

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie  
Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

## **PI3K-Inhibition im Pankreaskarzinommodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Thomas Körtl

2018



Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie  
Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

## **PI3K-Inhibition im Pankreaskarzinommodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Thomas Körtl

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Sven A. Lang
2. Berichterstatter:	PD Dr. Michael Haimerl
Tag der mündlichen Prüfung:	08.11.2018

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom .....	5
1.1.1	Epidemiologie .....	5
1.1.2	Diagnose und Therapie .....	5
1.2	<i>Kras</i> und <i>p53</i> im Pankreaskarzinom.....	6
1.3	Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg.....	7
1.3.1	Bedeutung von PI3K bei der Tumorangio-genese .....	8
1.3.2	Bedeutung von PI3K bei der Metastasierung .....	8
1.3.3	PI3K im humanen Pankreaskarzinom .....	8
1.4	Der PI3K Inhibitor BKM120 .....	10
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
3.2	Puffer, Lösungen und Gele.....	14
3.3	Zellkultur.....	16
3.4	Zellzahlbestimmung.....	17
3.5	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)- Assay.....	18
3.6	Zelltod-Assay.....	18
3.7	Migrationsassay.....	18
3.8	Western Blotting .....	19
3.9	Real-time PCR.....	20
3.10	Statistik.....	21
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
4.1	Auswirkung der PI3K Inhibition mit BKM120 auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i> .....	22
4.1.1	Auswirkung auf das Wachstum im MTT-Assay .....	22

---

4.1.2	Auswirkung auf das Wachstum im Zelltod-Assay .....	26
4.2	Einfluss der PI3K Inhibition mit BKM120 auf die Motilität von Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i> .....	29
4.3	Modulation intrazellulärer Signalwege durch PI3K Inhibition <i>in vitro</i> .....	30
4.4	Einfluss der PI3K Inhibition mit BKM120 auf die Expression von Transkriptionsfaktoren .....	34
4.5	Effekt der PI3K Blockade mit BKM120 auf die Expression angiogener und Resistenz-relevanter Faktoren in Pankreaskarzinomzelllinien .....	37
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>64</b>
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>65</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom gehört zur Gruppe der gastrointestinalen Tumore, an dem in den USA pro Jahr ungefähr 43.290 Personen neu erkranken. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 6% gehört das Pankreaskarzinom, das inzwischen die vierthäufigste krebbedingte Todesursache darstellt, zu den gefährlichsten Tumorerkrankungen (1). In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren. Beide Geschlechter haben ein Lebenszeitrisiko von 1,6%, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (2).

### 1.1.2 Diagnose und Therapie

Ein Problem bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist der Zeitpunkt der Diagnose. Aufgrund oftmals unspezifischer Frühsymptome, zu denen Gewichtsverlust, Schmerz, Anorexie, Ikterus und Asthenie zählen, erfolgt die Diagnosestellung meist erst in einem fortgeschrittenem Tumorstadium (3). Die Diagnose wird unter Einbeziehung bildgebender und interventioneller Verfahren, wie Abdominalsonographie, Computertomographie (CT), Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie (MRCP), endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikografie (ERCP) und Endosonographie gestellt (4), (5), (6), (7) . Das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA 19-9) als Tumormarker der Wahl sollte aufgrund seiner eingeschränkten Sensitivität und Spezifität nur in Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren zum Einsatz kommen und kann beispielsweise auch unspezifisch aufgrund einer Cholestase erhöht sein (8). Trotz allem kann CA 19-9 zur Kontrolle des Therapieerfolgs bzw. Nachsorge nach einer kurativ intendierten Pankreasresektion eingesetzt werden.

Die einzige kurative Therapieoption beim Pankreaskarzinom ist die chirurgische Resektion, für die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung allerdings nur 15-20% der Patienten infrage kommen (9). Je nach Lage des Tumors existieren verschiedene Resektionsverfahren, die sich hinsichtlich des Resektionsausmaßes unterscheiden.

Bei resektablen Pankreaskopfkarzinomen kommt entweder die klassische partielle Duodenopankreatektomie (OP nach Kausch-Whipple) oder die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie zum Einsatz, wobei sich beide Verfahren in Bezug auf die Überlebensdauer der Patienten nicht unterscheiden (10). Tumore, die sich im Pankreaskorpus oder im Pankreasschwanz befinden, werden mittels Pankreaslinksresektion mit en-bloc Splenektomie oder totaler Duodenopankreatektomie behandelt (11), (12). Ziel der Operation ist die komplette (R0) Resektion des Tumors. Das mediane Überleben nach kurativ intendierter Resektion eines Pankreaskarzinoms liegt, abhängig vom Tumorstadium, zwischen 10 und 20 Monaten (13). Postoperativ stehen für die adjuvante/additive Chemotherapie Gemcitabine oder 5-Fluorouracil zur Verfügung. Zwar zeigen beide Medikamente hinsichtlich ihres Überlebensvorteils ähnliche Ergebnisse, jedoch kommt es unter Gemcitabine-Therapie zu weniger behandlungsbezogenen Arzneimittelnebenwirkungen (14), (15). Bei metastasiertem/fortgeschrittenem Pankreaskarzinom kann durch FOLFIRINOX (Kombination aus Oxaliplatin, Irinotecan, Leucovorin und Fluorouracil) oder nab-Paclitaxel in Kombination mit Gemcitabine eine Verbesserung der Prognose oftmals jedoch unter Inkaufnahme massiver Nebenwirkungen erreicht werden (16), (17).

## 1.2 *Kras* und *p53* im Pankreaskarzinom

Ein Ansatz zur Entwicklung neuer Therapiestrategien sind Kenntnisse über das genetische Profil von Tumoren. Für das duktales Adenokarzinom des Pankreas wurden Mutationen in verschiedenen Tumorsuppressor- und Onkogenen beschrieben. Besonders häufig konnten Mutationen des *kras* Onkogens sowie des *p53* Tumorsuppressorgens beobachtet werden (18), (19). *Kras* Mutationen finden sich bei ca. 90% aller duktales Adenokarzinom des Pankreas, wohingegen *p53* Mutationen zu ca. 75% auftreten (20). Während durch Mutation von *kras* Mechanismen wie beispielsweise Zellproliferation und Invasion verstärkt werden, können *p53* Mutationen zu Störungen der Zellteilung und des Zellzyklus führen (21), (22). Im Mehrschritt-Karzinogenese-Modell tragen sowohl mutierte Onkogene als auch mutierte Tumorsuppressorgene zur Entstehung von Karzinomen aus präneoplastischen intraepithelialen Neoplasien des Pankreas bei (23), (24). Diese intraepithelialen Neoplasien können in drei Stadien unterteilt werden. Mutationen im für *kras*

kodierenden Gen gehören zu den frühesten genetischen Veränderungen, während Mutationen von *p53* erst bei fortgeschrittenen intraepithelialen Neoplasien auftreten (25).

### 1.3 Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg

Die Phosphoinositid-3-Kinasen gehören zur Familie der Lipidkinasen und nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation von zellulären Prozessen wie Proliferation, Überleben oder Motilität ein (26). Zudem wird der PI3K Signalweg mit tumorassoziierten Charakteristika, wie beispielsweise Metastasierung und Angiogenese assoziiert. Durch Aktivierung von PI3K werden verschiedene nachgeschaltete Signalwege („downstream“ Signalwege), wie AKT und „mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) aktiviert, die wiederum zu Tumorwachstum und –progression beitragen können (27), (28).

Die acht PI3K Isoformen werden in drei Klassen eingeteilt. Insbesondere die PI3 Kinasen der Klasse I, deren Aufgabe die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP3) ist, werden mit Malignomen assoziiert (29). Die PI3 Kinasen der Klasse IA bestehen aus einer katalytischen Untereinheit p110 und einer regulatorischen Untereinheit p85 und werden durch Rezeptortyrosinkinasen aktiviert. In Zellen, die sich nicht teilen, bindet p85 an p110, wodurch dessen Kinaseaktivität gehemmt wird. Aufgrund von Mutationen kann die Hemmung von p110 durch p85 aufgehoben werden, wodurch die Untereinheiten eine onkogene Wirkung entfalten können. Die PI3 Kinasen der Klasse IB sind ebenfalls aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Diese werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Im Unterschied zu den Klasse IA PI3 Kinasen wird die regulatorische Untereinheit der Klasse IB PI3 Kinasen durch p101 gebildet (30), (31).

Die PI3 Kinasen der Klasse II bestehen aus drei Isoformen und sind von allen drei Klassen die am wenigsten erforschten. Es wird angenommen, dass diese die Funktion der Klasse I PI3 Kinasen ergänzen und zudem an pathologischen Prozessen beteiligt sind (32).

Die einzig bekannte PI3 Kinase der Klasse III, Vps34, spielt eine wichtige Rolle bei der Autophagozytose. Diesem Mechanismus wird eine Beteiligung bei der Entstehung von Krankheiten zugeschrieben (33).

### **1.3.1 Bedeutung von PI3K bei der Tumorangiogenese**

Ein entscheidendes Element für das Wachstum und die Invasivität von Malignomen ist die Gefäßneubildung, d.h. Angiogenese. Angiogenese dient dazu, die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen und ein weiteres Wachstum zu ermöglichen. Dabei können zum Beispiel von Tumorzellen pro-angiogene Faktoren wie „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) sezerniert werden, die wiederum die Gefäßneubildung vorantreiben. Bei der Regulation der Angiogenese ist unter anderem auch der PI3K Signalweg beteiligt. Durch Aktivierung von PI3K kann die Sekretion von VEGF in entarteten Zellen erhöht werden. Zudem ist der PI3K Signalweg an der Regulation der Expression von „hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ “ (HIF-1 $\alpha$ ) beteiligt. HIF-1 $\alpha$  wiederum ist eine der Hauptregulationsinstanzen der VEGF Sekretion und damit einer der wichtigsten Faktor bei der Initiierung der Tumorneoangiogenese (34), (35), (36).

### **1.3.2 Bedeutung von PI3K bei der Metastasierung**

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum von Tumorerkrankungen ist die Metastasierung. Der PI3K Signalweges kann auch hier progressiv einwirken. Dabei wird unter anderem die Zytokin-induzierte Produktion von Matrix-Metalloproteasen (MMP), einer Gruppe von Enzymen, die Proteine der Extrazellulärmatrix abbauen und es damit Tumorzellen ermöglichen, die physische Barriere von Tumoren zu überwinden, beeinflusst. Außerdem fördert die intrinsische PI3K Aktivierung in Tumorzellen den Prozess, der dafür verantwortlich ist, die Zellen von ihrer Adhäsion an die Extrazellulärmatrix zu lösen und somit deren Ausbreitung weiter voranzutreiben (35), (36).

### **1.3.3 PI3K im humanen Pankreaskarzinom**

Bei Wachstum und Progression eines Pankreaskarzinoms ist der PI3K Signalweg ebenfalls von Bedeutung. Neuere Studien konnten unter anderem zeigen, dass die Isoform p110 $\gamma$  der PI3K Klasse IB, die für Tumorzellproliferation aufgrund einer

erhöhten AKT Phosphorylierung in Pankreaskarzinomzelllinien verantwortlich ist, eine wichtige Rolle in der Karzinogenese einnimmt (37). Zudem wurde im Pankreaskarzinom eine Überexpression verschiedener Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Liganden (z.B. „insulin-like growth factor-I receptor“ (IGF-I/IGF-IR), „epidermal growth factor receptor“ (EGF/EGFR)) beschrieben, die den PI3K Signalweg aktivieren können. Die Aktivierung des Signalwegs wiederum führt zu einer Phosphorylierung nachgeschalteter Signalkaskaden, wie MAPK („mitogen-activated protein kinase“)/ERK („extracellular-signal regulated kinase“) oder AKT/mTOR, die zum Teil PI3K vermittelt sind. Dabei kann zum Beispiel AKT durch „mammalian Target of Rapamycin Complex 2“ (mTORC2) aktiviert werden und so das Tumorzellwachstum stimulieren und somit zur Tumorprogression beitragen (38).

Neben dem Tumorzellwachstum ist der PI3K Signalweg bei verschiedenen anderen onkogenen Vorgängen, die im Pankreaskarzinom eine Rolle spielen, beteiligt. Beispielsweise kann eine Regulation des Tumormetabolismus durch PI3K Aktivierung erfolgen. Beschrieben wurde unter anderem eine Überexpression des Glucosetransporters GLUT1, was wiederum zu einer Erhöhung der Glucoseaufnahme in die Zelle führt und damit zum Tumorwachstum beitragen kann (39).

Ein Problem bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist die Zytostatikaresistenz gegenüber herkömmlichen Medikamenten, die heute Therapiestandard sind. Bisher wurden bereits einige Faktoren identifiziert, die für die intrinsische oder erworbene Zytostatikaresistenz verantwortlich sind. Dazu gehört unter anderem der PI3K Signalweg, der Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Angiogenese beeinflussen kann. So ist zum Beispiel Gemcitabine aufgrund seiner Hydrophilie auf bestimmte Transporter angewiesen, um die lipophile Zellmembran zu passieren. Deren verminderte Expression in manchen Pankreaskarzinomzellen korreliert direkt mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Gemcitabine. Durch eine kombinierte Gabe von Gemcitabine mit PI3K Inhibitoren kann die von Gemcitabine ausgelöste Apoptose bei Zellen mit einer Resistenz gegenüber Gemcitabine verstärkt werden (38), (40).

#### 1.4 Der PI3K Inhibitor BKM120

BKM120 ist ein 2,6-Dimorpholino Pyrimidinderivat, welches die drei katalytisch aktiven PI3K Isoformen der Klasse I (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , und p110 $\gamma$ ) blockieren kann und in klinischen Versuchen als neuer Wirkstoff in der Krebstherapie zum Einsatz kommt. Es wirkt dabei in Tumorzellen antiproliferativ und proapoptotisch. Außerdem zeigt BKM120 eine gute orale Bioverfügbarkeit im Tiermodell. Seine spezifische Aktivität, die in zellulären Untersuchungen festgestellt wurde, lässt sich gut auf *in vivo* Modelle von Tumoren übertragen, bei denen sich eine signifikante Abnahme der Tumorprogression gezeigt hat (41), (42).

Neben den Klasse I PI3K Pan-Inhibitoren wie BKM120 befinden sich zurzeit noch zwei andere Klassen von PI3K Inhibitoren in der klinischen Testphase: duale Klasse I PI3K Pan-/mTOR-Inhibitoren sowie Isoform-selektive PI3K Inhibitoren (43).

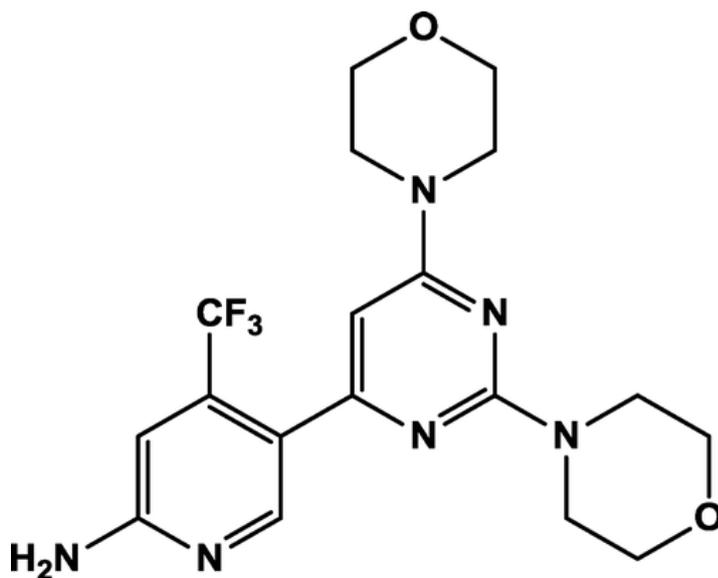


Abb. 1: Chemische Struktur von BKM120 (44)

## **2 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der Arbeit lag in der Bestimmung der Effektivität einer PI3K Inhibition mit BKM120 in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Mutationsmuster (*p53*, *kras*).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Blotting System Mini Protean 3	Bio-Rad, Hercules, USA
Boyden Kammer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einmal-Küvetten 1,5ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Entwickler M35 X-OMAT Processor	Kodak, Rochester, USA
Eppendorf Gefäße (1,5ml)	Corning, Corning, USA
Falkonröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Farbset Diff-Quick	Medion Diagnostics, Miami, USA
Filme Fuji Medical X-Ray	Fujifilm, Minato, Japan
Gefahrenstoffschränk FWF 90	Düperthal, Karlstein, Deutschland
Gewebekulturplatten:	
96-well Cell Culture Cluster Flat Bottom	Corning, Corning, USA
BioCoat Control Inserts 8-well-Platte 8.0µm	Corning, Corning, USA
LightCycler 480 System	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke, Staufen im Breisgau

Mehrkanalpipette	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Lichtmikroskop DMIL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Petrischalen (100mmx20mm)	Corning, Corning, USA
Photometer:	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer Emax	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Pipetten (0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenakku pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen:	
10µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
200µl	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
1000µl	Corning, Corning, USA
Kapillarspitzen für Western Blot	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Röntgenkassette	Rego X-Ray, Augsburg, Deutschland
Schüttelapparate:	
Schüttelapparat 3017	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttelapparat KL2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Spannungsquelle PowerPac 200/300	Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilbank	Clean Air, Woerden, Niederlande
Stickstofftank Espace 661	Air Liquide, Paris, Frankreich

