

**Aus der Klinik für Onkologie und Hämatologie
der Charité Campus Mitte**

DISSERTATION

**Analyse des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs bei
Plattenepithelkarzinom (SCC)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Abdulhakim Ibrahim

aus Syrien (Hasaka)/Kurdistan

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch).....	5
-------------------------	---

Abstract (Englisch).....	7
--------------------------	---

1. Einleitung

1.1. Lungenkarzinom.....	9
1.1.1. Epidemiologie.....	9
1.1.2. Histologische Klassifikation	9
1.1.3. Therapie von Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom.....	10
1.2. PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg.....	11
1.2.1. Regulation des mTOR-Signalwegs.....	11
1.2.2. Cap-abhängige mRNA-Translation.....	13
1.3. Regulation und Interaktion des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs.....	13
1.3.1. Zellzyklus-Regulation.....	13
1.3.2. Apoptose.....	16
1.3.3. Bedeutung der BCL-2 Familie	17
1.4. PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg-Inhibitoren	19
1.4.1. Everolimus (RAD001)	19
1.4.2. Dualinhibitor NVP-BEZ235.....	19
1.4.3. NVP-BKM120	20
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	21

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien.....	23
2.1.1. Geräte und Materialien.....	23
2.1.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer.....	24
2.1.3. Antikörper.....	25
2.1.4. Rezepte.....	26
2.2. Methoden.....	28

2.2.1. Zelllinien und Zellkultur.....	28
2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	29
2.2.3. Proteinisolierung.....	29
2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	29
2.2.5. Western Blot.....	30
2.2.5.1. Prinzip.....	30
2.2.5.2. Durchführung.....	30
2.2.6. MTT-Test (Bestimmung der Zellviabilität).....	32
2.2.6.1. Prinzip.....	32
2.2.6.2. Durchführung.....	32
2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse (FACS)	33
2.2.7.1. Prinzip.....	33
2.2.7.2. Durchführung.....	33
2.2.8. Transfektion.....	34
2.2.8.1. Prinzip.....	34
2.2.8.2. Durchführung.....	34
2.2.9. Statistische Auswertung.....	35

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der Phosphorylierung verschiedener Schlüsselproteine des PI3-Kinase/AKT/mTOR Signalwegs.....	36
3.2. Der Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 dephosphoryliert 4EBP1 und EIF4E bei allen SCC Zellen.....	37
3.3. Proliferationsmessung der verschiedenen SCC Zelllinien unter Kultivierung mit RAD001, NVP-BEZ235 oder NVP-BKM120.....	42
3.4. Analyse des Einflusses unterschiedlicher Inhibitoren auf Schlüsselproteine des Zellzyklus bei den verschiedenen SCC Zelllinien.....	46
3.5. Messung des Zelltodes verschiedener SCC Zellen nach Kultivierung mit RAD001, NVP-BKM120 oder NVP-BEZ235.....	48

- 3.6. Analyse der Wirkung unterschiedlicher Inhibitoren auf die Zelltod-Induktion bei den verschiedenen SCC Zelllinien.....52

4. Diskussion

- 4.1. Aktivierung des PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalwegs in SCC Zelllinien.....58
- 4.2. Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren auf Schlüsselproteine des PI3K/mTOR-Signalwegs.....60
- 4.3. Wirksamkeit von PI3K/AKT/mTOR-Signalweg Inhibitoren auf die Proliferation von Lungenkarzinom-Zelllinien.....60
- 4.4. Inhibition des mTOR-Signalwegs reduziert die Expression von Zellzyklus-fördernden Proteine und steigert die Expression des zellzyklus-hemmenden Proteins P27 in Lungenkarzinom-Zelllinien.....62
- 4.5. Inhibition des mTOR-Signalwegs induziert Zelltod in Lungenkarzinom-Zelllinien.....63
- 4.6. Klinische Bedeutung von PI3K/AKT/mTOR-Inhibitoren in der Therapie der Lungenkarzinome.....65
- 4.7. Zusammenfassung.....66
- 5. Literaturverzeichnis**68

Eidesstattliche Versicherung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

Abstrakt

Lungenkarzinome (LC) sind sowohl bei Männern als auch bei Frauen die am häufigsten zum Tode führenden Tumore in Deutschland. Die Lungenkarzinome unterteilen sich in zwei histologische Hauptformen, die kleinzelligen (SCLC) und nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC). Nicht kleinzellige Lungenkarzinome machen den Großteil der LC aus und lassen sich histologisch weiter in Adenokarzinome (AC), Plattenepithelkarzinome (SCC) und großzellige Karzinome (LCC) subtypisieren. Plattenepithelkarzinome machen ca. 30% aller nicht kleinzelligen Lungenkarzinome aus. Molekulare Veränderungen in Plattenepithelkarzinome sind für mehr als 50% der Fälle beschrieben. Viele Dysregulationen und Mutationen in PI3K/AKT/mTOR-Kaskade bei Plattenepithelkarzinom sind bereits identifiziert. Der PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg ist bei vielen Tumoren direkt oder indirekt in die Malignomgenese involviert. Verschiedene PI3K/AKT/mTOR-Signalweg Inhibitoren wie RAD001, NVP-BEZ235 und NVP-BKM120 sind bereits als alleinige Target-Therapie oder in Kombination mit der Chemotherapie bei vielen Karzinomen in klinischer Entwicklung.

In dieser Arbeit wurde der Expressions- und Phosphorylierungsstatus der verschiedenen Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs mittels Western Blot untersucht. Die Proliferationsmessung wurde durch MTT-Test, der Zelltod- und Zellarrest durch FACS analysiert. Die aktive Herunterregulation von proapoptotischem Protein PUMA wurde durch Einbringen von PUMA-siRNA in den Zellen mittels einer Elektroporation durchgeführt.

Die Schlüsselproteine des mTOR-Signalwegs waren bei allen untersuchten SCC Zelllinien aktiv. Die untersuchten SCC Zellen konnten anhand der Proliferations- und Zelltodmessungen beim Einsatz von mTOR-Signalweg Inhibitoren in RAD001 resistente und sensitive SCC Zellen unterteilt werden. Der Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 induziert bei allen SCC Zellen und insbesondere bei RAD001 sensitiven Zellen eine Proliferationshemmung und nur bei RAD001 sensitiven Zellen zusätzlichen Zelltod. Die weitere Untersuchung der RAD001 sensitiven SCC Zellen mittels Western Blot Analyse

zeigte eine Heraufregulation des proapoptotischen Faktors PUMA und verstärkte Caspasen-Spaltung. Eine Transfektion der zelltodempfindlichen SCC Zellen mit PUMA-siRNA nach anschließender Kultivierung mit NVP-BEZ235 führte zum verringerten Zelltod und zur verminderten Expression von PUMA sowie im Western Blot zur verminderten Menge an gespaltener Caspase 3. Diese signifikante Reduktion der durchflusszytometrischen Zelltodmengen und parallel hierzu die Abnahme der Caspase 3 Spaltung zeigten die Bedeutung von PUMA für die Zelltodinduktion durch Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs bei Plattenepithelkarzinom. Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der molekularen und funktionellen Bedeutung des PI3K/AKT/mTOR Signalweges deuten darauf hin, dass sich diese Signalwege als therapeutische Ziele in der Zukunft sehr eignen gut könnten.

Abstract

Lung cancer (LC) is the most frequent cause of cancer-related death in Germany in men and women alike. The lung cancer is divided into two main histological types, small cell (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). Non-small cell lung cancer make up the bulk of the LC and can be subtyped histologically further into adenocarcinoma (AC), squamous cell carcinoma (SCC) and large cell carcinoma (LCC). Squamous cell lung cancer account for approximately 30% of all non-small cell lung cancers. Molecular alterations in squamous cell carcinoma have been described for more than 50% of cases. Various dysregulation and mutations in PI3K/AKT/mTOR cascade in squamous have already been identified. The PI3K/AKT/mTOR pathway is directly or indirectly involved in the malignomgenesis in many tumors. Various PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors like RAD001, NVP-BEZ235 and NVP-BKM120 are already the single target agent or in combination with chemotherapy in many cancers in clinical development.

In this study the expression and phosphorylation status of the various proteins of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway was investigated by western blot. The proliferation measurement was analyzed by MTT test, the cell death and cell arrest by FACS. The active sub-regulation of proapoptotic protein PUMA was carried out by introducing PUMA-siRNA into the cells by electroporation.

The key proteins of the mTOR pathway were active in all examined cell lines (SCC). The investigated SCC cells could be divided based on the proliferation and cell death when using mTOR signaling pathway inhibitors in RAD001 resistant and sensitive cells. The dual inhibitor NVP-BEZ235 induced in all SCC cells and particularly RAD001 sensitive cells proliferation inhibition and only in RAD001 sensitive cells additional cell death. The further study of RAD001 sensitive SCC cells by western blot analysis showed up-regulation of the proapoptotic factor PUMA and enhanced caspase cleavage. Transfection of sensitive SCC cells with PUMA-siRNA after subsequent cultivation with NVP-BEZ235 led to decreased cell death and in western blot decreased expression of PUMA and a reduced amount of cleaved caspase 3. This significant reduction of the in the cell death in FACS and parallel

to this, the decrease in caspase 3 cleavage showed the importance of PUMA for cell death induction by inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in squamous cell carcinoma. The present results concerning the molecular and functional significance of the PI3K/AKT/mTOR pathway suggests that these pathways could very well as therapeutic targets in the future.

1. Einleitung

1.1. Lungenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Lungenkrebs gehört aktuell zu den häufigeren Krebserkrankungen in Deutschland und verursacht jährlich etwa 52.000 Neuerkrankungen. Die Zahl der Neuerkrankungen für das Jahr 2016 wurde auf insgesamt 55.300 geschätzt. Durch seine ungünstige Prognose ist Lungenkarzinom die häufigste Krebstodesursache bei Männern (25%) und die dritthäufigste bei Frauen (15%). Männer sind gegenüber den Frauen stärker betroffen, jedoch steigt die Inzidenz bei den Frauen weiterhin kontinuierlich an. Die Lungenkarzinome stehen an erster Position der Ursachen für die karzinombedingte Sterblichkeit. Im Gegensatz zu anderen Tumoren nehmen die Inzidenz und die Mortalität der Lungenkarzinome weltweit zu [1]. Bei Erstdiagnose befindet sich ein Großteil der Lungenkarzinome bereits in einem lokal weit fortgeschrittenen (IIIb) oder metastasierten Stadium (IV), in dem als therapeutische Option lediglich eine systemische Therapie zur Verfügung steht. Die 5-Jahres Überlebensraten der bisherigen Chemotherapie sind schlecht. Das mediane Überleben der meisten metastasierten Lungenkarzinome liegt weiterhin bei etwa zwölf Monaten.

1.1.2. Histologische Klassifikation

Lungenkarzinome (LC) werden in zwei histologische Hauptformen unterteilt, die kleinzelligen (SCLC) und die nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC). Die Unterscheidung in die beiden Hauptformen beruht auf der unterschiedlichen Morphologie der Tumore und bedingt auch einen Unterschied hinsichtlich des biologischen Verhaltens, der Prognose und der eingesetzten Therapien. Nicht kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) machen den Großteil (80%) der LC aus und lassen sich histologisch weiter in Adenokarzinome (AC), Plattenepithelkarzinome (SCC) und großzellige Karzinome (LCC) subtypisieren. Das Adenokarzinom und das Plattenepithelkarzinom sind die häufigsten Subtypen aller NSCLC und werden zum größten Teil rein zytomorphologisch anhand bestimmter Kriterien diagnostiziert [2].

1.1.3. Therapie von Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom

Lungenkarzinome verursachen häufig zu Beginn der Erkrankung wenig oder gar keine Beschwerden. Sie werden daher oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt, in dem eine Resektion mit kurativem Ziel nicht mehr möglich ist. Bei der Therapie der Lungenkarzinome wird hier entsprechend der Leitlinien zwischen kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden. Die kleinzelligen Lungenkarzinome sind primär meist nicht operabel. Aufgrund ihres schnellen Wachstums sprechen sie meist gut auf eine zytostatische, platinbasierte Chemotherapie an, die in bestimmten Situationen mit einer Strahlentherapie kombiniert wird. Es gibt auch Lungenkarzinome mit gemischter Histologie von kleinzelligen und nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen. Ein derart gemischtes Karzinom wird wie ein kleinzelliges Lungenkarzinom therapiert [3,4].

Die Therapie des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms ist primär abhängig von dessen Stadium. Hier wird zwischen den lokalen und systemischen Therapieoptionen unterschieden. Die lokalen Therapien sind die Operation und die Strahlentherapie. Zu den systemischen Therapien zählen die klassische Chemotherapie und zielgerichtete Therapien sowie in letzter Zeit die Immun-Checkpoint-Blockade. Die Therapie des Lungenkarzinoms ist häufig multimodal. Strahlentherapie und Chemotherapie können auch simultan als Radiochemotherapie appliziert werden. Chemotherapie, Strahlentherapie oder Radiochemotherapie können als adjuvante Therapien einer Operation folgen oder als neoadjuvante Therapie einer Operation vorausgehen. Bei NSCLC in den Stadien I und II erfolgt eine kurative Therapie, wobei die operative Tumorsektion die Behandlung der Wahl ist. Die Operation umfasst unter anderem Lobektomie, Bilobektomie (Entfernung von zwei benachbarten Lungenlappen) oder Pneumektomie jeweils mit systematischer mediastinaler Lymphadenektomie. Es wird auch nach kompletter Tumorsektion ab einem Stadium IIB, in bestimmten Fällen auch ab einem Stadium IIA eine platinbasierte adjuvante Chemotherapie empfohlen. Bei Patienten mit NSCLC im Stadium IIIA mit Befall nur eines Lymphknotenlevels sollte eine primäre Resektion durchgeführt werden. Eine adjuvante Chemotherapie wird im Anschluss empfohlen. NSCLC im Stadium IIIA mit Multilevel-Lymphknotenbefall oder NSCLC im Stadium IIIB sollten bei entsprechendem

Allgemeinzustand eine kurativ intendierte Radiochemotherapie erhalten. Hingegen ist die Methode der Wahl bei den Patienten in Stadium IIIB meist eine platinbasierte Radiochemotherapie. Die Patienten mit NSCLC im Stadium IV sollten eine ihrem Allgemeinzustand angepasste systemische Therapie erhalten. In der Erstlinie ist dies für die meisten Patienten eine Chemotherapie [5,6]

1.2. PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg

1.2.1. Regulation des mTOR-Signalwegs

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von Zellwachstum, Zellüberleben und DNA-Reparatur gesunder und neoplastischer Zellen [7,8]. Er wird physiologischerweise durch Wachstumsfaktoren wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Insulin, sowie durch zelluläre Stressfaktoren (Hypoxie, osmotischer Stress, reactive oxygen species (ROS) und virale Infektionen) aktiviert. Der Signalweg ist bei vielen Malignomen, so auch bei vielen Lungenkarzinomen dysreguliert. Die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Abb.1). Das Tumorsuppressorgen Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) ist ein multifunktionelles Enzym, das im mTOR-Signalweg die Umwandlung von PIP₃ zurück in PIP₂ katalysiert. Herunterregulation der Expression von PTEN oder Deletion des PTEN-Gens führt zur Überaktivierung des mTOR-Signalwegs mit einer kanzerogenen Wirkung (9,10). Mutationen und Deletion in PTEN-Gen wurde in 3-8% und 8-59% von Plattenepithelkarzinom der Lungenkarzinome berichtet [11,12,13,14,]. Die Aktivierung von PI3K ermöglicht den PI3K-abhängigen Kinasen (PDK) die Phosphorylierung der Proteinkinase AKT an Threonin 308 (Thr³⁰⁸). AKT benötigt zur vollen Aktivierung eine Phosphorylierung sowohl an Threonin 308 (Thr³⁰⁸) als auch an Serin 473 (Ser⁴⁷³). AKT, von dem 3 Isoformen bekannt sind (AKT1=PKB α , AKT2=PKB β , AKT3=PKB γ) spielt eine große Rolle für das Zellüberleben, Zellwachstum sowie die Apoptosehemmung. AKT gehört zu der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase und reguliert das Zellwachstum durch die Phosphorylierung und Aktivierung von mTORC1. Aktiviertes AKT fördert unter anderem Proliferation und hemmt den Zelltod durch die Phosphorylierung und

Inaktivierung des proapoptotischen Faktors Bad und des Transkriptionsfaktors FOXO, welche die Expression von Genen beeinflussen, die eine Rolle bei der Apoptose spielen [15,16].

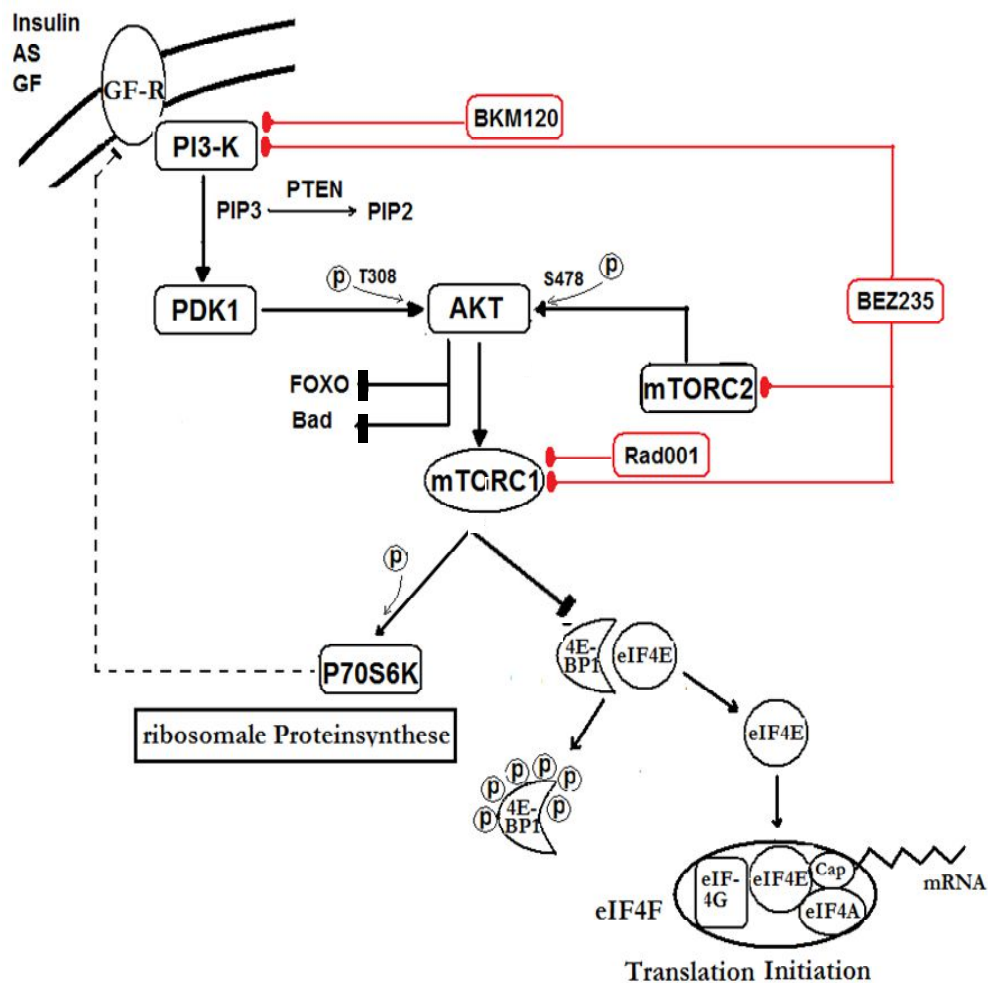


Abb.1: Der mTOR-Signalweg führt zur Proteinsynthese von MCL-1, Bcl-xL, c-Myc und Cyclin D1. Durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren kommt es zur Aktivierung des mTOR-Signalwegs. Die Zielstellung der jeweiligen mTOR-Signalweg-Inhibitoren sind mit roten Linien gekennzeichnet.

1.2.2. Cap-abhängige mRNA-Translation

Bei den eukaryontischen Zellen wird in der Einleitungsphase der Proteinsynthese eine strenge Regulation für die Bindung des 5`Endes der mRNA an das Ribosom benötigt. Da die eukaryontischen Ribosomen nicht in der Lage sind, das 5`Ende zu identifizieren und mRNA zu binden, wird ein Komplex aus den Translationsinitiations-Faktoren für die Translationseinleitung gebildet [17]. Dieser Komplex, eIF4F genannt, besteht aus folgenden Komponenten eIF4G (Strukturprotein), eIF4A (Helikase) und eIF4E (Initiationsfaktor). Das eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding protein 1 (4EBP1) ist ein Repressor der Translation Cap-abhängiger mRNA, der im inaktivierten Zustand an den Initiationsfaktor (eIF4E) gebunden und durch die Hyperphosphorylierung in seiner Funktion gehemmt wird. mTOR ist ein AKT nachgeschaltetes Protein, das als Serin/Threonin-Kinase fungiert und mit Raptor und mLST8 den mTOR Complex 1 (mTORC1) bildet. mTORC1 phosphoryliert den translationalen Repressor 4EBP1 und die 70-kDa ribosomale S6 Kinase (p70S6K), die an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist [18]. Die inaktivierende Phosphorylierung des translationalen Repressors 4EBP1 durch aktives mTORC1 induziert hingegen die Phosphorylierung und Freisetzung des Initiationsfaktors (eIF4E) [19]. Freies eIF4E bildet mit eIF4A und eIF4G den Translationskomplex, der die Translation Cap-abhängiger mRNA ermöglicht. Die Cap-Struktur am 5'-Ende der eukaryontischen mRNA spielt eine Rolle beim Transport, der Stabilisierung, der Translation und dem Splicing von mRNA. EIF4E induziert hierbei u.a. die Translation von Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Gefäßendothelwachstumsfaktor (VEGF), c-Myc und Cyclin D1 [20].

1.3. Regulation und Interaktion des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

1.3.1. Zellzyklus-Regulation

Die gleichmäßige und vollständige Weitergabe der genetischen Information, der DNA in einer eukaryontischen Zelle ist essentiell für das Leben. Die Weitergabe der DNA erfolgt in der Zellteilung. Bei den eukaryontischen Zellen gliedert sich der Zellzyklus in der Regel in zwei Hauptphasen, die Interphase und die Mitose, wobei die Interphase sich weiter in G1-,

S- und G2-Phase aufteilt. Die Mitose wird in vier Hauptphasen, die Pro-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt und sie ermöglicht, dass beide Tochterzellkerne die gleiche Anzahl an Chromosomen und damit die gleiche Erbinformation erhalten.

Die zentralen Übergänge im eukaryontischen Zellzyklus werden durch die Aktivität verschiedener Cycline und CDKs (Cyclin dependent kinase) gesteuert. So binden unterschiedliche Cycline phasenabhängig an spezifische CDKs und bilden Holoenzymkomplexe, die durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren den Zellzyklus steuern [21]. Die phasenunspezifischen D-Cycline (D1, D2 und D3) sind an der Regulation der frühen G1-Phase beteiligt und deren Transkription wird abhängig vom Wachstumsfaktoren-Stimulus durch verschiedene Signalwege aktiviert. Durch die Interaktion mit CDK4 und CDK6 bildet Cyclin-D einen aktiven Enzymkomplex, der die Tumorsuppressor-Proteine Retinoblastoma (Rb), p107 und p130 phosphoryliert, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. Im Ruhezustand sind diese Transkriptionsfaktoren hingegen an hypophosphoryliertes Retinoblastoma, p107 und p130 gebunden und dadurch inaktiv. Die Hyperphosphorylierung von Rb durch den CDK4/CDK6-Cyclin D Komplex in der frühen G1-Phase und durch CDK2/Cyclin E in der späten G1-Phase führt zum totalen Verlust der Interaktion der Retinoblastoma-Familie mit der E2F-Familie. Dies ist essentiell für den Start des Zellzyklus und den Eintritt in die Synthesephase. Der Transkriptionsfaktor E2F induziert die Expression von weiteren mitogenen Faktoren und phasenspezifischen Cyclinen (Cyclin E, Cyclin A, Cyclin B, CDK1 und DNA Polymerase- α) (Abb.2) [22].

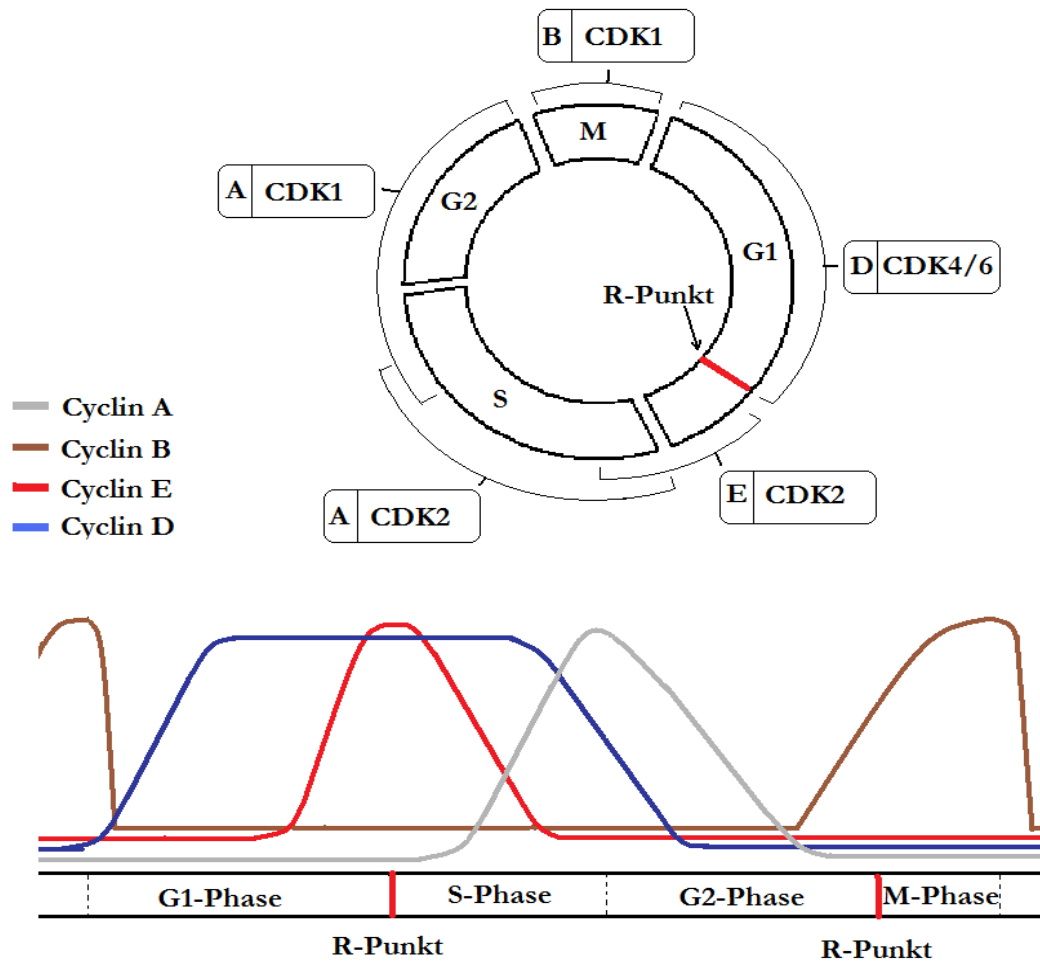


Abb.2: Schematische Darstellung des Zellzyklus bei einer eukaryontischen Zelle. Hier sind die einzelnen Phasen des Zellzyklus und die Cyclin- Unterheiten mit cyclin abhängigen Kinasen (CDKs) dargestellt.

Die Regulation der Kinasen-Aktivität (CDKs) wird sowohl durch den periodischen Abbau der Cycline und deren Transport aus dem Zellkern als auch durch verschiedene Gruppen von Tumorsuppressor-Proteinen gesteuert. Die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CKIs) werden in zwei Familien eingeordnet: die INK-Familie und die CIP/KIP-Familie. Die INK-Familie setzt sich aus P15, P16, P18 und P19 zusammen [24]. Die vier Mitglieder binden und inhibieren CDK4 und CDK6, wodurch eine Phosphorylierung der Rb

Proteinfamilie verhindert und die Zelle in der G1-Phase vor dem Restriktionspunkt arretiert wird. Die Inhibition von CDK4 und CDK6 durch die INK-Familie erfolgt sowohl durch eine Verhinderung der Interaktion von CDK4 und CDK6 mit den D-Cyclinen als auch durch Inhibition der Kinase-Aktivität der bereits gebildeten CDK/Cyclin D-Komplexe. Die CIP/KIP-Familie der CKIs besteht aus drei Mitgliedern (P21, P27 und P57). Der CDKs-Inhibitor P27, der an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, wird in der G1-Phase von zahlreichen Signalwegen gesteuert. Der CDK-Inhibitor p27 bindet und inhibiert in der G1-Phase sowohl CDK4/CDK6-Cyclin-D, als auch CDK2-Cyclin-E-Komplexe. Dadurch wird die Rb-Proteinfamilie nicht durch die Kinasekomplexe phosphoryliert. Dies hat zur Folge, dass die E2F-Transkriptionsfaktoren an die Rb-Proteinfamilie gebunden bleiben und die Zellen vor dem Restriktionspunkt in der G1-Phase arretieren [23,24,25].

Das „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) ist ein Schlüsselenzym innerhalb einer wichtigen Signaltransduktionskaskade, dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg und die mTOR-Überexpression bzw. die Aktivierung dieses Signalwegs geht mit einer vermehrten Neoangiogenese und Tumorzellproliferation einher. Auf Grund dessen ist die mTOR-Inhibition ein interessanter therapeutischer Ansatz bei einer Vielzahl solider Tumore, aber auch bei malignen hämatologischen Erkrankungen. Die Aktivierung von AKT und die Phosphorylierung von mTOR wurden bei 51% NSCLC-Patientenproben und bei 74% der NSCLC-Zelllinien beobachtet [26]. mTOR moduliert die Translation spezifischer mRNA durch die Phosphorylierung von Translationsproteinen wie P70S6K, 4E-binding protein 1 (4-EBP1) und dem eukaryotic elongation factor 2. Die Blockade von mTOR bzw. diesem Signalweg führt durch die Inaktivierung von P70S6K und die Hypophosphorylierung von 4-EBP1 zum G1-Zellarrest [27].

1.3.2. Apoptose

Apoptose wird auch als physiologischer bzw. programmierter Zelltod bezeichnet. Sie ist ein streng regulierter Prozess, dessen Dysregulation u.a. bei der Entstehung bösartiger Tumore eine wichtige Rolle spielt. Apoptose ist durch zahlreiche energieabhängige morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet. Diese Veränderungen

führen letztlich zur Entstehung apoptotischer Körperchen, die insbesondere von Makrophagen und dendritischen Zellen aufgenommen und abgebaut werden. Die Apoptose wird in zwei Hauptwege unterteilt. Beim intrinsischen Apoptoseweg kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dagegen wird der extrinsische Weg rezeptorvermittelt durch extrazelluläre Liganden wie TNF- und Fas-Rezeptoren aktiviert. Bei beiden Apoptosewegen kommt es zur Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind Cystein-aspartat-spaltende Proteinasen, die nach ihrer Aktivierung weitere Caspasen und DNAsen aktivieren, wodurch weitere zelluläre Proteine durch Spaltung inaktiviert werden.

1.3.3. Bedeutung der BCL-2 Familie

Die BCL-2 Familie ist eine Apoptose-regulierende Genfamilie, die nach ihrer Aktivität in zwei Hauptgruppen mit pro-apoptotischen bzw. anti-apoptotischen Proteine unterteilt wird. BH3-Domäne Proteine wie PUMA, BIM, BID, NOXA und BAD sind pro-apoptotische Proteine. Sie werden abhängig vom Zelltyp durch den Stimulus des intrinsischen Apoptose-Signalwegs posttranslational oder durch bestimmte Transkriptionsfaktoren vermehrt exprimiert [28]. Mcl-1, BCL-2, BCL-xL, BCL-w und BCL-xL sind anti-apoptotische Proteine der Bcl-2-Familie. Eine Aktivierung bzw. Heraufregulation der BH3- Proteine führt zur Interaktion mit den anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen BCL-xL, BCL-2, BCL-w, MCL-1 und A1. Diese werden dadurch neutralisiert, so dass die mitochondriale Aktivierung über ein Gleichgewicht zwischen den pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Proteinfamilie und deren Interaktion reguliert wird (Abb.3).

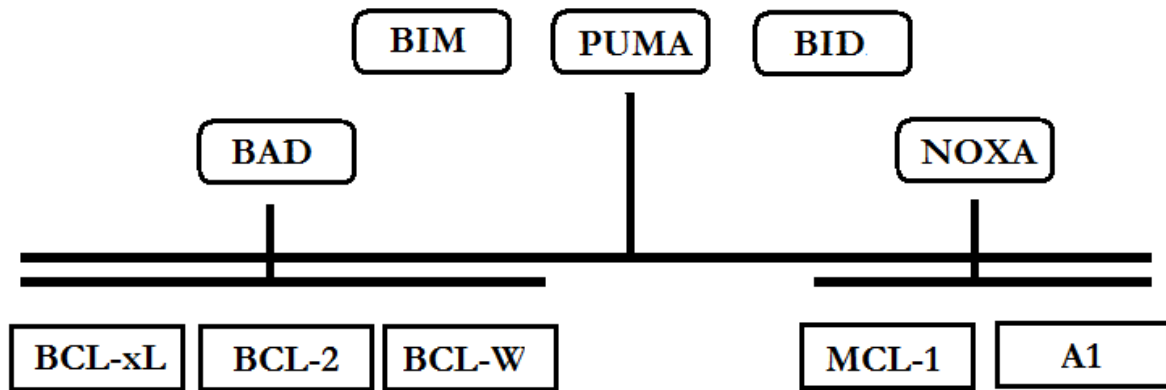


Abb.3 BH3-D Proteine binden an Proteine der BCL-2 Familie. BAD bindet selektiv BCL-xL, BCL-2 und BCL-w. NOXA bindet nur an MCL-1 und A1. Die anderen BH3-Proteine binden alle Proteine der BCL-2 Familie.

Dabei haben die drei BH3-D Proteine PUMA, BIM und BID eine hohe Bindungsaffinität zu allen anti-apoptotischen BCL-2 Proteinen, während BAD nur mit BCL-xL, BCL-2 und BCL-w und NOXA nur mit MCL-1 und A1 interagiert. Darüber hinaus können die Apoptose-Aktivatoren der BH3-D Proteine stimulusabhängig direkt mit den pro-apoptotischen, porenbildenden BCL-2 Proteinen BAX und BAK interagieren [29]. In ruhenden Zellen liegen die Proteine BAX inaktiviert frei im Zytoplasma und BAK an anti-apoptotische BCL-2 Proteine gebunden vor. Aktivierte BAK und BAX stimulieren die Porenbildung in die äußere Mitochondrienmembran, was zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix führt. Dieser Prozess wird MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) genannt. Da mehrere Mitglieder der Bcl-2-Familie in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert sind, führt der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials durch die Porenbildung zur vermehrten Freisetzung der proapoptotischen Proteine, wie Cytochrom C, Endonuklease G und AIF (Apoptosis Inducing Factor) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma, wodurch der intrinsische Apoptose-Signalweg eingeleitet wird [30].

1.4. PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg-Inhibitoren

1.4.1. Everolimus RAD001

Der PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg ist bei vielen LC, SCC wie non-SCC, direkt oder indirekt in die Malignomgenese und das Wachstum der Erkrankung involviert. In klinischen Studien untersuchten mTOR-Inhibitoren sind die Rapamycin-Analoga Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD001) und Ridafarolimus (AP23573).

Everolimus (RAD001) ist ein oral bioverfügbarer mTORC1- Inhibitor der Novartis-Firma. Everolimus gehört zu einer Gruppe der Immunsuppressiva und wird angewendet, um Abstoßung einer Nierentransplantation bzw. Herztransplantation zu verhindern. Everolimus wird hauptsächlich in der Leber über CYP3A4 abgebaut. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Übelkeit, Anämie, Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Hyperlipidämie und Wundheilungsstörungen [31].

Der mTOR-Inhibitor Everolimus RAD001 wurde bereits bei verschiedenen Tumoren untersucht. Die antitumoröse Wirkung wurde in klinischen Studien bei Patienten mit Magenkarzinom, Mammakarzinom und neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen [32,33,34]. Die größte Population wurde bislang beim metastasierten Nierenzellkarzinom (mRCC) analysiert. In dieser Indikation ist die Substanz u.a. zugelassen. Ergebnisse einer Phase II Studie mit Everolimus RAD001 alleine oder in Kombination mit Chemotherapie zeigten hingegen nur eine limitierte Aktivität bei NSCLC Patienten [35]. Grund hierfür könnte ein ‚feed back loop‘ sein bei dem es durch Rapamycin oder sein Analog Everolimus RAD001 durch Hemmung von p70S6K zu einer Aufhebung der negativen Rückkopplung und somit zu einer verstärkten Phosphorylierung vom AKT kommt.

1.4.2. Dualinhibitor NVP-BEZ235

Da viele hämatologische und solide Tumore mit einer Dysregulation bzw. gesteigerter Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs einhergehen und der oben genannte ‚feed back loop‘ in verschiedenen Zellsystemen beobachtet wurde, wird die multiple Hemmung dieses Signalwegs als attraktives Ziel für die Tumorthherapie angesehen. Der Dualinhibitor BEZ235 ist eine von Novartis entwickelte synthetische Verbindung, die zur Klasse der

Imidazochinoline gehört und die katalytische Aktivität von PI3K und mTOR durch kompetitive Bindung an den ATP-bindenden Spalt hemmt [36]. In einigen Studien sind bereits die antiproliferative und antitumorale Wirkung die Förderung der Apoptose bei verschiedenen Krebsarten beschrieben [37,38,39]. Durch die multiple Hemmung von Schlüsselproteinen des mTOR-Signalwegs mit dem Dualinhibitor NVP-BEZ235 wird eine Herunterregulation des Phosphorylierungs-Status von P70S6K, 4EBP1 und eIF4E erreicht.

Präklinische Daten zeigen, dass es bei doppelter Hemmung des mTOR-Signalwegs durch die Kombination von RAD001 mit NVP-BEZ235 zu einem synergistischen Effekt bezüglich der Inhibition von Tumorzellwachstum bei NSCLC Zellen sowie der Induktion von Apoptose und G1-Arrest kommt [40]. Die doppelte Hemmung des mTOR-Signalwegs hat die verstärkte Suppression der zentralen regulatorischen Proteine des mTOR-Signalwegs 4-EBP1, eIF4G und P70S6K, sowie der Zellzyklus und Apoptose regulierenden Faktoren wie Cyclin D1 und c-Myc zur Folge.

Die Wirksamkeit von NVP-BEZ235 bei NSCLC kann durch Kombination mit Inhibitoren der anderen Signalwege verstärkt und die zytostatische Aktivität in zytotoxische Wirkungen umzuwandeln werden. In einer Laborarbeit zeigte die selektive Blockade von Stat3 Signaling in Kombination mit NVP-BEZ235 Einsatz die Hyposensibilisierung der NSCLC Zelllinien bezüglich Zelltod, indem der proapoptotische Faktor BIM induziert wird [41].

1.4.3. NVP-BKM120

BKM120 ist ein weiterer Kinase-Inhibitor des mTOR-Signalwegs mit starker antiproliferativer Aktivität. Der PI3K-Inhibitor NVP-BKM120 hemmt spezifisch alle Isoformen der Klasse I von PI3K, so dass die Bildung von Phosphatidylinositol-3, 4,5-trisphosphate (PIP3) und damit die Aktivität des mTOR-Signalwegs reduziert und das Tumorzellwachstum inhibiert wird [42].

In Vitro-Studien an NSCLC Zelllinien zeigten, dass der neue PI3-Kinase-Inhibitor NVP-BKM120 die Proliferation der NSCLC Zellen reduziert, die Apoptose durch

Herunterregulation des MCL-1 Spiegels induziert und die TRAIL-induzierte Apoptose in NSCLC Zellen verstärkt [43].

Eine verstärkte Hemmung des mTOR Signalwegs durch Einsatz von NVP-BKM120 in Kombination mit RAD001 zeigte eine synergistische inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Lungenkarzinomzellen sowohl in vitro als auch in vivo. Diese Kombination verstärkte die RAD001-induzierte AKT-Phosphorylierung und führte zur Reduktion des Phosphorylierung Status von 4EBP1 [44].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Das Lungenkarzinom ist der häufigste von der Lunge ausgehende maligne Tumor. Er liegt in Deutschland in der Häufigkeit der Neuerkrankungen bei Männern und bei Frauen an der dritten Position. Lungenkarzinome unterteilen sich in kleinzellige und nicht kleinzellige Lungenkarzinome. Die nicht kleinzelligen Lungenkarzinome werden weiter in Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom und großzellige Lungenkarzinome unterteilt. Aufgrund der unterschiedlichen Wirksamkeit verschiedener Therapien ist bei den nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen eine Unterscheidung von Plattenepithelkarzinomen und Nicht-Plattenepithelkarzinomen von großer Bedeutung. Für die Hinzunahme der neueren Substanzen Pemetrexed und Bevacizumab wurde gegenüber einer Standardtherapie nur ein Nutzen beim non-SCC gezeigt. Der Einsatz von dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab ist bei den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aufgrund von deren Assoziation mit lebensgefährlichen Blutungen kontraindiziert [34].

Die molekulardiagnostische Untersuchung auf eine Mutation von EGFR bzw. ein Rearrangement von EML4-ALK eine therapeutische Relevanz. Diese Mutationen kommen praktisch nur bei Adenokarzinomen der Lunge vor [35, 36]. Die aktivierenden Genomveränderungen wie die EGFR-Mutation oder die EML4-ALK-Translokation, die prädiktiv für neue Therapeutika wie Erlotinib, Gefitinib und Crizotinib sind, wurden bisher nicht oder nicht im wesentlichen Umfang bei SCC nachgewiesen. Obwohl es nach wie vor auch bei non-SCC einen großen Bedarf für neue Therapieansätze gibt, ist der Bedarf aufgrund fehlender Fortschritte bei SCC ungleich größer.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Themen bearbeitet:

1. Charakterisierung der molekularen Regulationsmechanismen des mTOR-Signalwegs bei SCC Zellen in vitro.
2. Auswirkungen der verschiedenen mTOR-Inhibitoren auf Zellfunktionen wie Proliferation und Apoptose in dem analysierten SCC Zelllinienmodell.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Materialien

Geräte/Materialien	Hersteller
Brutschrank (HERA cell 240)	Heraeus
Elektrophorese-Kammer	BIO RAD
ELISA-Reader (anthos ht2)	Anthos Mikrosysteme
Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss
Multikanal-Pipette (Transferpette-8, 20-200 µL)	BRAND
Multistep-Pipetten (diverse)	Eppendorf, Ritter
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik
Lichtmikroskop	Leica
pH-Meter	WTW
Pipetten (min. 0,1 µL bis max. 1000 µL)	Eppendorf
Pipettierhilfen (diverse)	Integra Biosciences, Hirschmann-Laborgeräte
Photokassetten (Hypercassette)	Amersham
Semi-Dry-Blot-Gerät (Trans-Blot semi-dry)	BIO RAD
Sterilbank/Laminar-Flow-Box (Technoflow 3F120-II GS)	Integra Biosciences
Stickstofftank (Cryo 2000)	Thermo Scientific
Schüttler (diverse)	Heidolph, Edmund Bühler, Benchmark Research Products
Thermo-Inkubator	INFORS-AG
Thermo-Mixer 5436	Eppendorf
Ultraschallprozessor/Laborhomogenisator (UP 50H)	dr. hielscher GmbH
Umkehrmikroskop	Leica
Vortexer (diverse)	Heidolph, Scientific Industries

Wasserbad (SW-21C)	Julabo
Zentrifugen (diverse)	Heraeus
Zytospin-Zentrifuge (Cytospin3)	SHANDON
Transfektionsgerät	Amaya Biosystems

2.1.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer

Albumin	BSA & BGG Protein Assay Standard Sets, PIERCE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DMEM (mit und ohne Phenolrot)	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Ethanol	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Sigma-Aldrich
Entwickler	Kodak
Fixierer	Kodak
FCS	Gibco/Invitrogen
Glycerin	Sigma-Aldrich, ROTH
Glycin	MERCK
L-Glutamin	Biochrom AG
Methanol	MERCK
Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich
PhosphoSafe Extraction Buffer	Novagen
Ponceau S Solution (in 5% Essigsäure)	Sigma-Aldrich
PBS, Dulbecco's (steril, 500 mL)	PAA
PBS, Dulbecco's (Pulver für 10 L)	Biochrom AG
RPMI 1640 (Kulturmedium)	Gibco/Invitrogen

SDS	ROTH
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	PAA
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.1.3. Antikörper

Primär	Hersteller
Actin	(I-19) sc-1616, goat polyclonal IgG
p-AKT Ser ⁴⁷³	(193H12) Rabbit mAb 4058L, Cell signaling
p-AKT Thr ³⁰⁸	Ab 9275S, Cell signalling
AKT	(pan)(11E7) Rabbit 4685S, Cell signaling
p-4EBP1	(Thr 37/46) Antibody 9459L, Cell signaling
4EBP1	(53H11) Rabbit mAb, 9644, Cell signaling
eIF4E	Rabbit Ab, 9742, Cell signaling
p-eIF4E	(5269), Rabbit Ab 9741A, Cell signaling
Bad	Rabbit Ab, 9292S, Cell signaling
p-P70S6K	(T389) Rabbit Ab, 9205S, Cell signaling
c-Casp 3	Human specific Rabbit Ab, 9501A, Cell signaling
c-Casp9	(D175) (SA1E) Rabbit mAb, Cell signaling
PUMA α/β	(H-136) Rabbit polyclonal IgG, SC: 28226, Lot: G2309 Santa cruz
MCL-1	(S-19) Lot: E2810, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz
P53	(D6-1), SC-126, Lot: 12908, Mouse monoclonal IgG, Santa Cruz
Cyclin D	(DCS6), Mouse mAb, 2926, Cell signaling
Cyclin E	(HE-12), SC-247, Lot: H2511, Mouse monoclonal IgG, Santa Cruz
CDK6	(C-21), SC-177, Lot: L1511, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz
P27	(N-20), SC-527, H0510, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz
BAX	(N-20), SC-493, Lot: F1609, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz
BCL-xL	(H-5), SC-8392, Lot: G2709 Mouse monoclonal IgG, Santa Cruz

Sekundär	Hersteller
ECLTM Anti-mouse-IgG	HRP-linked whole antibody (from sheep), 1ml, NA931V, GE Healthcare
Goat-anti-rabbit-IgG-HRP	Sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, 200µg/0,5ml
Donkey-anti-goat-IgG-HRP	Sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, 200µg/0,5ml

2.1.4. Rezepte

MTT 1-Reagenz	3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid (Sigma) 5mg/ml PBS (PAA)
MTT 2-Reagenz	10 % SDS (Roth) in 0,01 M HCl (Merck) 1:200 mit Aqua dest. Verdünnen
Lysispuffer, 50ml	20 mM Tris-HCl (SAFC), pH 8 137 mM NaCl (Merck) 10 % Glycerol (Sigma) 1 % Triton X-100 (Sigma) 2 mM EDTA 1 mM Sodium-Orthovanadat 1x Complete Protease Inhibitor-Tablette (Roche)
10% Trenngel, 10ml	4,8 ml Aqua dest. 2,5 ml Acrylamid (40%ig, Roth) 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS (Sigma) 5 µl TEMED (Roth)
4% Sammelgel, 5ml	3,2 ml Aqua dest. 0,5 ml Acrylamid (40%ig, Roth) 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 50 µl 10 % SDS

	50 µl 10 % APS 10 µl TEMED (Roth)
2x SDS, 10 ml	0,2 ml (250 mM) 0,5 M Tris-HCl 8 ml (4 % SDS) 10 % SDS 2 ml (10 %) Glycerol
Ladepuffer 4x	1,25 ml 0,5 M Tris HCl 2,5 ml Glycerol 5 ml 20 % SDS 1,25 ml 1 % Bromphenolblau (Sigma) 20 % β-Mercaptoethanol (Sigma)
Elektrophoresepuffer 10x	125 mM Tris-Base 960 mM Glycin (Roth) 4 mM SDS
Transferpuffer 10x	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin 10 g SDS/0g SDS (mit/ohne SDS) Aqua dest. auf 1 L
Waschpuffer PBST 0,05 %	1x PBS mit 1 % Tween 20 (Sigma)
Entwicklerlösung: Kodak GBX Entwicklerkonzentrat	1:5 verdünnen mit aqua bidest.
Fixierlösung: Kodak GBX Fixiererkonzentrat	4% Paraformaldehyd in PBS
Transfektionspuffer: Cell Line Nucleofector™ Kit V (25 RCT)	Cell Line Nucleofector™ Solution V Supplement 1 SDS attached pmaxGFP™ Vector (0.5 µg/µl in 10mM Tris, pH 8.0; 30µg)

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien und Zellkulturen

Es wurden die folgenden Plattenepithelkarzinom-Zelllinien verwendet (NCI-H226, NCI-H2170, SK-MES-1, BEN97, NCI-H520 und SW900).

Die Zelllinien NCI-H226, NCI-H2170, SK-MES1 und SW900 wurden freundlicherweise im Labor von Herrn Prof. Dr. med. Sezer und die Zelllinien BEN97, NCI-H125 und NCI-H157 von dem Institut für Pathologie (Charite) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie NCI-H520 war vom zentralen Eingangslabor für Zytogenetische und Molekulargenetische Diagnostik (Universitätsklinikum Ulm) erhältlich.

Die oben erwähnten Lungenkarzinomzelllinien wurden von flüssigem Stickstoff im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und unter sterilen Bedingungen in 10 ml Zellmedium mit 10% FCS und 1% P/S in Polystyrol-Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation der Zellen (1000U/min, 5-10min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20 ml Medium mit 10% FCS und 1% P/S in geeigneten Kulturflaschen herangezüchtet und in Brutschränken bei H₂O-gesättigter Atmosphäre, 5% CO₂ und 37°C aufbewahrt. Mediumwechsel wurden je nach Zelllinie, Zelldichte und Verdopplungsrate alle zwei bis sechs Tage durchgeführt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einem „Laminar-Air-Flow“ Arbeitsplatz passagiert. Bei der Zellpassage wurden die Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Kulturflasche gelöst. Zum Ablösen wurden 3-5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 bis 10 min der Kulturflasche zugesetzt und anschließend 5 min. bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Ablösung wurden die Zellen in das Zellmedium überführt und anschließend zentrifugiert (1000 U/min, 5-10 min) und in neue Kulturflaschen verteilt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte über 7 bis 10 Passagen. Danach wurden neue Zellen aufgetaut. Für die Versuche wurden Zelllinien ab der dritten Passage verwendet. Voraussetzung für die Durchführung der jeweiligen Versuchsreihen war zudem ein negativer Mycoplasmentest.

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 10% DMSO-, 10% FCS und 1% P/S-Medium konzentriert (mindestens 2×10^6 Zellen/ml), zwischen 24 h und 30 Tagen bei -80°C abgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zahlkammer. Dafür wurden 20 μl einer Zellsuspension mit Trypanblau 1:1 verdünnt und in eine Neubauer Zahlkammer transferiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.2.3. Proteinisolierung

Vor der Zellbehandlung wurden die Zellen auf 2×10^6 Zellen/ml verdünnt und 10 ml dieser Suspension in eine dazugehörige Petrischale überführt. Nach mindestens 12 h wurde das Zellmedium durch ein Inhibitor-Medium ausgetauscht. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in 15 ml-Röhrchen überführt.

Jede Probe wurde folglich in je ein auf Eis vorgekühltes Zentrifugenröhrchen überführt, bei 4°C herunterzentrifugiert, nach Dekantieren des Überstandes erneut in eiskaltem PBS resuspendiert, erneut bei 4°C zentrifugiert, nach Entfernen des Überstandes wurden 30-100 μl Lysis-Puffer, bestehend aus 10% EDTA-Proteinase-free-Lösung und 90% Phosphosafe, zum Schutz phosphorylierter Proteine, zugesetzt. Nach mehrmaligem Einfrieren und Auftauen/Vortexen (mechanische Zerstörung der Zellmembran) wurden die Zellen 30 - 40 min. bei 4°C herunterzentrifugiert und der Überstand als Protein-Lysat in neuen Mikrozentrifugen-Gefäßen gelagert. Die Lagerung bis zur Konzentrationsbestimmung erfolgte im Gefrierfach bei -80°C .

2.2.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode. Dabei wird Biuret-Reaktion mit BCA (Bicinchinon-Säure) als Detektionssystem verknüpft. Die Biuretreaktion ist zusammengesetzt aus gelöstem Biuret (Carbamoyl-Harnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem Milieu. Dabei werden Ca^{2+} -Ionen durch Proteine zur Ca^+ reduziert. Diese

reduzierten Ca^+ -Ionen bilden mit Bicinchinon-Säure (BCA) einen Farbkomplex, der durch Absorptionsmessung bei 562 nm detektiert wird. Das BCA-Reagenz A (BCA) und Reagenz B (Ca^{2+}) wurden für die Bestimmung im Verhältnis 40:1 mit PBS verdünnt. Dann wurden 30 μl des Lysats mit 200 μl Reaktionsgemisch in Dreifachbestimmung zu den Proteinproben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h unter 37 °C konnte die Platte im Elisa-Reader gelesen werden. Unter Verwendung einer vorbereiteten Standardkonzentrationsreihe aus Albumin konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

2.2.5. Western Blot

2.2.5.1. Prinzip

Der Western Blot ist ein semiquantitatives Verfahren zur Detektion von Proteinen, das einen Vergleich des Expressionsgrades beliebiger Gene zwischen verschiedenen Zellkulturproben auf Translations- und Posttranslations-Ebene ermöglicht. Die in den Lysaten repräsentativer Proben einer Zellpopulation befindlichen Proteine werden hierbei nach Molekülgröße elektrophoretisch und in vertikaler Richtung in einem Polyacrylamid-Gel separiert. Anschließend erfolgt durch Anlegen einer elektrischen Spannung der horizontale Transfer vom Gel auf einen permanenten Träger, beispielsweise auf eine PVDF-Membran. Diese wird zunächst mit einem primären, für das interessierende Protein spezifischen sowie nachfolgend mit einem sekundären, den primären bindenden und an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper, inkubiert. Die Zugabe eines geeigneten Substrats initiiert schließlich eine Meerrettichperoxidase-katalysierte Chemilumineszenz, deren Intensität als relatives Maß des Proteinexpressions-Grades dient.

2.2.5.2. Durchführung

Für die Western Blot Analyse wurden jeweils 40 μg Lysate/Proteine mit 5 μl Ladepuffer (Beta-Mercaptoethanol, 1:5) vermischt und mit SDS im Überschuss verdünnt. SDS bindet die Proteine, die danach eine negative Ladung erhalten. Da diese Ladung zu ihrem Molekulargewicht proportional ist, werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix nur nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proteine

vor dem Laden denaturiert. Die Denaturierung der Proteine erfolgte bei 95 °C und 800 U/min für 10 Minuten auf einem Thermocycler. Um eine Renaturierung der Proteine zu verhindern, wurden die Proben sofort auf Eis überführt. Dann wurden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 4% Polyacrylamid konzentriert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese von je 14 µl Probenlösung sowie einem Protein-Marker in einem 10%igen Acrylamidgel für 90 - 120 Minuten bei 100 Volt, 25 mA und 100 W. Zur Equilibrierung vor dem Blot wurden die PVDF-Membranen für eine Minute in Methanol eingetaucht. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Acrylamidgele zusammen mit den Membranen und Blotting-Paper für 30 - 45 Minuten in Transferpuffer gelegt. Anschließend erfolgte die Schichtung des Blots in folgender Reihenfolge: Blotting-Papier, Acrylamid-Gel, PVDF-Membran, Blotting-Papier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte unter der Anlage von 15 V für 90- 120 Minuten. Am Ende des Blots wurden die Membranen zur Kontrolle in 0,1 % Ponceau-S-Lösung eingetaucht, wodurch die Proteinbanden rot gefärbt werden. Anschließend folgte mehrmaliges Waschen der Membran mit 0,05 % PBST. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 1 – 2 h in 6 ml 5 %iger Milch auf dem Schüttler inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren. Der Primärantikörper, der spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet war, wurde im Anschluss in entsprechender Konzentration in 6 ml 5 %iger Milch verdünnt dazugegeben und die Membrane anschließend darin über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein Waschvorgang für 3 x 10 min mit PBST und schließlich wurde der Sekundärantikörper, gelöst in 1%iger Milch, für 90 min zu den Membranen gegeben. Danach folgten erneut 3 - 5 Waschschrte mit PBST. Dann wurde 1 ml Elektrochemilumineszenz-Lösung (ECL) für 1 min auf die Membran gegeben, die Membran in Klarschichtfolie gehüllt und in eine Filmkassette eingelegt. Die Zugabe der ECL für 1 min bewirkte eine Aussendung von Lichtquanten in den durch spezifische Antikörper markierten Regionen der Membranen. Um die gesuchten Proteine sichtbar zu machen, wurde der Film in der Dunkelkammer entwickelt, in dem er nach verschiedene Belichtungszeiten für 2 min in Entwickler, dann kurz in Wasser und letztendlich für 2 min in Fixierer gelegt wurde. Für eine weitere Verwendung der Membran wurde diese für 20 min in Stripping-Puffer bei Raumtemperatur

geschüttelt und anschließend in PBS-Tween gewaschen und für 1 h in 5%iger Milch geblockt. Eine erneute Primäantikörper-Gabe konnte dann erfolgen.

2.2.6. MTT-Test (Bestimmung der Zellviabilität)

2.2.6.1. Prinzip

Hierbei handelt es sich um eine Methode zur Messung der Proliferation und Zellvitalität. Dabei werden keine Informationen über Zellzyklus-Arrest bzw. Zelltod geliefert. Der Nachweis vitaler Zellen basiert auf einer enzymatischen Reaktion durch mitochondriale Dehydrogenasen von stoffwechselaktiven Zellen. Dies ermöglicht einen Vergleich der Überlebensfähigkeiten verschiedenen behandelten Proben jener Zellpopulation untereinander sowie mit unbehandelten Kontrollen. Während der Inkubation der jeweiligen Proben mit einem gelösten Tetrazolium-Salz gelblicher Färbung (MTT I-Reagenz) wird dieses vorrangig durch Reaktion mit zellulären Reduktionsäquivalenten zu einer violett gefärbten kristallinen Formazan-Verbindung umgesetzt. Die intrazellulär ausgefällten Formazan-Kristalle gehen nach anschließender Zugabe eines Detergens (MTT II-Reagenz) in Lösung, deren Violettfärbung, die als optische Dichte photometrisch bei 550 nm gemessen wird, als semiquantitatives Maß für die Zellviabilität dient.

2.2.6.2. Durchführung

Die Zellsuspension wurde auf 1×10^5 Zellen/ml verdünnt und anschließend auf 96-Well-Platten für einen Tag ausgesiedelt, um eine Adhäsion an den Boden zu ermöglichen. Vor dem Expositionsbeginn wurde das Kulturmedium komplett aus den Wells abgesaugt und durch ein neues Inhibitor-Medium ersetzt. Die Inkubationszeit betrug 4 Tage. Nach Ende der Inkubationszeit wurde den Wells 10 μ l MTT I-Reagenz zugesetzt und dann für 3 - 4 h auf den Zellen belassen. Während dieser Inkubationszeit wird MTT I-Reagenz intrazellulär vom wasserlöslichen schwach gelben Tetrazolium-Salz in wasserunlösliches, dunkelblaues Formazan umgewandelt. Nach erfolgter Inkubation wurde den Wells 100 μ l Lysepuffer zugesetzt. Einen Tag danach wurden mit dem Elisa-Reader die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur Anzahl aller lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Messung.

2.2.7. Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

2.2.7.1. Prinzip

Durchflusszytometrie wird auch als FACS (**f**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting) bezeichnet, mit dieser Methode können die Oberflächenmoleküle, intrazelluläre Proteine und DNA quantitativ bestimmt werden. DNA lässt sich durch den Farbstoff Propidiumiodid anfärben. Da die Zellmembran für den Farbstoff nicht permeabel ist und nur in Zellen mit zumindest partiell geschädigter Plasmamembran eindringt und mit DNA interagiert, lassen sich durch Propidiumiodid einfach und effektiv die lebenden von den toten Zellen unterscheiden. Tote Zellen weisen hierbei höhere Fluoreszenz auf als lebende. Da die Menge des Fluoreszenzfarbstoffes wiederum direkt proportional der Konzentration DNA-Menge ist, kann mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung der Zellzyklus-Status der Zellen analysiert werden. Die toten Zellen wären hierbei Zellen mit hypodiploiden DNA.

2.2.7.2. Durchführung

In Vorbereitung auf die Zellzyklusanalyse wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dem Kulturmediums-Wechsel mit verschiedenen Inhibitoren behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 3 Tagen wurden die Zellen aus den 6-Well-Platten entfernt. Zum Ablösen wurden 2-3 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 bis 10 min den 6-Well-Platten zugesetzt und anschließend 5 min. bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Ablösung wurden die Zellen in 15 ml Röhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (1000 U/min, 5-10 min). Die Zellen wurden mit PBS 2X gewaschen (Mit PBS verdünnt, dann vorgetext und zentrifugiert und der Überstand entfernt) und dann in speziellen FACS-Röhrchen mit 3 ml 70%igem Ethanol in Eis für 15 min fixiert. Danach wurden die Zellen erneut für 5 min zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Anschließend wurden ca. 500 µl PI-Solution zu den FACS-Röhrchen zugesetzt. Vor der Messung mit dem FACS-Gerät wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Analyse erfolgte mit dem Durchflusszytometer. Da es sich bei Lungenkarzinomen um adhärente Zellen mit der Tendenz zur Aggregation handelt, mussten die Zellen vor der Durchflusszytometrie zur

Gewährleistung der Einzelzelldetektion noch aufgeschüttelt und durch einen Filter pipettiert werden.

2.2.8. Transfektion

2.2.8.1. Prinzip

Das Einbringen von PUMA-siRNA erfolgte durch die Elektroporation. Ein elektrischer Puls zerstörte kurzfristig das Membranpotential der Zellen. Dabei entstanden Membranporen, durch die sich PUMA-siRNAs in die Zellen hereingeschlängeln. Nach 24h wurden die Proben weiter mittels FACS und Western Blot nach Behandlung der Zellen mit NVP-BEZ235 für 72h für Zelltodmessung und 24h für Proteinbestimmung untersucht. Vor Behandlung der transfizierten NCI-H2170 Zellen mit dem Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 wurde eine optimale Konzentration der siRNA sowie ein optimales Programm im Nucleofector®-System und der entsprechende Transfektionspuffer mehrfach ausgetestet. Hier konnte eine Anzahl transfizierter Zellen von max. 38,5 % erreicht werden.

2.2.8.2. Durchführung

Die Transfektion erfolgte durch die Elektroporation und Lipofektion im Nucleofector®-System (Amaxa Biosystem). Hier wurde nach Zellzahlbestimmung und Zellzentrifugation zunächst 2 Mil. NCI-H2170 Zellen in 100 µL Transfektionspuffer (Amaxa Biosystem, 82 µl Nucleofector™ Solution V + 18 µl supplement I) suspendiert und dann in einem entsprechenden 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden insgesamt drei Eppendorf-Gefäße mit jeweils 2 Mil. NCI-H2170 Zellen vorbereitet. Eine Probe als Kontrolle wurde nur mit DNase free water (10 µl), eine mit negative siRNA 10 µM (10µl) und eine mit PUMA-siRNA 10 µM (10µl) behandelt und dann nach vorsichtiger Mischung in entsprechenden Küvetten überführt. Nun wurden die NCI-H2170 Zellen nach einer erfolgreichen Reaktion in Nucleofector®-System (optimales Programm: T-030) jeweils in 10 ml Kulturmedium überführt und dann jeweils 5 ml in 6-Well-Platten ausgesät (pro Ansatz 1 x 10⁶ Zellen). Da die NCI-H2170 adhärent sind, wurden sie zunächst ohne Behandlung in Kulturmedium für 12 h bei 37 °C inkubiert. Nach 12 h wurden die Zellen nach dem Kulturmediums-Wechsel mit dem Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 behandelt. Der

Wechsel vom Kulturmedium erfolgte zur Entfernung der im Medium schwimmenden toten Zellen, welche durch die Elektroporation verursacht wurden. Nach erfolgter Inkubationszeit (24 h für Proteinbestimmung und 72 h für Zelltodmessung) wurden die Zellen mittels Western Blot bzw. FACS-Messung analysiert.

2.2.9. Statistische Auswertung

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden in zwei wiederholten und unabhängigen Experimenten reproduziert. Dargestellt ist jeweils genau ein repräsentatives Resultat. Die Standardabweichungen quantitativer Messpunkte wurden jeweils in Excel ermittelt und sind in den untenstehenden Diagrammen angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p < 0,05$ festgelegt. Ist der errechnete p-Wert größer als das zuvor festgelegte Signifikanzniveau, gilt die Nullhypothese als bestätigt, d.h. die verglichenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant. Ist der p-Wert kleiner als das Signifikanzniveau gilt der Unterschied zwischen den beiden Gruppen als signifikant. Ein p-Wert $< 0,001$ gilt als statistisch höchst signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Phosphorylierung verschiedener Schlüsselproteine des PI3-Kinase/AKT/ mTOR Signalwegs

Der PI3K/AKT/mTOR Signalweg im Lungenkarzinom ist bisher wenig untersucht. Mit zunehmendem Nachweis von Mutationen im mTOR-Signalweg haben das Interesse und der Bedarf am PI3K/AKT/mTOR Signalweg als therapeutisches Ziel im Lungenkarzinom in den letzten Jahren stark zugenommen.

Hier wurden zunächst verschiedene Zelllinien nicht kleinzelliger Lungenkarzinome (NSCLC) mit plattenepitheliale Ursprung in unbehandeltem Zustand untersucht. Es ist bekannt, dass bei NSCLC häufig K-Ras oder der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor mutiert sind und es u.a. dadurch zu einer konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs kommt. Mittels Western Blot Analyse wurde bei verschiedenen SCC-Zelllinien die konstitutive Expression und Phosphorylierung von AKT, P70S6K, EIF4E und 4EBP1 analysiert. Während sich bei allen untersuchten Zellen eine ausgeprägte AKT-Expression findet, zeigen lediglich NCI-H2170, BEN97 und NCI-H157 Zellen eine starke AKT-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung und Expression des Schlüsselproteins 4EBP1 ist hingegen bei allen untersuchten Zelllinien außer bei SK-MES1 stark ausgeprägt.

Die Ergebnisse legen daher eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in allen untersuchten Zelllinien nahe, wobei möglicherweise nicht bei allen Zelllinien eine Aktivierung aller Schlüsselproteine dieses Signalweges vorliegt (Abb.4).

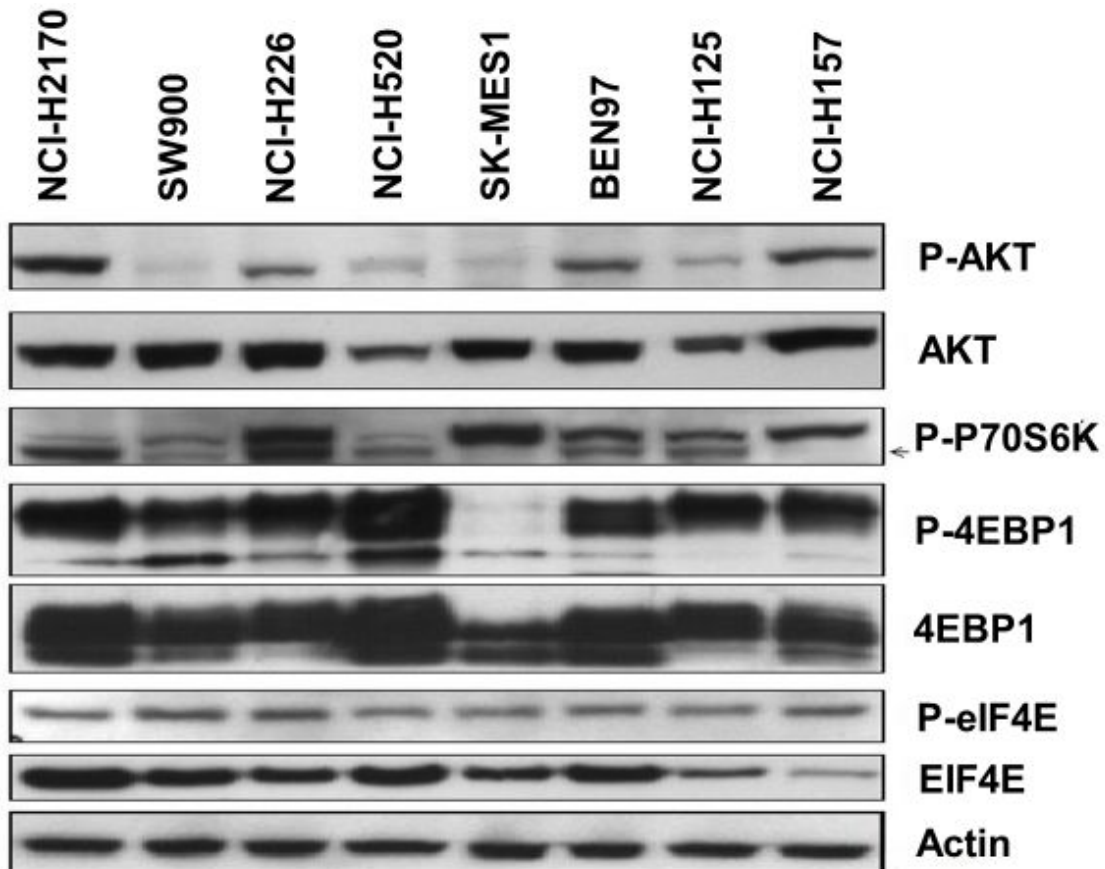


Abb.4: Die verschiedenen Zelllinien wurden in RPMI Medium mit 10 % fetalem Kälberserum kultiviert. Anschließend wurden die Zelllysate mittels Western Blot analysiert. Es wurden Antikörper gegen Schlüsselproteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs eingesetzt.

3.2. Der Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 dephosphoryliert 4EBP1 und eIF4E bei allen SCC Zellen

Als Nächstes wurden die folgenden Zelllinien (NCI-H226, NCI-H520, NCI-H2170 und BEN97) mit verschiedenen Konzentrationen des mTOR-Inhibitors RAD001, des pan-PI3K-Inhibitors NVP-BKM120 (BKM120) bzw. des dualen PI3K und mTOR-Inhibitors NVP-BEZ235 (BEZ235) inkubiert. Nach 24-stündiger Kultivierung mit RAD001 zeigte sich in der Western Blot Analyse bei allen untersuchten SCC Zelllinien ein Anstieg der Phosphorylierung von AKT bei den Aminosäuren Threonin 308 (Thr³⁰⁸) und Serin 473

(Ser⁴⁷³). Als Ausnahme konnte bei NCI-H2170 Zellen kein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von AKT bei der Aminosäure Serin 473 (Ser⁴⁷³) dargestellt werden (Abb.5 und Abb.6).

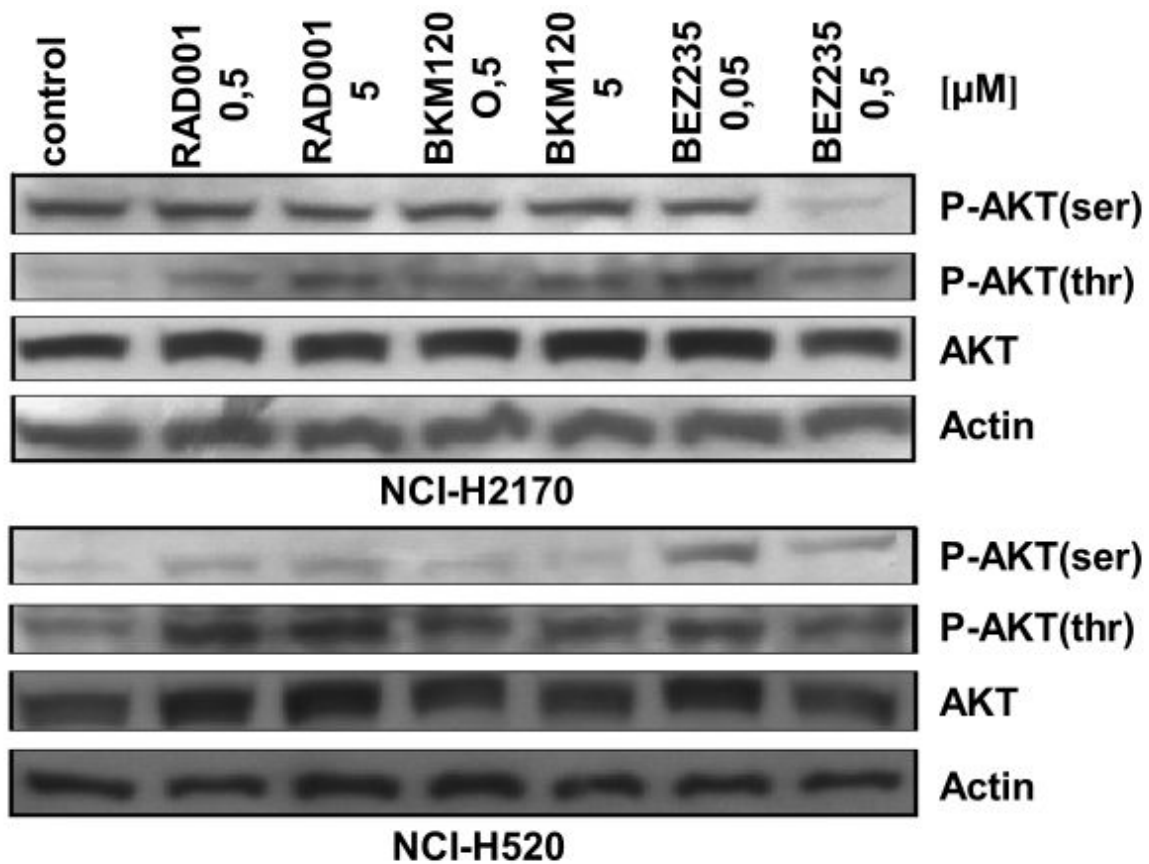


Abb.5: Die verschiedenen Zelllinien wurden für 24 Stunden in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine und deren Phosphorylierung mittels Western Blot gemessen.

Anstieg der Phosphorylierung von AKT beim RAD001 Einsatz ist in der Literatur beschrieben und erfolgt nach aktuellem Kenntnisstand durch den Wegfall des negativen feedback loops nach Hemmung der Aktivität von p70S6K. Es wird vermutet, dass die aus dem Wegfall des negativen feedback loops resultierende AKT Phosphorylierung mit ein

Grund dafür ist, dass RAD001 und andere Inhibitoren, die ausschließlich mTOR hemmen, keinen Zelltod induzieren.

Mit den Inhibitoren NVP-BEZ235- und NVP-BKM120 wurde interessanterweise eine ähnlich stark ausgeprägte Phosphorylierung von AKT (Thr³⁰⁸) und AKT (Ser⁴⁷³) wie mit RAD001 beobachtet, obwohl NVP-BKM120 und NVP-BEZ235 beide sämtliche Isoformen des PI3K Klasse I blockieren und NVP-BEZ235 zusätzlich noch mTOR hemmt. Lediglich bei Kultivierung der Zellen mit NVP-BEZ235 [0,5 µM] nahm die Phosphorylierung wieder ab (Abb.5 und Abb.6).

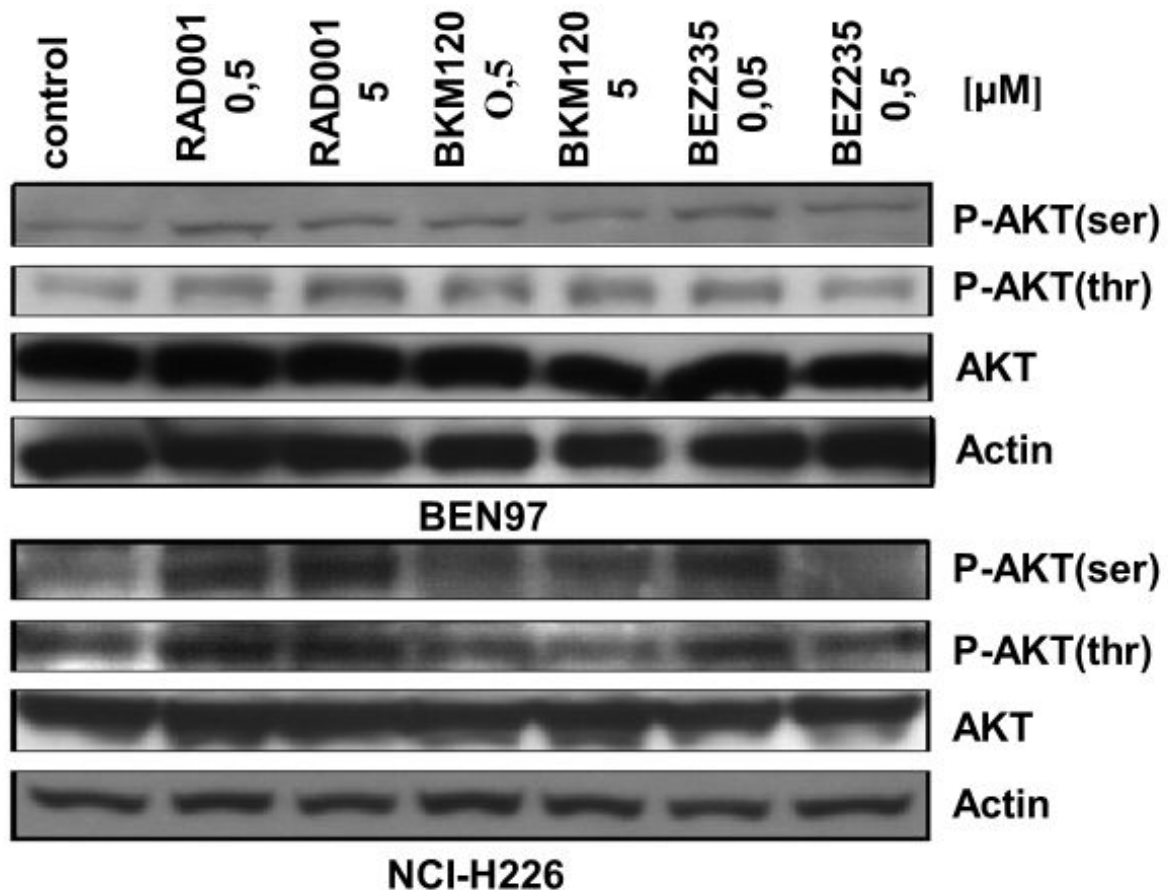


Abb.6: Die verschiedenen Zelllinien wurden für 24 Stunden in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine und deren Phosphorylierung mittels Western Blot gemessen.

Desweiteren wurden die Auswirkung einer Hemmung von mTORC1 durch RAD001 [0,5 und 5µM] und von PI3K durch NVP-BKM120 [0,5 und 5µM] auf Proteine unterhalb von mTORC1 nach Behandlung der SCC Zellen für 24 Stunden analysiert.

Durch Behandlung der SCC Zellen mit RAD001 [0,5 und 5µM] wurde bezüglich der Phosphorylierung von EIF4E ein ähnliches Bild wie bei AKT-Phosphorylierung nach Behandlung der Zellen mit RAD001 dargestellt. Phosphoryliertes eIF4E ist der ‚rate limiting factor‘ bei der Bildung des Translationskomplexes eIF4F, der eine wesentliche Rolle bei der Translation Cap-abhängiger RNA spielt. Proteine, die der Cap-abhängigen RNA-Translation bedürfen, wie c-Myc, MCL-1, Cyclin D1 oder BCL-xL, scheinen eine besondere Rolle bei der Proliferation und dem Zelltodschutz von Tumorzellen zu spielen. Die Expression und Phosphorylierungsstatus von 4EBP1 blieben hier durch RAD001 Einsatz unverändert (Abb.7 und Abb.8).

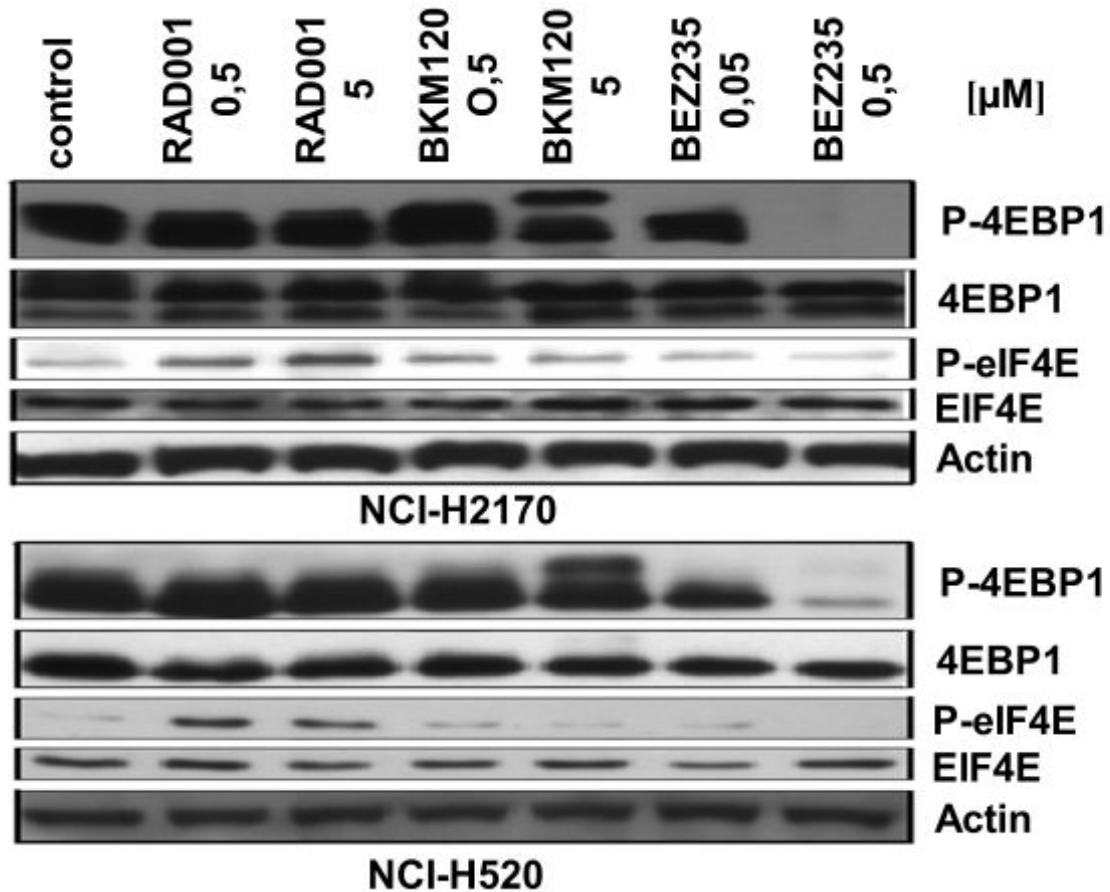


Abb.7: Die verschiedenen Zelllinien wurden für 24 Stunden in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine und deren Phosphorylierung mittels Western Blot gemessen.

