

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Signaltransduktion

Prof. Dr. rer. nat. Aymelt Itzen

Untersuchungen zur Wirkung von AKT- und mTOR-Inhibitoren auf das Wachstum von EpCAM⁺- und CD90⁺-Tumorstammzellen beim hepatozellulären Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Leonie Riebandt
aus Kiel

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.02.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Linda Diehl

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Für dich, Papa.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 8 |
| 1.1 | Das hepatozelluläre Karzinom | 8 |
| 1.1.1 | Epidemiologie | 8 |
| 1.1.2 | Ätiologie | 9 |
| 1.1.3 | Pathogenese..... | 13 |
| 1.1.4 | Staging | 14 |
| 1.1.5 | Therapie | 15 |
| 1.1.5.1 | Kurative Therapiemaßnahmen..... | 16 |
| 1.1.5.2 | Palliative Therapiemaßnahmen..... | 17 |
| 1.2 | Modellvorstellungen zur Tumorentwicklung | 19 |
| 1.2.1 | Das Modell der klonalen Evolution von Tumoren..... | 20 |
| 1.2.2 | Das Tumorstammzell (TSZ)-Modell..... | 21 |
| 1.2.3 | Das plastische TSZ-Modell..... | 23 |
| 1.3 | Identifizierung, Isolierung und Anreicherung von TSZ des HCCs | 23 |
| 1.3.1 | Die TSZ-Oberflächenmarker EpCAM und CD90 | 24 |
| 1.4 | Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg | 26 |
| 1.5 | Der mTOR-Inhibitor RAD001 | 36 |
| 1.6 | Der AKT-Inhibitor MK-2206..... | 38 |
| 1.7 | Ziele der Arbeit..... | 40 |
| 2 | Materialien und Methoden..... | 41 |
| 2.1 | Materialien | 41 |
| 2.1.1 | Geräte..... | 41 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien..... | 42 |
| 2.1.3 | Antikörper | 43 |
| 2.1.4 | MicroBeads..... | 44 |
| 2.1.5 | Inhibitoren..... | 44 |
| 2.1.6 | Kits und Reagenzien..... | 44 |
| 2.1.7 | Zellkulturreagenzien (Medien und Zusätze)..... | 45 |
| 2.1.8 | Puffer, Lösungen und Medien..... | 45 |
| 2.1.9 | Zelllinien | 48 |
| 2.1.10 | Mausstämme..... | 48 |
| 2.1.11 | Patientenmaterial | 48 |
| 2.1.12 | Software | 49 |
| 2.2 | Methoden | 49 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.2.1 | Zellbiologische Methoden | 49 |
| 2.2.1.1 | Kultivierung der adhärenenten Zelllinien | 49 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung der primären Tumorzellen | 50 |
| 2.2.1.3 | Beurteilung der Morphologie der Zellen | 50 |
| 2.2.1.4 | Zellzahlbestimmung | 50 |
| 2.2.1.5 | Einfrieren von Zellen | 51 |
| 2.2.1.6 | Auftauen von Zellen | 51 |
| 2.2.1.7 | Einfrieren von Gewebeproben..... | 51 |
| 2.2.1.8 | Erylyse | 52 |
| 2.2.1.9 | Fixierung von Zellen..... | 52 |
| 2.2.1.10 | Behandlung von Zellen mit RAD001 und MK-2206..... | 52 |
| 2.2.1.11 | Anreicherung der EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ mittels magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS)..... | 53 |
| 2.2.1.12 | Vorbereitung der Zellen für die orthotope Injektion in die Maus .. | 54 |
| 2.2.1.13 | Durchflusszytometrische Analyse (FACS)..... | 55 |
| 2.2.2 | Biochemische Methoden | 60 |
| 2.2.2.1 | Herstellung einer Einzelzellsuspension aus primärem HCC- Gewebe durch kombiniert mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluss | 60 |
| 2.2.2.2 | Herstellung von Proteinlysaten..... | 61 |
| 2.2.2.2.1 | Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien | 61 |
| 2.2.2.2.2 | Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe | 61 |
| 2.2.2.3 | Quantitative Proteinbestimmung | 62 |
| 2.2.2.4 | Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS- PAGE) | 63 |
| 2.2.2.5 | Western Blot..... | 64 |
| 2.2.3 | Das Prinzip des <i>in vivo</i> -Biolumineszenzimagings (BLI) | 65 |
| 2.2.4 | Statistik | 66 |
| 3 | Ergebnisse | 67 |
| 3.1 | Kombinatorische Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft- Maustumoren mit AKT- und mTOR-Inhibitoren..... | 67 |
| 3.1.1 | Vorversuch zur Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber RAD001 und MK-2206 <i>in vitro</i> | 67 |
| 3.1.2 | Analyse einer kombinatorischen Behandlung orthotoper Huh7-Luc- Xenograft-Maustumoren mit RAD001 und MK-2206..... | 69 |
| 3.1.2.1 | Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen..... | 70 |
| 3.1.2.2 | Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den Huh7-Luc-Maustumoren..... | 71 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2 | Vergleichende Analyse nicht-invasiver Messmethoden zum Monitoring von aus primären HCC-Zellen generierten orthotopen Xenograft-Maustumoren | 78 |
| 3.3 | Anreicherung primärer EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ für die Etablierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells | 81 |
| 3.3.1 | Vorversuche zur Anreicherung von EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ aus primärem HCC-Gewebe..... | 81 |
| 3.3.1.1 | Expression von EpCAM und CD90 bei Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen | 82 |
| 3.3.1.2 | Mischversuch zur Untersuchung der Effizienz der Anreicherung von EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ mittels MACS..... | 84 |
| 3.3.1.3 | Beeinflussung der Expression von EpCAM und CD90 durch die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit dem Tumor Dissociation Kit und dem gentleMACS Dissociator | 86 |
| 3.3.2 | Anreicherung von EpCAM ⁺ -TSZ aus orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren | 88 |
| 3.3.3 | Anreicherung von CD90 ⁺ - und EpCAM ⁺ -TSZ aus einer HCC-Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus | 91 |
| 3.3.4 | Tumorigenität der nicht-angereicherten und angereicherten HCC-Zellen | 95 |
| 3.3.5 | Kultivierung der nicht-angereicherten HCC-Zellen in kollagenbeschichteten und unbeschichteten Kulturflaschen | 95 |
| 4 | Diskussion..... | 97 |
| 4.1 | Kombinatorische Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit AKT- und mTOR-Inhibitoren..... | 98 |
| 4.1.1 | Vorversuch zur Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber RAD001 und MK-2206 <i>in vitro</i> | 99 |
| 4.1.2 | Analyse einer kombinatorischen Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit RAD001 und MK-2206..... | 100 |
| 4.1.2.1 | Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen..... | 101 |
| 4.1.2.2 | Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den Huh7-Luc-Maustumoren..... | 101 |
| 4.2 | Vergleichende Analyse nicht-invasiver Messmethoden zum Monitoring von aus primären HCC-Zellen generierten orthotopen Xenograft-Maustumoren | 108 |
| 4.3 | Anreicherung primärer EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -HCC-Zellen für die Etablierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells | 109 |
| 4.3.1 | Vorversuche zur Anreicherung von EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ aus primärem HCC-Gewebe..... | 109 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.3.1.1 | Expression von EpCAM und CD90 bei Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen und Mischversuch zur Untersuchung der Effizienz der Anreicherung von EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -TSZ mittels MACS | 109 |
| 4.3.1.2 | Beeinflussung der Expression von EpCAM und CD90 durch die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit dem Tumor Dissociation Kit und dem gentleMACS Dissociator | 112 |
| 4.3.2 | Anreicherung von EpCAM ⁺ -TSZ aus orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren und von CD90 ⁺ - und EpCAM ⁺ -TSZ aus einer HCC-Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus | 113 |
| 4.3.3 | Tumorigenität der nicht-angereicherten und angereicherten HCC-Zellen | 116 |
| 5 | Zusammenfassung | 118 |
| 6 | Summary | 119 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 120 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 142 |
| 9 | Tabellenverzeichnis | 144 |
| 10 | Abkürzungsverzeichnis | 145 |
| 11 | Danksagung | 150 |
| 12 | Lebenslauf | 151 |
| 13 | Eidesstattliche Versicherung | 152 |

1 Einleitung

1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Die für das Jahr 2020 veröffentlichten Daten des *Global Organization Board of Cancer Association Networks* (GLOBOCAN) zeigen, dass es sich bei den weltweit geschätzten 19,3 Millionen Krebsneuerkrankungen in circa 906.000 Fällen um primäre Leberkarzinome handelt. Somit stellt das Leberkarzinom die sechshäufigste Tumorentität dar (Sung *et al.*, 2021). Dabei ist das von den Parenchymzellen der Leber ausgehende hepatozelluläre Karzinom (HCC) mit etwa 80% der häufigste histologische Subtyp. Den zweithäufigsten Subtyp stellt mit circa 15% das intrahepatische Cholangiokarzinom (ICC) mit Ursprung im Gallengangepithel dar (Ferlay *et al.*, 2015). Männer sind mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Sung *et al.*, 2021). Möglicherweise liegt ein Grund hierfür in ihrem insgesamt risikobehafteteren Lebensstil (McGlynn, Petrick and London, 2015). Die GLOBOCAN-Schätzungen für das Jahr 2020 zeigen auch, dass die Inzidenz in Abhängigkeit von der Region stark schwankt. Dabei werden Regionen mit sehr hoher (>20/100.000), moderater (11-20/100.000), mittlerer (5-10/100.000) und niedriger (<5/100.000) Inzidenz unterschieden (Gomaa *et al.*, 2008; Venook *et al.*, 2010). Im weltweiten Vergleich ist die höchste altersstandardisierte Inzidenzrate (ASIR), bezogen auf 100.000 Einwohner, mit über 10 in Ostasien (17,8) und Nordafrika (15,2), gefolgt von Mikronesien (14,6) und Ländern Südostasiens (13,7) zu verzeichnen. Niedrige Inzidenzen von unter 5 weisen Nordeuropa, Westasien, Südafrika und Länder Südamerikas sowie Zentral- und Osteuropas mit jeweils 4,3 auf. Südzentrasien ist die Region mit der weltweit geringsten ASIR von drei Fällen pro 100.000 Einwohner (siehe Abbildung 1) (International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2020). Die Inzidenz nimmt in vielen Teilen der Welt weiterhin stetig zu. Dabei ist auch eine Zunahme in Ländern mit bisher geringer Inzidenz wie den USA und Europa festzustellen. Der Anstieg wird im Wesentlichen auf die Hepatitis C-Virus (HCV)-Epidemie in den 1970er und 1980er Jahren zurückgeführt und die Inzidenz wird mit aller Wahrscheinlichkeit bis zum Jahr 2040 weiter ansteigen (zeitverzögerte Prävalenz) (Sawatzki and Semela, 2012; Sung *et al.*, 2021). Ebenfalls eine Rolle spielt das vermehrte Vorkommen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) als Folge von Diabetes Typ IIB und dem metabolischen Syndrom in den letzten Jahren (Mittal *et al.*, 2016). Hingegen ist die Inzidenzrate in Ländern mit historisch eher hohen Raten wie Japan und China tendenziell rückläufig. Für China werden hierfür u.a. *public health*-Programme zur Verringerung der Aflatoxin-Exposition und Hepatitis B-Virus (HBV)-Infektion verantwortlich gemacht (Gao *et al.*, 2012). Mit 830.000 Todesfällen im Jahr 2020 handelt es sich beim Leberkrebs um den

dritthäufigsten zum Tode führenden Tumor. Dabei entspricht die geographische Verteilung weitestgehend der Verteilung der Inzidenz. Vor allem in Nordamerika liegt eine im Verhältnis zur Inzidenz vergleichsweise niedrige Mortalität vor (Sung *et al.*, 2021). Die 5-Jahres-Überlebensrate von HCC-Patienten liegt zwischen 5%-14%, wobei sie in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und Therapie variiert. Die Mehrzahl der Patienten stirbt binnen eines Jahres nach Diagnosestellung (Greten *et al.*, 2005; Sarveazad *et al.*, 2019).

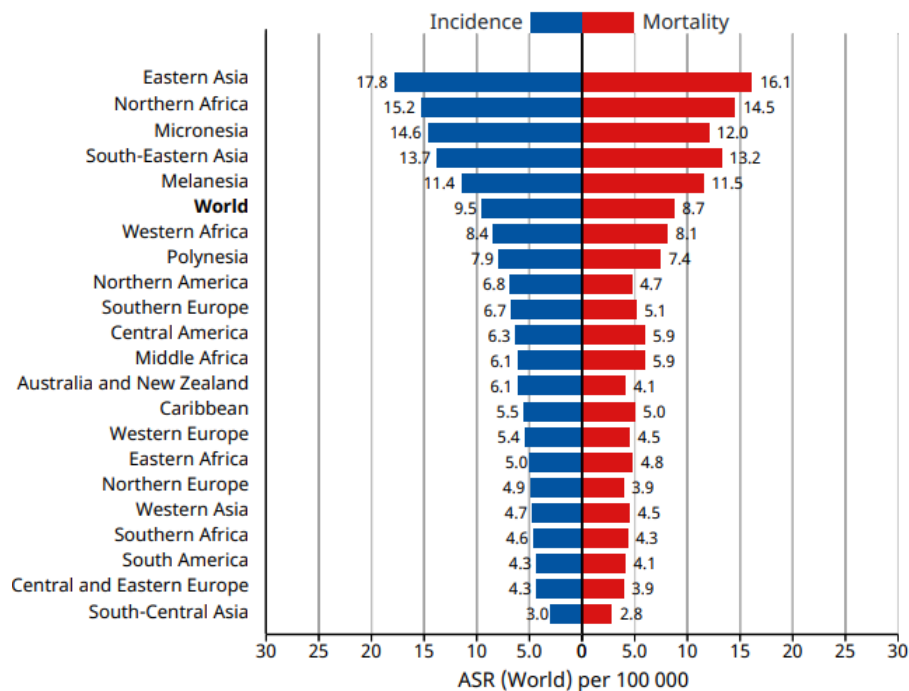


Abbildung 1: Geschätzte weltweite altersstandardisierte Inzidenzraten (ASIR) und Mortalitätsraten des primären Leberzellkrebses. Dargestellt ist die ASIR beider Geschlechter nach geographischer Region im Jahr 2020, Alter 0-74 Jahre (International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2020).

1.1.2 Ätiologie

Eine übersichtliche Darstellung der einzelnen Risikofaktoren findet sich in Tabelle 1. Die weltweit starken regionalen Unterschiede in der Inzidenz des HCCs kommen durch die unterschiedliche Exposition der Bevölkerungen gegenüber diesen verschiedenen Risikofaktoren zu Stande. Tendenziell stellen in Ländern mit hoher Inzidenz Hepatitis B und Aflatoxin B1 (AFB1)-Exposition die Hauptrisikofaktoren für das HCC dar. Dagegen stellen chronische Hepatitis C, exzessiver Alkoholkonsum und mit zunehmender Prävalenz auch Adipositas und daraus resultierender Diabetes Typ II sowie das metabolische Syndrom, die beide zu einer NAFLD führen können, v.a. in Ländern mit geringer Inzidenz, Risikofaktoren für das HCC dar (McGlynn, Petrick and London, 2015). Die häufigsten Risikofaktoren weltweit sind Hepatitis B und Hepatitis C. Insgesamt ist weltweit bei 54% aller HCC-Patienten, d.h. bei 400 Millionen Menschen, eine chronische HBV-Infektion

ursächlich. HCV stellt weltweit bei 31% der am HCC Erkrankten und somit bei 170 Millionen Menschen, die Ursache dar (European Association for the Study of the Liver/European Organisation for Research and Treatment of Cancer, 2012). Während es gegen das HCV keinen Impfstoff gibt, ist seit Anfang der 80er Jahre ein gut verträgliches und hoch wirksames Impfmittel gegen HBV verfügbar und auch ein drastischer Rückgang der Inzidenz zu verzeichnen. Dennoch ist die Zahl der Neu-Infizierten mit weltweit 1,75 Millionen im Jahr 2015 sehr hoch (World Health Organization, 2017).

Tabelle 1: Globale Verteilung der Risikofaktoren für die Entstehung eines HCCs.

| | Hepatitis C | Hepatitis B* | Alkohol | andere |
|--------------------|-------------|--------------|---------|--------------------|
| Europa | 60-70% | 10-15% | 20% | 10% |
| Nordamerika | 50-60% | 20% | 20% | 10% (NASH) |
| Asien und Afrika** | 20% | 70% | 10% | 10% (Aflatoxin)*** |
| Japan | 70% | 10-20% | 10% | 10% |
| Weltweit | 31% | 54% | 15% | |

* HBsAg-Träger (ohne okkulte Hepatitis B), ** ohne Japan, *** Aflatoxin ist der wichtigste Kofaktor für das onkogenetische Risiko bei Patienten mit HBV-Infektion (modifiziert nach Llovet, Burroughs and Bruix, 2003; European Association for the Study of the Liver/European Organisation for Research and Treatment of Cancer, 2012).

Von den Virushepatitiden können nur das HBV und HCV eine chronische Lebererkrankung hervorrufen. Das Hepatitis D-Virus (HDV) ist inkomplett und nur in Anwesenheit des HBV pathogen (Anand, 1999). Die Chronifizierungsrate ist beim HCV mit bis zu 80% (Gomaa *et al.*, 2008) wesentlich höher als beim HBV mit bis zu 10% (Dudareva *et al.*, 2020).

Beim HBV handelt es sich um ein zur Familie der Hepadnaviridae gehörendes, umhülltes Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Virus mit zirkulärer, teils doppelsträngiger DNA. Die DNA-Synthese erfolgt über ein Ribonukleinsäure (RNA)-Intermediat mittels Reverser Transkriptase. Die Virushülle ist aus dem lipidhaltigen Hepatitis B-Oberflächenantigen (*HB surface antigen*, HBsAg), das im Zuge der Immunreaktion von Antikörpern als Antigen erkannt wird und für den serologischen Nachweis einer akuten oder chronischen Infektion relevant ist, aufgebaut. Die Hülle umgibt das aus dem *core*-Antigen (*HB core antigen*, HBcAg) aufgebaute Viruskapsid. Weiter findet sich das extrazelluläre Antigen (*HB extracellular antigen*, HBeAg) im Serum. Dabei handelt es sich um die lösliche Form des HBcAgs (Lamontagne, Bagga and Bouchard, 2016). Das HBV kann sowohl direkt als auch indirekt zur Tumorgenese beitragen. Direkt, indem die Virus-DNA in das Genom infizierter Hepatozyten integriert wird. Dies erfolgt nicht bevorzugt, jedoch auffällig häufig in Gene, die in zelluläre Signalkaskaden oder in die Wachstumskontrolle involviert sind. Die Integration der Virus-DNA führt zudem zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität (But, Lai and Yuen, 2008). Von besonderer Relevanz für die Entwicklung eines HCCs ist auch das Hepatitis Bx (HBx)-Genprodukt, denn es fungiert als transkriptioneller Aktivator verschiedener, mit der Kontrolle des Zellwachstums assoziierter Gene. HBx interagiert zudem mit p53 und beeinflusst so dessen

Funktion als Tumorsuppressor. Ein weiteres virales Genprodukt, das im Zusammenhang mit der HCC-Genese assoziiert wird, ist das verkürzte HBsAg-Genprodukt, wobei der Pathomechanismus nicht geklärt ist. Die virale Zytotoxizität und die vom Virus ausgelöste Immunantwort führen zu chronisch-entzündlichen und regenerativen Prozessen. Diese fördern indirekt die Tumorgenese (Bisceglie, 2009).

Das HCV gehört zur Familie der *Flaviviridae* und ist ein lineares, einsträngiges, umhülltes RNA-Virus mit positiver Polarität. Es existieren sieben Genotypen mit einer Vielzahl weiterer Subtypen. Weltweit ist Genotyp 1 mit circa 50% auch in Europa und Nordamerika am häufigsten (Dudareva *et al.*, 2020). Das Nukleokapsid wird gemeinsam vom *core*-Protein und dem Virusgenom gebildet und wird von einer Lipidmembran (*envelope*), in die zwei Hüllproteine (E1 und E2) verankert sind, umschlossen (Dubuisson and Cosset, 2014). Der Pathomechanismus ist noch nicht vollständig geklärt. Da es sich im Unterschied zum HBV um ein RNA-Virus handelt und somit eine Integration in das humane Genom ausbleibt, wurde lange vermutet, dass das HCV ausschließlich über den indirekten, immunologischen Weg an der Hepatokarzinogenese beteiligt sei. Doch wurden auch Fälle ohne vorhergehende Leberzirrhose registriert (But, Lai and Yuen, 2008) und heute weiß man, dass die Induktion des HCCs, vermittelt durch das HCV-*core*-Protein und Nicht-Strukturproteine (NS) wie NS3 und NS5A auch über den direkten Weg erfolgt (Vescovo *et al.*, 2016). So z.B. ebenfalls über die Interaktion mit p53 (Kao *et al.*, 2004).

Die NAFLD wird als die hepatische Komponente des metabolischen Syndroms verstanden und umfasst alle Stadien einer Fettleber. Von der einfachen nicht-alkoholischen Fettleber (Steatose) über die nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH), die sich histologisch nicht von einer alkoholischen Steatohepatitis (*alcoholic steatohepatitis*, ASH) unterscheidet, über die Steatofibrose bis zur Leberzirrhose, aus der sich ein HCC entwickeln kann (Hashimoto, Tanai and Tokushige, 2013). Der Pathomechanismus der NAFLD sowie ihre Progression zur NASH sind noch nicht vollständig verstanden. Ein anerkanntes Erklärungsmodell ist die „*two-hit*“-Hypothese. Der „*first hit*“ beschreibt die Fettakkumulation in den Hepatozyten mit der Steatose als Ergebnis. Auslöser ist eine Insulinresistenz. Beim Gesunden hemmt Insulin den durch die Lipoproteinlipase (LPL) katalysierten Triglyceridabbau im peripheren Fettgewebe, wodurch es zu einer verminderten Freisetzung freier Fettsäuren (*free fatty acids*, FFAs) kommt. Bei Insulinresistenz kommt es trotz erhöhtem Insulinspiegel zur Lipolyse im Fettgewebe und es gelangen vermehrt FFAs über die Blutbahn zur Leber, wo ihre Veresterung zu Triglyceriden erfolgt. 25% der in der Leber synthetisierten Triglyceride entstehen bei Insulinresistenz zusätzlich durch *de-novo*-Synthese und weitere 15% der FFAs entstammen Nahrungsfetten (Paschos and Paletas, 2009). Durch die Hyperinsulinämie wird die Synthese von Apolipoprotein B100 gestört. Folglich ist auch der Abtransport der Lipide aus der Leber mittels *very low density* Lipoproteinen (VLDL) beeinträchtigt (Charlton *et al.*, 2002). Letztlich führt die Hyperinsulinämie in den Hepatozyten zu einer gesteigerten Triglyceridsynthese bei gleichzeitiger Hemmung der Triglyceridsekretion mit der

Folge einer Steatose. Dieser „*first hit*“ macht die Hepatozyten für den „*second hit*“ vulnerabel, der durch oxidativen Stress, u.a. entstanden durch mitochondriale β -Oxidation, ausgelöst wird. Der Stress führt zu Prozessen wie Nekrose, Apoptose, erhöhter Expression proinflammatorischer Zytokine und zur Aktivierung hepatischer Sternzellen und letztlich zur Fibrose (Paschos and Paletas, 2009).

Chronischer Alkoholkonsum schädigt die Leber entweder direkt durch unmittelbare Einwirkung auf die Leberzellen oder indirekt über eine Leberzirrhose (Testino, Leone and Borro, 2014). Bei moderatem Konsum erfolgt der Abbau von Alkohol v.a. durch die zytosolische Alkoholdehydrogenase (ADH), in geringem Ausmaß durch die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase und bei chronischem Konsum zusätzlich durch das Cytochrom-Isoenzym CYP2E1 des mikrosomalen Ethanoloxidierenden Systems (MEOS). Dabei entsteht zunächst stets Acetaldehyd, das in den Mitochondrien durch die Aldehyddehydrogenase (ALDH) weiter zum nicht toxischen Acetat oxidiert wird. Dabei wird Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) zu NADH reduziert (Rocco *et al.*, 2014). Das Acetat wird weiter durch eine Thiokinase zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) aktiviert, wodurch der abgebaute Alkohol Anschluss an den Intermediärstoffwechsel gewinnt. Häufiger Alkoholkonsum führt aufgrund der Anreicherung von NADH zu einer Verschiebung des Redoxgleichgewichts. Dadurch kommt es zu einer reduzierten β -Oxidation von Fettsäuren und zu einer gesteigerten Fettsäuresynthese aus Acetyl-CoA und somit zur ASH (Salaspuro and Lieber, 1981; Ceni *et al.*, 2014). Während NADH v.a. für die Fettleber verantwortlich ist, wirkt Acetaldehyd zelltoxisch. So bindet Acetaldehyd an verschiedene Proteine, darunter auch an Enzyme der DNA-Reparatur, wie die O^6 -Methylguanin-Methyltransferase. Daneben stört Acetaldehyd durch Bildung verschiedener DNA-Addukte die DNA-Integrität. Nicht zuletzt schädigt es die Mitochondrien und führt zu Veränderungen des antioxidativen Glutathions. Der Ethanolabbau über das CYP2E1 führt zu oxidativem Stress, da neben Acetaldehyd auch reaktive O_2 -Spezies (ROS) entstehen. Sie führen zur Lipidperoxidation, wodurch z.B. 4-Hydroxynonenal (4-HNE) entsteht. 4-HNE kann mit Basen der DNA reagieren und so exozyklische DNA-Addukte generieren, die zu einer Mutation auf dem Codon 249 im p53-Gen führen können (Sidharthan and Kottlilil, 2013). CYP2E1 baut überdies Retinol und Retinsäure ab. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression des heterodimeren Aktivator Protein-1 (AP-1)-Transkriptionsfaktorkomplexes, was letztlich zu einem Anstieg von Cyclin D1 und somit einer Hyperproliferation in der Leber führt (Testino, Leone and Borro, 2014). Alkohol erhöht die Permeabilität der Darmmukosa, sodass Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien vermehrt in die Leber gelangen und dort Kupferzellen aktivieren. Infolge kommt es auch über diesen Weg zur Produktion von ROS und darüber hinaus zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Rocco *et al.*, 2014).

Aflatoxin ist ein von den beiden Schimmelpilzarten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildetes Mykotoxin. Von den natürlich vorkommenden Aflatoxinen ist AFB1 das potenteste und wird von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko an einem HCC zu erkranken, als ein humanes Kanzerogen in die Gruppe 1 eingestuft

(International Agency for Research on Cancer, 2012). Bei Patienten mit erhöhtem AFB1-Level ist das Risiko, ein HCC zu entwickeln, viermal höher und bei gleichzeitigem Vorliegen einer chronischen HBV-Infektion sogar 60fach erhöht (McGlynn, Petrick and London, 2015). Der Pilz befällt verschiedene landwirtschaftliche Produkte, darunter hauptsächlich Mais, Erdnüsse, Reis und Hirse, v.a. bei Lagerung unter feuchtwarmen Bedingungen in tropischen und subtropischen Regionen. Die Metabolisierung von Aflatoxin erfolgt größtenteils in der Leber durch Cytochrom-P450-Enzyme. Sie aktivieren AFB1 u.a. zum hochreaktiven AFB1-8,9-exo-epoxid, das im Zellkern DNA-Addukte bildet (Kew, 2013). Vorwiegend kommt es dabei durch Reaktion mit der N7-Position des Guanins zum 8,9 dihydro-8-(N7-guanosinyl)-9-hydroxyaflatoxin B1 (AFB1-N7-Gua) zu einer Transversion des Guanins zu Thymin (von AGG zu AGT) im Codon 249 des Tumorsuppressorgens p53, wodurch im Rahmen der Translation Serin an Stelle von Arginin in das Protein eingebaut (International Agency for Research on Cancer, 2012) und die Funktion von p53 aufgehoben wird (Kew, 2013). Bedingt durch die verschiedenen ätiologischen Faktoren handelt es sich beim HCC um einen genetisch und phänotypisch sehr heterogenen Tumor (Nault and Villanueva, 2015).

1.1.3 Pathogenese

Ungefähr 80-90% aller HCCs entwickeln sich auf Basis einer Leberzirrhose, die somit als eine Präkanzerose zu verstehen ist. Nur einzelne Risikofaktoren wie das HBV können auch direkt zur Entwicklung eines HCCs führen (Dhanasekaran, Bandoh and Roberts, 2016). Die Pathogenese des HCCs läuft unabhängig von seiner Ätiologie gleich ab, wobei es sich um einen über viele Jahre andauernden, mehrstufigen Prozess handelt, der lange vollkommen beschwerdefrei verlaufen kann (Zhou, Zhang and Qiao, 2014).

Die Einwirkung der ätiologischen Faktoren führt zu einem Zustand chronischer Inflammation mit einer immer wiederkehrenden Abfolge von Zellschaden, Zelltod und Regeneration. Die vermehrte Aktivierung hepatischer Sternzellen führt über die Entwicklung einer Fibrose zur Leberzirrhose. Diese ist charakterisiert durch Leberzelluntergang, den destruktiven Umbau des Leberparenchyms mit Verlust der Läppchenarchitektur durch narbige Bindegewebsvermehrung und der Bildung funktionsloser Pseudolobuli, den sog. Regeneratknoten. Sie werden als Versuch verstanden, das Funktionsgewebe wieder zu ersetzen (Zhou, Zhang and Qiao, 2014). Im weiteren Verlauf kommt es zum unkontrollierten Anstieg der Hepatozytenproliferation mit zunehmender genomischer Instabilität und Akkumulation weiterer kritischer Mutationen. Die zirrhotische Leber zeigt dann fokale Areale abnormaler, unreifer Hepatozyten. Diese dysplastischen Foci (< 1 mm) entwickeln sich weiter zu dysplastischen Knoten (*dysplastic nodules*, DNs) (≥ 1 mm). Bei den DNs handelt es sich um Präkanzerosen. Sie treten einzeln oder multipel auf und sind makroskopisch größer als die umliegenden zirrhotischen

Knoten. Die DN's werden anhand bestimmter zytologischer Atypien in *low-grade* DN's (LGDN's) und *high-grade* DN's (HGDN's) unterteilt. Beide Formen können sich potenziell zu einem HCC entwickeln, wobei das Risiko bei den HGDN's deutlich höher ist. Vor allem die Unterscheidung der HGDN's vom frühen HCC ist schwierig. Im Jahr 2009 einigte sich das *International Corporate Governance Network* (ICGN), auf die stromale Invasion als entscheidendes Kriterium. Das HCC wird weiter klassifiziert in das frühe und fortgeschrittene HCC. Das frühe HCC besteht aus kleinen (< 2 mm), gut differenzierten (Grad 1), unscharf begrenzten Tumorknoten und hat im Vergleich zum fortgeschrittenen HCC (Grad 2/3) eine bessere Prognose (Dhanasekaran, Bando and Roberts, 2016).

1.1.4 Staging

Die Prognose eines Tumors hängt im Wesentlichen von seiner Progression ab. Eine Besonderheit bei Lebertumoren ist, dass es mit fortschreitender Erkrankung zirrrosebedingt auch zu einer eingeschränkten Leberfunktion kommt. Zur prognostischen Beurteilung eines HCCs sollte das *staging*-System neben dem Tumorstadium daher auch Leberfunktion und körperliche Leistungsfähigkeit des Patienten einbeziehen. Die klassische *tumor, node, metastasis* (TNM)-Klassifikation, die für verschiedenste Tumorentitäten angewendet wird, berücksichtigt die Ausdehnung des Primärtumors und die Anzahl vorhandener regionärer Lymphknoten- oder Fernmetastasen und gruppiert diese nach den Stadien der *Union International Contre le Cancer* (UICC), bezieht jedoch weder Leberfunktion noch Leistungsfähigkeit des Patienten mit ein. Dieses *staging*-System ist eher ein morphologisches und v.a. für chirurgische Eingriffe von Bedeutung. Es eignet sich jedoch nicht für ein prognostisches *staging* des HCCs (Greten *et al.*, 2013).

Speziell für die Beurteilung der Leberfunktionen wurden verschiedene prognostische *scoring*-Systeme eingeführt, die die einzelnen Teilfunktionen der Leber getrennt bewerten. Der resultierende Gesamt-score wird dann für prognostische Aussagen herangezogen (Müller, 2019).

Eines dieser Systeme ist die Child-Pugh-Klassifikation, die 1964 erstmals von Child und Turcotte zur Einschätzung des Risikos portokavaler *shunt*-Operationen eingeführt und 1973 von Pugh modifiziert wurde. Es wird die Einschränkung der Leberfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose beurteilt und zugleich eine prognostische Aussage gemacht. Fünf Parameter, drei Laborwerte (Bilirubin, Albumin und Prothrombinzeit) und zwei klinische Befunde (Aszites und hepatische Enzephalopathie) werden nach ihrem Schweregrad beurteilt. Die Höhe der erreichten Punktzahl korreliert mit der Prognose (Child and Turcotte, 1964; Pugh *et al.*, 1973).

Der *Model for endstage liver disease* (MELD)-score wurde im Jahr 2000 eingeführt, um die Prognose nach transjugulärem intrahepatischem portosystemischen *shunt* (TIPS) bei Patienten mit Leberzirrhose abschätzen zu können und wird heute

hauptsächlich in der Transplantationsmedizin zur Priorisierung bei der Organzuteilung angewendet. Es handelt sich um einen logarithmischen *score*, der die Gerinnung (*international normalized ratio*, INR), Serumkreatinin, Gesamt-Bilirubin und die Ätiologie der Zirrhose einbezieht (Subramaniam, Kelley and Venook, 2013; Müller, 2019).

Nachteil beider Systeme ist, dass nur die Schwere der Erkrankung, nicht jedoch der *performance*-Status (Allgemeinzustand) des Patienten einbezogen wird.

Ein heute weltweit gebräuchliches System ist die Klassifikation der *Barcelona Clinic Liver Cancer* (BCLC) Group (siehe Abbildung 2). Neben den Tumorcharakteristika (Größe, Anzahl, Gefäßeinbrüche und Metastasen) werden auch der Grad der Zirrhose (CHILD-Stadium) und der *performance*-Status einbezogen und somit die oben genannten Parameter integriert. Der Vorteil des Systems ist zudem, dass es das *staging* direkt mit Stadium-spezifischen Behandlungsstrategien verbindet (Raza and Sood, 2014; Han and Kim, 2015).

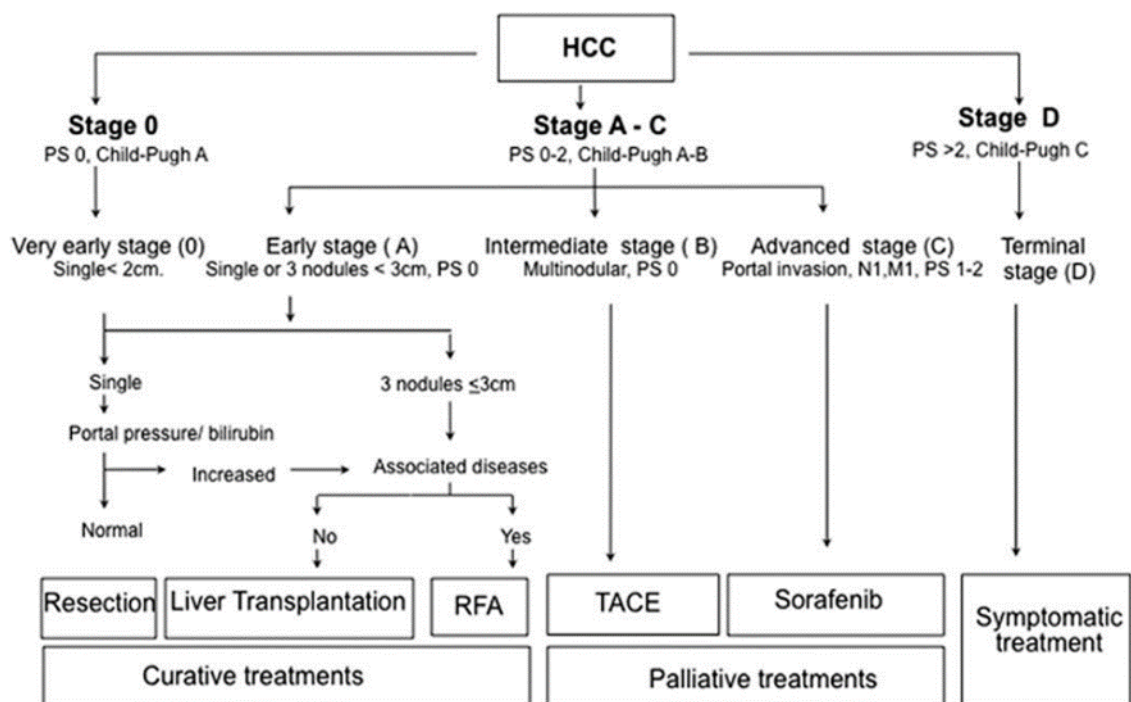


Abbildung 2: Das BCLC *staging*-System für das HCC. M=metastasis classification; N=node classification; PS=performance status; RFA=radiofrequency ablation; TACE=transarterial chemoembolization (Bruix and Sherman, 2011).

1.1.5 Therapie

Bei den Therapien lassen sich kurative und nicht-kurative, palliative Therapieansätze unterscheiden. Zu den Therapien mit kurativem Potential zählen Resektion, orthotope Lebertransplantation und lokal-ablative Therapieansätze. Alle übrigen werden vornehmlich mit palliativer Intention durchgeführt und wirken potentiell lebensverlängernd. Zu ihnen zählen die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die systemischen Therapien (Poulou *et al.*, 2015).

1.1.5.1 Kurative Therapiemaßnahmen

Aufgrund fehlender oder unspezifischer Symptome werden lediglich 46% der HCCs im Frühstadium der Erkrankung diagnostiziert und sind somit potentiell für kurative Therapien geeignet (Singal and El-Serag, 2015). Allerdings sind weniger als 20% der Tumoren überhaupt für eine Resektion oder Transplantation zugänglich (Poulou *et al.*, 2015).

Die Leberresektion ist die Therapie der ersten Wahl für die wenigen Patienten mit nur einzelnen HCC-Knoten, bei denen eine Resektion im Gesunden möglich ist, die einen adäquaten klinischen Allgemeinzustand aufweisen, ohne Zirrhose oder mit kompensierter Child A-Zirrhose. Um das Risiko einer postoperativen Leberdekompensation zu verringern, stellt eine erhöhte portale Hypertension eine relative Kontraindikation für die Resektion bei zirrhotischen Patienten dar (Bruix *et al.*, 1996). Bei Einhaltung dieser Kriterien kann mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70% gerechnet werden. Problematisch ist allerdings das Rezidivrisiko mit beinahe 70% 5 Jahre nach Resektion (Raza and Sood, 2014; Intaraprasong, Siramolpiwat and Vilaichone, 2016).

Durch die Lebertransplantation werden sowohl der Tumor als auch die ihm zugrundeliegende Zirrhose therapiert und somit das Rezidivrisiko verringert (Feng, 2014). Geeignet für die Transplantation sind Patienten im BCLC-Stadium A, die aufgrund einer Child A/B-Zirrhose oder portaler Hypertension nicht für eine Resektion geeignet sind. In Frage kommen jedoch auch Patienten mit fortgeschrittener Grundkrankheit (Child C), solange der Tumor innerhalb der sog. Milan-Kriterien liegt. Die Milan-Kriterien werden zur Abschätzung der Erfolgsaussicht und Leistung der Patienten herangezogen. Die Kriterien erfüllen Patienten mit einem solitären Tumor von weniger als 5 cm Durchmesser oder mit bis zu drei Läsionen mit einem Durchmesser von jeweils maximal 3 cm. Weiterhin dürfen weder vaskuläre Invasion noch extrahepatische Manifestationen vorliegen (Mazzaferro *et al.*, 1996). Wird innerhalb dieser Kriterien transplantiert, können 5-Jahres-Überlebensraten von über 70% und eine Rezidivrate von unter 15% erzielt werden (Malek *et al.*, 2014; Intaraprasong, Siramolpiwat and Vilaichone, 2016). Aufgrund von Organmangel kommt es oft zu langen Wartezeiten, die ein hohes Risiko darstellen, aufgrund des Tumorprogresses aus den engen Kriterien herauszufallen. Die Wartezeit in Europa liegt bei circa 6 bis 12 Monaten und die jährliche *dropout*-Rate in Europa und den USA liegt bei 30%-40% (Feng and Ma, 2014). Geschätzte 10% versterben während dieser Zeit (Belghiti *et al.*, 2003). Um dies zu verhindern und die Tumorprogression zu verlangsamen, können Patienten im Rahmen des sog. *bridgings* bereits während ihrer Wartezeit therapiert werden. Üblicherweise finden neben der Resektion v.a. lokal-ablative Methoden Anwendung (Belghiti *et al.*, 2003; Pompili *et al.*, 2013).

Lokal-ablative Methoden stellen auch für Patienten, für die chirurgische Maßnahmen ungeeignet sind, die besten Therapiealternativen dar. Ziel ist es, mittels Chemikalien oder thermaler Energie eine Tumornekrose zu bewirken. Die thermale Ablation kann hyperthermisch z.B. durch Radiofrequenzablation (RFA)

oder Mikrowellenablation (MWA) oder hypothermisch durch Kryoablation erfolgen (Poulou *et al.*, 2015). Bei der RFA handelt sich um eine relativ neue Technik, die sich in den letzten Jahren zu der am häufigsten angewendeten Ablationsmethode entwickelt hat (Feng and Ma, 2014). Gründe hierfür sind u.a. die gute lokale Tumorkontrolle und eine akzeptable Morbidität (Rhim, Lim and Choi, 2010). Der Zugang, über den die RFA erfolgt kann perkutan, laparoskopisch oder offen gestaltet werden, wobei ersterer als der am wenigsten invasive Zugang favorisiert wird (Greten *et al.*, 2013). Über eine Nadelelektrode wird ein hochfrequenter Wechselstrom in den Tumor eingebracht. Die Hitzeentwicklung führt zu Koagulationsnekrosen (Feng and Ma, 2014; Poulou *et al.*, 2015). Da bei der RFA ein nekrotisches Areal von 4 cm erzielt werden kann, ist es eine effektive Methode für HCCs von maximal 3 cm (Raza and Sood, 2014) und wird im BCLC-Stadium 0-A empfohlen. Da das behandelte Gewebe im Körper bleibt, besteht allerdings die Gefahr der Entwicklung von Residualtumoren (Feng and Ma, 2014).

1.1.5.2 Palliative Therapiemaßnahmen

Die TACE ist die klassische Therapie für Patienten mit multifokalem Tumorwachstum im intermediären Stadium (BCLC-Stadium B) und erfolgt mit palliativer Intention. Die TACE macht sich zunutze, dass die Blutversorgung des HCCs fast ausschließlich über kleine arterielle Gefäße der *Arteria hepatica* erfolgt, wohingegen gesundes Lebergewebe v.a. über die Pfortader versorgt wird (Cazejust *et al.*, 2014). Über einen Katheter wird ein Zytostatikum, meist Doxorubicin, in die *Arteria hepatica* injiziert und im Anschluss erfolgt die Gefäßokklusion durch Gabe eines Embolisats wie Lipiodol (Vogl *et al.*, 2007). Es kommt zu ischämischen und zytotoxischen Wirkungen, die zu einer Teilnekrose von bis zu 90% des HCCs führen und so das Tumorwachstum hemmen. Die Therapie kann im Abstand von 4-12 Wochen wiederholt werden (Greten *et al.*, 2013).

Verschiedene systemische Behandlungsmethoden wie die Hormontherapie oder auch die konventionelle Chemotherapie werden nicht für die Therapie des HCCs empfohlen. Letztere verfolgt das Ziel, die in die zelluläre Replikation involvierten Mechanismen sich schnell teilender Zellen zu inhibieren (Hassoun and Gores, 2003; Deng, Zeng and Shen, 2015). Das HCC ist allerdings eine Tumorentität, die sehr resistent gegenüber diesen konventionellen Chemotherapeutika ist. Zudem handelt es sich typischerweise um nicht-selektive, zytotoxische Moleküle mit erheblichen systemischen Nebenwirkungen (Avila *et al.*, 2006). Zirrhose kann den Metabolismus dieser Substanzen negativ beeinflussen und dadurch ihre Toxizität verstärken. Hinzu kommt, dass einige mit der Chemotherapie einhergehende Komplikationen wie systemische Infektionen, gerade bei immunkomprimierten Patienten wie Zirrhotikern, besonders schwerwiegend verlaufen (European Association for the Study of the Liver/European Organisation for Research and Treatment of Cancer, 2012).

Fortschritte in der molekularen Zellbiologie haben in den letzten Jahrzehnten zu einem detaillierteren Verständnis der dem HCC zugrunde liegenden molekularen Mechanismen geführt. Basierend auf diesem Wissen wurden neue Therapieansätze in Form der sog. zielgerichteten Therapie (*targeted therapy*) entwickelt. Meist werden niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) oder Antikörper eingesetzt. Im Unterschied zur konventionellen Chemotherapie werden gezielt für die Tumorprogression kritische Moleküle gehemmt (Huang *et al.*, 2014). Dieser Therapieansatz ist vielversprechend aufgrund der geringen systemischen Toxizität und v.a., da bereits erste therapeutische Erfolge erzielt wurden, z.B. im Rahmen der Therapie der das *breakpoint cluster region* (BCR)-Abelson (ABL)-Tyrosinkinase-Fusionsgen tragenden chronischen myeloischen Leukämie (CML) mit Imatinib (Gleevec), einem selektiven Inhibitor der BCR-ABL-Tyrosinkinase (O'Brien *et al.*, 2003). Sehr gut sprachen auch Patienten mit metastasierendem Melanom mit aktivierender *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog* (BRAF)-V600E-Mutation auf Vemurafenib, einem selektiven Inhibitor der Kinase BRAF, an (Flaherty *et al.*, 2010). Ein Durchbruch in der Therapie des HCCs wurde mit Sorafenib (Nexavar) erlangt (Llovet and Bruix, 2008). Der Wirkstoff wurde Ende 2007 in den USA von der US-amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (*Food and Drug Administration*, FDA) und in Europa durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (*European Medicines Agency*, EMA) offiziell als Erstlinientherapie des fortgeschrittenen HCCs (BCLC-Stadium C) zugelassen (European Association for the Study of the Liver/European Organisation for Research and Treatment of Cancer, 2012). Ausschlaggebend für diese Entscheidung waren die Ergebnisse der sog. SHARP-Studie (*Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol Trial*). Im Rahmen dieser Studie konnte erstmals eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von HCC-Patienten unter systemischer Therapie festgestellt werden. Es handelte sich um eine multinationale randomisierte und placebokontrollierte Studie mit 602 nicht vorbehandelten Probanden im fortgeschrittenen Stadium. Es war eine signifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit um 2,8 Monate zu verzeichnen (Llovet, Ricci and Mazzaferro, 2008). Ähnliche Resultate wurden im Rahmen der ORIENTAL-Studie im Asia-Pazifikraum mit einem vergleichbaren Studiendesign erzielt (Cheng *et al.*, 2009). Als Multi-Kinase-Inhibitor hemmt Sorafenib mehrere Kinasen zugleich. Hierzu zählen die Rezeptortyrosinkinasen (RTK) *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Rezeptor 2 und 3, *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor β und die Serin-Threoninkinasen *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF)-1 und BRAF (Germano and Daniele, 2014). Durch Inhibition des RAF/ *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/ *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalweges wird die Proliferation der Tumorzellen gehemmt und zugleich durch Hemmung von VEGF-Rezeptor 2 und 3 und PDGF-Rezeptor β indirekt auch die Angiogenese (Ge and Huang, 2015). Die Therapie mit Sorafenib umfasst ein breites Spektrum an Nebenwirkungen, war aber über viele Jahre die einzige systemische Therapie, die das Leben von HCC-Patienten verlängern konnte. Basierend auf den Daten der IMbrave150-Studie erfolgte im Jahr 2020 durch die FDA und EMA die Zulassung des monoklonalen anti-*programmed death-ligand 1* (PD-L1)-Antikörpers

Atezolizumab, einem Immun-*checkpoint*-Inhibitor, in Kombination mit dem antiangiogenetisch wirksamen Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab als neuer Standard in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen oder nicht-resezierbaren HCCs. Diese Therapie zeigte erstmals nach über einem Jahrzehnt ohne Fortschritt in der Forschung eine signifikante Verlängerung des Überlebens bei gleichzeitig deutlich besserer Verträglichkeit (Luo, Wu and He, 2021).

1.2 Modellvorstellungen zur Tumorentwicklung

Ein Tumor kann als ein aberrantes Organ verstanden werden, das wie gesundes Gewebe aus heterogenen Zellpopulationen mit verschiedenen phänotypischen Charakteristika und unterschiedlichem proliferativem Potential besteht (Reya *et al.*, 2001). Dieses Phänomen erschwert sowohl Tumordiagnose als auch Tumorthherapie. Der Ursprung der morphologischen und funktionellen Diversität der Zellen eines Tumorzellverbandes ist noch nicht geklärt. Es lassen sich im Wesentlichen zwei Modelle der Karzinogenese unterscheiden, anhand derer auch diese Heterogenität erklärbar wäre (Dick, 2008). Zum einen das klassische „Modell der klonalen Evolution“ und zum anderen das „Tumorstammzell (TSZ)-Modell“. Beide Konzepte schließen sich nicht gegenseitig aus und werden im weiterentwickelten „plastischen TSZ-Modell“ miteinander verknüpft (Rich, 2016) (siehe Abbildung 3). Das Verständnis der molekularen und zellulären Basis dieser Heterogenität hat einen bedeutenden Einfluss auf die therapeutische Strategie (Dick, 2008).

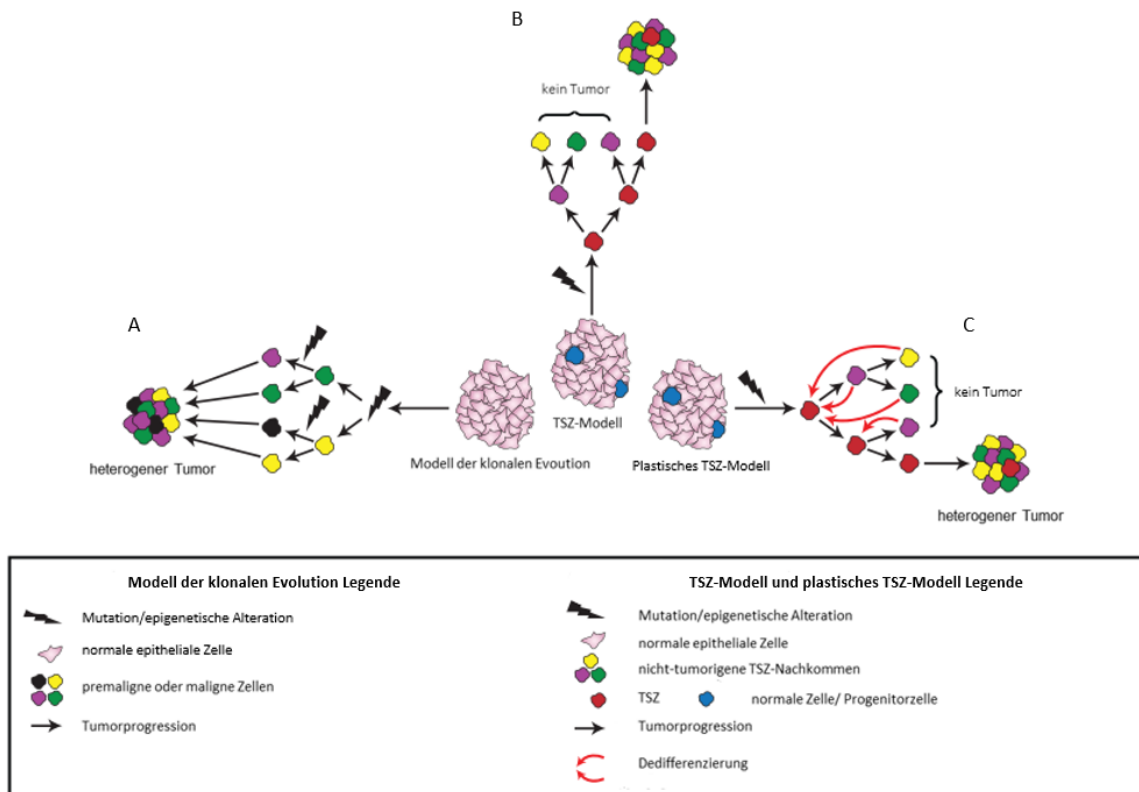


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Modelle zur Erklärung der Tumorerheterogenität. (A) Das Modell der klonalen Evolution geht von einer nicht-hierarchischen Organisation des Tumorzellverbandes aus. Die Acquisition zufälliger genetischer und/oder epigenetischer Alterationen führt zu einer klonalen Expansion der in Bezug auf das Mikromilieu und dem therapeutischen Druck am besten angepassten Zelle. (B) Nach dem TSZ-Modell ist der Tumorzellverband hierarchisch organisiert. An der Spitze stehen TSZ. Nur von ihnen können Tumorinitiation und Tumorwachstum ausgehen. Sie besitzen die Fähigkeit, durch symmetrische Teilung zwei identische Tochterzellen zu generieren oder durch asymmetrische Teilung eine identische Tochterzelle und eine sich schnell teilende Nicht-TSZ hervorzubringen. Diese trägt zur Bildung der Tumormasse bei, besitzt eine limitierte Lebensspanne und „differenziert“ sich weiter. Dieser Prozess wird als ein irreversibler, unidirektional gerichteter Vorgang verstanden. (C) Das plastische TSZ-Modell beschreibt eine bidirektional gerichtete Differenzierung. Nicht-TSZ können durch Dedifferenzierung wieder TSZ-Eigenschaften erlangen (modifiziert nach Rich, 2016).

1.2.1 Das Modell der klonalen Evolution von Tumoren

Die klassische Vorstellung der Tumorgenese gründet sich auf dem Modell der klonalen Evolution von Tumoren, das 1976 von Nowell entwickelt wurde (Nowell Peter C., 1976). Hiernach ist die Transformation normaler Zellen in Tumorzellen in Anlehnung an die Grundprinzipien der von Charles Darwin formulierten Evolutionstheorie zur Erklärung der unterschiedlichen biologischen Arten das Ergebnis eines evolutionären Prozesses (Wagener and Müller, 2009) mit schrittweiser Acquisition bestimmter genetischer oder epigenetischer Aberrationen (Ajani *et al.*, 2015). Ausgelöst durch ein initiales Mutationsereignis in einer Zelle erlangt sie einen Wachstumsvorteil. Folglich kommt es, soweit die zelluläre Wachstumskontrolle dies nicht verhindern kann, zu ihrer selektiven klonalen Expansion. Die unkontrollierte Proliferation und erhöhte genomische Instabilität

dieser sich schnell teilenden Subklone führt im Verlauf der klonalen Vermehrung zu weiteren genetischen Alterationen, die dann wiederum den bestangepassten Subklonen einen Wachstumsvorteil verschaffen und zur Bildung weiterer, noch schneller proliferierender Subklone mit zunehmend aggressiverem Wachstumsverhalten führen. Der Prozess wiederholt sich so lange, bis ein maligner Klon zu einem Tumor auswächst, der den Kontrollmechanismen des Wirtsorganismus entzogen ist (Wagener and Müller, 2009). Dieses Modell wird auch als stochastisches Modell bezeichnet, da die Zelle eines expandierenden Klon zufällig von einem mutagenen Ereignis getroffen wird. Welche Zelle mit welcher Mutation einen Wachstumsvorteil erlangt, ist abhängig vom vorherrschenden Selektionsdruck. Dieser wird nicht nur durch Faktoren wie dem Mikromilieu und der Immunantwort bestimmt, sondern auch durch den therapeutischen Druck (Hatina *et al.*, 2007). Der Tumor setzt sich dann aus unabhängig voneinander entstandenen, genetisch verschiedenen Subklonen, darunter ein dominanter Klon, zusammen. Das Modell erklärt jedoch nicht nur die Heterogenität des Tumors, sondern auch charakteristische Mutationen und die Reihenfolge ihres Auftretens in verschiedenen Tumorentitäten. Diese Modellvorstellung hat die Entwicklung der Antitumorthherapie seit den letzten 50 Jahren geprägt. Die konventionellen Chemotherapeutika wurden mit dem Ziel entwickelt, die Mehrheit der Tumorzellpopulationen zu eliminieren (Ajani *et al.*, 2015).