Stripetten	nerbe plus, Winsen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer:	
Vortexer Reax Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortexer Topmix 1118	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage Kern 434	Kern & Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad SW-20C	Julabo, Seelbach, Deutschland
Wattestäbchen	Consumer Medical Care, Sontheim an der Brenz, Deutschland
Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup> )	Corning, Corning, USA
Zentrifugen:	
Gekühlte Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Whatmanpapier	Whatman International, Maidstone, Großbritannien
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad, Hercules, USA

**Tab. 1:** Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

### 3.2 Puffer, Lösungen und Gele

Für die Herstellung der Puffer, Lösungen und Gele wurden Chemikalien von Bio-Rad (Hercules, USA), Sigma- Aldrich (St. Louis, USA) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Bezeichnung	Ansatz
10%-Laufgel	3,6 ml Aqua dest.
	3 ml 30% Acrylamide
	2,25 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8)
	90µl 10% SDS
	60µl 10% APS
	20µl TEMED
5%-Sammelgel	2,06 ml Aqua dest.
	500 µl 30% Acrylamide
	380 µl 0,5 M TRIS (pH 6,8)
	32 µl 10% SDS
	32 µl 10% APS
	6 µl TEMED
8%-Laufgel	4,2 ml Aqua dest
	2,4 ml 30% Acrylamide
	2,2 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8)
	90 µl 10% SDS
	44 µl 10% APS
	8 µl TEMED
Laemmli Puffer	950 µl Laemmli Puffer
	50 µl 2-Mercaptoethanol
Lysepuffer	795 µl RIPA-B-Puffer
	100 µl Proteininhibitor 10x
	100 µl 20 mM PMSF
	5 µl 0,1M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>

MTT-Lösung	125 mg	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
	50 ml	PBS
PCR-Puffer (Ansatz pro Petrischale)	350 µl	RA1-Lösung
	3,5 µl	β-Mercaptoethanol
RIPA-B-Puffer	5 ml	Triton X-100
	15 ml	5 M NaCl
	5 ml	0,5 M EDTA
	50 ml	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	Auf 500 ml mit Aqua dest auffüllen	

**Tab. 2:** Übersicht der verwendeten Puffer, Lösungen und Gele

### 3.3 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) bei einer Temperatur von 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5% inkubiert. Das Zellkulturmedium für die HPAF-II, L3.6pl und MiaPaCa2 Zelllinien setzte sich aus 500 ml „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) (PAA Laboratories, Lienz, Österreich) angereichert mit 75 ml fetalem Kälberserum (FCS – „fetal calf serum“) (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 ml L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 5 ml Antibiotika/Antimykotika (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 5 ml Vitamine (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zusammen (15% DMEM Medium). Für Capan2 und Panc02 wurde 500 ml „Roswell Park Memorial Institute medium 1640“ (RPMI 1640) (PAA Laboratories, Lienz, Österreich) (ohne L-Glutamin) mit 50 ml FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Antibiotika/Antimykotika und 5 ml Vitamine, für die BxPC3 500 ml RPMI 1640 (mit L-Glutamin, mit 25 nM HEPES) (PAA Laboratories, Lienz, Österreich) mit 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Antibiotika/Antimykotika und 5 ml Vitamine verwendet. Zum Schutz der Zellen vor Kontamination wurden sterile Arbeiten unter der Sterilbank durchgeführt. Der für die Experimente verwendete PI3K Inhibitor BKM120 (Novartis Oncology, Basel, Schweiz)

wurde in Zellkulturmedium verdünnt. Eine Übersicht der verwendeten Zelllinien zeigt Tabelle 3 (Tab. 3).

Zelllinie	Mutationsmuster <i>kras</i>	Mutationsmuster <i>p53</i>	Herkunft
BxPC3	WT	Y220C	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
Capan2	G12V	WT	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
HPAF-II	G12D	P151S	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
Panc02	WT	WT	Prof. V. Schmitz (Universität Bonn, Deutschland)
L3.6pl	mut	WT	Dr. I. J. Fidler (Universität Texas M.D. Anderson Cancer Center, USA)
MiaPaCa2	G12C	R248W	American Type Culture Collection (Manassas, USA)

**Tab. 3:** Übersicht der Mutationsmuster von *kras* und *p53* in Pankreaskarzinomzelllinien (45), (46), (47) und deren Herkunft

### 3.4 Zellzahlbestimmung

Damit die Versuche unter gleichen Bedingungen ausgeführt werden konnten, wurde vor Beginn der Experimente die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden 20 µl aus der bei der Passagierung entstandenen Zellsuspension und 20 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) vermischt und in eine Zählkammer gegeben. Anschließend wurden zwei gegenüberliegende Quadrate der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel errechnet:

(Anzahl der lebenden Zellen in Quadrat 1 + Anzahl der lebenden Zellen in Quadrat 2)  $\times 10^4$  = Zellzahl in Millionen

### **3.5 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) -Assay**

Zum Nachweis der Toxizität von BKM120 auf die Tumorzellen wurde der MTT-Assay durchgeführt. Dabei wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid durch lebende Zellen mitochondrial metabolisiert, wodurch sich dunkelblau-violette Formazan-Kristalle bilden.

Es wurden in einer 96 well-Platte 2000 Zellen pro Vertiefung in einem Volumen von 200 µl ausplattiert und jeweils ein Ansatz in Vollmedium (VM; 10-15% FCS) und ein Ansatz in serumreduziertem Medium (SRM; 1% FCS) vorbereitet. Die Platten wurden mit BKM120 in den Konzentrationen 0, 1, 10, 100, 250, 500, 1000 und 10000 nM behandelt, wobei für jede Konzentration acht Proben angesetzt und diese für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert wurden. Nach Hinzugabe der MTT-Lösung und Dimethylsulfoxids (DMSO) (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde die Absorption des gebildeten Formazans am Photometer bei einer Wellenlänge von 590 nm bestimmt.

Um eine bessere Aussagekraft zu erreichen, wurden für die Versuche in VM die IC<sub>50</sub> Werte, also die benötigte BKM 120 Konzentration, bei der das Zellwachstum um 50% inhibiert wird, bestimmt.

### **3.6 Zelltod-Assay**

Zur Untersuchung des Wachstums der Tumorzellen unter Einfluss von BKM120 wurden Zelltod-Assays durchgeführt. In kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) wurden jeweils 0,1 Millionen Zellen ausplattiert und BKM120 in einer Dosierung von 0, 250, 500 und 1000 nM hinzugegeben. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Ansätze mit PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) gewaschen, abtrypsiniert und mit Medium nachgespült. Anschließend wurden die Suspensionen in Flacon Tubes zentrifugiert und die Anzahl der lebenden und toten Zellen mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden alle vier Felder der Zählkammer ausgezählt.

### **3.7 Migrationsassay**

Um den Einfluss von BKM120 auf die Zellmotilität festzustellen, wurden Migrationsassays in Boyden Kammern verwendet.

In die Einsätze einer 8 Well-Platte wurden jeweils 50000 Zellen in VM bzw. in SRM pipettiert und diese in die Vertiefungen, in denen sich die Behandlung befand, eingesetzt. BKM120 wurde in einer Dosierung von 250 nM verwendet. Die Ansätze wurden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Membranen auf Objektträgern fixiert. Um die Anzahl der migrierten Zellen bestimmen zu können, wurden am Mikroskop pro Membran vier Bilder angefertigt und diese mit Hilfe von ImageJ (Version 1.48) ausgewertet.

### **3.8 Western Blotting**

Western Blotting bezeichnet eine Methode, mit der Proteine mittels Antikörper nachgewiesen werden können. Zunächst erfolgt durch die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, anschließend werden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Um die Proteine für die Versuche zu gewinnen, wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Millionen Zellen pro Petrischale ausplattiert und nach Behandlung mit 500 nM BKM120 durch Zugabe von 40 µl Lysepuffer geerntet. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert und der Überstand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der Bradford-Methode am BioPhotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Im Anschluss wurde zu einer bestimmten Menge an Protein Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) hinzugefügt und die Gele mit den Proben beladen. Nach der Aufteilung der Proteine hinsichtlich ihrer Größe wurden die Proben geblottet und die Membranen blockiert. Danach erfolgte eine Inkubation mittels spezieller Primärantikörper (Tabelle 4). Nach Zugabe eines Sekundärantikörpers wurden die Membranen in der Dunkelkammer belichtet.

Bezeichnung	Hersteller
pAKT <sup>Ser473</sup>	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
pAKT <sup>Thr308</sup>	
pERK <sup>Thr202/Tyr204</sup>	
pmTOR <sup>Ser2448</sup>	
pRICTOR <sup>Thr1135</sup>	
pSGK1 <sup>Ser78</sup>	
pSGK3 <sup>Thr320</sup>	
AKT	
ERK	
RICTOR	
SGK1	
SGK3	
c-Myc	
HIF-1 $\alpha$	
HIF-2 $\alpha$	
Anti-rabbit IgG Antikörper	
Anti-goat IgG Antikörper	
Anti-mouse IgG Antikörper	
PDI	Stressgen, Victoria, Kanada
$\beta$ -Actin	Santa Cruz, Dallas, USA

**Tab. 4:** Übersicht der verwendeten Antikörper beim Western Blot

### 3.9 Real-Time- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Real-Time-PCR, die zur Bestimmung des Einflusses von BKM120 auf die Expression von „vascular endothelial growth factor-A“ (VEGF-A) (R&D Systems Minneapolis, USA), „platelet-derived growth factor-B“ (PDGF-B) (R&D Systems

Minneapolis, USA) und „multidrug-resistance-protein-1“ (MDR-1) (R&D Systems Minneapolis, USA) zum Einsatz kam, stellt ein Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung bestimmter DNA-Sequenzen dar. Als „housekeeping“ Gen kam 18S zum Einsatz. Die Primerpaare (Eurofins, Luxemburg, Luxemburg) hatten dabei folgende Sequenz: für VEGF-A 5'-CTGGAGTGTGTGCCCACTGA-3' und 5'-TCCTATGTGCTGGCCTTGGT-3', für PDGF-B 5'-CCTGGCATGCAAGTGTGA-3' und 5'-CGAATGGTCACCCGAGTTT-3', für MDR-1 5'-AAGGCATTTACTTCAAACCTTGTC-3' und 5'-TGGATTCATCAGCTGCATTT-3' und für 18S 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' und 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'.

Zur Gewinnung der Proben wurden pro Petrischale  $5 \times 10^5$  Millionen Zellen ausplattiert und mit 500 nM BKM120 versetzt. Nachdem diese mit Hilfe des PCR-Puffers (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) geerntet wurden, wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Im ersten Schritt wurde mittels reverser Transkriptasen die „ribonucleid acid“ (RNA) in „complementary deoxyribonucleic acid“ (cDNA) umgeschrieben. Danach wurden die Ansätze, die aus DEPC-Wasser, Primer Mix (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), Light Cycler Mix (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und cDNA bestanden, in eine 96-well-Platte pipettiert. Diese wurde anschließend zentrifugiert und mit Hilfe des Light Cyclers 480 analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Anwendung der LC480 Software (Roche, Basel, Schweiz).

### 3.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Zweistichproben-t-Tests (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die Resultate des MTT- und Migrationsassays wurden als Relativwerte zur „baseline“ bzw. zu den Kontrollen angegeben. Die IC50 anhand der MTT- Assays wurde mit Hilfe von GraphPadPrism bestimmt.

## 4 Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden aufgrund des o.a. Mutationsstatus primär in den Zelllinien BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> durchgeführt. In der Folge sind daher die Ergebnisse dieser Zelllinien dargestellt. Teilversuche wurden zusätzlich in L3.6pl<sup>(mut/WT)</sup> und MiaPaCa2<sup>(mut/mut)</sup> durchgeführt.

### 4.1 Auswirkungen von BKM120 auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

#### 4.1.1 Auswirkung auf das Wachstum im MTT-Assay

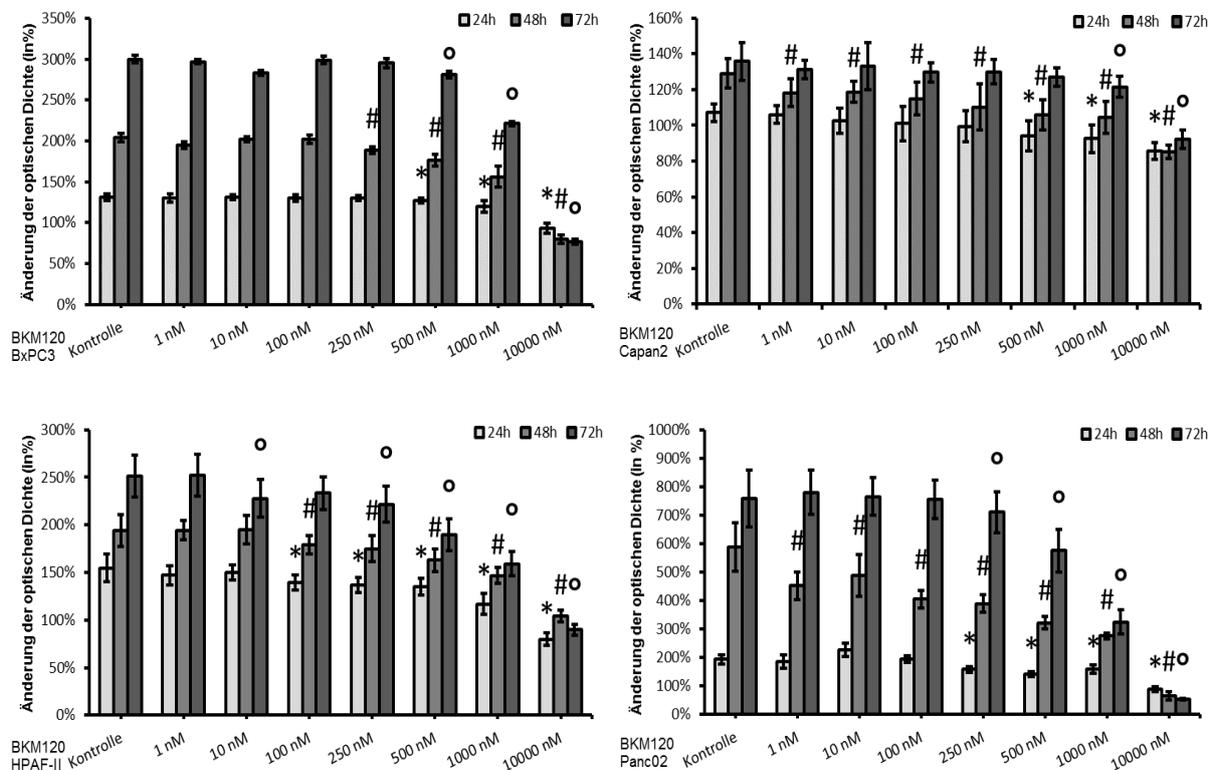
Zunächst wurde der Effekt der PI3K-Inhibition mit BKM120 auf das Wachstum der Tumorzellen mittels MTT-Assays untersucht. Tabelle 5 (Tab.5) zeigt die BKM120 Konzentration, die benötigt wurde, um das Wachstum der verschiedenen Tumorzelllinien in VM zu den jeweiligen Zeitpunkten signifikant zu hemmen.

Zelllinie	Zeitpunkt	Konzentration
BxPC3 <sup>(WT/mut)</sup>	24 h	ab 1000 nM
	48 h	ab 250 nM
	72 h	ab 500 nM
Capan2 <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	ab 500 nM
	48 h	ab 1 nM
	72 h	ab 1000 nM
HPAF-II <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	ab 100 nM
	48 h	ab 100 nM
	72 h	ab 10 nM
Panc02 <sup>(WT/WT)</sup>	24 h	ab 250 nM
	48 h	ab 1 nM
	72 h	ab 500 nM

L3.6pl <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	ab 1000 nM
	48 h	ab 500 nM
	72 h	ab 250 nM
MiaPaCa2 <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	ab 500 nM
	48 h	ab 1 nM
	72 h	ab 500 nM

**Tab. 5:** BKM120 Konzentrationen, bei denen eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums in VM erreicht werden konnte

Zwar konnte in allen Tumorzelllinien eine signifikante Inhibition des Wachstums durch die PI3K Blockade mit BKM120 erreicht werden, jedoch waren die entsprechenden Konzentrationen des Inhibitors sehr different (Tab. 5, Abb. 2). Trotz statistischer Signifikanz ist die biologische Relevanz dieser Bewertung zweifelhaft.



**Abb. 2:** Wachstumsreduktion im MTT-Assay bei BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> (\*, #, °  $p < 0.05$  vs. Kontrolle) in VM

Um eine bessere Beurteilung des BKM120 Effektes zu ermöglichen, erfolgte daher die Bestimmung der IC50 Konzentration. Tabelle 6 fasst die Ergebnisse für BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> zusammen (Tab. 6). Während für BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> extrem hohe Werte (z.T. >10000 nM) für einzelne Zeitpunkte benötigt wurden, lagen diese für Panc02<sup>(WT/WT)</sup> deutlich niedriger.

