

Aus der Klinik für Urologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Jocham

Inhibition des *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) als mögliches Therapiekonzept
des Urothelkarzinoms der Harnblase und der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Medizinischen Sektion -

Lübeck 2011

vorgelegt von

Fiona Schedel

aus Isernhagen

Meinen Eltern gewidmet

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Fritz Keck

Tag der mündlichen Prüfung: 11.1.2013

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 11.1.2013

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	8
1.1 UROTHELKRZINOME DER BLASE.....	8
1.2 PLATTENEPITHELKRZINOME DES KOPF-HALS-BEREICHES (HNSCC)	8
1.3 MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN (MTOR).....	9
1.4 DAS RAPAMYCIN-DERIVAT TEMSIROLIMUS	13
1.5 SMALL INTERFERING RNA (SIRNA).....	14
1.6 FRAGESTELLUNG.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 <i>Laborgeräte</i>	18
2.1.2 <i>Puffer und Lösungen</i>	19
2.1.3 <i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	19
2.1.4 <i>Zelllinien</i>	20
2.1.5 <i>Antikörper</i>	21
2.1.6 <i>Primer-Sequenzen</i>	22
2.1.7 <i>Verwendete siRNAs</i>	22
2.2 METHODEN	23
2.2.1 <i>Zellkultur</i>	23
2.2.2 <i>RT-PCR</i>	24
2.2.3 <i>Proteinbiochemie</i>	25
2.2.4 <i>Transfektion von siRNAs</i>	28
2.2.5 <i>Durchflusszytometrie</i>	29
2.2.6 <i>MTT-Test</i>	32
2.2.7 <i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	33
3 ERGEBNISSE	36
3.1 EXPRIEMIERUNG VON MTOR IN UROTHELKRZINOM- UND HNSCC-ZELLINIEN	36
3.2 EINFLUSS VON SIRNA AUF MTOR- UND AKTIVIERTES MTOR-PROTEIN	37
3.3 EINFLUSS VON TEMSIROLIMUS UND SIRNA AUF DIE ZELLVIABILITÄT.....	41
3.4 EINFLUSS VON TEMSIROLIMUS UND SIRNA AUF DIE ZELLPROLIFERATION UND MTOR-AKTIVIERUNG	49
3.5 EINFLUSS VON TEMSIROLIMUS UND SIRNA AUF DEN ZELLZYKLUS UND APOPTOSEINDUKTION	54
4 DISKUSSION	58
4.1 MTOR-EXPRESSION UND -AKTIVIERUNG IN UROTHELZELLKRZINOM- UND HNSCC-ZELLINIEN.....	58
4.2 MTOR-INHIBITION: SEQUENZSPEZIFISCHE SIRNAS UND TEMSIROLIMUS.....	59
4.3 KOMBINATION VON TEMSIROLIMUS UND CISPLATIN	67
4.4 AUSBLICK	69
5 ZUSAMMENFASSUNG	71
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	72
7 DANKSAGUNG	80
8 LEBENS LAUF	81
9 PUBLIKATIONS LISTE	83

Keywords: bladder cancer, HNSCC, Temsirolimus, siRNA, mTOR

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua dest.	deionisiertes Wasser
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Aufl.	Auflage
Bd.	Band
BP	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FRB	FKBP12-Rapamycin <i>binding</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GβL	<i>G-protein β-subunit like protein</i>
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
IC ₂₅	Konzentration, bei der 25% der Zellen im Wachstum gehemmt werden
IC ₅₀	halbmaximale wachstums-inhibierende Konzentration
mLST8	<i>mammalian LST8</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	mTOR-Komplex 1
mTORC2	mTOR-Komplex 2
mRNA	<i>messenger-RNA</i>

MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
pmTOR/ phospho-mTOR	<i>phosphorylated mammalian target of rapamycin</i>
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute
RISC	<i>RNA-induced silencing-complex</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>sideward scatter (Seitwärtsstreulicht)</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
WB	Westernblot

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Urothelkarzinome der Blase

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigsten malignen Tumorarten. Die Inzidenz variiert weltweit stark und zeigt die höchsten Erkrankungsraten in den hoch entwickelten Ländern. In den Vereinigten Staaten treten jedes Jahr geschätzte 70 980 neu diagnostizierte Fälle auf (Jemal et al., 2009), in der Europäischen Union sind es geschätzte 110 529 (ECO, European Cancer Observatory, 2008). Jährlich sterben weltweit über 130 000 Menschen an einem Harnblasenkarzinom (vom Dorp et al., 2009). Der Goldstandard zur Behandlung von muskelinvasiven Urothelkarzinomen (definiert als >T1 nach der TNM-Klassifikation (UICC, Union for International Cancer Control)) ist die radikale Zystektomie, eine Alternative stellt die Radiochemotherapie dar. Während die 5-Jahresüberlebensrate für Patienten mit lokal beschränkten, muskelinvasiven Tumoren nach Zystektomie etwa 80% beträgt, liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei Vorliegen eines Tumors im Stadium T3a nach Zystektomie nur bei 20-43% und bei lymphknotenpositiven Patienten lediglich bei 17-35 % (Kausch et al., 2006). Patienten im metastasierten Stadium haben eine mittlere Überlebenszeit von 3-6 Monaten. Hierbei stellt laut Literatur die Cisplatin-basierte Chemotherapie mit 10-50% Komplettremissionen die derzeit beste Behandlungsmöglichkeit dar. Die Steigerung der Überlebensrate beträgt jedoch weniger als 4 Monate (Kausch und Jocham, 2007).

Es besteht daher ein erheblicher Bedarf, sowohl die Behandlung von metastasierten Urothelkarzinomen zu verbessern als auch organsparende Therapien zu entwickeln, die seltener die Indikation zur radikalen Zystektomie erfordern.

1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (*head and neck squamous cell carcinoma*, abgekürzt HNSCC) stehen hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens an sechster Stelle weltweit mit geschätzten 35 720 jährlich neu diagnostizierten Fällen in den Vereinigten Staaten (Jemal et al., 2009) und 66 553 in Europa (ECO, European Cancer Observatory, 2009), bezogen auf Tumore der Mundhöhle und des Pharynx. Die Bezeichnung HNSCC beinhaltet epitheliale Tumore der Nasen- und Mundhöhle, des Pharynx und Larynx. Betroffen sind überwiegend Menschen im mittleren Lebensalter mit Alkohol- oder Nikotinkonsum (Guénel et al., 1988; Vineis et al., 2004). In den letzten Jahrzehnten haben sich die Therapieoptionen für HNSCC deutlich verändert. Durch den Einsatz von multimodaler Therapie und Verbesserungen der chirurgischen und

strahlentherapeutischen Techniken konnte die Lebensqualität der Patienten deutlich erhöht werden.

Die operative Entfernung und die Radiotherapie stellen die wichtigsten Therapiemodalitäten bei HNSCC dar (Haddad und Shin, 2008). Die Chemotherapie erhöht durch radio-sensibilisierende Wirkung bei lokal fortgeschrittenen Tumoren das Überleben (Adelstein et al., 2003; Cohen et al., 2004). Bei noch wenig fortgeschrittenen Tumoren wird die Operation vorgezogen. Eine Alternative bei Larynxkarzinomen stellt die organerhaltende Radiotherapie dar (Jones et al., 2004). Bei nicht resezierbaren HNSCC ist die Radiochemotherapie mit Cisplatin die Standardtherapie und zeigt bessere Überlebensraten als eine alleinige Radiotherapie (Adelstein et al., 2003). Auch bereits operierte Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren und hohen Risikofaktoren können von begleitenden Chemotherapien bei postoperativer Bestrahlung profitieren (Bernier et al., 2004). Insgesamt erhöht der zusätzliche Einsatz von Chemotherapeutika zu den anderen Therapiemodalitäten die Überlebensrate um 6,5 % nach fünf Jahren (Pignon et al., 2009).

Trotz des Einsatzes dieser Therapieregime ist die 5-Jahres-Überlebensrate weiterhin niedrig und hat sich im Laufe der letzten Jahre kaum verändert. Patienten mit rezidivierendem und/oder metastasiertem HNSCC haben eine mittlere Überlebenszeit von etwa 6 Monaten. Die Ansprechrate auf eine Monotherapie mit Cytostatika beträgt 15-30 %. Mit Kombinationstherapien konnten zwar höhere Ansprechraten erzielt werden, jedoch keine signifikante Verlängerung des Überlebens (Chin et al., 2004).

Insbesondere Zellen des Kopf-Hals-Bereiches sind dafür bekannt, molekulare Strategien zu entwickeln, um der Antitumor-Antwort des Immunsystems zu entgehen. Es wird angenommen, dass die Produktion von verschiedenen immunsuppressiven Mediatoren hierzu beiträgt. Jedoch bleibt die molekulare Ursache für diesen malignen Transformationsprozess und die Entwicklung einer immunsupprimierten Umgebung von HNSCC weitgehend unbekannt (Mann et al., 1992; Woods et al., 1998; Chen et al., 1999; Douglas et al., 2004; Pries und Wollenberg, 2006; Pries et al., 2006).

1.3 Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)

In den letzten Jahren wurden neue Schlüssel-moleküle von Signaltransduktionswegen entdeckt, die das Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und tumor-assoziierte Prozesse wie Angiogenese und Metastasierung steuern. Das Molekül *mammalian target of rapamycin* (mTOR) hat

besonderes Interesse geweckt, da es eine zentrale Rolle bei diesen Steuerungsmechanismen spielt und dessen Inhibition bereits bei einigen Tumorentitäten klinische Wirksamkeit zeigt (Hudes et al., 2007; Dreyling et al., 2010). Seinen Namen erhielt mTOR, als die antiproliferative Wirkung des ursprünglich als Antipilzmittel und Immunsuppressivum verwendeten Rapamycins erforscht wurde. Das Zielprotein von Rapamycin, das für diese antiproliferative Wirkung verantwortlich ist, wurde mammalian target of Rapamycin genannt (Abraham und Gibbons, 2007).

mTOR ist der Gruppe der Serin-Threonin-Proteinkinasen der PI3K-Familie zugehörig und Bestandteil des Phosphatidylinositol 3-Kinase PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges (Abbildung 1). AKT ist eine für diesen Signaltransduktionsweg zentrale Serin-Threonin-Proteinkinase, die über andere Proteine die Aktivität von mTOR-Komplex-1 steuert (Abraham und Gibbons, 2007).

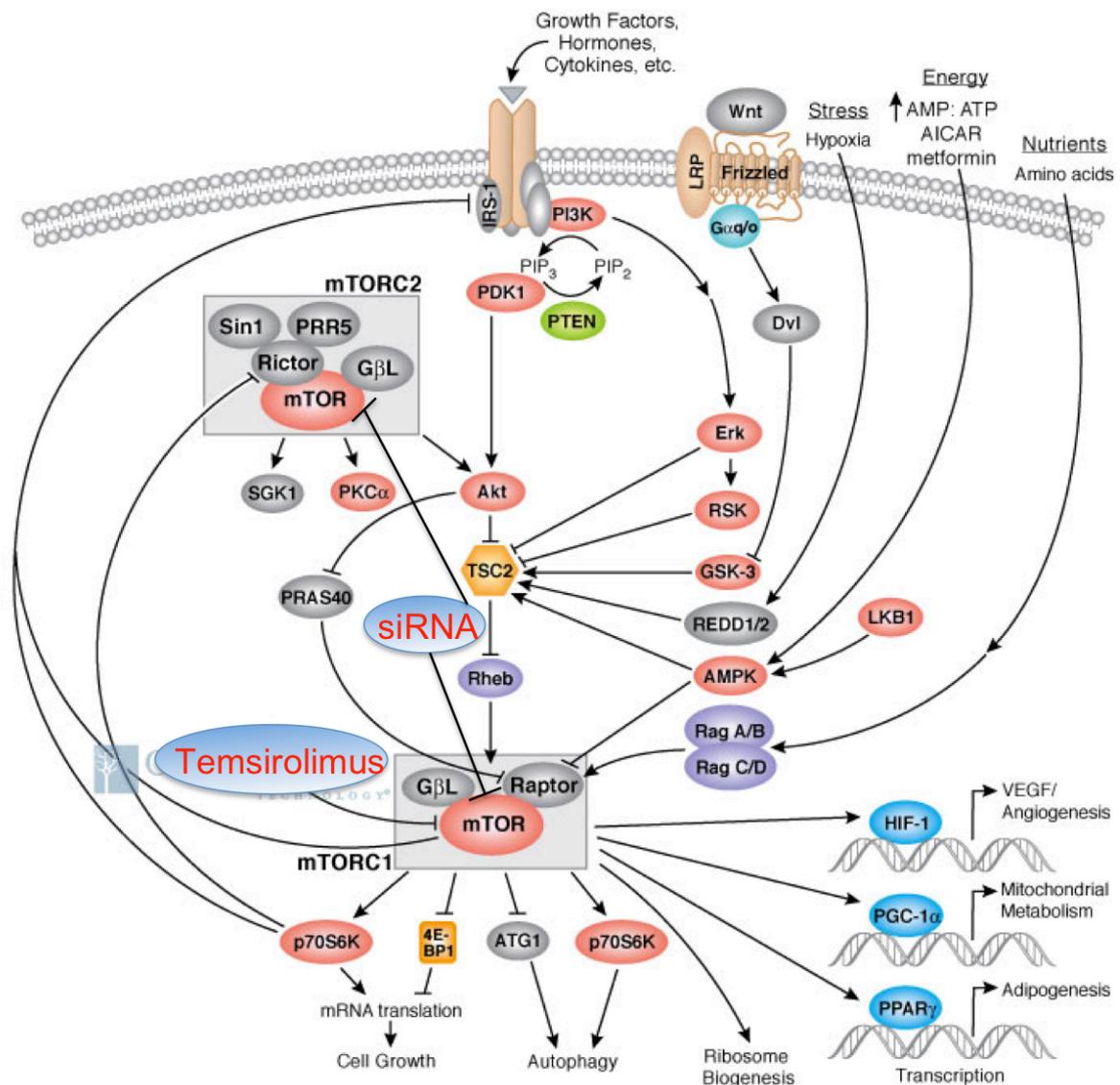


Abbildung 1 Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg

Der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg steuert über mTOR-Komplexe Zellwachstum und -überleben. Temsirolimus hemmt spezifisch mTOR-Komplex 1 (mTORC1), mTOR-siRNA hemmt sowohl mTORC1 als auch mTORC2.

(modifiziert nach: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/mTor.html>)

Es sind bisher zwei verschiedene mTOR-Komplexe bekannt, die sich beide im Zytosol befinden.

Der mTOR-Komplex 1 (mTORC1) setzt sich aus mTOR, regulatory associated protein of mTOR (Raptor) und mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein (mLST8/G β L) zusammen. Dieser mTORC1 kontrolliert über die Phosphorylierung von den beiden Translationsfaktoren eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) und p70 S6 Kinase (p70 S6K) Tumorzellwachstum und Angiogenese. Die Aktivität von mTORC1 ist abhängig von Wachstumsfaktoren, Stresssignalen und dem Energiezustand des Organismus und wird über den PI3K/AKT-Weg gesteuert. Direkt

übergeordnet wird mTORC1 durch Rheb-GTP und PRAS 40, ein durch Insulin reguliertes Protein (Sancak et al., 2007), aktiviert beziehungsweise gehemmt. Der mTORC1 kann spezifisch durch Rapamycin-Derivate, also Moleküle wie beispielsweise Temsirolimus, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Rapamycin aufweisen, inhibiert werden (Abraham und Gibbons, 2007).

Der mTOR-Komplex 2 (mTORC2) besteht aus mTOR, rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), GβL und mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1). Der mTORC2 reguliert die Dynamik des Zytoskeletts und aktiviert außerdem AKT an der Position Ser 473. Dieser Komplex kann im Gegensatz zu mTORC1 nicht durch Rapamycin oder Rapamycin-Derivate gehemmt werden (Abraham und Gibbons, 2007). mTOR-siRNAs sind jedoch in der Lage sowohl mTORC1 als auch mTORC2 zu hemmen.

Die aktivierte Form von mTOR liegt phosphoryliert vor und wird daher auch als phospho-mTOR oder pmTOR bezeichnet (Brown et al., 1995).

Eine Fehlregulierung dieses PI3K-Signaltransduktionsweges kann onkogen wirken und wurde bereits für mehreren Tumorentitäten, wie beispielsweise Mammakarzinome, beschrieben (Dancey, 2006; Arslan et al., 2006; Georgakis und Younes, 2006).

In vielen Harnblasentumoren wurden unabhängig von Differenzierungsgrad und Stadium des Tumors Veränderungen im PI3K-Weg gefunden (Knowles et al., 2009). Dies ist ein wichtiger Aspekt, da diese Veränderungen die Sensitivität für eine mTOR-Inhibition deutlich erhöhen können. Weiterhin könnte von klinischer Relevanz sein, welche Tumorentitäten mit welchen Mutationen besonders gut auf die mTOR-Inhibition ansprechen. Die Mutationen finden sich beim Harnblasenkarzinom in folgenden Genen:

- PIK3CA-Gen: kodiert für das Protein p110 α , die katalytische Untereinheit von PI3K. Es wurden in 27 % (Platt et al., 2009) beziehungsweise 13 % (Lopez-Knowles et al., 2006) der untersuchten Urothelkarzinome Mutationen mit einer signifikanten Assoziation zu *low-grade* und *low-stage* Tumoren gefunden.
- PTEN-Gen: kodiert für die Phosphatase PTEN, welche die Produkte der PI3K dephosphoryliert und somit PI3K negativ reguliert. Deletionen des PTEN-Gens wurden in 24-58% der invasiven Urothelkarzinome, aber nur selten in *low-grade* papillären Tumoren gefunden (Cappellen et al., 1997; Kagan et al., 1998; Aveyard et al., 1999). Neuere Studien konnten bestätigen, dass auch die Expression des PTEN-Proteins in invasiven Urothelkarzinomen stärker reduziert ist als in papillären Tumoren (Tsuruta et al., 2006; Platt et al., 2009; Puzio-Kuter et al., 2009).

- AKT1-Gen: Mutationen sind in 4,8 % der 44 untersuchten Urothelkarzinom-Zelllinien zu finden und in 2,7 % der 184 untersuchten Blasenkarzinome (Askham et al., 2009).
- TSC1-Gen: aktuelle Studien zeigen eine Mutationsfrequenz von insgesamt 14,5% in Urothelkarzinomen (Knowles et al., 2009).
- Es wird vermutet, dass weitere Mutationen in Genen vorliegen, die für Proteine kodieren, die dem PI3K-Weg vorgeschaltet sind, wie beispielsweise Rezeptortyrosinkinasen und RAS (Knowles et al., 2009).

Die genetischen Veränderungen des PI3K-Signaltransduktionsweges sind bei HNSCC deutlich weniger untersucht als bei Urothelkarzinomen. *Pedrero et al.* (2005) untersuchten 117 Primärtumoren. Das PIK3CA-Gen liegt in 37 % der untersuchten Tumoren amplifiziert vor, das AKT-2-Gen in 30 %. In 47 % der Tumoren wurde zumindest eine molekulare Alteration im PI3K-Signaltransduktionsweg gefunden.

1.4 Das Rapamycin-Derivat Temsirolimus

Zur mTOR-Inhibition können verschiedene Rapamycin-Derivate wie beispielsweise Everolimus (RAD001), Ridaforolimus (AP23573) oder Temsirolimus (CCI-779) eingesetzt werden. Rapamycin ist ein Antimykotikum (Vézina et al., 1975), das an die FKBP-12-Rapamycin bindende (FRB) Domäne von mTORC1 bindet und nachfolgende Signaltransduktionswege blockiert (Brown et al., 1994). Obwohl Rapamycin eine vielversprechende Substanz in der Behandlung von Tumoren darstellt (Bjornsti und Houghton, 2004), limitieren die pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanz ihren Einsatz. Hierzu zählen geringe Wasserlöslichkeit, geringe Bioverfügbarkeit, ein hoher hepatischer *First-Pass-Effect* und eine komplexe Pharmakokinetik (Napoli und Taylor, 2001). Aus diesem Grund wurde Rapamycin chemisch modifiziert. Everolimus stellt ein oral besser verfügbares Rapamycin-Derivat dar. Temsirolimus ist eine Vorstufe (*prodrug*) von Rapamycin und wird nach intravenöser Applikation in Rapamycin umgewandelt. Es ist bereits zur Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms bei Patienten mit schlechter Prognose zugelassen (Leitlinie der European Association of Urologists (EAU), 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Temsirolimus-Monotherapie ein um 50 % erhöhtes Gesamtüberleben im Vergleich zur Standardtherapie mit Interferon-alpha haben (Hudes et al., 2006; Hudes et al., 2007). Auch in der Behandlung von Mantelzelllymphomen wird Temsirolimus bereits erfolgreich eingesetzt (Ansell et al., 2008) und ist für die Therapie bei refraktärem und rezidivierendem Mantelzelllymphom zugelassen (Dreyling et al., 2010). Temsirolimus zeigt im Allgemeinen eine gute klinische Verträglichkeit und wird einmal wöchentlich intravenös verabreicht. Als häufige Nebenwirkungen können reversible Hautausschläge, Herpes-simplex-

Reaktivierungen und Stomatitis auftreten. Die hauptsächlich dosislimitierende Nebenwirkung ist eine reversible Thrombozytopenie (Raymond et al., 2004).

Die Wirkung von Temsirolimus beruht auf folgendem Mechanismus: Es komplexiert intrazellulär mit dem FK506-*binding protein*. Dieser Komplex bindet an die FRB (FKBP12-Rapamycin *binding*)-Domäne von mTOR. Es handelt sich um eine allosterische Hemmung mit der Folge, dass die Phosphorylierung der S6-Kinase und von 4EBP-1 inhibiert wird (vergleiche Abbildung 1). FRB findet sich nur in den TOR-Proteinen, die im mTORC1 vorhanden sind, nicht jedoch im mTORC2. Daher wirkt Temsirolimus, wie auch andere Rapamycin-Derivate, sehr spezifisch (Abraham und Gibbons, 2007). Durch die Inhibition von mTORC1 wird sowohl die Translation von Zellzyklus-regulierenden Proteinen blockiert (Zellzyklus wird in der G₁-Phase gestoppt) als auch die Überexpression von angiogenetischen Faktoren verhindert und nimmt somit Einfluss auf das Tumorwachstum (Shor et al., 2008).

Beim Harnblasenkarzinom gibt es bisher noch keine Daten zum Einsatz von Temsirolimus, in der Literatur finden sich nur wenige Artikel zur mTOR-Inhibition mit anderen Rapamycin-Derivaten (Mansure et al., 2009; Pinto-Leite et al., 2009; Fechner et al., 2009; Chiong et al., 2011).

Auch für HNSCC finden sich in der Literatur bisher nur wenige Artikel mit präklinischen Daten zum Einsatz von Temsirolimus (Amornphimoltham et al., 2005; Jimeno et al., 2007).

1.5 Small interfering RNA (siRNA)

Einen weiteren Ansatz zur selektiven mTOR-Inhibition stellt die RNA-Interferenz durch Einsatz von *small interfering RNA* (siRNA) dar.

Das Prinzip des Gebrauchs von siRNAs ist es, eine sequenzspezifische mRNA-Degradation des Zielgens, in diesem Fall mTOR, durchzuführen. Die Degradation wird durch eine zur Zielsequenz homologe dsRNA induziert. Dieser Mechanismus ist entwicklungsgeschichtlich hochkonserviert und dient im Organismus der Eliminierung von fremder mRNA wie beispielsweise der von Virus-RNA (Phalon et al., 2010).

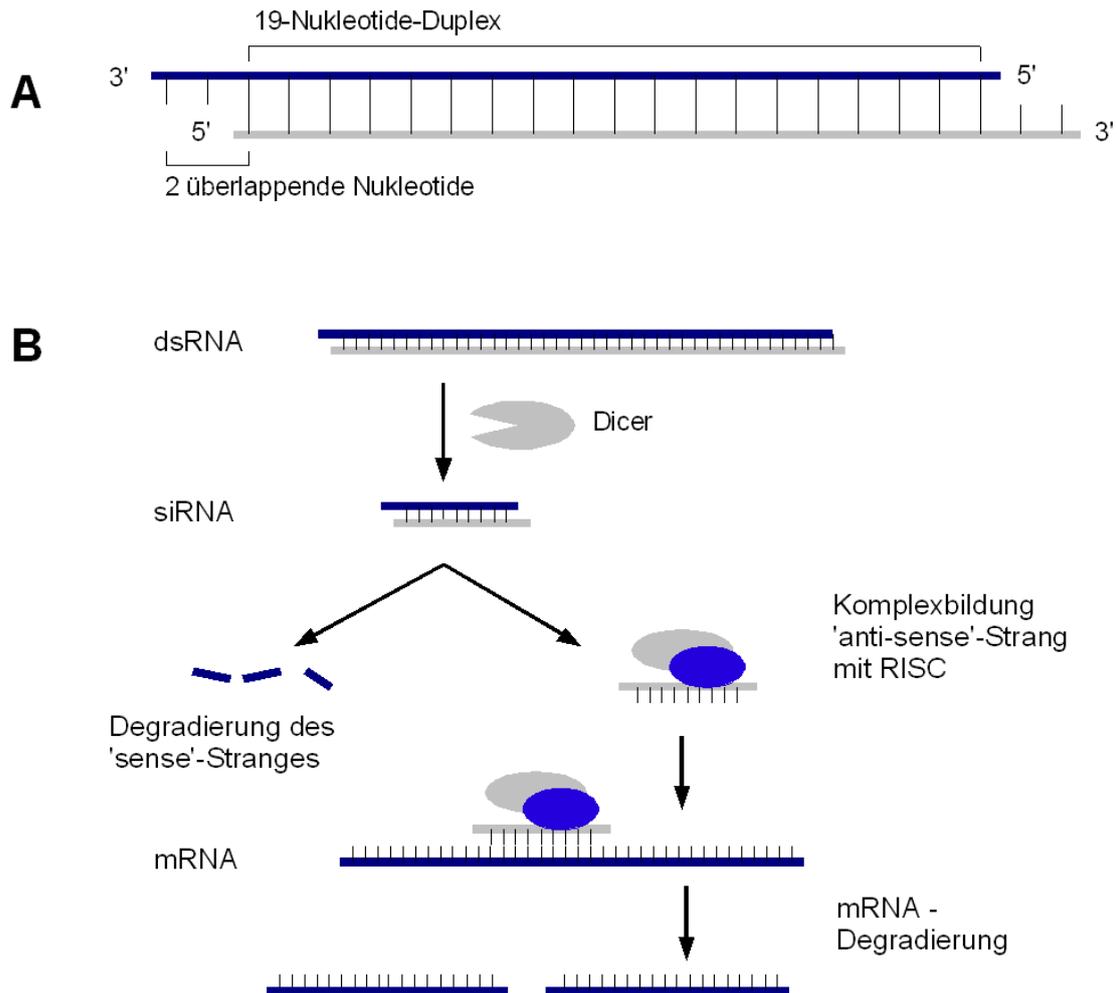


Abbildung 2 A: Struktur der siRNA und **2 B:** Mechanismus der RNA-Interferenz.

(Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1297619>)

In Zellen von Säugetieren wird dsRNA durch einen Enzymkomplex der RNase-III-Familie namens *Dicer* in 21-23 Basenpaar (BP) große RNA-Fragmente mit zwei unpaaren Nucleotiden am unphosphorylierten 3'-Ende gespalten (Abbildung 2). Diese siRNAs binden und aktivieren den RNA-induced silencing-complex (RISC) (Hammond et al., 2000). RISC zerstört den *Sense*-Strang der siRNA, dessen Sequenz mit der zelleigenen mRNA übereinstimmt. Der *Antisense*-Strang bleibt an RISC gebunden und kann durch komplementäre Basenpaarung spezifisch an die Ziel-mRNA binden. Passen die Sequenzen exakt zueinander, zerschneidet die Nuklease-Untereinheit *Slicer* die gebundene mRNA und setzt die Bruchstücke ins Zytoplasma frei, wo sie von zelleigenen RNAsen weiter degradiert werden (Sharp, 2001; Hannon, 2002). Synthetisch hergestellte 21 BP große siRNAs ahmen den "*Dicer*-Effekt" nach und können zur gezielten Manipulation der Genexpression in eukaryotischen Systemen eingesetzt werden (Elbashir et al., 2001).

1.6 Fragestellung

Der Erfolg der derzeitigen Therapien ist sowohl beim Harnblasenkarzinom als auch beim HNSCC nicht zufriedenstellend. Es besteht daher ein großer Bedarf an neuen Therapieansätzen. Ein Vorteil bei der Wahl einer bereits in der Praxis eingesetzten Substanz besteht darin, dass sowohl Nebenwirkungen als auch die Art der Anwendung bereits bekannt sind. Die Zeit, die zwischen den Ergebnissen im Labor und der klinischen Anwendung am Patienten vergeht, wäre auf diese Weise deutlich verkürzt. Das ebenfalls bei urologischen Tumoren (klarzelliges Nierenzellkarzinom) eingesetzte Temsirolimus, das auch bei nicht-urologischen Tumorentitäten intensiv erforscht wird, erscheint vielversprechend. siRNAs, die der Wirkung von Temsirolimus auf molekularer Ebene ähneln und mTOR sehr spezifisch hemmen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich untersucht. siRNA wird bei anderen Tumoren bereits klinisch eingesetzt und könnte somit als Therapieoption ebenfalls in Betracht gezogen werden (Ashihara et al., 2010).

Eine grundlegende Fragestellung war, ob mTOR-mRNA und mTOR-Protein in den untersuchten Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien exprimiert werden, um die molekulare Zielstruktur des Therapieansatzes der mTOR-Inhibition ausfindig zu machen. Wie vielversprechend ist die mTOR-Inhibition bei Urothelkarzinomen und HNSCC? Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die Stärke der mTOR-Expression dieser Tumorentitäten mit der von Nierenzellkarzinom-Zelllinien verglichen und die Expression von aktiviertem, phosphoryliertem mTOR (pmTOR) untersucht. Hauptsächliches Ziel war es dann herauszufinden, welchen Einfluss die mTOR-Inhibition mit Temsirolimus und siRNA auf die Aktivität von mTOR, die Zellviabilität, die Zellproliferation und den Zellzyklus hat und ob Apoptose induziert wird. Könnten Temsirolimus oder mTOR-siRNA einen wirksamen Therapieansatz bei diesen Tumorentitäten darstellen?

2 Material und Methoden

In der folgenden Tabelle sind die Fragestellungen mit den angewendeten Methoden zusammengefasst dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Fragestellung und verwendete Methoden

<i>Fragestellung</i>	<i>Methode</i>
<p>Ist mTOR-mRNA in Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien vorhanden?</p> <p>Wie stark ist die Expression im Vergleich zu anderen Zelllinien (z.B. zu Nierenzellkarzinom-Zelllinien)?</p>	RT-PCR
<p>Wird mTOR-Protein in Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien exprimiert?</p> <p>Welchen Einfluss haben mTOR-siRNAs auf die Expression von mTOR- und pmTOR-Protein?</p>	Westernblot
<p>Wie hoch ist die siRNA-Transfektionseffizienz?</p> <p>Welchen Einfluss haben Temsirolimus und siRNA auf den Zellzyklus?</p> <p>Wird Apoptose induziert?</p>	Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalysen (Histogramme)
<p>Wie wirken sich Temsirolimus und mTOR-siRNAs auf die Zellviabilität in den verschiedenen Zelllinien aus?</p>	MTT-Test
<p>Wie wirken sich Temsirolimus und mTOR-siRNAs auf die Proliferation und die Expression von mTOR und pmTOR aus?</p>	Fluoreszenzmikroskopie

Die Reihenfolge der Methoden und der Ergebnisse orientieren sich an der Reihenfolge der gezeigten Tabelle.

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2 *Verwendete Laborgeräte*

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Queue Systems, Asheville, N.C., USA
iCycler	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Cytospin 3	Shandon, Astmoor, England
Dunkelhaube	Biometra, Göttingen
FACS Canto	Becton Dickinson, NJ, USA
Feinwaage	KERN, Albstadt
Heizblock	Labnet, Woodbridge, NJ
Kühlzentrifuge 32R	Hettich, Tuttlingen
Kryokonservierungsgerät Mr. Frosty	Nalgene
Laborabzug CAPTAIR	Erlab
Laufkammer für Westernblot	Phase, Lübeck
Laufkammer Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Mikroplattenphotometer	Anthos labtec instruments, Salzburg
Mikroskop	Leitz/Diavert
Mikrowelle	Sharp
Netzgerät PowerPac 300	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Netzgerät PowerPac HC	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Neubauer Zählkammer	Assistent, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Rüttler Minishaker	IKA
Rüttler Mini Rocker MR-1	lab4you
Schüttler Vibramax 100	Heidolph
Semi-Dry-Blotting-Gerät	Phase, Lübeck
Tischzentrifuge Combi-Spin	lab4you
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Deutschland
Wasserbad	GFL
Zellkulturbank Microflow	Nulge Nunc International, Wiesbaden- Biebrich

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Lämmli-Puffer	125 mM Tris HCl, 30 % Glycerin, 8 % SDS, pH 6,8
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 nM 6-Aminohexansäure, 20 % MeOH
Anodenpuffer 1	30 mM Tris, 20 % MeOH
Anodenpuffer 2	300 mM Tris, 20 % MeOH
Laufpuffer	25 nM Tris, 192 nM Glycerin, 0,1 % SDS
Coomassie	0,1 % Coomassieblau, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure in aqua dest.
Amidoschwarz	0,1 % Amidoschwarz, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure in aqua dest.
TBS-Tween	140 mM NaCl, 53,6 mM KCl, 25 mM Tris pH 7,4, 0,1 % Tween

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 4 Zellkulturmedien und Zusätze mit Hersteller

<i>Medium/Zusatz</i>	<i>Hersteller</i>
Dimethylsulfonat (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Dulbecco's Phosphate Buffer (<i>phosphate-buffered saline</i> , PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamin 200 mM (100 x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Penicillin/Streptomycin (10000 U/10 mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Sodium Pyruvat (100 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
MEM	Gibco, Invitrogen
HEPES	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypsin-EDTA 0,05 % / 0,02 % in PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien

DSMZ = deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ATCC = American Type Culture Collection

Zelllinie	Histologie des Ausgangstumors	Bezug
T-24	Urothelkarzinom der Harnblase, Grad III, PTEN-Defekt (Knowles et al., 2009). Verdopplungszeit circa 48 h	DSMZ Referenzen: <i>Bubeník et al. (1970), Bubeník et al. (1973), Grimm et al. (1995)</i>
RT-4	Urothelkarzinom der Harnblase, papillär wachsend, Grad I. Verdopplungszeit circa 80 h	DSMZ Referenzen: <i>Rigby und Franks (1970), Marshall et al. (1977), Hastings und Franks (1981)</i>
EJ-28	Urothelkarzinom, invasiv (pT2), stark entdifferenziert, metastatisch, Mutationen in H-RAS und P 53. Verdopplungszeit circa 24 h	Urologische Klinik Dresden
J82	Urothelkarzinom der Harnblase, invasiv, stark entdifferenziert, PTEN-Defekt (Knowles et al., 2009)	ATCC, Nr.: HTB-1
PCI-1	humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	Pittsburg Cancer Institut; USA (Heo et al., 1989)
PCI-13	humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	Pittsburg Cancer Institut; USA (Heo et al., 1989)

BHY	humanes Plattenepithelkarzinom, Oropharynx (hochdifferenziert); adhärent	DSMZ #ACC404, Braunschweig
SKRC-47	Nierenzellkarzinom	<i>Ebert et al.</i> (1990)

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 6 Primärantikörper für Westernblot (WB) und Fluoreszenzmikroskopie (FM)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Wirt</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
anti-mTOR	Kaninchen	WB 1:2500, FM 1:250	Millipore, USA
pmTOR pS2448	Kaninchen	WB 1:2500, FM 1:500	Rockland, Hamburg
anti-β-Actin	Maus	1:5000	Calbiochem, Deutschland
anti-Ki-67	Maus	1:100	Dako, United Kingdom

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7 Sekundärantikörper für Westernblot und Fluoreszenzmikroskopie

<i>Methode</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Wirt</i>	<i>eingesetzte Konzentration</i>	<i>Hersteller</i>
Westernblot	anti-Kaninchen-IgG	Ziege	1:50000	Sigma
	anti-Maus-IgM	Ziege	1:50000	Sigma
Fluoreszenzmikroskopie	anti-Maus-FITC	Ziege	1:1000	Zymed, San Francisco
	anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:250	Dianova, Hamburg

2.1.6 Primer-Sequenzen

Tabelle 8 Primer-Sequenzen für die RT-PCR

Ziel-mRNA	Oligonukleotid- Sequenz forward	Oligonukleotid- Sequenz reverse	Hersteller
GAPDH	5'-GAC AGT CAG CCG CAT CTT CTT -3'	5'-TCC GTT GAC TCC GAC CTT C-3'	Metabion, Martinsried, Germany
mTOR	5'- TGC CAA CTA TCT TCG GAA CC-3'	5'- GCT CGC TTC ACC TCA AAT TC-3'	Metabion, Martinsried, Germany

2.1.7 Verwendete siRNAs

Tabelle 9 Gegen mTOR gerichtete siRNA-Konstrukte

	Sequenz	Bezugsquelle	Firma
siRNA Konstrukt 1 (mTOR-siRNA1)	sense: 5' GGC CUA UGG UCG AGA UUU A dTdT 3' anti-sense: 5' UAA AUC UCG ACC AUA GGC C dTdT3`	von Eurogentec empfohlen	Eurogentec, Köln
siRNA Konstrukt 2 (mTOR-siRNA2)	sense: 5' CCU GCU GGA UGC UGA AUU A dTdT 3' anti-sense: 5' UAA UUC AGC AUC CAG CAG G dTdT 3'	von Eurogentec empfohlen	Eurogentec, Köln
siRNA Konstrukt 3 (mTOR-siRNA3)	sense: 5' GGA GUC UAC UCG CUU CUA U dTdT 3' anti-sense: 5' AUA GAA GCG AGU AGA CUC C dTdT 3'	<i>Peponi et al.</i> (2006)	Eurogentec, Köln

Die siRNA-Konstrukte wurden von Eurogentec mit einer Konzentration von 0,67 µg/µl geliefert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde FITC-markierte non-silencing siRNA (Qiagen, Hilden) verwendet und die Fluoreszenz, wie unter 2.2.5 beschrieben, gemessen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, einem CO₂-Partialdruck von 5 % und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Alle Zelllinien wuchsen als adhären-te Monolayer und wurden mit den entsprechenden Medien (RPMI beziehungsweise DMEM) in Petrischalen oder Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Konfluenz (Anteil der Fläche der Zellen an der Gesamtfläche des Bodens des Kulturgefäßes) der Zellen wurde dreimal wöchentlich mikroskopisch beurteilt.

Bei einer Konfluenz von unter 80 % wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde die Zellkulturflasche leicht geschwenkt und das Kulturmedium mit Hilfe einer Stabpipette abgesaugt. Anschließend wurde das zuvor entnommene Volumen durch neues Kulturmedium ersetzt.

Bei einer Konfluenz von über 80 % erfolgte eine Aufteilung in neue Kulturgefäße. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und 1-2 ml PBS (*phosphate-buffered saline*) auf die Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wurde das PBS abgesaugt, 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und, abhängig von der Zelllinie, das Kulturgefäß für 5-15 min im Brutschrank inkubiert. Um die Einwirkzeit des Trypsins möglichst kurz zu halten und somit das Verdauen wichtiger Proteine der Zellen zu verhindern, wurde unter dem Mikroskop die Ablösung der Zellen verfolgt und restliche, noch leicht adhären-te Zellen durch vorsichtiges Klopfen auf den Rand des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend wurde jeweils 9 ml frisches Medium in neue Kulturgefäße vorgelegt und weitere 9 ml fetales Kälberserum (FKS)-haltiges Medium auf die Zellen gegeben, um die Zellsuspension zu verdünnen und das Trypsin durch das FKS zu inaktivieren. Es wurden je nach der Teilungsrate der Zelllinien entweder 0,5 ml (z.B. für T24) oder 1 ml (z.B. für RT4) der Zellsuspension in die neuen Kulturgefäße überführt.

Die Zellkulturen wurden nicht länger als bis zur 30. Passage kultiviert.

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden Kryokonserven angelegt. Es wurden nur Zellen bis Passage 10 eingefroren. Ziel hierbei war es, die Vitalität der Zellen durch langsame Temperaturabsenkung so weit wie möglich zu erhalten.

Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde in Normalmedium resuspendiert und anschließend Einfriermedium (RPMI- beziehungsweise DMEM-Medium mit 20 % DMSO) hinzugegeben, sodass die Endkonzentration von DMSO 10 % betrug. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und mit einem Kryokonservierungsgerät (Mr. Frosty) automatisch gesteuert um 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen enthaltenden

Röhrchen in den Gefrierschrank gestellt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196 °C) getaucht.

Bei Bedarf wurden die Zellen schließlich wieder aufgetaut. Prinzipielles Ziel ist es, die Zellen schnellstmöglich aufzutauen. Hierzu wurde ein Wasserbad auf 37 °C erhitzt und anschließend die Röhrchen mit einem Schwimmer in das Wasserbad gegeben. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 5 ml vorgewärmtes RPMI- beziehungsweise DMEM-Medium aufgenommen und 4 min bei 1600 UPM zentrifugiert. Durch Abnehmen des Überstandes wurde das DMSO entfernt und dann frisches Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen ausgesät. Die ersten 2 Wochen wurde dem Zellkulturmedium Ciprobay (Ciprofloxacin 200 mg/ml) beigelegt (50 µl in 10 ml Medium), um eine Kontamination mit Mykoplasmen zu vermeiden.

2.2.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauerzählkammer. Hierzu wurde die zu zählende Zellsuspension sorgfältig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellsuspension mit 0,1 % Trypanblaulösung (Sigma) im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau dient dem Detektieren von avitalen Zellen, da dieser anionische Diazofarbstoff nicht von vitalen Zellen aufgenommen werden kann. Lebende Zellen erscheinen deshalb im Lichtmikroskop farblos, avitale Zellen hingegen dunkelblau. Das Gemisch wurde in die Neubauerzählkammer gegeben und die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt: Mittelwert der 4 Quadranten x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10^4 = Zellzahl pro ml Suspension.

2.2.2 RT-PCR

2.2.2.1 Funktionsweise

Die reverse-Transkriptase-PCR wird zur Quantifizierung spezifischer mRNAs in der Gesamt-RNA eingesetzt. Dabei wird nach der Isolation der Gesamt-RNA die mRNA in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben (reverse Transkription) und durch anschließende Amplifikation mittels PCR mit spezifischen Primern nachgewiesen. Der Prozess der reversen Transkription ist nötig, da die anschließend verwendete DNA-Polymerase DNA-abhängig ist.

2.2.2.2 Versuchsprotokoll

Die RNA-Isolierung wurde mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Es wurden zunächst die Zellen geerntet (T24, EJ28, RT4, J82, SKRC-35, SKRC-47, SKRC-58, BHY, PCI-1 und PCI-13) und mit dem Qiashreder homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Qiagen).

Zur Verhinderung einer möglichen genomischen Kontamination wurde die DNA nach Angaben des Gibco/Invitrogen Protokolls durch Dnase I verdaut. Für die cDNA-Synthese wurden 500 ng der Gesamt-RNA eingesetzt und nach dem Gibco/Invitrogen Protokoll umgeschrieben. Die Real-time

PCR wurde mittels iCycler nach dem PCR Mastermix Protokoll (qPCR Core Kit for SYBR Green I, Eurogentec, Belgien) durchgeführt. Die Genexpressionslevel wurden durch das *housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert (Primer-Sequenzen siehe 2.1.6).

Nach einer initialen Aktivierung für 2 min bei 95 °C wurden 40 Amplifikationszyklen mit jeweils 45 Sekunden bei 95 °C und bei 60 °C durchgeführt. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte durch Ermittlung des Ct-Wertes. Der Ct-Wert (*cycle threshold* für Schwellenwert-Zyklus) ist eine theoretische Größe, die den Teil der Kurve beschreibt, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und sich die Kurve im exponentiellen Bereich befindet.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Funktionsweise

Ziel der im Rahmen der Proteinbiochemie durchgeführten Westernblots ist es, verschiedene Proteine gelelektrophoretisch aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. In unseren Versuchen sollte die Menge an mTOR- und pmTOR-Protein in den verschiedenen Zelllinien und der Einfluss der siRNA-Transfektion auf die mTOR- und pmTOR-Proteinmengen bestimmt werden. Als Kontrolle dienten Aktin-Westernblots.

2.2.3.2 Versuchsprotokoll

Es wurden die Zelllinien T24, RT4, J82, EJ28, PCI-1, PCI-13 und BHY verwendet. Die Arbeitsschritte waren:

1. Proteinextraktion
2. Proteinbestimmung
3. SDS-Gelelektrophorese
4. Semi-Dry-Blotting
5. Nachweis der Proteine durch monoklonale Antikörper

2.2.3.2.1 Proteinextraktion

Die mit siRNA transfizierten Zellen wurden 3-mal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 90 µl Lämmli-Puffer pro Well. Mittels eines Zellschabers (Sarstedt) wurden die Zellen abgelöst, in QIAshredder (Qiagen) überführt und für 2 min bei 11 000 UPM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt) gegeben und nach 15 min Zentrifugieren mit 10 000 UPM bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des Pierce BCA (*bicinchoninic acid*) Protein Assay Kits (Pierce, Rockford, USA). Im Kit enthaltene Substanzen werden durch die in ihrer Menge zu

bestimmenden Proteine in einen Komplex überführt, der im Photometer eine Absorption bei 562 nm zeigt. Diese Absorption verhält sich nahezu linear zur Proteinkonzentration.

Die Proben wurden aufgetaut, 5 min gekocht und 15 min bei 10 000 UPM zentrifugiert. Die Standardreihe (2-fach-Bestimmung) und die Proben (4-fach-Bestimmung) wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben. Als Leerwert wurde Lämmli-Puffer verwendet. Nach einer 30 minütigen Inkubation der Proben mit der Arbeitslösung wurde die Absorption gemessen. Nach der Auswertung erfolgte das Einstellen der Proben auf circa 25 µg Protein mit Lämmli, Bromphenolblau und Dithiothreitol (DTT, 100 nM). Nach 5 min Kochen bei 100 °C und 10 min Zentrifugation bei 10 000 UPM wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.2.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Negativ geladenes SDS (Natriumdodecylsulfat) lagert sich an die Proteine an und denaturiert sie, sodass Ladung und Struktur keinen wesentlichen Einfluss auf die Auftrennung haben.

Zur Detektion von mTOR und pmTOR wurden Gele mit 7,5 % Acrylamidanteil verwendet, für β-Aktin 12,5 %ige Gele (Zusammensetzung siehe Tabelle 10).

Tabelle 10 Zusammensetzung eines 7,5 % / 12,5 % SDS-Gels

Gelbestandteil	Trenngel		Sammelgel
	7,5 %	12,5 %	
1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 [ml] mit 0,4 % SDS	3	3	
1 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8 [ml] mit 0,1 % SDS			1
30 % Acrylamid [ml]	3	4,8	1,9
dest. H ₂ O [ml]	6	4,2	4,7
Ammoniumperoxodisulfat (APS) [µl]	100	100	60
Tetramethylethylendiamin (TEMED) [µl]	10	10	6

Vor der Elektrophorese wurden die Proben im Heizblock für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend für 15 min bei 10 000 UPM zentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Laufkammer von Phase mit Laufpuffer. Als Marker diente Prestain Dual Color (BioRad). Das Einlaufen der Proteine ins Sammelgel erfolgte bei 60 V, die Auftrennung im Trenngel bei 135 V.

2.2.3.2.4 Semi-Dry-Blotting

Das Semi-Dry-Blotting dient der elektrophoretischen Übertragung der Proteine im Gel auf eine Membran. Hierzu wurde ein Semi-Dry-Blotting-Gerät (Phase, Lübeck) verwendet. Auf die Eisenplatte des Gerätes wurden in der korrekten Reihenfolge gelegt: drei Lagen in Kathodenpuffer getauchtes Filterpapier, das Gel, eine Nitrocellulosemembran (BIO-RAD), jeweils drei Lagen in Anodenpuffer 1 und drei Lagen in Anodenpuffer 2 getauchtes Filterpapier. Anschließend wurde die Graphitplatte des Gerätes aufgelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 150 mA für 2 h.

Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine wurde das Gel im Anschluss mit Coomassie gefärbt. Bei erfolgreicher Übertragung sind auf dem Gel kaum Proteinreste zu erkennen.

2.2.3.2.5 Nachweis der Proteine durch monoklonale Antikörper

Die folgenden Schritte erfolgten auf dem Schüttler Vibramax 100 (Heidolph).

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Antikörper wurden die Membranen für 1 h in frisch angesetzter 5 %iger Milchpulver/TBS-Tween-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Membranen über Nacht mit dem in TBS-Tween und Azid-Lösung (10 % Azid, Sigma) verdünnten Primärantikörper gegen mTOR, pmTOR oder β -Aktin inkubiert. Im Anschluss wurden durch fünfmaliges je 5-minütiges Waschen mit TBS-Tween ungebundene Primärantikörper entfernt. Der Sekundärantikörper wurde zusammen mit Precision Strep-Tactin HRP (BioRad, Konzentration 1:25000) in 5 %iger Milchpulver/TBS-Tween-Lösung gelöst und die Membranen für eine Stunde inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Membranen für je 5-mal 5 min mit TBS-Tween und 1-mal 5 min mit TBS wurden die Bindestellen des Sekundärantikörpers mittels SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) nach Angaben des Herstellers visualisiert. Anschließend wurden die Membranen mit Filmen (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) für circa 10 min in eine Kassette gelegt und der Film entwickelt.

Um Unterschiede in der Proteinbeladung der einzelnen Banden auszugleichen, wurde die Expression des Housekeeping-Gens β -Aktin bestimmt. Außerdem wurden die Membranen zur Kontrolle der Qualität mit Amidoschwarz gefärbt.

2.2.3.2.6 Auswertung

Die Quantifizierung der Protein-Banden erfolgte mittels der Software BioDocAnalyze (BioRad). Die Auswertung erfolgte anhand des Vergleichs zwischen der 100 nM siRNA-Bande und der Bande der unbehandelten Zellen.

2.2.4 Transfektion von siRNAs

2.2.4.1 Funktionsweise

Unter Transfektion wird die Einschleusung von Nukleinsäuren in Zellkulturzellen verstanden. Als Transporter für die Nukleinsäuren wurde LipofectaminTM 2000 (Invitrogen) verwendet. Lipofectamin besteht aus kationischen Lipidmolekülen, die in wässriger Phase positiv geladene Liposomen ausbilden. Diese sind in der Lage, die negativ-geladenen RNA- oder DNA-Moleküle zu komplexieren und sich an die Zelloberfläche anzulagern. Über die Fusion der Liposomen mit der Zellmembran können die Nukleinsäuren direkt ins Zytoplasma aufgenommen werden.