Basierend auf diesem Konzept lässt sich das Auftreten von Rezidiven und Metastasen nach anfänglicher Remission durch den therapeutischen Selektionsdruck erklären (Dean, Fojo and Bates, 2005).

1.2.2 Das Tumorstammzell (TSZ)-Modell

Das TSZ-Modell nimmt eine hierarchische Organisation des Tumorgewebes, bei der die Zellhierarchie gesunden Gewebes nachgeahmt wird, an (Dick, 2008). An der Spitze der Hierarchie steht eine kleine Gruppe langsam proliferierender TSZ, von denen das Tumorstammzellwachstum ausgeht (Bomken *et al.*, 2010). Eine TSZ kann sich symmetrisch teilen. Dadurch entstehen zwei identische Tochterzellen, die für den Erhalt des Tumors sorgen. Sie kann sich jedoch auch asymmetrisch teilen, wodurch eine identische Tochterzelle und eine sich schnell teilende Progenitorzelle entstehen. Letztere trägt zur Bildung der Tumormasse bei, besitzt nur eine limitierte Lebensdauer und die Fähigkeit zur „Differenzierung“ (Bomken *et al.*, 2010; Ajani *et al.*, 2015). TSZ ähneln aufgrund ihres Potenzials zur Selbsterneuerung und ihrer Pluripotenz normalen Stammzellen (Rich, 2016). Entsprechend wurde eine TSZ im Jahr 2006 im Rahmen eines Workshops von der *American Association for Cancer Research* (AACR) definiert als eine Zelle innerhalb eines Tumors mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Bildung aller heterogener Zelllinien, aus denen der Tumor besteht (Clarke *et al.*, 2006). Im Unterschied zu normalen Stammzellen unterliegen die TSZ keiner Wachstumskontrolle (Rich, 2016) und sie durchlaufen keine Differenzierung im

ursprünglichen Sinne, sondern vielmehr ein aberrantes Differenzierungsprogramm, wodurch funktionsuntüchtige Zellen mit unterschiedlichen für den Tumor relevanten Eigenschaften entstehen (Hatina *et al.*, 2007). Die Zellen der verschiedenen Subpopulationen des Tumors sind genetisch identisch. Die Heterogenität des Tumorzellverbandes rührt aus den unterschiedlich differenzierten Subklonen (Marjanovic, Weinberg and Chaffer, 2013). Die Herkunft der TSZ der Leber ist noch unbekannt. Angenommen wird eine Transformation von Stammzellen/Progenitorzellen der Leber oder auch eine Dedifferenzierung reifer Zellen des Leberparenchyms (Nio, Yamashita and Kaneko, 2017). Der erste bedeutende Nachweis von TSZ erfolgte 1997 durch Dick und Bonnet. Sie isolierten eine *cluster of differentiation* (CD)34⁺/CD38⁻-Zellpopulation, die aufgrund dieses Expressionsmusters phänotypisch einer normalen hämatopoetischen Stammzelle glich, von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Obwohl diese Population nur 0,2% aller Tumorzellen ausmachte, war nur sie in der Lage, in *non-obese diabetic* (NOD)/ *severe combined immunodeficiency* (SCID)-Mäusen eine AML zu generieren und es handelte sich um die einzige Population, die sich serientransplantieren ließ (Bonnet and Dick, 1997). In den Fokus der Tumorforschung gerieten TSZ jedoch erst, nachdem sie von Al-Hajj *et al.* 2003 auch in soliden Tumoren nachgewiesen wurden. Die Gruppe isolierte CD44⁺/CD24⁻-Zellen aus humanem Brustkrebsgewebe und zeigte im Mausmodell, dass mit weniger als 100 Zellen ein Tumorwachstum initiiert werden konnte, während selbst mehrere zehntausend CD44⁻/CD24⁺-Zellen keinen Tumor generierten (Al-Hajj *et al.*, 2003). In den Folgejahren gelang der Nachweis von TSZ auch in weiteren soliden Tumoren, darunter in Melanomen, beim Multiplen Myelom sowie in Tumoren des Gehirns, der Lunge, der Prostata, des Kolons, des Pankreas und der Lunge (Zhou and Zhang, 2008) und im Jahr 2007 auch im HCC (Ma *et al.*, 2007). Mit Hilfe des TSZ-Modells lassen sich Rezidive und Metastasen nach konventioneller Chemotherapie damit erklären, dass lediglich die schnell proliferierenden Nicht-TSZ eliminiert werden, während die TSZ erhalten bleiben. Dadurch kommt es zwar zunächst zu einer Reduktion der Tumormasse, doch nehmen die TSZ dann Wochen, Monate und selbst Jahre später ihre Proliferation wieder auf (Ajani *et al.*, 2015). Diese natürliche Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie haben TSZ mit normalen Stammzellen gemein. Sie rührt womöglich daher, dass sie ebenfalls nur langsam proliferieren (Lathia and Liu, 2017), denn auch, wenn die TSZ eine ausgeprägtere Fähigkeit zur symmetrischen Teilung und somit zur Selbsterneuerung im Vergleich zu normalen Stammzellen besitzen, so ist die Zeit, die sie für die Zellteilung benötigen, immer noch kürzer als die ihrer differenzierten Nachkommen (Duan *et al.*, 2013). Zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika trägt zudem die vermehrte Expression von Adenosintriphosphat (ATP)-Transportern (*ATP binding cassette*, ABC) bei, mit deren Hilfe die TSZ zytotoxische Substanzen ausschleusen (Dean, Fojo and Bates, 2005). TSZ weisen ein geringes Level an ROS auf. Dies wird auf ihr hohes Level an *scavenger*-Molekülen zurückgeführt, wodurch sich ihre Resistenz gegen DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlung erklären lassen würde (Diehn *et al.*, 2009). Zur Resistenz gegen Radiotherapie trägt womöglich auch die Tatsache bei, dass TSZ über sehr

effektive Reparaturmechanismen für strahleninduzierte DNA-Schäden verfügen (Duan *et al.*, 2013).

Dem TSZ-Modell folgend wäre eine Eliminierung der TSZ ausreichend für eine erfolgreiche Tumorthherapie (Ajani *et al.*, 2015).

1.2.3 Das plastische TSZ-Modell

Mittlerweile wurde mit dem plastischen TSZ-Modell ein weiteres Konzept vorgeschlagen, das beide Modellvorstellungen miteinander verknüpft und nach dem beide Konzepte gemeinsam zur Heterogenität eines Tumors beitragen (Tang, 2012). Das Modell beschreibt eine dynamische Beziehung zwischen den zwei Populationen der Nicht-TSZ und TSZ. Nicht-TSZ können als Reaktion auf bestimmte Einflüsse der sog. Tumorstammzellnische durch Dedifferenzierung die phänotypischen Eigenschaften von TSZ annehmen. Dies geschieht als ein stochastisches Ereignis (Chaffer *et al.*, 2011; Schwitalla, 2014), sodass sich potentiell jede Tumorzelle in eine TSZ transformieren kann. Es wird somit angenommen, dass die Differenzierung ein dynamischer, bidirektional gerichteter Prozess ist (Jayachandran, Dhungel and Steel, 2016). Der molekulare Mechanismus, der der TSZ-Plastizität zugrunde liegt, ist bisher noch nicht bekannt. Es wird u.a. vermutet, dass die Zellen hierfür das embryonale Programm der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) aktivieren (Chaffer *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2015; Jayachandran, Dhungel and Steel, 2016).

1.3 Identifizierung, Isolierung und Anreicherung von TSZ des HCCs

Untersuchungen zur Biologie der TSZ und zur zielgerichteten Therapie gegen sie sind auf ihre Identifizierung, Isolierung und/oder Anreicherung angewiesen. Seitdem der Gruppe um John Dick 1997 erstmals erfolgreich die Isolation einer TSZ-Population anhand ihrer Oberflächenmarker mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) gelungen war (siehe Kapitel 1.2.2), wurden weitere Strategien für ihre Anreicherung entwickelt. Da TSZ viele Eigenschaften mit normalen Stammzellen teilen, wurden hierfür meist Methoden aus der Stammzellforschung herangezogen (Bonnet and Dick, 1997; Duan *et al.*, 2013).

Hierzu zählen *assays*, die spezifische funktionelle Eigenschaften der TSZ detektieren wie die Eigenschaft, aufgrund ihrer Überexpression von ABC-Transportern den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342, der in den meisten Zellen akkumuliert, wieder auszuschleusen. Die TSZ können so aufgrund ihrer geringen Fluoreszenz als sog. Seiten-Population (*side population*, SP) isoliert werden (Dean, Fojo and Bates, 2005; Chiba *et al.*, 2006). Auch anhand der Aktivität intrazellulärer

Enzyme wie der ALDH1 lassen sich TSZ identifizieren (Duan *et al.*, 2013). Eine Anreicherung von TSZ kann des Weiteren unter speziellen Kulturbedingungen erfolgen. So können nur die TSZ unter nicht-adhäsiven, serumfreien Kulturbedingungen überleben und Sphäroide (*spheres*) ausbilden (Cao *et al.*, 2011).

Am weitesten verbreitet ist allerdings die Isolierung und Anreicherung von TSZ anhand spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS oder magnetisch aktivierter Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) (Duan *et al.*, 2013).

Die endgültige Verifizierung einer mittels dieser Methoden isolierten Zellpopulation als TSZ-Population sollte stets durch eine serielle Xenotransplantation erfolgen. Diese Technik gilt als „Goldstandard“ für die Identifizierung von TSZ, denn nur so lässt sich die Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen bestätigen (Clarke, 2005).

Nicht jede Tumorentität folgt dem TSZ-Konzept und nicht alle TSZ lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker identifizieren. Es existieren jedoch viele Belege dafür, dass TSZ auch beim HCC eine zentrale Rolle für die Initiierung, Progression, Metastasierung und Chemoresistenz spielen (Joo, Kim and Lee, 2015). Den ersten Nachweis für die Existenz von TSZ beim HCC erbrachten im Jahr 2007 Ma und Kollegen. Sie isolierten eine kleine CD133⁺-Zellpopulation mit stammzellähnlichen Eigenschaften aus humanen Leberzelllinien. Diese Zellen zeigten eine ausgeprägte Fähigkeit Kolonien zu bilden (*colony forming efficiency*, CFE), eine hohe proliferative Aktivität und eine hohe Tumorinitiierungsfähigkeit (Ma *et al.*, 2007). Seitdem wurden noch weitere TSZ-Marker des HCCs entdeckt. Hierzu zählen neben CD44 (Z. F. Yang, Ngai, *et al.*, 2008) auch der Ovalzellenmarker OV-6 (W. Yang *et al.*, 2008) sowie das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (*epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM) (Yamashita *et al.*, 2009) und CD90 (Z. F. Yang, Ho, *et al.*, 2008).

Es besteht noch kein genereller Konsens darüber, welches Epitop am besten zur Identifizierung von TSZ des HCCs geeignet ist. CD90 und EpCAM, aber auch CD133 werden am häufigsten verwendet. Aufgrund verschiedener Kombinationen dieser Marker existieren noch weitere Subpopulationen innerhalb einer TSZ-Subpopulation. Dies führt zu einer großen Vielfalt hepatischer TSZ-Phänotypen auch innerhalb eines Tumors und in HCC-Zelllinien (Jayachandran, Dhungel and Steel, 2016; Luong *et al.*, 2020).

1.3.1 Die TSZ-Oberflächenmarker EpCAM und CD90

Von einer das Oberflächenmolekül EpCAM exprimierenden Population von HCC-Zellen mit typischen TSZ-Charakteristika berichteten Yamashita *et al.* erstmals in ihrer 2009 veröffentlichten Arbeit (Yamashita *et al.*, 2009). Bei EpCAM handelt es sich um ein 40 kDa großes Glykoprotein bestehend aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (*EpCAM extracellular domain*, EpEX) und einer kurzen C-terminalen intrazellulären Domäne (*EpCAM intracellular domain*, EpiCD). Es fungiert als Ca²⁺-unabhängiges Zelladhäsionsmolekül, das homophile Zell-Zell-

Adhäsionskontakte in Epithelien herstellt (Litvinov *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Funktion wird es, trotz seiner untypischen Struktur, der Familie der *cell adhesion molecules* (CAMs) zugeordnet (Litvinov *et al.*, 1997). Wie bei anderen CAMs ist die Funktion von EpCAM nicht auf Adhäsion beschränkt (Trzpis *et al.*, 2007). So spielt es auch bei der Signaltransduktion eine Rolle. Dabei kommt es zu einer sequentiellen Spaltung des Moleküls, die zur Entlassung von EpEX als löslichen Faktor in die Zellumgebung und zur Freisetzung von EpICD ins Zytoplasma führt. EpICD bildet hier einen Komplex mit *four and a half LIM domain protein 2* (FHL2) und β -Catenin. Dies führt zu seiner Translokation in den Nukleus, wo der Komplex mit *lymphoid enhancer factor 1* (Lef-1) interagiert, an die DNA bindet und so die Transkription verschiedener Gene wie des Protoonkogens *cellular-mycelocytomatosis* (c-Myc) und der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin A und Cyclin E induziert (Münz *et al.*, 2004; Maetzel *et al.*, 2009). EpCAM wird während der Embryogenese in vielen Geweben vermehrt exprimiert, auch im embryonalen Lebergewebe. Mit fortschreitender Differenzierung der Hepatozyten nimmt die Expression stetig ab. Beim Erwachsenen wird das Molekül auf den meisten gesunden Epithelzellen exprimiert, allerdings exprimieren differenzierte Hepatozyten das Epitop nicht mehr. In der gesunden, adulten Leber wurde EpCAM lediglich als Marker für Stammzellen/Progenitorzellen und Ovalzellen identifiziert. Seine Expression korreliert mit der proliferativen Aktivität, sei es physiologisch oder neoplastisch. Bei den meisten Karzinomen wird es entweder vermehrt oder *de novo* exprimiert (de Boer *et al.*, 1999). Basierend auf der EpCAM-Expression und dem Alpha-Fetoprotein (AFP)-Level identifizierten Yamashita *et al.* vier prognostische Subtypen des HCCs. Von diesen gingen AFP⁺/EpCAM⁺-HCCs mit der schlechtesten Prognose einher. Diese Population exprimierte typische Stamm- bzw. Progenitorzellmarker wie die Tyrosinkinase c-Kit und zeigte eine erhöhte Aktivität des *wingless and Int-1* (WNT)- β -Catenin-Signalweges, der für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften nötig ist (Yamashita *et al.*, 2008). Die Zellen zeigten zudem typische TSZ-Eigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierung, initiierten hoch invasive HCCs in immundefizienten Mäusen und zeigten Resistenz gegen 5-Fluorouracil (Yamashita *et al.*, 2009). Hingegen exprimierten EpCAM⁻/AFP⁺-HCCs v.a. Gene reifer Hepatozyten (Yamashita *et al.*, 2008).

Yang *et al.* 2008 identifizierten CD90 als einen weiteren TSZ-Marker des HCCs (Z. F. Yang, Ngai, *et al.*, 2008). CD90 ist ein kleines 25-37 kDa schweres n-glykosyliertes Oberflächenprotein, das keine Transmembrandomäne besitzt, sondern über einen Glykophosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert ist. CD90 spielt eine Rolle bei der T-Zell-Aktivierung, agiert jedoch auch in einer Vielzahl nicht-immunologischer Vorgänge. So ist CD90 ein wichtiger Regulator von Zellmotilität und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen im Rahmen von Axonregeneration, Apoptose, Adhäsion, Migration, Tumorwachstum und Fibrose. Das Epitop wird v.a. auf Leukozyten (Rege and Hagood, 2006), allerdings auch auf hepatischen Stammzellen/Progenitorzellen der gesunden adulten und fetalen Leber, jedoch nicht auf reifen Hepatozyten exprimiert (Dan *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2006). Bei verschiedenen Leberzelllinien korrelierte die Expression von CD90 mit dem tumorigenen und metastatischen Potential der Zellen. Zur

Verifizierung der Ergebnisse wurden CD45⁻/CD90⁺-Zellen und somit nur die nicht-lymphatischen CD90⁺-Zellen aus Gewebe- und Blutproben von HCC-Patienten isoliert. Die Zellen waren in allen Tumorproben und in 90% der Blutproben nachweisbar. Nur CD90⁺-Zellen generierten in immunsupprimierten Mäusen Tumoren. Diese Tumorigenität wurde auch nach serieller Transplantation aufrecht erhalten (Z. F. Yang, Ho, *et al.*, 2008; Z. F. Yang, Ngai, *et al.*, 2008).

EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen weisen verschiedene Gen- und Proteinexpressionsprofile auf. Genexpressionsanalysen zeigten, dass EpCAM⁺-Zellen epitheliale Eigenschaften und CD90⁺-Zellen endotheliale Eigenschaften besitzen. Pathologische Analysen von EpCAM⁺-HCCs zeigten neben einer wenig differenzierten Zellmorphologie auch eine deutlich erhöhte AFP-Sekretion und die Anwesenheit von CD90⁺-Zellen ging mit einer hohen Inzidenz an Fernmetastasen einher (Yamashita *et al.*, 2013). Serielle Xenotransplantationen von EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen primärer HCCs in immundefiziente Mäuse zeigten ein schnelles, subkutaner Wachstum der EpCAM⁺-Zellen und eine ausgeprägte Tendenz von CD90⁺-Zellen Lungenmetastasen zu bilden. Bei Co-Kultivierung von HCC-Zelllinien wurde beobachtet, dass CD90⁺-Zellen die Motilität von EpCAM⁺-Zellen durch Aktivierung des *transforming growth factor* (TGF)- β -Signalweges fördern, wohingegen der Proteinkinaseinhibitor Imatinib die TGF- β 1-Expression in CD90⁺-TSZ unterdrückte und dadurch die CD90⁺-TSZ-induzierte Motilität in EpCAM⁺-TSZ verminderte (Yamashita *et al.*, 2013).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass beide Populationen nicht nur unabhängig voneinander exprimiert werden, sondern auch miteinander interagieren und so die Tumorprogression vorantreiben können. Für eine effiziente Therapie des HCCs reicht es letztlich nicht aus nur eine der beiden TSZ-Populationen zu eliminieren (Yamashita and Kaneko, 2014).

1.4 Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Zur Aufrechterhaltung ihrer Stammzeleigenschaften nutzen TSZ typische Stammzellensignalwege wie den Wnt/ β -Catenin-, TGF- β -, Januskinase (JAK)/*signal transducers and activators of transcription* (STAT)-, *Hippo-yes-associated protein* (YAP)/*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ)-, NOTCH- und *hedgehog* (Hh)-Signalweg. Diese Signalwege sind nicht wie bei den normalen Stammzellen strikt reguliert, sondern aufgrund von Mutationen oder epigenetischen Veränderungen dysreguliert, wodurch es zu einer reizunabhängigen, konstitutiv aktiven Proliferation und gestörten Differenzierung sowie zum unkontrollierten Wachstum funktionslosen Gewebes kommt (Ajani *et al.*, 2015; Lathia and Liu, 2017). Inzwischen haben Studien auch direkte Beziehungen zwischen dem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Signalweg und der TSZ-Biologie nachgewiesen (Xia and Xu, 2015). In der Mehrzahl aller Tumorentitäten und in bis zu 50% aller HCCs ist dieser Signalweg konstitutiv aktiviert. Ursächlich hierfür sind

Mutationen seiner Komponenten oder die Aktivierung von *upstream* gelegenen Signalwegmolekülen (O'Reilly *et al.*, 2006; Villanueva *et al.*, 2008). Der PI3K/AKT-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege zur Regulierung von Zellmetabolismus, Zellwachstum, Zellproliferation, Zellüberleben und Neoangiogenese und er integriert dabei sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Signale miteinander (Laplane and Sabatini, 2009). Seine physiologische Aktivierung erfolgt durch transmembranöse RTKs (Whittaker, Marais and Zhu, 2010; Cervello *et al.*, 2012) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCRs) (Georgescu, 2010). Vor allem die RTK-vermittelte Aktivierung des Signalweges scheint für die Kanzerogenese von Bedeutung zu sein (Engelman, Luo and Cantley, 2006). Die Ligandenbindung an die RTKs führt in Folge einer Konformationsänderung zur Dimerisierung bzw. im Falle des Insulinrezeptors (IR) und dem mit ihm verwandten *insulin-like growth factor receptor* (IGF-IR) zur Konformationsänderung der intrazellulär gelegenen Rezeptoruntereinheiten. Ihre Annäherung bzw. Konformationsänderung führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität der katalytischen Domäne der Rezeptoren und zur Autophosphorylierung und Transphosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne (Lemmon and Schlessinger, 2010). In manchen Fällen sind Adapterproteine notwendig. So phosphorylieren aktivierte IR und IGF-IR nach Ligandenbindung mit den aktivierten Ketten ihres tetrameren Rezeptorkomplexes Tyrosinreste des Insulinrezeptorsubstrates-1 (IRS-1) (White, 2002). An YXXM-Motive der aktivierten RTKs oder der Adapterproteine, bei denen ein phosphoryliertes Tyrosin und ein Methionin den Rahmen für zwei beliebige Aminosäuren bilden, können nun Proteine mit SH2 (*src homology 2*)-Domäne binden (Songyang *et al.*, 1993). Hierzu zählen die PI3Ks, die basierend auf ihrer Substratspezifität und ihrem strukturellen Aufbau in drei funktionelle Klassen (I, II und III) eingeteilt werden. Bei Säugern wird die Klasse I weiter in die Subklassen I_A und I_B unterteilt (Thorpe, Yuzugullu and Zhao, 2015). Während die PI3Ks der Klasse I_B v.a. durch GPCRs aktiviert werden und eine eher unbedeutende Rolle bei der Onkogenese spielen, führt die Aktivierung von RTKs zur Aktivierung von PI3Ks der Klasse I_A. Diese Rezeptoren spielen somit eine bedeutende Rolle bei der Entstehung eines Tumors (Engelman, Luo and Cantley, 2006). Es handelt sich bei den PI3Ks der Klasse I_A um Heterodimere, bestehend aus einer 85 kDa großen regulatorischen Untereinheit (p85) und einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit (p110). Beide Untereinheiten werden jeweils durch drei unterschiedliche Gene kodiert, sodass jeweils verschiedene Isoformen existieren: p85 α (inklusive ihrer *splice*-Varianten p55 α und p50 α), p85 β , p55 γ und PIK3CA, PIK3CB, PIK3CD (Fruman, Meyers and Cantley, 1998). Nach Bindung der p85 über ihre SH2-Domäne an die YXXM-Motive der aktivierten RTKs bzw. Adaptermoleküle kommt es zur Aufhebung der basalen Inhibition von p110 durch p85. Zur Familie der intrazellulären Lipidkinasen gehörend, katalysiert p110 die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂, kurz: PIP₂), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃, kurz: PIP₃) entsteht (Thorpe, Yuzugullu and Zhao, 2015). PIP₃ fungiert als *second messenger* und rekrutiert intrazelluläre Effektorproteine mit Pleckstrin-Homologie

(PH)-Domäne zur Plasmamembran. Zwei dieser Effektorproteine sind die Serin/Threoninkinase AKT, die zur Familie der Proteinkinasen gehört, und auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet wird und die *phosphoinositid-dependent-Kinase 1* (PDK1) (Vasudevan and Garraway, 2010). Es existieren drei, von verschiedenen Genen kodierte Isoformen von AKT: AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) und AKT3 (PKB γ) (siehe Abbildung 4A). Sie haben eine ähnliche Struktur, jedoch unterschiedliche Funktionen (Toker and Marmiroli, 2014). Während AKT1 ubiquitär exprimiert wird, wird AKT2 hauptsächlich in insulin-sensitiven Geweben wie Leber, Skelettmuskel oder Fettgewebe und AKT3 vorwiegend im Gehirn und im Hoden exprimiert (Wang, Chen and Hay, 2017). Obwohl auf unterschiedlichen Genen lokalisiert, zeigen alle Isoformen eine Sequenzhomologie von über 80% und einen Aufbau mit drei unterschiedlichen funktionellen Domänen (Toker and Marmiroli, 2014). Zu ihnen gehört die aus 120 Aminosäuren bestehende N-terminale PH-Domäne, die zentral gelegene Kinase-Domäne (KD) und die am C-Terminus befindliche regulatorische Domäne (RD) mit einem hydrophoben Motiv (HM), das allen AGC-Kinasen (benannt nach den Proteinkinasen A, G und C) gemein ist (Vasudevan and Garraway, 2010). Zwischen PH-Domäne und KD befindet sich eine kurze flexible α -helikale *linker*-Region mit noch unbekannter Funktion (Toker and Marmiroli, 2014). AKT liegt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor, die sich in ihrer relativen Position der PH-Domäne zur KD unterscheiden (siehe Abbildung 4B). Unter basalen Konditionen nimmt AKT auf Grund der intramolekularen Interaktion zwischen der PH-Domäne und der KD seine geschlossene, inaktive „PH-*in*“-Konformation ein, bei der die PH-Domäne über die KD gefaltet ist und so die ATP-Bindetasche blockiert. Durch die Translokation an die Plasmamembran nimmt AKT durch Bindung seiner PH-Domäne an PIP₃ vorübergehend seine membranassoziierte offene, aktive „PH-*out*“-Konformation ein, bei der sich PH-Domäne und KD relativ voneinander weg bewegen und letztere freigelegt wird. Dadurch kommt es im Fall von AKT1 zur Exposition von Threonin an Position 308 (T308), das somit für seine Phosphorylierung durch die sich nun in räumlicher Nähe befindliche PDK1 zugänglich ist (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014; Manning and Toker, 2017).

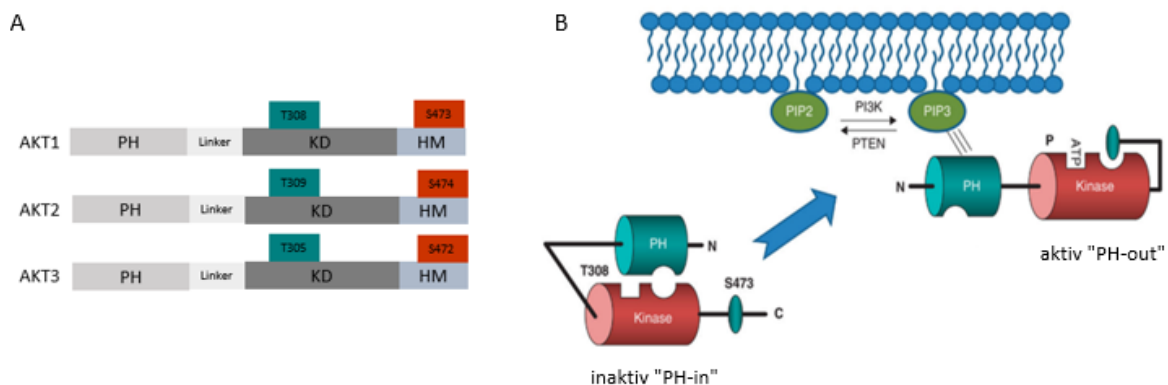


Abbildung 4: Schematische Darstellung der AKT-Domänen und der Aktivierung von AKT. (A) N-terminal befindet sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), zentral eine Kinase-Domäne (KD) mit der entsprechenden Threonin-Phosphorylierungsstelle und C-terminal ist eine regulatorische Domäne (RD) mit einem hydrophoben Motiv (HM) und der jeweiligen Serin-Phosphorylierungsstelle lokalisiert. (B) Im Zytoplasma liegt AKT in seiner inaktiven "PH-in"-Konformation vor. Nach Rekrutierung an die Plasmamembran nimmt AKT seine "PH-out"-Konformation ein, in der PIP₃ die PH-Domäne bindet, wodurch im Fall von AKT1 T308 exponiert wird und seine Phosphorylierung durch die PDK1 erfolgen kann (modifiziert nach Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014; Toker and Marmiroli, 2014).

Diese Phosphorylierung führt zu einer gesteigerten Kinaseaktivität von AKT, die daraufhin im Rahmen eines erst kürzlich von Yang *et al.* 2015 aufgedeckten positiven *feedback*-Mechanismus die Untereinheit *stress-activated protein kinase-interacting 1* (SIN1) des mTOR-Komplexes 2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*, mTORC2) an Position T86 phosphoryliert. Dieser Schritt fördert wiederum die Kinaseaktivität von mTORC2, der zusätzlich einen in der hydrophoben Domäne von AKT1 an Position 473 lokalisierten Serinrest (S473) phosphoryliert und damit die aktive Konformation stabilisiert und die vollständige Aktivierung der Kinasefunktion von AKT1 bewirkt. Die oben beschriebene Phosphorylierung beider Aminosäurereste erfolgt an korrespondierenden Aminosäureresten bei AKT2 (T309 und S474) und AKT3 (T305 und S472) (Mani *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2015; Manning and Toker, 2017).

Die Aktivierung von AKT wird durch Dephosphorylierung von PIP₃-Molekülen durch Lipidphosphatasen unterdrückt. Zunächst dephosphoryliert *phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome* (PTEN), PI(3,4,5)P₃ an der D3-Position des Inositolringes zurück zu PI(4,5)P₂ (Cantley and Neel, 1999). Einige Lipidphosphatasen wie *SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1* (SHIP1) und 2 (SHIP2) dephosphorylieren das Molekül an der D5-Position des Inositolrings, wodurch PI(3,4)P₂ entsteht. Auch in der Abwesenheit von PIP₃ bleibt AKT noch solange aktiv, bis es im Anschluss zu einer direkten Deaktivierung durch Proteinphosphatasen kommt. Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert AKT an ihrer KD (T308 beim AKT1) (Andjelkovic *et al.*, 1996), wohingegen *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase* (PHLPP) das HM von AKT (beim AKT1 S473) Isoform-spezifisch dephosphoryliert (Gao, Furnari and Newton, 2005). Die PHLPP1 dephosphoryliert AKT2 und AKT3, die PHLPP2 AKT1 und AKT3 (Brognard *et al.*, 2007).

Im aktivierten Zustand verlässt AKT die Zellmembran und transloziert ins Zytosol und in den Zellkern, um verschiedene Substrate zu phosphorylieren, von denen derzeit über 100 bekannt sind. Die Phosphorylierung erfolgt an Serin- oder Threoninresten, vorwiegend im Bereich der Konsensus-Sequenz R-X-RXXS/T-B (X=variable AS; B=hydrophober Rest) mit entweder stimulatorischem oder inhibitorischem Effekt auf die Aktivität. Aktiviertes AKT nimmt so Einfluss auf viele verschiedene zelluläre Funktionen wie Zellüberleben, Zellwachstum, Zellproliferation, Zellmetabolismus, Angiogenese und somit auf Faktoren, die auch für das Tumorwachstum von Bedeutung sind (Manning and Cantley, 2007).

Bei Stimulation durch Überlebenssignale wirkt AKT auf vielerlei Arten antiapoptotisch, sowohl direkt über Phosphorylierung von Effektorproteinen als auch indirekt auf transkriptioneller Ebene. AKT phosphoryliert proapoptotische Proteine der *B-cell lymphoma* (BCL)-Familie wie *BCL-2-antagonist of cell death* (BAD), das in Abwesenheit von Überlebenssignalen in einem Komplex mit antiapoptotischen Proteinen der BCL-Familie wie dem gleichnamigen BCL-2 und *BCL-extra-Large* (BCL-xL) vorliegt und durch deren Inhibierung die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Aktivierung der Caspase-Kaskade bewirkt wird (Manning and Cantley, 2007). Durch Phosphorylierung von BAD am S136 entsteht eine Bindungsdomäne für 14-3-3 Proteine. Deren Bindung bewirkt möglicherweise eine Konformationsänderung und führt zur Freilegung und Phosphorylierung von S155, was zur Ablösung von BAD von seinen *target*-Proteinen führt (Datta *et al.*, 2000). Ein weiteres Substrat von AKT ist die Initiator-Caspase-9, durch deren Phosphorylierung eine Initiierung der Caspase-Kaskade verhindert wird (Cardone *et al.*, 1998). Ebenfalls gut untersucht ist die durch AKT vermittelte Inhibition von Transkriptionsfaktoren der Familie der *forkhead box* (Fox)-Proteine der Unterklasse O (FoxO). Durch Phosphorylierung von FoXO1, FoXO3a und FoXO4 (Manning and Cantley, 2007) entsteht eine Bindungsdomäne für 14-3-3 Proteine, durch deren Bindung die Translokation der FoXO-Transkriptionsfaktoren vom Nukleus ins Zytoplasma und ihre dort erfolgende Sequestration getriggert wird (Manning and Toker, 2017). Dadurch wird die Transkription proapoptotischer Gene wie die vom Protein *BCL-like protein 21* (BIM) aus der BCL-2-Familie oder Zytokinen wie dem *Fas-ligand* (FasL), *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und *TNF-receptor-associated death domain protein* (TRADD) unterbunden (Vasudevan and Garraway, 2010). Im Gegenzug aktiviert AKT Faktoren der *cAMP responsive element binding* (CREB)-Familie und fördert so die Expression antiapoptotischer Gene wie BCL-2 oder *cellular Jun* (c-Jun) (Du and Montminy, 1998). AKT phosphoryliert die *mouse double minute 2* (MDM2), eine E3-Ubiquitin-Ligase, und fördert so ihre Translokation in den Zellkern. Hier bildet MDM2 einen Komplex mit p53 und initiiert durch Ubiquitinierung dessen Degradation. Dies führt zu einer verringerten Transkription von Genen der BCL-2-Familie v.a. *BCL-2-associated X protein* (BAX) und somit zu einer verminderten Induktion der Apoptose (Mayo and Donner, 2001; Moll and Petrenko, 2003). AKT phosphoryliert auch beide Isoformen der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3), GSK3 α und GSK3 β , und inaktiviert sie. Dies hat u.a. eine verminderte Phosphorylierung von *myeloid cell leukemia-1* (MCL-1), einem Protein der BCL-2-Familie, zur Folge (Manning and Cantley, 2007).

Zwar beeinflusst AKT v.a. Zellüberleben und Zellwachstum, stimuliert jedoch auch durch Beeinflussung von Komponenten der Zellzykluskontrolle direkt die Zellproliferation (Manning and Cantley, 2007). So führt das verringerte Level von p53 zur verminderten Transkription des cyclin-abhängigen Kinase (*cyclin-dependent kinase*, CDK)-Inhibitors p21. Ebenfalls führt die Phosphorylierung der FoxO-Transkriptionsfaktoren zu einer verringerten Expression des CDK-Inhibitors p27 (Medema, Kops and Bos, 2000). Zusätzlich verhindert die direkte Phosphorylierung der beiden CDK-Inhibitoren p27 und p21 nahe ihrer *nuclear localisation sequence* (NLS) ihre Translokation in den Zellkern, sodass ihre Inhibition des Zellzyklus ausbleibt (Bellacosa *et al.*, 2004). Die durch AKT vermittelte Inaktivierung der GSK3 führt ebenfalls zu einer reduzierten proteasomalen Degradation von für die Zellzyklusprogression bedeutenden Proteinen, die durch aktivierte GSK3 ansonsten phosphoryliert und für die proteasomale Degradation markiert werden würden (Manning and Cantley, 2007). Darunter die G1-Cykline Cyclin D1 (Diehl *et al.*, 1998) und Cyclin E (Welcker *et al.*, 2003) sowie die Transkriptionsfaktoren c-Jun (Wei *et al.*, 2005) und c-Myc (Yeh *et al.*, 2004).

Unter anderem über die Phosphorylierung der GSK3 nimmt AKT auch Einfluss auf den Metabolismus der Zellen. Dieser Einfluss erfolgt auf direktem Weg durch Aktivierung des IRs und der anschließenden Phosphorylierung der GSK3 durch AKT was zu einer Aktivierung der Glykogensynthase (GS) führt (Frame and Cohen, 2001). Indirekt beeinflusst AKT den Metabolismus durch die Regulierung metabolisch relevanter Transkriptionsfaktoren (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011).

Einfluss auf das Zellwachstum nimmt AKT hauptsächlich durch die Aktivierung des mTOR-Komplexes 1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*, mTORC1) (Manning and Cantley, 2007), einer 280 kDa großen Serin/Threoninkinase, die aufgrund der Homologie ihres C-Terminus zur katalytischen Domäne der PI3K, zur *PI3K-kinase-related kinase* (PIKK)-Familie gehört, besteht (Laplane and Sabatini, 2009).

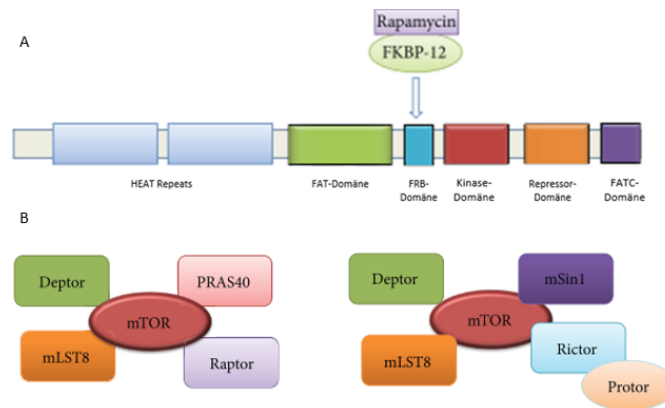


Abbildung 5: Schematische Darstellung der mTOR-Domänenstruktur und der Komponenten des mTORC1 und mTORC2. (A) Die ersten 1200 N-terminal gelegenen Aminosäuren des mTOR-Proteins bilden die sog. HEAT-Repeats (*Huntington, Elongation Factor 3 (EF3), a subunit of PP2A and TOR1*), die als Schnittstellen für Protein-Protein-Interaktionen (PPI) fungieren. Weiter *downstream* findet sich eine FAT (*FRAP-ATM-IRRAP*)-Domäne, an die sich C-terminal die *FK506-binding protein 12* (FKBP12)-*Rapamycin-binding* (FRB)-Domäne, die Rapamycin und seine Analoga im Komplex mit FKBP12 bindet sowie die Kinase-Domäne (KD) und die Repressor-Domäne anschließen. Am C-Terminus befindet sich die FATC (*FRAP-ATM-IRRAP C-terminal*)-Domäne von der angenommen wird, dass sie mit der FAT-Domäne interagiert, was zur Exposition der KD führt. (B) MTOR im mTORC1 (**links**) und im mTORC2 (**rechts**) (modifiziert nach Showkat, Beigh and Andrabi, 2014).

MTOR interagiert mit verschiedenen Proteinen und liegt nicht nur im mTORC1, sondern auch im mTORC2 vor (Helliwell *et al.*, 1994) (siehe Abbildung 5B). Neben mTOR setzen sich beide Komplexe außerdem aus *mammalian lethal with SEC13 protein 8* (mLST8) und *death domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor) zusammen (Foster and Fingar, 2010). Die Funktion von mLST8 im mTORC1 ist noch unklar, da seine Deletion *in vivo* keinen Einfluss auf die mTORC1-Aktivität hat. Hingegen scheint mLST8 essentiell für die mTORC2-Funktion zu sein, denn sowohl Stabilität als auch Aktivität des Komplexes sind bei Deletion beeinträchtigt (Guertin *et al.*, 2006). Deptor fungiert in beiden Komplexen als Inhibitor (Peterson *et al.*, 2010). Während mTORC2 zusätzlich aus *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) sowie SIN1 und *protein observed with Rictor* (Protor) besteht, assoziiert der mTORC1 außerdem mit *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor) und *proline rich AKT/PKB substrat 40 kDA* (PRAS40) (Foster and Fingar, 2010). Rictor und Sin1 stabilisieren sich gegenseitig und bilden so eine strukturelle Basis für die Zusammenlagerung des mTORC2 (Frias *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). Auch Protor interagiert mit RICTOR, allerdings ist die physiologische Funktion nicht geklärt (Pearce *et al.*, 2007). Raptor bindet als *scaffolding*-Protein an *TOR signaling* (TOS)-Motive der *downstream*-Substrate und verbindet sie dadurch mit der KD von mTOR, wodurch ihre Phosphorylierung erfolgen kann (Schalm and Blenis, 2002). Die Funktion von PRAS40 besteht wie bei Deptor in der negativen Regulation von mTORC1 durch Inhibition seiner *rat sarcoma* (Ras)-*homolog-enriched-in-brain* (Rheb)-Guanosintriphosphat (GTP)-vermittelten Aktivierung (Sancak *et al.*, 2007).

Beide Komplexe weisen nicht nur strukturelle, sondern auch funktionelle Unterschiede auf (Laplante and Sabatini, 2009). Die am besten charakterisierte Funktion von mTORC2 besteht in der Aktivierung von AKT durch Phosphorylierung von S473 (Sarbasov *et al.*, 2005). Darüber hinaus reguliert der Komplex die

Organisation des Aktinzytoskeletts (Jacinto *et al.*, 2004). mTORC1 registriert verschiedene extra- und intrazelluläre Signale und verlinkt sie mit verschiedenen anabolischen Prozessen wie Protein- und Lipidbiosynthese, Nukleotidsynthese und der ribosomalen Biogenese (Xie, Wang and Proud, 2016). mTORC1 hemmt auch die Autophagie, einen bedeutenden katabolen Mechanismus (Kim and Guan, 2015). Alle diese Prozesse sind für das Zellwachstum von Bedeutung. Die wichtigste Funktion von mTORC1 besteht dabei in der Regulation von Translation und Ribosomenbiogenese.

Die durch Wachstumsfaktoren ausgelöste AKT-vermittelte Aktivierung von mTORC1 erfolgt entweder direkt über die Phosphorylierung von PRAS40, wodurch die PRAS40-vermittelte Inhibition von mTORC1 aufgehoben wird (Sancak *et al.*, 2007) oder indirekt über die Phosphorylierung des *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), auch Tuberin genannt, das dadurch inaktiviert wird. TSC2 liegt in einem Komplex mit *tuberous sclerosis complex 1* (TSC1), auch Hamartin genannt, vor (Huang and Manning, 2009). Während TSC1 TSC2 stabilisiert und dessen Ubiquitin-vermittelte Degradation verhindert (Chong-Kopera *et al.*, 2006), fungiert TSC2 im aktiven, unphosphorylierten Zustand als ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), das Rheb, eine mit Ras verwandte kleine GTPase, durch Hydrolyse von GTP in seinen Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen inaktiven Status (Rheb-GDP) negativ reguliert und somit eine Aktivierung von mTORC1 verhindert. Bei Phosphorylierung und somit Inaktivierung des TSC1-TSC2-Komplexes liegt Rheb folglich in seiner aktiven GTP-gebundenen Form (Rheb-GTP) vor. Auch, wenn der genaue Mechanismus noch nicht ganz verstanden ist, so führt Rheb-GTP zu einer gesteigerten mTORC1-Kinase-Aktivität (Huang and Manning, 2009).

mTORC1 wird nicht nur über den ihm vorgeschalteten PI3K/AKT-Signalweg kontrolliert, sondern registriert auch den intrazellulären Energiestatus und die Verfügbarkeit von O₂ und Aminosäuren für die Proteinbiosynthese. Die wichtigsten Mediatoren hierbei sind die 5'-Adenosinmonophosphat (AMP)-aktivierte Kinase (AMPK) und *regulated in development and DNA damage response 1* (REDD1). Ein Energiedefizit (erhöhter AMP/ATP-Quotient) führt zur Aktivierung der AMPK, die TSC2 phosphoryliert und so den durch mTORC1-Aktivität vermittelten erhöhten Energieverbrauch hemmt (Inoki *et al.*, 2003). mTORC1 kann durch Phosphorylierung von Raptor auch direkt durch die AMPK gehemmt werden (Gwinn *et al.* 2008). Hypoxie führt über verschiedene Wege zur Hemmung von mTORC1. O₂-Mangel bewirkt z.B. die Stabilisierung des Hypoxie induzierten Faktors 1 α (HIF1 α), der die Transkription von REDD1 induziert (Brugarolas *et al.*, 2004), das dafür sorgt, dass TSC2 aus seiner Wachstumsfaktor-induzierten inhibitorischen Verbindung mit 14-3-3 Proteinen entlassen wird und mTORC1 hemmen kann (DeYoung *et al.*, 2008). Aminosäuren führen unabhängig von der AKT-TSC1/TSC2-Achse zur Aktivierung von mTORC1. Ihre Anwesenheit bewirkt, dass *recombination activating gene* (RAG)-Proteine an Raptor binden und so die intrazelluläre Lokalisation von mTOR in ein seinen Aktivator Rheb enthaltendes perinukleäres Zellkompartiment fördern (Sancak *et al.*, 2008).

Zusätzlich existieren viele *crosstalks* zwischen dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und anderen Signalwegen. So erfolgt die Aktivierung von mTORC1 auch über den

Ras/MAPK-Signalweg, wodurch es ebenfalls zur Aktivierung von TSC1/TSC2 kommt (Bhaskar and Hay, 2007).

Der aktivierte mTORC1 stimuliert die Proteinbiosynthese durch Phosphorylierung von *eucaryotic translation initiation factor 4E-binding proteins* (4E-BPs) und der *p70 ribosomal protein S6-kinase* (p70^{S6K}), beides Schlüsselproteine der Translation (Ma and Blenis, 2009). Die Einleitung der eukaryotischen Translation erfolgt mit Hilfe verschiedener *eukaryotic translation initiation factors* (eIFs), darunter auch der eIF4F-Komplex. Dieser besteht aus dem Cap-bindenden Protein eIF4E, der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A, die die komplexe Sekundärstruktur der 5'-*untranslated region* (5'-UTR) entwindet (Jackson, Hellen and Pestova, 2010) sowie dem multivalenten Adapterprotein eIF4G, das sich über das *poly-A binding protein* (PABP) an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende heftet, mit eIF4E interagiert und so eine Zirkularisierung der *messenger RNA* (mRNA) bewirkt (Wells *et al.*, 1998). EIF4G assoziiert auch mit eIF3 des 43S-Präinitiationskomplexes und bewirkt so die Rekrutierung der 40S-ribosomalen Untereinheit. Der Komplex bewegt sich entlang der mRNA gen 3'-Richtung bis zum ersten AUG-Codon (*scanning*), wodurch die Bindung der großen 60S-ribosomalen Untereinheit ausgelöst wird und das vollständige 80S Ribosom entsteht (Jackson, Hellen and Pestova, 2010). Die Regulierung der eIF4E-eIF4G-Interaktion erfolgt über 4E-BPs. Nicht-phosphoryliertes 4E-BP bindet eIF4E am selben Bindemotiv wie eIF4G, wodurch es kompetitiv verdrängt wird. Ringschluss und Initiation bleiben aus (Mader *et al.*, 1995). Aktiviertes mTORC1 phosphoryliert 4E-BP1 und bewirkt so die Dissoziation des 4E-BP/eIF4E-Komplexes. Dadurch steigt das Level an freiem eIF4E, das für die Initiation der Cap-abhängigen Translation eIF4E-sensitiver mRNAs zur Verfügung steht. Hierzu zählen die mRNAs von Cyclin D1 und c-Myc, die beide lange, hoch strukturierte 5'-UTR besitzen (Ma and Blenis, 2009). Es sind bisher sieben Phosphorylierungsstellen von 4E-BP bekannt: T37, T46, S65, T70, S83, S101 und S112 (Showkat, Beigh and Andrabi, 2014). Die Phosphorylierungen erfolgen dabei hierarchisch zunächst an T37 und T46, gefolgt von T70 und S65 durch mTORC1 (Gingras *et al.*, 2001). Die darauffolgenden Phosphorylierungen erfolgen durch andere Kinasen und sind nicht von Bedeutung für die Beeinflussung der Fähigkeit vom 4E-BP1, eIF4E zu binden und zu inhibieren (Showkat, Beigh and Andrabi, 2014). Ein weiteres *target* von mTORC1 ist die p70^{S6K}, kurz S6K, von der verschiedene Isoformen existieren. Von Bedeutung für das Zellwachstum scheint v.a. die S6K1 zu sein. Ihre Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an T389 durch AKT, gefolgt von einer Phosphorylierung durch die PDK1 an T229, die unabhängig von ihrer Bindung an PIP₃ erfolgt (Manning and Cantley, 2007; Ma and Blenis, 2009). Die S6K1 reguliert v.a. Proteine der Translationsmaschinerie. Sie moduliert die Funktion der Translationsinitiationsfaktoren während der Proteinbiosynthese. So steigert sie die Aktivität von eIF4A durch Phosphorylierung von eIF4B (Duncan and Hershey, 1985), aber auch durch Phosphorylierung von *programmed cell death protein 4* (PDCD4), einem Inhibitor von eIF4A, der dadurch für die Degradation markiert wird (Yang *et al.*, 2003). Durch Phosphorylierung von *ribosomal protein S6* (rpS6) kurbelt die S6K1 auch die Ribosomenbiogenese an. Die Phosphorylierung von rpS6 führt zur gesteigerten Translation von mRNA mit

terminaler Oligopyrimidin-Sequenz, sog. 5' TOP (*5'-terminal oligopyrimidine*)-mRNA, die v.a. für ribosomale Proteine und weitere für die Translation benötigte Komponenten wie Elongationsfaktoren kodieren. So konnte gezeigt werden, dass die Translation der 5' TOP-mRNAs durch Rapamycin-vermittelte Inhibition der S6K unterdrückt wird (Jefferies *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass rpS6 als Komponente der mRNA-Bindestelle in der 40S-Untereinheit für die Rekrutierung von 5' TOP-mRNA zu den Ribosomen nötig ist (Wool, Chan and Glück, 1995; Thomas, 2000).

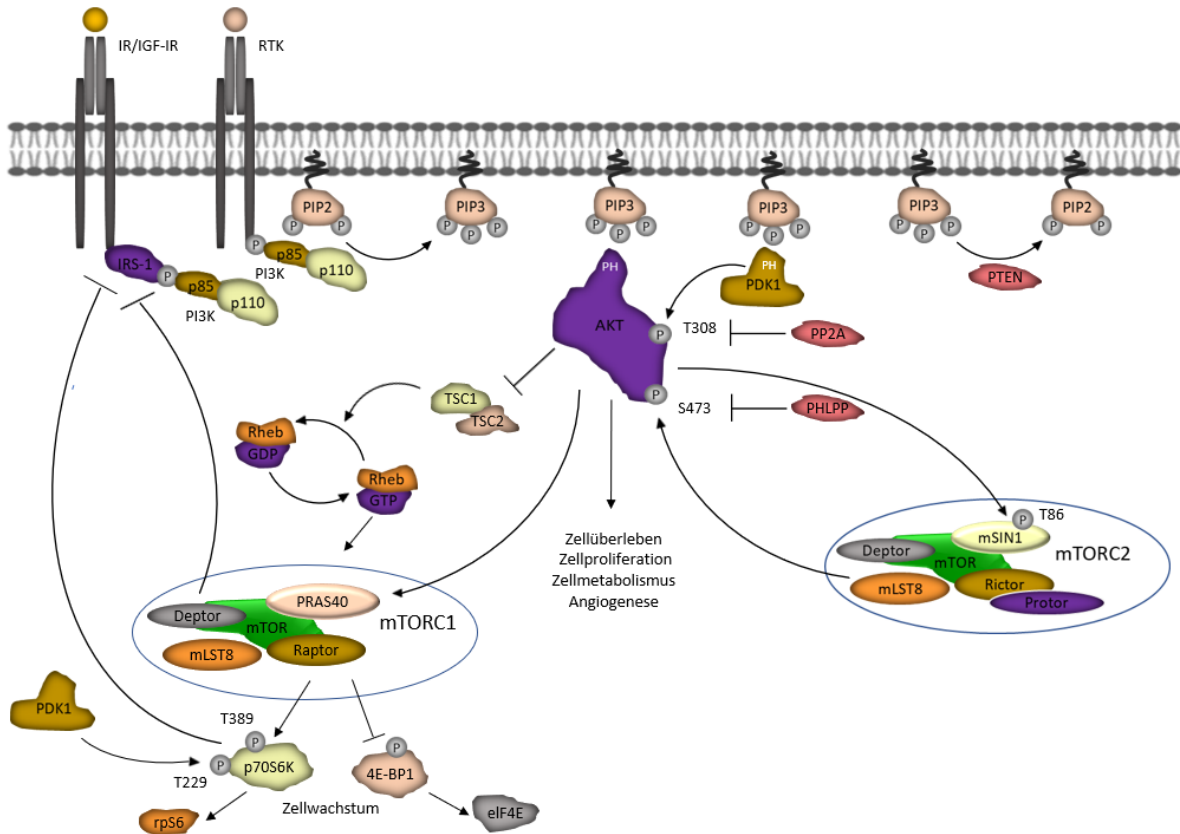


Abbildung 6: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3K mit ihrer SH2-Domäne an die YXXM-Motive der aktivierten RTKs bzw. Adapterproteine führt zur Aufhebung der Inhibition der katalytischen Untereinheit p110 der PI3K. Diese katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf PIP₂, sodass PIP₃ entsteht, das als *second messenger* intrazelluläre Effektorproteine wie AKT und die PDK1 an die Plasmamembran rekrutiert, die dann mit ihrer PH-Domäne an PIP₃ binden. AKT nimmt dadurch seine aktive „PH-out“-Konformation ein, wodurch T308 exponiert und durch die PDK1 phosphoryliert wird. Daraufhin phosphoryliert AKT die Untereinheit SIN1 des mTORC2, der dann wiederum AKT an S473 phosphoryliert und damit die vollständige Aktivierung von AKT bewirkt. Lipidphosphatasen wie PTEN reduzieren die Aktivität von AKT über die Dephosphorylierung von PIP₃. Die PP2A und die PHLPP deaktivieren AKT durch direkte Dephosphorylierung. Aktiviertes AKT transloziert ins Zytosol und in den Zellkern und reguliert hier über die Phosphorylierung verschiedener Substrate Zellüberleben, Zellproliferation, Zellmetabolismus und Angiogenese. Auf das Zellwachstum nimmt AKT im Wesentlichen Einfluss durch Aktivierung von mTORC1. Entweder direkt über die Phosphorylierung von PRAS40 oder indirekt über die Phosphorylierung des TSC2. Der aktivierte mTORC1 stimuliert die Proteinbiosynthese durch die Phosphorylierung zweier Schlüsselproteine der Translation. Durch die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird dessen Bindung an eIF4E verhindert und das Level an freiem eIF4E, das für die Bildung des eIF4F-Komplexes und somit für die Initiation der Cap-abhängigen Translation zur Verfügung steht, steigt. Die Phosphorylierung der p70^{S6K} führt zur gesteigerten Ribosomenbiogenese. Eingebunden in einen negativen *feedback*-Mechanismus phosphorylieren mTORC1 und p70^{S6K} IRS-1 an verschiedenen Serin- und Threoninresten und markieren es so für die Degradation (siehe Kapitel 1.5) (modifiziert nach Franke, 2008).

1.5 Der mTOR-Inhibitor RAD001

Der Wirkstoff Rapamycin (Sirolimus) wurde erstmals Mitte der 70er Jahre aus dem Boden der Osterinsel (Rapa Nui) isoliert. Es handelt sich um ein Makrolid-Antibiotikum, das vom Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird. Aufgrund seiner antifungalen Eigenschaften wurde es anfänglich als Antimykotikum eingesetzt (Vézina, Kudelski and Sehgal, 1975), zeigte allerdings schwere immunsupprimierende Nebenwirkungen, was letztlich in der klinischen Weiterentwicklung von Rapamycin zu einem Immunsuppressivum mündete und 1999 von der FDA und 2000 von der EMA zugelassen wurde und nach Nierentransplantation als Alternative zu Calcineurininhibitoren (CNI) zur Verhinderung einer Abstoßungsreaktion verabreicht wird (Rowinsky, 2016). Rapamycin behindert in Interleukin-2 (IL-2)-stimulierten T-Zellen den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und unterdrückt dadurch die T-Zell-Proliferation (Dumont and Su, 1996). Im Unterschied zu den klassischen Immunsuppressiva wie Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin, beides CNI, zeichnet sich Rapamycin v.a. durch seine gute Verträglichkeit und geringen nephrotoxischen Wirkungen aus (Khan and Sewell, 2006). Aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung wird es seit 2003 auch zur Beschichtung von *stents* (*drug-eluting stents*) zur Vermeidung von Restenosen durch neointimale Hyperplasie nach *stent*-Implantationen in die Koronararterien eingesetzt (Tomberli, Mattesini and Baldereschi, 2018) und rückte in den Fokus der Antitumorthherapie (MacKeigan and Krueger, 2015). Neben der direkten antiproliferativen Wirkung auf Tumorzellen hemmt der Wirkstoff das Tumorwachstum auch durch Blockade der Angiogenese (Guba *et al.*, 2002).