Zelllinie	Zeitpunkt	IC50-Wert
BxPC3 <sup>(WT/mut)</sup>	24 h	> 10000 nM
	48 h	5498 nM
	72 h	3457 nM
Capan2 <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	> 10000 nM
	48 h	> 10000 nM
	72 h	> 10000 nM
HPAF-II <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	> 10000 nM
	48 h	> 10000 nM
	72 h	3427 nM
Panc02 <sup>(WT/WT)</sup>	24 h	7749 nM
	48 h	889 nM
	72 h	576 nM

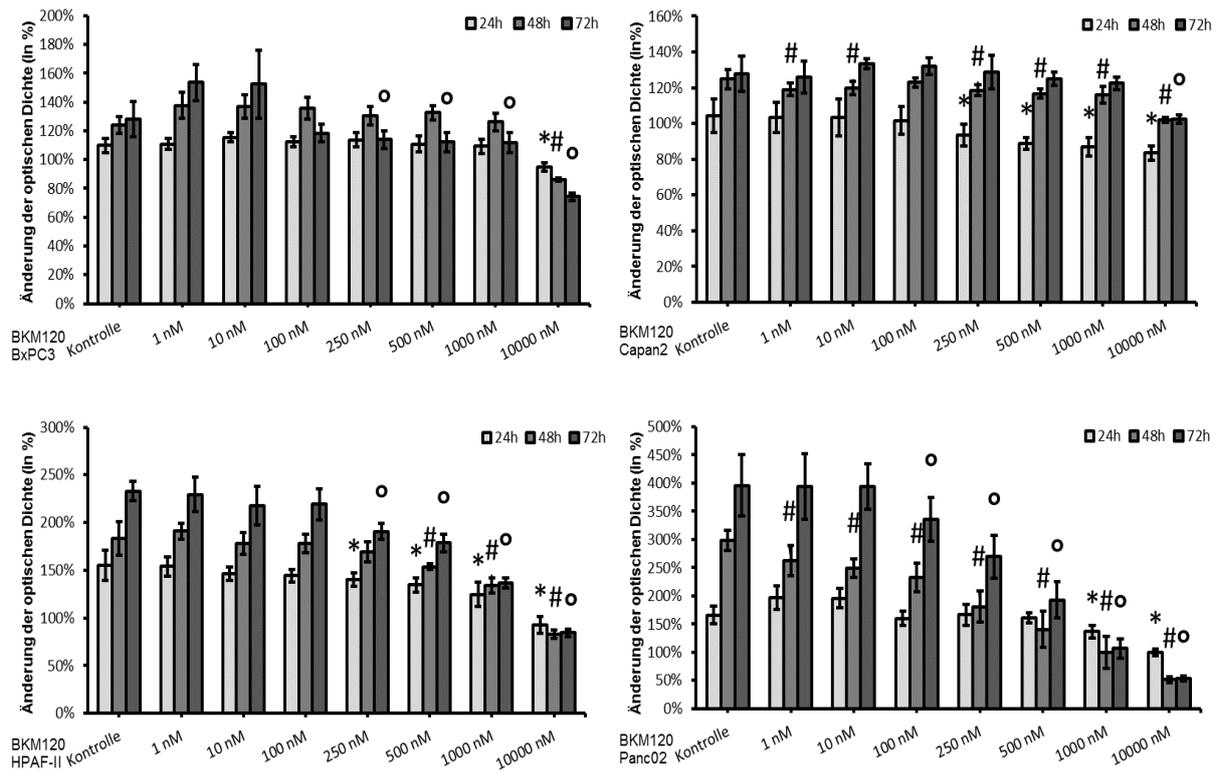
**Tab. 6:** Übersicht der IC50-Werte für BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 24, 48 und 72 h

Zudem wurde der Effekt der PI3K Blockade auf das Wachstum der Tumorzellen in SRM untersucht. Die nachfolgende Tabelle 7 (Tab. 7) gibt die benötigten BKM120 Konzentrationen, ab denen eine signifikante Inhibition des Wachstums festgestellt werden konnte, an.

Zelllinie	Zeitpunkt	Konzentration
BxPC3 <sup>(WT/mut)</sup>	24 h	ab 10000 nM
	48 h	ab 10000 nM
	72 h	ab 250 nM
Capan2 <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	ab 500 nM
	48 h	ab 1 nM
	72 h	ab 10000 nM
HPAF-II <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	ab 250 nM
	48 h	ab 500 nM
	72 h	ab 250 nM
Panc02 <sup>(WT/WT)</sup>	24 h	ab 1000 nM
	48 h	ab 1 nM
	72 h	ab 100 nM
L3.6pl <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	ab 500 nM
	48 h	ab 100 nM
	72 h	ab 550 nM
MiaPaCa2 <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	ab 500 nM
	48 h	ab 250 nM
	72 h	ab 10 nM

**Tab. 7:** BKM120 Konzentrationen, bei denen eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums in SRM erreicht werden konnte

Analog zu den Ergebnissen in VM konnte auch in SRM bei allen Zelllinien eine statistisch signifikante Wachstumshemmung beobachtet werden (Abb.3).



**Abb. 3:** Wachstumsreduktion im MTT-Assay bei BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> (\*, #, °  $p < 0.05$  vs. Kontrolle) in SRM

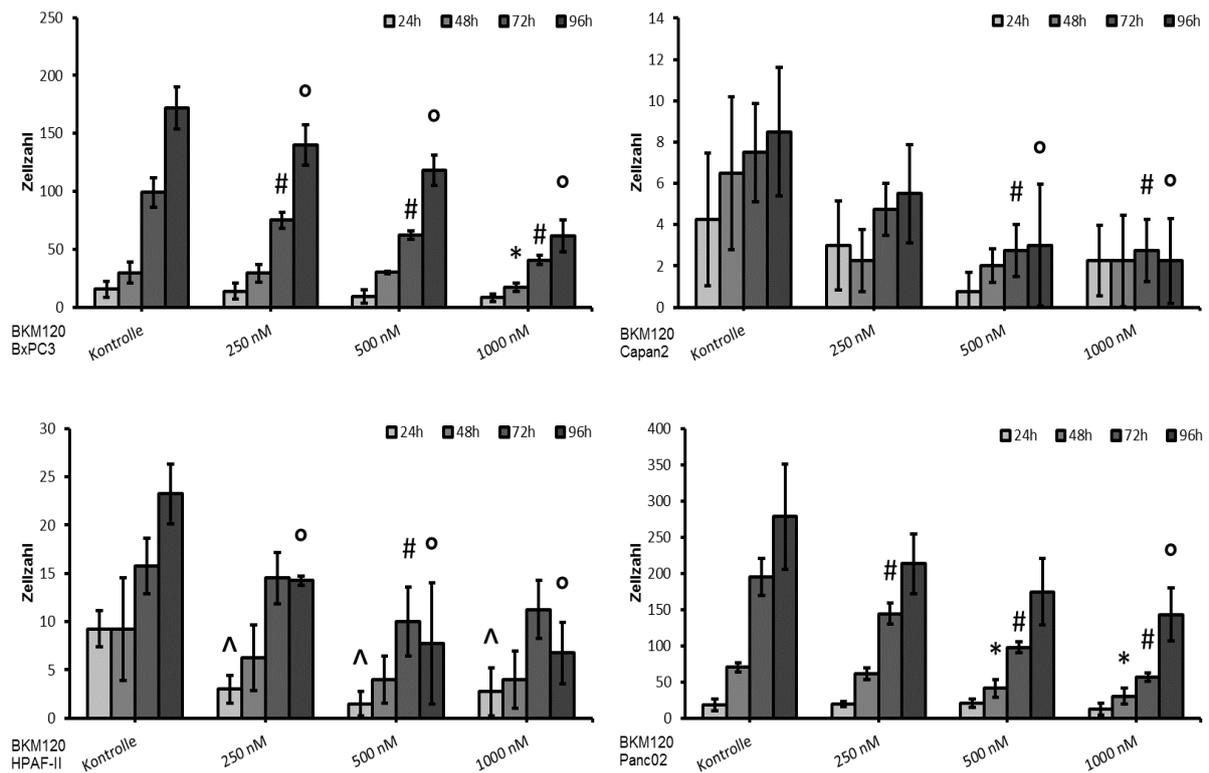
#### 4.1.2 Auswirkung auf das Wachstum im Zelltod-Assay

Zur komplementären Darstellung des BKM120 Effektes wurden Zelltod-Assays verwendet. In der nachfolgenden Tabelle 8 (Tab. 8) sind die benötigten BKM120 Konzentration aufgeführt, die zu einer signifikanten Wachstumsreduktion der verschiedenen Tumorzelllinien nach 24, 48, 72 und 96 Stunden führten.

Zelllinie	Zeitpunkt	Konzentration
BxPC3 <sup>(WT/mut)</sup>	24 h	nicht signifikant
	48 h	ab 1000 nM
	72 h	ab 250 nM
	96 h	ab 250 nM
Capan2 <sup>(mut/WT)</sup>	24 h	nicht signifikant
	48 h	nicht signifikant
	72 h	ab 500 nM
	96 h	ab 500 nM
HPAF-II <sup>(mut/mut)</sup>	24 h	ab 250 nM
	48 h	nicht signifikant
	72 h	nur 500 nM
	96 h	ab 250 nM
Panc02 <sup>(WT/WT)</sup>	24 h	nicht signifikant
	48 h	ab 500 nM
	72 h	ab 250 nM
	96 h	ab 10000 nM

**Tab. 8:** BKM120 Konzentrationen, die zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl im Zelltod-Assay nach 24, 48, 72 und 96 Stunden führten

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch bei den Zelltod-Assays eine signifikante Wachstumshemmung der Tumorzellen zu beobachten war. Der Effekt trat dabei bei allen Zelllinien spätestens nach 72 Stunden auf (Abb. 4).

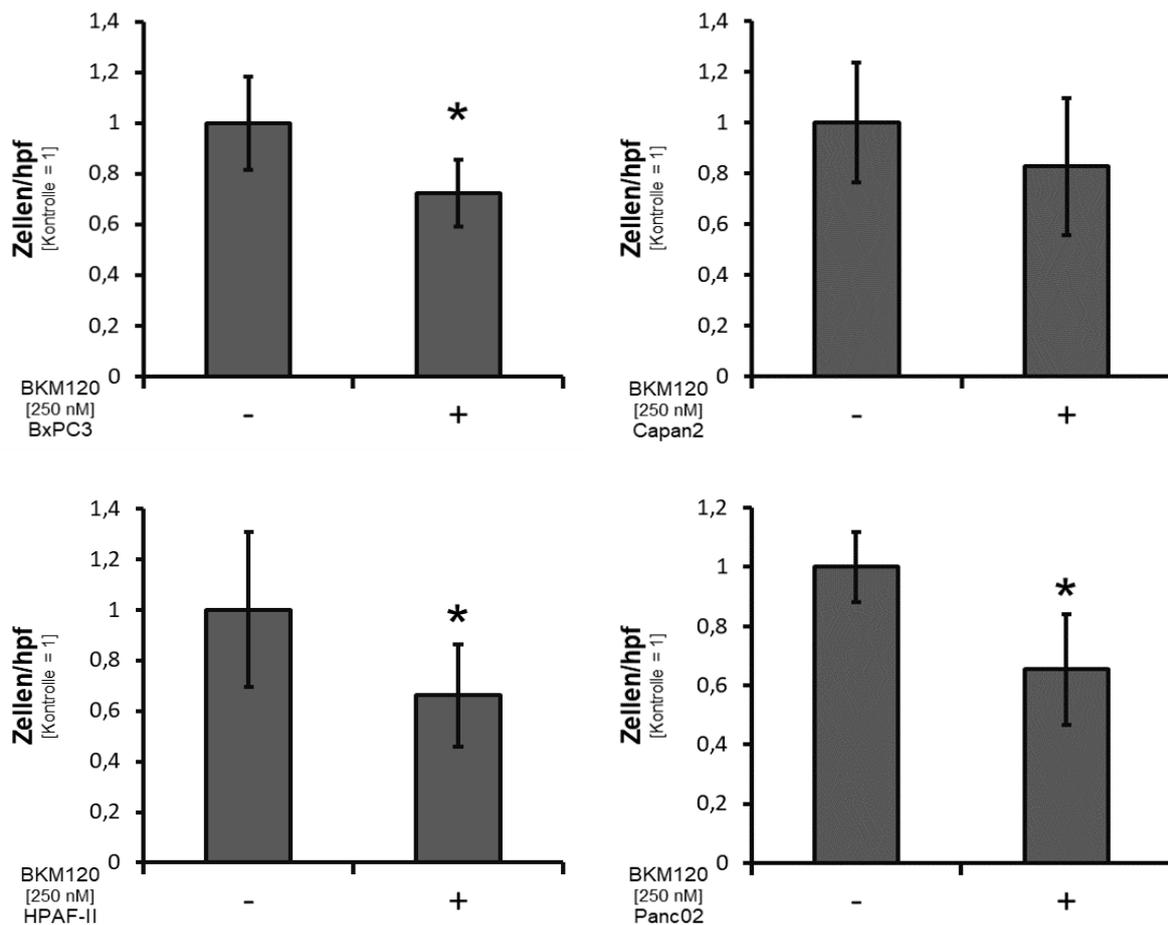


**Abb. 4:** Wachstumsreduktion der Tumorzellen im Zelltod-Assay ( $\wedge$ ,  $*$ ,  $\#$ ,  $^\circ$   $p < 0.05$  vs. Kontrolle) in VM

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl bei den MTT-Assays in VM und SRM als auch bei den Zelltod-Assays ein signifikanter, hemmender Einfluss von BKM120 auf das Wachstum der Pankreaskarzinomzellen festgestellt werden konnte. Dieser Effekt trat jedoch erst bei hohen Dosen des PI3K Inhibitors auf. Zudem war die Auswirkung der Wachstumshemmung bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Unter anderem konnte anhand der IC50-Werte beobachtet werden, dass das Wachstum von Panc02<sup>(WT/WT)</sup> am stärksten gemindert werden konnte, während der Einfluss auf das Wachstum von Capan2<sup>(mut/WT)</sup> am geringsten war.

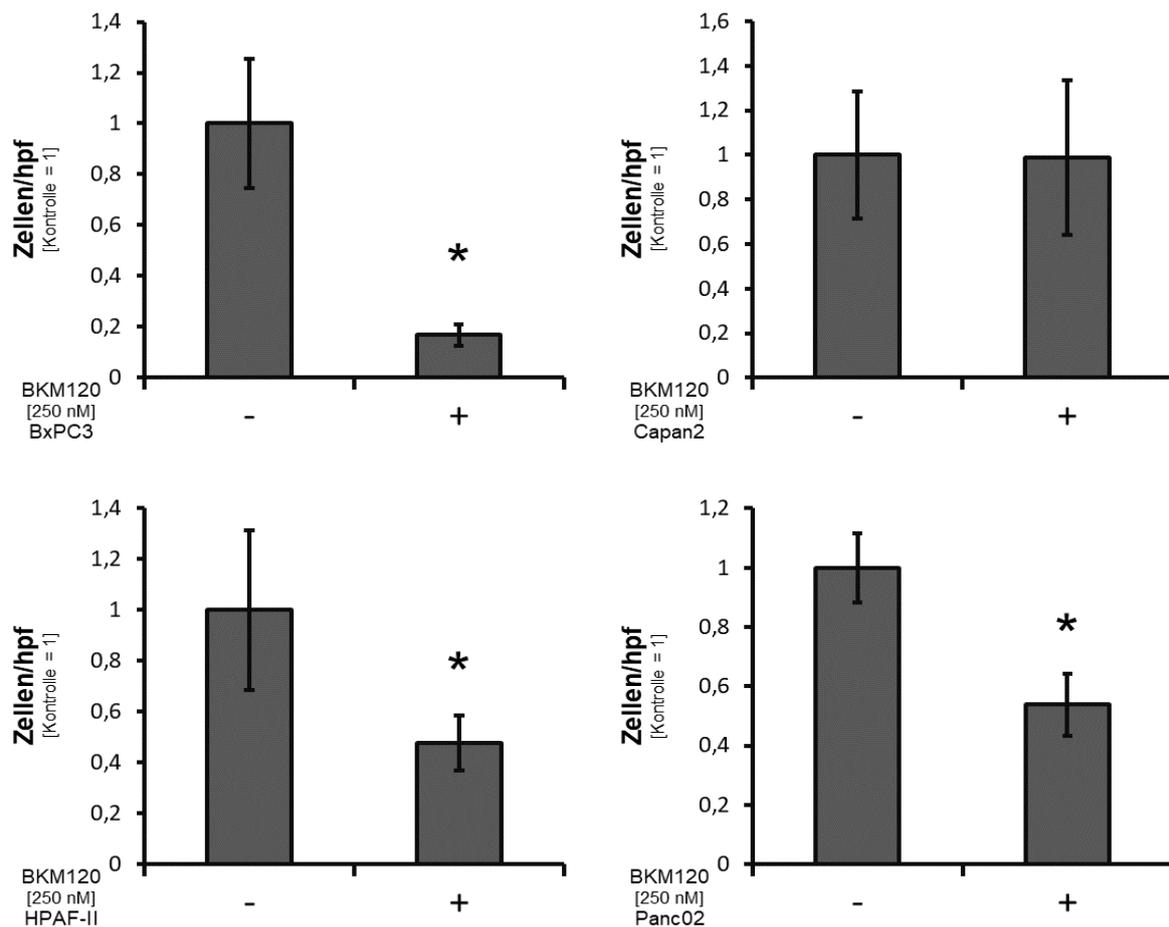
## 4.2 Einfluss der PI3K Inhibition mit BKM120 auf die Motilität von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Ein wesentliches Charakteristikum von Malignomen ist die Metastasierung. Daher wurde im nächsten Schritt der Effekt der PI3K Blockade mit BKM120 auf die Motilität der Tumorzelllinien nach 48 Stunden untersucht. Um Effekte des Inhibitors auf das Tumorzellwachstum zu verhindern, wurde mit einer relativ geringen BKM120 Konzentration (250 nM) behandelt. Die Untersuchungen wurden sowohl in VM (Abb. 5) als auch in SRM (Abb. 6) durchgeführt. Die Ergebnisse in VM zeigten eine statistisch signifikante Hemmung der konstitutiven Zellmotilität durch BKM120 in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> im Vergleich zur Kontrolle, während bei Capan2<sup>(mut/WT)</sup> durch die PI3K Blockade kein signifikanter Einfluss auf die Tumorzellmigration nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 5:** Hemmung der Motilität durch PI3K-Blockade bei den BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen (#  $p < 0.05$ ) in VM

Analog zu den Ergebnissen in VM zeigte sich in SRM wiederum eine Inhibition der Zellmotilität in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup>. Auch hier konnte durch BKM120 kein Effekt auf die Tumorzellmigration bei Capan2<sup>(mut/WT)</sup> beobachtet werden.