Zur Bestätigung und Quantifizierung der Internalisierung der Nukleinsäuren (Transfektionseffizienz) wurden FACS-Analysen durchgeführt (siehe 2.2.5).

2.2.4.2 Versuchsprotokoll

Für jede Zelllinie und jedes siRNA-Konstrukt wurde der im Folgenden beschriebene Ansatz vierfach durchgeführt (J82 und PCI-13 einfach).

An Tag 1 erfolgte die Aussaat der Zellen in Antibiotika-freiem Medium (RPMI beziehungsweise DMEM). An Tag 2 wurden die siRNAs in 1 nM, 10 nM und 100 nM Konzentration transfiziert;

Übersicht über den Versuchsansatz gibt folgende Tabelle:

Tabelle 11 Übersicht Versuchsansatz Transfektion von siRNAs

Die Wells 4-8 dienen als Kontrolle, Well 5 dient bei der Auswertung als Referenz.

<i>Ansatz in Mikrotiter-Platte (Well-Nummer)</i>	<i>Behandlung der Zellen</i>
1	1 nM siRNA und Lipofectamin
2	10 nM siRNA und Lipofectamin
3	100 nM siRNA und Lipofectamin
4	keine siRNA, nur Lipofectamin
5	keine Behandlung
6	1 nM siRNA ohne Lipofectamin
7	10 nM siRNA ohne Lipofectamin
8	100 nM siRNA ohne Lipofectamin

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Wells wie folgt behandelt:

Tabelle 12 Übersicht Versuchsansatz zur Kontrolle der Transfektionseffizienz

<i>Ansatz in Mikrotiter-Platte (Well-Nummer)</i>	<i>Behandlung der Zellen</i>
1	1 nM FITC-markierte siRNA mit Lipofectamin
2	10 nM FITC-markierte siRNA mit Lipofectamin
3	100 nM FITC-markierte siRNA mit Lipofectamin
4	keine FITC-markierten siRNA, nur Lipofectamin
5	keine Behandlung
6	100 nM FITC-markierte siRNA ohne Lipofectamin

Zur Transfektion wurde sowohl die mTOR-siRNA als auch die FITC-markierte siRNA in der jeweils gewünschten Konzentration in Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* (Gibco) verdünnt, durch Pipettieren resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Inkubation von siRNA und Lipofectamin erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Verhältnis von siRNA zu Lipofectamin betrug nach Optimierung 1:4. Während der Inkubationszeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend Opti-MEM hinzugegeben. Die Transfektionskomplexe und die (auf gleiche Art erstellten) Kontrollen wurden dann auf die entsprechenden Wells verteilt. Für vier Stunden wurde das Transfektionsmedium auf den Zellen im Brutschrank inkubiert und danach durch FKS-haltiges Kulturmedium ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für jeweils 24 beziehungsweise 48 Stunden weiter kultiviert, d.h. der oben geschilderte Ansatz wurde zweimal erstellt. Am 3. beziehungsweise 4. Tag wurden die Proben für den Westernblot geerntet.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mittels FACSCanto™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Die Steuerung der Messungen sowie die primäre Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der BD FACS Diva™ Software (BD Biosciences). Bei den im Durchflusszytometer ermittelten Werten handelt es sich nicht um Absolutwerte sondern um relative Signalgrößen der gemessenen Zellen zueinander. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der siRNA-Transfektionsraten und zur Erstellung von Histogrammen verwendet.

2.2.5.1 Funktionsweise

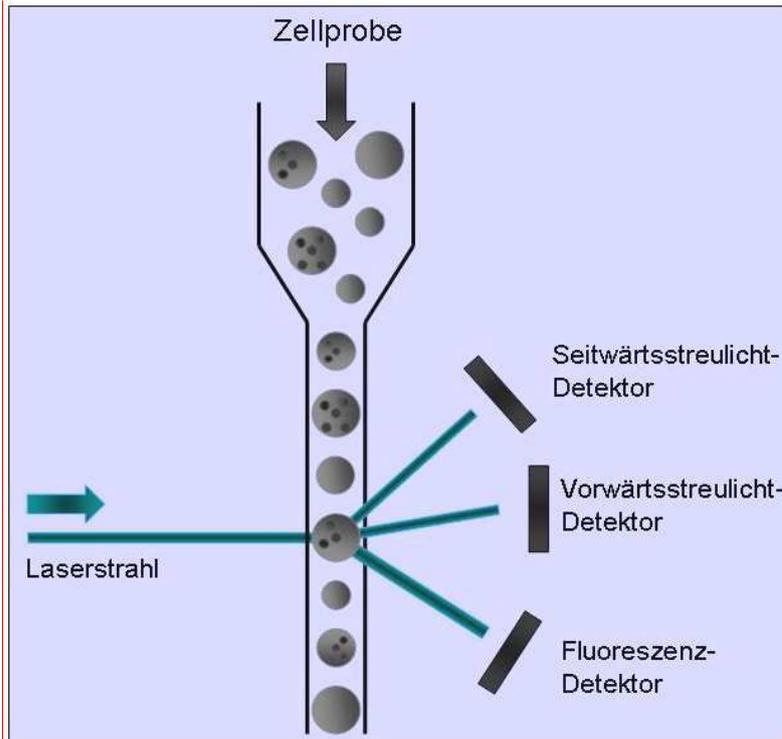


Abbildung 3 Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers

Nach vorne gestreutes Licht wird vom „Vorwärtsstreulicht-Detektor“ (Forward Scatter, FCS) gemessen und ist proportional zur Größe der Zelle. Die Menge des seitwärts zum Laserstrahl gestreuten Lichtes („Seitwärtsstreulicht-Detektor“, Side Scatter, SSC) ist proportional zur inneren Komplexität, d.h. zur Granularität der Zelle. Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in oder auf der Zelle befinden (z.B. an siRNA gekoppelt), werden mittels Argon-Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmter Wellenlänge, die für das Fluorochrom charakteristisch ist (Fluoreszenzdetektor) (Ditz, 2007).

Die Durchflusszytometrie dient der Zählung und Charakterisierung von Zellen oder anderen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Die zu untersuchenden Zellen einer Einzelzellsuspension werden aus dem Probengefäß aufgenommen und in einer laminaren Strömung einzeln hintereinander aufgereiht in den optischen Messbereich befördert. Dort wird jede Zelle mit einem gebündelten Argon-Laserstrahl angestrahlt. An den Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung, die von geeigneten Detektoren in Stärke und Richtung gemessen wird und Informationen über die Größe (Forward Scatter, FCS) und Granularität (Side Scatter, SSC) der Zelle liefert. Außerdem ist durch Markierung definierter Strukturen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen eine weitere Zelldifferenzierung möglich (Abbildung 3).

2.2.5.2 *Versuchsprotokoll*

2.2.5.2.1 *Probenvorbereitung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz*

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen zunächst geerntet und gezählt. Anschließend wurden die Zellen 4 min bei 1600 UPM zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde je Probe 0,5 ml 2 %ige BSA/ PBS-Lösung (PBS-Lösung mit 2 % bovinem Serumalbumin) hinzugegeben und in FACS-Röhrchen (BD Biosciences) überführt. Unmittelbar vor der Messung wurden 5 µl (50 µg/ml) Propidiumjodid (BD Biosciences) zugegeben, um avitale Zellen zu markieren.

Der Farbstoff Propidiumjodid diffundiert aufgrund der gestörten Barrierefunktion der Zellmembranen in den Zellkern apoptotischer und nekrotischer Zellen und interkaliert dort in die DNA-Doppelhelix. Interkaliertes Propidiumjodid wird im Durchflusszytometer detektiert.

Vor der Messung wurden die Zellen suspendiert und dann in die Probenhalterung gestellt, sodass nach Starten der Messung die Zellen dem Messsystem zugeführt wurden. Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte anhand nicht-transfizierter Kontrollzellen. Die so eingestellten Parameter wurden für die zu messenden Proben beibehalten. Von jeder Probe wurden 10.000 Ereignisse gemessen. Um Zelltrümmer aus der Untersuchung auszuschließen, wurde mit Hilfe der Parameter Zellgröße und Granularität eine Population P1 definiert, die für die weiteren Analysen herangezogen wurde.

2.2.5.2.2 *Probenvorbereitung zur Erstellung der Zellzyklusanalyse*

Zur Zellzyklusanalyse wurden nach siRNA-Transfektion und nach Temsirolimus-Behandlung mittels Durchflusszytometrie Histogramme erstellt.

Die siRNA-Transfektion (vergleiche 2.2.4) erfolgte nach folgendem Transfektionsschema:

Tabelle 13 Transfektionsschema siRNA-Transfektion zur Histogrammerstellung

<i>Ansatz in Mikrotiter-Platte (Well-Nummer)</i>	<i>Behandlung der Zellen</i>
1	100 nM siRNA 1
2	100 nM siRNA 2
3	100 nM siRNA 3
4	100 nM siRNA-Negativkontrolle
5	keine siRNA, nur Lipofectamin
6	100 nM siRNA-Mix: jeweils 33 nM der siRNAs 1-3

Die siRNA-Negativkontrolle ist eine FITC-markierte-siRNA (AllStars Neg. Fluorescin, Qiagen,Hilden).

Für diese Versuche wurde ebenfalls die Transfektionseffizienz bestimmt.

Die Temsirolimus-Behandlung erfolgte mittels Applikation der IC_{50} (vergleiche 2.2.6.2), die Negativkontrollen wurden mit Medium versetzt.

Jeweils am Tag nach der siRNA-Transfektion beziehungsweise der Temsirolimus-Behandlung wurden die Proben auf folgende Weise geerntet:

Zunächst wurden die Zellen mit 300 μ l Accutase abgelöst und 4 min bei 1600 UPM in der Hettich Kühlzentrifuge 32R zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 500 μ l EtOH resuspendiert und fixiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation wurde PBS hinzugegeben und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben 2-mal mit PBS gewaschen und in 300 μ l Färbe-Lösung (bestehend aus 12 μ l Propidiumjodid-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe), 7,5 μ l RNaseA-Lösung (Sigma)) zum RNA-Verdau in 280,5 μ l PBS aufgenommen.

Anschließend wurden die Proben 30 min im Dunkeln inkubiert. Vor der Durchflusszytometrie wurden 200 μ l PBS hinzugegeben.

2.2.5.3 Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm BD FACS Diva™ (BD Biosciences). Die Darstellung der gemessenen Signale kann dabei als zweidimensionales sog. Dot-Blot-Fenster erfolgen, in dem jedes Ereignis, wie z.B. Zellen oder Zelltrümmer, als einzelner Punkt dargestellt wird und so entsprechend seiner Fluoreszenz und Größe beziehungsweise Granularität repräsentiert wird. Alternativ können Histogramme erstellt werden, indem die Zellzahl auf der y-Achse (linear) gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen wird.

2.2.6 MTT-Test

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-Tests (MTT-Tests) wurden zur Überprüfung der Zellviabilität nach Behandlung mit Temsirolimus, siRNA und der Kombination aus Temsirolimus und Cisplatin verwendet. Vorversuche beinhalteten die Bestimmung der Einwirkzeiten und der Konzentrationen mit dem größten Effekt auf die Reduktion der Zellviabilität, die inhibitorischen Konzentrationen IC_{25} und IC_{50} wurden berechnet.

2.2.6.1 Funktionsweise

Mittels eines MTT-Testes kann die Zellviabilität nachgewiesen werden. Vitale Zellen reduzieren gelbes, wasserlösliches Tetrazoliumsalz in ein violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Reduktion geschieht hauptsächlich durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und teilweise durch Succinat. Das Formazan wird mit Detergentien (zum Beispiel DMSO) aus der Zelle

gelöst und photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Probe ist dem Anteil der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen direkt proportional. Somit kann gemessen werden, wie groß der Anteil an Zellen ist, die nach Zugabe von Temsirolimus noch vital sind.

2.2.6.2 Versuchsprotokoll

Es wurden insgesamt sieben verschiedene Zelllinien (T24, J 82, EJ 28, RT4, SK-RC 47, PCI-1 und -13) in 96-Well-Platten ausgesät. An Tag 1 wurden pro Well 2×10^4 Zellen ausgesät und mit 100 μ l Medium versetzt. An Tag 2 wurde zunächst je nach Versuch siRNA transfiziert (s. 2.2.4), Cisplatin angesetzt oder 1 mg Temsirolimus in 1 ml DMSO gelöst und anschließend mit Filtern der Porengröße 0,2 μ m (Nalgene) steril filtriert. Diese Lösungen wurden in unterschiedlicher Verdünnung mit Medium mit einem Endvolumen von 100 μ l auf die verschiedenen Zellen gegeben. Pro Konzentration und Zelllinie wurde eine 4-fach-Bestimmung durchgeführt. Nach 24 h wurde der MTT-Test durchgeführt. Hierzu wurde das Medium mit siRNA/Cisplatin/Temsirolimus entfernt und durch MTT Medium (Tetrazoliumsalz + RPMI beziehungsweise DMEM im Verdünnungsverhältnis 5:100) ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit dem MTT Medium im Brutschrank 4 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt und pro Well 100 μ l DMSO aufgetragen. Die 96-Well-Platten wurden 10 min auf einen Schüttler gestellt; danach erfolgte die photometrische Messung bei 550 nm. Zur Auswertung der gemessenen Werte wurde die Extinktion der vitalen, nicht behandelten Zellen als 100 % festgelegt und die Werte der behandelten Zellen in Relation dazu gesetzt. Die 4-fach-Bestimmungen gingen als gemittelte Werte in die Auswertung ein.

2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

2.2.7.1 Funktionsweise

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Fähigkeit von fluoreszierenden Stoffen (Fluorochrome) Licht einer bestimmten Wellenlänge aufzunehmen (Absorption), angeregt zu werden und daraufhin Licht mit definierter, höherer Wellenlänge zu emittieren (Emission). Es wird zwischen Primärfluoreszenz (= Eigenfluoreszenz) und Sekundärfluoreszenz (nach Einbringen von Fluorochromen) unterschieden. Um eine Sekundärfluoreszenz zu erreichen, können die Zellbestandteile entweder direkt (durch Behandlung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen) oder indirekt (Fluoreszenzfarbstoffe sind an Antikörper gebunden, die an Zellbestandteile binden) gefärbt werden.

Die emittierten Frequenzen der Fluorochrome können anschließend im Mikroskop dargestellt und die Bilder mittels entsprechender Software auf dem Computer ausgewertet werden.

2.2.7.2 Versuchsprotokoll

2.2.7.2.1 Übersicht

Es wurden die Zelllinien SK-RC 47, T24, RT4, PCI-1, PCI-13 und Zellen humaner Tonsille als Kontrolle verwendet.

2.2.7.2.2 Behandlung der Zellen

Jede Zelllinie wurde in fünf verschiedene Portionen aufgeteilt, in Mikrotiter-Platten verbracht und wie folgt behandelt:

- Well 1-3: 100 nM mTOR-siRNA Konstrukt 1 bis 3
- Well 4: IC₅₀ von Temsirolimus (ermittelt aus MTT-Test)
- Well 5: unbehandelt

2.2.7.2.3 Erstellung von Cytospins

Für eine optimale Auswertung der Fluoreszenzmikroskopiebilder (keine überlagerten Zellen und möglichst viele Zellen pro Bildausschnitt) wurden pro Objektträger 20.000 Zellen ausgesät. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, gezählt und nach einer einmaligen Waschung mit PBS in 100 µl 2,5 % BSA/PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in den Cytospineinsatz gegeben und bei 800 UPM 4 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Präparate circa 2 bis 3 Stunden luftgetrocknet und bei -80°C gelagert.

2.2.7.2.4 Färbung

Die Zytospin-Präparate wurden zuerst mit 2 % Paraformaldehyd fixiert. Nach einmaliger Waschung mit PBS wurden die Zellen mit 0,2 % Triton permeabilisiert. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden unspezifische Bindungen mittels 5 % Normal-Goat-Serum und 5 % BSA in PBS geblockt.

Die Inkubation mit der 1. wie auch mit der 2. Antikörper-Präparation erfolgte für jeweils 1 h bei Raumtemperatur. Für jeden Ansatz wurden für jede Zelllinie Negativ-Kontrollen mitgeführt, bei denen die Zellen lediglich mit dem Sekundäntikörper inkubiert wurden.

Die Zellkernfärbung erfolgte mittels DAPI (Konzentration 1:5000, Roche, Mannheim) mit einer Inkubationszeit von einer Minute, ebenfalls bei Raumtemperatur.

Zwischen und nach den Färbungen erfolgten dreifache Waschungen mit PBS, die Objektträger wurden mit Vectashild eingedeckt und die Deckgläschen mit Nagellack fixiert.

2.2.7.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Aufnahme der Bilder wurde das Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit der AxioCam MRm Digital Kamera (Zeiss, Göttingen) verwendet. Es wurden je Präparat mindestens vier bis fünf Bildausschnitte zufällig ausgewählt. Um eine valide Auswertung zu gewährleisten wurden für alle

Präparate einer Färbung die gleichen Belichtungszeiten gewählt. Die Bilder wurden mittels der Computersoftware AxioVision Rel. 4.7 (Zeiss, Göttingen) bearbeitet und gespeichert.

2.2.7.2.6 Auswertung

Zur Auswertung der Bilder wurde Image J mit einem von Ben Niehaus und Birgit Hüsing (Klinik für HNO, Universität zu Lübeck) entwickelten *Plugin* verwendet. Das Programm ist in der Lage, die Zellen zu zählen und die Farbintensität der einzelnen Zellen zu messen. Vom Untersucher wurde für jeden Farbkanal (für Ki-67 und mTOR beziehungsweise pmTOR) eine negative Zelle ausgewählt. Zellen, die mehr als 10 % Fluoreszenz im Vergleich zu dieser negativen Zelle aufwiesen, wurden als positiv gezählt. Die Ergebnisse werden daher in Prozent positive Zellen angegeben. Im Durchschnitt wurden je Präparat bei der mTOR-Ki-67-DAPI-Färbung 265 Zellen gezählt. Bei der pmTOR-Ki-67-DAPI-Färbung waren es 266 Zellen je Präparat.

3 Ergebnisse

Temsirolimus wird bereits in der Therapie von Nierenzellkarzinomen (EAU-Leitlinien) und Mantelzelllymphomen (Ansell et al., 2008) angewendet. siRNAs werden ebenfalls als Behandlungsstrategie für zielgerichtete Tumorthérapien klinisch eingesetzt (Ashihara et al., 2010). In diesem Kapitel wird der Einsatz von Temsirolimus sowie siRNAs zur mTOR-Inhibition bei Harnblasenkarzinomen und HNSCC beschrieben. Es wurden die Effekte der mTOR-Inhibition durch Temsirolimus und mTOR-siRNAs hinsichtlich der Aspekte mTOR-Expression, Zellviabilität, Zellzyklus und Apoptoseinduktion untersucht.

3.1 Exprimierung von mTOR in Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien

Mittels RT-PCR wurde auf RNA-Ebene untersucht, ob mTOR-mRNA in den Zelllinien vorhanden ist. Hierzu wurden je Tumorart mindestens drei Tumorzelllinien eingesetzt und eine RT-PCR mit mTOR-Primern durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass mTOR-mRNA sowohl in den untersuchten Urothelkarzinom- als auch in den HNSCC-Zelllinien exprimiert wird (Abbildung 4). Als Vergleich dienten Nierenzellkarzinom-Zelllinien, da diese klinisch auf die mTOR-Inhibition ansprechen. Die Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien zeigten eine den Nierenzellkarzinom-Zelllinien vergleichbar starke Expression von mTOR-mRNA.

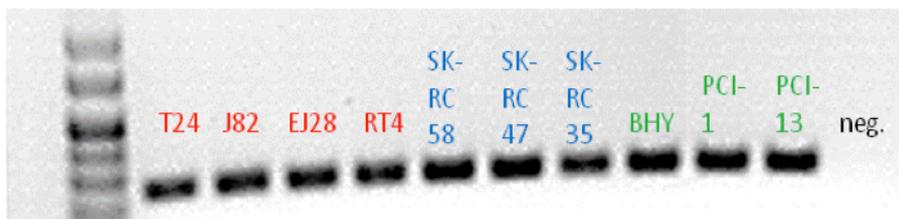


Abbildung 4 mTOR-mRNA-Expression in unterschiedlichen Urothelkarzinom-, Nierenzellkarzinom- und HNSCC-Zelllinien
RNA wurde aus unterschiedlichen unbehandelten Urothelkarzinom- (rot), Nierenzellkarzinom- (blau) und HNSCC-Zelllinien (grün) isoliert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet. Die PCR-Produkte wurden in einem 4 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard wurde ein 25 BP Marker (Gibco, Invitrogen) verwendet. Die Größe des mTOR-Produktes beträgt 135 BP. In allen untersuchten Zelllinien ist die mTOR-Expression ungefähr gleich.

Aufgrund der anzunehmenden Vergleichbarkeit der Zelllinien einer Tumorentität wurden für weitere Versuche SKRC-47 für Nierenzellkarzinome, RT4 und T24 für Urothelkarzinome und PCI-1 und PCI-13 für HNSCC verwendet. Der Gehalt an mTOR und pmTOR wurde auf Proteinebene zusätzlich in den Zelllinien BHY (HNSCC-Zelllinie) und EJ28 (Urothelkarzinom-Zelllinie) untersucht. Phosphoryliertes mTOR (pmTOR) ist die aktivierte Form von mTOR. Mittels Westernblot-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die unphosphorylierte als auch die

phosphorylierte Form von mTOR in allen untersuchten Zelllinien vorhanden ist (Abbildung 5). Der verwendete mTOR-Antikörper richtet sich gegen die C-terminale Region von mTOR und detektiert sowohl unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes mTOR. Somit wurde durch diesen Antikörper die Gesamtmenge an mTOR erfasst. Der pmTOR-Antikörper richtete sich hingegen spezifisch gegen phosphoryliertes mTOR. Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt, um zu sehen, ob der Proteingehalt der aufgetragenen Proben vergleichbar war.

Beide Tumorentitäten zeigten eine hohe Expression an phosphoryliertem mTOR, mit Ausnahme von PCI-13. Bei dieser Zelllinie wurde eine geringere Expression beobachtet (siehe Abbildung 5).

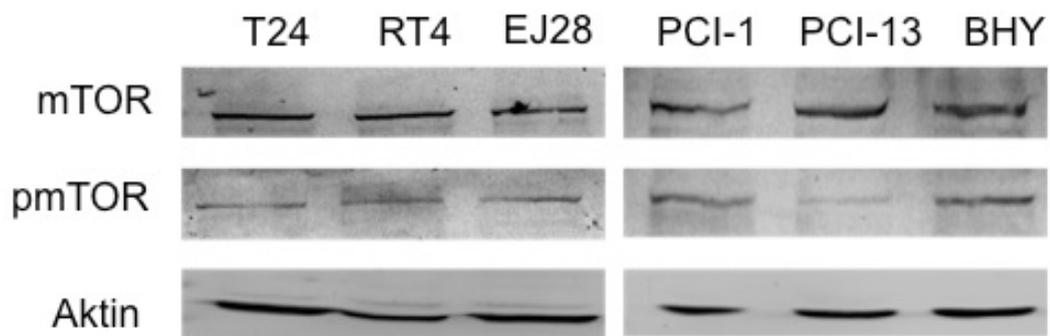


Abbildung 5 Nachweis von mTOR- und pmTOR-Protein in Blasenkarzinom- und HNSCC-Zelllinien

Im Westernblot konnte auch auf Proteinebene in allen untersuchten Zelllinien (Urothelkarzinome: T24, RT4 und EJ28; HNSCC: PCI1, PCI-13 und BHY) mTOR und die aktivierte Form von mTOR (pmTOR) nachgewiesen werden. Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2 Einfluss von siRNA auf mTOR- und aktiviertes mTOR-Protein

In den Zelllinien T24, J82, EJ28, RT4, PCI-1 und PCI-13 wurde der Einfluss von drei unterschiedlichen siRNA-Konstrukten auf die Gesamtmenge an mTOR-Protein und auf pmTOR-Protein (aktiviertes mTOR-Protein) untersucht. Zwei der siRNA-Konstrukte wurden von Eurogentec empfohlen (Konstrukt 1 und 2), Konstrukt 3 wurde von *Peponi et al.* (2006) übernommen. Die Zellen wurden mit mTOR-siRNA mit den Endkonzentrationen 1, 10 und 100 nM mittels Lipofectamin transfiziert und nach 24 bzw. 48 Stunden analysiert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit einer unspezifischen FITC-markierten siRNA (Qiagen) transfiziert. Im Anschluss wurde die Transfektionseffizienz im FITC-Kanal des Durchflusszytometers (FACS) quantitativ bestimmt.

Durch die Transfektion dieser drei siRNA-Konstrukte konnte die Menge an mTOR-Protein dosisabhängig gesenkt werden. Die Quantifizierung der Westernblotbanden erfolgte mittels der

Software BioDocAnalyse (BioRad) durch Vergleich der Intensität der Proteinbanden des Experimentes (siRNA-Transfektion) mit den Proteinbanden der Kontrollen. In Abbildung 6 ist exemplarisch ein Westernblot dargestellt. Die J82-Zellen wurden mit siRNA-Konstrukt 2 transfiziert. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden.