Um die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes zu verbessern, wurden Rapamycin-Analoga, die sog. Rapaloge, als mTOR-Inhibitoren der ersten Generation entwickelt, darunter Temsirolimus (CCI-779), Deforolimus (AP23573) und Everolimus (RAD001) (Matter *et al.*, 2014), das von Novartis entwickelt und im Unterschied zu Sirolimus eine 2-Hydroxyl-Kette anstelle eines Wasserstoffatoms an Position 40 besitzt (Ballou and Lin, 2008). Es wird in Europa und anderen Teilen der Welt unter dem Namen Certican und in den USA unter dem Namen Zortress in der Transplantationsmedizin vermarktet. Die Zulassung durch die EMA erfolgte 2003 zunächst als Immunsuppressivum nach Herz- und Nierentransplantation in Kombination mit Cyclosporin. Die Zulassung für den US-amerikanischen Markt durch die FDA erfolgte 2010 für die Nachbehandlung von Nierentransplantationen. Die Zulassung als Immunsuppressivum nach Lebertransplantation in Kombination mit Tacrolimus erfolgte 2012 durch die EMA und im Jahr 2013 auch durch die FDA (Rowinsky, 2016). In der Onkologie wird es unter dem Namen Afinitor vertrieben und 2009 von der EMA und FDA zunächst zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen (Motzer *et al.*, 2008). Es folgten 2011 ebenfalls durch EMA und FDA Zulassungen zur Therapie des mit der tuberösen Sklerose assoziierten subependymalen Riesenzellastrozytoms, der fortgeschrittenen oder metastasierenden neuroendokrinen Tumoren pankreatischen Ursprungs und

neuroendokriner Tumoren mit Ursprung in der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt (Rowinsky, 2016). Seit 2012 wird es in Europa und den USA auch beim fortgeschrittenen Hormonrezeptor (HR)-positiven, humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2 (HER2)/neu-negativen Mammakarzinom eingesetzt (Baselga *et al.*, 2012).

Der Wirkmechanismus von Rapamycin und seinen Analoga ist identisch. Sie formen zunächst einen Komplex mit dem *FK506-binding protein 12* (FKBP12), der dann an die FRB-Domäne von mTOR bindet. Der Komplex interagiert allerdings nur mit mTORC1 und nicht mit mTORC2 (Jacinto *et al.*, 2004). Dies vermutlich, da die Bindung des Komplexes an die FRB-Domäne von mTOR durch Komponenten des mTORC2 verhindert wird. Nach mehrtägiger Therapie kommt es jedoch bei einigen Tumorzelllinien auf indirektem Weg zu einer Blockade der mTORC2-Aktivität. Da auch der Rapamycin/FKBP12-Komplex freies, neu-synthetisiertes mTOR bindet, konkurriert er zunehmend mit den mTORC2-Komponenten um das Molekül (Sarbassov *et al.*, 2006). Der Mechanismus, durch den der Rapamycin/FKBP12-Komplex zur Inhibition von mTORC1 führt, ist noch nicht vollständig verstanden (Oshiro *et al.*, 2004). So wird, basierend auf der Beobachtung, dass der Komplex die Autophosphorylierung von mTOR und Phosphorylierung von 4E-BP1 *in vitro* inhibiert, angenommen, dass die Bindung des Komplexes an die FRB-Domäne zu Veränderungen führt, die eine allosterische Hemmung der direkt benachbart gelegenen KD bewirken (Jacinto *et al.*, 2004; Ballou and Lin, 2008). Eine weitere Modellvorstellung ist, dass Rapamycin die mTOR-Funktion durch Destabilisierung der mTOR-Raptor-Interaktion hemmt (Kim *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2004; Yip *et al.*, 2010). In ihrer kürzlich veröffentlichten Publikation geben Aylett *et al.* 2016 Einblicke in die Architektur von mTORC1, die sie mit Hilfe von kryoelektronenmikroskopischen Analysen aufdecken konnten. Sie konnten neben detaillierteren strukturellen Erkenntnissen auch Informationen über Interaktion und Funktion der einzelnen Proteine gewinnen. Unter anderem wurde deutlich, dass es durch die Bindung des FKBP12/Rapamycin-Komplexes an die FRB-Domäne zu einer Verkleinerung des Zugangs zum aktiven Zentrum von 20 Å auf 10 Å kommt. Dadurch wird der Zugang der Substrate mit TOS-Motiven limitiert (Aylett *et al.*, 2016; Yuan and Guan, 2016). Die FRB-Domäne fungiert nach diesem Modell sozusagen als ein *gatekeeper*, was auch erklären würde, weshalb Rapamycin manche Substrate stärker als andere hemmt (Xie, Wang and Proud, 2016). Denn, während die mTORC1-abhängige Phosphorylierung von S6K1 an T389 vollständig inhibiert wird, wird sie beim 4E-BP1 nur partiell beeinflusst (Thoreen and Sabatini, 2009). Choo *et al.* 2008 fanden weiter heraus, dass die anfängliche Hemmung von 4E-BP1 in einigen Zelltypen binnen 6 h durch Dephosphorylierung wieder aufgehoben wird, während die S6K1-Inhibition fortbestehen blieb (Choo *et al.*, 2008).

Bisher ist weder eine Zulassung von Rapamycin noch von seinen Analoga zur Behandlung des HCCs erfolgt. Studien zeigen nur limitierte Erfolge einer Monotherapie mit Rapaloga (Matter *et al.*, 2014). Im Rahmen mehrerer Studien wurde unter RAD001 ein erhöhtes IRS-1-Proteinlevel und eine vermehrte AKT-Phosphorylierung beobachtet (Y. Shi *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). Als wesentlichen und auch am besten charakterisierten Mechanismus für

diesen limitierten Therapieerfolg wird der Wegfall der mTORC1/S6K-abhängigen intrinsischen negativen *feedback*-Schleife, in die der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eingebunden ist, angenommen. Bei anhaltender Insulin- oder *insulin like growth factor* (IGF)-Exposition phosphorylieren mTORC1 (Y. Shi *et al.*, 2005) und die durch mTORC1 aktivierte S6K1 (Leslie *et al.*, 2008) IRS-1 an verschiedenen Serin- und Threoninresten, wodurch es zu dessen Ubiquitinierung durch verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen und seiner anschließenden proteasomalen Degradation kommt (Haruta *et al.*, 2000; Pederson, Kramer and Rondinone, 2001). So erfolgt die Phosphorylierung durch mTORC1 an den Serinresten 636/639 und durch die S6K an den Serinresten 270/307/636/1001 (Rozengurt, Soares and Sinnet-Smith, 2015) (siehe Abbildung 6). Es wurden inzwischen verschiedene E3-Ubiquitin-Ligasen entdeckt, die für die IRS-1-Ubiquitinierung verantwortlich zu sein scheinen (Yoneyama *et al.*, 2018). Auch wurde gezeigt, dass die aktivierte S6K über einen noch weitestgehend unbekanntem Mechanismus zugleich auch die Expression von IRS-1 herunterreguliert (Harrington *et al.*, 2004).

Die limitierten Therapieerfolge der Rapaloga trieben die Entwicklung der zweiten Generation der mTOR-Inhibitoren voran. Es handelt sich um ATP-kompetitive mTOR-Kinase-Inhibitoren mit dem Vorteil, dass sie die Kinaseaktivität von mTORC1 und mTORC2 hemmen. Aufgrund der Ähnlichkeit der KD von mTOR und den PI3Ks inhibieren einige dieser Inhibitoren auch die PI3K und verhindern die durch Wegfall der intrinsischen *feedback*-Schleife bedingte vermehrte Aktivierung von AKT. Auch, wenn erste vorklinische Phase-I-Studien bessere Resultate als mit Inhibitoren der ersten Generation lieferten, so ist die Anwendung dieser Inhibitoren aufgrund dosislimitierender Toxizitäten stark eingeschränkt (Matter *et al.*, 2014). Auch Resistenzmechanismen wurden beobachtet (Renna, 2016).

Die enttäuschenden Resultate ließen eine Erweiterung des Anwendungsbereiches der Rapaloga für weitere Indikationen nicht zu. Um die vielen Vorteile dieser Wirkstoffe, wie die hohe Spezifität, die wenigen Nebenwirkungen und die bereits vorhandene klinische Zulassung nutzen zu können, wurde dazu übergegangen Studien durchzuführen, im Rahmen derer Rapaloga in Kombination mit anderen Therapeutika eingesetzt werden, z.B. mit AKT-Inhibitoren (Matter *et al.*, 2014).

1.6 Der AKT-Inhibitor MK-2206

Es lassen sich drei verschiedene Gruppen von AKT-Inhibitoren unterscheiden (siehe Abbildung 7).

Die ATP-kompetitiven Inhibitoren sind pan-AKT-Inhibitoren, haben die ATP-Bindetasche der KD als Zielstruktur und binden an die aktive „PH-*out*“-Konformation von AKT. Allerdings verfügen sie aufgrund des hohen Grads an Homologie der KDs aller Kinasen der AGC-Superfamilie über eine geringe Selektivität (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014), weshalb die Entwicklung dieser Inhibitoren nicht weiter verfolgt wurde (Yun, 2010). Interessanterweise kommt es durch Inhibition der AKT-Kinaseaktivität zur sog. „paradoxen AKT-Hyperphosphorylierung“. Diese beruht

nicht, wie unter Rapamycin-Therapie beobachtet, auf dem Wegfall der mTORC1/S6K-vermittelten negativen *feedback*-Schleife (Han *et al.*, 2007; Okuzumi *et al.*, 2010). Es ist nicht vollständig geklärt, wie die Hyperphosphorylierung zustande kommt. So wird u.a. angenommen, dass die Besetzung der ATP-Bindetasche zu einer intramolekularen Interaktion von phospho-T308 (AKT1) bzw. phospho-T309 (AKT2) mit zwei Resten in der katalytischen Tasche von AKT führt, wodurch der Zugang der PP2A zum phospho-T308 bzw. phospho-T309 blockiert wird (Chan *et al.*, 2011). Ein Beispiel in der Anwendung eines kompetitiven Inhibitors ist Imatinib, das die BCR-ABL-Kinase bei der CML inhibiert (Yun, 2010).

Die Zielstruktur der PH-Domäne-Inhibitoren ist die PH-Domäne von AKT in seiner aktiven „PH-out“-Konformation, wodurch die Bindung von PIP₃ an AKT und somit dessen Aktivierung verhindert wird. Allerdings können potentiell auch andere Moleküle mit PH-Domänen als Zielstrukturen erkannt werden, womit auch bei dieser Gruppe von Inhibitoren eine geringe Selektivität gegeben ist (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014). Allosterische AKT-Inhibitoren binden distal der ATP-Bindetasche an die PH-Domäne und an die KD und stabilisieren das Molekül in seiner inaktiven „PH-in“-Konformation. Dadurch kann PIP₃ nicht binden. Es kommt zu einer Inhibition seiner Phosphorylierung durch die PDK1 und mTORC2 und zur Inhibition seiner Kinaseaktivität. Diese Strategie verspricht eine erhöhte Spezifität und geringere Toxizität (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014).

Zu den allosterischen AKT-Inhibitoren zählt MK-2206. Es handelt sich um einen oral verabreichten Wirkstoff, der als pan-AKT-Inhibitor alle drei AKT-Isoformen hemmt, wobei seine Potenz gegen das humane AKT3 geringer ist als gegen AKT1 und AKT2 (Hirai *et al.*, 2010). Bei MK-2206 handelt es sich um den klinisch am weitesten entwickelten allosterischen AKT-Inhibitor. Klinische Studien zeigten, dass MK-2206 zwar sehr gut vertragen wird (Kumar Pal *et al.*, 2011; Yap *et al.*, 2011), doch aufgrund der limitierten antitumorösen Effekte, die unter MK-2206-Monotherapie im Rahmen von Phase-II-Studien beobachtet wurden, wurde der Fokus vermehrt auf Kombinationstherapien gelegt (Brown and Banerji, 2017).

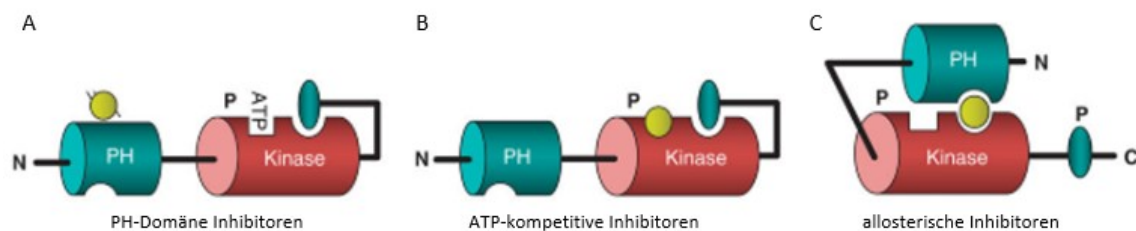


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der verschiedenen AKT-Inhibitoren. (A) PH-Domäne Inhibitoren binden an die PH-Domäne und verhindern dadurch die Bindung von PIP₃. (B) ATP-kompetitive Inhibitoren binden an die ATP-Bindetasche und stabilisieren AKT in seiner „PH-out“-Konformation. (C) Allosterische Inhibitoren binden an die PH-Domäne und die KD und stabilisieren AKT in seiner „PH-in“-Konformation, wodurch sowohl ihre Kinaseaktivität als auch ihre Aktivierung gehemmt wird (modifiziert nach Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014).

1.7 Ziele der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine kombinatorische Therapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem pan-AKT Inhibitor MK-2206 sowohl *in vitro* als auch in einem subkutanen Xenograft-Mausmodell *in vivo* einen synergistischen Hemmeffekt auf die Proliferation von HCC- und Cholangiokarzinom-Zellen zur Folge hat (Grabinski *et al.*, 2012; Ewald *et al.*, 2013). Auf Basis dieser Ergebnisse erforscht unsere Arbeitsgruppe die Wirkung einer RAD001/MK-2206-Therapie auf orthotope Maustumoren, die mit primären aus dem Tumor von HCC-Patienten angereicherten EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ generiert wurden. Die in der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen wurden im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführt. Es lassen sich im Wesentlichen drei übergeordnete Ziele dieser Arbeit abgrenzen:

1. Zunächst sollte untersucht werden, ob auch bei orthotoper Transplantation der Luciferase-exprimierenden HCC-Zelllinie Huh7-Luc eine Hemmung der Zellproliferation unter RAD001/MK2206-Therapie beobachtet werden kann. In einem Vorversuch sollte zunächst die Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber RAD001 und MK-2206 *in vitro* mittels Western Blot-Analysen untersucht werden. Nach orthotoper Injektion der Zellen durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa in die Maus sollte dann die Wirkung einer RAD001/MK2206-Therapie auf das Tumorstadium *in vivo* mittels BLI verfolgt werden. Als Teil dieser Arbeit sollte die Auswertung und Analyse der Biolumineszenzmessungen erfolgen. Um die Wirkung der Inhibitoren auf ausgewählte Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zu untersuchen, sollten zudem Western Blot-Analysen mit aus dem Tumorgewebe hergestellten Proteinlysaten durchgeführt werden.
2. Werden primäre HCC-Zellen zur Generierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells verwendet, ist ein nicht-invasives Monitoring der Tumorstadium mittels BLI nicht möglich. Aus diesem Grund sollte von PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe ein orthotopes HCC-Xenograft-Mausmodell mit Huh7-Luc-Zellen etabliert und die Tumorstadium mittels unterschiedlicher nicht-invasiver Messmethoden verfolgt werden. Als Teil dieser Arbeit sollte die Auswertung der aus diesen Versuchen erhobenen Daten erfolgen und analysiert werden, ob die Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) im Serum der Mäuse als alternative, nicht-invasive Methode für das *in vivo*-Monitoring des Tumorstadiums geeignet ist.
3. Durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa sollte ein orthotopes Xenograft-Mausmodell mit aus primärem HCC-Gewebe isolierten CD90⁺- und EpCAM⁺-Tumorstadiumzellen (TSZ) etabliert werden, um auch hier eine kombinatorische Therapie mit RAD001 und MK-2206 durchzuführen. Die Anreicherung der TSZ sollte nach Herstellung einer Einzelzellsuspension mittels MACS erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieses Vorgehen zunächst durch verschiedene Vorversuche näher untersucht werden, um dann die Aufarbeitung einer ersten Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus vorzunehmen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

| | |
|--|---------------------|
| Autoklav Evo 120 | MediTech |
| Blotkammer Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell | Bio-Rad |
| Brutschrank für Zellkultur | Heraeus |
| Dewargefäß | KGW Isotherm |
| Durchflusszytometer | |
| CytoFLEX S | Beckman Coulter |
| BD FACS Canto II | Becton Dickinson |
| Feinwaage UniBloc | Shimadzu |
| Gelelektrophoresekammer SE 600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit, 18x16 cm ² | Hoefer |
| gentleMACS Dissociator | Miltenyi Biotec |
| Gewebehomogenisator FastPrep-24 | MP Biomedicals |
| Horizontalschüttler Rocky N | Fröbel Labortechnik |
| Luminescent Image Analyzer LAS-3000 | Fujifilm |
| Magnetrührer MR 3001K | Heidolph |
| MACS Magnetständer | Miltenyi Biotec |
| MACS Separatoren | |
| MidiMACS Separator | Miltenyi Biotec |
| QuadroMACS Separator | Miltenyi Biotec |
| Mikroskope | |
| Labovert | Leitz |
| Axiovert 25 | Zeiss |
| Mikrotiterplattenleser Infinite M200 | Tecan |
| pH-Meter CG 820 | Schott-Geräte |
| pH-Elektrode SenTix 21 | WTW |
| Pipetten | |
| Model Reference 0,5-10 µl | Eppendorf Research |
| Model Reference 2-20 µl | Eppendorf Research |
| Model Reference 10-100 µl | Eppendorf Research |
| Model Reference 20-200 µl | Eppendorf Research |
| Model Reference 100-1000 µl | Eppendorf Research |

| | |
|---|------------------------|
| Pipettierhilfen | |
| accu-jet | Brand |
| Pipetus-akku | Hirschmann Laborgeräte |
| Reinstwassersystem Synergy UV | Millipore |
| Sicherheitswerkbank Klasse II HERA safe | Heraeus |
| Type HS 12 | |
| Stromversorgungsgeräte | |
| PowerPac 200 | Bio-Rad |
| PowerPac Universal | Bio-Rad |
| Tube Rotator MACSmix | Miltenyi Biotec |
| Vortexer MS2 Minishaker | IKA-Werk |
| Waage Type PM 2000 | Mettler |
| Wasserbäder | |
| Typ 1012 | GFL |
| Typ 1002 | GFL |
| Zählkammer | Neubauer |
| Zentrifugen | |
| Varifuge 3.0R | Heraeus |
| Tischzentrifuge 5415D | Eppendorf |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|--|
| Deckgläschen | Laboratory Glassware, Marienfeld-Superior |
| Einmalpipetten | |
| 5 ml | BD Falcon |
| 10 ml | BD Falcon |
| 25 ml | BD Falcon |
| FACS-Röhrchen 5,0 ml | Falcon |
| Filterpapier 460 x 570 mm | GE Healthcare Whatman |
| gentleMACS C-tubes | Miltenyi Biotec |
| Glasgeräte | Schott |
| Kanülen 0,90 x 40 mm | Braun |
| Kryoröhrchen 2,0 ml | Greiner bio-one |
| Kulturplatten | |
| 6-Well | Greiner bio-one |
| 96-Well Ultra low attachment Platten (ULA), Costar 7007 | Sigma-Aldrich |
| Lysing Matrix D-tubes | MP Biomedicals |

| | |
|--|--|
| MACS Smart Strainers 70 µm und 30 µm | |
| 70 µm | Miltenyi Biotec |
| 30 µm | Miltenyi Biotec |
| MACS Separation LS Columns | Miltenyi Biotec |
| Mikrotiterplatten | Greiner bio-one |
| Nitrozellulosemembran | GE Healthcare |
| Objektträger | Laboratory Glassware, Superior-Marienfeld |
| Parafilm M | Pechiney Plastic Packaging |
| Petrischalen 10 cm | Sarstedt |
| Pipettenspitzen | |
| 10 µl | Eppendorf |
| 200 µl | Eppendorf |
| 1000 µl | Eppendorf |
| Probenröhrchen mit Schraubverschluss aus Polypropylen | |
| 15 ml | Sarstedt |
| 50 ml | Sarstedt |
| Reaktionsgefäße aus Polypropylen | |
| 1,5 ml | Eppendorf |
| 2,0 ml | Eppendorf |
| Spritzen 20 ml | Braun |
| Sterilfilter 0,22 µm | Millipore |
| Zellkulturflaschen für adhärente Zellen | |
| 50 ml/25 cm ² Cellstar | Greiner bio-one |
| 250 ml/75 cm ² Cellstar | Greiner bio-one |

2.1.3 Antikörper

| | |
|---|---------------------------|
| Phospho-AKT (Ser473) (D9E) XP [®] Rabbit mAb (#4060) | Cell Signaling Technology |
| Phospho-AKT (Thr308) (D25E6) XP [®] Rabbit mAb (#13038) | Cell Signaling Technology |
| AKT1 (C73H10) Rabbit mAb (#2938) | Cell Signaling Technology |
| AKT2 (5B5) Rabbit mAb (#2964) | Cell Signaling Technology |
| Anti-AKT3/PKBy Antibody, clone GMA 104 | Merck Millipore |
| AKT (pan) (11E7) Rabbit mAb (#4685) | Cell Signaling Technology |
| pGSK-3α/β (Ser 21/9) (37F11) Rabbit | Cell Signaling Technology |
| Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP [®] Rabbit mAb | Cell Signaling Technology |
| Phospho-mTOR (Ser2481) Antibody (#2974) | Cell Signaling Technology |
| mTOR (7C10) Rabbit mAb (#2983) | Cell Signaling Technology |
| Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244) (D68F8) XP [®] Rabbit mAb (#5364) | Cell Signaling Technology |

| | |
|---|---------------------------|
| Phospho-IRS-1 (Ser636/639) Antibody (#2388) | Cell Signaling Technology |
| IRS-1 Antibody (#2382) | Cell Signaling Technology |
| HSC-70 Antibody (B-6): sc-7298, mouse | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody Lot 33 | Cell Signaling Technology |
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody Lot 27 | Cell Signaling Technology |
| CD326 (EpCAM)-PE antibodies, recombinant human IgG1 (clone REA764) | Miltenyi Biotec |
| CD326 (EpCAM)-APC antibodies, recombinant human IgG1 (clone REA764) | Miltenyi Biotec |
| REA Control (S) antibodies APC (clone REA293) | Miltenyi Biotec |
| REA Control (S) antibodies PE (clone REA293) | Miltenyi Biotec |
| CD90-APC antibodies, recombinant human IgG1 (clone REA897) | Miltenyi Biotec |
| FcR Blocking Reagent, human | Miltenyi Biotec |

2.1.4 MicroBeads

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| CD326 (EpCAM) MicroBeads, human | Miltenyi Biotec |
| CD90 MicroBeads, human | Miltenyi Biotec |

2.1.5 Inhibitoren

| | |
|---------|-------------------|
| MK-2206 | Selleck Chemicals |
| RAD001 | Novartis |

2.1.6 Kits und Reagenzien

| | |
|---|-----------------|
| DC-Protein Assay | Bio-Rad |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Honeywell |
| ECL-Detektionsreagenzien | |
| SuperSignal West Pico PLUS | Thermo Fisher |
| Chemiluminescent Substrate | |
| SuperSignal West Dura Extended | Thermo Fischer |
| Duration Substrate | |
| FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD | BioLegend |
| Human Dissociation Kit | Miltenyi Biotec |
| Kollagen Typ IV aus menschlicher Placenta | Sigma-Aldrich |

Matrigel
Trypanblau-Lösung
Trypsin/EDTA in PBS

Corning Life Sciences
Sigma-Aldrich
Biochrom

2.1.7 Zellkulturreagenzien (Medien und Zusätze)

Dulbecco's modied Eagle Medium (DMEM)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640
Medium
fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS)
Penicillin/Streptomycin (P/S)-Lösung
Puromycin

GIBCO, Invitrogen
GIBCO, Invitrogen
GIBCO, Invitrogen
GIBICO, Invitrogen
Sigma-Aldrich

2.1.8 Puffer, Lösungen und Medien

Für die Herstellung der Proteinlysate:

| | | |
|------------------|--------|-----------------------|
| NP40-Lyse Puffer | 50 mM | Hepes, pH 7,5 |
| | 150 mM | NaCl |
| | 5 m | NaCl |
| | 1% | NP40 |
| | 2 mM | EDTA |
| | 50 mM | NaF |
| | 10 mM | NaPPi |
| | 10% | Glycerin |
| | 2% | Aprotinin |
| | 1 mM | Natrium-Ortho-Vanadat |
| | 1 mM | Pefabloc |

Für die Zellkultur:

| | | |
|----------------------------|---------|-------------|
| Vollmedium (Huh7-Parental) | | DMEM Medium |
| | 10% | FCS |
| | 1% | P/S |
| Vollmedium (Huh7-Luc) | | DMEM Medium |
| | 10% | FCS |
| | 1% | P/S |
| | 2 µg/ml | Puromycin |

| | | |
|--|-------------|----------------------------------|
| Vollmedium (SK-Hep-1) | 20% | RPMI Medium |
| | 1% | FCS |
| | | P/S |
| 1 x PBS, pH 7,4 | 137 mM | NaCl |
| | 27 mM | KCl |
| | 100 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| | 18 mM | KH ₂ PO ₄ |
| | | pH mit NaOH eingestellt |
| Einfriermedium | 90% | FCS |
| | 10% | DMSO |
| <u>Für MACS und FACS:</u> | | |
| MACS/FACS-Buffer | | PBS, pH 7,2 |
| | 2 mM | EDTA |
| | 0,5% | BSA |
| <u>Für die Aufarbeitung des primären Tumorgewebes:</u> | | |
| Erylysepuffer | 0,16 M | NH ₄ Cl |
| | 0,17 M | Tris, pH 7,6 |
| | | auf pH 7,2 einstellen |
| <u>Für die Protein-Gelelektrophorese:</u> | | |
| Trenngel | 8-12% | Acrylamid |
| | 0,2% | N,N'- |
| | | Methylenbisacrylamid |
| | 375 mM | Tris/HCl |
| | 0,1% (w/v) | SDS, pH 8,8 |
| | 0,07% (v/v) | TEMED |
| | 0,07% (w/v) | APS |
| Sammelgel | 375 mM | Tris/HCl |
| | 4% | Acrylamid |
| | 0,1% | N,N'- |
| | | Methylenbisacrylamid |
| | 0,1% (w/v) | SDS, pH 6,7 |
| | 0,07% (v/v) | TEMED |
| | 0,14% (w/v) | APS |

| | | |
|---------------------|--|---|
| SDS-PAGE Laufpuffer | 25 mM 0,1% 192 mM | Tris SDS Glycin |
| 3x Ladepuffer | 0,18 M 6% (w/v) 30% 0,001% (w/v) | Tris SDS Glycerin Bromphenolblau, pH 6,8 |
| 1x Ladepuffer | 0,0625 M 10% (w/v) 10% 0,001% (w/v) | Tris SDS Glycerin Bromphenolblau, pH 6,8 |

Für den Western Blot:

| | | |
|----------------|---|--|
| Transferpuffer | 192 mM 25 mM 0,1% (w/v) 20% (v/v) | Glycin Tris SDS Methanol |
| Blockierlösung | 144 mM 10 mM 0,5% (v/v) 5% (w/v) | NaCl Tris, pH 8 Tween 20 Magermilchpulver |
| Waschlösung | 144 mM 10 mM 0,5% (v/v) 2,5% (w/v) | NaCl Tris, pH 8 Tween 20 Magermilchpulver |
| TBS-Tween | 144 mM 10 mM 0,5% (v/v) | NaCl Tris, pH 8 Tween 20 |

2.1.9 Zelllinien

Bei der SK-Hep-1-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie, die 1971 aus dem Aszites eines am Adenokarzinom erkrankten Kaukasiers etabliert wurde. Die Zellen sind epithelialen Ursprungs und weisen ein adhärentes Wachstumsverhalten auf (Heffelfinger *et al.*, 1992).

Bei der Huh7-Zelllinie handelt es sich um eine humane, adhärent und als Monolayer wachsende Zelllinie, die im Jahre 1982 aus dem HCC eines 57-jährigen Japaners etabliert wurde (Nakabayashi *et al.*, 1982).

Die die Luciferase-exprimierenden Huh7-Luc-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Stefan Horn (Zentrum für Onkologie und Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Mausstämme

Die orthotope Injektion der HCC-Zellen erfolgte in 3-4 Monate alte männliche NOD *scid gamma* mouse (NSG)-Mäuse. Die Injektion der Huh7-Luc-Zellen erfolgte in NOD.Cg (2687)-Mäuse. Die Injektion humaner HCC-Zellen erfolgte in NOD/Cg-Prkdcscid-Mäuse. Die Mäuse wurden freundlicherweise vom Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie (UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.11 Patientenmaterial

Das Patientenmaterial stammt von einem HBV- und HCV-negativen HCC-Patienten und wurde freundlicherweise von PD Dr. med. Jun Li (Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.12 Software

| | |
|---|------------------------|
| Axiovision Rel. 4.8 | Carl Zeiss Microscopy |
| CytExpert 2.1 | Beckman Coulter |
| GraphPAD Prism 4.0 | GraphPad Software Inc. |
| ImageJ 1.51f | Rasband |
| Image Reader LAS-3000 | Fujifilm |
| Living Image Software 4.0 | Caliper Life Sciences |
| AIDA Image Analyzer 3.44 | Raytest-Image Quant |
| Mendeley Desktop 1.15.3 | Mendeley |
| Microsoft Office Home and Student 2016 (Word, Excel, Powerpoint) | Microsoft |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten, die eine konkrete Gefahr der Zellkontamination darstellten, erfolgten in keimarmer Atmosphäre unter einer sterilen Sicherheitswerkbank der Sicherheitsstufe 2. Alle Arbeitsflächen, Geräte sowie Hilfsmittel wurden zuvor mit einer 70%igen Ethanollösung desinfiziert. Alle verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder, sofern nicht thermolabil, bei 12°C und 1,21 bar autoklaviert.

2.2.1.1 Kultivierung der adhärennten Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in belüfteten T25-Kulturflaschen (25 cm²) oder T75-Kulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank gelagert. Die Huh7-Parental-Zellen und Huh7-Luc-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. Dem Medium für die Huh7-Luc-Zellen wurde zur Selektion der die Luciferase stabil exprimierenden Zellen Puromycin in einer Konzentration von 2 µl/ml zugegeben. Die Kultivierung der SK-Hep-1-Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 20% FCS und 1% P/S. Bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80% erfolgte nach Bedarf circa alle 2-3 Tage ein Wechsel des Mediums. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Pipette abgenommen und durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Für das Passagieren bei einer Konfluenz von circa 80% wurde zunächst das alte Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurde im Anschluss 3 ml Trypsin/EDTA über den Zellrasen gegeben. Nach einer dreiminütigen Inkubation im

Brutschrank wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinreaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in Lösung gebracht und verbleibende akkumulierte Zellen weiter vereinzelt. Für die Reduktion der Zellzahl (Passagieren im Verhältnis 1:3) wurden 4 ml der Suspension aus der Kulturflasche entnommen und entweder verworfen oder für weitere Experimente verwendet. Den verbleibenden 2 ml wurden 8 ml frisches Medium beigegeben und die Kulturflasche zur Kultivierung in den Brutschrank zurückgestellt.

2.2.1.2 Kultivierung der primären Tumorzellen

Die nicht-angereicherten Zellen wurden in belüfteten T25-Kulturflaschen (25 cm²) oder T75-Kulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank gelagert. Die Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS und 1% P/S kultiviert. Zur Untersuchung idealer Kulturbedingungen für die primären Tumorzellen wurden Aliquots von Zellen auch in mit Kollagen beschichteten T25-Kulturflaschen ausplattiert. Hierfür wurde vor der Ausplattierung eine Beschichtung der T25-Kulturflaschen mit 0,01%iger Kollagen Typ IV-Lösung vorgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Kollagenlösung wurde der Flaschenboden durch langsames Schwenken benetzt und jede Flasche im Anschluss für 5 min zum Antrocknen Beiseite gestellt. Danach wurde der Überschuss abgenommen und die Flasche mit nur leicht angedrehtem Deckel bei 37°C und 5% CO₂ zum vollständigen Trocknen im Inkubator gelagert. Vor jeder Ausplattierung wurde der Flaschenboden zur Entfernung von Säureresten mit etwas Medium gewaschen. Alle 2 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.1.3 Beurteilung der Morphologie der Zellen

Um die Morphologie der Zellen zu beurteilen, wurde zunächst das alte Medium abgenommen. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. So wurden abgestorbene Zellen und Zellreste entfernt. Mit einem mit einer Kamera ausgestatteten Lichtmikroskop konnte die Morphologie der Zellen beurteilt und fotografisch dokumentiert werden.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,1 mm; 0,0025 mm²). Zur Unterscheidung zwischen

lebenden und toten Zellen wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Tote Zellen werden dadurch aufgrund ihrer nicht intakten Zellmembran binnen kurzer Zeit angefärbt, während lebende Zellen den Farbstoff erst nach längerer Inkubationszeit aufnehmen. Für die Färbung wurden 10 µl Trypanblaulösung mit 10 µl der homogen durchmischten Zellsuspension vermischt (1:2 Verdünnung) und davon wiederum 10 µl unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert. Die Zählung erfolgte in den vier Großquadranten. Zur Berechnung der Zellzahl wurde zunächst der Mittelwert aus den vier Quadranten gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Durch anschließende Multiplikation mit 10^4 ergab sich die Zellzahl pro ml.

2.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium bestehend aus einer Mischung von 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert, in 1 ml-Kryoröhrchen gefüllt und in vorgekühlten Einfrierbehältern bei -80°C langsam eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung erfolgte nach 24 h die Umlagerung in den Stickstofftank.

2.2.1.6 Auftauen von Zellen

Nach Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Kryoröhrchen sogleich auf Eis gelagert und in einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt, bis der komplette Inhalt bis auf einen kleinen Eiskern aufgetaut war. Die Zellen wurden sodann unverzüglich in 7,5 ml Medium aufgenommen. Nach anschließender 7-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt und in den Brutschrank gestellt.

2.2.1.7 Einfrieren von Gewebeproben

Gewebestückchen wurden in ein Kryoröhrchen gegeben, das dann für circa 10 Sekunden in ein mit Flüssigstickstoff gefülltes Dewargefäß gehalten wurde. Im Anschluss wurde das Röhrchen in eine vorgekühlte Einfrierhilfe gestellt und dann bei -80°C in der Gefriertruhe gelagert und für die längerfristige Lagerung in den Stickstofftank überführt.

2.2.1.8 Erylyse

Zur Beseitigung der Erythrozyten aus dem frischen Tumorgewebe wurde eine Erylyse durchgeführt. Zur Herstellung des Erylysepuffers wurden zunächst eine 0,16 M Ammoniumchlorid (NH₄Cl)-Lösung und 1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) (pH 7,6) hergestellt. Dann wurden Tris und NH₄Cl in einem Verhältnis von 1:9 gemischt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Für die Erylyse erfolgte eine Resuspension der Zellen mit 50 ml des Erylysepuffers und eine anschließende Inkubation für 10 min bei RT. Danach wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen. Dabei wurde jeweils für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Zellpellet mit einem geeigneten Volumen MACS-Puffer resuspendiert und mit der Zellzählung fortgefahren.

2.2.1.9 Fixierung von Zellen

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Paraformaldehyd (PFA). PFA bindet kovalent an Aminogruppen und bewirkt so eine Quervernetzung benachbarter Proteine. Durch die Fixierung werden alle zellulären Lebensvorgänge gestoppt und dadurch größere strukturelle Veränderungen verhindert. Zunächst wurden 1-2 ml 4%iges PFA auf das Zellpellet pipettiert und bei 37°C für 10 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte dabei bei 1400 rpm für je 7 min.

2.2.1.10 Behandlung von Zellen mit RAD001 und MK-2206

Zwei Tage vor Zugabe der Inhibitoren wurden die Zellen in insgesamt acht 10 cm Schalen ausplattiert, mit 10 ml Medium mit Zusätzen und bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am Tag der Zugabe der Inhibitoren erfolgte die Herstellung der Stockansätze mit einem Gesamtvolumen von je 10 ml. Für den RAD001-Ansatz wurden 20 µl des Inhibitors mit einer Konzentration von 1000 µM und für den MK-2206-Ansatz 20 µl des Inhibitors mit einer Konzentration von 5000 µM in 9980 µl Medium pipettiert. Für die Herstellung des Stockansatzes der Kombinationstherapie wurden jeweils 10 µl der Inhibitoren allerdings mit doppelter Konzentration, d.h. der RAD001-Inhibitor in einer Konzentration von 2000 µM und der MK-2206 in einer Konzentration von 10.000 µM, in 9980 µl Medium pipettiert. Für den Stock der Negativkontrollen wurden 20 µl DMSO als Lösungsmittelkontrolle zu 9980 µl Medium gegeben. Von jedem Ansatz wurden 5 ml auf die entsprechende Schale pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 48 h und 3 h vor Herstellung der Proteinlysate erfolgte eine erneute Zugabe der Inhibitoren.

2.2.1.11 Anreicherung der EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ mittels magnetisch aktivierter Zellseparation (MACS)

Zur Anreicherung der EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ aus einem Zellgemisch wurde die Methode der magnetisch aktivierten Zellseparation (*magnetic activated cell sorting*, MACS) angewendet.

Allgemeines Prinzip: Mittels MACS lassen sich bestimmte Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenproteine aus einem heterogenen Zellgemisch isolieren. Zunächst erfolgt eine Markierung der Zielzellen über monoklonale Antikörper an die superparamagnetische, circa 50 nm kleine Partikel, sog. MicroBeads, gekoppelt sind. Es lassen sich das direkte und das indirekte magnetische *labeling* unterscheiden. Bei letzterem sind zwei Schritte nötig. Zunächst werden die Zellen mit einem primären Antikörper, der direkt gegen das Oberflächenantigen gerichtet ist inkubiert und erst im zweiten Schritt werden die Zellen mit den MicroBeads markiert. Die Zellsuspension wird dann über eine Trennsäule mit einer Matrix aus ferromagnetischen *spheres* gegeben. Die Säule wird in einen magnetischen Separator, dem MACS-Separator, mit Permanentmagnetfeld positioniert, sodass die nicht-markierten Zellen als negative Fraktion (sog. Depletion) die Säule passieren, während die markierten Zellen haften bleiben. Nach Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld kann die so angereicherte positive Selektion mit Hilfe eines Stempels eluiert werden (siehe Abbildung 8). Die MicroBeads bestehen aus einer biologisch abbaubaren Matrix, die nach ein paar Tagen in Kultur abgebaut wird. Sie müssen nach dem Separationsprozess nicht entfernt werden. Normalerweise verändern sie weder Struktur, Funktion noch Aktivität der markierten Zellen und beeinflussen nachfolgende Experimente nicht (Miltenyi Biotec, 2010). Aufgrund ihrer kleinen Partikelgröße und der verwendeten Konzentration sättigen die MicroBeads die Epitope nicht komplett (es werden nur 1/3 der Epitope besetzt) und es bleiben noch ausreichend Epitope für eine gleichzeitige Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern übrig (Miltenyi Biotec, 2016).

Durchführung: Zunächst erfolgte das direkte magnetische *labeling* der Zellen mit den MicroBeads. Nach Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet aus maximal $1 \cdot 10^7$ Zellen in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Bei der Färbung primärer Tumorzellen wurde nun 100 μ l eines FcR-Blocking Reagenzes zugegeben, um eine Fc-Rezeptor-vermittelte Färbung zu verhindern. Im Anschluss wurden 20 μ l CD326 (EpCAM)-MicroBeads oder CD90-MicroBeads hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 4-8°C, bei der EpCAM-Färbung für 30 min und bei der CD90-Färbung für 15 min. Die Zellen wurden dann mit 1-2 ml MACS-Puffer gewaschen und dabei mit 1400 rpm für 5 min zentrifugiert, um nach Abnahme des Überstandes in 500 μ l MACS-Puffer für die anschließende magnetische Separation resuspendiert zu werden. Es folgte die magnetische Separation mittels LS-Säulen, deren Kapazität für maximal $2 \cdot 10^9$ Zellen insgesamt und höchstens $1 \cdot 10^8$ markierte Zellen geeignet ist. Diese Säulen wurden in das magnetische Feld des MACS-Separators gesteckt und ein 15 ml

Probenröhrchen unter jeder Säule positioniert. Zunächst wurden die Säulen mit 2 ml MACS-Puffer äquilibriert und im Anschluss die Zellsuspension über die Säulen gegeben. Nach dem Durchlaufen der Suspension erfolgte ein dreimaliges Waschen jeder Säule durch Zugabe von jeweils 3 ml MACS-Puffer. Am Ende wurden die Säulchen aus dem Separator genommen und auf ein neues 15 ml Probenröhrchen positioniert. Es wurden 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben und durch zügiges Herunterdrücken des Stempels die markierte Zellfraktion eluiert. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurde die positive Selektion ein zweites Mal über eine Säule laufen gelassen. Zur Bestimmung der Reinheit schloss sich eine durchflusszytometrische Analyse an.

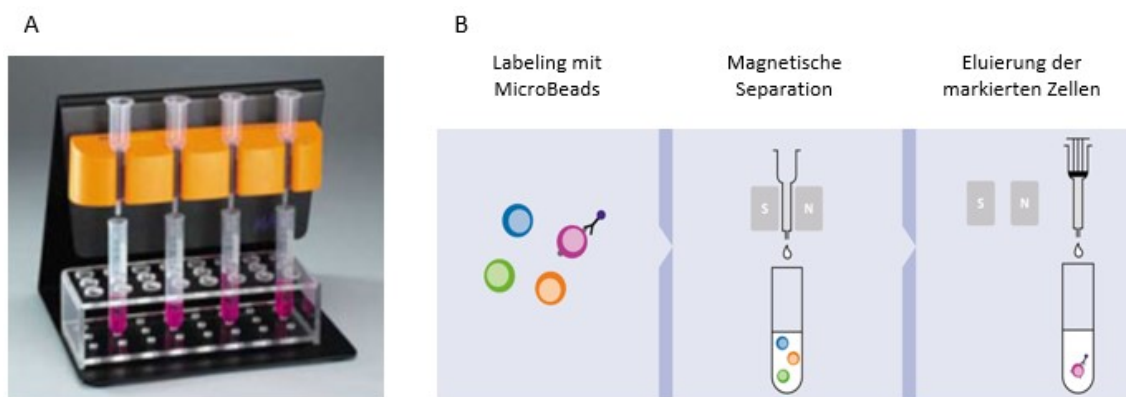


Abbildung 8: Versuchsaufbau und schematische Darstellung des Prinzips der magnetischen Zellseparation. (A) Die Apparatur bestand aus einer Trennsäule (Typ LS) mit einer Matrix aus ferromagnetischen *spheres*, die in den MACS-Separator, einer Halterung mit einem Permanentmagnetfeld, eingespannt wurden. Unter die Trennsäulchen wurden Röhrchen zum Auffangen der angereicherten Zellen positioniert. (B) Nach magnetischer Markierung der Zellen mit MicroBeads wurde die Zellsuspension über die Trennsäule gegeben. Die unmarkierten Zellen passierten die Säule ungehindert, während die markierten Zellen haften blieben. Nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld wurde die so angereicherte positive Selektion mit einem Stempel eluiert (modifiziert nach Miltenyi Biotec, 2012).

2.2.1.12 Vorbereitung der Zellen für die orthotope Injektion in die Maus

Nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität in der Neubauer-Zählkammer wurde je nach gewünschter Zellzahl, bei den Huh7-Luc-Zellen $1 \cdot 10^6$ Zellen und bei den primären HCC-Zellen in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Zellzahl, das entsprechende Volumen an Zellsuspension in ein frisches Probenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das injizierte Volumen pro Maus durfte ein Gesamtvolumen von 20 μl nicht überschreiten. Die Zellsuspension sollte in einem Verhältnis von 1:1 mit Matrigel vermengt werden, was pro Maus einem Volumen von je 10 μl Zellsuspension und 10 μl Matrigel entsprach. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet mit der gewünschten Menge PBS resuspendiert, in ein 1,2 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Vorbereitung der Matrigelaliquots in einem separaten 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die Arbeit erfolgte

auf Eis. Zur besseren Handhabung wurden Matrigel und Pipetten zuvor im Kühlschrank gelagert.

2.2.1.13 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Allgemeines Prinzip: Der Begriff „FACS“ ist der registrierte Markenname der Firma Becton Dickinson und steht für „*fluorescence activated cell sorting*“. Dieses Akronym ist an sich irreführend, da mit den Geräten heute meist keine Sortierungen durchgeführt werden, hat sich jedoch mittlerweile als Synonym für die Durchflusszytometrie etabliert (Tung *et al.*, 2007). Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Quantifizierung und molekularen Charakterisierung von Einzelzellen auf Basis ihrer Streulichteigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung (Rothe, 2007). Die Zellsuspension wird mit hohem Druck in den Hüllstrom (*sheath fluid*) injiziert, von einer Düse angesogen und vom Hüllstrom umgeben mittels Druckluft durch die Durchflusszelle gepresst. Der Hüllstrom wird mit einem höheren Druck angetrieben und fließt dadurch schneller als der Probenstrom. Dies führt zu einer hydrodynamischen Fokussierung des Probenstroms (siehe Abbildung 9A), der dadurch in die Länge gezogen und verjüngt wird, sodass die Zellen einzeln und „perlschnurartig“ hintereinander aufgereiht durch eine dünne Messkammer (*flow cell*) im rechten Winkel an einem gebündelten Laserstrahl vorbeiströmen. Über den Druck, mit dem die Probenflüssigkeit in den Hüllstrom injiziert wird, kann die Fließrate beeinflusst werden. Je höher dieser Druck, desto breiter der Flüssigkeitsstrahl und desto höher die Anzahl der Zellen, die pro Sekunde durch die Messkammer strömen. Das gestreute Licht wird durch zwei unterschiedlich positionierte Detektoren registriert. Mittels eines in der Verlängerung des anregenden Lasers befindlichen Detektors wird das in einem kleinen Winkel zum Laserstrahl abgelenkte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) als unscharfes bzw. grobes Maß der Größe einer Zelle detektiert. Der zweite Detektor befindet sich in einem Winkel von circa 90° zum anregenden Laser und detektiert das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) als Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel. Es werden so Informationen zur Granularität bzw. Komplexität des Zytoplasmas der Zelle erhalten (Rothe, 2007). Gleichzeitig können auch Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlänge wie die Eigenfluoreszenz aufgrund fluoreszierender Proteine wie GFP *green fluorescent protein* (GFP) oder mit Fluorochrom-konjugierte Antikörper detektiert werden. Werden die Elektronen eines Fluorochroms durch den Laser mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Absorptionsspektrum) angeregt, werden sie auf ein höheres Energielevel angehoben und fallen unter Energieabgabe in Form von Photonen einer höheren Wellenlänge (Emissionsspektrum) auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die emittierte Lichtmenge verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper. Die optischen Signale werden über Filter und Spiegel zu photosensitiven Detektoren geleitet, von einem Photomultiplier verstärkt und in elektrische Signale

umgewandelt, die an einen Computer zur Speicherung und Analyse weitergeleitet werden (Böhmler, 2011) (siehe Abbildung 9B).

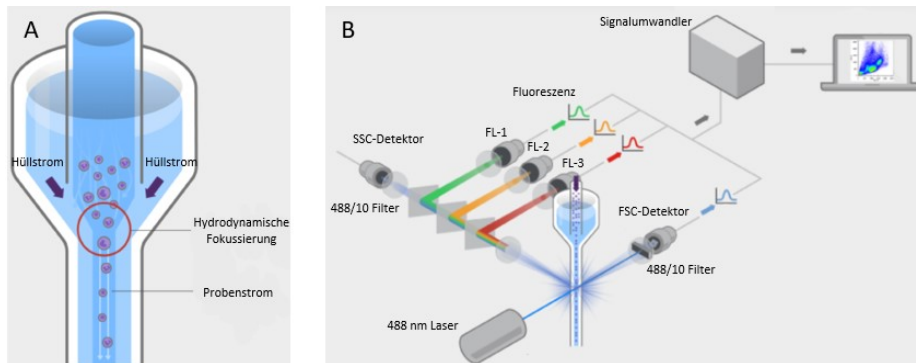


Abbildung 9: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung des Probenflusses und Aufbau des Durchflusszytometers. (A) Die Zellsuspension und der sie umgebende Hüllstrom (*sheath fluid*) werden mit Druckluft durch die Durchflusszelle gepresst. Der Hüllstrom wird mit einem höheren Druck angetrieben und fließt daher schneller. Er beschleunigt die Partikel, führt sie in die Mitte des Probenstroms und bewirkt so seine hydrodynamische Fokussierung, sodass die Partikel „perlschnurartig“ hintereinander aufgereiht durch die Messkammer strömen (modifiziert nach Thermo Fisher Scientific, no date a). **(B)** An der Stelle, an der Laserstrahl und Probenstrom sich kreuzen werden Fluoreszenzen angeregt und Licht gestreut. Die Detektion des *forward scatters* (FSC) liefert Informationen über die Größe der Partikel. Durch Farbteilerspiegel und Filter werden *side scatter* (SSC), als Maß für die Granularität, und Fluoreszenzen voneinander getrennt. Die Detektoren für die Fluoreszenz werden mit zunehmendem spektralem Abstand zum anregenden Licht aufsteigend nummeriert. Wird ein blau-grüner Argon-Laser (488 nm) verwendet, so detektiert z.B. der FL1-Detektor grünes Licht, der FL2-Detektor oranges Licht und der FL3-Detektor rotes Licht (modifiziert nach Thermo Fisher Scientific, no date b).

Emissionsspektren einzelner Fluorochrome können überlappen, sodass Zellen, obwohl nur mit einem Farbstoff markiert, Mischsignale auf zwei Detektoren erzeugen. Diese spektralen Überlappungen müssen daher zur Vermeidung falsch-positiver Messungen korrigiert werden. Hierfür werden optische Filter, sog. *bandpass* (BP)-Filter, eingesetzt. Der erste angegebene Wert gibt die Wellenlänge an, die den Filter zu 100% passiert, während der zweite Wert die Bandbreite angibt (50% Transmission). Die maximale Transmission eines BP-Filters 530/30 z.B. liegt bei 530 nm, während Licht einer Wellenlänge von 515-545 nm zu 50% transmittiert wird. Da jedoch BP-Filter nicht alle spektralen Überlappungen beseitigen können, ist nachträglich eine zusätzliche Korrektur durch elektronische Kompensation nötig (Rothe, 2007) (siehe Abbildung 10).

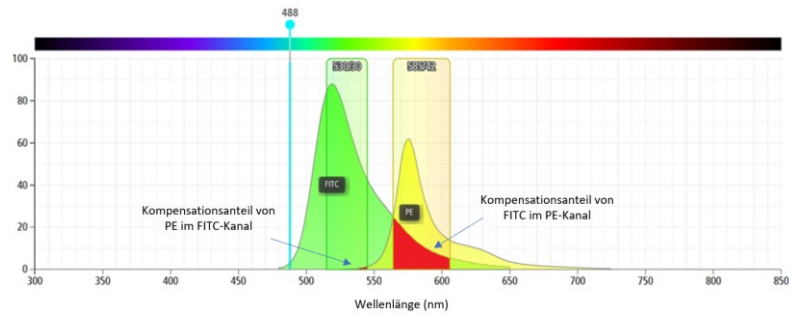


Abbildung 10: Überlappung von Fluoreszenzspektren. Dargestellt sind die Fluoreszenzspektren von Fluorescein Isothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) mit den jeweils zu kompensierenden Anteilen bei Anregung durch das blaue Licht eines Argon-Lasers (488 nm) und bei Verwendung der *bandpass* (BP)-Filter 530/30 für FITC und 585/42 für PE für die spektrale Trennung. Dabei zeigen sich spektrale Überlappungen. Die FITC-gefärbten Partikel sind positiv im PE-Kanal und umgekehrt. Unkompensiert wäre eine falsch-positive Population die Folge. Die Überlappung muss im Anschluss an die Messung durch rechnerische Kompensation korrigiert werden (modifiziert nach BD Biosciences, no date).

Die graphische Darstellung der Messwerte erfolgt in Form zweidimensionaler Punkt-Diagramme (*dotplots*) oder eindimensionaler Histogramme. Beim *dotplot* repräsentiert jeder Punkt ein Ereignis (*event*), das entsprechend seiner x- und y-Signalintensitäten eingetragen wurde. Die Achsenzuteilung ist frei wählbar. Meist wird im ersten Schritt ein *dotplot* erstellt, beim dem auf der x-Achse FSC und auf der y-Achse SSC aufgetragen sind. Ziel ist es, zunächst die interessierende Zellpopulation (P1) anhand ihrer Größe und Granularität durch das Setzen eines sog. *gates* zu definieren und nicht-interessierende Zellpopulationen und etwaige Zelltrümmer und Zellaggregate aus der weiteren Analyse auszuschließen. In weiteren *dotplots* kann diese Zellpopulationen anhand des Fluoreszenzsignals weiter in Oberflächenmarker-negative und Oberflächenmarker-positive Populationen (P2) untergliedert werden.

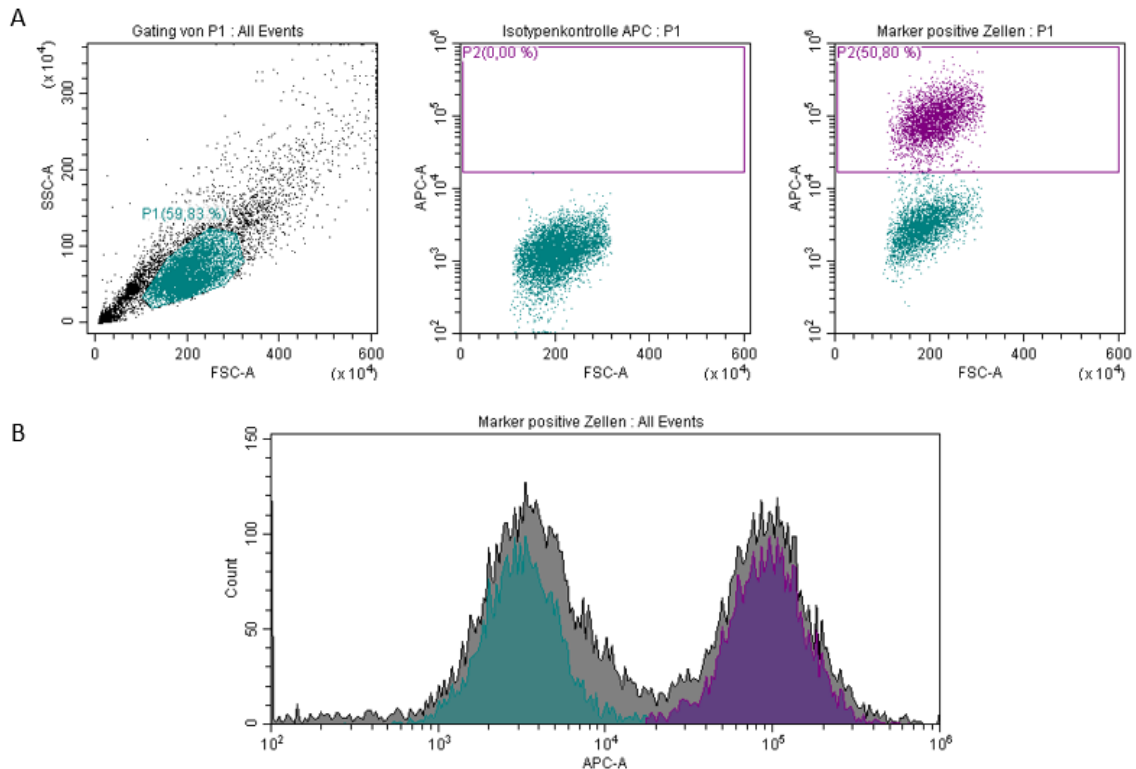


Abbildung 11: Prinzip des *gatings* anhand von *dotplots* und exemplarische Darstellung eines *Histogramms*. (A) Jeder Punkt entspricht einem *event*. Im ersten *dotplot* (links) sind Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) gegeneinander aufgetragen. Beide Parameter bestimmen die charakteristische Position verschiedener Zellpopulationen, Zelltrümmer und Zellaggregate im *dotplot*. Um die interessierende Zellpopulation wird zunächst das *gate* P1 gelegt. In einem zweiten *dotplot* (mittig) werden die detektierten Fluoreszenzsignale der Isotypenkontrolle bzw. ungefärbten Probe, die innerhalb der P1 durch unspezifische Bindungen bzw. Eigenfluoreszenz entstandenen sind, gegen FSC aufgetragen. Es wird dann durch Legen des *gates* P2 der Schwellenwert, ab dem eine Zelle positiv für den Marker ist, festgelegt. Im ganz rechten *dotplot* lässt sich deutlich die Marker-positive Zellpopulation P2 von den Marker-negativen Zellen abgrenzen. (B) Die in Abbildung 11A ausgewählten Zellpopulationen P1 (türkis) und P2 (lila) sind hier im Histogramm dargestellt. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der gezählten *events*.

