

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend)

Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges als Ziel einer Target- Therapie im Harnblasenkarzinom

Florian Stellwagen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend
2. apl. Prof. Dr. Margitta Retz
3. Univ.- Prof. Dr. Angela Krackhardt

Die Dissertation wurde am 18.10.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 18.09.2013 angenommen.

Inhalt

1	Einleitung.....	4
1.1	Das Harnblasenkarzinom.....	4
1.1.1	Epidemiologie.....	4
1.1.2	Ätiologie.....	4
1.1.3	Histopathologische Klassifikation.....	8
1.1.4	Prognose.....	8
1.1.5	Therapie.....	9
1.2	Der PI3K/mTOR Signalweg.....	12
1.3	Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges im Harnblasenkarzinom.....	15
1.4	Der MAP Kinase Signalweg.....	18
1.5	Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges.....	19
1.5.1	Rapamycin und Analoga.....	19
1.5.2	PI3K Inhibitoren.....	20
1.6	Verwendete Substanzen.....	22
1.6.1	RAD001 (Everolimus).....	22
1.6.2	NVP-BEZ235.....	22
1.6.3	NVP-BGT 226.....	23
1.6.4	NVP-BKM 120.....	23
2	Zielsetzung der Arbeit.....	24
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Material.....	25
3.1.1	Chemikalien.....	25
3.1.2	Plastik- und Verbrauchsmaterialien.....	25
3.1.3	Geräte.....	26
3.1.4	Zellkulturmaterialien.....	26
3.1.5	Kits.....	27
3.1.6	Antikörper.....	27
3.1.7	Substanzen.....	28
3.1.8	shRNA Transduktion.....	28
3.2	Methoden und spezielle Materialien.....	29
3.2.1	Zellkultur:.....	29
3.2.2	Lysatherstellung für Western-Blot.....	31
3.2.3	Proteinelektrophorese:.....	32

3.2.4	Western-Blot:	33
3.2.5	Detektion.....	34
3.2.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	35
3.2.7	Caspase Assay.....	36
3.2.8	Untersuchung des Zellmetabolismus	36
3.2.9	Adenovirale Transduktion	37
3.2.10	Statistik.....	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Harnblasenkarzinom-zelllinien.....	38
4.2	Einfluss inhibitorischer Ansätze auf die Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR-Signalweges.	40
4.2.1	Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR nach Anwendung von small molecule Inhibitoren.....	40
4.2.2	Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR Signalweges nach Transduktion mit mTOR shRNA.	45
4.3	Untersuchung der Phosphorylierung und Expression von Proteinen des PI3K/mTOR Signalweges nach 72 Stunden Inkubationszeit mit RAD001 und NVP-BE2235.....	46
4.3.1	Expression und Phosphorylierung nach 72 Inkubationszeit mit NVP-BE2235 und erneuter Substanzzugabe.....	49
4.4	Auswirkung von RAD001, NVP-BE2235 und mTOR shRNA auf Zellzahl, Proliferation, Apoptose und Metabolismus	51
4.4.1	Einfluss von RAD001, NVP-BE2235 und mTOR shRNA auf die Zellzahl	51
4.4.2	Einfluss von RAD001 und NVP-BE2235 auf die Proliferation	53
4.4.3	Einfluss von RAD001, NVP-BE2235 und mTOR shRNA auf die Apoptose.....	56
4.4.4	Einfluss von RAD001, NVP-BE2235 und mTOR shRNA auf den Zellmetabolismus.....	58
5	Diskussion.....	62
5.1	Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Blasenkarzinomzelllinien.....	63
5.2	Molekulare Regulationsmechanismen des PI3K/mTOR Signalweges im Blasenkarzinom....	64
5.3	Funktionelle Bedeutungen der Regulationsmechanismen des PI3K/mTOR Signalweges	68
5.4	Klinische Bedeutung von Inhibitoren des PI3K/ mTOR Signalweges in der Therapie des Harnblasenkarzinom	70
5.5	Ausblick	72
6	Zusammenfassung.....	73
7	Literaturverzeichnis.....	75
8	Abkürzungsverzeichnis.....	93
9	Curriculum Vitae.....	97

10	Veröffentlichungen.....	99
11	Danksagung	100

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit etwa 3% aller malignen Tumoren ist das Harnblasenkarzinom der häufigste Tumor der ableitenden Harnwege und damit bei Männern an dritter und bei Frauen an fünfter Stelle der häufigsten malignen Tumorerkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2010). In Deutschland erkranken jährlich ca. 25.000 Menschen neu an Harnblasenkrebs. Dabei entwickelt eine von 62 Frauen und einer von 23 Männern im Laufe ihres Lebens ein Harnblasenkarzinom, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 74 bzw. 72 Jahren liegt. Männer erkranken 2,5 mal so häufig wie Frauen.

Eine Erkrankung vor dem 45 Lebensjahr ist selten. Während die Inzidenz für Männer im Alter zwischen 45-50 Jahren 3 Erkrankungen/100.000 Einwohner beträgt, liegt sie bei der Gruppe der über 80 Jährigen bei mehr als 200 Erkrankungen/100.000 Einwohner (Otto T, 2004). Durch die demographische Entwicklung hat die Inzidenz des Blasenkarzinoms seit 60 Jahren stetig zugenommen. (Robert-Koch-Institut, 2010).

1.1.2 Ätiologie

Als Ursache für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms wird eine multifaktorielle Genese angenommen, bei der sowohl die genetischen Zusammenhänge eine wichtige Rolle spielen als auch Karzinogene aus der Umwelt und Arbeitswelt als Verursacher nachgewiesen werden konnten.

Genetik

Als genetische Ursache wurden verschiedene Alterationen bei Harnblasenkarzinomen identifiziert, wobei ein Zusammenspiel dieser für die Ausbildung von Blasenkarzinomen nötig scheint. Am häufigsten wurden solche Alterationen in dem p53- Tumorsuppressorgen, dem Retinoblastomgen (Hartmann A, 1999), dem Rat Sarcoma Proto Oncogen (RAS), dem PTEN Gen sowie Mutationen des Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3) nachgewiesen (Wu, 2009). Alterationen im p53-, RB- und PTEN Gen sind dabei hauptsächlich mit invasiven Blasenkarzinomen assoziiert, während Mutationen im FGFR3 und H-RAS Gen bei der Ausbildung von oberflächlichen Blasenkarzinomen von Bedeutung sind.

In den derzeit gültigen Modellen wird die Initiation und Progression der Harnblasenkarzinome über zwei verschiedene Wege beschrieben (Wu, 2009). Im ersten Weg, der 70-80% der Harnblasenkarzinome ausmacht, entwickelt sich über eine Urothelhyperplasie ein gut differenziertes, nicht invasives papilläres Harnblasenkarzinom (Abb. 1). Dabei konnten Mutationen im Gen des FGFR 3 (70%), im HRAS Gen (30-40%) und Deletionen im Chromosom 9 nachgewiesen werden (Dinney CP, 2004; Cappellen D D. O., 1999). Bei Progressen zu invasiven Karzinomen wurden Deletionen in den kurzen Armen von Chromosom 8 und 11 und in den langen Armen von Chromosom 13 und 14 beobachtet (Wu, 2009). Bei der Ausbildung von Karzinomen über diesen Weg scheint die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie dem Mitogen- Activated Protein Kinase (MAPK) und Phosphoinositol 3-Kinase /mammalian Target of Rapamycin (PI3K/mTOR) Signalweg durch das

Schlüsselprotein RAS eine wichtige Rolle zu spielen (Zhang ZT, 2001). Die Bedeutung der Signaltransduktion über RAS bei der Tumorinitiation konnte bereits im Mäuseversuch belegt werden (Abb. 2). Bei Mäusen, deren Urothel dauerhaft HRAS exprimierte, wurde bei allen Tieren die rasche Ausbildung einer Urothelhyperplasie beobachtet (Zhang ZT, 2001). 60% entwickelten nach längerer Beobachtungszeit ein gut differenziertes oberflächliches Karzinom. Die RAS- Aktivierung führte zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges. Bei überexprimierten HRAS konnte zusätzlich eine Aktivierung des PI3K/mTOR Signalweges und eine frühzeitige Ausbildung von gut differenzierten papillären Karzinomen beobachtet werden (Mo L Z. X., 2007).

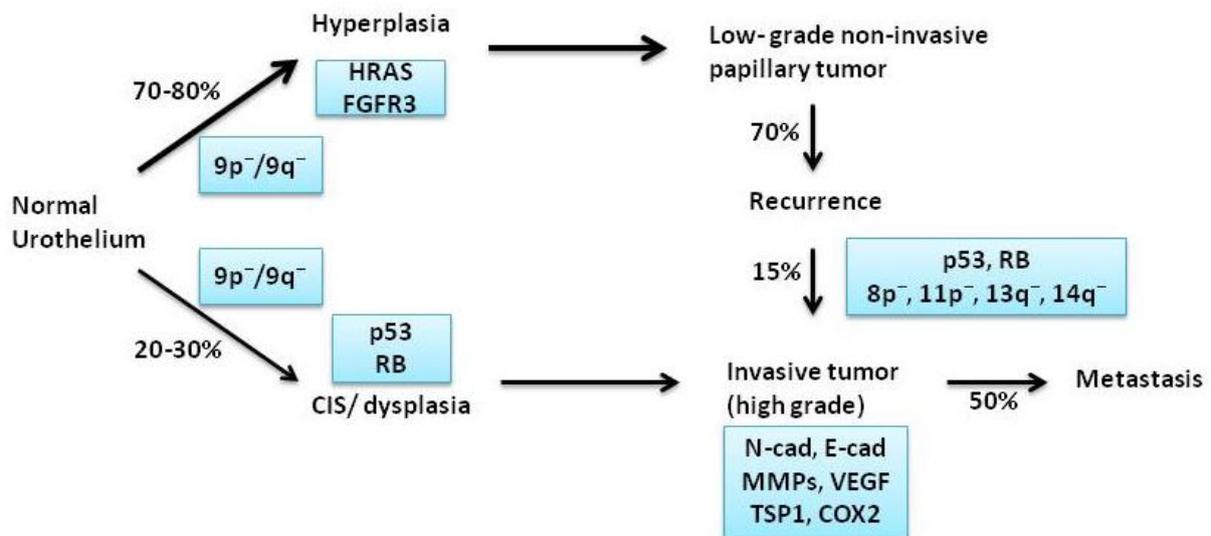


Abbildung 1: Die Entstehung und Progression des Blasenkarzinoms über zwei verschiedenen Wege. Die Ausbildung von gut differenzierten papillären Karzinomen war mit Deletionen in Chromosom 9 und Mutationen im HRAS- und FGFR3- Gen assoziiert. Bei der Entwicklung von invasiven Karzinomen können ebenfalls frühzeitig Deletionen im Chromosom 9 nachgewiesen werden sowie Mutationen in den Genen der Tumorsuppressoren p53 und RB (modifiziert nach Wu, 2009).

Über den zweiten Weg entstehen ca. 20-30% der Harnblasenkarzinome (Wu, 2009). Diese schlecht differenzierten invasiven Karzinome entwickeln sich aus schwerwiegenden Dysplasien, carcinoma in situ oder de novo. Mehr als die Hälfte dieser Tumore weisen strukturelle und funktionelle Veränderungen der Tumorsuppressoren p53 und RB auf (Abb. 1). Des Weiteren bilden mehr als 50% dieser Tumore unter Therapie Metastasen aus. Metastasierung wurde im Harnblasenkarzinom mit der Aktivierung verschiedenster Faktoren wie N- und H- Cadherine, Matrix Metalloproteasen, VEGF, Thrombospondin 1 und der Cyclooxygenase 2 in Verbindung gebracht (Wu, 2009). Deletionen in beiden Armen des Chromosom 9 gehören bei der Ausbildung von Blasenkarzinomen zu den früh auftretenden Veränderungen beider Wege.

Auch wenn Mutationen im p53- und RB- Gen bei invasiven Blasenkarzinomen häufig nachgewiesen wurden und mit einer schlechten Prognose und kurzen Überlebenszeit assoziiert waren (Cote RJ, 1998; Grossman HB, 1998; Cordon-Cardo C, 1997), scheinen diese Mutationen nicht für die Ausbildung von invasiven Karzinomen auszureichen. He *et al.* untersuchten die Auswirkungen eines Knockouts von p53 oder pRB sowie eines kombinierten Knockouts von p53 und pRB auf das Urothel von Mäusen und die Ausbildung von invasiven Harnblasenkarzinomen (He F, 2009). Nach Langzeitbeobachtung konnte bei weniger als 5% der Doppel Knockout Mäuse die Ausbildung einer Hyperplasie des Urothels und von vereinzelt oberflächlichen gut differenzierten Karzinomen beobachtet werden. Die Ausbildung von invasiven Karzinomen konnte nicht nachgewiesen werden.

Erst nach 10 wöchiger Behandlung mit der karzinogenen Substanz BBN entwickelten 50% der Doppel-Knockout Mäuse invasive Blasenkarzinome. Durch das alleinige Ausschalten einer der beiden Tumorsuppressoren konnte kein invasives Wachstum im Mausmodell induziert werden. Hier zeigte sich, dass ein kombinierter Defekt im p53- und RB- Gen notwendig, aber keinesfalls ausreichend für die Ausbildung eines invasiven Blasenkarzinoms ist (He F, 2009). So werden bei Funktionsverlust beider Gene andere Proteine der Retinoblastomgenfamilie wie p107 hochreguliert. Erst durch BBN Gabe und Ausschaltung von p107 konnte invasives Wachstum induziert werden.

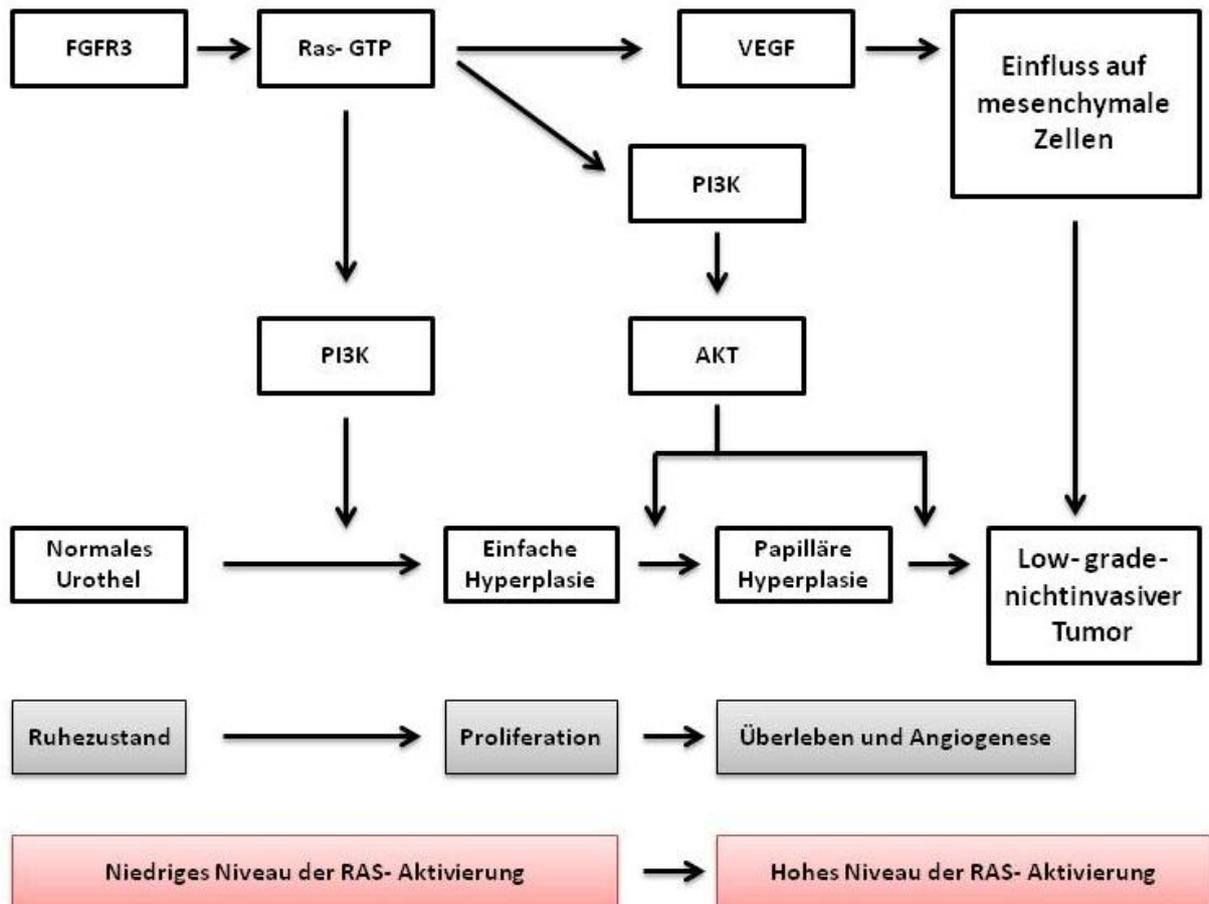


Abbildung 2: RAS Aktivierung führte zur Aktivierung des MAPK Signalweges sowie zur Ausbildung einer epithelialen Hyperplasie ohne Anzeichen von Malignität. Bei doppelter RAS Aktivität konnte eine Aktivierung des PI3K/mTOR Signalweges sowie die Ausbildung von nicht invasiven gut differenzierten Blasenkarzinomen beobachtet werden (modifiziert nach Knüchel- Clarke R, 2010).

Ein weiterer Tumorsuppressor, der bei der Ausbildung von invasiven Blasenkarzinomen eine wichtige Rolle spielt ist PTEN. Mutationen im PTEN Gen konnten bei invasiven Blasenkarzinomen je nach Tumorausdehnung in 24-58% der Fälle nachgewiesen werden, während sie in oberflächlichen Tumoren nur selten zu finden waren (Aveyard JS, 1999; Cappellen D D. G., 1997; Kagan J, 1998; Tsuruta H, 2006). Dabei konnte bei invasiven Karzinomen mit PTEN Mutation häufig auch eine p53 und RB Mutation nachgewiesen werden. Diese Patienten fielen durch eine besonders schlechte Prognose auf (Puzio-Kuter AM, 2009). Im Mausmodell konnten durch PTEN/p53 Knockout diese Beobachtungen bestätigt werden, wobei es zur Ausbildung von invasiven, hochmalignen und schnell metastasierenden Blasenkarzinomen kam (Puzio-Kuter AM, 2009). Auf weitere Mutationen des

PI3K/mTOR Signalweges und deren Bedeutung im Blasenkarzinom wird im Detail in Kapitel 1.2 und 1.3 eingegangen.

Exogene Faktoren

Bereits im Jahre 1895 konnte der Frankfurter Chirurg Dr. Rehn einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Harnblasenkarzinomen und der Berufstätigkeit in den Höchster Farbwerken zeigen. Später konnte geklärt werden, dass dies durch die Exposition mit Anilin-Farbstoffen bedingt war (Rehn, 1895). In den 30er bis 60er Jahren konnten kanzerogene Risikostoffe identifiziert werden wobei Biogene Amine dabei eine besondere Gefahr darstellen (Hueper WC, 1938). Zu den gesicherten Karzinogenen gehören 2-Naphthylamin, Benzidin, 4-Aminobiphenyl, Chlornaphazin, Dichlorbenzidin, Orthodianosidin, Phenacetin, Cyclophosphamid, Auramin und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Dabei konnte eine Korrelation zwischen Intensität und Dauer der Exposition und dem Erkrankungsrisiko gezeigt werden (Case RAM, 1954). Durch ein langes Zeitintervall (10-40 Jahre) zwischen der Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms und der Exposition mit den kanzerogenen Noxen, wird die Identifikation der auslösenden Substanzen erschwert. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass in der deutschen Gesetzgebung (7. Sozialgesetzbuch SGB VII, §9 Abs.1, Nr. 1301 der Anlage zur Berufskrankheitenverordnung) „Schleimhautveränderungen, Krebs oder andere Neubildungen der Schleimhaut und der Harnwege“ als Berufskrankheit anerkannt wurden. Rund 25% aller Harnblasenkarzinome sind dabei nach Schätzungen auf berufsbedingte Einflüsse zurückzuführen (Johansson SL, 1997). Zu den gefährdeten Berufen zählen unter anderem Maler, Lackierer, Zahntechniker und Friseure um nur einige zu nennen (Leppert JT, 2006).

Das Risiko von Rauchern ein Blasenkarzinom zu entwickeln ist viermal höher als das von Nichtrauchern (Brennan P, 2000). Ungefähr die Hälfte der Blasenkarzinome bei Männern und ein Drittel der Blasenkarzinome bei Frauen sind auf das Rauchen zurückzuführen (Kälble, 2001). Dabei sind die Anzahl der gerauchten Zigaretten und ein frühes Einstiegsalter die wichtigsten Risikofaktoren. Im Zigarettenrauch konnte das Molekül 2-Naphthylamin als verursachende Substanz identifiziert werden (Hoffmann D, 1969). Nach Beendigung des Konsums sinkt das Erkrankungsrisiko ab, erreicht aber selbst nach 30 Jähriger Abstinenz nicht wieder das eines Nichtrauchers (Marcus PM, 2000).

Cyclophosphamid ist das einzige noch zugelassene Medikament, für welches ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms nachgewiesen wurde, wobei diese Patienten gehäuft Karzinome mit schlechter Prognose entwickelten (Baker GL, 1987). Seit Einführung der Mesna Prophylaxe ist die Behandlung mit Cyclophosphamid als Risikofaktor jedoch zu vernachlässigen.

Bei Patienten mit chronischen Harnwegsinfekten konnte ebenfalls eine erhöhte Inzidenz für Harnblasenkarzinome beobachtet werden. Besonders deutlich wurde dies bei gleichzeitiger Langzeitkatheterisierung oder Vorliegen von Harnsteinen (Wynder EL, 1977). Ursächlich wird die vermehrte Bildung von Nitrosaminen diskutiert, die als Produkt entzündlicher Reaktionen anfallen. Eine ähnliche Genese wurde bei der in Afrika und Teilen Asiens endemisch vorkommenden Bilharziose angenommen. Bei chronischer Infektion kam es gehäuft zur Ausbildung von Plattenepithelkarzinomen (Hicks RM, 1977). In Ägypten werden laut Schätzungen ca. 15% aller Blasenkarzinome durch Bilharziose verursacht (Bedwani R, 1998).

1.1.3 Histopathologische Klassifikation

Über 90% aller Harnblasenkarzinome gehen vom Urothel aus, etwa 7% sind Plattenepithelkarzinome und in 1-2% der Fälle liegt ein Adenokarzinom vor (Raghavan D, 1995; Anderström C, 1983; Johnson DE, 1976). Weniger als 1% entstehen sekundär durch Infiltration von anderen Malignomen oder durch Metastasierung. Weitere seltene Ursachen können andere maligne (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom) oder benigne Tumore (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangiom, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom) sein. Das Carcinoma in situ stellt eine Sonderform des Harnblasenkarzinoms dar (Rübben H, 1998).

1.1.4 Prognose

Die Prognose des Harnblasenkarzinoms hängt im wesentlichen von der Infiltrationstiefe und dem Differenzierungsgrad des Tumors ab, wobei zwischen diesen beiden Faktoren ein enger Zusammenhang besteht (Rübben H, 1998). So sind nichtinvasive Blasenkarzinome in mehr als 60% der Fälle hochdifferenziert, während Invasive in der Regel mäßig bis schlecht differenziert sind.

Ungefähr 70% der Harnblasenkarzinompatienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein oberflächliches Tumorstadium auf. Ein hohes Rezidivrisiko von 50-70% ist für dieses Tumorstadium charakteristisch (Rübben H, 1998). In 10-30% der Fälle kommt es zu einer Progression und somit zu einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom mit deutlich verschlechterter Prognose.

Tumorstadium	5 Jahres Überlebensrate (%)
pTa	80-95*
pT1	53-81*
pT2	63**
pT3b	31**
pT4	21**
N1	0-30
N2/3	0
M1	0

Abbildung 3: 5-Jahres Überlebensrate in Korrelation zur Tumorausdehnung. modifiziert nach: (Oosterlinck W, 2002)

* TUR-B

** Zystektomie

20-30% der Harnblasenkarzinome wachsen bei Erstdiagnose invasiv und zeigen somit eine Infiltration der Muskelschicht (Rübben H, 1998). Etwa die Hälfte der Patienten haben zu diesem Zeitpunkt

bereits Metastasen in regionären Lymphknoten oder Fernmetastasen gebildet. Unbehandelt verstarben 85% der Patienten mit invasivem Blasenkarzinom innerhalb der folgenden 2 Jahre nach Diagnosestellung (Jemal A, 2008). Sofern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Lymphknotenmetastasen vorlagen, blieben 50-68% der Patienten mit invasiven Karzinomen unter radikaler chirurgischer Intervention 10 Jahre progressionsfrei (Stein JP, 2001). Patienten mit Metastasen wiesen dagegen mit einer medianen Überlebenszeiten von 14 Monaten eine deutlich schlechtere Prognose auf (Vom Dorp F, 2008).

1.1.5 Therapie

Therapie des nicht invasiven Harnblasenkarzinoms

Als Behandlungsziel wird ein Tumorfrees Überleben, möglichst unter Erhalt der Harnblase angestrebt.

Initial wird zur Tumorentfernung und Diagnosestellung eine transurethrale Resektion durchgeführt. Zur Senkung des Rezidivrisikos wird derzeit bei Rezidiven eines G1 Tumors, sowie bei primären Tumoren des Differenzierungsgrades \geq G2 eine adjuvante Installationstherapie mit Zytostatika (Mitomycin C, Doxorubicin) oder dem Immunmodulator BCG durchgeführt. Bei sogenannten High Risk Tumoren (pT1/G3 und pTis), die ein hohes Risiko zur Metastasierung und Progression aufweisen, ist eine radikale Zystektomie anzustreben (Bichler KH, 2000).

Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Bei Patienten mit invasivem Harnblasenkarzinom ist, soweit es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt, die radikale Zystektomie das Therapieverfahren der Wahl (Deutsche-Krebsgesellschaft, 2004). In Ausnahmefällen kann als Alternative eine TUR mit anschließender Strahlentherapie oder kombinierter Radio- oder Chemotherapie durchgeführt werden.

Zusätzlich zur Zystektomie werden systemisch Chemotherapeutika eingesetzt, mit dem Ziel die ungünstige Prognose des Blasenkarzinoms günstig zu beeinflussen. Das neoadjuvante Therapiekonzept dient dabei der präoperativen Tumorreduktion sowie der Kontrolle okkult Metastasen, die ca. die Hälfte der Patienten mit invasivem Blasenkarzinom bei Diagnosestellung bereits gebildet haben (Soloway MS, 1981; Wallace DM, 1991). Die adjuvante Chemotherapie soll dagegen die in kurativer Absicht erfolgte Operation absichern.

Die Medical Research Council leitete diesbezüglich 2 Metaanalysen, die den Nutzen von neoadjuvanten und adjuvanten Cisplatin basierten Polychemotherapiekonzepten anhand von mehreren randomisierten Studien untersuchten. Die Analyse des neoadjuvanten Chemotherapiekonzeptes ergab nur grenzwertige Unterschiede bezüglich eines Überlebensvorteils der Chemotherapiegruppe, was dazu führte dass keine Empfehlung zur routinemäßigen Anwendung ausgesprochen wurde (Collaboration. A. B.-a., 2003). Besser fiel die Analyse der Studien zur adjuvanten Chemotherapie aus, bei der ein absoluter Überlebensvorteil der Chemotherapiegruppe von 11% nachgewiesen wurde (Collaboration. A. B.-a., 2005). Aufgrund zu kleiner Patientenkollektive und weiterer Fehler im Studiendesign konnte auch hier keine Empfehlung zur breiten Anwendung ausgesprochen werden. Somit bleibt der Stellenwert neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapeutika in der Therapie des invasiven Harnblasenkarzinoms weiterhin umstritten.

Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms

Neben der radikalen Zystektomie ist die systemische Chemotherapie das Verfahren der Wahl für Patienten mit metastasiertem Harnblasenkarzinom (Deutsche-Krebsgesellschaft, 2004). Zahlreiche Substanzen sind bereits in verschiedenen Kombinationen getestet worden, wobei sich die Polychemotherapie der Monotherapie überlegen darstellte. Die Prognose fällt dabei mit Langzeitüberlebensraten von weniger als 10% schlecht aus.

Das MVAC- Schema, eine Kombination aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin, wurde Ende der 80er Jahre als wichtigstes Polychemotherapieschema beim metastasierten Harnblasenkarzinom etabliert. Die vielversprechenden Daten lieferten Sternberg *et al.* die in ihrer Studie mit 121 Patienten bei 72% einen stabilen Krankheitsverlauf und bei 36% eine komplette Remission beobachteten (Sternberg CN, 1989). Die mittlere Überlebenszeit betrug 38 Monate wobei 68% der Patienten mit kompletter Remission im weiteren Verlauf ein Rezidiv entwickelten. Obwohl in Folgestudien diese Ergebnisse nicht vollständig bestätigt werden konnten (Loehrer PJ Sr, 1992; Von der Maase H, 2000), lieferte das MVAC Schema im Vergleich zu den anderen Kombinationen doch die besten Ergebnisse und galt über ein Jahrzehnt als der Goldstandard in der Chemotherapie des Harnblasenkarzinoms. Im Jahre 2005 veröffentlichten von der Maase *et al.* die bislang einflussreichste Phase 3 Studie zur Chemotherapie des metastasierten Blasenkarzinoms (von der Maase H, 2005). Dabei wurde eine Kombination aus Cisplatin und Gemcitabine mit dem MVAC Schema verglichen. Auch wenn, entgegen der Zielsetzung, kein Überlebensvorteil der Cisplatin/Gemcitabine Gruppe gezeigt werden konnte, so führte diese Studie vor allem aufgrund der niedrigen Nebenwirkungsrate bei vergleichbaren Überlebenszeiten zu einer allgemeinen Akzeptanz und Anwendung dieser Kombinationstherapie. Zwar konnten durch die Anwendung von anderen Dosisintensivierten Chemotherapieschemata in verschiedenen Studien marginale Lebenszeitverlängerungen erreicht werden (Milowsky MI, 2009; Bellmunt J A. S., 2009), diese konnte jedoch nicht die hohen Toxizitätsraten kompensieren. Auch Alternativschemata wie Gemcitabin/Carboplatin oder Methotrexat/ Carboplatin/Vinblastin konnten die Überlebenszeiten der Gemcitabin/Cisplatin Kombination nicht erreichen (De Santis M, 2009). In einer kürzlich veröffentlichten Phase 3 Studie mit Patienten mit Harnblasenkarzinomen wurde die Wirksamkeit von Paclitaxel/Cisplatin/Gemcitabine mit dem etablierten Schema Cisplatin/Gemcitabine verglichen. Dabei zeigte die Kombination mit Paclitaxel eine bessere Ansprechrate (55%/43,6%) und eine längere Überlebenszeit der Patienten (15,8 Monate/ 12,7 Monate) (Bellmunt J v. d.-A., 2012). In wie weit diese Daten belegt werden können muss weiter untersucht werden.

Somit konnte trotz ständiger Weiterentwicklung der Chemotherapeutika und der Therapieregime in den letzten 20 Jahren keine wesentlichen Verbesserungen bezüglich der Prognose von Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen erreicht werden. Hoffnungen werden in neue Substanzgruppen, sogenannte targetspezifische Therapien gesetzt, die gezielt auf die biologischen und zytologischen Eigenschaften des Tumors gerichtet sind. In den ersten klinischen Studien wurde bereits die Wirkung von Endothelial Growth Factor Rezeptor- (EGFR) und Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor- (VEGFR) Inhibitoren bei Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen untersucht.

In der ersten Studie, die allerdings nur 6 Patienten einschloss, wurde wöchentlich der EGFR Hemmer Trastuzumab (F. Hoffmann-La Roche AG) verabreicht (Peyromaurea M, 2005). Dabei erhielten 4 Patienten eine Kombination aus Trastuzumab, Paclitaxel und Carboplatin, ein Patient eine Kombination aus Trastuzumab und Paclitaxel und ein Patient ausschließlich Trastuzumab. Bei allen

Patienten konnte vorübergehend eine Regression der Metastasen beobachtet werden. Generell wurde die Therapie gut vertragen. Bei einem Patienten musste aufgrund einer ausgeprägten Neutropenie die Therapie abgebrochen werden. Die mittlere Überlebenszeit betrug 15 Monate.

In einer weiteren Phase 2 Studie wurde die Wirkung und Verträglichkeit einer Kombination aus Trastuzumab, Paclitaxel, Carboplatin und Gemcitabine bei 44 Patienten mit Her2/neu positiven metastasierten Blasenkarzinomen untersucht (Hussain MH, 2007). Dabei zeigten 5 Patienten eine komplette, 26 Patienten eine partielle Remission. Die mittlere Überlebenszeit betrug 14 Monate, das mittlere progressionsfreie Intervall 9,3 Monate. Die am häufigsten beobachtete Nebenwirkung war dabei eine Knochenmarkssuppression.

Lapatinib (GlaxoSmithKline plc.) ist ein weiterer EGFR Inhibitor, der bereits als first line Therapie bei Her-2 positiven Mammatumoren etabliert wurde (Cameron, 2007). In einer Phase 2 Studie wurde die Wirksamkeit von Lapatinib an 59 Patienten mit invasiven oder metastasierten Blasenkarzinomen untersucht, die unter Platin basierter first-line Therapie einen Progress zeigten (Wulfing C, 2009). Bei 18 Patienten konnte ein stabiles Krankheitsbild beobachtet werden. Ein Ansprechen auf die Therapie wurde nur bei 1,7% der Patienten nachgewiesen. Das mittlere progressionsfreie Intervall betrug 8,6 Wochen, die mittlere Überlebenszeit 17,9 Wochen. Patienten deren Tumore eine erhöhte Expression an EGFR aufwiesen, zeigten ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie und verlängerter Überlebenszeiten.

Die Angiogenese des Tumors konnte bei Patienten mit invasiven Blasenkarzinomen als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden (Bochner BH, 1995). Substanzen, welche die Angiogenese hemmen wie z.B. VEGFR Inhibitoren könnten somit eine vielversprechende Alternative in der Therapie des Blasenkarzinoms darstellen. In der bisher neuesten Phase 2 Studie wurden 43 Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen mit Cisplatin, Gemcitabine und Bevacizumab als first- line Chemotherapie behandelt (Hahn NM, 2011). Dabei zeigten 19% der Patienten eine komplette Remission, 53% eine partielle. Obwohl das mittlere progressionsfreie Intervall vergleichbare Ergebnisse zu Studien mit etablierten Chemotherapieschemata zeigte, konnte mit einer mittleren Überlebenszeit von 19.1 Monaten ein signifikant besseres Ergebnis erzielt werden. Allerdings traten 3 Todesfälle auf, die auf Nebenwirkungen zurückzuführen waren und 21% der Patienten entwickelten venöse Thromboembolien.

Die bisher angewendeten Substanzen konnten die hohen Erwartungen noch nicht erfüllen. Bei guter Verträglichkeit zeigten EGFR Inhibitoren keinen Überlebensvorteil gegenüber etablierten Chemotherapieregimen bei Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen. Der VEGFR Inhibitor Bevacizumab (F. Hoffmann-La Roche AG) hingegen wies bei guter Wirksamkeit ein nicht akzeptables Nebenwirkungsspektrum auf. Die Wirkung einer Vielzahl weiterer targetspezifischer Substanzen wird derzeit in klinischen Studien untersucht, deren Ergebnisse noch ausstehen.

1.2 Der PI3K/mTOR Signalweg

Der PI3K/mTOR Signalweg erfüllt eine bedeutende Rolle in der Regulation von Wachstum, Proliferation und Zellüberleben (Cantley, 2002). Genetische Alterationen und erhöhte Aktivitäten dieses Signalweges wurden bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen, was ihn zu einem interessanten therapeutischen Ziel macht (Luo J, 2003). Mehrere Inhibitoren gegen Proteine des Signalweges wie PI3K, AKT und mTOR wurden bisher entwickelt, wovon einige vielversprechende Ergebnisse lieferten und zum Teil bereits in klinischen Studien angewendet werden.

Wachstumsfaktoren wie IGF, VEGF, PDGF, EGF bewirken an der Zelloberfläche durch Phosphorylierung von Tyrosinresten an Tyrosinkinaserzeptoren eine Weiterleitung des Signals nach intrazellulär. Beim PI3K/mTOR Signalweg führt dies zur Aktivierung von PI3K, welche nach Struktur, Bindungspartner, Aktivierung und Substratspezifität in drei Klassen unterteilt werden kann (Cantley, 2002). Die am besten untersuchte Klasse 1 kann nochmals in drei weitere Isoformen unterteilt werden, PI3K- α , PI3K- β und PI3K- δ . Die PI3Ks setzen sich aus einer regulatorischen p85 Untereinheit und einer katalytischen p110 Untereinheit zusammen. Die Bindung der p85-Einheit an einen Rezeptor-Tyrosin-Kinase- oder G-Protein-gekoppelten Rezeptor bewirkt über die p-110 Einheit eine Umwandlung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol (4,5)- Bisphosphat zu Phosphatidylinositol- 3,4,5-Trisphosphat (Carpenter CL, 1998) und nach Rekrutierung von PDK1 an die Zellmembran (protein dependent kinase 1) eine Aktivierung von AKT (Proteinkinase B). Auch im PI3K Gen wurden in Tumorgewebe gehäuft Mutationen beobachtet. Das einzige dabei regelmäßig betroffene Gen kodiert für die katalytische p110 Einheit (Chalhoub N, 2009). Besonders häufig wurden solche Mutationen in Tumoren der Prostata, der Brust, des Endometriums, des Darms und der ableitenden Harnwege nachgewiesen.

Antagonistisch zur PI3K wirkt PTEN, indem es PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert (Cantley, 2002). Eine Mutation bzw. Deletion im PTEN Gen und eine damit verbundene verminderte Expression von PTEN konnte bei einer Vielzahl verschiedener Tumorarten gezeigt werden. Am häufigsten bei Tumoren des Endometriums, des ZNS, der Haut, der Prostata, des Darms und der ableitenden Harnwege (Chalhoub N, 2009). Dabei konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von PTEN, dem Tumorstadium und der Überlebenszeit festgestellt werden. Bei Zellen in denen PTEN nicht exprimiert wurde, konnte eine dauerhaft erhöhte Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges nachgewiesen werden (Cantrell, 2001). In neueren Studien wurde ein erheblicher Einfluss der Lokalisation von PTEN auf die Funktion nachgewiesen. So wirkt PTEN bei Lokalisation im Zytoplasma antagonistisch zur PI3K und kann die Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges hemmen (Cantley, 2002), während PTEN bei Lokalisation im Zellkern eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellzyklus, Translation und Differenzierung einnimmt (Carracedo A, 2011).

AKT, von dem 3 Isoformen bekannt sind (AKT1/AKT2/AKT3), gehört zur Gruppe der cAMP und cGMP abhängigen Proteinkinasen C und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Apoptose, Proliferation und Wachstum. Erst nach der Lokalisation an die Plasmamembran und Phosphorylierung an beiden Bindungsstellen (durch PDK1 an Threonin 308 und durch mTORC2 an Serin 473) liegt AKT in der vollständig aktivierten Form vor (Alessi DR J. S., 1997; Cantley, 2002; Bai X, 2010). Wiederholt konnten in Studien erhöhte Level von phosphoryliertem AKT bei mehreren soliden Tumorarten nachgewiesen werden (Jones PF, 1991; Cheng JQ G. A., 1992; Cheng JQ R. B., 1996). Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen hohen Leveln von pAKT (S473) und einer schlechten

Prognose bereits bei Tumoren der Haut, des Pankreas, der Leber, der Prostata, der Brust, des Endometriums, des Magens und des Gehirns nachgewiesen werden (LoPiccolo J, 2007). Die antiapoptotische Wirkung von aktiviertem AKT beruht dabei unter anderem auf der verminderten Freisetzung von Cytochrom C, der Inaktivierung des proapoptotischen Faktors BAD (Song G, 2005), des Transkriptionsfaktors FOXO (Burgering BM, 2003) und der Serin-Threonin Kinase GSK3 β (Pap M, 1998).

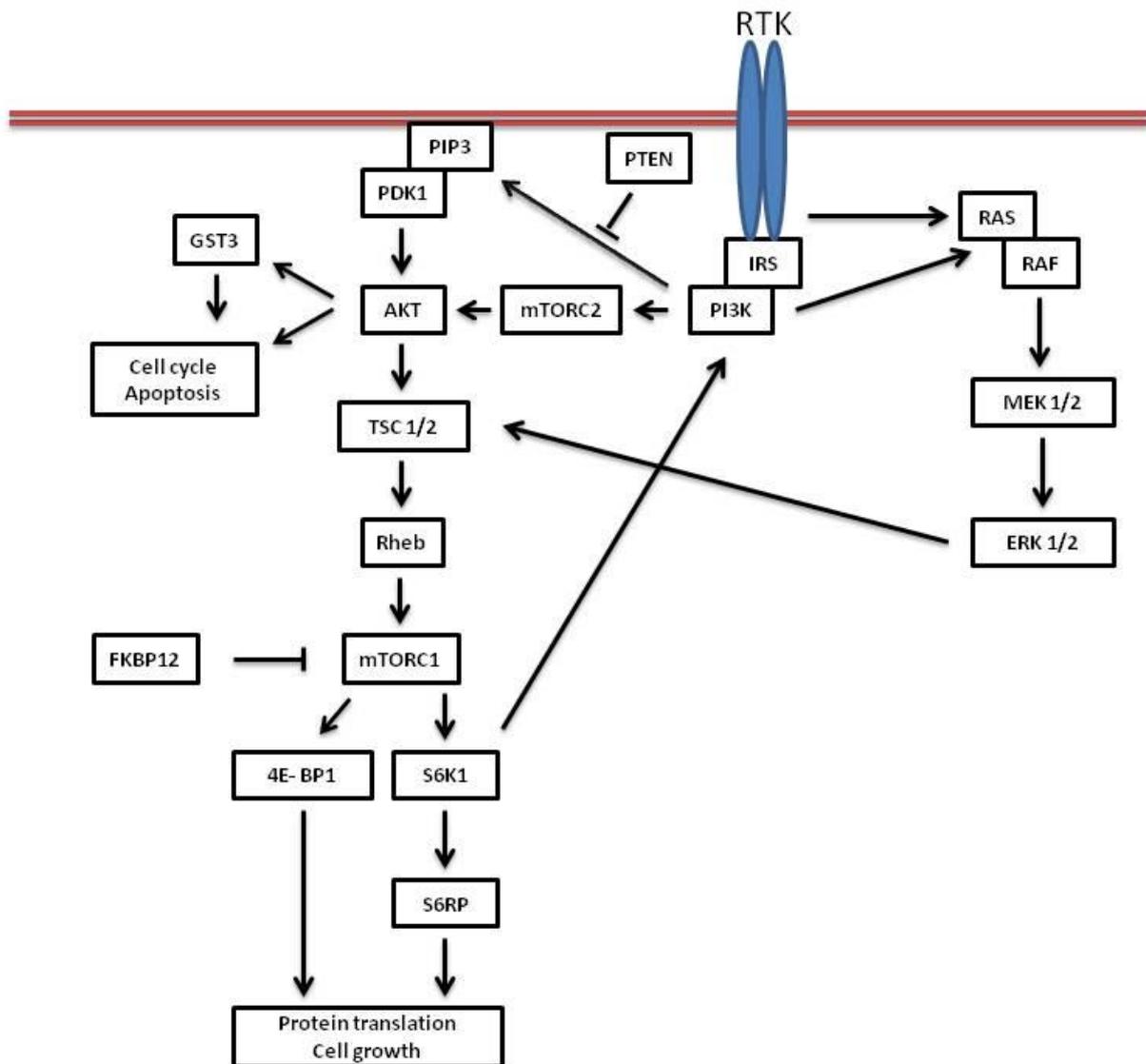


Abbildung 4: Schematische Darstellung des PI3K/mTOR und MAPK Signalweges (modifiziert nach Nawroth R, 2011).

Eines der am besten charakterisierten Zielmoleküle von AKT ist mTOR. mTOR (mammalian target of rapamycin= Ziel von Rapamycin im Säugetier) ist eine 289kDa große Serin- Threonin Kinase, die sich als Bestandteil eines Proteinkomplexes hauptsächlich im Zellplasma befindet (Bjornsti MA, 2004). Das carboxyterminale Ende des Proteins ist homolog zur katalytischen Einheit der Phosphoinositol 3-Kinase, und wird somit zu der PIKK-Familie (Phosphoinositid- Kinase assoziierte Kinase) gezählt. In gesunden Zellen fungiert mTOR als zentraler Regulator von Zellwachstum und Metabolismus. Über extrazelluläre Einflüsse wie die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und Nährstoffen wird die

Aktivierung von mTOR reguliert, welches wiederum die Biosynthese anderer Proteine anregt, und so Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese und Apoptose nimmt (Wullschleger S, 2006). AKT ist in der Lage mTOR direkt zu phosphorylieren (an Ser2448), allerdings ist die Bedeutung der direkten Aktivierung noch nicht ausreichend geklärt (Inoki K L. Y., 2002). Häufiger führt die Inhibierung eines Komplexes aus den Tumorsuppressorproteinen TSC1 und TSC2 (tuberous sclerosis complex), die auch als Hamartin und Tuberin bekannt sind, zur Aktivierung von mTOR (Inoki K L. Y., 2002). Dabei wirkt der Komplex aus TSC1/TSC2 als RhebGTPase (RHEB- regulatory associated protein of mTOR) aktivierendes Enzym. Durch die Hemmung von TSC1/TSC2 erhöht sich das GTP-Rheb/GDP-Rheb Verhältnis, was eine Aktivierung von mTOR zur Folge hat (Garami A, 2003), während eine Aktivierung des TSC1/TSC2 Komplexes eine Hemmung von mTOR bewirkt (Inoki K L. Y., 2003).

Es kommen zwei verschiedene mTOR- Komplexe (TORC1 und TORC2) vor. Der Rapamycin sensitive Komplex TORC1 mit dem Protein Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), und der nicht-Rapamycin sensitive Komplex TORC2 mit den Proteinen Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) und mSin1(mitogen-activated-protein-kinase-associated protein 1). In beiden Komplexen ist zusätzlich das Protein G β -like, das für die Interaktion zwischen den Proteinen erforderlich ist, vorhanden (Huang S, 2003). Während mTORC2 den Einfluss von AKT auf Wachstum, Apoptose reguliert und eine noch nicht ausreichend untersuchte Rolle in der Organisation des Zytoskeletts spielt, kontrolliert mTORC1 das zelluläre Wachstum durch Regulierung der Proteinsynthese (Sarbasov DD A. S., 2004).

Die beiden am besten charakterisierten Zielmoleküle von mTORC1 sind die S6 Kinase 1 und das eukaryotische Initiationsfaktor bindende Protein 4E-BP1 (Ma XM, 2009).

In aktivierter Form liegt S6K1 nach Phosphorylierung durch mTORC1 (Ali M, 2005; Hara K, 2002) und anschließender Phosphorylierung durch PDK1 vor (Alessi DR K. M., 1998). Über weitere Phosphorylierungsstellen kann die katalytische Aktivität von S6K1 durch mTORC1 reguliert werden. Von S6K1 wird wiederum direkt das ribosomale Protein S6 (S6RP) aktiviert. S6RP reguliert die Translation verschiedener mRNAs, die für ribosomale Proteine und weitere für die Translation benötigte Komponenten kodieren (Proud, 2004). Außerdem spielt S6RP eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellgröße, des Wachstums und der Proliferation (Shima H, 1998).

Der zweite Weg über den mTORC1 die Translation und Proteinsynthese reguliert, ist die Phosphorylierung des eukaryotische Initiationsfaktor bindende Protein (4E-BP1). Im unphosphorylierten Zustand bindet 4E-BP1 den Initiationsfaktor eIF4E, der zusammen mit einer Helikase (eIF4A) und einem Strukturprotein (eIF4G) den Initiationskomplex der Translation bildet. Durch hierarchische Phosphorylierung durch mTORC1 an 6 verschiedenen Aminosäureresten wird eIF4E von 4E-BP1 abgespalten, kann als Teil des Initiationskomplexes an die Cap Struktur der mRNA binden und so die Translation einleiten (Proud, 2004 ; Mamane Y, 2006). In verschiedenen Studien konnte die Bedeutung dieses Signalwegabschnittes für Zellzyklusprogression, Wachstum, Apoptose und Angiogenese nachgewiesen werden (Rosenwald, 2004).

1.3 Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges im Harnblasenkarzinom

Das Interesse am PI3K/mTOR Signalweg als Therapieoption beim Harnblasenkarzinom hat in den letzten Jahren stark zugenommen. So stellen Proteine wie PI3K, AKT und mTOR potentielle Therapieziele dar, gegen die verschiedene Inhibitoren entwickelt werden oder sich schon in klinischen Studien befinden. Schwierigkeiten bereiten dabei die komplexen Regulationsmechanismen des Signalweges und die große Anzahl an Aktivierungsmöglichkeiten (Knowles MA, 2009).

Mutationen in Teilen des PI3K/mTOR Signalweges gehören im Harnblasenkarzinom wie auch in anderen Tumorentitäten zu den am häufigsten beobachteten Mutationen (Knowles MA, 2009). Das PI3K Gen war abhängig von der Infiltrationstiefe des Tumors in 23-65% der Fälle betroffen, wobei die Mutationen eher mit einem oberflächlichen und gut differenzierten Tumor assoziiert waren (Platt FM, 2009; Lopez-Knowles E, 2006). Mutationen im Gen von AKT1 waren bis jetzt eher selten zu finden. In Blasenkarzinomzelllinien wurde bei 5% aller Zelllinien eine Mutation beobachtet, in Blasenkarzinomen sogar nur in 2% der Fälle (Carpten JD, 2007). Auch die Bedeutung von AKT als prognostischer Marker ist bis jetzt noch ungeklärt. Schultz *et al.* haben beobachtet, dass hohe Level an pAKT in Harnblasenkarzinomen eher mit einer guten Prognose der Patienten assoziiert waren. Bei 32-44% der invasiven Blasenkarzinome konnte immunhistochemisch kein phosphoryliertes AKT erfasst werden. Dagegen konnten in oberflächlichen Tumoren und in gesundem Gewebe erhöhte Level an phosphoryliertem AKT nachgewiesen werden (Schultz L, 2010). In einer anderen Studie, die allerdings nur 20 Patienten mit invasiven Blasenkarzinomen einschloss, wiesen dagegen 55% der Tumore erhöhte Level an phosphoryliertem AKT auf (Wu X, 2004). Mutationen im häufig untersuchten PTEN Gen konnten bei invasiven Tumoren je nach Tumorausdehnung in 24-58% der Fälle nachgewiesen werden, während bei nicht invasiven papillären Karzinomen nur vereinzelt Mutationen auftraten (Aveyard JS, 1999; Cappellen D D. G., 1997; Kagan J, 1998; Tsuruta H, 2006). Dabei konnte bei invasiven Karzinomen mit PTEN Mutation häufig auch eine p53 Mutation nachgewiesen werden. Diese Patienten fielen durch eine besonders schlechte Prognose auf (Puzio-Kuter AM, 2009). Im Urothel- Mausmodell konnten durch PTEN/p53 Knockout diese Beobachtungen bestätigt werden, wobei es zur Ausbildung von invasiven, hochmalignen und schnell metastasierenden Blasenkarzinomen kam (Puzio-Kuter AM, 2009). Eine fehlende Expression von PTEN war dabei mit einer Hyperplasie des Urothels und einer Zunahme an phosphoryliertem mTOR und AKT assoziiert (Tsuruta H, 2006; Yoo LI, 2006). Eine maligne Entartung konnte erst nach langer Beobachtungsdauer nachgewiesen werden. Schultz *et al.* haben bei Patienten nach radikaler Zystektomie bei 42% immunhistochemisch keine PTEN Expression beobachten können. Zusätzlich war bei 8% der Proben eine verminderte Expression aufgefallen. Das gesunde Urothel dagegen wies normale Level an PTEN auf (Schultz L, 2010). Eine Korrelation zwischen einer verminderten PTEN Expression und einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung konnte somit in verschiedenen Studien beobachtet werden. (Schultz L, 2010; Puzio-Kuter AM, 2009; Aveyard JS, 1999; Cappellen D D. G., 1997; Kagan J, 1998). Hansel *et al.* konnten eine hohe Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges bei Patienten mit primären Blasenkarzinomen nachweisen. Phosphoryliertes mTOR wurde in 74% der Proben invasiver Blasenkarzinome nachgewiesen. Dabei waren sowohl hohe Level an pmTOR als auch ein großer Anteil an pmTOR positiven Zellen mit einer schlechten Prognose sowie einem fortgeschrittenem und schlecht differenzierten Tumor assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen hohen Leveln an pmTOR und der Metastasierung des Tumors konnte dabei nicht festgestellt werden. Zusätzlich konnte bei 55 % der Proben eine Phosphorylierung von S6K1 nachgewiesen werden, wobei hohe Level an pS6K1 mit

einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung und somit schlechten Prognose assoziiert waren (Hansel DE, 2010). Tickoo *et al.* untersuchten die muskelinvasiven Blasenkarzinome von 92 Patienten auf die Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR Signalweges. Dabei wurde bei 58% eine Phosphorylierung von 4E-BP1 und bei 34% ein Phosphorylierung von S6K1 beobachtet (Tickoo SK, 2010). In einer weiteren kürzlich erschienenen Studie konnte bei 208 Patienten nach radikaler Zystektomie ein Zusammenhang zwischen hohen Leveln an pS6K1 und einer schlechten Prognose, einem hohem Rezidivrisiko und einem hohen Progressionsrisiko nachgewiesen werden (Park SJ, 2011).

Somit wurden bei Patienten mit Blasenkarzinomen wiederholt Mutationen und Veränderungen der Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges nachgewiesen werden, die häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert waren. Trotzdem ist die Funktion des PI3K/mTOR Signalwegs im Blasenkarzinom noch unzureichend geklärt und bisher hauptsächlich in präklinischen Studien untersucht worden. Mit dem PI3K Inhibitor LY294002 konnte die Invasionsfähigkeit hoch maligner Blasenkarzinomzellen gehemmt werden. Im Mausmodell wurde allerdings nur eine geringe antitumoröse Wirkung beobachtet, während eine Kombination aus PI3K Hemmung und Bestrahlung gute antitumoröse Wirkungen zeigte (Gupta AK, 2003; Wu X, 2004). Ein ähnlicher synergistischer Effekt konnte auch bei einer Kombination aus Strahlentherapie und AKT-Hemmung beobachtet werden (Kim IA, 2005). Eine hohe Expression von PTEN hemmte das Tumorwachstum in Blasenkarzinomzelllinien (Tanaka M, 2000).

In präklinischen Untersuchungen mit mTOR Inhibitoren zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit im Harnblasenkarzinom. So konnte nach Rapamycinbehandlung *in vitro* eine Hemmung der Stoffwechselaktivität, Proliferation und eine verminderte VEGF Expression gezeigt werden (Makhlin I, 2010; Fechner G, 2009; Wu MJ, 2009). Dagegen konnten Iwamaru *et al.* nach Behandlung von Blasenkarzinomzelllinien mit Rapamycin nur geringe Effekte auf die Stoffwechselaktivität der Zellen beobachten (Iwamaru A, 2007). Auch nach Behandlung von Blasenkarzinomzelllinien mit RAD001 wurden keine signifikanten Auswirkungen auf Proliferation und Apoptose deutlich (Vasconcelos-Nóbrega C, 2011; Chiong E, 2011).

In Xenograft Mausmodellen mit Urothelkarzinomen zeigte Rapamycin eine gute Wirksamkeit. Dabei führte die Behandlung mit Rapamycin gegenüber der Kontrolle zu einem verminderten Tumorwachstum und einem signifikanten Überlebensvorteil (Makhlin I, 2010; Hansel DE, 2010). In Mäusen, deren Urothel kombinierte Deletionen von PTEN und P53 aufwies, konnte durch Rapamycinbehandlung, sowohl intraperitoneal als auch intravesikal verabreicht, die Ausbildung und Progression von Blasenkarzinomen gehemmt werden (Puzio-Kuter AM, 2009; Seager CM, 2009). Wu *et al.* beobachteten nach Fütterung mit 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) bei allen Ratten innerhalb von 12 Wochen die Entwicklung invasiver Blasenkarzinome. Unter Rapamycinbehandlung wurde nur bei 10% der Tiere ein invasives Blasenkarzinom nachgewiesen (Wu MJ, 2009). Mansure *et al.* beobachteten *in vitro* und im Xenograft Mausmodell eine signifikante Hemmung des Wachstums, welches vor allem auf eine Hemmung der Angiogenese und Zellproliferation zurückzuführen war (Mansure JJ, 2009). Eine Auswirkung auf die Apoptose konnte nicht gezeigt werden.

Die ersten klinischen Studien mit Patienten mit Harnblasenkarzinomen lieferten keine vielversprechenden Ergebnisse. Bei einer Phase 2 Studie von Seront *et al.* wurden 17 Patienten mit

metastasierten Blasenkarzinomen, die nicht auf eine Platinbasierte Chemotherapie ansprachen, mit RAD001 behandelt (Seront E, 2010). Dabei konnte bei 3 Pat für maximal 234 Tage ein stabiles Krankheitsbild beobachtet werden. Eine komplette oder partielle Remission konnte nicht beobachtet werden. In einer weiteren Phase 2 Studie wurden 24 Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen, die nicht auf eine platinbasierte Chemotherapie ansprachen, mit einer Kombination aus RAD001 und Paclitaxel behandelt (Niegisch G, 2012). Dabei zeigten 21% der Patienten eine partielle Remission und 9 einen stabilen Krankheitsverlauf.

1.4 Der MAP Kinase Signalweg

Der PI3K/mTOR und der MAPK Signalweg interagieren auf verschiedenen Ebenen miteinander. So können beide Signalwege die Funktion des anderen sowohl regulieren als auch teilweise übernehmen (Ma XM, 2009). Aus diesem Grund haben wir in dieser Arbeit die Auswirkung der Inhibition des PI3K/mTOR Signalweges auf die Aktivität des Mitogen- Activated Protein Kinase Signalweges untersucht. Wie der PI3K/mTOR Signalweg ist auch der MAP Kinase Signalweg einer Rezeptortyrosinkinase nachgeschaltet. Das Signal wird durch 3 hintereinander geschaltete Kinasen zum Zellkern geleitet.

Nach Dimerisierung des Tyrosinkinase-Rezeptors dienen intrazelluläre Tyrosylreste als Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 welches wiederum das Protein SOS (son of sevenless) bindet (Hefti MA, 1997). Durch Phosphorylierung von GDP zu GTP wird das G-Protein Ras durch SOS phosphoryliert und somit aktiviert (Vanderkuur JA, 1997). Nach der Bindung und Aktivierung von RAF (rapidly growing fibrosarcoma) auf Ebene der Zellmembran aktiviert dies die Kinase MEK (mitogen/extracellular-signal regulated kinase kinase) durch Phosphorylierung von 2 Serinresten (Leevers SJ, 1994). MEK (MAP-KK) ist in der Lage Phosphatgruppen sowohl auf Threonin- als auch auf Tyrosinreste der beiden Zielproteine MAPK1/ERK1 (p44) und MAPK2/ERK2 (p42) (Mitogen-aktivierte Kinase/extrazelluläre Signalregulierende Kinase) zu übertragen (Ahn NG, 1990).

Während ERK1 und ERK2 die einzigen bekannten Ziele der MEK sind, ist phosphoryliertes ERK in der Lage, eine Vielzahl von Zielproteinen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu aktivieren.

Neben der Möglichkeit über die Phosphorylierung von RAF und MEK selbst in die Regulation des MAP Kinase Signalweges einzugreifen besteht die wichtigste Funktion in der Transkriptionsinitiation der sogenannten „immediate early“ Gene c-fos und c-jun, welche eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung, Apoptose und Proliferation spielen (Khosravi-Far R, 1998).

Beide Signalwege interagieren auf verschiedenen Ebenen miteinander (Abb. 4). So können die Protein RAS und Erk1/2 direkt über die PI3K oder auch TSC die Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges beeinflussen (Rodriguez-Viciano P, 1994; Iijima, 2002), während eine Inhibition von mTOR über die Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase oder des Insulin Rezeptor Substrat Proteins nicht nur zu einer Reaktivierung von AKT, sondern auch zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges führte (Carracedo, 2008).

1.5 Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges

1.5.1 Rapamycin und Analoga

Mitte der 70er Jahre wurde Rapamycin als fungizide Substanz auf der Inselgruppe Rapa Nui entdeckt. Nach Identifikation des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* und Isolation von Rapamycin durch die Ayerst Research Laboratories in Montreal wurde Rapamycin als Antimykotikum gegen *Candida Albicans*, *Aspergillus fumigatus* und *Cryptokokkus neoformans* eingesetzt (Vezina C, 1975).

Anfang der 90er Jahre wurde Rapamycin aufgrund der starken immunsuppressiven Wirkung durch T-Zell Hemmung bei Patienten nach Nierentransplantationen verwendet, da es im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Immunsuppressiva Ciclosporin und Tacrolimus keine Nierentoxizität aufwies (Ekberg H, 2007).

In der Kardiologie werden aufgrund seiner antiproliferativen Wirkung Rapamycin beschichtete Stents (drug eluting stents) verwendet um eine Restenose des Stents durch eine Hyperproliferierende Intima zu verhindern (Stanik-Hutt, 2004).

Die antitumorösen Eigenschaften von Rapamycin konnten in den letzten Jahren bei einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Luan FL, 2002; Wiederrecht GJ, 1995). Allerdings ermöglichte erst die Entwicklung von neuen mTOR Inhibitoren wie RAD001 (Everolimus/ Novartis), CCI-779 (Temsirolimus/ Wyeth-Pfizer) und AP23573 (Ridaforolimus/ ARIAD-Merck), die eine bessere Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit aufwiesen, eine breite klinische Anwendung.

Rapamycin und seine Analoga binden durch Komplexbildung mit dem FK506-bindenden Protein 12 (FKBP12) an mTORC1 und führen so über eine verminderte Aktivierung der Effektoren des PI3K/mTOR Signalweges zu einem Zellzyklusarrest, einer verminderten Proliferation und Hemmung der Angiogenese (Rosenwald, 2004).

CCI-779 (Pfizer, Inc., New York City, NY, US) wurde im Jahr 2007 als erster mTOR Inhibitor mit onkologischer Indikation als First-Line Therapie für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zugelassen. Kürzlich erfolgte auch die Zulassung zur Therapie des rezidivierenden/refraktären Mantellzelllymphoms. Die Wirksamkeit bei Patienten mit Mamma- oder Lungen-Karzinomen wird zur Zeit in Phase 3 Studien untersucht (BK, 2005 ; Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2012; Smolewski, 2006).

Das Rapamycin Analogon AP23573 befindet sich momentan in Phase 3 Studien bei Patienten mit metastasierten Weichteil- und Knochensarkomen. Des weiteren wird dieser mTOR Inhibitor derzeit in Phase 2 Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Endometriums, der Prostata und kleinzelligen Lungenkarzinomen angewendet (ARIAD Pharmaceuticals, 2010; www.clinicaltrials.gov, 2012).

Auf das in dieser Arbeit verwendete RAD001 wird im Detail in 1.6.1 eingegangen.

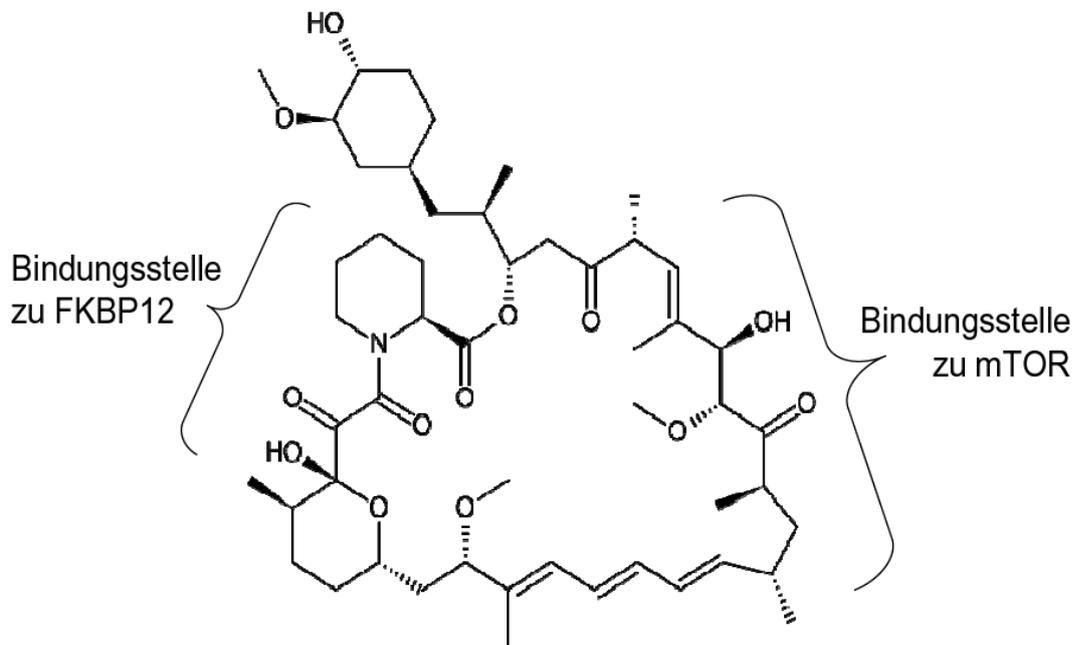


Abbildung 5: Struktur von Rapamycin (Vignot S, 2005)

1.5.2 PI3K Inhibitoren

Neben dem mTOR Inhibitor RAD001 wurden in dieser Arbeit auch Substanzen verwendet, die verschiedene Klassen an PI3Ks hemmen.

Schon für die PI3K Inhibitoren der ersten Generation Wortmannin und LY294002 konnte für eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* eine gute antitumoröse Wirkung nachgewiesen werden (Kong D, 2008). Beide Inhibitoren wurden, wie auch die meisten der neuen Inhibitoren, als pan- p110 Inhibitoren entwickelt, die über eine kompetitive und reversible Blockade der ATP Bindungsstelle alle PI3Ks der Klasse 1 hemmen sollen (Djordjevic S, 2002). Durch eine breite Anwendung zur Charakterisierung des PI3K/mTOR Signalweges konnte für diese Substanzen allerdings eine relativ unspezifische Wirkung nachgewiesen werden (Gharbi SI, 2007). So zeigte sich für LY294002 neben einer Hemmung von mTOR, dessen carboxyterminales Ende homolog zur katalytischen Einheit der Phosphoinositol 3-Kinase ist, eine Wirkung auf weitere verschiedene Klassen an PI3Ks, andere Kinasen wie die DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) und die CK2 (caseinkinase 2) sowie Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor κ B) (Gharbi SI, 2007). Somit konnten sie wegen geringer Selektivität und daraus resultierender hoher Toxizität sowie schlechter Bioverfügbarkeit nie in der Klinik eingesetzt werden (Garcia-Echeverria C, 2008; Hirata Y, 2003). Bessere Verträglichkeit und höhere Spezifität sollen die neu entwickelten PI3K Inhibitoren aufweisen, von denen sich einige bereits in klinischen Studien befinden.

Der PI3K Inhibitor XL 147 (Exelixis, South San Francisco, CA, US) zeigte präklinisch eine gute antitumoröse Wirkung gegen verschiedene Tumorentitäten (Markman B, 2010). In der ersten veröffentlichten Phase 1 Studie mit 78 Patienten mit soliden Tumoren wies die Substanz zwar eine gute Verträglichkeit auf (Edelman G, 2010). Bei einem Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte eine partielle Remission beobachtet.

Das Wortmannin Derivat PX-866 (Oncothyreon, Seattle, WA, US) ist ebenfalls ein pan PI3K Inhibitor. Er unterscheidet sich allerdings von den anderen Inhibitoren, da er nicht ATP kompetitiv verdrängt, sondern kovalent die ATP Bindungsstelle der PI3k besetzt. Präklinisch konnte eine gute antitumoröse Wirksamkeit vor allem bei Xenograft Modellen mit PTEN oder PI3K Mutationen nachgewiesen werden (Ihle NT, 2009). Die erste Phase 1 Studie schloss 60 Patienten mit soliden Tumoren ein. 25% der Patienten zeigten über einen durchschnittlichen Zeitraum von 57 Tagen ein stabiles Krankheitsbild (Jimeno A, 2010). Remissionen konnten nicht beobachtet werden.

Auch der PI3K Inhibitor GDC-0941 (Piramed/Genentech, Slough, United Kingdom/South San Francisco, CA, US) zeigte in Xenograft Modellen mit PTEN oder PI3K Mutation eine gute Wirkung (Friedman L, 2008). In der ersten Phase 1 Studie mit 59 Patienten mit soliden Tumoren fielen die Nebenwirkungen moderat aus. Des Weiteren konnte bei einer Patientin mit einem Mammakarzinom und einer Patientin mit einem Ovarialkarzinom eine partielle Remission beobachtet werden (Von Hoff DD, 2010).

Der Inhibitor SF1126 (Semafore Pharmaceuticals Indianapolis, IN, US) ist ein Prodrug des PI3K Inhibitors LY294002, der eine starke anti-angiogenetische Wirkung aufweist (Garlich JR, 2008). In der ersten klinischen Studie mit 39 Patienten wurde er sehr gut vertragen. 50% der Patientin wiesen ein stabiles Krankheitsbild auf. Remissionen konnten nicht beobachtet werden (Garlich J, 2010).

XL765 (Exelixis, South San Francisco, CA, US) ist ein anderer gut verträglicher PI3K Inhibitor, der in verschiedenen Xenograftmodellen das Tumorstadium hemmen oder sogar verringern konnte. In der ersten klinischen Studie mit 83 Patienten zeigten 12 einen stabilen Krankheitsverlauf für durchschnittlich 16 Wochen (Brana I, 2010).

Das derzeit beste Ergebnis lieferte CAL-101 (Calistoga Pharmaceuticals, Seattle, WA, US), ein PI3K Inhibitor der spezifisch die p110 δ Isoform hemmen soll, bei Patienten mit Lymphomen oder Leukämien. Diese Isoform wird hauptsächlich in Leukozyten exprimiert. Nachdem präklinisch bereits eine gute Wirksamkeit mit Apoptoseinduktion an Lymphom- und Leukämiezellen nachgewiesen werden konnte (Herman SE, 2010), zeigten in der ersten klinischen Studie, die 106 Patienten einschloss, 57% der Patienten mit Non Hodgkin Lymphomen, 67% der Patienten mit Mantelzelllymphomen sowie 33% der Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie eine partielle Remissionen (Furman RR, 2010). Komplette Remissionen konnten nicht beobachtet werden.

Auf die in dieser Arbeit verwendeten PI3K Inhibitoren wird im Detail unter 1.6.2 eingegangen.

Somit sind fast alle PI3K Inhibitoren, die sich derzeit in klinischen Studien befinden relativ unspezifische pan-PI3K Inhibitoren, die mehrere Isoformen der PI3K hemmen (Kong D, 2008) und deren Wirkungsprofil noch nicht ausreichend charakterisiert wurde. Folglich sollte ein klinischer Einsatz dieser Substanzen kritisch erfolgen.

1.6 Verwendete Substanzen

1.6.1 RAD001 (Everolimus)

RAD001 ist ein oral bioverfügbare mTORC1- Inhibitor der Firma Novartis Pharma GmbH (Basel, SUI) der hauptsächlich in der Leber über CYP3A4 abgebaut wird und sich durch seine gute Verträglichkeit auszeichnet.

Neben der Zulassung als Immunsuppressivum nach Herz und Nierentransplantation wurde RAD001 im März 2009 als second line Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen (Battelli C, 2011). Kürzlich erfolgte ebenfalls die Zulassung zur Therapie von Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Kulke MH, 2011).

Zur Zeit wird die Wirksamkeit von RAD001 an einer Vielzahl anderer maligner Erkrankungen untersucht. Eine gute antitumoröse Wirkung mit geringen Nebenwirkungen konnte bereits in klinischen Studien bei Patienten mit Mamma-CA (Jerusalem G, 2010), neuroendokrinen Tumoren (Yao JC, 2008), Glioblastomen (Sarkaria JN, 2010), Hodgkin und Non- Hodgkin Lymphomen (Johnston PB, 2010; Tobinai K, 2010; Witzig T, 2009), Endometrium- CA (Slomovitz BM, 2010), Magen-CA (Doi T, 2010), nicht kleinzelligen Lungen- CA (Johnson BE, 2007) und malignen hämatologischen Erkrankungen wie AML, Mantel Zell Lymphome, B- und T-Zell Leukämien (Yee KWL, 2006) nachgewiesen werden. Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen Stomatitis, Übelkeit, Anämie, Hyperglykämie und Hyperlipidämie fielen dabei meist moderat aus.

Die ersten Studien mit Blasenkarzinompatienten lieferte dagegen wie oben beschrieben keine guten Ergebnisse bezüglich der antitumorösen Wirkung von mTOR Inhibitoren im Harnblasenkarzinom (Niegisch G, 2012; Seront E, 2010).

1.6.2 NVP-BEZ235

NVP-BEZ235 ist ein PI3K/mTOR Inhibitor der Firma Novartis Pharma GmbH (Basel,SUI), der nach erfolgreicher Evaluation *in vitro* und *in vivo* vor kurzer Zeit in klinische Studien überführt wurde (Kong D, 2008).

In vitro konnten bei Tumorzellen der Brust (Brachmann SA, 2009; Creighton CJ, 2010; Serra V, 2008), der Prostata, des Darms, Glioblastomzellen (Maira SM S. F., 2008) und Plasmozytomzellen starke antiproliferative Effekte und Apoptoseinduktion beobachtet werden. Im Xenograft Mausmodell wurde eine Inhibition des Tumorwachstums bei guter Verträglichkeit bei Tumorzellen der Lunge (Engelman JA, 2008), der Brust (Serra V, 2008), des Pankreas (Cao P, 2009), der Prostata, bei Glioblastomzellen (Maira SM S. F., 2008), Plasmozytomzellen (McMillin DW, 2009) und Sarkomzellen (Nanni P, 2010) nachgewiesen. Verschiedene Gruppen beobachteten in ihren Mausmodellen zusätzlich einen erheblichen Einfluss der BEZ235 Behandlung auf die Angiogenese (Marone R, 2009; Schnell CR, 2008) und Metastasierungseigenschaften (Marone R, 2009; Nanni P, 2010) des Tumors. Gegen Chemotherapeutika resistente Tumorzellen aufgrund eines hoch aktiven PI3K/mTOR Signalweges konnten durch BEZ235 Behandlung wieder sensibilisiert werden (Eichhorn PJA, 2008). In der ersten Phase 1 Studie mit 51 Patienten wurde bei 2 Patienten eine partielle Remission beobachtet (Burris H, 2010). Bei einer Patientin mit HER2 neg., Östrogen Rezeptor pos. Mammakarzinom und einem Patienten mit Cowden Snyderom (PTEN Mutation), der ein

Bronchialkarzinom entwickelt hatte. Bei 27% der Patienten wurde ein stabiler Krankheitsverlauf für durchschnittlich 4 Monate erreicht.

Die Wirksamkeit von BEZ235 bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen wird derzeit untersucht (www.clinicaltrials.gov, 2012). Allerdings sind bis heute noch keine Ergebnisse veröffentlicht worden.

1.6.3 NVP-BGT 226

NVP-BGT 226 ist ein PI3K/mTOR Inhibitor der Firma Novartis Pharma GmbH (Basel,SUI), zu dem bis jetzt noch keine Daten veröffentlicht wurden. Nachdem NVP-BGT226 in vitro in verschiedenen Tumorentitäten eine gute Wirksamkeit zeigte, wurde die weitere Entwicklung und Anwendung zu Gunsten anderer Substanzen mittlerweile eingestellt (Glienke W, 2012; Chang KY, 2011; Baumann P, 2012).

1.6.4 NVP-BKM 120

NVP-BKM120 (Novartis, Basel, SUI) wurde als Inhibitor aller PI3Ks der Klasse 1 entwickelt. NVP-BKM120 zeigte in verschiedenen Xenograft Modellen mit und ohne PI3K/PTEN Mutationen vielversprechende antitumoröse Aktivität (Maira M, 2010; Voliva CF, 2010). Die erste klinische Studie mit 31 Patienten zeigte eine sehr gute Verträglichkeit (Baselga J, 2010). Es zeigte sich bei 2 Patientinnen mit Mammakarzinomen eine partielle Remission. Dabei wies eine Patientin eine KRAS, die andere eine PI3K Mutation auf. 20% der Patienten zeigten für mindestens 8 Monate einen stabilen Krankheitsverlauf. Des Weiteren wird die Wirksamkeit von BKM120 derzeit an einer Vielzahl von soliden Tumoren und malignen hämatoonkologischen Erkrankungen untersucht (www.clinicaltrials.gov, 2012).

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Interesse am PI3K/mTOR Signalweg als Therapieoption im Harnblasenkarzinom hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Das gehäufte Auftreten von Mutationen in verschiedenen Genen des Signalweges und Veränderungen der Aktivität konnten wiederholt bei Patienten mit Blasenkarzinomen nachgewiesen werden und waren mit einer schlechten Prognose assoziiert. Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges stellen daher vielversprechende molekulare Substanzen dar, die in verschiedenen Tumorentitäten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits gute antitumoröse Wirkungen gezeigt haben und in die neue Hoffnungen gesetzt werden bezüglich der medikamentösen Therapie maligner Tumorerkrankungen. Im Harnblasenkarzinom sind die Regulationsmechanismen und Funktionen des PI3K/mTOR Signalweges bisher allerdings wenig charakterisiert worden. Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges wurden bereits in klinischen Studien angewendet, obwohl das Wirkungsprofil dieser Substanzen präklinisch im Blasenkarzinom noch nicht hinreichend evaluiert wurde.

Aus dieser Problematik ergaben sich die unten beschriebenen Fragestellungen als Vorlage für diese Arbeit.

1. Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die die Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Harnblasenkarzinomzelllinien *in vitro* regulieren.
2. Untersuchung verschiedener Strategien zur Inhibition von Schlüsselproteinen des PI3K/mTOR Signalweges.
3. Auswirkungen von verschiedenen Strategien zur Inhibition von Schlüsselproteinen des PI3K/mTOR Signalweges auf Zellfunktionen wie Wachstum, Proliferation, Apoptose und Stoffwechselaktivität.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Darmstadt
Ethanol 70%	Merck	Darmstadt
Ethanol 96%	Merck	Darmstadt
Isopropanol	Merck	Darmstadt
HCL	Merck	Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth	Karlsruhe
Ammonium persulfat = APS 10%	Sigma	Sigma
Temed 99%	Roth	Karlsruhe
TGS 10x	Bio-Rad	München
Triton X100	Sigma	München
EDTA	AppliChem	Darmstadt
Tween	Specialty Chemicals	Essen
Glycerin	Merck	Darmstadt
Methanol	Sigma	München
Bromphenolblau	Sigma	München
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen	Darmstadt
SDS	Sigma	München
TRIS	Merck	Darmstadt
Glycin	Sigma	München
Milchpulver	Saliter	Obergünzburg
Natriumchlorid	Merck	Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	FluKa	Neu-Ulm
Entwicklerkonzentrat	Röntgen Bender	Baden-Baden
Fixiererkonzentrat	Röntgen Bender	Baden-Baden

3.1.2 Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Glasgefäße	Schott	Mainz
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg
Cryoröhrchen 1,8 ml	Nunc	Roskilde (Dänemark)
Latexhandschuhe	Sempermed	Wien (Österreich)
Zellkulturschalen 10 cm	Falcon	Heidelberg
Mikrotiterplatten (6-well)	Greiner	Nürtlingen
Mikrotiterplatten (96-well)	Greiner	Nürtlingen
Pasteurpipetten Glas	Brand GmbH	Wertheim
50 ml Polypropylen Röhrchen	Falcon	Heidelberg
5 ml Polypropylen Röhrchen	Falcon	Heidelberg
4,5 ml Polystyrol Röhrchen	Greiner	Nürtlingen
12 ml Polystyrol Röhrchen	Greiner	Nürtlingen
Zellschaber	Corning Incorporated	Lowell Ma. (USA)
Combitips plus 10µl	Eppendorf AG	Hamburg
Combitips plus 20µl	Eppendorf AG	Hamburg

Combitips plus 50µl	Eppendorf AG	Hamburg
Ritips steril 100 µl	Ritter GmbH	Schwabmünchen
Ritips steril 250 µl	Ritter GmbH	Schwabmünchen
Combitips plus 500µl	Eppendorf AG	Hamburg
Sterile Pipetten 2ml	Falcon	Heidelberg
Sterile Pipetten 5ml	Sarstedt AG	Nürnberg
Sterile Pipetten 10ml	Sarstedt AG	Nürnberg
Sterile Pipetten 25ml	Falcon	Heidelberg
Pipettenspitzen Lad Professional 10 µl	Biozym	Oldendorf
Lad Professional 200 µl	Biozym	Oldendorf
Lad Professional 1000 µl	Biozym	Oldendorf

3.1.3 Geräte

CO2 Inkubator Hera Cell	Thermo	München
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss	Göttingen
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik	Gehrden
Entwickler CP 1000	Agfa	Düsseldorf
Waage Sartorius	Schultheiss	München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein	Zürich (Schweiz)
Elisa Reader Victor X3 (Caspase)	Perkin Elmer	Rodgau- Jügesheim
Kamera Chemi Doc XRS	Bio RAD	München
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich	Tuttlingen
Sterilbank Hera Safe	Thermo	München
Pipetman Neo	Gilson	Middleton, WI (USA)
Purelab Classic	Elga	Celle
Magnetrührer Mini MR Standard	Ika Labortechnik	Staufen
Power Pac HC	Bio-Rad	München
Kinetic microplate reader	Molecular devices	Downington, PA (USA)
Medical X-Ray Screen Film blue sensitive	Agfa	Düsseldorf

3.1.4 Zellkulturmaterialien

Fetal Bovine Serum	Biochrom AG	Berlin
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG	Berlin
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG	Berlin
Dulbecco's MEM (1x)	Biochrom AG	Berlin
Dulbecco's PBS (1x)	Biochrom AG	Berlin
Dulbecco's PBS (10x)	Biochrom AG	Berlin
Trypsin/EDTA Lsg.	Biochrom AG	Berlin
Complete Mini- Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche	Mannheim
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad	München
Penstrep 100u	Biochrom	Berlin

Trypanblau	Biochrom	Berlin
Phosphatase Inhibitor Mix2	Serva	Heidelberg

3.1.5 Kits

ECL Plus Western Blotting	RPN2132	Amersham
APC BrdU Flow Kit	552598	BD Pharmingen
Caspase – Glo 3/7 Assay	G7790	Promega
BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Scientific
XTT sodium salt	X-4626	Sigma
PMS (für XTT Assay)	P-9625	Sigma

3.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Alle Primären Antikörper wurden bei Cell Signaling (Boston, USA) bestellt und in TBS, 0,1% Tween, 5% BSA, 0,02% Na-Azid aufgelöst.

Antikörper	Best. Nr.
4E-BP1 AK	9452
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	9459
Akt	4691
Phospho-Akt (Ser473)	4060
Phospho- Akt (Thr. 308)	2965
GSK-3 Beta	9315
Phospho GSK-3 Beta (Ser9)	9323
Phospho- mTOR	2971
mTOR	2972
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4376
P44/42 MAPK (Erk1/2)	9102
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	9234
P70 S6 Kinase	9202
Phospho- S6 Ribosomale Protein	4858
S6 Ribosomal Protein	2217

Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper wurden von Dianova bezogen und in TBS, 0,1% Tween und 5% Milchpulver gelöst.

Peroxidase-conj. F(ab)2-Fragm. Donkey Anti Mouse	715-036-150	Dianova
Peroxidase-conj. F(ab)2-Fragm. Donkey Anti Rabbit	711-036-152	Dianova

3.1.7 Substanzen

RAD001	Novartis Pharma GmbH
NVP-BEZ235	Novartis Pharma GmbH
NVP-BGT226	Novartis Pharma GmbH
NVP-BKM120	Novartis Pharma GmbH

Alle Substanzen wurden in 100% DMSO gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 10 mmol/L. Für jeden Versuch wurde eine frische Verdünnung in Zellkulturmedium hergestellt.

3.1.8 shRNA Transduktion

mTOR shRNA Adenovirus	AV-004958-01	Sirion Biotech
Gibco OptiMEM	31985	Invitrogen
Control Virus	SB-P-AV-146-01	Sirion Biotech

3.2 Methoden und spezielle Materialien

3.2.1 Zellkultur:

Material:

- Neubauer Zählkammer mit geschliffenem Deckglas
- Dulbecco's PBS/5nM EDTA
- Trypsin/EDTA
- RPMI bzw. DMEM + nicht essentielle Aminosäuren + 10% FKS+ 1% Penicillin/Streptomycin
- Trypanblau

Verwendete Zelllinien:

Die Zelllinien RT4, HT1376, 647V, 486P, J82, 253J, EJ28, T24 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) erhalten. Die Zelllinie RT112 von der German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig).

Zelllinie	Medium	Verdünnung bei Aussaat	Eigenschaften
T24	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:10	G3 HRAS Onkogen PTEN Mutation
HT-1376	DMEM mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:2	G3
RT4	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:2	T1 G1/2
J82	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:10	T3 G3 H-RAS Onkogen
RT112	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:5	G2 FGFR3- Überexpression

647-V	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:2	G2
253J	DMEM mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:5	T4 G4
486P	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:2	T4 G4
EJ 28	RPMI mit 2mM Glutamin 10% FCS nicht ess. Aminosäuren 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)	1:10	G3-4

Methode:

Kultivieren der Zellen:

Alle Zellen wurden bei 37°C, in einer mit 5% CO₂ angereicherten, wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Je nach Zelllinie wurde RPMI oder Dulbecco's MEM als Nährmedium verwendet (siehe Tabelle). Als Zusatz enthielt das Medium 10% FKS, nicht essentielle Aminosäuren und 100U Penicillin-Streptomycin. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden sie wie folgt gesplittet: Nach dem Absaugen des Mediums und dem 2-maligen Waschen mit Dulbecco's PBS/5nM EDTA wurden die Zellen mit 2,5ml Trypsin/EDTA bedeckt und im Brutschrank inkubiert. Sobald unter mikroskopischer Kontrolle ein Ablösen der Zellen sichtbar war, wurden sie in 5 ml frischem Medium aufgenommen, in 12 ml Röhrchen überführt und bei 250G 5 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Zelllinie wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen in neue Schalen überführt (siehe Tabelle).

Zellzahlbestimmung:

Alle Zellzahlbestimmungen wurden in einer mit einem Deckglas verschlossenen Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach Trypsinierung, Zentrifugation und Resuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und in der Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt.

Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen:

Um die Zellen für längere Zeit zu lagern wurden sie wie zuvor beschrieben gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Um die Ausbildung von Eiskristallen zu verhindern wurde Einfriermedium verwendet, das sich aus RPMI, 50% FCS und 10% DMSO (bei den Zelllinien 253 J und HT1376 DMEM, 60% FCS, 10% DMSO) zusammensetzte. Nach der Resuspension des Pellets in Einfriermedium wurde die Lösung in Reaktionsgefäße überführt. Nach 24 h bei -70°C folgte die Lagerung bei -194°C in flüssigem Stickstoff.

Zum Aussähen der eingefrorenen Zellen wurden die Reaktionsgefäße bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Die Verdünnung des DMSO haltigen Einfriermediums erfolgte möglichst frühzeitig, so dass die Zellen durch die toxische Wirkung des warmen DMSO nicht geschädigt wurden. Nach dem Zentrifugieren bei 250G für 5 Minuten wurde das Pellet in geeignetem Zellkulturmedium resuspendiert und in Kultur genommen.

3.2.2 Lysatherstellung für Western-Blot

Material:

- Lysepuffer

150mM Nach	7,5ml 5M Nach
50mM TRIS/Hol pH 7,2	12,5 ml 1M TRIS/Hol
1% Triton X100	2,5 ml Triton X100
0,05% SDS	625 µl 20% SDS
5nM EDTA	2,5ml 0,5M EDTA
	Mit sterilem H ₂ O auf 250 ml auffüllen

- Complete Mini- Protease Inhibitor Cocktail Tablets (1 Tablette+ 10 ml Lysepuffer)
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Methode:

Bei der Lysatherstellung wurde besonders darauf geachtet, dass die Kühlkette zu keinem Zeitpunkt unterbrochen wurde. Zur Proteingewinnung für den Western-Blot wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90% 2-mal mit PBS (1x) gewaschen. Nach der Zugabe von 500 µl Lysepuffer in 10 cm Schalen, in 6-well 100µl, wurden die Zellen 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 31.000G 30 Minuten zentrifugiert. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgte bei -20°C.

BCA Protein Assay (Proteinquantifizierung)

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte mithilfe des „BCA Protein Assay Kits“ nach Pierce. Bei dieser Methode wird die Biuret- Reaktion ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$) mit einer Messung des violettfarbenen Komplexes aus Bicinchoninsäure und Cu^{1+} kombiniert, der eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm aufweist. Mithilfe einer Standard- Protein-Verdünnungsreihe kann nach photometrischer

Messung der Proben die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden (siehe Herstellerprotokoll).

3.2.3 Proteinelektrophorese:

Material:

Kammer: Bio-RAD Mini- PROTEAN Tetra Cell

Chemikalien:

- 1,5M Tris/HCl pH=8,8
- 0,5M Tris/HCl pH=6,8
- Acrylamid-/ Bisacrylamidsg 37,5:1
- Ammonium persulfat = APS 10%
- TEMED 99%
- Gelladepuffer 4x: 0,25M TRIS pH 6,8/8g SDS/10 ml H₂O/50ml 0,5M TRIS/HCl pH=6,8/ Lösen unter Erwärmen/40 ml Glycerin/0,04g Bromphenolblau mit H₂O auf 100 ml auffüllen
- Dithiothreitol= DTT 1M
- Laufpuffer: TGS 10x
- Proteinmarker: Precision Plus Protein Standard

Trenngel

Anzahl Gele	6%			12%		
	1x	2x	3/4x	1x	2x	3/4x
Aq. Dest. (ml)	5,45	10,89	16,34	3,45	6,89	10,34
1,5M TRIS pH 8,8 (ml)	2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
30% Acrylamid mit 0,8 Bisacrylamid (ml)	2	4	6	4	8	12
10% APS (µl)	50	100	150	50	100	150
TEMED (µl)	10	20	30	10	20	30
Gesamt (ml)	10	20	30	10	20	30

Sammelgel

Anzahl Gele	1x	2x	3/4x	5/6x
Aq. Dest. (ml)	3,07	6,14	9,21	15,25
1,5M TRIS pH 8,8 (ml)	1,25	2,5	3,75	6,25
30% Acrylamid mit 0,8 Bisacrylamid (ml)	0,65	1,3	1,95	3,25
10% APS (µl)	25	50	75	125
TEMED (µl)	5	10	15	25
Gesamt (ml)	5	10	15	25

Methode:

Gele Gießen:

Die Lösungen für die Gele wurden laut Tabelle zusammengestellt. Nach dem Reinigen und Trocknen der Glasplatten wurden sie laut Herstellerprotokoll zur Gießeinheit zusammengesetzt. Zum Start der Polymerisierung wurde dann dem Trenngel APS und TEMED zugegeben. Anschließend wurden 5 ml Trenngel eingefüllt und zum Sauerstoffabschluss mit 1ml Isopropanol überschichtet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Isopropanol verworfen, mit destilliertem Wasser nachgespült und mit Filterpapier getrocknet. Nachdem dem Sammelgel APS und TEMED zugegeben wurde, wurde das Trenngel damit überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach weiteren 30 Minuten bei RT konnten die Gele entweder gleich verwendet oder in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert werden.

Elektrophorese:

Die SDS-Page ist eine Variante der Gel-Elektrophorese und wird zum Auftrennen der Proteine nach ihrer Größe verwendet. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb, durch das kleine Moleküle gut wandern können, während Größere zurückgehalten werden. Zur Vorbereitung wurden die Konzentrationen der verwendeten Proteinlösungen nach Quantifizierung mit dem „BCA Protein Assay“ durch Verdünnung mit Lysepuffer der Proteinlösung mit der geringsten Konzentration angeglichen. Anschließend wurden 40µl Proteinlösung mit 10 µl eines Gemisches aus Ladepuffer und DTT (Ladepuffer:DTT/5:1) vermischt und 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Das im Ladepuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) führt durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken zum Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstrukturen und überdeckt die Eigenladung der Proteine, sodass die Proteine eine konstante negative Ladung aufweisen. Durch das zugegebene DTT werden beim Aufkochen Disulfidbrücken gespalten. Für die Versuche zur Detektion des Proteins mTOR wurde ein 6 prozentiges Polyacrylamidgel verwendet, für die übrigen Proteine ein 12 prozentiges Gel. Als Größenstandard wurde 10µl Precision Plus Protein Standard (Bio-RAD) verwendet, der zusammen mit 40µl Proteinlösung/Ladepuffergemisch auf das Sammelgel geladen wurde. Zum Einlaufen wurde für die ersten 15 Minuten eine Spannung von 90V, anschließend eine Spannung von 150V angelegt bis die Proteine die Unterkante des Trenngels erreicht haben.

3.2.4 Western-Blot:

Material

Kammer:

Bio RAD Mini Trans-Blot Cell Membran: Millipore Immobilon-P Transfer Membrane

Chemikalien:

- Blotting Puffer (10x): 15g TRIS/ 72g Glycin/ Auf 1000 ml H₂O auffüllen
- Gebrauchsfertiger Blotting Puffer: 200ml (10x) Puffer/ 1400ml H₂O/ 400ml MeOH

- TBS 10x (0,5M): 60,5g TRIS in 700 ml H₂O lösen/ mit HCL auf pH 7,6 einstellen/ mit H₂O auf 900 ml auffüllen/ nochmals pH überprüfen/ 90g NaCl darin lösen / Mit H₂O auf 1000 ml auffüllen
- TBST: 100 ml TBS (10x)/ 900 ml H₂O/ 1 ml Tween 20 (=1:1000)
- TBST-Milch (=Blocking Puffer):TBST/ 5% Magermilchpulver

Methode

Zur Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Membran wurde der Western-Blot verwendet. Dabei wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel stehendes elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern entlang dieses elektrischen Feldes auf eine Membran wobei das Muster der elektrophoretische Auftrennung erhalten bleibt. Durch das Auswaschen des SDS vor der Übertragung kann ein Teil der Proteine wieder ihre Sekundär- oder Tertiärstruktur einnehmen. Nach dem Abschneiden des Sammelgels wurde das Polyacrylamidgel zusammen mit der PVDF-Membran, dem Filterpapier und den Schwämmen in Blotting-Puffer eingelegt. Die PVDF Membran wurde vor der Verwendung 2 Minuten in MeOH, danach in H₂O eingelegt. Wie in Abb. 6 dargestellt wurde die Blottingeinheit zusammengestellt und unter Kühlung für 2h eine Spannung von 100V angelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit Blocking Puffer bei RT für 1h, oder bei 4°C über Nacht inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.



Abbildung 6: Blotting Einheit

3.2.5 Detektion

Material

Primär- AK: Cell Signaling s.o.

Sekundär- AK: Dianova s.o.

Entwicklung:

- ECL Plus Western Blotting Detection Reagents
- Entwicklerkonzentrat
- Fixiererkonzentrat

Methode

AK-Detektion

Alle Primärantikörper wurden in TBST/ 5%BSA/ 0,02%Na-Azid verdünnt (Verdünnung siehe Herstellerprotokoll), und die Membran mit dieser Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran drehend 3x 5 Minuten mit TBST/MP inkubiert um ungebundene Antikörper herunter zu waschen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (Anti-Mouse oder Anti-Rabbit), der in TBST/5% MP verdünnt (Verdünnung siehe Herstellerprotokoll) wurde, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ab diesem Schritt durfte das TBST/MP kein Na-Azid mehr enthalten, da das Konjugat des 2. Antikörper sonst inaktiv wäre. Zum Abschluss wurde die Membran erneut 3x 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Entwicklung

Für die Entwicklung wurden die beiden Reagenzien des ECL Western Blot Detection Kits im entsprechenden Verhältnis gemischt und die Membran 5 Minuten bei RT eingelegt. Anschließend wurde in der Dunkelkammer der Film belichtet und entwickelt.

3.2.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Material

APC BrdU Flow Kit:

- BrdU (10mg/ml)
- 10x Perm/Wash Buffer
- Staining Buffer 1x PBS+ 3%FCS+ 0,04% sodium azide
- 300µl DNase (1mg/ml)+700µl 1x PBS
- Fluorochrom conjugierter anti- Brdu Antikörper

Methode

Bei der FACS- Messung (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) wird das Streulicht- und Fluoreszenzverhalten einzelner Zellen aufgezeichnet. Hierbei werden Zellen die sich in einer Lösung befinden durch eine Kapillare gesaugt, und passieren einzeln einen Laserstrahl. Durch die Menge des gestreuten Lichtes können die Zellen nach Eigenschaften von vitalen und abgestorbenen Zellen getrennt werden. Während die Messung des Vorwärtsstreulichtes (FSC=Forward Scatter) Aufschluss über die Größe der Zelle gibt, hängt die Messung des Seitstreulichtes (SSC=Sidewards Scatter) hauptsächlich von der Granularität ab. Die Signale werden aufgenommen und logarithmisch verstärkt. Unabhängig voneinander werden sie digitalisiert und gespeichert.

In dieser Arbeit wurde die FACS- Messung verwendet um den Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation und die Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. Dafür wurde BrdU und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) verwendet. BrdU ist ein Nukleotid, das zu Beginn der S-Phase anstatt Thymin in die Nukleinsäuresequenz eingebaut wird. Mit Hilfe eines BrdU Antikörpers kann das BrdU anschließend immunochemisch nachgewiesen werden kann. Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurde 7-AAD verwendet, das nur in Zellen mit nicht intakter Membran eingebaut werden kann. So

kann mittels FACS Messung zwischen lebenden, DNA synthetisierenden Zellen und Zellen in Apoptose unterschieden werden.

3.2.7 Caspase Assay

Material

- Caspase Glo 3/7 Assay

Methode

Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit Hilfe des Caspase Glo 3/7 Assays bestimmt, die zu den Effektorcaspasen gehören und von den Initiatorcaspasen (u.a. Caspase 8 und 9) aktiviert werden. Gemessen wird bei diesem Test eine Lumineszenzzunahme, die durch die Spaltung eines künstlichen Substrates (Z-DEVD Aminoluziferin) durch die Caspasen 3 und 7 zustande kommt. Das bei der Spaltung freiwerdende Aminoluziferin dient dabei als Substrat für die im Kit enthaltene Luziferase.

Nach Ablauf der Inkubation mit den jeweiligen Substanzen wurden in jedes Well 75µl Caspase Reagenz zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation wurde in eine Schwarze lichtundurchlässige 96-well Platte umpipettiert und weitere 50 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte im Elisa Reader Victor X3.

3.2.8 Untersuchung des Zellmetabolismus

Material

XTT- Kit:

- XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt)
- PMS (Phenazine Methosulfate)

Methode

Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde der XTT Test verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Tetrazoliumreduktionstest, bei dem das Tetrazoliumsalz XTT zum wasserlöslichen Orange-farbenen Formazan gespalten wird. Für diese Spaltung werden Dehydrogenaseenzyme lebender Zellen benötigt. Diese Enzyme befinden sich in den Mitochondrien und werden kurz nach dem Zelltod deaktiviert, was daher unmittelbar zum Absinken der Reduktionsrate des Testsubtrats führt. Die Umwandlung in Formazan kann Photometrisch bestimmt werden.

Die Reagenzien des XTT Tests wurden im Dunkeln aufgetaut und ohne Licht in der Sterilbank in die 96-well Platte gegeben. Dafür wurden 5ml XTT mit 100µl PMS vermischt und in jedes Well 50µl zugegeben. Anschließend wurden die Platten für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 und 620 nm. Pro Konzentration wurde eine vierfach Messung durchgeführt und als Kontrolle wurde nur DMSO zugesetzt.

3.2.9 Adenovirale Transduktion

Material

- RPMI nicht essentielle Aminosäuren + 10% FKS + 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin)
- Gibco OptiMEM
- mTOR shRNA Sequenz: GCATGGAAGAATACACCTGTA
Kontroll Sequenz: CTTACAATCAGACTGGCGA

Methode

Durch das Einbringen einer shRNA mithilfe eines Adenovirus kann gezielt die Expression eines Gens gehemmt werden. Dabei ist die Sequenz der eingebrachten shRNA komplementär zur Zielregion der mRNA. In der Zelle wird die shRNA zu einer siRNA umgebaut, die dann die Translation der komplementären mRNA verhindert. Durch den Einsatz einer shRNA kann gegenüber einer siRNA eine längere Wirkung die auch durch Zellteilung wenig beeinflusst wird erreicht werden.

Zur Vorbereitung wurden am Vortag $1,5 \times 10^5$ in 6-well Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Für die Transduktion wurde am folgenden Tag das Medium abgesaugt, 100U mTOR shRNA Virus zusammen mit 400µl OptiMEM zugegeben und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen in normalen Medium inkubiert bis eine Konfluenz von 80% erreicht wurde. Dann wurden wie beschrieben die weiteren Versuche durchgeführt.

3.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweizeitige t-Test verwendet. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Ist der errechnete p-Wert größer als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau, gilt die Nullhypothese als bestätigt, d.h. die verglichenen Wertegruppen unterscheiden sich nicht signifikant. Ist der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau gilt der Unterschied zwischen den beiden Wertegruppen als signifikant. Ein p-Wert $< 0,001$ gilt als statistisch höchst signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Harnblasenkarzinomzelllinien

Das Interesse am PI3K/mTOR Signalweg als Therapieoption im Harnblasenkarzinom hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Mutationen in Teilen des Signalweges konnten wiederholt bei Patienten mit Blasenkarzinomen nachgewiesen werden. Präklinisch ist der mTOR Signalweg im Harnblasenkarzinom bisher allerdings wenig charakterisiert worden.

Um die Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Harnblasenkarzinomzellen zu untersuchen wurde der Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine dieses Signalweges bestimmt. Dafür wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90% lysiert und mittels Western Blot der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, mTOR, S6K1, S6RP und 4E-BP1 relativ zu dem Gesamtproteingehalt detektiert. Als Ladungskontrolle wurde β -Actin verwendet.

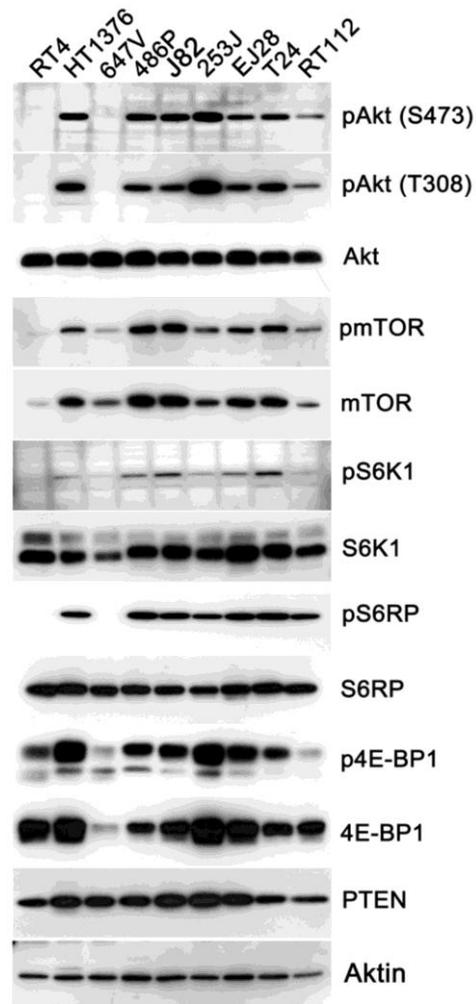


Abbildung 7: Charakterisierung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR- Signalweges in 9 verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien mittels Western-Blot.

In diesem Versuch wurde ein breites Spektrum an Harnblasenkarzinomzelllinien verwendet. So gehören die Zelllinien RT112, RT4 und 647V zu den gut und mäßig differenzierten Zelllinien (G1-G2), während die Zelllinien T24, J82, 253J, 486P, HT1376 und EJ28 den schlecht und undifferenzierten Zelllinien zugeordnet werden. Die Zelllinie T24 ist Träger des HRAS Onkogens sowie einer PTEN Mutation. Die Zelllinie J82 trägt ebenfalls ein HRAS Onkogen während die Zelllinie RT112 eine erhöhte Expression des FGFR3 aufweist. Dies sind Alterationen die häufig in Blasenkarzinomen gefunden wurden und mit einer erhöhten Aktivierung des PI3K/mTOR Signalweges assoziiert waren (Platt FM, 2009; Li C, 2005; Gomez-Roman JJ, 2005).

In allen Zelllinien konnte die Expression von AKT, mTOR, S6K1, S6RP, 4E-BP1 und PTEN nachgewiesen werden. In 7 von 9 Zelllinien konnte zudem eine Phosphorylierung aller Proteine des Signalweges beobachtet werden. Keine Expression von phosphoryliertem AKT wiesen die Zelllinien RT4 und 647V auf. Diese beiden Zelllinien zeigten auch eine deutlich verminderte Expression von phosphoryliertem mTOR, S6K1 und S6RP. Die Expression von p4-EBP1 hingegen war bei der Zelllinie RT4 stark bei der Zelllinie 647V schwach ausgeprägt. Alle Zelllinien zeigten eine Expression von PTEN.

Für die weiteren Versuche wurde die gut bis mäßig differenzierte Zelllinie RT112 und die schlecht differenzierte Zelllinie T24 verwendet, da diese beiden Zelllinien die oben beschriebenen für Blasenkarzinome charakteristischen Alterationen aufweisen und beide Zelllinien in unseren Versuchen einen durchweg aktiven Signalweg zeigten.

4.2 Einfluss inhibitorischer Ansätze auf die Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR-Signalweges.

Um die funktionelle Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges im Harnblasenkarzinom zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Strategien charakterisiert, um molekulare Schlüsselproteine dieses Signalweges zu inhibieren. Dabei wurden sowohl chemische Inhibitoren mit hoher Spezifität gegen einzelne Kinasen, als auch shRNAs gegen einzelne Proteine getestet.

4.2.1 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR nach Anwendung von small molecule Inhibitoren

Nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde die Expression und Phosphorylierung der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges mittels Western-Blot dargestellt. Dafür wurden die Zellen nachdem eine Konfluenz von 80-90% erreicht wurde eine Stunde mit der jeweiligen Substanz in aufsteigender Konzentration inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, mTOR, S6K1, S6RP und 4E-BP1 relativ zu dem Gesamtproteingehalt detektiert. Zum Kontrolle wurde eine DMSO- Verdünnung, welche der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet.

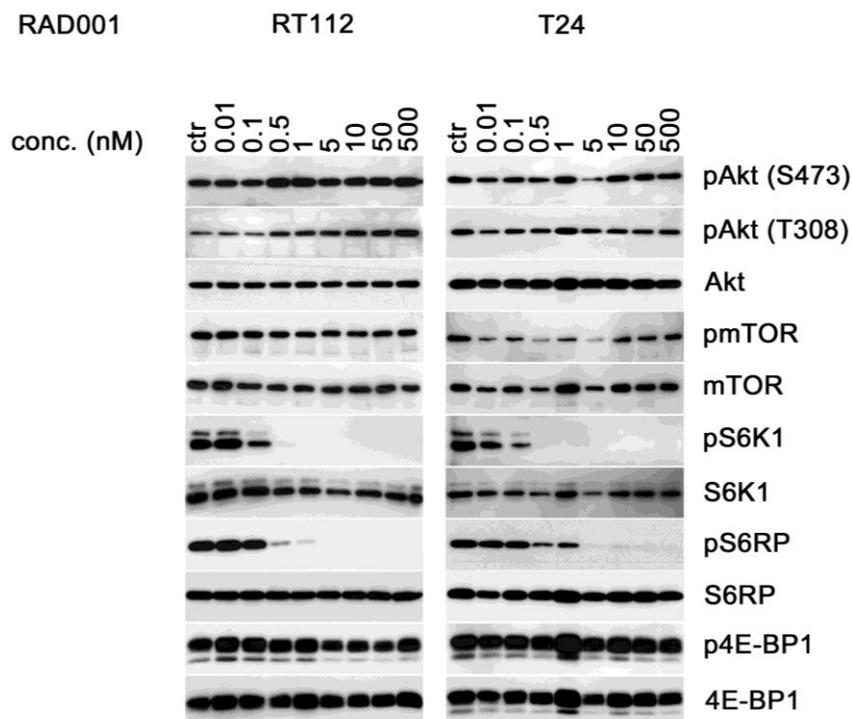


Abbildung 8: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach einstündiger Inkubation mit RAD001.

Im ersten Versuch wurde der mTORC1 Inhibitor RAD001 verwendet, der bereits die Zulassung als second-line Therapie für Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen erhalten hat und dessen Wirksamkeit derzeit in klinischen Studien mit Patienten mit Tumoren der Lunge, der Mamma und

des Magens evaluiert wird (Jerusalem G, 2010; Doi T, 2010; Johnson BE, 2007). In der ersten klinischen Studie mit Harnblasenkarzinompatienten zeigte RAD001 keine gute Wirksamkeit (Seront E, 2010).

Für diesen Versuch wurden die Zelllinien mit aufsteigenden RAD001 Konzentrationen von 0,01 bis 500 nM für eine Stunde inkubiert. Mittels einer Chemilumineszenzkammer wurden die Signale des Western- Blots aufgezeichnet und quantifiziert. Aus diesen Daten wurde dann die IC50 berechnet.

Bei beiden Zelllinien konnte in Abhängigkeit der Konzentration eine verminderte Phosphorylierung von S6K1 und S6RP relativ zu dem Gesamtprotein beobachtet werden (Abb. 8). Eine Abnahme der Phosphorylierung wurde bei beiden Proteinen sowohl in RT112 als auch in T24 bei einer Konzentration von 0,8 nM beobachtet. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wurde durch Inkubation mit RAD001 nicht beeinflusst. Eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 wurde bei der Zelllinie RT112 bei einer Konzentration von 0,5nM deutlich. Bei der Zelllinie T24 konnte eine Zunahme der Phosphorylierung an S473 erst ab einer Konzentration von 10nM nachgewiesen werden. Die Expression der Gesamtproteine und des phosphorylierten mTOR blieb auch bei steigender Konzentration bei beiden Zelllinien unverändert. Die IC50 war nach Inkubation mit RAD001 bei beiden Zelllinien nahezu gleich (siehe Abb. 9).

Zelllinie	RAD001		NVP-BEZ235	
	RT112	T24	RT112	T24
AKT (T308)	-	-	36,8 ± 4,1	9,03 ± 1,34
AKT (S473)	-	-	27,2 ± 6,2	10,2 ± 1,59
pS6K1	0,19 ± 0,08	0,15 ± 0,05	5,05 ± 0,6	0,55 ± 0,13
pS6RP	0,35 ± 0,1	0,5 ± 0,07	9,04 ± 0,08	0,63 ± 0,14
p4E-BP1	-	-	40,8 ± 5,7	16,3 ± 2,99

Abbildung 9: IC50 der Target Proteine von mTORC1 und der PI3K nach Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ235.

Im nächsten Versuch wurde der PI3K Inhibitor NVP-BEZ235 verwendet. Während NVP-BEZ235 bei einer Reihe von Tumorzellen wie der Brust, der Prostata, des Darms und der Lunge eine gute antitumoröse Wirksamkeit zeigte und auch schon Anwendung in klinischen Studien fand, wurde die Wirksamkeit an Blasenkarzinomzellen noch nicht untersucht (Kong D, 2008; Serra V, 2008; Maira SM S. F., 2008).

Um das Wirkungsprofil von NVP-BEZ235 in Blasenkarzinomzelllinien zu evaluieren, wurden die Zelllinien eine Stunde mit aufsteigenden BEZ Konzentrationen von 0,01 nM bis 1000 nM inkubiert. Anschließend wurden in einer Chemilumineszenzkammer die Signale des Western- Blots aufgezeichnet, quantifiziert und die IC50 berechnet.

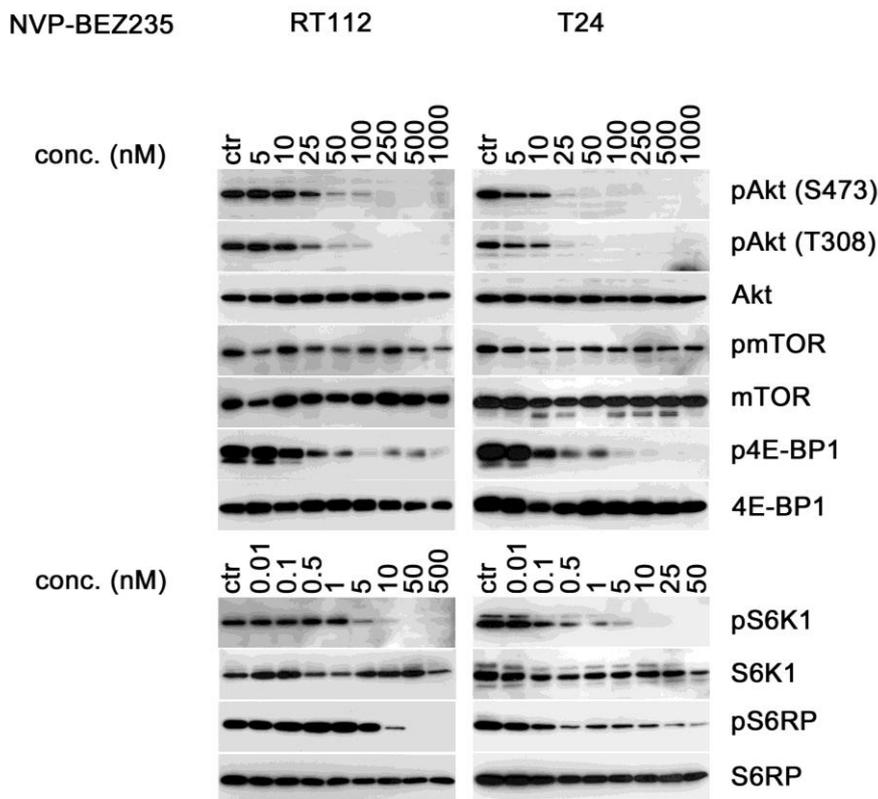


Abbildung 10: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach einstündiger Inkubation mit NVP-BEZ235.

Nach Inkubation mit NVP-BEZ235 wurde eine Abnahme der Phosphorylierung von Akt an T308 und S473, S6K1, S6RP und 4E-BP1 beobachtet (Abb. 10). Dabei unterschieden sich die beiden Zelllinien in der IC50 voneinander (Abb. 9). Die Phosphorylierung von AKT an Thr308 und Ser473 und 4E-BP1 wurde bei einer Konzentration von 25nM in RT112 und 10nM in T24 inhibiert. Dagegen wurde eine Inhibition der Phosphorylierung von S6K1 bereits ab einer Konzentration von 5nM in RT112 und 0,1nM in T24 deutlich. Dabei folgten die Phosphorylierungslevel von S6RP in der Kinetik S6K1, während die Phosphorylierungslevel von 4E-BP1 der Kinetik von AKT folgten. Die Phosphorylierung von mTOR und die Expression der Gesamtproteine blieb auch bei steigenden Konzentrationen unverändert.

Da nach Inkubation mit dem PI3K Inhibitor NVP-BEZ235, entgegen der Behandlung mit RAD001, eine Abnahme der Phosphorylierung des 4E-BP1 beobachtet wurde, wurde nun die Wirkung der PI3K Inhibitoren NVP-BKM120 und NVP-BGT226 evaluiert. Dabei stellte sich neben dem Wirkungsprofil der Substanzen die Frage ob im Blasenkarzinom eine Inhibition der PI3K immer auch mit einer Inhibition des 4E-BP1 einhergeht.

Während NVP-BKM120 bereits in klinischen Studien angewendet wird, wurden zu NVP-BGT226 bisher noch keine Ergebnisse veröffentlicht (Baselga J, 2010). Die Wirksamkeit beider Substanzen wurde noch nicht an Blasenkarzinomzelllinien untersucht.

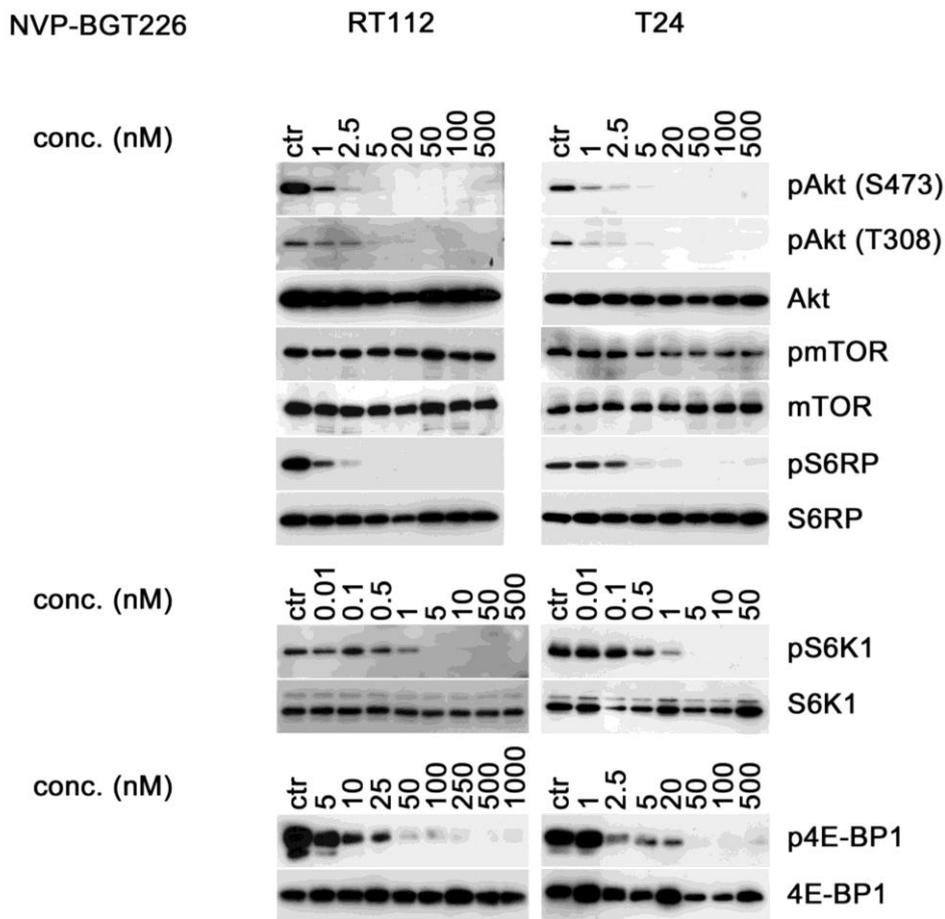


Abbildung 11: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach einstündiger Inkubation mit NVP-BGT226.

Um das Wirkprofil des PI3K Inhibitors NVP-BGT226 zu untersuchen wurden die Zellen eine Stunde mit Konzentrationen von 0,01nM bis 1000nM inkubiert. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von AKT an T308 und S473, S6K1, S6RP und 4E-BP1 (Abb. 11). Die Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 und S6K1 wurde in beiden Zelllinien bei einer Konzentration von 1nM inhibiert. Eine Hemmung der Phosphorylierung von S6RP wurde ab einer Konzentration von 1nM in RT112 und 5nM in T24 deutlich. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wurde bei der Zelllinie T24 ab einer Konzentration von 2,5 nM inhibiert, bei der Zelllinie RT112 bei 5 nM. Somit konnte eine Inhibition der Phosphorylierung aller hier untersuchten Proteine bei beiden Zelllinien in ähnlichen Konzentrationsbereichen beobachtet werden. Die Phosphorylierung von mTOR und die Expression der Gesamtproteine blieb auch bei steigenden Konzentrationen unverändert.

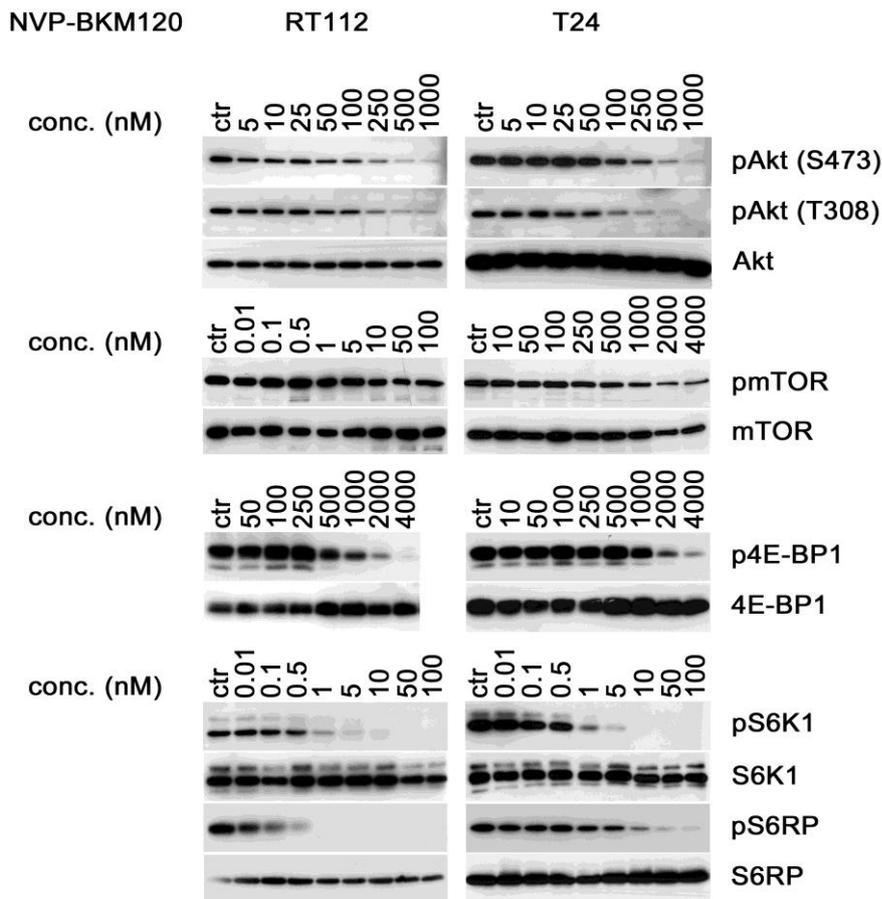


Abbildung 12: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach einstündiger Inkubation mit NVP-BKM120.

Als letzte Substanz wurde der PI3K Inhibitor NVP-BKM120 verwendet. Die Zellen wurden eine Stunde mit aufsteigenden Konzentrationen von 0,01nM bis 4000nM inkubiert. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von AKT an T308 und S473, S6K1, S6RP und 4E-BP1 (Abb. 12). Die Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 wurde bei der Zelllinie T24 bei einer Konzentration von 100 nM, bei der Zelllinie RT112 bei einer Konzentration von 250 nM inhibiert. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wurde dagegen bei der Zelllinie RT112 erst bei einer Konzentration von 500 nM gehemmt, bei der Zelllinie T24 ab einer Konzentration von 1000nM. Für eine Hemmung der Phosphorylierung von S6K1 und S6RP wurden dagegen erheblich geringere Konzentrationen benötigt. Die Phosphorylierung von S6K1 wurde bei beiden Zelllinien schon bei einer Konzentration von 1nM gehemmt. Eine Inhibition der Phosphorylierung von S6RP wurde in RT112 ab einer Konzentration von 0,5nM und in T24 ab 10nM deutlich. Die Phosphorylierung von mTOR und die Expression der Gesamtproteine blieb auch bei steigenden Konzentrationen unverändert.

4.2.2 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Proteinen des PI3K/mTOR Signalweges nach Transduktion mit mTOR shRNA.

Nach Inkubation mit dem mTORC1 Inhibitor RAD001 und den PI3K Inhibitoren NVP-BE235, NVPBGT226 und NVP-BKM120 wurde eine Hemmung der Phosphorylierung von 4E-BP1 nach PI3K-, nicht aber nach mTORC1- Inhibition beobachtet. Sowohl S6K1 als auch 4E-BP1 wurden in den meisten Modellen, entgegen unserer Ergebnisse (Abb. 9), als Zielmolekül von mTOR beschrieben (Ma XM, 2009). Deswegen wurde mittels einer adenoviralen shRNA die mTOR Expression inhibiert, um die Abhängigkeit der 4E-BP1- Aktivität von mTOR zu untersuchen.

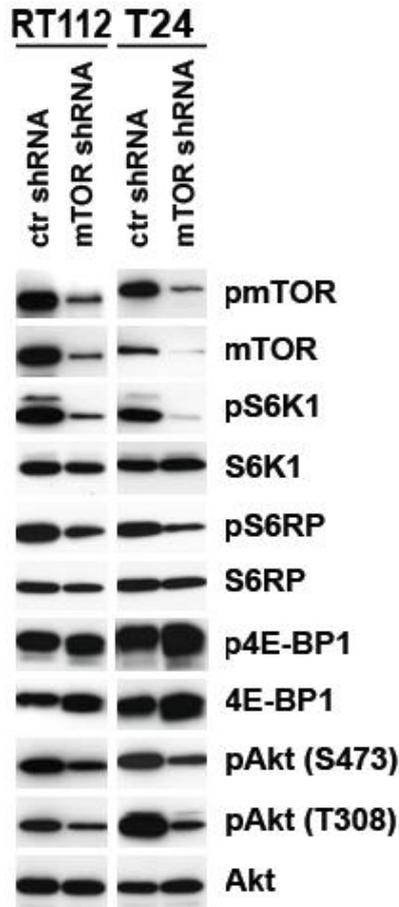


Abbildung 13: Expressions- und Phosphorylierungsstatus des PI3K/mTOR Signalweges nach Transduktion mit shRNA gegen mTOR.

Dafür wurden die Zellen 72 Stunden nach Transduktion lysiert und mittels Western- Blot der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, mTOR, S6K1, S6RP und 4E-BP1 relativ zu dem Gesamtproteingehalt detektiert.

Dabei zeigte sich nach Transduktion eine verminderte Expression von mTOR um 86-96% (Abb. 13). Das Ausschalten von mTOR hatte eine verminderte Phosphorylierung von S6k1 und pS6RP zur Folge, aber keinen Einfluss auf die Expression der Gesamtproteine. Die Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 wurde um 40-60% gehemmt. Dagegen kam es bei beiden Zelllinien zu einer Zunahme der 4E-BP1 Expression und gleichzeitig auch zu einer Zunahme an phosphoryliertem 4E-BP1.

4.3 Untersuchung der Phosphorylierung und Expression von Proteinen des PI3K/mTOR Signalweges nach 72 Stunden Inkubationszeit mit RAD001 und NVP-BEZ235

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Substanzen RAD001 und NVP-BEZ235 gelegt. Dies erfolgte vor dem Hintergrund, dass RAD001 bereits zur Therapie des Nierenzellkarzinoms und neuroendokriner Tumore des Pankreas zugelassen wurde und sich NVP-BEZ235 derzeit mit ersten Veröffentlichungen in klinischen Studien befindet (Battelli C, 2011; Kulke MH, 2011; Burris H, 2010).

Als wesentliche limitierende Faktoren für die Anwendung von Inhibitoren des mTOR Signalweges wurde eine Reaktivierung der PI3K nach mTOR bzw. S6K1 Inhibition sowie eine Aktivierung des MAPK Signalweges nach Hemmung des mTOR Signalweges beschrieben (Carracedo, 2008; Ma XM, 2009). So konnte in klinischen Studien nach Behandlung mit RAD001 eine verstärkte Aktivierung des MAPK Signalweges nachgewiesen werden (Carracedo, 2008). In vitro konnte diese Aktivierung durch PI3K Hemmung mittels LY204002 reduziert werden (Carracedo, 2008).

Um diese Regulationsmechanismen näher zu untersuchen wurden die beiden Blasenkarzinomzelllinien T24 und RT112 über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem mTORC1 Inhibitor RAD001 oder dem PI3K Inhibitor NVP-BEZ235 inkubiert. Hierfür wurden drei verschiedene Konzentrationen verwendet, die der zuvor ermittelten IC50, IC100 sowie einer weiteren höheren Konzentration entsprechen (Abb. 9). Als Kontrolle wurde eine DMSO- Verdünnung, welche der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, mTOR, S6K1, S6RP und 4E-BP1 relativ zu dem Gesamtproteingehalt detektiert.

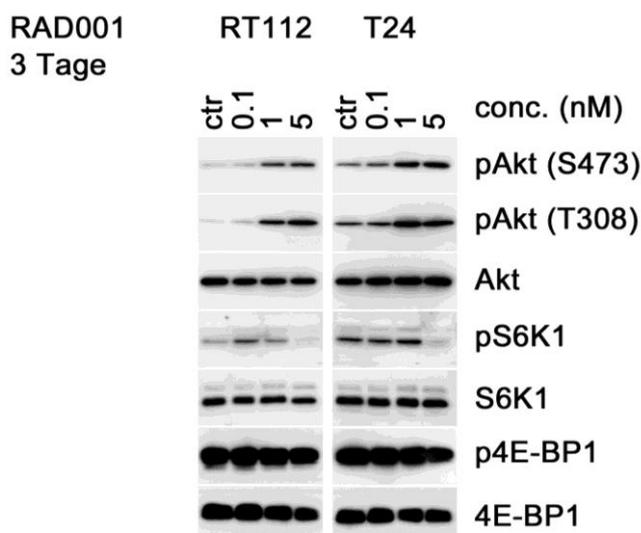


Abbildung 14a: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach dreitägiger Inkubation mit RAD001.

Im ersten Versuch wurden die Zellen 72 Stunden mit Konzentrationen von 0.1, 1 und 5nM RAD001 inkubiert. Dabei zeigte sich eine Hemmung der Phosphorylierung von S6K1 bei einer Konzentration

von 1nM in RT112 und 5nM in T24 sowie eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT sowohl an T308 als auch an S473 ab einer Konzentration von 1nM in beiden Zelllinien (Abb. 14a). Nach dreitägiger Inkubation wurde dieser Effekt in beiden Zelllinien deutlich, während eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT nach 1 Stunde nur bei der Zelllinie RT112 zu beobachten war. Diese Phosphorylierung von AKT wurde in weiteren Versuchen bereits nach 24 Stunden nachgewiesen (Nawroth R, 2011). Eine Veränderung der Phosphorylierung von 4E-BP1 oder der Expression des Gesamtproteins wurde nicht beobachtet.

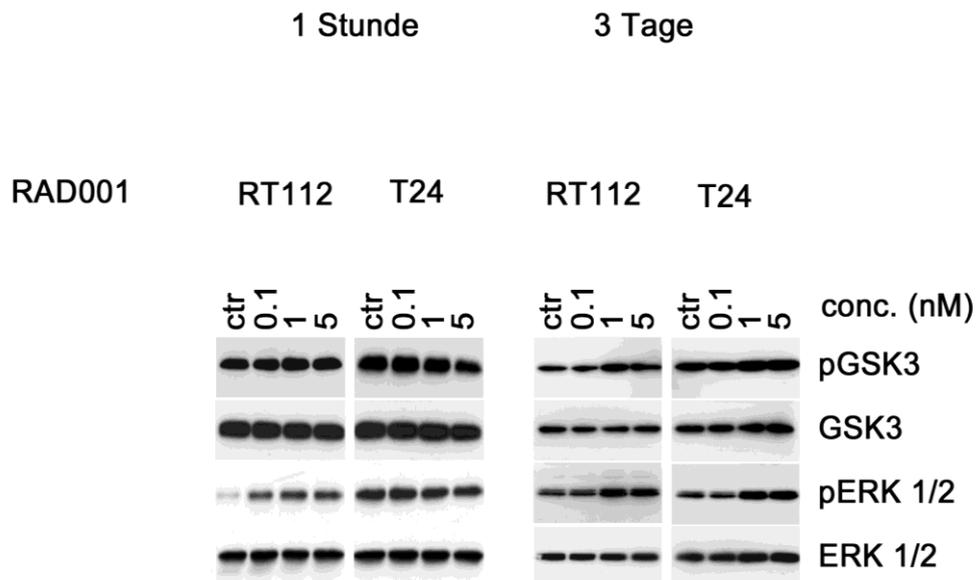


Abbildung 14b: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine GSK3 und ERK1/2 nach einer Stunde und nach dreitägiger Inkubation mit RAD001.

Zusätzlich zu den bereits untersuchten Proteinen des PI3K/mTOR Signalwegs wurde ein Antikörper gegen GSK3 β verwendet. GSK3 β ist ein Targetprotein von AKT, welches eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion spielt und ein Schlüsselprotein für das Zellüberleben darstellt (Pap M, 1998). Dabei stellte sich die Frage, ob die beobachtete Reaktivierung von AKT auch eine Phosphorylierung von GSK3 β zur Folge hat.

Um die Wechselwirkung des mTOR Signalweges und des MAP-Kinase Signalweges zu untersuchen wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK 1/2 charakterisiert, welches ein zentrales Protein des MAPK Signalweges ist.

Nach drei Tagen zeigte sich in beiden Zelllinien bei einer Konzentration von 1 nM eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK 1/2 und GSK3 β (Abb. 14b). Bei der Zelllinie RT112 konnte diese Zunahme bereits nach einer Inkubationszeit von einer Stunde nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie T24, die Träger einer RAS Mutation ist, zeigte sich nach einer Stunde eine konstante Phosphorylierung von ERK, welche auch mit zunehmender RAD001 Konzentration keine Änderungen aufwies. Eine Auswirkung auf die Expression der Gesamtproteine konnte nicht beobachtet werden. In weiteren Versuchen zeigten sich diese Effekte bereits nach eintägiger Inkubation mit RAD001 (Nawroth R, 2011).

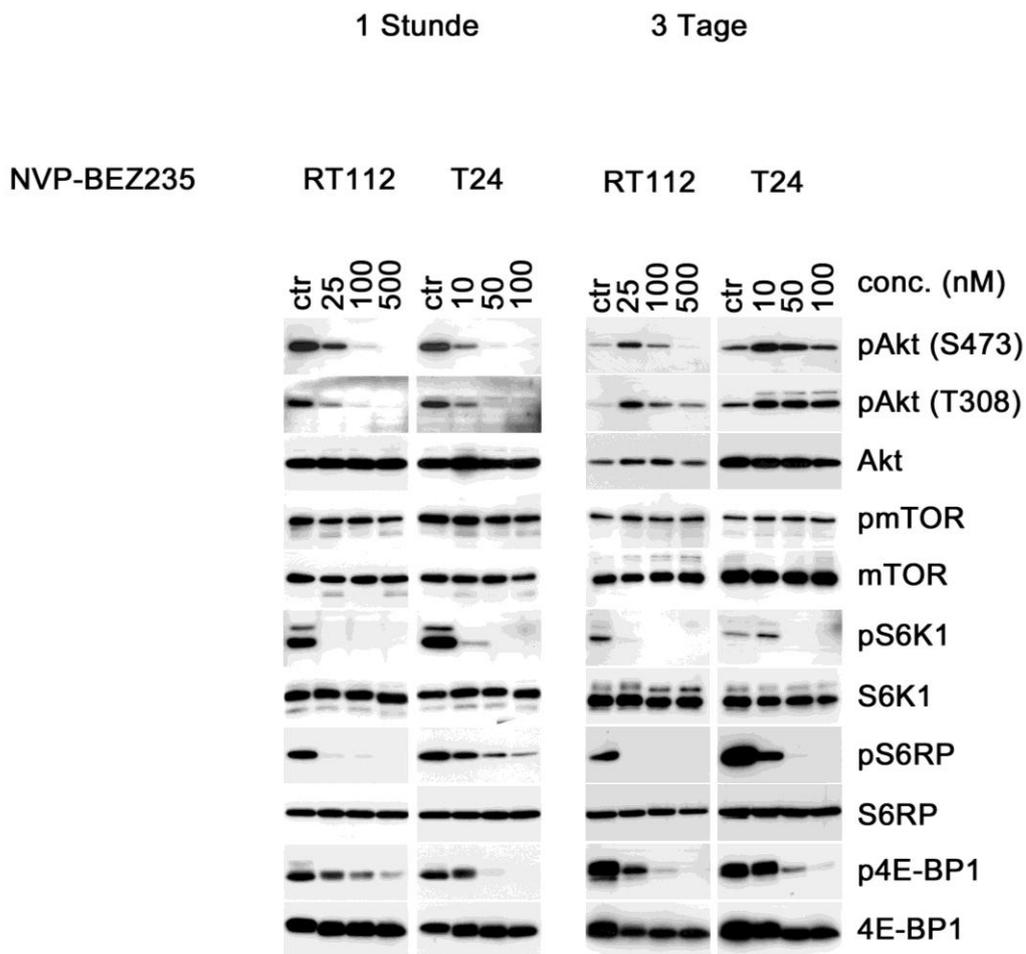


Abbildung 15a: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach einstündiger und dreitägiger Inkubation mit NVP-BEZ.

Im nächsten Versuch wurden die Zellen eine Stunde bzw. drei Tage mit NVP-BEZ235 inkubiert. Bei der Zelllinie RT112 wurden Konzentrationen von 25, 100 und 500 nM verwendet, bei der Zelllinie T24 25, 50 und 100 nM. Dabei zeigte sich nach einstündiger und dreitägiger Inkubation eine Hemmung der Phosphorylierung von S6K1, S6RP und 4E-BP1 in ähnlichen Konzentrationsbereichen (Abb. 15a). Des Weiteren zeigte sich eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 bei einer Konzentration von 25 nM in RT112 und von 10 nM in T24. Generell konnte durch Erhöhung der Konzentration die Phosphorylierung an S473 besser gehemmt werden, obwohl bei der Zelllinie T24 selbst die doppelte IC100 nicht ausreichte die Phosphorylierung vollständig zu unterdrücken. Die Aktivierung an T308 konnte bei beiden Zelllinien durch Erhöhung der Konzentration schlecht gehemmt werden. Bei der Zelllinie T24 konnte nach Inkubation mit der doppelten IC100 keinerlei Effekt auf die Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Während es nach einstündiger Inkubation mit NVP-BEZ235 zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Phosphorylierung von GSK3 β bei beiden Zelllinien kam, konnte nach dreitägiger Inkubation eine Zunahme der Phosphorylierung von GSK3 β beobachtet werden (Abb. 15b). Bei der Zelllinie RT112 wurde dies bei Konzentrationen von 25 nM deutlich, bei T24 bei einer Konzentration von 10 nM. Die Phosphorylierung von Erk zeigte keine Unterschiede nach einer Stunde und drei

Tagen. So konnte nach einer Stunde und auch nach drei Tagen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Phosphorylierung beobachtet werden. Die Phosphorylierung von mTOR sowie die Expression der Gesamtproteine zeigten keine Veränderungen nach drei Tagen Inkubationszeit. In weiteren Versuchen wurden diese beschriebene Effekte auch nach eintägiger Inkubation mit NVP-BEZ235 nachgewiesen (Nawroth R, 2011).

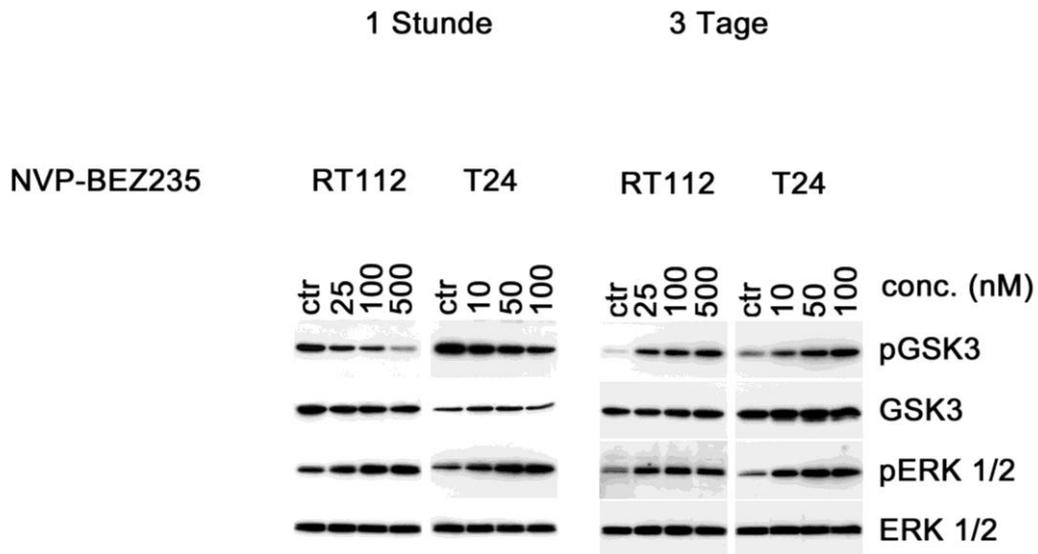


Abbildung 15b: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine GSK3 β und ERK1/2 nach dreitägiger und einstündiger Inkubation mit NVP-BEZ235.

4.3.1 Expression und Phosphorylierung nach 72 Inkubationszeit mit NVP-BEZ235 und erneuter Substanzzugabe

Um nachzuweisen, dass die Veränderungen nach dreitägiger Inkubation mit NVP-BEZ235 nicht auf einen Aktivitätsverlust der Substanz zurückzuführen sind, wurden die Zellen nach dreitägiger Inkubationszeit noch einmal eine Stunde mit frischer Substanzlösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, GSK3 β und ERK 1/2 relativ zu dem Gesamtproteingehalt detektiert.

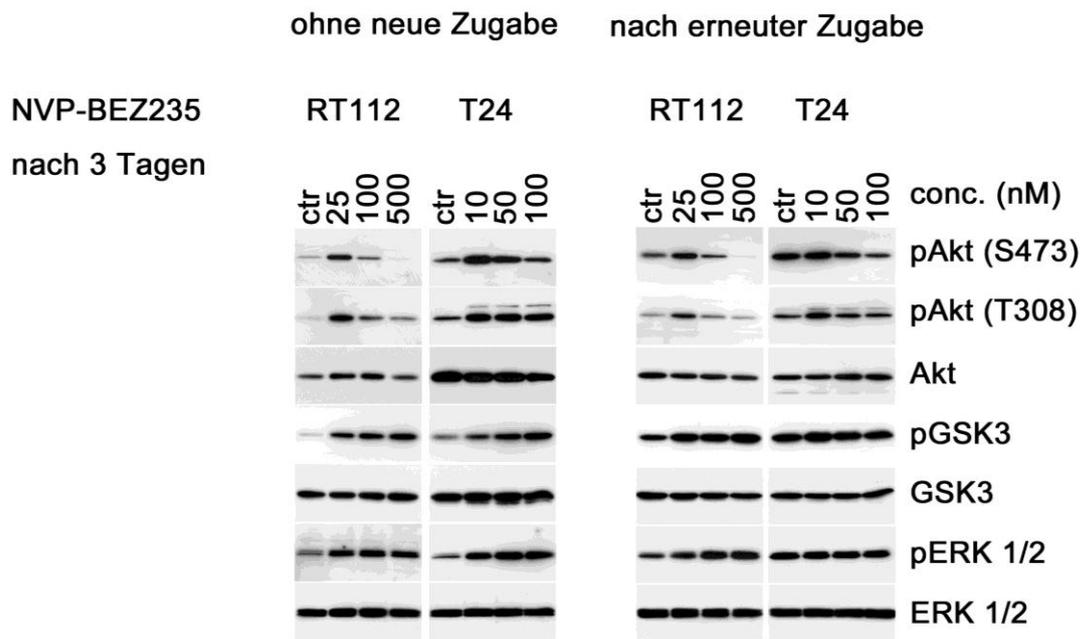


Abbildung 16: Expressions- und Phosphorylierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges nach dreitägiger Inkubation ohne und nach erneuter Zugabe von NVP-BEZ235.

Nach erneuter Zugabe von Substanzlösung konnte bei beiden Zelllinien wie im Versuch zuvor eine Aktivierung von AKT an T308 und S473 beobachtet werden (Abb. 16). Auch die konzentrationsabhängige Zunahme der Phosphorylierung von GSK3 β und ERK konnte wiederholt nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 in beiden Zelllinien durch erneute Zugabe von Substanzlösung konzentrationsabhängig besser inhibiert werden. Die Phosphorylierung von GSK3 β nahm dagegen weiterhin zu, allerdings in abgeschwächter Form. Die Expression der Gesamtproteine blieb von der erneuten Zugabe ebenfalls unbeeinflusst.

4.4 Auswirkung von RAD001, NVP-BEZ235 und mTOR shRNA auf Zellzahl, Proliferation, Apoptose und Metabolismus

Nachdem die Mechanismen der PI3K/mTOR Inhibition auf molekularer Ebene untersucht wurden, wurde anschließend die Auswirkung der Behandlung mit RAD001, NVP-BEZ235 und des Ausschaltens von mTOR mittels shRNA auf Wachstum, Proliferation, Apoptose und Metabolismus untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob die von uns beobachteten Veränderungen und Unterschiede nach Behandlung mit RAD001, NVP-BEZ235 und mTOR shRNA, wie eine Aktivierung von AKT oder eine Aktivierung des MAPK Signalweges, eine Auswirkung auf die Zellfunktionen haben.

4.4.1 Einfluss von RAD001, NVP-BEZ235 und mTOR shRNA auf die Zellzahl

Um die Auswirkung von RAD001 und NVP-BEZ235 auf das Wachstum zu untersuchen wurden die Zelllinien RT112 und T24 jeweils 1, 2 und 3 Tage mit 5 nM RAD001 oder 100 nM NVP-BEZ235 inkubiert. Anschließend wurde in einer Neubauer Zählkammer nach Anfärbung mit Trypanblau die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

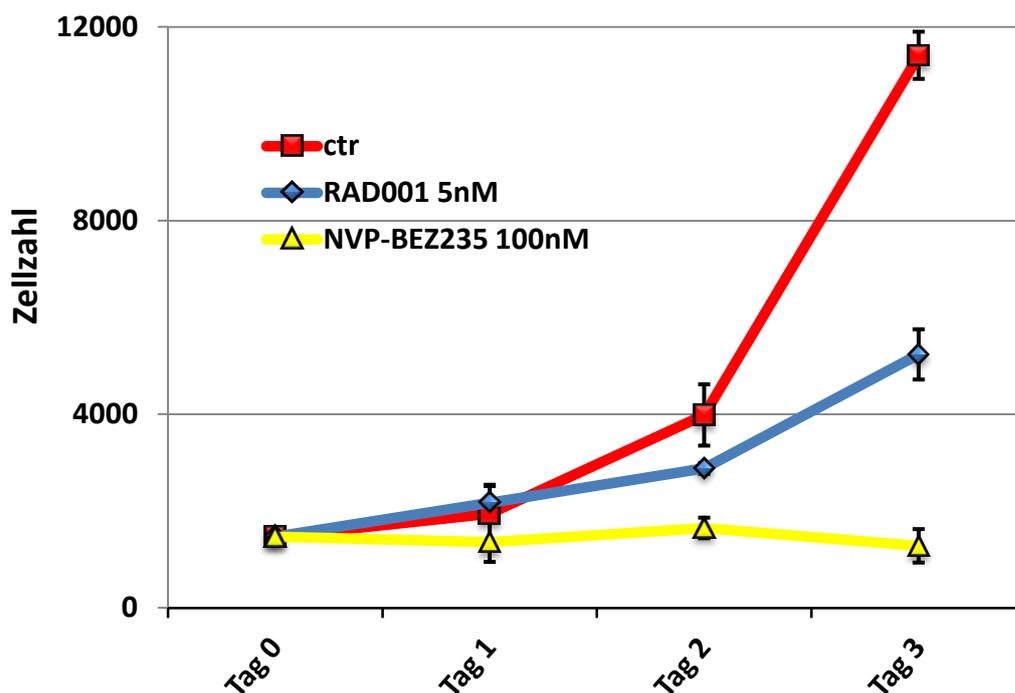


Abbildung 17a: Untersuchung der Zellzahl von RT112 nach 1-, 2- und 3-tägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ235.

In beiden Zelllinien konnte gegenüber der Kontrolle ein deutlicher Einfluss auf das Wachstum beobachtet werden. Nach dreitägiger Inkubationszeit zeigte sich nach Behandlung mit RAD001 bei der Zelllinie RT112 eine um 62% (Abb. 17a), bei T24 eine um 40% verringerte Zellzahl gegenüber des Kontrollwertes (Abb. 17b).

Auch nach Behandlung mit NVP-BE2235 konnte eine Abnahme der Zellzahl beobachtet werden. Während die Zellzahl bei der Zelllinie T24 um 66% geringer war gegenüber des Kontrollwertes (Abb. 17b), zeigten sich bei der Zelllinie RT112 nach drei Tagen Inkubation keine Veränderungen der Zellzahl (Abb. 17a). Bei der Zelllinie RT112 war der Effekt der Substanzen ausgeprägter und konnte auch bereits nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen nachgewiesen werden, während bei der Zelllinie T24 eine Auswirkung auf die Zellzahl erst am dritten Tag deutlich wurde.

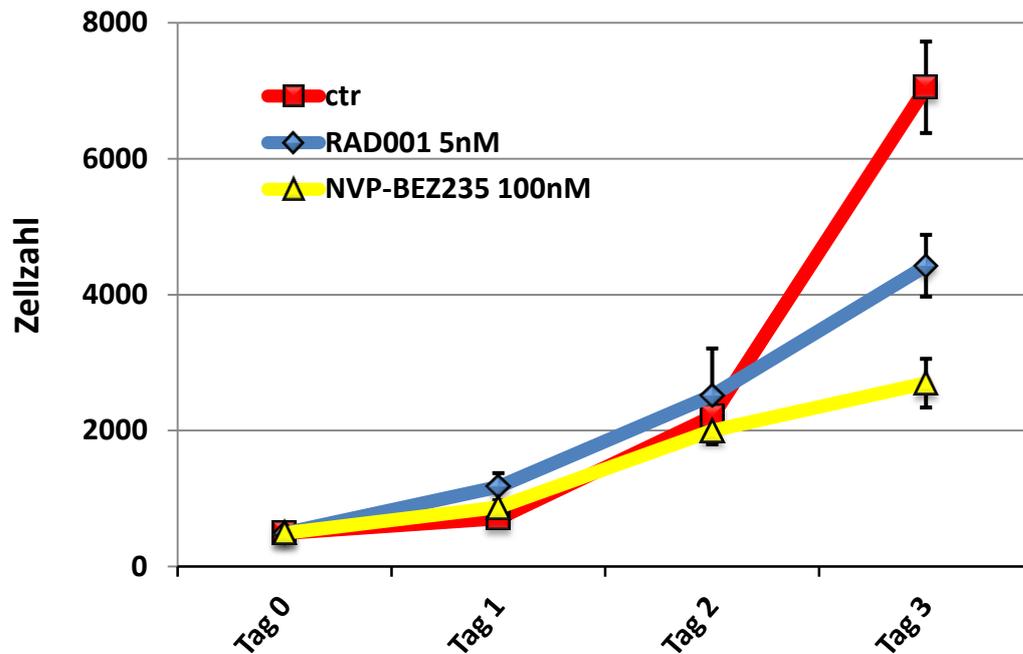


Abbildung 17b: Untersuchung der Zellzahl von T24 nach 1-,2- und 3- tägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BE2235.

Um die Bedeutung des Ausschalten von mTORC1 und mTORC2 für das Zellwachstum zu untersuchen wurde jeweils am 1.,2. und 3. Tag nach Transduktion mit einer shRNA in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

Nach Suppression der mTOR- Expression mittels shRNA konnte bereits nach 24 Stunden bei beiden Zelllinien eine Zunahme der Zellzahl beobachtet werden (Abb. 17c). Bei der Zelllinie T24 stieg die Zellzahl nach 3 Tagen um 40%, während bei der Zelllinie RT112 sogar ein um 70% verstärktes Wachstum gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

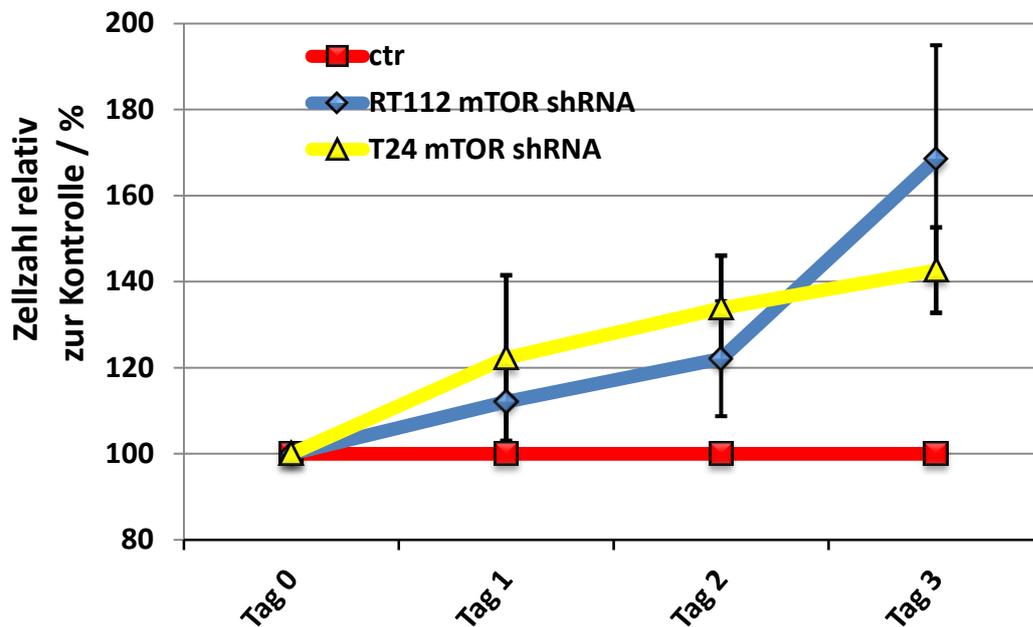


Abbildung 17c: Bestimmung der Zellzahl nach einer Inkubationszeit von 1, 2 und 3 Tagen nach Transduktion mit mTOR-shRNA.

4.4.2 Einfluss von RAD001 und NVP-BEZ235 auf die Proliferation

Der PI3K/mTOR Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation (Cantley, 2002). Dabei werden verschiedene Komponenten des Signalwegs als Schlüsselproteine für die Steuerung der Proliferation und Zellzyklusprogression beschrieben (Wullschleger S, 2006; Shima H, 1998). In Zusammenschau der Ergebnisse auf molekularer Ebene wurde die Wirkung von RAD001, NVP-BEZ235 und mTOR shRNA auf die Proliferation der Zelllinien RT112 und T24 untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit mit 1nM RAD001, 100nM NVP-BEZ235 bzw. 48 Stunden nach Transduktion mit mTOR shRNA mit Bromdesoxyuridin (BrdU) und 7-Aminoactinomycin (7- AAD) markiert. Mittels FACS- Messung konnte so der Anteil der apoptotischen Zellen und die Phase des Zellzyklus bestimmt werden.

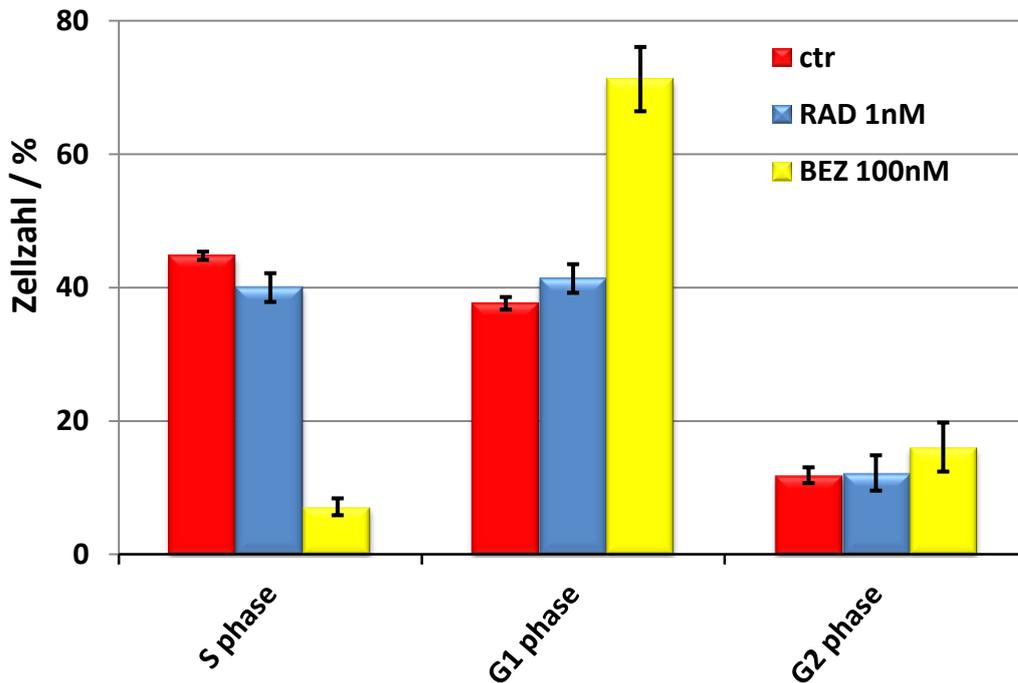


Abbildung 18a: Untersuchung der Proliferation bei der Zelllinie RT 112 nach eintägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BE2235.

Nach der Behandlung mit RAD001 wurde bei beiden Zelllinien keine signifikante Inhibition der Proliferation beobachtet. Dagegen zeigte sich nach Inkubation mit NVP-BE2235 vor allem bei der Zelllinie RT112 ein deutlicher Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Gegenüber der Kontrolle konnte eine um 84% geringere Anzahl der Zellen in der S Phase beobachtet werden (Abb. 18 a). Bei der Zelllinie T24 fiel dieser Effekt wesentlich geringer aus mit 20% (Abb. 18b). Bei beiden Zelllinien konnte nach der Inkubation mit RAD001 und nach der Inkubation mit NVP-BE2235 eine Zunahme der Zellzahl in der G1-Phase nachgewiesen werden, allerdings war diese Wirkung nach der Behandlung mit NVP-BE2235 in beiden Zelllinien stärker ausgeprägt. Eine Auswirkung auf die Zellzahl in der G2 Phase konnte nur bei der Zelllinie RT112 nach Inkubation mit NVP-BE2235 beobachtet werden. Dagegen wurde nach Transduktion mit mTOR shRNA eine Zunahme der Proliferation in beiden Zelllinien deutlich (Abb. 18 c). Bei der Zelllinie T24 zeigte sich eine Zunahme der Zellen in S-Phase um 50%. Bei der Zelllinie RT112 konnte sogar eine Zunahme von fast 250% beobachtet werden. Gleichzeitig wurde bei beiden Zelllinien eine verminderte Anzahl an Zellen in der G1 Phase nachgewiesen sowie in T24 ein Zunahme der Zellen in G2 Phase.

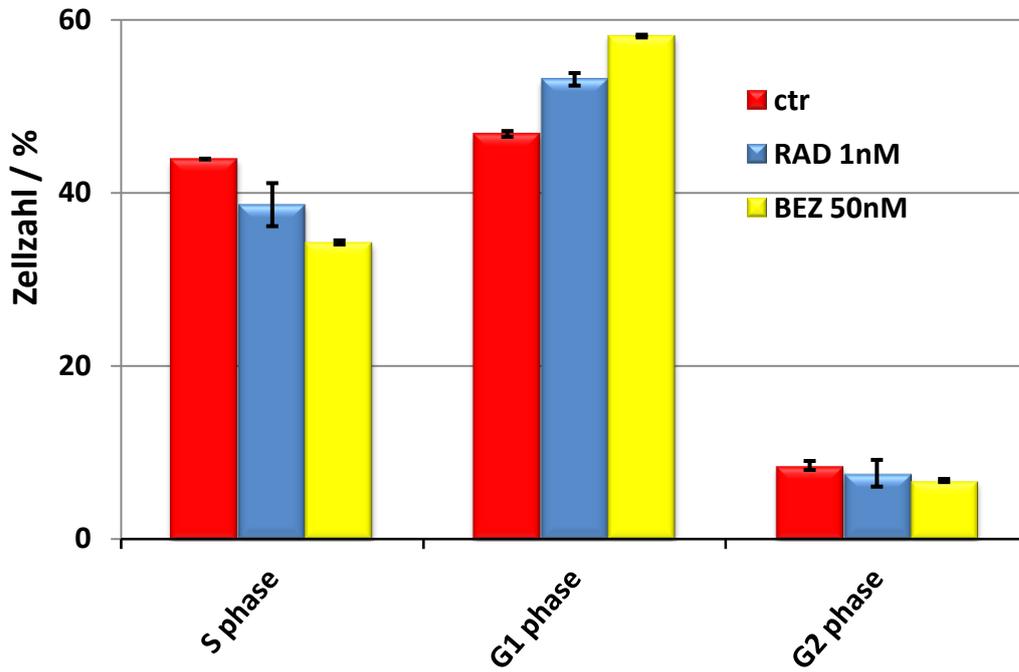


Abbildung 18b: Untersuchung der Proliferation bei der Zelllinie T24 nach eintägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ235.

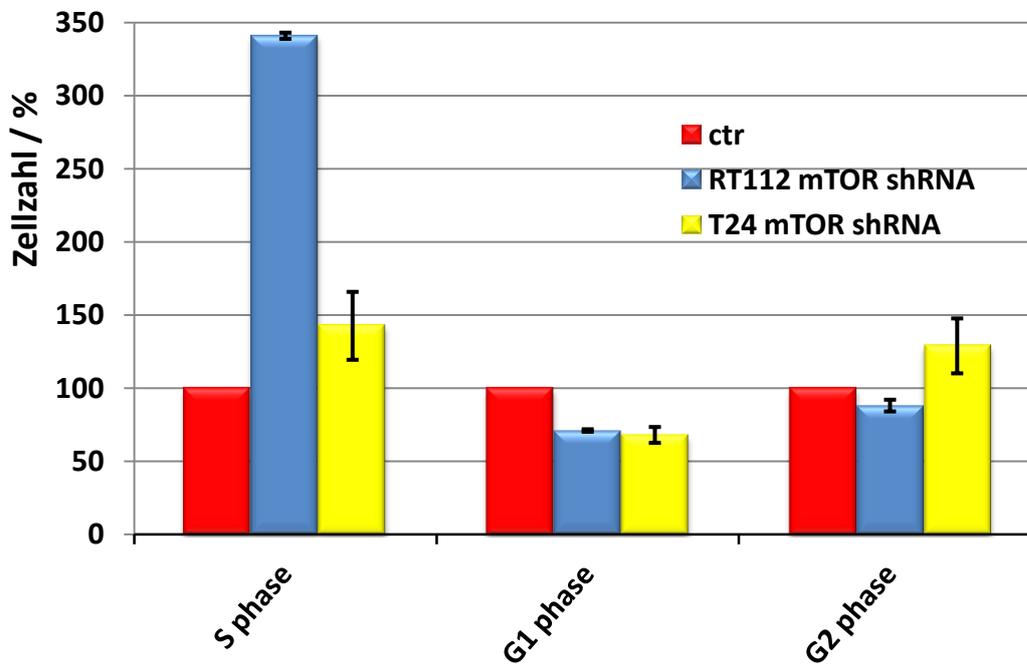


Abbildung 18c: Untersuchung der Proliferation bei den Zelllinien RT112 und T24 nach Transduktion mit mTOR shRNA.

4.4.3 Einfluss von RAD001, NVP-BEZ2335 und mTOR shRNA auf die Apoptose

Eine weitere Funktion des PI3K/mTOR Signalweges ist die Regulation der Apoptose. Das Schlüsselprotein AKT nimmt dabei eine zentrale Stellung ein. Über eine verminderte Freisetzung von Cytochrom C, der Inaktivierung des proapoptotischen Faktors BAD (Song G, 2005), des Transkriptionsfaktors FOXO (Burgering BM, 2003) und der Serin-Threonin Kinase GSK3 β (Pap M, 1998) hemmt phosphoryliertes AKT die Apoptose. Nachdem auf molekularer Ebene nach ein- und dreitägiger Inkubation mit RAD001 und BEZ235 eine Phosphorylierung von AKT und gleichzeitig auch eine Zunahme der GSK3 β Phosphorylierung beobachtet werden konnte, wurden die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Apoptose der Zellen untersucht. Hierfür wurde mittels Caspase Glo 3/7 Assay (Promega) die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 ermittelt. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose. Durch Initiator Caspasen werden die nachgeschalteten Effektor-Caspasen (unter anderem Caspase 3, 7, 6) aktiviert, die anschließend zelleigene Proteine wie Aktin und Laminin sowie durch Aktivierung einer Nuklease nukleäre DNA spalten können (Degterev A, 2003).

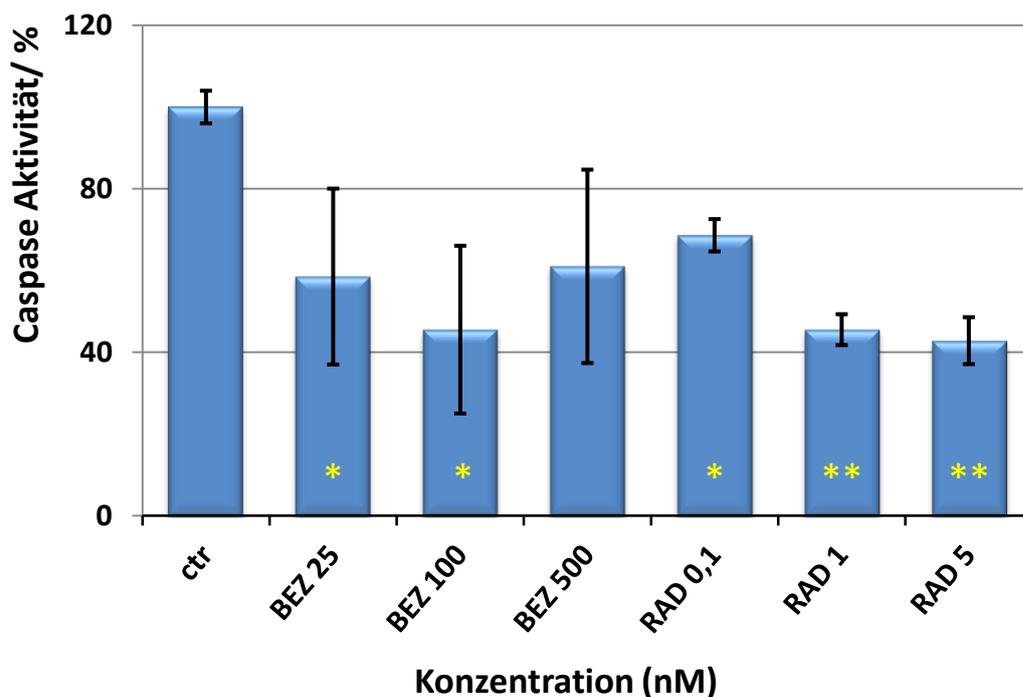


Abbildung 19a: Untersuchung der Caspaseaktivität bei der Zelllinie RT112 nach eintägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ2335. (*p<0,05/**p<0,001)

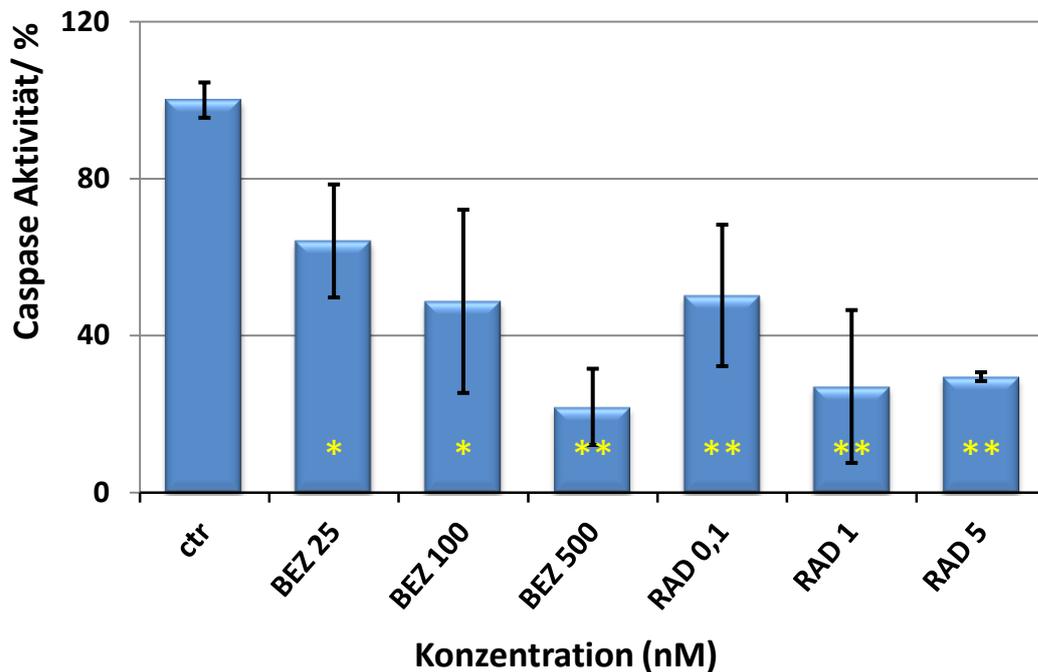


Abbildung 19b: Untersuchung der Caspaseaktivität bei der Zelllinie T24 nach eintägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ235. (*p<0,05/p<0,001)**

Die Zelllinien RT112 und T24 wurden drei Tage lang mit 25, 100, 250 nM NVP-BEZ235 bzw. 0.1, 1, 5 nM RAD001 inkubiert. Anschließend wurde mittels Caspase Glo Assay 3/7 (Promega) die Aktivität der Caspasen 3 und 7 ermittelt (siehe Herstellerprotokoll). Um die Auswirkungen des Ausschaltens von mTOR zu untersuchen wurde drei Tage nach Transduktion mit mTOR shRNA der Caspase Glo Assay 3/7 verwendet.

In beiden Zelllinien zeigte sich eine signifikante Abnahme der Caspaseaktivität, wobei der Effekt bei der Zelllinie T24 sowohl nach Inkubation mit RAD001 als auch nach der Inkubation mit NVP-BEZ235 deutlicher ausfiel (Abb. 19b). Nach Behandlung mit NVP-BEZ235 wurde ein Absinken der Caspaseaktivität bei der Zelllinie RT112 um 55% gegenüber des Kontrollwertes beobachtet (Abb. 19a). Bei der Zelllinie T24 konnte sogar ein Absinken um 80% auf 20% nachgewiesen werden (Abb. 19b). Bei der Zelllinie RT112 sank die Caspaseaktivität unter RAD001 um 57%, während es bei der Zelllinie T24 zu einer Abnahme von 73% kam. Nach Transduktion mit mTOR shRNA wurde ebenfalls eine Abnahme der Apoptoseaktivität in beiden Zelllinien beobachtet (Abb. 19c). In T24 zeigte sich eine Abnahme um 30%, während bei der Zelllinie RT112 eine um 40% geringere Caspaseaktivität gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden konnte.

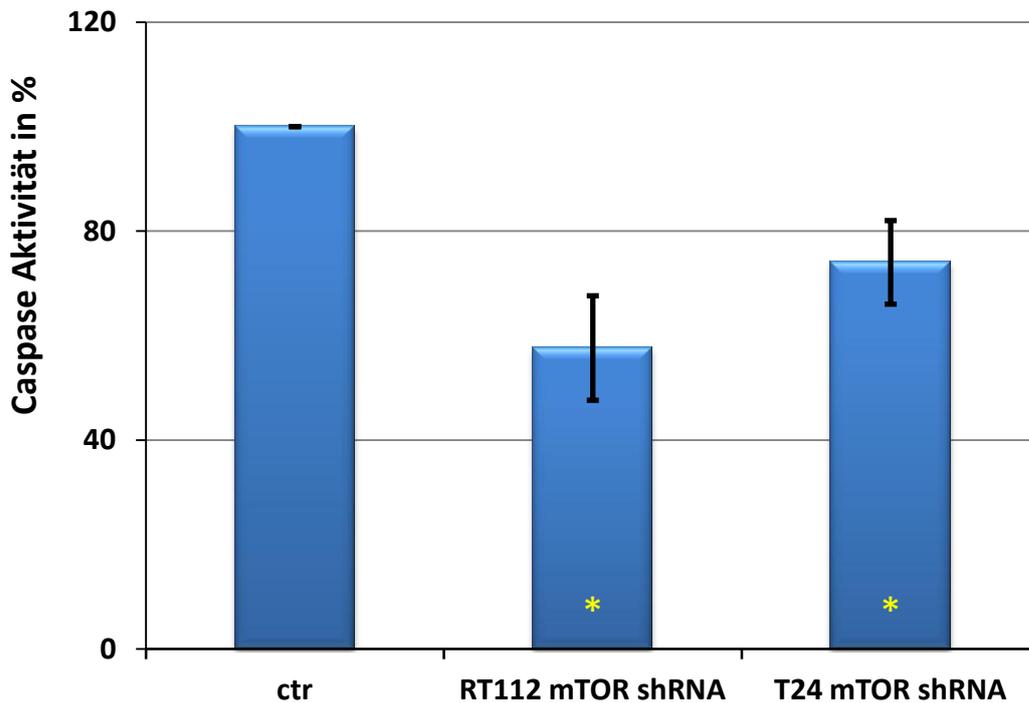


Abbildung 19c: Auswirkung der Transduktion mit mTOR shRNA auf die Caspaseaktivität der Zelllinien RT112 und T24. (*p<0,05/**p<0,001)

4.4.4 Einfluss von RAD001, NVP-BEZ235 und mTOR shRNA auf den Zellmetabolismus.

Im letzten Versuch wurde die Auswirkung von NVP-BEZ235, RAD001 und mTOR shRNA auf den Metabolismus der Zellen mittels XTT- Test untersucht. Dabei werden zur Spaltung von XTT zum Orangefarbenen Farbstoff Formazan Dehydrogenaseenzyme lebender Zellen benötigt. Diese Enzyme befinden sich in den Mitochondrien und werden kurz nach dem Zelltod deaktiviert, was daher unmittelbar zum Absinken der Reduktionsrate des Testsubtrats und damit zu einem geringeren Signal führt.

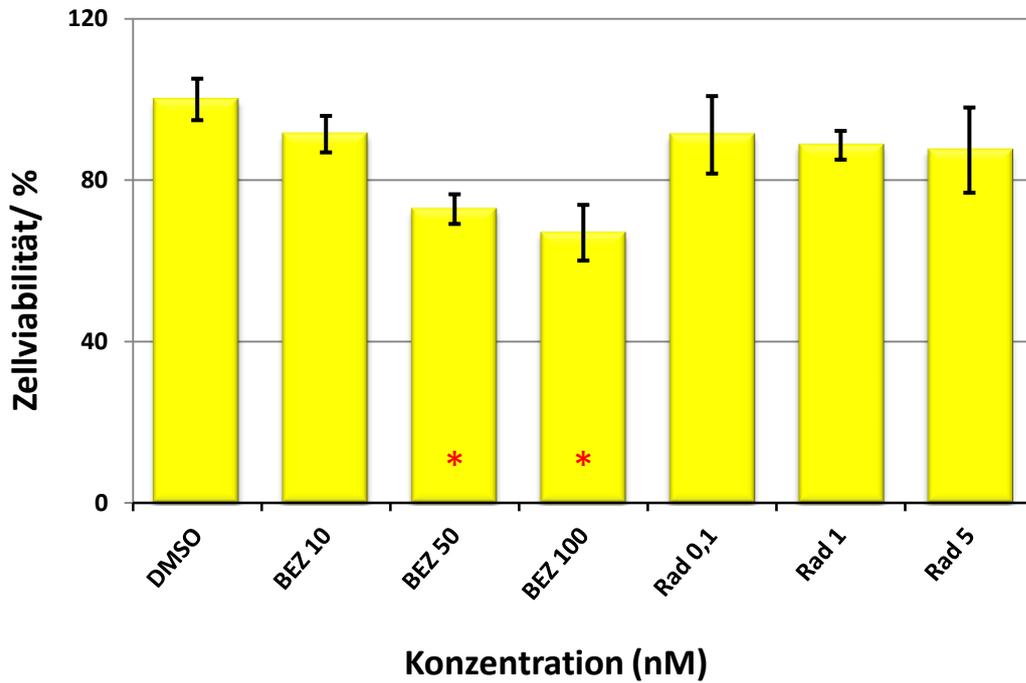


Abbildung 20a: XTT-Messung bei der Zelllinie RT112 nach eintägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BE235. (* $p < 0,05$ /** $p < 0,001$)

Die Zelllinien RT112 und T24 wurden 24 Stunden mit 10, 50, 100nM NVP-BE235 und 0,1, 1, 5 nM RAD001 inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzien des XTT Tests zugegeben (siehe Herstellerprotokoll/ Sigma). Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 und 620 nm. Um die Auswirkung der Transduktion mit mTOR shRNA zu untersuchen wurde der XTT Test 24 Stunden nach Transduktion durchgeführt.

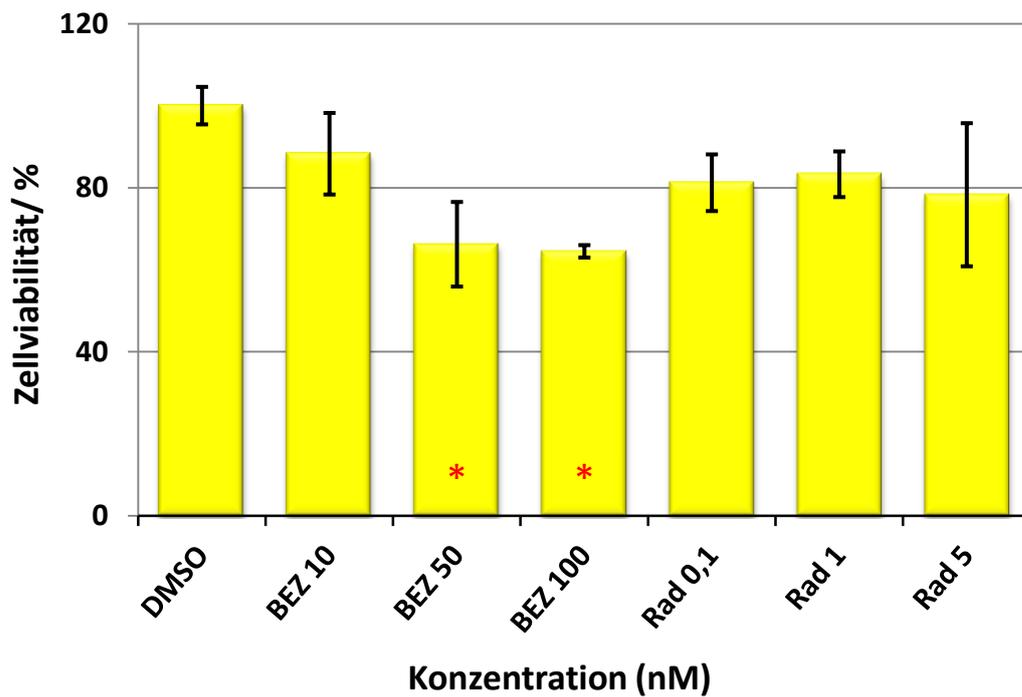


Abbildung 20b: XTT-Messung bei der Zelllinie T24 nach 1- tägiger Inkubation mit RAD001 und NVP-BE2235. (*p<0,05)

Nach Inkubation mit NVP-BE2235 war bei beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme des Metabolismus zu beobachten. Bei der Zelllinie T24 fiel die Aktivität um 36% gegenüber der Kontrolle (Abb. 20b), bei der Zelllinie RT112 um 34% (Abb. 20a). Dagegen konnten bei beiden Zelllinien keine signifikanten Veränderungen nach Inkubation mit RAD001 nachgewiesen werden. Nach Transduktion mit mTOR shRNA zeigte sich in beiden Zelllinien eine signifikante Reduktion des Metabolismus der Zellen (Abb. 20c). Dabei sank bei der Zelllinie RT112 der Wert um 20% gegenüber der Kontrolle, während es bei der Zelllinie T24 zu einer Abnahme um 40% kam.

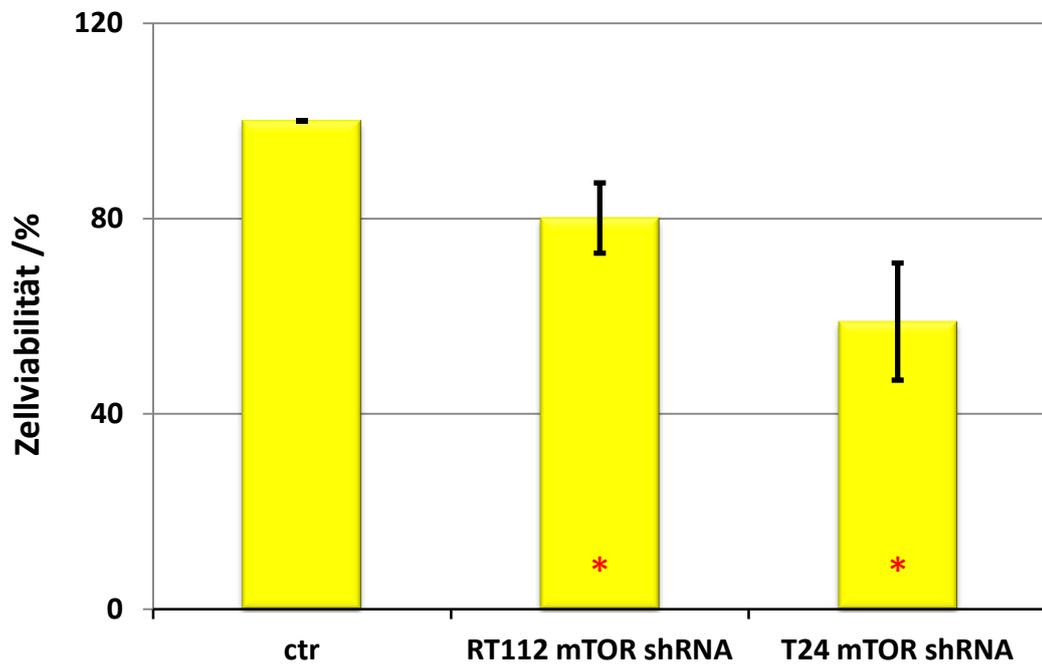


Abbildung 20c: XTT- Messung nach Transduktion mit mTOR shRNA (*p<0,05/**p<0,001)

5 Diskussion

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste Tumor der ableitenden Harnwege und damit bei Männern an dritter und bei Frauen an fünfter Stelle der häufigsten malignen Tumorerkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2010). Während die 5- Jahres Überlebensrate bei Patienten mit nicht- invasiven Blasenkarzinomen 94% beträgt, fällt sie bei Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen auf 20% und weniger. Nachdem Ende der 80er Jahre die Kombination aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin als Standardchemotherapieschema etabliert wurde, konnte in der Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms keine weitere Verbesserung bezüglich der Prognose der Patienten erreicht werden (Vom Dorp F, 2008). Auch die 2005 neu eingeführte Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin zeigte bei zwar besserer Verträglichkeit keinen weiteren Überlebensvorteil der Patienten (von der Maase H, 2005). Hoffnungen werden in neue Substanzen, sogenannte Target-Therapeutika gesetzt, welche spezifisch die Aktivität verschiedener Kinasen in Signaltransduktionswegen von Zellen, oder auch Signalmoleküle, wie beispielsweise dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) hemmen. Voraussetzung für die Anwendung solcher Substanzen ist jedoch das genauere Verständnis der biologischen Eigenschaften des jeweiligen Tumors.

In dieser Arbeit wurde der PI3K/mTOR Signalweg untersucht, der eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum, Proliferation und Zellüberleben einnimmt (Cantley, 2002). Einige Substanzen gegen Schlüsselmoleküle dieses Signalweges wurden bereits für die klinische Anwendung zugelassen, wodurch diesem Signalweg hinsichtlich der therapeutischen Möglichkeiten eine besondere Bedeutung zukommt.

In Harnblasenkarzinomen wurden in bis zu 65% der Fälle Mutationen des PI3K/mTOR Signalweges nachgewiesen (Kompier LC L. I., 2010). Somit scheint der PI3K/mTOR Signalweg eine besondere Rolle in der Biologie dieser Tumorentität einzunehmen und könnte möglicherweise ein geeignetes Target in der Therapie von Patienten mit Harnblasenkarzinomen darstellen.

Daher wurde hier die Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges an Harnblasenkarzinomzelllinien analysiert. Des Weiteren wurden molekulare Mechanismen untersucht, welche die Kombination von verschiedenen Target- Therapeutika als sinnvoll erscheinen lassen.

5.1 Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges in Blasenkarzinomzelllinien.

In der Literatur wird eine Aktivierung des PI3K/mTOR Signalweges über Wachstumsfaktoren wie IGF, VEGF, PDGF, EGF beschrieben, die an der Zelloberfläche durch Phosphorylierung von Tyrosinresten an verschiedenen Tyrosinkinasezeptoren eine Weiterleitung des Signals nach intrazellulär bewirken (Ma XM, 2009). Die Aktivierung von PI3K bewirkt eine Umwandlung des Membranbestandteils Phosphatidylinositol (4,5)- Bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphat (PIP3). Dies führt zu einer Rekrutierung von PDK1 (protein dependent kinase 1) an die Zellmembran und nachfolgend zu einer Aktivierung von AKT (Proteinkinase B) (Carpenter CL, 1998). Antagonistisch zu PI3K wirkt PTEN, indem PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert wird (Cantley, 2002). Nach Phosphorylierung an beiden Bindungsstellen (durch PDK1 an Threonin 308 und durch mTORC2 an Serin 473) liegt AKT in der vollständig aktivierten Form vor (Alessi DR J. S., 1997; Cantley, 2002; Bai X, 2010). Eines der am besten charakterisierten Zielmoleküle von AKT ist mTOR. Dieses fungiert als zentraler Regulator von Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese und Apoptose (Wullschleger S, 2006). AKT ist in der Lage mTOR direkt zu phosphorylieren (an Ser2448), allerdings ist die Bedeutung der direkten Aktivierung noch nicht ausreichend geklärt (Inoki K L. Y., 2002). Häufiger führt die AKT abhängige Inhibierung eines Komplexes aus den Tumorsuppressorproteinen TSC1 und TSC2 (tuberous sclerosis complex), die auch als Hamartin und Tuberin bekannt sind, zur Aktivierung von mTOR (Inoki K L. Y., 2002). In der Zelle liegt mTOR als Proteinkomplex in Assoziation mit raptor (regulatory-associated protein of mTOR) als mTORC1 oder rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR) als mTORC2 vor (Bai X, 2010). Während mTORC2 den Einfluss von AKT auf Wachstum, Apoptose reguliert und eine noch nicht ausreichend untersuchte Rolle in der Organisation des Zytoskeletts spielt, kontrolliert mTORC1 das zelluläre Wachstum durch Regulierung der Proteinsynthese (Sarbasov DD A. S., 2004). Dies wird in der Literatur vor allem durch Kontrolle der Phosphorylierung von 4E- BP1 und S6K1 beschrieben (Bai X, 2010).

In dieser Arbeit wurde der Expressions- und Phosphorylierungsstatus der einzelnen Proteine des PI3K/mTOR Signalweges in Blasenkarzinomzelllinien untersucht. Dabei wurde in 7 von 9 Blasenkarzinomzelllinien eine konstitutive Aktivierung sämtlicher Schlüsselproteine des PI3K/mTOR Signalwegs beobachtet (Abb. 7). Diese Ergebnisse bestätigen zwei andere Studien, die den Aktivierungsstatus einiger Proteine des PI3K/mTOR Signalweges bei Patienten nach radikaler Zystektomie untersucht haben. Dabei konnten Tickoo *et al.* bei 58% der Patienten mit invasiven Blasenkarzinomen erhöhte Level von phosphoryliertem 4E-BP1 und bei 34% erhöhte Level von pS6K1 beobachten (Tickoo SK, 2010). Hansel *et al.* konnten bei Patienten mit invasiven Blasenkarzinomen bei 55% der Präparate erhöhte Level von pS6K1 und bei 74% erhöhte Level von pmTOR nachweisen (Hansel DE, 2010). *In vitro* wurde die Aktivität des PI3K/mTOR Signalweges bisher nur in einer Studie untersucht. Diese beschränkte sich jedoch ausschließlich auf den Phosphorylierungsstatus von Akt. Dabei konnten in 55% der Zelllinien erhöhte Level an phosphoryliertem AKT nachgewiesen werden (Wu X, 2004).

Somit konnte in dieser Arbeit, zusammenfassend mit den oben beschriebenen Ergebnissen, *in vitro* ein ähnlich hoher Aktivierungsstatus der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges beobachtet werden, wie bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen. Diese Ergebnisse stellten die Grundlage für weitere Versuche dar, die Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges im Harnblasenkarzinom näher zu charakterisieren.

5.2 Molekulare Regulationsmechanismen des PI3K/mTOR Signalweges im Blasenkarzinom

Um die biologische Funktion des PI3K/mTOR Signalweges im Blasenkarzinom besser zu verstehen, wurden verschiedene Schlüsselmoleküle mittels Small Molecule Inhibitoren oder RNA- Interferenz entweder in ihrer Aktivität oder ihrem Expressionsstatus inhibiert.

Dabei konnte nach Anwendung des Rapamycinderivates RAD001 eine Abnahme der Phosphorylierung von S6K1 und S6RP nachgewiesen werden (Abb. 8). Allerdings zeigte sich, anders als in den meisten Veröffentlichungen bisher beschrieben (Ma XM, 2009), keine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1. Nach Anwendung der beiden PI3K Inhibitoren NVP- BEZ235 und NVP- BGT226 wurde dagegen eine Abnahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 als auch von AKT, S6K1 und S6RP deutlich (Abb. 10/11). Dabei konnte vor allem nach Inkubation mit NVP-BEZ235 ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Konzentrationskinetik von AKT und 4E-BP1 nachgewiesen werden (Abb. 10). Nach dreitägiger Inkubation mit NVP-BEZ235 wurde eine neue partielle Phosphorylierung von AKT an T308 und S473 beobachtet, welche allerdings keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 hatte. Um die Abhängigkeit der 4E-BP1 Aktivität von mTOR abschließend zu untersuchen wurde mittels mTOR shRNA die Expression von mTOR (mTORC1/2) inhibiert. Dabei konnte, bei einer Abnahme der Phosphorylierung von mTOR, AKT, S6RP und S6K1, keine Abnahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 nachgewiesen werden (Abb. 13). Diese mTOR unabhängige 4E-BP1 Regulation wurde kürzlich auch in anderen Tumorentitäten beschrieben. Iwamaru *et al.* beobachteten nach Inkubation von Gliomzellen mit Rapamycin eine Suppression der Phosphorylierung von S6K1, nicht aber von 4E-BP1 (Iwamaru A, 2007). Willett *et al.* zeigten nach Inkubation von Myoblasten mit RAD001 über einen Zeitraum von 72 Stunden eine Zunahme der Phosphorylierung von 4E-BP1 (Willett M, 2009). Auch Chapuis *et al.* konnten nach der Inkubation von Leukämie- Zelllinien mit Rapamycin keine Suppression der Phosphorylierung von 4E-BP1 nachweisen (Chapuis N, 2010). Dagegen beobachteten Chiong *et al.* nach der Inkubation der Blasenkarzinomzelllinien UM-UC-3/ UM-UC-6/ UM-UC-9/ UM-UC-14 mit RAD001 bei allen Zelllinien eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung von S6K1 als auch von 4E-BP1 (Chiong E, 2011). Diese Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe nach Behandlung der Zelllinien UM-UC-3 und UM-UC-6 mit RAD001 nicht reproduziert werden (persönliche Kommunikation mit A. Sathe und R. Nawroth). So zeigte die Inkubation mit RAD001 keinen Einfluss auf die Expression oder Phosphorylierung von 4E-BP1. Da die Arbeitsgruppe um Chiong *et al.* nicht das Gesamtprotein von 4E-BP1, sondern nur die phosphorylierte Form betrachtet hatte, könnte die Abnahme der Phosphorylierung an 4E-BP1 aus einer Abnahme des Gesamtproteins oder ungleichen Proteinmengen in der Gel- Elektrophorese resultieren.

Zusammenfassend zeigen die Versuche dieser Arbeit, dass in den untersuchten Harnblasenkarzinomzellen die Phosphorylierung von 4E-BP1 nicht von mTOR reguliert wird. Da die nach dreitägiger Inkubation mit NVP-BEZ235 beobachtete neue partielle Phosphorylierung an AKT nicht zu einer Phosphorylierung von 4E-BP1 geführt hat, scheint eine Beteiligung von AKT an der Regulation von 4E-BP1 eher unwahrscheinlich (Abb. 14a). Dies lässt vermuten, dass die Aktivität von 4E-BP1 von PI3K reguliert wird (Abb. 21). In wieweit andere unbekannte Moleküle bei der Regulation von 4E-BP1 eine Rolle spielen muss zukünftig weiter evaluiert werden.

Nach Inkubation mit dem PI3K Inhibitor NVP-BKM120 konnte wie auch zuvor nach Inkubation mit NVP-BEZ235 und NVP-BGT226 eine Abnahme der Phosphorylierung von S6RP und S6K1 beobachtet werden (Abb. 12). Eine Abnahme der Phosphorylierung von AKT wurde dagegen erst bei einer 100-fach höheren Konzentrationen deutlich. Während NVP-BKM120 als spezifischer Inhibitor von PI3Ks der Klasse 1 beschrieben wurde (Maira SM P. S., 2012), scheint NVP-BKM120 in diesen Versuchen mTORC1 deutlich besser zu inhibieren als PI3K. Somit ist NVP-BKM120, wie auch die meisten anderen PI3K Inhibitoren, nicht spezifisch gegen PI3Ks der Klasse 1 wirksam. Im Gegenteil weisen diese Ergebnisse auf eine geringe Wirkung gegen PI3Ks der Klasse 1 bei besserer Wirkung gegen PI3Ks anderer Klassen wie beispielweise mTOR hin. Daher unterstützen diese Ergebnisse das Modell, welches eine mTOR unabhängige Regulation von 4E-BP1 beschreibt (Abb. 21). Eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von 4E-BP1 zeigte sich sogar erst bei Konzentrationen zwischen 500 und 1000nM, was nicht mehr als spezifische Wirkung angesehen werden sollte. Neben einer geringen Spezifität von NVP-BKM120 gegen PI3Ks der Klasse 1, könnte dies auf eine Regulation von 4E-BP1 durch weitere Moleküle außer PI3K hinweisen, die nach Zugabe von NVP-BEZ235 und NVP-BGT226, nicht aber nach Zugabe von NVP-BKM120 inhibiert wurden. Zur genaueren Charakterisierung des Wirkprofils von NVP-BKM120 sind aber basierend auf den Daten dieser Arbeit weitere Untersuchungen erforderlich.

Nach Inkubation mit RAD001 konnte des weiteren eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT sowohl nach einstündiger als auch nach dreitägiger Inkubation beobachtet werden (Abb. 8/14a). Diese S6K1 abhängige Aktivierung von PI3K wurde bereits von Carracedo *et al.* an Mamma- CA Zelllinien beschrieben (Carracedo, 2008). Die Bedeutung für die klinische Anwendung muss allerdings noch evaluiert werden. Derzeit wird eine Regulation des Aktivierungsstatus von AKT über PDK1 und mTORC2 beschrieben (Abb. 4) (Bai X, 2010) .

Nach Transduktion mit einem mTOR shRNA Adenovirus konnte hier ebenfalls ein deutlicher Einfluss von mTOR auf die Aktivierung von AKT nachgewiesen werden (Abb. 13). So zeigte sich nach Herabregulation der mTOR mRNA eine Inhibition der Phosphorylierung von AKT sowohl an S473 als auch an T308. Diese Effekte konnten auch von Sarbassov *et al.* nach Inhibition der mTOR Expression mittels mTOR shRNA beobachtet werden (Sarbassov DD G. D., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die derzeit gültigen Modelle, die eine Phosphorylierung von AKT an S473 durch mTORC2 beschreiben, welche eine vollständige Phosphorylierung von AKT an T308 ermöglicht (Bai X, 2010; Sarbassov DD G. D., 2005; Julien LA, 2010).

In weiteren Versuchen konnte bei der Zelllinie T24 nach einstündiger mTORC1 Inhibition mit RAD001 eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT an S473 nachgewiesen werden (Abb. 8), während erst nach einer Inkubationszeit von drei Tagen eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT an T308 deutlich wurde (Abb. 14a). Dies könnte bedeuten, dass die Inhibition von mTORC1 schon nach einer Stunde zu einer Aktivitätszunahme von mTORC2 geführt hat, in der Annahme, dass pAKT (S473) als direktes Ziel mTORC2 nachgeschaltet ist (Bai X, 2010; Julien LA, 2010).

Eine Abhängigkeit der mTORC2 Aktivität von mTORC1 wurde ebenfalls von Julien *et al.* beschrieben (Julien LA, 2010).

Eine Zunahme der Phosphorylierung von GSK3 β wurde sowohl nach Inkubation mit RAD001 als auch nach Inkubation mit NVP-BEZ235 nach drei Tagen beobachtet (Abb. 14b/15b). Dabei scheint eine

partielle Phosphorylierung von AKT an S473 für eine Phosphorylierung von GSK3 β ausreichend zu sein.

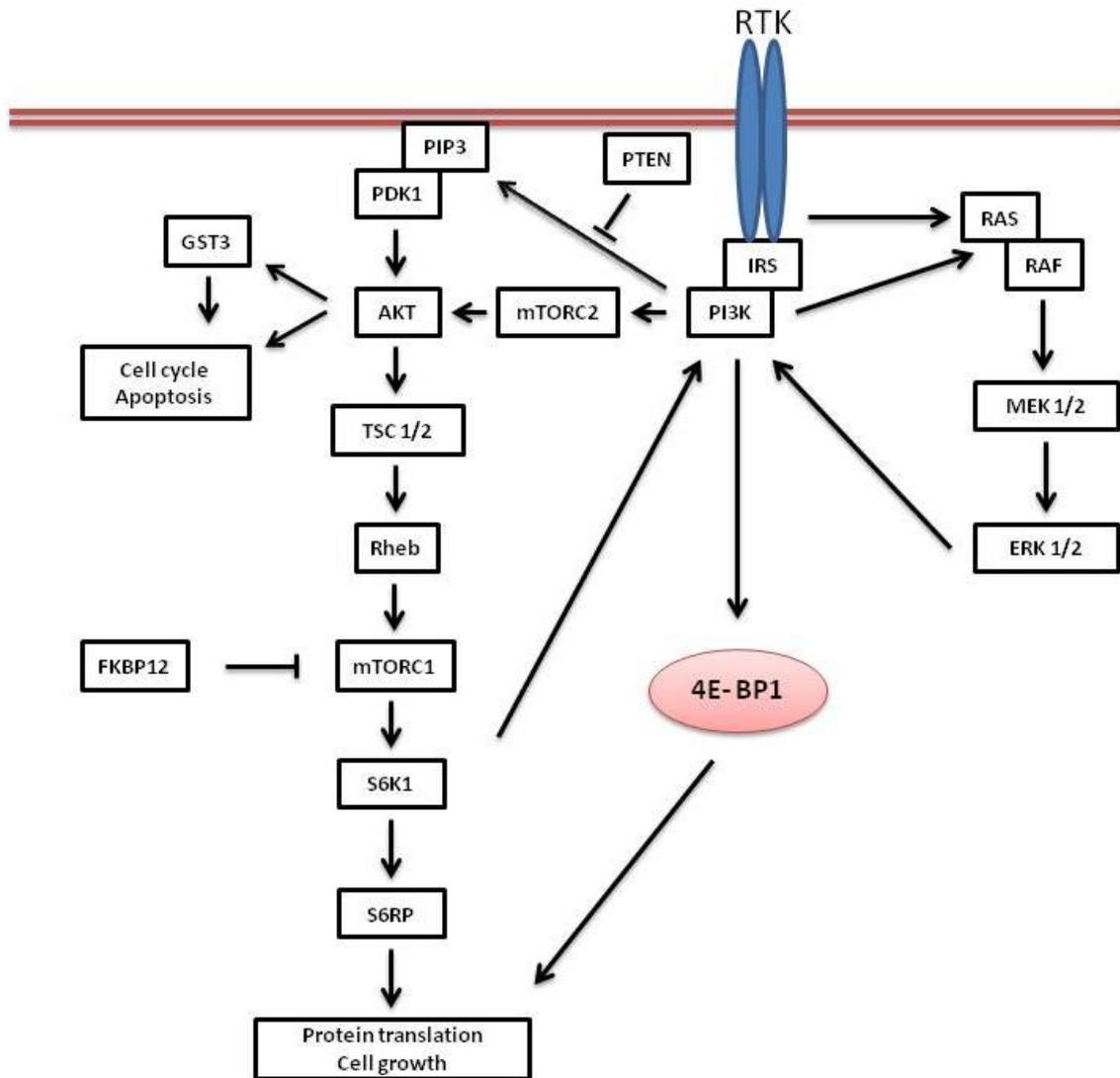


Abbildung 21: Schematische Darstellung des PI3K/mTOR und MAPK Signalweges (modifiziert nach Nawroth R, 2011).

Sowohl nach Inhibition von mTORC1 durch RAD001 als auch nach Inhibition von PI3K/mTOR durch NVP-BE235 konnte eine Aktivitätszunahme des MAPK Signalweges nachgewiesen werden (Abb. 14b/15b). Dabei zeigte sich nach einstündiger und dreitägiger Inkubation mit RAD001 eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 bei der Zelllinie RT112. Die Zelllinie T24, die Träger einer RAS Mutation ist, zeigte nach einstündiger Inkubation eine konstante Phosphorylierung von ERK1/2, während nach drei Tagen eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet wurde (Abb. 15a/b). Nach Behandlung mit NVP-BE235 zeigte sich in beiden Zelllinien sowohl nach eintägiger Inkubation als auch nach drei Tagen eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2.

Wechselwirkungen zwischen dem PI3K/mTOR und MAPK Signalweg wurden wiederholt beschrieben. So können beide Signalwege die Aktivität des anderen regulieren (Ma XM, 2009). Derzeit wird in der Literatur beschrieben, dass ERK1/2 die Phosphorylierung von mTORC1 entweder über Hemmung von TSC2 oder direkt über Interaktion mit der mTORC1 Untereinheit raptor verstärken kann (Castellano E, 2011). Eine Hemmung von mTOR bzw. S6K1 führte dagegen über IRS/PI3K und RAS zu einer

Aktivitätszunahme des MAPK Signalweges. In Tumorzellen und embryonalen Fibroblasten konnte nach Inkubation mit RAD001 eine Aktivierung des MAPK Signalweges beobachtet werden (Carracedo, 2008; Zhang J, 2008), wobei eine Auswirkung auf die Expression von mTORC2, AKT und anderen Proteinen wie TSC1/2 und RHEB nicht nachgewiesen werden konnte. Zellen, die eine erhöhte Aktivität der PI3K zeigten, wiesen eine besonders starke Aktivierung des MAPK Signalweges auf. Durch Inhibition der PI3K mittels LY294002 konnte die ERK1/2 Phosphorylierung nach Rapamycin Behandlung reduziert werden (Carracedo, 2008).

Mögliche Ursache für die unsere Beobachtungen könnten verschiedene Mechanismen sein über die der PI3K/mTOR Signalweg die Aktivität des MAPK Signalweges reguliert. So scheint in unseren Versuchen die Inhibition von PI3K durch NVP-BEZ235 zu einer direkten Aktivierung des MAPK Signalweges zu führen (Abb. 15b). Dagegen scheint eine Inhibition von mTORC1/S6K1 durch RAD001, eine indirekte Aktivierung des MAPK Signalweges zur Folge zu haben (Abb. 21). Ursache dieses Effektes könnte die wiederholt beschriebene S6K1 abhängige Aktivierung von PI3K nach mTORC1 Inhibition sein (Carracedo, 2008).

Da die Aktivität des MAPK Signalweges sehr sensibel auf Veränderungen des intra- und extrazellulären Milieus reagiert, sollte neben einer Aktivierung des MAPK Signalweges durch Hemmung des PI3K/mTOR Signalweges auch eine unspezifische Aktivierung in Erwägung gezogen werden. Dabei kommt es zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges nach Behandlung mit zytotoxischen Substanzen als Ausdruck zellulären Stresses, was eine Inhibition der Apoptose und eine Stimulation der Translation von pro-survival Proteinen, v.a. der Bcl-2 Familie, zur Folge hat (Herr I, 2001; Ballif BA, 2001).

5.3 Funktionelle Bedeutungen der Regulationsmechanismen des PI3K/mTOR Signalweges

Nach der Anwendung verschiedener Inhibitoren gegen Moleküle des PI3K/mTOR Signalweges konnte nach Inkubation mit dem PI3K Inhibitor NVP-BE235 eine signifikante Inhibition von Zellzahl (Abb. 17a/b), Proliferation (Abb. 18a/b) und Stoffwechselaktivität (Abb. 20a/b) nachgewiesen werden. Dagegen wurde nach Behandlung mit dem mTORC1 Inhibitor RAD001 keine signifikante Auswirkung auf Proliferation (Abb. 18a/b) und Stoffwechselaktivität (Abb. 20a/b) deutlich. Des weiteren zeigten sich, im Vergleich mit NVP-BE235, nach RAD001 Behandlung geringere Auswirkungen auf die Zellzahl.

Eine geringe Wirksamkeit von RAD001 konnte in Harnblasenkarzinomzelllinien bereits beobachtet werden. Dabei wurde nach Inkubation mit RAD001 mittels MTT- Assay keine signifikante Auswirkung auf Stoffwechselaktivität von Blasenkarzinomzellen nachgewiesen (Vasconcelos-Nóbrega C, 2011). Nach Zellzyklusanalyse mittels Propidium- Jodid konnte ebenfalls keine signifikante Hemmung der Proliferation beobachtet werden. Chiong *et al.* konnten nach Inkubation mit RAD001 keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstum von Blasenkarzinomzelllinien beobachten (Chiong E, 2011). Hierfür wurde das Wachstum mittels Kristall- Violet und (3H)- Thymidin-Assay untersucht. Der stärkere Effekt von NVP-BE235 auf Wachstum, Proliferation und Stoffwechselaktivität in unseren Versuchen könnte durch die gleichzeitige Hemmung der Phosphorylierung von 4E-BP1 und S6K1 erklärt werden. Die beobachtete Phosphorylierung von AKT zeigte dagegen nur geringe Auswirkungen auf die untersuchten Zellfunktionen. Trotz dieser Phosphorylierung wurde nach Behandlung mit NVP-BE235 die Proliferation, Wachstum und die Stoffwechselaktivität der Zellen signifikant gehemmt (Abb. 18a,b/17a,b/20a,b). Allerdings könnte die hier nachgewiesene verminderte Caspaseaktivität ein direkter Effekt der Phosphorylierung von AKT und GSK3 β sein (Abb. 19a/b). So ist für AKT eine Hemmung der Apoptose über eine verminderte Freisetzung von Cytochrom C, der Inaktivierung des proapoptotischen Faktors BAD (Song G, 2005), des Transkriptionsfaktors FOXO (Burgering BM, 2003) und der Serin-Threonin Kinase GSK3 β (Pap M, 1998) beschrieben. *In vitro* konnte durch Inhibition von AKT bei Lungenkarzinomzellen Apoptose und Zellzyklusarrest induziert werden (LoPiccolo J, 2007). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse überwiegen jedoch die Effekte, die durch Inhibition der Phosphorylierung von 4E-BP1 und S6K1 erzielt werden.

Nach Inhibition der Expression von mTOR mittels mTOR shRNA wurde eine Abnahme der Caspaseaktivität nachgewiesen, obwohl nicht wie zuvor nach Behandlung mit RAD001 und NVP-BE235 eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT deutlich wurde (Abb. 19c). Des weiteren wurde nach mTOR knock-down wie auch nach Behandlung mit NVP-BE235 und RAD001 eine Abnahme der Stoffwechselaktivität beobachtet (Abb. 20c). Dagegen zeigte sich eine Zunahme der Zellzahl und Proliferation (Abb. 17c/18c). Während eine Hemmung von Proliferation, Wachstum und Zunahme von Apoptose durch Herabregulation von mTOR in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte, wurde ein Zusammenhang dieser Effekte mit molekularen Regulationsmechanismen bisher noch wenig untersucht (Matsubara H, 2012; Liu MY, 2011). Zhang *et al.* konnten in Kolonkarzinomzellen nach knockdown von mTOR eine Inhibition von Proliferation, Zellzahl sowie eine Zunahme der Apoptose nachweisen (Zhang YJ, 2009). Auf molekular Ebene zeigte sich dabei allerdings eine Abnahme der Phosphorylierung von S6K1 und 4E-BP1. Versuche mit Harnblasenkarzinomzelllinien wurden bisher noch nicht veröffentlicht. Des weiteren wurden noch keine

Untersuchungen veröffentlicht, in denen nach knock-down von mTOR eine Zunahme der Expression und Phosphorylierung von 4E-BP1 deutlich wurde. Die Zunahme von Zellzahl und Proliferation könnte somit als eine direkte Auswirkung der Zunahme von Expression und Phosphorylierung von 4E-BP1 erklärt werden.

Somit scheint 4E-BP1 eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellfunktionen einzunehmen, während die funktionelle Bedeutung der Proteine upstream wie AKT und somit auch die wiederholt beschriebene S6K1 abhängige Feedback- Aktivierung von PI3K anhand dieser Ergebnisse eher als gering einzuschätzen ist. Die sinnvolle Anwendung von Rapamycinderivaten wäre damit entscheidend davon abhängig, ob eine Regulation von 4E-BP1 über mTOR oder PI3K vorliegt.

5.4 Klinische Bedeutung von Inhibitoren des PI3K/ mTOR Signalweges in der Therapie des Harnblasenkarzinom

mTOR- Inhibitoren zeigen bei einer Vielzahl von Tumorentitäten eine gute Wirksamkeit. So wurde CCI-779 (Temsirrolimus) im Jahr 2007 als erster mTOR Inhibitor mit onkologischer Indikation als First-Line Therapie für Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom zugelassen (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2012). Kürzlich erfolgte auch die Zulassung zur Therapie des refraktären Mantellzelllymphoms. Die Wirksamkeit bei Patienten mit Mamma- oder Bronchial-Karzinomen wird zur Zeit in Phase 3 Studien untersucht (www.clinicaltrials.gov, 2012). RAD001 wird derzeit als Second-Line Therapie für Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen sowie zur Therapie von Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas angewendet (Battelli C, 2011; Kulke MH, 2011). Dagegen zeigten die ersten klinischen Studien mit Patienten mit Harnblasenkarzinomen keine vielversprechenden Ergebnisse. Bei einer Phase 2 Studie von Seront *et al.* wurden 17 Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen, die nicht auf eine Platin-basierte Chemotherapie ansprachen, mit RAD001 behandelt (Seront E, 2010). Dabei konnte bei 3 Patienten (18%) für maximal 234 Tage ein stabiles Krankheitsbild beobachtet werden. Eine komplette oder partielle Remission konnte nicht beobachtet werden. In einer weiteren Phase 2 Studie wurden 24 Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen, die nicht auf eine Platin- basierte Chemotherapie ansprachen, mit einer Kombination aus RAD001 und Paclitaxel behandelt (Niegisch G, 2012). Dabei zeigten 4 Patienten (21%) eine partielle Remission und neun Patienten (37%) einen stabilen Krankheitsverlauf. Gleichzeitig fielen bei 50% erhebliche hämatologische Nebenwirkungen auf. Für Paclitaxel konnte klinisch bereits eine gute Wirksamkeit nachgewiesen werden. So wurde in einer Phase 3 Studie mit Patienten mit Harnblasenkarzinomen die Wirksamkeit von Paclitaxel/ Cisplatin/ Gemcitabin mit dem etablierten Schema Cisplatin/ Gemcitabin verglichen. Dabei zeigte die Kombination mit Paclitaxel eine bessere Ansprechrate (55%/43,6%) und eine längere Überlebenszeit der Patienten (15,8 Monate/ 12,7 Monate) (Bellmunt J v. d.-A., 2012).

Ursache dieser fehlenden Wirksamkeit von RAD001 könnten die hier beschriebenen Regulationsmechanismen sein. So können mTORC1 Inhibitoren offensichtlich eine gute Wirksamkeit nur dann erreichen, wenn sowohl die Aktivität von S6K1 als auch von 4E-BP1 von mTORC1 reguliert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Frage auf, ob Rapamycinderivate für die Therapie von Patienten mit Blasenkarzinomen so gut geeignet sind wie bei Patienten mit anderen Tumorentitäten. Vielversprechender scheint dagegen die Anwendung von PI3K Inhibitoren wie NVP-BE235 zu sein. Dabei könnte als limitierender Faktor die Aktivierung des MAPK Signalweges eine wichtige Rolle spielen. So konnte in weiteren Versuchen nach Inkubation mit NVP-BE235 und dem ERK1/2 Inhibitor UO126 eine signifikant stärkere Hemmung von Wachstum, Apoptose und Proliferation gegenüber der alleinigen Behandlung mit NVP-BE235 nachgewiesen werden (Nawroth R, 2011).

Die hier beobachtete Aktivierung des MAPK Signalweges nach mTORC1 Inhibition gilt als weiterer limitierender Faktor bei der Anwendung von Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges und konnte auch schon in klinischen Studien nachgewiesen werden. In einer Phase 1 Studie wurden 10 Patienten mit metastasierten Karzinomen (acht mit Mamma-CA, ein Patient mit einem malignem Melanom und ein Patient mit einem Kolon-CA) mit dem mTORC1 Inhibitor RAD001 behandelt (Carracedo, 2008).

Nach einer Behandlungszeit von 4 Wochen wurden bei 50% immunhistochemisch signifikant erhöhte Level an phosphoryliertem ERK (Thr202/Tyr204) nachgewiesen. Welchen Einfluss die Aktivierung des MAPK Signalweges auf die Wirksamkeit der mTOR Inhibitoren hat ist in klinischen Studien trotz immer häufigerer Anwendung noch nicht untersucht worden.

Des Weiteren konnte in vielen Tumorentitäten ein Zusammenhang zwischen phosphoryliertem AKT (an S473) und einer schlechten Prognose nachgewiesen werden, weshalb AKT als ein vielversprechendes Ziel für die Anwendung von Target Therapien gilt (LoPiccolo J, 2007). Allerdings zeigten AKT Inhibitoren in der Klinik bisher keine gute antitumoröse Wirksamkeit. So zeigten in den 3 bisher veröffentlichten Phase 2 Studien mit Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten 7 von 68 Patienten zeitweise einen stabilen Krankheitsverlauf. Ein Ansprechen der Therapie im Sinne einer partiellen oder vollständigen Remission konnte nicht nachgewiesen werden (LoPiccolo J, 2007).

Somit stellt sich die Frage, ob die Anwendung von Inhibitoren gegen mTORC1 oder AKT eine geeignete Strategie als Target- Therapie im Harnblasenkarzinom darstellt. So scheint, aufgrund der hier beobachteten Regulationsmechanismen, die Wirksamkeit von mTORC1 Inhibitoren im Harnblasenkarzinom begrenzt und der Einfluss von AKT auf die Zellfunktionen gegenüber anderen Proteinen des mTOR Signalweges eher gering zu sein. Allerdings lieferte auch die erste Studie mit NVP-BE2235, das in unseren Versuchen eine bessere Wirksamkeit aufwies, ein enttäuschendes Ergebnis. In der ersten veröffentlichten Phase 1 Studie mit 51 Patienten wurde bei 2 Patienten (4%) eine partielle Remission beobachtet (Burriss H, 2010). Bei einer Patientin mit HER2/neu negativem, Östrogen Rezeptor positiven Mammakarzinom und einem Patienten mit Cowden Syndrom (PTEN Mutation), der ein Bronchialkarzinom entwickelt hatte. Bei 13 Patienten (27%) wurde ein stabiler Krankheitsverlauf für durchschnittlich 4 Monate beobachtet.

Somit stellt aufgrund komplexer Regulationsmechanismen und Wechselwirkungen des PI3K/mTOR und des MAPK Signalweges eine Inhibierung von einzelnen Targets dieser Signalwege wahrscheinlich kein vielversprechendes Therapiekonzept dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass ein erfolgreiches Therapieansprechen nur nach gleichzeitiger Inhibition verschiedener Schlüsselproteine beider Signalwege erzielt werden kann.

Eine weitere Ursache für die schlechte klinische Wirksamkeit von Inhibitoren gegen Proteine des PI3K/mTOR Signalweges könnte eine nicht immer eindeutig geklärte Targetspezifität vieler Substanzen sein. So wurde für die meisten PI3K Inhibitoren, neben der Inhibition von PI3K und mTOR, eine inhibierende Wirkung auf eine Vielzahl anderer Kinasen und Transkriptionsfaktoren beschrieben (Gharbi SI, 2007). Auch bei den Substanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigten sich teilweise erhebliche Abweichungen von den beschriebenen Wirkprofilen. Besonders deutlich konnte dies nach Anwendung des PI3K Inhibitors NVP-BKM120 beobachtet werden. Als spezifischer Klasse 1-PI3K Inhibitor beschrieben (Maira SM P. S., 2012), zeigte sich in unseren Versuchen eine geringe Spezifität gegen PI3K, bei erheblich höherer Spezifität gegen mTOR. Ohne hinreichend untersuchte Spezifität der Substanzen wird das Anwendungsspektrum von Target- Therapien schwer zu definieren sein, wodurch auch zukünftig keine bestmögliche Therapie sichergestellt werden kann.

5.5 Ausblick

mTOR- Inhibitoren haben bei einer Vielzahl von Tumorentitäten eine gute antitumoröse Wirksamkeit gezeigt. So wurden RAD001 und CCI-779 bereits für die Therapie von Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen zugelassen und befinden sich in anderen Tumorentitäten bereits in weit fortgeschrittenen klinischen Studien. Dagegen lieferten die ersten beiden Phase 2 Studien des mTOR Inhibitors RAD001 ernüchternde Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges bei Patienten mit Blasenkarzinomen (Seront E, 2010; Niegisch G, 2012).

Eine mögliche Ursache könnte dabei die hier beschriebene Regulation des 4E-BP1 über PI3K und nicht wie in der Regel über mTORC1 sein, was in diesen Versuchen den entscheidenden Unterschied der Überlegenheit von NVP-BEZ235 gegenüber RAD001 ausmachte. Dem entsprechend konnten S6K1 und 4E-BP1 als die besten Ziele für eine Anwendung von Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges im Harnblasenkarzinom identifiziert werden. Die Bedeutung der Proteine upstream von mTOR wie AKT stellte sich in diesen Versuchen als eher gering dar.

Somit könnte NVP-BEZ235 eine vielversprechende neue Substanz unter den Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges zur Anwendung im Harnblasenkarzinom sein. Allerdings wurden bis heute noch keine Ergebnisse zu klinischen Studien mit Patienten mit Blasenkarzinomen veröffentlicht. Der limitierende Faktor bei der Anwendung von NVP-BEZ235 als Monotherapie könnte dabei die Aktivierung des MAPK Signalweges sein. Einen aussichtsreicher Ansatz für diese Problematik stellt eine Kombination aus NVP-BEZ235 und einem ERK1/2 Inhibitor dar. Nach Inkubation mit einer Kombination aus NVP-BEZ235 und dem ERK1/2 Inhibitor UO126 konnte in Blasenkarzinomzelllinien gegenüber der Inkubation mit NVP-BEZ235 eine signifikant stärkere Inhibition auf Wachstum, Apoptose und Proliferation der Zellen nachgewiesen werden (Nawroth R, 2011). Engelmann *et al.* konnten bei Mäusen mit Lungentumoren nach 2 wöchiger Behandlung mit NVP-BEZ235 und dem ERK1/2 Inhibitor ARRY-142886 eine deutliche Auswirkung auf die Tumorgroße beobachten (Engelman JA, 2008). Dabei zeigte sich gegenüber der Monotherapie mit NVP-BEZ235 oder ARRY-142886 eine erhebliche Überlegenheit der Kombinationstherapie. Weitere Nebenwirkungen konnten bei den Tieren nicht beobachtet werden.

Um eine individuelle und bestmögliche Therapie mit Inhibitoren gegen Moleküle des PI3K/mTOR bzw. des MAPK Signalweges zu gewährleisten wird in Zukunft die Identifizierung von Molekülen eine wichtige Rolle spielen, die als prädiktive Marker geeignet sind. So konnten bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen bereits hohe Level an pS6K1 und pAKT als prädiktive Faktoren für das Ansprechen einer Therapie mit dem mTOR Inhibitor CCI-779 identifiziert werden (Cho D, 2007). Patienten, bei denen weder pS6k1 noch pAKT nachgewiesen wurden, zeigten alle kein Ansprechen auf die Therapie mit CCI-779.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der molekularen Steuerung und funktionellen Bedeutung des PI3K/mTOR und des MAPK Signalweges deuten darauf hin, dass sich diese Signalwege, wenn optimal inhibiert, als therapeutische Ziele sehr gut eignen. Des weiteren konnten die Proteine identifiziert werden, denen dabei eine Schlüsselrolle zukommt. Welchen Stellenwert die Inhibitoren des PI3K/mTOR und MAPK Signalweges in der Therapie von Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen einnehmen werden, muss zukünftig in klinischen Studien evaluiert werden.

6 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist der häufigste Tumor der ableitenden Harnwege und damit bei Männern an dritter und bei Frauen an fünfter Stelle der häufigsten malignen Tumorerkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2010). In Deutschland erkranken jährlich ca. 25.000 Menschen neu an Harnblasenkrebs. Durch die demographische Entwicklung hat die Inzidenz des Blasenkarzinoms in den vergangenen 60 Jahren stetig zugenommen. (Robert-Koch-Institut, 2010).

Über 90% aller Harnblasenkarzinome gehen vom Urothel aus, etwa 7% sind Plattenepithelkarzinome und in 1-2% der Fälle liegt ein Adenokarzinom vor (Raghavan D, 1995; Anderström C, 1983; Johnson DE, 1976). Weniger als 1% entstehen sekundär durch Infiltration von anderen Malignomen oder durch Metastasierung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen 70% der Patienten ein oberflächliches Tumorstadium auf. Ein hohes Rezidivrisiko von 50-70% ist für dieses Tumorstadium charakteristisch (Rübben H, 1998). In 10-30% der Fälle kommt es zu einer Progression und somit zu einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom mit deutlich verschlechterter Prognose. Trotz chirurgischer Versorgung mittels radikaler Zystektomie und Platin-basierter Chemotherapie entwickeln die Hälfte der Patienten unter Therapie ein Rezidiv mit Metastasen. Diese Patienten weisen bei einer medianen Überlebenszeit von 14 Monaten eine besonders schlechte Prognose auf, die in den letzten 20 Jahren trotz ständiger Weiterentwicklung der Chemotherapieregime nicht verbessert werden konnte (Vom Dorp F, 2008).

Bei der Initiation und Progression von Blasenkarzinomen spielt die Aktivierung intrazellulärer Signalwege eine wichtige Rolle (Wu, 2009; Cheng L, 2010). Einer dieser Signalwege ist der PI3K/mTOR Signalweg, der in vielen Tumorentitäten wie auch im Blasenkarzinom häufig Mutationen aufweist und somit ein geeignetes Ziel für die effektive Anwendung von Targettherapeutika darstellt (Engelman JA, 2008; Bai X, 2010). Der PI3K/mTOR Signalweg wird durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren aktiviert und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Wachstum, Proliferation, Apoptose und Stoffwechselaktivität.

Inhibitoren des PI3K/mTOR Signalweges haben in verschiedenen Tumorentitäten eine gute antitumoröse Wirksamkeit gezeigt. So wurden die mTORC1 Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus für die Therapie von Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen zugelassen und befinden sich in anderen Tumorentitäten bereits in weit fortgeschrittenen klinischen Studien (Battelli C, 2011; Kulke MH, 2011). Andere maligne Tumore wie Glioblastome und Melanome zeigten dagegen kein Ansprechen.

Im Harnblasenkarzinom gehören Alterationen des PI3K/mTOR Signalweges zu den am häufigsten beobachteten Mutationen. Meistens sind die Gene von PTEN oder PI3K betroffen, seltener das AKT1 Gen (Knowles MA, 2009). Mutationen im PTEN Gen konnten bei invasiven Tumoren je nach Tumorausdehnung in 24-58% der Fälle nachgewiesen werden, während bei nicht invasiven Karzinomen nur vereinzelt Mutationen auftraten. Eine Korrelation zwischen einer verminderten PTEN Expression und einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden (Schultz L, 2010; Puzio-Kuter AM, 2009; Aveyard JS, 1999; Cappellen D D. G., 1997; Kagan J, 1998). Bei Patienten mit invasiven Blasentumoren konnte eine Korrelation zwischen hohen Leveln an phosphoryliertem mTOR und phosphorylierter S6K1 mit einer fortgeschrittenen Tumorausdehnung und schlechten Prognose nachgewiesen werden (Hansel DE, 2010).

Trotz dieser Daten ist die Funktion des PI3K/mTOR Signalweges im Blasenkarzinom bis jetzt wenig untersucht worden. In den ersten präklinischen Studien mit PI3K Inhibitoren wiesen diese nur geringe antitumoröse Wirkungen auf (Wu X, 2004; Gupta AK, 2003), während mTOR Inhibitoren im Mausmodell eine gute Wirksamkeit zeigten (Makhlin I, 2010; Hansel DE, 2010). In den ersten Phase 2 Studien mit Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen wies der mTOR Inhibitor Everolimus/RAD001 der Firma Novartis Pharma GmbH dagegen keine gute Wirksamkeit auf (Seront E, 2010; Niegisch G, 2012).

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges für die Therapie des Harnblasenkarzinoms untersucht. Dafür wurde nach gezielter Hemmung verschiedener Schlüsselproteine des PI3K/mTOR Signalweges die Auswirkung auf Signaltransduktion und Zellfunktionen wie Wachstum, Apoptose, Proliferation und Stoffwechselaktivität analysiert.

In unseren Versuchen konnten wir in 7 von 9 Harnblasenkarzinomzelllinien einen konstitutiv aktiven PI3K/mTOR Signalweg nachweisen. Durch die Hemmung von mTOR wurde die Phosphorylierung von S6K1 gehemmt. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 konnte durch Anwendung der Klasse 1 und 3 PI3K-Inhibitoren NVP-BE2235 und NVP-BGT226 inhibiert werden, nicht aber wie durch mTORC1 Inhibition mit RAD001. Die gleichzeitige Inaktivierung der S6K1 und des 4E-BP1 durch NVP-BE2235 wurde als entscheidender Faktor für die effektivere Hemmung von Wachstum, Proliferation und Stoffwechselaktivität identifiziert. Eine Reaktivierung von AKT hatte dagegen nur geringe Auswirkungen auf die Wirksamkeit der von uns verwendeten Substanzen. Die Wechselwirkung zwischen PI3K/mTOR und MAPK Signalweg wird direkt über PI3K und indirekt über S6K1 vermittelt (Castellano E, 2011). Allerdings konnte in unseren Versuchen auch durch Hemmung von PI3K und mTOR durch NVP-BE2235 eine Aktivierung des MAPK Signalwegs nicht verhindert werden. Eine Kombination aus NVP-BE2235 und einem ERK1/2 Inhibitor zeigte in einem Lungentumor Mausmodell bereits synergistische Effekte auf Tumorwachstum ohne Auftreten weiterer toxischer Nebenwirkungen (Engelman JA, 2008).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der molekularen Steuerung und funktionellen Bedeutung des PI3K/mTOR und des MAPK Signalweges deuten darauf hin, dass sich diese Signalwege, wenn optimal inhibiert, als therapeutische Ziele sehr gut eignen. Des Weiteren konnten die Proteine identifiziert werden, denen dabei eine Schlüsselrolle zukommt. Dabei könnte eine Inhibition der Signalwege an verschiedenen molekularen Punkten den Schlüssel für ein erfolgreiches Therapieansprechen darstellen. NVP-BE2235 zeigte in unseren eine gute Wirksamkeit und sollte in Kombination mit einem Inhibitor des MAPK Signalweges als Studienmodell für die Therapie von Patienten mit metastasierten Blasenkarzinomen in Betracht gezogen werden. Durch die komplexen Wechselwirkungen der Proteine des PI3K/mTOR Signalweges untereinander und die Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen wie dem MAPK Signalweg wird es allerdings auch in Zukunft schwierig sein die Funktionen der verschiedenen Proteine endgültig aufzuklären. Welchen Stellenwert Inhibitoren des PI3K/mTOR und MAPK Signalweges in der Therapie von Patienten mit metastasierten Harnblasenkarzinomen einnehmen werden, muss daher zukünftig in klinischen Studien noch weiter evaluiert werden.

7 Literaturverzeichnis

Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1990). Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* (266) , S. 4220-4227.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* (4) , S. 261-269.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1998). Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol* (8) , S. 69-81.

Ali SM, Sabatini DM (2005). Structure of the S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem* (280) , S. 19445-19448.

Anderström C, Johansson SL, von Schultz L (1983). Primary adenocarcinoma of urinary bladder (52). *Cancer* , S. 1273.

ARIAD Pharmaceuticals, I. (2010). www.ariad.com. Abgerufen am 11 2010

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. (2012). Abgerufen am 2012 von www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2010010-Torisel.pdf

Atkins MB, Hidalgo M, Stadler WM, Logan TF, Dutcher JP, Hudes GR, Park Y, Liou SH, Marshall B, Boni JP, Dukart G, Sherman ML (2004). Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* (22) , S. 909-918.

Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA (1999). Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. *British Journal of Cancer* (80) , S. 904–908.

Baba HA, Wohlschlaeger J, Cicinnati VR, Hilgard P, Lang H, Sotiropoulos GC, Takeda A, Beckebaum S, Schmitz KJ (2009). Phosphorylation of p70S6 kinase predicts overall survival in patients with clear margin-resected hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* (29) , S. 399-405.

Bai X, Jiang Y (2010). Key factors in mTOR regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* (67) , S. 239–253.

Baker GL, Kahl LE, Zee BC, Stolzer BL, Agarwal AK, Medsger TA Jr (1987). Malignancy following treatment of rheumatoid arthritis with cyclophosphamide: Long-term case-control follow-up study. *Am J Med* (83) , S. 1-9.

Ballif BA, Blenis J (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.* 12(8) , S. 397-408.

Bendell JC, Rodon J, Burris HA, de Jonge M, Verweij J, Birlle D, Demanse D, De Buck SS, Ru QC, Peters M, Goldbrunner M, Baselga J (2010). A first-in-human phase I study of BKM120, an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* (28) .

- Battelli C, Cho DC (2011). mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy* 8 , S. S. 359–367.
- Baumann P, Schneider L, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R (2012). Simultaneous targeting of PI3K and mTOR with NVP-BGT226 is highly effective in multiple myeloma. *Anticancer Drugs*. 23(1) , S. 131-8.
- Bedwani R, Renganathan E, El Kwahsky F, Braga C, Abu Seif HH, Abul Azm T, Zaki A, Franceschi S, Boffetta P, La Vecchia C (1998). Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria. *Br J Cancer* (77) , S. 1186-1189.
- Bellmunt J, Albiol S, Suárez C, Albanell J (2009). Optimizing therapeutic strategies in advanced bladder cancer: update on chemotherapy and the role of targeted agents. *Crit Rev Oncol Hematol*. 69(3) , S. 211-222.
- Bellmunt J, von der Maase H, Mead GM, Skoneczna I, De Santis M, Daugaard G, Boehle A, Chevreau C, Paz-Ares L, Laufman LR, Winquist E, Raghavan D, Marreaud S, Collette S, Sylvester R, de Wit R (2012). Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987. *J Clin Oncol*. 30(10) , S. 1107-13.
- Bichler KH, Becker G, Bokemeyer C, Braunwald H, Buck G, Dammann H, Feil G, Krause FS, Lahme S, Nelde HJ, Preßler H, Strohmaier WL, Zumbrägel A (2000). Harnblasenkarzinom- Empfehlungen zur Diagnose, Therapie und Nachsorge. Interdisziplinäres Tumorzentrum Klinikum Eberhard- Karls- Universität Tübingen.
- Bjornsti MA, Houghton PJ (2004). The mTOR pathway: a target for cancer Therapy. *Nature* (4) , S. 335-348.
- Law BK (2005). Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? *Oncology / Hematology* (56) , S. 47-60.
- Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW (1995). Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *Journal of the National Cancer Institute* 87(21) , S. 1603–1612.
- Bose S, Chandran S, Mirocha JM, Bose N (2006). The akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis. *Mod Pathol*. (19) , S. 238-245.
- Brachmann SM, Hofmann I, Schnell C, Fritsch C, Wee S, Lane H, Wang S, Garcia-Echeverria C, Maira SM (2009). Specific apoptosis induction by the dual PI3K/mTor inhibitor NVP-BEZ235 in HER2 amplified and PIK3CA mutant breast cancer cells. *Cell Biology* .
- I. Brana, P. LoRusso, J. Baselga, E. I. Heath, A. Patnaik, S. Gendreau, A. Laird, K. Papadopoulos (2010). A phase I doseescalation study of the safety, pharmacokinetics (PK), and pharmacodynamics of XL765 (SAR245409), a PI3K/TORC1/TORC2 inhibitor administered orally to patients (pts) with advanced malignancies. *J Clin Oncol (MeetingAbstracts)* (28) .
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jöckel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A,

Kogevinas M, Boffetta P (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* (86) , S. 289-294.

Brognaard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* (61) , S. 3986–3997.

Burgering BM, Medema RH (2003). Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when Akt/PKB is off duty. *J Leukoc Biol* (73) , S. 689-701.

Burris H, Rodon J, Sharma S, Herbst RS, Tabernero J, Infante JR, Silva A, Demanse D, Hackl W, Baselga J (2010). First-in-human phase I study of the oral PI3K inhibitor BEZ235 in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* (28) .

Cameron D (2007). Lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive advanced breast cancer. *Clinical Advances in Hematology and Oncology* 6(5) , S. 456–458.

Cantley LC, Neel BG (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/ Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci* (96) , S. 4240-4245.

Cantley LC (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* (296) , S. 1655-1657.

Cantrell D (2001). Phosphoinositide 3-Kinase signalling pathways. *J Cell Sci.* (114) , S. 1439-1445.

Cao P, Maira SM, García-Echeverría C, Hedley DW (2009). Activity of a novel, dual PI3-kinase/mTor inhibitor NVP-BE235 against primary human pancreatic cancers grown as orthotopic xenografts. *Br J Cancer* (100) , S. 1267–1276.

Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F (1997). Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* (14) , S. 3059–3066.

Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature Genetics* (23) , S. 18–20.

Carpenter CL, Cantley LC (1998). A flattened face for membranes. *Nat Struct Biol.* (10) , S. 843-845.

Carpenter JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* (448) , S. 439–444.

Carracedo A, Alimonti A, Pandolfi PP (2011). PTEN level in tumor suppression: how much is too little? *Cancer Res.* 71(3) , S. 629-33.

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 118(9) , S. 3065-74.

Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, Alimonti A, Nardella C, Varmeh S, Scardino PT, Cordon-Cardo C, Gerald W, Pandolfi PP (2009). Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet.*(41) , S. 619-624.

CASE RA, PEARSON JT (1954). Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. *BR J Ind Med* (11) , S. 213.

Castellano E, Downward J (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer* 2 (3) , S. 261– 274.

Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramon y Cajal S (2006). Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cance* (107) , S. 1801-1811.

Chalhoub N, Baker SJ (2009). PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* (4) , S. 127–150.

Chan S, Scheulen ME, Johnston S, Mross K, Cardoso F, Dittrich C, Eiermann W, Hess D, Morant R, Semiglazov V, Borner M, Salzberg M, Ostapenko V, Illiger HJ, Behringer D, Bardy-Bouxin N, Boni J, Kong S, Cincotta M, Moore L (2005). Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* (23) , S. 5314–5322.

Chang KY, Tsai SY, Wu CM, Yen CJ, Chuang BF, Chang JY (2011). Novel phosphoinositide 3-kinase/mTOR dual inhibitor, NVP-BGT226, displays potent growth-inhibitory activity against human head and neck cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 17(22): , S. 7116-26.

Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Vignon C, Bardet V, Neyret A, Pannetier M, Willems L, Park S, Maccone A, Maira SM, Ifrah N, Dreyfus F, Herault O, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D (2010). Dual Inhibition of PI3K and mTORC1/2 Signaling by NVP-BE2235 as a New Therapeutic Strategy for Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* (16) , S. 5424-5435.

Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci* (89) , S. 9267-9271.

Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci* (93) , S. 3636-3641.

Cheng L, Davidson DD, Maclennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, Montironi R, Lopez-Beltran A (2010). The origins of urothelial carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 10(6) , S. 865-880.

Chiong E, Lee IL, Dadbin A, Sabichi AL, Harris L, Urbauer D, McConkey DJ, Dickstein RJ, Cheng T, Grossman HB (2011). Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells. *Clin Cancer Res.* 17(9) , S. 2863-73.

Cho D, Signoretti S, Dabora S, Regan M, Seeley A, Mariotti M, Youmans A, Polivy A, Mandato L, McDermott D, Stanbridge E, Atkins M (2007). Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 5(6) , S. 379-85.

Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration (2005). Adjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. *Eur Urol*. (48) , S. 189-201.

Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration (2003). Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. (361) , S. 1927-34.

Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE, Benedict WF (1997). Cooperative effects of p53 and pRb alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Research* (57) , S. 1217–1221.

Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, Stein JP, Shi SR, Tran QC, Hu SX, Xu HJ, Groshen S, Taylor CR, Skinner DG, Benedict WF (1998). Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. *Cancer Research* (58) , S. 1090–1094.

Creighton CJ, Fu X, Hennessy BT, Casa AJ, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Gray JW, Brown PH, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Mills GB, Lee AV, Schiff R (2010). Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer. *Breast Cancer Research* (12) .

De Santis M, Bellmunt J, Mead G, Kerst JM, Leahy M, Maroto P, Skoneczna I, Marreaud S, de Wit R, Sylvester R (2009). Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/ carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer "unfit" for cisplatin-based chemotherapy: phase II--results of EORTC study 30986. *J Clin Oncol*. 2009 27(33) , S. 5634-9.

Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22(53) , S. 8543-8567.

Deutsche-Krebsgesellschaft (2004). www.leitlinien.net. Abgerufen am Oktober 2010

Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, Kamat AM, Siefker-Radtke AO, Tuziak T, Sabichi AL, Grossman HB, Benedict WF, Czerniak B (2004). Focus on bladder cancer. *Cancer Cell* (6) , S. 111-116.

Djordjevic S, Driscoll PC (2002). Structural insight into substrate specificity and regulatory mechanisms of phosphoinositide 3-kinases. *Trends Biochem Sci* (27) , S. 426-432.

Doi T, Muro K, Boku N, Yamada Y, Nishina T, Takiuchi H, Komatsu Y, Hamamoto Y, Ohno N, Fujita Y, Robson M, Ohtsu A (2010). Multicenter Phase II Study of Everolimus in Patients With Previously Treated Metastatic Gastric Cancer. *J Clin Oncol* (28) , S. 1904-1910.

Edelman G, Bedell C, Shapiro G, Pandya SS, Kwak EL, Scheffold C, Nguyen LT, Laird A, Baselga J, Rodon J (2010). A phase I doseescalation study of XL147 (SAR245408), a PI3K inhibitor administered orally to patients (pts) with advanced malignancies. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*(28) .

Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, Beijersbergen RL, Valero V, Seoane J, Bernardis R, Baselga J (2008). PI3K Hyperactivation Results in Lapatinib Resistance that is Reversed by the mTOR/PI3K Inhibitor NVP-BE235. *Cancer Res.* , S. 9221–9230.

Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U, Vanrenterghem Y, Daloz P, Halloran PF; ELITE-Symphony Study (2007). Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* (25) , S. 2562-2575.

Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, Chirieac LR, Kaur R, Lightbown A, Simendinger J, Li T, Padera RF, García-Echeverría C, Weissleder R, Mahmood U, Cantley LC, Wong KK (2008). Effective Use of PI3K and MEK Inhibitors to Treat Mutant K-Ras G12D and PIK3CA H1047R Murine Lung Cancers. *Nat Med.* 2008 December (14) , S. 1351–1356.

Fechner G, Classen K, Schmidt D, Hauser S, Müller SC (2009). Rapamycin Inhibits In Vitro Growth and Release of Angiogenic Factors in Human Bladder Cancer. *Urology* (73) , S. 665-669.

Feng W, Brown RE, Trung CD, Li W, Wang L, Khoury T, Alrawi S, Yao J, Xia K, Tan D (2008). Morphoproteomic profile of mTOR, Ras/Raf kinase/ERK, and NF-kappaB pathways in human gastric adenocarcinoma. *Ann Clin Lab Sci.*(38) , S. 195-209.

Friedman L (2008). GDC-0941, a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3K. In: Proceedings of the 99th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.

Furman RR, Byrd JC, Flinn IW, Coutre SE, Benson Jr DM., Brown JR, Kahl BS, Wagner-Johnston ND, Giese NA, Yu AS (2010). Interim results from a phase I study of CAL-101, a selective oral inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110d isoform, in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* (28) .

Garami A, Zwartkruis FJ, Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Stocker H, Kozma SC, Hafen E, Bos JL, Thomas G (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signalling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* (11) , S. 1457-1466.

Garcia-Echeverria C, Sellers WR (2008). Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* (27) , S. 5511-5526.

Garcia-España A, Salazar E, Sun TT, Wu XR, Pellicer A (2005). Differential expression of cell cycle regulators in phenotypic variants of transgenically induced bladder tumors: implications for tumor behavior. *Cancer Research* (65) , S. 1150–1157.

Garlich J, Shelton C, Qi W, Liu X, Cooke L, Mahadevan D (2010). Update on the Novel Prodrug Dual mTOR-PI3K Inhibitor SF1126. In: Cambridge Healthtech Institute's 8th Annual Next-Gen Kinase Inhibitors Oncology & Beyond Conference.

Garlich JR, De P, Dey N, Su JD, Peng X, Miller A, Murali R, Lu Y, Mills GB, Kundra V, Shu HK, Peng Q, Durden DL (2008). A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* (68) , S. 206-215.

Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* (404) , S. 15-21.

Glienke W, Maute L, Wicht J, Bergmann L (2012). The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BGT226 induces cell cycle arrest and regulates Survivin gene expression in human pancreatic cancer cell lines. *Tumour Biol.* 33(3) , S. 757-65.

Gómez-Román JJ, Saenz P, Molina M, Cuevas González J, Escuredo K, Santa Cruz S, Junquera C, Simón L, Martínez A, Gutiérrez Baños JL, López-Brea M, Esparza C, Val-Bernal JF (2005). Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clin Cancer Res* 11 , S. 459–465.

Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, Palmer JL, Benedict WF (1998). p53 and Rb expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clinical Cancer Research* (4) , S. 829–834.

Gupta AK, Cerniglia GJ, Mick R, Ahmed MS, Bakanauskas VJ, Muschel RJ, McKenna WG (2003). Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3K using LY294002. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* (56) , S. 846–853.

Hahn NM, Stadler WM, Zon RT, Waterhouse D, Picus J, Nattam S, Johnson CS, Perkins SM, Waddell MJ, Sweeney CJ; Hoosier Oncology Group (2011). Phase II trial of cisplatin, gemcitabine, and bevacizumab as first-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: Hoosier Oncology Group GU 04-75. *J Clin Oncol.* 29(12) , S. 1525-30.

Hannan KM, Brandenburger Y, Jenkins A, Sharkey K, Cavanaugh A, Rothblum L, Moss T, Poortinga G, McArthur GA, Pearson RB, Hannan RD (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol.*;23(23), S.8862-77

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 (2010). Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Cellular Proliferation and Tumor Growth in Urothelial Carcinoma. *Am J Pathol* (176) , S. 3062-3072.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* (110) , S. 177-189.

Hartman TR, Nicolas E, Klein-Szanto A, Al-Saleem T, Cash TP, Simon MC, Henske EP (2009). The role of the birt-hogg-dube protein in mTOR activation and renal tumorigenesis. *Oncogene* (28) , S. 1594-1604.

Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R (1999). Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154(3) , S. 721-727.

He F, Mo L, Zheng XY, Hu C, Lepor H, Lee EY, Sun TT, Wu XR (2009). Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Research* 15;69(24), S. 9413-2 .

Heck MM, Gschwend JE, Retz M (2010). Update on chemotherapy for bladder cancer. *Urologe A.* 49(10) , S. 1294-300.

Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J.Mol.Cell Cardiol.* (29) , S. 2873-2892.

Herman SE, Gordon AL, Wagner AJ, Heerema NA, Zhao W, Flynn JM, Jones J, Andritsos L, Puri KD, Lannutti BJ, Giese NA, Zhang X, Wei L, Byrd JC, Johnson AJ (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase- δ inhibitor CAL-101 demonstrates promising pre-clinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals. *Blood* (116) , S. 2078-2088.

Herr I, Debatin KM (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood.* 98(9) , S. 2603-2614.

Hicks RM, Walters CL, Elsebai I, Aasser AB, Merzabani ME, Gough TA (1977). Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med* (70) , S. 413-417.

Hirata Y, Kiuchi K (2003). Mitogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor is dependent on the activation of p70S6 kinase, but independent of the activation of ERK and up-regulation of Ret in SH-SY5Y cells. *Brain Res* (983) , S. 1-12.

Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL (1969). Alpha- naphthylamin and beta- naphthylamine in cigarette smoke. *Nature* (221) , S. 254.

Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ (2003). Rapamycins- Mechanism of Action and Cellular Resistance. *Cancer Biology and Therapy* , S. 222-232.

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; Global ARCC Trial (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* (356) , S. 2271-2281.

Hueper WC, Wiley FH, Wolfe HD; Ranta KE, Leminig MF (1938). Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of beta- naphthylamine. *J Indust Hyg Toxiol* (20) , S. 46.

Hussain MH, MacVicar GR, Petrylak DP, Dunn RL, Vaishampayan U, Lara PN Jr, Chatta GS, Nanus DM, Glode LM, Trump DL, Chen H, Smith DC; National Cancer Institute (2007). Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial. *J Clin Oncol.* 25(16) , S. 2218-2224.

Ihle NT, Lemos R Jr, Wipf P, Yacoub A, Mitchell C, Siwak D, Mills GB, Dent P, Kirkpatrick DL, Powis G (2009). Mutations in the phosphatidylinositol-3-kinase pathway predict for antitumor activity of the inhibitor PX-866 whereas oncogenic Ras is a dominant predictor for resistance. *Cancer Res* (69) , S. 143-150.

Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey CD, Sundaravadivel B, Xu L, McDermott PJ, Kuppaswamy D (2002). c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J Biol Chem* 277(25) , S. 23065-75.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* (17) , S. 1829-34.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat Cell Biol* (4) , S. 648-657.

Iwamaru A, Kondo Y, Iwado E, Aoki H, Fujiwara K, Yokoyama T, Mills GB, Kondo S (2007). Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* 26(13) , S. 1840-1851.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008). Cancer Statistics 2008. *A Cancer J Clin.* (58) , S. 71-96.

Jerusalem G, Fasolo A, Dieras V, Cardoso F, Bergh J, Vittori L, Zhang Y, Massacesi C, Sahnoud T, Gianni L (2010). Phase I trial of oral mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab and vinorelbine in pre-treated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* .

Jimeno A, Herbst RS, Falchook GS, Messersmith WA, Hecker S, Peterson S, Hausman DF, Kurzrock R, Eckhardt SG, Hong DS (2010). Final results from a phase I, dose-escalation study of PX-866, an irreversible, pan-isoform inhibitor of PI3 kinase. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* (28) .

Johansson SL, Cohen SM (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol* (13) , S. 291-298.

Johnson BE, Jackman D, Jänne PA (2007). Rationale for a Phase I Trial of Erlotinib and the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Everolimus (RAD001) for Patients with Relapsed Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* (13) , S. 4628-2631.

Johnson DE, Schoenwald MB, Ayala AG, Miller LS (1976). Squamous cell carcinoma of the bladder. *J Urol* (115) , S. 542.

Johnston PB, Inwards DJ, Colgan JP, Laplant BR, Kabat BF, Habermann TM, Micallef IN, Porrata LF, Ansell SM, Reeder CB, Roy V, Witzig TE (2010). A Phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma. *Am. J. Hematol.* (85) , S. 320–324.

Jones PF, Jakubowicz T, Hemmings BA (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul* (12) , S. 1001-1009.

Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP (2010). mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* , S. 908–921.

Kagan J, Liu J, Stein JD, Wagner SS, Babkowski R, Grossman BH, Katz RL (1998). Cluster of allele losses within a 2.5 cM region of chromosome 10 in high-grade invasive bladder cancer. *Oncogene* (16) , S. 909–913.

Kälble T (2001). Etiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer. *Urologe* (40) , S. 447-450.

- Kanai M, Göke M, Tsunekawa S, Podolsky DK (1997). Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *Journal of Biological Chemistry* (272) , S. 6621–6628.
- Khosravi-Far R, Campbell S, Rossman KL, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signaltransduction: involvement of Rho family proteins. *Adv Cancer Res* (72) , S. 57-107.
- Kim IA, Bae SS, Fernandes A, Wu J, Muschel RJ, McKenna WG, Birnbaum MJ, Bernhard EJ (2005). Selective Inhibition of Ras, Phosphoinositide 3 Kinase, and Akt Isoforms Increases the Radiosensitivity of Human Carcinoma Cell Lines. *Cancer Res* (65) , S. 7902-7910.
- King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, Taylor BS, Sander C, Cardiff RD, Couto SS, Gerald WL, Sawyers CL (2009). Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet.*(41) , S. 524-526.
- Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation. *Cancer Metastasis Rev* (28) , S. 305-316.
- Knüchel-Clarke R, Dahl E, Gaisa NT, Schwamborn K, Lindemann-Docter K, Henke C (2010). Stand des Wissens zur molekularen Pathologie des Urothelkarzinoms. *Pathologe* (31) , S. 234–238.
- Kompier LC, Lurkin I, van der Aa MN, van Rhijn BW, van der Kwast TH, Zwarthoff EC (2010). FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 5(11) , S. 13821.
- Kong D, Yamori T (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci.* (9) , S. 1734-1740.
- Kulke MH, Bendell J, Kvols L, Picus J, Pommier R, Yao J (2011). Evolving diagnostic and treatment strategies for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Hematol Oncol* (4) , S. 1-8.
- Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* (369) , S. 411-414.
- Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Belldegrun AS, Pantuck AJ (2006). Prevention of bladder cancer: A review . *European Urology* (49) , S. 226-234.
- Li C, Teng RH, Tsai YC, Ke HS, Huang JY, Chen CC, Kao YL, Kuo CC, Bell WR, Shieh B (2005). H-Ras oncogene counteracts the growth-inhibitory effect of genistein in T24 bladder carcinoma cells. *Br J Cancer* 92 , S. 80–88.
- Liu MY, Hou GQ, Zhang Y, Bei WJ, Yan AH (2011). Effects of mTOR siRNA on mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cells and the growth of transplanted tumor in nude mice. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 33(5) , S. 334-9.
- Liu TJ, Koul D, LaFortune T, Tiao N, Shen RJ, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Yung WK (2009). NVP-BE2235, A Novel Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Elicits Multifaceted Antitumor Activities in Human Gliomas. *Mol Cancer Ther.* 8(8) , S. 2204–2210.

Loehrer PJ Sr, Einhorn LH, Elson PJ, Crawford ED, Kuebler P, Tannock I, Raghavan D, Stuart-Harris R, Sarosdy MF, Lowe BA (1992). A randomised comparison of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol* , S. 1066–1073.

López-Knowles E, Hernández S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardón A, Serra C, Real FX (2006). PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Research* (66) , S. 7401–7404.

LoPiccolo J, Granville CA, Gills JJ, Dennis PA (2007). Targeting Akt in cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 18(8) , S. 861-874.

Luan FL, Hojo M, Maluccio M, Yamaji K, Suthanthiran M (2002). Rapamycin blocks tumor progression: unlinking immunosuppression from antitumor efficacy. *Transplantation* (73) , S. 1565-1572.

Luo J, Manning BD, Cantley LC (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and premise. *Cancer Cell* (4) , S. 257–262.

Ma XM, Blenis J (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(5) , S. 307-318.

Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Hisamoto K, Hayakawa J, Nishio Y, Adachi K, Takahashi K, Arimoto-Ishida E, Nakatsuji Y, Tasaka K, Murata Y (2002). Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to Paclitaxel. *J Biol Chem* (277) , S. 33490–33500.

Maira M, Menezes D, Pecchi S, Shoemaker K, Burger M, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Nagel T, Sellers WR, Garcia-Echeverria C, Wiesmann M, Voliva CF (2010). NVP-BKM120, a novel inhibitor of phosphoinositide 3-kinase in Phase I/II clinical trials, shows significant antitumor activity in xenograft and primary tumor models. In: Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.

Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T, Wiesmann M, Brachmann S, Fritsch C, Dorsch M, Chène P, Shoemaker K, De Pover A, Menezes D, Martiny-Baron G, Fabbro D, Wilson CJ, Schlegel R, Hofmann F, García-Echeverría C, Sellers WR, Voliva CF (2012). Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 11(2) , S. 317-28.

Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, De Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* (7) , S. 1851–1863.

Makhlin I, Zhang J, Long CJ, Devarajan K, Zhou Y, Klein-Szanto AJ, Huang M, Chernoff J, Boorjian SA (2010). The mTOR pathway affects proliferation and chemosensitivity of urothelial carcinoma cells and is upregulated in a subset of human bladder cancers. *BJU International* .

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* (25) , S. 6416-6422.

Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Rocha J, Scarlata E, Kassouf W (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. *Cancer Biology & Therapy* (8:24) , S. 2339-2347.

Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmüller J, Ishizaki T, Karakaya AE, Ladero JM, Mommsen S, Okkels H, Romkes M, Roots I, Rothman N (2000). Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case- series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (9) , S. 461-467.

Markman B, Dienstmann R, Tabernero J (2010). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway--beyond rapalogs. *Oncotarget* (7) 2010 , S. 530-543.

Marone R, Erhart D, Mertz AC, Bohnacker T, Schnell C, Cmiljanovic V, Stauffer F, Garcia-Echeverria C, Giese B, Maira SM, Wymann MP (2009). Targeting Melanoma with Dual Phosphoinositide 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors. *Mol Cancer Res* (7) , S. 601-613.

Matsubara H, Sakakibara K, Kunimitsu T, Matsuoka H, Kato K, Oyachi N, Dobashi Y, Matsumoto M (2012). Non-small cell lung carcinoma therapy using mTOR-siRNA. *Int J Clin Exp Pathol*. 5(2) , S. 119-25.

McMillin DW, Ooi M, Delmore J, Negri J, Hayden P, Mitsiades N, Jakubikova J, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Schlossman R, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS (2009). Antimyeloma Activity of the Orally Bioavailable Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer Res* (69) , S. 5835-5842.

Milowsky MI, Nanus DM, Maluf FC, Mironov S, Shi W, Iasonos A, Riches J, Regazzi A, Bajorin DF (2009). Final results of sequential doxorubicin plus gemcitabine and ifosfamide, paclitaxel, and cisplatin chemotherapy in patients with metastatic or locally advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Oncol*. 27(25) , S. 4062-4067.

Miyakawa M, Tsushima T, Murakami H, Wakai K, Isozaki O, Takano K (2003). Increased expression of phosphorylated p70S6 kinase and akt in papillary thyroid cancer tissues. *Endocr J*. (50) , S. 77-83.

Mo L, Cheng J, Lee EY, Sun TT, Wu XR (2005). Gene deletion in urothelium by specific expression of Cre recombinase. *American Journal of Physiology and Renal Physiology* (289) , S. 562-568.

Mo L, Zheng X, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Cordon-Cardo C, Sun TT, Wu XR (2007). Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation* (117) , S. 314-325.

Nanni P, Nicoletti G, Landuzzi L, Croci S, Murgo A, Palladini A, Antognoli A, Ianzano ML, Stivani V, Grosso V, Maira SM, García-Echeverría C, Scotlandi K, De Giovanni C, Lollini PL (2010). High metastatic efficiency of human sarcoma cells in Rag2/cc double knockout mice provides a powerful test system for antimetastatic targeted therapy. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* (46) , S. 659-668.

Nawroth R, Stellwagen F, Schulz WA, Stoehr R, Hartmann A, Krause BJ, Gschwend JE, Retz M (2011). S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer. *PLoS ONE* 6(11) .

Ng SS, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW (2001). Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* (7) , S. 3269-3275.

Niegisch G, Retz M, Thalgott MK, Balabanov S, Honecker F, Stöckle M, Ohlmann CH, Boegemann M, vom Dorp F, Gschwend J, Hartmann A, Ohmann C, Albers P (2012). Second-line treatment of advanced urothelial cancer with paclitaxel and RAD001 (everolimus) in a German phase II trial (AUO trial AB 35/09). *ASCO*.

Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström PU, Stöckle M, Sternberg C (2002). Guidelines on bladder. *Prog Urol* (12) , S. 1161-1163.

Otto T, Rübber. H. (2004). Prävention des Harnblasenkarzinoms. S. 562-264.

Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Beldegrun AS, Figlin RA (2007). Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. *Cancer* (109) , S. 2257-2267.

Pap M, Cooper GM (1998). Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* (273) , S. 375-387.

Park SJ, Lee TJ, Chang IH (2011). Role of the mTOR Pathway in the Progression and Recurrence of Bladder Cancer: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study. *Korean J Urol.* 52(7) , S. 466-473.

Peyromaure M, Scotté F, Amsellem-Ouazana D, Vieillefond A, Oudard S, Beuzeboc P (2005). Trastuzumab (Herceptin™) in Metastatic Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Tract: Report on Six Patients. *European Urology* (5)48 , S. 771-778.

Platt FM, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA (2009). Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clinical Cancer Research* (15) , S. 6008–6017.

Proud CG (2004) . mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* (313) , S. 429-236.

Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C (2009). Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes and Development* (23) , S. 675-680.

Qian CN, Furge KA, Knol J, Huang D, Chen J, Dykema KJ, Kort EJ, Massie A, Khoo SK, Vanden Beldt K, Resau JH, Anema J, Kahnoski RJ, Morreau H, Camparo P, Comperat E, Sibony M, Denoux Y, Molinie V, Vieillefond A, Eng C, Williams BO, Teh BT (2009). Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models. *Cancer Res.*(69) , S. 8256-8264.

- Raghavan D, Huben R (1995). Management of bladder cancer (19). *Curr Probl Cancer* , S. 1-64.
- Rehn (1895). Über Blasentumoren bei Fuchsarbeitern. *Arch Kind Chir* (50) , S. 588.
- Rieger-Christ KM, Mourtzinos A, Lee PJ, Zaghera RM, Cain J, Silverman M, Libertino JA, Summerhayes IC (2003). Identification of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in urine sediment DNA samples complements cytology in bladder tumor detection. *Cancer* (98) , S. 737–744.
- Robert-Koch-Institut. (2010). *Krebs in Deutschland 2005-2006. Häufigkeiten und Trends*. Berlin.
- Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* (370) , S. 572-532.
- Rosenwald I (2004). The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* (23) , S. 3230-3247.
- Rübber H, Otto T (1998). Harnblasenkarzinom. In *Uroonkologie* (S. 88-99). Springer.
- Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M (2004). mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res.*(10) , S. 8421-8425.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin- insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* (14) , S. 1296-1302.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* (307) , S. 1098-1101 .
- Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Peller PJ, Giannini C, Brown PD, Uhm JH, McGraw S, Jaeckle KA, Buckner JC (2010). North central cancer treatment group phase1 trial NO57K of everolimus (RAD001) and temozolomide in combination with radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* .
- Schnell CR, Stauffer F, Allegrini PR, O'Reilly T, McSheehy PM, Dartois C, Stumm M, Cozens R, Littlewood-Evans A, García-Echeverría C, Maira SM (2008). Effects of the Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BE235 on the Tumor Vasculature: Implications for Clinical Imaging. *Cancer Res* 2008 (68) , S. 6598-6607.
- Schultz L, Albadine R, Hicks J, Jadallah S, DeMarzo AM, Chen YB, Nielsen ME, Gonzalgo ML, Sidransky D, Schoenberg M, Netto GJ (2010). Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder After Cystectomy. *Cancer* . 116(23). S. 5517-26
- Seager CM, Puzio-Kuter AM, Patel T, Jain S, Cordon-Cardo C, Mc Kiernan J, Abate-Shen C (2009). Intravesical delivery of rapamycin suppresses tumorigenesis in a mouse model of progressive bladder cancer. *Cancer Prev Res* , S. 1008-1014.
- Seront E, Rottey S, Sautoi B, D'Hondt LA, Canon JR, Vandenbulcke J, Whenham N, Goeminne J, Verhoeven D, Machiels JH (2010). A single arm, multicenter, phase II trial of everolimus as

monotherapy in the palliative treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma after failure of platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* (28) .

Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, Botero ML, Llonch E, Atzori F, Di Cosimo S, Maira M, Garcia-Echeverria C, Parra JL, Arribas J, Baselga J (2008). NVP-BE235, a Dual PI3K/mTOR Inhibitor, Prevents PI3K Signaling and Inhibits the Growth of Cancer Cells with Activating PI3K Mutations. *Cancer Res* (68) , S. 8022-8030.

Seufferlein T, Rozengurt E (1996). Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* (56) , S. 3895-3897.

Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, Kozma SC (1998). Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* (17) , S. 6649-6659.

Slomovitz BM, Lu KH, Johnston T, Coleman RL, Munsell M, Broaddus RR, Walker C, Ramondetta LM, Burke TW, Gershenson DM, Wolf J (2010). A Phase 2 Study of the Oral Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor, Everolimus, in Patients With Recurrent Endometrial Carcinoma. *Cancer* 116(23):5415-9.

Smolewski P (2006). Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anti-Cancer Drug* (17) , S. 487-494.

Soloway MS, Ikard M, Ford K (1981). Cis-diamminedichloroplatinum (II) in locally advanced and metastatic urothelial cancer. *Cancer* (47) , S. 476-480.

Song G, Ouyang G, Bao S (2005). The activation of Akt/PKB signalling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* (9) , S. 59-71.

Stanik-Hutt JA (2004). Drug-coated stents: preventing restenosis in coronary artery disease. *J Cardiovasc Nurs.* (19) , S. 404-408.

Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng AC, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol.* (19) , S. 666-675.

Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Geller N, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughan ED, Bander N (1989). Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer* (64) , S. 2448-2458.

Tampellini M, Longo M, Cappia S, Bacillo E, Alabiso I, Volante M, Dogliotti L, Papotti M (2007). Co-expression of EGF receptor, TGFalpha and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at diagnosis. *Virchows Arch.* (450) , S. 321-328.

Tanaka M, Koul D, Davies MA, Liebert M, Steck PA, Grossman HB (2000). MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells. *Oncogene* (19) , S. 5406-5412.

Tickoo SK, Milowsky MI, Dhar N, Dudas ME, Gallagher DJ, Al-Ahmadie H, Gopalan A, Fine SW, Ishill N, Bajorin DF, Reuter VE (2010). Hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin pathway markers in urothelial carcinoma of the bladder: possible therapeutic implications. *BJUI* , S. 1464-1517.

Tobinai K, Ogura M, Maruyama D, Uchida T, Uike N, Choi I, Ishizawa K, Itoh K, Ando K, Taniwaki M, Shimada N, Kobayashi K (2010). Phase I study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in Japanese patients with relapsed or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol (92)* , S. 563–570.

Treiber U (2008). *Manual Urogenitale Tumore*. S. 83-139.

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 (2006). Hyperplasia and carcinomas in PTEN-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients. *Cancer Res 2006 (66)* , S. 8389–8396.

van der Hage JA, van den Broek LJ, Legrand C, Clahsen PC, Bosch CJ, Robanus-Maandag EC, van de Velde CJ, van de Vijver MJ (2004). Overexpression of P70 S6 kinase protein is associated with increased risk of locoregional recurrence in node-negative premenopausal early breast cancer patients. *Br J Cancer (90)* , S. 1543-1550.

van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC (2004). FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Research (64)* , S. 1911–1914.

Vanderkuur JA, Butch ER, Waters SB, Pessin JE, Guan KL, Carter-Su C (1997). Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology (138)* , S. 4301-4307.

Vasconcelos-Nóbrega C, Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Ferreira R, Brochado P, Cardoso ML, Palmeira C, Salvador A, Guedes-Teixeira CI, Colaço A, Palomino LF, Lopes C, Santos L, Oliveira PA (2011). In vivo and in vitro effects of RAD001 on bladder cancer. *Urol Oncol. 31(7):1212-21*.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN (1975). Rapamycin (AY-22,989) a new antifungal antibiotic. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (28)* , S. 721-726.

Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of Oncology (16)* , S. 525-537.

Voliva CF, Pecchi S, Burger M, Nagel T, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Menezes D, Knapp M, Shoemaker K, Wiesmann M, Huh K, Zaror I, Dorsch M, Sellers WR, Garcia-Echeverria C, Maira M(2010). Biological characterization of NVP-BKM120, a novel inhibitor of phosphoinositide 3-kinase in Phase I/II clinical trials. In: Proceedings of the 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research.

Vom Dorp F, Börgermann C, Rose A, Becker M, Rübber M (2008). Targeted-Therapie des metastasierten Urothelkarzinoms. *Urologe (47)* , S. 1311–1314.

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Bodrogi I, Albers P, Knuth A, Lippert CM, Kerbrat P, Sanchez Rovira P, Wersall P, Cleall SP, Roychowdhury DF, Tomlin I, Visseren-Grul CM, Conte PF (2000). Gemcitabine and Cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomised, multinational, multicenter phase III study. *J Clin Oncol* (18) , S. 3068–3077.

von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* (23) , S. 4602-4608.

Von Hoff DD, LoRusso PM, Tibes R, Mazina KE, Ware JA, Yan Y, Derynck MK, Demetr GD (2010). A first-in-human phase I study to evaluate the pan-PI3K inhibitor GDC-0941 administered QD or BID in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* (28) .

Wallace DM, Raghavan D, Kelly KA, Sandeman TF, Conn IG, Teriana N, Dunn J, Boulas J, Latief T (1991). Neo-adjuvant (pre-emptive) cisplatin therapy in invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol.* (67) , S. 608-615.

Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT (1995). Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res.*(1) , S. 53-71.

Willett M, Cowan JL, Vlasak M, Coldwell MJ, Morley SJ (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling in C2C12 myoblasts prevents myogenic differentiation without affecting the hyperphosphorylation of 4E-BP1. *Cell Signal* 21(10) , S. 1504-1512.

Witzig T, Habermann T, Reeder C, Micallef I, Ansell S, L. Porrata L , Johnston P, LaPlant B, Kabat B, Zent C, Zeldenrust S, Inwards D, Colgan J, Call T, Markovic S, Tun H (2009). A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed non- Hodgkin lymphom and Hodgkin disease. *Haematologica* (94) .

Wu MJ, Chang CH, Chiu YT, Wen MC, Shu KH, Li JR, Chiu KY, Chen YT (2009). Rictor-dependent AKT activation and inhibition of urothelial carcinoma by rapamycin. *Urologic Oncology* .

Wu X, Obata T, Khan Q, Highshaw RA, De Vere White R, Sweeney C (2004). The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* (93) , S. 143-150.

Wu XR(2009). Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. *Cancer Metastasis Rev* (28) , S. 281–290.

Wülfing C, Machiels JP, Richel DJ, Grimm MO, Treiber U, De Groot MR, Beuzebec P, Parikh R, Pétavy F, El-Hariry IA (2009). “A singlearm,multicenter, open-label phase 2 study of lapatinib as the second-line treatment of patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma,”. *Cancer* 115 (13) , S. 2881–2890.

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006). TOR Signaling in growth and metabolism . *Cell.* (124) , S. 471-484.

www.clinicaltrials.gov. (2012). Abgerufen am 2012

www.targetmtor.de. (2010). Abgerufen am Oktober 2010

Wynder EL, Goldsmith R (1977). The epidemiology of bladder cancer: a second look. *Cancer* (40) , S. 1246.

Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F (2008). Efficacy of RAD001 (Everolimus) and Octreotide LAR in Advanced Low- to Intermediate-Grade Neuroendocrine Tumors: Results of a Phase II Study. *J Clin Oncol* (26) , S. 4311-4318.

Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, Ferrajoli A, Thomas D, Wierda W, Apostolidou E, Albitar M, O'Brien S, Andreeff M, Giles FJ (2006). Phase I/II Study of the Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Everolimus (RAD001) in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* , S. 5165-5173.

Yoo LI, Liu DW, Le Vu S, Bronson RT, Wu H, Yuan J (2006). Pten deficiency activates distinct downstream signaling pathways in a tissue-specific manner. *Cancer Research* (66) , S. 1929-1939.

Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J (2008). S6K Directly Phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to Promote Insulin Resistance in Response to TNF-Alpha Signaling through IKK2. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 283(51) , S. 35375–35382.

Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, Xu MH, Chen GQ, Han ZG, Fang JY (2009). mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*.16(9) , S. 2617-28.

Zhang ZT, Pak J, Huang HY, Shapiro E, Sun TT, Pellicer A, Wu XR (2001). Role of Ha-ras activation in superficial papillary pathway of urothelial tumor formation. *Oncogene* (20) , S. 1973–1980.

Zhou L, Huang Y, Li J, Wang Z (2010). The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. (27) , S. 255-261.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
NM	Nano Mol
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AP23573	mTOR Inhibitor (Deforolimus)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Promoter der Apoptose, Bcl-2 hemmendes Protein
BBN	N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CCI779	mTOR Inhibitor (Temsirrolimus)
Cu	Kupfer
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelial Growth Factor
eIF	Eucaryotic translation Initiation Factor
Erk	Extracellular signal-regulated kinase

FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	Fetal Calf Serum (Foetales Kälberserum)
FGFR3	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
FKBP12	FK506-bindende Protein
Foxo	Transkriptionsfaktor
FSC	Forward scatter
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
Grb	Growth factor receptor-bound protein
GSK	Glycogen synthase kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Chlorwasserstoff
HER2	Human epidermal growth factor receptor
IC50	Konzentration, bei welcher 50% Inhibition erzielt wird
IGF	Insulin Growth Factor
IRS	Insulin-Rezeptor Substrat
kDa	Kilo Dalton
LY294002	PI3K Inhibitor (Wortmannin)
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MeOH	Methanol
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MP	Mercaptopurin
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-RNA)
mSin1	Mitotisch-aktiviertes-Proteinkinase-assoziertes Protein 1
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR-Komplex1 (beinhaltet mTOR, Raptor und GβL)

mTORC2	mTOR-Komplex2 (beinhaltet mTOR, Rictor, GβL und mSin1)
MVAC	Polychemotherapieschema aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
NACL	Natrium Chlorid
nM	Nano Molar
NVP-BEZ235	PI3K/mTOR Inhibitor
NVP-BGT226	PI3K/mTOR Inhibitor
NVP-BKM120	PI3K Inhibitor
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase isoform 1
PenStrep	Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und stabilisierendem Natriumchlorid zur Anwendung in der Zellkultur
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat PIP
PMS	Phenazinmethosulfat
PKB	Proteinkinase B
PMS	Phenazine Methosulfate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on Chromosome 10
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAD001	mTOR Inhibitor (Everolimus)
RAF	Rapidly growing fibrosarcoma
Raptor	Regulatory-associated Protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma Proto Oncogen
Rb	Retinoblastom
RHEB	regulatory associated protein of mTOR
Rictor	Rapamycin-insensitive Companion of mTOR
RPMI	Zellkulturmedium am Roswell Park Memorial Institute entwickelt

RT	Raumtemperatur
S6K1	S6 Kinase 1
S6RP	S6 Ribosomale Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Thr	Threonin
siRNA	Small interfering RNA
SOS	Son of sevenless
SSC	Sideward scatter
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamine
TGS	Triglycinsulfat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Tuberous sclerosis complex
TUR	Transurethrale Resektion
U	Unit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organisation
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Curriculum Vitae

Kieferngartenstraße 5

80939 München

flo090984@aol.com

Name: Florian Stellwagen

Geburtsdatum: 09. 09. 1984

Geburtsort: Mannheim

Staatsbürgerschaft: deutsch

Familienstatus: ledig

Schulen:

1991-1995: Gerhart Hauptmann Grundschule Mannheim, Rheinau-Süd

1995-2004: Johann-Sebastian-Bach Gymnasium, Mannheim-Neckarau

2004: Abitur

Studium:

2005: Aufnahme des Medizinstudiums an der LMU München

2008: erfolgreich bestandener erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2012: erfolgreich bestandener zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen: Anästhesiologie, Klinikum Schwetzingen
Kardiologie, Theresienkrankenhaus Mannheim
Allgemein- und Viszeralchirurgie, Diakonissenkrankenhaus Mannheim
Allgemeinmedizin in Hausärztlicher Versorgung
Dr. Gabriele Satke- Stellwagen (Beindersheim)

Praktisches Jahr: Anästhesiologie: Klinikum Fürstenfeldbruck
Chirurgie: Amper Klinikum Dachau
Innere Medizin: Amper Klinikum Dachau

Seit 01.08.2012 Assistenzarzt in Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin in der Abteilung für Innere Medizin II des Amper Klinikums Dachau.

Promotion:
2008-2012: Bedeutung des PI3K/mTOR Signalweges als Ziel einer Target-Therapie im Harnblasenkarzinom an der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München.
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

Sprachen: Deutsch (Muttersprache)
Englisch (flüssig)
Französisch (Grundkenntnisse)
Latein

10 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Nawroth R, **Stellwagen F**, Schulz WA, Stoehr R, Hartmann A, Krause BJ, Gschwend JE, Retz M

S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer.

PLoS One. 2011;6(11)

11 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen E. Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, für die Bereitstellung des Themas danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. Roman Nawroth, Leiter des Forschungslabors der Urologischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München, für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation und Unterstützung durch regelmäßige konstruktive Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich auch Claude Krämer, Doris Langer, Monika Moissl und Stephanie Rämisch danken, für die geduldige Einarbeitung, tatkräftige Unterstützung und eine schöne kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich meiner Familie, meiner Freundin Vanessa, und allen Freunden danken, die auch in dieser nicht einfachen Zeit immer zu mir gehalten haben.

Und nicht zuletzt allen fleißigen Korrekturlesern, die in den letzten Tagen vor Abgabe einige Nächte für das Gelingen dieser Arbeit geopfert haben.