Abbildung 6 Dosisabhängige Verringerung der Menge an mTOR-Protein

J82-Zellen wurden mit siRNA-Konstrukt 2 transfiziert und 48 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die Menge an mTOR-Protein nach Transfektion von 1, 10 und 100 nM siRNA (bezeichnet mit 1, 10, 100 nM) im Vergleich zum mTOR-Proteingehalt in den Kontrollen (Ko 1: keine siRNA, nur Lipofectamin; Ko 2: keine Behandlung; Ko 3-5: 1, 10 und 100 nM siRNA ohne Lipofectamin)

Im Durchschnitt wurde die größte Herunterregulation des mTOR-Proteins in allen untersuchten Zelllinien durch die Transfektion mit siRNA-Konstrukt 1 nach 24 Stunden Inkubation erzielt. Es wurde der Mittelwert der Herunterregulation aller Zelllinien in Abhängigkeit der siRNA-Konstrukte und Inkubationszeiten berechnet (Tabelle 14).

Tabelle 14 Verminderung der mTOR-Expression nach 24 h und 48 h

Dargestellt ist der Mittelwert der Menge an Gesamt-mTOR-Protein aller untersuchten Zelllinien nach Transfektion von drei verschiedenen siRNA-Konstrukten und Inkubationszeiten der siRNAs von 24 beziehungsweise 48 Stunden. Die Gesamt-mTOR-Menge ist in Prozent im Vergleich zum mTOR-Gehalt unbehandelter Zellen angegeben. Die Zahlen setzen sich zusammen aus den Mittelwerten aller untersuchter Zelllinien (T24, J82, EJ28, RT4, PCI-1 und PCI-13). Es ist zu erkennen, dass nach 24 Stunden Einwirkzeit bei allen Konstrukten eine höhere Reduktion an mTOR-Protein erreicht wurde als nach 48 Stunden. Das siRNA-Konstrukt 1 zeigte die höchste Effektivität mit einer Verminderung der Gesamt-mTOR-Menge auf 50% im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

	<i>siRNA-Konstrukt 1</i>		<i>siRNA-Konstrukt 2</i>		<i>siRNA-Konstrukt 3</i>	
	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>	<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
% mTOR (Mittelwert)	50	55	74	59	72	69

In Abbildung 7 ist der Gehalt an mTOR- und pmTOR-Protein nach Transfektion des siRNA-Konstruktes 1 nach 24 Stunden Inkubation dargestellt. Es ist zu erkennen, dass trotz erniedrigter mTOR-Expression (Gesamt-mTOR) die Menge an aktivem pmTOR in den meisten Zelllinien nur gering beeinflusst wurde. Eine Ausnahme stellt die Zelllinie T24 dar, bei der die pmTOR-Menge im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter 40 % betrug.

Bei RT4, der höchstdifferenzierten Zelllinie, zeigte sich die geringste Reduktion an Gesamt-mTOR.

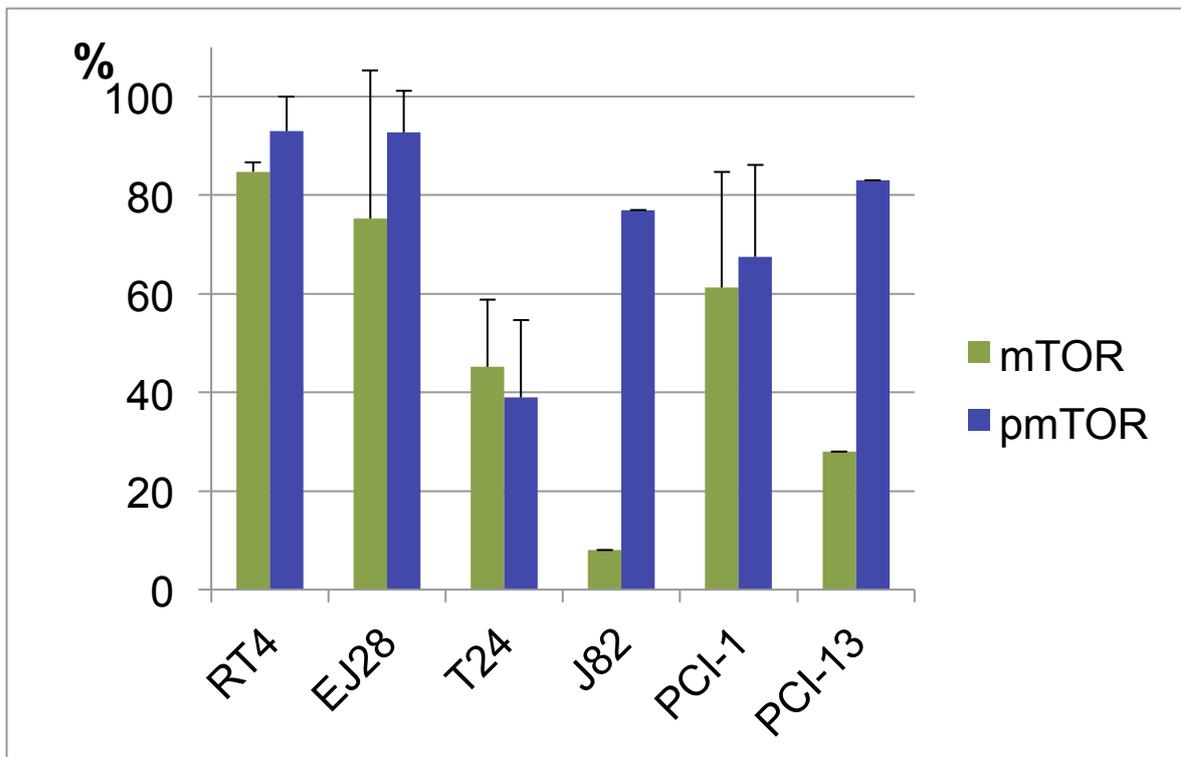


Abbildung 7 Expression von mTOR und pmTOR nach siRNA-Transfektion

Dargestellt ist der Einfluss des siRNA-Konstruktes 1 auf die Gesamt-mTOR-Menge (grün) und die pmTOR-Menge (blau) in vier Urothelkarzinom-Zelllinien (RT4, EJ28, T24, J82) und zwei HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 100 nM siRNA. Die Proteinmengen sind in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben (100 %). Bei den Zelllinien J82 und PCI-1 betrug die Anzahl der Stichproben $n = 1$, bei den anderen Zelllinien $n = 3-4$. Durch die Transfektion mit mTOR-siRNAs konnte in allen Zelllinien die mTOR-Menge reduziert werden, die Menge an pmTOR ist jedoch außer bei der Zelllinie T24 nur leicht vermindert.

3.2.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Zu jeder durchgeführten Transfektion mit siRNAs wurde die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmt. In der folgenden

Tabelle 15 sind die Mittelwerte der Transfektionseffizienzen nach 24 und 48 Stunden Einwirkzeit der verschiedenen Zelllinien bei Verwendung von 100nM siRNA gezeigt:

Tabelle 15 Mittelwerte der Transfektionseffizienzen

Angaben in Prozent transfizierter Zellen.

<i>Zelllinie</i>	<i>Einwirkzeit siRNA</i>	
	<i>24 Stunden</i>	<i>48 Stunden</i>
RT4	28	4
EJ28	45	19
T24	32	16
J82	24	21
PCI-1	49	16
PCI-13	62	38
<i>Mittelwerte aller Zelllinien</i>	40	19
<i>Standardabweichung</i>	14,5	11

Es ist zu erkennen, dass nach 24 Stunden siRNA-Inkubation deutlich mehr Zellen eingeschleuste siRNA enthielten als nach 48 Stunden.

Im folgenden Diagramm (Abbildung 8) sind exemplarisch die Transfektionseffizienzen nach 24 und 48 Stunden sowie nach unterschiedlicher RNA-Konzentration (FITC-markierte RNA) anhand von EJ28-Zellen gezeigt:

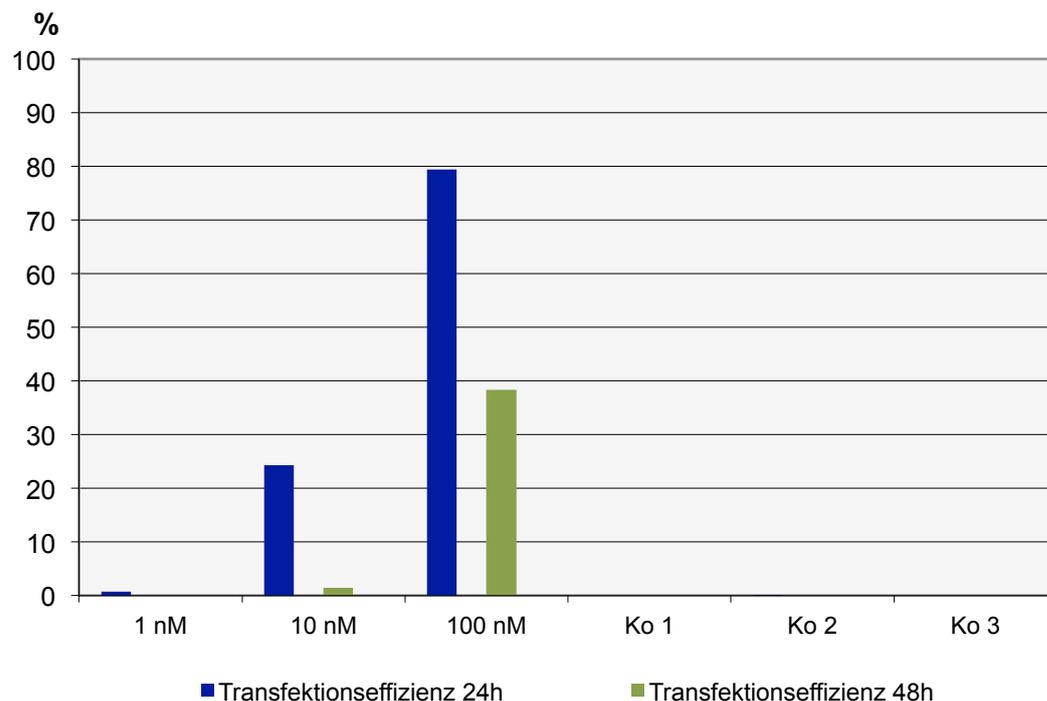


Abbildung 8 Die Transfektionseffizienz ist abhängig von der Konzentration der siRNA

Die Abbildung zeigt die Transfektionseffizienz FITC-markierter siRNA der Zelllinie EJ28. Auf der y-Achse ist die Anzahl der mit FITC markierten Zellen in Prozent aller ausgewerteten Zellen angegeben, auf der x-Achse sind die verschiedenen Ansätze dargestellt (1 nM siRNA, 10 nM siRNA, 100 nM siRNA und Kontrollen: Ko 1: keine siRNA, nur Lipofectamin, Ko 2: keine Behandlung, Ko 3: 100 nM siRNA ohne Lipofectamin).

Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, konnten durch höhere Konzentrationen an siRNA höhere Transfektionseffizienzen erzielt werden.

3.3 Einfluss von Temsirolimus und siRNA auf die Zellviabilität

Temsirolimus wird bereits bei anderen Tumorentitäten in der klinischen Praxis wirksam eingesetzt (Nierenzellkarzinom (Hudes et al., 2007), Mantelzelllymphom (Dreyling et al., 2010)). Es stellt sich die Frage, wie wirksam Temsirolimus bei Harnblasenkarzinomen und HNSCC ist. Hierzu wurden *in vitro* vier Blasen-tumor-Zelllinien (T24, RT4, EJ28, J82), zwei HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) und zum Vergleich eine Nierenzellkarzinom-Zelllinie (SKRC-47) für 24 Stunden mit Temsirolimus inkubiert und im Anschluss ein MTT-Test durchgeführt. Parallel wurde die Wirksamkeit der siRNA in Hinsicht auf die Zellviabilität untersucht. Hierzu gibt es ebenfalls bereits Untersuchungen bei anderen Zelllinien. Bei kolorektalen Karzinom-Zelllinien wurde im MTT-Test durch mTOR-siRNAs eine starke Verminderung der Zellviabilität erreicht (Zhang et al., 2009).

In Abbildung 9 sind die mittels Photometer gemessenen Absorptionswerte nach Temsirolimus-Inkubation von vier Urothelkarzinom-Zelllinien (T24, EJ28, RT4 und J82) und zwei HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) dargestellt. Der MTT-Test misst die Absorption von Formazan, das nur von vitalen Zellen aus dem zugegebenen Tetrazoliumsalm gebildet werden kann. Je mehr Formazan gebildet wird, desto höher ist demnach die Zahl an vitalen Zellen. Es ist zu erkennen, dass durch Temsirolimus in allen Zelllinien eine deutliche Zellviabilitätsminderung stattfindet. In der Abbildung 9 wird besonders deutlich, dass die Zellzahlen der Kontrollproben, bei denen kein Temsirolimus zugegeben wurde, unterschiedlich waren. Dies spiegelt sich am ersten Datenpunkt der jeweiligen Zelllinie wieder. Die Ursache hierfür ist das unterschiedliche Zellteilungsverhalten der Zellen. PCI-1 und PCI-13 wiesen beispielsweise eine sehr hohe Zellteilungsrate auf.

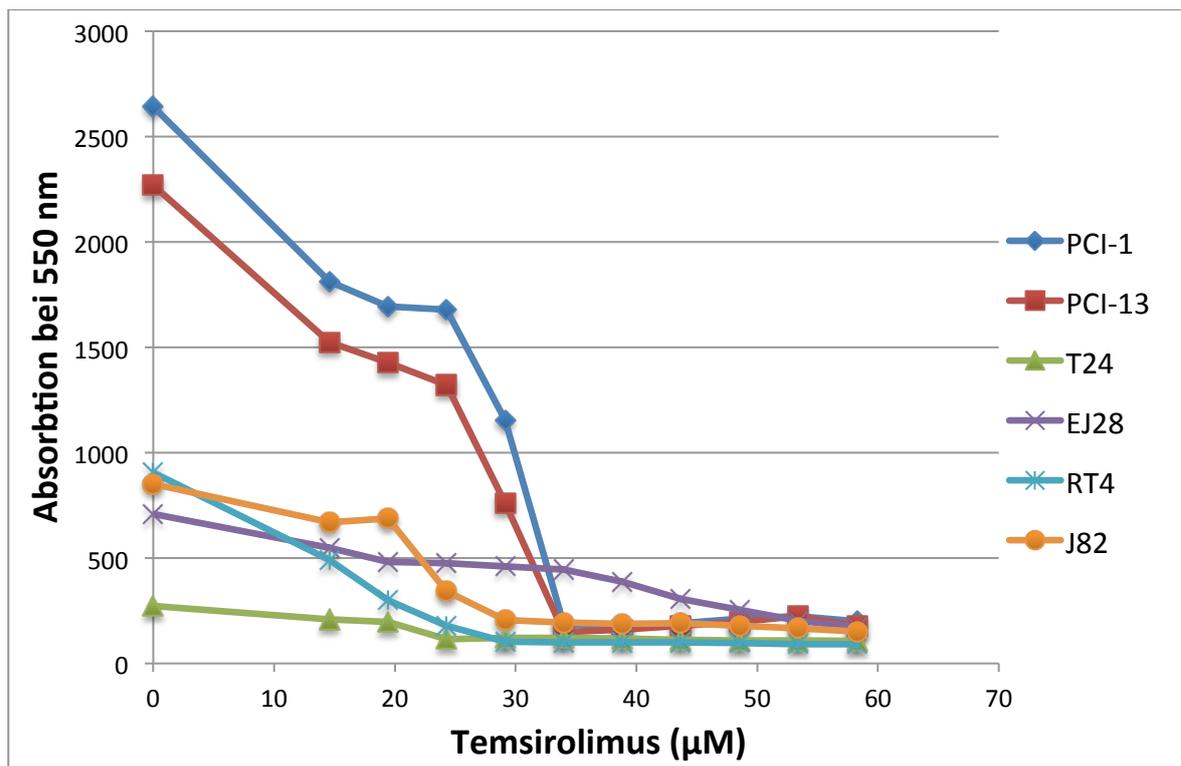


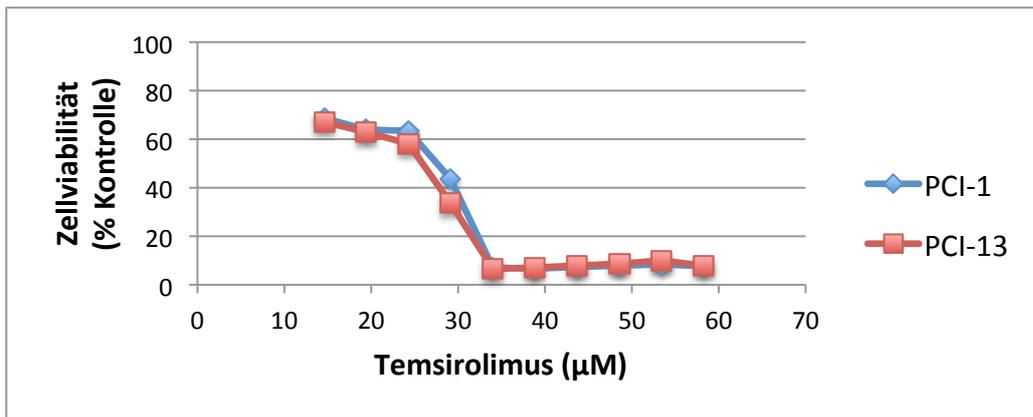
Abbildung 9 Einfluss der Temsirolimus-Konzentration auf die Zellviabilität

Mittels MTT-Test wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit verschiedener Temsirolimus-Konzentrationen die Zellviabilität von vier Urothelkarzinom- (T24, EJ28, RT4 und J82) und zwei HNSCC-Zelllinien (PCI-1, PCI-13) analysiert. Dargestellt sind die Absorptionsrohdaten des Photometers bei 550 nm (Y-Achse). Auf der X-Achse ist die eingesetzte Temsirolimus-Konzentration aufgetragen. Bei allen untersuchten Zelllinien hatte eine hohe Konzentration eine niedrige Zellviabilität zur Folge. Bei den Urothelkarzinom-Zelllinien, insbesondere bei T24, wies die Kontrollprobe weniger lebende Zellen auf als bei den HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13). Dies lässt sich an der niedrigeren Absorption der Kontrollprobe ohne Temsirolimus erkennen (im Diagramm der erste Datenpunkt der jeweiligen Zelllinie).

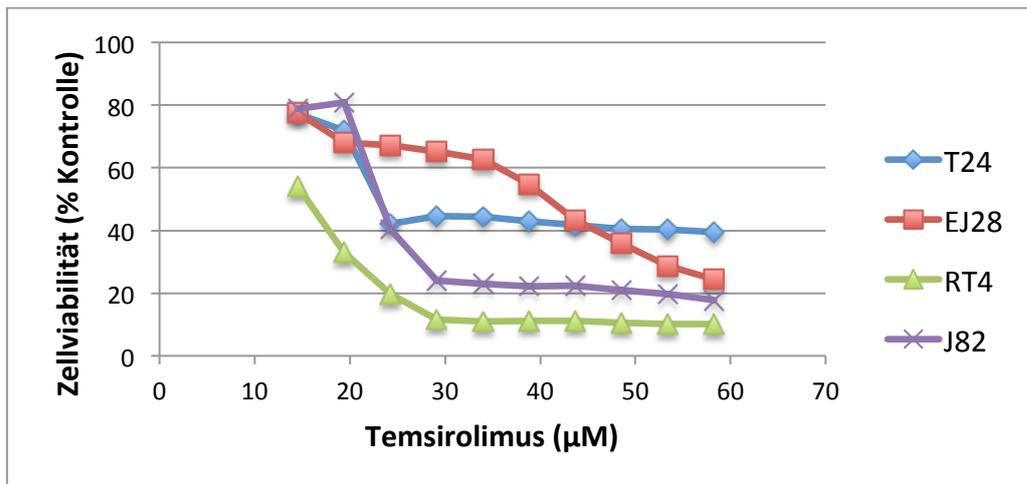
Es wurden noch weitere Inkubationszeiten von Temsirolimus im MTT-Test ausgetestet (3, 6, 12, 48, 72, 96, 120 und 168 Stunden). Vor Ablauf von 24 Stunden (3, 6 und 12 Stunden Inkubationszeit) zeigten sich geringere Verminderungen der Zellviabilität als nach 24 Stunden Inkubationszeit. Nach Ablauf von 24 Stunden (48, 72, 96, 120 und 168 Stunden Inkubationszeit) fand sich kein eindeutig zusätzlicher Effekt auf die Zellviabilität. Daher wurden die weiteren Versuche mit 24 Stunden Inkubationszeit durchgeführt.

In Abbildung 10 ist für die verschiedenen Tumorentitäten die Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien zeigten in den Mittelwerten der MTT-Untersuchungen ähnliche Sensitivität gegenüber Temsirolimus wie die Nierenzellkarzinom-Zelllinie SKRC-47. Die Reduktion der Zellviabilität war eindeutig bei allen Zelllinien dosisabhängig.

A



B



C

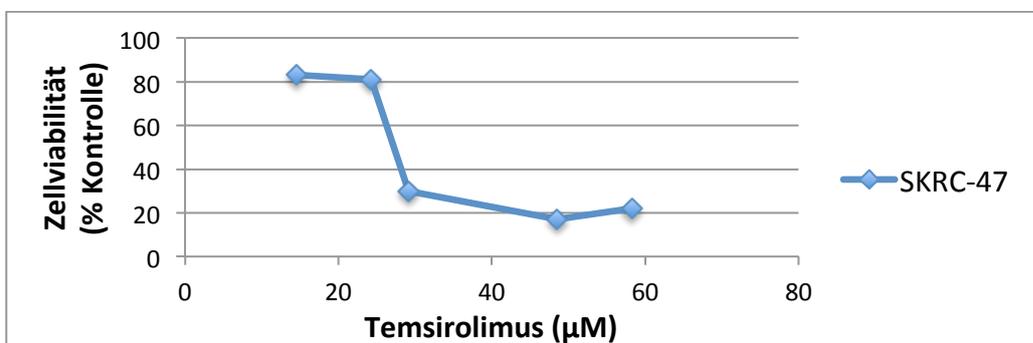


Abbildung 10 Dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität durch Temsirolimus

Dargestellt ist die mit MTT-Tests ermittelte Zellviabilität 24 Stunden nach Temsirolimus-Zugabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Werte wurden aus vier Versuchsansätzen gemittelt. In allen Zelllinienentitäten (A: HNSCC-Zelllinien, B: Urothelkarzinom-Zelllinien, C: Nierenzellkarzinom-Zelllinie) ist eine deutliche, dosisabhängige Verminderung der Zellviabilität durch Temsirolimus zu erkennen. Außer bei der Zelllinie T24 konnte die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf unter 25 % gesenkt werden.

Es erfolgte eine Einteilung in verschiedene Sensitivitätsgruppen anhand der halbmaximalen wachstumsinhibierenden Konzentration (IC_{50}) (Tabelle 16). Die IC_{50} diente der Konzentrationsfindung zur Verwendung von Temsirolimus in weiteren Versuchen. Außerdem kann durch die IC_{50} eine Aussage über die Sensitivität der Zelllinien gegenüber einer mTOR-Inhibition durch Temsirolimus getroffen werden. Insbesondere die Urothelkarzinom-Zelllinien RT4, T24 und J82 zeigen bei schmalen 95 % Konfidenzintervall eine hohe Sensitivität gegenüber Temsirolimus. Aber auch die HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 wiesen eine ähnlich hohe Sensitivität wie die Nierenzellkarzinom-Zelllinie SKRC-47 auf. Nur die stark entdifferenzierte Urothelkarzinom-Zelllinie EJ28 zeigte eine relativ niedrige Sensitivität im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

Tabelle 16 IC_{50} und Einteilung nach Sensitivität der untersuchten Zelllinien

Dargestellt sind in aufsteigender Reihenfolge die halbmaximalen wachstumsinhibierenden Konzentrationen (IC_{50}) der verschiedenen Zelllinien mit zugehörigem 95 % Konfidenzintervall. Die IC_{50} wurden mittels GraphPad Prism (Version 5.0) bestimmt. Außer bei PCI-1 und SKRC-47 zeigten sich relativ schmale 95 % Konfidenzintervalle.

<i>Sensitivität</i>	<i>Zelllinie</i>	<i>IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>95 % Konfidenzintervall</i>
sensitiv	RT4	19,3	18,5 bis 20,1
	T24	21,2	18,8 bis 23,8
	J82	24,3	23,6 bis 25,0
moderat sensitiv	SKRC-47	28,3	18,7 bis 42,9
	PCI-13	29,6	29,3 bis 30,0
	PCI-1	30,2	sehr groß
relativ resistent	EJ28	48,9	40,8 bis 58,7

Bei der vergleichenden MTT-Untersuchung mit mTOR-siRNAs wurden die drei verwendeten siRNA-Konstrukte 24 und 48 Stunden mit einer Konzentration von 100 nM inkubiert. Es wurden die HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13, die Urothelkarzinom-Zelllinien T24 und RT4 und die Nierenzellkarzinom-Zelllinie SKRC-47 untersucht. Alle Zelllinien zeigten, im Gegensatz zu den MTT-Tests nach Temsirolimus-Gabe, keine oder nur eine sehr geringe Minderung der Zellviabilität (Abbildung 11). Auch eine Inkubationszeit von 48 Stunden hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität. Die Zelllinien wiesen sehr ähnliche Ergebnisse auf, sodass sie hier zusammengefasst dargestellt werden. Es wurde bei jedem Versuchsansatz jeweils für 24 Stunden und für 48 Stunden Inkubationszeit eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Die Absorption dieser

Kontrollansätze wurde als Referenz (100 %) der Zellviabilität für die jeweiligen Versuchsansätze (siRNA-Transfektion) verwendet.