Die weitere Analyse kann auch mit Hilfe eines sog. Histogramms erfolgen. Im Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung dargestellt. Es erfolgt eine eindimensionale Auftragung bei der Streulichtparameter oder die Fluoreszenzintensitäten gegen die Anzahl der gezählten Ereignisse aufgetragen werden.

Durchführung: Einzelne FACS-Messungen erfolgten anfänglich an einem BD FACSCanto II. Vorwiegend kam allerdings ein CytoFLEX S der Firma Beckman Coulter zum Einsatz. Das Gerät verfügt über vier Laser (375 nm, 405 nm, 488 nm, 638 nm) und 13 Fluoreszenzkanäle. Betrachtet wurden jeweils 10.000 *events* der angefärbten Proben. Die verwendeten Fluorochrome und ihre jeweiligen Absorptions- und Emissionsmaxima sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.

| Fluorochrom | Absorptionsmaximum | Emissionsmaximum |
|----------------------------------|--------------------|------------------|
| PE (Phycoerythrin) | 565 nm | 575 nm |
| APC (Allophycocyanin) | 652 nm | 660 nm |
| FITC (Fluorescein Isothiocyanat) | 498 nm | 517 nm |
| 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) | 548 nm | 648 nm |

Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit dem Programm CytExpert 2.1. Für die Oberflächenfärbung wurden nach Zellzählung Aliquots von maximal $1 \cdot 10^6$ Zellen gebildet, die nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1400 rpm in 98 μ l frisch angesetzten und steril filtrierten MACS-Puffer resuspendiert wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 2 μ l CD326 (EPCAM) PE bzw. APC oder CD90 APC Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen von der Fluoreszenz der PE- bzw. APC-markierten Zellen abgrenzen zu können, wurde stets ein ungefärbtes Aliquot gebildet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen, wurden parallel zudem Isotypenkontrollen durchgeführt. Hierfür wurden Antikörper vom gleichen Immunglobulin (Ig)-Isotyp wie dem des spezifischen Antikörpers verwendet, die zwar an dasselbe Fluorochrom gekoppelt, jedoch nicht gegen ein spezifisches Epitop gerichtet sind. Die Färbung mit den Isotypenkontrollen REA Control (S) APC bzw. PE erfolgte mit der gleichen Konzentration wie beim spezifischen Antikörper. Nach 10-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 2-8°C wurden die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer gewaschen, in 400 μ l MACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die Identifizierung nekrotischer und apoptotischer Zellen erfolgte zum einen mittels FSC/SSC-*dotplot*, um jedoch auch eine differenziertere Aussage über die Vitalität der Zellen treffen zu können, wurde ergänzend eine Lebend-Tod-Färbung mit Annexin V-FITC und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) durchgeführt. In vitalen Zellen findet sich Phosphatidylserin (PS) nur auf der Innenseite der Zellmembran. Während der Apoptose erfolgt nun eine Translokation des PS auf die Außenseite der Membran und wo es dann Ca^{2+} -abhängig von Annexin V gebunden wird. Werden die Zellen nekrotisch wird ihre Membran zunehmend durchlässig und Annexin V kann in die Zelle eindringen und an die Membraninnenseite binden. Aus diesem Grund lässt sich mit einer alleinigen Annexinfärbung keine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen vornehmen. Daher wurde die Färbung mit einer 7-AAD-Färbung kombiniert. Das 7-AAD penetriert nur in Zellen mit nicht intakter Membran und interkaliert hier spezifisch zwischen den DNA-Nukleinbasen Cytosin und Guanosin und ist somit geeignet um nekrotische Zellen nachzuweisen. Vitale Zellen sind somit Annexin-negativ und 7-AAD-negativ, frühapoptotische Zellen sind lediglich Annexin-positiv und spätapoptotische Zellen sind sowohl Annexin-positiv als auch 7-AAD-positiv. Nekrotische, nicht-apoptotische Zellen sind 7-AAD-positiv, aber Annexin-negativ. Für die Färbung wurden die Zellen zweimal mit kaltem BioLegend staining buffer gewaschen und $0,25 \cdot 10^7$ bis $10 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml calciumhaltigem Annexin V Binding Buffer resuspendiert. Nach Transfer von 100 μ l der Suspension in ein FACS-Röhrchen

wurden je 5 µl FITC-konjugiertes Annexin V und 10 µl 7-AAD hinzupipettiert. Nach vorsichtigem Vortexen erfolgte die Inkubation für 15 min bei RT und im Dunkeln. Im Anschluss wurden 400 µl Annexin V Binding Buffer hinzugegeben und mit der FACS-Analyse fortgefahren.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus primärem HCC-Gewebe durch kombiniert mechanisch-enzymatischen Gewebeaufschluss

Allgemeines Prinzip: Der Gewebeaufschluss des frisch aus dem OP erhaltenen HCC-Gewebes erfolgte in einer Kombination aus mechanischer Dissoziation und enzymatischer Digestion mittels gentleMACS Dissociator, ein Gerät, das vollautomatisch verschiedenste Gewebearten homogenisieren oder aus ihnen eine Einzelzellsuspension herstellen kann. Je nach Art des gewünschten Gewebeaufschlusses kommen zwei unterschiedliche Röhrchen zur Verwendung. Das M-tube führt zu einer vollständigen Homogenisierung der Gewebeprobe. Durch das C-tube wird das Gewebe schonend dissoziiert, um so eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Auf dem Gerät finden sich diverse vorinstallierte Programme für unterschiedliche Gewebearten und Gewebebeschaffenheiten. Auch werden verschiedene gewebespezifische Enzyme enthaltende Dissoziations- und Extraktionskits angeboten.

Durchführung: Zunächst wurden die zuvor aliquotierten Enzyme des Tumor Dissociation Kits (100 µl von Enzym R, 200 µl von Enzym H, 25 µl von Enzym A) und 4,7 ml DMEM in einem gentleMACS C-tube zusammengegeben. Um ein Austrocknen des Tumorgewebes zu verhindern, wurde es in eine mit PBS gefüllte 10 cm Schale gegeben und mit einem Skalpell in grobe Stückchen mit einer Kantenlänge von etwa 5 mm zerkleinert und maximal je 1 g Gewebe in ein den Enzymmix enthaltendes C-tube überführt. Dann wurden zeitgleich maximal zwei C-tubes mit dem Verschluss nach unten auf den gentleMACS Dissociator gesteckt und das Programm ‚h_tumor_1‘ gestartet. Im Anschluss wurden maximal drei C-tubes zugleich in schräger Position im MACSmix Tube Rotator positioniert und bei 12 rpm für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Durchlaufen des Programms erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation bei 37°C und 12 rpm im Tube Rotator. Nach einem letzten Durchlauf des Programms wurden die Röhrchen bei 1400 rpm für 7 min zentrifugiert und 4 ml des Überstandes abgenommen. Für das belassene Pellet wurde das Programm ‚m_imptumor_01‘ gestartet und der Röhrcheninhalt danach zu dem zuvor abgenommenen Überstand gegeben. Abschließend wurde die entstandene Einzelzellsuspension zur Erhöhung der Homogenität unter Spülung mit je 20 ml DMEM zunächst durch einen mit PBS befeuchteten MACS

SmartStrainer (Zellsieb aus Nylongaze) mit einer Porengröße von 70 µm und dann durch einen *strainer* mit einer Porengröße von 30 µm gegeben.

2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten

Die Herstellung der Proteinlysate erfolgte unter Verwendung von Nonidet P40 (NP40)-Lyse-Puffer. Die Enzyme Aprotinin, Vanadat und Pefabloc wurden erst kurz vor der Lyse hinzupipettiert und die Lösung auf Eis gelagert.

2.2.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Zelllinien

Für die Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren RAD001 und MK-2206 einzeln, in Kombination sowie mit DMSO (siehe Kapitel 2.2.1.10). Nach 45 h erfolgte eine erneute Zugabe der Inhibitoren und nach weiteren 3 h wurde das Medium vollständig abgenommen und der Zellrasen jeder Schale mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schalen auf Eis gestellt und durch Zugabe von 800 µl kaltem NP40-Lyse-Puffer lysiert. Es folgte das Ablösen der Zellen vom Schalenboden mit einem Zellschaber. Nach zehnmaligem Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der neu entstandene Überstand ergab das Lysat und wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. 20 µl des Lysats wurden für die Proteinbestimmung aliquotiert. Die Reaktionsgefäße mit den Lysaten wurden zum Schockfrieren kurz in ein mit Flüssigstickstoff gefülltes Dewargefäß gehalten und bei -80°C weggefroren.

2.2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe

Zunächst erfolgte die mechanische Pulverisierung des primären Tumorgewebes unter flüssig Stickstoff durch einen Stempelmörser. Das Pulver der Proben wurde dann in Lysing Matrix D-tubes überführt und mit 800 µl NP40-Lyse-Puffer überschichtet. Es schloss sich für 20 Sekunden der Aufschluss mittels Gewebehomogenisator an (Stufe 4). Im Anschluss wurde das Homogenisat für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (circa 5*100 µl), wobei stets auch ein Aliquot von 20 µl für die Proteinbestimmung abgenommen wurde. Die Lysate wurden dann bei -80°C eingelagert.

2.2.2.3 Quantitative Proteinbestimmung

Allgemeines Prinzip: Zur Quantifizierung von Proteinmengen existieren verschiedene Techniken. Bei der Absorptionsspektroskopie erfolgt eine direkte Messung der Absorptionsspektren, wohingegen bei kolorimetrischen Tests nach Zugabe bestimmter Farbstoffe die Verfärbung der Lösung mit der Verfärbung einer Eichlösung mit bekannter Proteinkonzentration verglichen wird. Die quantitative Proteinbestimmung der Lysate erfolgte mit den Reagenzien des DC Protein-Assays der Firma Bio-Rad. Es handelt sich hierbei um einen auf der Methode nach Lowry basierenden kolorimetrischen assay (Lowry *et al.*, 1951). Die Reaktion beruht auf der Reduktion von Kupfer (II) zu Kupfer (I), die in alkalischer Lösung unter Bildung eines Protein-Kupfer(I)-Komplexes (Biuret-Reaktion) erfolgt. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des gelben Folin-Reagenzes durch den Protein-Kupfer(I)-Komplex, wodurch es zum charakteristischen blauen Farbumschlag kommt. Für diesen sind in erster Linie das Tyrosin und Tryptophan der Proteine verantwortlich. Sie reduzieren das Folin-Reagenz, wodurch verschiedene Reaktionsprodukte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm, die für die blaue Farbe verantwortlich sind, entstehen. Je nach vorhandener Proteinmenge färbt sich die Lösung unterschiedlich blau. Die Extinktion der Lösung kann dann im Photometer oder Mikrotiterplattengerät bei 750 nm gemessen und die darin enthaltene Proteinmenge unter Zuhilfenahme einer Eichkurve bestimmt werden (Bio-Rad Laboratories, 2013).

Durchführung: Zu Beginn erfolgte die Herstellung von Reagenz A` aus Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrate Lösung) und 2% Reagenz S. Dann wurde eine Eichgrade erstellt. Hierfür wurde eine *bovine serum albumin* (BSA)-Standardreihe erstellt. Es handelt sich um eine Verdünnungsreihe von in NP40-Lyse-Puffer gelöstem BSA mit den Konzentrationen 0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,25 mg/ml und 1,5 mg/ml. Dann wurden von jeder Verdünnung Triplikate von je 5 µl in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und danach pro well 25 µl Reagenz A' pipettiert und anschließend 200 µl Reagenz B (Folin-Reagenz) gegeben. Danach wurde die Platte für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer bei 750 nm im Mikrotiterplattenleser. Mittels der Extinktionswerte dieser Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt. Für die eigentliche Proteinbestimmung der Lysate wurden 5 µl jeder Probe in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und auch hier in jedes well 25 µl Reagenz A` und 200 µl Reagenz B hinzupipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Messung der Extinktion im Mikrotiterplattenleser bei 750 nm. Die Proteinkonzentration der Lysatproben konnte mit Hilfe der Eichgraden über lineare Regression bestimmt und unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors auf das Gesamtzelllysat umgerechnet werden.

2.2.2.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Allgemeines Prinzip: Mittels Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) erfolgt die analytische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse. Dadurch wird ihre spätere Detektion mit den Antikörpern erleichtert. Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Durch Versetzung und anschließendes Aufkochen der Proben mit SDS, einem anionischen Tensid (Detergenz), kommt es zur Denaturierung der Proteine, dabei verlieren sie ihre räumliche Struktur. Außerdem werden sie von dem Tensid umhüllt, wodurch sie ihre Eigenladung verlieren und eine negative Ladung annehmen, die mit ihrer Länge korreliert. Zur Auftrennung werden die denaturierten Proben auf ein Polyacrylamidgel gegeben. Das Anlegen einer elektrischen Spannung führt zur Wanderung der negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Dabei wirkt das Gel wie ein Sieb. Proteine mit einer kleinen molekularen Masse wandern leicht durch die Poren des Gels, während größere Proteine zurückgehalten werden und das Gel langsamer durchwandern. Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese passieren die Proben Gele unterschiedlicher Porengröße, die abhängig von der Acrylamidkonzentration ist. Je niedrigprozentiger das Gel, desto weiter die Poren. Zunächst passieren die Proben das grobporige Sammelgel, dessen molekularer Siebeffekt gering ist. Dieses Gel bewirkt eine Fokussierung der Proteine. Das bedeutet, dass sie in einer Ebene konzentriert werden, um dann im Anschluss im feinporigen Trenngel separiert zu werden. Die Größenanalyse bzw. Quantifizierung der aufgetrennten Moleküle erfolgt mit im Gel aufgetragenen Standardproteinen, den sog. Markern, bekannter Größe (Dechert, 2012).

Durchführung: Am Tag vor der SDS-PAGE erfolgte das Gießen der Gele. Nach Zusammenbau entsprechend den Angaben des Herstellers wurde die Dichtigkeit der Gelträger mit destilliertem Wasser überprüft. Im Anschluss wurden sie mit 13 ml Trenngel luftblasenfrei aufgefüllt. Die Oberfläche der Trenngele wurden dann mit circa 600 µl Isopropanol überschichtet, um einen sauberen Abschluss der Geloberkante zu erreichen. Die Polymerisation erfolgte für 1,5-2 h. Danach wurde das Isopropanol mit ddH₂O verdrängt und vorsichtig abgegossen. Im Anschluss wurde das Sammelgel in den Gelträger gegeben und der Kamm vorsichtig in das Gel gesteckt. Nach der mindestens 30-minütigen Auspolymerisation wurde der Gelträger mit Frischhaltefolie luftdicht eingewickelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Am Tag der Durchführung des Western Blots wurden die Glasplatten mit dem auspolymerisierten Gel vom Halter genommen und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Durch vorsichtiges Spülen der Geltaschen mit ddH₂O/1fach Laufpuffer wurden etwaig entstandene Blasen entfernt und das Wasser vorsichtig ausgeschüttet. Dann wurden die Geltaschen mit 1fach Laufpuffer gefüllt und die Stege der Taschen vorsichtig ausgerichtet. Dann erfolgte das Aliquotieren der Proben. Hierfür wurden die Lysate zunächst auf Eis aufgetaut und

mit NP40-Lyse-Puffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration verdünnt. Zu jeder Verdünnung wurde 3fach Ladepuffer, der zuvor mit 1 M Dithiothreitol (DTT) im Verhältnis 3:7 aktiviert wurde, pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei 100°C wurde jedes Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen gegeben. Der Marker wurde unverdünnt aufgetragen. Im Anschluss wurde das Gel aus der Halterung genommen und ins Elektrophoresegerät eingesetzt. Die Außenkammer (Kathodenkammer) wurde mit 1fach Laufpuffer und die Innenkammer (Anodenkammer) mit zuvor mit 500 µl DTT aktiviertem 1fach Laufpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V gestartet. Nachdem die Proben in das Sammelgel gelaufen waren, wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Kurz bevor die Lauffront das Ende der Trenngels erreicht hatte, wurde die Gelelektrophorese gestoppt.

2.2.2.5 Western Blot

Allgemeines Prinzip: Beim Western Blot handelt es sich um eine Technik, die dazu dient, die im Rahmen der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran zu transferieren und dadurch zu immobilisieren. Dann erfolgt die Detektierung und Sichtbarmachung der Proteine auf der Membran durch immunochemische Analyse mittels spezifischer Primär- und Sekundärantikörper.

Durchführung: Im Rahmen der Vorbereitung für den Transfer der Proteine wurden pro Gel eine Nitrocellulosemembran und zwei Whatman-Papiere auf die Größe des Gels zugeschnitten. Dann wurde die Blotkassette mit den Blottingschwämmen und den Whatman-Papieren in eine Schale mit Transferpuffer gelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde zum Äquilibrieren zunächst in ddH₂O gelegt und dann ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Danach wurde das Gel aus dem Gelträger ausgebaut und das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und entsorgt. Dann wurde das Gel vorsichtig von der Glasplatte abgelöst und auf eines der Whatman-Papiere platziert. Darüber wurde die Nitrocellulosemembran gelegt und dabei die Lage des Gels zur Membran markiert. Auf die Membran wurde nun das zweite Whatman-Papier gelegt. Das entstandene Blot-Sandwich (Whatman-Papier-Gel-Membran-Whatman-Papier) wurde von der Schale auf den Tisch umgelagert und durch vorsichtiges Rollen mit einer 10 ml Pipette von Luftblasen befreit. Danach wurde das Sandwich zwischen zwei Blottingschwämme in die Blotkassette gespannt und in die Blotkammer eingehängt. Die Kammer wurde komplett mit Transferpuffer aufgefüllt. Das Blotten erfolgte für 2 h unter Rühren mit einem Rührfisch bei 4°C und 68 V. Nach dem Transfer wurde die Membran aus der Blotkassette ausgebaut und das Trenngel verworfen. Dann wurde die Membran für 5 min auf dem Kippschüttler in ddH₂O äquilibriert. An dieser Stelle bestand die Möglichkeit eine unspezifische und reversible Färbung der Banden mit Ponceau S einzuschieben, um den Transfer der Proteine auf die Membran zu kontrollieren. Je nach Fragestellung, wurde die

Membran dann mit einem Skalpell auf einer Glasplatte zurechtgeschnitten. Zur Absättigung der freien Bindungsstellen wurden die Membranstreifen bei RT für mindestens 1 h mit Blockierlösung auf dem Kippschüttler blockiert. Die Primärantikörper und Sekundärantikörper wurden nach Herstellerangaben mit Waschlösung angesetzt. Die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Danach wurde der Primärantikörper abgegossen und die Membran für 30 min auf dem Kippschüttler mit Waschlösung gewaschen. Es schloss sich dann die Zugabe des Sekundärantikörpers an. Die Inkubation erfolgte unter Schwenken für 1 h bei RT. Nach Abgießen des Antikörpers wurde die Membran für 30 min mit 0,5% TBS Tween gewaschen und im Anschluss nochmal für 20 min mit 1fach TBS äquilibriert. Für die Messung der Chemilumineszenz wurde zunächst das *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Detektionsreagenz angemischt. Hierfür wurden die Lumino/Enhancer-Lösung und Peroxid-Lösung (beides SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate) im Verhältnis 1:1 zusammenpipettiert. Um eine höhere Sensitivität zu erzielen, wurden die beiden SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate 1:1 zusammengemischt und im Verhältnis 1:10 hinzupipettiert. Die Membran wurde auf eine Plastikfolie gelegt und mit dem Reagenz bedeckt. Die Folie wurde über die Membran geklappt. Die Inkubation erfolgte für 5 min. Etwaige Bläschen und Unebenheiten wurden dann mit einer Rolle vorsichtig ausgestrichen. Die Lichtentwicklung erfolgte im Lumineszenz Image Analyser LAS-3000.

2.2.3 Das Prinzip des *in vivo*-Biolumineszenzimagings (BLI)

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Analyse und Auswertung der Messwerte der Biolumineszenzbildgebung (*biolumineszenz imaging*, BLI). Mittels BLI können nicht-invasiv Lichtemissionen *in vivo* detektiert, lokalisiert und quantifiziert werden. Für die orthotope Injektion in die Maus wurden Huh7-Luc-Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um mit einem lentiviralen Luciferasevector (LeGO-iG2-Puro+Luc2) transduzierte Huh7-Parental-Zellen. Die Tumorzellproliferation wurde einmal wöchentlich durch Messung der Luciferaseaktivität bestimmt. Hierfür wurde D-Luciferin intraperitoneal injiziert. Bei dem injizierten D-Luciferin, auch Firefly Luciferin genannt, handelt es sich um das in den Peroxisomen der Zellen des Leuchtorgans der Leuchtkäfer gebildete Substrat der Firefly Luciferase. Diese katalysiert unter Anwesenheit von Mg^{2+} , ATP und molekularem Sauerstoff folgende Reaktion: $Luciferin + ATP + O_2 + Mg^{2+} \rightleftharpoons Oxiluciferin + AMP + PPi + CO_2 + Photonen$ (Vieira, Pinto da Silva and Esteves, 2012). Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 560 nm und wurde mit dem In Vivo Imaging System (IVIS)-200 (Core Facility, UKE Hamburg) detektiert. Die Analyse und Quantifizierung der Daten erfolgten mit der Living Image Software 4.0. Auf jede Maus wurde ein zirkulärer den Primärtumor umfassender Messbereich (*region of interest*, ROI) gelegt. Die Fläche der ROIs wurde für alle Mäuse gleich groß gewählt und so positioniert, dass der Fokus über der Stelle mit der höchsten Lichtintensität lag. Angegeben wird die *radiance*

(p/sec/cm²/sr). Diese gibt die Anzahl der Photonen (*photons*, p) an, die pro Sekunde (*second*, sec) von einem cm² Gewebe ausgehen und dabei in einem kegelförmigen Raumwinkel (*sterdian*, sr) ausgestrahlt werden (PerkinElmer Health Sciences, 2017).

2.2.4 Statistik

Alle statistischen und graphischen Analysen in dieser Arbeit erfolgten mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 4. Zur Bestimmung linearer Korrelationen zwischen zwei Parametern wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson (R) und das Bestimmtheitsmaß (R²) berechnet. Die Detektion von Ausreißern erfolgte durch Berechnung des Interquartilsabstandes (*interquartile range*, IQR). Die Fehlerbalken werden als mittlerer Fehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, Mean ± SEM) dargestellt. Der Vergleich zweier Gruppen zur Ermittlung der Signifikanzen erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaartem Student's t-Test. Ein p-Wert ab < 0,05 wurde als Kriterium für statistische Signifikanz gewählt (*).

3 Ergebnisse

3.1 Kombinatorische Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit AKT- und mTOR-Inhibitoren

In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die kombinatorische Behandlung der drei HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 und einer Cholangiokarzinom-Zelllinie mit RAD001 und MK-2206 bereits bei niedrigen Konzentrationen einen synergistischen Hemmeffekt auf die Proliferation der Zellen sowohl *in vitro* als auch auf das subkutane Wachstum im Mausmodell *in vivo* hat (Grabinski *et al.*, 2012; Ewald *et al.*, 2013).

Es sollte nun untersucht werden, ob eine Hemmung des Tumorwachstums auch bei der Behandlung von Huh7-Luc-Zellen, die in der Leber und somit in ihrer natürlichen Lokalisation wachsen, auftritt. Im Rahmen diverser Studien wurde bereits belegt, dass das Mikromilieu nicht nur die Morphologie und das Metastasierungsverhalten, sondern auch die Chemosensitivität der Tumorzellen beeinflusst, insbesondere auch beim HCC (Wilmanns *et al.*, 1992; Newell *et al.*, 2008; Yang, Ikuo and Roberts, 2011; Hernandez-Gea *et al.*, 2013).

3.1.1 Vorversuch zur Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber RAD001 und MK-2206 *in vitro*

Vor der orthotopen Injektion der Huh7-Luc-Zellen in den linken Leberlappen der Maus wurde in einem Vorversuch die Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 *in vitro* untersucht. Es erfolgte die Zugabe definierter Konzentrationen von RAD001 und MK-2206 in einem festen Verhältnis von 1:5 einzeln und in Kombination. Als Referenz diente eine unbehandelte DMSO-Kontrolle. Nach 48-stündiger Inkubation wurden NP40-Proteinlysate hergestellt und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung ausgewählter Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges untersucht.

MK-2206 stabilisiert AKT in seiner „PH-*in*“-Konformation und verhindert dadurch dessen Phosphorylierung, sowohl durch die PDK1 am T308 als auch durch mTORC2 am S473 (beim AKT1) (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014). Als Maß für die Effektivität des allosterischen AKT-Inhibitors MK-2206 wurde daher die Phosphorylierung von AKT mittels phospho-AKT(S473) (pAKT(S473))-spezifischen Antikörpern detektiert. pAKT(S473)-spezifische Antikörper können aufgrund der ausgeprägten Homologie der drei AKT-Isoformen nicht zwischen den einzelnen Isoformen unterscheiden. Ebenfalls wurde die phosphorylierte Form der GSK3 α

und β , zwei direkte *downstream targets* von AKT, die durch Phosphorylierung inhibiert werden (Frame and Cohen, 2001), mittels phospho-GSK3 α/β (S21/9) (pGSK α/β (S21/9))-spezifischen Antikörpern analysiert. Zur Beurteilung der Wirkung des mTOR-Inhibitors RAD001 wurde die Phosphorylierung vom ribosomalen Protein S6 als indirektes Maß für die Aktivität von mTORC1 mit phospho-S6(S240/244) (pS6(S240/244))-spezifischen Antikörpern untersucht. Beim S6 handelt es sich um ein direktes *downstream target* der durch mTORC1 aktivierten S6K1 (Manning and Cantley, 2007). Das *housekeeping* Protein HSC70 und eine Proteinfärbung mittels Ponceau S dienten als Ladekontrollen.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in Abbildung 12 dargestellt. Nach Inkubation der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 zeigte sich eine, im Vergleich zur Kontrolle signifikante Reduktion des Signals für pS6 (** $p < 0,001$), was ein Indiz für eine erfolgreiche Hemmung von mTORC1 war. Allerdings konnte die durch den Wegfall des mTORC1/S6K1-abhängigen negativen *feedback loops* unter mTOR-Inhibition beschriebene, vermehrt auftretende Phosphorylierung von AKT (Y. Shi *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007) (siehe Kapitel 1.5) nicht beobachtet werden. Es zeigte sich im Gegenteil ein im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar nicht signifikantes, aber dennoch vermindertes Signal für die Phosphorylierung von AKT an S473 durch mTORC2. Entsprechend zeigte sich auch das Signal für die GSK3 α/β im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verringert. Die Hemmung der GSK3 α/β war, auch wenn nicht signifikant, der Erwartung entsprechend unter MK-2206-Behandlung stärker als unter der Behandlung mit RAD001. Eine alleinige Inkubation der Zellen mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 führte wie erwartet zu einer im Vergleich zur Kontrolle (** $p < 0,001$) und RAD001-Inhibition (** $p < 0,001$) signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Position S473 durch mTORC2. Wie zu erwarten, war die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins bei den mit MK-2206 behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit RAD001 oder der Kombination beider Inhibitoren behandelt wurden, signifikant (** $p < 0,001$) höher. Allerdings ließ sich dennoch eine signifikant (* $p < 0,05$) niedrigere Phosphorylierung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle feststellen. Hingegen war die Phosphorylierung der GSK3 α/β unter MK-2206 nur geringfügig niedriger als unter RAD001 und der Hemmeffekt von MK-2206 auf pS6 gar stärker als auf die GSK3 α/β . Bei Kombination von RAD001 und MK-2206 zeigte sich ein deutlich vermindertes Signal für pAKT(S473), sowohl im Vergleich zur DMSO-Kontrolle als auch zur alleinigen RAD001-Inkubation. Allerdings bewirkte die Kombination beider Wirkstoffe keine merklich zusätzliche Reduktion des Signals für pAKT(S473) im Vergleich zur MK-2206-Behandlung der Zellen. Der Hemmeffekt unter MK-2206 war sogar tendenziell stärker als unter der kombinierten Gabe von RAD001 und MK-2206. Die Behandlung der Zellen mit der Kombination verringerte das Signal für pS6 im Vergleich zu den Monotherapien. Im Vergleich zur MK-2206 Therapie signifikant (** $p < 0,001$), allerdings nicht signifikant mehr als RAD001 alleine. Die Phosphorylierung der GSK3 α/β war bei Kombination der Inhibitoren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (** $p < 0,01$) und RAD001 (** $p < 0,01$) um ein signifikantes Maß reduziert.

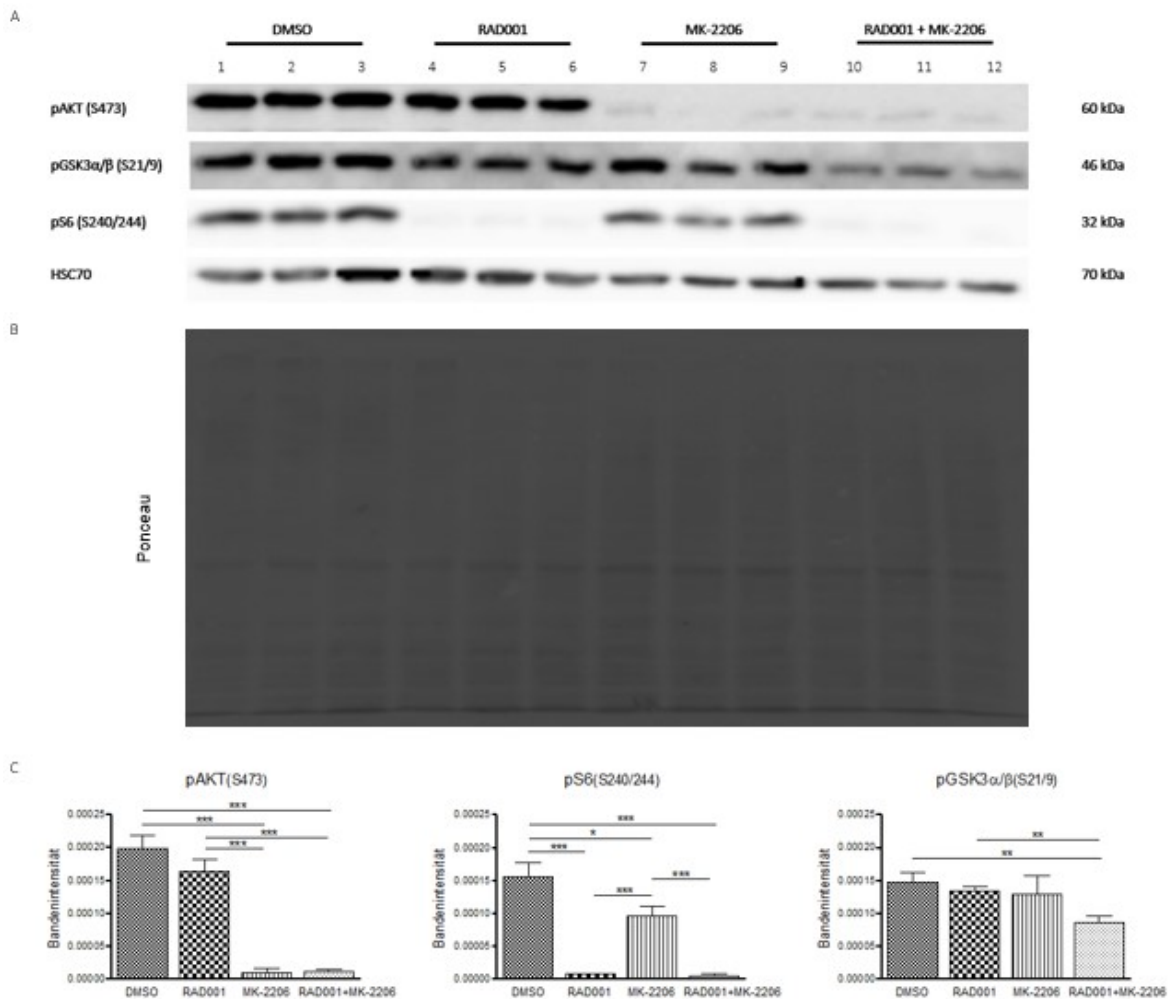


Abbildung 12: Western Blot-Analyse der Huh7-Luc-Zellen nach Inkubation mit RAD001 und MK-2206 *in vitro*. Nach 48-stündiger Inkubation der Huh7-Luc-Zellen mit entweder RAD001 oder MK-2206 sowie der Kombination beider Inhibitoren wurden Proteinlysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren analysiert wurden. Die Kontrolle erfolgte mit DMSO. (A) Repräsentative Bilder der Western Blot-Analyse. Das *housekeeping* Protein HSC70 und (B) eine Ponceau-Aufnahme dienten als Ladekontrollen. (C) Quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Abgebildet sind die Mittelwerte aus $n=3$. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwert \pm SEM. Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

3.1.2 Analyse einer kombinatorischen Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit RAD001 und MK-2206

Um zu untersuchen, ob die von unserer Arbeitsgruppe im subkutanen Xenograft-Mausmodell beobachtete vertikale Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges durch RAD001 und MK-2206 auch bei der Behandlung von HCC-Zelllinien, die orthotop wachsen, auftritt, wurde von PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe durch Transplantation der Luciferase-exprimierenden HCC-Zelllinie Huh7-Luc, die bereits ein subkutanes Tumorwachstum zeigte (Grabinski *et al.*, 2012), ein orthotopes HCC-Xenograft-Mausmodell etabliert. Durch Verwendung dieser Zelllinie war es möglich, das

Tumorwachstum *in vivo* durch BLI zu verfolgen. Da das Wachstum von HCCs in männlichen NSG-Mäusen nicht nur schneller, sondern auch voluminöser verläuft als in weiblichen NSG-Mäusen (Martin-Padura, 2010), erfolgten die nachfolgenden Versuche ausschließlich mit männlichen NSG-Mäusen. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden direkt in das Parenchym des linken Leberlappens eingepflegt. Mäuse, bei denen nach 7 Tagen kein Anwachsen der Tumorzellen detektierbar war, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Je acht Mäuse wurden dann randomisiert und entweder der Kontrollgruppe oder der Behandlungsgruppe, der die Kombination der beiden Inhibitoren RAD001 und MK-2206 verabreicht wurde, zugeordnet. Die Therapie wurde 7 Tage nach Injektion der Zellen begonnen. RAD001 wurde den Mäusen einmal täglich in einer Konzentration von 1mg/kg Körpergewicht über eine Schlundsonde verabreicht. MK-2206 wurde jeden zweiten Tag in einer Dosis von 100 mg/kg gegeben. Keine Maus erreichte vor Ablauf der maximalen Periode von 21 Tagen, nach der die Kontrollgruppe getötet werden musste, die Terminationskriterien, sodass die Behandlung über 14 Tage erfolgen konnte. Das Monitoring erfolgte dreimal durch *in vivo*-Messung der Luciferaseaktivität auf einer wöchentlichen Basis, beginnend an Tag 7 nach Transplantation. Zehn Minuten nach der Injektion von D-Luciferin wurden die Mäuse anästhesiert und die BLI-Signale mit dem IVIS Lumina Imaging System aufgezeichnet. An Tag 14 nach Therapiebeginn wurden alle Mäuse getötet und die Primärtumoren sowie eventuell vorhandene Metastasen entnommen, mit Formalin fixiert und bei -80°C eingefroren. Die Entnahme der Tumoren erfolgte durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa. Die Messung der BLI-Signale wurde von Michael Horn-Glander (Core Facility, UKE Hamburg) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der emittierten Photonen mit Hilfe der Living Image Software durch das Legen zirkulärer ROIs, die Aufbereitung des Tumorgewebes und die anschließende Analyse im Western Blot-Verfahren.

3.1.2.1 Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen

Mit der Therapie der Mäuse und mit der *in vivo*-Messung des Fluoreszenzsignals wurde erst 7 Tage nach Injektion der Huh7-Luc-Zellen begonnen. Ein zu früher Beginn der Messung hätte keine aussagekräftigen Ergebnisse geliefert, da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass auch alle transplantierten Zellen anwachsen würden. Sieben Tage nach orthotoper Injektion durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa war in allen Mäusen ein lokales Tumorwachstum in der Leber nachweisbar und mithin eine Tumorfrequenz von 100% zu verzeichnen. Wie v.a. aus Abbildung 13B, jedoch auch aus Abbildung 13A hervorgeht, war die relative Fluoreszenzsignalstärke der Behandlungsgruppe im Vergleich zum Wert der Kontrollgruppe nur leicht erhöht, sodass von einer annähernd gleichen Verteilung der intrahepatischen Tumorlast zu Beginn der Messreihe ausgegangen werden kann. Wie aus Abbildung 13A ersichtlich, kam es über einen Zeitraum von 14 Tagen in beiden Gruppen zu einer kontinuierlichen Zunahme des

Fluoreszenzsignals, jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß. So stieg das Signal bei der Kontrollgruppe sehr viel schneller an als bei der behandelten Gruppe. Bei letzterer zeigte sich ein sehr viel flacherer Verlauf des Graphen, sodass aufgrund dieses Ergebnisses insgesamt von einer effizienten Hemmung durch die kombinierte Behandlung mit RAD001 und MK-2206 ausgegangen werden kann. Abbildung 13B zeigt, dass es zwischen der ersten Messung und der zweiten Messung zu einer deutlichen Abnahme der relativen *radiance* der Therapiegruppe kam. Sieben Tage nach Beginn der Therapie betrug die relative *radiance* der behandelten Mäuse 18% von der der Kontrollgruppe, dabei war die Differenz signifikant (* $p < 0,05$). Allerdings nahm die relative *radiance* zwischen der zweiten Messung und der dritten Messung an Tag 14 dann wieder zu und betrug am Tag der dritten Messung bereits 25% der Tumorlast der Kontrollgruppe. Dabei war die Differenz signifikant (***) $p < 0,001$). Der Wiederanstieg der relativen *radiance* innerhalb der Behandlungsgruppe zwischen Tag 7 und Tag 14 war zwar nicht signifikant (Ergebnisse nicht dargestellt), könnte allerdings bedeuten, dass der Hemmeffekt der Inhibitoren sein Plateau nach bereits 2 Wochen erreicht hat und ein Hinweis auf eine Resistenzentwicklung sein.

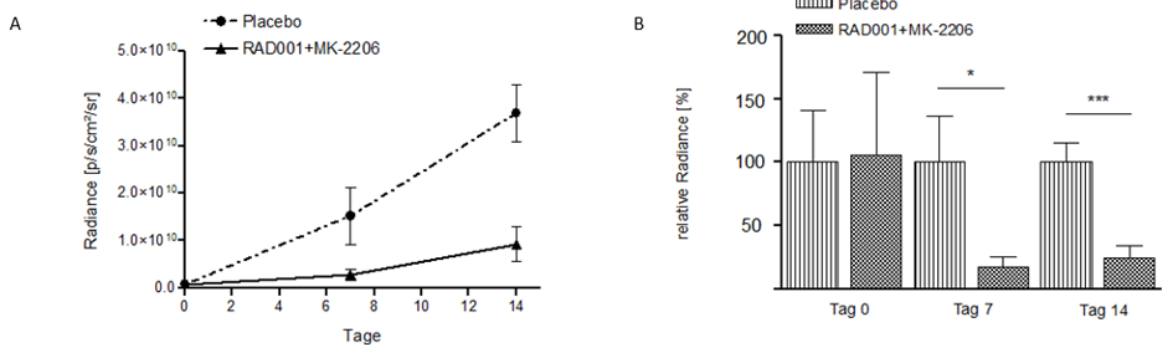


Abbildung 13: Effekt der kombinatorischen Therapie mit RAD001 und MK-2206 auf das orthotope Tumorstadium im Verlauf an Tag 0, 7 und 14 nach Therapiebeginn. 1×10^6 Huh7-Luc-Zellen wurden orthotop in das Parenchym des linken Leberlappens von männlichen NSG-Mäusen injiziert (n=8 pro Gruppe). Die Behandlung der tumortragenden Mäuse mit entweder Placebo oder der Kombination von RAD001 und MK-2206 wurde nach 7 Tagen begonnen. Veränderungen des Tumorstadiums wurden durch *in vivo*-BLI der Fluoreszenzsignale der Zellen mit dem IVIS Lumina Imaging System wöchentlich über einen Zeitraum von 14 Tagen detektiert. (A) Es zeigte sich in beiden Gruppen eine kontinuierliche Zunahme der *radiance* mit einem stärkeren Anstieg in der Placebogruppe. (B) Die kombinierte Gabe von RAD001 und MK-2206 führte im Vergleich zur Placebogabe zu einer Inhibition des Tumorstadiums und war signifikant an Tag 7 und 14, * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$.

3.1.2.2 Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den Huh7-Luc-Maustumoren

Um zu untersuchen, inwieweit die Hemmung des Tumorstadiums der behandelten Mäuse auf die Effekte der beiden Inhibitoren zurückzuführen war und gegebenenfalls auch, um genauere Aussage über ihren spezifischen Wirkmechanismus treffen zu können, schlossen sich Western Blot-Analysen an. Hierfür wurden von sechs Mäusen jeder Versuchsgruppe Proteinlysate, die aus dem

primären HCC-Gewebe hergestellt wurden, durch die SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren analysiert.

Zunächst wurde die Phosphorylierung derselben Schlüssel-moleküle der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade wie beim *in vitro*-Versuch untersucht (siehe Kapitel 3.1.1). Als Maß für die Hemmwirkung von MK-2206 wurde die Phosphorylierung von AKT am S473 mittels pAKT(S473)-spezifischen Antikörpern untersucht. Ebenfalls wurde die Phosphorylierung der AKT-*downstream targets* GSK3 α und β mittels pGSK α/β (S21/9)-spezifischen Antikörpern analysiert. Um den Effekt von RAD001 auf die Aktivität von mTORC1 zu bestimmen, wurde auch hier das Signal für die Phosphorylierung des S6-Proteins an den Serinresten 240 und 244 detektiert. Eine Proteinfärbung mittels Ponceau S diente als Ladekontrolle. Das *housekeeping* Protein HSC70 erwies sich als Ladekontrolle nicht geeignet, denn trotz gleichmäßiger Ponceaufärbung waren die Signale für HSC70 in den Proben der behandelten Mäuse deutlich reduziert. Dies könnte bedeuten, dass eine Behandlung mit RAD001 und MK-2206 zu einer reduzierten Expression von HSC70 führt. Die Normalisierung erfolgte daher auf die Ponceaufärbung. Die Ergebnisse des Western Blots sind in Abbildung 14 dargestellt. Während die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 wie erwartet unter Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant unterdrückt wurde (***) $p < 0,001$), zeigte sich wider Erwarten ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhter (***) $p < 0,001$) Phosphorylierungsstatus von AKT am S473, dessen Phosphorylierung durch mTORC2 für die vollständige Aktivierung von AKT notwendig ist (Manning and Toker, 2017). Auch für pGSK3 α/β , dem direkten *downstream target* von AKT, ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier zeigte sich ein zwar nicht signifikanter, aber dennoch erhöhter Phosphorylierungsgrad unter Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass zwar eine Inhibition durch RAD001 erfolgt ist, eine erfolgreiche Inhibition durch MK-2206 allerdings ausgeblieben ist.

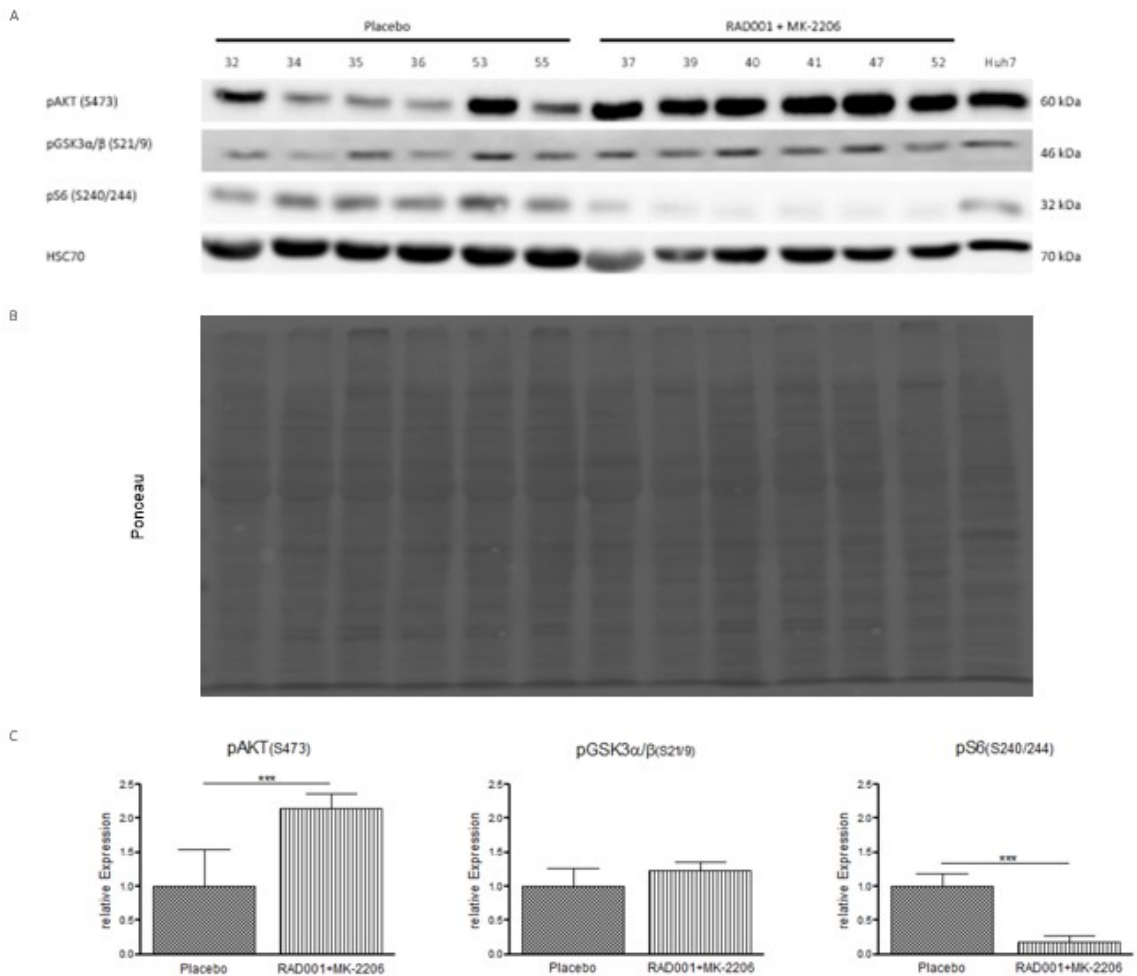


Abbildung 14: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels pAKT(S473)-, pGSKα/β(S21/9)- und pS6(S240/244)-spezifischen Antikörpern analysiert. **(A)** Bilder der Western Blot-Analyse. Das *housekeeping* Protein HSC70 und **(B)** eine Ponceau-Aufnahme dienten als Ladekontrolle. **(C)** Quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus n=6 abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte±SEM. Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test ermittelt (***) $p < 0,001$.

Unterstützt wurde diese Vermutung durch die zuvor erhaltenen Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen, die nach 2 Wochen das Erreichen einer Plateauphase vermuten ließen.

Es ergab sich auf Basis der Ergebnisse nun die Frage nach dem Mechanismus, auf dem die Herunterregulation von pS6 bei gleichzeitiger vermehrter Phosphorylierung von AKT am S473 beruhte. Aus diesem Grund wurden weitere Western Blot-Analysen durchgeführt.

Zunächst wurden das Phosphorylierungs- und Expressionslevel von mTOR näher untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. Je nachdem, ob sich mTOR im mTORC1 oder mTORC2 befindet, liegt es im aktivierten Zustand an unterschiedlichen Serinresten phosphoryliert vor. Im Rapamycin-sensitiven mTORC1 ist mTOR vorwiegend am S2448 phosphoryliert, während im Rapamycin-unsensitiven mTORC2 mTOR vorwiegend am S2481 phosphoryliert ist (Copp, Manning and Hunter, 2010). Um zu untersuchen, ob die verminderte

Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 auf die mTOR-Inhibition durch RAD001 zurückgeführt werden kann, wurden phospho-mTOR(S2448) (pmTOR(S2448))-spezifische Antikörper verwendet. Da das Signal für pmTOR(S2448) bei den behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert war (** $p < 0,001$), kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibition von mTOR im mTORC1 durch RAD001 effizient war. Um auch die Aktivität von mTORC2 zu analysieren, wurde phospho-mTOR(S2481) (pmTOR(S2481)) detektiert. Im Unterschied zum mTORC1 zeigte sich hier die Phosphorylierung unter Therapie nahezu unverändert, war aber tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe. Das passt nicht ganz zu dem signifikant erhöhten Phosphorylierungsgrad von AKT am S473. Mit mTOR-spezifischen Antikörpern wurde zudem das Gesamtproteinlevel von mTOR bestimmt. Da dessen Verfügbarkeit weitestgehend konstant blieb, schien der verminderte Phosphorylierungsgrad von pmTOR(S2448) in einer verminderten enzymatischen Aktivität des für die Phosphorylierung von mTOR an dieser Position verantwortlichen Enzyms begründet gewesen zu sein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die verminderte Aktivität von mTORC1 nicht auf einer verminderten Expression des Proteins basierte, sondern vielmehr auf der durch RAD001 bewirkten Hemmung der mTOR-Kinase in diesem Komplex. Das bedeutet, dass das Tumorstadium unabhängig von der AKT/mTORC1-Achse erfolgt sein muss.

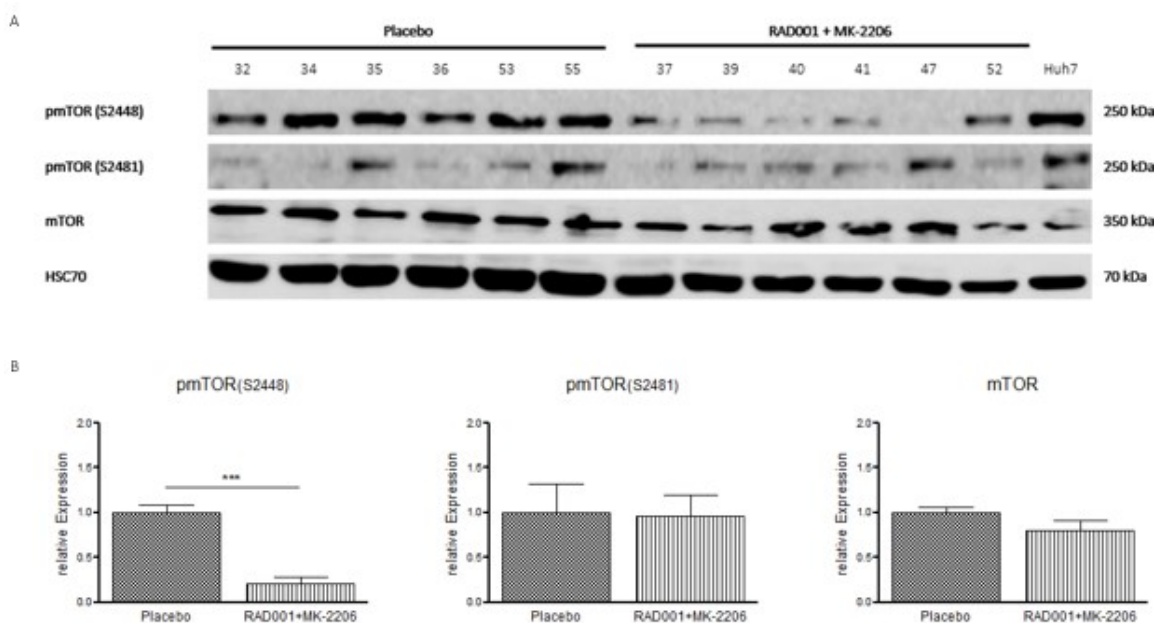


Abbildung 15: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels pmTOR(S2448)-, pmTOR(S2481)- und mTOR-spezifischen Antikörpern analysiert. **(A)** Bilder der Western Blot-Analyse und **(B)** quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau (siehe Abbildung 14B) normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus $n=6$ abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM. Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test ermittelt (** $p < 0,001$).

Nachdem nun die Inhibition von mTORC1 durch RAD001 bestätigt werden konnte, sollte die Wirkung von MK-2206 näher betrachtet werden. Als allosterischer pan-AKT-Inhibitor stabilisiert MK-2206 die Kinase in ihrer „PH-*in*“-Konformation, wodurch ihre Rekrutierung an die Plasmamembran und ihre Phosphorylierung durch die PDK1 und mTORC2 verhindert wird (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014). Zunächst wurde die Phosphorylierung von AKT mittels phospho-AKT(T308) (pAKT (T308))-Antikörpern detektiert. Wie auch die pAKT(S473)-spezifischen Antikörper unterscheiden diese Antikörper aufgrund ihrer ausgeprägten Homologie nicht zwischen den drei AKT-Isoformen. Eine Phosphorylierung von T308 durch die PDK1 ist Voraussetzung für die Phosphorylierung von S473 durch mTORC2, die zur vollständigen Aktivierung von AKT führt (Manning and Toker, 2017). Wie oben festgestellt, war die Menge an pAKT(S473) signifikant erhöht. Aus dem Balkendiagramm in Abbildung 16B geht hervor, dass auch die Menge an pAKT(T308) höher war als in der unbehandelten Gruppe, allerdings nicht signifikant. Es bestand somit eine eindeutige Prävalenz für die Phosphorylierung von S473.

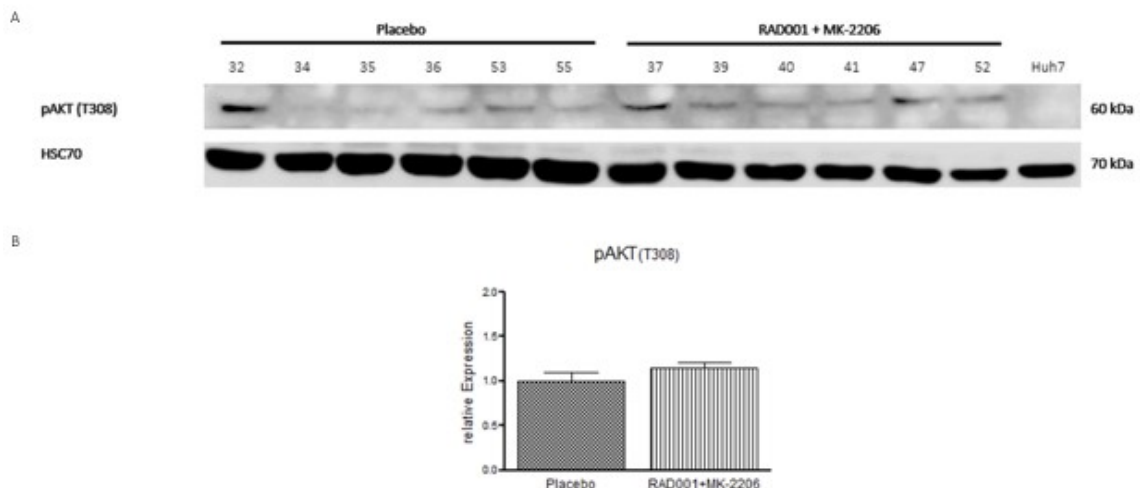


Abbildung 16: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels pAKT(T308)-spezifischen Antikörpern analysiert. (A) Bilder der Western Blot-Analyse und (B) quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau (siehe Abbildung 14B) normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus n=6 abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte±SEM.