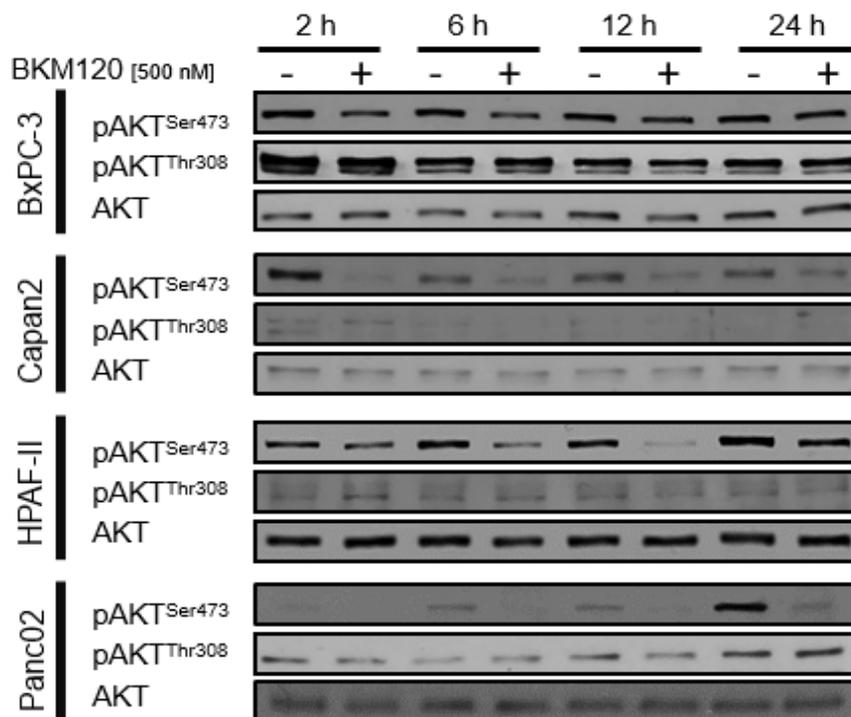
**Abb. 6:** Hemmung der Motilität durch PI3K-Blockade bei den BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen (#  $p < 0.05$ ) in SRM

#### 4.3 Modulation intrazellulärer Signalwege durch PI3K Inhibition *in vitro*

Verschiedene Signaltransduktionskaskaden können durch PI3K beeinflusst werden. Diese untersuchten wir in der Folge mit Hilfe von Western Blot Analysen.

Zunächst wurde der Einfluss von BKM120 auf die konstitutive AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung sowie die konstitutiven AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung untersucht (Abb. 7). Durch die PI3K Blockade konnte in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> kein Effekt auf die konstitutive AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung nachgewiesen werden. Hingegen wurde in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> durch BKM120 die konstitutive AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung nach 2,

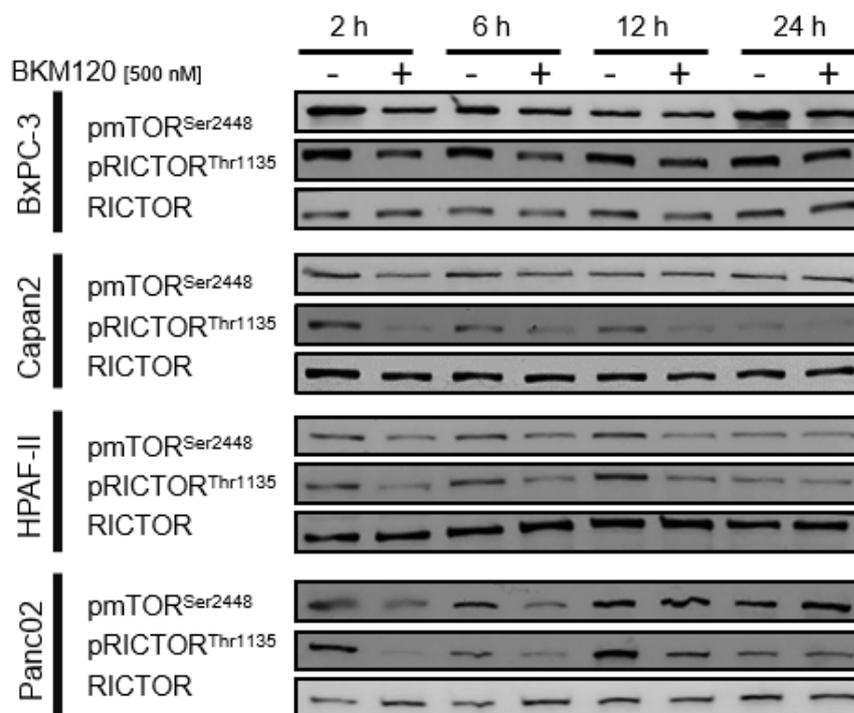
6, 12 und 24 Stunden gehemmt. Ebenfalls konnte in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> eine Inhibition der AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung festgestellt werden, die jedoch nur nach 2, 6 und 12 Stunden und nicht mehr nach 24 Stunden auftrat. Die Überprüfung des Einflusses von BKM120 auf die konstitutive AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> zeigte, dass diese durch die PI3K Blockade bei keiner der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien beeinflusst werden konnte.



**Abb. 7:** Hemmung der konstitutiven AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup>; Kein Einfluss auf die konstitutive AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung

Der Effekt von BKM120 auf die konstitutive mTOR<sup>Ser2448</sup> und RICTOR<sup>Thr1135</sup> („rapamycin-insensitive companion of mTOR“) Phosphorylierung ist in der nachfolgenden Abbildung 8 (Abb. 8) dargestellt. Die Untersuchung der konstitutiven mTOR<sup>Ser2448</sup> Phosphorylierung zeigte keinen Einfluss von BKM120 in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>. Bei den Capan2<sup>(mut/WT)</sup> sowie den Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen ließ sich nach 2 und 6 Stunden und bei HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> Zellen nach 2, 6 und 12 Stunden eine Hemmung der mTOR<sup>Ser2448</sup> Phosphorylierung beobachten. Allerdings konnte die Inhibition der

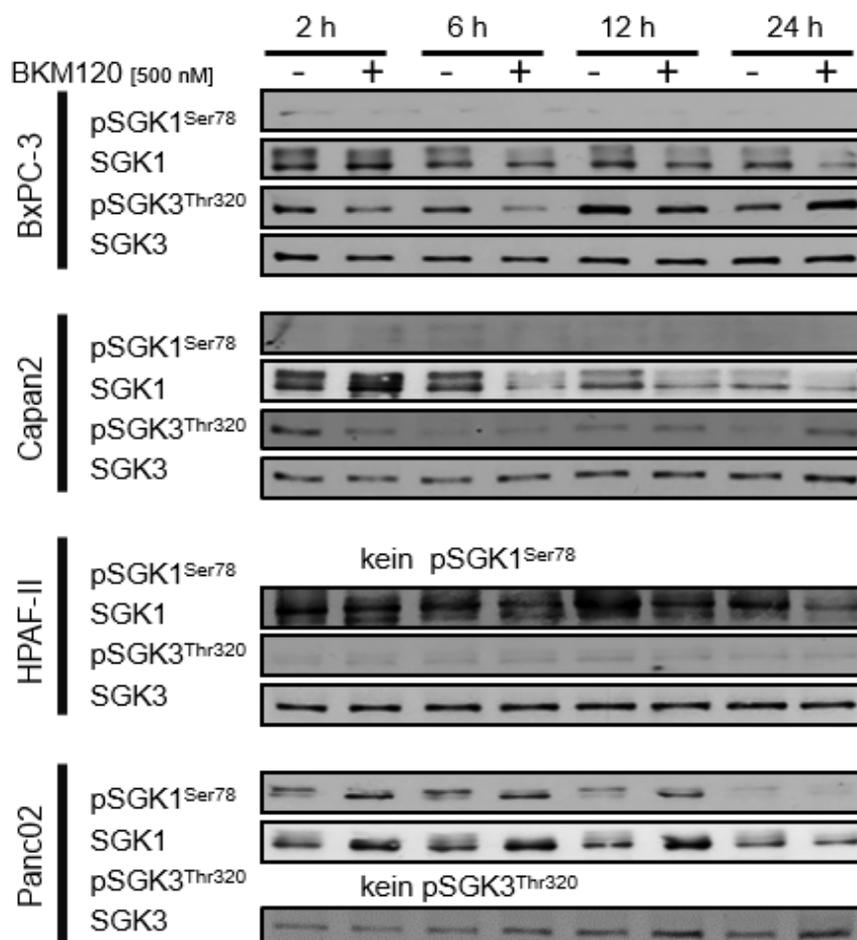
mTOR<sup>Ser2448</sup> Phosphorylierung bei keiner der vier Zelllinien nach 24 Stunden nachgewiesen werden. Die Überprüfung der konstitutiven RICTOR<sup>Thr1135</sup> Phosphorylierung ergab, dass diese durch Zugabe von BKM120 in den BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> Zellen nicht beeinflusst werden konnte. Hingegen wurde bei den restlichen Zelllinien ein Effekt nach 2, 6 und 12 Stunden sichtbar. Auch hier war zum 24 Stunden Zeitpunkt bei keiner der Tumorzelllinien ein Einfluss der PI3K Blockade auf die konstitutive RICTOR<sup>Thr1135</sup> Phosphorylierung festzustellen.



**Abb. 8:** Hemmung der konstitutiven mTOR<sup>Ser2448</sup> sowie RICTOR<sup>Thr1135</sup> Phosphorylierung in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup>

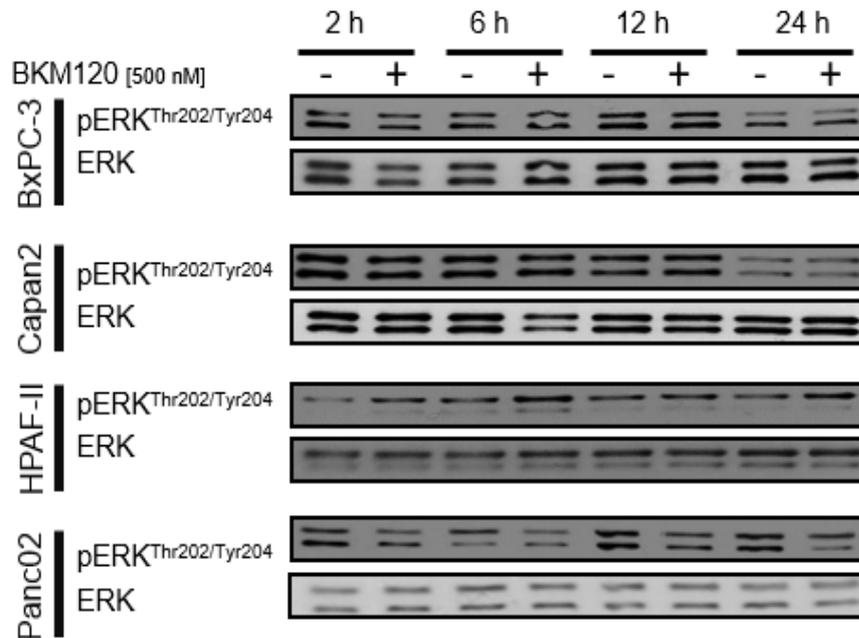
Zudem untersuchten wir die Auswirkung der PI3K Inhibition auf die konstitutive SGK1<sup>Ser78</sup> („serum and glucocorticoid-regulated kinase 1“) sowie die SGK3<sup>Thr320</sup> („serum and glucocorticoid-regulated kinase 3“) Phosphorylierung (Abb. 9). Dabei konnte durch Behandlung mit BKM120 lediglich in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 2, 6 und 12 Stunden eine Hemmung der konstitutiven SGK1<sup>Ser78</sup> Phosphorylierung festgestellt werden. Dieser Effekt wurde nach 24 Stunden nicht mehr beobachtet. In BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und Capan2<sup>(mut/WT)</sup> zeigte die PI3K Blockade keinen Effekt auf die SGK1<sup>Ser78</sup> Phosphorylierung, während sich pSGK1<sup>Ser78</sup> in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> nicht darstellen ließ. Die

Überprüfung der konstitutiven  $\text{SGK3}^{\text{Thr320}}$  Phosphorylierung ergab, dass diese durch BKM120 in  $\text{BxPC3}^{\text{(WT/mut)}}$  nach 2 und 6 Stunden sowie in den  $\text{Capan2}^{\text{(mut/WT)}}$  Zellen nach 2 Stunden gehemmt werden konnte, nach 24 Stunden war dieser Einfluss allerdings nicht mehr nachweisbar. Die konstitutiven  $\text{SGK3}^{\text{Thr320}}$  Phosphorylierung wurde durch die PI3K Blockade in  $\text{HPAF-II}^{\text{(mut/mut)}}$  nicht beeinflusst. In  $\text{Panc02}^{\text{(WT/WT)}}$  konnte  $\text{pSGK3}^{\text{Thr320}}$  nicht dargestellt werden.



**Abb. 9:** Hemmung der konstitutiven  $\text{SGK1}^{\text{Ser78}}$  Phosphorylierung in  $\text{Panc02}^{\text{(WT/WT)}}$ ; Hemmung der konstitutiven  $\text{SGK3}^{\text{Thr320}}$  Phosphorylierung in  $\text{BxPC3}^{\text{(WT/mut)}}$  und  $\text{Capan2}^{\text{(mut/WT)}}$

Den Einfluss von BKM120 auf konstitutive  $\text{ERK}^{\text{Thr202/Tyr204}}$  Phosphorylierung zeigt Abbildung 10 (Abb. 10). Dabei konnte festgestellt werden, dass weder in  $\text{BxPC3}^{\text{(WT/mut)}}$  noch in  $\text{Capan2}^{\text{(mut/WT)}}$ ,  $\text{HPAF-II}^{\text{(mut/mut)}}$  oder  $\text{Panc02}^{\text{(WT/WT)}}$  durch die PI3K Blockade die konstitutive  $\text{ERK}^{\text{Thr202/Tyr204}}$  Phosphorylierung gehemmt wurde.

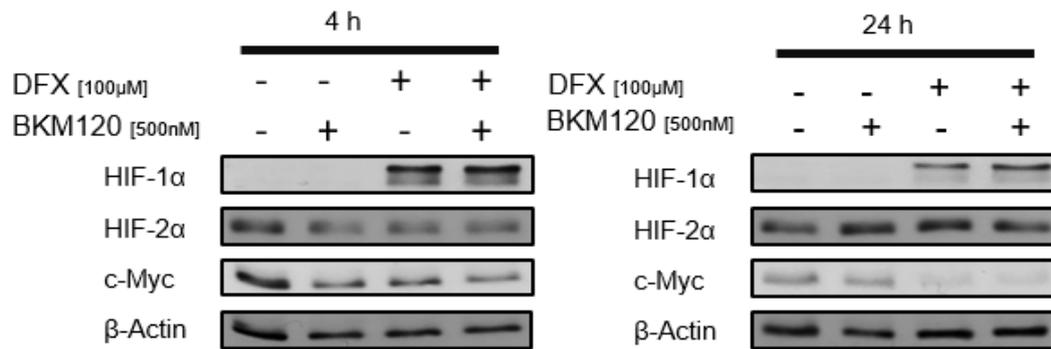


**Abb. 10:** Keine Hemmung der konstitutiven ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung

#### 4.4 Einfluss der PI3K Inhibition mit BKM120 auf die Expression von Transkriptionsfaktoren

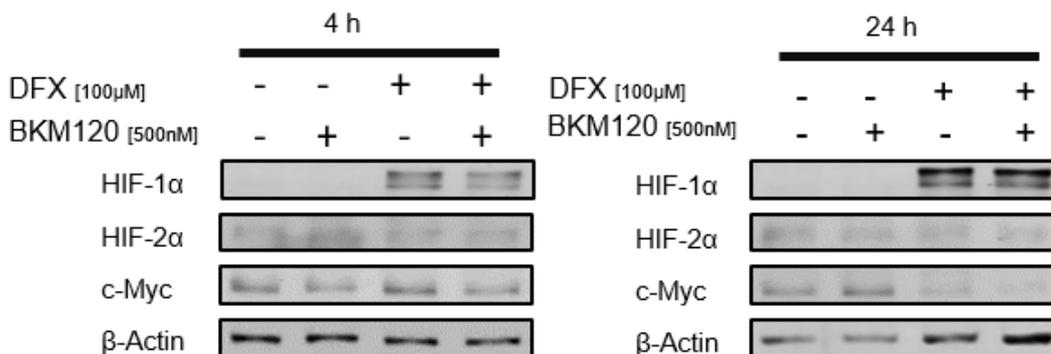
Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 $\alpha$ , „hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ “ (HIF-2 $\alpha$ ) und c-Myc werden mit Tumorwachstum und Metastasierung unter anderem beim humanen Pankreaskarzinom assoziiert (48), (49). Zudem kann die Expression dieser Faktoren durch Hypoxie und Mutationen von *kras/p53* verstärkt werden (50), (51). Beides wird unter anderem durch Aktivierung von PI3K vermittelt. Daher wurde die Expression dieser Faktoren in der Folge sowohl konstitutiv als auch unter „chemisch-induzierter“ Hypoxie mit Deferrooxamin (DFX, 100  $\mu$ M) induziert.

In BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> führte DFX nach 4 und 24 Stunden zu einer verstärkten Expression von HIF-1 $\alpha$ , die Expression von HIF-2 $\alpha$  wurde dagegen nicht beeinflusst. Durch die PI3K Blockade mit BKM120 konnte kein Effekt auf die HIF-1 $\alpha$  und HIF2 $\alpha$  Expression festgestellt werden. Ebenfalls hatte BKM120 keinen Einfluss auf die Expression von c-Myc (Abb. 11).



**Abb. 11:** Kein Einfluss von BKM120 auf die Expression von HIF-1α, HIF-2α und c-Myc in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>

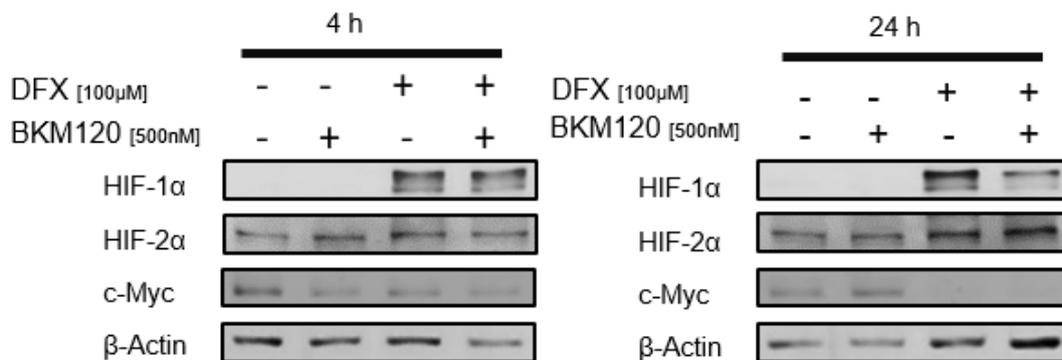
Der Einfluss von BKM120 und DFX in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> ist in Abbildung 12 dargestellt. Analog zu den Beobachtungen in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> konnte DFX in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> die HIF-1α Expression induzieren, während die Expression von HIF-2α nicht beeinflusst wurde. BKM120 konnte weder die HIF-1α noch die HIF-2α sowie die c-Myc Expression hemmen.



**Abb. 12:** Kein Einfluss von BKM120 auf die Expression von HIF-1α, HIF-2α und c-Myc in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>

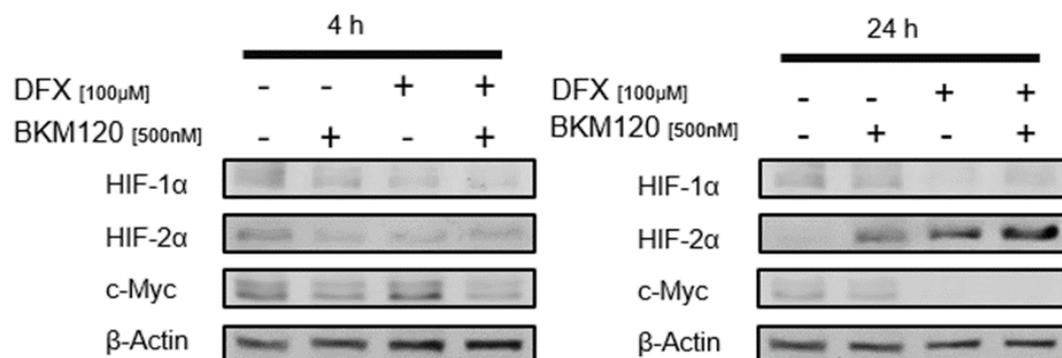
Die Expression der Transkriptionsfaktoren in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> verhielt sich ähnlich wie bei den beiden zuvor untersuchten Zelllinien (Abb.13). Wiederum wurde durch Zugabe von DFX die HIF-1α Expression verstärkt, während die HIF-2α Expression unverändert

blieb. Die Behandlung mit BKM120 zeigte keinen Effekt auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  sowie c-Myc.



**Abb. 13:** Kein Einfluss von BKM120 auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und c-Myc in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup>

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Tumorzelllinien wurde HIF-1 $\alpha$  in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> durch DFX nicht induziert (Abb. 14). Allerdings wurde durch Zugabe von DFX die HIF-2 $\alpha$  Expression nach 24 Stunden verstärkt. Auch hier hatte die PI3K Hemmung keinen Einfluss auf die Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und c-Myc.

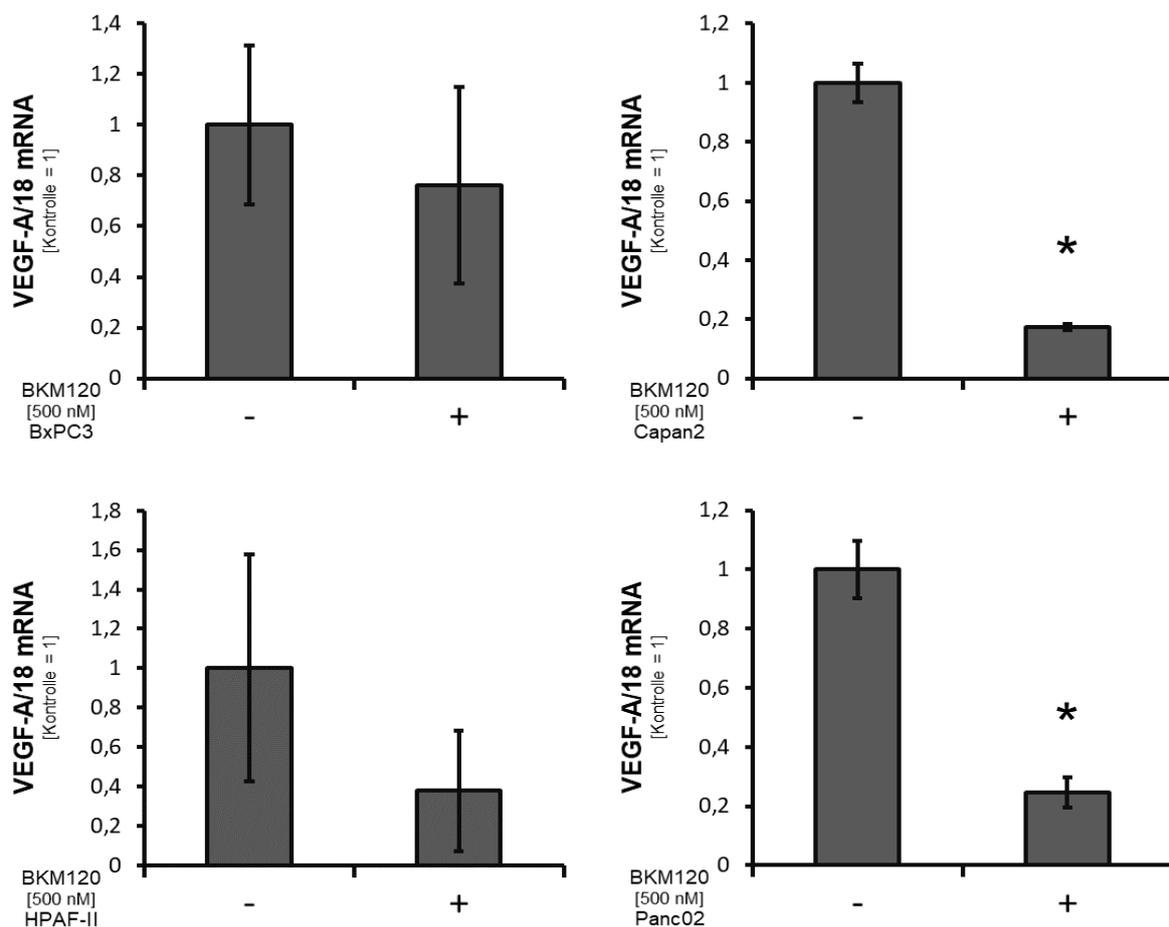


**Abb. 14:** Kein Einfluss von BKM120 auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und c-Myc in Panc02<sup>(WT/WT)</sup>

#### 4.5 Effekt der PI3K Blockade mit BKM120 auf die Expression angiogener und Resistenz-relevanter Faktoren in Pankreaskarzinomzelllinien

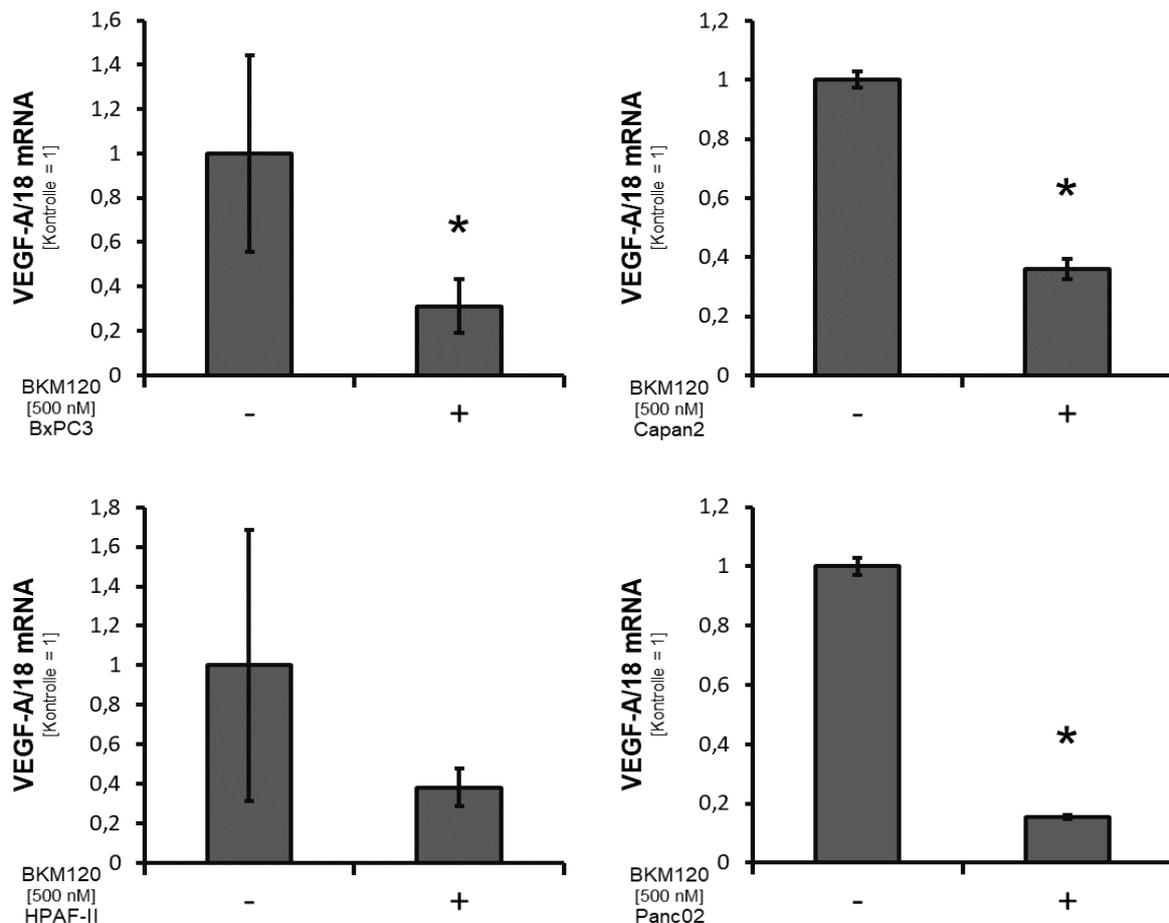
Faktoren wie VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 können durch PI3K Inhibition moduliert werden. Wir untersuchten daher die mRNA Expressionsniveaus in den Tumorzelllinien unter PI3K Blockade mit 500 nM BKM120 nach 2 und 12 Stunden.

Dabei konnte durch die Behandlung mit BKM120 das VEGF-A Expressionsniveau in allen untersuchten Zelllinien nach 2 Stunden gemindert werden (Abb. 15). Jedoch war die Abnahme des Expressionsniveaus nur bei Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> statistisch signifikant.



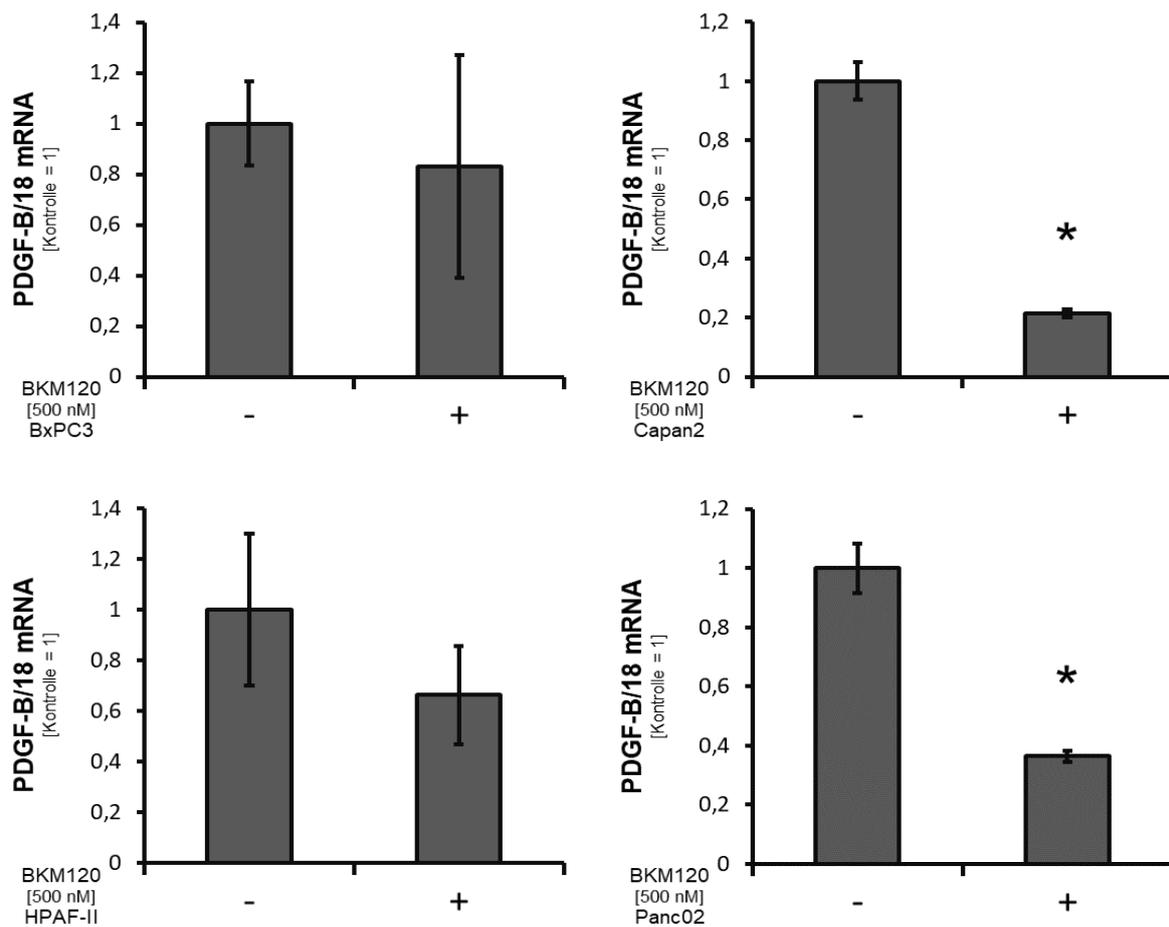
**Abb. 15:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von VEGF-A mRNA in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 2 h

Ein ähnliches Ergebnis präsentierte sich bei der Untersuchung der VEGF-A Expression nach 12 Stunden (Abb. 16). Wiederum konnte durch BKM120 eine Herabregulierung des VEGF-A Expressionsniveaus in den Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war die Abnahme der VEGF-A Expression bei BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> statistisch signifikant.