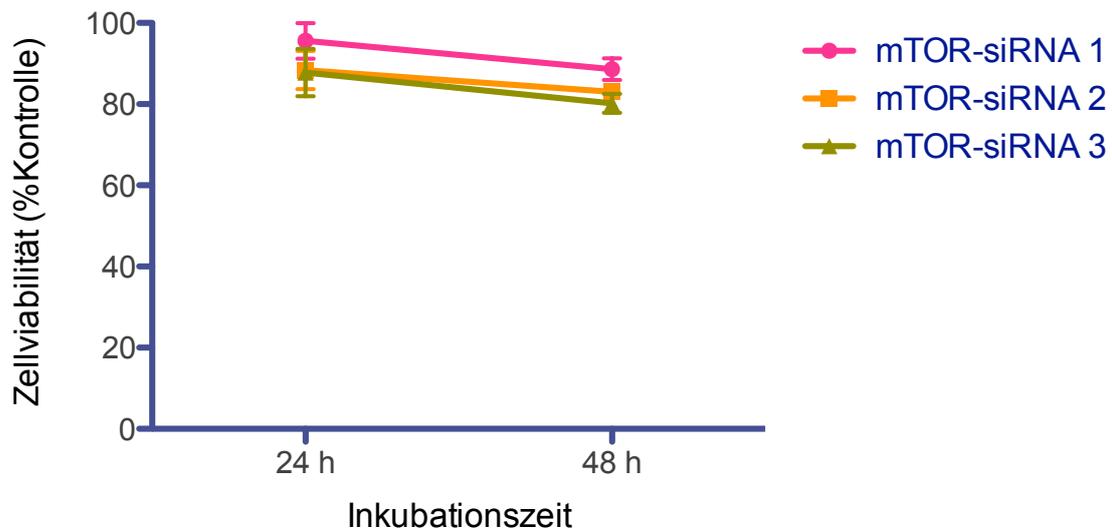


Abbildung 11 Einfluss von mTOR-siRNA auf die Zellviabilität

Die mittels MTT-Test ermittelte Zellviabilität wurde durch mTOR-siRNAs nicht oder nur sehr gering gesenkt. Da die untersuchten Zelllinien (HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13, Urothelkarzinom-Zelllinien T24 und RT4 und die Nierenzellkarzinom-Zelllinie SKRC-47) deckungsgleiche Ergebnisse aufwiesen, sind die Mittelwerte der Zellviabilitäten aller Zelllinien und die zugehörigen Standardabweichungen zusammengefasst in einem Graphen dargestellt. Die Werte sind in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Zeitpunkte angegeben. Die Ergebnisse für die jeweiligen Zelllinien setzten sich aus mindestens vierfach-Bestimmungen zusammen. Durch keines der siRNA-Konstrukte konnte die Zellviabilität wesentlich gemindert werden und auch die Inkubationszeit hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität (24 oder 48 Stunden (h)).

Um auszuschließen, dass die Verdopplungszeiten der Zellen zu lang sind, um eine im MTT-Test sichtbare Wirkung der siRNAs zu zeigen, wurde stichprobenartig mit zwei Zelllinien ein MTT-Test nach 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Durch die Verwendung von lediglich zweifach-Bestimmungen zeigt sich in diesem Versuch eine größere Streuung der Werte als im vorherig gezeigten. Es ist zu erkennen, dass die Zellviabilität nach der 24-stündigen Inkubation mit transfizierter mTOR-siRNA nicht deutlich abnimmt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit war in diesem Versuch eine leichte Verminderung der Zellviabilität auf circa 80 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beobachten. Nach 72-stündiger Inkubation zeigte sich keine zusätzliche Verminderung der Zellviabilität im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation (Abbildung 12).

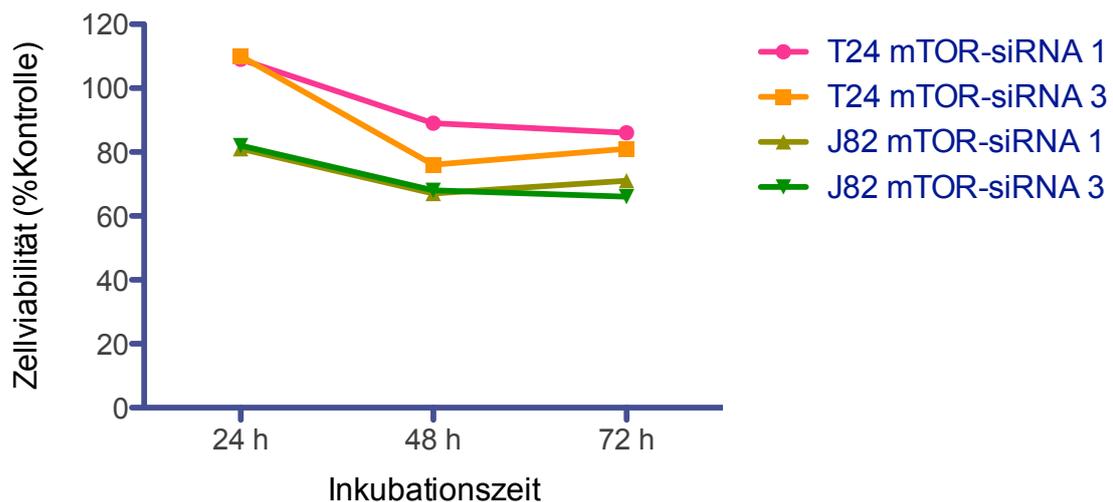


Abbildung 12 Effekt der Inkubationszeit der mTOR-siRNA Konstrukte 1 und 3 auf die Zellviabilität in den Zelllinien T24 und J82

Ergänzend zu den Ergebnissen in Abbildung 11 wurde untersucht, ob nach einer Inkubationszeit der siRNA von 72 Stunden eine zusätzliche Wirkung auf die Zellviabilität im Vergleich zur Inkubation nach 48 Stunden zu beobachten ist. Die Werte sind in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Zeitpunkte angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit mit dem Vorversuch wurde zusätzlich die Zellviabilität nach 24 Stunden Inkubation untersucht. Es ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden die Zellviabilität im Vergleich zur 48-stündigen Inkubation nicht weiter abnimmt.

Am Beispiel der Zelllinie T24 soll das Ergebnis verdeutlicht werden (Abbildung 12). Bei einer Verdopplungszeit der Zelllinie T24 von circa 48 Stunden ist anzunehmen, dass spätestens nach 72 Stunden eine Verminderung der Zellviabilität durch siRNA sichtbar sein müsste. Die Zellen wiesen jedoch auch nach 72 Stunden keine geringere Zellviabilität als nach 48 Stunden auf.

3.3.1 Additiver Effekt von Temsirolimus und Cisplatin

Vor dem Hintergrund, dass derzeit Cisplatin klinisch die beste Möglichkeit ist, das metastasierte Harnblasenkarzinom zu behandeln und auch bei HNSCC zu den wirksamsten Cytostatika zählt (Iro und Werner, 2009), wurde *in vitro* die Kombination von Cisplatin mit Temsirolimus in ihrer Wirkung auf die Zellviabilität untersucht.

Mittels MTT-Test wurden die Auswirkungen der alleinigen Inkubation mit Temsirolimus oder Cisplatin auf die Zellviabilität im Vergleich zur kombinierten Inkubation untersucht. Die kombinierten Inkubationen setzten sich hierbei aus der gleichzeitigen Inkubation mit Temsirolimus und Cisplatin und der zeitlich aufeinanderfolgenden Inkubation zusammen. Diese verschiedenen Versuchsansätze sollten zeigen, ob eine der beiden Substanzen für die jeweils andere sensibilisiert und inwiefern dies mit der zeitlichen Abfolge der Applikation

zusammenhängt. Vergleichend wurde untersucht, welche Wirkung bei gleichzeitiger Applikation der beiden Substanzen beobachtet wird (Abbildung 13). Grundsätzlich wurde in diesem Versuch die im MTT-Test ermittelte IC_{25} von Temozolomid und Cisplatin verwendet. Der Versuch erfolgte mit HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13), Urothelkarzinom-Zelllinien (T24 und RT4) und einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie (SKRC-47). Für jede Zelllinie wurden vier Versuchsansätze erstellt, deren Ergebnisse gemittelt in die Auswertung eingingen. Da die Zelllinien sehr ähnlich auf die verschiedenen Inkubationen reagierten, werden sie zusammengefasst betrachtet. In der Abbildung 13 ist zu erkennen, dass insbesondere die aufeinanderfolgenden Inkubationen von Temozolomid und Cisplatin unabhängig von der Reihenfolge der Substanzapplikation etwas stärker die Zellviabilität senken, als die alleinige Inkubation einer der beiden Substanzen. Zur genauen Verifizierung dieser Ergebnisse wurde eine statistische Analyse mittels GraphPad Prism durchgeführt.

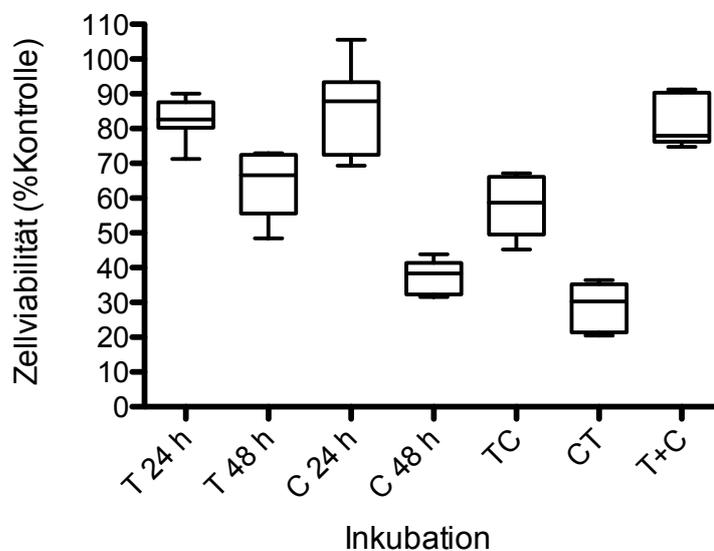


Abbildung 13 Vergleich der Wirksamkeit zwischen der alleinigen Inkubation mit Temozolomid beziehungsweise Cisplatin und der Kombination

Die Zelllinien wurden mit der aus Vorversuchen mit den MTT-Tests ermittelten zelllinienspezifischen IC_{25} in verschiedenen Kombinationen inkubiert und anschließend MTT-Tests durchgeführt. Die sehr ähnlichen Ergebnisse der einzelnen Zelllinien spiegeln sich hier in der engen Spanne der Box-Whisker-Plots wider. Die kombinierten Inkubationen sind durch die rechten drei Plots dargestellt. Für den ersten Teil des Versuches wurden die Zellen 24 Stunden mit Temozolomid inkubiert und im Anschluss 24 Stunden mit Cisplatin (TC). Im zweiten Teil war die Reihenfolge der Inkubation umgekehrt (CT), und im dritten Teil wurden die Zellen gleichzeitig mit Temozolomid und Cisplatin für 24 Stunden inkubiert (T+C). Als Vergleich wurde die alleinige 24-stündige Inkubation mit Temozolomid (T 24 h) beziehungsweise Cisplatin (C 24 h) herangezogen. Da bei den kombinierten Inkubationen TC und CT der Abstand der jeweils ersten Substanz zum MTT-Test um 24 Stunden länger ist als bei der gleichzeitigen Inkubation (T+C), wurde

zusätzlich 48 Stunden nach Applikation von Temsirolimus (T 48 h) beziehungsweise Cisplatin (C 48 h) der MTT-Test durchgeführt.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse von gepaarten T-Tests gezeigt, die Größe und Signifikanz der Unterschiede aufzeigen. Die kombinierten Inkubationen TC und CT zeigen im Vergleich zur alleinigen Inkubation einer der beiden Substanzen einen signifikant additiven Effekt. Die gleichzeitige Gabe von Temsirolimus und Cisplatin (T+C) verminderte hingegen die Zellviabilität nicht stärker als die alleinige 24-stündige Inkubation mit Temsirolimus (T 24 h) oder Cisplatin (C 24 h).

Tabelle 17 Gepaarte T-Tests: Vergleich kombinierter Inkubationen mit alleinigen Inkubationen mit Temsirolimus oder Cisplatin

P-Wert signifikant ab $p < 0,05$. Es zeigte sich bei den Kombinationen TC und CT eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Verminderung der Zellviabilität im Vergleich zur alleinigen Inkubation. Bei der gleichzeitigen Inkubation mit Cisplatin und Temsirolimus (C+T) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Inkubation (T 24 h oder C 24 h).

	<i>Durchschnittlicher Unterschied</i>	<i>95 % Konfidenzintervall</i>	<i>p-Wert</i>
TC versus T 48 h	6,5	3,6 bis 9,4	0,003
CT versus C 48 h	8,4	2,4 bis 14,4	0,017
C+T versus T 24 h	- 3	- 17,3 bis 11,3	0,59
C+T versus C 24 h	0,8	- 16,4 bis 17,9	0,9

3.4 Einfluss von Temsirolimus und siRNA auf die Zellproliferation und mTOR-Aktivierung

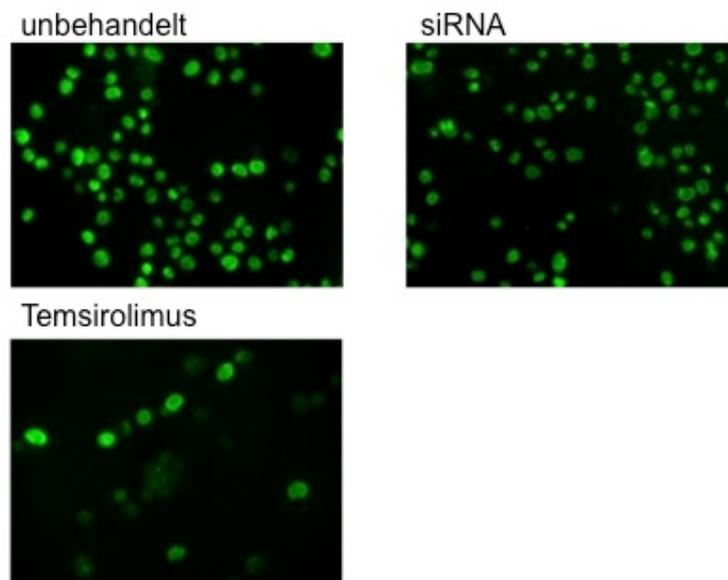
Zur Untersuchung des Einflusses von Temsirolimus und siRNA auf die Zellproliferation und den mTOR- und pmTOR-Gehalt der Zelllinien wurden von den mit der jeweiligen Substanz inkubierten Zellen Zytospin-Präparate erstellt und diese anschließend mit spezifischen, markierten Antikörperpräparationen inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopisch erstellten Bilder wurden mittels der Software ImageJ analysiert. Untersucht wurden die HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 und die Urothelkarzinom-Zelllinien T24 und RT4.

3.4.1 Analyse der Zellproliferation

Die Zellproliferation nach siRNA-Transfektion und Temsirolimusinkubation wurde mittels Ki-67-Färbung fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Das Ki-67-Antigen steht eindeutig mit der Zellproliferation in Zusammenhang (Scholzen und Gerdes, 2000). Es wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert (G_1 , S, G_2 und Mitose), und fehlt in ruhenden Zellen (G_0).

Die meisten untersuchten Zelllinien zeigten ein dem in Abbildung 14 dargestelltes ähnliches Bild der Ki-67-Expression im Fluoreszenzmikroskop. In Abbildung 14 ist die Ki-67-Expression exemplarisch bei PCI-1 für HNSCC-Zelllinien (A) und bei RT4 (B) für Blasenkarzinomzelllinien dargestellt.

A



B

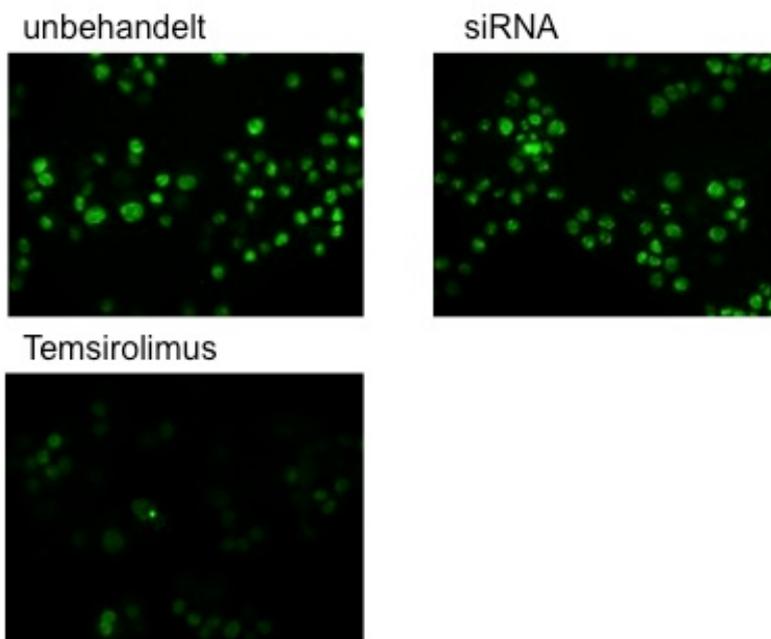


Abbildung 14 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Ki-67 Expression exemplarisch bei PCI-1 und RT4-Zellen

Mit Temsirolimus oder siRNA inkubierte Zellen wurden im Vergleich zu unbehandelten Zellen fluoreszenzmikroskopisch hinsichtlich der Proliferation untersucht. Der Primärantikörper richtete sich gegen den Proliferationsmarker Ki-67, der Sekundärantikörper war FITC-markiert und erscheint grün im Fluoreszenzmikroskop. Hier abgebildet sind eine HNSCC-Zelllinie (PCI-1) (A) und eine Urothelkarzinom-Zelllinie (RT4) (B). unbehandelt = unbehandelte Zellen, siRNA= nach Transfektion mit siRNA, Temsirolimus= nach Inkubation mit Temsirolimus. Obwohl es sich um Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten handelt, ist die Ki-67-Expression bei den jeweiligen Inkubationsbedingungen vergleichbar. siRNA verminderte kaum die Ki-67-Expression, Temsirolimus hingegen verminderte sie eindeutig.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Ki-67-Expression nach siRNA- und Temsirolimus-Inkubation aller untersuchten Zelllinien dargestellt. Alle mit siRNA transfizierten Zelllinien wiesen keine wesentliche Verminderung der Proliferation auf (gelbe Säulen). Nach Temsirolimus-Inkubation war eine Abnahme des Proliferationsmarkers insbesondere bei den HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) und der Urothelkarzinom-Zelllinie RT4 zu beobachten (grüne Säulen). Bei der Urothelkarzinom-Zelllinie T24 war nur eine leichte Verminderung erkennbar.

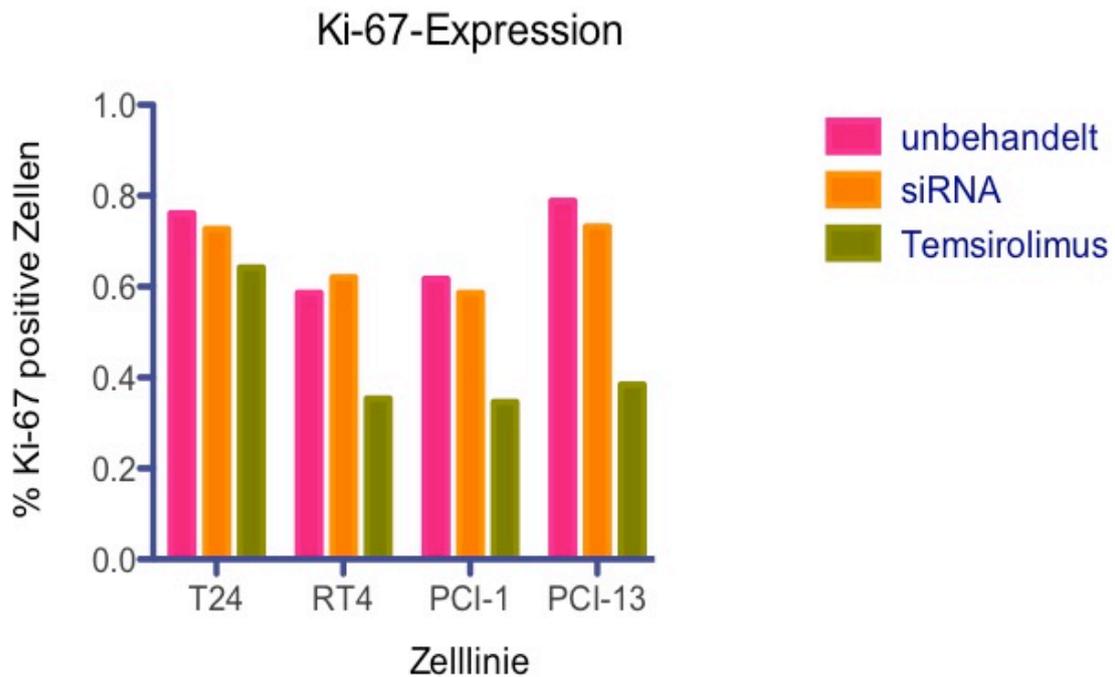


Abbildung 15 Einfluss von siRNA und Temsirolimus auf die Zellproliferation

Nach der jeweiligen Inkubation wurde fluoreszenzmikroskopisch die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen bestimmt. Die Auszählung wurde mit einem zu diesem Zweck erstellten *Plugin* für die Software ImageJ durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei verschiedenen Versuchsansätzen (Färbungen).

3.4.2 Analyse des mTOR-Gehaltes und -Aktivierung

Bei eindeutiger Minderung der Zellviabilität durch Temsirolimus und unveränderter Zellviabilität nach siRNA-Inkubation stellt sich die Frage, wie hoch der aktivierte mTOR (pmTOR) -Gehalt je nach Art der mTOR-Inhibition ist. Hierzu wurden die mTOR-Proteine fluoreszenzmikroskopisch markiert und ihre Fluoreszenz mittels ImageJ in Abhängigkeit positiv fluoreszierender Zellen ausgewertet (Abbildung 16). Der verwendete phospho-mTOR- (pmTOR) Antikörper bindet an mTOR-Proteine, die an der Position Ser²⁴⁴⁸ phosphoryliert sind (Nave et al., 1999).

Die Zelllinien zeigten nach siRNA-Inkubation im Vergleich zur Temsirolimus-Inkubation eine eindeutig höhere Expression an pmTOR (Abbildung 16). Auch der mTOR-Gehalt der Zellen wurde ergänzend zu den Westernblot-Untersuchungen nach siRNA-Transfektion untersucht. Die Ergebnisse der Westernblot-Untersuchungen zeigten eine erfolgreiche Herunterregulierung des mTOR-Proteins um bis zu 50 % (siehe Tabelle 14). In Abbildung 16 wird deutlich, dass die Westernblot-Ergebnisse nach siRNA-Transfektion fluoreszenzmikroskopisch für die Zelllinien PCI-1 und PCI-13 bestätigt werden konnten. In den Zelllinien T24 und RT4 konnte nach siRNA-Transfektion in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung kein verminderter mTOR-Gehalt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

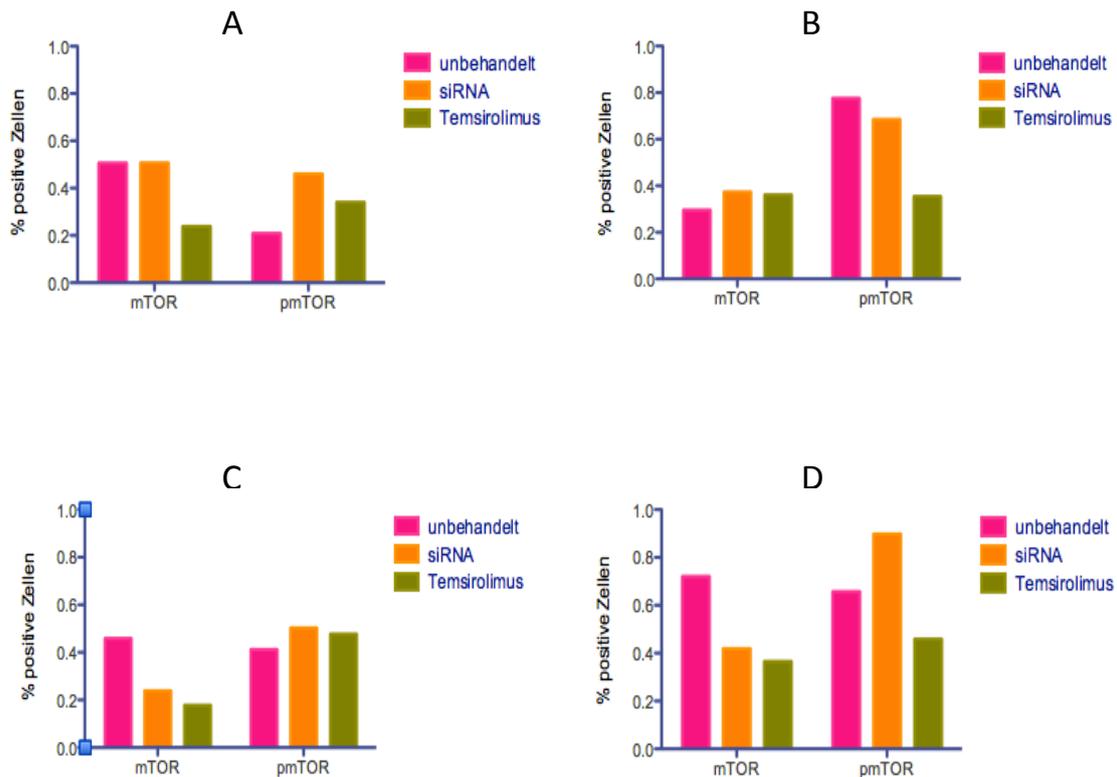


Abbildung 16 Fluoreszenzmikroskopische Expression von mTOR und pmTOR

Dargestellt ist der fluoreszenzmikroskopisch ermittelte Einfluss von mTOR-siRNA und Temsirolimus auf mTOR- und pmTOR-Gehalt von den Urothelkarzinom-Zelllinien T24 (A) und RT4 (B) und den HNSCC-Zelllinien PCI-1 (C) und PCI-13 (D). Auf der x-Achse sind unbehandelte Zellen und Zellen, die mit drei siRNA-Konstrukten (Mittelwert) beziehungsweise mit Temsirolimus inkubiert wurden, aufgetragen. Die y-Achse zeigt mTOR-positive beziehungsweise pmTOR-positive Zellen in Prozent (von der Software Image J ermittelt).

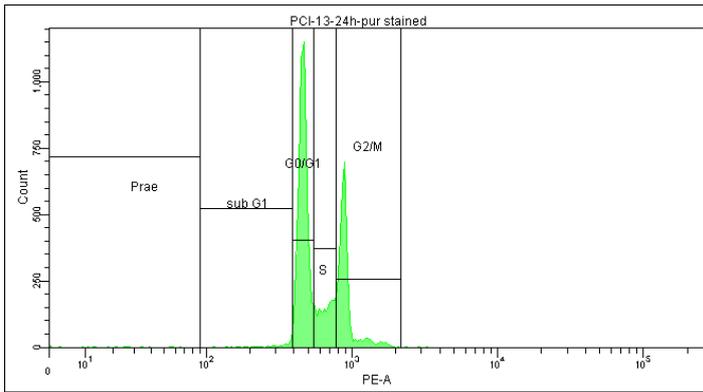
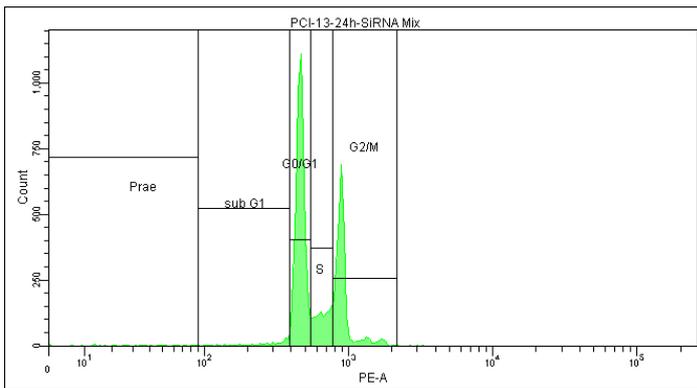
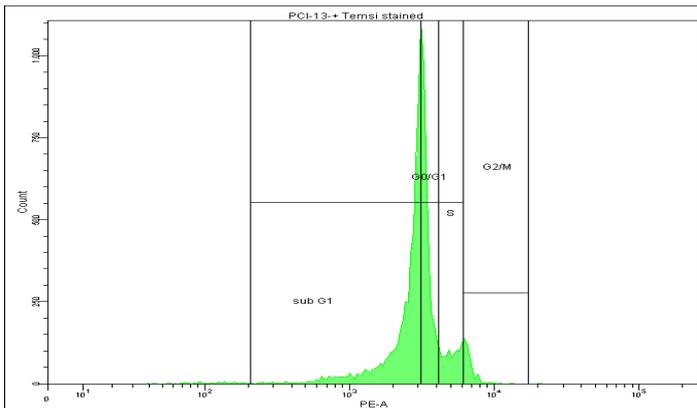
3.5 Einfluss von Temsirolimus und siRNA auf den Zellzyklus und Apoptoseinduktion

Zur Untersuchung des Einflusses einer mTOR-Inhibition mittels siRNA-Transfektion und Temsirolimus auf den DNA-Gehalt und die Zellzyklusverteilung wurden durchflusszytometrische Messungen mit Propidiumjodid durchgeführt. Die Zellmembranen wurden mit Alkohol (EtOH) für den Farbstoff Propidiumjodid permeabilisiert und anschließend durch Behandlung mit RNase die RNA entfernt, sodass nur DNA-assoziierte Fluoreszenz verbleibt. Propidiumjodid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix und wird durch seinen Emissionspeak bei 650 nm im Durchflusszytometer detektiert. Da der DNA-Gehalt der Zellen abhängig von der Zellzyklusphase ist, können Rückschlüsse von der Fluoreszenzstärke von Propidiumjodid auf den Zellzyklus gezogen werden (Remmele, 1999). Die Ergebnisse wurden in Histogrammen graphisch dargestellt. Apoptotische

Zellen haben einen geringen DNA-Gehalt und befinden sich im sub-G1-Bereich des DNA-Histogramms.

Es wurden Urothelkarzinom-Zelllinien (RT4 und T24), HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) und zum Vergleich eine Nierenzellkarzinom-Zelllinie (SKRC-47) mit siRNA transfiziert, beziehungsweise mit Temsirolimus behandelt. Als Kontrolle für die siRNA-Transfektion diente eine FITC-markierte siRNA. Wie in den vorherigen siRNA-Transfektionsversuchen wurden die mit der siRNA transfizierten Zellen 24 und 48 Stunden inkubiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob der gleichzeitige Einsatz aller drei siRNA-Konstrukte einen zusätzlichen Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose zeigt.

Anhand der erstellten Histogramme wurde deutlich, dass die eingeschleusten siRNA-Konstrukte unabhängig von der Inkubationszeit keinen Einfluss auf den Zellzyklus aufwiesen, während Temsirolimus deutlich Apoptose induzierte und zu einer G2/M zu G0/G1 Verschiebung führte. Auch der Einsatz einer siRNA-Mischung aus allen drei Konstrukten zeigte keinen Einfluss auf den Zellzyklus oder die Apoptoseinduktion (Abbildung 17).

A**B****C**

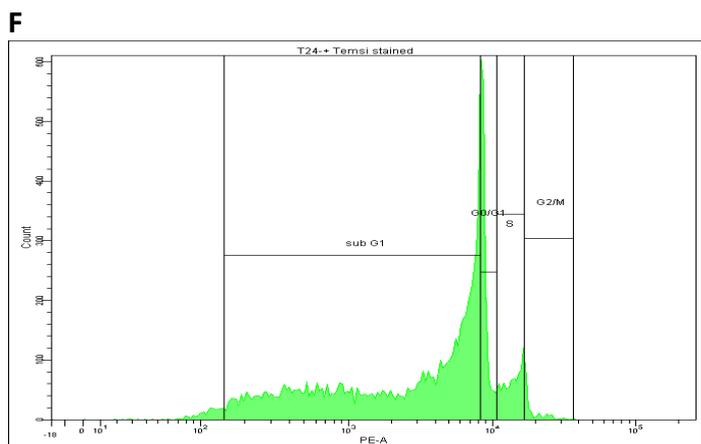
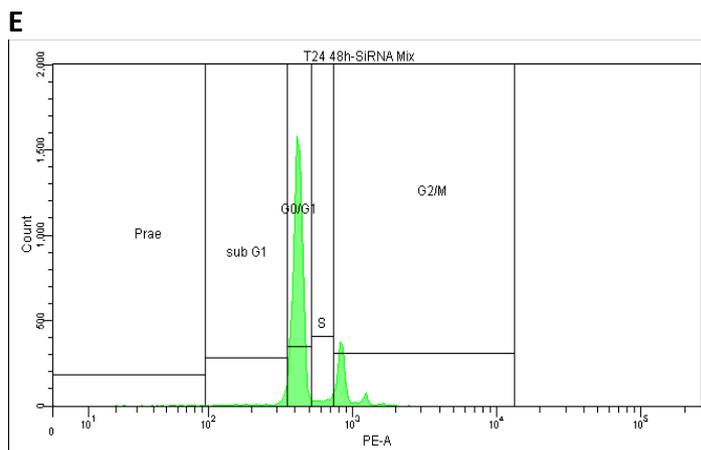
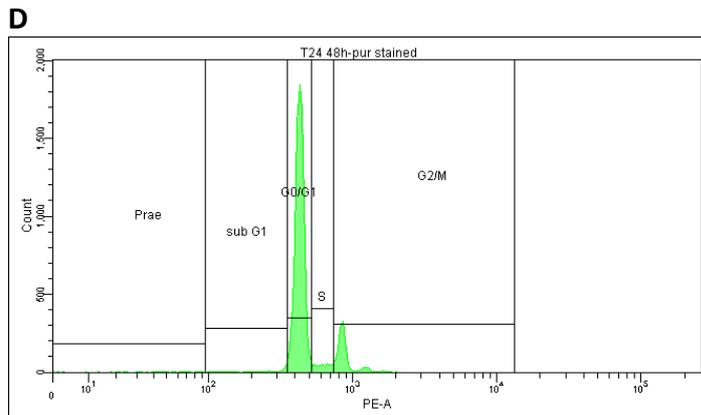


Abbildung 17 Einfluss von siRNA und Temsirolimus auf den Zellzyklus

Gezeigt sind durchflusszytometrisch erstellte Histogramme. Gezählt wurden Propidiumjodid-Signale (Count), die den DNA-Gehalt der Zellen repräsentieren. Für die untersuchten Zelllinien (T24, RT4, PCI-1, PCI-13 und SKRC-47) fanden sich vergleichbare Ergebnisse. Es sind repräsentativ für HNSCC-Zelllinien PCI-13-Zellen (A-C) und für Urothelkarzinom-Zelllinien T24 (D-F) dargestellt. In A und D ist die Zellzyklusverteilung nach Inkubation der Zellen in Medium gezeigt. In B und E ist zu erkennen, dass die Mischung aus allen drei siRNA-Konstrukten keinen Einfluss auf den Zellzyklus hatte. Temsirolimus hingegen führt zu Apoptose (erkennbar an dem Bereich vor dem ersten Peak, dem sub-G1-Peak) und einer G2/M zu G0/G1 Verschiebung des Zellzyklus (C und F).

4 Diskussion

Urothelkarzinome und Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches (HNSCC) stellen häufig auftretende maligne Erkrankungen dar (Jemal et al., 2009). Die Therapieerfolge bei diesen Erkrankungen sind trotz der technischen und biologischen Weiterentwicklung während der letzten Jahre weiterhin unbefriedigend. Dies wird durch aussagefähige klinische Studien belegt (Chin et al., 2004; Kausch und Jocham, 2007). Ansätze einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankungen können sich möglicherweise aus neuen Erkenntnissen über die gestörte zelluläre Regulation in den betreffenden Tumorentitäten ergeben (Dancey, 2006; Arslan et al., 2006; Georgakis und Younes, 2006).

Tumorzellen sowohl aus Urothelkarzinomen als auch aus HNSCC können Störungen des PI3K/AKT-Stoffwechselweges aufweisen (Nathan et al., 2004; Amornphimoltham et al., 2005; Ekshyyan et al., 2010; Tickoo et al., 2011). Es konnte in einer Vielzahl von Experimenten gezeigt werden, dass die hierdurch bedingten Regulationsstörungen auf zellulärer Ebene an der malignen Transformation beteiligt und für deren klinische Folgen verantwortlich sind (Menon und Manning, 2009). Die detaillierte Kenntnis dieser Fehlregulationen und ihre Beeinflussbarkeit durch therapeutisch einsetzbare Substanzen ist Voraussetzung für eine potentielle Nutzung dieser Stoffwechselwege zur klinischen Behandlung dieser Erkrankungen. Die Inhibition des mTOR-Systems mit Temsirolimus stellt bei Nierenzellkarzinomen bereits eine bis zum klinischen Einsatz entwickelte und routinemäßig eingesetzte Therapieoption dar, die eine wesentliche Verbesserung der Behandlungsergebnisse erbracht hat (Hudes et al., 2006; Hudes et al., 2007).

Diese Arbeit soll dazu beitragen, Grundlagen für Beeinflussungsmöglichkeiten dieser zellenregulierenden Systeme in Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien durch therapeutisch verwendbare Substanzen wie Temsirolimus und siRNA *in vitro* zu erarbeiten.

4.1 mTOR-Expression und -Aktivierung in Urothelzellkarzinom- und HNSCC-Zelllinien

Grundlage für eine erfolgversprechende mTOR-Inhibition im PI3K-Signaltransduktionsweges ist der Nachweis, dass mTOR-Protein in den Zellen vorhanden ist und eine Aktivierung vorliegt. Bei Nierenzellkarzinomen konnte die vermehrte Aktivierung des PI3K-Signaltransduktionsweges im Primärtumor sowie in Metastasen nachgewiesen werden (Hager et al., 2010). Verschiedene Bestandteile dieses Signaltransduktionsweges wie Phosphatidylinositol 3'-Kinase, PTEN, phospho-Akt, phospho-mTOR und p-70S6 wurden untersucht und eine vermehrte Expression dieser

aktivierenden Proteine, die mit mTOR in Zusammenhang stehen, wurde beobachtet (Abou Youssif et al., 2011). Bei Mantelzelllymphomen konnten *Peponi et al.* (2006) mittels Westernblot-Analyse feststellen, dass phospho-AKT und phospho-mTOR sowie die mTOR nachgeschalteten Moleküle p-70S6K, p-4E-BP1 und Gesamt-eIF4E stark aktiviert sind.

Bei diesen beiden Tumorentitäten zeigt die mTOR-Inhibition ausgehend von den *in vitro* Versuchen bis in die klinische Praxis eine gute Wirksamkeit (Peponi et al., 2006; Hager et al., 2007; Dreyling et al. 2010).

Es konnte bereits in einer Untersuchung zu Urothelkarzinomzellen, die aus Tumoren von Patienten gewonnen wurden, eine ähnliche Aktivierung der Proteine phospho-4E BP1, phospho-S6, HIF-1 α und VEGF-R2 nachgewiesen werden (Hansel et al., 2010; Tickoo et al., 2011).

In dieser Arbeit zeigten alle untersuchten Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien eine den untersuchten Nierenzellkarzinom-Zelllinien vergleichbare mTOR-mRNA-Expression. Die in dieser Arbeit nachgewiesene mTOR- und pmTOR-Expression auf RNA- und Proteinebene bestätigt die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen (Hager et al., 2010; Hansel et al., 2010; Abou Youssif et al., 2011; Tickoo et al., 2011) für die untersuchten Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien und weist auf einen aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweg hin. Die grundsätzliche Empfänglichkeit dieser Zellen für eine mTOR-Inhibition *in vitro* ist somit aufgrund der ermittelten Daten gegeben.

4.2 mTOR-Inhibition: sequenzspezifische siRNAs und Temsirolimus

4.2.1 mTOR-siRNA beeinflusst die Aktivität des mTOR-Signaltransduktionsweges nur gering

Die Transfektion von siRNAs ist eine häufig angewandte Methode, mit der zielgerichtet Proteine in der Zelle ausgeschaltet werden können (Elbashir et al., 2001). mTOR-siRNAs richten sich gegen beide mTOR-Komplexe und können somit auf zwei Wegen den PI3K-Signaltransduktionsweg inhibieren. Sie wirken auf mRNA-Ebene und verhindern die Neubildung der mTOR-Proteine (Nagy et al., 2003). Bei Nierenzellkarzinom-Zelllinien konnte durch mTOR-siRNAs die mTOR-Expression stark herunterreguliert werden, ebenso die Expression der nachgeschalteten Proteine HIF2-alpha, phosphoryliertem S6K und phosphoryliertem Akt über die gleichzeitige Ausschaltung von mTOR-Komplex 2 (Toschi et al., 2008). Auch in kolorektalen Karzinomen führte die Transfektion von mTOR-siRNAs zu einer bis zu 80 %igen Verminderung der Konzentration an mTOR- und pmTOR-Proteinen (Zhang et al., 2009). Bei Zervixkarzinom-Zelllinien zeigte sich eine verminderte Expression des im PI3K-Signaltransduktionsweg mTOR nachgeschalteten Proteins phospho-4-EBP1 (Ji und Zheng, 2010).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine Verminderung der mTOR-Expression durch mTOR-siRNAs in den Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien erreicht werden. Insbesondere das von Eurogentec empfohlene siRNA-Konstrukt 1 konnte die mTOR-Expression auf 50 % vermindern. Nur bei der von einem papillären Tumor abstammenden Tumorzelllinie RT4 konnte die mTOR-Expression nur gering herunterreguliert werden. Die Ursache hierfür könnte in der geringen Zellteilungsrate der Zelllinie liegen, da anteilig weniger neue Zellen mit vermindertem mTOR-Protein gebildet werden als in schnell proliferierenden Zelllinien.

Im Gegensatz zu der bereits beschriebenen starken Herunterregulation von pmTOR bzw. phospho-4-EBP1 bei kolorektalen Karzinomen, Zervixkarzinomen und Nierenzellkarzinomen (Toschi et al., 2008; Zhang et al., 2009; Ji und Zheng, 2010) wurde in den experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit die Protein-Expression von aktivem, phosphoryliertem mTOR (pmTOR) außer bei der Urothelkarzinom-Zelllinie T24 nur sehr schwach gesenkt. Die durch siRNA-Transfektion verminderte Konzentration an mTOR in den Zellen wird möglicherweise durch vermehrte Phosphorylierung der vorhandenen mTOR-Proteine zu einem Teil wieder ausgeglichen. Der PI3K-Signaltransduktionsweg würde bei Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien durch siRNAs somit nur gering beeinflusst und trotz Anwesenheit von siRNA größtenteils aktiviert bleiben.

4.2.2 Dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität durch Temsirolimus

Temsirolimus ist in letzter Zeit wichtiger Bestandteil in der Therapie von Tumoren insbesondere bei Nierenzellkarzinomen geworden (Hudes et al., 2007). Ob dabei tatsächlich ein zytostatischer Effekt erreicht wird oder werden kann, könnte von Alterationen im PI3K-Signaltransduktionsweg abhängen. Bei Urothelkarzinomen konnten Veränderungen in den Proteinen PIK3CA, PTEN, AKT1 und TSC1 festgestellt werden (Knowles et al., 2009). In der Randzone von humanen HNSCC-Primärtumoren findet eine vermehrte Expression von phospho-S6 und AKT statt (Nathan et al., 2004). In neuen, weiterführenden Untersuchungen der Randzone von HNSCC senkte Temsirolimus phospho-S6 und p4E-BP1 (Ekshyyan et al, 2010). In verschiedenen HNSCC-Zelllinien ist phospho-S6 identifiziert worden (Amornphimoltham et al., 2005). Diese Veränderungen könnten in Urothelkarzinomen und HNSCC zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren führen.

Mansure et al. (2009) und *Chiong et al. (2011)* führten Untersuchungen zur mTOR-Inhibition mittels des Rapamycin-Derivates Everolimus *in vitro* bei verschiedenen humanen Blasentumor-Zelllinien (UM-UC-Zelllinien) und am Nacktmausmodell durch (*Mansure et al., 2009; Chiong et al., 2011*). Es konnte nachgewiesen werden, dass Everolimus eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums zur Folge hat und die Zelllinien eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Everolimus besitzen. *Chiong et al. (2011)* konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen diesen

unterschiedlichen Sensitivitäten und dem PTEN- oder Akt-Status der Zelllinien feststellen. Drei der untersuchten Zelllinien wurden außerdem im Nacktmaus-Modell hinsichtlich des Tumorwachstums nach Transplantation untersucht. Everolimus inhibiert alle von dieser Arbeitsgruppe untersuchten Tumoren in ihrem Wachstum. Ein dosisabhängiger Unterschied in der Sensitivität gegenüber Everolimus konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür wird in alternativen Signaltransduktionswegen wie dem Angiogenese-Weg gesucht, der nur *in vivo* eine Rolle spielt (Chiong et al., 2011). *Pinto-Leite et al.* (2009) haben den Effekt von Sirolimus auf die Zellviabilität von T24-Zellen untersucht und konnten im MTT-Test eine Minderung der Zellviabilität feststellen. Auch *Fechner et al.* (2009) wiesen im MTT-Test eine verminderte Zellviabilität nach Inkubation mit Rapamycin in den Zelllinien RT112, RT4, T24 und SUP nach, ohne jedoch differenzierte Ergebnisse für die einzelnen Zelllinien zu nennen.

Für HNSCC-Zellen wurde gezeigt, dass Rapamycin zu einer Reduktion der Konzentration des mTOR nachgeschalteten Proteins S6 sowie zu einer Abnahme der Tumormasse im Mausmodell mit HN12-Zelllinien führt (Amornphimoltham et al., 2005). Im Mausmodell wurde darüber hinaus nach Temsirolimus-Applikation *in vivo* eine Hemmung des Wachstums der HNSCC-Zelllinien HEP2 und Detroit 562 nachgewiesen (Jimeno et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde für Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien *in vitro* mittels MTT-Test gezeigt, dass Temsirolimus zu einer deutlich verminderten Zellviabilität in allen Zelllinien führt. Die Zellviabilität konnte außer bei der Zelllinie T24 im Vergleich zu unbehandelten Zellen unter 25 % gesenkt werden. Die verhältnismäßig geringere Verminderung der Zellviabilität von T24 auf circa 40 % (vergleiche Abbildung 10) könnte jedoch an der im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien geringen Zellzahl im Versuchsansatz liegen, insbesondere erkennbar an den Kontrollproben ohne Zugabe von Temsirolimus (Abbildung 9). Die Untersuchungen von *Pinto-Leite et al.* (2009) unterstreichen die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse. Die Viabilität der Zelllinie T24 wurde im MTT-Test ebenfalls nur auf circa 45 % vermindert. Die Durchführung eines MTT-Tests mit höheren Temsirolimus-Konzentrationen erscheint aufgrund der aus dieser Arbeit und den von *Pinto-Leite et al.* (2009) resultierenden Ergebnissen sinnvoll.

Des Weiteren zeigte sich anhand der Einteilung der IC_{50} in dieser Arbeit (Tabelle 16), dass die Zelllinien mit PTEN-Defekt (T24 und J82) zur Gruppe der sensitiven Zelllinien gegenüber Temsirolimus gehörten. Ein mutiertes PTEN vermindert die Umwandlung von aktiviertem PIP3 in PIP2 (Kong und Yamori, 2009), somit entfällt ein Inhibitor direkt am Anfang des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges (vergleiche Abbildung 1). Dies stützt die Hypothese, dass ein aktivierter PI3K/AKT Signaltransduktionsweg die Sensibilität gegenüber mTOR-Inhibitoren verstärkt. Es ist jedoch zu beachten, dass die Tumorzelllinie RT4 in diesem Test als sensitivste Zelllinie identifiziert wurde. RT4-Zellen stammen von einem papillären Tumor ab und zeigen seltener als invasive

Tumoren PTEN-Mutationen. Es wäre möglich, dass der PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg auf anderem Wege bei dieser Zelllinie aktiviert wird. Ein Zusammenhang zwischen Art und Häufigkeit von Mutationen und Sensitivität gegenüber mTOR-Inhibitoren kann aufgrund der geringen Anzahl von Zelllinien nicht hergestellt werden. Dies deckt sich mit der Aussage von *Chiong et al.* (2011), in deren Untersuchungen sich ebenfalls kein Zusammenhang mit PTEN und Akt-Mutationen in den wenigen untersuchten Zelllinien ergeben hat.

Die Zellteilungsrate der Tumorzelllinien schien ebenfalls nicht in Zusammenhang mit der Sensitivität gegenüber Temsirolimus zu stehen. In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte die Zelllinie EJ28 mit einer Verdopplungszeit von circa 24 Stunden die geringste Sensitivität verglichen mit den anderen untersuchten Tumorzelllinien und RT4 mit einer Verdopplungszeit von circa 80 Stunden die höchste Sensitivität (vergleiche Tabelle 16).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse eine deutliche Zellviabilitätsminderung durch Temsirolimus zeigen, die vergleichbar und ergänzend zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bei Urothelkarzinomen und HNSCC sind. Deutliche Zusammenhänge der Mutationen im PI3K-Signaltransduktionsweg oder der Zellteilungsrate der Tumorzelllinien mit der Zellviabilitätsminderung durch Temsirolimus konnten in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

4.2.3 siRNAs haben keinen Effekt auf die Zellviabilität

Bei kolorektalen Karzinom-Zelllinien konnte durch Anwendung von mTOR-siRNA *in vitro* und auch *in vivo* das Zellwachstum signifikant vermindert werden (Zhang et al., 2009). Durch 24-stündige Inkubation von mTOR-siRNA konnte außerdem in CNE-2-Zelllinien, einer Zelllinie aus Nasopharynx-Tumoren, die Zellviabilität deutlich vermindert werden (Huang et al., 2009).

Die in dieser Arbeit verwendeten mTOR-siRNAs wirkten, zusätzlich zu dem von Temsirolimus inhibierten mTOR-Komplex-1 (Brown et al., 1994), inhibierend auf den mTOR-Komplex 2. Der PI3K/AKT Signaltransduktionsweg wird somit an zwei verschiedenen Stellen gehemmt.