Eingebunden in die negative *feedback*-Schleife ist auch IRS-1. Dieses wird bei anhaltender Insulin- oder IGF-Exposition direkt durch mTORC1 oder die S6K1 an verschiedenen Serin- und Threoninresten phosphoryliert, was über dessen Ubiquitinierung zu seiner proteasomalen Degradation führt (Haruta *et al.*, 2000; Pederson, Kramer and Rondinone, 2001). Aus diesem Grund müsste die Expression vom Gesamt-IRS-1 bei einem Wegfall des *loops* erhöht und die vom pIRS-1 im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt sein (Y. Shi *et al.*, 2005). Dabei müsste das Expressionslevel bei gleichzeitig ineffizienter Hemmung von AKT durch MK-2206 mindestens dem Signal für pAKT entsprechen. Es wurde daher die

Expression von IRS-1 sowie mittels phospho-IRS-1(S636/639) (pIRS-1(S636/639))-Antikörpern auch die Expression vom phosphoryliertem IRS-1 detektiert. Der Serinrest 639 ist eine bekannte Phosphorylierungsstelle von mTOR und der Serinrest 636 wird zusätzlich von der S6K phosphoryliert (Zhang *et al.*, 2008; Tzatsos, 2009). In Abbildung 17 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigt sich, dass das Signal für Gesamt-IRS bei den behandelten Mäusen höher war als in der Kontrollgruppe, jedoch nicht signifikant. Das könnte mit dem Wegfall der negativen *feedback*-Schleife zusammenhängen. Allerdings passt zu dieser Annahme nicht, dass auch das Signal für pIRS erhöht war, was wiederum bedeuten könnte, dass es unter Therapie zu einer gesteigerten IRS-Synthese gekommen sein könnte. Letztlich ist auch das im Vergleich zu pAKT(S473) viel geringere Signal für IRS-1 ein Hinweis dafür, dass die Phosphorylierung von AKT am S473 zumindest nicht alleine auf das Ausbleiben des *loops* durch RAD001-Wirkung zurückgeführt werden kann.

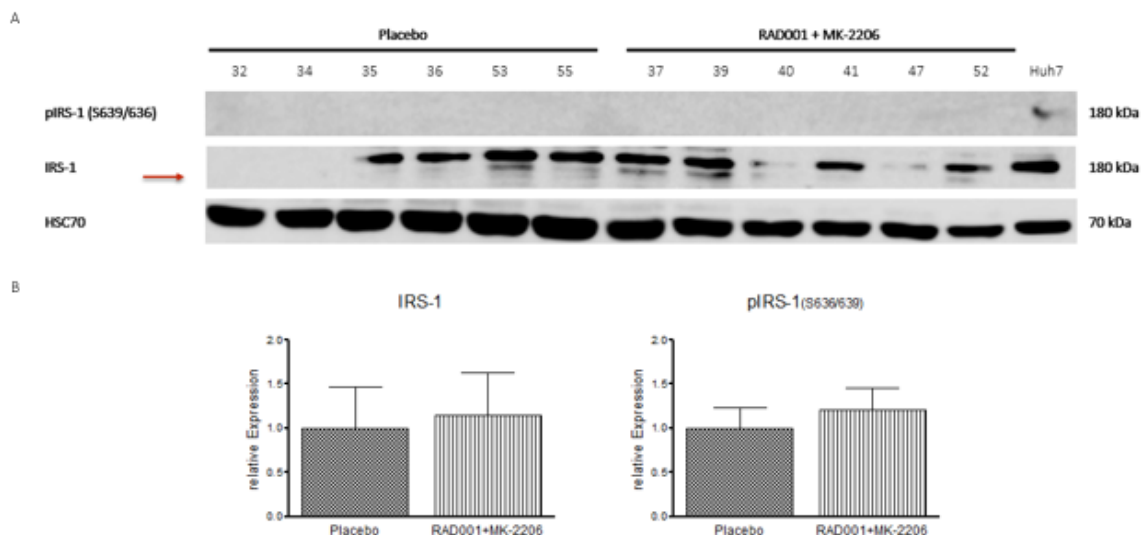


Abbildung 17: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels IRS-1- und pIRS-1(S636/639)-spezifischen Antikörpern analysiert. **(A)** Bilder der Western Blot-Analyse und **(B)** quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau (siehe Abbildung 14B) normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus n=6 abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte±SEM.

Um herauszufinden, ob die vermehrte Aktivität von AKT möglicherweise durch eine Hochregulierung von AKT auf Proteinebene bedingt war, wurde ein pan-AKT-Antikörper eingesetzt. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, zeigte sich die Gesamt-AKT-Expression bei der Behandlungsgruppe nur leicht erhöht. Dass die vermehrte AKT(S473)-Phosphorylierung als langsame Resistenzentwicklung aufgrund einer gesteigerten Proteinsynthese von AKT stattgefunden hat, ist daher unwahrscheinlich, zumal dann auch ein erhöhtes Level an pmTOR(2481) und pAKT(T308) hätte nachweisbar sein müssen.

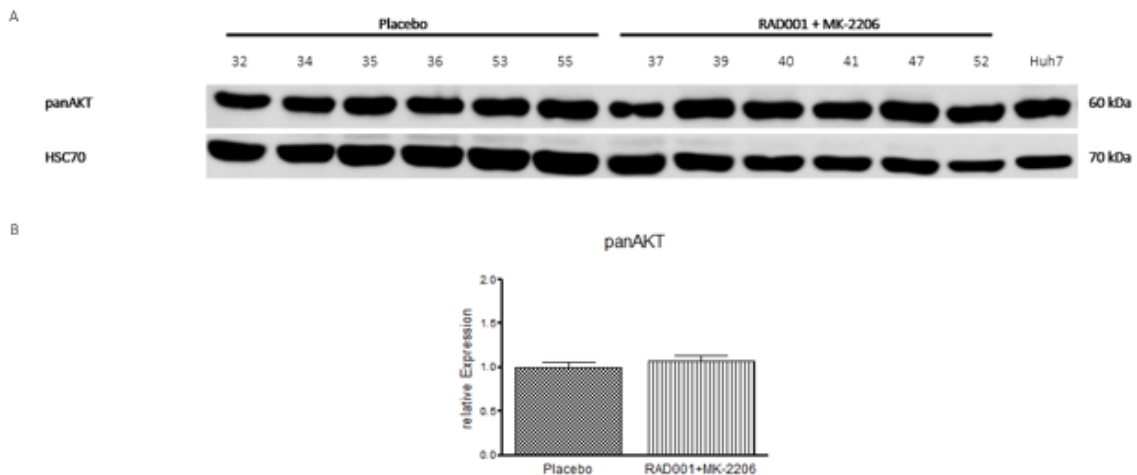


Abbildung 18: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels pan-AKT-spezifischen Antikörpern analysiert. **(A)** Bilder der Western Blot-Analyse und **(B)** quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau (siehe Abbildung 14B) normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus $n=6$ abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM.

Um auch eine möglicherweise Isoform-spezifische Hochregulation der AKT-Expression bzw. AKT-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden im Weiteren die Level der einzelnen AKT-Isoformen 1,2 und 3 mit entsprechenden AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern untersucht, die AKT-Isoformen unabhängig vom Phosphorylierungszustand detektieren. Die Auswertung in Abbildung 19 zeigt ein im Vergleich zur Kontrollgruppe beinahe unverändertes Level an AKT1. Das Level an detektiertem AKT2 war leicht und das Level an AKT3 schon etwas deutlicher vermindert. In beiden Fällen allerdings nicht signifikant. Ob es sich dabei um die aktive oder inaktive Form handelt, bleibt offen.

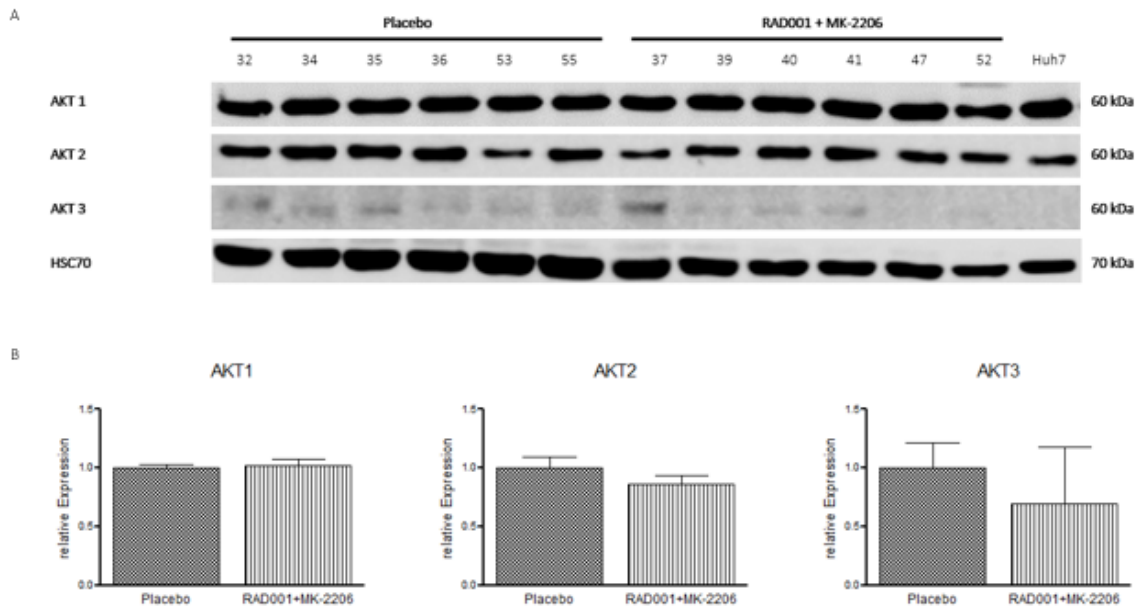


Abbildung 19: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. Es wurden Proteinlysate von jeweils sechs HCCs aus der Placebogruppe und der Behandlungsgruppe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-Verfahren mittels AKT1-, AKT2- und AKT3-spezifischen Antikörpern analysiert. **(A)** Bilder der Western Blot-Analyse und **(B)** quantitative Auswertung der Western Blot-Ergebnisse. Dargestellt ist die auf Ponceau (siehe Abbildung 14B) normalisierte Bandenintensität der Behandlungsgruppe im relativen Verhältnis zur normalisierten Bandenintensität der Placebogruppe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Es sind die Mittelwerte aus n=6 abgebildet. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM.

3.2 Vergleichende Analyse nicht-invasiver Messmethoden zum Monitoring von aus primären HCC-Zellen generierten orthotopen Xenograft-Maustumoren

Im Unterschied zur Arbeit mit subkutanen Tumormodellen kann das Tumorstadium bei orthotopen Tumormodellen nicht mit Hilfe von Methoden wie der externen Kalipermessung verfolgt werden. Aus diesem Grund wurde für das vorherige Experiment die Luciferase-exprimierende Zelllinie Huh7-Luc verwendet, die es ermöglicht, die Tumorstadium nicht-invasiv *in vivo* durch Messung der Biolumineszenz zu verfolgen. Doch nicht nur die orthotope Transplantation, sondern auch die Verwendung nativer Tumorzellen kommt den klinischen Bedingungen näher als die Verwendung von HCC-Zelllinien, u.a. da letztere meist über eine lange Zeit kultiviert werden und so ihre ursprünglichen molekularen Charakteristika verlieren (Leenders, Nijkamp and Borel Rinkes, 2008; He *et al.*, 2015).

Werden primäre Tumorzellen injiziert, so ist ein Monitoring mittels BLI allerdings nicht möglich. Um das Tumorstadium dennoch nicht-invasiv verfolgen zu können, kann sich die Eigenschaft vieler HCC-Zellen und HCC-Zelllinien humanes AFP (hAFP) zu sezernieren zu Nutzen gemacht werden (Martin-Padura *et al.*, 2012). Daher wurde in dieser Arbeit die Eignung des hAFP als Marker für die relative Tumorstadium und das Therapieansprechen der orthotop transplantierten Mäuse untersucht. Da auch bei Huh7-Zellen eine hAFP-Sekretion nachgewiesen wurde

(Martin-Padura *et al.*, 2012), konnten auch die weiteren Versuche mit dieser Zelllinie durchgeführt werden. Wie im vorherigen Versuch erfolgte auch hier durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa die orthotope Injektion von $1 \cdot 10^6$ Huh7-Luc-Zellen in männliche NSG-Mäuse. Das Monitoring erfolgte über einen Zeitraum von 21 Tagen mit wöchentlichen Messungen. Die erste Messung erfolgte 7 Tage nach Transplantation. Mäuse, die bis dahin kein Tumorwachstum zeigten, wurden aus dem Experiment ausgeschlossen. Die Messungen erfolgten mittels verschiedener Methoden. So erfolgte die Bestimmung des hAFP-Levels im Serum, wofür Blutproben aus der Schwanzvene entnommen wurden. Zudem wurde die Photonenemission mit dem IVIS-200 Imaging System detektiert. Das Tumolvolumen wurde zum einen *in vivo* durch Ultraschallmessung und an Tag 21 zusätzlich *ex vivo* nach Exzision des Tumors durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa mittels Kaliper bestimmt. Anhand der Messergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit der Korrelationskoeffizient nach Pearson (R) und das Bestimmtheitsmaß (R^2) bestimmt.

Wie in Abbildung 20A gezeigt, besteht zwischen den hAFP-Messwerten und den durch Ultraschall gemessenen Tumorumfängen eine statistisch signifikante positive Korrelation ($R = 0,9491$; *** $p < 0,001$). Ebenfalls zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation, auch wenn zu einem etwas geringeren Ausmaß, zwischen dem mit Ultraschall gemessenen Tumorumfang und dem Biolumineszenzsignal, ($R = 0,9134$; *** $p < 0,001$) (siehe Abbildung 20B). Ein ähnlicher Koeffizient ergab sich für die Kombination hAFP-Level und Biolumineszenz ($R = 0,9398$; *** $p < 0,001$) (siehe Abbildung 20C). Alle drei *scatterplots* zeigen tendenziell eine Abnahme der Korrelation mit Zunahme der Tumorgöße. Bei Betrachtung der Sensitivität zeigte sich, dass 100% der nachfolgend untersuchten HCCs bereits 1 Woche nach Transplantation der Zellen durch BLI und anhand der Bestimmung des hAFP-Serum-Levels detektiert werden konnten, wohingegen am selben Tag nur 54,55% der Tumoren mittels Sonographie nachweisbar waren.

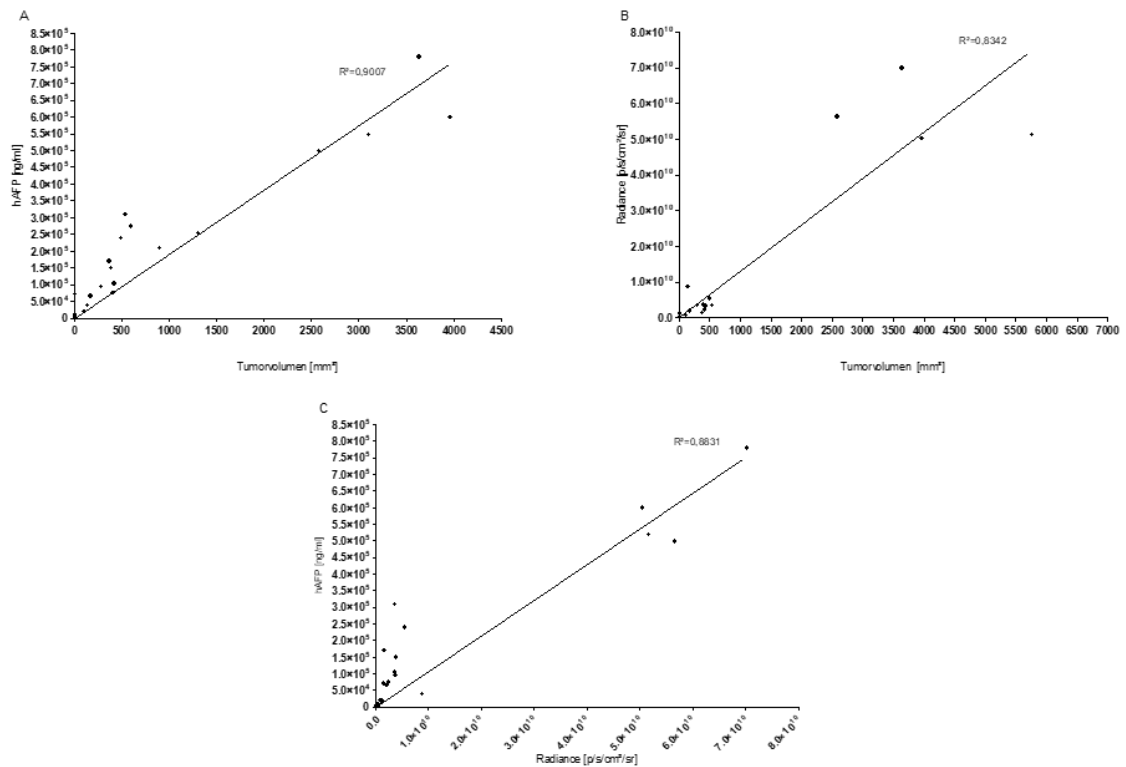


Abbildung 20: Korrelationen von drei verschiedenen Methoden für ein nicht-invasives Monitoring des Tumorstwachstums im orthotopen Mausmodell. $1 \cdot 10^6$ Huh7-Luc-Zellen wurden orthotop in das Parenchym des linken Leberlappens männlicher NSG-Mäuse ($n=11$) injiziert. Das Monitoring begann nach 7 Tagen und erfolgte wöchentlich parallel mittels Ultraschallmessung, Bestimmung des hAFP-Niveaus im Serum und Detektion des Biolumineszenzsignals. Hoch signifikante positive Korrelationen zeigten sich zwischen (A) dem mittels Ultraschall bestimmten Tumolvolumen und dem hAFP-Wert ($R = 0,9491$, $*** p < 0,001$), (B) dem Tumolvolumen und der radiance ($R = 0,9134$, $*** p < 0,001$) sowie zwischen (C) dem hAFP-Level und der radiance ($R = 0,9398$, $*** p < 0,001$).

Ergänzend wurden beide volumetrischen Messtechniken miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die sonographische Bestimmung des Tumolvolumens an Tag 21 stark mit dem realen nach Explantation mittels Kaliper bestimmten Tumolvolumen korreliert ($R = 0,9368$; $p < 0,001$) (siehe Abbildung 21A). Beim direkten Vergleich der Werte beider Techniken (siehe Abbildung 21B) zeigen sich keine eindeutigen Trends. Tendenziell scheinen die mit Ultraschall bestimmten Volumina kleiner als die realen zu sein.

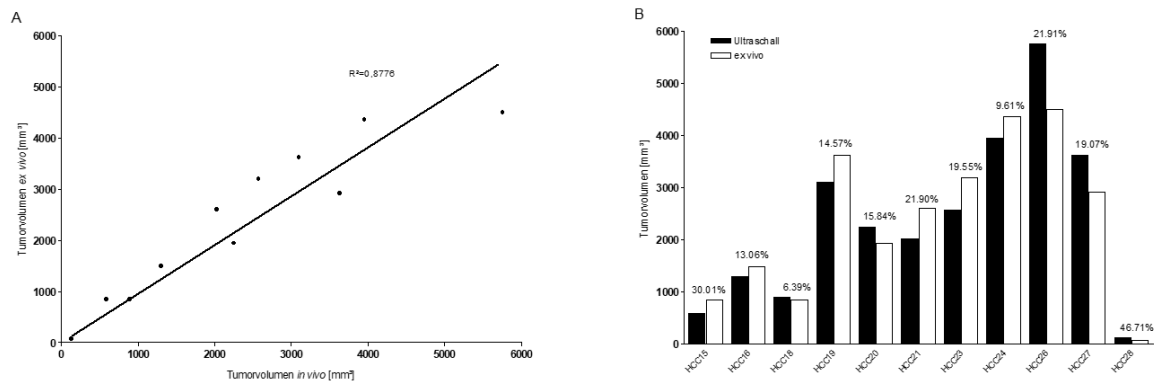


Abbildung 21: Vergleich der volumetrischen Messmethoden. Die *in vivo*-Messung des Tumorkörpers erfolgte auf einer wöchentlichen Basis, beginnend an Tag 7 nach Injektion bis Tag 21 durch Ultraschall. Zusätzlich erfolgte an Tag 21 nach Explantation eine *ex vivo*-Messung der realen Tumordimensionen mittels externer Kaliper-Messung (n=11). **(A)** Es besteht eine starke Korrelation zwischen dem sonographisch bestimmten Tumorkörper und dem realen Tumorkörper ($R=0,9368$, $*** p < 0,001$). **(B)** Direkter Vergleich der ermittelten Volumina beider Methoden. Es sind keine eindeutigen Trends erkennbar. Die prozentualen Abweichungen der Werte schwanken zwischen 6,39% und 46,71%.

3.3 Anreicherung primärer EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ für die Etablierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells

Es wird angenommen, dass TSZ für die Initiation, Progression, Metastasierung und Rezidiventwicklung des HCCs verantwortlich sind (Joo, Kim and Lee, 2015). Das *targeting* ihrer molekularen Strukturen wie z.B. von Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges scheint daher von besonderer Bedeutung für die Therapie des HCCs zu sein (Villanueva *et al.*, 2008). Die TSZ des HCCs lassen sich anhand verschiedener Oberflächenmarker identifizieren, darunter die Epitope EpCAM (Yamashita *et al.*, 2009) und CD90 (Z. F. Yang, Ho, *et al.*, 2008).

Unsere Arbeitsgruppe erforscht daher die Wirkung einer RAD001/MK-2206-Therapie auf orthotope Xenograft-Maustumoren, die mit aus primärem HCC-Gewebe isolierten CD90⁺- und EpCAM⁺-TSZ etabliert wurden. In dieser Arbeit wurde das methodische Vorgehen zur Anreicherung der TSZ aus dem primären Tumorgewebe näher untersucht und es erfolgte die Aufarbeitung einer ersten Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus.

3.3.1 Vorversuche zur Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ aus primärem HCC-Gewebe

Für die Anreicherung von TSZ aus primärem HCC-Gewebe müssen die Zellen zum einen in einer Einzelzellsuspension vorliegen. Zum anderen müssen sie dann anhand spezifischer Merkmale aus dem Zellgemisch isoliert werden können. Da es sich beim HCC um einen soliden Tumor handelt, musste somit zunächst die

Herstellung einer Einzelzellsuspension erfolgen. Hierfür sollte ein kombiniert mechanisch-enzymatisches Verfahren angewendet werden. Die Anreicherung der TSZ sollte im Anschluss anhand ihrer Oberflächenmarker EpCAM und CD90 mittels magnetischer Zellseparation erfolgen. Beide Methoden wurden im Rahmen einzelner Vorversuche auf ihre Eignung hin untersucht.

Trotz ihrer funktionellen Bedeutung für die Tumorbilogie handelt es sich bei den TSZ in aller Regel nur um eine sehr kleine Subpopulation von Zellen im Tumorgewebe (Yamashita *et al.*, 2013). Von Bedeutung ist somit ein schonendes und effizientes Verfahren zur Herstellung der Einzelzellsuspension sowie zur Anreicherung der interessierenden Zellen. Letzteres zeichnet sich v.a. dadurch aus, dass auch bei einem anfänglich geringen Anteil der anzureichernden Zellen in der Suspension eine hohe Reinheit der Selektion erzielt wird und sich ein möglichst geringer Anteil der anzureichernden Zellen in der Depletion wiederfindet (Plouffe, Murthy and Lewis, 2015). Zunächst sollte im Rahmen eines Mischexperimentes überprüft werden, inwieweit diese Kriterien bei der Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen mittels MACS erfüllt werden.

3.3.1.1 Expression von EpCAM und CD90 bei Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen

Für die Durchführung des Mischexperimentes war eine möglichst unabhängige Expression beider Epitope notwendig. Die EpCAM⁺-Zelllinie sollte sich aus einem annähernd 0%igem Anteil an CD90⁺-Zellen und einem möglichst 100%igem Anteil an EpCAM⁺-Zellen zusammensetzen. Umgekehrt sollte sich die CD90⁺-Zelllinie aus einem annähernd 0%igem Anteil an EpCAM⁺-Zellen und einem möglichst 100%igem Anteil an CD90⁺-Zellen zusammensetzen. In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass EpCAM und CD90 in mehreren Zelllinien unabhängig voneinander exprimiert werden. So wurde die Huh7-Zelllinie als eine EpCAM⁺- und CD90⁺-Zelllinie, hingegen die SK-Hep-1-Zelllinie als eine CD90⁺- und EpCAM⁺-Zelllinie beschrieben (Yamashita *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018).

Zunächst wurden beide Zelllinien auf ihre jeweiligen Expressionslevel der TSZ-Marker hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit den entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen diese beiden Epitope gefärbt, um im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse durchzuführen. Dieser Versuch wurde für jede Zelllinie insgesamt dreimal in einem wöchentlichen Abstand wiederholt. Um den Einfluss einer Fixierung der Zellen auf die Expression der Oberflächenmarker zu untersuchen, wurden für die letzten Messungen parallel Aliquots gebildet, die nach Antikörperfärbung direkt vor den Messungen zusätzlich mit PFA fixiert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt. Bei den Huh7-Luc-Zellen konnte eine eindeutig abgrenzbare EpCAM⁺-Zellpopulation mit einem Anteil von durchschnittlich 96,40% aller Zellen detektiert werden, wohingegen die CD90⁺-Population im Durchschnitt 2,60% aller Zellen ausmachte. Bis auf die erste Messung, bei der der Anteil der CD90⁺-Zellen lediglich 68,60% ergab, wurden

ähnliche Ergebnisse in umgekehrter Weise für die SK-Hep-1-Zelllinie erzielt. So betrug der durchschnittliche prozentuale Anteil an CD90⁺-Zellen an der Gesamtpopulation 90,97% und der durchschnittliche prozentuale Anteil an EpCAM⁺-Zellen lediglich 0,70%.

Es zeigte sich, dass die beiden Epitope in beiden Zelllinien unabhängig exprimiert werden und beide Zelllinien somit für das anschließende Mischexperiment geeignet waren. Die Ergebnisse zeigten auch, dass eine Fixierung die Expression der Epitope kaum beeinflusst hat. Die Tatsache, dass bei viermaliger Wiederholung der Messung im Passageverlauf relativ geringe Schwankungen der Ergebnisse erzielt wurden, zeigte überdies, dass die Zelllinien die jeweiligen Epitope stabil exprimieren und die Verwendung beider Zelllinien unabhängig von der Passage möglich sein sollte.

Tabelle 3: Übersicht der durchflusszytometrischen Messwerte der Expression der Oberflächenmarker EpCAM⁺ und CD90⁺ bei Huh7-Luc-Zellen und SK-Hep-1-Zellen im Passageverlauf.

| | Huh7-Luc | | SK-Hep-1 | |
|------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | EpCAM ⁺ | CD90 ⁺ | EpCAM ⁺ | CD90 ⁺ |
| 1. Messung | 97,00% | 1,80% | 0,40% | 68,60% |
| 2. Messung | 90,06% | 7,74% | 0,69% | 99,52% |
| | unfixiert | | unfixiert | |
| 3. Messung | 99,48% | 0,29% | 1,29% | 96,52% |
| | fixiert | | fixiert | |
| 3. Messung | 99,05% | 0,56% | 0,41% | 99,22% |

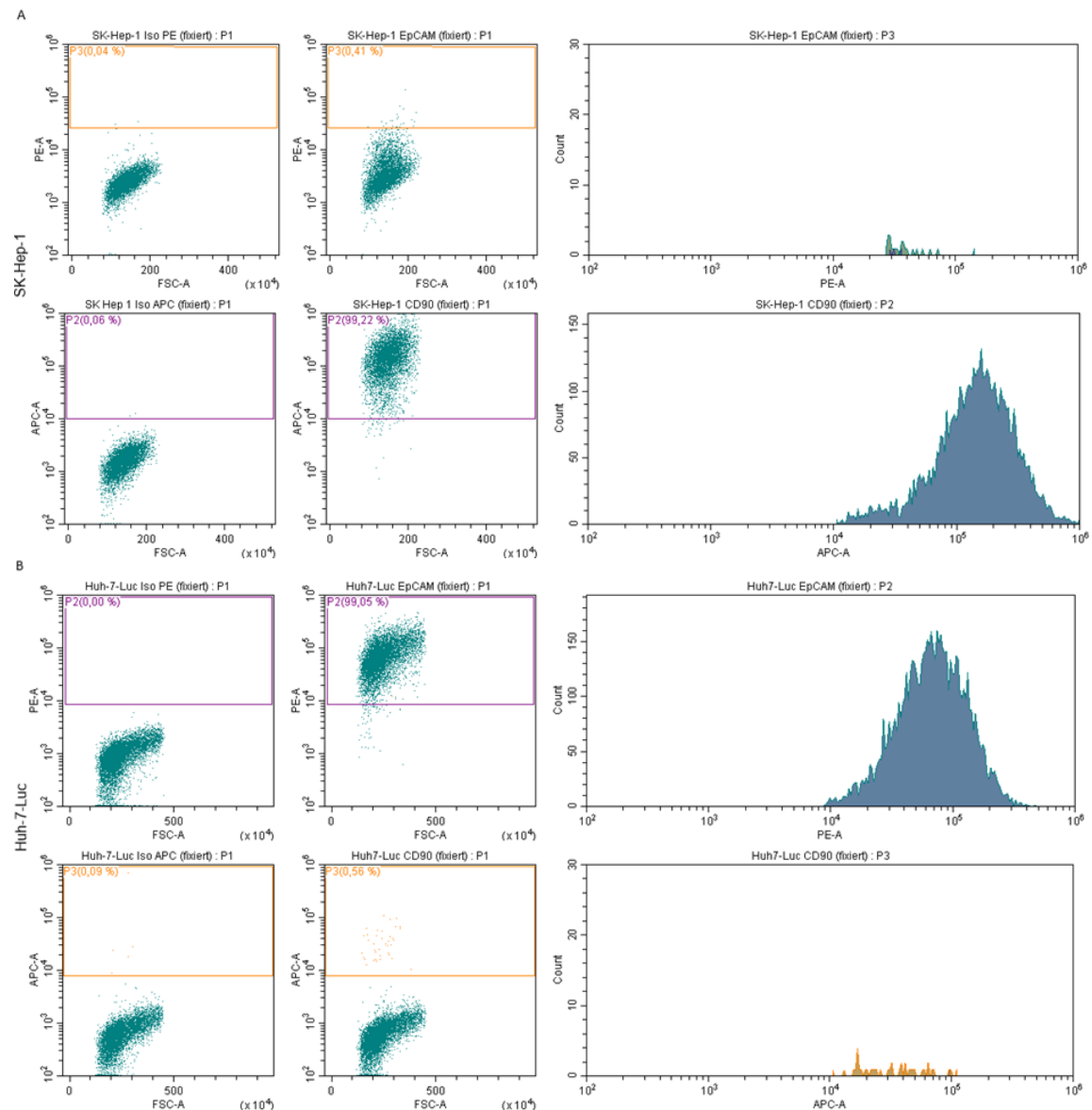


Abbildung 22: Exemplarische dotplots und Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von EpCAM und CD90 durch Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen. Aliquots von je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit CD326(EPCAM) PE bzw. CD90 APC Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Dotplots und Histogramme der SK-Hep-1-Zelllinie sowie **(B)** dotplots und Histogramme der Huh7-Luc-Zelllinie.

3.3.1.2 Mischversuch zur Untersuchung der Effizienz der Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ mittels MACS

Um die Effizienz der für die Anreicherung der EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellpopulationen vorgesehenen Technik der magnetischen Zellseparation zu untersuchen, wurde ein Mischexperiment durchgeführt. Hierfür wurden Mischungen der EpCAM⁺ Huh7-Luc-Zelllinie und der CD90⁺ SK-Hep-1-Zelllinie mit einem 100%igen, 50%igen, 10%igen, 2%igen und 0,4%igen Anteil der anzureichernden Zellpopulation hergestellt. Im Anschluss erfolgte das magnetische *labeling* mit CD90- bzw. EpCAM-MicroBeads und die Färbung mit entsprechenden Fluorochrom-konjugierten Antikörpern. Zur

Kontrolle der erzielten Mischverhältnisse schloss sich eine FACS-Analyse an (Originalprobe). Danach erfolgten die magnetische Zellseparation, eine Zellzählung und eine weitere FACS-Analyse zur Kontrolle der Reinheit der positiven und negativen Zellfraktionen.

Die Ergebnisse der EpCAM-Anreicherung sind in Tabelle 4 und die der CD90-Anreicherung in Tabelle 5 dargestellt. Gezeigt sind die mittels FACS-Analyse gemessene Reinheit der Selektion ($\text{purity (\%)} = \frac{\text{Anzahl positive Zellen Selektion}}{\text{Zellzahl Selektion}} \times 100$) und der Anteil der für den Marker positiven Zellen in der Depletion, der ermittelte Anreicherungsfaktor ($\text{enrichment factor} = \frac{\% \text{ positive Zellen Selektion}}{\% \text{ positive Zellen Originalprobe}}$) sowie die Wiedergewinnung der anzureichernden Zellen ($\text{target cell recovery (\%)} = 100 \times \frac{\text{Zellzahl Selektion} \times \% \text{ positive Zellen Selektion}}{\text{Zellzahl Originalfraktion} \times \% \text{ positive Zellen Originalprobe}}$) (Miltenyi *et al.*, 1990; Miltenyi Biotec, 2009; Tomlinson *et al.*, 2013).

Je niedriger der prozentuale Anteil an Huh7-Luc-Zellen in der anfänglichen Mischung ist desto schwieriger ist es eine hohe Reinheit zu erzielen. Bei einem in etwa 50%igen Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der Originalprobe wird in der positiven Fraktion noch eine Reinheit von 93,12% erzielt. Bei einer Einzelzellsuspension mit einem circa 0,4%igen Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der nicht-angereicherten Probe lässt sich nur noch eine Reinheit von 10,59% erzielen. Auch die Wiedergewinnung der eingesetzten EpCAM⁺-Zellen in der Selektion sinkt. Während sich nach Anreicherung der 50%-Mischung noch 90,40% der Huh7-Luc-Zellen in der Selektion wiederfinden, gehen während der Anreicherung der 0,4%-Mischung fast 85% der Huh7-Luc-Zellen verloren und es finden sich nur noch 15,28% von ihnen in der Selektion wieder. Während Reinheit und Wiedergewinnung der interessierenden Zellen abnehmen, steigt der Anreicherungsfaktor. In der 50%-Mischung liegt er noch bei circa 2 und bei der 0,4%-Mischung lässt sich eine mehr als 20fache Anreicherung der EpCAM⁺-Zellen erzielen.

Tabelle 4: Ergebnisse der EpCAM-Anreicherung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2.

| Angestrebter Anteil EpCAM ⁺ -Zellen | 100% | 50% | 10% | 2% | 0,4% |
|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Originalprobe | 96,65% | 47,32% | 9,93% | 2,35% | 0,50% |
| Selektion | 97,50% | 93,12% | 79,34% | 44,19% | 10,59% |
| Depletion | 1,66% | 0,45% | 1,09% | 1,04% | 0,44% |
| Anreicherungsfaktor | 1,01 | 1,97 | 7,99 | 18,80 | 21,18 |
| Wiedergewinnung | 86,22% | 90,40% | 72,89% | 40,28% | 15,28% |

Die Ergebnisse der CD90-Anreicherung zeigen, dass auch hier die erzielte Reinheit mit sinkendem Anteil CD90⁺-Zellen in der Zellsuspension abnimmt. Bei einem 50%igen Anteil an CD90⁺-Zellen in der noch nicht separierten Originalprobe lässt sich nach Separation in der Selektion eine Reinheit von 85,93% erzielen. Hingegen kommt es im Unterschied zur EpCAM-Anreicherung zu einer sprunghaften Abnahme der Reinheit, die bei der 10%-Mischung nur noch 20,48% und bei der 0,4%-Mischung nur noch 1,01% beträgt. Auffällig ist der sehr hohe Prozentsatz an CD90⁺-Zellen in der Depletion nach Anreicherung der 50%-Mischung mit fast 50%.

Auch die Werte der Wiedergewinnung zeigen, dass die magnetische Separation der Zellen nicht effizient war. Während der Separation der 50%-Mischung und der 10%-Mischung gingen circa 90% der CD90⁺-Zellen verloren und nach Separation der 2%- und 0,4%-Mischung waren in der Selektion kaum noch SK-Hep-1-Zellen nachweisbar. Der maximale Anreicherungsfaktor lag bei nur 2,12 für die 10%-Mischung.

Tabelle 5: Ergebnisse der CD90-Anreicherung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2.

| Angestrebter Anteil CD90 ⁺ -Zellen | 100% | 50% | 10% | 2% | 0,4% |
|---|--------|--------|--------|-------|-------|
| Originalprobe | 98,34% | 50,29% | 9,64% | 2,52% | 0,78% |
| Selektion | 98,96% | 85,93% | 20,48% | 5,22% | 1,01% |
| Depletion | 0,40% | 49,69% | 10,21% | 2,00% | 0,61% |
| Anreicherungsfaktor | 1,01 | 1,71 | 2,12 | 2,07 | 1,29 |
| Wiedergewinnung | 83,90% | 10,33% | 11,78% | 2,32% | 0,64% |

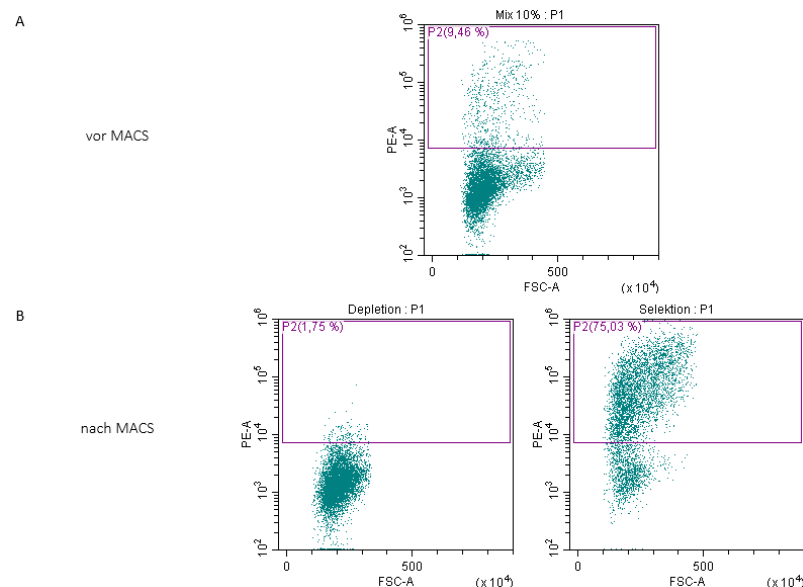


Abbildung 23: Exemplarische dotplots einer EpCAM-Anreicherung. Eine Zellsuspension mit einem 10%igen Anteil an Huh7-Luc-Zellen und einem 90%igen Anteil an SK-Hep-1-Zellen wurde mit EpCAM-MicroBeads markiert und EpCAM-PE Antikörpern gefärbt. Es folgte **(A)** eine FACS-Messung der nicht-angereicherten Zellen vor und **(B)** eine weitere FACS-Analyse der Selektion und Depletion nach magnetischer Separation.

3.3.1.3 Beeinflussung der Expression von EpCAM und CD90 durch die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit dem Tumor Dissociation Kit und dem gentleMACS Dissociator

Die Herstellung einer homogenen Einzelzellsuspension aus dem primären HCC-Gewebe sollte zum einen durch mechanische Dissoziation mit einem Skalpell, dem gentleMACS Dissociator und Filtrierung durch Zellfilter unterschiedlicher Feinheit,

und zum anderen mittels enzymatischer Digestion durch 60-minütige Inkubation mit dem Human Tumor Dissociation Kit bestehend aus drei verschiedenen durch den Hersteller nicht näher beschriebenen Enzymen (Enzym R, Enzym H und Enzym A) erfolgen.

Ziel des nachfolgenden Vorexperimentes war es zu prüfen, ob die Expression der Oberflächenmarker EpCAM und CD90 durch die enzymatische Digestion beeinflusst wird. Der Versuch wurde mit der stabil EpCAM-exprimierenden Zelllinie Huh7-Luc und der stabil CD90-exprimierenden Zelllinie SK-Hep-1 durchgeführt. Um die Expression der Epitope vor der Inkubation zu ermitteln, erfolgte zunächst eine FACS-Analyse. Dann wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, in mit dem Enzymmix aufgefüllte C-tubes überführt. Es erfolgte dann ein Programmdurchlauf ‚h_tumor_1‘ mit dem gentleMACS Dissociator. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation der Zellen mit dem Enzymmix unter kontinuierlicher Rotation im Tube Rotator bei 12 rpm und 37°C erfolgte eine zweite durchflusszytometrische Analyse zur Kontrolle des prozentualen Anteils an EpCAM⁺- bzw. CD90⁺-Zellen, sodass Rückschlüsse auf den Erhalt der Epitope möglich waren. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 6 und zeigen, dass die Expression sowohl von EpCAM als auch von CD90 nach der enzymatischen Inkubation nur vernachlässigbar geringer ist. Vor enzymatischer Digestion betrug der Anteil an EpCAM⁺-Zellen 99,28% und nach Inkubation 95,08%. Bei den SK-Hep-1-Zellen wurden vor der enzymatischen Verdauung 99,97% CD90⁺-Zellen detektiert und nach der Verdauung immer noch 99,85%. In Abbildung 24 sind die *dotplots* und Histogramme zur Veranschaulichung dargestellt.

Die Anwendung des Tumor Dissociation Kits in Kombination mit der Verwendung des gentleMACS Dissociators führte zu keiner negativen Beeinflussung der Expression der Epitope EpCAM und CD90. Es handelt sich somit um eine geeignete Methode zur schonenden Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem primär gewonnenen Tumorgewebe.

Tabelle 6: Expression der Oberflächenmarker EpCAM auf Huh7-Luc-Zellen und CD90 auf SK-Hep-1-Zellen vor und nach kombiniert mechanisch-enzymatischer Behandlung.

| | EpCAM ⁺ (Huh7-Luc) | CD90 ⁺ (SK-Hep-1) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
| vor Inkubation | 99,28% | 99,97% |
| nach Inkubation | 95,08% | 99,85% |

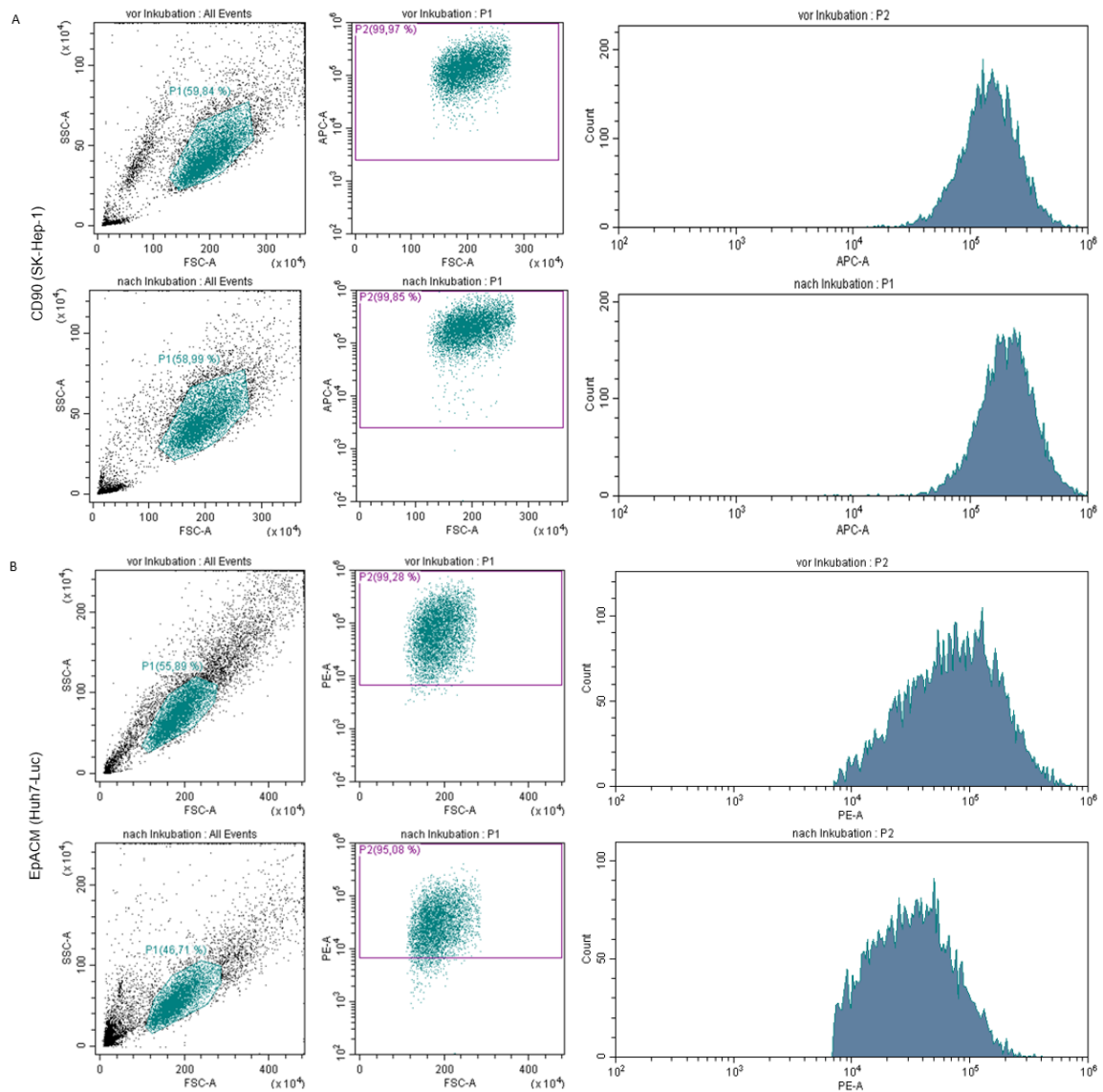


Abbildung 24: Dotplots und Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung des Erhalts von EpCAM- und CD90-Molekülen nach Inkubation mit dem Tumor Dissociation Kit und gentleMACS Dissociator. SK-Hep-1-Zellen (A) und Huh7-Luc-Zellen (B) wurden im kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren im gentleMACS Dissociator und mit dem Human Dissociation Kit behandelt. Sowohl vor (oben) als auch im Anschluss (unten) an die Behandlung erfolgte eine FACS-Analyse.

3.3.2 Anreicherung von EpCAM⁺-TSZ aus orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren

Aus HCC-Gewebeproben von zwei durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa mit Huh7-Luc-Zellen orthotop transplantierten NSG-Mäusen, von denen die eine mit RAD001 und MK-2206 behandelt wurde (Tumor A) und die andere der Kontrollgruppe angehörte (Tumor B) (siehe Kapitel 3.1.2), erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension im kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren mit Skalpell, gentleMACS Dissociator und Human Dissociation Kit sowie *strainer* (siehe Kapitel 2.2.2.1). Im Anschluss wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer

gezählt. Für Tumor A ergab sich eine Zahl von 1.920.000 Zellen und für Tumor B von 2.250.000 Zellen. Da es sich um mit Huh7-Luc-Zellen generierte Tumoren handelte, diese Zelllinie EpCAM⁺ ist, die Zellausbeute zudem sehr gering war und sich die CD90-Anreicherung in den Mischversuchen als weniger effizient erwies, wurde im Rahmen dieses Versuches lediglich eine Anreicherung der EpCAM⁺-TSZ durchgeführt. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension folgte das magnetische *labeling* von 960.000 Zellen aus Tumor A und von 562.500 Zellen aus Tumor B mit CD326 (EpCAM)-MicroBeads und Fluorochrom-konjugierten Antikörpern (PE). Sowohl vor magnetischer Separation als auch nach magnetischer Separation erfolgte eine FACS-Analyse. Die entsprechenden *dotplots* sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Anteil an EpCAM⁺-Zellen im Tumor A mit einem 0,78%igem Anteil sehr gering war, wohingegen ihr Anteil im Tumor B bereits vor magnetischer Anreicherung mit 33,03% verhältnismäßig hoch war. Dementsprechend gelang die Anreicherung der Zellen aus Tumor A auf lediglich 3,15%. Der Anteil EpCAM⁺-Zellen in der Selektion von Tumor B ergab 73,52%. Er war um den Faktor 2,23 und somit um einen mehr als doppelten Prozentsatz höher als vor magnetischer Anreicherung. Die nach der Separation gezählte Zellzahl in der Selektion von Tumor A betrug 139.258 Zellen und von Tumor B 190.000 Zellen. Die Wiedergewinnung lag für Tumor A bei 88,63% und die für Tumor B bei 75,28%.

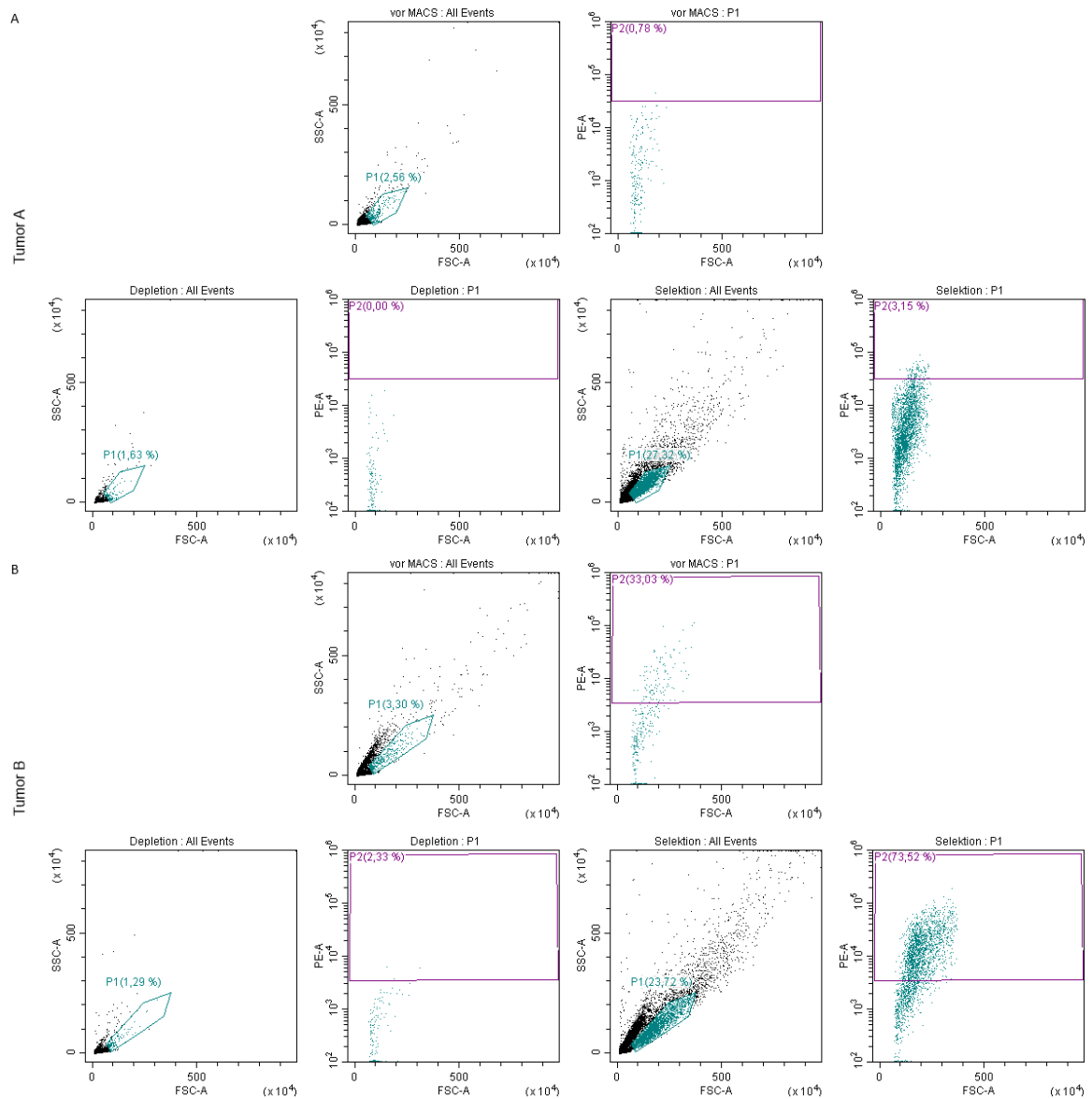


Abbildung 25: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM⁺-Zellen in Gewebeproben von zwei orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren vor und nach magnetischer Separation. 1*10⁶ Huh7-Luc-Zellen wurden orthotop in das Parenchym des linken Leberlappens von männlichen NSG-Mäusen injiziert. Nach 7 Tagen wurde die Behandlung der tumortragenden Mäuse mit entweder Placebo oder der Kombination von RAD001 und MK-2206 begonnen. Nach 21 Tagen wurden die Primärtumoren entnommen. Aus jeweils einer Gewebeprobe (**A**) der Behandlungsgruppe (Tumor A) und (**B**) der Placebogruppe (Tumor B) wurde im kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit EpCAM-MicroBeads markiert und mit EpCAM-PE Antikörpern gefärbt. Es folgte eine FACS-Messung der nicht-angereicherten Zellen vor und eine weitere FACS-Analyse der Selektion und Depletion nach magnetischer Separation.

Tabelle 7: Ergebnisse der EpCAM-Anreicherung aus Gewebeproben von zwei orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren.

| | Tumor A | Tumor B |
|--|---------|---------|
| Anteil EpCAM ⁺ -Zellen vor Anreicherung | 0,78% | 33,03% |
| Selektion | 3,15% | 73,52% |
| Depletion | 0,00% | 2,33% |
| Anreicherungsfaktor | 4,04 | 2,23 |
| Wiedergewinnung | 88,63% | 75,28% |

3.3.3 Anreicherung von CD90⁺- und EpCAM⁺-TSZ aus einer HCC-Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus

Der „*workflow*“ für die Aufarbeitung der Patientenprobe ist in Abbildung 26 veranschaulicht.

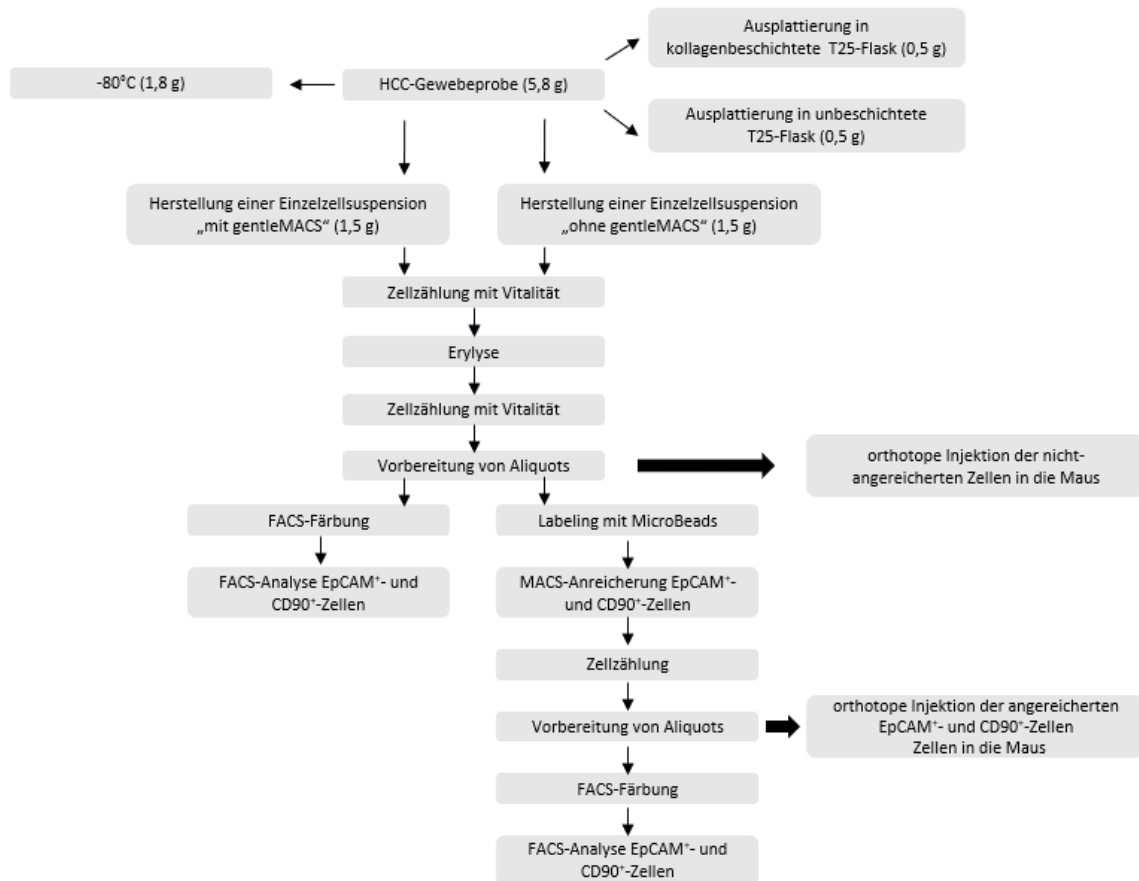


Abbildung 26: „*Workflow*“ für die Aufarbeitung der Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus.