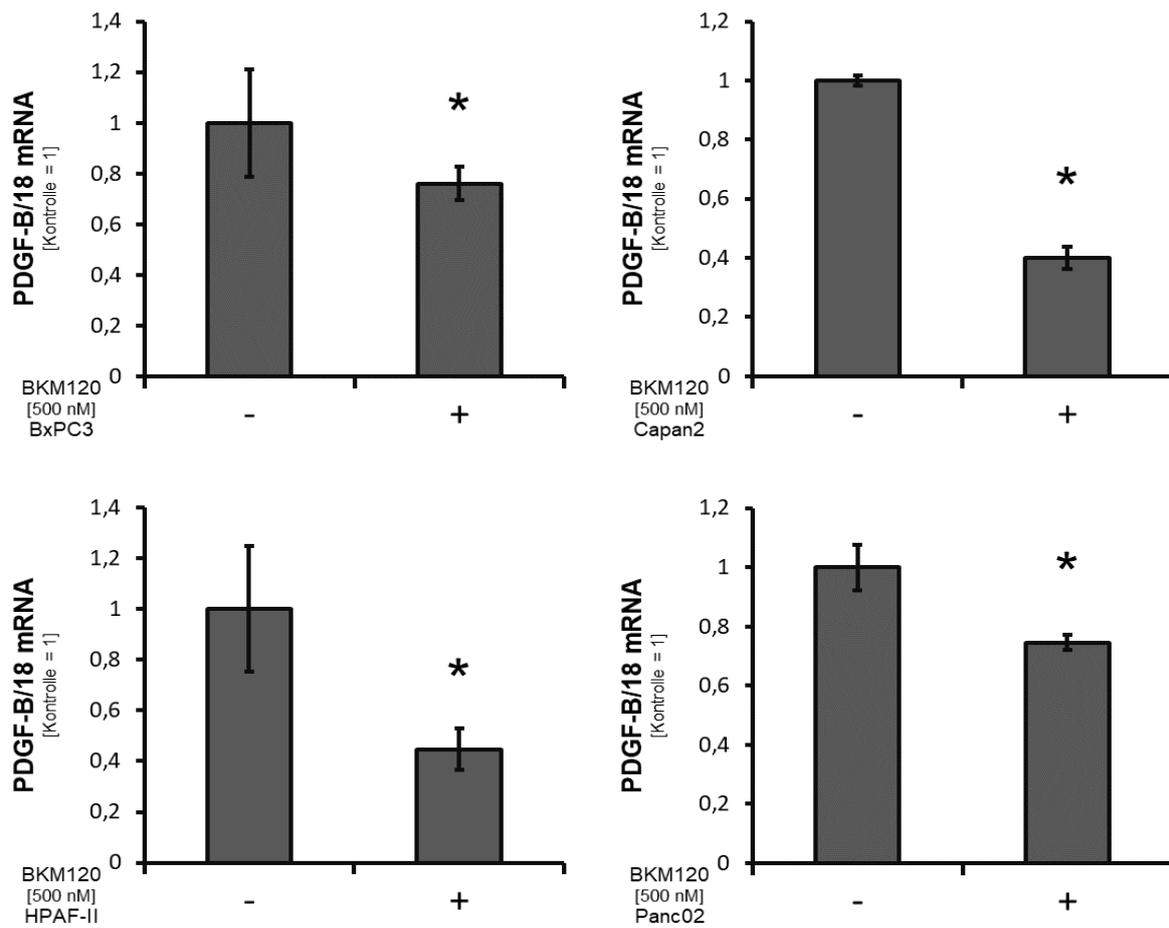
**Abb. 16:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von VEGF-A mRNA in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 12 h

Zudem wurde der Effekt der PI3K Blockade auf die PDGF-B Expression untersucht. Die nachfolgende Abbildung 17 (Abb. 17) zeigt die Ergebnisse unserer Untersuchung nach 2 Stunden. Durch BKM120 wurde das PDGF-B mRNA Expressionsniveau in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> signifikant gemindert. Die Abnahme der PDGF-B Expression in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> zeigte hingegen keine statistische Signifikanz.



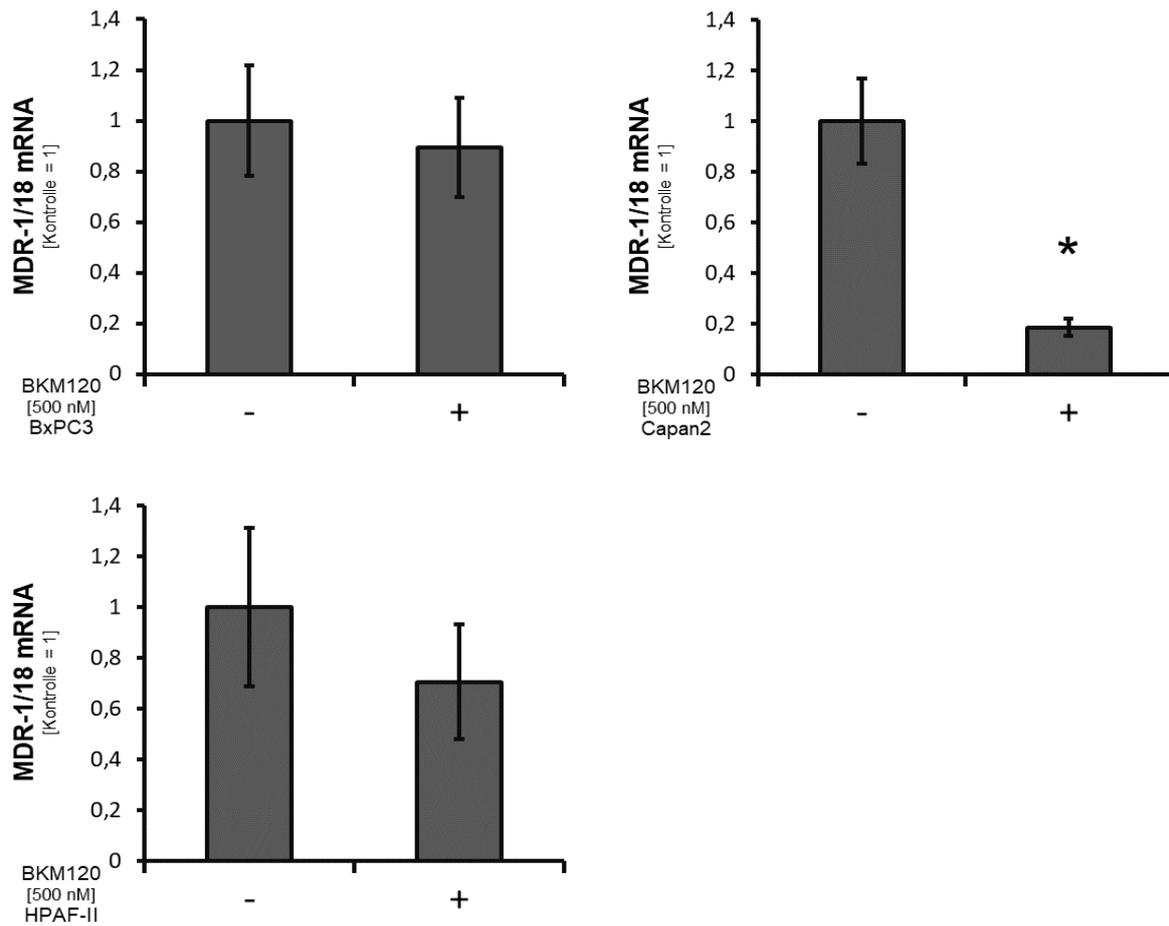
**Abb. 17:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von PDGF-B mRNA in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 2 h

Die Untersuchung der PDGF-B Expression nach 12 Stunden zeigte, dass diese durch Behandlung mit BKM120 allen vier Zelllinien signifikant gemindert wurde (Abb. 18).



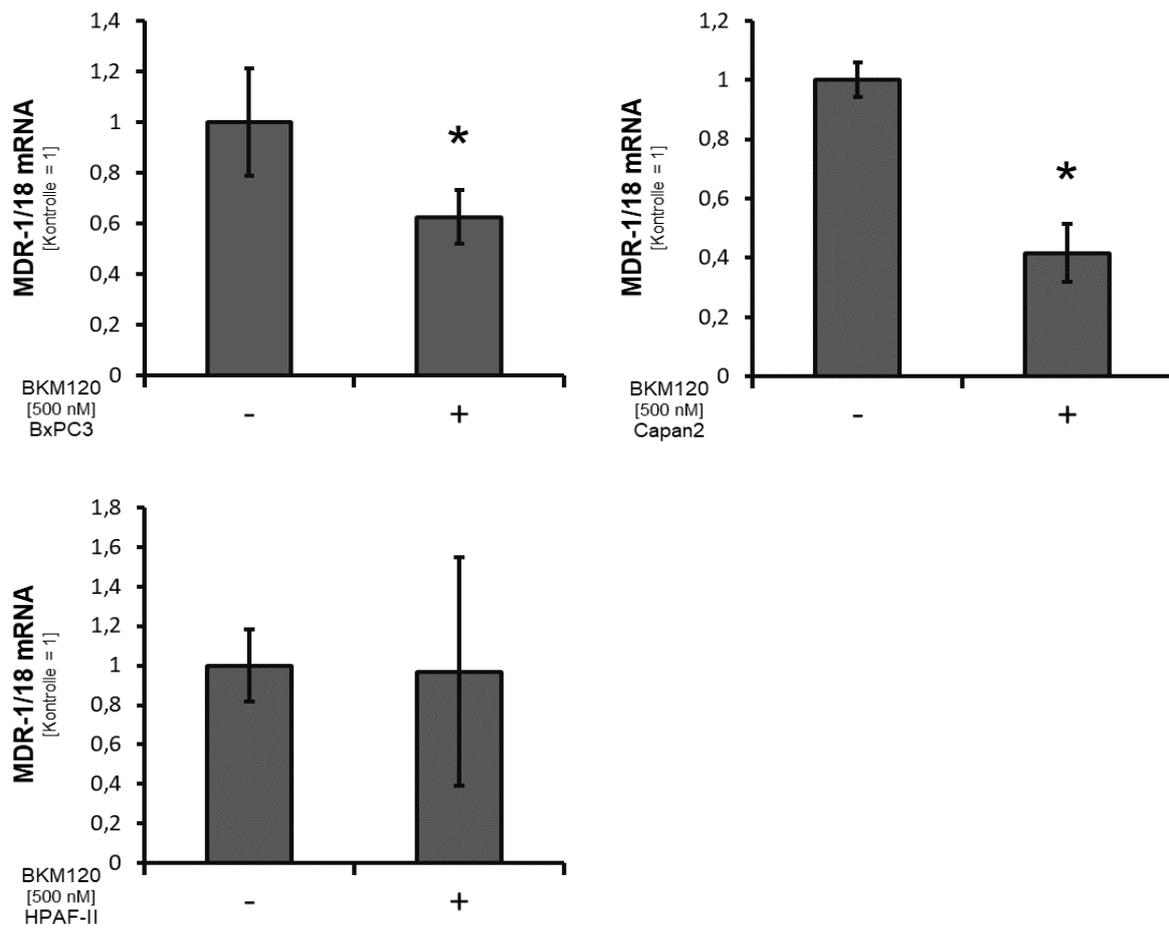
**Abb. 18:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von PDGF-B mRNA in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> nach 12 h

Abschließend wurde der Einfluss von BK120 auf die MDR-1 Expression bestimmt (Abb. 19). Da keine murine Primer zur Darstellung von MDR-1 in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> zur Verfügung stehen, wurde dieser Teilversuch nur in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> durchgeführt. Dabei ließ sich in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> sowie HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> eine Abnahme der MDR-1 Expression nach 2 Stunden beobachten, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Lediglich in Capan2 konnte durch die PI3K Blockade das MDR-1 mRNA Expressionsniveau signifikant reduziert werden.



**Abb. 19:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von MDR-1 mRNA in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> nach 2 h

Die Ergebnisse der MDR-1 Expression nach 12 Stunden zeigt Abbildung 20 (Abb. 20). Wie schon nach 2 Stunden konnte auch nach 12 Stunden die MDR-1 Expression in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> signifikant reduziert werden. Zudem zeigte sich das MDR-1 Expressionsniveau in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> zu diesem Zeitpunkt signifikant gemindert. Kein Effekt auf das MDR-1 Expressionsniveau konnte in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> festgestellt werden.



**Abb. 20:** Behandlung mit BKM120 führte zu einer signifikanten Herunterregulierung von MDR-1 mRNA in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und Capan2<sup>(mut/WT)</sup> nach 12 h

#### 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Überblick der Daten zeigt, dass BKM120 bei den untersuchten Zelllinien einen unterschiedlichen Effekt hinsichtlich Wachstum, Tumorzellmotilität, Beeinflussung intrazellulärer Signalwege, Expression von Transkriptionsfaktoren sowie angiogener und Resistenz-relevanter Faktoren hatte.

Das Tumorzellwachstum konnte durch die PI3K Blockade insgesamt nur schwach gehemmt werden. Bei der Betrachtung der IC<sub>50</sub> Werte ließ sich feststellen, dass BKM120 in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> noch den stärksten Einfluss auf das Wachstum zeigte, während der Effekt in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> am geringsten war.

Bei der Untersuchung des Einflusses von BKM120 auf die Motilität der Pankreaskarzinomzellen beobachteten wir, dass diese in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-

II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> durch die PI3K Inhibition gehemmt wurde. Die Motilität in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> konnte hingegen durch BKM120 nicht beeinflusst werden.

Die intrazellulären Signalwege konnten durch Behandlung mit BKM120 teilweise moduliert werden. So wurde die konstitutive AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> gehemmt, während die konstitutive AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung in keiner der Zelllinien beeinflusst wurde. Zudem konnte eine Hemmung der konstitutiven mTOR<sup>Ser2448</sup> sowie RICTOR<sup>Thr1135</sup> Phosphorylierung in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> festgestellt werden. Die konstitutive SGK1<sup>Ser78</sup> Phosphorylierung wurde in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> inhibiert, während die konstitutive SGK3<sup>Thr320</sup> Phosphorylierung in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und Capan2<sup>(mut/WT)</sup> gehemmt wurde. Auf die konstitutive ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung hatte die PI3K Inhibition keinen Einfluss.

Die Versuche zur Überprüfung des Einflusses von BKM120 auf die Expression von HIF-1 $\alpha$ , HIF-2  $\alpha$  und c-Myc zeigten, dass diese Transkriptionsfaktoren durch die PI3K Blockade nicht vermindert exprimiert wurden.

Das Expressionsniveau von VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 konnte durch Behandlung mit dem PI3K Inhibitor herunterreguliert werden. Nach 12 Stunden konnte das Expressionsniveau von VEGF-A in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> reduziert werden, das Expressionsniveau von PDGF-B wurde zusätzlich noch in HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> gemindert. Ferner führte BKM120 nach 12 Stunden zu einer Herunterregulierung von MDR-1 in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und Capan2<sup>(mut/WT)</sup>.

Die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 9 (Tab. 9) dargestellt.

	BxPC3 <sup>(WT/mut)</sup>	Capan2 <sup>(mut/WT)</sup>	HPAF-II <sup>(mut/mut)</sup>	Panc02 <sup>(WT/WT)</sup>
Wachstum	(↓)	(↓)	(↓)	↓
Motilität	↓	↔	↓	↓
Intrazelluläre Signalwege	↓ SGK3 <sup>Thr320</sup>	↓ AKT <sup>Ser473</sup> , mTOR <sup>Ser2448</sup> , RICTOR <sup>Thr1135</sup> , SGK3 <sup>Thr320</sup>	↓ AKT <sup>Ser473</sup> , mTOR <sup>Ser2448</sup> , RICTOR <sup>Thr1135</sup>	↓ AKT <sup>Ser473</sup> , mTOR <sup>Ser2448</sup> , RICTOR <sup>Thr1135</sup> , SGK1 <sup>Ser78</sup>
Transkriptions- faktoren	↔	↔	↔	↔
Angiogene/ Resistenz- relevante Faktoren	↓ VEGF-A, PDGF-B, MDR-1	↓ VEGF-A, PDGF-B, MDR-1	↓ PDGF-B	↓ VEGF-A, PDGF-B

**Tab. 9:** Auswirkung von BKM120 bei Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*  
(↓ = Herunterregulation; ↔ = kein Effekt; (↓) = minimaler Effekt)

## 5 Diskussion

Die gezielte Krebstherapie zur Behandlung des Pankreaskarzinoms gewinnt in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Deswegen stehen Wirkstoffe, die eine Beeinflussung des PI3K Signalwegs zufolge haben und somit das Tumorstadium verhindern sollen, im Zentrum vieler aktueller Studien (52). Generell lassen sich im Pankreaskarzinom eine Vielzahl an genetischen Mutationen finden, die zur Tumorentstehung beitragen. Dazu gehört beispielsweise die Aktivierung von Onkogenen wie *kras* und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *p53* (20).