In den Untersuchungen dieser Arbeit wiesen die im Westernblot gezeigte Verminderung des mTOR-Proteins und die dosisabhängigen Transfektionseffizienzen auf eine erfolgreiche siRNA-Transfektion und Wirksamkeit hin. Im MTT-Test wurde jedoch unabhängig von der Inkubationszeit der siRNAs (24, 48 und 72 Stunden) und des mTOR-siRNA-Konstrukts (zwei Sequenzen wurden von der Herstellerfirma empfohlen, eine weitere von *Peponi et al.* (2006) übernommen) keine Hemmung der Zellviabilität durch mTOR-siRNAs nachgewiesen. Es konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass die Verdopplungszeiten der Zellen zu lang sind, um eine im MTT-Test sichtbare Wirkung der siRNAs zu zeigen (siehe Abbildung 12).

Die unveränderte Zellviabilität im MTT-Test könnte durch die fehlende Beeinflussung der mTOR-Aktivierung erklärt werden, die sich im Westernblot und der Fluoreszenzmikroskopie dieser Arbeit durch geringe Reduktion an pmTOR durch siRNAs widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung wäre eine Reaktion der Zelle auf die verminderte Menge an mTOR-Proteinen. Es ist denkbar, dass bereits synthetisiertes mTOR-Protein vermehrt phosphoryliert wird. Über welche Signaltransduktionswege dies geschieht, lässt sich aus den Untersuchungen nicht ableiten. Eine Möglichkeit wäre eine vermehrte Aktivität von Rac1, das zur Rho-Familie von GTPasen gehört und einen kritischen Regulator von mTOR-Komplex 1 und mTOR-Komplex 2 als Antwort auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren darstellt (Saci et al., 2011). Es wurden in der Literatur keine Arbeiten zu diesem Phänomen gefunden.

Temsirolimus hingegen wirkt im Gegensatz zur siRNA-Transfektion erst nach der Translation an den schon gebildeten mTOR-Proteinen (Abraham und Gibbons, 2007). Die Zelle hat daher weniger Möglichkeiten der Gegenregulation als beim Einsatz von siRNAs. Dies könnte die Diskrepanz der Zellviabilitätsminderung zwischen Temsirolimus und siRNA erklären.

4.2.4 Temsirolimus vermindert die Zellproliferation, siRNA hat keinen Einfluss

Die Beeinflussung der Proliferation durch tumorwachstumshemmende Substanzen kann durch die Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 untersucht werden (Bartholomeusz et al., 2010). In Mammakarzinom-Zelllinien im *in vivo* Mausmodell wurde die Proliferationsrate nach Applikation von Rapamycin durch immunhistochemische Färbung von Ki-67 untersucht. Rapamycin supprimiert in diesem Modell die Tumorzellproliferation (Miller et al., 2009). In einer Phase-I-Studie wurde bei Patienten mit rekurrenden Glioblastomen in sieben von 14 Tumoren nach einwöchiger Behandlung mit Rapamycin die Zellproliferation, die mittels Ki-67 bestimmt worden war, deutlich vermindert (Cloughesy et al., 2008). Bei HNSCC- und Urothelkarzinomen wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt die Beeinflussung der mTOR-Inhibition auf den Proliferationsmarker Ki-67 nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde Ki-67 mittels Fluoreszenzmikroskopie vor und nach Inkubation der HNSCC-, Urothel- und Nierenzellkarzinom-Zelllinien mit Temsirolimus und siRNA bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Temsirolimus die Proliferation der HNSCC- und Urothelkarzinom-Zelllinien deutlich, im Durchschnitt um 36 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen, hemmt. Diese Aussage ergänzt sich mit den im MTT-Test gefundenen Zellviabilitätsminderungen in allen Zelllinien. Mit derselben fluoreszenzmikroskopischen Methode wurde die Proliferation nach mTOR-Inhibition mit mTOR-siRNA untersucht. Ebenfalls konkordant mit den Ergebnissen im MTT-Test findet sich keine Proliferationsminderung in den untersuchten Zelllinien. Die Proliferationshemmung durch

Temsirolimus kann als zusätzliche Bestätigung gewertet werden, dass eine mTOR-Inhibition durch diese Substanz bei Urothelkarzinomen und HNSCC einen effektiven Therapieansatz darstellt.

4.2.5 Steigerung der pmTOR-Expression durch siRNA-Transfektion, Verminderung durch Temsirolimus

Wie in vorausgegangenen Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist in den verwendeten Zelllinien der mTOR-Signaltransduktionsweg aktiviert. Es sollte daher fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden, wie der pmTOR-Spiegel durch Temsirolimus und siRNA beeinflusst wird und ob ein Zusammenhang mit der Verminderung der Zellviabilität und –proliferation besteht.

Im *in vivo* Maus-Modell wurde durch Everolimus immunhistochemisch keine Beeinflussung des pmTOR-Spiegels im Vergleich zur Placebo-Kontrolle beobachtet (Chiong et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurde bei Ratten mit durch BBN (N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)Nitrosamin) induzierten Blasen Tumoren durch Rapamycin eine deutliche Reduktion der pmTOR-Spiegel erreicht (Wu et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Temsirolimus-Inkubation bei der Hälfte der untersuchten Zelllinien (RT4, T24, PCI-1 und PCI-13) eine verminderte pmTOR-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskopie festgestellt. Es handelte sich um PCI-13 (HNSCC) und RT4 (Urothelkarzinom-Zelllinie). Die Zelllinie RT4 zeigte bereits im MTT-Test die stärkste Verminderung der Zellviabilität durch Temsirolimus und eine deutliche Proliferationsminderung in der Fluoreszenzmikroskopie. PCI-13 ist von den HNSCC-Zelllinien die mittels MTT-Test bestimmte sensitivere Zelllinie der beiden untersuchten HNSCC-Zelllinien und wies auch eine deutliche Verminderung der Proliferation nach Inkubation mit Temsirolimus auf. Somit bestätigen die Ergebnisse nicht nur die Zellviabilitäts- und Proliferationsversuche, sondern zusätzlich den Wirkmechanismus von Temsirolimus als mTOR-Inhibitor bei diesen Tumorentitäten. Dieser Effekt war bei PCI-1 und T24 nicht in dieser Weise zu beobachten. Dies ergänzt sich mit den gefundenen Ergebnissen von *Chiong et al.* (2011), die ebenfalls keine Beeinflussung des pmTOR-Spiegels fanden. Es ist anzunehmen, dass eine Beeinflussung von pmTOR durch Rapamycin oder Temsirolimus sehr tumorspezifisch und gegebenenfalls abhängig vom Subtyp einer Tumorentität ist.

Nach siRNA-Transfektion konnten im Vergleich zur Temsirolimus-Inkubation erhöhte pmTOR-Spiegel in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Die nach den Westernblot- und MTT-Versuchen aufgestellte Hypothese, dass mit siRNA inkubierte Zellen gegenregulatorisch noch vorhandenes mTOR phosphorylieren, konnte somit auch in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

4.2.6 Temsirolimus inhibiert den Zellzyklus und induziert Apoptose, siRNA hat hingegen keinen Einfluss

Der aktivierte mTOR-Komplex 1 reguliert die Proteinbiosynthese durch Phosphorylierung von 4E-bindendem Protein 1 (4E-BP1) und p70S6K (S6K). Diese Translationsinitiationsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der cap-abhängigen mRNA-Translation, die die Menge an Proteinen, die für die Zellzyklus-Progression, Proliferation, Zellüberleben und Angiogenese benötigt werden, erhöht. Onkogene und Tumorsuppressorgene, die den mTOR-Komplex 1 über den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg aktivieren, sind in Tumorzellen häufig dysreguliert (Gibbons et al., 2009).

Der Einfluss der mTOR-Inhibition auf den Zellzyklus wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Ein früher Zellzyklusarrest wurde mehrfach beschrieben, während zur Apoptoseinduktion sehr unterschiedliche Ergebnisse beschrieben wurden (Tabelle 18).

Tabelle 18 Beobachtungen zu Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion durch mTOR-Inhibition

In dieser Tabelle sind die bekannten Forschungsergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen und die Ergebnisse dieser Arbeit für den direkten Vergleich dargestellt.

<i>Tumorentität</i>	<i>Stimulanz</i>	<i>Zellzyklusarrest</i>	<i>Apoptoseinduktion</i>	<i>Referenz</i>
anaplastische Lymphome	siRNA und Rapamycin	GO/G1	ja	Vega et al. (2006)
lymphatische Leukämie	Temsirolimus	keine Angabe	ja	Teachey et al. (2006)
Mantelzelllymphom	siRNA	Abnahme Zellen in S-Phase	ja	Peponi et al. (2006)
Zervixkarzinom	siRNA und Rapamycin	G1	ja	Ji und Zheng (2010)
Endometriumkarzinom	Rapamycin	G1	nein	Zhou et al. (2003)
Hypophysentumore	Rapamycin und Everolimus	G1	nein	Sukumari-Ramesh et al. (2011)
Larynxkarzinom	Rapamycin	G1	ja	Lei et al. (2009)
Nasopharynxkarzinom	siRNA und Rapamycin	keine Angabe	ja	Huang et al. (2009)
Urothelkarzinom	Everolimus	G1	nein	Mansure et al. (2009)

HNSCC	Temsirolimus	G1	ja	diese Arbeit
Urothelkarzinom	Temsirolimus	G1	ja	diese Arbeit

Bei anaplastischen Lymphomen konnte durch mTOR-Inhibition mit siRNA und Rapamycin ein G0/G1-Zellzyklusarrest ausgelöst werden. Außerdem wurde durch erhöhte Annexin-V-Spiegel nach mTOR-Inhibition gezeigt, dass Apoptose induziert wird (Vega et al., 2006). Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin, welches auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen vorkommt und somit der Detektion von apoptotischen Zellen dient (Vermees et al., 1995). In einer Tumorzellkultur von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wurde mittels Annexin V eine erhöhte Apoptoserate durch Temsirolimus beobachtet (Teachey et al., 2006). Bei Mantelzelllymphomen wurde nach mTOR-Inhibition mit siRNA eine Abnahme der Zellen in der S-Phase gefunden. Auch für diese Tumoren konnte durch Bestimmung von Annexin-V und anti-apoptotischen Proteinen eine Apoptoseinduktion belegt werden (Peponi et al., 2006). In Zervixkarzinom-Zelllinien (HeLa-Zellen) wurde nach Rapamycin und mTOR-spezifischer siRNA ein G1-Arrest ausgelöst und Apoptose induziert (Ji und Zheng, 2010). Im Gegensatz hierzu konnte von der Arbeitsgruppe *Zhou et al.* (2003) trotz G1-Arrest durch Rapamycin keine Induktion von Apoptose festgestellt werden. In Zelllinien von Hypophysentumoren wird durch Rapamycin und Everolimus ebenfalls ein G1-Arrest ausgelöst. Die Apoptoserate wurde durch den prozentualen Anteil der Zellen in der sub-G1-Fraktion bestimmt. Keiner der beiden mTOR-Inhibitoren induziert bei dieser Tumorentität Apoptose (Sukumari-Ramesh et al., 2011). In der Larynx-Karzinom-Zelllinie Hep-2 wurde ebenfalls nachgewiesen, dass durch Rapamycin ein G1-Arrest induziert und die Apoptoserate erhöht wird (Lei et al., 2009). Die Apoptoseinduktion konnte von *Huang et al.* (2009) für Nasopharynx-Karzinome nach Rapamycin und mTOR-siRNA bestätigt werden. Der G1-Arrest konnte auch in neun Blasenkarzinom-Zelllinien nach Everolimus-Inkubation mittels FACS-Analysen festgestellt werden, Apoptose wird durch Everolimus jedoch nicht ausgelöst (Mansure et al., 2009).

In dieser Arbeit konnte durch Temsirolimus mittels Erstellung von Histogrammen in allen untersuchten Zelllinien ein G2/M zu G0/G1-Shift nachgewiesen werden. Dies bestätigt den von den anderen Arbeitsgruppen demonstrierten G1-Arrest durch mTOR-Inhibitoren für Urothelkarzinome und HNSCC. Sowohl bei Urothelkarzinomen als auch bei HNSCC wurde in dieser Arbeit eine vergrößerte sub-G1-Fraktion beobachtet, die auf Apoptoseinduktion in diesen Zelllinien schließen lässt. Diese Ergebnisse ergänzen sich mit der von *Lei et al.* (2009) und *Huang et al.* (2009) bei Larynx- und Nasopharynx-tumoren gezeigten Apoptoseinduktion und sind gegensätzlich zu den Ergebnissen von *Mansure et al.* (2009), der keine Apoptoseinduktion bei

Blasenkarzinomen nachweisen konnte. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass von *Mansure et al.* (2009) andere Blasenkarzinomzellen untersucht wurden als in der vorliegenden Arbeit.

Liu et al. (2007) haben das Ausmaß der mTOR-Expression im Verlauf des Zellzyklus in wenig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen (oral squamous carcinoma, OSC) und in Hela-Zellen untersucht. In OSC-Zellen wurde mTOR während der M-Phase vermehrt exprimiert, während in Hela-Zellen keine Änderung der mTOR-Expression im Verlauf des Zellzyklus beobachtet wurde. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass die Auswirkungen der mTOR-Inhibition mittels Rapamycin-Derivaten auf die Apoptoseinduktion anscheinend stark von der Tumorentität abhängen, während ein G1-Arrest in allen Tumorentitäten ausgelöst wird.

Durch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Apoptoseinduktion bei Urothelkarzinomen und HNSCC wird deutlich, dass Temsirolimus zu einer Verbesserung der Therapiemöglichkeiten bei diesen schwer therapierbaren Tumorentitäten führen könnte.

4.3 Kombination von Temsirolimus und Cisplatin

In den Untersuchungen dieser Arbeit stellte die mTOR-Inhibition mit Temsirolimus im Vergleich zur sequenzspezifischen Inhibition mit mTOR-siRNA eine erfolgversprechende Methode zur Behandlung von Harnblasenkarzinomen und HNSCC *in vitro* dar. Es stellte sich die Frage, ob durch Kombination von Temsirolimus mit einem Zytostatikum additive Effekte erreicht werden könnten. Cisplatin ist sowohl bei Urothelkarzinomen als auch bei HNSCC Teil der Standard-Therapie (Sharma et al., 2009; Pan et al., 2009). Cisplatin gehört zur Gruppe der Alkylanzien und führt zum Auftreten von Querverknüpfungen von DNA Strängen und zur Auslösung von Punktmutationen. Zusätzliche Mechanismen sind die Hemmung der zellulären DNA-Reparaturfunktionen und der Telomerase-Aktivität. Durch diese Wirkprinzipien kommt es zur Apoptose insbesondere sich schnell teilender Zellen (Marcu, 2009).

An neuroektodermalen Tumorzelllinien/Medulloblastom-Zelllinien wies Rapamycin eine additive Wirkung mit Cisplatin auf. Im Maus-Modell zeigte sich im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Cisplatin in der Kombination Temsirolimus/Cisplatin eine 1,3 fache Verringerung des Tumorwachstums (Geoerger et al., 2001). An Lungenkarzinom-Zelllinien wurde die Beeinflussung der Cisplatin-Sensibilität durch mTOR-Inhibition untersucht. Die verwendeten Cisplatin-resistenten Zelllinien weisen eine Aktivierung der mTOR-Signalkaskade mit vermehrter Bildung von Proteinen (cyclin D3, hTERT und phospho-AKT), die Wachstum/Proliferation und Überleben der Zelle vermitteln, auf. Diese führen dazu, dass die Wirkung von Cisplatin deutlich herabgesetzt ist (Wu et al., 2005). Eine mTOR-Inhibition mit Temsirolimus oder mTOR-siRNA führt zu einer Steigerung der wachstumsinhibierenden Wirkung von Cisplatin um ein Vielfaches (Wu et al., 2005; Wangpaichitr et al., 2008). In zwei Endometriumkarzinom-Zelllinien konnte durch die

Kombinationen von Rapamycin und Cisplatin beziehungsweise mTOR-siRNA und Cisplatin eine signifikant synergistische, antiproliferative Wirkung erzielt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem festgestellt, dass Rapamycin und mTOR-siRNA die Cisplatin-induzierte Apoptose-Rate erhöhen (Bae-Jump et al., 2009). In der Larynxkarzinom-Zelllinie Hep-2 und einer oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinie (OSCC Tca8113) wurde ebenfalls eine synergistische Wirkung von Rapamycin und Cisplatin beschrieben (Lei et al., 2009; Fang et al., 2011). Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass Rapamycin den Zellzyklus in der G1-Phase stoppt (Vega et al., 2006; Ji und Zheng, 2010; Sukumari-Ramesh et al., 2011). Da die G1-Phase den optimalen Zeitpunkt für eine gute Wirksamkeit von Cisplatin darstellt (Krishnaswamy und Dewey, 1993), könnte dieser Aspekt zum Teil die synergistische Wirkung von Rapamycin und Cisplatin erklären (Lei et al., 2009). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der gefundenen synergistischen Wirkung von Cisplatin und mTOR-Inhibitoren müssen jedoch weiterhin untersucht werden. Eine weitere denkbare Ursache des Synergismus könnte sein, dass es zwar keine molekularen Überschneidungen in der Wirkungsweise gibt, jedoch eine funktionelle Überschneidung hinsichtlich der Zellproliferation und der Apoptose-Induktion besteht, wie von Bae-Jump et al. (2009) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt die Kombination von Temsirolimus mit Cisplatin *in vitro* bei Urothelkarzinomen und HNSCC im MTT-Test hat. Unabhängig von der Reihenfolge der Substanzapplikation zeigten die Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien und die Nierenzellkarzinom-Zelllinie sehr ähnliche Ergebnisse. Durch die gleichzeitige Inkubation von Cisplatin und Temsirolimus wurde anders als bei den anderen Tumorentitäten keine zusätzliche Zellviabilitätsminderung im Vergleich zur alleinigen Inkubation einer der beiden Substanzen beobachtet. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Konzentrationen von Temsirolimus und Cisplatin wären nötig, um dieses Ergebnis zu verifizieren, da in der vorliegenden Arbeit lediglich die IC_{25} der beiden Substanzen verwendet wurde. In der Arbeit von Bae-Jump et al. (2009) hatten unterschiedliche Konzentrationen von Cisplatin einen Effekt auf die synergistische Wirkung mit Rapamycin. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern die Reihenfolge der Substanzapplikation Einfluss auf die Zellviabilität nimmt. Im Gegensatz zur gleichzeitigen Inkubation von Temsirolimus und Cisplatin konnte durch zeitlich versetzte Applikation eine signifikant additive Wirkung erzielt werden. Dies war unabhängig davon, welche Substanz zuerst appliziert wurde. Möglicherweise führen bei Urothelkarzinomen und HNSCC sowohl Temsirolimus als auch Cisplatin zu einer Sensibilisierung für die jeweils andere Substanz. Diese Sensibilisierung könnte zu dem beobachteten additiven Effekt führen. Ein Nachweis auf molekularer Ebene müsste noch erfolgen.

Dennoch könnten die gefundenen Ergebnisse klinisch für HNSCC und Urothelkarzinome relevant sein, da bei additiver Wirkung die Menge an Temozolomid und Cisplatin bei gleichbleibendem zytostatischen Effekt gesenkt werden könnte. Nebenwirkungen könnten somit vermindert werden. Gleichmaßen wäre bei voller Dosierung beider Substanzen ein zusätzlicher zytostatischer Effekt möglich.

Zusammenfassend für alle Untersuchungen dieser Arbeit lässt sich sagen, dass die mTOR-Inhibition mit Temozolomid einen deutlichen zytostatischen Effekt bei Urothelkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) zeigt, der sich in dieser Arbeit in Form einer Verminderung der Zellviabilität und Proliferation sowie Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion darstellte. Der Einsatz von Temozolomid könnte daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei diesen Tumorentitäten darstellen.

4.4 Ausblick

Die hier vorgeschlagenen Projekte sollen der Validierung und der genaueren Charakterisierung der Ergebnisse dieser Arbeit dienen, die einen Schritt auf dem Weg zum klinischen Einsatz von Temozolomid bei Patienten mit Urothelkarzinomen und HNSCC zum Ziel haben.

Anders als nach Inkubation mit Temozolomid ließ sich in dieser Arbeit durch mTOR-siRNA-Transfektion kein Einfluss auf Zellviabilität, Proliferation oder Apoptose bei Urothelkarzinomen und HNSCC nachweisen. Dies stand im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine Verminderung des Zellwachstums durch mTOR-siRNA bei Kolon- und Nasopharynxkarzinom-Zelllinien fanden (Huang et al., 2009; Zhang et al., 2009). Die untersuchten Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien könnten über einen bisher unbekanntem Signaltransduktionsweg vorhandene mTOR-Proteine vermehrt phosphorylieren, um die durch mTOR-siRNA verminderte Konzentration an mTOR-Proteinen auszugleichen. In weiterführenden Experimenten könnte beispielsweise untersucht werden, inwieweit nach siRNA-Transfektion die mTOR-vorgeschalteten Signaltransduktionswege aktiviert werden. Eine Möglichkeit wäre, die Aktivität von AKT und PTEN mittels Westernblot zu bestimmen. Denkbar wäre auch, dass Urothelkarzinome und HNSCC einen im Unterschied zu anderen Tumoren alternativen Signaltransduktionsweg aufweisen. Dieser müsste dann identifiziert und genauer analysiert werden.

Durch Inkubation der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien mit Temozolomid wurden eine Zellviabilitäts- und Proliferationsminderung sowie eine Apoptoseinduktion festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Temozolomid und der Mutationen im PI3K-Signaltransduktionsweg konnte jedoch weder in dieser Arbeit, noch in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Chiong et al., 2011). Eine weiterführende Untersuchung

mit einer größeren Zahl unterschiedlicher Zelllinien beziehungsweise primärem Tumormaterial müsste erfolgen, um festzustellen, ob ein aktivierter PI3K-Signaltransduktionsweg tatsächlich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temsirolimus führt und ob die Unterschiede in der Sensitivität abhängig von Mutationen in diesem Weg sind. Beispiele hierfür wären Mutationen im PTEN- oder TSC-1-Gen. Gegebenenfalls könnte eine Tumortypisierung vor der klinischen Behandlung mit Temsirolimus die Indikationsstellung eingrenzen und den Therapieerfolg verbessern.

In dieser Arbeit wurden mittels Histogrammen ein Zellzyklusarrest und eine Apoptoseinduktion durch Temsirolimus festgestellt. Spezifische Experimente zur genaueren Untersuchung des Apoptosezeitpunktes und der Apoptosewege könnten die Ergebnisse dieser Arbeit validieren. Darüber hinaus könnte die Kenntnis der mechanistischen Hintergründe beispielsweise den Einsatz von pathophysiologisch sinnvoll ergänzenden Therapieansätzen ermöglichen, wie etwa mit weiteren Zytostatika. Diese Untersuchungen können durch Einsatz der TUNEL-Methode mittels Durchflusszytometrie oder im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden. Auf diese Weise kann zu verschiedenen Zeitpunkten die DNA-Fragmentierung gemessen werden. Mittels Apoptosearrays und Untersuchung der Caspasen (real-time-PCR und Westernblot) können die molekularen Hintergründe, wie aktivierte Apoptosewege, identifiziert werden.

Alle bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit wurden *in vitro* durchgeführt. Es ist bekannt, dass mTOR-Inhibitoren wie Temsirolimus *in vivo* zusätzlich durch eine Inhibierung der Translation von angiogenetischen Faktoren wie HIF-1-alpha wirken (Wan et al., 2006). Dieser Effekt lässt auf eine zusätzliche Wachstumsinhibierung der Tumoren schließen (Del Bufalo et al., 2006), die auch bei Urothelkarzinomen und HNSCC eine Rolle spielen könnten. Daher wäre eine Bestätigung und gegebenenfalls eine Erweiterung der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse im Tiermodell anzustreben. Hierzu könnte beispielsweise die Konzentration an HIF-1-alpha mittels Westernblot nach Inkubation mit Temsirolimus im Vergleich zu Kontrollmäusen bestimmt werden.

Bei der kombinierten Inkubation von Temsirolimus und Cisplatin wurde in der vorliegenden Arbeit bei aufeinanderfolgender Inkubation eine leicht additive Wirkung gefunden. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine stärkere synergistische Wirkung bei höheren Konzentrationen an Cisplatin beobachtet werden kann (Bae-Jump et al., 2009). Es wäre daher vielversprechend auch bei Urothelkarzinomen und HNSCC Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin durchzuführen. Interessant wären auch Untersuchungen zum molekularen Hintergrund der in dieser Arbeit beobachteten additiven beziehungsweise in anderen Arbeiten beschriebenen synergistischen Wirkung.

5 Zusammenfassung

Urothelkarzinome der Harnblase und Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) gehören zu den häufigsten Tumorarten. Insbesondere in fortgeschrittenen Stadien sind die bisherigen Therapieoptionen bei diesen Tumoren von nur begrenztem Erfolg. Ziel dieser Arbeit war es, die bereits bei anderen Tumorentitäten erfolgreich eingesetzte mTOR-Inhibition bei Urothelkarzinomen und HNSCC präklinisch experimentell mit mTOR-spezifischer siRNA und Temsirolimus zu untersuchen. Hierzu erfolgten *in vitro* Untersuchungen an Urothelkarzinom-Zelllinien (T24, RT4, J82, EJ28), HNSCC-Zelllinien (PCI-1, PCI-13, BHY) und vergleichend an einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie (SKRC-47).

In Urothelkarzinomen und HNSCC zeigten sich als molekulare Grundlage für eine vielversprechende mTOR-Inhibition Hinweise auf einen aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweg in der RT-PCR und im Westernblot. Dennoch wurde durch die mTOR-Inhibition mit sequenzspezifischer siRNA keine Verminderung der Zellviabilität im MTT-Test beobachtet. Es konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden, dass auch die Proliferation der Tumorzellen durch siRNAs nicht beeinflusst wird. Dieser fehlende zytostatische Effekt wurde mit durchflusszytometrisch erstellten Histogrammen bestätigt, die weder Apoptoseinduktion aufwiesen noch einen Effekt auf den Zellzyklus zeigten. Ursächlich kommt eine gegenregulatorische Phosphorylierung von bereits in der Zelle vorhandenem mTOR in Frage, auf die siRNAs aufgrund ihrer Wirkung auf Translationsebene keinen Einfluss nehmen können. Diese Hypothese wurde unterstützt durch einen weiterhin aktivierten mTOR-Signaltransduktionsweg nach Inkubation mit siRNA im Westernblot.

Im Gegensatz zur mTOR-Inhibition mit siRNA führte die Inkubation mit Temsirolimus im MTT-Test zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte eine deutliche Proliferationsminderung nach Temsirolimus nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Rapamycin-Derivate wie Temsirolimus zu einem G1-Arrest und bei einigen Tumorentitäten zu Apoptose führen. In dieser Arbeit konnte der G1-Arrest für HNSCC und Urothelkarzinome bestätigt werden. Darüber hinaus wurde eine Apoptoseinduktion nachgewiesen.

Bei Urothelkarzinomen und HNSCC ist Cisplatin ein wichtiger Bestandteil der Standardtherapie. Es wurde die Wirkung von Cisplatin in der Kombination mit Temsirolimus mittels MTT-Test für beide Tumorentitäten untersucht. Es zeigte sich bei aufeinanderfolgender Inkubation der beiden Substanzen ein signifikant additiver Effekt und somit ein Zugewinn an Zytostase in der Kombination.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass die mTOR-Inhibition mit Temsirolimus einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei Urothelkarzinomen und HNSCC darstellen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Abou Youssif T, Fahmy MA, Koumakpayi IH, Ayala F, Al Marzooqi S, Chen G, Tamboli P, Squire J, Tanguay S, Sircar K. „The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases.“ *Cancer*, 2011: 290-300.

Abraham RT, Gibbons JJ. „The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy.“ *Clin Cancer Res*, 2007: 3109-14.

Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H Jr, Kish JA, Ensley JF, Schuller DE, Forastiere AA. „An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer.“ *J Clin Oncol*, 2003: 92-8.

Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, Molinolo AA, Gutkind JS. „Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck.“ *Cancer Res*, 2005: 9953-61.

Ansell SM, Inwards DJ, Rowland KM Jr, Flynn PJ, Morton RF, Moore DF Jr, Kaufmann SH, Ghobrial I, Kurtin PJ, Maurer M, Allmer C, Witzig TE. „Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group.“ *Cancer*, 2008: 508-14.

Arslan MA, Kutuk O, Basaga H. „Protein kinases as drug targets in cancer.“ *Curr Cancer Drug Targets*, 2006: 623-34.

Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. „Future prospect of RNA interference for cancer therapies.“ *Curr Drug Targets*, 2010: 345-60.

Askham JM, Platt F, Chambers PA, Snowden H, Taylor CF, Knowles MA. „AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K.“ *Oncogene*, 2009: 150-5.

Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. „Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma.“ *Br J Cancer*, 1999: 904-8.

Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, Gehrig PA. „Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells.“ *Cancer*, 2009: 3887-96.

Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM, Kazansky A, Krishnamurthy S, Liu P, Yuan LX, Yamasaki F, Liu S, Hayashi N, Zhang D, Esteva FJ, Hortobagyi GN, Ueno NT. „PEA-15 inhibits tumorigenesis in an MDA-MB-468 triple-negative breast cancer xenograft model through increased cytoplasmic localization of activated extracellular signal-regulated kinase.“ *Clin Cancer Res*, 2010: 1802-11.

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefèbvre JL, Greiner RH, Giral J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A, van Glabbeke M. „Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer.“ *N Engl J Med*, 2004: 1945-52.

- Bjornsti MA, Houghton PJ. „The TOR pathway: a target for cancer therapy.“ *Nat Rev Cancer*, 2004: 335-48.
- Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. „A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.“ *Nature*, 1994: 756-8.
- Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB, Schreiber SL. „Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo.“ *Nature*, 1995: 441-6.
- Bubeník J, Baresová M, Viklický V, Jakoubková J, Sainerová H, Donner J. „Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen.“ *Int J Cancer*, 1973: 765-73.
- Bubeník J, Perlmann P, Helmstein K, Moberger G. „Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas.“ *Int J Cancer*, 1970: 310-9.
- Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F. „Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder.“ *Oncogene*, 1997: 3059-66.
- Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C. „Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer.“ *Clin Cancer Res*, 1999: 1369-79.
- Chin D, Boyle G M, Theile D R, Parsons P G, Coman W B. „Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis.“ *Br J Plast Surg*, 2004: 595-602.
- Chiong E, Lee IL, Dadbin A, Sabichi AL, Harris L, Urbauer D, McConkey DJ, Dickstein RJ, Cheng T, Grossman HB. „Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells.“ *Clin Cancer Res*, 2011: 2863-73.
- Cloughesy TF, Yoshimoto K, Nghiemphu P, Brown K, Dang J, Zhu S, Hsueh T, Chen Y, Wang W, Youngkin D, Liao L, Martin N, Becker D, Bergsneider M, Lai A, Green R, Oglesby T, Koleto M, Trent J, Horvath S, Mischel PS, Mellinghoff IK, Sawyers CL. „Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma.“ *PLoS Med*, 2008: e8.
- Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE. „The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer.“ *J Clin Oncol*, 2004: 1743-52.
- Dancey JE. „Therapeutic targets: MTOR and related pathways.“ *Cancer Biol Ther*, 2006: 1065-73.
- Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G, Milella M. „Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus.“ *Cancer Res*, 2006: 5549-54.
- Ditz C. „Bedeutung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur für die Cisplatin-induzierte Chemoresistenz von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.“ Med. Diss. Lübeck, 2007.

Douglas WG, Tracy E, Tan D, Yu J, Hicks WL Jr, Rigual NR, Loree TR, Wang Y, Baumann H. „Development of head and neck squamous cell carcinoma is associated with altered cytokine responsiveness.“ *Mol Cancer Res*, 2004: 585-93.

Dreyling M, Herold M, Rummel M, Buske C. „Mantelzell – Lymphom.“ Herausgeber: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie: 2010. <http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/mantelzell-lymphom> (letzter Zugriff am 16. Oktober 2011).

Ebert T, Bander NH, Finstad CL, Ramsawak RD, Old LJ. „Establishment and characterization of human renal cancer and normal kidney cell lines.“ *Cancer Res*, 1990: 5531-6.

ECO/OEC. European Cancer Observatory. „Cancer: Bladder.“ 2008. <http://eu-cancer.iarc.fr/cancer-20-bladder.html,en> (letzter Zugriff am 16. Oktober 2011).

Ekshyyan O, Mills GM, Lian T, Amirghahari N, Rong X, Lowery-Nordberg M, Abreo F, Veillon DM, Caldito G, Speicher L, Glass J, Nathan CO. „Pharmacodynamic evaluation of temsirolimus in patients with newly diagnosed advanced-stage head and neck squamous cell carcinoma.“ *Head Neck*, 2010: 1619-28.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.“ *Nature*, 2001: 494-8.

Fang L, Wang H, Zhou L, Yu D. „FOXO3a reactivation mediates the synergistic cytotoxic effects of rapamycin and cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells.“ *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011: 8-15.

Fechner G, Classen K, Schmidt D, Hauser S, Müller SC. „Rapamycin inhibits in vitro growth and release of angiogenic factors in human bladder cancer.“ *Urology*, 2009: 665-8.

Georger B, Kerr K, Tang CB. „Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy.“ *Cancer Res*, 2001: 1527-32.

Georgakis GV, Younes A. „From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy.“ *Expert Rev Anticancer Ther*, 2006: 131-40.

Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. „Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth.“ *Semin Oncol*, 2009: S3-S17.

Grimm MO, Jürgens B, Schulz WA, Decken K, Makri D, Schmitz-Dräger BJ. „Inactivation of tumor suppressor genes and deregulation of the c-myc gene in urothelial cancer cell lines.“ *Urol Res*, 1995: 293-300.

Guénel P, Chastang JF, Luce D, Leclerc A, Brugère J. „A study of the interaction of alcohol drinking and tobacco smoking among French cases of laryngeal cancer.“ *J Epidemiol Community Health*, 1988: 350-4.

Haddad RI, Shin DM. „Recent advances in head and neck cancer.“ *N Engl J Med*, 2008: 1143-54.

Hager M, Haufe H, Lusuardi L, Schmeller N, Kolbitsch C. „p-AKT overexpression in primary renal cell carcinomas and their metastases.“ *Clin Exp Metastasis*, 2010: 611-7.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. „An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.“ *Nature*, 2000: 293-6.

Hannon GJ. „RNA interference.“ *Nature*, 2002: 244-51.

Hansel DE, Platt E, Orloff M, Harwalker J, Sethu S, Hicks JL, De Marzo A, Steinle RE, Hsi ED, Theodorescu D, Ching CB, Eng C. „Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates cellular proliferation and tumor growth in urothelial carcinoma.“ *Am J Pathol*, 2010: 3062-72.

Hastings RJ, Franks LM. „Chromosome pattern, growth in agar and tumorigenicity in nude mice of four human bladder carcinoma cell lines.“ *Int J Cancer*, 1981: 15-21.

Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, Barnes EL, Johnson JT, Herberman RB, Whiteside TL. „Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines.“ *Cancer Res*, 1989: 5167-75.

Huang XM, Dai CB, Mou ZL, Wang LJ, Wen WP, Lin SG, Xu G, Li HB. „Overproduction of cyclin D1 is dependent on activated mTORC1 signal in nasopharyngeal carcinoma: implication for therapy.“ *Cancer Lett*, 2009: 47-56.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ. „Temsirrolimus, interferon alpha, or both for advanced renal-cell carcinoma.“ *N Engl J Med*, 2007: 2271-81.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, G. Hudes, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, O'Toole T, Park Y, Moore L. „A phase 3, randomized, 3-arm study of temsirolimus (TEMSR) or interferon-alpha (IFN) or the combination of TEMSR+IFN in the treatment of the first line, poor risk patients with advanced renal cell carcinoma (adv RCC).“ *J Clin Oncol*, 2006: LBA4.

Iro H, Werner JA. „Handbuch HNO 2009.“ 30. Heidelberg: Springer, 2009.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. „Cancer statistics, 2009.“ *CA Cancer J Clin*, 2009: 225-49.

Ji J, Zheng PS. „Activation of mTOR signaling pathway contributes to survival of cervical cancer cells.“ *Gynecol Oncol*, 2010: 103-8.

Jimeno A, Kulesza P, Wheelhouse J, Chan A, Zhang X, Kincaid E, Chen R, Clark DP, Forastiere A, Hidalgo M. „Dual EGFR and mTOR targeting in squamous cell carcinoma models, and development of early markers of efficacy.“ *Br J Cancer*, 2007: 952-9.

Jones AS, Fish B, Fenton JE, Husband DJ. „The treatment of early laryngeal cancers (T1-T2 N0): surgery or irradiation?“ *Head Neck*, 2004: 127-35.

- Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH, Katz RL. „Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer.“ *Oncogene*, 1998: 909-13.
- Kausch I, Jocham D. „Maligne Tumoren der Harnblase.“ in Miller K, Jocham D. „Praxis der Urologie.“ 3. Aufl., 105-67. Stuttgart: Thieme, 2007.
- Kausch I, Doehn C, Jocham D. „Recent improvements in the detection and treatment of nonmuscle-invasive bladder cancer Expert Rev.“ *Anticancer Ther*, 2006: 1301-11.
- Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. „Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer.“ *Cancer Metastasis Rev*, 2009: 305-16.
- Kong D, Yamori T. „Advances in development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors.“ *Curr Med Chem*, 2009: 2839-54.
- Krishnaswamy G, Dewey WC. „Cisplatin induced cell killing and chromosomal aberrations in CHO cells: treated during G1 or S phase.“ *Mutat Res*, 1993: 161-72.
- Lei W, Jia T, Su Z, Wen W, Zhu X. „Combined effect of rapamycin and cisplatin on survival of Hep-2 cells in vitro.“ *Oncol Res*, 2009: 73-81.
- Liu Y, Hidayat S, Su WH, Deng X, Yu DH, Yu BZ. „Expression and activity of mTOR and its substrates in different cell cycle phases and in oral squamous cell carcinomas of different malignant grade.“ *Cell Biochem Funct*, 2007: 45-53.
- López-Knowles E, Hernández S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardón A, Serra C, Real FX. „PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors.“ *Cancer Res*, 2006: 7401-4.
- Mann EA, Spiro JD, Chen LL, Kreutzer DL. „Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas.“ *Am J Surg*, 1992: 567-73.
- Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Rocha J, Scarlata E, Kassouf W. „Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer.“ *Cancer Biol Ther*, 2009: 2339-47.
- Marcu LG. „The role of amifostine in the treatment of head and neck cancer with cisplatin-radiotherapy.“ *Eur J Cancer Care*, 2009: 116-23.
- Marshall CJ, Franks LM, Carbonell AW. „Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas.“ *J Natl Cancer Inst*, 1977: 1743-51.
- Menon S, Manning BD. „Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors.“ *Oncogene*, 2009: 43-51.
- Miller TW, Forbes JT, Shah C, Wyatt SK, Manning HC, Olivares MG, Sanchez V, Dugger TC, de Matos Granja N, Narasanna A, Cook RS, Kennedy JP, Lindsley CW, Arteaga CL. „Inhibition of mammalian target of rapamycin is required for optimal antitumor effect of HER2 inhibitors against HER2-overexpressing cancer cells.“ *Clin Cancer Res*, 2009: 7266-76.

Nagy P, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. „Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells.“ *Exp Cell Res*, 2003: 39-49

Napoli KL, Taylor PJ. „From beach to bedside: history of the development of sirolimus.“ *Ther Drug Monit*, 2001: 559-86.

Nathan CO, Amirghahari N, Abreo F, Rong X, Caldito G, Jones ML, Zhou H, Smith M, Kimberly D, Glass J. „Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway.“ *Clin Cancer Res*, 2004: 5820-7.

Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. „Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation.“ *Biochem J*, 1999: 427-31.

Pan Q, Gorin MA, Teknos TN. „Pharmacotherapy of head and neck squamous cell carcinoma.“ *Expert Opin Pharmacother*, 2009: 2291-302.

Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV. „Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma.“ *Int J Cancer*, 2005: 242-8

Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. „Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma.“ *Am J Pathol*, 2006: 2171-80.

Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J. „Potential use of RNA interference in cancer therapy.“ *Expert Rev Mol Med*, 2010: e26.

Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J. „Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients.“ *Radiother Oncol*, 2009: 4-14.

Pinto-Leite R, Botelho P, Ribeiro E, Oliveira PA, Santos L. „Effect of sirolimus on urinary bladder cancer T24 cell line.“ *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2009: 3.

Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. „Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer.“ *Clin Cancer Res*, 2009: 6008-17.

Pries R, Thiel A, Brocks C, Wollenberg B. „Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma.“ *In Vivo*, 2006: 45-8.

Pries R, Wollenberg B. „Cytokines in head and neck cancer.“ *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006: 141-6.

Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. „Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer.“ *Genes Dev*, 2009: 675-80.

Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. „Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer.“ *J Clin Oncol*, 2004: 2336-47.

Remmele W. „Molekularbiologische Methoden in der Pathologie (Molekularpathologie)“ in „Pathologie: Rechtsfragen in der Pathologie, Einführung in die bioptische Diagnostik, Herz und Gefäßsystem, Hämatologie, Milz, Thymus.“ Bd. 2, 2. Aufl., 63-76. Heidelberg: Springer, 1999.

Rigby CC, Franks LM. „A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure.“ *Br J Cancer*, 1970: 746-54.

Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. „Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size.“ *Mol Cell*, 2011: 50-61.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM. „PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase.“ *Mol Cell*, 2007: 903-15.

Scholzen T, Gerdes J. „The Ki-67 protein: From the known and the unknown.“ *Journal of Cellular Physiology*, 2000: 311–22.

Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P. „Diagnosis and treatment of bladder cancer.“ *Am Fam Physician*, 2009: 717-23.

Sharp PA. „RNA interference--2001.“ *Genes Dev*, 2001: 485-90.

Shor B, Zhang WG, Toral-Barza L, Lucas J, Abraham RT, Gibbons JJ, Yu K. „A new pharmacologic action of CCI-779 involves FKBP12-independent inhibition of mTOR kinase activity and profound repression of global protein synthesis.“ *Cancer Res*, 2008: 2934-43.

Sukumari-Ramesh S, Singh N, Dhandapani KM, Vender JR. „mTOR inhibition reduces cellular proliferation and sensitizes pituitary adenoma cells to ionizing radiation.“ *Surg Neurol Int*, 2011: 22.

Teachey DT, Obzut DA, Cooperman J, Fang J, Carroll M, Choi JK, Houghton PJ, Brown VI, Grupp SA. „The mTOR inhibitor CCI-779 induces apoptosis and inhibits growth in preclinical models of primary adult human ALL.“ *Blood*, 2006: 1149-55.

Tickoo SK, Milowsky MI, Dhar N, Dudas ME, Gallagher DJ, Al-Ahmadie H, Gopalan A, Fine SW, Ishill N, Bajorin DF, Reuter VE. „Hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin pathway markers in urothelial carcinoma of the bladder: possible therapeutic implications.“ *BJU Int*, 2011: 844-9.

Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M, Foster DA. „Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1 alpha and 2 alpha on mTORC1 and mTORC2.“ *J Biol Chem*, 2008: 34495-9.

Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, Horie Y, Natsui M, Shibata Y, Hamada K, Yajima N, Kawahara K, Sasaki M, Tsuchiya N, Enomoto K, Mak TW, Nakano T, Habuchi T, Suzuki A. „Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients.“ *Cancer Res*, 2006: 8389-96.

Union for International Cancer Control. www.uicc.org (letzter Zugriff: 17. Oktober 2011)

Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, Claret FX, Rassidakis GZ. „Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma.“ *Cancer Res*, 2006: 6589-97.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. „A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.“ *J Immunol Methods*, 1995: 39-51.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. „Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.“ *J Antibiot (Tokyo)*, 1975: 721-6.

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. „Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence.“ *J Natl Cancer Inst*, 2004: 99-106.

vom Dorp F, Eisenhardt A, Goebell PJ, Gschwend J, Jäger T, Jakse G, Jocham D, Karl A, Krege S, Lümmer G, Otto T, Rettenmeier A, Rödel C, Rübber H, Schenck M, Schmid KW, Stief C, Stöckle M, Zaak D. „Harnblasenkarzinom.“ in Rübber H. „Uroonkologie“ 5. Aufl., 395. Heidelberg: Springer, 2009.

Wan X, Shen N, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. „CCI-779 inhibits rhabdomyosarcoma xenograft growth by an antiangiogenic mechanism linked to the targeting of mTOR/Hif-1 α /VEGF signaling.“ *Neoplasia*, 2006: 394-401.

Wangpaichitr M, Wu C, You M, Kuo MT, Feun L, Lampidis T, Savaraj N. „Inhibition of mTOR restores cisplatin sensitivity through down-regulation of growth and anti-apoptotic proteins.“ *Eur J Pharmacol*, 2008: 124-7.

Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, Grimm EA. „Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens.“ *Cancer Res*, 1998: 1369-79.

Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, Kuo MT, Robles C, Lampidis T, Savaraj N. „Overcoming cisplatin resistance by mTOR inhibitor in lung cancer.“ *Mol Cancer*, 2005: 25.

Wu MJ, Chang CH, Chiu YT, Wen MC, Shu KH, Li JR, Chiu KY, Chen YT. „Rictor-dependent AKT activation and inhibition of urothelial carcinoma by rapamycin.“ *Urol Oncol*, 2010: Epub ahead of print am 29.05.2011.

Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, Xu MH, Chen GQ, Han ZG, Fang JY. „mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer.“ *Ann Surg Oncol*, 2009: 2617-28.

Zhou C, Gehrig PA, Whang YE, Boggess JF. „Rapamycin inhibits telomerase activity by decreasing the hTERT mRNA level in endometrial cancer cells.“ *Mol Cancer Ther*, 2003: 789-95.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Ingo Kausch von Schmeling ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas der Doktorarbeit und der überaus netten und freundschaftlichen Zusammenarbeit danken. Herrn Dr. rer. nat. Ralph Pries danke ich für die interessanten Anregungen, die Unterstützung und sehr angenehme Zusammenarbeit.

Für die Einarbeitung in die Methoden, die vielen guten Tipps und die fortwährende Unterstützung gilt mein Dank Beate Thode. Mit Brigitte Wollmann hat mir die Zusammenarbeit große Freude bereitet, auch ihr möchte ich herzlich danken. Birgit Hüsing danke ich für die hervorragende Einarbeitung in ImageJ.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Wulff hat mich insbesondere in der letzten Phase der Doktorarbeit sehr unterstützt. Vielen Dank für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und die vielen Anregungen.

Für die statistische Beratung gilt mein Dank Dipl.-Inform. Silke Szymczak des Institutes für medizinische Biometrie und Statistik der Universität zu Lübeck.

Außerdem möchte ich mich sehr bei der Vereinigung Norddeutscher Urologen e.V. für die Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums bedanken. Hierdurch wurde es mir ermöglicht, mich ganz auf meine Arbeit zu fokussieren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinem Vater für die Durchsicht des Manuskriptes, die guten Ratschläge und Motivation in vielen Situationen, meiner Mutter für die Unterstützung, aber auch für das Umsorgen in sämtlichen Lebensbereichen, das mir Platz und Raum für die Verfassung dieser Arbeit gegeben hat.

8 Lebenslauf

Name: Schedel
Vorname: Fiona
Geburtsdatum: 03.09.1986
Geburtsort: Hannover
Staatsbürgerschaft: deutsch
Eltern: Prof. Dr. med. I. Schedel
Dr. med. A. Schedel
Familienstand: ledig



Schulbildung

1992 - 1996 Grundschule Neuwarmbüchen, Isernhagen
1996 - 1998 Orientierungsstufe Isernhagen
1998 - 2005 Gymnasium Isernhagen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5
2003 zwei Auslandstrimester an der International Bilingual School of Provence (IBS) in Frankreich

Hochschulausbildung

Seit Oktober 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
August 2007 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
August 2008 Beginn der vorliegenden Doktorarbeit, gefördert durch das Promotionsstipendium der Vereinigung Norddeutscher Urologen e.V.
Derzeit 12. Semester

Famulaturen

2008 Unfallchirurgie im Krankenhaus St. Vinzenz in Zams, Österreich
Neurochirurgie im International Neuroscience Institute (INI) in Hannover
2009 Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Praxisfamulatur in Hannover
Urologie in der Universität zu Lübeck

	Handchirurgie/Orthopädie in der Praxisklinik München-West
2010	Plastische Chirurgie in der Medizinischen Hochschule Hannover
<u>Praktisches Jahr</u>	1. Tertial Chirurgie an der Università degli Studi di Parma, Italien 2. Tertial erste Hälfte Innere Medizin an der Universität zu Lübeck, 2. Hälfte in Tessin, Schweiz in einem Lehrkrankenhaus der Universität Bern 3. Tertial Plastische Chirurgie an der Universität zu Lübeck
<u>Sprachkenntnisse (fließend)</u>	Deutsch Englisch (Zertifikate: FCE und IELTS band score 7,5) Französisch (Zertifikate: DELF A5 und A6) Italienisch
<u>Zusätzliches Engagement</u>	Skills-Lab-Tutorin in der Inneren Medizin Tennistrainerin

9 Publikationsliste

F. Schedel, R. Pries, B. Thode, B. Wollmann, S. Wulff, D. Jocham, B. Wollenberg, I. Kausch: mTOR inhibitors show promising in vitro activity in bladder cancer and head and neck squamous cell carcinoma, *Oncology Reports* 2010

S. Wulff, R. Pries, B. Thode, D. Jocham, B. Wollenberg, **F. Schedel**, I. Kausch: Mechanismen der Apoptoseinduktion durch mTOR-Inhibierung beim Harnblasenkarzinom und HNO-Plattenepithelkarzinom, *Urologische Nachrichten* 09/2010, 25-26

F. Schedel, R. Pries, B. Thode, B. Wollmann, I. Kausch von Schmeling: Neue Behandlungsmöglichkeit gegen Harnblasenkrebs?, Doktorandentag St. Petri in Lübeck 2009, Poster

F. Schedel, R. Pries, B. Thode, B. Wollenberg, D. Jocham, I. Kausch von Schmeling: Kontroverse Wirkungen der mTOR-Inhibition durch Temsirolimus und siRNA beim Harnblasenkarzinom und HNSCC, 4. Nordkongress Urologie in Potsdam 2010, Poster 3.15

F. Schedel, R. Pries, S. Wulff, B. Thode, B. Wollmann, B. Wollenberg, D. Jocham, I. Kausch von Schmeling: Mechanismen der Apoptoseinduktion durch mTOR-Inhibierung beim Harnblasenkarzinom und HNSCC, 62. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Düsseldorf 2010, Poster 5.1