Nach Erhalt aus dem OP wurde die frische HCC-Gewebeprobe gewogen. Sie hatte ein Gewicht von insgesamt 5,8 g. Davon wurden 1,8 g bei -80°C eingefroren und jeweils 0,5 g in kollagenbeschichtete und unbeschichtete T25-Flaschen ausplattiert. Aus 1,5 g der Probe erfolgte die Herstellung einer Einzelzellsuspension durch mechanische Zerkleinerung mit dem gentleMACS Dissociator in Kombination mit einer enzymatischen Verdauung mit dem Human Dissociation Kit. Die so hergestellte Einzelzellsuspension bildete die Fraktion „mit gentleMACS“. Eine Probe von 1,5 g wurde lediglich mechanisch mit einem Skalpell zerkleinert und im Anschluss durch einen 70ger und 30ger *strainer* gegeben und bildete so die Fraktion „ohne gentleMACS“. Nach Herstellung der Einzelzellsuspensionen erfolgte eine erste Zellzählung. Diese ergab für die Fraktion „mit gentleMACS“ eine Zellzahl von insgesamt $1,3 \cdot 10^8$ Zellen mit einer Vitalität von 90% und für die Fraktion „ohne gentleMACS“ eine Zellzahl von $1 \cdot 10^7$ Zellen mit einer Vitalität von 90,90%. Es

folgten die Erylyse und eine erneute Zählung. Die Zellzahl der Fraktion „mit gentleMACS“ hat sich auf $4 \cdot 10^7$ Zellen reduziert, die der Fraktion „ohne gentleMACS“ war annähernd unverändert. Von jeder Fraktion wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa orthotop in das Parenchym des linken Leberlappens von zwei männlichen NSG-Mäusen injiziert. Kurz vor Injektion betrug die Vitalität der „ohne gentleMACS“-Fraktion 89,19% und die der „mit gentleMACS“-Fraktion 95,5%. Um eine noch differenziertere Aussage über die Vitalität der injizierten Zellen treffen zu können, wurden Aliquots beider Fraktionen mit Annexin V-FITC und 7-AAD gefärbt (siehe Abbildung 27). Die so bestimmte Vitalität der „mit gentleMACS“-Fraktion lag bei 89,70% und die der Fraktion „ohne gentleMACS“ bei 80,70%. In beiden Proben lag der prozentuale Anteil nekrotischer Zellen bei jeweils circa 1,30%. Der Anteil frühapoptotischer Zellen betrug bei der mit gentleMACS behandelten Fraktion 6,45% und in der unbehandelten Fraktion 8,27%. Der Prozentsatz spätapoptotischer Zellen war in der unbehandelten Fraktion mit 9,70% deutlich höher als in der behandelten Fraktion mit einem nur 2,52%igem Anteil.

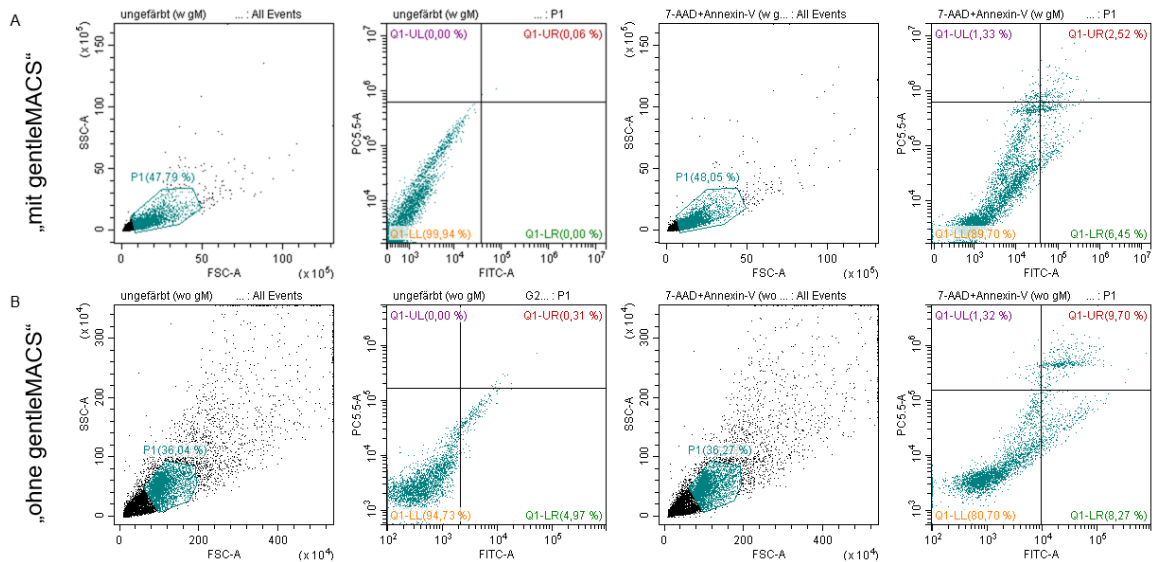


Abbildung 27: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse der injizierten HCC-Zellen nach Färbung mit 7-AAD und Annexin V-FITC zur Bestimmung der Vitalität. Aliquots beider Fraktionen wurden vor orthotoper Injektion in die Maus mit 7-AAD (x-Achse) und Annexin V-FITC (y-Achse) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Durch Aufteilung des Koordinatensystems in vier Quadranten lassen sich vier Subpopulationen voneinander abgrenzen: vitale Zellen (Q1-LL), nekrotische Zellen (Q1-UL), frühapoptotische Zellen (Q1-LR) und spätapoptotische Zellen (Q1-UR). **(A)** Dotplots der Fraktion „mit gentleMACS“ und **(B)** dotplots der Fraktion „ohne gentleMACS“.

Zur Detektion des prozentualen Anteils EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen in der HCC-Probe wurden Aliquots beider Fraktionen mit Fluorochrom-markierten EpCAM- bzw. CD90-Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Die jeweiligen dotplots sind in Abbildung 28 und 29 dargestellt. Der Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der „mit gentleMACS“-Fraktion betrug 33,88% und der Anteil an CD90⁺-Zellen 14,82%. Der Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der „ohne gentleMACS“-Fraktion betrug 88,48% und der Anteil an CD90⁺-Zellen lediglich 4,67%. Es folgte die magnetische Zellseparation der „mit gentleMACS“-Fraktion. Die Zellzahl in der Fraktion „ohne

gentleMACS“ war nicht ausreichend hierfür. Jeweils $4,5 \cdot 10^6$ Zellen wurden entweder mit EpCAM-MicroBeads oder mit CD90-MicroBeads markiert. Im Anschluss an die Separation erfolgte eine Zählung der Zellen. Die Zellzahl der Selektion der EpCAM-Anreicherung betrug 800.000 und die der CD90-Anreicherung 720.000. Aliquots von 650.000 Zellen der CD90-Selektion und 730.000 Zellen der EpCAM-Selektion wurden für die orthotope Injektion vorbereitet, die durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa erfolgte. Die Zellen der CD90-Selektion wurden in 20 μ l PBS resuspendiert und mit 20 μ l Matrigel vermischt. Da lediglich ein Volumen von 20 μ l injiziert wurde, wurden letztlich 325.000 Zellen in die Maus transplantiert. Die EpCAM-Selektion wurde in zwei NSG-Mäuse injiziert. Die Zellen wurden in 40 μ l PBS resuspendiert und mit der gleichen Menge Matrigel vermengt, sodass pro Maus 182.500 Zellen injiziert wurden. Die mittels Trypanblau-Färbung ermittelte Vitalität der EpCAM-Selektion betrug kurz vor Injektion 55,80%, die der CD90-Selektion 90%. Abschließend erfolgte eine erneute FACS-Analyse. Der Anteil an EpCAM⁺-Zellen nach MACS ergab 37,74% und der an CD90⁺-Zellen 15,34%. Die Wiedergewinnung betrug für die CD90⁺-Zellen 16,66% und für die EpCAM⁺-Zellen 19,80%. Eine Übersicht aller Ergebnisse der FACS-Messungen findet sich in Tabelle 8. Aufgrund der geringen Zellzahl wurde hier auf eine Färbung mit 7-AAD und Annexin V-FITC verzichtet.

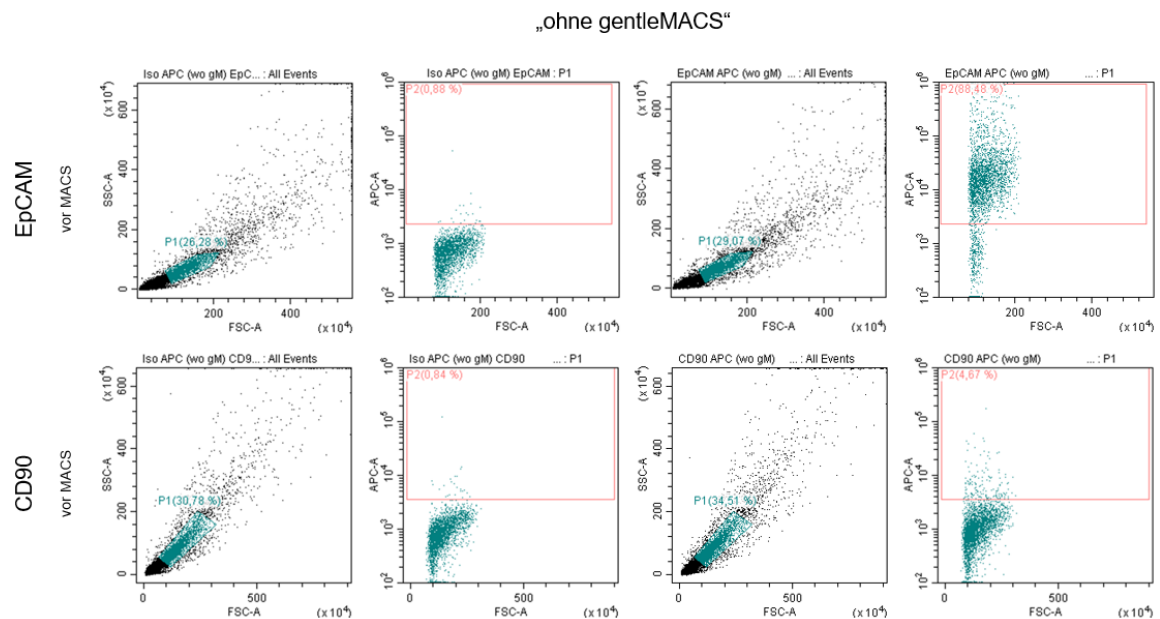


Abbildung 28: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen in der Patientenprobe ohne kombiniert mechanisch-enzymatische Aufarbeitung.

„mit gentleMACS“

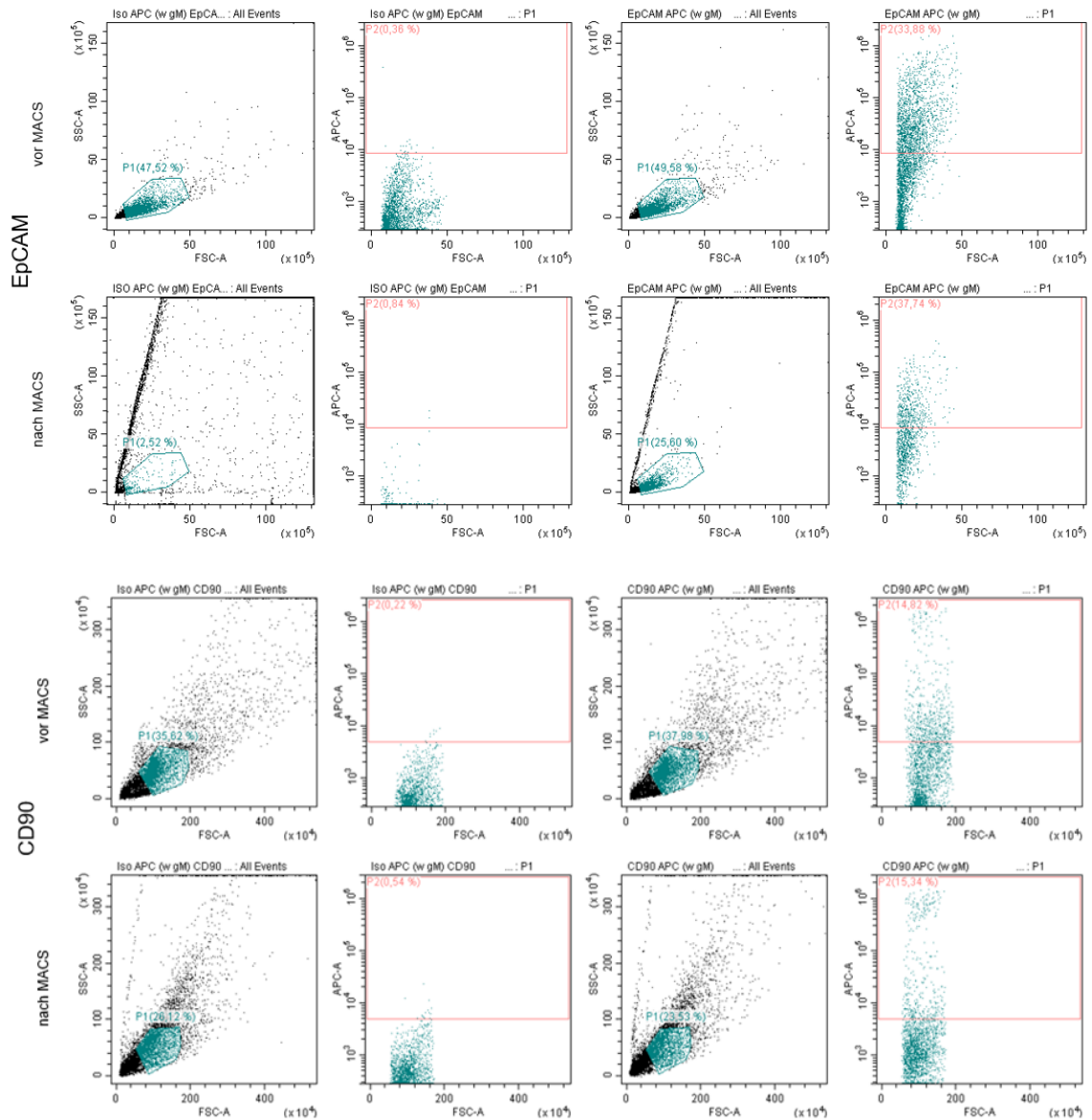


Abbildung 29: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen in der Patientenprobe mit kombiniert mechanisch-enzymatischer Aufarbeitung vor (oben) und nach (unten) magnetischer Separation.

Tabelle 8: FACS-Analyse zur Bestimmung der Reinheit der CD90⁺- und EpCAM⁺-Aliquots jeweils vor und nach magnetischer Separation sowie mit und ohne kombiniert mechanisch-enzymatischer Aufarbeitung.

| | | EpCAM ⁺ | CD90 ⁺ |
|-----------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| mit gentleMACS | vor MACS | 33,88% | 14,82% |
| | nach MACS | 37,74% | 15,34% |
| | Selektion | 1,11 | 1,04 |
| | Anreicherungsfaktor | 19,80% | 16,66% |
| | | EpCAM⁺ | CD90⁺ |
| ohne gentleMACS | vor MACS | 88,48% | 4,67% |
| | nach MACS | X | X |

3.3.4 Tumorigenität der nicht-angereicherten und angereicherten HCC-Zellen

Wie oben beschrieben, wurde durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa eine orthotope Transplantation von je $1 \cdot 10^6$ nicht-angereicherten Zellen der „ohne gentleMACS“-Fraktion und der „mit gentleMACS“-Fraktion in je eine männliche NSG-Maus vorgenommen. Unter Einbeziehung der FACS-Ergebnisse lässt sich berechnen, dass sich in dem Aliquot der „ohne gentleMACS“-Fraktion 46.700 CD90⁺-Zellen und 885.000 EPCAM⁺-Zellen und in dem Aliquot der „mit gentleMACS“-Fraktion 338.800 EpCAM⁺-Zellen und 148.200 CD90⁺-Zellen befunden haben müssen. Die anschließende Transplantation von 325.000 Zellen der CD90⁺-Selektion erfolgte in eine Maus und die Transplantation von jeweils 182.500 Zellen EpCAM⁺-Selektion in zwei NSG-Mäuse. Auch hier lässt sich unter Einbeziehung der FACS-Ergebnisse die ungefähre Zahl an injizierten TSZ berechnen. In der CD90⁺-Selektion müssten sich in etwa 55.991 CD90⁺-Zellen und in der EpCAM⁺-Selektion 68.875 EpCAM⁺-Zellen befunden haben.

In regelmäßigen Abständen wurde Serum aus den Schwanzvenen der transplantierten Mäuse entnommen und auf das hAFP-Level als Indikator für Tumorwachstum hin untersucht. Nach Erreichen der Terminationskriterien wurden die Mäuse getötet und die Tumoren sowie gegebenenfalls entstandene Metastasen entnommen. Leider war im Nachhinein nicht mehr nachvollziehbar, welche der nicht-angereicherten Fraktionen in welche der beiden Mäuse transplantiert wurde. Letztlich war in einer der transplantierten Mäuse nach 16 Wochen ein Tumorwachstum zu verzeichnen. Der Tumor wurde dann aus dem linken Leberlappen entnommen. Das Gewebe dieses Tumors wurde in zwei weitere NSG-Mäuse transplantiert. Bei allen drei mit den angereicherten Zellen transplantierten Mäusen war auch nach 30 Wochen kein Tumorwachstum nachweisbar.

3.3.5 Kultivierung der nicht-angereicherten HCC-Zellen in kollagenbeschichteten und unbeschichteten Kulturflaschen

Jeweils 0,5 g der frischen HCC-Gewebeprobe wurde in eine kollagenbeschichtete und eine unbeschichtete T25-Kulturflasche ausplattiert. Bereits 24 h nach Aussaat der Zellen zeigten sich sowohl in der beschichteten als auch in der unbeschichteten Kulturflasche erste adhärente Zellen, die tendenziell noch stark abgerundet waren. Während in der unbeschichteten Flasche nur vereinzelt Zellen adhäriert waren, waren in der beschichteten Flasche deutlich mehr adhärente Zellen zu erkennen. Nach 72 h nahmen die adhärierten Zellen in der kollagenbeschichteten Flasche deutlich länglichere Formen an und zytoplasmatische Ausläufer waren sichtbar. In der unbeschichteten Flasche waren nach 72 h bereits alle Zellen abgestorben, sodass im weiteren Verlauf lediglich die in der kollagenbeschichteten Flasche

ausgesäten Zellen weiter verfolgt wurden. Doch aufgrund eines Pilzbefalls dieser Zellen 24 h später musste dieser Versuch beendet werden.

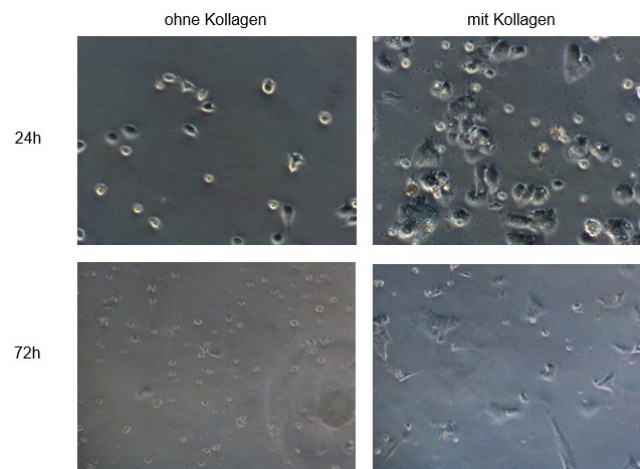


Abbildung 30: Vergleich des Adhärenzverhaltens der isolierten, nicht-angereicherten HCC-Zellen der primären Patientenprobe auf Kollagen und Kunststoff.

4 Diskussion

Das HCC ist mit ungefähr 80%, gefolgt vom ICC mit 15%, der häufigste histologische Subtyp der primären Lebertumoren. Es handelt sich beim HCC um die weltweit zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache (Ferlay *et al.*, 2015). Die Inzidenz unterliegt starken regionalen Schwankungen, nimmt aber insgesamt stetig zu, auch in Regionen mit bisher eher geringerer Inzidenz wie Europa und den USA (Gomaa *et al.*, 2008; Venook *et al.*, 2010; Sawatzki and Semela, 2012). Trotz verbesserter *screening*-Methoden erfolgt die Diagnose aufgrund des langen asymptomatischen Verlaufs meist erst spät, sodass nur wenige Patienten von einer kurativen Therapie profitieren (Singal and El-Serag, 2015). Die Mehrzahl der Patienten stirbt binnen eines Jahres nach Diagnosestellung (Greten *et al.*, 2005). Der Multi-Kinase-Inhibitor Sorafenib war die erste und für viele Jahre einzige Substanz, für die eine lebensverlängernde Wirkung nachgewiesen werden konnte. Sie führt zu einer signifikanten, jedoch lediglich moderaten Lebenszeitverlängerung von 2,8 Monaten. Trotz anfänglicher Remission kommt es auch unter dieser Therapie fast regelhaft zur Wiederaufnahme des Tumorwachstums (Llovet, Ricci and Mazzaferro, 2008).

Nach über einem Jahrzehnt ohne Fortschritt in der Forschung steht seit 2020 mit der Kombination des Immun-*checkpoint*-Inhibitors Atezolizumab und dem Angiogenesehemmer Bevacizumab eine Erstlinientherapie des nicht-resezierbaren HCCs zur Verfügung, die zu einer gesteigerten Remissionsrate, einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um 2,5 Monate (6,8 vs. 4,3 Monate) und zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens um 12,6% nach 12 Monaten (67,2% vs. 54,6%) bei gleichzeitig deutlich besserer Verträglichkeit als bei der Therapie mit dem Multi-Kinase-Inhibitor führt (Luo, Wu and He, 2021). Trotzdem bleibt die Prognose auch unter dieser Therapie für die Mehrzahl der Patienten mit fortgeschrittenem HCC schlecht. Zurückgeführt wird dies u.a. auf die sog. TSZ, eine kleine Subpopulation von Tumorzellen, die viele Eigenschaften mit normalen Stammzellen teilt und die für die Initiierung und Aufrechterhaltung des Tumorwachstums sowie Metastasierung und Chemo- und Radioresistenz des Tumors verantwortlich gemacht wird (Joo, Kim and Lee, 2015). Das gezielte *targeting* molekularer Strukturen dieser TSZ steht daher im Fokus der aktuellen Tumortheraieforschung.

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist ein bedeutender Signalweg zur Regulierung von Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben und er ist auch der am häufigsten deregulierte Signalweg bei der Mehrzahl aller Tumorentitäten, auch beim HCC. Bei diesem wurden in bis zu 50% der Patienten Mutationen von Komponenten dieses Signalweges nachgewiesen (Villanueva *et al.*, 2008). Im Rahmen diverser Studien wurde mittlerweile zudem seine zentrale Bedeutung in der Biologie von TSZ festgestellt (Xia and Xu, 2015). Daher scheinen Komponenten dieses Signalweges geeignete Zielstrukturen zu sein, um TSZ selektiv zu eliminieren.

MTOR-Inhibitoren werden bereits seit vielen Jahren als Immunsuppressiva bei organtransplantierten Patienten eingesetzt. Zu diesen Substanzen zählen auch allosterische mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin und seine Analoga, darunter RAD001, die aufgrund ihrer antiproliferativen Wirkung auch zunehmend in den Fokus der Tumorforschung rücken. Die Wirkstoffe zeichnen sich durch ihre gute orale Bioverfügbarkeit und geringen Nebenwirkungen aus (MacKeigan and Krueger, 2015). Aufgrund der Einbindung von mTOR in eine intrinsische inhibitorische *feedback*-Schleife führt eine mTOR-Inhibition zu einer vermehrten Aktivierung der oberhalb von mTOR gelegenen Kinase AKT. Vor allem dieser Mechanismus wird für den limitierten Therapieerfolg einer RAD001-Monotherapie verantwortlich gemacht (Y. Shi *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die kombinatorische Behandlung der drei HCC-Zelllinien Hep3B, HepG2 und Huh7 und einer Cholangiokarzinom-Zelllinie mit RAD001 und MK-2206 bereits bei niedrigen Konzentrationen einen synergistischen Hemmeffekt auf die Proliferation der Zellen sowohl *in vitro* als auch auf das subkutane Wachstum *in vivo* hat (Grabinski *et al.*, 2012; Ewald *et al.*, 2013). Basierend auf diesen Ergebnissen führt unsere Arbeitsgruppe weitergehende Untersuchungen durch. Ausgehend von der Annahme, dass auch das HCC dem TSZ-Modell folgt und CD90⁺- und EpCAM⁺-Zellen typische TSZ-Eigenschaften aufweisen, sollen mittels MACS aus primärem HCC-Gewebe EpCAM⁺- und CD90⁺-Zellen isoliert werden. Die Zellen sollen dann für die Etablierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells verwendet werden, um nach Tumorgenerierung eine kombinatorische Therapie mit RAD001 und MK-2206 durchzuführen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen sollen als ein Beitrag zu diesem Forschungsprojekt verstanden werden.

4.1 Kombinatorische Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit AKT- und mTOR-Inhibitoren

Subkutane Mausmodelle haben gewisse Vorteile. Sie sind relativ einfach durchzuführen, wenig invasiv und das Tumorwachstum ist leicht zu verfolgen (Bagi and Andresen, 2010). Doch im Rahmen diverser Studien wurde belegt, dass das Mikromilieu nicht nur die Morphologie und das Metastasierungsverhalten, sondern auch die Chemosensitivität des Tumors beeinflusst, insbesondere beim HCC (Wilmanns *et al.*, 1992; Newell *et al.*, 2008; Yang, Ikuo and Roberts, 2011; Hernandez-Gea *et al.*, 2013). Aus diesem Grund sollte zunächst untersucht werden, ob die Hemmung vom PI3K/AKT/mTOR-Signalweg durch RAD001 und MK-2206 nicht nur im subkutanen Xenotransplantationsmodell mit HCC-Zelllinien (Grabinski *et al.*, 2012), sondern auch bei der Behandlung von HCC-Zelllinien, die in der Leber und somit in ihrer natürlichen Lokalisation wachsen, auftritt.

4.1.1 Vorversuch zur Sensitivität der Huh7-Luc-Zellen gegenüber RAD001 und MK-2206 *in vitro*

Vor der orthotopen Injektion der Huh7-Luc-Zellen durch PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa in die Maus wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 in einem festen Verhältnis von 1:5 einzeln und in Kombination mit einer unbehandelten DMSO-Kontrolle als Referenz *in vitro* untersucht. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die Herstellung von NP40-Proteinlysaten, um in der anschließenden Western Blot-Analyse die Phosphorylierung ausgewählter Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zu untersuchen.

Die signifikante Reduktion des Signals für pS6 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nach alleiniger Inkubation der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 ist ein Indiz für eine erfolgreiche Hemmung von mTORC1. Allerdings konnte die unter Monotherapie mit allosterischen mTOR-Inhibitoren wie RAD001 in vielen Studien beschriebene, durch den Wegfall der mTORC1/S6K-abhängigen inhibitorischen *feedback*-Schleife bedingte, vermehrte Phosphorylierung von AKT an S473 nicht detektiert werden (Yijiang Shi *et al.*, 2005; O'Reilly *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). Es zeigte sich sogar im Gegenteil ein im Vergleich zur Kontrolle zwar nicht signifikantes, allerdings dennoch vermindertes Signal für pAKT(S473). Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, interagiert der FKBP12/Rapamycin-Komplex zwar nur mit mTORC1 direkt, doch führt eine mehr als 24-stündige Inkubation der Zellen mit Rapamycin entgegen früherer Annahmen auch zu einer indirekten Hemmung von mTORC2. Diese Sensitivität von mTORC2 gegenüber RAD001 kommt dadurch zu Stande, dass aufgrund der Bindung von freiem mTOR an den FKBP12/Rapamycin-Komplex zu wenig mTOR für die Bildung von mTORC2 vorhanden ist (Sarbasov *et al.*, 2006). Dieser zeitabhängige Mechanismus wäre eine Erklärung für das vorliegende Ergebnis. Ein Ausbleiben der *feedback*-Aktivierung von AKT unter RAD001 wurde bereits unter ähnlichen Versuchsbedingungen beobachtet. Eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT(S473) war nur innerhalb der ersten 12 bis 24 h nachweisbar (Grabinski *et al.*, 2012). Einhergehend mit dem verringerten Signal für pAKT(S473) zeigte sich auch das Signal für pGSK3 α/β (S21/9) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle vermindert. Die verringerte Aktivität des direkten *downstream targets* von AKT verifiziert die verminderte Aktivität der Kinase. Allerdings erwies sich die Hemmung der GSK3 durch MK-2206 nicht wesentlich effizienter als durch RAD001. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Studie von Armstrong *et al.* 2001 liefern. Die Gruppe beobachtete, dass die S6K durch Aminosäuren stimuliert wird, was zur inhibitorischen Phosphorylierung der GSK3 führt. Die Phosphorylierung der GSK3 durch die S6K wurde durch Rapamycin komplett gehemmt (Armstrong *et al.*, 2001; Frame and Cohen, 2001).

Wie erwartet führte eine Monotherapie der Zellen mit MK-2206 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und alleiniger Inkubation mit RAD001 zu einer signifikant reduzierten Phosphorylierung von AKT an S473. Erwartungsgemäß war das Signal für pS6 unter RAD001-Monotherapie oder der Kombination beider Wirkstoffe

deutlich schwächer ausgeprägt als unter MK-2206-Monotherapie. Dass MK-2206 jedoch zu einer sogar signifikanten Verminderung des Signals für phosphoryliertes Protein S6 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte, könnte daran liegen, dass eine AKT-Hemmung auch eine verminderte mTORC1-Aktivität bewirkt und somit indirekt auch eine verminderte Aktivierung der *downstream* gelegenen S6K zur Folge hat. Eine entsprechend dem pAKT(S473)-Signal deutliche Reduktion des Signals für pGSK3 α/β (S21/9) unter MK-2206 ließ sich nicht detektieren. Das könnte damit zusammenhängen, dass die GSK3 α/β nicht nur ein *target* von AKT ist, sondern z.B. auch von der S6K (s.o.) und neben dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in eine Vielzahl weiterer Signalwege eingebunden ist und durch verschiedene andere Stimuli beeinflusst wird (Beurel, Grieco and Jope, 2015).

Der kombinatorische Effekt der vertikalen Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges zeigte sich am deutlichsten am Phosphorylierungsstatus der GSK3 α/β . Dieser war bei Kombination beider Wirkstoffe deutlich geringer als unter den Monotherapien. Da die Aktivität der GSK3 α/β durch AKT- und mTOR-Inhibition ähnlich stark unterdrückt wird, fällt die Hemmung durch die Behandlung mit beiden Inhibitoren hier womöglich am deutlichsten aus. Die Gabe von MK-2206 in Ergänzung zu RAD001 bewirkte keine deutlich zusätzliche Verminderung des Signals für pS6, obwohl die Phosphorylierung des Proteins unter MK-2206 sogar signifikant niedriger war als in der DMSO-Kontrolle. Womöglich, da die S6K, wie oben erwähnt, nicht nur durch RAD001, sondern auch durch MK-2206 gehemmt wird, ließ sich hier dennoch tendenziell eine geringere Phosphorylierung unter dualer Therapie als unter RAD001-Monotherapie detektieren. Umgekehrt bewirkte die Verabreichung von RAD001 zusammen mit dem pan-AKT Inhibitor MK-2206 keine zusätzliche Reduktion des Signals für pAKT(S473), das unter dualer Therapie sogar stärker war als unter MK-2206-Therapie.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die gleichzeitige Gabe der Inhibitoren eine effiziente vertikale Inhibition des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den Huh7-Luc-Zellen bewirkt.

4.1.2 Analyse einer kombinatorischen Behandlung orthotoper Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren mit RAD001 und MK-2206

Um nun die Wirkung einer RAD001/MK-2206-Therapie auf das Wachstum orthotoper HCC-Maustumoren zu untersuchen, wurde durch die Transplantation der die Luciferase exprimierenden HCC-Zelllinie Huh7-Luc in den linken Leberlappen der Maus von PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe ein orthotopes HCC-Xenograft-Mausmodell entwickelt.

4.1.2.1 Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen

Da für die Etablierung des Mausmodells Huh7-Luc-Zellen verwendet wurden, war es möglich, das Monitoring des Tumorwachstums *in vivo* mittels BLI durchzuführen. Bei dieser Form des Monitorings handelt es sich um eine nicht-invasive Methode, die es möglich macht die Entwicklung eines Tumors im Verlauf vom einzelnen Tumor bis zum disseminierten Tumorbefall in ein und demselben Tier zu verfolgen. Die Tötung mehrerer Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation ist somit nicht notwendig. Das BLI macht sich dabei die Fluoreszenzemission zu Nutze, die nach Injektion von D-Luciferin, dem Substrat der Luciferase, unter Verbrauch von ATP und O₂ entsteht. Das Licht wird mittels CCS-Kamera sichtbar gemacht. Die Methode des BLIs wurde schon in diversen Studien als zuverlässige Methode für das Monitoring verschiedener Tumorentitäten in Versuchstieren angewendet (Edinger *et al.*, 1999; Zinn *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse des BLIs zeigen, dass es in der Placebogruppe und der mit RAD001 und MK-2206 therapierten Gruppe zu einer kontinuierlichen Zunahme des Fluoreszenzsignals kam. Dabei war die Zunahme in der Gruppe mit den behandelten Mäusen wesentlich geringer, sodass insgesamt von einer effizienten Hemmung des Tumorwachstums durch die kombinatorische Behandlung ausgegangen werden kann. Allerdings zeigt sich bei näherer Betrachtung der relativen *radiance*, dass es nach anfänglicher Abnahme zwischen Tag 0 und Tag 7, an dem die *radiance* der behandelten Mäuse 18% der *radiance* der Placebogruppe betrug, wieder zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals kam, sodass die *radiance* an Tag 14 bereits wieder 25% der *radiance* der Placebogruppe ausmachte. Der Wiederanstieg ist zwar nicht signifikant, lässt jedoch vermuten, dass die Hemmung durch die Inhibitoren ihr Plateau nach bereits 2 Wochen erreicht hat. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass es zu einer schnellen Resistenzentwicklung in den Tumorzellen gekommen ist. Bereits erfolgte weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe bestätigen dies. Mittels Rot-Grün-Blau (RGB)-Markierung der Huh7-Zellen wurde herausgefunden, dass diese Resistenz nicht nur schnell, sondern auch in sehr vielen Zellen während der Behandlung mit den Inhibitoren auftritt (Moustafa *et al.*, 2022).

4.1.2.2 Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den Huh7-Luc-Maustumoren

Auch die Ergebnisse der im Anschluss an die BLI-Messungen durchgeführten Western Blot-Analysen bestätigen den Verdacht auf eine schnelle Resistenzentwicklung.

Aus dem HCC-Gewebe von sechs Mäusen jeder Versuchsgruppe wurden Proteinlysate hergestellt, durch die SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot-

Verfahren analysiert. Es wurde die Phosphorylierung und Expression ausgewählter Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges untersucht.

Die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6, als Maß für die Wirkung von RAD001, zeigte sich bei kombinierter Verabreichung beider Inhibitoren in der Gruppe der therapierten Mäuse signifikant unterdrückt. Auch das signifikant verringerte Signal für pmTOR(S2448) in dieser Gruppe war ein weiteres Indiz für die effektive Inhibition der Aktivität von mTOR im mTORC1 durch RAD001. Das nur leicht verringerte Gesamtproteinlevel an mTOR in der Gruppe der therapierten Mäuse schließt aus, dass die verminderte mTORC1-Aktivität auf einer verminderten Expression der mTOR-Kinase beruhte. Diese Ergebnisse bestätigen die Hemmung von mTOR im mTORC1 der resistenten Tumorzellen durch RAD001. Das Tumorwachstum muss somit unabhängig von der AKT-mTORC1-Achse erfolgt sein.

Trotz kombinierter Gabe von RAD001 und MK-2206 war, entgegen der Erwartung, der Phosphorylierungsstatus von AKT an Position S473 in allen Maustumoren signifikant erhöht. Leicht erhöht war auch das detektierte Level an pGSK3 α/β (S21/9). Daher legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass MK-2206 im Unterschied zu RAD001 in den resistenten Tumorzellen nicht effizient wirken konnte.

MK-2206 fixiert AKT in der „PH-*in*“-Konformation und unterbindet so dessen Phosphorylierung an T308 durch die PDK1 und an S473 durch mTORC2 (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014). Die Phosphorylierung von AKT am T308 war allerdings nicht signifikant erhöht und der Phosphorylierungsstatus von mTORC2 am S2481 sogar tendenziell unterdrückt. Das passt nicht zu der signifikant erhöhten Phosphorylierung von AKT am S473, denn sowohl die Phosphorylierung vom T308 durch die PDK1 als auch die Phosphorylierung von mTORC2 am S2481 gehen der Phosphorylierung von AKT am S473 voraus. Zwar führt eine Phosphorylierung von T308 zu einer teilweisen Aktivierung von AKT, doch kommt es erst durch die Phosphorylierung von S473 durch mTORC2 zu seiner vollständigen Aktivierung (Manning and Toker, 2017) (siehe Kapitel 1.4).

Festgehalten werden kann, dass neben den BLI-Ergebnissen (siehe Kapitel 3.1.2.1) auch die Ergebnisse der Western Blot-Analysen darauf hindeuten, dass es zu einer schnellen Resistenzentwicklung in den Tumorzellen der behandelten Mäuse gekommen ist. Während die Hemmung von mTOR im mTORC1 durch RAD001 erfolgreich war, konnte MK-2206 die Phosphorylierung von AKT(S473) in den resistenten Zellen nicht effektiv hemmen.

Um zu verstehen, welcher Mechanismus dieser Resistenz zu Grunde liegt, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die nachfolgenden Überlegungen könnten hierbei richtungsweisend sein.

Im Allgemeinen wird zwischen der frühen, intrinsischen Resistenz (primäre oder *de novo*-Resistenz) und der späten, im Therapieverlauf erworbenen Resistenz (sekundäre Resistenz) unterschieden (Groenendijk and Bernards, 2014). Dabei sind eine Reihe von Mechanismen, die zu einer Resistenz von Tumorzellen in Reaktion auf eine zielgerichtete Therapie führen, bekannt.

Häufig kommt es zu zusätzlichen genetischen Alterationen des *targets* selbst (sog. *on-target*-Mutation). Hierzu zählen z.B. die sog. *gatekeeper*-Mutationen (Sherbenou and Druker, 2007), Amplifikationen (Gorre *et al.*, 2001) oder durch alternatives *splicing* entstandene *splicing*-Varianten des Oncogens (Poulikakos *et al.*, 2011).

Ein weiterer Mechanismus ist die Reaktivierung des Signalweges über einen parallelen Mechanismus (*bypass*-Mechanismus) wie z.B. durch vermehrte Expression und/oder Aktivierung einer RTK, die ebenfalls diesen Signalweg nutzt (Engelman, Zejnullahu and Mitsudomi, 2007).

Eine dritte Kategorie von Resistenzmechanismen bilden genomische Alterationen (z.B. Amplifikationen oder aktivierende Mutationen), die zur Dysregulation von Genen *upstream* (Nazarian *et al.*, 2010) oder *downstream* (Wagle *et al.*, 2011) des *targets* gelegener Effektoren des Signalweges führen.

Weiter spielt auch die Aktivierung alternativer sog. *pro-survival*-Signalwege eine Rolle.

Ein nicht-spezifischer Mechanismus ist die Hochregulierung von *drug-efflux*-Pumpen, die lange Zeit nur mit zytotoxischen Tumortherapien in Verbindung gebracht wurde, mittlerweile jedoch auch bei der zielgerichteten Therapie beobachtet wurde (Garraway and Jänne, 2012; Groenendijk and Bernards, 2014; Neel and Bivona, 2017).

Weiter wurden epigenetisch regulierte Resistenzmechanismen (Sharma *et al.*, 2010) und auch EMT-Prozesse im Zusammenhang mit *target*-Therapeutika beschrieben (Fuchs *et al.*, 2008; Salt, Bandyopadhyay and McCormick, 2014), wobei letztere mit der TSZ-Biologie in Verbindung gebracht werden (Neel and Bivona, 2017).

Das *output* von Signalkaskaden wird durch verschiedene intrinsische negative *feedback loops* herunterreguliert (Efeyan and Sabatini, 2010). Ihre Kenntnis ist tumortherapeutisch insofern relevant, als dass es bei Inhibition ihrer Komponenten nicht nur zu ihrer Unterbrechung, sondern üblicherweise zu einer kompensatorischen Hochregulierung einzelner Signalwegkomponenten kommt (O'Reilly *et al.*, 2006; Chandarlapaty *et al.*, 2011). Somit handelt es sich hierbei um einen weiteren *bypass*-Mechanismus, der zur Resistenzentwicklung beitragen kann (Garraway and Jänne, 2012).

Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse zeigen, dass RAD001 eine Inhibition von mTOR im mTORC1 bewirkt hat, sodass eine Alteration des mTOR-Proteins selber, wie z.B. eine Mutation der FRB-Domäne, die die Interaktion zwischen FKBP12 und RAD001 stören würde (Lorenz and Heitman, 1995), ausgeschlossen werden kann. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Phosphorylierung von AKT(S473) könnte vor dem Hintergrund der oben beschriebenen, verschiedenen zellulären Resistenzmechanismen ebenfalls auf die Wirkung von RAD001 zurückgeführt werden, allerdings über einen indirekten Mechanismus. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist in ein komplexes Netzwerk von verschiedenen Signalwegkomponenten ausgehenden negativen *feedback loops* eingebunden. So kommt es durch mTOR-Hemmung zum Ausfall der von mTORC1 ausgehenden inhibitorischen *loops*, von denen der mTORC1/S6K/IRS-vermittelte der am besten charakterisierte ist (O'Reilly *et al.*, 2006). Bei anhaltender Insulin- oder IGF-

Exposition wird IRS-1 durch mTORC1 und S6K1 an unterschiedlichen Serin- und Threoninresten phosphoryliert, was zu dessen Ubiquitinierung und proteasomalen Degradation führt (Haruta *et al.*, 2000; Pederson, Kramer and Rondinone, 2001; Mittal *et al.*, 2016). Der Wegfall des *loops* würde sich in einem erhöhten IRS-1-Level bei gleichzeitig erniedrigtem pIRS-1-Level äußern (Wan *et al.*, 2007). Zum einen war das Level an IRS-1 nicht signifikant erhöht und zum anderen war auch die Menge an pIRS-1 nicht verringert, sondern tendenziell sogar höher als in der Kontrollgruppe. Dies deutet zunächst darauf hin, dass der Ausfall dieses *loops* keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT(S473) gehabt hat. Allerdings beobachteten Wan *et al.* 2007 auch in IRS-1-*knockdown*-Zellen unter mTOR-Inhibition einen Anstieg der AKT-Phosphorylierung. Es wäre somit möglich, dass andere Mitglieder der IRS-Familie wie IRS-2 oder IRS-3 in der *feedback*-Regulation über den IGF-IR involviert sind (Wan *et al.*, 2007). Letztlich muss die Phosphorylierung von AKT(S473) über einen von IRS-1 unabhängigen Mechanismus erfolgt sein.

Es gibt eine Reihe von mTORC1 ausgehenden und von IRS-1 unabhängigen *feedback*-Schleifen, deren durch mTOR-Inhibition bedingter Ausfall zu einer gesteigerten Phosphorylierung von AKT(S473) führt. So wird Sin1 des mTORC2 durch die S6K1 an T85 und T398 phosphoryliert, wodurch es vom Komplex dissoziiert, sodass die Aktivität von mTORC2 unter RAD001-Therapie aufgrund der indirekten S6K1-Hemmung erhöht ist (Liu *et al.*, 2013). Ein ähnlicher Mechanismus wurde im Rahmen dreier unabhängiger Studien beobachtet. Es wurde gezeigt, dass die S6K Rictor am T1135 phosphoryliert und dadurch mTORC2 hemmt. Diese Phosphorylierung ist Rapamycin-sensitiv, sodass es unter RAD001-Therapie zu einer gesteigerten Aktivität von mTORC2 kommt (Dibble, Asara and Manning, 2009; Julien *et al.*, 2010). Da allerdings keine gesteigerte mTORC2-Aktivität nachweisbar war, sind diese Mechanismen hier vermutlich nicht zum Tragen gekommen.

Auch die Transkription bestimmter Rezeptoren wird durch mTORC1-vermittelte *loops* reguliert. So führt eine durch mTOR-Inhibitoren bewirkte indirekte Hemmung von S6K zur gesteigerten Expression des PDGF-Rezeptors (Zhang *et al.*, 2007). Carracedo *et al.* 2008 zeigten, dass eine mTORC1-Aktivierung über einen von S6K1 ausgehenden negativen *feedback loop* zur Inhibition der PI3K und MAPK führt und eine mTORC1-Inhibition die Aktivierung der ERK/MAPK-Signalkaskade zur Folge hat (Carracedo *et al.*, 2008). Beide Mechanismen könnten zur Aktivierung paralleler Signalwege geführt haben, allerdings erklären sie nicht die gesteigerte Aktivität von AKT.

Gerade im Hinblick auf diese könnte interessant sein, dass AKT zwar hauptsächlich über die Lipidkinase PI3K reguliert wird, mittlerweile sind jedoch mehrere Tyrosinkinase und Serin/Threoninkinasen bekannt, die AKT unabhängig von der PI3K direkt aktivieren. So ist AKT ein *downstream target* der *TANK-binding kinase 1* (TBK 1). TBK 1 aktiviert AKT dabei direkt durch Phosphorylierung von T308 und S473 (Ou *et al.*, 2012). Auch wurde die Aktivierung von AKT über S473-Phosphorylierung durch die *upstream* gelegene *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) bei DNA-Doppelstrangbrüchen beschrieben (Bozulic *et al.*, 2008). Eine weitere bekannte Serin/Threoninkinase, durch die AKT aktiviert wird, ist die *I-kappa*-

B-kinase epsilon (IKK ϵ). Auch sie phosphoryliert AKT(S473) und AKT(T308). Die *activated cdc42-associated kinase 1* (ACK 1) ist eine Tyrosinkinase, von der bekannt ist, dass sie AKT durch Phosphorylierung an diesen Resten aktiviert. Auch die Protein-Tyrosinkinase 6 (PTK 6) und Src haben AKT als direktes *downstream target* (Mahajan and Mahajan, 2013).

Durch den allosterischen AKT-Inhibitor MK-2206 konnte die Phosphorylierung von AKT(S473) nicht effektiv gehemmt werden. Neben dem mTORC1/S6K/IRS-abhängigen *loop*, der auch in Folge einer AKT-Inhibition unterbrochen wird, fällt unter AKT-Inhibition auch die negative Regulierung der RTK-Proteinlevel durch die FoXO-Transkriptionsfaktoren weg. Die Aktivierung von an die PI3K-gekoppelten RTKs führt zu einer AKT-vermittelten Phosphorylierung von FoXO-Transkriptionsfaktoren und zu einer Bindung von 14-3-3 Proteinen, mit der Folge ihrer nukleären Translokation und sich anschließenden Sequestration. Dies hat die Herunterregulation der Expression einiger der eng mit der PI3K assoziierten Rezeptoren zur Folge. AKT-Inhibitoren können daher die FoXO-abhängige Expression bestimmter Rezeptoren induzieren. Beispielsweise führte die Behandlung von Brustkrebszellen mit einem allosterischen AKT-Inhibitor zu einer deutlichen Hochregulierung von HER3, IGF-IR und dem IR (Chandarlapaty *et al.*, 2011; Manning and Toker, 2017).

Im Zusammenhang mit einer allosterischen AKT-Inhibition wurden auch von *feedback*-Schleifen unabhängige Resistenzmechanismen, die richtungsweisend für weitergehende Untersuchungen sein könnten, beobachtet.

Sowohl für die Autoinhibition bei Abwesenheit von Wachstumsfaktoren als auch für die Wirkung der allosterischen AKT-Inhibitoren ist die Interaktion zwischen PH-Domäne und KD, durch die AKT in der „PH-*in*“-Konformation gehalten wird, essentiell (Mattmann, Stoops and Lindsley, 2014) (siehe Kapitel 1.4 und 1.6). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass AKT-Mutationen, die zur Bevorzugung der „PH-*out*“-Konformation führen, eine verringerte Sensitivität gegenüber allosterischen AKT-Inhibitoren bewirken (Calleja, Laguerre and Parker, 2009; Wu *et al.*, 2010; Parikh *et al.*, 2012). So wiesen Parikh *et al.* 2012 in einer Vielzahl humaner Tumorentitäten Mutationen der PH-KD-Schnittstelle nach, die zu einer Störung der PH-KD-Interaktion führen. Sie zeigten auch, dass diese Mutationen nicht nur als „*driver*-Mutationen“ fungieren, sondern auch einen Resistenzmechanismus als Antwort auf eine zielgerichtete Therapie gegen Komponenten des Signalweges darstellen und so die Sensitivität gegenüber allosterischen AKT-Inhibitoren vermindern (Parikh *et al.*, 2012).

Möglich wäre auch, dass eine gestörte Dephosphorylierung durch die für die direkte Deaktivierung von AKT verantwortlichen Phosphatasen ursächlich für das erhöhte Level an phosphoryliertem AKT ist. Die direkte Deaktivierung von AKT erfolgt zum einen durch die Proteinphosphatase PP2A an der KD (T308 beim AKT1) (Andjelkovic *et al.*, 1996) und zum anderen Isoform-spezifisch durch PHLPPs am HM (S473 beim AKT1) (Gao, Furnari and Newton, 2005). Die PHLPP1 dephosphoryliert AKT2 und AKT3, die PHLPP2 AKT1 und AKT3 (Brognard *et al.*, 2007).

Auch die Kontrolle der Biosynthese der PHLPPs ist in einen kompensatorischen *feedback loop* eingebunden. Eine Aktivierung von AKT führt, ausgehend von den mTORC1-Substraten S6K und 4EBP, zu einer Hochregulierung der Expression von PHLPP. Das bedeutet umgekehrt, dass es unter RAD001-Therapie zu einer herunterregulierten Expression von PHLPP1 und PHLPP2 kommt (Liu, Stevens and Gao, 2011; Newton and Trotman, 2014). Diese Beobachtungen könnten die signifikant erhöhte Phosphorylierung von AKT(S473) bei gleichzeitig nur geringfügig erhöhter Phosphorylierung von AKT(T308) erklären.

Es könnte jedoch auch sein, dass eine verringerte Expression von PTEN hierfür verantwortlich ist. Wan *et al.* 2003 fanden heraus, dass das Expressionslevel von PTEN in Rhabdomyosarkomzellen in umgekehrter Weise mit dem Phosphorylierungsstatus von AKT(S473) korreliert, allerdings nicht mit dem von AKT(T308). Es wird vermutet, dass PTEN nicht nur, wie bisher angenommen, die Aktivierung von AKT über die Dephosphorylierung von PIP₃ reguliert und so die Phosphorylierung sowohl von S743 und als auch von T308 beeinflusst, sondern, dass PTEN die Phosphorylierung von S473 in einigen Zellen möglicherweise über einen unbekanntes PIP₃-unabhängigen Mechanismus reguliert. Auch, wenn PTEN als Lipidphosphatase in einer Vielzahl von Zelltypen agiert, so wurde gezeigt, dass PTEN auch Proteinsubstrate dephosphoryliert (Wan and Helman, 2003).

Stottrup *et al.* 2016 beobachteten in MK-2206-resistenten Brustkrebszellen eine AKT-Isoform-spezifische Hochregulierung. Diese Zellen wiesen nicht nur, wie schon von Chandarlapaty *et al.* 2011 beschrieben, ein erhöhtes Level an IGF-1R auf, sondern zeigten im Vergleich zu den parentalen Zellen zusätzlich eine erhöhte AKT3-Expression, begleitet von einem Wechsel des Phänotyps durch EMT und erhöhter Invasivität. Die Reversibilität der Resistenz, einhergehend mit einer Reexpression epithelialer Marker deutete auf eine epigenetische Regulierung hin (Chandarlapaty *et al.*, 2011; Stottrup *et al.*, 2016). Mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern, die die drei AKT-Isoformen unabhängig vom Phosphorylierungsstatus detektieren, wurde untersucht, ob es gegebenenfalls auch hier zu einer Isoform-spezifischen Hochregulierung gekommen ist. Doch das Level von AKT1 unterschied sich kaum von dem in der Kontrollgruppe. Das Level an AKT2 war leicht und das an AKT3 stärker verringert, allerdings auch nicht signifikant.

Es könnte auch sein, dass es zu einer vermehrten Expression von AKT aufgrund einer *on-target*-Mutation in Form einer Genamplifikation gekommen ist mit der Folge einer verringerten Potenz von MK-2206. Auf die Onkogenmoleküle kommen zu wenige Moleküle des Inhibitors (Neel and Bivona, 2017). Bei Melanompatienten, die initial auf eine Therapie mit BRAF-Inhibitoren ansprachen, bei denen dann jedoch das Tumorwachstum weiter voranschritt, wurde eine V600E-BRAF-Mutation, die zu einer Amplifikation mit der Folge einer V600E-BRAF-Überexpression und somit zu einer erworbenen Resistenz gegenüber BRAF-Inhibitoren führte, entdeckt (Shi *et al.*, 2012). Allerdings zeigte sich das Signal für die Gesamt-AKT-Expression unter der Behandlung nicht signifikant erhöht. Das deutet darauf hin, dass eine vermehrte Expression von AKT durch eine Genamplifikation nicht ursächlich gewesen sein kann.

Dass die RAD001/MK-2206-Therapie der HCC-Zellen im orthotopen HCC-Mausmodell im Unterschied zur Behandlung der Zellen *in vitro* und im subkutanen Mausmodell (Grabinski *et al.*, 2012) zur Entwicklung einer erworbenen Resistenz geführt hat, könnte mit dem unterschiedlichen Mikromilieu, in das die Zellen injiziert wurden, zusammenhängen. Solide Tumoren werden als „Organe“ betrachtet, die sich aus Tumorzellen und Tumorstroma zusammensetzen. Das Stroma bildet das Tumormikromilieu (TME) (Ye *et al.*, 2014) und beeinflusst verschiedene Faktoren der Tumorbiologie wie Tumorentstehung, Metastasierung und Chemosensitivität (Hernandez-Gea *et al.*, 2013). So lassen sich in orthotopen Mausmodellen nicht nur häufiger Metastasen als in subkutanen Mausmodellen beobachten (Zhao *et al.*, 2012), sondern auch eine veränderte Chemosensitivität gegenüber Therapeutika. Dies wurde beispielsweise schon von Wilmanns *et al.* 1992 bei der Therapie des Kolonkarzinoms mit Doxorubicin und 5-Fluoruracil gezeigt (Wilmanns *et al.*, 1992). So wie sich normale Stammzellen in sog. Stammzellnischen aufhalten, so wird mittlerweile auch davon ausgegangen, dass sich TSZ in spezifischen Nischen innerhalb des TMEs aufhalten. Es handelt sich hierbei um ein spezialisiertes Mikromilieu, zusammengesetzt aus zellulären und nicht-zellulären Komponenten, die eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung ihrer grundlegenden Eigenschaften spielen, sie vor Immunreaktionen schützen, ihr metastasierendes Potential und (Nio, Yamashita and Kaneko, 2017) EMT-Prozesse fördern und sogar eine physikalische Barriere gegenüber Therapeutika bilden (Ye *et al.*, 2014). Das Mikromilieu nimmt also einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten der Tumorzellen. Dessen Komponenten sind mittlerweile auch als vielversprechende *targets* in den Fokus der Tumorforschung gerückt (Prieto-Vila *et al.*, 2017).

