

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend)

Charakterisierung der Rolle von PI3K auf die Regulation der
mTORC1-Substrate S6K1 und 4EBP1 in Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Immanuel Augustin Oppolzer

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend
2. apl. Prof. Dr. Margitta Retz
3. Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Die Dissertation wurde am 22.09.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 01.08.2018 angenommen

Für

Johannes, Fabian, Sonja und Wolfgang

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie	1
1.2	Pathologie	2
1.2.1	Grading	2
1.2.2	Staging	3
1.2.3	Prognose	4
1.3	Therapie des Harnblasenkarzinoms	4
1.4	Ätiologie	5
1.4.1	Risikofaktoren	5
1.4.2	Familiäre Disposition	7
1.5	Molekularbiologie des Harnblasenkarzinoms	7
1.6	Target Therapie	10
1.6.1	Die Anfänge der Target Therapie	10
1.6.2	Target Therapie im Harnblasenkarzinom	11
1.6.3	Target Therapie des PI3K-Signalweges	13
1.6.4	Der PI3K-Signalweg und seine Rolle im Harnblasenkarzinom	13
1.6.5	Inhibitoren des PI3K-Signalweges	17
2	Zielsetzung der experimentellen Promotionsarbeit	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Chemikalien	21
3.1.2	Kitsysteme	22
3.1.3	Geräte	22
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	24
3.1.5	Inhibitoren, Medikamente	26
3.1.6	Puffer und Lösungen	27
3.1.7	Antikörper	29
3.1.8	Zelllinien	30
3.2	Methoden	32
3.2.1	Zellkultur	32
3.2.2	Behandlung mit „small molecule“ Inhibitoren	33
3.2.3	Immunoblotting	33
3.2.4	CellTiter-Blue® Zell Viabilitäts Assay	39
3.2.5	Graphische Darstellung	40

3.2.6	Auswertung der IC-50 Werte	40
3.2.7	Auswertung der Doppelbehandlungen	40
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Proteinbiochemische Veränderung in humanen Harnblasenkrebszellen nach der Behandlung mit dem PI3K-spezifischen Inhibitor PIK90	42
4.2	Effekt der Behandlung humaner Blasenkrebszellen mit dem mTORC1-spezifischen Inhibitor RAD001	45
4.3	Zellviabilitäts-Analyse humaner Harnblasenkarzinomzellen mittels CellTiter-Blue® Zellviabilitäts-Assay nach Behandlung mit PIK90 oder RAD001	47
4.3.1	Zellviabilitäts-Analyse von 13 Harnblasenkarzinomzellen nach 72h Behandlung mit PIK90	47
4.3.2	Zellviabilitäts-Analyse von 13 Harnblasenkarzinomzellen nach 72h Behandlung mit RAD001	49
4.4	Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die Behandlung mit PIK90 oder RAD001 und den genetischen Veränderungen der Zelllinien.....	52
4.5	Duale Behandlung ausgewählter Zelllinien mit PIK90 und RAD001 – Beeinflussung von 4EBP1 und des Zellwachstums im Vergleich zur Monotherapie.....	53
4.5.1	Immunoblotting der Zelllinien RT112, J82 und 639v nach dualer Behandlung mit PIK90 und RAD001	54
4.5.2	Zellviabilitäts-Assay nach 72h dualer Behandlung der Harnblasenkarzinom-Zelllinien RT112, J82 und 639v mit PIK90 und RAD001.....	56
5	Diskussion.....	59
5.1	Inhibition von PI3K mittels PIK90	59
5.2	Selektive Inhibierung von mTORC1 durch RAD001	62
5.3	Effekte durch duale Therapie mit PIK90 und RAD001	65
6	Zusammenfassung.....	71
7	Veröffentlichungen und Preise	73
7.1	Preise	73
7.2	Vorträge	73
7.3	Veröffentlichungen.....	73
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	74
8.1	Abbildungen	74
8.2	Tabellen	77
9	Literaturverzeichnis.....	78

10 Danksagung..... 87

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
nmol	Nanomol
µmol	Mikromol
mmol	Millimol
V	Volt
°C	Grad Celcius
s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
AACR	American Association for Cancer Research
AKT	V-akt murine thymoma viral oncogene
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BCA	Bicinchoninsäure
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2
BKM-120	Buparlisib
BSA	Kälberalbumin (Bovine serum albumin)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CCL	Cancer Cell Line Encyclopedia
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	Cyclin-dependent kinase Inhibitor
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
CI	Kombinationsindex
CIS	Carcinoma in situ
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COSMIC	Datenbank somatischer Krebsmutationen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEPTOR	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure

DTT	Dithiothreitol
EAU	European Association for Urology
ECL	Association of European Cancer Leagues
E-Cad	E-calcium-dependent adhesion
ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 im Menschen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EGFR2	Epidermal growth factor receptor type 2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor-3
FOXO	Forkhead-BOX-Protein
GC	Gemcitabine, Cisplatin
GTP	Guanosin-Triphosphat
H2O2	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HCT	Hydrochlorothiazid
HD	Helikale Domäne
HRAS	GTPase HRas
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSP	Hitzeschockproteine
IC	Konzentration bei der ein Inhibitor inhibiert
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS-1	Insulinrezeptor substrat -1
KD	Kinase Domäne
Kontr.	Kontrolle
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEOH	Methanol
MIBC	Muscle Invasive Bladder Cancer
miRNA	Micro-RNA
mLST8	Mammalian Lethal with Sec13 protein 8
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
mTORC1	MTOR Komplex 1
mTORC2	MTOR Komplex 2
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin
mSIN1	Mammalian Stress-Activated Protein Kinase-Interactin Protein 1
NaCL	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
N-cad	N-calcium-dependent adhesion
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NMIBC	Non-Muscle Invasive Bladder Cancer
NVP	N-Vinyl-2-pyrrolidon
P	Phosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PDK1	Protein Dependent Kinase 1
pH	Potentia Hydrogenii
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRAS40	Proline-Rich Akt Substrate 40
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raptor	Regulatory Associated Protein of mTOR
Ras	Rat Sarcoma
RB	Retinoblastom
RZB/ RCF	Zentrifugalbeschleunigung (Relative Centrifugal Force)
Rictor	Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S6K1	Ribosomal Protein S6 Kinase Beta-1
SCC	Plattenepithelkarzinome (Squamous Cell Carcinoma)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	Serin
SH2	Src homology domain-2
siRNA	Small Interfering RNA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline with Tween-20
TCCGA	Der Krebs Genom Atlas
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Thr	Threonin
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastase
TP53	Tumor Protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
TURB	Transurethrale Resektion der Harnblase
UroA	Urobasal A
UroB	Urobasal B
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Immunoblotting
WT	Wild Type

1 Einleitung

Das Harnblasenkarzinom ist eine komplexe, heterogene Erkrankung, die in den meisten Fällen vom Urothel ausgeht. Die Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Karzinoms bietet bisher kein zufriedenstellendes Ergebnis und die Erkrankung ist somit noch immer mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet.

1.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der ableitenden Harnwege und die neunthäufigste Krebserkrankung weltweit (Ploeg *et al.*, 2009). 2012 lag die Inzidenz weltweit bei ca. 429 000 Neuerkrankungen und die Mortalität bei ca. 165 000 (Ferlay *et al.*, 2015). Laut Robert-Koch-Institut betrug in Deutschland die Prävalenz für ein invasives Harnblasenkarzinom im selben Jahr 15 400 Menschen, davon 4 300 Frauen. Männer waren somit ca. viermal so häufig von einem Harnblasenkarzinom betroffen wie Frauen (GEKID, 2015; Parkin *et al.*, 2005). Die Mortalität in Deutschland lag bei 5 500 Erkrankten. Die Sterberate war bei betroffenen Frauen etwas höher (GEKID, 2015).

Viele, die an einem Harnblasenkarzinom Erkrankten sterben nicht an dieser Erkrankung. Häufig aber kommt es zu Rezidiven, die eine erneute Behandlung erfordern. Somit ist das Harnblasenkarzinom in den älteren Bevölkerungsgruppen eine der häufigsten und, durch die lange Behandlungsdauer, teuersten Krebsentitäten (Botteman *et al.*, 2003; Feldman *et al.*, 1986; Sievert *et al.*, 2009; Vercelli *et al.*, 1999). Die Erkrankung tritt häufiger bei Kaukasiern als bei Afrikanern, Indianern, Lateinamerikanern und Asiaten auf (GEKID, 2015; NIH, 2016). Die höchste Inzidenz findet sich dabei in den USA, Nord-Europa und Australien, die niedrigste in Asien und in Afrika (John N. Eble, 2004; Pelucchi *et al.*, 2006). Das Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, steigt mit dem Alter. Nur jeder Vierte erkrankt vor dem 65. Lebensjahr. In Deutschland beträgt das mittlere Alter bei Diagnosestellung 73 Jahre für Männer und 76 Jahre für Frauen (GEKID, 2015).

1.2 Pathologie

In Europa und den USA geht der Tumor in 90-95 % der Fälle vom Urothel aus, in ca. 2 % sind es Plattenepithelkarzinome und in 1-2 % liegt ein Adenokarzinom zugrunde. Die häufigste Lokalisation des Urothelkarzinoms ist die Harnblase (John N. Eble, 2004). Es kann jedoch überall dort entstehen, wo die Oberfläche mit Urothel ausgekleidet ist, also auch im Nierenbecken und im Harnleiter. Andere Tumorarten der Harnblase, wie Sarkome oder Lymphome, stellen eine seltene Ausnahme dar. Die Wand der Harnblase setzt sich aus vier bis sieben Schichten zusammen: dem Urothel, das in Abhängigkeit der Füllung der Harnblase in der Schichtdicke variiert, der darunter liegenden Lamina Propria, der Muscularis Propria und der Adventita oder Serosa, die die Blase vom umgebenden Gewebe begrenzen (John N. Eble, 2004).

1.2.1 Grading

Beim Harnblasenkarzinom wird zwischen dem nicht-muskelinvasiven Karzinom („Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer“; NMIBC) und dem muskelinvasiven Karzinom („Muscle-Invasive Bladder Cancer“; MIBC) unterschieden.

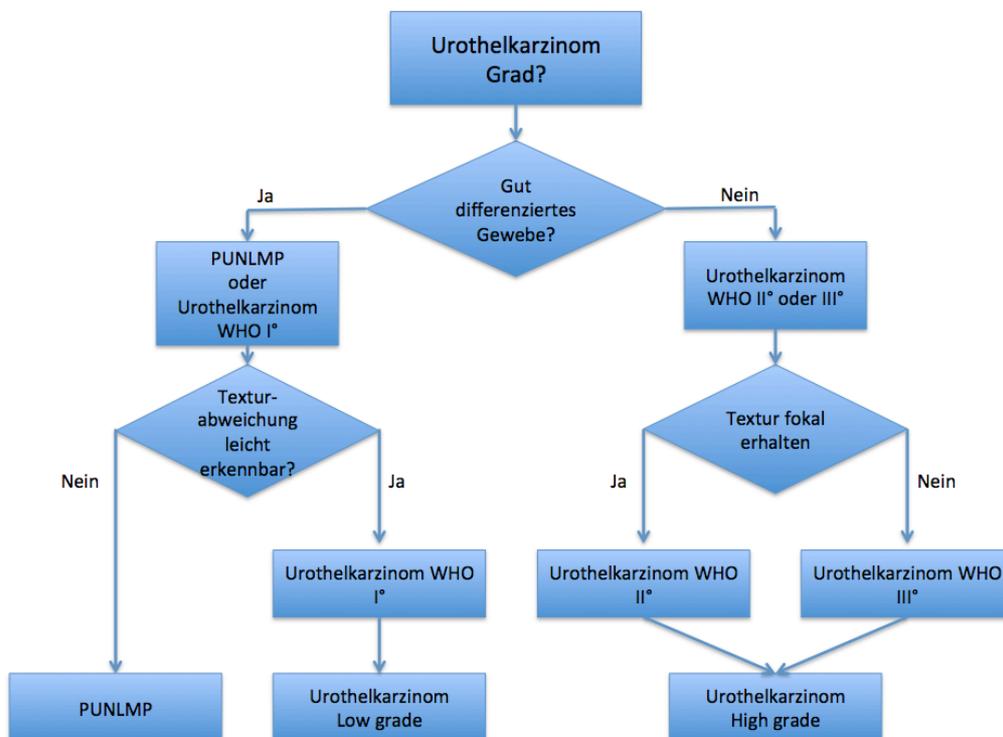


Abbildung 1.1 Flussdiagramm des Gradings eines nicht-invasiven Harnblasenkarzinoms. PUNLMP: „Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential“, modifiziert nach Busch und Algaba 2002 (Busch and Algaba, 2002)

Eine weitere Unterteilung erfolgt bei den nicht-invasiven Urothelkarzinomen in „Low Grade“ und „High Grade“ nach dem Schema der WHO (Abbildung 1.1), basierend auf dem Grad der Zellatypien und des Differenzierungsverlustes (John N. Eble, 2004).

1.2.2 Staging

Die wichtigste Information für das Staging eines Harnblasenkarzinoms ist die Eindringtiefe in die Wandschichten (Magi-Galluzzi, 2013). Diese Information findet sich im T-Stadium des TNM-Schemas der „Union Internationale Contre le Cancer“ (UICC) wieder (UICC, 2009). Abhängig von der TNM-Klassifikation und der WHO-Einteilung erfolgt die Stadieneinteilung und die Behandlung (Magi-Galluzzi, 2013).

Abbildung 1.2 und Tabelle 1.1 geben einen Überblick über das TNM-Schema der UICC von 2002, die Stadieneinteilung anhand des TNM-Stadiums und mögliche Therapien laut der S3-Leitlinie des Harnblasenkarzinoms.

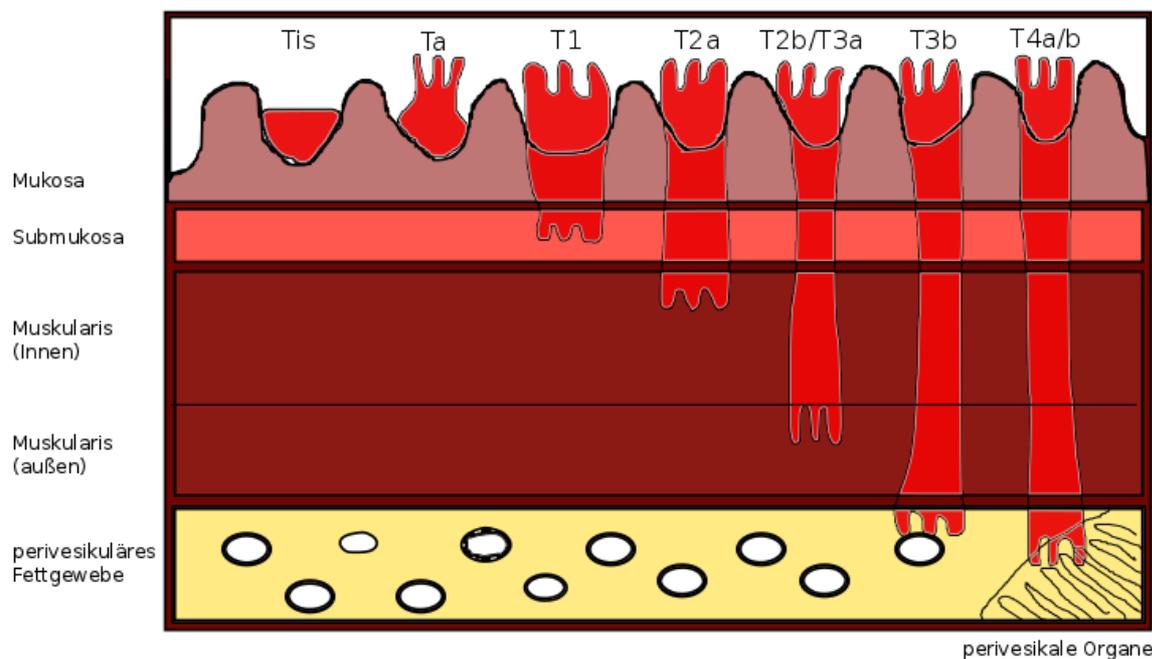


Abbildung 1.2 Schematische Abbildung der T-Stadien beim Harnblasenkarzinom. Modifiziert anhand der TNM Klassifikation des UICC (UICC, 2009)

Stadium	TNM Klassifikation	mögliche Therapie laut S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom
Stadium 0a	Ta, N0, M0	TURB +/- Installationstherapie
Stadium 0is	Tis, N0, M0	TURB +/- Installationstherapie
Stadium I	T1, N0, M0	TURB +/- Installationstherapie
Stadium II	T2a, b, N0, M0	Zystektomie +/- Chemotherapie
Stadium III	T3a, b, T4a, N0, M0	Zystektomie +/- Chemotherapie
Stadium VI	T4b, N0, M0 jedes T, N+ und/oder M+	Chemotherapie

Tabelle 1.1 Stadieneinteilung des UICC In Abhängigkeit der TNM Klassifikation. Therapievorschläge gemäß der S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie, 2016).

Das nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinom, das ca. 70 % der Karzinome bei Diagnosestellung ausmacht, rezidiert in 50-70 % der Fälle. Ein Progress hin zu einem muskelinvasiven Karzinom ist jedoch mit 15 % relativ selten (Prout *et al.*, 1992). Das muskelinvasive Karzinom verhält sich jedoch hochstaggessiv, schreitet schnell fort und neigt zur Metastasierung. (Kamat *et al.*, 2016).

1.2.3 Prognose

Die „American Cancer Society“ gab 2014 ein 5-Jahres-berleben von 78 % an. Für nicht-invasive Karzinome waren es 96 %. Für invasive Karzinome sank die 5-Jahres-Überlebensrate von 70 % für lokal begrenzte auf 5 % für metastasierte Karzinome (ACS, 2014). Dabei waren das Staging und der Lymphknotenstatus unabhängige prognostische Faktoren (Hautmann *et al.*, 2012).

1.3 Therapie des Harnblasenkarzinoms

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms unterscheidet zwischen oberflächlichen Tumoren (pTis, pTa, pT1) und muskelinvasiven Tumoren (\geq pT2). Oberflächliche Tumore werden standardmäßig mittels einer transurethralen Resektion des Blasentumors und einer anschließenden Instillationstherapie mittels Mitomycin oder Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) behandelt. Die Standardtherapie beim muskelinvasiven Tumor ist hingegen die radikale Zystektomie, welcher stadienabhängig eine Chemotherapie vorausgehen kann. Kommt es zum Wiederauftreten der Erkrankung oder zu einer Metastasierung, ist eine Chemotherapie indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2016). Das Standardschema

hierfür besteht seit über 25 Jahren aus Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin (Adriamycin) und Cisplatin (M-VAC). Hierdurch wird ein medianes Überleben von 12-15 Monaten erreicht (Sternberg *et al.*, 1988). Ähnliche Überlebensraten bei niedrigerer Toxizität bietet Gemcitabin plus Cisplatin (GC) (von der Maase *et al.*, 2005), das als gleichwertiges Schema in der Behandlung genutzt wird. Als Zweitlinientherapie ist Vinflunin, mit einem Überlebensvorteil von 6,9 Monaten gegenüber 4,6 Monaten unter „Best Supportiv Care“ (BSC), durch die Europäische Arzneimittel-Agentur zugelassen (Bellmunt *et al.*, 2013; Leitlinienprogramm Onkologie, 2016). Seit 2016 ist durch die „Food and Drug Administration“ (FDA) mit Atezolizumab (Tecentriq®) ein Immuntherapeutikum für die Behandlung von Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinom, bei denen es zu einem Fortschreiten oder Wiederauftreten der Erkrankung nach einer Chemotherapie kommt, zugelassen (AACR, 2016). Dieses wird in Kapitel 1.6.2 besprochen. Seit der Einführung der platinbasierten Chemotherapie im Jahr 1985 hat sich die Prognose des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms nicht wesentlich gebessert. Es gab kaum klinisch relevante Veränderungen bezüglich der Mortalität (Abdollah *et al.*, 2013). Somit besteht ein dringender Bedarf für eine Weiterentwicklung der Therapie.

1.4 Ätiologie

Die Exposition des Urothels gegenüber dem Urin und seinen toxischen Metaboliten ist wahrscheinlich für die meisten Harnblasenkarzinome auslösend. Die potentiellen Karzinogene sind entweder Ausscheidungsprodukte im Urin oder Stoffe die im Urin aktiviert werden.

1.4.1 Risikofaktoren

Rauchen ist der wesentliche Risikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms in den westlichen Ländern. In einer großen prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass die Hazard Ratio für Männer mit 3.89 und für Frauen mit 4.65 für Raucher deutlich erhöht war. Auch für frühere Raucher war das Risiko an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken noch deutlich erhöht (Freedman *et al.*, 2011). Jedoch reduziert sich das Risiko nach Beendigung des Nikotinabusus in 25 Jahren um 60 % (Brennan *et al.*, 2000). Im Zigarettenrauch sind über 60 bekannte Karzinogene und Sauerstoffradikale vorhanden. Für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms werden vor allem die aromatischen Amine im Zigarettenrauch

als ursächlich angenommen (Hecht, 2006). Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Harnblasenkrebs und aromatischen Aminen --vor allem 2-Naphthylamine, Benzidine und deren Vorstufen und Derivate-- konnte in epidemiologischen Studien und Laborversuchen nachgewiesen werden (Kogevinas *et al.*, 2003; Steineck *et al.*, 1990; Vineis and Pirastu, 1997).

Es wird angenommen, dass die Exposition am Arbeitsplatz gegenüber bestimmten chemischen Substanzen für 5-10 % der Harnblasenkarzinome verantwortlich ist (Kogevinas *et al.*, 2003). Hier sind vor allem Arbeiter in der Färbemittelindustrie, der Gummiindustrie, im Güterkraftverkehr, im Leder verarbeitenden Handwerk, sowie Maler, Lackierer, Metallarbeiter, Automechaniker und Friseure betroffen (Bosetti *et al.*, 2005; Gaertner *et al.*, 2004; Kogevinas *et al.*, 2003; Takkouche *et al.*, 2009).

Risikofaktor	Karzinogen oder Karzinogenese	Bewertung
Berufliche Belastung		
Aromatische Amine Färbemittelindustrie Gummiindustrie Maler Gerber Metallindustrie Lastwagenfahrer Friseure	Exposition gegenüber karzinogenen Chemikalen wie z.B. aromatischen Aminen, polzyklischen Hydrokarbonen Dieseldämpfe reduziertes Entleeren der Blase	für aromatische Amine besteht ein reeller Zusammenhang
Ernährung		
Karzinogene im Trinkwasser	z.B Chlor, Arsen	für Arsen reell, möglich für andere
Erkrankungen des Harntraktes		
Schistosoma haematobium Zystitis andere	Chronische Inflammation und/oder erhöhter Metabolismus	für Schistosoma haematobium besteht ein reeller Zusammenhang
Medikamente		
Phenacetin Cyclophosphamid		Reell
Andere		
positive Familienanamnese	Genetische Prädisposition	Reell
Genetische Polymorphismen von Genen, die in die Entgiftung von aromatischen Amine eingebunden sind (NAT1/NAT2, GTSM1)	erhöhte Spiegel kanzerogener Substanzen im Urin	Reell
Rauchen	Aromatische Amine und andere Kanzerogene	Reell

Tabelle 1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Frei nach Pelucchi *et al.* 2006(Pelucchi *et al.*, 2006)

Das Risiko an, Blasenkrebs zu sterben, bleibt für über 30 Jahre nach Beendigung der Arbeit erhöht (Pira *et al.*, 2010). Insgesamt wurden zwischen 1978 und 2010 in der BRD ca. 2000 Harnblasentumore als Berufserkrankungen anerkannt (Butz, 2012). Auch zu nennen ist die vor allem in Afrika und Teilen Asiens auftretende Bilharziose, ausgelöst durch *Schistosoma haematobium*. Hierbei kommt es aber vermehrt zum Auftreten eines Plattenepithelkarzinoms (Hicks *et al.*, 1977). In Tabelle 1.2 werden die wichtigsten Risikofaktoren nochmals aufgeführt und bewertet.

1.4.2 Familiäre Disposition

Ein erhöhtes Risiko besteht, wenn Verwandte an einem Harnblasenkrebs erkrankt sind (Aben *et al.*, 2002). Besonders hoch ist es, wenn die Diagnose dabei vor dem 60. Lebensjahr gestellt wurde (Goldgar *et al.*, 1994).

1.5 Molekularbiologie des Harnblasenkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom ist eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung, die sich durch eine besondere Tumorbilogie auszeichnet. Man spricht von einem „Zwei-Krankheiten-Modell“. Einerseits gibt es die nicht-invasiven „Low-Grade“-Tumore und andererseits die, über den Zwischenschritt CIS entstehenden, muskelinvasiven Tumore. Ein dritter Weg, der über Hyperplasie und Dysplasie des Urothels zu einem „High-Grade“-Tumor und später zu einer muskelinvasiven Erkrankung führt, wird diskutiert. Man geht im Normalfall davon aus, dass sich ein „Low-Grade“-Tumor, aufgrund seiner genomischen Stabilität, nicht in ein invasives Karzinom weiterentwickelt, aber zu einem lokalen Rezidiv führen wird (Knowles, 2006; Knowles and Hurst, 2015; Lindgren *et al.*, 2006). Vergleicht man die Entstehung eines nicht-invasiven Urothelkarzinoms mit der eines invasiven Urothelkarzinoms, so fällt auf, dass bei ersterem die Urothelzellen vermehrt durch Rezeptor-Tyrosin-Kinase vermittelte Signalwege aktiv sind (Wu, 2005). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein hyperaktives H-Rat Sarcoma (Ras) ausreichend ist, um ein nicht-invasives Urothelkarzinom hervorzurufen und H-Ras in ca. 30 % der Ta-Tumoren mutiert ist. In 50-80 % der Ta-tumoren ist der „Fibroblast Growth Factor Receptor 3“ (FGFR3) verändert (Cappellen *et al.*, 1999; Mo *et al.*, 2007; van Rhijn *et al.*, 2004). FGFR3 aktiviert den „Mitogen-Activated Protein Kinase“ (MAPK) -Signalweg (Kanai *et al.*, 1997). Da die Mutationen sehr selten gemeinsam auftreten, ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Ta-Tumore durch eine der beiden Veränderungen bedingt ist

(Jebar *et al.*, 2005; Wu, 2005). Mo *et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass abhängig von der Aktivität von FGFR3 oder H-Ras erst der MAPK-Signalweg und dann der „Phosphoinositid-3-Kinase“ (PI3K)/ „v-akt Murine Thymoma Viral Oncogene“ (AKT) (PI3K/AKT)- und „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT)-Signalweg aktiviert wurden (Mo *et al.*, 2007). Im invasiven Harnblasenkarzinom, das ca. 20-30 % der Karzinome ausmacht, findet man in etwa 50 % der Fälle Defekte von „Retinoblastoma Protein“ (pRB) und p53 (Mitra *et al.*, 2006). TP53 ist ein sehr häufig mutiertes Gen in menschlichen Tumoren und sein Produkt p53 ist entscheidend für die Kontrolle der Apoptose innerhalb des Zellzykluses und der genetischen Stabilität (Vogelstein *et al.*, 2000).

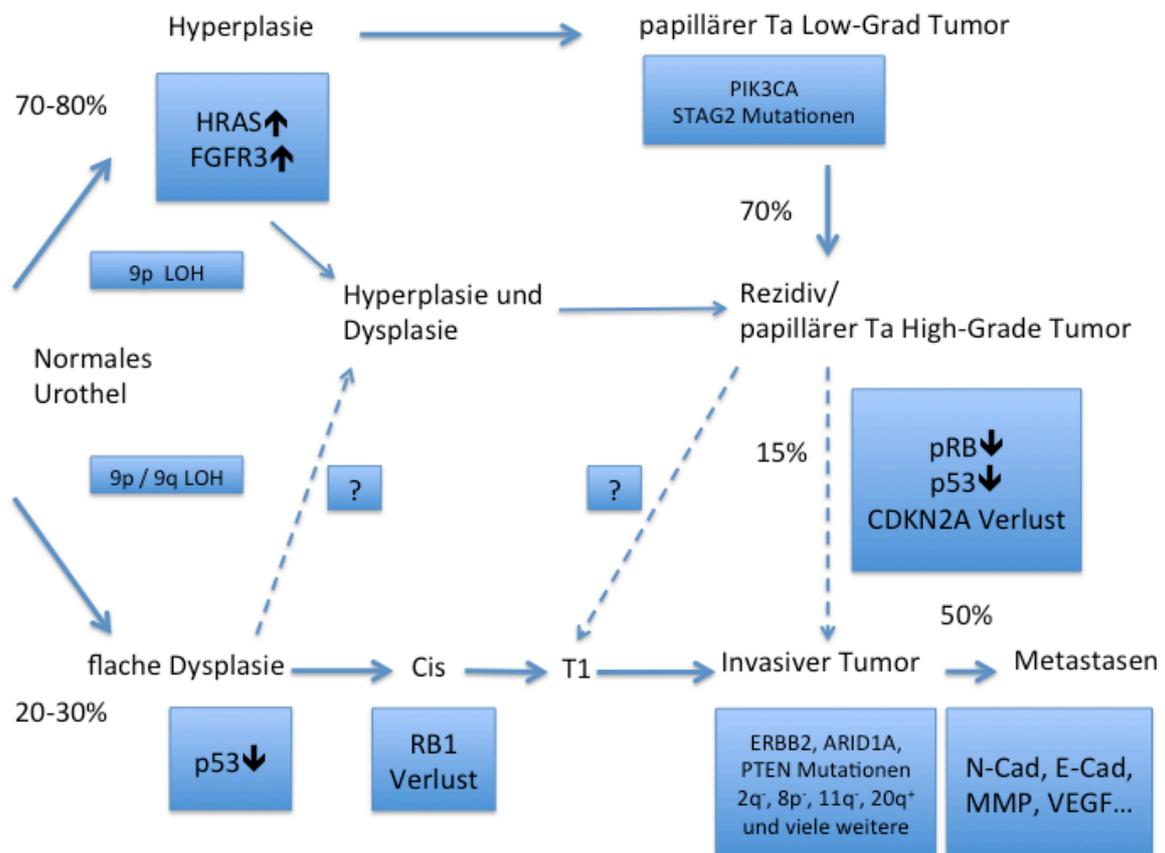


Abbildung 1.3 Das Zwei-Krankheiten-Modell. In der Mehrzahl der Fälle ist die Entwicklung einer Hyperplasie mit Mutation in HRAS und FGFR3 zu beobachten. Dies führt zu einem nicht-invasiven Tumor. In invasiv wachsenden Tumoren wird häufig eine Mutation für RB und p53 nachgewiesen. Modifiziert nach Wu (Wu, 2005); Knowles und Hurst (Knowles and Hurst, 2015).

Im Mausmodell war jedoch weder der Ausfall von pRB und p53 alleine noch gemeinsam ausreichend, um ein muskelinvasives Harnblasenkarzinom zu verursachen. Sie scheinen nötig für die Tumorentstehung, aber erst die Behandlung mit Butyl-Nitrosamin (BBN) induziert ein invasives Karzinom. Dies ist auf die

Herunterregulierung von p107, einem Protein aus der pRb-Familie, zurückzuführen (He *et al.*, 2009). Beide Subtypen zeigen häufig eine Deletion des Chromosoms 9. Dadurch beeinflusst sind vor allem die Tumorsuppressorgene CDKN2A, CDKN2B, TSC1, PTCH1 und DBC1 (Knowles and Hurst, 2015). Das muskelinvasive Karzinom zeigt dabei gehäuft Alterationen in Genen, welche die DNA-Reparatur, die Regulation von Chromatin, die Adhäsion und die Sekretion beeinflussen. Diese Vielzahl an Alterationen begünstigen das Auftreten von weiteren chromosomalen Aberrationen wie die Deletion von 8p, 2q, 11q (Kandoth *et al.*, 2013; Knowles and Hurst, 2015). In Abbildung 1.3 ist das sogenannte „Zwei-Krankheiten-Modell“ als Schaudiagramm dargestellt.

Das „Zwei-Krankheiten-Modell“ reicht jedoch nicht aus, um die großen Unterschiede im klinischen Verhalten innerhalb der Subgruppen zu erklären. Darum wurde das Konzept um Daten aus der Molekularforschung erweitert. Man versuchte Alterationsmuster festzustellen, die eine bessere Einteilung der Krankheit zulassen, mit Staging, Grading und dem Outcome korrelieren und somit eine personalisierte Behandlung ermöglichen (Knowles and Hurst, 2015). So haben Sjødahl *et al.* eine Unterteilung in fünf Subtypen unternommen: „Urobasal A“ (UroA), „Urobasal B“ (UroB), „Genomisch instabil“ (GU), „Plattenepithelzellähnlich“ (SCCL) und „Infiltriert“ (von Nicht-Tumorzellen durchwachsen). In Anlehnung an die Einteilung im Brustkrebs wurde der Vorschlag gemacht, das „Plattenepithelzellähnliche“ als „Basal“ zu bezeichnen (Sjodahl *et al.*, 2012; Sjødahl *et al.*, 2013). Diese Subtypen korrelieren nur bedingt mit der pathologischen Einteilung, was den Schluss zulässt, dass verschiedene Tumordignitäten in der pathologischen Einteilung in gleiche Gruppen klassifiziert werden, wie in Tabelle 1.3 dargestellt.

	UroA	UroB	GU	SCCL/ Basal	Infiltriert
TNM	vor allem Ta, auch T1	hauptsächlich $\geq T2$	$\geq T2$ und T1	hauptsächlich $\geq T2$,	hauptsächlich $\geq T2$, einige Ta und T1
Prognose	gut	schlecht	intermediär	schlecht	intermediär

Tabelle 1.3 Fünf Subtypen des Harnblasenkarzioms. Urobasal A (UroA), Urobasal B (UroB), Genomisch instabil (Genomic Unstabel; GU), Plattenepithelzellähnlich („Squamosa Cell Carnimoa-Like“ (SCCL)/ Basal) und Infiltrativ. Frei nach Sjødahl 2012.

In weiteren Studien wurde das MIBC in einen „Basaltyp“ und einen „Luminaltyp“ eingeteilt (Damrauer *et al.*, 2014). Choir *et al.* definierten noch einen „p53-like“

Zwischentyp, der als Besonderheit ein Wild-Typ p53, niedrigere Proliferationsraten und viel Extrazellulärmatrix besitzt, sich am ehesten mit der „Infiltriert“-Gruppe von Sjö Dahl vergleichen lässt und interessanterweise eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapie aufweist (Choi *et al.*, 2014; Knowles and Hurst, 2015). Die „Cancer Genome Atlas“-Studie hat ein Vier-Klaster-Modell aufgestellt, das ähnlich der Einteilung von Sjö Dahl ist, sich jedoch auf invasive Tumore beschränkt (NIH, 2014). Bisher ist aber noch keine endgültige Lösung gefunden worden und es existieren auch noch keine klinisch etablierten Untersuchungsmethoden, um diese Erkenntnisse in die allgemeine Diagnostik und Behandlung umsetzen zu können. Es ist aber sehr unwahrscheinlich geworden, dass das Zwei-Krankheiten-Konzept die Diversität der Erkrankung im Vollen erfasst (Knowles and Hurst, 2015).

1.6 Target Therapie

Unter „Target Therapie“ wird eine Behandlung verstanden, die sich gezielt gegen Moleküle von Tumorzellen richtet. Dies kann mit sogenannten „Small Molecules“ innerhalb der Zelle oder durch Antikörper z. B. gegen Rezeptoren von außen erfolgen. Die Idee ist hierbei, Signalwege der Zelle, die durch die Krebserkrankung verändert sind, zu beeinflussen. Diese Veränderungen führen oft über eine „Gain-of-Function“- (GOF)-Mutation eines Protoonkogens oder „Loss-of-Function“ (LOF)-Mutation eines Tumorsuppressorgens zu einem Vorteil der Zelle in Wachstum und Proliferation gegenüber Normalgewebe. Hanahan und Weinberg haben dies im Jahr 2011 als die zehn „Hallmarks of Cancer“ bezeichnet (Hanahan and Weinberg, 2011).

1.6.1 Die Anfänge der Target Therapie

Der erste erfolgreiche Versuch einer zielgerichteten Therapie war die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) mit dem Proteinkinaseinhibitor Imatinib, welcher sich gegen die, durch Chromosomentranslokation (Philadelphia Chromosom t(9,22)) ständig aktive, Tyrosinkinase BCR-Abl richtet (Druker, 2008).

Seitdem gibt es für mehrere andere Krebserkrankungen eine Reihe von Target Therapien. In der Behandlung des Melanoms wird z. B. Vemurafenib, ein „B- Rapidly Accelerated Fibrosarcoma“ (BRAF) -Kinaseinhibitor, bei Patienten mit der BRAF-Mutation V600E mit einem fünfzig-prozentigem Ansprechen, eingesetzt (Chapman *et al.*, 2011). Im Brust- und Magenkarzinom gab es einen Prognosesprung für HER2/neu positive Krebsentitäten seit dem Einsatz des Her2-Antikörpers

Trastuzumab. So wurde im Brustkrebs Trastuzumab (in Kombination mit der Standardchemotherapie) eingesetzt und erbrachte ein um fünf Monate verlängertes medianes Überleben (25,1 vs. 20,3 Monate) (Roskoski, 2014; Vogel *et al.*, 2002).

Imatinib und Trastuzumab waren die ersten Medikamente, die für Tumore durch die FDA in der zielgerichteten Krebstherapie zugelassen wurden. Sie sind ein gutes Beispiel dafür, dass man für eine zielgerichtete Therapie ein sehr gutes Verständnis der einzelnen Karzinome und ihrer spezifischen Tumorbiologie braucht.

1.6.2 Target Therapie im Harnblasenkarzinom

Nachdem es seit sehr langer Zeit keine Fortschritte in der Therapie des Harnblasenkarzinoms gab, hat die FDA 2016 den „Programmed Death Ligand 1“ (PD-L1) -Blocker Atezolizumab (Tecentriq®) zur Zweitlinientherapie im fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom zugelassen. Dies ist gleichzeitig die erste Zulassung eines PD-L1-Blockers in der modernen Krebstherapie (AACR, 2016). Checkpoint-Inhibitoren wie Atezolizumab, einem monoklonalen Antikörper gegen PD-L1, verhindern eine Abschwächung der Immunantwort gegenüber Krebszellen bzw. fördern diese. In der Studie von Rosenberg *et al.* konnte eine objektive Ansprechrates bei 15 % der Patienten, mit einem medianen Überleben von 7.9 Monaten, beobachtet werden. 84 % (38/45) der Patienten wiesen ein Langzeitansprechen auf. Patienten mit PD-L1 Expression zeigten mit einer objektiven Ansprechrates von 26 % ein besseres Ansprechen auf die Therapie. (Rosenberg *et al.*, 2016). Interessanterweise ist PD-L1 in 12 % der Tumorzellen und in bis zu 50 % der Zellen von Tis-Tumoren nachweisbar (Inman *et al.*, 2007).

Versuche mit anderen Target Therapeutika gab es die letzten Jahre viele, jedoch konnte keine der klinisch getesteten Substanzen ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielen. So musste ein erster Versuch einer Kombinationstherapie von Cisplatin, Gemcitabine und Gefitinib, einem oralen „Epidermal Growth Factor Receptor“ (EGFR) -Tyrosinkinaseinhibitor, wegen erhöhter Toxizität abgebrochen werden. Eine Änderung des Therapieschemas führte zwar zu tolerablen Nebenwirkungen, eine Verbesserung in der Therapie des metastasierten Harnblasenkarzinoms konnte jedoch nicht festgestellt werden (Philips *et al.*, 2008; Philips *et al.*, 2009). Ähnlich unzufriedenstellende Ergebnisse ergaben Studien mit den Multityrosinkinaseinhibitoren Sunitinib (Bellmunt *et al.*, 2011; Gallagher *et al.*, 2010), Sorafenib (Dreicer *et al.*, 2009; Sridhar *et al.*, 2011), Pazopanib (Necchi *et al.*, 2012)

und Lapatinib (Wulfing *et al.*, 2009). Ein Problem war sicherlich, dass fast alle dieser Studien nur sehr geringe Fallzahlen aufwiesen, meist schwerkranke, „austherapierte“ Patienten einschlossen und eine Präselektion anhand des Mutationstatus des Karzinoms vermissen ließen. Für eine Studie mit Trastuzumab in Kombination mit Gemcitabine und Cisplatin wurde eine Präselektion für eine Her2/Neu-Überexpression vorgenommen. Eine Amplifikation konnte in ihrem Kollektiv bei 50 % gefunden werden. Die Ansprechrate lag bei 57 %, jedoch kam es auch zu erhöhten Nebenwirkungsraten (Hussain *et al.*, 2007). Versuche mit sogenannten „Rapalogs“ (Rapamycin Analoga), die direkt gegen das „mechanistic Target of Rapamycin Complex 1“ (mTORC1) gerichtet sind, als Target-Therapeutika im Harnblasenkarzinom zu etablieren, verliefen bisher, trotz erfolgreicher *in vitro* und *in vivo* Versuche, nicht zufriedenstellend (Chiong *et al.*, 2011; Fechner *et al.*, 2009). So zeigte Temsirolimus als Monotherapie nach Versagen der Chemotherapie ein medianes Überleben von 3,5 Monaten (Gerullis *et al.*, 2012). Eine Kombinationstherapie von Everolimus mit Paclitaxel brachte, mit einer partiellen Ansprechrate von 12,5 %, ebenfalls enttäuschende Ergebnisse (Niegisch *et al.*, 2015). Zwei weitere Studien mit Everolimus brachten ähnliche Ergebnisse, jedoch konnte ein gutes Ansprechen bei Einzelpatienten gezeigt werden (Milowsky *et al.*, 2013; Seront *et al.*, 2012). Eine genauere Untersuchung eines Patienten, der ein Ansprechen > 26 Monate zeigte, erbrachte eine LOF-Mutation des „Tuberous Sclerosis 1“- (TSC1) und des „Neurofibromatosis Type 2“- (NF2) Gens. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine TSC1 Mutation ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Rapalogs vorhersagen könne (Iyer *et al.*, 2012). Die katalytischen Domänen von mTOR und PI3K sind sich sehr ähnlich, so dass ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung vermutet wird (Engelman *et al.*, 2006). Vor diesem Hintergrund kam es zur Entwicklung von dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren wie z. B. NVP-BEZ235, welcher sich für viele Tumore in klinischen Studien befindet (Houede and Pourquier, 2015) und im Harnblasenkarzinom *in vitro* und *in vivo* eine gute Aktivität gezeigt hat (Matsushima *et al.*, 2015; Nawroth *et al.*, 2011). Eine Phase-II-Studie, die die Wirksamkeit von NVP-BEZ253 im Harnblasenkarzinom an 20 Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung untersuchte, zeigte bescheidene Aktivität und deutliche Nebenwirkungen. Bei einem Patienten konnte ein partielles Ansprechen gesehen werden und bei zwei Patienten eine Krankheitsstabilisierung. Interessanterweise zeigten diese Patienten keine Überaktivität im PI3K/AKT/mTOR-

Signalweg. 50 % der Probanden erlitten Nebenwirkungen 3. - 4. Grades, inklusive Nierenversagen, Hepatotoxizität oder Hypertension (Seront *et al.*, 2016). Bei zwei Studien, in denen die Kombinationstherapie von Gemcitabine/Cisplatin mit Rapalogs untersucht wurde, sind die endgültigen Daten noch ausstehend (NCT01090466; NCT01182168). Duale mTOR-Inhibitoren wie MLN0128 (INK128) befinden sich in Phase-I-Studien (NCT01058707) (Carneiro *et al.*, 2015). Weitere Studien mit FGFR3-Inhibitoren, Her2/ERBB2-Inhibitoren, Aurora-Kinasen, Polo-Like-Kinase 1, CDK4/6-Inhibitoren, HSP90 und PI3K-Inhibitoren wie BKM120 werden zur Zeit durchgeführt (Carneiro *et al.*, 2015).

1.6.3 Target Therapie des PI3K-Signalweges

Eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Proliferation und des Zellüberlebens spielt der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. In vielen verschiedenen Krebsentitäten konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg hyperaktiviert ist und eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese spielt. So konnten Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen wie z. B. „Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosom 10“ (PTEN), aber auch aktivierende Mutationen und Amplifikationen in Protoonkogenen wie AKT1, AKT2, PDK1 oder PIK3CA nachgewiesen werden (Engelman *et al.*, 2006; Knowles *et al.*, 2009). Es gibt eine enge Verbindung zwischen dem PI3K-Signalweg und dem MAPK-Signalweg. Eine Kontrolle dieser Signalwege verspricht eine gut verträgliche, hoch effiziente Tumorthherapie. Aufgrund der mannigfaltigen Möglichkeiten ihrer Aktivierung und Querverbindungen ist es aber sehr schwierig, gezielt die alterierten Signalwege zu beeinflussen. Dies erklärt das hohe Forschungsaufkommen, das es in diesem Bereich gibt (Knowles *et al.*, 2009; McCubrey *et al.*, 2012).

1.6.4 Der PI3K-Signalweg und seine Rolle im Harnblasenkarzinom

Die PI3-Kinasen sind intrazelluläre Lipidkinasen, die die Phosphorylierung der 3'-Hydroxyl-Gruppe am Inositolring von Phosphatidylinositolen und Phosphoinositiden katalysieren. Damit nehmen sie einen wichtigen Stellenwert in der Regulation des Zellmetabolismus, des Überlebens der Zelle und des Transportes von Stoffen innerhalb der Zelle ein (Engelman *et al.*, 2006).

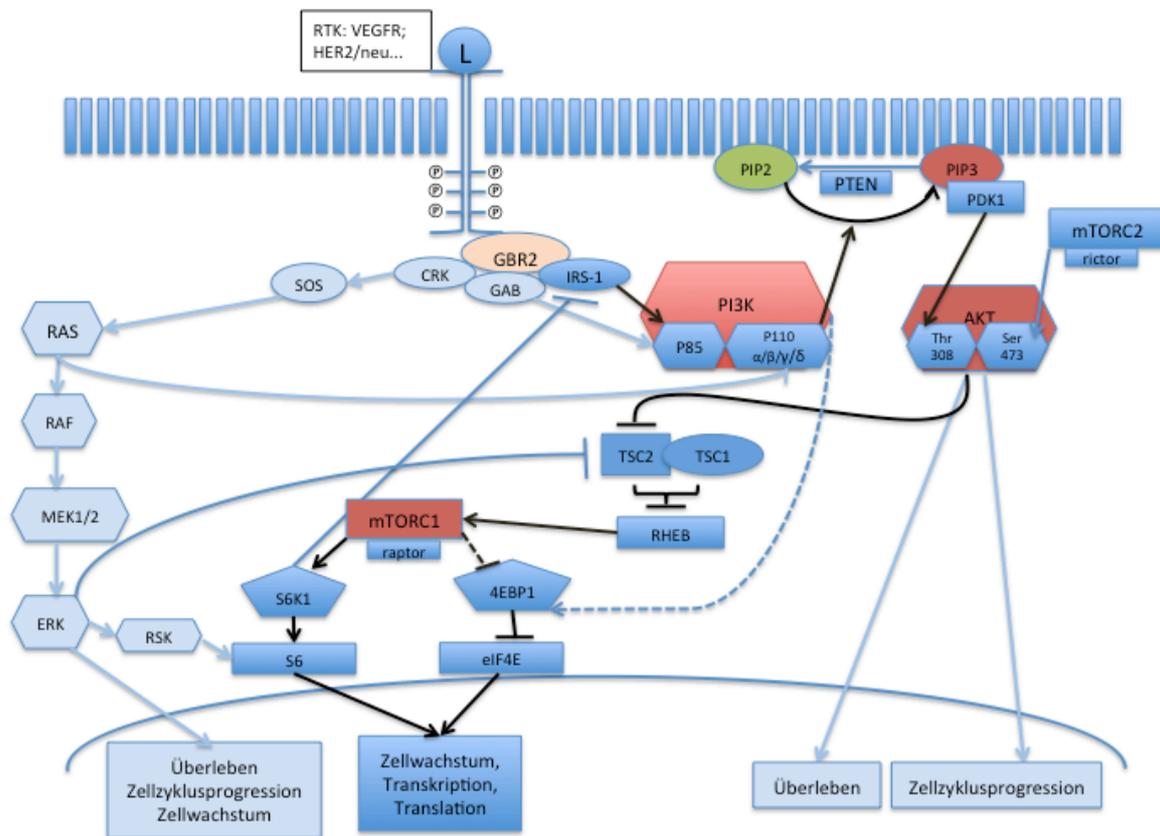


Abbildung 1.4 PI3K/ AKT/ mTOR Signalweg. Durch die Aktivierung von PI3K erfolgt die Akkumulation von PIP₃; PTEN katalysiert die entgegengesetzte Reaktion. PIP₃ rekrutiert PDK1 und AKT an die Zellmembran, wo AKT durch PDK1 an Thr308 und durch mTORC2 an Ser473 phosphoryliert wird. AKT hat auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen Einfluss. Eines der Zielproteine von AKT ist mTORC1 über die Inhibition von TSC2, woraufhin es zu einer Aktivierung von mTORC1 und seiner Zielproteine kommt. Gezeigt sind auch die Verbindungen zum MAPK-Signalweg. Frei nach Knowles et. al 2009; Nawroth et. al 2011

PI3K teilt sich in drei Klassen auf, die sich hinsichtlich ihrer Aktivierung und ihres Substrates unterscheiden. Am besten ist die Klasse I untersucht, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) umwandelt. Die Klasse I unterteilt sich in eine Klasse IA und IB. Die Klasse IA wird durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Dies erfolgt über die regulatorische Untereinheit p85. PI3K der Klasse IB wird vor allem durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Die Phosphorylierung der Substrate erfolgt über die katalytische Untereinheit p110 (Engelman, 2009; Engelman *et al.*, 2006). Diese besitzt eine Domäne die durch p85 oder „Rat Sarcoma“ (Ras) aktiviert werden kann (Engelman *et al.*, 2006). Kommt es zur Aktivierung von PI3K, führt dies wie in Abbildung 1.4, gezeigt über die katalytische Untereinheit p110 zur Phosphorylierung von PIP₂ zu PIP₃. PTEN kann diese Phosphorylierung rückgängig machen (Knowles *et al.*, 2009).

PTEN gilt als das am häufigsten veränderte Tumorsuppressorgen (Dienstmann *et al.*, 2014). PIP₃ rekrutiert die „Protein Dependent Kinase 1“ (PDK1) und AKT an die Zellmembran, wo AKT von PDK1 an der Stelle Thr308 phosphoryliert wird. Eine weitere Phosphorylierung, die zur vollständigen Aktivierung von AKT notwendig ist, erfolgt durch den „mTOR Complex 2“ (mTORC2) an der Aminosäure Ser473. AKT ist ein zentrales Protein im PI3K/AKT-Signalweg. Es hat einen Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Hierunter fällt die Aktivierung des Zellzyklus, das Zellwachstum, die Unterdrückung von apoptotischen Signalen sowie der Metabolismus und der Energiehaushalt der Zelle. Eines der wichtigsten Zielproteine von AKT ist der „mTOR Complex 1“ (mTORC1). Die Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung des „Tuberous Sclerosis Complex 2“ (TSC2) durch AKT (Engelman, 2009; Engelman *et al.*, 2006). Dies führt zu einer Inaktivierung des TSC1/2 Komplexes, was zu einer Destabilisierung von TSC2 führt. Damit wird seine Funktion als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für die GTPase „Ras Homolog Enriched in Brain“ (Rheb) unterbunden (Inoki *et al.*, 2003), was dann zur Aktivierung von mTORC1 führt. Der mTORC 1-Komplex setzt sich aus der Ser/Thr-Kinase mTOR, dem „Regulatory-Associated Protein of mTOR“ (Raptor) - das als Gerüst für die anderen mTORC1-Substrate dient - dem „Mammalian Lethal with Sec13 Protein 8“ (mLST8 oder GβL), dem „Proline Rich AKT Substrate 40 kDA“ (PRAS40) und dem „DEP-Domain-Containing mTOR-Interacting Protein“ (Deptor) zusammen (Laplante and Sabatini, 2009). Weitere Auslöser für eine Aktivierung von mTORC1 sind eine gute Ernährungslage und ein positiver Energiehaushalt der Zelle (Benjamin *et al.*, 2011). Die zwei wichtigsten Substrate von mTORC1 sind „Ribosomal Protein S6 Kinase Beta-1“ (S6K1) und „Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Binding Protein 1“ (4EBP1). S6K1 ist notwendig für die Translation vom 5'-Ende der mRNAs. Die Phosphorylierung von 4EBP1 führt zu der Freigabe des Cap-bindenden Proteins eIF4E, was zur Initiation der Translation führt. Somit wird über diese zwei Zielproteine die Zellproteinsynthese und damit auch das Zellwachstum kontrolliert (Mamane *et al.*, 2006). Im Blasenkrebs unterliegt nur S6K1 der direkten Kontrolle von mTORC1. 4EBP1 wird von einer Inhibierung von mTOR nicht direkt beeinflusst (Nawroth *et al.*, 2011). Ein negativer Feedbackloop durch S6K1 reguliert „Insulin Receptor Substrate 1“ (IRS-1) und somit die Aktivität des PI3K-Signalweges. Das bedeutet, dass eine Hemmung von mTORC1 zu einer Aktivierung des PI3K-Signalweges führt (Nawroth *et al.*, 2011). Weiter Querverbindungen gibt es zu

anderen Signalwegen. Besonders wichtig sind hier die Verlinkungen zu dem MAPK-Signalweg. So kann Ras-GTP PI3K aktivieren oder auch „Extracellular signal-Regulated Kinase“ (ERK) via „p90 Ribosomal S6 Kinase“ (RSK) den TSC-Komplex phosphorylieren und so zu einer Aktivierung von mTORC1 führen. Es wurde auch beschrieben, dass ERK via RSK Raptor phosphorylieren kann, was die mTORC1-Phosphorylierung von 4EBP1 fördert. Aktiviertes AKT kann aber auch durch eine direkte Phosphorylierung von RAF die Aktivität des PI3K-Signalweges herunterfahren (Mendoza *et al.*, 2011). Von den vier Untereinheiten der katalytischen Einheit der PI3-Kinase - p110 α , β , γ , δ - wurde die Isoform p110 α , die durch das am zweithäufigsten mutierte Onkogen PI3KCA kodiert wird, in vielen verschiedenen Krebserkrankungen amplifiziert oder mutiert entdeckt (Dienstmann *et al.*, 2014), so auch im Harnblasenkarzinom. Eine Vielzahl der Karzinome zeigten Mutationen im PI3KCA, jedoch scheinen diese mit einem niedrigeren Tumorstadium und einer besseren Zelldifferenzierung einherzugehen. Weiterhin unterscheidet sich der Ort der Mutation im PI3KCA-Gen von dem anderer Tumoren. So sind die E542K- und E545K-Mutationen in der helikalen Domäne sehr häufig im Harnblasenkarzinom und die Mutationen in der Kinase-Domäne H1047R, die in anderen Tumorentitäten die häufigsten Mutationen darstellen, deutlich seltener. Insgesamt sind in ca. 20-25 % der Harnblasenkarzinome aktivierende Mutationen im PI3KCA-Gen nachzuweisen. PTEN, eines der am häufigsten veränderten Tumorsuppressorgene in menschlichen Krebserkrankungen, findet sich häufig verändert im Harnblasenkarzinom. Es sind nur 3-4 % inaktivierende Mutationen bekannt. Es zeigen sich aber häufig eine reduzierte bzw. keine Expression von PTEN. Eine weitere Subgruppe der Harnblasenkarzinome zeigt einen Verlust der Funktion von TSC1. Dies ist einerseits auf den häufigen Verlust von Chromosom 9, auf dem das Gen für TSC1 liegt, im Harnblasenkarzinom zurückzuführen, aber auch auf eine Mutationsfrequenz von ca. 14 %. AKT1-Amplifikationen scheinen eher seltener im Harnblasenkarzinom aufzutreten (Ciriello *et al.*, 2013; Knowles *et al.*, 2009; Network, 2014; Platt *et al.*, 2009).

Zu bedenken ist aber, dass viele andere Veränderungen, wie Rezeptor-Amplifikationen, Mutationen im MAPK-Signalweg und anderen Signalwegen, die eine Verlinkung zum PI3K-Signalweg aufweisen, einen Einfluss auf die Tumorentstehung und damit auch auf das Ansprechen auf die Therapie haben. So konnte eine erhöhte Aktivität im RTK/RAS/PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in ca. 70 % der Harnblasenkarzinome festgestellt werden (NIH, 2014).

1.6.5 Inhibitoren des PI3K-Signalweges

Seit der große Einfluss des PI3K-Signalweges auf die Entstehung und Entwicklung einer Krebserkrankung bekannt wurde, gab es eine Vielzahl von Versuchen in diesen Signalweg zielgerichtet einzugreifen. Seit der Entdeckung von Wortmannin und LY-294002, zwei unspezifischen PI3K Inhibitoren (Houede and Pourquier, 2015) und der Zulassung der zwei Rapalogs Everolimus und Temsiroliums durch die FDA 2007 in der Therapie des Nierenzellkarzinoms, der Lymphome, des Astrozytoms und des Pankreaskarzinoms (Benjamin *et al.*, 2011), hat sich die Anzahl der Substanzen, die den PI3K-Signalweg als Ziel haben, deutlich erhöht. Es gibt duale PI3K-mTOR-Inhibitoren, PI3K-Inhibitoren, AKT-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren, selektive Inhibitoren für mTORC1 oder duale Inhibitoren für mTORC1 und mTORC2. Wie in Kapitel 1.6.2 genauer erläutert, beschäftigt sich eine Vielzahl an klinischen Studien, mit diesen Substanzen (Houede and Pourquier, 2015). Unsere Gruppe konnte 2011 zeigen, dass in Harnblasenkarzinom-Zelllinien die spezifische Inhibition von mTORC1 mittels RAD001 einen Dephosphorylierungseffekt auf S6K1 aber nicht auf 4EBP1 bewirkt. Die duale Inhibition von PI3K und mTOR mittels NVP-BEZ235 zeigte, dass S6K1 bei niedrigeren Konzentrationen inhibiert wird als pAKT (Ser473/Thr308). p4EBP1 begann bei Konzentrationen ähnlich denen von AKT mit einer Verminderung der Aktivität zu reagieren. Auch die Inhibition von mTOR und AKT mittels siRNA und shRNA zeigte keinen Einfluss auf 4EBP1 (Nawroth *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde der PI3K-selektive Inhibitor PIK90 und der mTORC1-spezifische Inhibitor Everolimus (RAD001) verwendet. Die Wirkmechanismen sind in Abbildung 1.5 vereinfacht dargestellt.

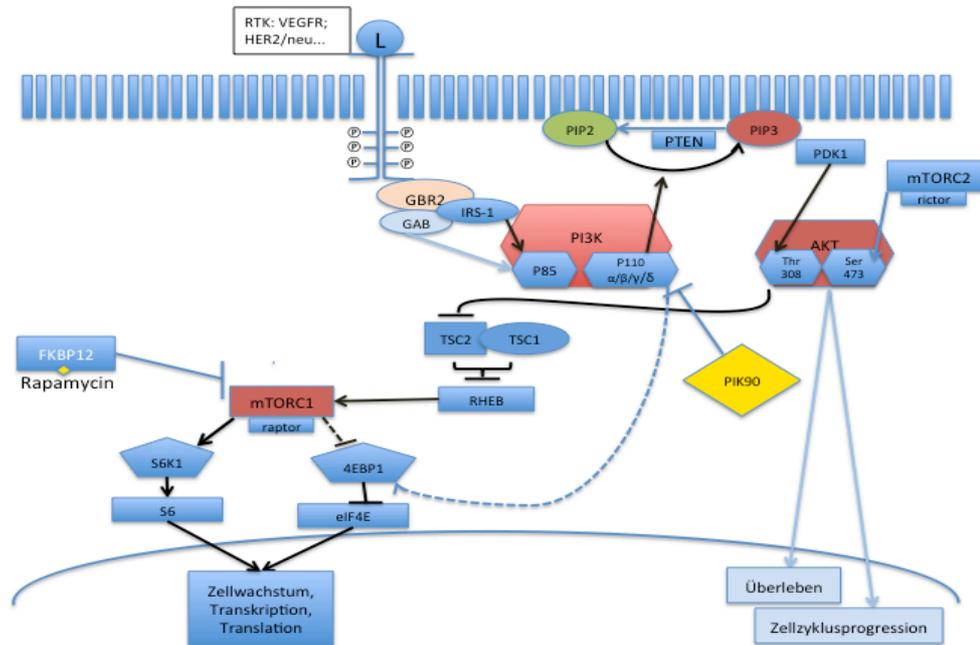


Abbildung 1.5 Darstellung der Angriffsstellen von Rapamycin und PIK90. Rapamycin wirkt über die Bindung an FKBP12 spezifisch auf mTORC1 ein und führt zu einer Herunterregulierung der Aktivität. PIK90 hemmt die katalytischen Domänen der PI3-Kinase.

1.6.5.1 PIK90 – ein allosterischer PI3K-Inhibitor

PIK90 ist ein Imidazopyridin, das 2006 von der Forschungsgruppe um Zachary Knight synthetisiert wurde. Zu dieser Zeit war es einer der potentesten PI3K-Inhibitoren. PIK90 ist relativ spezifisch für p110 α und - γ . Die in der Literatur angegebenen IC₅₀ Konzentrationen für eine Inhibition von p110 β und δ liegen mit 35 nM bzw. 58 nM drei bis fünf Mal so hoch. Einen Einfluss auf mTORC1 nimmt PIK90 mit einer IC₅₀ von > 1000 nM. Bis zu welcher Konzentration wirklich eine Spezifität gegeben ist, scheint von molekularen Alterationen der Tumorzelle abzuhängen (Fan *et al.*, 2006). PIK90 zeigte in CLL- und Glioma-Zellen eine gute Wirksamkeit. Auch *in vivo* zeigte sich PIK90 effektiv (Cheng *et al.*, 2012). Durch die relative Spezifität ist die Zelltoxizität von PIK90, im Vergleich zu anderen „pan“-PI3K-Inhibitoren, sehr gering (Knight *et al.*, 2006; Niedermeier *et al.*, 2009).

1.6.5.2 Everolimus und die Rapalogs

Everolimus (RAD001) ist, wie Temsirolimus (CCI-779) oder Ridaforolimus (AP23573), ein sogenanntes Rapalog. Diese Substanzen sind Abkömmlinge der Grundsubstanz Rapamycin (Serolimus). Rapamycin wird durch das 1965 auf den Osterinseln (Rapa Nui) entdeckte Aktinobakterium *Streptomyces hygroscopicus* produziert und wurde erstmals in den 1970er Jahren im Labor isoliert (Vezina *et al.*,

1975). Rapamycin besitzt anitfugale, antikanzerogene und immunsuppressive Wirkungen. Versuche zum Wirkmechanismus von Rapamycin, führten zur Entdeckung der TOR1- und TOR2-Kinasen in Hefen, die später auch in Menschlichen Zellen gefunden wurden (mTOR). Die TOR-Kinase besitzt an ihrem Carboxy-Ende eine Kinase-Domäne und eine Domäne für die Bindung von „FK506-Binding-Protein“ (FKBP), die „FKBP-Rapamycin Binding“ (FRB)-Domäne. Rapamycin interagiert mit FKBP12 (FKBP im Menschen) und führt zur Bindung von FKBP12 an die Bindungsstelle FRB. Dadurch kommt es zu einer allosterischen Inhibition der Kinaseaktivität (Benjamin *et al.*, 2011; Heitman *et al.*, 1991). Rapamycin und seine Derivate sind viel genutzte Medikamente in der Tumorthherapie und der immunsuppressiven Therapie, z.B. der Beschichtung von Stents oder in der Transplantationsmedizin (Benjamin *et al.*, 2011).

RAD001 hat eine O-(2-Hydroxyethyl)-Gruppe an der Position C-40 der Rapamycin-Struktur und ist ein oral verfügbares Analogon mit einer kürzeren Halbwertszeit und einer besseren Bioverfügbarkeit als Rapamycin (Zhou and Huang, 2012). Neben Zulassungen in der immunsuppressiven Therapie ist es durch die FDA seit 2009 für die Zweitlinienbehandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen, seit 2010 für das subependymale Riesenzellastrozytom („Subependymal Giant Cell Astrocytoma“, kurz SEGA), seit 2011 auch für das neuroendokrine Pankreaskarzinom, seit 2012 für das Her2/neu-Rezeptor-positive fortgeschrittene Mammakarzinom als Zweitlinientherapie (Pazdur, 2013) und seit Februar 2016 für neuroendokrine Tumore des Gastrointestinaltraktes bei fortgeschrittener oder metastasierter Erkrankung (FDA, 2016).

Die Erfolge im Harnblasenkarzinom sind, wie in Kap. 1.6.2 beschrieben, hinter den Erwartungen zurückgeblieben. Auch im direkten Vergleich mit Rapamycin scheint RAD001 ein schlechteres antikanzerogenes Wirkungsprofil zu besitzen (Pinto-Leite *et al.*, 2016b).

Aus diesen Gründen hat sich die Idee der Kombinationstherapie mit Rapalogs und PI3K- oder AKT-Inhibitoren oder herkömmlichen Chemotherapeutika ergeben. Weitere Grundlagenforschung bezüglich des genauen Einflusses von RAD001 auf mTORC1 ist notwendig, um wirkungsvollere Therapie zu entwickeln.

2 Zielsetzung der experimentellen Promotionsarbeit

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist einer der am häufigsten aktiven Signalwege in humanen Karzinomen. Eine erhöhte Aktivität dieses Signalweges kann auch im Harnblasenkarzinom gezeigt werden, was ihn zu einem attraktiven Angriffsziel der Target Therapie macht. Es fehlt jedoch ein genaues Verständnis, welche Moleküle in diesem Signalweg medikamentös kontrolliert werden müssen, um eine effektive und nebenwirkungsarme Therapie zu entwickeln. Auch ist bisher unklar, wie man Patienten sinnvoll präselektioniert, um ein Ansprechen vorhersagen zu können. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Kinasen an der Regulation von 4E-BP1 und S6K1 beteiligt sind und wie sich diese Regulation auf eine Tumorthherapie auswirkt.

Dabei wurde:

- die Regulation der Proteine S6K1 und 4EBP1 des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges im Harnblasenkarzinom nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren im Immunblot charakterisiert.
- der unterschiedliche Einfluss von PI3K und mTORC1 einzeln und im Zusammenspiel hinsichtlich der Regulation der Phosphorylierung von S6K1 und 4EBP1 untersucht.
- das Therapieansprechen auf Konzentrationen der Inhibitoren getestet, die biochemisch eine Inhibierung ihrer Zielmoleküle zeigen.
- die absolute IC50 mit dem biochemischen Ansprechen korreliert und eingeordnet.

Im Einzelnen wurde untersucht:

- Immunhistochemische Veränderungen im PI3K-Signalweg nach Behandlung von Harnblasenkarzinomzelllinien mit PIK90 oder RAD001.
- Therapeutische Effekte von PIK90 und RAD001 *in vitro* mittels Zellviabilitäts-Assays.
- Molekulare Alterationen der Zelllinien und ihr Ansprechen auf die Therapie.
- Veränderungen in Immunohistochemie und Viabilität durch duale Behandlung der Zellen mit PIK90 und RAD001 gegenüber der Monobehandlung.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Firma	Ort
Acrylamid/Bisacrylamid37, 5:1	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Cell-Signaling	Cambridge, England
Dulbeco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Biochrom	Berlin, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	BrueggemannAlcohol GmbH Heilbronn	Heilbronn, Deutschland
Ethanol 96 %	Otto Fischar GmbH	Saarbrücken, Deutschland
Entwicklerkonzentrat	Röntgen Bender GmbH & Co. KG	Baden-Baden, Deutschland
Fixierkonzentrat	Röntgen Bender GmbH & Co. KG	Baden-Baden, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom	Berlin, Deutschland
Glycerin	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Milchpulver	Nestle	Vevey, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl)	Merck-Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 100x	Biochrom	Berlin, Deutschland

Penicilline/ Streptomycin 10000 IE/10000 µg/ml	Biochrom	Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1x, 10x	Biochrom	Berlin, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Mix II	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Precision Plus Protein Standard	Bio-RAD	Hercules, CA, USA
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Biochrom	Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED) 99 %	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
TGS 10x	Bio-Rad	München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Triton X100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Trypan-Blau 0,5 %	Biochrom	Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA	Biochrom	Berlin, Deutschland
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck Chemicals GmbH	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3.1 Chemikalien

3.1.2 Kitsysteme

Kit	Firma	Ort
CellTiter-blue Cell Viability Assay	Promega	Madison, WI, USA
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific,	Waltham, MA, USA

Tabelle 3.2 Kitsysteme

3.1.3 Geräte

Bezeichnung	Firma	Ort
Autoklav Systec DX-65	Systec GmbH	Linden, Deutschland
Biologische Sicherheitswerkbank Herasafe KS12	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Chemidox XRS Bildgebungssystem	BioRad	Hercules, CA, USA
Eismaschine Manitowoc	Manitowoc Ice	Manitowoc, WI, USA

Filmentwickler Curix CP1000	Agfa Healthcare	Mortsel, Belgien
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC professional	Vacuubrand GmbH	Wertheim, Deutschland
Folienschweißgerät FS3602	Severin Elektrogeräte GmbH	Sundern, Deutschland
Gefriercontainer Cryo „Mr. Frosty“ 1°C	Nalgene	Rochester, NY, USA
Glaswaren	Schott AG	Mainz, Deutschland
Grammwaage Sartorius 2254	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Heizblock BT100	Kleinfeld Labortechnik	Gehrden, Deutschland
Intellimixer RM-2L	Elmi Ltd., Laboratory Equipment	Calabasas, CA, USA
Mikroplatten Leser Vmax Kinetic	Molecular Devices	Sunnyvale, CA, USA
Mikroskop AxioVert.135	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop AxioVert. A1	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mini Protean System	BioRad	Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot Cell Transfer System	BioRad	Hercules, CA, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell Gel System	BioRad	Hercules, CA, USA
Minishaker IKA MS2	IKA Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Multilabel Plate Reader VICTOR X3	Perkin Elmer	Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge 5430R	Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge QuikSpin QS7000	Edwards Instrument Co,	Narellan, NSW, Australia
Nanowaage AT250	Mettler Toledo	Giessen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik	Lancing, England
Netzteil Elektrophorese EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech	Uppsala, Schweden
Netzteil PowerPac HC	BioRad	Hercules, CA, USA
Kaltlichtsystem Leica L2	Leica Microsystem GmbH	Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach, Deutschland
pH-Meter 691	Metrohm	Filderstadt, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reasarch	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Spektrofotometer Nanodrop 2000c	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Stereomikroskop Stemi DV4	Carl Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Wärme- und Trockenofen Heraeus FunctionLine B6	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Wärme- und Trockenofen Heraeus FunctionLine UT20	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Wasserbad W350	Memmert	Schwabach, Deutschland
Wasserreinigungssystem Purelab	ELGA Lab water	Celle, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, NY, USA
Zellkultur CO ₂ Inkubator HERA Cell240	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Zellkultur CO ₂ Inkubator HERA Cell240i	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Zentrifuge 5810R	Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge ROTINA 35R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3.3 Geräte

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma	Ort
96-Well Platten, Polystyren, weiß	Corning Inc.	Corning, NY, USA
96-Well Platten, Polystyren, schwarz	Corning Inc.	Corning, NY, USA
Amersham Hybond-P PVDF-Membranen	GE-Healthcare	Buckinghamshire, England
Konische Falcon Röhren 15 ml, 50 ml	Greiner GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Linsenreinigungspapier	The Tiffen Company	Hauppauge, NY, USA
Mikroskop Deckgläser	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Omnifix 1 ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt	Nuembrecht, Deutschland

Polystyrenen Röhren mit rundem Boden	Corning Inc.	Corning, NY, USA
Polystyrenen Röhren mit konischem Boden	Elkay	Hampshire, UK
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt	Nuembrecht, Deutschland
Röntgenfilm CEA RP New	Agfa Healthcare	Mortsel, Belgien
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International AG	Kremsmuenster, Österreich
Silikonfolie 0,5 mm	Sahlberg GmbH & Co. KG	München, Deutschland
Sterile Filter Nalgene 0,25 µm, 0,45 µm	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Tieftemperatur-Röhrchen 1.8 ml Nunc	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Zell Heber Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Zellkultur Platten 96-Well, 6-Well, 10 cm, 20 cm	Coning Inc.	Corning, NY, USA

Tabelle 3.4 Verbrauchsmaterialien

3.1.5 Inhibitoren, Medikamente

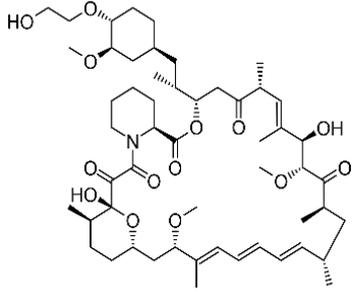
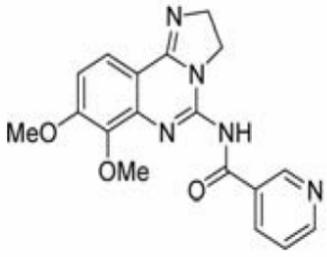
Strukturformel	Name	Firma
	<p>Everolimus (RAD001)</p> <p>Handelsnamen:</p> <p>in der Transplantationsmedizin</p> <ul style="list-style-type: none"> • Certican® (Europa) • Zortress® (USA) <p>in der Onkologie</p> <ul style="list-style-type: none"> • Afinitor® 	<p>Novartis AG, Basel, Schweiz</p>
	<p>PIK90</p>	<p>SYNkinase, Parkville, Australien</p>

Tabelle 3.5 Inhibitoren und Medikamente

3.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteile
0,05 % SDS Protein Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCL pH 7,2 1 % Triton X100 0,05 % SDS 5 mM EDTA (Auf 10 ml Lysepuffer 100 µl Phosphatase Inhibitor und eine Tablette Mini-Protease Inhibitor vor Gebrauch hinzugegeben.)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCL pH = 6,8 (30,29 g Tris in 400 ml dest. Wasser gelöst, mittels HCL auf pH von 6,8 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCL pH = 8,8; (181,7 g Tris in 800 ml dest. Wasser gelöst, mittels HCL auf pH von 8,8 eingestellt, auf 1000 ml aufgefüllt).
Gelladepuffer (4x)	0,25 M Tris; pH = 6,8 8 % SDS 40 % Glycerin und 0,04 % Bromphenolblau hinzugeben. Vor Nutzung auf 500 µl 4x Gelladepuffer 100 µl 1 M DTT hinzug.
10x Blotting-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycine
1x Blotting-Puffer	10 % 10x Blotting-Puffer 20 % Methanol 70 % dest. Aqua
10x TBS („Tris-buffered saline“)	0,5 M Tris-HCL, pH = 7,6
10x TBE (Tris-Borat-EDTA- Puffer)	1 M Tris 1 M Borat 0,02 M EDTA
TBS-T	1x TBS 0,001 % Tween-20
Immunoblotting Blockierungslösung	5 % fettfreies Milchpulver in TBS-T

Immunoblotting Verdünnungspuffer für Antikörper	5 % BSA in TBS-T mit 0,02 % Natriumazid
ECL (Enhanced-Chemilumineszenz) Lösung; Reagenz A	0,1 M Tris/HCL, pH = 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 nM p-Cumarsäure
ECL - Lösung; Reagenz B	0,1 M Tris/HCL, pH = 8,5 0,18 % H ₂ O ₂ (EPAR, 2009)(EPAR, 2009)(EPAR, 2009)(EPAR, 2009)(EPAR, 2009)(EPAR, 2009)

Tabelle 3.6 Puffer und Lösungen

3.1.7 Antikörper

Alle Antikörper wurden mit dem Immunoblotting Verdünnungspuffer verdünnt.

Zielprotein	Verdünnung für WB	Sekundärer Antikörper	Bestell Nr.	Hersteller
4EBP1	1:1000	Hase	9452	CST, Beverly, MA, USA
Pospho-4EBP1 (Thr37/46)	1:1000	Hase	9459	CST, Beverly, MA, USA
AKT (pan)	1:1000	Hase	4685	CST, Beverly, MA, USA
Phospho-AKT (Thr308)	1:1000	Hase	2965	CST, Beverly, MA, USA
Phospho-AKT (Ser473)	1:1000	Hase	3787	CST, Beverly, MA, USA
p70-S6Kinase	1:1000	Hase	9202	CST, Beverly, MA, USA
Pospho-p70-S6Kinase (Thr389)	1:1000	Hase	9234	CST, Beverly, MA, USA
Peroxidase-konjugierter Anti-Rabbit IgG (sekundärer Antikörper)	1:10000	-	711-036-152	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 3.7 Primär- und Sekundärantikörper

3.1.8 Zelllinien

Zell Name	Tumor Art	Kulturbedingungen
253J	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: T4	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
639v	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: KD	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
647v	Human Urothelkarzinom Grading: G2 Staging: KD	RPMI Medium bei 5 % CO ₂
BFTC905	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: KD	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
HCV-29	Human normales Urothel von Patient mit Harnblasenkarzinom	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
HT1197	Human Urothelkarzinom Grading: G4 Staging: T2	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
HT1376	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: „invasiv“	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
J82	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: T3	RPMI Medium bei 5 % CO ₂

KU19-19	Human Urothelkarzinom Grading: G3 Staging: T3b	RPMI Medium bei 5 % CO ₂
RT112	Human Urothelkarzinom Grading: G2 Staging: KD	RPMI Medium bei 5 % CO ₂
T24	Human Urothelkarziom Grading: G3 Staging: KD	RPMI Medium bei 5 % CO ₂
UMUC3	Human Urothelkarzinom Grading: KD Staging: KD	DMEM Medium bei 10 % CO ₂
VmCUB1	Human Urothelkarzinom Grading: KD Staging: KD	DMEM Medium bei 10 % CO ₂

Tabelle 3.8 verwendete Zelllinien. KD: Keine Daten. Quellen: (Bubenik *et al.*, 1973; Elliott *et al.*, 1977; Elliott *et al.*, 1976; Elliott *et al.*, 1974; Grossman *et al.*, 1986; Marshall *et al.*, 1977; Masters *et al.*, 1986; O'Toole *et al.*, 1978; Rasheed *et al.*, 1977; Tachibana *et al.*, 1995; Tzeng *et al.*, 1996; Williams, 1980)

Den Medien wurde 10 % fetales Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) und 1 % nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) zugegeben.

Einfriermedium:

50 % RPMI oder DMEM

40 % FKS

10 % DMSO

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kulturbedingungen und Zellsplitting

Die Arbeit mit den Zellkulturen wurde in Reinluftwerkbänken unter sterilen Bedingungen verrichtet. Die Zelllinien wurden subkonfluent gehalten und in niedrigen Zyklen verwendet. Alle Medien wurden vor Benutzung auf 37 °C erwärmt. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und die am Boden adhärenen Zellen mit 5 % 0,5 M EDTA versetztem PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit Trypsin bei 37 °C bis die Zellen sich von der Platte lösten. Um das Trypsin zu neutralisieren, wurde frisches Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden bei 300 RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung) für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium aufgelöst. Fraktionen davon wurden auf neuen Platten ausgesät, und anschließend bei 37 °C und hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für genaue Angaben zu jeder einzelnen Zelllinie siehe Tabelle 3.8.

3.2.1.2 Zellzählung und Vitalitätstestung

Die Zellzählung wurde mittels Zugabe von 0,5 % Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Da lebende Zellen Trypanblau nicht aufnehmen, konnte als Nebeneffekt auch die Viabilität der Zellen getestet werden. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Da die Neubauer Zählkammer ein Volumen von 0,1 µl hat, konnte mithilfe der Formel

$$N * V * \frac{10^4}{ml} = \text{Zellzahl/ml}$$

die Zellzahl pro ml Suspension ermittelt werden. N entspricht dabei dem Mittelwert aus zwei ausgezählten Quadraten, V ist der Verdünnungsfaktor.

3.2.1.3 Kryokonservierung von Zelllinien

Das Vorgehen des Einfrierens entspricht bis zur Zentrifugation dem Vorgehen des Aussäens (Kap. 3.2.1.1) Das Zellpellet wurde nun allerdings in einem Milliliter Einfriermedium aufgelöst und in Tieftemperatur-Röhrchen überführt. Bevor die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte, wurden die Zellen für 48 – 72 h

bei - 80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde dem tiefgefrorenen Medium frisches Medium hinzugefügt und die Zellen abzentrifugiert. Danach erfolgte das Aussäen.

3.2.2 **Behandlung mit „small molecule“ Inhibitoren.**

Die Inhibitoren PIK90 und RAD001 wurden als 10 mM-Vorrat bei - 20 °C aufbewahrt. Bei Benutzung wurde eine frische Verdünnung mit 37 °C warmem Medium hergestellt. Die Zellen wurden einen Tag vorher in den Konzentrationen 1×10^6 , 2×10^6 oder 500 – 1000 Zellen in 10 cm, 6-Well oder 96-Well Platten ausgesät. Als Kontrolle wurde die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet.

3.2.3 **Immunoblotting**

3.2.3.1 **Zellysatherstellung**

Material

- Lysepuffer
- Zellschaber
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

Lysatherstellung

Da das Proteinlysate äußerst instabil war, musste immer auf Eis gearbeitet werden. Vor Lysierung der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Bei der zweiten Waschung war darauf zu achten, dass kein PBS zurückblieb. Dies hätte sonst zu einer Verdünnung des Lysates geführt und die Wirkung des Lysepuffers beeinträchtigt.

Für 6-Well-Schalen wurden 100 µl Lysepuffer verwendet. Für 10 cm-Schalen 200 - 500 µl. Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers heruntergekratzt und mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Sollten mehrere Schalen zusammengeführt werden, wurde der Lysepuffer aus der ersten Schale benutzt, um die nächste Schale zu lysieren. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 - 10 min bei 4 °C auf dem Drehrad rotiert. Danach wurden sie für 30 min bei 31000 G und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, welches mit dem Namen der Zelllinie, gegebenenfalls dem Namen des Medikamentes, dessen Konzentration und dem Datum versehen war. Die Lysate wurden bei - 80 °C verwahrt, um einen Proteinverlust zu vermeiden. Sollte mit den Lysaten am gleichen

Tag weiter gearbeitet werden, wurden sie kurzzeitig auf Eis gelegt und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Proteinquantifizierung mittels des BCA Assay

Das „BCA Protein Assay Kit“ nach Pierce wurde eingesetzt, um eine Quantifizierung des Gesamtproteins im Lysat vorzunehmen und bei mehreren Lysaten ein gleichmäßiges Laden der Gele zu ermöglichen. Der Assay nutzt die Komplexbildung aus Bicinchoninsäure (*engl.* bicinchoninic acid, BCA) und Cu^+ . Es entsteht ein violettfarbener Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm zu messen ist. Hierfür wurden in einem ersten Schritt alle Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert (Biuret-Reaktion). Der Anteil von Cu^{2+} ist proportional zur Menge an Protein in der Lösung.

In eine 96-Well-Schale wurden die neun Standards (St.) von 0 µg/ml bis 2000 µg/ml Albumin in Duplikaten zu jeweils 12,5 µl pipettiert. Die Lysate wurden auch in Duplikaten pipettiert (Probe), allerdings in einer 1:2 Verdünnung mit Lysepuffer, um Lysat zu sparen. Als Blindprobe wurde das BCA Reagenzgemisch verwendet. Tabelle 3.9 gibt eine Darstellung der 96-Well-Schale wieder

Blank	St1	St5	St9	Probe1							
Blank	St1	St5	St9	Probe1							
	St2	St6		Probe2							
	St2	St6		Probe2							
	St3	St7		...							
	St3	St7		...							
	St4	St8									
	St4	St8									

Tabelle 3.9 Beispielhafte Darstellung der 96-Well Schale und ihrer Befüllung

BCA-Reagens-A (Na_2CO_3 , NaHCO_3 , BCA, und Natrium Salz in 0.1M Natriumhydroxid) und BCA-Reagens-B (4 % Kupfersulfat) wurden im Verhältnis 1:50 miteinander gemischt. Das Gemisch war, nach sorgfältiger Mischung grünlich. Auf jede Probe kamen 112,5 µl (total: 125 µl). Als Blindprobe diente 125 µl BCA Reagens.

Die Schale wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und danach mit Hilfe des ELISA-Readers (Perkin Elmer) gemessen. Ausgehend von der Proteinkonzentration wurden nun die Proben für die Elektrophorese hergestellt.

Proben Erstellen

Gemäß BCA Protein Assay wurde für jede Probe eine Mischung aus Lysat und Lysepuffer erstellt. Das Gesamtvolumen bemaß sich an der Anzahl an Gelen (35 µl pro Gel und Probe). Die Proben wurden kurz gevortext ohne sie dabei zu erwärmen. Danach wurden 15 µl Ladepuffer + DDT (6:1) hinzugegeben, nochmals gut gevortext, für 5 min aufgekocht und danach zentrifugiert. SDS (Natriumdodecylsulfat) im Ladepuffer sorgte für eine Unterbrechung der Wasserstoffbrücken und ein Aufspalten der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Außerdem bewirkte SDS eine negative Ladung aller Proteine als Voraussetzung für die Elektrophorese. Das DDT spaltete die Disulfidbrücken während des Aufkochens. Das Gesamtvolumen der Probe betrug nun 50 µl.

Die Proben konnten sofort verwendet werden oder sie wurden bei -20 °C aufbewahrt. Im Falle eines Einfrierens mussten sie vor dem Verwenden nochmals 3 min aufgekocht werden.

3.2.3.2 Proteinelektrophorese

Material

- Kammer
 - Bio-RAD Mini-PTOTTEAN Tetra Cell
 - Spacer und Glasplatten (BioRad; BioSat)
 - Gießgeräte
- Chemikalien
 - 1,5 M TRIS/HCL pH = 8,8; Trenngelpuffer
 - 0,5 M TRIS/HCL pH = 6,8; Sammelgelpuffer
 - Gelladepuffer (100 ml)
 - Blotting Puffer (10x)
 - TBS 10x
 - TBST
 - TBST-Milch = Block-Puffer
 - DDT 1 M
 - Proteinmarker : Precision Plus Protein Standard

Gelherstellung

Um Gele herzustellen, mussten als erstes Spacer und Glasplatte in das Gießgerät gespannt werden. Danach wurden Trenngel und Sammelgel vorbereitet (siehe Tabelle), jedoch APS und Temed noch nicht hinzugeben. Das Sammelgel wurde mit Parafilm verschlossen, APS und Temed zum Trenngel hinzugegeben und mit einer 10 ml Pipette gut durchmischt. Die Flüssigkeit wurde so zwischen Spacer und Glasplatte eingefüllt, dass ein 2 cm breiter Rand übrig blieb. Der Rand wurde mit Isopropanol überschichtet und polymerisierte innerhalb von 30 min aus. Danach wurde das Isopropanol abgegossen, mit Wasser abgewaschen und mit Papier getrocknet.

Nach Zugabe und Durchmischung von APS und Temed zum Sammelgel wurde das Trenngel damit überschichtet und der Kamm eingesetzt. Die Auspolymerisierung dauerte weitere 30 min. Nicht direkt verwendete Gele wurden bei 4 °C für bis zu 10 Tage gelagert.

Polyacrylamid Trenngele (Mengenangaben für ein Gel)

	8 %	10 %	12 %
Aqua Dest. (ml)	4,75	4,1	3,45
1,5M TRIS pH 8,8 (ml)	2,5	2,5	2,5
30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (ml)	2,67	3,33	4
10 % APS (ml)	0,05	0,05	0,05
TEMED (ml)	0,01	0,01	0,01
Gesamt (ml)	10	10	10

Tabelle 3.10 Angaben für Polyacrylamid Trenngele.

Polyacrylamid Sammelgel

Aqua Dest. (ml)	3,07
1,5 M TRIS pH 6,8 (ml)	1,25
30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid (ml)	0,65
10 % APS (ml)	0,025
TEMED (ml)	0,005
Gesamt (ml)	5

Tabelle 3.11 Angaben für Polyacrylamid Sammelgele

Gelektrophorese

Die Gele wurden in die Halterung eingespannt und in die Elektrophoresekammer gestellt. Die Kammer wurde mit TGS 1x bis zur Markierung gefüllt. Die Kämme wurden aus den Gelen entfernt und mit Hilfe einer Spritze mit TGS ausgespült. Die Kammern wurden nun mit Protein Standard (Precision Plus Protein Standards, BIORAD) oder mit 20 bis 100 µg Probe geladen. Um eine Separierung der Proteine nach ihrer Größe zu erreichen, wurde eine Spannungsquelle an die Kammern angeschlossen. Bis sich der Standard zu separieren begann, das Sammelgel also durchlaufen war, wurde eine Spannung von 90 Volt angelegt. Danach wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Gestoppt wurde die Elektrophorese, wenn die Proben durch das Gel gelaufen waren. Die Gele wurden nun mittel Western-Blot auf eine SDS-Membran übertragen. Es wurden 8 %, 10 % und 12 % Polyacrylamid Gele verwendet

3.2.3.3 **Western-Blot**

Unter „Blotting“ wird generell die Übertragung von Proteinen (Western-Blot), DNA (Southern-Blot) oder RNA (Northorn-Blot) auf eine Membran verstanden. Diese Membran kann dann zum Nachweis bestimmter Moleküle genutzt werden.

Material

- Kammer
 - Bio-RAD Mini-PTOTEAN Tetra Cell
- PVDF-Membran
- Chemikalien
 - Blotting-Puffer

- Immunoblotting Blockierungslösung
- Primäre und Sekundäre Antikörper
- ECL-Reagenzien
- Stripping-Puffer
- MeOH

Transfer und Blotting

Pro Gel wurden zwei Schwämme und zwei Filterpapiere in Blotting-Puffer eingeweicht. Die PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran wurde erst zwei bis fünf Minuten in MeOH aktiviert und dann in Blotting-Puffer gelegt.

Es wurden „Sandwiches“ aus jeweils zwei Schwämmen, zwei Papieren, der Membran und dem Gel, wie in Abbildung 3.1 veranschaulicht, angefertigt und so in die Blotting-Vorrichtung gestellt, dass sich das Gel auf der „Minus“-Seite und die Membran auf der „Plus“-Seite befanden. Die Kammer wurde mit kaltem Blotting-Puffer gefüllt, so dass die „Sandwiches“ mit Flüssigkeit bedeckt waren.

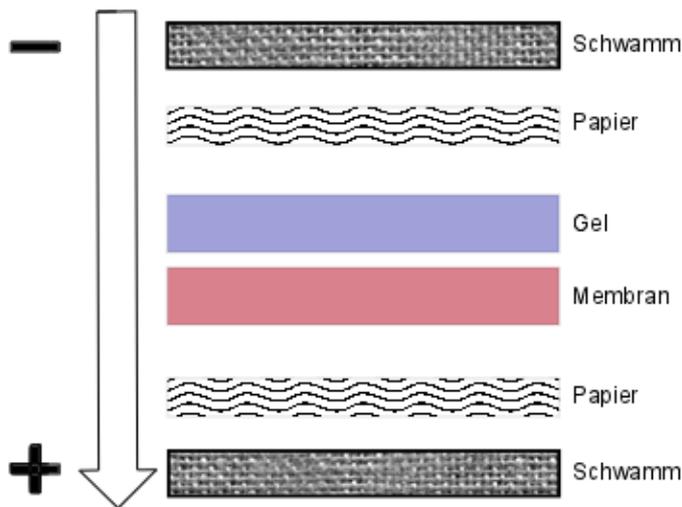


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines "Sandwiches"

Es wurde nun eine Spannung von 100 Volt für ein bis zwei Stunden angelegt. Nach Ablauf der Zeit wurde das „Sandwich“ auseinandergenommen und die Membranen kamen in ein vorher beschriftetes 50 ml Falcon-Röhrchen. Die Membranen wurden nun mit der Immunoblotting-Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach erfolgte die Waschung mit TBST.

Immundetektion

Die Primärantikörper wurden in den in Tabelle 3.7 angegebenen Konzentrationen mit dem Immunoblotting-Verdünnungspuffer für Antikörper verdünnt und bei 4 °C über Nacht auf dem Rollenmischgerät inkubiert. Hiernach erfolgten drei bis vier Waschungen mit TBST. Anschließend wurden die Membranen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem in Tabelle 3.7 angegebenen Sekundärantikörper verdünnt und in der Immunoblotting-Blockierlösung unter Rotation bebrütet. Nach weiteren drei bis fünf Waschungen mit TBST wurden die ECL-Reagenzien auf die Membranen gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysierte eine Oxidation des Luminols, was dann zu einer Chemielumineszenz führte. Diese Lichtabgabe konnte mittels der Autoradiographie als Schwärzung eines Röntgenfilmes dargestellt werden. Hierfür wurden die beiden ECL-Reagenzien A und B (Tabelle 3.6) im Verhältnis 1:40 miteinander vermischt und die Membranen für 5 Minuten inkubiert. In der Dunkelkammer wurden in lichtdichten Kassetten auf die Membranen, getrennt durch eine Plastikfolie, Röntgenfilme aufgelegt. Die Dauer richtete sich nach der Stärke des Lumineszenzsignales. Danach erfolgte die Entwicklung des Filmes mittels des automatischen Filmentwicklers CP 1000.

Lagerung und Wiederverwenden der Membranen

Um primäre sowie sekundäre Antikörper von PVDF-Membranen zu entfernen, wurden die Membranen für 15 Minuten mit 10 ml "Stripping-Puffer" inkubiert. Dadurch lösten sich die Antikörper von den Membranen. Bevor eine erneute Detektion mit einem primären Antikörper erfolgen konnte, musste die Membran mit der Immunoblotting-Blockierlösung behandelt werden. Danach konnte sie, wie oben beschrieben, erneut mit einem primären Antikörper behandelt werden. Für eine eventuelle spätere Verwendung wurden die Membranen bei - 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen mussten sie 15 Sekunden in Methanol gelegt und dreimal mit TBST gewaschen werden.

3.2.4 CellTiter-Blue® Zell Viabilitäts Assay

CellTiter-Blue® der Firma Promega bietet die Möglichkeit, mittels Fluoreszenz die Anzahl lebensfähiger Zellen in Kulturplatten zu erfassen und zu quantifizieren. Hierzu wird die Fähigkeit lebender Zellen, Resazurin (Alamarblau) in Resorufin zu reduzieren, genutzt. Resorufin ist stark fluoreszierend. Die Messung findet bei 560 und 580 nm Wellenlänge statt.

Material

- 96-Well Platten
- Multilabel plate reader VICTOR X3
- CellTiter-Blue® -Kit

Methode

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit den vorgesehenen Substanzen behandelt. Die Auswertung fand nach einer mikroskopischen Sichtkontrolle statt. Zu 100 µl Medium wurden 20 µl CellTiter-Blue® Reagenz dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37° C. Danach wurde die Fluoreszenz bei 560 und 580 nm gemessen. Die Auswertung der Messung erfolgte mittels Microsoft Excel®.

3.2.5 Graphische Darstellung

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Experimente mindestens dreimal durchgeführt. Die Graphen wurden mit Microsoft Excel® erstellt. Es wurde immer der Mittelwert der Experimente angegeben. Zusätzlich wurde mittels Microsoft Excel® die Standardabweichung ermittelt und graphisch als Fehlerindikator dargestellt.

3.2.6 Auswertung der IC-50 Werte

Die Auswertung der absoluten IC-50 erfolgte mittels der GraphPad Prism Software, die auf der nachfolgenden Formel basiert:

$$IC50 = c \left(\frac{a - 50 \% \text{ Antwort}}{50 \% \text{ Antwort} - d} \right) \left(\frac{1}{b} \right)$$

Hier entspricht a der unteren, d der oberen Asymptote der sigmoidalen Kurve. b ist der Umschlagspunkt und c die Konzentration, die dem Mittelwert zwischen a und d entspricht.

3.2.7 Auswertung der Doppelbehandlungen

Die Auswertung von Doppelbehandlungen erfolgte durch die rechnerische Ermittlung eines Kombinationsindex (CI) (Chou, 2010). Für diese Berechnungen wurde die Software CompuSyn verwendet. Der Effekt einer Monobehandlung wird mit folgender Formel beschrieben:

$$\frac{Fa}{Fu} = \left(\frac{D}{Dm} \right)^m$$

D steht für die Dosis der Substanz, Fa für den Anteil, der einen Effekt zeigt, Fu für den Anteil, der keinen Effekt zeigt. Dm ist die mediane Dosis, die einen Effekt erzeugt und m ist der Koeffizient, der die Dosis-Wirkungsbeziehung mit $m = 1$ für hyperbolische, > 1 für sigmoidale und < 1 für flache Kurvenverläufe angibt. Der Kombinationsindex CI wird mittels des medianen Effekts der Substanzen in Kombination sowie des Effektes der Kombination beider Substanzen errechnet. Die Formel lautet:

$$CI = \frac{D_1}{Dx_1} + \frac{D_2}{Dx_2}$$

$Dx_{1/2}$ als Nenner für D1 und D2 geben den Effekt in Prozent an, wenn die Substanzen für sich alleine gesehen werden. D1 und D2 hingegen geben den Effekt einer Kombination in Prozent an. Ein CI kleiner 1 gibt Synergismus an. Ist er gleich 1 bedeutet dies einen additiven Effekt. Ist der CI größer eins bedeutet dies, dass die beiden Substanzen zusammen einen antagonistischen Effekt besitzen.

4 Ergebnisse

Unser Ziel war es, die Regulation des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und seinen Einfluss auf die Zellviabilität zu untersuchen. Mittels Western-Blot wurde nach Behandlung mit spezifischen Inhibitoren von mTORC1 oder PI3K der Phosphorylierungsstatus von Zielproteinen des Signalweges dargestellt. Mittels Zellviabilitäts-Analyse wurden die Ergebnisse des Immunoblottings in ein mögliches Ansprechen der Zellen auf eine Behandlung übersetzt.

4.1 Proteinbiochemische Veränderung in humanen Harnblasenkrebszellen nach der Behandlung mit dem PI3K-spezifischen Inhibitor PIK90

Um den Effekt der Inhibierung von PI3K in verschiedenen humanen Harnblasenkrebszellen auf seine Zielproteine zu untersuchen, nutzten wir den PI3K-spezifischen Inhibitor PIK90. Untersucht wurde die Expressierung und der Phosphorylierungsstatus der Proteine AKT, pAKT (Thr308), pAKT (Ser473), S6K1, pS6K1 (Thr389) und 4EBP1 sowie p4EBP1 (Thr37/46). Wir untersuchten die biochemischen Effekte an neun verschiedene Zelllinien: 253J, BFTC905, RT112, T24, HCV29, HT1197, 639v, J82 und UMUC3. Mittels Western-Blot stellten wir die Einflussnahme von PIK90 auf die Proteinexpression im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg nach einer Stunde Behandlung dar (Abbildung 4.1). Die in der Literatur angegebene IC₅₀ für die Inhibierung der katalytischen Untereinheiten von PI3K wird für 110 α mit 11 nM und für 110 γ mit 18 nM angegeben, für p110 β und δ liegen sie bei 35 nM bzw. 58 nM. Die IC₅₀ für mTORC1 liegt bei 1050 nM (Knight *et al.*, 2006). Wir wählten aufsteigende Dosierungen zwischen 1 und 2000 nM. Die Zellen wurden für eine Stunde behandelt. Hier zeigte sich für alle Zelllinien ein Effekt in der Dephosphorylierung von pAKT an den Aminosäureresten Ser472 und Thr389. Der Phosphorylierungsstatus der Zelllinie HCV29 wurde im Vergleich zu den anderen Zelllinien früh mit einer IC₅₀ von 25 nM inhibiert. Die meisten Zelllinien zeigten ein Ansprechen bei einer PIK90-Konzentration von ca. 50 nM. T24 hatte eine IC₅₀ von 100 nM für pAKT Thr389. Die Inhibierung von pAKT Ser472 erfolgte bei ca. 100 nM. Für alle anderen getesteten Zelllinien erfolgte die Dephosphorylierung von pAKT Thr389 und Ser472 bei ähnlichen PIK90-Konzentrationen. Eine IC₅₀-Inhibierung für

AKT wurde für die Zelllinie UMUC3 bei 250 nM erreicht. Die IC50 der Dephosphorylierung von pS6K1 variierte stärker zwischen den Zelllinien. 253J und BFTC905 zeigten eine IC50 von 50 nM mit einer nicht mehr nachweisbaren Aktivität für 500 nM. RT112, 639v und J82 hatten eine IC50 bei 100 nM. Die IC50 für HT1197 und T24 lag bei 350 nM, für UMUC3 bei 500 nM und für die HCV29 bei 650 nM. Drei der getesteten neun Zelllinien reagierten mit einer teilweisen Dephosphorylierung von 4EBP1: 253J mit einer IC50 von 500 nM, BFTC905 und RT112 mit einer IC50 von 600 nM. Die unterschiedlichen IC50 sind in Abbildung 4.2 graphisch aufgeführt. Zusammenfassend konnte man feststellen, dass alle Harnblasenkarzinomzellen mit einer Inhibierung innerhalb des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges reagierten. Eine teilweise Dephosphorylierung für 4EBP1 zeigten drei Zelllinien: 253J, BFTC905 und RT112, allerdings erst für Konzentrationen von PIK90, die bei AKT und S6K1 bereits zu einer vollständigen Dephosphorylierung geführt hatten und bei denen von einer unspezifischen Inhibitor durch PIK90 ausgegangen werden muss.

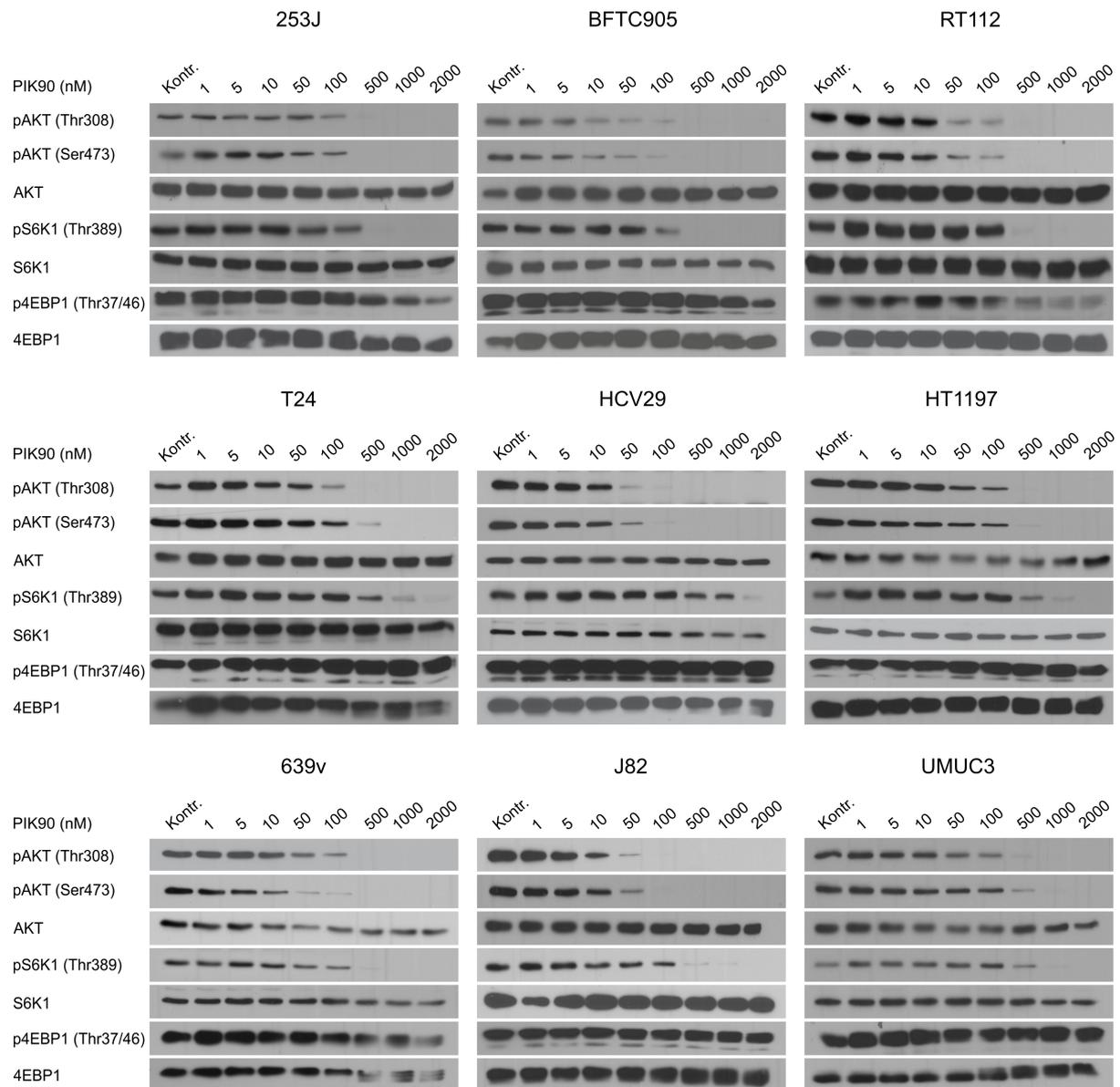


Abbildung 4.1 Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen nach Behandlung mit PIK90. Die Zellen wurden für eine Stunde mit PIK90 behandelt und die Proteinexpression danach mittels Western-Blot analysiert. Als Kontrolle wurde jeweils die totale Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Kontr.: Kontrolle; nM: nanomolar. Teile dieser Daten wurden bereits veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

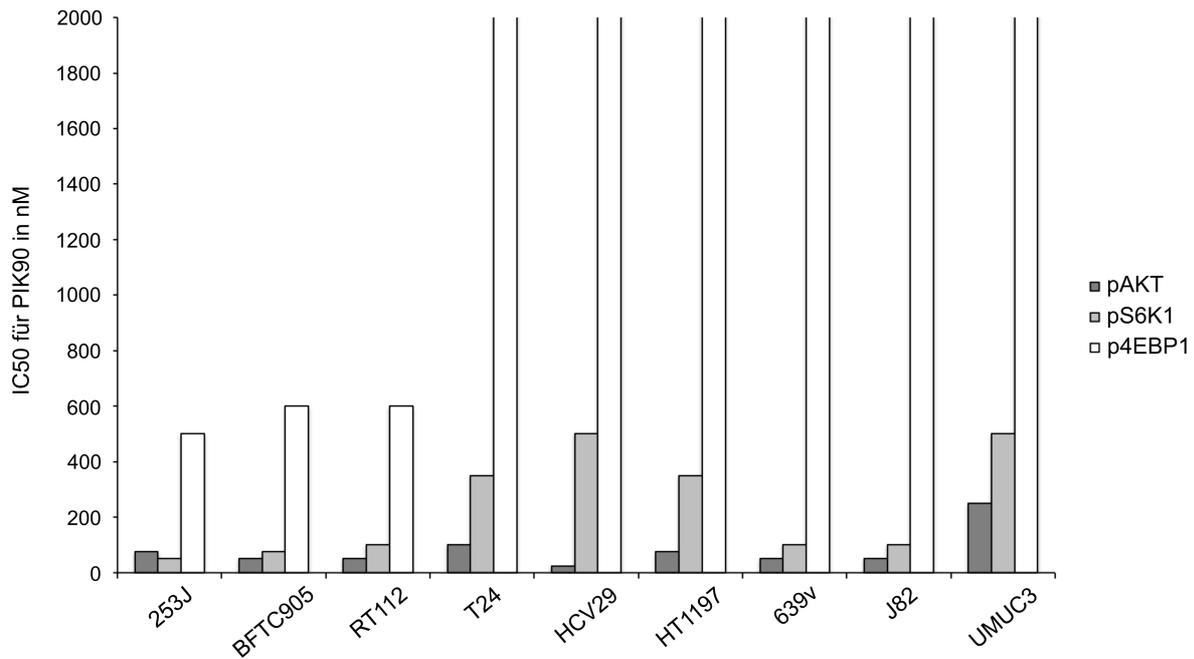


Abbildung 4.2 IC₅₀ Werte der Proteine pAKT (THR), pS6K1 und p4EBP1 für verschiedene Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit PIK90.

4.2 Effekt der Behandlung humaner Blasenkrebszellen mit dem mTORC1-spezifischen Inhibitor RAD001

Da nur eine kleine Untergruppe der getesteten Zelllinien einen Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 zeigte, galt unser Interesse dem allosterischen mTORC1-spezifischen Inhibitor RAD001 (Everolimus) und seinem Einfluss auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg in Harnblasenkarzinomzellen. Unsere Gruppe konnte bereits zeigen, dass RAD001 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von 4EBP1 in den Zelllinien T24 und RT112 hatte (Nawroth *et al.*, 2011). Wir untersuchten nun zusätzlich die Zelllinien HT1197, J82, 253J und 639v in aufsteigenden Konzentrationen von 0,001 nM bis 50 nM RAD001 (Abbildung 4.3). Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Aktivität von pAKT für höhere Konzentrationen von RAD001. Alle Zelllinien zeigten eine Dephosphorylierung von pS6K1. Die Zelllinie HT1197 erreichte für 2 nM RAD001 eine IC₅₀. J82 sprach bei 0,6 nM an, 253J und 639v bei 0,5 nM bzw. 0,4 nM. Keine der Zelllinien reagierte mit einer Dephosphorylierung von 4EBP1 auf die Inhibierung von mTORC1.

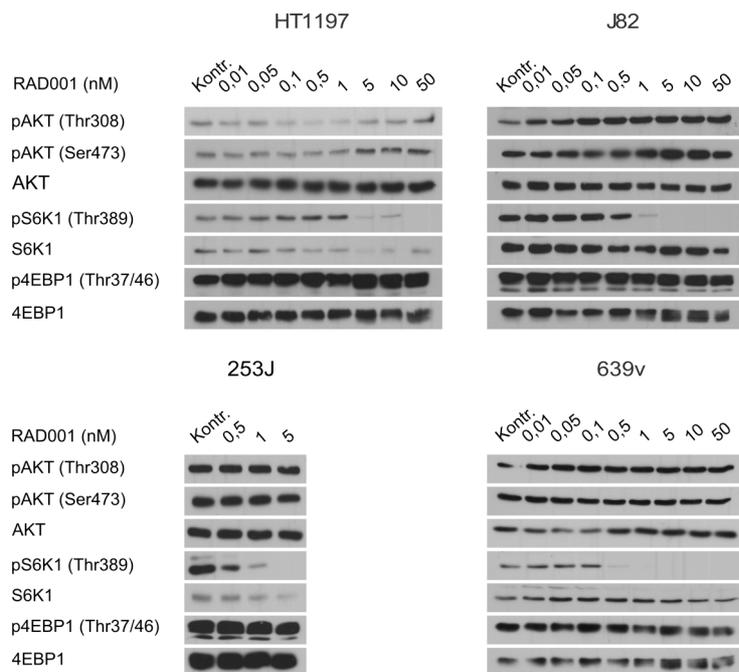


Abbildung 4.3 Analyse der Phosphorylierung verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit RAD001. Die Zellen wurden für eine Stunde mit RAD001 behandelt. Western-Blot der einzelnen Zelllinien mit aufsteigenden Konzentrationen für RAD001. Als Kontrolle wurde jeweils die totale Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Kontr: Kontrolle, nM: nanomolar. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

Diese Ergebnisse deckten sich mit den Daten aus den vorhergegangenen Versuchen, in welchen wir schon ausführlich zeigen konnten, dass die Inhibierung von mTOR keinen Einfluss auf den Aktivitätsstatus von 4EBP1 in Harnblasenkarzinomzellen hat (Nawroth *et al.*, 2011). Ein Effekt auf p4EBP1 kann also nur in drei von neun Zelllinien nach einer Inhibierung von PI3K gesehen werden und auch hier nur in Konzentrationen, in denen man von einer unspezifischen Inhibition anderer Kinasen der PI3K-Familie ausgehen muss. Die allosterische Inhibierung mittels Komplexbildung von RAD001 und FKBP12 und der daraus resultierenden Inhibierung von mTORC1 zeigte auch bei den neu untersuchten Zelllinien keinen Einfluss auf p4EBP1.

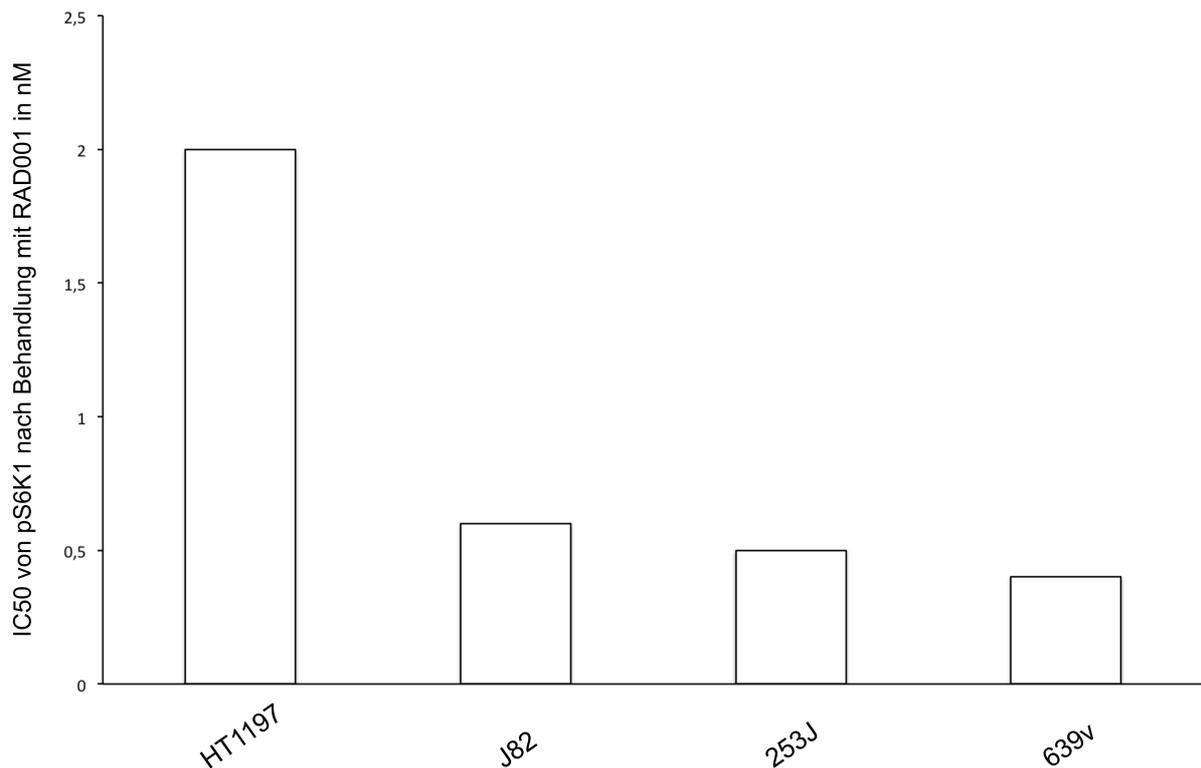


Abbildung 4.4 IC50 für pS6K1 verschiedener Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit RAD001.

4.3 Zellviabilitäts-Analyse humaner Harnblasenkarzinomzellen mittels CellTiter-Blue® Zellviabilitäts-Assay nach Behandlung mit PIK90 oder RAD001

Um eine Korrelation zwischen der Veränderung in der Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges und der Proliferationsfähigkeit der Harnblasenkarzinomzellen zu untersuchen, führten wir eine Zellviabilitäts-Analyse an 13 Zelllinien durch. Zu den neun mittels Immunoblotting analysierten Zelllinien nahmen wir noch fünf weitere Zelllinien hinzu: 639v, 647v, HT1376, KU19-19 und VmCUB1. Nach einer Behandlungszeit von 72 Stunden mit RAD001 oder PIK90 wurde die Zellzahl mittels CellTiter-Blue®-Fluoreszenzassay analysiert (Kapitel 3.2.4).

4.3.1 Zellviabilitäts-Analyse von 13 Harnblasenkarzinomzellen nach 72h Behandlung mit PIK90

Für den Versuch wurde PIK90 in aufsteigenden Konzentrationen von 50 bis 2000 nM auf die Zellen gegeben. Die Auswertung erfolgte nach 72 Stunden (Abbildung 4.5). Im Ansprechen der Zelllinien auf die Behandlung mit dem Inhibitor zeigten sich große Unterschiede.

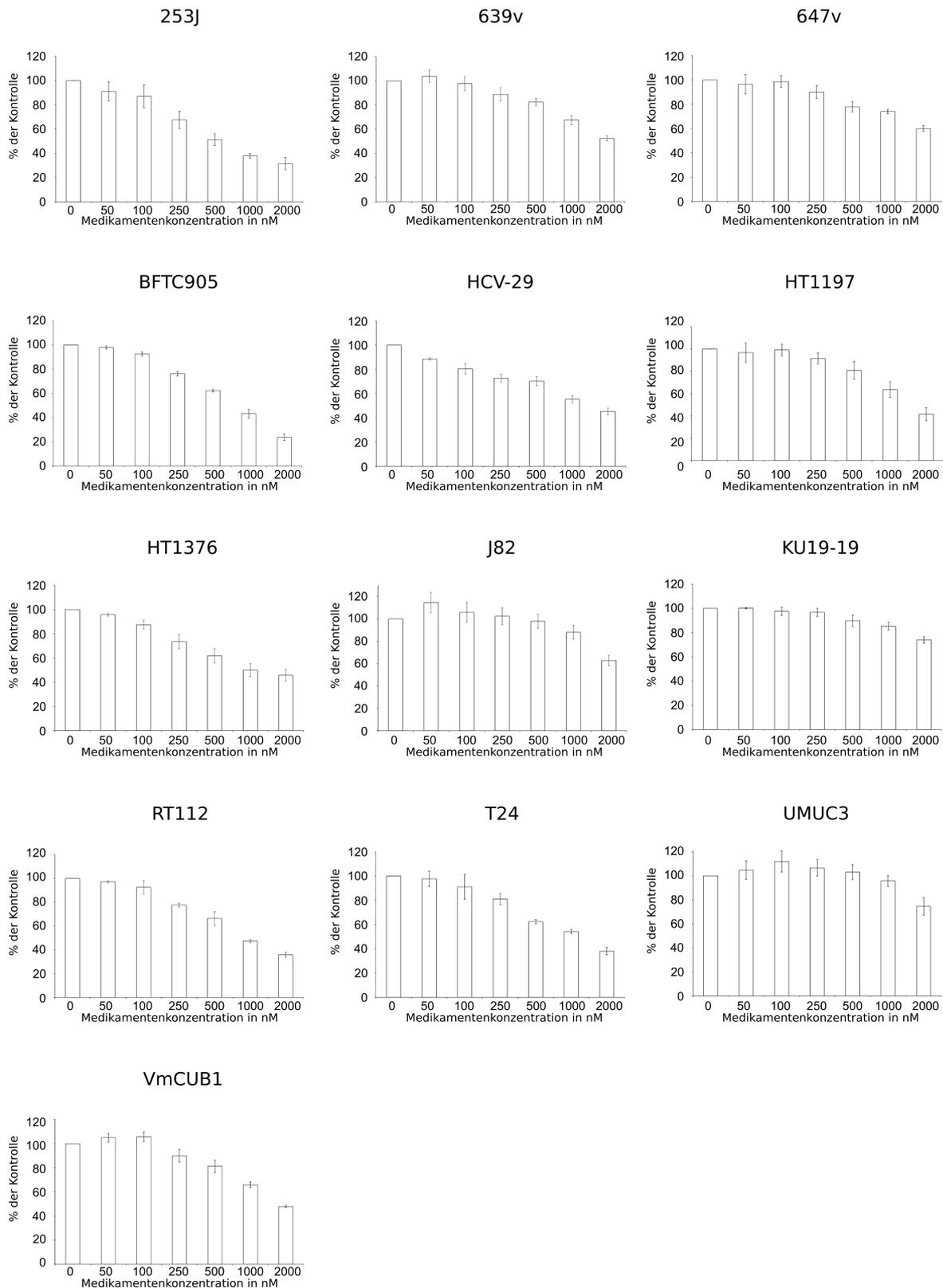


Abbildung 4.5 Zellviabilitäts-Analyse für verschiedene Harnblasenkarzinomzellen nach Behandlung mit PIK90 in aufsteigenden Konzentrationen. Die 13 Zelllinien wurden für 72h mit PIK90 behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmessung. Als Kontrolle wurde die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

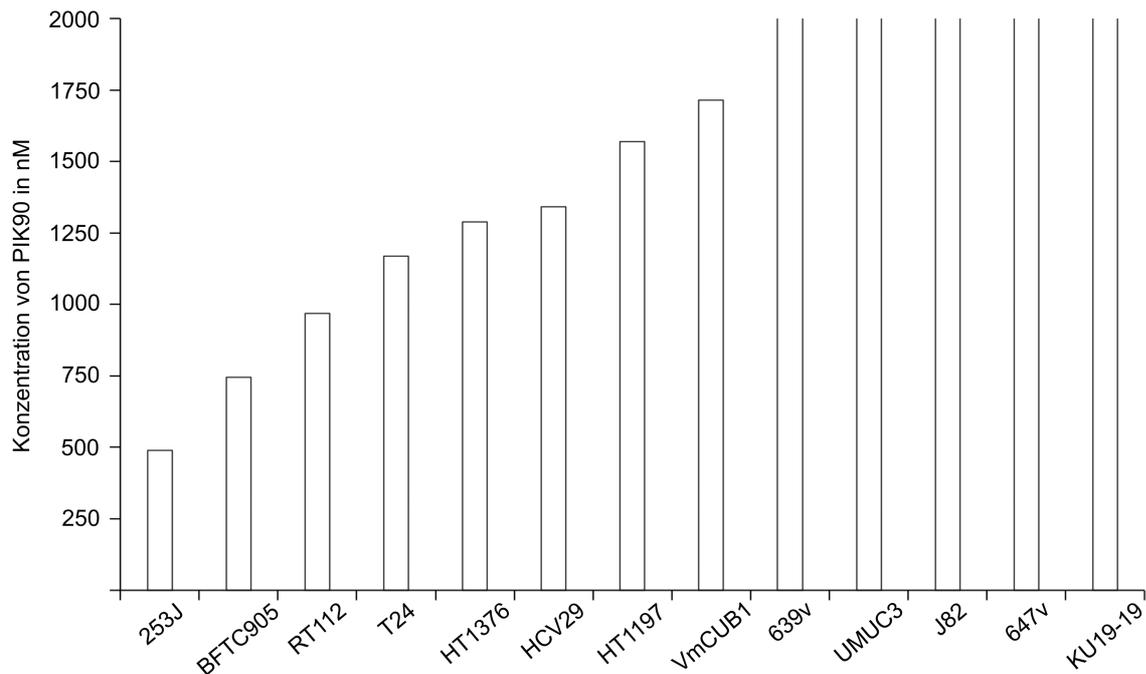


Abbildung 4.6 Absolute IC50 Konzentrationen für 13 Zelllinien in aufsteigender Reihenfolgen. Für KU19-19, 647v, J82, UMUC3 und 639v konnte bis 2000 nM keine IC50 ermittelt werden.

Sowohl der Zeitpunkt des Ansprechens als auch die absoluten IC50 Konzentrationen der verschiedenen Zelllinien variierten (Abbildung 4.5, Abbildung 4.6). Das sensitivste Ansprechen zeigten 253J, BFTC905 und RT112 (23 % der getesteten Zelllinien). Dies korrelierte mit der Dephosphorylierung für 4EBP1 auf die Behandlung mit PIK90 im Immunoblotting. Das durchschnittliche Ansprechen dieser drei von 13 getesteten Zelllinien lag für 500 nM bei 40 % und für 2000 nM bei 80 % Reduktion gegenüber der Kontrolle. Fünf Zelllinien (38 %) zeigten ein intermediäres Ansprechen. Dies entsprach einer Abnahme der Zellzahl gegenüber der Kontrolle für 500 nM zwischen 20 % und 40 % und für 2000 nM zwischen 55 % und 60 %. Weitere fünf Zelllinien (38 %) zeigten sich nicht sensitiv gegenüber der Behandlung mit PIK90 und erreichten bis zu einer Konzentration von 2000 nM PIK90 keine IC50. UMUC3, J82 und KU19-19 zeigten für 500 nM keine Reduktion im Wachstum und 647v eine Abnahme von 20 %. Für 2000 nM erreichten sie Werte von ca. 40 %. KU19-19 schien mit nur 25 % Reduktion besonders resistent.

4.3.2 Zellviabilitäts-Analyse von 13 Harnblasenkarzinomzellen nach 72h Behandlung mit RAD001

Um den Effekt einer mTORC1-spezifischen Inhibierung auf Harnblasenkarzinomzelllinien untersuchen zu können, führten wir eine Behandlung der gleichen 13 Zelllinien mit RAD001 durch, wie in Abbildung 4.7 dargestellt.

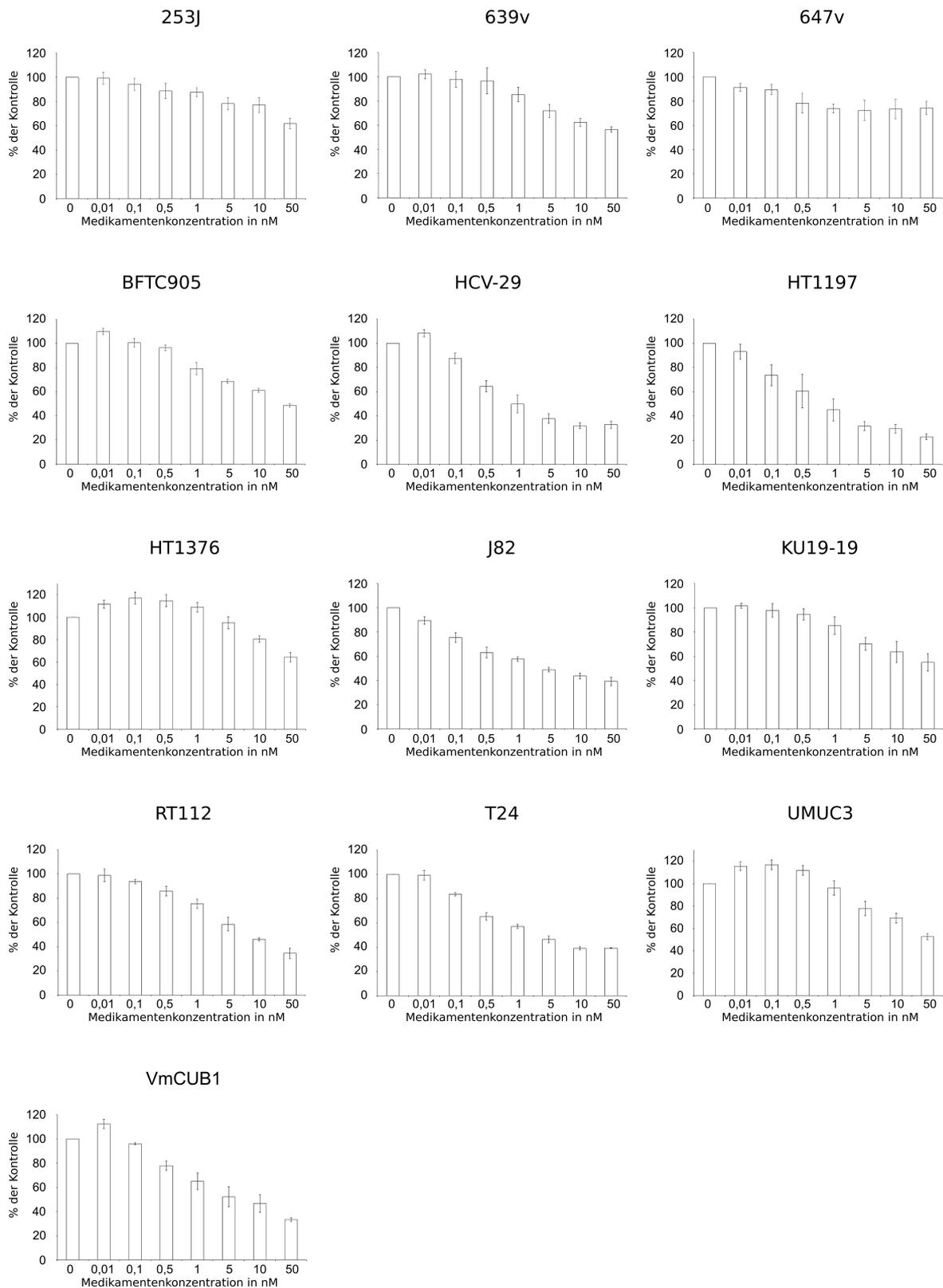


Abbildung 4.7 Zellviabilitäts-Assay für verschiedene Harnblasenkarzinomzellen unter Behandlung mit RAD001 in aufsteigenden Konzentrationen. Die 13 Zelllinien wurden mit Konzentrationen von 0,01 bis 50 nM für 72h behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmessung. Als Kontrolle wurde die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

Das Ansprechverhalten zeigte sich ähnlich heterogen wie das nach der Behandlung mit PIK90. Die Zellen wurden mit RAD001 in Konzentrationen zwischen 0,01 - 50 nM für 72 Stunden behandelt. Hier reagierten sechs der 13 Zelllinien (46 %) mit einer IC50 von ≤ 10 nM und acht (61 %) erreichten eine absolute IC50 (Abbildung 4.8). Das sensitivste Ansprechen zeigte die Zelllinie HT1197, welche schon bei einer Konzentration von 0,1 nM mit einer Reduktion von 25 % gegenüber der Kontrolle reagierte, bei 5 nM sogar mit fast 70 %. Die vier Zelllinien (HCV29, T24, J82 und HT1197) mit dem deutlichsten Ansprechen für 0,1 nM mit 20 % reagierten auch für 5 nM mit fast 60 % am effektivsten auf die Behandlung mit RAD001. Keine andere der getesteten Zelllinien zeigte ein Ansprechen für 0,1 nM von >10 %. Einige der Zelllinien reagierten sehr früh (0,1 nM) auf eine Behandlung mit RAD001, dies sagte aber kein gutes Ansprechen für höhere Konzentrationen vorher. Z. B. zeigte die Zelllinie 647v zwar eine 10 %-ige Reduktion ihres Wachstums für 0.1 nM, aber nur 30 % für 5 nM. Wohingegen VmCUB1 für 0.1 nM gerade einmal einen 4 %-igen Effekt zeigte, für 5 nM jedoch fast 50 % erreichte.

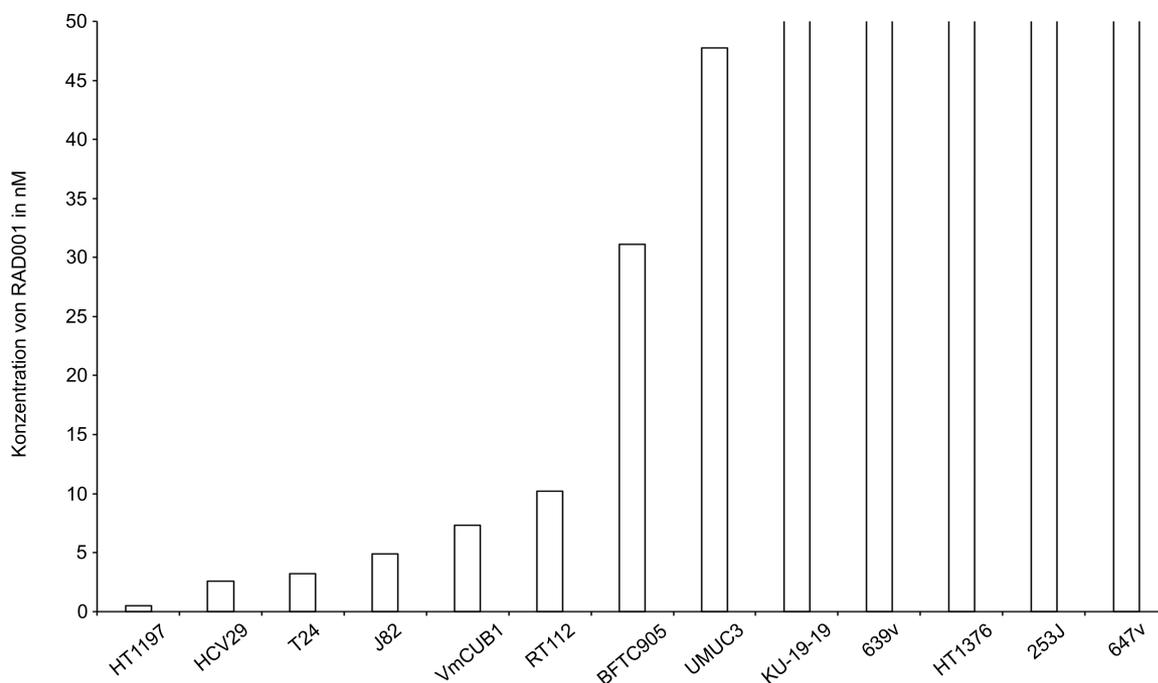


Abbildung 4.8 Absolute IC50 Konzentrationen für 13 Zelllinien in aufsteigender Reihenfolge. Bis zu einer IC50 von 10 nM wurde das Ansprechen als Sensitiv gewertet. Für fünf Zelllinien konnte keine IC50 ermittelt werden.

Eine Korrelation zwischen diesem Ansprechen und den Ergebnissen des Immunoblottings konnte nicht festgestellt werden. Zusammenfassend zeigte sowohl

die Behandlung mit PIK90 oder RAD001 ein heterogenes Ansprechen in der Viabilität.

4.4 Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die Behandlung mit PIK90 oder RAD001 und den genetischen Veränderungen der Zelllinien

Für die Behandlung mit PIK90 konnte in drei von neun Zelllinien eine beginnende Dephosphorylierung von 4EBP1 bis 2000 nM gesehen werden. Diese Zelllinien reagierten auch sensibel im Viabilitäts-Assay. Insgesamt zeigten acht von 13 Zelllinien ein sensibles bis moderates Ansprechen für die Behandlung mit PIK90. Für RAD001 zeigt sich, dass fünf von 13 getesteten Zelllinien sensibel auf die Behandlung reagierten. Zwar konnten im Immunoblotting verschiedene IC50-Konzentrationen für die Dephosphorylierung von pS6K1 gesehen werden, eine Korrelation zum Viabilitäts-Assay war jedoch nicht festzustellen. Es stellte sich daher die Frage, ob Alterationen oder Mutationen der verschiedenen Zelllinien einen Einfluss auf das Ansprechen im Immunoblotting und/oder im Zellviabilitäts-Assay haben. Hierfür durchsuchten wir die einschlägigen Datenbanken SANGER (www.sanger.ac.uk) und CCLE (www.broadinstitute.org) sowie Daten aus wissenschaftlichen Artikeln (Askham *et al.*, 2010; Platt *et al.*, 2009) auf Literatur über Veränderungen in der Genetik der Zelllinien. Die Alterationen sind in Tabelle 4.1 graphisch dargestellt. Wir konzentrierten uns dabei auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Die Zelllinie 253J zeigte eine aktivierende Mutation im PI3KCA-Gen. Auch die Zelllinie HT1197 wies eine solche Mutation auf, jedoch war das Ansprechen auf PIK90 eher moderat, und im Immunoblotting konnte kein Effekt auf p4EBP1 gesehen werden. Da wir früher zeigen konnten, dass der Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg einen Einfluss auf den PI3K-Signalweg nahm (Nawroth *et al.*, 2011), wurde auch das Alterationsspektrum von H-, N-, K-Ras betrachtet. Die Zelllinie BFTC905 trug eine Mutation im N-Ras-Gen. Aber auch hier zeigte sich kein prädiktiver Zusammenhang, wenn man das Verhalten anderen Zelllinien mit einer ähnlichen genetischen Veränderung betrachtet. Für RAD001 wird in der Literatur der Gen-Locus TSC1 diskutiert, der zusammen mit einer Veränderung im Neurofibromatose Typ II (NF2)-Gen in einem Patienten gefunden wurde. Dieser Patient hatte auf die Behandlung mit RAD001 26 Monate progressionsfreies Überleben gezeigt (Seront *et al.*, 2012). In diesem Versuchsaufbau konnte die

genannte Veränderung für TSC1 jedoch nicht mit einem generell guten Ansprechen verknüpft werden.

Zelllinie	PI3KCA	PTEN	AKT	TSC1	FGFR3	RAS	PIK90 WB 4EBP1	PIK 90 ZVA	RAD001 ZVA
253J	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Grey	White	Blue
639v	Yellow	Red	Green	Red	Red	Green	Dark Grey	Blue	Blue
647v	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Black	Blue	Blue
BFTC905	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Grey	White	Blue
HCV-29	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Dark Grey	Light Blue	White
HT1197	Red	Red	Green	Green	Green	Red	Dark Grey	Light Blue	White
HT1376	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Black	Light Blue	Blue
J82	Yellow	Red	Green	Green	Red	Green	Dark Grey	Blue	White
KU19-19	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Black	Blue	Blue
RT112	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Grey	White	White
T24	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Dark Grey	Light Blue	White
UMUC3	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Dark Grey	Blue	Blue
VmCUB1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Black	Light Blue	White

Legende:

■ Wildtyp	■ Reduktion	■ Gutes Ansprechen
■ Mutation bekannt	■ Keine Reduktion	■ Intermediäres Ansprechen
■ Mutation ohne aktivierenden Effekt	■ Keine Daten	■ Kein Ansprechen

Tabelle 4.1 Mutationsspektrum des PI3K-Signalwegs der benutzten Harnblasenkarzinom-Zelllinien.

Auch für andere Gen-Loci ist anhand der bisher bekannten Mutationen, in diesem Setting, keine Vorhersage des Ansprechens für PIK90 und für RAD001 möglich.

4.5 Duale Behandlung ausgewählter Zelllinien mit PIK90 und RAD001 – Beeinflussung von 4EBP1 und des Zellwachstums im Vergleich zur Monotherapie

In den vorausgegangenen Experimenten konnten wir zeigen, dass RAD001 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von 4EBP1 hatte und PIK90 nur in den Zelllinien 253J, RT112 und BFTC905 und in unspezifischen Dosierungen. Interessanterweise führte aber der gegen das katalytische Zentrum der PI3Kinase-Familie gerichtete duale mTOR/PI3K-Inhibitor NVP-BEZ253 zu einer Dephosphorylierung von 4EBP1. Jedoch reagierte p4EBP1 erst bei deutlich höheren Konzentrationen als pS6K1. pAKT reagierte, anders als bei der Behandlung mit PIK90, deutlich später als pS6K1, was auf eine direkte Inhibierung von mTOR durch

NVP-BEZ253 hinwies. Unter der Behandlung mit PIK90 schien erst die Inhibierung von pAKT zu einem Effekt auf mTORC1 zu führen (Nawroth *et al.*, 2011). Von Interesse war nun, ob die gleichzeitige Inhibition von PI3K und mTOR zu einem Effekt, ähnlich dem von NVP-BEZ253 führen würde. Zusätzlich sahen wir, dass ein gutes Ansprechen im Zellviabilitäts-Assay für PIK90 mit einer Reduktion der Phosphorylierung von 4EBP1 zusammenhing. Unsere Gruppe zeigte, dass p4EBP1 in Harnblasenkarzinomzellen nicht der Regulierung von mTOR unterliegt (Nawroth *et al.*, 2011). Es galt, die regulatorischen Einflüsse von 4EBP1 näher zu beschreiben. Außerdem sollte verifiziert werden, dass das Ansprechen auf ein Eingreifen in den PI3K-Signalweges besonders effektiv ist, wenn biochemisch eine Dephosphorylierung von 4EBP1 festgestellt werden kann. Hierzu untersuchten wir den Einfluss einer dualen Inhibition des PI3K-Signalweges mittels RAD001 und PIK90.

4.5.1 Immunoblotting der Zelllinien RT112, J82 und 639v nach dualer Behandlung mit PIK90 und RAD001

Wir behandelten die Harnblasenkarzinomzellen RT112, J82 und 639v gleichzeitig mit 5 nM RAD001 und PIK90 in aufsteigenden Konzentrationen, beginnend mit 10 nM und einem Höchstwert von 2000 nM PIK90. Wir wählten dazu gezielt drei Zelllinien, die die Diversität des Ansprechens auf RAD001 und PIK90 in den vorhergegangenen Versuchen widerspiegeln. Hierfür wurde zunächst RT112 untersucht, eine Zelllinie, die ein sehr gutes Ansprechen auf PIK90 im Viabilitäts-Essay zeigte. Auch war für hohe Konzentrationen PIK90, in denen unspezifische Bindungen von PIK90 angenommen werden müssen ein Dephosphorylierungseffekt von 4EBP1 zu sehen. Im Ansprechen auf RAD001 zeigte sich eine IC₅₀ von 10 nM. J82 war im Bezug auf RAD001 mit einer IC₅₀ von 4,8 nM, sensitiv, für PIK90 jedoch wurde bis 2000 nM keine IC₅₀ erreicht. 639v erreichte weder in der Behandlung mit PIK90 noch mit RAD001 in der Monobehandlung eine IC₅₀.

Nach einer Stunde Behandlung mit der Kombination aus RAD001 und PIK90 wiesen die drei Zelllinien im Immunoblotting für pAKT Thr389 und Ser472 eine IC₅₀ von 5 nM für RAD001 und 50 nM für PIK90 auf. Keine der Zelllinien zeigte für 5nM RAD001 und 500 nM PIK90 noch eine Aktivität für pAKT. pS6K1 zeigte, wie zu erwarten, für keine der dargestellten Konzentrationen eine Aktivität. Die Dephosphorylierung von 4EBP1 zeigte für RT112 eine IC₅₀ für 5 nM RAD001 und 500 nM PIK90. Eine komplette Reduktion konnte für die gewählten Konzentrationen

nicht festgestellt werden. Ähnlich verhielt es sich auch mit den Zelllinien J82 und 639v. Für die Zelllinie 639v zeigte sich allerdings erst für 5 nM RAD001 und 1000 nM PIK90 eine deutliche Reduktion der Aktivität von p4EBP1 (Abbildung 4.9).

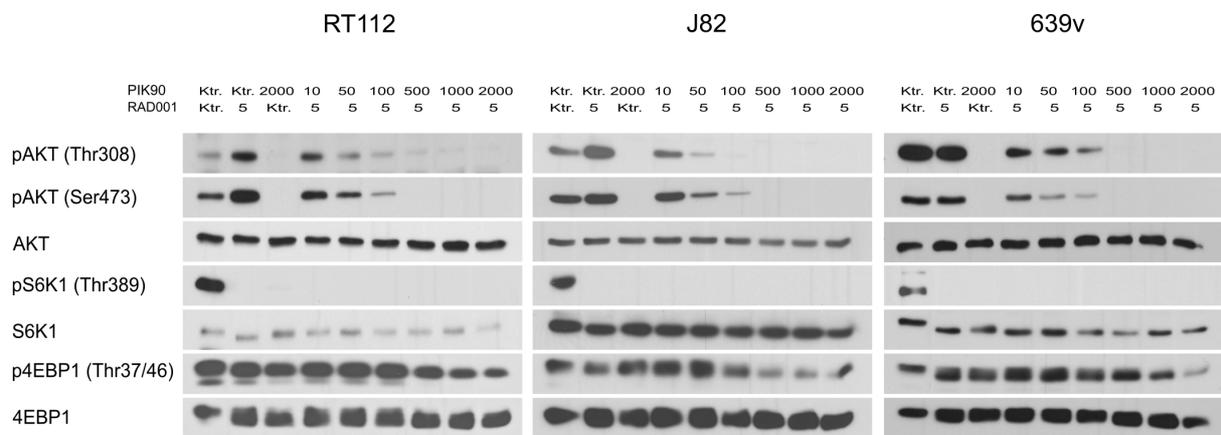


Abbildung 4.9: Analyse der Phosphorylierung verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen. Western-Blot-Analyse der Zelllinien Rt112, J82 und 639v mit aufsteigenden Konzentrationen für PIK90 bei gleichzeitiger Gabe von 5 nM RAD001. Die Behandlung erfolgte für eine Stunde. Als Kontrolle wurde jeweils die totale Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Ktr. : Kontrolle, Alle Konzentrationen in nM. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

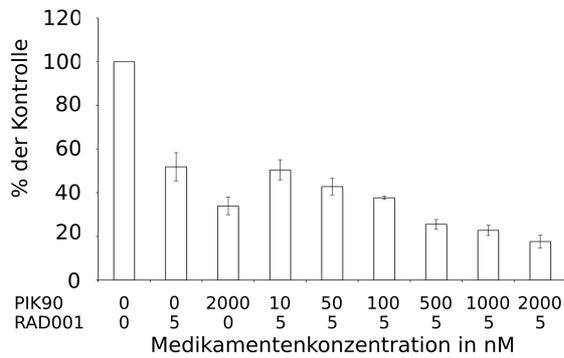
Die Ergebnisse der dualen Behandlung waren für die Zelllinie RT112 vergleichbar mit den Western-Blots der Monotherapie bezüglich der Dephosphorylierung von 4EBP1. Für die Zelllinie 639v zeigte sich kein Unterschied bezüglich pAKT und pS6K1. Bemerkenswert war jedoch der oben beschriebene Effekt auf p4EBP1. Die Zelllinie J82 reagierte auch ähnlich bezogen auf pAKT und pS6K1. Für die Zelllinien 639v und J82 war die beginnende Dephosphorylierungseffekt auf p4EBP1 allerdings in der Monotherapie nicht zu beobachten. Wir konnten also zeigen, dass die duale Inhibition mittels eines PI3K-Inhibitors und eines mTOR-Inhibitors, einen Einfluss auf den Aktivierungszustand von 4EBP1 hat.

4.5.2 Zellviabilitäts-Assay nach 72h dualer Behandlung der Harnblasenkarzinom-Zelllinien RT112, J82 und 639v mit PIK90 und RAD001

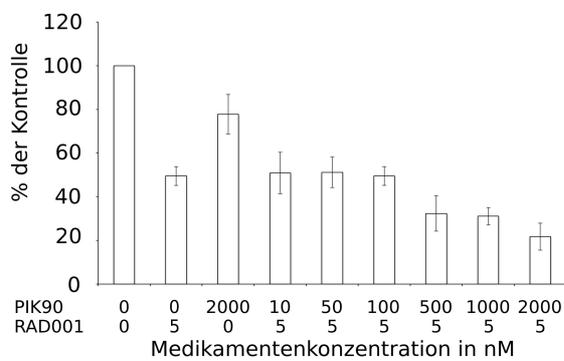
Es stellte sich nun die Frage, ob die Dephosphorylierung von 4EBP1 mit dem Zellwachstum humaner Harnblasenkarzinomzelllinien korreliert. Wir gestalteten den gleichen Versuchsaufbau wie für die Wachstumskurven in der Monobehandlung und nutzten die Konzentrationen des Immunoblottings der Doppelbehandlung. Man konnte einen sehr deutlichen Effekt auf das Ansprechen der Zellen beobachten, insbesondere für Konzentrationen ab 500 nM PIK90 und 5 nM RAD001 (Abbildung 4.10 A). So zeigte sich für die Zelllinien RT112 eine 75 %ige Reduktion für 500 nM PIK90 und 5 nM RAD001 gegenüber der Kontrolle. Die alleinige Behandlung mit PIK90 erbrachte nur einen Effekt von 40 %. Ähnlich fiel das Ergebnis für die anderen beiden Zelllinien aus. J82 sprach mit 68 % Reduktion gegenüber der Kontrolle an. In der Monobehandlung mit PIK90 war kein Effekt feststellbar. 639v sprach mit 64 % gegenüber 18 % ebenfalls deutlich besser an. Da ein Teil dieses Effektes alleinig auf die zusätzliche Behandlung mit RAD001 zurückzuführen war, errechneten wir mittels der Software CompuSyn (Chou, 2010) ,Kapitel 3.2.7) den Kombinationsindex (CI). Ein CI kleiner eins lässt auf einen Synergismus schließen. Ist der CI gleich eins bedeutet dies einen additiven Effekt. Ist der CI größer eins spricht dies für einen antagonistischen Effekt der beiden Substanzen. Wir beobachteten, dass für RT112 bis 500 nM PIK90 und 5 nM RAD001 ein klar synergistischer Effekt festzustellen war. Der Synergieeffekt wurde weniger für 1000 nM PIK90 und 5 nM RAD001 und ging in einen additiven Effekt für 2000 nM PIK90 und 5 nM RAD001 über.

A

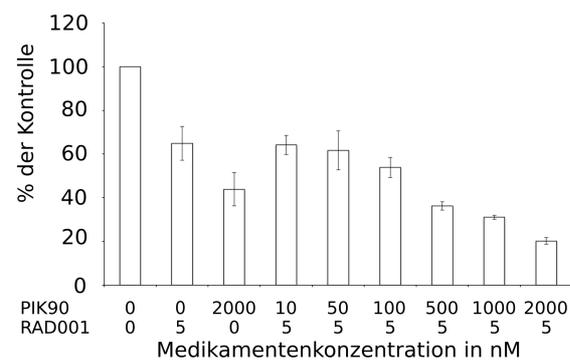
RT112



J82

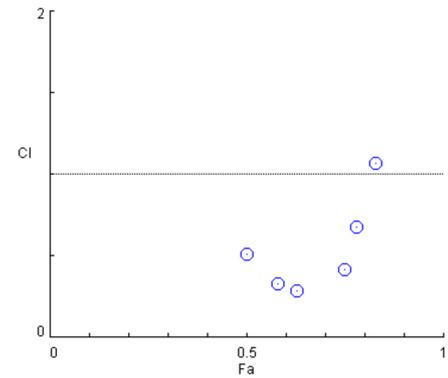


639v

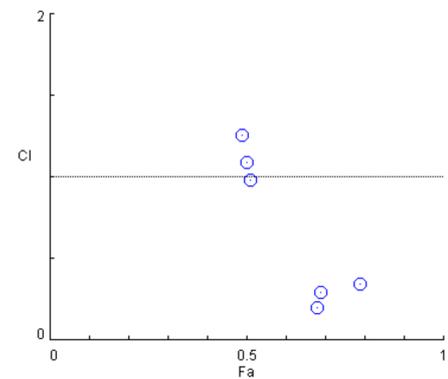


B

RT112



J82



639v

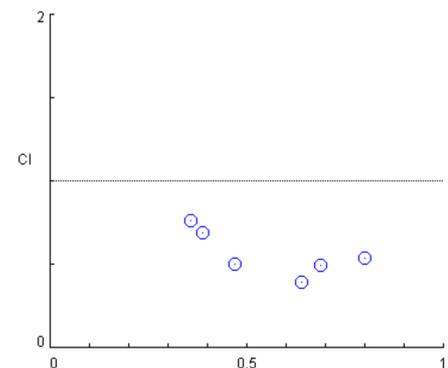


Abbildung 4.10 A Doppelbehandlung mit PIK90 in aufsteigenden Konzentrationen und RAD001 in fester Konzentration von 5 nM. Als Kontrollen wurden die höchsten Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe *et al.*, 2018)

B Kombinationsindex (CI) für die duale Behandlung der Zelllinien RT112, J82 und 639v mit PIK90 und RAD001. Gezeigt ist eine graphische Darstellung des Kombinationsindexes. Werte unterhalb der CI-Linie entsprechen einem synergistischen Effekt. Darüber besteht, abhängig vom Abstand zu der CI-Linie, ein additiver oder antagonistischer Effekt. Die genauen Zahlenwerte finden sich in Tabelle 4.2.

Dosis RAD001	Dosis PIK90	CI RT112	CI J82	CI 639v
5nM	10nM	0.5	1.1	0.8
5nM	50nM	0.3	1.2	0.7
5nM	100nM	0.3	0.9	0.5
5nM	500nM	0.4	0.2	0.4
5nM	1000nM	0.7	0.3	0.5
5nM	2000nM	1	0.3	0.5

Tabelle 4.2 Kombinationsindex (CI) für die Zelllinien RT112, J82 und 639v bei Doppelbehandlung mit RAD001 und PIK90. Der Kombinationsindex wurde mittels der Software CompuSyn berechnet.

Ein anderes Bild zeigte sich für die Zelllinie J82. Für niedrigere Konzentrationen von PIK90 konnte ein additiver bis antagonistischer Effekt auf die Doppelbehandlung gesehen werden. Für hohe Konzentrationen (>500 nM) PIK90 zeigte sich jedoch ein ausgeprägter synergistischer Effekt. Die Zelllinie 639v reagierte bei allen Konzentrationen der beiden Medikamente mit einem deutlichen synergistischen Effekt (Abbildung 4.11 B, Tabelle 4.2). Bei dualer Behandlung von Harnblasenkarzinomzellen gegenüber der Monobehandlung ergab sich ein additiver bis synergistischer Effekt der beiden Substanzen für Konzentrationen ≥ 5 nM RAD001 und 100 nM PIK90. Dieser Effekt korrelierte mit einer Dephosphorylierung von 4EBP1.

5 Diskussion

Einer der am häufigsten veränderten Signalwege in humanen Krebserkrankungen ist der PI3K-Signalweg (Weigelt and Downward, 2012). Beim Harnblasenkarzinomen konnte in ca. 70 % eine erhöhte Aktivität im RTK/RAS/PI3K/AKT/mTOR-Signalweg festgestellt werden (Network, 2014). Die ersten zugelassenen Therapeutika, die in den PI3K-Signalwege eingriffen, waren die sogenannten Rapalogs (Rapamycin-Derivate). Seitdem wurden eine Vielzahl von PI3K-Signalweg-Inhibitoren entwickelt. Sie unterscheiden sich durch ihren Angriffspunkt innerhalb des Signalweges. Es gibt ATP-kompetitive, duale Klasse I PI3K/mTOR-Inhibitoren (mTORC1 und mTORC2), "pan-,PI3K-Inhibitoren, isoform-spezifische PI3K-Inhibitoren, allosterische und katalytische AKT-Inhibitoren und ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren (mTORC1 und mTORC2). Jedoch wurde, abgesehen von den Rapalogs, nur der PI3K- δ -Inhibitor Idelalisib für die Behandlung der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) durch die FDA zugelassen (Yap *et al.*, 2015). Alle klinischen Versuche im Harnblasenkarzinom mit PI3K/AKT/mTOR-Signalweg-Inhibitoren sind bisher eher enttäuschend verlaufen. Die Gründe hierfür sind noch nicht abschließend untersucht. In dieser Arbeit wurde mittels spezifischer Inhibition der PI3-Kinase und mTORC1 in Monotherapie und dualer Therapie die Regulation von 4EBP1 in Harnblasenkarzinomzellen weiter erforscht, um somit Grundlagen zu erarbeiten, auf Basis derer eine weitere Erforschung *in vivo* und in klinischen Studien erfolgen kann.

5.1 Inhibition von PI3K mittels PIK90

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Inhibierung der PI3-Kinase vor allem auf die mTORC1 Substrate S6K1 und 4EBP1, und die Viabilität in Harnblasenkarzinomzellen getestet. In allen verwendeten Harnblasenkarzinomzellen führte die Behandlung mit PIK90 zu einer Dephosphorylierung von pAKT an den beiden Aminosäureresten Ser473 und Thr308. Aufgrund der Dephosphorylierung von pS6K1 konnte davon ausgegangen werden, dass mTORC1 durch die Behandlung mit PIK90 via der Inhibition von PI3K ebenfalls beeinflusst wurde (Laplane and Sabatini, 2009). Das in den drei Zelllinien 253J, BFTC905 und RT112, wie in Abbildung 4.1 gezeigt, bei höheren Konzentrationen ein Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 zu sehen war, ist vermutlich auf eine zusätzliche

direkte Inhibition von mTORC1 zurückzuführen (Knight *et al.*, 2006). Die IC50 für mTORC1 wird mit 1000 nM angegeben, jedoch ist bekannt, dass Zelllinien, abhängig von ihrem Alterationsspektrum, in ihrer Spezifität variieren (Fan *et al.*, 2006). Ein Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 konnte von uns in Harnblasenkarzinomzelllinien bisher nur mit dualen PI3K/mTOR-Inhibitoren, wie NVP-BEZ235, zuverlässig erzielt werden. Spezifische PI3K-Inhibitoren oder mTOR-Inhibitoren zeigten in Konzentrationen, in denen eine relative Spezifität angenommen werden kann, keinen Einfluss auf 4EBP1 (Nawroth *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2014). In Adipozyten konnte für PIK90 bis zu einer Konzentration von 1000 nM kein Effekt auf p4EBP1 gezeigt werden (Knight *et al.*, 2006). In Glioma-Zellen zeigte PIK90 zwar einen Dephosphorylierungseffekt für 4EBP1, jedoch deutlich geringer als der PI3K/mTOR-Inhibitor PI-103 (Fan *et al.*, 2006). Dies unterstützt unsere Annahme, dass nur eine duale Inhibition von mTOR und PI3K einen suffizienten Einfluss auf die Phosphorylierung von 4EBP1 hat. Schaut man sich nun den Einfluss von PIK90 auf die Zellviabilität in Abbildung 4.5 an, so sieht man, dass ein gutes Ansprechen auf die Behandlung mit PIK90 dann gegeben war, wenn im Immunoblotting eine Dephosphorylierung von 4EBP1 zu sehen war. So zeigten die drei Zelllinien, 253J, BFTC905 und RT112, die im Immunoblotting mit einer beginnenden Dephosphorylierung für 4EBP1 für Konzentrationen größer 500 nM reagierten, das beste Ansprechen auf die Behandlung mit PIK90. Dass nur eine gemeinsame Inhibition von 4EBP1 und S6K1 zu einem effektiven Therapieerfolg führte, konnten wir schon früher in der Behandlung von Harnblasenkarzinomzelllinien mit NVP-BEZ235 im Vergleich zu RAD001 zeigen (Nawroth *et al.*, 2011). Zusammenfassend unterstreichen diese Ergebnisse, dass in der Behandlung von humanen Harnblasenkarzinomzellen mittels einer Inhibition des PI3K-Signalweges die Inhibierung von 4EBP1 mit einer erfolgreichen Therapie korreliert. Die Dephosphorylierung von 4EBP1 ist auch ein wichtiger Biomarker für das generelle Ansprechen von Tumoren gegenüber einer PI3K/AKT/mTOR-Therapie (She *et al.*, 2010). Die reine Inhibition von PI3K hat jedoch keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von 4EBP1 und scheint somit nicht ausreichend für eine erfolgsversprechende Therapie.

Dass nur drei der getesteten neun Zelllinien mit einer Dephosphorylierung reagierten, ist wahrscheinlich auf ihren molekularen Mutations- oder Alterationsstatus zurückzuführen. Um eine mögliche Korrelation aufzuzeigen, untersuchten wir das

Ansprechen in Bezug auf das Mutationsspektrum für PI3K, PTEN, AKT, TSC1, FGFR3, und RAS. In unseren getesteten Zelllinien konnten wir keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Alterationsspektrum der Zelllinien und ihrem Ansprechen auf die Therapie sehen. Andere Gruppen konnten zeigen, dass PTEN-defiziente oder PI3KCA-mutierte Tumore eine höhere Sensitivität gegenüber einer Therapie mit PI3K/AKT/mTOR-Inhibitoren haben (Meric-Bernstam *et al.*, 2012; Neshat *et al.*, 2001). Im Harnblasenkarzinom sagt eine PI3KCA-Mutation in der helikalen Domäne ein Ansprechen auf die Therapie mit dem allosterischen AKT-Inhibitor MK-2206 vorher (Sathe *et al.*, 2014). Schaut man sich, wie in Tabelle 4.1 aufgeführt, die Alterationsmuster der Zelllinien an, die auf die Inhibition der PI3-Kinase mit einer Dephosphorylierung von 4EBP1 und einem sehr sensitiven Ansprechen im Viabilitätsassay reagierten, so trägt 253J eine aktivierende PI3KCA-Mutation in sich. BFTC905 trägt eine Mutation im N-Ras-Gen, und es sind keine Mutationen im PI3K-Signalweg bekannt. Eine konstitutive Aktivierung des PI3K/MAPK-Signalweges durch die Überexpression des FGFR3-Rezeptors konnte in der Zelllinie RT112 gezeigt werden (Gomez-Roman *et al.*, 2005; Nawroth *et al.*, 2011). Von Will *et al.* konnten zeigen, dass eine Veränderung im Ras- oder Raf-Gen in Mammakarzinomzelllinien zu einer Desensibilisierung für die PI3K-Therapie führt und nur ein Wildtyp-Ras der Kontrolle einer PI3K-Inhibition zu unterliegen scheint (Will *et al.*, 2014b). Wir konnten diesen Effekt für die Zelllinie BFTC905 allerdings nicht sehen, die sich, trotz der Ras-Mutation auf eine Behandlung mit einem PI3K-Inhibitor besonders sensitiv zeigte. Interessanterweise scheint die Aktivität von PI3K bei Mutationen in der helikalen Domäne Ras abhängig zu sein (Zhao and Vogt, 2008). Die Zelllinie HT1197, welche eine aktivierende Mutation in der helikalen Domäne besitzt, zeigte ein schlechtes Ansprechen. Dies könnte hierbei auf die zusätzliche N-Ras-Mutation der Zelllinie zurückzuführen sein. Verschiedene Gruppen zeigten, dass ein Ansprechen auf eine Therapie mit PI3K/mTOR-Signalweg-Inhibitoren besser ist, wenn Alterationen im PI3K-Signalweg vorliegen. Die Klassifizierung, welcher Inhibitor bei welcher Alteration am besten wirkt und wie die verschiedenen Alterationen miteinander das Ansprechen beeinflussen, bedarf jedoch noch weiterer Forschung (Gonzalez-Angulo and Blumenschein, 2013; Meric-Bernstam *et al.*, 2012; Neshat *et al.*, 2001).

5.2 Selektive Inhibierung von mTORC1 durch RAD001

Rapamycin und seine Derivate haben in klinischen Studien zur einer Stabilisation von verschiedenen Tumorerkrankungen geführt. Ein Rückgang des Tumors konnte, außer in Einzelfällen, nicht beobachtet werden (Milowsky *et al.*, 2013; Pinto-Leite *et al.*, 2016a). So führt die Behandlung mit Rapalogs zu einem G1/G0-Arrest (Chiong *et al.*, 2011; Mansure *et al.*, 2009). In den von uns getesteten Zelllinien konnten wir, wie in Abbildung 4.3 gezeigt, eine gute Aktivität von RAD001 gegenüber dem mTORC1-Substrat S6K1 sehen. Die IC50 variierten zwischen den Zelllinien, ab einer Konzentration von 1 nM war jedoch nur noch vereinzelt Restaktivität zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigte sich für 4EBP1 bis zu einer Konzentration von 50 nM kein Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus. Für die Zelllinien T24 und RT112 konnten wir dies bis 500 nM nachweisen (Nawroth *et al.*, 2011). In einer weiteren Arbeit konnten wir für die Zelllinien UMUC3, 639v, VmCUB1 und J82 keinen Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 nach einer Behandlung mit RAD001 bis 10 nM zeigen (Sathe *et al.*, 2018). Chiong *et al.* konnten einen Dephosphorylierungseffekt für 4EBP1 nach der Behandlung mit RAD001 in den Harnblasenkarzinomzellen UMUC-3, UMUC-6, UMUC-9 und UMUC-14 darstellen, jedoch erst für sehr hohe Dosen von RAD001 (100 nM). Der Effekt variierte stark von Zelllinie zu Zelllinie und es gab sogar Rephosphorylierungen von 4EBP1 für höhere Konzentrationen von RAD001 (Chiong *et al.*, 2011). Uns ist auch keine weitere Veröffentlichung bekannt, die in dieser Deutlichkeit einen Effekt von RAD001 in Harnblasenkarzinomzellen auf p4EBP1 abbildete. Pinto-Leite *et al.*, zeigte für die Zelllinie 5637 zwar einen Effekt auf p4EBP1, in den Zelllinien HT1376 und T24 konnte er jedoch nicht bestätigt werden. Interessanterweise kam es in diesem Versuch nach der Behandlung mit RAD001 in keiner der getesteten Zelllinien zu einem Effekt auf pS6K1 (Pinto-Leite *et al.*, 2014). Für sehr hohe Konzentrationen Rapamycin (10µM) konnte eine Dephosphorylierung von 4EBP1 gesehen werden. Jedoch muss für diese hohen Konzentrationen des Inhibitors angenommen werden, dass er mTORC1 unspezifische Eigenschaften entwickelt und solche Konzentrationen aufgrund der Toxizität nur im Rahmen einer Instillationstherapie möglich wären (Barilli *et al.*, 2008; Kyou Kwon *et al.*, 2014). In einem Versuch mit intravesikaler Instillationstherapie, Rapamycin in Kombination mit BCG, konnte ein Effekt auf p4EBP1 gesehen werden. Die alleinige Instillation der jeweiligen Substanzen führte nur zu einem Effekt auf pS6K1. Der Effekt von BCG scheint mTOR unabhängig zu sein (Ferrari *et al.*, 2015).

Es reagierten zwar nahezu alle Zellen auf eine Behandlung mit Rapamycin oder mit dessen Derivaten mit einer Dephosphorylierung von pS6K1, der Effekt auf p4EBP1 unterschied sich aber von Tumorerkrankung zu Tumorerkrankung, ja selbst von Zelllinie zu Zelllinie (Choo and Blenis, 2009). Wenn es zu einem Dephosphorylierungseffekt auf 4EBP1 kam, zeigte sich meist nach einer kurzen Phase des Ansprechens eine Rephosphorylierung von 4EBP1. Diese scheint Raptor-abhängig zu sein und korreliert mit der deutlich höheren Bindungsaffinität von 4EBP1 für mTORC1. Auch verschiedene Adapterproteine für S6K1 und 4EBP1 an mTORC1 werden als Grund für diesen Effekt diskutiert. (Choo and Blenis, 2009; Dowling *et al.*, 2010; Klempner *et al.*, 2013). In Lungenkrebszellen konnte ein Effekt von Rapalogs auf pS6K1 und p4EBP1 nachgewiesen werden, diese Behandlung führte aber auch zu einer Hyperphosphorylierung von AKT und paradoxerweise eIF4E (Sun *et al.*, 2005). Eine Hyperphosphorylierung von AKT konnte auch von unserer Gruppe gezeigt werden und ist auf den Feedbackloop von S6K1 via IRS-1/PI3K zurückzuführen (Abbildung 4.3, (Nawroth *et al.*, 2011)). Darüber hinaus konnte in CML-Zelllinien ein Einfluss auf AKT via mTORC2 bei längerer Behandlung mit Rapamycin beobachtet werden (Zeng *et al.*, 2007). Vergleicht man das Ansprechen der getesteten Zelllinien im Viabilitäts-Assay (Abbildung 4.7) mit der Konzentration die RAD001 benötigte um S6K1 zu dephosphorylieren, ergibt sich kein Zusammenhang zwischen der IC50 von pS6K1 und dem Ansprechen im Zellviabilitäts-Assay. Mansure *et al.* postulieren, dass Zellen, die in der Immunohistochemie früher mit einer Dephosphorylierung von S6K1 reagierten, mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie ansprechen. Andere Autoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie unsere Gruppe (Chiong *et al.*, 2011; Mansure *et al.*, 2009; Pinto-Leite *et al.*, 2014). Der Effekt, den RAD001 auf das Wachstum einzelner Harnblasenkarzinomzellen hat, scheint also nicht direkt mit der Inhibierung von S6K1 in Verbindung zu stehen.

Dass ab einer Konzentration von 10 nM RAD001 kein weiterer Effekt auf die Viabilität der Zellen zu sehen ist, wie von anderen Gruppen beschrieben (Ito *et al.*, 2016; Serra *et al.*, 2008), konnten wir in fünf von 13 Zelllinien darstellen. Hier erbrachte auch eine Erhöhung der Dosis auf das Fünffache keinen weiteren Effekt (Abbildung 4.7).

Dass der molekulare Alterationsstatus einer Zelllinie auf das Ansprechen auf die Behandlung mit Rapalogs beeinflusst, wurde von verschiedenen Gruppen postuliert

(Guo *et al.*, 2013; Iyer *et al.*, 2012; Kiessling *et al.*, 2015) Schaut man sich den Mutationsstatus der von uns getesteten Zelllinien an, so fällt auf, dass die im TSC1-Gen mutierte Zelllinie HCV29 sehr sensitiv auf die Behandlung mit RAD001 reagierte (siehe Tabelle 4.1). Dass TSC1-mutierte Tumore wahrscheinlich besser auf die Behandlung mit Rapalogs ansprechen, konnte auch von anderen Gruppen gezeigt werden (Guo *et al.*, 2013; Iyer *et al.*, 2012). Ein Langzeitansprechen fand sich jedoch nur bei einem Patienten, dessen Tumor gleichzeitig eine NF2 LOF-Mutation in sich trug. Für Tumore mit alleiniger TSC1-Mutation zeigte sich kein signifikanter Überlebensvorteil. Die Zelllinie 639v trägt zwar auch eine TSC1-Mutation in sich, auf die Behandlung mit RAD001 reagierte sie jedoch nicht. Allerdings konnten Guo *et al.* zeigen, dass die TSC1 in dieser Zelllinie trotz der Mutation aktiv ist (Guo *et al.*, 2013). Generell kann basierend auf diesen Ergebnissen davon ausgegangen werden, dass eine LOF-Mutation in TSC-1 die Sensitivität gegenüber einer Therapie mit RAD001 erhöhen kann, jedoch immer vor dem Hintergrund weiterer molekularer Veränderungen.

Kiessling *et al.* postulierten, dass HRAS-Mutationen zu einem besseren Ansprechen auf die Therapie mit mTOR-Inhibitoren führten (Kiessling *et al.*, 2015). Auch für NRAS-mutierte Neuroblastom-Zelllinien konnte ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit RAD001 gezeigt werden (Kiessling *et al.*, 2016). Die Zelllinie T24, die eine HRAS-Mutation in sich trägt, zeigte im Viabilitäts-Assay ein sehr gutes Ansprechen auf RAD001. Die Zelllinie BFTC905, die eine NRAS-Mutation trägt, sprach schlecht auf RAD001 an, dafür war sie eine der sensitivsten bei der Behandlung mit PIK90. Die NRAS- und PI3K-mutierte Zelllinie HT1197 war für mTOR die sensitivste. Dies könnte an einem stark mTOR-abhängigen Überleben durch das Zusammenspiel der Mutationen liegen. Die beiden anderen K- oder NRAS-mutierten Zelllinien UMUC3 und KU19-19 zeigten kein Ansprechen auf die Therapie mit RAD001. Demnach lässt sich anhand der untersuchten molekularen Alterationen kein Surrogatmarker ermitteln, der für eine Prästratifizierung von Patienten für eine Behandlung mit RAD001 genutzt werden könnte. Auch in der aktuellen Literatur ist kein einheitliches Bild ersichtlich.

Wieso die Rapalogs so hinter ihren Erwartungen zurückgeblieben sind, ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Diskutiert werden eine Vielzahl von Ursachen. So könnte die Inhibierung von mTORC1 ursächlich sein, die zu einem Ausbleiben des negativen Feedback-Loop auf IRS-1 führt und damit zu einer Aktivierung des PI3K-

Singalweges. Auch der geringe Einfluss von Rapalogs auf mTORC2 oder die Querverbindungen zwischen den verschiedenen Signalwegen, v.a. MAPK und PI3K, stehen zur Diskussion. Weitere Punkte sind, dass die Inhibition von mTORC1 außerhalb der Kinasen-Domäne, die im Harnblasenkarzinom gezeigte fehlende Dephosphorylierung von 4EBP1 und somit eine insuffiziente Unterbindung der Proteinsynthese (Benjamin *et al.*, 2011; Nawroth *et al.*, 2011; Pinto-Leite *et al.*, 2016b). Die Inhibition des Tumorwachstums durch RAD001 *in vivo* scheint am ehesten auf eine Hemmung der Neovaskularisierung zurückzuführen zu sein (Chiong *et al.*, 2011; Mansure *et al.*, 2009). Rapalogs scheinen auch zu einer Aktivierung von Autophagie innerhalb der Zellen zu führen, was mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Tumorthérapien einhergeht (Lin *et al.*, 2016).

Für die Behandlung der getesteten Zelllinien mit RAD001 konnte von uns kein immunhistochemischer Surrogatmarker für das Ansprechen im Viabilitäts-Assay gefunden werden. Für PIK90 scheint dieser Surrogatmarker jedoch die Dephosphorylierung von 4EBP1 zu sein. So liegt die Vermutung nahe, dass der moderate Effekt der PI3K- und mTOR-Inhibition auf die unzureichende Dephosphorylierung von 4EBP1 zurückzuführen ist. 4EBP1 könnte somit ein Parameter sein, an dem der Erfolg einer in den PI3K-Signalweg eingreifenden Therapie gemessen werden könnte (Abou-Nassar *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2015; Choo *et al.*, 2008; Nawroth *et al.*, 2011).

5.3 Effekte durch duale Therapie mit PIK90 und RAD001

In einer vorhergegangenen Arbeit konnte unsere Gruppe zeigen, dass die Phosphorylierung von 4EBP1 im Gegensatz zu S6K1 in Harnblasenkarzinom-Zelllinien nach der Behandlung mit dem spezifischen mTORC1-Inhibitor RAD001 nicht beeinflusst wird. NVP-BEZ235, ein dualer PI3K/mTOR-Inhibitor, zeigte jedoch einen Dephosphorylierungseffekt auf 4EBP1. Der Versuch mittels Gen-Silencing AKT oder mTOR auszuschalten zeigte in beiden Versuchen eine Dephosphorylierung von S6K1, aber keinen Einfluss auf 4EBP1 (Nawroth *et al.*, 2011). Somit stellt sich die Frage, ob NVP-BEZ235 unspezifisch Kinasen bindet, die den Effekt auf 4EBP1 erklären, oder ob erst die gemeinsame Inhibition von PI3K und mTORC1 einen Effekt auf 4EBP1 hat. Das NVP-BEZ235 auch in den Viabilitäts-Assays deutlich effektiver wirkte als die Rapamycin-Derivate führt zu der Annahme, dass 4EBP1 auch im Harnblasenkarzinom als prognostischer Faktor herangezogen oder als

therapeutisches Ziel genutzt werden könnte. In anderen Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte mTOR Aktivität mit einem schlechteren Verlauf der Erkrankung einhergeht (Ching and Hansel, 2010; Park *et al.*, 2011) und dass die Zielproteine S6K1 und 4EBP1 in ihrer Aktivität unabhängige prognostische Faktoren sind (She *et al.*, 2010). In den letzten zwei Kapiteln wurde erläutert, dass die alleinige Inhibition von PI3K oder mTORC1 keinen Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 hatte. Dies trifft auch auf die Inhibition des Signalweges mittels AKT-Inhibitoren zu (Nawroth *et al.*, 2011; Sathe *et al.*, 2014). Die Inhibierung von einzelnen Strukturen innerhalb des PI3K-Signalweges scheint also nicht ausreichend, um einen Einfluss auf 4EBP1 zu nehmen. Die gleichzeitige Inhibierung von PI3K und mTOR mittels PIK90 und RAD001 zeigt in den Harnblasenkarzinomzellen RT112, J82 und 639v jedoch eine Dephosphorylierung für 4EBP1 (Abbildung 4.9). Dies zeigt sich auch in der Monotherapie mit PIK90 für RT112, jedoch erst für Konzentrationen, bei welchen eine zusätzliche, dosisabhängige, unspezifische Inhibierung von mTORC1 angenommen werden muss (Knight *et al.*, 2006). Der Effekt, den PIK90 alleine in der Zelllinie RT112 erzielt, wurde, was die Immunhistochemie betrifft, durch die duale Therapie nicht gesteigert. Die Zelllinien J82 und 639v zeigten durch die Zugabe von 5 μ M RAD001 eine Kinetik, die der von RT112, 253J und BFTC905 in der Monobehandlung mit PIK90 entspricht (Abbildung 4.1, Abbildung 4.10). Dies ist insoweit bedeutend, als dass im Viabilitäts-Assay die Reduktion des Zellwachstums in der dualen Behandlung deutlich effektiver ausfiel als in der Monobehandlung. So zeigte die Zelllinie 639v in der Monotherapie mit PIK90 bei 500 nM einen Effekt von 20% und mit RAD001 bei 5 nM einen Effekt von 30 %. Das Ansprechen auf die Kombinationstherapie war bei gleichen Konzentrationen mit 65 % deutlich besser. Der berechnete Kombinationsindex für 639v ergab entsprechend einen Synergismus für alle getesteten Konzentrationen von PIK90 und RAD001. Auffallend war, dass vor allem Zelllinien, die auf die Monobehandlung schlecht reagierten, einen hohen Zusatznutzen von einer dualen Therapie zu haben schienen. So zeigte vor allem die Zelllinie 639v wie oben erwähnt ein deutlich besseres Ansprechen. Die Zelllinie J82, die bei der alleinigen Behandlung RAD001 ein gutes Ansprechen gezeigt hatte, reagierte erst bei höheren Konzentrationen von PIK90 (>100nM) mit einem synergistischen Ansprechen, für niedrigere Konzentrationen kam es zu additiven bis antagonistischen Effekten. Jedoch führte auch hier der zusätzliche Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1

zu einem deutlich bessere Ansprechen gegenüber der Monotherapie (Abbildung 4.10). Die Zelllinie RT112 zeigt für Konzentrationen von 2000 nM PIK90 einen Übergang von einem synergistischen in einen additiven Effekt (Tabelle 4.2). Dies mag darauf beruhen, dass, wie für die Monobehandlung von RT112 mit PIK90 gezeigt wurde, ab einer Konzentration von 500 nM PIK90 von unspezifischen Bindungen ausgegangen werden muss. Auch wenn die Inhibition von mTORC1 durch PIK90 einem anderer Mechanismus zugrunde liegt als der durch RAD001. NVP-BEZ235, das wie von unserer Gruppe gezeigt einen Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1 in der Monotherapie hat, zeigte in der Kombinationstherapie mit RAD001 in Zelllinien aus endokrinen Pankreastumoren einen synergistischen Effekt. Dies könnte der kompetitiven Inhibition von NVP-BEZ235 gegenüber der allosterischen von RAD001 geschuldet sein. Zu beachten ist aber, dass auch hier diejenigen Zelllinien besonders sensitiv auf die duale Behandlung reagierten, die resistent gegenüber eine Monotherapie mit RAD001 waren (Passacantilli *et al.*, 2014). Dass die duale Therapie mittels PI3K-Inhibitoren und RAD001 ein synergistisches Ansprechen zeigte, konnten auch Ren *et al.* für BKM120, einen pan-PI3K-Inhibitor in Non-Small-Cell-Lung-Carcinoma (NSCLC)-Zelllinien, zeigen. *In vivo* konnte ein signifikant reduziertes Tumorwachstum nur in Mäusen beobachtet werden, die die Kombinationstherapie erhalten hatten. Eine suffiziente Dephosphorylierung von 4EBP1 wurde *in vitro* wie *in vivo* auch nur gesehen, wenn BKM120 und RAD001 in Kombination verabreicht wurden (Ren *et al.*, 2012).

Die genaue Regulation von 4EBP1, die das ausschlaggebende Signal zu sein scheint, bleibt aber noch immer teilweise unverstanden. Wir konnten jedoch - wie in Abbildung 5.1 dargestellt - zeigen, dass die allosterische Inhibition von mTORC1 via RAD001 und die katalytische Inhibition von PI3K via PIK90 einen inhibitorischen Einfluss auf die Phosphorylierung von 4EBP1 nimmt. Die Dephosphorylierung von 4EBP1 durch NVP-BEZ235 in Harnblasenkarzinom-Zelllinien konnte also mittels der spezifischen Inhibition von PI3K durch PIK90 und mTORC1 durch RAD001 reproduziert werden. Auch hier zeigte sich der Effekt auf 4EBP1 lange nachdem S6K1 vollständig dephosphoryliert war. Auch wenn somit gezeigt werden konnte, dass es für einen Effekt auf 4EBP1 der Inhibition von PI3K und mTOR bedarf, ist die genaue Regulierung von 4EBP1 noch nicht abschließend geklärt.

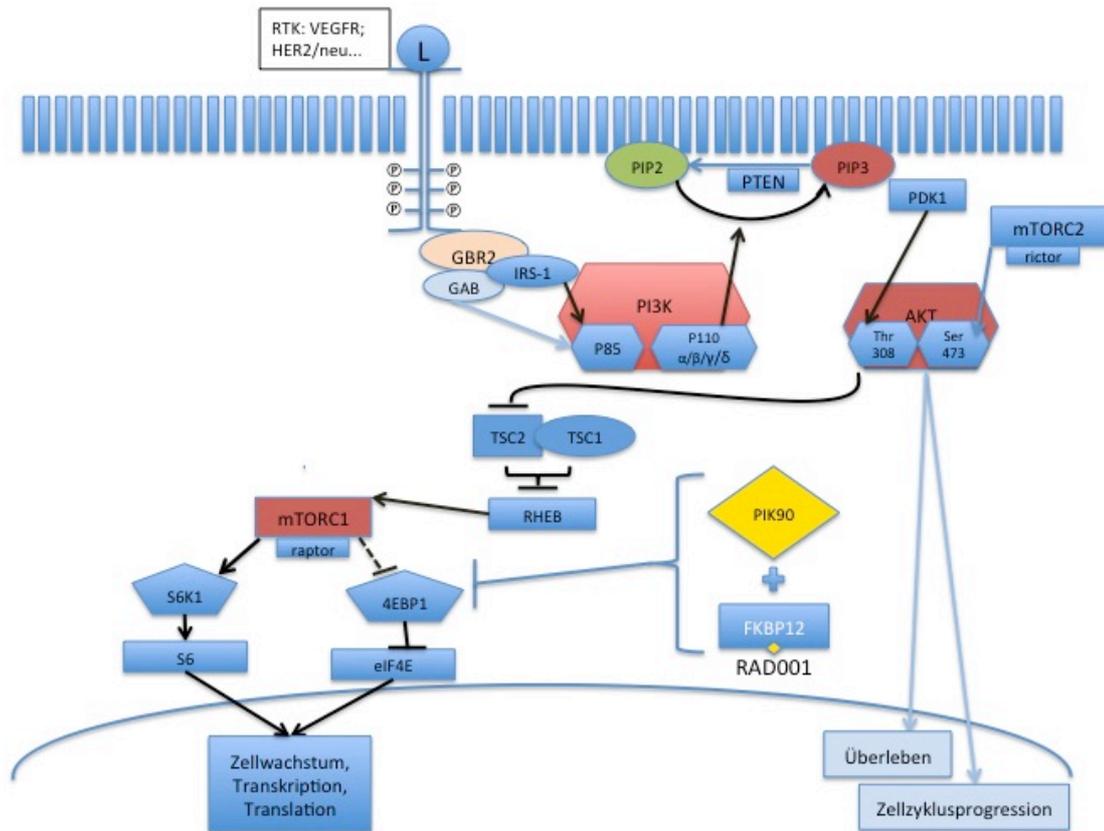


Abbildung 5.1 Duale Inhibition des PI3K-Signalweges mit PIK90 und RAD001

Kyou Kwon et al. postulierten, dass die Phosphorylierung von 4EBP1 Rapamycin-resistent, aber mTORC1-abhängig ist (Kyou Kwon *et al.*, 2014). Einen weiteren Einfluss auf die Regulation von 4EBP1 scheint der MAPK-Signalweg zu besitzen. Ras hat einen Einfluss auf die PI3K-Aktivität und ERK kann mTORC1 durch die Inhibition von TSC1 aktivieren. Auch Raptor unterliegt der Kontrolle von ERK und die Phosphorylierung von Raptor fördert die 4EBP1-Phosphorylierung. 4EBP1 scheint für beide Signalwege eines der ausschlaggebenden Zielproteine zu sein (Mendoza *et al.*, 2011; She *et al.*, 2010). Auch bringt, wenn Alterationen in beiden Signalwegen vorliegen, erst die gemeinsame Inhibition der beiden Signalwege eine zuverlässige Induktion von Apoptose, (She *et al.*, 2010; Will *et al.*, 2014a). So ist erst die Inhibition von MAPK und PI3K ausreichend, um eine Freisetzung von BAD und die Induktion von Apoptose einzuleiten (Mendoza *et al.*, 2011). mTORC1 und S6K1 können auch über den MAPK-Signalweg aktiviert werden. RAD001 hat über den Feedbackloop S6K1-PI3K-Ras auch einen aktivierenden Einfluss auf den MAPK-Signalweg (Carracedo *et al.*, 2008). Die Inhibition von mTORC1 durch den Wegfall des Feedbackloops über IRS-1 führt zu

einer Hyperphosphorylierung von AKT (Nawroth *et al.*, 2011; Stocker *et al.*, 2003). Die gleichzeitige Gabe von PIK90 oder anderen PI3K-Inhibitoren unterbindet diesen Loop effizient (Abbildung 4.9, (Sun *et al.*, 2005) . Dies konnte auch für die duale Inhibition von NSCLC - Zelllinien mittels BKM120 (pan-PI3K-Inhibitor) und RAD001 gesehen werden (Ren *et al.*, 2012). Jedoch trat bei Langzeitbehandlungen mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor NVP-BEZ235 nach frühzeitiger Dephosphorylierung von AKT eine Rephosphorylierung im Verlauf auf (Nawroth *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2008). Die Kombinationstherapie mit Rapalogs wird derzeit in vielen Studien verfolgt. So gab es Versuche mit Sorafenib, Cisplatin, Vinblastin und anderen Substanzen (Pinto-Leite *et al.*, 2016a). RAD001 zeigte in Kombination mit Sorafenib in Osteosarkomzellen *in vitro* und *in vivo* eine gute Aktivität, ein gutes Ansprechen im klinischen Versuch blieb allerdings aus (Grignani *et al.*, 2015; Pignochino *et al.*, 2013). Die Kombination mit Cisplatin konnte für die Zelllinien T24 und HT1376 eine gute Aktivität *in vitro* zeigen (Pinto-Leite *et al.*, 2014). Eine Kombination von RAD001 und Autophagie-Inhibitoren führte zur Induktion von Apoptose (Lin *et al.*, 2016). Eine klinische Studie für die duale Inhibition von PI3K und mTORC1 mit Rapalogs steht jedoch noch aus.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die duale Inhibition von PI3K und mTORC1 durch PIK90 und RAD001 *in vitro* einen Effekt auf die Dephosphorylierung von 4EBP1 in Harnblasenkarzinomzellen hat und dieser auch ein deutlich verbessertes Ansprechen in der Zellviabilität zur Folge hat. Dies stimmt mit unseren Daten für NVP-BEZ235 im Vergleich zur der Behandlung mit RAD001 oder einem reinen pan-PI3K-Inhibitor überein (Nawroth *et al.*, 2011) . Über die duale Inhibition von mTORC1 und PI3K kann also eine effektive therapeutische Antwort generiert werden. Die klinischen Versuche mit NVP-BEZ235 in Patienten mit Harnblasenkarzinom mussten leider aufgrund von erhöhter Toxizität abgebrochen werden. Mehr als 90 % der Behandelten Patienten erlitten Nebenwirkungen, 50 % sogar dritten bis vierten Grades. In einigen Patienten konnte jedoch ein gutes Ansprechen auf NVP-BEZ235 gesehen werden (Seront *et al.*, 2016). Möglicherweise könnte hier durch eine Kombinationstherapie von Substanzen, die gezielt Strukturen des PI3K-Signalweges angreifen, die Konzentrationen der einzelnen Substanzen und damit ihre Toxizität minimiert werden. Diese Arbeit bedarf natürlich noch weiterer Forschung *in vitro* und *in vivo*, um eine Übersetzung in klinische Studien zu ermöglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die duale Inhibition mittels

eines Rapalagos und eines PI3K-Inhibitors in NSCLC-Zelllinien eine gute Aktivität *in vivo* hat (Ren *et al.*, 2012). Ein weiteres neues duales Therapieschema mittels der Inhibition von PI3K und MAPK, welches sowohl zu einer suffizienten Inhibition von mTORC1 und PI3K führt als auch mögliche Resistenzmechanismen mit behandelt, scheint sich gerade zu entwickeln (Vujic *et al.*, 2014; Will *et al.*, 2014b).

6 Zusammenfassung

Im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom ist die medikamentöse Therapie mit Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin (MVAC) oder mit Gemcitabin und Cisplatin (GC) seit 25 Jahren die Standardtherapie mit einem medianen Überleben von etwa 14 Monaten. Seit 2009 ist Vinflunine in Europa zugelassen und seit 2010 als Zweitlinientherapie in die Leitlinie der European Association of Urology (EAU) aufgenommen. Der Überlebensvorteil gegenüber „Best Supportive Care“ beträgt jedoch nur 2 Monate. Seit 2016 ist mit Atezolizumab (Tecentriq®) ein Immuntherapeutikum für die Behandlung von Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Urothelkarzinom zugelassen. Eine mögliche alternative Therapieform ist die Target-Therapie gegen bestimmte Signalwege einer Zelle wodurch das Tumorwachstum beeinflusst wird. In einigen Krebsentitäten, wie z. B. dem Nierenzellkarzinom oder dem Mammakarzinom, hat dies schon zu großen Fortschritten in der Therapie geführt. Jedoch haben alle Therapeutika, die gezielt Zellsignalwege ansteuern in klinischen Studien bisher enttäuscht. Ein Grund liegt dabei in einem fehlenden Verständnis der genauen molekularen Vorgänge in dieser Tumorentität und der damit nicht möglichen Prästratifizierung der Patienten in potentielle Ansprecher auf eine Therapie. In dieser Arbeit wurde die Regulation der Proteine S6K1 und 4EBP1 des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs im Harnblasenkarzinom nach Behandlung mit PI3K- und mTOR-Inhibitoren charakterisiert, um zukünftig mögliche Therapiestrategien zu identifizieren und Hinweise auf potentielle prognostische molekulare Faktoren zu erhalten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Monotherapie gegen die Aktivität von PI3K oder des mTORC1-Komplexes die Phosphorylierung von 4EBP1 nicht beeinflusst wird. Jedoch wird die Phosphorylierung von S6K1 inhibiert. Auch die Zellviabilität wird nur bedingt reduziert. Eine duale Therapie mittels einer spezifischen PI3K- und einer parallelen mTORC1-Inhibierung zeigte in verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien jedoch einen sehr guten Effekt auf die Phosphorylierung von 4EBP1. Dies korreliert im Viabilitäts-Assay mit einem ca. 30 % besseren Ansprechen und damit dem Effekt dualer PI3K/mTOR Inhibitoren wie NVP-BE235.

Es konnte somit dargelegt werden, dass – anders als bislang in der Literatur beschrieben– PI3K und mTORC1 wichtige Substrate dieses Signalweges

gemeinsam regulieren und nur eine gezielte Regulation der Aktivität beider Moleküle in der Therapie erfolgreich sein kann. Somit stellt die duale bzw. multimodale Therapie einen neuen Ansatz in Aussicht, der durch weitere Basisforschung genauer analysiert werden muss, um dann klinisch erprobt zu werden.

7 Veröffentlichungen und Preise

7.1 Preise

Preisträger des Nachwuchs-Förderprogramms der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. 2014 „Die Besten der Urologie“

7.2 Vorträge

Vortrag auf dem DGU-Kongress 2015

Combination of dual PI3K/mTOR and AKT inhibition does suppress molecular feedback loops and provides an effective novel concept for therapie

Sathe, A; Wong, K.; von Busch, M.; Oppolzer, I.; Gschwend, J.; Retz, M; Nawroth, R., München

7.3 Veröffentlichungen

Teile dieser Doktorarbeit wurden Veröffentlicht:

Sathe, A., Chalaud, G., Oppolzer, I., Wong, K. Y., von Busch, M., Schmid, S. C., Tong, Z., Retz, M., Gschwend, J. E., Schulz, W. A. and Nawroth, R. (2018). Parallel PI3K, AKT and mTOR inhibition is required to control feedback loops that limit tumor therapy. *PloS One*, **13**, e0190854. (Sathe *et al.*, 2018)

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1.1 Flussdiagramm des Gradings eines nicht-invasiven Harnblasenkarzinoms. PUNLMP: „Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential“, modifiziert nach Busch und Algaba 2002 (Busch and Algaba, 2002)	2
Abbildung 1.2 Schematische Abbildung der T-Stadien beim Harnblasenkarzinom. Modifiziert anhand der TNM Klassifikation des UICC (UICC, 2009)	3
Abbildung 1.3 Das Zwei-Krankheiten-Modell. In der Mehrzahl der Fälle ist die Entwicklung einer Hyperplasie mit Mutation in HRAS und FGFR3 zu beobachten. Dies führt zu einem nicht-invasiven Tumor. In invasiv wachsenden Tumoren wird häufig eine Mutation für RB und p53 nachgewiesen. Modifiziert nach Wu (Wu, 2005); Knowles und Hurst (Knowles and Hurst, 2015).....	8
Abbildung 1.4 PI3K/ AKT/ mTOR Signalweg. Durch die Aktivierung von PI3K erfolgt die Akkumulation von PIP ₃ . PTEN katalysiert die entgegengesetzte Reaktion. PIP ₃ rekrutiert PDK1 und AKT an die Zellmembran, wo AKT durch PDK1 an Thr308 und durch mTORC2 an Ser473 phosphoryliert wird. AKT hat auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen Einfluss. Eines der Zielproteine von AKT ist mTORC1 über die Inhibierung von TSC2, woraufhin es zu einer Aktivierung von mTORC1 und seiner Zielproteine kommt. Gezeigt sind auch die Verbindungen zum MAPK-Signalweg. Frei nach Knowles et. al 2009; Nawroth et. al 2011	14
Abbildung 1.5 Darstellung der Angriffsstellen von Rapamycin und PIK90. Rapamycin wirkt über die Bindung an FKBP12 spezifisch auf mTORC1 ein und führt zu einer Herunterregulierung der Aktivität. PIK90 hemmt die katalytischen Domänen der PI3-Kinase.	18
Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines "Sandwiches"	38
Abbildung 4.1 Phosphorylierungsstatus verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen nach Behandlung mit PIK90. Die Zellen wurden für eine Stunde mit PIK90 behandelt und die Proteinexpression danach mittels Western-Blot analysiert Als Kontrolle wurde jeweils die totale	

Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Kontr : Kontrolle; nM : nanomolar Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe <i>et al.</i> , 2018)	44
Abbildung 4.2 IC50 Werte der Proteine pAKT (THR), pS6K1 und p4EBP1 für verschiedene Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit PIK90.....	45
Abbildung 4.3 Analyse der Phosphorylierung verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit RAD001. Die Zellen wurden für eine Stunde mit RAD001 behandelt. Western-Blot der einzelnen Zelllinien mit aufsteigenden Konzentrationen für RAD001. Als Kontrolle wurde jeweils die totale Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Kontr: Kontrolle, nM: nanomolar Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe <i>et al.</i> , 2018)	46
Abbildung 4.4 IC50 für pS6K1 verschiedener Harnblasenkarzinomzellen nach der Behandlung mit RAD001.....	47
Abbildung 4.6 Absolute IC50 Konzentrationen für 13 Zelllinien in aufsteigender Reihenfolgen. Für KU19-19, 647v, J82, UMUC3 und 639v konnte bis 2000 nM keine IC50 ermittelt werden.....	49
Abbildung 4.9:Analyse der Phosphorylierung verschiedener Proteine des PI3K-Signalwegs in humanen Harnblasenkarzinomzellen. Western-Blot-Analyse der Zelllinien Rt112, J82 und 639v mit aufsteigenden Konzentrationen für PIK90 bei gleichzeitiger Gabe von 5 nM RAD001. Die Behandlung erfolgte für eine Stunde.. Als Kontrolle wurde jeweils die totale Proteinmenge und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Ktr. : Kontrolle, Alle Konzentrationen in nM. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe <i>et al.</i> , 2018).....	55
Abbildung 4.10 A Doppelbehandlung mit PIK90 in aufsteigenden Konzentrationen und RAD001 in fester Konzentration von 5 nM. Als Kontrollen wurden die höchsten Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe und die DMSO-Verdünnung, die der höchsten Konzentration an DMSO der Verdünnungsreihe entsprach, verwendet. Teile dieser Daten wurden bereits Veröffentlicht: (Sathe <i>et al.</i> , 2018)	57

Abbildung 5.1 Duale Inhibition des PI3K-Signalweges mit PIK90 und RAD001..... 68

8.2 Tabellen

Tabelle 1.1 Stadieneinteilung des UICC In Abhängigkeit der TNM Klassifikation. Therapievorschläge gemäß der S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom (Leitlinienprogramm Onkologie, 2016).	4
Tabelle 1.2 Risikofaktoren für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Frei nach Pelucchi et al. 2006(Pelucchi <i>et al.</i> , 2006)	6
Tabelle 1.3 Fünf Subtypen des Harnblasenkarzioms. Urobasal A (UroA), Urobasal B (UroB), Genomisch instabil (Genomic Unstabel; GU), Plattenepithelzellähnlich („Squamosa Cell Carnimoa-Like“ (SCCL)/ Basal) und Infiltrativ. Frei nach Sjodahl 2012.....	9
Tabelle 3.1 Chemikalien	22
Tabelle 3.2 Kitsysteme	22
Tabelle 3.3 Geräte	24
Tabelle 3.4 Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3.5 Inhibitoren und Medikamente.....	26
Tabelle 3.6 Puffer und Lösungen.....	28
Tabelle 3.7 Primär- und Sekundärantikörper	29
Tabelle 3.8 verwendete Zelllinien. KD: Keine Daten. Quellen: (Bubenik <i>et al.</i> , 1973; Elliott <i>et al.</i> , 1977; Elliott <i>et al.</i> , 1976; Elliott <i>et al.</i> , 1974; Grossman <i>et al.</i> , 1986; Marshall <i>et al.</i> , 1977; Masters <i>et al.</i> , 1986; O'Toole <i>et al.</i> , 1978; Rasheed <i>et al.</i> , 1977; Tachibana <i>et al.</i> , 1995; Tzeng <i>et al.</i> , 1996; Williams, 1980).....	31
Tabelle 3.9 Beispielhafte Darstellung der 96-Well Schale und ihrer Befüllung.....	34
Tabelle 3.10 Angaben für Polyacrylamid Trenngele.....	36
Tabelle 3.11 Angaben für Polyacrylamid Sammelgele	37
Tabelle 4.1 Mutationsspektrum des PI3K-Signalwegs der benutzen Harnblasenkarzinom-Zelllinien.	53
Tabelle 4.2 Kombinationsindex (CI) für die Zelllinien RT112, J82 und 639v bei Doppelbehandlung mit RAD001 und PIK90. Der Kombinationsindex wurde mittels der Software CompuSyn berechnet.	58

9 Literaturverzeichnis

- AACR. (2016). Nods for Atezolizumab and Nivolumab from FDA. *Cancer Discovery*, **6**, 811.
- Abdollah, F., Gandaglia, G., Thuret, R., Schmitges, J., Tian, Z., Jeldres, C., Passoni, N. M., Briganti, A., Shariat, S. F., Perrotte, P., Montorsi, F., Karakiewicz, P. I. and Sun, M. (2013). Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiology*, **37**, 219-225.
- Aben, K. K. H., Witjes, J. A., Schoenberg, M. P., De Kaa, C. H. V., Verbeek, A. L. M. and Kiemeny, L. A. L. M. (2002). Familial aggregation of urothelial cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, **98**, 274-278.
- Abou-Nassar, K. E., Stevenson, K. E., Antin, J. H., McDermott, K., Ho, V. T., Cutler, C. S., LaCasce, A. S., Jacobsen, E. D., Fisher, D. C., Soiffer, R. J., Alyea, E. P., Koreth, J. and Freedman, A. S. (2011). (90)Y-ibritumomab tiuxetan followed by reduced-intensity conditioning and allo-SCT in patients with advanced follicular lymphoma. *Bone Marrow Transplantation*, **46**, 1503-1509.
- ACS. (2014). Cancer Facts & Figures 2014, American Cancer Society, Atlanta, pp. 22.
- Askham, J. M., Platt, F., Chambers, P. A., Snowden, H., Taylor, C. F. and Knowles, M. A. (2010). AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene*, **29**, 150-155.
- Barilli, A., Visigalli, R., Sala, R., Gazzola, G. C., Parolari, A., Tremoli, E., Bonomini, S., Simon, A., Closs, E. I., Dall'Asta, V. and Bussolati, O. (2008). In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovascular Research*, **78**, 563-571.
- Bellmunt, J., Fougeray, R., Rosenberg, J. E., von der Maase, H., Schutz, F. A., Salhi, Y., Culine, S. and Choueiri, T. K. (2013). Long-term survival results of a randomized phase III trial of vinflunine plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced urothelial carcinoma patients after failure of platinum-based chemotherapy. *Annals of Oncology*, **24**, 1466-1472.
- Bellmunt, J., Gonzalez-Larriba, J. L., Prior, C., Maroto, P., Carles, J., Castellano, D., Mellado, B., Gallardo, E., Perez-Gracia, J. L., Aguilar, G., Villanueva, X., Albanell, J. and Calvo, A. (2011). Phase II study of sunitinib as first-line treatment of urothelial cancer patients ineligible to receive cisplatin-based chemotherapy: baseline interleukin-8 and tumor contrast enhancement as potential predictive factors of activity. *Annals of Oncology*, **22**, 2646-2653.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. and Hall, M. N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **10**, 868-880.
- Bosetti, C., Pira, E. and La Vecchia, C. (2005). Bladder cancer risk in painters: A review of the epidemiological evidence, 1989-2004. *Cancer Causes and Control*, **16**, 997-1008.
- Botteman, M. F., Pashos, C. L., Redaelli, A., Laskin, B. and Hauser, R. (2003). The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*, **21**, 1315-1330.
- Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Chang-Claude, J., Bolm-Audorff, U., Jockel, K. H., Donato, F., Serra, C., Wahrendorf, J., Hours, M., T'Mannetje, A., Kogevinas, M. and Boffetta, P. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *International Journal of Cancer*, **86**, 289-294.
- Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H. and Donner, J. (1973). Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, **11**, 765-773.
- Busch, C. and Algaba, F. (2002). The WHO/ISUP 1998 and WHO 1999 systems for malignancy grading of bladder cancer. Scientific foundation and translation to one another and previous systems. *Virchows Archiv*, **441**, 105-108.
- Butz, M. (2012). Beruflich verursachte Krebserkrankung. In: *Dokumentation des Berufskrankheiten-Geschehens ind Deutschland*, DGUV, Berlin.

- Cappellen, D., De Oliveira, C., Ricol, D., de Medina, S., Bourdin, J., Sastre-Garau, X., Chopin, D., Thiery, J. P. and Radvanyi, F. (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature Genetics*, **23**, 18-20.
- Carneiro, B. A., Meeks, J. J., Kuzel, T. M., Scaranti, M., Abdulkadir, S. A. and Giles, F. J. (2015). Emerging therapeutic targets in bladder cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **41**, 170-178.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A. T., Thomas, G., Kozma, S. C., Papa, A., Nardella, C., Cantley, L. C., Baselga, J. and Pandolfi, P. P. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **118**, 3065-3074.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., Eggermont, A. M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R. J., Flaherty, K. T. and McArthur, G. A. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *New England Journal of Medicine*, **364**, 2507-2516.
- Cheng, C. K., Gustafson, W. C., Charron, E., Houseman, B. T., Zunder, E., Goga, A., Gray, N. S., Pollok, B., Oakes, S. A., James, C. D., Shokat, K. M., Weiss, W. A. and Fan, Q. W. (2012). Dual blockade of lipid and cyclin-dependent kinases induces synthetic lethality in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 12722-12727.
- Chi, B. H., Kim, S. J., Seo, H. K., Seo, H. H., Lee, S. J., Kwon, J. K., Lee, T. J. and Chang, I. H. (2015). P70S6K and Eif4E dual inhibition is essential to control bladder tumor growth and progression in orthotopic mouse non-muscle invasive bladder tumor model. *Journal of Korean Medical Science*, **30**, 308-316.
- Ching, C. B. and Hansel, D. E. (2010). Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation*, **90**, 1406-1414.
- Chiong, E., Lee, I. L., Dadbin, A., Sabichi, A. L., Harris, L., Urbauer, D., McConkey, D. J., Dickstein, R. J., Cheng, T. and Grossman, H. B. (2011). Effects of mTOR inhibitor everolimus (RAD001) on bladder cancer cells. *Clinical Cancer Research*, **17**, 2863-2873.
- Choi, W., Czerniak, B., Ochoa, A., Su, X., Siefker-Radtke, A., Dinney, C. and McConkey, D. J. (2014). Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*, **11**, 400-410.
- Choo, A. Y. and Blenis, J. (2009). Not all substrates are treated equally: implications for mTOR, rapamycin-resistance and cancer therapy. *Cell Cycle*, **8**, 567-572.
- Choo, A. Y., Yoon, S. O., Kim, S. G., Roux, P. P. and Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 17414-17419.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Research*, **70**, 440-446.
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N. and Sander, C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics*, **45**, 1127-1133.
- Damrauer, J. S., Hoadley, K. A., Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., Yeh, J. J., Milowsky, M. I., Iyer, G., Parker, J. S. and Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 3110-3115.
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V. and Tabernero, J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics*, **13**, 1021-1031.
- Dowling, R. J., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B. D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., Kozma, S. C., Thomas, G. and Sonenberg, N. (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*, **328**, 1172-1176.
- Dreicer, R., Li, H., Stein, M., DiPaola, R., Eleff, M., Roth, B. J. and Wilding, G. (2009). Phase 2 trial of sorafenib in patients with advanced urothelial cancer: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer*, **115**, 4090-4095.
- Druker, B. J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, **112**, 4808-4817.
- Elliott, A. Y., Bronson, D. L., Cervenka, J., Stein, N. and Fraley, E. E. (1977). Properties of cell lines established from transitional cell cancers of the human urinary tract. *Cancer Research*, **37**, 1279-1289.

- Elliott, A. Y., Bronson, D. L., Stein, N. and Fraley, E. E. (1976). In vitro cultivation of epithelial cells derived from tumors of the human urinary tract. *Cancer Research*, **36**, 365-369.
- Elliott, A. Y., Cleveland, P., Cervenka, J., Castro, A. E., Stein, N., Hakala, T. R. and Fraley, E. E. (1974). Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. *Journal of the National Cancer Institute*, **53**, 1341-1349.
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews: Cancer*, **9**, 550-562.
- Engelman, J. A., Luo, J. and Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, **7**, 606-619.
- EPAR. (2009). Javlor Vinflunine EPAR.
- Fan, Q. W., Knight, Z. A., Goldenberg, D. D., Yu, W., Mostov, K. E., Stokoe, D., Shokat, K. M. and Weiss, W. A. (2006). A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, **9**, 341-349.
- FDA. (2016). Everolimus (Afinator), F. a. D. A. (FDA), Ed.
- Fechner, G., Classen, K., Schmidt, D., Hauser, S. and Muller, S. C. (2009). Rapamycin inhibits in vitro growth and release of angiogenetic factors in human bladder cancer. *Urology*, **73**, 665-668; discussion 668-669.
- Feldman, A. R., Kessler, L., Myers, M. H. and Naughton, M. D. (1986). The prevalence of cancer. Estimates based on the Connecticut Tumor Registry. *New England Journal of Medicine*, **315**, 1394-1397.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, **136**, E359-386.
- Ferrari, K. L., de Camargo, J. A., Rocha, G. Z., Carvalheira, J. B., Saad, M. J., Billis, A. and Reis, L. O. (2015). Intravesical bacillus Calmette-Guerin efficiently reduces p70S6K1 but not 4E-BP1 phosphorylation in nonmuscle invasive bladder cancer. *Journal of Urology*, **193**, 682-689.
- Freedman, N. D., Silverman, D. T., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A. and Abnet, C. C. (2011). Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*, **306**, 737-745.
- Gaertner, R. R. W., Trpeski, L., Johnson, K. C., Paulse, B., Dewar, R., Dryer, D., Kreiger, N., Liewer, E., Robson, D., Fincham, S. and Le, N. (2004). A case-control study of occupational risk factors for bladder cancer in Canada. *Cancer Causes and Control*, **15**, 1007-1019.
- Gallagher, D. J., Milowsky, M. I., Gerst, S. R., Ishill, N., Riches, J., Regazzi, A., Boyle, M. G., Trout, A., Flaherty, A. M. and Bajorin, D. F. (2010). Phase II study of sunitinib in patients with metastatic urothelial cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **28**, 1373-1379.
- GEKID. (2015). Krebs in Deutschland 2011/2012 In: 10, Vol. 10 Ausgabe, Robert Koch-Insitut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), Berlin.
- Gerullis, H., Eimer, C., Ecke, T. H., Georgas, E., Freitas, C., Kastenholz, S., Arndt, C., Heusch, C. and Otto, T. (2012). A phase II trial of temsirolimus in second-line metastatic urothelial cancer. *Medical Oncology*, **29**, 2870-2876.
- Goldgar, D. E., Easton, D. F., Cannon-Albright, L. A. and Skolnick, M. H. (1994). Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *Journal of the National Cancer Institute*, **86**, 1600-1608.
- Gomez-Roman, J. J., Saenz, P., Molina, M., Cuevas Gonzalez, J., Escuredo, K., Santa Cruz, S., Junquera, C., Simon, L., Martinez, A., Gutierrez Banos, J. L., Lopez-Brea, M., Esparza, C. and Val-Bernal, J. F. (2005). Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth. *Clinical Cancer Research*, **11**, 459-465.
- Gonzalez-Angulo, A. M. and Blumenschein, G. R., Jr. (2013). Defining biomarkers to predict sensitivity to PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **39**, 313-320.
- Grignani, G., Palmerini, E., Ferraresi, V., D'Ambrosio, L., Bertulli, R., Asaftei, S. D., Tamburini, A., Pignochino, Y., Sangiolo, D., Marchesi, E., Capozzi, F., Biagini, R., Gambarotti, M., Fagioli, F., Casali, P. G., Picci, P., Ferrari, S. and Aglietta, M. (2015). Sorafenib and everolimus for patients with unresectable high-grade osteosarcoma progressing after standard treatment: a non-randomised phase 2 clinical trial. *Lancet Oncology*, **16**, 98-107.
- Grossman, H. B., Wedemeyer, G., Ren, L., Wilson, G. N. and Cox, B. (1986). Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *Journal of Urology*, **136**, 953-959.
- Guo, Y., Chekaluk, Y., Zhang, J., Du, J., Gray, N. S., Wu, C. L. and Kwiatkowski, D. J. (2013). TSC1 involvement in bladder cancer: diverse effects and therapeutic implications. *Journal of Pathology*, **230**, 17-27.

- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
- Hautmann, R. E., de Petriconi, R. C., Pfeiffer, C. and Volkmer, B. G. (2012). Radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder without neoadjuvant or adjuvant therapy: long-term results in 1100 patients. *European Urology*, **61**, 1039-1047.
- He, F., Mo, L., Zheng, X. Y., Hu, C., Lepor, H., Lee, E. Y., Sun, T. T. and Wu, X. R. (2009). Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. *Cancer Research*, **69**, 9413-9421.
- Hecht, S. S. (2006). Cigarette smoking: cancer risks, carcinogens, and mechanisms. *Langenbecks Archives of Surgery*, **391**, 603-613.
- Heitman, J., Movva, N. R. and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, **253**, 905-909.
- Hicks, R. M., Walters, C. L., Elsebai, I., Aasser, A. B., Merzabani, M. E. and Gough, T. A. (1977). Demonstration of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, **70**, 413-417.
- Houede, N. and Pourquier, P. (2015). Targeting the genetic alterations of the PI3K-AKT-mTOR pathway: its potential use in the treatment of bladder cancers. *Pharmacology and Therapeutics*, **145**, 1-18.
- Hussain, M. H., MacVicar, G. R., Petrylak, D. P., Dunn, R. L., Vaishampayan, U., Lara, P. N., Jr., Chatta, G. S., Nanus, D. M., Glode, L. M., Trump, D. L., Chen, H., Smith, D. C. and National Cancer, I. (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. *Journal of Clinical Oncology*, **25**, 2218-2224.
- Inman, B. A., Sebo, T. J., Frigola, X., Dong, H., Bergstralh, E. J., Frank, I., Fradet, Y., Lacombe, L. and Kwon, E. D. (2007). PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer*, **109**, 1499-1505.
- Inoki, K., Li, Y., Xu, T. and Guan, K. L. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes and Development*, **17**, 1829-1834.
- Ito, H., Ichiyangi, O., Naito, S., Bilim, V. N., Tomita, Y., Kato, T., Nagaoka, A. and Tsuchiya, N. (2016). GSK-3 directly regulates phospho-4EBP1 in renal cell carcinoma cell-line: an intrinsic subcellular mechanism for resistance to mTORC1 inhibition. *BMC Cancer*, **16**, 393.
- Iyer, G., Hanrahan, A. J., Milowsky, M. I., Al-Ahmadie, H., Scott, S. N., Janakiraman, M., Pirun, M., Sander, C., Succi, N. D., Ostrovskaya, I., Viale, A., Heguy, A., Peng, L., Chan, T. A., Bochner, B., Bajorin, D. F., Berger, M. F., Taylor, B. S. and Solit, D. B. (2012). Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. *Science*, **338**, 221.
- Jebar, A. H., Hurst, C. D., Tomlinson, D. C., Johnston, C., Taylor, C. F. and Knowles, M. A. (2005). FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene*, **24**, 5218-5225.
- John N. Eble, G. S., Jonathan I. Epstein, Isabell A. Sesterhenn. (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France.
- Kamat, A. M., Hahn, N. M., Efstathiou, J. A., Lerner, S. P., Malmstrom, P. U., Choi, W., Guo, C. C., Lotan, Y. and Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *Lancet*.
- Kanai, M., Goke, M., Tsunekawa, S. and Podolsky, D. K. (1997). Signal transduction pathway of human fibroblast growth factor receptor 3. Identification of a novel 66-kDa phosphoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 6621-6628.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D., Miller, C. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J. and Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, **502**, 333-339.
- Kiessling, M. K., Curioni-Fontecedro, A., Samaras, P., Atrott, K., Cosin-Roger, J., Lang, S., Scharl, M. and Rogler, G. (2015). Mutant HRAS as novel target for MEK and mTOR inhibitors. *Oncotarget*, **6**, 42183-42196.
- Kiessling, M. K., Curioni-Fontecedro, A., Samaras, P., Lang, S., Scharl, M., Aguzzi, A., Oldrige, D. A., Maris, J. M. and Rogler, G. (2016). Targeting the mTOR Complex by Everolimus in NRAS Mutant Neuroblastoma. *PloS One*, **11**, e0147682.
- Klempner, S. J., Myers, A. P. and Cantley, L. C. (2013). What a tangled web we weave: emerging resistance mechanisms to inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cancer Discovery*, **3**, 1345-1354.

- Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., Balla, T., Weiss, W. A., Williams, R. L. and Shokat, K. M. (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell*, **125**, 733-747.
- Knowles, M. A. (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, **27**, 361-373.
- Knowles, M. A. and Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nature Reviews: Cancer*, **15**, 25-41.
- Knowles, M. A., Platt, F. M., Ross, R. L. and Hurst, C. D. (2009). Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **28**, 305-316.
- Kogevinas, M., T Mannelte, A., Cordier, S., Ranft, U., González, C. A., Vineis, P., Chang-Claude, J., Lynge, E., Wahrendorf, J., Tzonou, A., Jöckel, K. H., Serra, C., Porru, S., Hours, M., Greiser, E. and Boffetta, P. (2003). Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes and Control*, **14**, 907-914.
- Kyou Kwon, J., Kim, S. J., Hoon Kim, J., Mee Lee, K. and Ho Chang, I. (2014). Dual inhibition by S6K1 and Elf4E is essential for controlling cellular growth and invasion in bladder cancer. *Urologic Oncology*, **32**, 51.e27-35.
- Laplane, M. and Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, **122**, 3589-3594.
- Leitlinienprogramm Onkologie. (2016). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 1.0, September 2016 AWMF-Registriernummer 032/038OL, Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF, Berlin.
- Lin, J. F., Lin, Y. C., Yang, S. C., Tsai, T. F., Chen, H. E., Chou, K. Y. and Hwang, T. I. (2016). Autophagy inhibition enhances RAD001-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, **10**, 1501-1513.
- Lindgren, D., Liedberg, F., Andersson, A., Chebil, G., Gudjonsson, S., Borg, A., Mansson, W., Fioretos, T. and Hoglund, M. (2006). Molecular characterization of early-stage bladder carcinomas by expression profiles, FGFR3 mutation status, and loss of 9q. *Oncogene*, **25**, 2685-2696.
- Magi-Galluzzi, C. Z., Ming. (2013). Pathology of bladder neoplasms. *UpToDate*.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O. and Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, **25**, 6416-6422.
- Mansure, J. J., Nassim, R., Chevalier, S., Rocha, J., Scarlata, E. and Kassouf, W. (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **8**, 2339-2347.
- Marshall, C. J., Franks, L. M. and Carbonell, A. W. (1977). Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, **58**, 1743-1751.
- Masters, J. R., Hepburn, P. J., Walker, L., Highman, W. J., Trejdosiewicz, L. K., Povey, S., Parkar, M., Hill, B. T., Riddle, P. R. and Franks, L. M. (1986). Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Research*, **46**, 3630-3636.
- Matsushima, M., Kikuchi, E., Matsumoto, K., Hattori, S., Takeda, T., Kosaka, T., Miyajima, A. and Oya, M. (2015). Intravesical dual PI3K/mTOR complex 1/2 inhibitor NVP-BE2235 therapy in an orthotopic bladder cancer model. *International Journal of Oncology*, **47**, 377-383.
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Sun, L., Davis, N. M., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Cocco, L., Evangelisti, C., Chiarini, F., Martelli, A. M., Libra, M., Candido, S., Ligresti, G., Malaponte, G., Mazzarino, M. C., Fagone, P., Donia, M., Nicoletti, F., Polesel, J., Talamini, R., Basecke, J., Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Michele, M., Tafuri, A., Dulinska-Litewka, J., Laidler, P., D'Assoro, A. B., Drobot, L., Umezawa, D., Montalto, G., Cervello, M. and Demidenko, Z. N. (2012). Advances in targeting signal transduction pathways. *Oncotarget*, **3**, 1505-1521.
- Mendoza, M. C., Er, E. E. and Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 320-328.
- Meric-Bernstam, F., Akcakanat, A., Chen, H., Do, K. A., Sangai, T., Adkins, F., Gonzalez-Angulo, A. M., Rashid, A., Crosby, K., Dong, M., Phan, A. T., Wolff, R. A., Gupta, S., Mills, G. B. and Yao, J. (2012). PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clinical Cancer Research*, **18**, 1777-1789.
- Milowsky, M. I., Iyer, G., Regazzi, A. M., Al-Ahmadie, H., Gerst, S. R., Ostrovskaya, I., Gellert, L. L., Kaplan, R., Garcia-Grossman, I. R., Pendse, D., Balar, A. V., Flaherty, A. M., Trout, A., Solit,

- D. B. and Bajorin, D. F. (2013). Phase II study of everolimus in metastatic urothelial cancer. *BJU International*, **112**, 462-470.
- Mitra, A. P., Datar, R. H. and Cote, R. J. (2006). Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of Clinical Oncology*, **24**, 5552-5564.
- Mo, L., Zheng, X., Huang, H. Y., Shapiro, E., Lepor, H., Cordon-Cardo, C., Sun, T. T. and Wu, X. R. (2007). Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not Ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, **117**, 314-325.
- Nawroth, R., Stellwagen, F., Schulz, W. A., Stoehr, R., Hartmann, A., Krause, B. J., Gschwend, J. E. and Retz, M. (2011). S6K1 and 4E-BP1 are independent regulated and control cellular growth in bladder cancer. *PLoS One*, **6**, e27509.
- Necchi, A., Mariani, L., Zaffaroni, N., Schwartz, L. H., Giannatempo, P., Crippa, F., Morosi, C., Lanocita, R., Sava, T., Ortega, C., Messina, C., Sacco, C., Pennati, M., Daidone, M. G., Nicolai, N., De Braud, F., Gianni, A. M. and Salvioni, R. (2012). Pazopanib in advanced and platinum-resistant urothelial cancer: an open-label, single group, phase 2 trial. *Lancet Oncology*, **13**, 810-816.
- Neshat, M. S., Mellingshoff, I. K., Tran, C., Stiles, B., Thomas, G., Petersen, R., Frost, P., Gibbons, J. J., Wu, H. and Sawyers, C. L. (2001). Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 10314-10319.
- Network, C. G. A. R. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, **507**, 315-322.
- Niedermeier, M., Hennessy, B. T., Knight, Z. A., Henneberg, M., Hu, J., Kurtova, A. V., Wierda, W. G., Keating, M. J., Shokat, K. M. and Burger, J. A. (2009). Isoform-selective phosphoinositide 3'-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. *Blood*, **113**, 5549-5557.
- Niegisch, G., Retz, M., Thalgott, M., Balabanov, S., Honecker, F., Ohlmann, C. H., Stockle, M., Bogemann, M., Vom Dorp, F., Gschwend, J., Hartmann, A., Ohmann, C. and Albers, P. (2015). Second-Line Treatment of Advanced Urothelial Cancer with Paclitaxel and Everolimus in a German Phase II Trial (AUO Trial AB 35/09). *Oncology*, **89**, 70-78.
- NIH. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, **507**, 315-322.
- NIH. (2016). SEER Stat Fact Sheets: Bladder Cancer, National Cancer Institute.
- O'Toole, C., Price, Z. H., Ohnuki, Y. and Unsgaard, B. (1978). Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, **38**, 64-76.
- Park, S. J., Lee, T. J. and Chang, I. H. (2011). Role of the mTOR Pathway in the Progression and Recurrence of Bladder Cancer: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study. *Korean J Urol*, **52**, 466-473.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **55**, 74-108.
- Passacantilli, I., Capurso, G., Archibugi, L., Calabretta, S., Caldarola, S., Loreni, F., Delle Fave, G. and Sette, C. (2014). Combined therapy with RAD001 e BEZ235 overcomes resistance of PET immortalized cell lines to mTOR inhibition. *Oncotarget*, **5**, 5381-5391.
- Pazdur, R. (2013). FDA Approval for Everolimus, National Cancer Institute.
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Malvezzi, M. and La Vecchia, C. (2006). Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nature Clinical Practice: Urology*, **3**, 327-340.
- Philips, G. K., Halabi, S., Sanford, B. L., Bajorin, D. and Small, E. J. (2008). A phase II trial of cisplatin, fixed dose-rate gemcitabine and gefitinib for advanced urothelial tract carcinoma: results of the Cancer and Leukaemia Group B 90102. *BJU International*, **101**, 20-25.
- Philips, G. K., Halabi, S., Sanford, B. L., Bajorin, D., Small, E. J., Cancer and Leukemia Group, B. (2009). A phase II trial of cisplatin (C), gemcitabine (G) and gefitinib for advanced urothelial tract carcinoma: results of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) 90102. *Annals of Oncology*, **20**, 1074-1079.
- Pignochino, Y., Dell'Aglio, C., Basirico, M., Capozzi, F., Soster, M., Marchio, S., Bruno, S., Gammaitoni, L., Sangiolo, D., Torchiaro, E., D'Ambrosio, L., Fagioli, F., Ferrari, S., Alberghini, M., Picci, P., Aglietta, M. and Grignani, G. (2013). The Combination of Sorafenib and Everolimus Abrogates mTORC1 and mTORC2 upregulation in osteosarcoma preclinical models. *Clinical Cancer Research*, **19**, 2117-2131.
- Pinto-Leite, R., Arantes-Rodrigues, R., Ferreira, R., Palmeira, C., Oliveira, P. A. and Santos, L. (2014). Treatment of muscle invasive urinary bladders tumors: A potential role of the mTOR inhibitors. *Biomedicine & Aging Pathology*, **4**, 169-178.

- Pinto-Leite, R., Arantes-Rodrigues, R., Sousa, N., Oliveira, P. A. and Santos, L. (2016a). mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. *Tumour Biology*, **37**, 11541-11551.
- Pinto-Leite, R., Arantes-Rodrigues, R., Sousa, N., Oliveira, P. A. and Santos, L. (2016b). mTOR inhibitors in urinary bladder cancer. *Tumour Biology*.
- Pira, E., Piolatto, G., Negri, E., Romano, C., Boffetta, P., Lipworth, L., McLaughlin, J. K. and La Vecchia, C. (2010). Bladder cancer mortality of workers exposed to aromatic amines: a 58-year follow-up. *Journal of the National Cancer Institute*, **102**, 1096-1099.
- Platt, F. M., Hurst, C. D., Taylor, C. F., Gregory, W. M., Harnden, P. and Knowles, M. A. (2009). Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clinical Cancer Research*, **15**, 6008-6017.
- Ploeg, M., Aben, K. K. and Kiemeny, L. A. (2009). The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World Journal of Urology*, **27**, 289-293.
- Prout, G. R., Jr., Barton, B. A., Griffin, P. P. and Friedell, G. H. (1992). Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *Journal of Urology*, **148**, 1413-1419.
- Rasheed, S., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Nelson-Rees, W. A. and Arnstein, P. (1977). Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *Journal of the National Cancer Institute*, **58**, 881-890.
- Ren, H., Chen, M., Yue, P., Tao, H., Owonikoko, T. K., Ramalingam, S. S., Khuri, F. R. and Sun, S. Y. (2012). The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, **325**, 139-146.
- Rosenberg, J. E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., van der Heijden, M. S., Balar, A. V., Necchi, A., Dawson, N., O'Donnell, P. H., Balmanoukian, A., Loriot, Y., Srinivas, S., Retz, M. M., Grivas, P., Joseph, R. W., Galsky, M. D., Fleming, M. T., Petrylak, D. P., Perez-Gracia, J. L., Burris, H. A., Castellano, D., Canil, C., Bellmunt, J., Bajorin, D., Nickles, D., Bourgon, R., Frampton, G. M., Cui, N., Mariathasan, S., Abidoye, O., Fine, G. D. and Dreicer, R. (2016). Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, **387**, 1909-1920.
- Roskoski, R., Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, **79**, 34-74.
- Sathe, A., Chalaud, G., Oppolzer, I., Wong, K. Y., von Busch, M., Schmid, S. C., Tong, Z., Retz, M., Gschwend, J. E., Schulz, W. A. and Nawroth, R. (2018). Parallel PI3K, AKT and mTOR inhibition is required to control feedback loops that limit tumor therapy. *PLoS One*, **13**, e0190854.
- Sathe, A., Guerth, F., Cronauer, M. V., Heck, M. M., Thalgott, M., Gschwend, J. E., Retz, M. and Nawroth, R. (2014). Mutant PIK3CA controls DUSP1-dependent ERK 1/2 activity to confer response to AKT target therapy. *British Journal of Cancer*, **111**, 2103-2113.
- Seront, E., Rottey, S., Filleul, B., Glorieux, P., Goeminne, J. C., Verschaeve, V., Vandenbulcke, J. M., Sautois, B., Boegner, P., Gillain, A., van Maanen, A. and Machiels, J. P. (2016). Phase II study of dual phosphoinositol-3-kinase (PI3K) and mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor BEZ235 in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma. *BJU International*, **118**, 408-415.
- Seront, E., Rottey, S., Sautois, B., Kerger, J., D'Hondt, L. A., Verschaeve, V., Canon, J. L., Dopchie, C., Vandenbulcke, J. M., Whenham, N., Goeminne, J. C., Clausse, M., Verhoeven, D., Glorieux, P., Branders, S., Dupont, P., Schoonjans, J., Feron, O. and Machiels, J. P. (2012). Phase II study of everolimus in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: clinical activity, molecular response, and biomarkers. *Annals of Oncology*, **23**, 2663-2670.
- Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Valero, V., Guzman, M., Botero, M. L., Llonch, E., Atzori, F., Di Cosimo, S., Maira, M., Garcia-Echeverria, C., Parra, J. L., Arribas, J. and Baselga, J. (2008). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Research*, **68**, 8022-8030.
- She, Q. B., Halilovic, E., Ye, Q., Zhen, W., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Solit, D. B. and Rosen, N. (2010). 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer Cell*, **18**, 39-51.
- Sievert, K. D., Amend, B., Nagele, U., Schilling, D., Bedke, J., Horstmann, M., Hennenlotter, J., Kruck, S. and Stenzl, A. (2009). Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology*, **27**, 295-300.

- Sjodahl, G., Lauss, M., Lovgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., Patschan, O., Aine, M., Ferno, M., Ringner, M., Mansson, W., Liedberg, F., Lindgren, D. and Hognlund, M. (2012). A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **18**, 3377-3386.
- Sjodahl, G., Lovgren, K., Lauss, M., Patschan, O., Gudjonsson, S., Chebil, G., Aine, M., Eriksson, P., Mansson, W., Lindgren, D., Ferno, M., Liedberg, F. and Hognlund, M. (2013). Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma. *American Journal of Pathology*, **183**, 681-691.
- Sridhar, S. S., Winqvist, E., Eisen, A., Hotte, S. J., McWhirter, E., Tannock, I. F., Mukherjee, S. D., Wang, L., Blattler, C., Wright, J. J. and Moore, M. J. (2011). A phase II trial of sorafenib in first-line metastatic urothelial cancer: a study of the PMH Phase II Consortium. *Investigational New Drugs*, **29**, 1045-1049.
- Steineck, G., Plato, N., Norell, S. E. and Hogstedt, C. (1990). Urothelial cancer and some industry-related chemicals: An evaluation of the epidemiologic literature. *American Journal of Industrial Medicine*, **17**, 371-391.
- Sternberg, C. N., Yagoda, A., Scher, H. I., Watson, R. C., Herr, H. W., Morse, M. J., Sogani, P. C., Vaughan, E. D., Jr., Bander, N., Weiselberg, L. R. and et al. (1988). M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *Journal of Urology*, **139**, 461-469.
- Stocker, H., Radimerski, T., Schindelholz, B., Wittwer, F., Belawat, P., Daram, P., Breuer, S., Thomas, G. and Hafen, E. (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nature Cell Biology*, **5**, 559-565.
- Sun, S. Y., Rosenberg, L. M., Wang, X., Zhou, Z., Yue, P., Fu, H. and Khuri, F. R. (2005). Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Research*, **65**, 7052-7058.
- Tachibana, M., Miyakawa, A., Tazaki, H., Nakamura, K., Kubo, A., Hata, J., Nishi, T. and Amano, Y. (1995). Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Research*, **55**, 3438-3443.
- Takkouche, B., Regueira-Méndez, C. and Montes-Martínez, A. (2009). Risk of cancer among hairdressers and related workers: A meta-analysis. *International Journal of Epidemiology*, **38**, 1512-1531.
- Tzeng, C. C., Liu, H. S., Li, C., Jin, Y. T., Chen, R. M., Yang, W. H. and Lin, J. S. (1996). Characterization of two urothelium cancer cell lines derived from a blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Anticancer Research*, **16**, 1797-1804.
- UICC. (2009). TNM Classification of Malignant Tumors 7th Edition, Vol. 7, pp. 262-265.
- van Rhijn, B. W., van der Kwast, T. H., Vis, A. N., Kirkels, W. J., Boeve, E. R., Jobsis, A. C. and Zwarthoff, E. C. (2004). FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Research*, **64**, 1911-1914.
- Vercelli, M., Quaglia, A., Parodi, S. and Crosignani, P. (1999). Cancer prevalence in the elderly. ITAPREVAL Working Group. *Tumori*, **85**, 391-399.
- Vežina, C., Kudelski, A. and Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *Journal of Antibiotics*, **28**, 721-726.
- Vineis, P. and Pirastu, R. (1997). Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes and Control*, **8**, 346-355.
- Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., Stewart, S. J. and Press, M. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **20**, 719-726.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J. T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., Zimmermann, A. and 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. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 4602-4608.
- Vujic, I., Posch, C., Sanlorenzo, M., Yen, A. J., Tsumura, A., Kwong, A., Feichtenschlager, V., Lai, K., Arneson, D. V., Rappersberger, K. and Ortiz-Urda, S. M. (2014). Mutant NRASQ61 shares signaling similarities across various cancer types--potential implications for future therapies. *Oncotarget*, **5**, 7936-7944.
- Weigelt, B. and Downward, J. (2012). Genomic Determinants of PI3K Pathway Inhibitor Response in Cancer. *Frontiers in Oncology*, **2**, 109.
- Will, M., Qin, A. C., Toy, W., Yao, Z., Rodrik-Outmezguine, V., Schneider, C., Huang, X., Monian, P., Jiang, X., de Stanchina, E., Baselga, J., Liu, N., Chandarlapaty, S. and Rosen, N. (2014a).

- Rapid Induction of Apoptosis by PI3K Inhibitors Is Dependent upon Their Transient Inhibition of RAS-ERK Signaling. *Cancer Discovery*.
- Will, M., Qin, A. C., Toy, W., Yao, Z., Rodrik-Outmezguine, V., Schneider, C., Huang, X., Monian, P., Jiang, X., de Stanchina, E., Baselga, J., Liu, N., Chandarlapaty, S. and Rosen, N. (2014b). Rapid induction of apoptosis by PI3K inhibitors is dependent upon their transient inhibition of RAS-ERK signaling. *Cancer Discovery*, **4**, 334-347.
- Williams, R. D. (1980). Human urologic cancer cell lines. *Investigative Urology*, **17**, 359-363.
- Wu, X. R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nature Reviews: Cancer*, **5**, 713-725.
- Wulfing, C., Machiels, J. P., Richel, D. J., Grimm, M. O., Treiber, U., De Groot, M. R., Beuzeboc, P., Parikh, R., Petavy, F. and El-Hariry, I. A. (2009). A single-arm, 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**, 2881-2890.
- Yap, T. A., Bjerke, L., Clarke, P. A. and Workman, P. (2015). Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies. *Current Opinion in Pharmacology*, **23**, 98-107.
- Zeng, Z., Sarbassov dos, D., Samudio, I. J., Yee, K. W., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., Giles, F. J., Sabatini, D. M., Andreeff, M. and Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*, **109**, 3509-3512.
- Zhao, L. and Vogt, P. K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, **27**, 5486-5496.
- Zhou, H. Y. and Huang, S. L. (2012). Current development of the second generation of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Chinese Journal of Cancer*, **31**, 8-18.

10 Danksagung

Ich danke zuallererst meinem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Roman Nawroth für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, im Forschungslabor der Urologie des MRI meine Dissertation durchzuführen. Ich danke ihm herzlich für seine Freundlichkeit und Geduld, mit der er mich bei meinen ersten wissenschaftlichen Gehversuchen unterstützt und geleitet hat. Seine intensive und konstruktive Betreuung, sein Ideenreichtum und sein kritischer Blick auf meine Ergebnisse ermöglichten es mir, ein Gefühl für wissenschaftliches Arbeiten zu entwickeln und diese Arbeit durchzuführen.

Weiterhin danke ich Anuja Sathe, die mir immer kompetent als Ansprechpartnerin zur Seite stand. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich, wenn es um Methodik, wissenschaftliches Arbeiten oder auch das Einordnen und Bewerten von Ergebnissen ging. Den anderen Doktoranden und Wissenschaftlern der Arbeitsgruppe danke ich für den freundschaftlichen Umgang und guten Rat. Vor allem möchte ich hier PD Dr. med. Sebastian Schmidt und Margarita von Busch danken.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder Fabian Opolzer danken, die mich in der sehr herausfordernden Zeit der experimentellen Phase und auch darüber hinaus immer unterstützt haben.

Abschließend danke ich Theresa Coßmann. Ohne Ihre fortwährende Motivation und geduldige Begleitung wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie zu einem Ende gekommen.