In unserer Studie konnte ein Einfluss von BKM120 auf das Wachstum der Tumorzellen im MTT- und Zelltod-Assay nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich die dosisabhängige Wachstumsinhibition *in vitro* erst bei relativ hohen Konzentrationen. Ein Grund dafür könnte sein, dass neben dem PI3K Signalweg noch andere Mechanismen eine Rolle spielen, die das Tumorstadium beeinflussen. So berichten Alagesan *et al.*, dass im Pankreaskarzinom eine Kombination aus einem PI3K und „mitogen-activated protein kinase“ (MEK) Inhibitor einer Monotherapie überlegen ist. Dabei wirkte die MEK Inhibition vor allem zytostatisch, während die Kombination mit einem PI3K Hemmer die Apoptose induzierte (53). Im endokrinen Pankreaskarzinom konnte eine Untersuchung nachweisen, dass BKM120 im Gegensatz zu anderen PI3K Inhibitoren wie BEZ235, das die katalytische Aktivität von mTOR sowie aller Klasse I PI3K Isoformen inhibiert, und BYL719, das ausschließlich die Aktivität der p110 $\alpha$  Isoform hemmt, einen schwächeren Effekt auf Zellproliferation und -überleben zeigte (54). Auch bei anderen Tumorentitäten ergibt sich ein ähnliches Bild. Zwar führte BKM120 Monotherapie beim Lungenkarzinom zu einer Wachstumsinhibition, jedoch war auch hier eine Kombinationstherapie aus dem mTOR Inhibitor RAD001 und BKM120 effektiver (55). Des Weiteren lassen sich in der Literatur Hinweise darauf finden, dass BKM120 eine größere Auswirkung auf Zelllinien mit *kras* WT hinsichtlich des Zellwachstums zeigt. Diese Beobachtung konnte von Roper *et al.* in kolorektalen Karzinomzellen bestätigt werden. Dabei inhibierte BKM120 signifikant das Zellwachstum in *kras* WT Zellen (56). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit, bei der die Panc02<sup>(WT/WT)</sup> stärker im Wachstum inhibiert wurden als die Zellen mit mutiertem *kras*. Dagegen scheint es keinen Zusammenhang zwischen dem *p53* Mutationsstatus und dem Einfluss von BKM120 auf das Wachstum der

Pankreaskarzinomzellen zu geben. Somit lässt die aktuelle Studienlage den Schluss zu, dass BKM120 als Monotherapie, die auf die Bekämpfung des Tumorwachstums abzielt, von eher geringerem Nutzen ist. Vielversprechender erscheint der Einsatz in Kombinationen mit anderen Wirkstoffen.

Deutlicher als auf das Wachstum war der Einfluss von BKM120 auf die Tumorzellmotilität. Hier konnte unsere Studie zeigen, dass bei einer Konzentration von 250 nM BKM120 die konstitutive Tumorzellmotilität in den BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen gehemmt wird. Im Gegensatz dazu konnte in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> keine signifikante Reduktion der Tumorzellmotilität festgestellt werden. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf den spezifischen *kras* und *p53* Mutationsstatus der Capan2<sup>(mut/WT)</sup> Zellen zurückzuführen. Zudem war die gewählte Konzentration von 250 nM BKM relativ gering, sodass möglicherweise bei einer höheren Dosis des PI3K Inhibitors die Motilität in Capan2<sup>(mut/WT)</sup> Zellen gehemmt werden könnte. Interessanterweise war die Hemmung der Tumorzellmotilität in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> am stärksten ausgeprägt. Diese Zelllinie ist hinsichtlich des *kras* und *p53* Mutationsstatus gegensätzlich zu Capan2<sup>(mut/WT)</sup>. Somit ist in unserer Studie der Einfluss von BKM120 auf die Migration der Tumorzellen bei *kras* WT und mutiertem *p53* am größten. Da jedoch ebenfalls die Motilität von HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen gehemmt werden konnte, ergibt sich hinsichtlich des Effekts von BKM120 auf die Motilität von Zellen mit WT bzw. mutiertem *kras/p53* kein eindeutiges Bild. Zu diesem Ergebnis kommt auch eine andere Untersuchung, bei der der Effekt von BKM120 auf Gallengangskarzinomzellen bestimmt wurde und sowohl die Motilität bei Zellen mit WT als auch mutiertem *kras* gehemmt werden konnte (57). Ferner konnten weitere Studien von Kanteti *et al.* und Speranza *et al.* zeigen, dass auch im Pleuramesotheliom und im Glioblastom durch die PI3K Blockade mit BKM120 eine Inhibition der Tumorzellmotilität auftritt. Allerdings fand dabei der spezifische *kras* bzw. *p53* Mutationsstatus der Zellen keine spezielle Berücksichtigung (58), (59). Hinsichtlich der Auswirkung von BKM120 auf die Migration von Tumorzellen mit unterschiedlichem *p53* Mutationsstatus lassen sich derzeit in der Literatur keine Vergleichsergebnisse finden.

Eine wichtige Komponente, die zur Entstehung des Pankreaskarzinoms beiträgt, sind Fehlregulationen im PI3K/AKT/mTOR Signalweg. Innerhalb der Zelle kann mTOR entweder Teil des „mammalian target of rapamycin complex 1“ (mTORC1) oder mTORC2 Komplexes sein. Mittels negativer Feedbackschleife kann mTORC1 die PI3K/AKT Aktivierung hemmen, wohingegen mTORC2 AKT durch positive Rückkopplung aktivieren kann (38). Die PI3K Aktivierung kann auch zur Induktion/Phosphorylierung der Proteinkinasen SGK1 und SGK3 führen, die eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den AKT Kinasen haben und an der Tumorgenese beteiligt sind (60). Neben dem PI3K Signalweg ist zudem der MAPK/ERK Signalweg am Prozess der Tumorentstehung beteiligt (61). Die Resultate unserer Studie zeigen, dass die AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung in allen Zelllinien mit Ausnahme der BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> Zellen gehemmt wird, während der Einfluss auf die konstitutive AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung ausblieb. Der Einfluss von BKM120 auf die AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung konnte bereits in anderen Studien festgestellt werden (41), (42). Allerdings zeigte sich bei diesen Untersuchungen im Gegensatz zu unserer Studie ein Effekt von BKM120 auf die AKT<sup>Thr308</sup> Phosphorylierung. Zudem scheint BKM120 in unserer Studie die AKT Phosphorylierung unabhängig vom *kras* und *p53* Mutationsstatus zu beeinflussen, was zumindest hinsichtlich des *p53* Mutationsstatus in einer anderen Untersuchung bestätigt werden konnte (41), (42). Eine andere Studie empfiehlt bei Magenkarzinomzelllinien mit mutiertem *kras* eine Kombinationsbehandlung aus einem PI3K Inhibitor sowie einem STAT3 Inhibitor zur Inhibition der AKT Phosphorylierung, da die simultane Gabe dieser Wirkstoffe der alleinigen Behandlung mit BKM120 überlegen zu sein scheint (62). Die konstitutive mTOR<sup>Ser2448</sup> Phosphorylierung konnte ähnlich wie die AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup>, jedoch nicht in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> inhibiert werden. Die konsitutive Phosphorylierung von RICTOR<sup>Thr1135</sup>, einer Untereinheit von mTORC2, wurde ebenfalls in Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen gehemmt. Verglichen mit der Herabregulierung der AKT<sup>Ser473</sup> Phosphorylierung, war die Hemmung der mTOR und RICTOR Phosphorylierung nach 24 Stunden jedoch nicht mehr nachweisbar und somit insgesamt schwächer ausgeprägt. Die Kombination von BKM120 mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin erzielte in Bezug auf die Inhibierung der mTOR Phosphorylierung laut einer Studie von Liu *et al.* bessere Ergebnisse als die Monotherapie mit BKM120 (63). Dagegen kam Pereira *et al.* zu dem Ergebnis, dass BKM120 bei bestimmten Leukämieformen als

Monotherapie die Phosphorylierung von mTOR wirkungsvoll hemmen kann (64). Der Effekt von BKM120 auf die SGK1<sup>Ser78</sup> und SGK3<sup>Thr320</sup> Phosphorylierung war in unserer Untersuchung ebenfalls nur schwach ausgeprägt. So konnte die SGK1<sup>Ser78</sup> Phosphorylierung nur in Panc02<sup>(WT/WT)</sup> Zellen inhibiert werden. Diese Zelllinie ist durch WT *kras* und *p53* charakterisiert, was darauf hinweist, dass dieses Mutationsmuster besonders sensitiv gegenüber einer PI3K Blockade zu sein scheint. Die SGK3<sup>Thr320</sup> Phosphorylierung hingegen konnte in den BxPC3<sup>(WT/mut)</sup> und Capan2<sup>(mut/WT)</sup> Zellen gehemmt werden. Allerdings war der Einfluss sowohl auf die SGK1<sup>Ser78</sup> als auch die SGK3<sup>Thr320</sup> Phosphorylierung nicht dauerhaft und bereits nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Diese schwache Auswirkung der PI3K Blockade auf die SGK Phosphorylierung wurde in einer anderen Untersuchung bestätigt. Dabei konnte der PI3K Inhibitor GDC-0941 ähnlich wie BKM120 die SGK3 Phosphorylierung kaum beeinflussen (65). Bago *et al.* kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass BKM120 nach fünf Tagen zu einer Induktion von SGK3 führt. Dasselbe Resultat konnte auch bei Behandlung mit einem weiteren PI3K Inhibitor beobachtet werden. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass die Tumorzellen bei Behandlung mit PI3K Inhibitoren andere Signalwege wie den SGK3 Signalweg hochregulieren, um ihr Überleben zu sichern. Außerdem stellen sie die potentielle Bedeutung von SGK Inhibitoren bei der Krebstherapie heraus (66). Unsere Untersuchung konnte kein Einfluss von BKM120 auf die konstitutive ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung nachweisen. Um diesen zu erzielen, war vermutlich die von uns angewandte Konzentration von 500 nM zu gering. So konnten Park *et al.* zeigen, dass BKM120 bei Konzentrationen von über 1 µM in der Lage ist, die ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung zu hemmen. Interessanterweise ließ sich in derselben Studie feststellen, dass BKM120 teilweise die ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung induziert (62). Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass durch die Aktivität von PI3K Inhibitoren andere Faktoren durch negative Rückkopplung hochreguliert werden, die wiederum den ERK und PI3K Signalweg reaktivieren können (41). Eine andere Studie fand heraus, dass durch eine Behandlung mit BKM120 und einem MEK Inhibitor wie AZD-6244 die ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> Phosphorylierung wirksam gehemmt werden kann (53). Die Übersicht der Auswirkung von BKM120 auf die Signaltransduktion und der Vergleich mit anderen Studien zeigt, dass die PI3K Inhibition nur teilweise zu einer Hemmung von intrazellulären Signalwegen führt und diese in manchen Fällen sogar induziert. Der Einfluss von *kras* und *p53* Mutationen

auf diese Beobachtungen ist bisher noch nicht gut erforscht und könnte ein Ziel für zukünftige Untersuchungen sein.

Ein klareres Bild ergibt sich in unserer Studie bei der Überprüfung des Effekts von BKM120 auf die HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und c-Myc Expression. Bei den von uns untersuchten Zelllinien konnte keine Hemmung der induzierten Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu einer Untersuchung von Tanaka *et al.*, die zu dem Ergebnis kam, dass im HCC durch eine PI3K Inhibition mit dem Wirkstoff LY294002 das HIF-1 $\alpha$  Expressionsniveau gemindert werden konnte (67). Auch im Mammakarzinom führte die PI3K Inhibition laut Chen *et al.* zu einer Reduktion der Expression von HIF-1 $\alpha$  (68). Möglicherweise benötigt man zur Inhibierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  in den Pankreaskarzinomzelllinien eine höhere BKM120 Konzentration die von uns verwendete. Beispielsweise behandelten Chen *et al.* bei ihren Experimenten mit einer Inhibitor-Konzentration von 10  $\mu$ m, während bei uns BKM120 in einer Konzentration von 500 nM zum Einsatz kam. Auch bezüglich des Effekts von BKM120 auf die c-Myc Expression finden sich in der Literatur Studien, die zu einem anderen Ergebnis wie unsere Untersuchung kommen. Cardnell *et al.* konnten in ihrer Studie nachweisen, dass durch BKM120 die Expression von c-Myc beeinflusst wird (69). Somit kommen wir hinsichtlich der Auswirkung der PI3K Blockade auf die Expression von Transkriptionsfaktoren zu einem anderen Resultat als bisherige wissenschaftliche Arbeiten.

Für den Prozess der Tumorangio-genese und -progression sind unter anderem Faktoren wie VEGF-A und PDGF-B, die für die Tumorangio-genese sowie für das Wachstum von Tumorzellen eine wichtige Bedeutung haben und im Pankreaskarzinom häufig vermehrt exprimiert sind, entscheidend (70). Zudem kann es durch die Expression von MDR-1 in Pankreaskarzinomzellen zu Zytostatikaresistenzen kommen (71). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen eine Abnahme des VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 Expressionsniveaus bei Behandlung mit BKM120. Dabei scheint der PI3K Inhibitor unabhängig vom spezifischen *kras* und *p53* Mutationsmusters der jeweiligen Zelllinien die Expression von VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 zu reduzieren. Der Einfluss von BKM120 auf die VEGF-A Expression konnte auch in einer anderen Studie nachgewiesen werden (41). Ebenfalls kam eine weitere Studie zu dem Ergebnis, dass PI3K Inhibitoren PDGF-B vermittelte Mechanismen hemmen können (72). Zudem konnten Hu *et al.* nachweisen, dass BKM120 im Mammakarzinom die MDR-vermittelte Therapieresistenz

überwinden kann und die Kombination aus BKM120 und herkömmlichen Chemotherapeutika synergistische Effekte zeigt (73). Die in unserer Untersuchung beobachtete verminderte Expression von PDGF-B durch die PI3K Blockade könnte ein interessanter Ansatz für zukünftige Therapien sein. PDGF-B ist unter anderem an der Proliferation von Stromazellen beteiligt, die einen Großteil der Tumormasse des Pankreaskarzinoms ausmachen und zum Scheitern von systemischen Therapien beitragen (74), (75). Möglicherweise kann durch eine Reduzierung der PDGF-B Expression und somit einer Hemmung des Stromawachstums die Wirksamkeit von etablierten und zukünftigen Therapiestrategien erhöht werden. Zudem lässt die Beobachtung, dass BKM120 ebenfalls die Expression von MDR-1 hemmt, die Schlussfolgerung zu, dass der PI3K Inhibitor wirksames Mittel gegen Resistenzrelevante Faktoren im Pankreaskarzinom darstellt. Beispielsweise hängt die Gemzitabineresistenz im Pankreaskarzinom unter anderem von MDR Expression ab (76). Möglicherweise könnte durch eine simultane Behandlung mit BKM120 die Wirksamkeit von Gemzitabine im Vergleich zur Monotherapie gesteigert werden. Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich bei unserer Untersuchung ähnlich wie bei anderen Studien einen Einfluss der PI3K Blockade auf VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 beobachten ließ.

Die in vitro Resultate unserer Untersuchung und der Vergleich mit der aktuellen Studienlage weisen darauf hin, dass BKM120 sowohl beim Pankreaskarzinom als auch bei anderen Tumorentitäten ein möglicher Therapieansatz zu sein scheint. Allerdings lassen sich Aussagen über die tatsächliche Wirksamkeit neuer Medikamente im menschlichen Organismus erst nach klinischen Testreihen treffen. Deswegen werden im Folgenden kurz drei aktuelle Studien vorgestellt. Eine Untersuchung an japanischen Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, bei denen die Erkrankten mit 25 mg, 50 mg und 100 mg BKM120 pro Tag behandelt wurden, empfiehlt eine Tagesdosis von 100 mg BKM120 für weitere Studien. Die häufigsten Nebenwirkungen bei dieser Behandlung waren Ausschläge, erhöhte Transaminasenwerte, erhöhte Blutinsulinspiegel und eine Eosinopenie (77). In einer weiteren Analyse wurde BKM120 an Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom getestet. Diese stellte fest, dass BKM120 die im Vorfeld erwartete Verbesserung im Behandlungsergebnis nicht bestätigen konnte und rät dazu, den PI3K Inhibitor mit anderen Wirkstoffen zu kombinieren (78). Bei einer Studie an

Patienten, die an *kras* mutiertem Ovarialkarzinom erkrankt sind, zeigte eine Behandlung mit 60 mg BKM120 und 1,5 mg Trametinib (MEK Inhibitor) zwar vielversprechende antitumoröse Eigenschaften, jedoch gestaltet sich eine Langzeittherapie wegen häufiger Dosisunterbrechungen und -reduzierungen aufgrund der Toxizität der Therapie schwierig (79).

Unsere Studie weist bestimmte Beschränkungen auf. Die von uns verwendeten Zelllinien sind bereits sehr artifiziell, weswegen Untersuchungen an Organoiden oder Primärtumorzellen eine größere Aussagekraft hätten. Zudem wurde lediglich eine Zelllinie für jedes Mutationsmuster getestet. Somit könnten die Ergebnisse entweder zufällig oder von anderen Veränderungen innerhalb der Zelle mitbeeinflusst werden, wozu beispielsweise DNA-Schädigungen zählen. Letztlich wurden die dargelegten Untersuchungen außerdem nur *in vitro* durchgeführt, sodass aufgrund des Fehlens von *in vivo* Experimenten die Effektivität der Behandlung sowie die biologische Verfügbarkeit des Wirkstoffs nicht beurteilt werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine Tumorerkrankung mit einer sehr schlechten Prognose. Die Diagnosestellung erfolgt häufig erst zu einem Zeitpunkt, bei dem die Erkrankung schon weit fortgeschritten ist. Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien, die dem Patienten ein längeres Überleben und eine Verbesserung der Lebensqualität ermöglicht, steht im Zentrum vieler aktueller Untersuchungen. Unsere Studie hatte das Ziel, die Auswirkung des PI3K Inhibitors BKM120 auf Pankreaskarzinomzelllinien mit unterschiedlichem *kras* und *p53* Mutationsmuster zu überprüfen.

Die Untersuchungen wurden in den Pankreaskarzinomzelllinien BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup>, HPAF-II<sup>(mut/mut)</sup>, Panc02<sup>(WT/WT)</sup>, L3.6pl<sup>(mut/WT)</sup> sowie MiaPaCa2<sup>(mut/mut)</sup> mit unterschiedlichem Mutationsmuster hinsichtlich *kras* und *p53* durchgeführt. Zur PI3K Blockade verwendeten wir den Inhibitor BKM120. Der Einfluss der PI3K Inhibition auf das Zellwachstum, Migration, Expression angiogener und Resistenz-relevanter Faktoren, Transkriptionsfaktoren sowie auf die Aktivierung von Signalwegen untersuchten wir mittels verschiedener *in vitro* Verfahren.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die PI3K Blockade *in vitro* zu einer Wachstumshemmung führt, diese war allerdings bei allen Zelllinien eher schwach ausgeprägt. Zudem ließ sich feststellen, dass durch BKM120 die Motilität der Tumorzellen in BxPC3<sup>(WT/mut)</sup>, Capan2<sup>(mut/WT)</sup> und Panc02<sup>(WT/WT)</sup> signifikant inhibiert wurde. Außerdem konnte durch die PI3K Inhibition die Aktivität von Signalwegen moduliert werden, am stärksten wurde hierbei die AKT<sup>Ser473</sup>, mTOR<sup>Ser2448</sup> und RICTOR<sup>Thr1135</sup> Phosphorylierung gehemmt. Hingegen wurde in unserer Untersuchung die Expression von HIF-1a, HIF-2a und c-Myc nicht durch BKM120 beeinflusst. Ein deutlicher Effekt konnte auf die Expression von VEGF-A, PDGF-B und MDR-1 festgestellt werden.

BKM120 zeigt *in vitro* einen signifikanten Einfluss auf Teilbereiche der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von BKM120 und dem Mutationsstatus der Tumorzellen ließ sich jedoch nicht nachweisen.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cDNA	<i>engl.:</i> complementary deoxyribonucleic acid
CT	Computertomographie
DFX	Deferroxamin
DMEM	<i>engl.:</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	<i>engl.:</i> epidermal growth factor
EGFR	<i>engl.:</i> epidermal growth factor receptor
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	<i>engl.:</i> extracellular-signal regulated kinase
FCS	<i>engl.:</i> fetal calf serum
HIF-1 $\alpha$	<i>engl.:</i> hypoxia-inducible factor 1-alpha
HIF-2 $\alpha$	<i>engl.:</i> hypoxia-inducible factor 2-alpha
IGF-I	<i>engl.:</i> insulin-like growth factor-I
IGF-IR	<i>engl.:</i> insulin-like growth factor-I receptor
MAPK	<i>engl.:</i> mitogen-activated protein kinase
MDR-1	<i>engl.:</i> multidrug-resistance-protein-1
MEK	<i>engl.:</i> mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
mTORC1	<i>engl.:</i> mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2	<i>engl.:</i> mammalian Target of Rapamycin Complex 2
mTOR	<i>engl.:</i> mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCA	duktales Adenokarzinom des Pankreas

---

PDGF-B	<i>engl.</i> : platelet-derived growth factor-B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
RICTOR	<i>engl.</i> : rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNA	<i>engl.</i> : ribonucleid acid
RPMI	<i>engl.</i> : Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGK1	<i>engl.</i> : serum and glucocorticoid-regulated kinase 1
SGK3	<i>engl.</i> : serum and glucocorticoid-regulated kinase 3
SRM	serumreduziertes Medium
VEGF	<i>engl.</i> : vascular endothelial growth factor
VEGF-A	<i>engl.</i> : vascular endothelial growth factor-A
VM	Vollmedium
WT	Wildtyp

## 8 Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(1):10–29.
2. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010; 2013. Available from: URL: [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/krebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile).
3. Elli M, Piazza E, Franzone PC, Isabella L, Poliziani D, Taschieri AM. Considerations on early diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Hepatogastroenterology* 2003; 50(54):2205–7.
4. Karlson BM, Ekbom A, Lindgren PG, Källskog V, Rastad J. Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis. *Radiology* 1999; 213(1):107–11.
5. Hessel SJ, Siegelman SS, McNeil BJ, Sanders R, Adams DF, Alderson PO et al. A prospective evaluation of computed tomography and ultrasound of the pancreas. *Radiology* 1982; 143(1):129–33.
6. Adamek HE, Albert J, Breer H, Weitz M, Schilling D, Riemann JF. Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *Lancet* 2000; 356(9225):190–3.
7. Guo X, Cui Z, Hu Z. Role of endoscopic ultrasound in treatment of pancreatic cancer. *Endosc Ultrasound* 2013; 2(4):181–9.
8. Cwik G, Wallner G, Skoczylas T, Ciechanski A, Zinkiewicz K. Cancer antigens 19-9 and 125 in the differential diagnosis of pancreatic mass lesions. *Arch Surg* 2006; 141(10):968.
9. Castellanos JA, Merchant NB. Intensity of follow-up after pancreatic cancer resection. *Ann Surg Oncol* 2014; 21(3):747–51.
10. Lin P-W, Shan Y-S, Lin Y-J, Hung C-J. Pancreaticoduodenectomy for pancreatic head cancer: PPPD versus Whipple procedure. *Hepatogastroenterology* 2005; 52(65):1601–4.

11. Kayahara M, Nagakawa T, Ueno K, Ohta T, Kitagawa H, Arakawa H et al. Distal pancreatectomy--does it have a role for pancreatic body and tail cancer. *Hepatogastroenterology* 1998; 45(21):827–32.
12. Shoup M, Conlon KC, Klimstra D, Brennan MF. Is extended resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas justified? *J Gastrointest Surg* 2003; 7(8):946.
13. Wilkowski R, Wolf M, Heinemann V. Primary advanced unresectable pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res* 2008; 177:79–93.
14. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA* 2010; 304(10):1073–81.
15. Vera R, Dotor E, Feliu J, González E, Laquente B, Macarulla T et al. SEOM Clinical Guideline for the treatment of pancreatic cancer (2016). *Clin Transl Oncol* 2016; 18(12):1172–8.
16. Hoff DD von, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013; 369(18):1691–703.
17. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011; 364(19):1817–25.
18. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54(13):3568–73.
19. Bournet B, Buscail C, Muscari F, Cordelier P, Buscail L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur J Cancer* 2016; 54:75–83.
20. Rishi A, Goggins M, Wood LD, Hruban RH. Pathological and molecular evaluation of pancreatic neoplasms. *Semin Oncol* 2015; 42(1):28–39.
21. Steele RJ, Thompson AM, Hall PA, Lane DP. The p53 tumour suppressor gene. *Br J Surg* 1998; 85(11):1460–7.

22. Lu L, Zeng J. Evaluation of K-ras and p53 expression in pancreatic adenocarcinoma using the cancer genome atlas. *PLoS One* 2017; 12(7):e0181532.
23. Ansari D, Chen B-C, Dong L, Zhou M-T, Andersson R. Pancreatic cancer: Translational research aspects and clinical implications. *World J Gastroenterol* 2012; 18(13):1417–24.
24. Guo M, Jia Y, Yu Z, House MG, Esteller M, Brock MV et al. Epigenetic changes associated with neoplasms of the exocrine and endocrine pancreas. *Discov Med* 2014; 17(92):67–73.
25. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20(10):1218–49.
26. Stein RC. Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(3):237–48.
27. Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(1):7–24.
28. Vogt PK, Hart JR, Gymnopoulos M, Jiang H, Kang S, Bader AG et al. Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 347:79–104.
29. Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(5):329–41.
30. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(12):921–9.
31. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annual Review of Pathology* 2009:127–50.
32. Mazza S, Maffucci T. Class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha: What we learned so far. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2(2):168–82.
33. Jaber N, Zong W-X. Class III PI3K Vps34: Essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1280:48–51.
34. Xia C, Meng Q, Cao Z, Shi X, Jiang B-H. Regulation of angiogenesis and tumor growth by p110 alpha and AKT1 via VEGF expression. *J Cell Physiol* 2006; 209(1):56–66.

35. Hirsch E, Ciraolo E, Franco I, Ghigo A, Martini M. PI3K in cancer-stroma interactions: bad in seed and ugly in soil. *Oncogene* 2014; 33(24):3083–90.
36. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; 144(5):646–74.
37. Edling CE, Selvaggi F, Buus R, Maffucci T, Di Sebastiano P, Friess H et al. Key role of phosphoinositide 3-kinase class IB in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(20):4928–37.
38. Sun C, Rosendahl AH, Andersson R, Wu D, Wang X. The role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2011; 11(2):252–60.
39. Melstrom LG, Salabat MR, Ding X-Z, Milam BM, Strouch M, Pelling JC et al. Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 2008; 37(4):426–31.
40. Hung SW, Mody HR, Govindarajan R. Overcoming nucleoside analog chemoresistance of pancreatic cancer: a therapeutic challenge. *Cancer Lett* 2012; 320(2):138–49.
41. Maira S-M, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2012; 11(2):317–28.
42. Koul D, Fu J, Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N et al. Antitumor activity of NVP-BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res* 2012; 18(1):184–95.
43. Yap TA, Bjerke L, Clarke PA, Workman P. Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies. *Curr Opin Pharmacol* 2015; 23:98–107.
44. Burger MT, Pecchi S, Wagman A, Ni Z-J, Knapp M, Hendrickson T et al. Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2(10):774–9.
45. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010; 39(4):425–35.

46. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994; 58(2):185–91.
47. Walters DM, Lindberg JM, Adair SJ, Newhook TE, Cowan CR, Stokes JB et al. Inhibition of the growth of patient-derived pancreatic cancer xenografts with the MEK inhibitor trametinib is augmented by combined treatment with the epidermal growth factor receptor/HER2 inhibitor lapatinib. *Neoplasia* 2013; 15(2):143–55.
48. Li Y-J, Wei Z-M, Meng Y-X, Ji X-R. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: Relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(14):2117–23.
49. Guan Y, Reddy KR, Zhu Q, Li Y, Lee K, Weerasinghe P et al. G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1alpha and HIF-2alpha and block tumor growth. *Mol Ther* 2010; 18(1):188–97.
50. Lou E, Subramanian S, Steer CJ. Pancreatic cancer: Modulation of KRAS, MicroRNAs, and intercellular communication in the setting of tumor heterogeneity. *Pancreas* 2013; 42(8):1218–26.
51. Kang R, Hou W, Zhang Q, Chen R, Lee YJ, Bartlett DL et al. RAGE is essential for oncogenic KRAS-mediated hypoxic signaling in pancreatic cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5:e1480.
52. Mosquera C, Maglic D, Zervos EE. Molecular targeted therapy for pancreatic adenocarcinoma: A review of completed and ongoing late phase clinical trials. *Cancer Genet* 2016.
53. Alagesan B, Contino G, Guimaraes AR, Corcoran RB, Deshpande V, Wojtkiewicz GR et al. Combined MEK and PI3K inhibition in a mouse model of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(2):396–404.
54. Passacantilli I, Capurso G, Archibugi L, Calabretta S, Caldarola S, Loreni F et al. Combined therapy with RAD001 e BEZ235 overcomes resistance of PET immortalized cell lines to mTOR inhibition. *Oncotarget* 2014; 5(14):5381–91.
55. Ren H, Chen M, Yue P, Tao H, Owonikoko TK, Ramalingam SS et al. The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2012; 325(2):139–46.

56. Roper J, Sinnamon MJ, Coffee EM, Belmont P, Keung L, Georgeon-Richard L et al. Combination PI3K/MEK inhibition promotes tumor apoptosis and regression in PIK3CA wild-type, KRAS mutant colorectal cancer. *Cancer Lett* 2014; 347(2):204–11.
57. Jin L, Jin M-H, Nam A-R, Park J-E, Bang J-H, Oh D-Y et al. Anti-tumor effects of NVP-BKM120 alone or in combination with MEK162 in biliary tract cancer. *Cancer Lett* 2017; 411:162–70.
58. Speranza M-C, Nowicki MO, Behera P, Cho C-F, Chiocca EA, Lawler SE. BKM-120 (Buparlisib): A Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase Inhibitor with Anti-Invasive Properties in Glioblastoma. *Sci Rep* 2016; 6:20189.
59. Kanteti R, Riehm JJ, Dhanasingh I, Lennon FE, Mirzapioazova T, Mambetsariev B et al. PI3 Kinase Pathway and MET Inhibition is Efficacious in Malignant Pleural Mesothelioma. *Sci Rep* 2016; 6:32992.
60. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res* 2013; 5:281–92.
61. Furukawa T. Impacts of activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in pancreatic cancer. *Front Oncol* 2015; 5:23.
62. Park E, Park J, Han S-W, Im S-A, Kim T-Y, Oh D-Y et al. NVP-BKM120, a novel PI3K inhibitor, shows synergism with a STAT3 inhibitor in human gastric cancer cells harboring KRAS mutations. *Int J Oncol* 2012; 40(4):1259–66.
63. Liu W-L, Gao M, Tzen K-Y, Tsai C-L, Hsu F-M, Cheng A-L et al. Targeting Phosphatidylinositide3-Kinase/Akt pathway by BKM120 for radiosensitization in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2014; 5(11):3662–72.
64. Pereira JKN, Machado-Neto JA, Lopes MR, Morini BC, Traina F, Costa FF et al. Molecular effects of the phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 on T and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2015; 51(14):2076–85.
65. García-Martínez JM, Wullschleger S, Preston G, Guichard S, Fleming S, Alessi DR et al. Effect of PI3K- and mTOR-specific inhibitors on spontaneous B-cell follicular lymphomas in PTEN/LKB1-deficient mice. *Br J Cancer* 2011; 104(7):1116–25.
66. Bago R, Sommer E, Castel P, Crafter C, Bailey FP, Shpiro N et al. The hVps34-SGK3 pathway alleviates sustained PI3K/Akt inhibition by stimulating mTORC1 and tumour growth. *EMBO J* 2016; 35(17):1902–22.

67. Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M et al. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2006; 66(23):11263–70.
68. Chen X, Zhao M, Hao M, Sun X, Wang J, Mao Y et al. Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates compensatory AKT activation and improves tamoxifen response in breast cancer. *Mol Cancer Res* 2013; 11(10):1269–78.
69. Cardnell RJ, Feng Y, Mukherjee S, Diao L, Tong P, Stewart CA et al. Activation of the PI3K/mTOR Pathway following PARP Inhibition in Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2016; 11(4):e0152584.
70. Berardi R, Morgese F, Torniai M, Savini A, Partelli S, Rinaldi S et al. Medical treatment for gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumours. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8(4):389–401.
71. Nath S, Daneshvar K, Roy LD, Grover P, Kidiyoor A, Mosley L et al. MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis* 2013; 2:e51.
72. Wagner B, Gorin Y. Src tyrosine kinase mediates platelet-derived growth factor BB-induced and redox-dependent migration in metanephric mesenchymal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306(1):F85-97.
73. Hu Y, Guo R, Wei J, Zhou Y, Ji W, Liu J et al. Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells. *Cell Death Dis* 2015; 6:e2020.
74. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; 18(16):4266–76.
75. Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals*; 2010(3):572–99.
76. Cao J, Yang J, Ramachandran V, Arumugam T, Deng D, Li Z et al. TM4SF1 Promotes Gemcitabine Resistance of Pancreatic Cancer In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 2015; 10(12):e0144969.

77. Ando Y, Inada-Inoue M, Mitsuma A, Yoshino T, Ohtsu A, Suenaga N et al. Phase I dose-escalation study of buparlisib (BKM120), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Sci* 2014; 105(3):347–53.
78. Vansteenkiste JF, Canon J-L, Braud F de, Grossi F, Pas T de, Gray JE et al. Safety and Efficacy of Buparlisib (BKM120) in Patients with PI3K Pathway-Activated Non-Small Cell Lung Cancer: Results from the Phase II BASALT-1 Study. *J Thorac Oncol* 2015; 10(9):1319–27.
79. Bedard PL, Tabernero J, Janku F, Wainberg ZA, Paz-Ares L, Vansteenkiste J et al. A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2015; 21(4):730–8

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Thomas Körtl
Geburtsdatum und -ort	06.05.1993 in Schwandorf
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Religion	römisch-katholisch

### Schul- und Hochschulausbildung

09/2003-07/2011	Carl-Friedrich-Gauß Gymnasium Schwandorf Abschluss: Abitur
10/2011-09/2013	Vorklinischer Abschnitt Universität Regensburg
10/2013-	Klinischer Abschnitt Universität Regensburg

### Praktisches Jahr

05/2017-09/2017	Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg
09/2017-10/2017	Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg
10/2017-12/2017	Chirurgie, Karapitiya Teaching Hospital, Galle, Sri Lanka
12/2017-04/2018	Innere Medizin, Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg

### Promotion

Ab 05/2014	„PI3K-Inhibition im Pankreaskarzinommodell“ (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sven A. Lang, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Freiburg, Prof. Dr. E. K. Geissler, Lehrstuhl für experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg)
------------	--

## 10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Sven A. Lang für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, für die exzellente Betreuung sowie für die stetige Unterstützung danken. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Ermöglichung der Präsentation meiner Daten während der Chirurgischen Forschungstage 2015 bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Julia Redekopf und Christine Wagner, die bei der praktischen Durchführung der Experimente eine sehr große Hilfe waren und ohne die ich die Arbeit im Labor nicht hätte bewerkstelligen können.

Zudem gilt mein Dank Dr. Katharina Schmidt und Marvin Anders für ihre stets hilfreichen Ratschläge und ihre Unterstützung.

Bei Prof. Edward K. Geissler, PhD, dem Leiter der experimentellen Chirurgie, sowie Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, bedanke ich mich für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich bei der Anfertigung der Dissertation unterstützt und motiviert haben und die mir während meines gesamten Studiums ein großer Rückhalt waren.

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.