Neben dem Einfluss des Mikromilieus könnte auch die sehr komplexe Blutversorgung der Leber die Therapie unterschiedlich beeinflusst haben (Bagi and Andresen, 2010).

Es kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse der Western Blot-Analysen keinen direkten Rückschluss auf den Mechanismus, der zu der schnellen Resistenz der orthotop transplantierten HCC-Zellen gegen die RAD001/MK-2206-Therapie geführt hat, zulassen.

Im Rahmen nachfolgender Untersuchungen identifizierte unsere Arbeitsgruppe in RAD001/MK-2206-resistenten Tumorzellen eines orthotopen Maustumors, der mit EpCAM⁺-HCC-Zellen eines Patienten generiert wurde, neben einer vermehrten Aktivität von AKT(S473) mittels *Kinom-profiling* auch eine signifikante Hochregulierung der p38 MAPK und der *MAPK activated protein kinase 3* (MAPKAPK3). Möglicherweise könnte also die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges eine Rolle bei der Resistenzentwicklung der Zellen spielen (Moustafa *et al.*, 2022).

4.2 Vergleichende Analyse nicht-invasiver Messmethoden zum Monitoring von aus primären HCC-Zellen generierten orthotopen Xenograft-Maustumoren

Nicht nur die orthotope Transplantation, sondern auch die Arbeit mit primären, nativen Tumorzellen kommt den natürlichen Bedingungen des Tumorwachstums näher. Zelllinien werden meist über eine lange Zeit kultiviert und verlieren dadurch viele ihrer ursprünglichen Charakteristika (Leenders, Nijkamp and Borel Rinkes, 2008; He *et al.*, 2015). Allerdings ist bei mit primären Tumorzellen generierten Tumoren im Unterschied zu mit Huh7-Luc-Zellen generierten Tumoren ein Monitoring mittels BLI nicht möglich. Um die Tumorprogression dennoch nicht-invasiv verfolgen zu können, sollte sich die Eigenschaft von HCC-Zellen AFP zu sezernieren zu Nutze gemacht werden.

AFP ist ein Glykoprotein, das im Jahr 1956 zum ersten Mal in Serumproben von Feten nachgewiesen wurde (Bergstrand and Czar, 1956). Seine physiologische Produktion erfolgt v.a. während der Schwangerschaft durch die Dottersackzellen und während der Fetalzeit durch Zellen der fetalen Leber und der Mukosa des Darms und ist im Kindes- und Erwachsenenalter weitestgehend supprimiert (Gomaa *et al.*, 2009). Unter anderem wird angenommen, dass es als Transportmolekül für andere Proteine fungiert und so Aufgaben des Albumins übernimmt. Es wird vermutet, dass es in HCC-Zellen zur Aufhebung der Suppression des für die Synthese von AFP verantwortlichen Gens kommt (Gressner and Arndt, 2012).

Um nun zu untersuchen, inwieweit der AFP-Wert ein repräsentativer Indikator für die relative Tumorlast und somit für das therapeutische Ansprechen eines Tumors ist, wurden die Korrelationskoeffizienten dreier verschiedener nicht-invasiver Messmethoden für das Monitoring der Tumorprogression im orthotopen HCC-Mausmodell bestimmt. Die Korrelation zwischen dem hAFP-Level und dem mit Ultraschall detektierten Tumolvolumen sowie zwischen dem hAFP-Level und dem BLI-Signal war statistisch signifikant. Die Koeffizienten stimmten dabei annähernd mit den von Martin-Padura *et al.* 2012 ermittelten überein (Martin-Padura *et al.*, 2012). Auch im Rahmen anderer Studien wurde eine direkte Korrelation von Tumorgröße und AFP-Level beobachtet (Yao *et al.*, 2003). Somit handelt es sich beim AFP um einen geeigneten Marker, um die Tumorprogression im mit primären HCC-Zellen generierten orthotopen Mausmodell nicht-invasiv zu verfolgen. Zudem erwies sich AFP neben dem BLI auch als eine sehr sensitive Messmethode, denn der Nachweis aller HCCs gelang bereits 7 Tage nach Implantation der Tumorzellen, während zum selben Zeitpunkt mittels Sonographie nur knapp über die Hälfte der Tumoren detektiert werden konnten.

4.3 Anreicherung primärer EpCAM⁺- und CD90⁺-HCC-Zellen für die Etablierung eines orthotopen Xenograft-Mausmodells

TSZ werden für die Initiation, Progression, Metastasierung und Rezidiventwicklung des HCCs verantwortlich gemacht (Joo, Kim and Lee, 2015). Das selektive *targeting* molekularer Strukturen der TSZ wie von Komponenten des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges scheint daher von großer antitumortheraeutischer Bedeutung zu sein (Villanueva *et al.*, 2008). Die TSZ des HCCs lassen sich anhand der beiden Epitope EpCAM (Yamashita *et al.*, 2009) und CD90 (Z. F. Yang, Ho, *et al.*, 2008) identifizieren. Unsere Arbeitsgruppe erforscht daher die Wirkung einer kombinierten RAD001/MK-2206-Therapie auf orthotope Xenograft-Maustumoren, die mit aus primärem HCC-Gewebe isolierten CD90⁺- und EpCAM⁺-TSZ etabliert wurden. In dieser Arbeit wurde das methodische Vorgehen zur Anreicherung der TSZ aus dem primären Tumorgewebe näher untersucht, um dann die Aufarbeitung einer ersten Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus vorzunehmen.

4.3.1 Vorversuche zur Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ aus primärem HCC-Gewebe

4.3.1.1 Expression von EpCAM und CD90 bei Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen und Mischversuch zur Untersuchung der Effizienz der Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ mittels MACS

Untersuchungen zur Biologie der TSZ sind auf ihre Identifizierung, Isolierung und/oder Anreicherung aus einem Zellgemisch angewiesen. Dafür werden bekannte Methoden der Tumorstammzellforschung angewendet (Duan *et al.*, 2013) (siehe Kapitel 1.3). Hier sollte die Anreicherung der TSZ anhand der beiden Oberflächenmarker EpCAM und CD90 mittels magnetischer Zellseparation erfolgen.

Bei den TSZ handelt es sich trotz ihrer essentiellen Bedeutung für das Tumorwachstum meist nur um eine kleine Subpopulation der Tumorzellen. In ihrer Arbeit analysierten Yamashita *et al.* 2013 die Expression beider Oberflächenmarker in 15 primären HCCs. Bei einer Vitalität von über 70% waren in acht HCCs EpCAM-exprimierende Zellen nachweisbar. Ihr Anteil betrug durchschnittlich 15,51% und schwankte zwischen minimal 0,06% und maximal 67,70%. CD90⁺-Zellen waren hingegen in allen HCCs detektierbar. Ihr Anteil betrug im Durchschnitt 1,45% und schwankte zwischen 0,03% und 7% (Yamashita *et al.*, 2013). Aufgrund des teils sehr geringen prozentualen Anteils an für TSZ-Marker-positiven Zellen ist ein schonendes und effizientes Vorgehen bei ihrer Isolierung aus dem Gewebe sehr wichtig.

Eine effektive magnetische Anreicherung einer bestimmten Zellpopulation aus einem Zellgemisch zeichnet sich dadurch aus, dass auch bei einem anfänglich geringen Anteil der interessierenden Zellen in der Suspension eine hohe Reinheit der angereicherten Zellen in der Selektion, ein möglichst geringer Verlust der interessierenden Zellen während der Separation mit einem geringen Anteil in der Depletion und somit einer hohen Wiedergewinnung dieser Zellen erzielt wird (Plouffe, Murthy and Lewis, 2015).

Im Rahmen eines Mischexperimentes wurde untersucht wie effektiv die Anreicherung von EpCAM⁺-TSZ und von CD90⁺-TSZ mittels MACS gelingt. Hierfür wurden die Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen vorab auf die Expression von EpCAM und CD90 hin untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtung von Yamashita *et al.* 2013, dass beide Epitope in den Zelllinien unabhängig voneinander exprimiert werden und, dass die Huh7-Zellen EpCAM⁺/CD90⁻ und die SK-Hep-1-Zellen EpCAM⁻/CD90⁺ sind. Während die Gruppe 57,70% EpCAM⁺-Zellen in der Huh7-Zelllinie detektierte, lag der hier ermittelte Wert bei durchschnittlich 96,40%. Eine ähnliche Differenz zeigte sich bei dem prozentualen Anteil an CD90⁺-SK-Hep-1-Zellen. Während die Gruppe einen Anteil von 59% feststellte, lag der in dieser Arbeit gemessene Anteil an CD90⁺-Zellen bei durchschnittlich 90,97% (Yamashita *et al.*, 2013). Auch Zhang *et al.* 2018 ermittelten in der SK-Hep1-Zelllinie einen ähnlich hohen prozentualen Anteil an CD90⁺-Zellen von über 85% (Zhang *et al.*, 2018).

Es wurden Mischungen der EpCAM⁺-Zelllinie Huh7-Luc und der CD90⁺-Zelllinie SK-Hep-1 mit einem 100%igen, 50%igen, 10%igen, 2%igen und 0,4%igen Anteil der anzureichernden Zellpopulation hergestellt. Jeweils vor und nach magnetischer Anreicherung wurde der prozentuale Anteil an EpCAM⁺-Zellen und CD90⁺-Zellen mittels FACS detektiert.

Bei einem 50%igen Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der zu separierenden Originalprobe konnte durch die magnetische Separation eine Reinheit von circa 93% erzielt werden und bei Anreicherung der 10%-Mischung sogar noch eine Reinheit von fast 80%. Der Anteil an EpCAM⁺-Zellen nach Anreicherung der 2%-Mischung lag bei circa 44% und bei der 0,4%-Mischung dann nur noch bei etwa 11%. Bei der Anreicherung der CD90⁺-Zellen wurde nach Separation der 50%-Mischung noch eine Reinheit von beinahe 86% erzielt, doch zeigte sich bei der 10%-Mischung eine sprunghafte Abnahme der Reinheit auf circa 20%. Bei Anreicherung der 0,4%-Mischung konnte nur noch eine Reinheit von etwa 1% erzielt werden.

Es wurde deutlich, dass die erreichbare Reinheit mit sinkendem Anteil der anzureichernden Zellen in der Ausgangssuspension abnimmt. Dies erfolgt nicht kontinuierlich, sondern relativ sprunghaft. Zudem war es deutlich schwieriger eine hohe Reinheit bei der Anreicherung der CD90⁺-Zellen zu erzielen.

Liegt der Anteil der gewünschten Zellpopulation bei unter 1% ist es generell nicht einfach eine hohe Reinheit zu erzielen, denn schon eine nur geringe Zahl unspezifisch zurückgehaltener Zellen bildet dann einen relativ hohen Anteil (Miltenyi *et al.*, 1990; Lee and Lufkin, 2012). Daher wird empfohlen ab einem Prozentsatz von unter 5% weitere Separationsschritte durchzuführen (Miltenyi Biotec, 2009) und/oder die Antikörpermenge herunter zu titrieren, um die Zahl unspezifischer

Bindungen zu verringern. Grundsätzlich besteht das Dilemma darin, dass eine Optimierung der Reinheit zwangsläufig mit Einbußen bei der Wiedergewinnung der Zellen einhergeht und umgekehrt (Bosio *et al.*, 2009).

Auch die Wiedergewinnung der interessierenden Zellen nimmt mit ihrem sinkenden Anteil in der zu separierenden Suspension ab. Bei der EpCAM-Anreicherung erreichte die Wiedergewinnung insgesamt recht gute Werte. Während sich nach Anreicherung der 50%-Mischung noch etwa 90% der Huh7-Luc-Zellen in der Selektion wiederfanden, waren es nach der Separation der 0,4%-Mischung noch etwa 15%. Die Ergebnisse der Wiedergewinnung der CD90⁺-Zellen waren deutlich schlechter. Während der Separation der 50%-Mischung und der 10%-Mischung gingen circa 90% der CD90⁺-Zellen verloren und nach Separation der 2%- und 0,4%-Mischung waren in der Selektion kaum noch SK-Hep-1-Zellen nachweisbar. Während Reinheit und Wiedergewinnung der interessierenden Zellen abnahmen, stieg der Anreicherungsfaktor bei der EpCAM-Anreicherung deutlich an. Lag er bei der 50%-Mischung noch bei circa 2, ließ sich bei der 0,4%-Mischung eine mehr als 20fache Anreicherung der EpCAM⁺-Zellen erzielen. Der maximal erzielte Anreicherungsfaktor der CD90⁺-Zellen lag hingegen bei nur ungefähr 2 für die 10%-Mischung. Insgesamt gelang die Anreicherung der EpCAM⁺-Zellen deutlich besser und effizienter als die Anreicherung der CD90⁺-Zellen.

Obwohl die Färbung der Zellen mit den MicroBeads strikt nach dem Protokoll des Herstellers erfolgte, sind methodische Ungenauigkeiten nicht auszuschließen. So könnte durch das Belassen von zu viel Puffer auf dem Zellpellet nach dem Zentrifugieren oder durch Fehler bei der Zellzählung eine zu geringe Konzentration der MicroBeads eine Rolle gespielt haben (Miltenyi Biotec, 2009; Sutermeister and Darling, 2019). Eine zu hohe Konzentration an MicroBeads hingegen hätte eine vermehrte unspezifische Bindung der Antikörper an nicht-*target*-Zellen (*background labeling*) zur Folge (Chalmers *et al.*, 2010). In Frage käme auch eine zu kurze Inkubationszeit der Zellen mit den MicroBeads. Wiederum könnte eine zu lange Inkubationszeit ebenfalls zu einer vermehrten Markierung von nicht-interessierenden Zellen geführt haben (Miltenyi Biotec, 2009).

Eine andere Möglichkeit könnte die Zahl an CD90-Molekülen auf der Zelloberfläche gewesen sein, die möglicherweise in einer zu geringen Zahl für eine effiziente Anreicherung vorhanden waren. So könnte es sein, dass CD90 grundsätzlich weniger exprimiert wird als EpCAM oder, dass es zu einer Herunterregulierung seiner Expression gekommen ist (Tomlinson *et al.*, 2013). Die Anzahl der Epitope korreliert mit der Antigenbindungskapazität (*antigen binding capacity*, ABC) einer Zelle und ermöglicht die Bindung der mit den MicroBeads konjugierten Antikörper. Dadurch wird die magnetophoretische Mobilität der Zelle, die als ein Parameter für die Stärke ihres Magnetismus dient, beeinflusst (McCloskey, Chalmers and Zborowski, 2000; Zhang, 2004). Je geringer die Epitopendichte ist, desto niedriger ist die ABC und damit zugleich auch die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle in der Säule zurückgehalten wird. Umgekehrt zeigten Comella *et al.* 2001, dass die Bindung zu vieler Antikörper zu einer verminderten Wiedergewinnung führen kann. Die Gruppe untersuchte den Einfluss der Antikörperkonzentration auf die magnetische Separation natürlicher Killerzellen anhand von CD56 mit dem

MiniMacs-System und MS-Säulen der Firma Miltenyi. Sie fanden heraus, dass mit steigender Zahl gebundener Antikörper die magnetophoretische Mobilität der Zellen stieg und sie in der Depletion nicht mehr nachweisbar waren. Trotzdem sank gleichzeitig, womöglich aufgrund einer irreversiblen Zurückhaltung der Zellen in der Säule, ihre Wiedergewinnung (Comella *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus könnte auch hier eine Rolle gespielt haben und bedeuten, dass die für den Marker positiven Zellen auch nach Entfernung des magnetischen Feldes an den Säulen verblieben sind. Dies könnte die geringen Werte der Wiedergewinnung erklären, wobei hierzu allerdings die relativ hohe Wiedergewinnung nach Anreicherung der 100%-Mischung nicht passen würde.

Weshalb die Anreicherung der CD90⁺-Zellen so schwierig war und, ob es überhaupt sinnvoll ist TSZ anhand dieses Moleküls mittels MACS zu isolieren, müsste in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

4.3.1.2 Beeinflussung der Expression von EpCAM und CD90 durch die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit dem Tumor Dissociation Kit und dem gentleMACS Dissociator

Die Möglichkeit eine Einzelzellsuspension aus solidem Tumorgewebe herzustellen hängt von der Art des Tumors und von seinem Differenzierungsgrad ab. Je differenzierter ein Tumor ist, desto höher ist die Anzahl gut entwickelter Desmosomen und umso schwieriger gestaltet sich die Dissoziation. Es lassen sich grob zwei Kategorien von Dissoziationstechniken unterscheiden: mechanische und enzymatische. Für jede existiert dabei eine Vielzahl unterschiedlicher methodischer Herangehensweisen (Cerra, Zarbo and Crissman, 1990). Wesentlich ist, dass durch das Verfahren eine Suspension intakter Zellen erhalten wird, die die Zellpopulationen des Tumors repräsentiert und ausreichend Zellen für sich anschließende Analysen enthält (Engelholm, Spang-Thomsen and Brünner, 1985). Wenn, wie im Rahmen dieser Arbeit, Oberflächenmarker für die Identifizierung und Anreicherung bestimmter Zellen herangezogen werden, muss besonders schonend gearbeitet werden.

Der Vorteil bei der mechanischen Aufbereitung von Geweben mit weniger gut ausgebildeten interzellulären Kontakten, wie z.B. Lymphomen, besteht darin, dass die Oberflächenantigene der Zellen in der Regel erhalten bleiben. Bei der mechanischen Aufarbeitung anderer Gewebe mit vielen und besser ausgebildeten Desmosomen kommt es durch Scherkräfte leicht zu ihrem Zerreißen und dadurch zu einer irreversiblen Schädigung der Zellmembran, die mit einem Verlust der Expression von Oberflächenmarkern und Vitalität einhergeht (Cerra, Zarbo and Crissman, 1990). Enzymatische Dissoziationsmethoden unterscheiden sich, neben den verwendeten Enzymen und ihren eingesetzten Konzentrationen, auch in Inkubationszeit und Temperatur. Zur Auflösung desmosomaler Kontakte werden häufig Proteasen und zur Degradation der EZM Kollagenasen eingesetzt. DNAsen werden ebenfalls oft zugefügt, denn sie verhindern eine Reaggregation der

suspendierten Zellen durch Verdau der klebrigen, freien DNA-Stränge der zerstörten Zellen (Cerra, Zarbo and Crissman, 1990). Enzymatische Verfahren führen zu einer besseren Zellausbeute mit höherer Vitalität als mechanische Verfahren (Russell *et al.*, 1976). Nachteilig ist, dass Proteasen die Expression einer Vielzahl von Oberflächenmarkern negativ beeinflussen. Dadurch werden u.a. auch sich anschließende FACS-Analysen und magnetische Zellanreicherungen beeinflusst (Autengruber *et al.*, 2012) und unter Umständen nicht repräsentative Ergebnisse einer Zellpopulation erhalten (Engelholm, Spang-Thomsen and Brünner, 1985). So soll Trypsin eine Spaltung der Oberflächenproteine CD4 und CD133 bewirken (Tomlinson *et al.*, 2013). Die rein mechanische Aufarbeitung soliden Tumorgewebes ist ein schnelles und einfaches Verfahren. Dennoch ist die Zellausbeute im Vergleich zur enzymatischen Digestion geringer, denn nicht alle Zellen lassen sich mechanisch aus dem Gewebeverbund lösen (Engelholm, Spang-Thomsen and Brünner, 1985). Die mechanische Dissoziation fördert die enzymatische Verdauung, indem sie eine Oberflächenvergrößerung des zerkleinerten Gewebes bewirkt, wodurch die benötigte Zeit für den Verdau und damit einhergehend die Wahrscheinlichkeit eines enzyminduzierten Zelltodes reduziert werden (Tomlinson *et al.*, 2013). Daher wird eine kombiniert mechanisch-enzymatische Disaggregationstechnik empfohlen (Engelholm, Spang-Thomsen and Brünner, 1985).

Dieses Vorgehen wurde auch für die Herstellung der Einzelzellsuspension aus dem frisch gewonnenen HCC-Gewebe gewählt und erfolgte mechanisch mit Skalpell, gentleMACS Dissociator und Filtrierung durch Nylon-Zellfilter sowie enzymatisch durch Inkubation mit dem Human Dissociation Kit, einem Enzymmix, der drei unbekannte Enzyme beinhaltet.

Im Rahmen eines Vorexperimentes wurde untersucht, inwieweit der enzymatische Verdau die Epitopendichte beeinflusst und somit die Anreicherung durch die magnetische Zellseparation vermindern könnte. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der beiden Oberflächenmarker EpCAM und CD90 nicht negativ beeinflusst wird und die Verwendung des Kits in Kombination mit der Verwendung des gentleMACS Dissociators eine geeignete Methode zur schonenden Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem primär gewonnenen Tumorgewebe darstellt.

4.3.2 Anreicherung von EpCAM⁺-TSZ aus orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren und von CD90⁺- und EpCAM⁺-TSZ aus einer HCC-Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus

Aus Gewebeproben, die von zwei durch PD med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa mit Huh7-Luc-Zellen orthotop transplantierten NSG-Mäusen stammten, erfolgte die Anreicherung von EpCAM⁺-Zellen. Die Anreicherung von Tumor B (behandelt mit RAD001/MK-2206), mit einem anfänglich in etwa 33%igen Anteil an EpCAM⁺-

Zellen, auf circa 73,50% und somit einem Anreicherungsfaktor von 2,23, gelang sehr gut. Dieser Wert reiht sich in die Reihe der Ergebnisse des Mischversuches ein (siehe Kapitel 3.3.1.2). Der Wert für die Reinheit der Selektion erreichte allerdings nicht ganz das Niveau der beim Mischversuch erzielten Reinheit. Die Reinheit der Selektion nach Anreicherung von Tumor A (Placebogruppe) war, aufgrund des anfänglich nur 0,78%igen Anteils an EpCAM⁺-Zellen, niedrig. Es wurde eine Reinheit von 3,15% erreicht. Die Wiedergewinnung der Zellen war in beiden Fällen mit etwa 89% für Tumor A und etwa 75% für Tumor B hoch.

Dann erfolgte die Anreicherung einer frisch aus dem OP erhaltenen HCC-Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus, die von PD Dr. med. Jun Li und Dr. Mohamed Moustafa vorgenommen wurde. Die Herstellung der Einzelzellsuspension im kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren führte, im Vergleich zur rein mechanischen Aufbereitung mit Skalpell und *strainer*, zu keiner negativen Beeinflussung der Vitalität der Zellen und auch nach Erylyse waren die Vitalitäten, mit fast 90% in der „mit gentleMACS“-Fraktion und circa 80% in der „ohne gentleMACS“-Fraktion, hoch. Die Erylyse führte allerdings zu einer erheblichen Reduktion der Zellzahl in der „mit gentleMACS“-Fraktion, wobei die Zellzahl in der anderen Fraktion annähernd konstant blieb. Nach Herstellung der Einzelzellsuspension wurden von jeder Fraktion der noch nicht-angereicherten Zellen Aliquots von je $1 \cdot 10^6$ Zellen orthotop in das Parenchym des linken Leberlappens von zwei männlichen NSG-Mäusen injiziert.

Die FACS-Analyse vor Anreicherung der TSZ ergab für die Fraktion „mit gentleMACS“ einen Anteil von rund 34% EpCAM⁺-Zellen und rund 15% CD90⁺-Zellen. Der Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der „ohne gentleMACS“-Fraktion war mit circa 88,50% mehr als doppelt so hoch wie in der „mit gentleMACS“-Fraktion. Hingegen war der prozentuale Anteil an CD90⁺-Zellen in der „ohne gentleMACS“-Fraktion mit circa 5% zu einem Drittel geringer als in der „mit gentleMACS“-Fraktion. Dass der Anteil an EpCAM⁺-Zellen in der unbearbeiteten Probe wesentlich höher war als in der bearbeiteten Probe, könnte bedeuten, dass es während des Dissoziationsprozesses möglicherweise doch zu einer negativen Beeinflussung der Expression der EpCAM-Epitope gekommen ist. Allerdings variiert die Verteilung einer bestimmten TSZ-Subpopulation auch innerhalb eines Tumors teils erheblich. Luong *et al.* 2020 zeigten, dass die Expression von CD90 von der Tumorperipherie zum Zentrum eines HCC-Nodulus stetig zunimmt (Luong *et al.*, 2020).

Es schloss sich die magnetische Separation der „mit gentleMACS“-Fraktion an. Der Anteil der EpCAM⁺-Zellen nach MACS ergab rund 38% und der der CD90⁺-Zellen 15,50%. Der prozentuale Anteil der EpCAM⁺-Zellen erhöhte sich um etwa 4% und der der CD90⁺-Zellen um noch nicht einmal 1%. Auch die Wiedergewinnung der anzureichernden Zellen war in beiden Fraktionen mit unter 20% sehr niedrig.

Im Unterschied zur EpCAM⁺-Anreicherung der Maustumorprobe B, bei der in der ursprünglichen Suspension ebenfalls ein etwa 33%iger Anteil an EpCAM⁺-Zellen vorhanden war, der dann mehr als verdoppelt werden konnte, ist hier keine wirkliche Anreicherung erfolgt.

Zudem weichen die Werte auch stark von den im Rahmen des Mischversuches erzielten ab (siehe Kapitel 3.3.1.2). Allerdings ist ein direkter Vergleich der Effizienz

einer Anreicherung von Zellen aus einer primären Tumorprobe mit der Effizienz einer Anreicherung von *in vitro* kultivierten Zelllinien schwierig, denn bei malignen Tumoren handelt es sich um komplexe, organartige Gebilde, die sich im Unterschied zu einer homogenen Zellkultur, aus heterogenen Zellpopulationen zusammensetzen (siehe Kapitel 1.2), die die Effizienz der Anreicherung potentiell negativ beeinflussen und zu einer Verzerrung der Messergebnisse führen können. Zudem wird die Anreicherung von Zellen aus primärem Tumorgewebe durch einen höheren Anteil an toten Zellen und Debris erschwert. Sobald Zellen aus ihrem Gewebeverband isoliert werden, fangen sie an zu sterben. Hinzu kommt, dass auch durch den Dissoziationsprozess eine gewisse Anzahl an Zellen zugrunde geht. Apoptotische, präapoptotische und nekrotische Zellen setzen DNA frei. Aufgrund der klebrigen Enden der DNA neigen die Zellen dazu Aggregate untereinander zu bilden, innerhalb derer dann lebende Zellen eingeschlossen werden können. Die Aggregate bleiben leicht an den Säulen haften und werden mit der positiven Fraktion eluiert (Lee and Lufkin, 2012). Um die DNA-assoziierte Bildung von Zellaggregaten zu minimieren, enthalten viele Enzymkits DNAsen. Die Bestandteile des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Human Dissociation Kits sind allerdings nicht bekannt.

Ein weiteres Problem bei der magnetischen Zellseparation stellen unspezifische Bindungen von Antikörpern dar, die nicht nur aufgrund einer zu hohen Konzentration zustande kommen (siehe Kapitel 4.3.1.1). Vor allem tote Zellen neigen zur unspezifischen Bindung von Antikörpern. Problematisch ist jedoch auch die unspezifische Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren, die auf Zellen des Immunsystems zu finden sind und das Fc-Fragment von Antikörpern erkennen. Unspezifisch gebundene Antikörper stehen nicht mehr für die Markierung der interessierenden Zellen zur Verfügung und es kommt zu einer falsch-positiven Anreicherung (Tomlinson *et al.*, 2013). Dieses *background labeling* kann die Effizienz einer Anreicherung sehr sensibel beeinflussen. Bei einem nur 1%igem Anteil an unspezifisch gebundenen Zellen und einem nur 1%igem Anteil an interessierenden Zellen in der ursprünglichen Suspension, setzt sich die Selektion aus einem je 50%igen Anteil *background* und der interessierenden Zellpopulation zusammen (Lee and Lufkin, 2012). Um unspezifische Bindungen zu verhindern, können Reagenzien zur Blockierung nicht-spezifischer Bindestellen eingesetzt werden. So wurde vor Färbung der primären HCC-Zellen mit den MicroBeads ein FcR-Blocking Reagenz angewendet.

Auch, wenn tote Zellen nicht ausschließlich für unspezifische Bindungen verantwortlich sind, so ist es doch ein Problem, das v.a. durch sie verursacht wird. Ein unter 10%iger Anteil toter Zellen wird allgemein noch als akzeptabel betrachtet. Liegt ihr Anteil darüber, wird empfohlen sie durch vorangehende Separation zu entfernen (Tomlinson *et al.*, 2013).

Die Vitalität der EpCAM-angereicherten Zellfraktion betrug kurz vor Injektion 55,80%, während die der CD90-angereicherten Fraktion noch 90% betrug. Bei Betrachtung der *dotplots* nach MACS (siehe Abbildung 29) fällt v.a. bei der EpCAM-Messung der sehr hohe Anteil an Debris auf. Daher wäre es für nachfolgende

Anreicherungen primärer TSZ gegebenenfalls sinnvoll, tote Zellen und Debris vor der magnetischen Separation zu entfernen.

Vor allem auch die Zellzahl, die sich im Laufe der Anreicherung erheblich reduzierte, führte zu methodischen Schwierigkeiten. Hinzu kommt, dass die interessierenden CD90⁺- bzw. EpCAM⁺-Zellpopulationen jeweils auch nur einen geringeren prozentualen Anteil ausmachen. Während der Anteil an EpCAM⁺-Zellen im Maustumor B und in der Patientenprobe (jeweils circa 33%) und auch der Anteil an CD90⁺-Zellen in der Patientenprobe (circa 15%) relativ hoch war, war der Anteil an EpCAM⁺-Zellen im Maustumor A mit nur 0,78% gering. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zahl der TSZ nicht nur von Tumor zu Tumor variabel ist, sondern auch innerhalb eines Tumors teils erheblich variiert. Auch, wenn $1 \cdot 10^3$ EpCAM⁺-Zellen und CD90⁺-Zellen, die aus primärem HCC-Gewebe isoliert und mittels FACS sortiert wurden, ausreichten, um 3 Monate nach subkutaner Injektion Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen zu initiieren (Yamashita *et al.*, 2013), so könnte für die Anreicherung nachfolgender HCCs, auch im Hinblick auf eventuelle ergänzende Untersuchungen, eine der Transplantation vorangehende *in vitro*-Kultivierung der magnetisch separierten Zellen sinnvoll sein. Hierfür könnte das methodische Vorgehen von Zhang *et al.* 2014 interessant sein. Aus einer Einzelzellsuspension von Lungenkarzinomzellen isolierte die Gruppe mittels MACS CD133⁺-Zellen und reicherte die so isolierten Zellen *in vitro* unter nicht-adhärenenten, serumfreien und nährstoffarmen Kulturbedingungen weiter an, um sie dann in immundefiziente Mäuse zu transplantieren (Zhang *et al.*, 2014). Diese speziellen Kulturbedingungen führen dazu, dass die differenzierten Zellen absterben und nur die TSZ überleben, proliferieren und sich zu *spheres* organisieren (Ma *et al.*, 2019). Speziell für EpCAM⁺-HCC-Zellen (Wilson *et al.*, 2013) und CD90⁺-HCC-Zellen (Zhang *et al.*, 2018) wurde die Fähigkeit *spheres* zu bilden bereits beschrieben. Auch für die Anreicherung von TSZ anderer Tumorentitäten werden derartige „*sphere formation assays*“ vermehrt angewendet (Cao *et al.*, 2011; Muenzner *et al.*, 2018).

4.3.3 Tumorigenität der nicht-angereicherten und angereicherten HCC-Zellen

Wie oben beschrieben, erfolgte vor magnetischer Anreicherung eine orthotope Transplantation von $1 \cdot 10^6$ Zellen der Fraktion „ohne gentleMACS“ und „mit gentleMACS“ in je eine männliche NSG-Maus. Nach Anreicherung erfolgte die Transplantation von 325.000 Zellen der CD90⁺-Selektion, mit einem 15,34%igem Anteil an CD90⁺-Zellen (50.008 Zellen), in eine Maus und die Transplantation von jeweils 182.500 Zellen der EpCAM⁺-Fraktion, mit einem 37,74%igem Anteil an EpCAM⁺-Zellen (68.875 Zellen), in zwei NSG-Mäuse.

In regelmäßigen Abständen wurde Serum aus der Schwanzvene der transplantierten Mäuse entnommen und auf das AFP-Level als Indikator für Tumorwachstum hin untersucht. Lediglich in einer der mit den nicht-angereicherten Zellen transplantierten Mäuse war nach 16 Wochen ein Tumorwachstum zu verzeichnen. Der Tumor wurde dann aus dem linken Leberlappen entnommen. Das

Gewebe dieses Tumors wurde in zwei weitere NSG-Mäuse transplantiert. Leider war im Nachhinein nicht mehr nachvollziehbar in welche der beiden Mäuse die Zellen der Fraktion „mit gentleMACS“ bzw. „ohne gentleMACS“ transplantiert wurden. Bei allen mit den angereicherten Zellen transplantierten Mäusen war auch nach 30 Wochen kein Tumorwachstum nachweisbar.

Wie zuvor erwähnt, erwies sich in einer von Yamashita *et al.* 2013 durchgeführten Untersuchung bereits eine Zahl von $1 \cdot 10^3$ CD90⁺-Zellen bzw. EpCAM⁺-Zellen als ausreichend, um nach 3 Monaten ein Tumorwachstum in immunsupprimierten Mäusen zu generieren. Der Anteil, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit in die einzelnen Mäuse transplantierten CD90⁺- und EpCAM⁺-TSZ, überstieg diese Zellzahl bei Weitem. Es könnten andere Faktoren als die Zellzahl bzw. der prozentuale Anteil der TSZ die Tumorigenität beeinflussen haben. Beispielsweise stammte das hier verwendete Tumormaterial von einem HBV- und HCV-negativen Patienten. In den von Yamashita *et al.* 2013 durchgeführten Untersuchungen waren lediglich die mit HBV- und HCV-assoziierten TSZ tumorigen (Yamashita *et al.*, 2013).

5 Zusammenfassung

Nach dem gegenwärtigen Modell sind Tumorstammzellen (TSZ) an der Initiierung, Progression, Metastasierung und Chemoresistenz des hepatozellulären Karzinoms (HCC) beteiligt. Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Biologie von TSZ und ist in circa 50% der HCCs konstitutiv aktiviert. Die Moleküle dieses Signalweges scheinen daher geeignete *targets* zu sein, um TSZ selektiv zu eliminieren. Aufgrund der Einbindung von mTOR in einen negativen *feedback loop* führt eine mTOR-Inhibition jedoch zu einer Aktivierung von AKT. Eine Kombinationstherapie mit dem mTOR-Inhibitor RAD001 und dem AKT-Inhibitor MK-2206 zeigte sowohl *in vitro* als auch im subkutanen Mausmodell *in vivo* eine synergistische Hemmung des Wachstums von etablierten HCC-Zelllinien (Grabinski *et al.*, 2012). Ob diese Therapie auch das Wachstum orthotop transplantierte HCC-Zellen, insbesondere das primäre TSZ von HCC-Patienten, hemmen kann, ist nicht bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es nun, die Wirkung einer RAD001/MK-2206-Therapie auf das Wachstum der HCC-Zelllinie Huh7 in einem orthotopen Mausmodell zu untersuchen und die Methode zur Anreicherung von EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ aus frischem Tumorgewebe zu etablieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine RAD001/MK-2206-Therapie zu einer Hemmung des Wachstums von orthotop transplantierten EpCAM⁺ Huh7-Luc Zellen führt. Jedoch kam es bereits 7 Tage nach Therapiebeginn zu einer Resistenzentwicklung in den Tumorzellen, die insbesondere auf einen Verlust der Wirkung des AKT-Inhibitors MK-2206 zurückzuführen war.

Weiterhin erfolgte eine vergleichende Analyse dreier nicht-invasiver Messmethoden zur Verfolgung von orthotop transplantierten HCC-Zellen in der Maus. Das Alpha-Fetoprotein (AFP)-Level im Serum der Mäuse korrelierte mit den Messwerten des Biolumineszenzimagings (BLI) und der Sonografie. Zudem erwies sich die Bestimmung des AFPs neben dem BLI deutlich sensitiver als die Sonografie.

Weiter wurde die Anreicherung primärer EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ aus frisch gewonnenem HCC-Gewebe untersucht. Die Herstellung der Einzelzellsuspension im kombiniert mechanisch-enzymatischen Verfahren mittels gentleMACS-Dissociator und Inkubation mit dem Human Dissociation Kit hatte keinen Einfluss auf die Expression von EpCAM und CD90. Zudem funktionierte die Anreicherung EpCAM⁺-TSZ mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) sehr gut, während sich die der CD90⁺-TSZ als weniger effizient erwies. Nach orthotoper Transplantation der HCC-Linie Huh7 in NSG-Mäuse konnten aus einem Maustumor EpCAM⁺-TSZ angereichert werden.

Vor weiterführenden Untersuchungen zur Wirkung einer RAD001/MK-2206-Therapie auf das Wachstum von magnetisch angereicherten EpCAM⁺- und CD90⁺-TSZ von HCC-Patienten im orthotopen Mausmodell müsste die magnetische Anreicherung der CD90⁺-Zellen weiter optimiert werden. Außerdem wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob eine Kultivierung der TSZ im Anschluss an die magnetische Anreicherung unter nicht-adhärenenten Bedingungen zur Ausbildung von Sphäroiden führt, die möglicherweise nach Transplantation in Mäusen besser anwachsen. Zudem müsste der molekulare Mechanismus der Resistenzentwicklung gegen die Inhibitoren aufgeklärt werden, um besseres therapeutisches Ansprechen dieser bereits in der Klinik eingesetzten Inhibitoren zu erlangen.

6 Summary

According to the current model, cancer stem cells (CSCs) are involved in the initiation, progression, metastasis, and chemoresistance of hepatocellular carcinoma (HCC). The PI3K/AKT/mTOR pathway plays an important role in the biology of CSCs and is constitutively activated in circa 50% of HCCs. Molecules of this pathway therefore appear to be suitable targets to selectively eliminate CSCs. However, due to the involvement of mTOR in a negative feedback loop, mTOR inhibition leads to activation of AKT. Combination therapy with the mTOR inhibitor RAD001 and the AKT inhibitor MK-2206 showed synergistic inhibition of the growth of established HCC cell lines both *in vitro* and in a subcutaneous mouse model *in vivo* (Grabinski et al., 2012). Whether this therapy can also inhibit the growth of orthotopically transplanted HCC cells, in particular the growth of primary CSCs from HCC patients, is not known. The aim of the present work was now to investigate the effect of RAD001/MK-2206 therapy on the growth of the HCC cell line Huh7 in an orthotopic mouse model and to establish the method to enrich EpCAM⁺ and CD90⁺ CSCs from fresh tumor tissue.

The results of this work show that RAD001/MK-2206 therapy leads to inhibition of growth of orthotopically transplanted EpCAM⁺ Huh7-Luc cells. However, resistance development in tumor cells occurred as early as 7 days after therapy initiation, which was particularly due to a loss of effect of the AKT inhibitor MK-2206.

Furthermore, a comparative analysis of three non-invasive measurement methods for tracking orthotopically transplanted HCC cells in mice was performed. The alpha-fetoprotein (AFP) level in the serum of the mice correlated with bioluminescence imaging (BLI) and sonography measurements. Moreover, determination of AFP in addition to BLI proved to be significantly more sensitive than sonography.

Further, the enrichment of primary EpCAM⁺ and CD90⁺ CSCs from freshly obtained HCC tissue was investigated. Preparation of the single-cell suspension by the combined mechanical-enzymatic method using gentleMACS Dissociator and incubation with the Human Dissociation Kit had no effect on the expression of EpCAM and CD90. In addition, the enrichment of EpCAM⁺ CSCs by magnetic activated cell sorting (MACS) worked very well, whereas that of CD90⁺ CSCs proved to be less efficient. After orthotopic transplantation of the HCC line Huh7 into NSG mice, EpCAM⁺ CSCs could be enriched from a mouse tumor.

Before further studies on the effect of RAD001/MK-2206 therapy on the growth of magnetically enriched EpCAM⁺ and CD90⁺ CSCs from HCC patients in the orthotopic mouse model, the magnetic enrichment of CD90⁺ cells would need to be further optimized. In addition, it would be useful to investigate whether culturing the CSCs following magnetic enrichment under nonadherent conditions would lead to the formation of spheroids that might grow better after transplantation into mice. In addition, the molecular mechanism of resistance development to the inhibitors would need to be elucidated to obtain better therapeutic response of these inhibitors already used in the clinic.

7 Literaturverzeichnis

- Ajani, J. A. *et al.* (2015) 'Cancer stem cells: the promise and the potential', *Seminars in Oncology*, 42(S1), pp. S3–S17. doi: 10.1053/j.seminoncol.2015.01.001.
- Al-Hajj, M. *et al.* (2003) 'Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells', *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7), pp. 3983–3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- Andjelkovic, M. *et al.* (1996) 'Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(12), pp. 5699–5704. doi: 10.1073/pnas.93.12.5699.
- Armstrong, J. L. *et al.* (2001) 'Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(2), pp. 952–956. doi: 10.1074/jbc.M004812200.
- Autengruber, A. *et al.* (2012) 'Impact of enzymatic tissue disintegration on the level of surface molecule expression and immune cell function', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 2(2), pp. 112–120. doi: 10.1556/EuJMI.2.2012.2.3.
- Avila, M. A. *et al.* (2006) 'New therapies for hepatocellular carcinoma', *Oncogene*, 25(27), pp. 3866–3884. doi: 10.1038/sj.onc.1209550.
- Aylett, C. H. *et al.* (2016) 'Architecture of human mTOR complex 1', *Science*, 351(6268), pp. 48–52. doi: 10.1126/science.aaa3870.
- Bagi, C. M. and Andresen, C. J. (2010) 'Models of hepatocellular carcinoma and biomarker strategy', *Cancers*, 2(3), pp. 1441–1452. doi: 10.3390/cancers2031441.
- Ballou, L. M. and Lin, R. Z. (2008) 'Rapamycin and mTOR kinase inhibitors', *J Chem Biol*, 1, pp. 27–36. doi: 10.1007/s12154-008-0003-5.
- Baselga, J. *et al.* (2012) 'Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer', *N Engl J Med.*, 366(6), pp. 520–529. doi: 10.1056/NEJMoa1109653.
- BD Biosciences (no date) *BD spectrum viewer*. Available at: <https://www.bdbiosciences.com/en-de/resources/bd-spectrum-viewer> (Accessed: 19 May 2020).
- Belghiti, J. *et al.* (2003) 'Resection prior to liver transplantation for hepatocellular carcinoma.', *Ann Surg*, 238(6), pp. 885-892; discussion 892-893. doi: 10.1097/01.sla.0000098621.74851.65.
- Bellacosa, A. *et al.* (2004) 'A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities', *Cancer Biology & Therapy*, 3(3), pp. 268–275. doi: 10.4161/cbt.3.3.703.
- Bergstrand, C. G. and Czar, B. (1956) 'Demonstration of a new protein fraction in serum from the human fetus', *Scand J Clin Lab Invest.*, 8(2), p. 174. doi: 10.3109/00365515609049266.

- Beurel, E., Grieco, S. F. and Jope, R. S. (2015) 'Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases', *Pharmacol Ther.*, 148, pp. 114–131. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016.
- Bhaskar, P. T. and Hay, N. (2007) 'The Two TORCs and Akt', *Dev Cell*, 12(4), pp. 487–502. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.020.
- Bio-Rad Laboratories (2013) *Protein Assays, Technical Bulletin No. 1069*. Available at: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_1069.pdf (Accessed: 24 June 2022).
- de Boer, C. J. *et al.* (1999) 'Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver', *Journal of Pathology*, 188(2), pp. 201–206. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199906)188:2<201::AID-PATH339>3.0.CO;2-8.
- Böhmler, A. (2011) *Grundlagen der Durchflusszytometrie: Einführung und Überblick (Workshop Durchflusszytometrie in Essen und Berlin)*. Available at: <http://beckman.tentativ.de/Klinische+Diagnostik/Download/Veranstaltungen-p-664.html> (Accessed: 24 June 2022).
- Bomken, S. *et al.* (2010) 'Understanding the cancer stem cell', *British Journal of Cancer*, 103(4), pp. 439–445. doi: 10.1038/sj.bjc.6605821.
- Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997) 'Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell', *Nature Medicine*, 3(7), pp. 730–737. doi: 10.1038/nm0797-730.
- Bosio, A. *et al.* (2009) 'Isolation and enrichment of stem cells', *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 114(May), pp. 23–72. doi: 10.1007/10_2008_38.
- Bozulic, L. *et al.* (2008) 'PKB α /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival', *Mol Cell.*, 30(2), pp. 203–213. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.024.
- Brogard, J. *et al.* (2007) 'PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms', *Molecular Cell*, 25(6), pp. 917–931. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.017.
- Brown, J. S. and Banerji, U. (2017) 'Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments', *Pharmacology and Therapeutics*, 172(April), pp. 101–115. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.12.001.
- Brugarolas, J. *et al.* (2004) 'Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1 / TSC2 tumor suppressor complex', *Genes and Development*, 18(23), pp. 2893–2904. doi: 10.1101/gad.1256804.
- Bruix, J. *et al.* (1996) 'Surgical resection of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: prognostic value of preoperative portal pressure.', *Gastroenterology*, 111(4), pp. 1018–22. doi: 10.1016/s0016-5085(96)70070-7.
- Bruix, J. and Sherman, M. (2011) 'Management of hepatocellular carcinoma: an update', *Hepatology*, 53(3), pp. 1020–1022. doi: 10.1002/hep.24199.
- But, D. Y. K., Lai, C. L. and Yuen, M. F. (2008) 'Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 14(11), pp. 1652–1656. doi: 10.3748/wjg.14.1652.

- Calleja, V., Laguerre, M. and Parker, P. J. (2009) 'Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB / Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition', *PLoS Biology*, 7(1), pp. 189–200. doi: 10.1371/journal.pbio.1000017.
- Cantley, L. C. and Neel, B. G. (1999) 'New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), pp. 4240–4245. doi: 10.1073/pnas.96.8.4240.
- Cao, L. *et al.* (2011) 'Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines', *BMC Gastroenterology*, 11(1), p. 71. doi: 10.1186/1471-230X-11-71.
- Cardone, M. H. *et al.* (1998) 'Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation', *Science*, 282(5392), pp. 1318–1321. doi: 10.1126/science.282.5392.1318.
- Carracedo, A. *et al.* (2008) 'Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer', *Journal of Clinical Investigation*, 118(9), pp. 3065–3074. doi: 10.1172/JCI34739.
- Cazejust, J. *et al.* (2014) 'Hepatocellular carcinoma vascularization: From the most common to the lesser known arteries', *Diagnostic and Interventional Imaging*, 95(1), pp. 27–36. doi: 10.1016/j.diii.2013.04.015.
- Ceni, E. *et al.* (2014) 'Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism', *World Journal of Gastroenterology*, 20(47), pp. 17756–17772. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17756.
- Cerra, R., Zarbo, R. J. and Crissman, J. D. (1990) 'Dissociation of cells from solid tumors', *Methods in Cell Biology*, 33, pp. 1–12. doi: 10.1016/s0091-679x(08)60506-3.
- Cervello, M. *et al.* (2012) 'Targeted therapy for hepatocellular carcinoma: novel agents on the horizon', *Oncotarget*, 3(3), pp. 236–260. doi: 10.18632/oncotarget.466.
- Chaffer, C. L. *et al.* (2011) 'Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), pp. 7950–7955. doi: 10.1073/pnas.1102454108.
- Chalmers, J. . *et al.* (2010) 'Quantification of non-specific binding of magnetic micro and nano particles using cell tracking velocimetry: Implication for magnetic cell separation and detection', *Biotechnol Bioeng*, 105(6), pp. 1078–1093. doi: 10.1002/bit.22635.
- Chan, T. O. *et al.* (2011) 'Resistance of Akt kinases to dephosphorylation through ATP-dependent conformational plasticity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(46), pp. E1120–E1127. doi: 10.1073/pnas.1109879108.
- Chandarlapaty, S. *et al.* (2011) 'AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity', *Cancer Cell*, 19(1), pp. 58–71. doi: 10.1016/j.ccr.2010.10.031.
- Charlton, M. *et al.* (2002) 'Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis', *Hepatology*, 35(4), pp. 898–904. doi: 10.1053/jhep.2002.32527.

- Cheng, A. L. *et al.* (2009) 'Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 10(1), pp. 25–34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70285-7.
- Chiba, T. *et al.* (2006) 'Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties', *Hepatology*, 44(1), pp. 240–251. doi: 10.1002/hep.21227.
- Child, C. G. and Turcotte, J. G. (1964) 'Surgery and portal hypertension', in Child, C. G. (ed.) *The liver and portal hypertension*. Philadelphia, PA: Saunders, pp. 50–64.
- Chong-Kopera, H. *et al.* (2006) 'TSC1 Stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin Ligase', *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), pp. 8313–8316. doi: 10.1074/jbc.C500451200.
- Choo, A. Y. *et al.* (2008) 'Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), pp. 17414–17419. doi: 10.1073/pnas.0809136105.
- Clarke, M. F. (2005) 'A self-renewal assay for cancer stem cells', *Cancer Chemother Pharmacol*, 56 Suppl 1, pp. 64–68. doi: 10.1007/s00280-005-0097-1.
- Clarke, M. F. *et al.* (2006) 'Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells', *Cancer Research*, 66(19), pp. 9339–9344. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3126.
- Comella, K. *et al.* (2001) 'Effects of antibody concentration on the separation of human natural killer cells in a commercial immunomagnetic separation system', *Cytometry*, 45(4), pp. 285–293. doi: 10.1002/1097-0320(20011201)45:4<285::aid-cyto10018>3.0.co;2-w.
- Copp, J., Manning, G. and Hunter, T. (2010) 'TORC-specific phosphorylation of mTOR: phospho-Ser2481 is a marker for intact mTORC2', *Cancer Research*, 69(5), pp. 1821–1827. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3014.
- Dan, Y. Y. *et al.* (2006) 'Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), pp. 9912–9917. doi: 10.1073/pnas.0603824103.
- Datta, S. R. *et al.* (2000) '14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 Domain Phosphorylation', *Molecular Cell*, 6(1), pp. 41–51. doi: 10.1016/S1097-2765(05)00012-2.
- Dean, M., Fojo, T. and Bates, S. (2005) 'Tumour stem cells and drug resistance', *Nature Reviews Cancer*, 5(4), pp. 275–284. doi: 10.1038/nrc1590.
- Dechert, U. (2012) 'Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)', in Jansohn, M. and Rothhäme, S. (eds) *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5th edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 37–92.
- Deng, G., Zeng, S. and Shen, H. (2015) 'Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges', *World Journal of*

Hepatology, 7(5), pp. 787–798. doi: 10.4254/wjh.v7.i5.787.

DeYoung, M. P. *et al.* (2008) 'Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14 – 3 – 3 shuttling', *Genes and Development*, 22(2), pp. 239–251. doi: 10.1101/gad.1617608.

Dhanasekaran, R., Bandoh, S. and Roberts, L. R. (2016) 'Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances', *F1000Research*, 5(May), p. 879. doi: 10.12688/f1000research.6946.1.

Dibble, C. C., Asara, J. M. and Manning, B. D. (2009) 'Characterization of rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1', *Molecular and Cellular Biology*, 29(21), pp. 5657–5670. doi: 10.1128/MCB.00735-09.

Dick, J. E. (2008) 'Stem cell concepts renew cancer research', *Blood*, 112(13), pp. 4793–4807. doi: 10.1182/blood-2008-08-077941.

Diehl, J. A. *et al.* (1998) 'Glycogen synthase kinase-3 regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization', *Genes and Development*, 12(22), pp. 3499–3511. doi: 10.1101/gad.12.22.3499.

Diehn, M. *et al.* (2009) 'Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells', *Nature*, 458(7239), pp. 780–783. doi: 10.1038/nature07733.

Du, K. and Montminy, M. (1998) 'CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(49), pp. 32377–32379. doi: 10.1074/jbc.273.49.32377.

Duan, J. *et al.* (2013) 'Strategies for isolating and enriching cancer stem cells: well begun is half done', *Stem Cells and Development*, 22(16), pp. 2221–2238. doi: 10.1089/scd.2012.0613.

Dubuisson, J. and Cosset, F. L. (2014) 'Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - an update', *Journal of Hepatology*, 61(1), pp. S3–S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.

Dudareva, S. *et al.* (2020) 'Virushepatitis B und D sowie Virushepatitis C im Jahr 2019', *Epidemiologisches Bulletin*, 30/31, pp. 1–36. doi: 10.25646/7025.

Dumont, F. J. and Su, Q. (1996) 'Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin', *Life Sciences*, 58(5), pp. 373–395. doi: 10.1016/0024-3205(95)02233-3.

Duncan, R. and Hershey, J. W. B. (1985) 'Regulation of initiation factors during translational repression caused by serum depletion. Covalent modification', *The Journal of Biological Chemistry*, 260(9), pp. 5493–5497.

Edinger, M. *et al.* (1999) 'Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models', *Neoplasia*, 1(4), pp. 303–310. doi: 10.1038/sj.neo.7900048.

Efeyan, A. and Sabatini, D. M. (2010) 'mTOR and cancer: many loops in one pathway', *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), pp. 169–176. doi: 10.1016/j.ceb.2009.10.007.

Engelholm, S. A., Spang-Thomsen, M. and Brünner, N. (1985) 'Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical and enzymatic methods', *British*

- Journal of Cancer*, 51(1), pp. 93–98. doi: 10.1038/bjc.1985.13.
- Engelman, J. A., Luo, J. and Cantley, L. C. (2006) 'The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism', *Nature Reviews Genetics*, 7(8), pp. 606–619. doi: 10.1038/nrg1879.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K. and Mitsudomi, T. (2007) 'MET amplification leads to Gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling', *Science*, 316(5827), pp. 1039–1043. doi: 10.1126/science.1141478.
- European Association for the Study of the Liver/European Organisation for Research and Treatment of Cancer (2012) 'EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma', *Journal of Hepatology*, 56(4), pp. 908–943. doi: 10.1016/j.jhep.2011.12.001.
- Ewald, F. *et al.* (2013) 'Combined targeting of AKT and mTOR using MK-2206 and RAD001 is synergistic in the treatment of cholangiocarcinoma', *International Journal of Cancer*, 133, pp. 2065–2076. doi: 10.1002/ijc.28214.
- Feng, K. and Ma, K.-S. (2014) 'Value of radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 20(20), pp. 5987–5998. doi: 10.3748/wjg.v20.i20.5987.
- Ferlay, J. *et al.* (2015) 'Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012', *International Journal of Cancer*, 136(5), pp. E359–E386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Flaherty, K. T. *et al.* (2010) 'Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma', *The New England Journal of Medicine*, 363(9), pp. 809–819. doi: 10.1056/NEJMoa1002011.
- Foster, K. G. andingar, D. C. (2010) 'Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony', *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), pp. 14071–14077. doi: 10.1074/jbc.R109.094003.
- Frame, S. and Cohen, P. (2001) 'GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery', *Biochemical Journal*, 359(Pt 1), pp. 1–16. doi: 10.1042/0264-6021:3590001.
- Franke, T. F. (2008) 'PI3K/Akt: getting it right matters', *Oncogene*, 27(50), pp. 6473–6488. doi: 10.1038/onc.2008.313.
- Frias, M. A. *et al.* (2006) 'mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s', *Current Biology*, 16(18), pp. 1865–1870. doi: 10.1016/j.cub.2006.08.001.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E. and Cantley, L. C. (1998) 'Phosphoinositide Kinases', *Annual Review of Biochemistry*, 67, pp. 481–507. doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.481.
- Fuchs, B. C. *et al.* (2008) 'Epithelial-to-enchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells', *Cancer Research*, 68(7), pp. 2391–2399. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2460.
- Gao, S. *et al.* (2012) 'Declining rates of hepatocellular carcinoma in urban Shanghai: incidence trends in 1976–2005', *Eur J Epidemiol.*, 27(1), pp. 39–46. doi:

10.1007/s10654-011-9636-8.