Im Weiteren wurde eine Veränderung der Phosphorylierung von 4EBP1 und EIF4E oder der Expression des Gesamtproteins nach 24 stündiger Behandlung der Zellen mit NVP-BKM120 [0,5 und 5 μ M] nicht beobachtet. Eine Dephosphorylierung von 4EBP1 wurde hierbei in allen untersuchten Zelllinien lediglich durch Behandlung mit 0,5 μ M NVP-BEZ235 erreicht (Abb.7 und Abb.8).

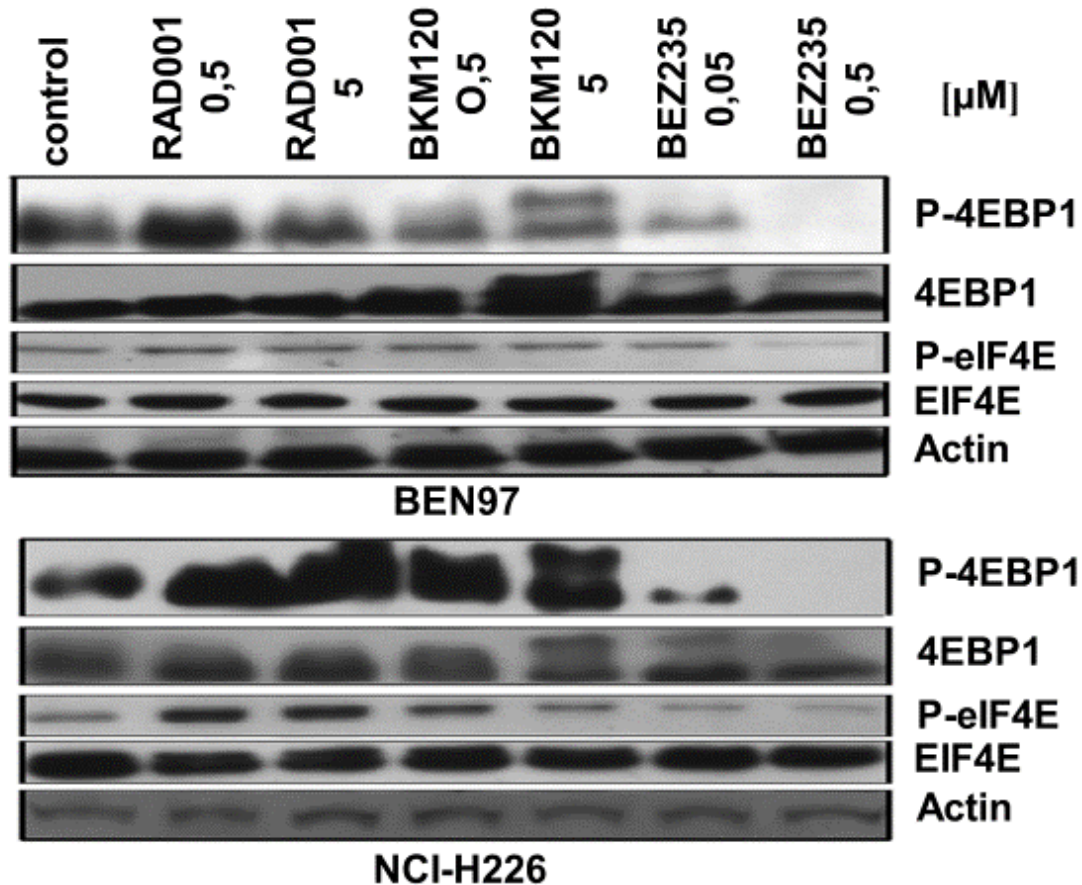


Abb.8: Die verschiedenen Zelllinien wurden für 24 Stunden in den angegebenen Konzentrationen inkubiert, anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine und deren Phosphorylierung mittels Western Blot gemessen.

3.3. Proliferationsmessung der verschiedenen SCC Zelllinien unter Kultivierung mit RAD001, NVP-BEZ235 oder NVP-BKM120

Anschließend wurde mit dem MTT-Test untersucht, ob eine Hemmung von Proteinen des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs mit den Inhibitoren RAD001, NVP-BKM120 oder NVP-BEZ235 zu einer Reduktion der Zellproliferation führt. Die Analyse verschiedener SCC Zelllinien ergab ein heterogenes Bild. Es zeigte sich bereits bei der sehr geringen Konzentration von 0,001 μM RAD001 bei BEN97 und NCI-H2170 Zellen eine deutliche

Proliferationsreduktion. Diese Proliferationshemmung nahm dosisabhängig weiter zu. Die beiden anderen untersuchten Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520 reagierten wesentlich schwächer auf RAD001. Bei diesen Zelllinien wurde die maximale Proliferationshemmung von ca. 20 % bereits bei Inkubation mit 0,001 μM RAD001 beobachtet und blieben von einer weiteren Dosissteigerung bis 10 μM kaum beeinflusst (Abb.9).

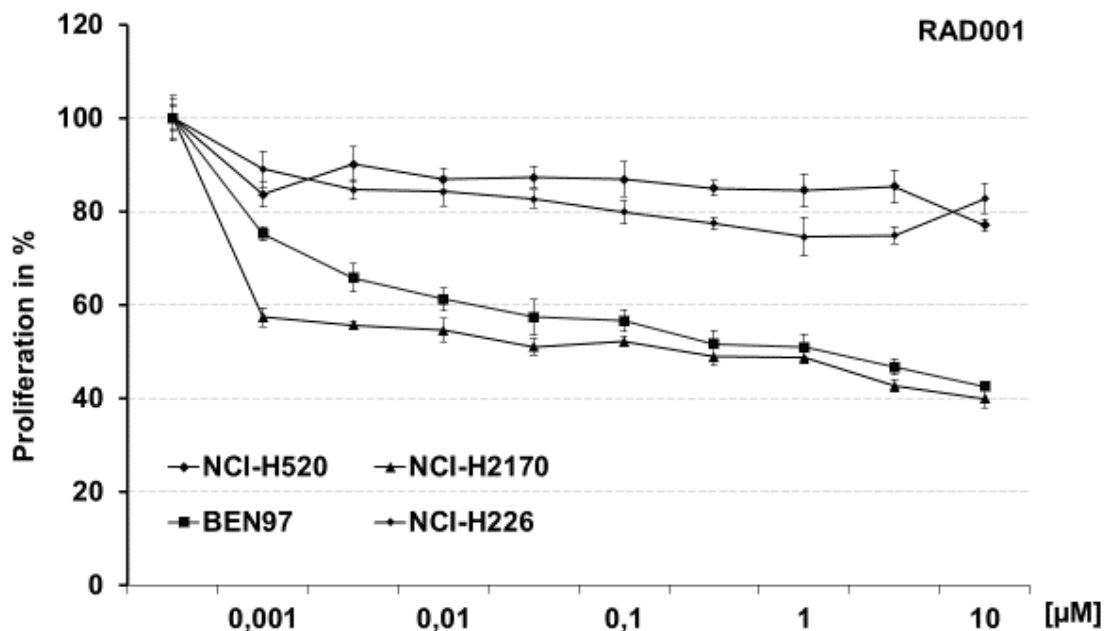


Abb.9: Darstellung der Wirkung des mTORC1-Inhibitors RAD001 auf verschiedene SCC Zelllinien. Die Proliferation der verschiedenen Zelllinien wurde nach 96-stündiger Kultur mit RAD001 mittels MTT-Test gemessen.

Es wurde weiter untersucht, ob die SCC-Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520 neben einer RAD001-Unempfindlichkeit auch eine Resistenz auf eine PI3K bzw. PI3K/mTOR-Hemmung aufweisen. Alle untersuchten SCC Zellen wurden daher auch mit dem Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 und PI3-K Inhibitor NVP-BKM120 kultiviert. Interessanterweise kam

es bei allen vier untersuchten Zelllinien zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferation nach Inkubation mit NVP-BEZ235. Erwähnenswert ist hierbei, dass die Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520 weniger empfindlich als die Zelllinien NCI-H2170 und BEN97 reagierten. Eine weitere Proliferationshemmung durch Dosissteigerung von NVP-BEZ235 ab 0,1 μM bei allen untersuchten SCC Zelllinien wurde nicht beobachtet (Abb.10).

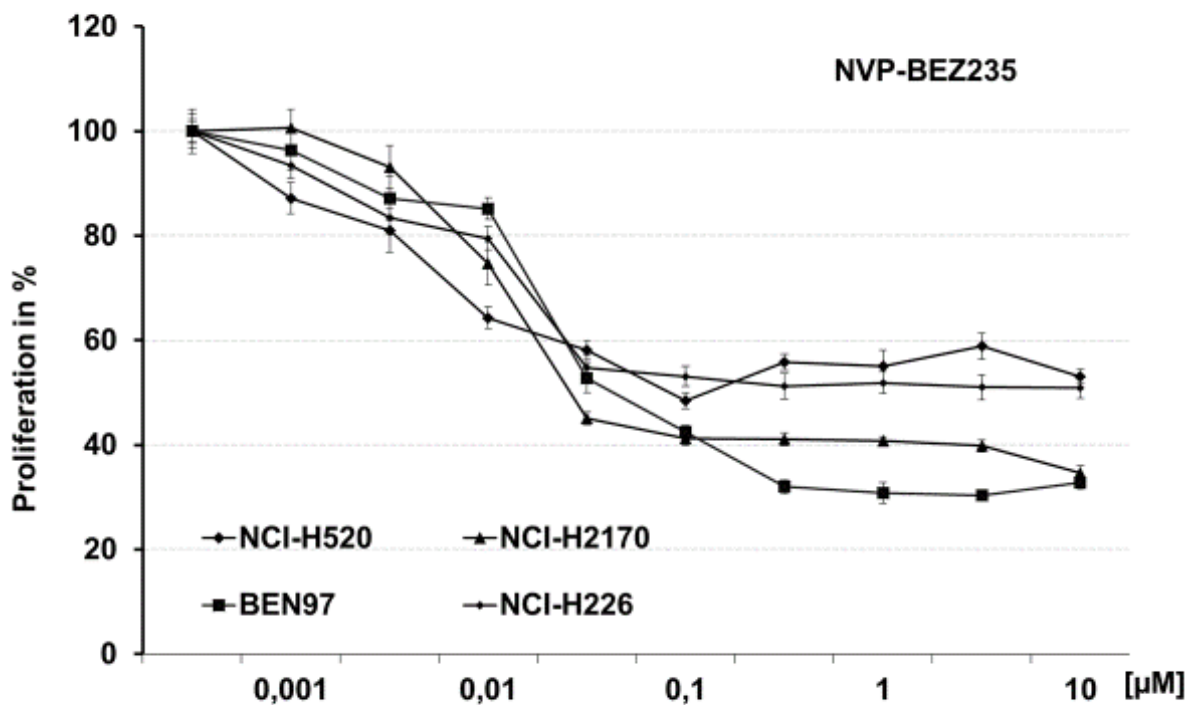


Abb.10: Darstellung der Wirkung des Multikinase-Inhibitors NVP-BEZ235 auf verschiedene SCC Zelllinien. Die Proliferation der verschiedenen Zelllinien wurde nach 96-stündiger Kultur mit NVP-BEZ235 mittels MTT-Test gemessen.

Um zu analysieren, ob die alleinige Blockade der PI3K ebenfalls zu einer Reduktion der Proliferation führt, wurde der PI3K Inhibitor NVP-BKM120 bei den zuvor genannten Zelllinien eingesetzt. Der Einsatz des PI3K Inhibitors NVP-BKM120 führte bei allen untersuchten SCC Zelllinien erst bei einer höheren Konzentration von 0,5 μM zu einem, dann aber sehr ausgeprägten Einfluss auf die Proliferation bei den Zelllinien NCI-H520 und BEN97. Der Einsatz des PI3-K Inhibitors NVP-BKM120 zeigte ab einer Dosis von 0,5 μM eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation bei NCI-H226 und NCI-H2170 (Abb.11).

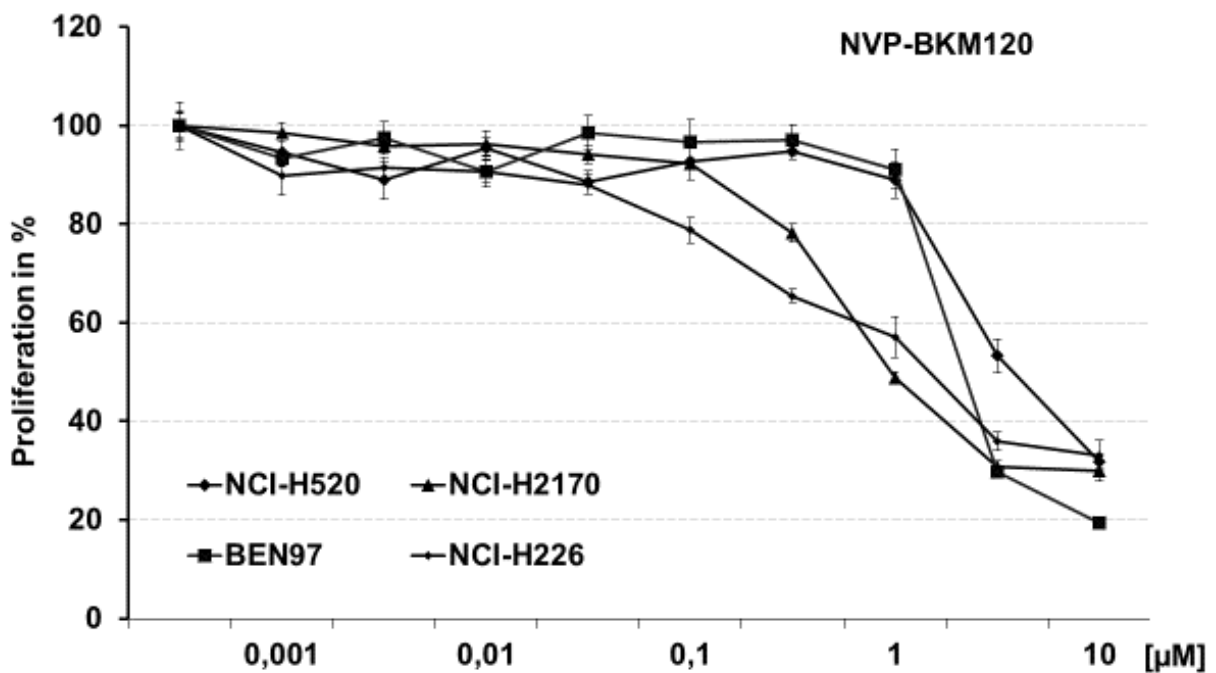


Abb.11: Darstellung der Wirkung des Multikinase-Inhibitors NVP-BKM120 auf verschiedene SCC Zelllinien. Die Proliferation der verschiedenen Zelllinien wurde nach 96-stündiger Kultur mit NVP-BKM120 mittels MTT-Test gemessen.

3.4. Analyse des Einflusses unterschiedlicher Inhibitoren auf Schlüsselproteine des Zellzyklus bei den verschiedenen SCC Zelllinien

Eine Reduktion des Signals im MTT-Test bedeutet, dass sich weniger Zellen teilen. Dies sagt jedoch weder etwas über die Ursache der verminderten Proliferation aus, noch kann man hieraus schließen, in welcher Phase des Zellzyklus die Zellen arretiert sind oder ob es zu Zelltod kommt.

In einem weiteren Schritt wurde durch Western Blot analysiert, welchen Einfluss die hier eingesetzten mTOR-Signalweginhibitoren bei den unterschiedlichen Zelllinien auf die Expression verschiedener Zellzyklus-regulierender Proteine haben. Keiner der eingesetzten Inhibitoren induziert eine Herunterregulation der konstitutiv exprimierten Zyklin-abhängigen Kinase 6 (CDK6).

Hingegen kam es nach Kultivierung mit NVP-BEZ235 und NVP-BKM120 bei den vier untersuchten SCC Zelllinien zu einer dosisabhängigen verminderten Expression der Zellzyklus-fördernden Proteine Cyclin D1 und Cyclin E. (Abb.12 und Abb.13).

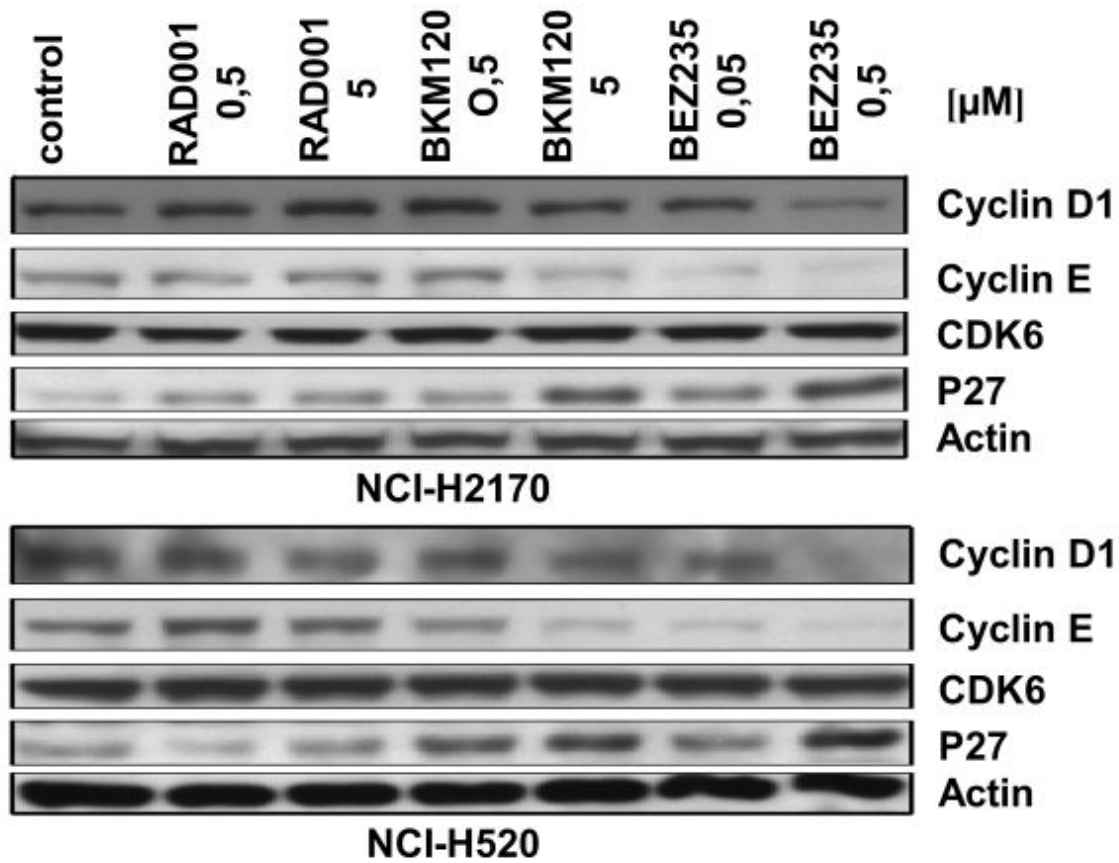


Abb.12: Die verschiedenen SCC-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot gemessen.

Im Weiteren wurde durch Einsatz von NVP-BKM120 und NVP-BEZ235 bei der untersuchten SCC Zellen eine dosisabhängige Steigerung der Expression des zellzyklus-hemmenden P27 beobachtet. Hingegen führte die Inkubation mit RAD001 lediglich zu einer mäßigen Heraufregulation von P27, während sich die Expression von Cyclin D1 und Cyclin E nicht änderte (Abb.12 und Abb.13).

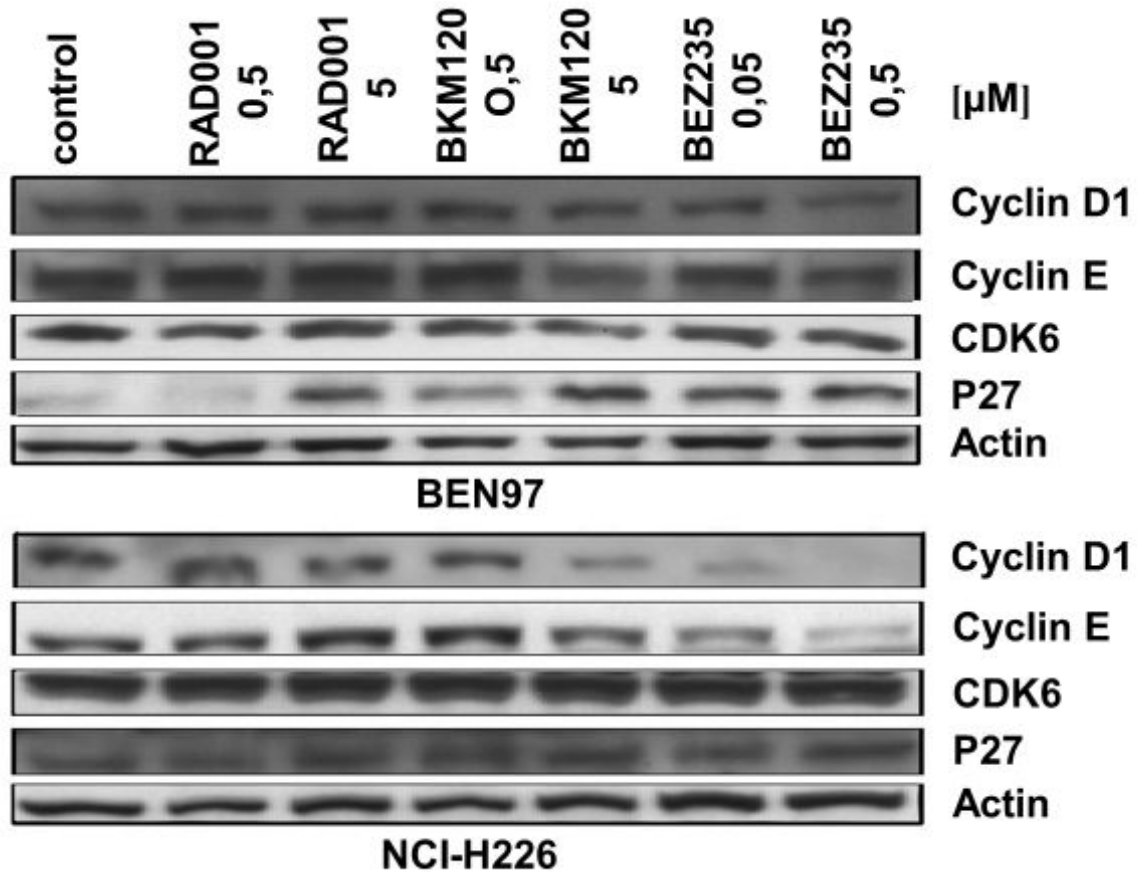


Abb.13: Die verschiedenen SCC-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine mittels Western Blot gemessen.

3.5. Messung des Zelltodes verschiedener SCC Zellen nach Kultivierung mit RAD001, NVP-BKM120 oder NVP-BEZ235

Eine weitere Funktion des PI3K/AKT/mTOR Signalweges ist auch die Regulation der Apoptose, bei der das Schlüsselprotein AKT eine zentrale Rolle einnimmt.

Im Weiteren konnte hier der Anteil toter Zellen nach 72-stündiger Kultivierung mit RAD001, NVP-BKM120 oder NVP-BEZ235 bei allen untersuchten SCC Zellen mittels FACS-Messung bestimmt werden.

Bei Einsatz von RAD001 in der Konzentration von 0,1 bzw. 1 μM kam es nach 72-stündiger Kultivierung lediglich bei den Zelllinien BEN97 und NCI-H2170 zu einer signifikanten Zelltodinduktion. Die beiden anderen Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520 waren hingegen nicht für RAD001-vermittelten Zelltod empfindlich (Abb.14).

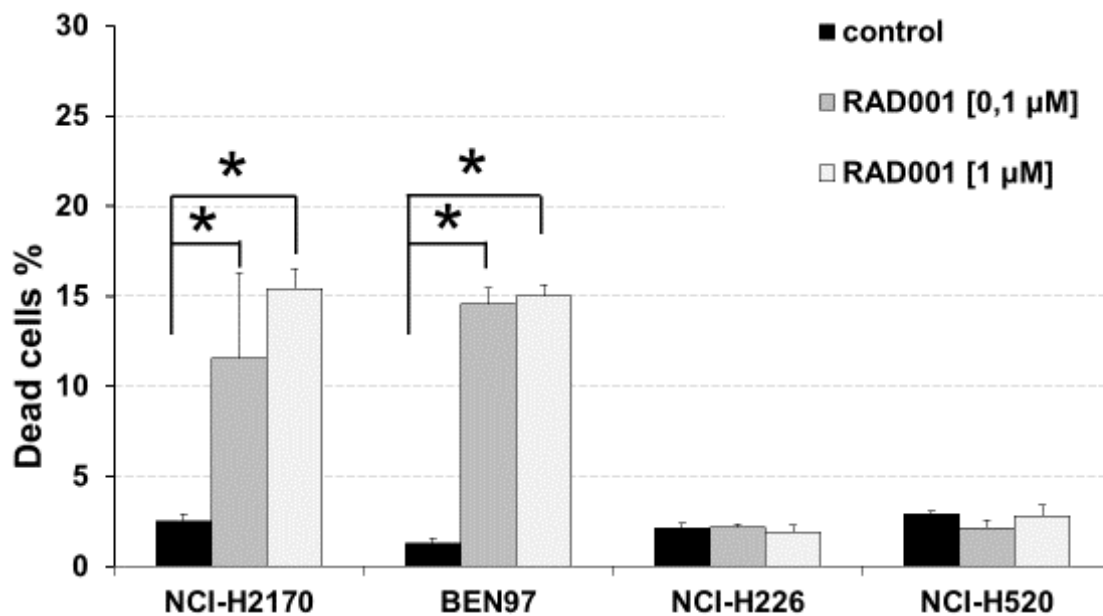


Abb.14: Zelltod wurde nach 72-stündiger Kultivierung mit RAD001 in den angegebenen Konzentrationen mittels durchflusszytometrischer Messung von Zellen mit hypodiploider DNA bestimmt. (* $p < 0,05$)

Im weiteren Versuch wurde die Auswirkung von Dual-Inhibitor NVP-BE235 bezüglich Zelltod auf die zuvor genannten SCC Zelllinien untersucht. Der Anteil toter Zellen wurden hier auch nach 72-stündiger Kultivierung mit NVP-BE235 [0,1 und 1 μM] bei allen untersuchten SCC Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Nach Inkubation der Zellen mit NVP-BEZ235 [1µM] wurde bei der Zelllinie NCI-H2170 ein signifikant vermehrter Zelltod um 24% und bei der Zelllinie BEN79 ein hochsignifikant vermehrter Zelltod um 16% gegenüber des Kontrollwertes beobachtet. In beiden anderen Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520 zeigten sich nach Zellbehandlung mit NVP-BEZ235 [0,1 und 1 µM] ein ähnliches Bild wie nach Zellbehandlung mit RAD001 keine signifikante Zelltodinduktion (Abb.15).

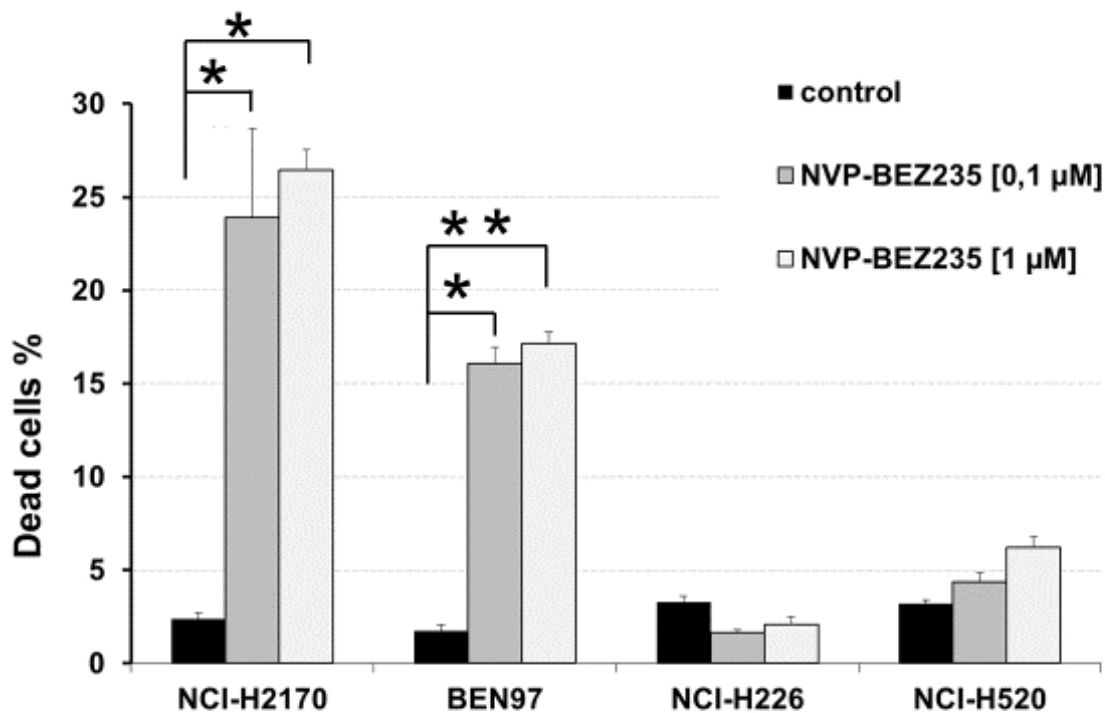


Abb.15: Zelltod wurde nach 72-stündiger Kultivierung mit NVP-BEZ235 in den angegebenen Konzentrationen mittels durchflusszytometrischer Messung von Zellen mit hypodiploider DNA bestimmt. (* $p < 0,05$ /** $p < 0,001$)

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkungen von NVP-BKM120 auf die Zelltodinduktion bei den SCC Zellen wurde hier der Zelltod nach 72-stündiger Kultivierung mit NVP-BKM120 [0,1 und 1 μ M] mittels durchflusszytometrischer Messung von Zellen mit hypodiploider DNA bestimmt.

Nach 72-stündiger Kultivierung der Zellen mit NVP-BKM120 [0,1 und 1 μ M] wurde ein signifikanter Zelltod bei NCI-H2170 Zellen auch mit niedriger Dosis von 0,1 μ M und bei NCI-H226 Zellen erst bei höherer Konzentration vom 1 μ M mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb.16).

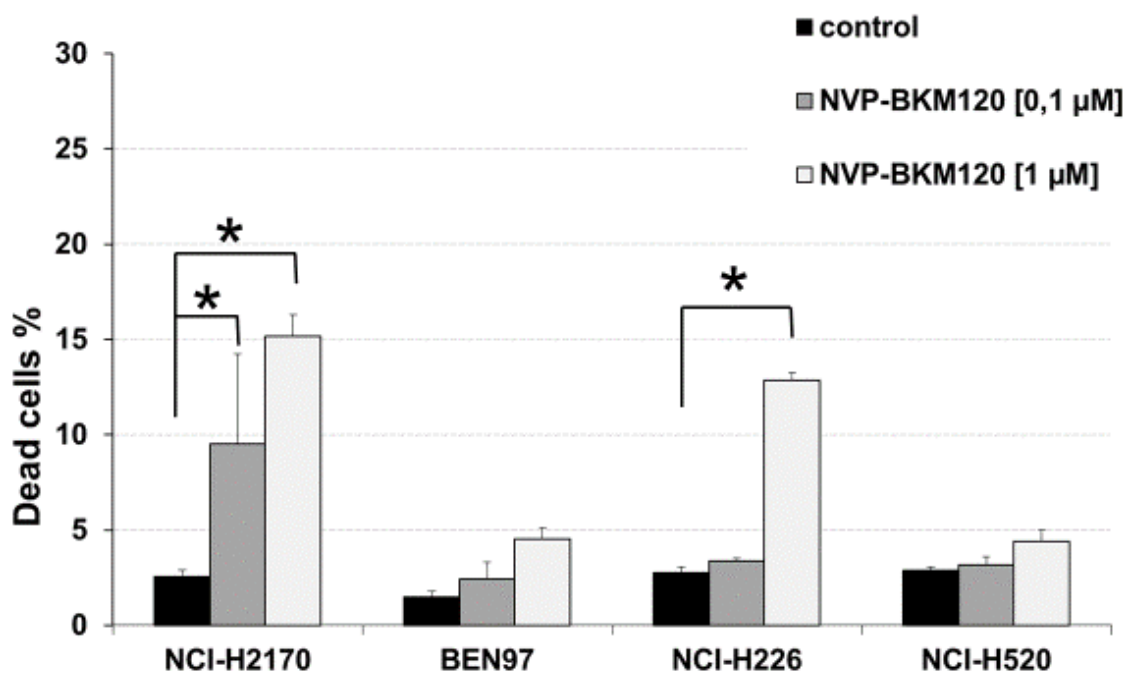


Abb.16: Zelltod wurde nach 72-stündiger Kultivierung mit NVP-BKM120 in den angegebenen Konzentrationen mittels durchflusszytometrischer Messung von Zellen mit hypodiploider DNA bestimmt. (* $p < 0,05$)

3.6. Analyse der Wirkung unterschiedlicher Inhibitoren auf die Zelltod-Induktion bei den verschiedenen SCC Zelllinien

Um den Mechanismus der Zelltod-Induktion durch Inhibition des mTOR-Signalwegs besser zu verstehen, wurden hierbei beteiligte Schlüsselproteine untersucht. Dazu wurden SCC Zellen mit den verschiedenen mTOR-Inhibitoren für 24 h inkubiert. In der Western Blot Analyse wurde eine ausgeprägte Spaltung der Caspase 9 und Caspase 3 bei den zelltodempfindlichen Zelllinien NCI-H2170 und BEN97 nach Inkubation mit NVP-BEZ235 (0,05 und 0,5 μM) oder RAD001 (0,5 und 5 μM) beobachtet. Interessanterweise galt dies auch für beide Zelllinien nach Inkubation mit NVP-BKM120 [0,5 und 5 μM], obwohl durchflusszytometrisch nur bei NCI-H2170 und nicht bei BEN97 NVP-BKM120-induzierter Zelltod nachgewiesen wurde. Desweiteren führte der Einsatz des mTOR-Inhibitors RAD001, PI3K-Inhibitors NVP-BKM120 und Dualinhibitors NVP-BEZ235 bei den NCI-H2170 und BEN97 Zellen zu einer deutlichen Heraufregulation des pro-apoptischen BH3-only Proteins PUMA. Dies galt insbesondere für die Inkubation mit NVP-BEZ235 (Abb.17).

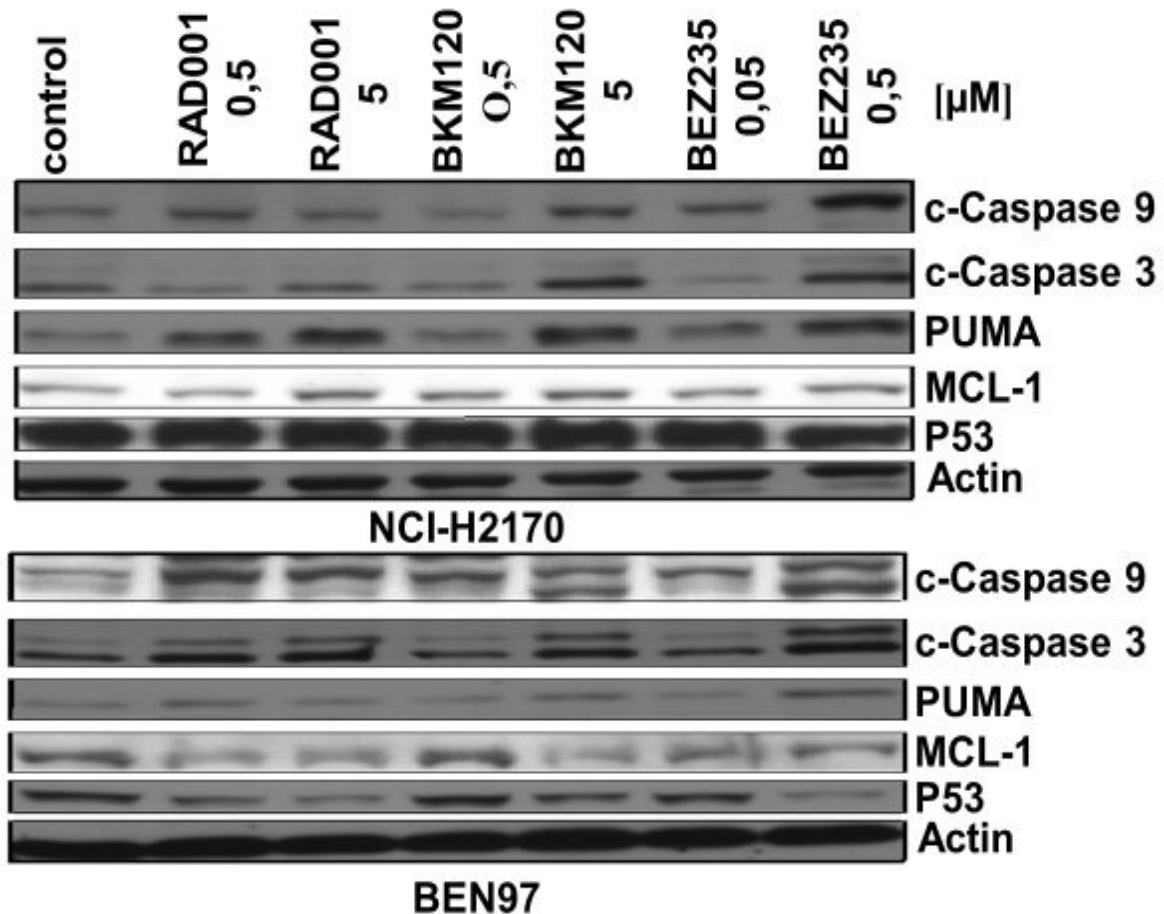


Abb.17: Die verschiedenen SCC-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine im Western Blot gemessen.

Im Gegensatz dazu ergab die Western Blot Analyse keine Veränderung des Proteins PUMA bei den Zelllinien NCI-H226 und NCI-H520, die entweder kaum oder gar nicht mit Zelltod auf die Inkubation mit RAD001 und NVP-BEZ235 reagierten. Bezüglich des anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitglieds MCL-1 und des pro-apoptotischen Faktors P53 zeigte sich wiederum ein heterogenes Bild. Der Einsatz von mTOR-Inhibitoren führte zur Herunterregulation des anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitgliedes MCL-1 in NCI-H520

und BEN97 Zellen. Bei NCI-H226 Zellen blieb MCL-1 hingegen unverändert (Abb.17 und Abb.18).

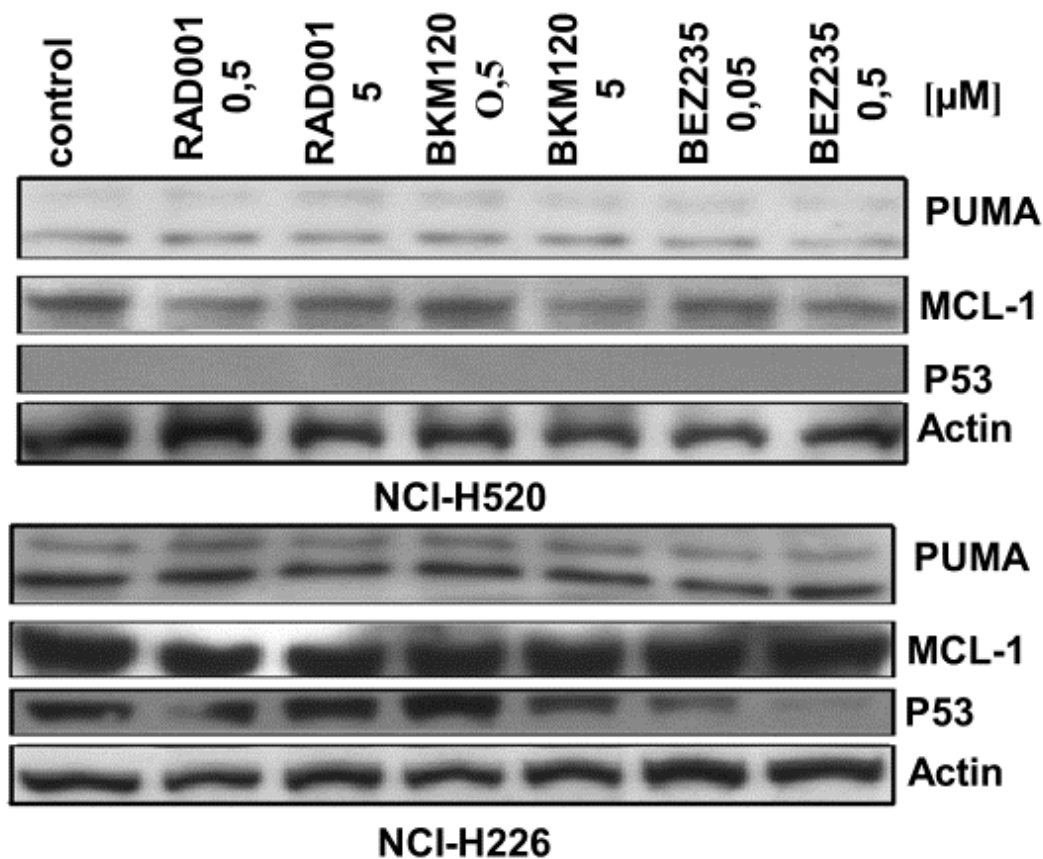


Abb.18: Die verschiedenen SCC-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine im Western Blot gemessen.

Anschließend wurde mittels Western Blot weiter untersucht, ob eine Hemmung des PI3-K/AKT/mTOR-Signalwegs mit dem Multikinaseinhibitor NVP-BE235 nach Inkubation zwischen 3 und 24 Stunden zu einer dynamischen Heraufregulation verschiedener proapoptotischer Faktoren führt. Diesbezüglich wurde bei den untersuchten zelltodempfindlichen SCC Zelllinien BEN97 und NCI-H2170 unter NVP-BE235 in einer

Konzentration von 0,5 μM eine ausgeprägte zeitabhängige Heraufregulation der pro-apoptotischen Proteine c-Caspase 3, PUMA und Bax beobachtet. Der anti-apoptotische Faktor BCL-xL blieb hingegen unverändert. Diese Veränderungen bei pro-apoptotischen Faktoren deuten auf eine erhöhte Apoptose-Aktivität hin (Abb.19).

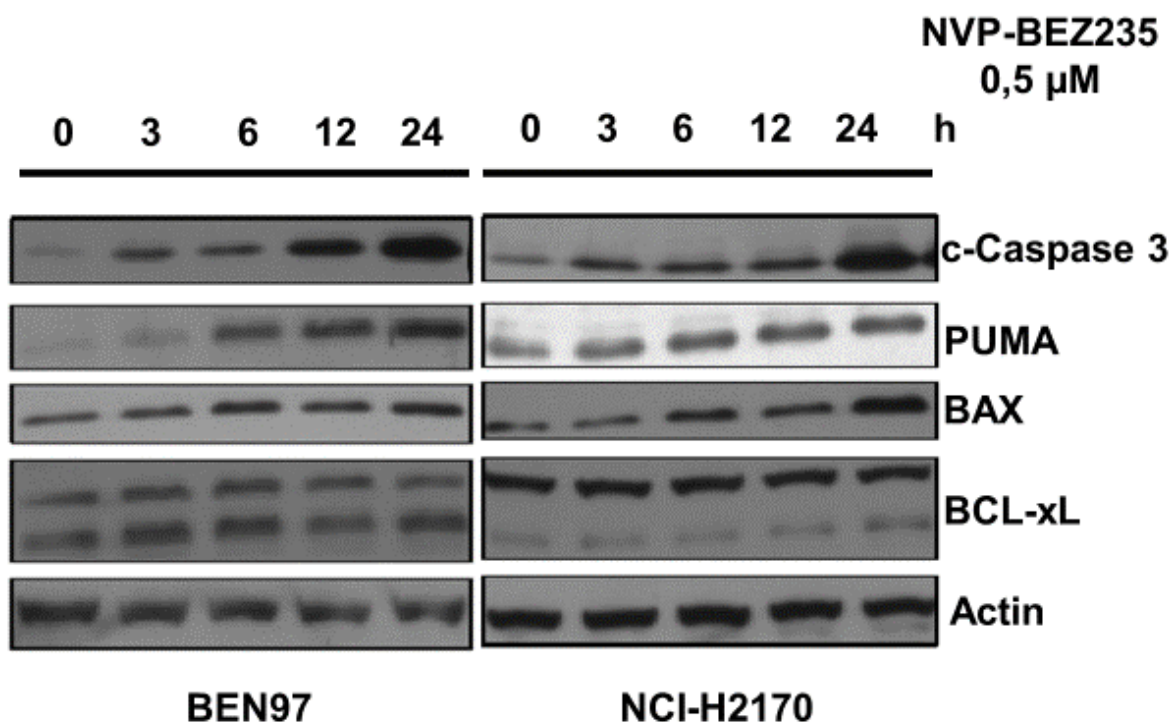


Abb.19: Die SCC Zellen NCI-H2170 und BEN97 wurden für unterschiedliche Zeiten mit NVP-BE235 (0,5 μM) inkubiert. Anschließend wurde die Expression verschiedener Proteine im Western Blot gemessen.

Um die Rolle des pro-apoptotischen BH3-only Proteins PUMA bei der Zelltodinduktion durch Inhibition des mTOR-Signalwegs genauer zu untersuchen, wurde PUMA in der zelltod-empfindlichen SCC Zelllinie NCI-H2170 mit siRNA herunterreguliert. In NCI-H2170 Zellen, die mit siRNA gegen PUMA transfiziert wurden, kam es nach 24 stündiger

Inkubation mit 0,5 μ M NVP-BEZ235 zur verringerten Expression vom Protein PUMA und verminderten Spaltung der c-Caspase 3 (Abb.20). Diese Veränderungen deuten auf eine verminderte Apoptose-Aktivität nach erfolgreicher Herunterregulation vom pro-apoptischen Protein PUMA hin.

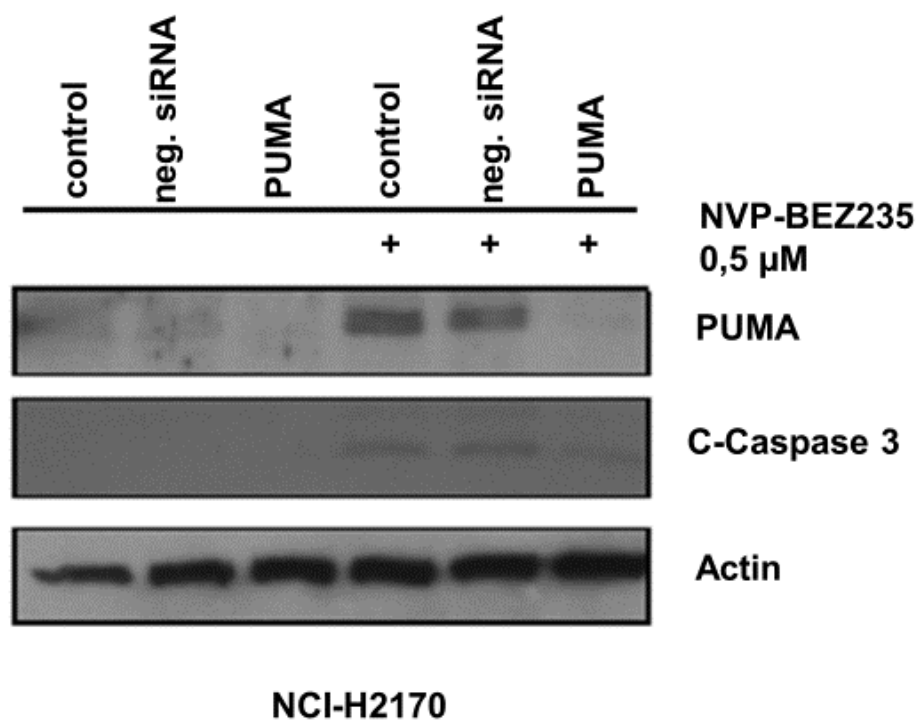


Abb.20: Die NCI-H2170 Zellen wurden für 24 Stunden mit und ohne NVP-BEZ235 nach erfolgreicher Penetration der Zellen mit PUMA-siRNA und neg.siRNA inkubiert. Anschließend wurde die Expression von PUMA, c-Caspase 3 und Actin mittels Western Blot gemessen.

Nach erfolgreicher Elektroporation der NCI-H2170 Zellen und Penetration vom PUMA-siRNA wurden die Zellen dann nach 72 stündiger Inkubation mit und ohne Einsatz von NVP-BEZ235 [1 μ M] weiter mittels FACS-Messung analysiert.

Nach Inkubation der NCI-H2170 Zellen mit NVP-BEZ235 [1 μ M] wurde hier ein signifikant vermehrter Zelltod um 16% und bei gleichzeitiger Penetration vom neg.siRNA ein signifikant vermehrter Zelltod um 15% gegenüber des Kontrollwertes beobachtet (Abb.21).

Nach Transfektion der NCI-H2170 Zellen mit PUMA-siRNA zeigte sich eine signifikante Reduktion des NVP-BEZ235-induzierten Zelltodes bei der Anzahl transfizierter Zellen von nur 38,5 %. Dabei sank der Wert um 7% gegenüber der Kontrolle (Abb.21).

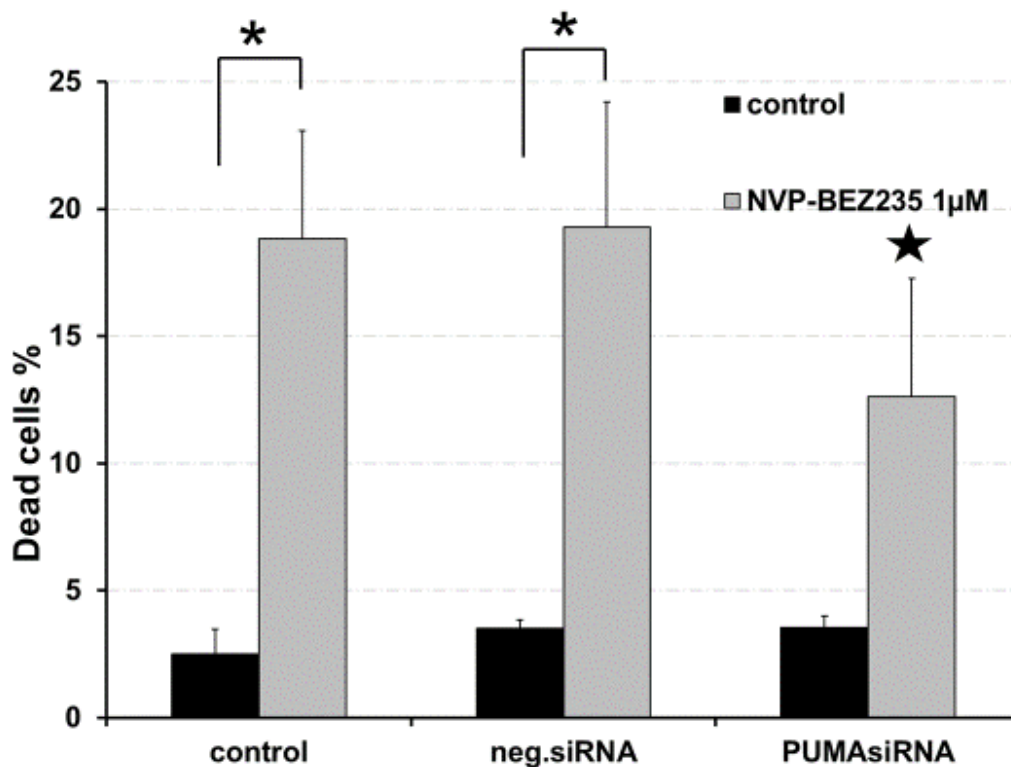


Abb.21: Zelltodmessung nach 72 h Kultivierung der NCL-H2170 Zellen mit dem Dualinhibitor NVP-BEZ235 und unter Einbringen von neg.siRNA und PUMA-siRNA. Die Anzahl transfizierter Zellen und die Zelltodmessung wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. (★Signifikante Reduktion des NVP-BEZ235-induzierten Zelltodes gegenüber der Kontrolle und neg.siRNA, $p < 0,05$) (* $p < 0,05$)

4. Diskussion

4.1. Aktivierung des PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalwegs in SCC Zelllinien

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde bei verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien mit plattenepithelialem Ursprung die konstitutive Expression von Schlüsselproteinen des PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalwegs und deren Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse untersucht. In allen untersuchten SCC Zelllinien wurde die konstitutive Aktivierung verschiedener Schlüsselproteine des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs beobachtet. So zeigte die Western Blot Analyse bei vier von den acht untersuchten SCC Zelllinien eine starke Phosphorylierung von AKT. Ebenso wurde auch von AKT nachgeschalteten Proteinen im PI3K/AKT/mTOR-Signalweg wie P70S6K, 4EBP1 und eIF4E eine konstitutive Aktivierung gezeigt. Allerdings wurde bei der Zelllinie SK-MES1 nur eine schwache Phosphorylierung von Proteinen des mTOR-Signalwegs beobachtet. Dieses heterogene Phosphorylierungsmuster bei SCC Zellenlinien kann sowohl durch unterschiedliche molekularpathologische Veränderungen in PI3K/AKT/mTOR-Signalweg als auch durch die unterschiedliche Interaktion des mTOR-Signalwegs mit den anderen Signalwegen bei den untersuchten SCC Zelllinien begründet sein. Ein ähnlich heterogenes Phosphorylierungsmuster von Proteinen des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs wurde bei Blasenkarzinomzelllinien beobachten. Die Untersuchung beschränkte sich jedoch auf die Phosphorylierungsstatus von AKT und ERK. In der Arbeit wird die Vermutung einer direkten Regulation der Aktivität von 4EBP1 von PI3K, eine Abhängigkeit der mTORC2 Aktivität von mTORC1 sowie eine Verstärkung der Phosphorylierung von mTORC1 durch ERK1/2 als Gründe für das heterogene Phosphorylierungsmuster angeführt [45].

Die physiologische Aktivierung des mTOR-Signalwegs erfolgt, wie in der Literatur beschrieben, durch Stimulation über Tyrosinkinase-Rezeptoren durch Wachstumsfaktoren wie Epidermal Growth Factor, Insulin Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor [46]. Der mTOR-Signalweg ist bei vielen Malignomen verschiedener Entitäten dysreguliert. Dysregulierungen des mTOR-Signalwegs können auf verschiedenen Ebenen innerhalb des Signalwegs durch unterschiedliche Mechanismen

entstehen. Diese Änderungen beinhalten häufig beim pulmonalen Plattenepithelkarzinom die Aktivierung von PI3K vorgeschalteten Proteinen wie Tyrosinkinase-Rezeptoren, PIK3CA Amplifikation, Mutationen in LKB1, KRAS, PI3K, AKT, TSC2 oder der Verlust des Tumorsuppressorgens PTEN. Experimentelle Studien zeigen aktivierende Mutationen von PI3KCA bis 5% der SCC Zellen [11]. Das Tumorsuppressorgen PTEN katalysiert im mTOR-Signalweg die Umwandlung von PIP3 zurück in PIP2. Der funktionelle Verlust von PTEN kann durch Mutation, Deletion oder transkriptionale Repression entstehen. Eine Überaktivierung des mTOR-Signalwegs ist oft mit einer Veränderung des PTENs assoziiert [47]. Bei den SCC Zellen wird der Verlust von PTEN bis 59% und PTEN Mutation bis 10 % beschrieben. PTEN-Verlust wurde bei Plattenepithelkarzinom signifikant häufiger als bei Adenokarzinom (59% versus 34%) beobachtet [48,12]. Derartige Veränderungen könnten die Ursache der hier beschriebenen konstitutiven Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs sein.

Der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg spielt neben dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg auch eine wesentliche Rolle bei der Embryogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die MAP-Kinasen leiten über mehrere Stufen die Signale der Rezeptoren durch Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine ins Innere der Zellen weiter. Es ist bekannt, dass die beiden Signalwege sich wechselseitig auf verschiedenen Ebenen beeinflussen bzw. gegenseitig Funktionen übernehmen können [46]. Das Protein RAS spielt eine zentrale Rolle im MAP-Kinasen Signalweg und kann durch PI3K direkt beeinflusst werden. Eine weitere Kreuzaktivierung erfolgt über Phosphorylierung von TSC im mTOR-Signalweg durch das Protein ERK, wodurch die indirekt hemmende Wirkung von TSC auf mTOR aufgehoben wird [49].

Die beobachtete konstitutive Phosphorylierung von Schlüsselproteinen des PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalwegs stellte die Grundlage für weitere Versuche in der hier vorgestellten Arbeit dar. Ziel war es die Bedeutung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs bei Lungenkarzinomen mit plattenhistologischem Ursprung genauer zu charakterisieren.

4.2. Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren auf Schlüsselproteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs

Unsere Western Blot Untersuchungen an Schlüsselproteinen des mTOR-Signalwegs zeigten beim Einsatz von vorher benannten PI3K/AKT/mTOR-Signalweg-Inhibitoren bei allen untersuchten SCC Zelllinien ein ähnliches Reaktionsverhalten.

Die Blockade von mTORC1 durch RAD001 führte zur verstärkten Phosphorylierung von eIF4E und bei AKT sowohl an Serin 473 als auch an Threonin 308 bei den untersuchten SCC Zelllinien, wodurch die Wege für das Zellüberleben und Resistenzentwicklung aktiviert wurden. Dieses Phänomen ist in der Literatur bei NSCLC beschrieben und erfolgte nach dem aktuellen Kenntnisstand durch das Aufheben der negativen Rückkopplung von p70S6K [50]. Nach der 24 stündigen Inkubation von SCC Zellen mit dem Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 mit einer Dosis von 0,5 μ M, der sowohl PI3K als auch mTOR (mTORC1/C2) hemmt, wurde die komplette Ausschaltung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs durch die Dephosphorylierung sämtlicher Schlüsselproteine dieses Signalwegs wie AKT, 4EBP1 und eIF4E beobachtet. Es findet hier bei der reaktiven Phosphorylierung von AKT durch mTOR-Blockade im Gegensatz zu eIF4E keine verstärkte Phosphorylierung von 4EBP1 statt. Da der Dual-Inhibitor NVP-BEZ235 auch zu Herunterregulation von 4EBP1 führt, kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NVP-BEZ235 im Gegensatz zur RAD001 zur Unterdrückung bzw. Ausschaltung von 4EBP1 und p-AKT führt und somit eine stärkere Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs bedingt. Dies könnte daran liegen das NVP-BEZ235 in dieser Konzentration sowohl die Bildung des mTOR-Komplexes I (mTORC1) als auch von mTORC2 hemmt. Es kann auch daran liegen, dass NVP-BEZ235 ab einer bestimmten Dosis unspezifisch wirkt und andere Tyrosinkinase hemmt.

4.3. Wirksamkeit von PI3K/AKT/mTOR-Signalweg Inhibitoren auf die Proliferation von Lungenkarzinom-Zelllinien

In der Abbildung (9) werden die unterschiedlichen Auswirkungen der Blockade von mTOR durch RAD001 auf die Proliferation der untersuchten SCC Zellen gezeigt. Die SCC Zelllinien waren unterschiedlich sensitiv auf mTOR-Inhibitor RAD001. Sowohl die

resistente (NCI-H226 und NCI-H520) als auch die sensitiven SCC Zellen (NCI-H2170 und BEN97) wurden durch gesteigerte RAD001 Dosis anhand der Proliferation kaum weiter unterdrückt. Die unterschiedliche Sensitivität von NSCLC Zelllinien auf RAD001 ist schon in experimentellen Studien dargestellt [50]. Es wurde auch beschrieben, dass Zell-Sensitivität zu RAD001 mit PTEN Mutation oder Aktivierung von AKT zusammenhängen kann [51,52]. Der Literatur entnehmen wir, dass die untersuchten SCC Zellen keine PTEN Mutation haben und da die SCC Zellen selten an PTEN oder AKT mutiert sind, bleibt die Rolle von PTEN Mutation und AKT-Aktivierung bei dem Effekt des mTOR-Inhibitors RAD001 auf NSCLC Zellen noch ungeklärt. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass NSCLC Zellen mit ausgeprägter konstitutiver Phosphorylierung von AKT (p-AKT) nicht sensitiver auf RAD001 reagierten als Zellen mit niedrigem p-AKT [50]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird erstmals bei SCC Zelllinien gezeigt, dass die duale Inhibition mit NVP-BEZ235 zu einer stärkeren Hemmung der Proliferation als die alleinige Blockierung von mTOR mit RAD001 führt (Abb.10). Das ist insofern interessant, dass Tyrosinkinaseinhibitoren bisher keinen Stellenwert bei der Behandlung von NSCLC mit SCC Histologie besitzen. Die beiden SCC Zellen, die auf RAD001 mit geringer Sensitivität in ihrer Proliferation reagierten, waren auch teilresistenter bei der Hemmung von PI3K und mTOR (mTORC1/C2) durch NVP-BEZ235.

Die SCC Zelllinien waren auch unterschiedlich sensitiv auf PI3K-Inhibitor NVP-BKM120. Die Proliferation von BEN97 und NCI-H226 wird dosisabhängig gehemmt. Ein abrupter Abfall wird nur für die beiden anderen Zelllinien (NCI-H2170 und NCI-H520) beobachtet. Ab einer höheren Konzentration von 1-2 μM zeigte sich bei allen untersuchten SCC Zellen eine unspezifische Wirksamkeit.

Die Empfindlichkeit der untersuchten Zelllinien korrelierte sowohl bei dem RAD001, NVP-BKM120 als auch bei dem NVP-BEZ235-Einsatz nicht mit dem Umfang der konstitutiven Phosphorylierung von AKT, eIF4E oder 4EBP1.

4.4. Inhibition des mTOR-Signalwegs reduziert die Expression von Zellzyklus-fördernden Proteine und steigert die Expression des zellzyklus-hemmenden Proteins P27 in Lungenkarzinom-Zelllinien

Die Analyse des Zellzyklus der behandelten SCC Zellen umfasste die Zellzyklus-fördernden Proteine Cyclin D1, Cyclin E und CDK6 sowie den zytostatischen CDK-Inhibitor P27. Im Gegensatz zum RAD001 Einsatz resultierte der NVP-BEZ235 Einsatz in der Herunterregulation von Cyclin D1 und Cyclin E. Das zytostatische Protein P27 wurde bei allen eingesetzten mTOR-Inhibitoren heraufreguliert. Das 4EBP1 ist ein Repressor der Translation Cap-abhängiger mRNA, der in inaktivierten Form an eIF4E gebunden wird und dies in seiner Funktion hemmt. eIF4E induziert hierbei u.a. die Translation von MCL-1, BCL-xL, c-Myc sowie Cyclin D1 [52]. Durch die Interaktion mit CDK4 und CDK6 bildet Cyclin D einen aktiven Enzymkomplex, der die Tumorsuppressor-Proteine Retinoblastoma phosphorylieren, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt wird. Der Transkriptionsfaktor E2F induziert die Expression von weiteren mitogenen Faktoren und phasenspezifischen Cyclinen (Cyclin E, Cyclin A, Cyclin B, CDK1 und DNA Polymerase α). CDKs-Inhibitor P27 beteiligt sich an der Regulation des Zellzyklus in G1-Phase, indem er sowohl CDK4/CDK6-Cyclin-D, als auch CDK2-Cyclin E-Komplexe bindet und inhibiert. Dadurch kann die Rb-Proteinfamilie nicht durch die Kinase Komplexe phosphoryliert werden. Bei fehlender Phosphorylierung von Retinoblastom-Proteinen können die E2F-Transkriptionsfaktoren nicht freigesetzt werden. Es kommt zum Arretieren der Zellen in G1-Phase. Die Blockade des mTOR-Signalwegs mit RAD001 oder NVP-BEZ235 führte zur Heraufregulation des Proteins P27 bei den meisten untersuchten SCC Zellen. Der Zellarrest der untersuchten SCC Zellen zeigte keine stärkere Wirksamkeit beim NVP-BEZ235 gegenüber RAD001. Somit ergab sich kein Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Reduktion der Proliferation und des Zellarrestes bei den analysierten SCC Zellen.

4.5. Inhibition des mTOR-Signalwegs induziert Zelltod in Lungenkarzinom-Zelllinien

Die Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs sowohl mit RAD001 als auch mit NVP-BEZ235 induzierte nur bei sensitiven SCC Zellen (NCI-H2170 und BEN97) Zelltod in wesentlichem Umfang. Die stärkere Wirksamkeit von NVP-BEZ235 gegenüber RAD001 bei der Zelltod-Messung wurde nur bei einer der beiden analysierten Zelllinien beobachtet. Die Wirksamkeit von NVP-BEZ235 bei der Induktion des Zelltodes oder des G1-Arrestes ist mittlerweile bei verschiedenen Tumorentitäten unter anderem bei SCC beschrieben worden. Es war der Umfang des Zelltodes bei der Rapamycin-resistenten Zellen durch NVP-BEZ235 Einsatz im Gegensatz zu unserer Arbeit wesentlich größer [54]. Inwieweit hier unbekannte Moleküle bei der Apoptose-Regulation eine Rolle spielen muss zukünftig weiter evaluiert werden.

Der Literatur entnehmen wir, dass unsere SCC Zelllinien NCI-H2170, NCI-H520 und BEN97 an P53 mutiert sind. Es bestand eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß der Proliferations-Hemmung und der Menge an Zelltodinduktion bei den untersuchten Zelllinien. Zur weiteren Untersuchung des Zelltod-Mechanismus bei der Blockade des mTOR-Signalwegs haben wir mittels Western Blot den BH3-only (auch als BH3-Domäne bezeichnet) Faktor PUMA bei allen untersuchten SCC Zellen analysiert. BH3-D Proteine wie PUMA, NOXA, BIM, BID und BAD sind proapoptotische Proteine der BCL-2 Familie. Die Aktivierung von BH3-D Proteinen führt zur neutralisierenden Interaktion mit den antiapoptotischen BCL-2 Familienmitgliedern MCL-1, BCL-2, BCL-xL und BCL-w. Die Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs wird zwischen den pro- und antiapoptotischen BCL-2 Proteinen und deren Interaktion reguliert. BH3-D Proteine können direkt mit den proapoptotischen porenbildenden BCL-2 Proteinen wie BAX und BAK interagieren, wodurch die intrinsische Apoptose eingeleitet werden kann. Die Western Blot Analyse nach Behandlung mit Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, zeigte bei den zelltodempfindlichen SCC Zelllinien eine Heraufregulation von PUMA und eine Zunahme der Caspasen-Spaltung. Hingegen veränderte sich das Expressionsniveau von PUMA bei

den resistenten Zellen durch RAD001- oder NVP-BEZ235-Einsatz kaum. PUMA wird in der Regel bei humanen Zellen in geringer Menge exprimiert und erst durch DNA-Schädigung oder erhöhte Induktion von P53 heraufreguliert [55]. Der hier beobachtete Anstieg der PUMA-Expression bei gleichzeitiger Zunahme der Apoptose wurde bereits in der Literatur beschrieben. Der Anstieg erfolgt nach dem aktuellen Kenntnisstand durch die Hemmung der Aktivität von AKT. AKT reguliert das Zellüberleben unter anderem über FOXO. Dieses wird von AKT phosphoryliert. Aktiviertes FOXO als Transkriptionsfaktor spielt eine Rolle bei der Transaktivierung von PUMA [56].

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung von PUMA bei der Zelltod-Induktion wurde bei den beiden zelltodempfindlichen SCC Zelllinien PUMA durch Einbringen von siRNA gegen PUMA teilweise inaktiviert. Anschließend wurden die Zelllinien nach Inkubation mit NVP-BEZ235 mittels Durchflusszytometrie und Western Blot weiter analysiert. Der Nachweis einer signifikanten Reduktion der durchflusszytometrischen Zelltodmengen und parallel hierzu die Abnahme der Caspase 3 Spaltung im Western Blot unterstreicht die Bedeutung von PUMA für die Zelltodinduktion durch Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs in unserem Modell. Unsere Ergebnisse werden unterstützt durch publizierte *in vitro* und *vivo* Daten, die die Bedeutung von PUMA bei der Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion von humanen Lungenkarzinomzellen in verschiedenen Modellen zeigen [56,57].

Zusammenfassend konnte somit in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Hemmung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs und insbesondere die duale Blockade dieses Signalwegs bei einem Teil der untersuchten SCC Zelllinien sowohl zu einer Reduktion der Proliferation als auch zur Induktion von Zelltod führt. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass das BH3-only Protein PUMA in unserem Modell eine wesentliche Rolle spielt und es sich bei dem induzierten Zelltod dabei wahrscheinlich um Apoptose handelt. Die Bedeutung einer Hemmung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs für die Therapie von Patienten mit SCC sollte daher im Rahmen präklinischer und -klinischer Untersuchungen weiter analysiert werden.

4.6. Klinische Bedeutung von PI3K/AKT/mTOR-Inhibitoren in der Therapie der Lungenkarzinome

Der PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg ist bei vielen soliden und hämatologischen Tumoren direkt oder indirekt in die Malignomgenese und das Wachstum der Erkrankung involviert. mTOR-Inhibitoren zeigen bei vielen Tumorentitäten gute Wirksamkeit.

Everolimus RAD001 als Monotherapie (10mg/Tag) zeigen bei Patienten mit fortgeschrittenen NSCLC, die in einer Phase-II-Studie (N = 85) inseriert waren, eine mäßige Antitumoraktivität, die bei 5% der Patienten zu einer partiellen Remission führte und die Progression der Erkrankung bei fast 50% linderte [58]. Es wurde auch gezeigt, dass Everolimus die Empfindlichkeit gegenüber EGFR-Hemmung in resistenten NSCLC-Zelllinien wiederherstellt [59]. Um die klinische Aktivität der dualen Hemmung von mTOR und EGFR zu untersuchen, wurde eine Phase-I / II-Studie mit Everolimus und Erlotinib für Chemotherapie-refraktäre, fortgeschrittene NSCLC eingeleitet. Die tägliche Therapie (Everolimus 5 mg / Tag oder 50 mg / Woche plus Erlotinib 150 mg / Tag) zeigte eine verbesserte Antitumoraktivität [60].

Der Multikinase-Inhibitor NVP-BEZ235 hemmt im Gegensatz zu Everolimus zusätzlich mTORC2 und PI3K und ist somit durch die komplette Ausschaltung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs stärker in seiner Wirkung und Toxizität. Um diesen toxischen Effekt in einen zytostatischen Effekt umzuwandeln, wird NVP-BEZ235 mit niedriger Dosis in Kombination mit anderen Inhibitoren getestet. Der Multikinase-Inhibitor NVP-BEZ235 wird in ca. 22 Phase I/II Studien untersucht (www.clinicaltrials.gov, 2018). Präklinische Studien zeigten, dass die Kombination von NVP-BEZ235 mit Everolimus einen synergistischen Hemmungseffekt des Zellwachstums bei NSCLC Zellen sowohl in vitro als auch in vivo hat. Dies wird als entwickelte Strategie zur Verbesserung der mTOR-Target-Therapie angesehen [40].

Es stellt sich die Frage, ob die Anwendung von mTOR-Inhibitoren zukünftig eine passende Strategie als Target-Therapie bei Lungenkarzinomen und insbesondere bei Plattenepithelkarzinomen wie bei Patienten mit anderen Tumorentitäten darstellt. Aufgrund

der beobachteten Regulationsmechanismen sowie der Wirksamkeit der verwendeten mTOR-Inhibitoren in der Durchflusszytometrie und im MTT-Test könnten Inhibitoren dieses Signalwegs für einen Teil der NSCLC mit SCC Histologie eine geeignete Target-Therapiealternative darstellen. Die Therapie des Lungenkarzinoms von Plattenepithel-Subtyp basiert aktuell auf standardisierter Mono- bzw. kombinierter Chemotherapie. Hohe Prävalenz von Patienten mit Plattenepithelkarzinom tragen auch deregulierten PI3K-Signalweg. Die selektive Hemmung des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs könnte die Chancen für die Target-Therapie auch bei diesem Subtyp von Lungenkarzinom erhöhen.

4.7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Lungenkarzinomzelllinien Plattenepithelialen-Ursprungs (SCC) mit den Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs Rad001, NVP-BEZ235 und NVP-BKM120 untersucht. Es wurden die Schlüsselproteine des mTOR-Signalwegs in ihrem konstitutiven Zustand und nach dem Einsatz der genannten Inhibitoren durch Western Blot Analyse beobachtet. Die Schlüsselproteine des mTOR-Signalwegs waren bei allen untersuchten SCC Zelllinien aktiv. Die Stärke der konstitutiven Expression bzw. Phosphorylierung der Proteine zeigte ein heterogenes Bild, das nicht mit den Ergebnissen der weiteren Untersuchungen korrelierte. Nach dem Einsatz von mTOR-Inhibitoren und der Darstellung der molekularen Regulationsmechanismen des mTOR-Signalwegs wurden anschließend die Proliferation und der Zelltod mit MTT-Test und Durchflusszytometrie gemessen. Die untersuchten SCC Zellen konnten anhand der Proliferations- und Zelltodmessungen in resistente und sensitive SCC Zellen unterteilt werden. Es bestand anhand der Sensitivität der SCC Zelllinien zu den benutzten mTOR-Inhibitoren Übereinstimmung zwischen den Zelltod- und Proliferations-Ergebnissen. Die sensitiven Zellen zeigten in Western Blot Analyse Heraufregulation des proapoptischen Faktors PUMA und verstärkte Caspasen-Spaltung. Um die hieran beteiligten Mechanismen weiter zu untersuchen, wurden zelltodempfindliche SCC Zellen (NCI-H2170 und BEN97) mit PUMA-siRNA transfiziert und nach anschließender Kultivierung mit NVP-BEZ235 analysiert. Als Resultat wurde ein verringerter Zelltod und eine verminderte Expression von PUMA sowie eine Menge an gespaltener Caspase 3 gemessen.

Die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der molekularen und funktionellen Bedeutung des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs deuten darauf hin, dass sich diese Signalwege als therapeutische Ziele in der Zukunft sehr gut könnten. Desweiteren konnten Proteine identifiziert werden, die eine zentrale Rolle für Zellproliferation und Zelltod in dem hier eingesetzten Modell spielen. Der Einsatz von NVP-BEZ235 in vitro zeigte in der vorliegenden Arbeit eine sehr gute Wirksamkeit und sollte in die Zukunft im Bezug auf die Behandlung plattenepithelialer NSCLC weiter präklinisch und im Rahmen klinischer Studien untersucht werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, Spix C, Katalinic et al. Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut [Hrsg.] und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. [Hrsg.]. 10. Ausgabe, Berlin 2015.
2. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol* 2017;7:193.
3. Hammerschmidt St, Wirtz Hu. Lungenkarzinom – aktuelle Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:809–20.
4. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J* 2009;34:17-41.
5. Reck M, Popat S, Reinmuth N, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;Suppl 3:iii27-39.
6. Burdett SS, Stewart LA, Ryzewska L. Chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;3:CD006157.
7. Ben-Sahra I, Manning BD. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 2017;45:72-82.
8. apadimitrakopoulou V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:1315-26.
9. Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung Cancer* 2006;51:181-91.
10. Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, et al. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2012;18:6771-83.

11. Stjernström A, Karlsson C, Fernandez OJ, Söderkvist P, Karlsson MG, Thunell LK. Alterations of INPP4B, PIK3CA and pAkt of the PI3K pathway are associated with squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Med* 2014;3:337-48.
12. Jin G, Kim MJ, Jeon HS, et al. PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 2010;69:279-83.
13. Reungwetwattana T, Dy GK. Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. *J Carcinog* 2013;12:22.
14. Yanagawa N, Leduc C, Kohler D, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog protein expression is an independent poor prognostic marker in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012;7:1513-21.
15. Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:589-98.
16. Vasudevan KM, Garraway LA. AKT signaling in physiology and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;347:105-33.
17. Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009;136:731-45.
18. Ren HY, Wang J, Yang F, et al. Cytoplasmic TRAF4 contributes to the activation of p70s6k signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget* 2015;6:4080-96.
19. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274-93.
20. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Mol Biol Int* 2014:686984.
21. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 2013;140:3079-93.
22. Uchida C. Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *Biomed Res Int* 2016:5959721.

23. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 1999;18: 5311-17.
24. Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 2007;59:419-26.
25. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 2008;14:159-69.
26. Balsara BR, Pei J, Mitsuuchi Y, et al. Frequent activation of AKT in non-small cell lung carcinomas and preneoplastic bronchial lesions. *Carcinogenesis* 2004;25: 2053-59.
27. Yip PY. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR) signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2015;4:165-76.
28. Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ* 2005;12:292-03.
29. Chen L, Willis SN, Wei A, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005;17:393-03.
30. Fuchs Y, Steller H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015;16:329-44.
31. Nashan B, Citterio F. Wound healing complications and the use of mammalian target of rapamycin inhibitors in kidney transplantation. *Transplantation* 2012;94:547-61.
32. Doi T, Muro K, Boku N. Multicenter Phase II Study of Everolimus in Patients With Previously Treated Metastatic Gastric Cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1904-10.
33. Jerusalem G, Fasolo A, Dieras V, et al. Phase I trial of oral mTOR inhibitor everolimus in combination with trastuzumab and vinorelbine in pre-treated patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:447-55

34. Yao JC, Phan AT, Chang DZ. Efficacy of RAD001 (Everolimus) and Octreotide LAR in Advanced Low- to Intermediate-Grade Neuroendocrine Tumors: Results of a Phase II Study. *J Clin Oncol* 2008;26:4311-18.
35. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol* 2014;90:197-207.
36. Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1851–63.
37. Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, Camacho CV, Pichamoorthy N, Burma S. The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM-and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia* 2012;14:34–38.
38. Del Alcazar CRG, Hardebeck MC, Mukherjee B, Tomimatsu N, Gao X, Yan J. Inhibition of DNA double-strand break repair by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 as a strategy for radiosensitization of glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2014;20:1235–48.
39. Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C. Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol* 2012;82:1230–40.
40. Baumann P, Mandl-Weber S, Oduncu F, Schmidmaier R. The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp Cell Res* 2009;315:485-97.
41. Jin HO, Lee YH, Park JA, et al. Blockage of Stat3 enhances the sensitivity of NSCLC cells to PI3K/mTOR inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;444: 502-08.

42. Burger MT, Pecchi S, Wagman A. Identification of NVP-BKM120 as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Class I PI3 Kinase Inhibitor for Treating Cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011;2:774–79.
43. Ren H, Zhao L, Li Y, et al. The PI3 kinase inhibitor NVP-BKM120 induces GSK3/FBXW7-dependent Mcl-1 degradation, contributing to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Lett* 2013;338:229-38.
44. Ren H, Chen M, Yue P, et al. The combination of RAD001 and NVP-BKM120 synergistically inhibits the growth of lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 2012;325:139-46.
45. Wu X, Obata T, Khan Q, Highshaw RA, De Vere White R, Sweeney C. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. *BJU Int* 2004;93:143-50.
46. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:307-18.
47. Zhang S, Yu D. PI(3)K Apart PTEN's Role in Cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4325-30.
48. Yanagawa N, Leduc C, Kohler D, et al. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog Protein Expression Is an Independent Poor Prognostic Marker in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2012;7:1513–21.
49. Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* 2011;2:261– 74.
50. Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, et al. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res* 2005;65:7052-8.
51. Shi Y, Gera J, Hu L. Enhanced Sensitivity of Multiple Myeloma Cells Containing PTEN Mutations to CCI-77. *Cancer Research* 2002;62:5027–34.
52. Gera JF, Mellinghoff IK, Shi Y, et al. AKT activity determines sensitivity to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors by regulating cyclin D1 and c-myc expression. *J Biol Chem* 2004;279:2737-46.

53. Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E-from translation to transformation. *Oncogene* 2004;23:3172-9.
54. Xu CX, Li Y, Yue P, et al. The Combination of RAD001 and NVP-BEZ235 Exerts Synergistic Anticancer Activity against Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2011;6:e20899.
55. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a Novel Proapoptotic Gene, Is Induced by p53. *Mol Cell* 2001;7:683-94.
56. Amente S, Zhang J, Lavadera ML, Lania L, Avvedimento EV, Majello B. Myc and PI3K/AKT signaling cooperatively repress FOXO3a dependent PUMA and GADD45a gene expression. *Nucleic Acids Res* 2011;39:9498-507.
57. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 2006;12:440-50.
58. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY. Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol* 2009;20:1674-81.
59. La Monica S, Galetti M, Alfieri RR, et al. Everolimus restores gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2009;78:460-8.
60. Papadimitrakopoulou VA, Soria JC, Jappe A. Everolimus and erlotinib as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7:1594-601.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Abdulhakim Ibrahim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Analyse des PI3K/AKT/mTOR Signalwegs bei Plattenepithelkarzinom (SCC)] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

15.01.2018

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Abkürzungsverzeichnis

AC	adenocarcinoma
Bad	Promoter der Apoptose, Bcl-2 hemmendes Protein
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchinon-Säure
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
°C	Grad Celsius
Caspase	Cysteine-dependent aspartate-directed protease
CDK	cyclin-dependent kinases
DMSO	Dimethylsulfoxid Lösungsmittel
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	epidermal Growth Factor Receptor
eIF	Eucaryotic translation Initiation Factor
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4F	eukaryotic initiation factor
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum (Foetales Kälberserum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
Foxo	Transkriptionsfaktor
GSK	Glycogen synthase kinase
IGF	Insulin Growth Factor
LC	lung cancer

LCC	large cell cancer
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-RNA)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1 mTOR-Komplex1	(beinhaltet mTOR, Raptor und GβL)
mTORC2 mTOR-Komplex2	(beinhaltet mTOR, Rictor, GβL und mSin1)
NSCLC	non-Small Cell Lung Cancer
NVP-BEZ235	PI3K/mTOR Inhibitor
NVP-BKM120	PI3K Inhibitor
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat PIP
PKB	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on Chromosome 10
RAD001	mTOR Inhibitor (Everolimus)
Ras	Rat sarcoma Proto Oncogen, monomeres G-Protein, Rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
ROS	Reactive oxygen species
SCC	squamous cell carcinoma
SCLC	small cell lung cancer
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TSC	Tuberous sclerosis complex
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Danksagung

Herrn PD. Dr. Christian Scholz möchte ich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv begleitet. Besonders bedanken will ich mich auch für die Freiheit, die sie mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, was maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Liu und Herr Dr. Zang. Sie nahmen mich freundschaftlich in ihr Team auf und arbeiteten mich mit großer Unterstützung in die Zellkulturarbeiten und anderen Forschungstätigkeiten ein.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben: Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Midia und meinen Onkel Alae-Alden, die während der Anfertigung der Doktorarbeit immer zu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