Gao, T., Furnari, F. and Newton, A. C. (2005) 'PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth', *Molecular Cell*, 18(1), pp. 13–24. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.008.

Garraway, L. A. and Jänne, P. A. (2012) 'Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine', *Cancer Discovery*, 2(3), pp. 214–226. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0012.

Ge, S. and Huang, D. (2015) 'Systemic therapies for hepatocellular carcinoma', *Drug Discoveries & Therapeutics*, 9(5), pp. 352–362. doi: 10.5582/ddt.2015.01047.

Georgescu, M. M. (2010) 'Pten tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control', *Genes and Cancer*, 1(12), pp. 1170–1177. doi: 10.1177/1947601911407325.

Germano, D. and Daniele, B. (2014) 'Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives', *World Journal of Gastroenterology*, 20(12), pp. 3087–3099. doi: 10.3748/wjg.v20.i12.3087.

Gingras, A. C. *et al.* (2001) 'Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1', *Genes and Development*, 15(21), pp. 2852–2864. doi: 10.1101/gad.912401.

Gomaa, A. I. *et al.* (2008) 'Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis', *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), pp. 4300–4308. doi: 10.3748/wjg.14.4300.

Gomaa, A. I. *et al.* (2009) 'Diagnosis of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastroenterology*, 15(11), pp. 1301–1314. doi: 10.3748/wjg.15.1301.

Gorre, M. E. *et al.* (2001) 'Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification', *Science*, 293(5531), pp. 876–880. doi: 10.1126/science.1062538.

Grabinski, N. *et al.* (2012) 'Combined targeting of AKT and mTOR synergistically inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells', *Molecular Cancer*, 11(85), pp. 1–14. doi: 10.1186/1476-4598-11-85.

Gressner, A. M. and Arndt, T. (2012) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2nd edn. Edited by A. M. Gressner and T. Arndt. Heidelberg: Springer.

Greten, T. *et al.* (2005) 'Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients', *British Journal of Cancer*, 92, pp. 1862–1868. doi: 10.1038/sj.bjc.6602590.

Greten, T. F. *et al.* (2013) *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Leitlinienreport 1.0, AWMF Registrierungsnummer: 032-053OL*. Available at: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Accessed: 13 September 2020).

Groenendijk, F. H. and Bernards, R. (2014) 'Drug resistance to targeted therapies: Déjà vu all over again', *Molecular Oncology*, 8(6), pp. 1067–1083. doi:

10.1016/j.molonc.2014.05.004.

Guba, M. *et al.* (2002) 'Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor', *Nat Med*, 8(2), pp. 128–135. doi: 10.1038/nm0202-128.

Guertin, D. A. *et al.* (2006) 'Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1', *Developmental Cell*, 11(6), pp. 859–871. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.007.

Han, E. *et al.* (2007) 'Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition', *Oncogene*, 26(38), pp. 5655–5661. doi: 10.1038/sj.onc.1210343.

Han, K. and Kim, J. H. (2015) 'Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma treatment: Barcelona clinic liver cancer staging system', *World Journal of Gastroenterology*, 21(36), pp. 10327–10335. doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10327.

Harrington, L. S. *et al.* (2004) 'The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins', *The Journal of Cell Biology*, 166(2), pp. 213–223. doi: 10.1083/jcb.200403069.

Haruta, T. *et al.* (2000) 'A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1', *Molecular Endocrinology*, 14(6), pp. 783–794. doi: 10.1210/mend.14.6.0446.

Hashimoto, E., Taniai, M. and Tokushige, K. (2013) 'Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH', *Gastroenterology & Hepatology*, 28(Suppl. 4), pp. 64–70. doi: 10.1111/jgh.12271.

Hassoun, Z. and Gores, G. J. (2003) 'Treatment of hepatocellular carcinoma', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 1(1), pp. 10–18. doi: 10.1053/jcgh.2003.50003.

Hatina, J. *et al.* (2007) 'Tumorstammzellen - ein neues Konzept in der Tumorbilogie', *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132(31/32), pp. 1629–1632. doi: 10.1055/s-2007-984945.

He, L. *et al.* (2015) 'Mouse models of liver cancer: progress and recommendations', *Oncotarget*, 6(27), pp. 23306–23322. doi: 10.18632/oncotarget.4202.

Heffelfinger, S. C. *et al.* (1992) 'SK Hep-1: a human cell line of endothelial origin', *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 28A(2), pp. 136–142. doi: 10.1007/BF02631017.

Helliwell, S. B. *et al.* (1994) 'TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast', *Molecular Biology of the Cell*, 5(1), pp. 105–118. doi: 10.1091/mbc.5.1.105.

Hernandez-Gea, V. *et al.* (2013) 'Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma', *Gastroenterology*, 144(3), pp. 512–527. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.002.

Herrera, M. B. *et al.* (2006) 'Isolation and characterization of a stem cell population

from adult human liver', *Stem Cells*, 24(12), pp. 2840–2850. doi: 10.1634/stemcells.2006-0114.

Hirai, H. *et al.* (2010) 'MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo', *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(7), pp. 1956–1967. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1012.

Huang, J. and Manning, B. D. (2009) 'The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth', *Biochem. J.*, 412(2), pp. 179–190. doi: 10.1042/BJ20080281.

Huang, M. *et al.* (2014) 'Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade', *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(1), pp. 41–50. doi: 10.1016/j.tips.2013.11.004.

Inoki, K. *et al.* (2003) 'TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival', *Cell*, 115(5), pp. 577–590. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00929-2.

Intaraprasong, P., Siramolpiwat, S. and Vilaichone, R. (2016) 'Advances in management of hepatocellular carcinoma', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(8), pp. 3697–3703. doi: 10.1016/j.jceh.2016.03.006.

International Agency for Research on Cancer/World Health Organization (2020) *Liver Cancer Fact Sheet*. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf> (Accessed: 18 August 2021).

International Agency for Research on Cancer (2012) 'Aflatoxins', *Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks on Humans.*, 100 F, pp. 225–248.

Jacinto, E. *et al.* (2004) 'Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive', *Nature Cell Biology*, 6(11), pp. 1122–1128. doi: 10.1038/ncb1183.

Jacinto, E. *et al.* (2006) 'SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity', *Cell*, 127(1), pp. 125–137. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.033.

Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. and Pestova, T. V. (2010) 'The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2), pp. 113–127. doi: 10.1038/nrm2838.

Jayachandran, A., Dhungel, B. and Steel, J. C. (2016) 'Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma', *Journal of Hematology & Oncology*, 9(1), p. 74. doi: 10.1186/s13045-016-0307-9.

Jefferies, H. B. J. *et al.* (1997) 'Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70 s6k', *The EMBO Journal*, 16(12), pp. 3693–3704. doi: 10.1093/emboj/16.12.3693.

Joo, I., Kim, H. and Lee, J. M. (2015) 'Cancer stem cells in primary liver cancers: Pathological concepts and imaging findings', *Korean Journal of Radiology*, 16(1), pp. 50–68. doi: 10.3348/kjr.2015.16.1.50.

Julien, L. *et al.* (2010) 'mTORC1-activated S6K1 phosphorylates rictor on

- threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling □', *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), pp. 908–921. doi: 10.1128/MCB.00601-09.
- Kaidanovich-Beilin, O. and Woodgett, J. R. (2011) 'GSK-3: functional insights from cell biology and animal models', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4(40), pp. 1–25. doi: 10.3389/fnmol.2011.00040.
- Kao, C. *et al.* (2004) 'Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein', *Oncogene*, 23(14), pp. 2472–2483. doi: 10.1038/sj.onc.1207368.
- Khan, S. and Sewell, C. (2006) 'Oral immunosuppressive drugs', *Clinical Medicine*, 6(4), pp. 352–355. doi: 10.7861/clinmedicine.6-4-352.
- Kim, D. *et al.* (2002) 'mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery', *Cell*, 110(2), pp. 163–175. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
- Kim, Y. C. and Guan, K. (2015) 'mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), pp. 25–32. doi: 10.1172/JCI73939.such.
- Kumar Pal, S. *et al.* (2011) 'Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer', *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19(11), pp. 1355–1366. doi: 10.1517/13543784.2010.520701.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0.
- Lamontagne, R. J., Bagga, S. and Bouchard, M. J. (2016) 'Hepatitis B virus molecular biology and pathogenesis', *Hepatoma Research*, 2, pp. 163–186. doi: 10.20517/2394-5079.2016.05.
- Laplante, M. and Sabatini, D. M. (2009) 'mTOR signaling at a glance', *Journal of Cell Science*, 122(Pt 20), pp. 3589–3594. doi: 10.1242/jcs.127308.
- Lathia, J. D. and Liu, H. (2017) 'Overview of cancer stem cells and stemness for community oncologists', *Targeted Oncology*, 12(4), pp. 387–399. doi: 10.1007/s11523-017-0508-3.
- Lee, M. Y. and Lufkin, T. (2012) 'Development of the “ Three-step MACS ”: a novel strategy for isolating rare cell populations in the absence of known cell surface markers from complex animal tissue', *Journal of Biomolecular Techniques*, 23(2), pp. 69–77. doi: 10.7171/jbt.12-2302-003.
- Leenders, M. W. H., Nijkamp, M. W. and Borel Rinkes, I. H. M. (2008) 'Mouse models in liver cancer research: a review of current literature', *World Journal of Gastroenterology*, 14(45), pp. 6915–6923. doi: 10.3748/wjg.14.6915.
- Lemmon, M. A. and Schlessinger, J. (2010) 'Cell signaling by receptor tyrosine kinases', *Cell*, 141(7), pp. 1117–1134. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
- Leslie, N. R. *et al.* (2008) 'Understanding PTEN regulation: PIP2 , polarity and protein stability', *Oncogene*, 27(41), pp. 5464–5476. doi: 10.1038/onc.2008.243.
- Litvinov, S. V. *et al.* (1994) 'Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule', *The Journal of Cell Biology*, 125(2), pp. 437–446. doi:

10.1083/jcb.125.2.437.

Litvinov, S. V. *et al.* (1997) 'Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins', *The Journal of Cell Biology*, 139(5), pp. 1337–1348. doi: 10.1083/jcb.139.5.1337.

Liu, J., Stevens, P. D. and Gao, T. (2011) 'mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), pp. 6510–6520. doi: 10.1074/jbc.M110.183087.

Liu, P. *et al.* (2013) 'Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signaling to suppress tumorigenesis', *Nature Cell Biology*, 15(11), pp. 1340–1350. doi: 10.1038/ncb2860.

Llovet, J. and Bruix, J. (2008) 'Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 48(4), pp. 1312–1327. doi: 10.1002/hep.22506.

Llovet, J. M., Burroughs, A. and Bruix, J. (2003) 'Hepatocellular carcinoma', *The Lancet*, 362(9399), pp. 1907–1917. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14964-1.

Llovet, J. M., Ricci, S. and Mazzaferro, V. (2008) 'Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma', *The New England Journal of Medicine*, 359(4), pp. 378–390. doi: 10.1056/NEJMoa0708857.

Lorenz, M. C. and Heitman, J. (1995) 'TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(46), pp. 27531–27537. doi: 10.1074/jbc.270.46.27531.

Lowry, O. H. *et al.* (1951) 'Protein measurement with the folin phenol reagent', *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp. 265–275. Available at: http://www.life.illinois.edu/biochem/355/articles/LowryJBC193_265.pdf (Accessed: 19 July 2020).

Luo, X.-Y., Wu, K.-M. and He, X.-X. (2021) 'Advances in drug development for hepatocellular carcinoma: clinical trials and potential therapeutic targets', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), p. 172. doi: 10.1186/s13046-021-01968-w.

Luong, A. B. *et al.* (2020) 'The mRNA distribution of cancer stem cell marker CD90/Thy-1 is comparable in hepatocellular carcinoma of Eastern and Western Populations', *Cells*, 9(12), p. 2672. doi: 10.3390/cells9122672.

Ma, S. *et al.* (2007) 'Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells', *Gastroenterology*, 132(7), pp. 2542–2556. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.025.

Ma, X. *et al.* (2019) 'Sphere-forming culture enriches liver cancer stem cells and reveals Stearoyl-CoA desaturase 1 as a potential therapeutic target', *BMC Cancer*, 19(760), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12885-019-5963-z.

Ma, X. M. and Blenis, J. (2009) 'Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(5), pp. 307–318. doi: 10.1038/nrm2672.

MacKeigan, J. P. and Krueger, D. A. (2015) 'Differentiating the mTOR inhibitors everolimus and sirolimus in the treatment of tuberous sclerosis complex', *Neuro-Oncology*, 17(12), pp. 1550–1559. doi: 10.1093/neuonc/nov152.

- Mader, S. *et al.* (1995) 'The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins', *Molecular and Cellular Biology*, 15(9), pp. 4990–4997. doi: 10.1128/mcb.15.9.4990.
- Maetzel, D. *et al.* (2009) 'Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM', *Nature Cell Biology*, 11(2), pp. 162–171. doi: 10.1038/ncb1824.
- Mahajan, K. and Mahajan, N. P. (2013) 'PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics', *J Cell Physiol.*, 227(9), pp. 3178–3184. doi: 10.1002/jcp.24065.
- Malek, N. P. *et al.* (2014) 'The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma', *Deutsches Arzteblatt International*, 111(7), pp. 101–106. doi: 10.3238/arztebl.2014.0101.
- Mani, S. a *et al.* (2008) 'The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells', *Cell*, 133(4), pp. 704–715. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- Manning, B. and Cantley, L. (2007) 'AKT/PKB Signalling: navigating downstream', *Cell*, 129(7), pp. 1261–1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Manning, B. D. and Toker, A. (2017) 'AKT/PKB Signaling: navigating the network', *Cell*, 169(3), pp. 381–405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001.
- Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A. and Chaffer, C. L. (2013) 'Cell plasticity and heterogeneity in cancer', *Clinical Chemistry*, 59(1), pp. 168–179. doi: 10.1373/clinchem.2012.184655.
- Martin-Padura, I. (2010) 'Sex-related efficiency in NSG mouse engraftment', *Blood*, 116(14), pp. 2616–2617. doi: 10.1182/blood-2010-07-295584.
- Martin-Padura, I. *et al.* (2012) 'Residual dormant cancer stem-cell foci are responsible for tumor relapse after antiangiogenic metronomic therapy in hepatocellular carcinoma xenografts', *Laboratory Investigation*, 92(7), pp. 952–966. doi: 10.1038/labinvest.2012.65.
- Matter, M. S. *et al.* (2014) 'Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: current state and future trends', *Journal of Hepatology*, 60(4), pp. 855–865. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.031.
- Mattmann, M. E., Stoops, S. L. and Lindsley, C. W. (2014) 'Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(9), pp. 1309–1338. doi: 10.1517/13543776.2011.587959.
- Mayo, L. D. and Donner, D. B. (2001) 'A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), pp. 11598–11603. doi: 10.1073/pnas.181181198.
- Mazzaferro, V. *et al.* (1996) 'Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis', *The New England Journal of Medicine*, 334(11), pp. 693–699. doi: 10.1056/NEJM199603143341104.
- McCloskey, K. E., Chalmers, J. J. and Zborowski, M. (2000) 'Magnetophoretic

mobilities correlate to antibody binding capacities', *Cytometry*, 40(4), pp. 307–315. doi: 10.1002/1097-0320(20000801)40:4<307::aid-cyto6>3.0.co;2-h.

McGlynn, K. A., Petrick, J. L. and London, W. T. (2015) 'Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability', *Clinics in liver disease*, 19(2), pp. 223–238. doi: 10.1016/j.cld.2015.01.001.

Medema, R. H., Kops, G. J. P. L. and Bos, J. (2000) 'AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1', *Nature*, 404(6779), pp. 782–787. doi: 10.1038/35008115.

Miltenyi Biotec (2009) *autoMACS™ Pro Separator User manual Version 2.0*. Available at: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/5ba58a311e63e5ff86c05b2b431ba25b84edaaa1/autoMACS Pro Separator user manual.pdf (Accessed: 21 August 2021).

Miltenyi Biotec (2010) *MACS® Technology Gold standard in cell separation*. Available at: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/dec7bd1e0f2bb994cd6e6774d8f79f5980224a22/autoMACS_Pro_Brochure.pdf (Accessed: 21 August 2021).

Miltenyi Biotec (2016) *MACS® Cell Separation Select the best*. Available at: https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf (Accessed: 21 August 2021).

Miltenyi, S. *et al.* (1990) 'High gradient magnetic cell separation with MACS', *Cytometry*, 11(2), pp. 231–238. doi: 10.1002/cyto.990110203.

Mittal, S. *et al.* (2016) 'Hepatocellular carcinoma in the absence of cirrhosis in US veterans is associated with non-alcoholic fatty liver disease', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(1), pp. 124–131. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.019.

Moll, U. M. and Petrenko, O. (2003) 'The MDM2-p53 interaction', *Molecular Cancer Research*, 1(14), pp. 1001–1008. Available at: <https://aacrjournals.org/mcr/article/1/14/1001/232350/The-MDM2-p53-Interaction>.

Motzer, R. J. *et al.* (2008) 'Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial', *The Lancet*, 372(9637), pp. 449–456. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61039-9.

Moustafa, M. *et al.* (2022) 'Combined targeting of AKT and mTOR inhibits tumor formation of EpCAM+ and CD90+ human hepatocellular carcinoma cells in an orthotopic mouse model', *Cancers*, 14(8), pp. 1–22. doi: 10.3390/cancers14081882.

Muenzner, J. K. *et al.* (2018) 'Generation and characterization of hepatocellular carcinoma cell lines with enhanced cancer stem cell potential', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(12), pp. 6238–6248. doi: 10.1111/jcmm.13911.

Müller, C. (2019) 'Operationsrisiko bei chronischen Lebererkrankungen', *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*, 17(1), pp. 18–24. doi: 10.1007/s41971-019-0045-2.

Münz, M. *et al.* (2004) 'The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation', *Oncogene*, 23(34), pp. 5748–5758. doi:

10.1038/sj.onc.1207610.

Nault, J. and Villanueva, A. (2015) 'Intratumor molecular and phenotypic diversity in hepatocellular carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 21(8), pp. 1786–1789. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2602.

Nazarian, R. *et al.* (2010) 'Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation', *Nature*, 468(7326), pp. 973–977. doi: 10.1038/nature09626.

Neel, D. S. and Bivona, T. G. (2017) 'Resistance is futile: overcoming resistance to targeted therapies in lung adenocarcinoma', *npj Precision Oncology*, 1(1), p. 3. doi: 10.1038/s41698-017-0007-0.

Newell, P. *et al.* (2008) 'Experimental models of hepatocellular carcinoma', *Journal of Hepatology*, 48(5), pp. 858–879. doi: 10.1016/j.jhep.2008.01.008.

Newton, A. C. and Trotman, L. C. (2014) 'Turning off AKT: PHLPP as a drug target', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, pp. 537–558. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140338.

Nio, K., Yamashita, T. and Kaneko, S. (2017) 'The evolving concept of liver cancer stem cells', *Molecular Cancer*, 16(1), p. 4. doi: 10.1186/s12943-016-0572-9.

Nowell Peter C. (1976) 'The clonal evolution of tumor cell populations', *Science*, 194(4260), pp. 23–28. doi: 10.1126/science.959840.

O'Brien, S. G. *et al.* (2003) 'Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia', *The New England Journal of Medicine*, 348(11), pp. 994–1004. doi: 10.1056/NEJMoa022457.

O'Reilly, K. E. *et al.* (2006) 'mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt', *Cancer Research*, 66(3), pp. 1500–1508. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925.

Okuzumi, T. *et al.* (2010) 'Inhibitor hijacking of Akt activation', *Nature Chemical Biology*, 5(7), pp. 484–493. doi: 10.1038/nchembio.183.

Oshiro, N. *et al.* (2004) 'Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function', *Genes to Cells*, 9(4), pp. 359–366. doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00727.x.

Ou, Y. *et al.* (2012) 'TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation', *Mol Cell.*, 41(4), pp. 458–470. doi: 10.1016/j.molcel.2011.01.019.

Parikh, C. *et al.* (2012) 'Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), pp. 19368–19373. doi: 10.1073/pnas.1204384109.

Paschos, P. and Paletas, K. (2009) 'Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome', *Hippokratia*, 13(1), pp. 9–19. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2633261/>.

Pearce, L. R. *et al.* (2007) 'Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2', *Biochemical Journal*, 405(3), pp. 513–522. doi: 10.1042/BJ20070540.

Pederson, T. M., Kramer, D. L. and Rondinone, C. M. (2001) 'Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation', *Diabetes*, 50(1), pp. 24–31. doi: 10.2337/diabetes.50.1.24.

PerkinElmer Health Sciences (2017) *IVIS Spectrum software manual*. Available at: [https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020-06/IVIS Spectrum software manual.pdf](https://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/2020-06/IVIS%20Spectrum%20software%20manual.pdf) (Accessed: 22 August 2021).

Peterson, T. R. *et al.* (2010) 'DEPTOR is an mTOR inhibitor whose frequent overexpression in multiple myeloma cells promotes their survival', *Cell*, 137(5), pp. 873–886. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.046.

Plouffe, B. D., Murthy, S. K. and Lewis, L. H. (2015) 'Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment', *Reports on Progress in Physics*, 78(1). doi: 10.1088/0034-4885/78/1/016601.

Pompili, M. *et al.* (2013) 'Bridging and downstaging treatments for hepatocellular carcinoma in patients on the waiting list for liver transplantation', *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), pp. 7515–7530. doi: 10.3748/wjg.v19.i43.7515.

Poulikakos, P. I. *et al.* (2011) 'RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)', *Nature*, 480(7377), pp. 387–390. doi: 10.1038/nature10662.

Poulou, L. S. *et al.* (2015) 'Percutaneous microwave ablation vs radiofrequency ablation in the treatment of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Hepatology*, 7(8), pp. 1054–1063. doi: 10.4254/wjh.v7.i8.1054.

Prieto-Vila, M. *et al.* (2017) 'Drug resistance driven by cancer stem cells and their niche', *International Journal of Molecular Science*, 18(12), p. 2574. doi: 10.3390/ijms18122574.

Pugh, R. *et al.* (1973) 'Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices', *British Journal of Surgery*, 60(8), pp. 646–654. doi: 10.1002/bjs.1800600817.

Raza, A. and Sood, G. K. (2014) 'Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine', *World Journal of Gastroenterology*, 20(15), pp. 4115–4127. doi: 10.3748/wjg.v20.i15.4115.

Rege, T. A. and Hagood, J. S. (2006) 'Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis', *The FASEB Journal*, 20(8), pp. 1045–1054. doi: 10.1096/fj.05-5460rev.

Renna, M. (2016) 'Commentary: overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor', *Frontiers in Pharmacology*, 7(November), p. 431. doi: 10.3389/fphar.2016.00431.

Reya, T. *et al.* (2001) 'Stem Cells, Cancer, and cancer stem cells', *Nature*, 414(6859), pp. 105–111. doi: 10.1038/35102167.

Rhim, H., Lim, H. K. and Choi, D. (2010) 'Current status of radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma', *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2(4), pp. 128–136. doi: 10.4240/wjgs.v2.i4.128.

Rich, J. N. (2016) 'Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and

- heterogeneity', *Medicine (United States)*, 95(1 Suppl 1), pp. S2–S7. doi: 10.1097/MD.00000000000004764.
- Rocco, A. *et al.* (2014) 'Alcoholic disease: liver and beyond', *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), pp. 14652–14659. doi: 10.3748/wjg.v20.i40.14652.
- Rothe, G. (2007) 'Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie', in Sack, U., Tárnok, A., and Rothe, G. (eds) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, pp. 27–70.
- Rowinsky, E. K. (2016) 'Targeting mTOR: A little bit of history and a large future', in Mita, M., Mita, A., and Rowinsky, E. K. (eds) *mTOR Inhibition for Cancer Therapy - Past, Present and Future*. Springer, Paris, pp. 1–19. doi: 10.1007/978-2-8178-0492-7_1.
- Rozengurt, E., Soares, H. P. and Sinnett-Smith, J. (2015) 'Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple over-activation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(11), pp. 2477–2488. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0330.
- Russell, S. W. *et al.* (1976) 'Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I. TUMOR disaggregation and identification of constituent inflammatory cells', *International Journal of Cancer*, 18(3), pp. 322–330. doi: 10.1002/ijc.2910180309.
- Salaspuro, M. P. and Lieber, S. (1981) 'Attenuation of the ethanol-induced hepatic redox change after chronic alcohol consumption in baboons: metabolic consequences in vivo and in vitro', *Hepatology*, 1(1), pp. 33–38. doi: 10.1002/hep.1840010106.
- Salt, M. B., Bandyopadhyay, S. and McCormick, F. (2014) 'Epithelial-to-mesenchymal transition rewires the molecular path to PI3K-dependent proliferation', *Cancer Discovery*, 4(2), pp. 186–199. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0520.
- Sancak, Y. *et al.* (2007) 'PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase', *Molecular Cell*, 25(6), pp. 903–915. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.003.
- Sancak, Y. *et al.* (2008) 'The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1', *Science*, 320(5882), pp. 1496–1501. doi: 10.1126/science.1157535.
- Sarbassov, D. D. *et al.* (2005) 'Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex', *Science*, 307(5712), pp. 1098–1101. doi: 10.1126/science.1106148.
- Sarbassov, D. D. *et al.* (2006) 'Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB', *Molecular Cell*, 22(2), pp. 159–168. doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- Sarveazad, A. *et al.* (2019) 'Predictors of 5 year survival rate in hepatocellular carcinoma patients', *J Res Med Sci*, 24(86), pp. 1–7. doi: 10.4103/jrms.JRMS_1017_18.
- Sawatzki, M. and Semela, D. (2012) 'Epidemiologie und Ätiologie des

hepatocellulären Karzinoms', *Tumor Diagnostik und Therapie*, 33(1), pp. 10–13. doi: 10.1055/s-0031-1299310.

Schalm, S. S. and Blenis, J. (2002) 'Identification of a conserved motif required for mTOR signaling', *Current Biology*, 12(8), pp. 632–639. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00762-5.

Schwitalla, S. (2014) 'Tumor cell plasticity: the challenge to catch a moving target', *Journal of Gastroenterology*, 49(4), pp. 618–627. doi: 10.1007/s00535-014-0943-1.

Sharma, S. V. *et al.* (2010) 'A chromatin-mediated reversible drug tolerant state in cancer cell subpopulations', *Cell*, 141(1), pp. 69–80. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.027.

Sherbenou, D. W. and Druker, B. J. (2007) 'Applying the discovery of the Philadelphia chromosome', *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), pp. 2067–2074. doi: 10.1172/JCI31988.

Shi, H. *et al.* (2012) 'Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E) B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance', *Nature Communications*, 3(724). doi: 10.1038/ncomms1727.

Shi, Y. *et al.* (2005) 'Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade', *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), pp. 1533–1540. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0068.

Shi, Y. *et al.* (2005) 'Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor / insulin receptor substrate-1 / phosphatidylinositol 3-kinase cascade', 4(October), pp. 1533–1541. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0068.

Showkat, M., Beigh, M. A. and Andrabi, K. I. (2014) 'mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions', *Molecular Biology International*, 2014. Available at: <https://www.hindawi.com/archive/2014/686984/>.

Sidharthan, S. and Kottlil, S. (2013) 'Mechanisms of alcohol-induced hepatocellular carcinoma', *Hepatology International*, 8(2), pp. 452–457. doi: 10.1007/s12072-013-9494-4.

Singal, A. G. and El-Serag, H. B. (2015) 'Hepatocellular carcinoma from epidemiology to prevention: translating knowledge into practice', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(12), pp. 2140–2151. doi: 10.1016/j.cgh.2015.08.014.

Singh, A. K. *et al.* (2015) 'Tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: updates in concept, controversies and clinical relevance', *International Journal of Cancer*, 136(9), pp. 1991–2000. doi: 10.1002/ijc.28804.

Songyang, Z. *et al.* (1993) 'SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences', *Cell Press*, 72(5), pp. 767–778. doi: 10.1016/0092-8674(93)90404-E.

Stottrup, C. *et al.* (2016) 'Upregulation of AKT3 confers resistance to AKT inhibitor MK2206 in breast cancer', *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8), pp. 1964–1974.

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0748.

Subramaniam, S., Kelley, R. K. and Venook, A. P. (2013) 'A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems', *Chinese Clinical Oncology*, 2(4), p. 33. doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.05.

Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.

Sutermaster, B. A. and Darling, E. M. (2019) 'Considerations for high-yield, high-throughput cell enrichment: fluorescence versus magnetic sorting', *Scientific Reports*, 9(1), p. 227. doi: 10.1038/s41598-018-36698-1.

Tang, D. G. (2012) 'Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity', *Cell Research*, 22(3), pp. 457–472. doi: 10.1038/cr.2012.13.

Testino, G., Leone, S. and Borro, P. (2014) 'Alcohol and hepatocellular carcinoma: a review and a point of view', *World Journal of Gastroenterology*, 20(43), pp. 15943–15954. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15943.

Thermo Fisher Scientific (no date a) *Fluidics of a Flow Cytometer*. Available at: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/fluidics-flow-cytometer.html> (Accessed: 21 August 2021).

Thermo Fisher Scientific (no date b) *Optics of a Flow Cytometer*. Available at: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/optics-flow-cytometer.html> (Accessed: 21 August 2021).

Thomas, G. (2000) 'An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation', *Nature Cell Biology*, 2(5), pp. E71–E72. doi: 10.1038/35010581.

Thoreen, C. C. and Sabatini, D. M. (2009) 'Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely', *Autophagy*, 5(5), pp. 725–726. doi: 10.4161/auto.5.5.8504.

Thorpe, L. M., Yuzugullu, H. and Zhao, J. J. (2015) 'PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation, and therapeutic targeting', *Nature Reviews Cancer*, 15(1), pp. 7–24. doi: 10.1038/nrc3860.

Toker, A. and Marmiroli, S. (2014) 'Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease', *Advances in Biological Regulation*, 55, pp. 28–38. doi: 10.1016/j.jbior.2014.04.001.

Tomberli, B., Mattesini, A. and Baldereschi, G. I. (2018) 'A brief history of coronary artery stents', *Revista Española de Cardiología (English edition)*, 71(5), pp. 312–319. doi: 10.1016/j.rec.2017.11.022.

Tomlinson, M. J. *et al.* (2013) 'Cell separation: terminology and practical considerations', *Journal of Tissue Engineering*, 4. doi: 10.1177/2041731412472690.

Trzpis, M. *et al.* (2007) 'Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule', *The American Journal of Pathology*, 171(2), pp.

386–395. doi: 10.2353/ajpath.2007.070152.

Tung, J. W. *et al.* (2007) 'Modern flow cytometry: a practical approach', *Clinics in Laboratory Medicine*, 27(3), pp. 453–468. doi: 10.1016/j.cll.2007.05.001.

Tzatsos, A. (2009) 'Raptor binds the SAIN (Shc and IRS-1 NPXY binding) domain of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and regulates the phosphorylation of IRS-1 at Ser-636/639 by mTOR', *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), pp. 22525–22534. doi: 10.1074/jbc.M109.027748.

Vasudevan, K. M. and Garraway, L. A. (2010) 'AKT signaling in physiology and disease', *Curr Top Microbiol Immunol.*, 6(4), pp. 23–27. doi: 10.1007/82.

Venook, A. P. *et al.* (2010) 'The incidence and epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global and regional perspective', *The Oncologist*, 15(Suppl 4), pp. 5–13. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S4-05.

Vescovo, T. *et al.* (2016) 'Molecular mechanisms of hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma', *Clinical Microbiology and Infection*, 22(10), pp. 853–861. doi: 10.1016/j.cmi.2016.07.019.

Vézina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. N. (1975) 'Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle', *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 28(10), pp. 721–726. doi: 10.7164/antibiotics.28.721.

Vieira, J., Pinto da Silva, L. and Esteves, J. C. G. (2012) 'Advances in the knowledge of light emission by firefly luciferin and oxyluciferin', *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, 117, pp. 33–39. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.08.017.

Villanueva, A. *et al.* (2008) 'Pivotal role of mTOR signalling in hepatocellular carcinoma', *Gastroenterology*, 135(6), pp. 1972–1983. doi: 10.1053/j.gastro.2008.08.008.

Vogl, T. J. *et al.* (2007) 'Transarterielle chemoembolisation (TACE) des hepatozellulären Karzinoms: Technik, Indikationsstellung und Ergebnisse', *RöFo Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren*, 179(11), pp. 1113–1126. doi: 10.1055/s-2007-963285.

Wagener, C. and Müller, O. (2009) *Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. 3rd edn. Edited by C. Wagener and O. Müller. Stuttgart: Thieme.

Wagle, N. *et al.* (2011) 'Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling', *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), pp. 27–31. doi: 10.1200/JCO.2010.33.2312.

Wan, X. *et al.* (2007) 'Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism', *Oncogene*, 26(13), pp. 1932–1940. doi: 10.1038/sj.onc.1209990.

Wan, X. and Helman, L. J. (2003) 'Levels of PTEN protein modulate Akt phosphorylation on serine 473, but not on threonine 308, in IGF-II-overexpressing rhabdomyosarcomas cells', *Oncogene*, 22(50), pp. 8205–8211. doi: 10.1038/sj.onc.1206878.

- Wang, Q., Chen, X. and Hay, N. (2017) 'Akt as a target for cancer therapy: more is not always better (lessons from studies in mice)', *British Journal of Cancer*, 117(2), pp. 159–163. doi: 10.1038/bjc.2017.153.
- Wei, W. *et al.* (2005) 'The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase', *Cancer Cell*, 8(1), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.ccr.2005.06.005.
- Welcker, M. *et al.* (2003) 'Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation', *Molecular Cell*, 12(2), pp. 381–392. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00287-9.
- Wells, S. E. *et al.* (1998) 'Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors', *Molecular Cell*, 2(1), pp. 135–140. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80122-7.
- White, M. F. (2002) 'IRS proteins and the common path to diabetes', *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(3), pp. E413–E422. doi: 10.1152/ajpendo.00514.2001.
- Whittaker, S., Marais, R. and Zhu, A. X. (2010) 'The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma', *Oncogene*, 29(36), pp. 4989–5005. doi: 10.1038/onc.2010.236.
- Wilmanns, C. *et al.* (1992) 'Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil', *International Journal of Cancer*, 52(1), pp. 98–104. doi: 10.1002/ijc.2910520118.
- Wilson, G. S. *et al.* (2013) 'Efficacy of using cancer stem cell markers in isolating liver cancer stem cells', *Stem Cells and Development*, 22(19). doi: 10.1089/scd.2012.0703.
- Wool, I. G., Chan, Y. and Glück, A. (1995) 'Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins', *Biochemistry and Cell Biology*, 73(11–12), pp. 933–947. doi: 10.1139/o95-101.
- World Health Organization (2017) 'Global hepatitis report, 2017'. Edited by World Health Organization, pp. 1–83. Available at: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1082592/retrieve>.
- Wu, W. *et al.* (2010) 'Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition', *PLoS ONE*, 5(9), p. e12913. doi: 10.1371/journal.pone.0012913.
- Xia, P. and Xu, X.-Y. (2015) 'PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application', *American Journal of Cancer Research*, 5(5), pp. 1602–1609. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497429/>.
- Xie, J., Wang, X. and Proud, C. G. (2016) 'mTOR inhibitors in cancer therapy', *F1000Research*, 5(F1000 Faculty Rev), p. 2078. doi: 10.12688/f1000research.9207.1.
- Yamashita, T. *et al.* (2008) 'EpCAM and α -fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma', *Cancer Research*, 68(5), pp. 1451–1461. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6013.

- Yamashita, T. *et al.* (2009) 'EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features', *Gastroenterology*, 136(3), pp. 1012–1024. doi: 10.1053/j.gastro.2008.12.004.
- Yamashita, T. *et al.* (2013) 'Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 57(4), pp. 1484–1497. doi: 10.1002/hep.26168.
- Yamashita, T. and Kaneko, S. (2014) 'Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells', *Journal of Gastroenterology*, 49(7), pp. 1105–1110. doi: 10.1007/s00535-014-0951-1.
- Yang, G. *et al.* (2015) 'A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation', *Cell Reports*, 12(6), pp. 937–943. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.016.
- Yang, H. *et al.* (2003) 'The transformation suppressor Pcd4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation', *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), pp. 26–37. doi: 10.1128/mcb.23.1.26-37.2003.
- Yang, J. D., Ikuo, N. and Roberts, L. R. (2011) 'The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets', *Seminars in Cancer Biology*, 21(1), pp. 35–43. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.10.007.
- Yang, W. *et al.* (2008) 'Wnt/ β -catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells', *Cancer Research*, 68(11), pp. 4287–4295. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6691.
- Yang, Z. F., Ngai, P., *et al.* (2008) 'Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer', *Hepatology*, 47(3), pp. 919–928. doi: 10.1002/hep.22082.
- Yang, Z. F., Ho, D. W., *et al.* (2008) 'Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer', *Cancer Cell*, 13(2), pp. 153–166. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.013.
- Yao, X. *et al.* (2003) 'A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis', *Clinical Cancer Research*, 9(7), pp. 2719–2726. Available at: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/9/7/2719.full.pdf>.
- Yap, T. A. *et al.* (2011) 'First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors', *Journal of Clinical Oncology*, 29(35), pp. 4688–4695. doi: 10.1200/JCO.2011.35.5263.
- Ye, J. *et al.* (2014) 'The cancer stemcell niche: cross talk between cancer stemcells and their microenvironment', *Tumor Biology*, 35(5). doi: 10.1007/s13277-013-1561-x.
- Yeh, E. *et al.* (2004) 'A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells', *Nature Cell Biology*, 6(4), pp. 308–318. doi: 10.1038/ncb1110.
- Yip, C. K. *et al.* (2010) 'Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition', *Molecular Cell*, 38(5), pp. 768–774. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.017.

- Yoneyama, Y. *et al.* (2018) 'Serine phosphorylation by mTORC1 promotes IRS-1 degradation through SCF β -TRCP E3 ubiquitin ligase', *thec*, 5, pp. 1–18. doi: 10.1016/j.isci.2018.06.006.
- Yuan, H. and Guan, K. (2016) 'Structural insights of mTOR complex 1', *Cell Research*, 26(3), pp. 267–268. doi: 10.1038/cr.2016.10.
- Yun, J. (2010) 'Allosteric AKT inhibitors as a targeted cancer therapy', *Cancer Biology and Therapy*, 9(7), pp. 504–506. doi: 10.4161/cbt.9.7.11356.
- Zhang, D.-G. *et al.* (2014) 'Isolation, cultivation and identification of human lung adenocarcinoma stem cells', *Oncology Letters*, 9(1), pp. 47–54. doi: 10.3892/ol.2014.2639.
- Zhang, H. (2004) *Immunomagnetic cell separation: continued development of fundamental model of magnetophoretic mobility and further applications*. The Ohio State University.
- Zhang, H. *et al.* (2007) 'PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR', *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), pp. 730–738. doi: 10.1172/JCI28984.
- Zhang, J. *et al.* (2008) 'S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-alpha signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(51), pp. 35375–35382. doi: 10.1074/jbc.M806480200.
- Zhang, K. *et al.* (2018) 'CD90 promotes cell migration, viability and sphere-forming ability of hepatocellular carcinoma cells', *International Journal of Molecular Medicine*, 41(2), pp. 946–954. doi: 10.3892/ijmm.2017.3314.
- Zhao, G. J. *et al.* (2012) 'Establishment of an orthotopic transplantation tumor model of hepatocellular carcinoma in mice', *World Journal of Gastroenterology*, 18(47), pp. 7087–7092. doi: 10.3748/wjg.v18.i47.7087.
- Zhou, J. and Zhang, Y. (2008) 'Cancer stem cells: models, mechanisms and implications for improved treatment', *Cell Cycle*, 7(10), pp. 1360–1370. doi: 10.4161/cc.7.10.5953.
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B. and Qiao, L. (2014) 'Pathogenesis of liver cirrhosis', *World Journal of Gastroenterology*, 20(23), pp. 7312–7324. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7312.
- Zinn, K. R. *et al.* (2008) 'Noninvasive bioluminescence imaging in small animals', *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 49(1), pp. 103–115. doi: 10.1093/ilar.49.1.103.

8 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Geschätzte weltweite altersstandardisierte Inzidenzraten (ASIR) und Mortalitätsraten des primären Leberzellkrebses..... | 9 |
| Abbildung 2: Das BCLC staging-System für das HCC. | 15 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Modelle zur Erklärung der Tumorheterogenität..... | 20 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der AKT-Domänen und der Aktivierung von AKT..... | 29 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der mTOR-Domänenstruktur und der Komponenten des mTORC1 und mTORC2. | 32 |
| Abbildung 6: Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg..... | 35 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der verschiedenen AKT-Inhibitoren. | 39 |
| Abbildung 8: Versuchsaufbau und schematische Darstellung des Prinzips der magnetischen Zellseparation..... | 54 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der hydrodynamischen Fokussierung des Probenflusses und Aufbau des Durchflusszytometers. | 56 |
| Abbildung 10: Überlappung von Fluoreszenzspektren. | 57 |
| Abbildung 11: Prinzip des gatings anhand von dotplots und exemplarische Darstellung eines Histogramms..... | 58 |
| Abbildung 12: Western Blot-Analyse der Huh7-Luc-Zellen nach Inkubation mit RAD001 und MK-2206 <i>in vitro</i> | 69 |
| Abbildung 13: Effekt der kombinatorischen Therapie mit RAD001 und MK-2206 auf das orthotope Tumorwachstum im Verlauf an Tag 0, 7 und 14 nach Therapiebeginn. | 71 |
| Abbildung 14: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 73 |
| Abbildung 15: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 74 |
| Abbildung 16: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 75 |
| Abbildung 17: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 76 |
| Abbildung 18: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 77 |
| Abbildung 19: Western Blot-Analyse der explantierten Huh7-Luc-Maustumoren. | 78 |
| Abbildung 20: Korrelationen von drei verschiedenen Methoden für ein nicht-invasives Monitoring des Tumorwachstums im orthotopen Mausmodell. | 80 |
| Abbildung 21: Vergleich der volumetrischen Messmethoden. | 81 |
| Abbildung 22: Exemplarische dotplots und Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von EpCAM und CD90 durch Huh7-Luc- und SK-Hep-1-Zellen. | 84 |
| Abbildung 23: Exemplarische dotplots einer EpCAM-Anreicherung..... | 86 |
| Abbildung 24: Dotplots und Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung des Erhalts von EpCAM- und CD90-Molekülen nach Inkubation mit dem Tumor Dissociation Kit und gentleMACS Dissociator. | 88 |
| Abbildung 25: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM ⁺ -Zellen in Gewebeproben von zwei orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren vor und nach magnetischer Separation..... | 90 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 26: „Workflow“ für die Aufarbeitung der Patientenprobe zur orthotopen Injektion in die Maus..... | 91 |
| Abbildung 27: Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse der injizierten HCC-Zellen nach Färbung mit 7-AAD und Annexin V-FITC zur Bestimmung der Vitalität. | 92 |
| Abbildung 28: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -Zellen in der Patientenprobe ohne kombiniert mechanisch-enzymatische Aufarbeitung. ... | 93 |
| Abbildung 29: Dotplots zur Bestimmung des Anteils EpCAM ⁺ - und CD90 ⁺ -Zellen in der Patientenprobe mit kombiniert mechanisch-enzymatischer Aufarbeitung vor und nach magnetischer Separation..... | 94 |
| Abbildung 30: Vergleich des Adhärenzverhaltens der isolierten, nicht-angereicherten HCC-Zellen der primären Patientenprobe auf Kollagen und Kunststoff. | 96 |

9 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Globale Verteilung der Risikofaktoren für die Entstehung eines HCCs | 10 |
| Tabelle 2: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome. | 59 |
| Tabelle 3: Übersicht der durchflusszytometrischen Messwerte der Expression der Oberflächenmarker EpCAM ⁺ und CD90 ⁺ bei Huh7-Luc-Zellen und SK-Hep-1-Zellen im Passageverlauf. | 83 |
| Tabelle 4: Ergebnisse der EpCAM-Anreicherung..... | 85 |
| Tabelle 5: Ergebnisse der CD90-Anreicherung..... | 86 |
| Tabelle 6: Expression der Oberflächenmarker EpCAM auf Huh7-Luc-Zellen und CD90 auf SK-Hep-1-Zellen vor und nach kombiniert mechanisch-enzymatischer Behandlung. | 87 |
| Tabelle 7: Ergebnisse der EpCAM-Anreicherung aus Gewebeproben von zwei orthotopen Huh7-Luc-Xenograft-Maustumoren..... | 90 |
| Tabelle 8: FACS-Analyse zur Bestimmung der Reinheit der CD90 ⁺ - und EpCAM ⁺ -Aliquots jeweils vor und nach magnetischer Separation sowie mit und ohne kombiniert mechanisch-enzymatischer Aufarbeitung. | 94 |

10 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| 4E-BP | <i>eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i> |
| 4-HNE | 4-Hydroxynonena |
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin D |
| AACR | <i>American Association for Cancer Research</i> |
| ABC | <i>antigen binding capacity</i> |
| ABC | <i>ATP binding cassette</i> |
| ABL | Abelson |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym A |
| ACK 1 | <i>activated cdc42-associated kinase 1</i> |
| ADH | Alkoholdehydrogenase |
| AFB1 | Aflatoxin B1 |
| AFP | Alpha-Fetoprotein |
| AKT | <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i> |
| ALDH | Aldehyddehydrogenase |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-aktivierte Kinase |
| AP-1 | Aktivator Protein-1 |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ASH | alkoholische Steatohepatitis (<i>alcoholic steatohepatitis</i>) |
| ASIR | altersstandardisierte Inzidenzrate |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAD | <i>BCL-2-antagonist of cell death</i> |
| BAX | <i>BCL-2-associated X protein</i> |
| BCL | <i>B-cell lymphoma</i> |
| BCLC | <i>Barcelona Clinic Liver Cancer</i> |
| BCL-xL | <i>BCL-extra-Large</i> |
| BCR | <i>breakpoint cluster region</i> |
| BIM | <i>BCL-like protein 21</i> |
| BLI | <i>biolumineszenz imaging</i> |
| BP | <i>bandpass</i> |
| BRAF | <i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i> |
| BSA | bovines Serum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| CAM | <i>cell adhesion molecule</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| CDK | cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>) |
| CFE | <i>colony forming efficiency</i> |
| c-Jun | <i>cellular Jun</i> |
| c-Kit | Tyrosinkinase Kit |
| CML | chronisch myeloische Leukämie |
| c-Myc | <i>cellular myelocytomatosis</i> |
| CNI | Calcineurininhibitor |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CREB | <i>cAMP responsive element binding</i> |
| C-Terminus | Carboxylterminus (COOH) |
| ddH ₂ O | doppelt deionisiertes Wasser |

| | |
|---------------|---|
| Deptor | <i>death domain-containing mTOR-interacting protein</i> |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DN | dystplastischer Knoten (<i>dysplastic nodule</i>) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNA-PK | <i>DNA-dependent protein kinase</i> |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescence</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| eIF | <i>eukaryotic translation initiation factor</i> |
| EMA | Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>European Medicines Agency</i>) |
| EMT | epithelial-mesenchymale Transition |
| EpCAM | <i>epithelial cell adhesion molecule</i> |
| EpEX | <i>EpCAM extracellular domain</i> |
| EpICD | <i>EpCAM intrazellular domain</i> |
| ERK | <i>extracellular signal-regulated kinase</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FasL | <i>Fas-ligand</i> |
| FCS | fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FFA | freie Fettsäure (<i>free fatty acid</i>) |
| FHL2 | <i>four and a half LIM domain protein</i> |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| FKBP12 | <i>FK506-binding protein 12</i> |
| FoX | <i>forkhead box</i> |
| FSC | <i>forward scatter</i> |
| GAP | GTPase aktivierendes Protein |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| GLOBOCAN | <i>Global Organization Board of Cancer Association Network</i> |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>) |
| GPI | Glykophosphatidylinositol |
| GS | Glykogensynthese |
| GSK3 | Glykogensynthese-Kinase 3 |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| hAFP | humanes AFP |
| HBcAg | <i>HB core antigen</i> |
| HBeAg | <i>HB extracellular antigen</i> |
| HBsAg | <i>HB surface antigen</i> |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HCC | hepatozelluläres Karzinom |
| HCV | Hepatitis C-Virus |
| HDV | Hepatitis D-Virus |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HER2 | epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2 |
| HGDN | <i>high-grade DN</i> |
| Hh | <i>hedgehog</i> |
| HIF1 α | Hypoxie induzierter Faktor 1 α |
| HM | hydrophobes Motiv |
| HR | Hormonrezeptor |
| HSC70 | <i>heat shock cognate protein 70</i> |

| | |
|--------------------|--|
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| ICC | intrahepatisches Karzinom |
| ICGN | <i>International Corporate Governance Network</i> |
| Ig | Immunglobulin |
| IGF | <i>insulin like growth factor</i> |
| IGF-IR | <i>insulin-like growth factor receptor</i> |
| IKK ϵ | <i>I-kappa-B-kinase epsilon</i> |
| IL-2 | Interleukin-2 |
| INR | <i>International Normalized Ratio</i> |
| IQR | <i>interquartile range</i> |
| IR | Insulinrezeptor |
| IRS | Insulinrezeptorsubstrat |
| JAK | Januskinase |
| KD | Kinase-Domäne |
| kDa | kiloDalton |
| Lef-1 | <i>lymphoid enhancer factor 1</i> |
| LGDN | <i>low-grade DN</i> |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | <i>magnetic activated cell sorting</i> |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein kinase</i> |
| MAPKAPK3 | <i>MAPK activated protein kinase 3</i> |
| MCL-1 | <i>myeloid cell leukemia-1</i> |
| MDM2 | <i>mouse double minute 2</i> |
| MEK | MAPK/ERK-Kinase |
| MELD | <i>Model for endstage liver disease</i> |
| MEOS | mikrosomales Ethanol-oxidierendes System |
| min | Minute |
| mLST8 | <i>mammalian lethal with SEC13 protein 8</i> |
| mRNA | messenger RNA |
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| mTORC | <i>mammalian target of rapamycin complex</i> |
| MWA | Mikrowellenablation |
| n | Anzahl |
| NAD ⁺ | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert) |
| NADH | Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert) |
| NAFLD | nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (<i>nonalcoholic fatty liver disease</i>) |
| NASH | nicht-alkoholische Fettleberhepatitis (<i>nonalcoholic steatohepatitis</i>) |
| NLS | <i>nuclear localisation sequence</i> |
| NOD | <i>non-obese diabetic</i> |
| NP40 | Nonidet P40 |
| NS | Nicht-Strukturprotein |
| NSG | NOD scid gamma |
| N-Terminus | Amino-Terminus (NH ₂) |
| O ₂ | Sauerstoff |
| p | Photonen |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| p70 ^{S6K} | <i>p70 ribosomal protein S6-kinase</i> |
| PABP | <i>poly-A binding protein</i> |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>) |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>) |

| | |
|-----------------------|---|
| PDCD4 | <i>programmed cell death protein 4</i> |
| PDGF | <i>platelet-derived growth factor</i> |
| PDK1 | <i>Phosphoinositid-dependent-Kinase 1</i> |
| PD-L1 | <i>programmed death-ligand 1</i> |
| PE | Phycoerythrin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PH | Pleckstrin-Homologie |
| PHLPP | <i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase</i> |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PIKK | <i>PI3K-kinase-related kinase</i> |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PI(3,4)P ₂ | Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat |
| PIP ₃ | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat |
| PKB | Proteinkinase B |
| PP2A | Proteinphosphatase 2A |
| PPI | Protein-Protein-Interaktion |
| PRAS40 | <i>proline rich AKT/PKB substrat 40 kDA</i> |
| Protor | <i>protein observed with Rictor</i> |
| PS | Phosphatidylserin |
| PTEN | <i>phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome</i> |
| PTK 6 | Protein-Tyrosinkinase 6 |
| R | Korrelationskoeffizient nach Pearson |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| RAF | <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> |
| Rag | <i>recombination activating gene</i> |
| Raptor | <i>regulatory associated protein of mTOR</i> |
| Ras | <i>rat sarcoma</i> |
| RD | regulatorische Domäne |
| REDD1 | <i>regulated in development and DNA damage response 1</i> |
| RFA | Radiofrequenzablation |
| RGB | rot, grün, blau |
| Rheb | <i>Ras-homolog-enriched-in-brain</i> |
| Rictor | <i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROI | <i>region of interest</i> |
| ROS | reaktive O ₂ -Spezies |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| rpS6 | <i>ribosomal protein S6</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptortyrosinkinase |
| SCID | <i>severe combined immunodeficiency</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| sec | Sekunde |
| SEM | <i>standard error of the mean</i> |
| SH2 | <i>src-homology 2</i> |
| SHARP | <i>Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol</i> |
| SHIP | <i>SH2 domain-containing inositol-5-phosphatase</i> |
| SIN1 | <i>stress-activated protein kinase-interacting 1</i> |
| sp | <i>side population</i> |
| sr | <i>sterdian</i> |

| | |
|---------------------|--|
| src | <i>sarcoma</i> |
| SSC | <i>side scatter</i> |
| STAT | <i>signal transducers and activators of transcription</i> |
| TACE | transarterielle Chemoembolisation |
| TAZ | <i>transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i> |
| TBK 1 | <i>TANK-binding kinase 1</i> |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| TIPS | transjugulärer intrahepatischer portosystemischer shunt |
| TME | Tumormikromilieu |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TNM | <i>tumor, node, metastasis</i> |
| TOP | <i>terminal oligopyrimidine</i> |
| TOS | <i>TOR signaling</i> |
| TRADD | <i>TNF-receptor-associated death domain protein</i> |
| TRAIL | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TSC | <i>tuberous sclerosis complex</i> |
| TSZ | Tumorstammzelle |
| UICC | <i>Union International Contre le Cancer</i> |
| UTR | <i>untranslated region</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VLDL | <i>very low density lipoprotein</i> |
| WNT | <i>wingless and Int-1</i> |
| YAP | <i>yes-associated protein</i> |

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2018 bis August 2022 am Institut für Biochemie und Signaltransduktion am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir beim Gelingen meiner Dissertation behilflich waren.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Jücker, denn er hat mir diese Dissertation ermöglicht. Ich hatte großes Glück von ihm betreut zu werden. Er war jederzeit für offene Fragen ansprechbar, gab mir wertvolle Anregungen und Hilfestellungen und hat meiner Arbeit dabei stets viel Interesse entgegengebracht.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Sabine Windhorst für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank geht auch an PD Dr. med. Jun Li (Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, UKE Hamburg) und Dr. Mohamed Moustafa (Zentrum für Experimentelle Medizin und Institut für Biochemie und Signaltransduktion, UKE Hamburg) für die Durchführung der Tierexperimente sowie an alle weiteren daran beteiligten technischen MitarbeiterInnen, darunter besonders Frau Sabrina Christiansen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Michael Horn-Glander für die Durchführung der *in vivo*-Biolumineszenzmessungen sowie bei Dr. Stefan Horn (Zentrum für Onkologie und Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE Hamburg) für die Bereitstellung der Huh7-Luc-Zellen.

Ich bedanke mich bei allen anderen DoktorantInnen, PraktikantInnen und MitarbeiterInnen des Labors für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein ganz besonderer Dank geht dabei an Carina Schröder und Carolin Tatschl für die Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots und an Nina Nelson für ihre wertvollen Tipps.

Vielen Dank auch an Monika für das Korrekturlesen, an Hanna für die Hilfe bei der Übersetzung und an meinen Bruder Lenny für die Unterstützung bei der Formatierung. Ich danke Patti, denn er hat meine ein oder andere Laune während der Anfertigung dieser Arbeit geduldig ertragen und liebevoll aufgefangen.

Herzlichen Dank an Kej und Hans. Sie haben mich schlussendlich dazu ermutigt die Arbeit einzureichen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen lieben Eltern für ihre wunderbare und unermüdliche Stütze bedanken. Ohne sie hätte ich meinen teilweise recht „holprigen“ Weg bis hierher nicht meistern können!

12 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: