Aus dem Institut für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Untersuchung der Regulation und der prognostischen Bedeutung des mTOR-Signalweges in Ovarialkarzinomen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

> von Juliane Lena Lindenberg aus Berlin

## Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Denkert

- 2. Prof. Dr. med. J. Sehouli
- 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. E. Dahl

Datum der Promotion: 19.09.2008

## Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		6
ABBIL	DUNGSVERZEICHNIS	9
TABEL	LENVERZEICHNIS	9
1. EI	NLEITUNG	10
1.1.	Das Ovarialkarzinom – Epidemiologie und Klassifizierung	
1.1.1.	Epidemiologie und Risikofaktoren	
1.1.2.	Histopathologische Klassifikation der Ovarialtumoren	
1.1.3.	Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms	
1.1.4.	Therapeutische Optionen	
1.2.	Der mTOR-Signalweg zur Proteintranslation	
1.2.1.	Das zentrale Protein mTOR reguliert die Kaskade des Signalweges	
1.2.2.	Der mTOR-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert	
1.2.3.	mTOR steuert die Proteintranslation	
1.2.4.	Initiationsfaktoren bilden einen Komplex zur Translationseinleitung	
1.2.5.	Bedeutung des mTOR-Signalweges beim Ovarialkarzinom	
1.3.	mTOR-Inhibitoren als neue molekulare Therapeutika	
1.3.1.	Die Entdeckung von Rapamycin	
1.3.2.	Wirkungsweise von Rapamycin und seinen Analoga	
2. ZI	ELSTELLUNG	21
3. M	ATERIAL UND METHODEN	22
3.1.	Material	
3.1.1.	Zellinien	
3.1.2.	Antikörper	
3.1.3.	Chemikalien	
3.1.4.	Kits	
3.1.5.	Lösungen, Kulturmedien	
3.1.6.	Verbrauchsmaterial	

Inhalt
minait

3.1.7	. Geräte	32
3.2.	Patientenkollektiv	34
3.3.	Methoden	36
3.3.1	. Zellkultur	36
3.3.2	. Behandlung der Zellen	36
3.3.3	Proteinisolierung	36
3.3.4	. Proteinkonzentrationsbestimmung	37
3.3.5	Western Blot	37
3.3.6	. Zellproliferations Assay (XTT)	39
3.3.7	. Durchflusszytometrie (FACS)	40
3.3.8	. Immunhistochemische Färbung	42
3.3.9	. Statistische Analyse	43
4. E	RGEBNISSE	.44
4.1.	Expression der Proteine des mTOR-Signalweges in benignen und malignen Zelllinien des Ovars	45
4.2.	Einfluss von Rapamycin auf die Zellproliferation	46
4.3.	Expression der Proteine des mTOR-Signalweges nach Rapamycin-Behandlung	48
4.4.	Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Rapamycin	52
4.5.	Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch Rapamycin	54
4.6.	Immunhistochemische Analyse von Phospho-mTOR und statistische Auswertung	56
5. D	ISKUSSION	.59
5.1. Rapamy	Proliferationshemmung der Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 durch den Einsatz von ycin	60
5.2.	Beeinflussung der Proteinexpression des mTOR-Signalweges durch Rapamycin	61
5.3.	Apoptose und Zellzyklusstillstand durch Rapamycin	63
5.3.1	. Rapamycin bewirkt keine Apoptose in den Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80	63
5.3.2 Zellz	. Rapamycin führt zur Proliferationshemmung durch Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des yklus	63
5.4.	Phospho-mTOR-Expression in Ovarialkarzinomgewebe korreliert mit dem Überleben der	
Patienti	nnen	65

## Inhalt\_

6.	AUSBLICK6	9
7.	ZUSAMMENFASSUNG7	1
8.	ABSTRACT7	3
LITE	ERATUR7	5
AN	IANG8	0
ANH Perso	IANG	<b>0</b> 30
ANI Perso Tabe	IANG	3 <b>0</b> 30 30
ANH Perso Tabe Erkli	IANG	3 <b>0</b> 30 30

## Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF4E-Binding Protein
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BAD	Promoter der Apoptosis, Bcl-2 hemmendes Protein
BRCA	Breast Cancer-gene.
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
°C	Grad Celsius
Cu	Kupfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid, Lösungsmittel
eEF	eucaryotic Elongation Factor
eIF	eucaryotic translation Initiation Factor
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer)
FCS	Fetal Calf Serum (Foetales Kälberserum)
FGF / bFGF	fibroblast growth factor / basic fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe)
FKBP12	FK506-bindende Protein
FOXO	Transkriptionsfaktor
FSC	Forward scatter
GβL	Gβ-like Protein, dass ursprünglich bei Hefen LST8 genannt wurde
GFR	Growth Factor Receptor, Wachstumsfaktoren-Rezeptor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GMP	Guanosinmonophosphat
GOG	Gynecologic Oncology Group
HNPCC-Syndrom	hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome
HPV	Humanes Papillomavirus
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei welcher 50% Inhibierung erzielt wird

## Abkürzungsverzeichnis\_

IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilo Dalton
MMP9	Matrix Metalloproteinase-9
mRNA	messenger Ribonucleic Acid (Boten-RNA)
mSin1	mitotisch-aktiviertes-Proteinkinase-assoziiertes Protein 1
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR-Komplex1 (beinhaltet mTOR, Raptor und G $\beta$ L)
mTORC2	mTOR-Komplex2 (beinhaltet mTOR, Rictor, GβL und mSin1)
Мус	Transkriptionsfaktor, essentiell für Tumorzellproliferation
nM	nano Molar
p70s6K	70-kDa ribosomales Protein S6 Kinase
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase isoform 1
PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
РКВ	Proteinkinase B
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on Chromosome 10
Raptor	Regulatory-associated Protein of mTOR
Rictor	Rapamycin-insensitive Companion of mTOR
S6K1	S6 Kinase 1
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SSC	Sideward scatter
Thr	Threonin
TEMED	N, N, N´,N´-Tetramethylethylendiamine
TMA	Tissue Micro Array
TNM	TNM-Klassifikation: T= Tumor, Ausdehnung des Primärtumors N= Nodus = Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen M= Metastasen, Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen
TSC	Tuberous sclerosis complex
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor

## Abkürzungsverzeichnis

vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot
WHO	World Health Organisation

## Abbildungsverzeichnis

Nr:	Beschreibung:	Seite:
Abb. 1:	Der mTOR-Signalweg zur Proteintranslation.	17
Abb. 2:	Chemische Struktur von Rapamycin.	19
Abb. 3:	Western Blot: Untersuchung von 11 Ovarialkarzinomzelllinien und einer Oberflächenepithelzelllinie des Ovars (HOSE).	45
Abb. 4:	Zellproliferationsassay: OVCAR-3 nach Rapamycin-Behandlung	46
Abb. 5:	Zellproliferationsassay: SK-OV-3 nach Rapamycin-Behandlung	47
Abb. 6:	Zellproliferationsassay: A 27/80 nach Rapamycin-Behandlung	48
Abb. 7:	Western Blot: OVCAR-3 nach Rapamycin-Behandlung	49
Abb. 8:	Western Blot: SK-OV-3 nach Rapamycin-Behandlung	50
Abb.9:	Western Blot: A 27/80 nach Rapamycin-Behandlung	51
Abb. 10:	FACS-Apoptosemessung: OVCAR-3, SK-OV-3, A 27/80 nach Rapamycin-Behandlung	53
Abb. 11:	FACS-Zellzyklus Messung: OVCAR-3, SK-OV-3, A 27/80 nach Rapamycin-Behandlung	55
Abb. 12:	Immunhistochemische Färbung durch P-mTOR-Antikörper	56
Abb. 13:	Einfluss von P-mTOR auf das Gesamtüberleben (Kaplan-Meier-Kurve)	57

## Tabellenverzeichnis

Nr:	Beschreibung:	Seite:
Tab. 1:	Charakterisierung des Ovarialkarzinom-Patientinnenkollektivs	35
Tab. 2:	Korrelation der Phospho-mTOR-Expression mit klinisch- pathologischen Merkmalen	58
Tab. 3:	Dysregulation der Cap-abhängigen Translationsinitiation bei Tumoren	67

### 1. Einleitung

## 1.1. Das Ovarialkarzinom – Epidemiologie und Klassifizierung

### 1.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Ovarialkarzinom steht mit 22.430 geschätzten Neuerkrankungsfällen für das Jahr 2007 in den Vereinigten Staaten (nach Brust-, Lungen-, Kolon-, Uteruskarzinom, NHL, Melanom und Schilddrüsenkarzinom) an achter Stelle der weiblichen Krebserkrankungen und macht damit 3% aller Krebserkrankungen aus. Das Ovarialkarzinom ist von allen gynäkologischen Tumoren derjenige mit der höchsten Mortalitätsrate. Mit 15.280 erwarteten Todesfällen für das Jahr 2007 steht es an fünfter Stelle und macht damit 6% der krebsbedingten Todesfälle bei der weiblichen US-Bevölkerung aus [Jemal et al, 2007]. In Deutschland lag die Prävalenz im Jahr 2004 für die bösartigen Neubildungen des Ovars bei 35.262 Fällen und es mussten 1896 Sterbefälle verzeichnet werden [GBE des Bundes, 2006]. Die Inzidenz weist eine leicht steigende Tendenz auf [AWMF].

Nur 25% der Tumoren werden im lokalisierten Stadium diagnostiziert, wodurch eine sehr schlechte 5-Jahres-Überlebensrate von insgesamt 50% zu verzeichnen ist [AWMF]. Ein effektives Screening-Verfahren zur Früherkennung gibt es bislang nicht und Frühsymptome der Erkrankung fehlen. Schätzungsweise werden 5-10% aller Frauen in ihrem Leben zum Ausschluss eines malignen Tumors bei Adnexveränderungen operiert. Bei lediglich 13-21% bestätigt sich der Verdacht. Jede 70. Frau wird in ihrem Leben an einem Eierstockkrebs erkranken, wobei die höchste Inzidenz bei 80 Jahren liegt und die Diagnose am häufigsten zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr gestellt wird [Kaufmann et al., 1996].

Des Weiteren ist bekannt, dass Faktoren, die mit einer **ununterbrochenen Ovulation** einhergehen, wie Nulliparität, keine Einnahme von Kontrazeptiva, frühe Menarche und späte Menopause, Risikofaktoren darstellen. Zur Erklärung dieses Zusammenhanges geht man davon aus, dass nach jeder Ovulation das Oberflächenepithel des Ovars proliferiert um den Defekt zu verschließen und durch die häufigen Zellteilungen die Entstehung von Mutationen begünstigt ist [Kaufmann et al., 1996].

10% aller epithelialen Ovarialkarzinome sind hereditär bedingt. Bei der **familiären Disposition** als Risiko werden 3 klinische Konstellationen beschrieben: 1. das "seitenspezifische" Ovarialkarzinom, 2. das Mamma- und Ovarialkarzinom-Syndrom und 3. das HNPCC-Syndrom (hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome; oder Lynch II). Die ersten beiden Gruppen

sind mit Mutationen in den BRCA-1 und BRCA-2 Tumor-Suppressorgenen assoziiert. 40% bis 50% der Frauen mit dem mutierten BRCA-1-Gen erkranken im Laufe des Lebens am Ovarialkarzinom. Mutationsträger des BRCA-2 Gens haben eine Lebenszeitrisiko von 20% bis 30% am Ovarialkarzinom zu erkranken. Die meisten Karzinome mit entsprechenden Mutationen im BRCA-Gen werden schon bei jungen Patientinnen in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Meist handelt es sich um seröse Karzinome. Beim HNPCC-Syndrom findet man vor allem Mutationen in den Genen hMLH1 und hMSH2, die für die DNA-Reparatur mitverantwortlich sind. Das kumulative Risiko für das Ovarialkarzinom in HNPCC-Familien liegt bei 12%. Auch hier tritt es bereits in jüngerem Alter auf, ist aber meist noch nicht so weit fortgeschritten und besser differenziert [Prat et al., 2005].

Als **schützende Faktoren** werden ausgetragene Schwangerschaften, Stillen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren angesehen [Kaufmann et al., 1996].

#### 1.1.2. Histopathologische Klassifikation der Ovarialtumoren

Histologisch werden die Ovarialtumoren entsprechend den internationalen Empfehlungen der WHO in epitheliale Tumoren, Keimstrang-Stroma-Tumoren, sowie Keimzelltumoren klassifiziert.

In den westlichen Ländern stehen die epithelialen Tumoren mit 90% aller Ovarialtumoren im Vordergrund, sie leiten sich von dem Müller-Oberflächenepithel ab. Bezüglich der Dignität teilt man sie ein in die Gruppe der benignen Tumoren, die Gruppe der malignen Tumoren (Ovarialkarzinome) und die Gruppe der Borderline-Tumoren, welche biologisch zwischen den gutartigen und den bösartigen Tumoren liegen. Die Ovarialkarzinome sind eine heterogene Gruppe, die sich histologisch in seröse, muzinöse, endometroide, klarzellige und transitionalzellige Tumoren klassifizieren lassen [Böcker et al., 2004].

Die genauen molekularen Mechanismen zur Entstehung der ovarialen Tumoren sind noch nicht vollständig bekannt, jedoch hat die Gruppe um Kurman in einer neueren Arbeit ein duales Model der Pathogenese vorgeschlagen. Hierin werden die epithelialen Tumoren in 2 Kategorien eingeteilt. Typ 1 (gut differenzierte Neoplasien), die schrittweise aus Borderline-Tumoren entstehen und mit molekularen Veränderungen wie beispielsweise PTEN-Mutationen assoziiert sind. Für den Typ 2 (gering differenzierte Neoplasien) wurden keine Vorstufen identifiziert. Sie entstehen nach dem Modell von Kurman und Mitarbeitern de novo [Shih et al., 2003].

#### 1.1.3. Prognosefaktoren des Ovarialkarzinoms

Zu den Prognosefaktoren zählen das Tumorstadium (in der Regel nach FIGO eingeteilt), der Differenzierungsgrad (Einteilung nach Silverberg), der postoperativ verbliebene Tumorrest, der Lymphknotenstatus und die Aszitesbildung. Außerdem sind das Alter, der klinische Allgemeinzustand und der histologische Typ von Bedeutung [AWMF]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im FIGO-Stadium I 60-90%, im Stadium II 40-70%, im Stadium III, welches das häufigste Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist, nur noch 4-15% und im Stadium IV 0-5% [Kaufmann et al., 1996].

#### 1.1.4. Therapeutische Optionen

Die Therapie des Ovarialkarzinoms basiert auf der operativen Resektion und der Chemotherapie. Ziel des operativen Vorgehens ist die komplette oder zumindest weitestgehende Tumorresektion, da der postoperativ verbleibende Tumorrest für die Patientin den entscheidenden Prognosefaktor darstellt. Die Primäroperation sollte als "Staging-Laparotomie" vorgenommen werden und umfasst zumindest Hysterektomie, Adnexektomie beidseits, Omentektomie, Appendektomie, pelvine und paraaortale Lymphonodektomie, Peritonealbiopsie und peritoneale Spülzytologie. Hieraus erfolgt die Stadieneinteilung (TNM, FIGO, Silverberg), von der die weitere postoperative systemische Therapie abhängig ist [AWMF; Kaufmann et al., 1996]. Postoperativ wird eine Chemotherapie, häufig mit einer Kombination aus Platin-basierten Substanzen und Taxol durchgeführt.

Bisher wird bei nur 15-20% der Patientinnen eine Langzeitremission nach Chemotherapie erreicht [Kelland, 2005]. Die primäre Ansprechrate ist hoch, jedoch entwickeln sich häufig Resistenzen gegenüber den chemotherapeutischen Substanzen. Dies verdeutlicht die bislang insgesamt unzureichenden therapeutischen Möglichkeiten. Zusätzlich müssen die Patientinnen die starken Nebenwirkungen der systemischen Chemotherapie ertragen. Des Weiteren stellt die Entwicklung von Resistenzen gegen die für das Ovarialkarzinom empfohlenen chemotherapeutischen Substanzen Carboplatin und Paclitaxel eine häufiges klinisches Problem dar [Richardson et al. 2005].

Ziel der Forschungsbemühungen ist es, die veränderten molekularen Mechanismen in den entarteten Zellen besser zu verstehen, um aus diesem Verständnis neue und molekular definierte individualisierte Therapien abzuleiten. Idealerweise sollten diese sowohl auf den jeweiligen Tumor (Stadium, Histologie) abgestimmt sein, als auch selektiv Tumorzellen angreifen, um Nebenwirkungen zu minimieren [Kelland, 2005]. Einen Ansatz hierfür bieten experimentelle Untersuchungen des AKT- und mTOR-Signalweges, der in verschiedenen Karzinomen als überaktiviert in Erscheinung tritt. Auch das Problem der Resistenzentwicklung wird möglicherweise durch den über Wachstumsfaktoren aktivierten AKT-mTOR-Signalweg reguliert. Entsprechend gibt es Hinweise darauf, dass durch die Blockierung der Signalkette die Überwindung der Resistenz begünstigt wird [Richardson et al. 2005]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist daher die Untersuchung der Proteine AKT, mTOR und 4E-BP1, sowie eIF-4E in Ovarialkarzinomen.

#### 1.2. Der mTOR-Signalweg zur Proteintranslation

#### 1.2.1. Das zentrale Protein mTOR reguliert die Kaskade des Signalweges

mTOR bedeutet "mammalian target of Rapamycin", synonym verwendet werden auch die Abkürzungen FRAP=FKBP12 und rapamycin-associated protein, RAPT1=Rapamycin target1, RAFT1=Rapamycin and FKBP12 target-1, SEP=Sirolimus effector protein. mTOR ist ein Faktor, der in der Signalkette der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) sowie der Proteinkinase B (AKT) nachgeschaltet ist (vgl. Abbildung 1). Das mTOR-Protein ist ein 289-kDa großes Enzym, dessen carboxyterminales Ende der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) homolog ist, so dass es zu der PIKK-Familie (Phosphoinositid-Kinase assoziierte Kinasen Familie) gezählt wird [Bjornsti et al., 2004]. mTOR fungiert als Serin/Threonin-Kinase [Tee et al., 2005]. Die Kinase AKT phosphoryliert und aktiviert das ihr im Signalweg nachgeschaltete Enzym mTOR an der Aminosäure Serin2448, welche als inhibitorisch regulierende Domäne postuliert wurde und deren Verlust damit zur gesteigerten Kinase-Aktivität führt. Die Aktivierung durch AKT geschieht entweder direkt oder wahrscheinlicher durch die Inhibierung eines Komplexes, der aus den Tumorsuppressor-Proteinen TSC1 und TSC2 (auch bekannt als Hamartin und Tuberin) gebildet wird.

#### 1.2.2. Der mTOR-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert

Die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine an Zellmembranrezeptoren führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), die die Umwandlung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat katalysiert (vgl. Abbildung 1). AKT ist ein häufig beschriebener Faktor, der für das

Zellüberleben mitverantwortlich ist und der durch die PI3-Kinase aktiviert wird. Seine antiapoptotische Wirkung beruht unter anderem darauf, dass die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien gehemmt wird. Außerdem phosphoryliert und inaktiviert es den proapoptotischen Faktor BAD und den Transkriptionsfaktor FOXO, welcher die Expression von Genen beeinflusst, die eine Rolle bei der Apoptose spielen, wie beispielsweise das Fas-Ligand Gen [Altomare et al., 2005]. AKT, von dem es 3 Isoformen gibt (AKT1=PKBα, AKT2=PKBβ, AKT3=PKBγ), gehört zu der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase C-Familie (AGC) und reguliert das Zellwachstum durch die Phosphorylierung und Aktivierung von mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Hierbei kommt es zur Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber Rapamycin. Auch der mTOR-Gegenspieler TSC2 (Tuberin) wird durch AKT in seiner Funktion beeinflusst.

Im Jahr 1992 wurde erstmals eine Veränderung im AKT-Gen und Überexpression von AKT2 in humanen Karzinomen (Ovarialkarzinomen) identifiziert [Cheng et al., 1992]. Es konnte festgestellt werden, dass die AKT2-Expression häufiger in undifferenzierten Ovarialkarzinomen vorkommt. Dies lässt vermuten, dass eine veränderte AKT2 Expression mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert ist. In der Arbeit von Zhou und Mitarbeitern wurde die aktivierte Form der AKT-Kinase im Brustgewebe untersucht. Sie beschreiben eine Zunahme der Phospho-AKT-Expression vom normalen Brustdrüsengewebe über die Hyperplasie, atypische Hyperplasie bis zum invasiven Karzinom [Zhou et al., 2004]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen der nachweisbaren AKT-Aktivität und verschiedenen klinischpathologischen Parametern gibt. So korreliert die verstärkte Aktivierung der AKT-Kinase in einigen Tumortypen mit einem fortgeschrittenem Stadium der Krankheit und schlechter Prognose [Altomare et al., 2005]. In immunhisto-chemischen Untersuchungen von humanen Ovarialkarzinomen konnte ebenfalls eine Assoziation mit der Überexpression von Phospho-AKT und Phospho-mTOR beschrieben werden [Altomare et al., 2004]. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde eine signifikant erhöhte AKT-Expression in Borderline-Tumoren des Ovars und invasiven Ovarialkarzinomen im Vergleich zum ovarialen Normalgewebe beschrieben. Die gesteigerte AKT-Expression im Gewebe korrelierte zudem mit einem fortgeschrittenem FIGO-Stadium und positivem Lymphknotenstatus [Noske et al., 2006].

#### 1.2.3. mTOR steuert die Proteintranslation

mTOR existiert in Zellen in zwei verschiedenen Komplexen: einem Rapamycin-sensitiven Komplex (TORC1) durch die Interaktion mit dem Protein Raptor (regulatory-associated protein of mTOR) und einem nicht-Rapamycin-sensitiven Komplex (TORC2) mit Rictor (rapamycininsensitive companion of mTOR) sowie einem weiteren Protein, dem mSin1 (mitogen-activatedprotein-kinase-associated protein 1). Beide Komplexe beinhalten außerdem das kleine Protein Gß-like (GBL), das ursprünglich LST8 bei Hefen genannt wurde. GBL ist erforderlich für die nährstoffabhängige Interaktion zwischen den Strukturproteinen Raptor bzw. Rictor und mTOR [Huang et al., 2003]. Der Rapamycin-sensitive mTOR-Raptor Komplex kontrolliert das zelluläre Wachstum durch Regulierung der Proteinsynthese in vivo und in vitro über zwei Wege. Ein Angriffspunkt ist der Translationsregulator S6K1, welcher durch mTOR in Koordination mit der PDK1-Proteinkinase phosphoryliert wird [Guertin et al., 2005]. Durch die Aktivierung der p70s6-Kinase (p70s6K), die wiederum das ribosomale Protein S6 phosphoryliert, wird die Translation verschiedener mRNAs gesteigert, die vorwiegend für Komponenten des Translationsapparates, wie ribosomale Proteine, Elongationsfaktoren (eEF1A, eEF2) und Poly-A-Bindungsproteine, codieren. Der in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchte zweite Weg beinhaltet die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Suppressorproteine 4E-BPs (eIF-4E bindenden Proteinen) durch den mTOR-Raptor Komplex.

#### 1.2.4. Initiationsfaktoren bilden einen Komplex zur Translationseinleitung

Die Proteinsynthese wird auf vielen Ebenen in der Einleitungsphase reguliert, das heißt während der Bindung des 5`Endes der mRNA an das Ribosom. Die eukaryontischen Ribosomen sind nicht in der Lage selbständig das 5`Ende zu identifizieren und die mRNA zu binden. Sie benötigen die Translationsinitiations-Faktoren zur Führung, was durch ein Zusammenwirken der **eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIF)** ermöglicht wird. Das Ziel ist also die Bildung des Initiationsfaktor), eIF4G (Strukturprotein) und eIF4A (Helikase). Hier wird nun die Bedeutung von mTOR deutlich, denn eIF4E muss, bevor es die Bindung mit den anderen Initiationsfaktoren eingehen kann, aus der Bindung mit 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1) befreit werden [Hay et al., 2004]. Die Kinase mTOR phosphoryliert in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Insulin und Aminosäuren das 4E-BP1 an sechs Stellen in hierarchischer Reihenfolge. Das hyperphosphorylierte 4E-BP1 gibt nun den Cap-bindenden Initiationsfaktor

Threonin37 und Threonin46 der einleitende Vorgang und Serin65 wird zuletzt phosphoryliert. Zur Lösung von eIF4E vom 4E-BP1 wird zumindest die Phosphorylierung an Threonin37, Threonin46, Serin65 und Threonin70 benötigt [Gingras et al., 2001]. Das ungebundene eIF4E muss zur Bildung des Komplexes zuerst mit der "Kopf"-Struktur der mRNA (m<sup>7</sup>GpppN cap, hierbei ist das 7-methyliertes Guanosin über Triphosphat an ein beliebiges Nukleotid gebunden) interagieren. Dann bindet das große Gerüstprotein eIF4G, welches die RNA-Helikase (eIF4A) an den Komplex (eIF4F) heftet. Die genannte Helikase wird zum 5 Ende der mRNA dirigiert, um die durch das RNA-Ablesen entstandene Sekundärstruktur zu entwinden. Durch mTOR-Inhibitoren, wie dem Rapamycin, bleibt 4E-BP1 hypophosphoryliert und damit auch mit eIF4E eng verbunden. Dies verhindert die Bildung des Translationsinitiationskomplexes (eIF4F) und dadurch auch die Einleitung der Cap-abhängigen Translation [Bjornsti et al., 2004].

Die Aktivierung von S6K1 und eIF-4E durch mTOR wird mittels Insulin, anderen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen (vor allem Aminosäuren) beeinflusst. Der mTOR-Signalweg kontrolliert die Translation von mRNAs, die Proteine kodieren, welche für die G1-Zellzyklusprogression und S-Phasen Einleitung von Nöten sind. In verschiedenen Studien wurde belegt, dass eIF-4E spezifisch die Produktion von Proteinen wie Cyclin D1, Ornithindecarboxylase, c-Myc, Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) und Gefäßendothel-wachstumsfaktor (VEGF) steigert, die eine Schlüsselrolle zur Förderung des Zellwachstums haben. Auch wurde über einen Apoptose unterdrückenden Effekt bei eIF-4E-Überexpression und Entzug von Wachstumsfaktoren aus dem Serum berichtet [Rosenwald 2004]. Daraus ergibt sich, dass es durch die Hemmung der mTOR-Aktivität zur verlängerten G1-Phase oder Stillstand in dieser Phase kommt. mTOR erscheint also als Schlüsselenzym, das die G1-Progression nur unter der Bedingung ausreichender Nährstoffversorgung zulässt [Altomare et al., 2005].



#### Abb. 1: Der mTOR-Signalweg zur Proteintranslation

Durch den Einfluss von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (GFRs) kommt es zur Aktivierung des mTOR-Signalweges. Auch Onkoproteine und inaktivierte Tumorsuppressoren, regulieren den Signalweg. Die rot markierten Proteine kennzeichnen Onkoproteine, welche bei vielen menschlichen Tumoren überexprimiert sind und durch Mutationen hervorgehen. Blau markierte Proteine stellen Tumorsuppressoren dar, deren Verlust oder Inaktivierung bei Tumorbildung festgestellt wurde (modifiziert nach: <u>Altomare et al., 2005</u>).

#### 1.2.5. Bedeutung des mTOR-Signalweges beim Ovarialkarzinom

In verschiedenen Studien [Bjornsti et al., 2004; Altomare et al., 2005; Tee et al., 2005], wurde eine Aktivierung des AKT-mTOR-4E-BP1-Signalweges in verschiedenen Karzinomen beschrieben. Das unter Punkt 1.3. beschriebene Medikament Rapamycin vermag es an einer genau bekannten Stelle in dem Signalweg das Enzym mTOR zu binden und damit zu blockieren. Es kommt zur Proliferationshemmung und einem Zellzyklusstillstand in der G1-Phase.

Im Ovarialkarzinom ist der genaue Mechanismus noch unzureichend untersucht worden. Erkenntnisse über die Expression der Proteine, die dem mTOR im Signalweg nachgeschaltet sind, vor und nach Therapie mit Rapamycin, könnten Aufschlüsse über die genaue Wirkweise von Rapamycin geben. Hieraus können wiederum Schlüsse gezogen werden, welche Patientengruppe von der Therapie mit Rapamycin profitieren wird. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen ein Beitrag sein zum Verständnis des Signalweges und zur Überprüfung der Potenz einzelner Proteine als Prognosemarker zu fungieren. Ziel ist es individuelle Therapien für Patientinnen zur Verfügung zu haben, die zuverlässig die Heilung begünstigen und das Nebenwirkungsspektrum minimieren.

#### 1.3. mTOR-Inhibitoren als neue molekulare Therapeutika

#### 1.3.1. Die Entdeckung von Rapamycin

Wie aus dem Namen TOR (Target of Rapamycin) deutlich wird, rührt ein großer Teil unseres Wissens über dieses Protein von dem Gebrauch des Makrolids Rapamycin, welches ein Produkt des Bakteriums Streptomyces hygroscopicus ist. Dieses Molekül wurde vor circa 30 Jahren auf der Osterinsel Rapa Nui entdeckt, woher auch der Name abgeleitet ist. Rapamycin (auch bekannt als Sirolimus oder Rapamune) ist ein sehr spezifischer Inhibitor von mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Initial wurde Rapamycin nach seiner Isolierung durch Ayerst Research Laboratories (Montreal) im Jahr 1972 als Antimykotikum gegen Candida albicans, Cryptococcus neoformans und Aspergillus fumigatus eingesetzt. Mittlerweile gilt es als eine nicht zytotoxische Substanz, die das Tumorwachstum verschiedener Neoplasien in vivo und in vitro vermindert. Hauptsächlich wurde es bisher zur Suppression des Immunsystems zur Verhinderung der Transplantatabstoßung gebraucht, indem es die T-Zell-Proliferation hemmt [Sehgal, 2003; Bjornsti et al., 2004; Vignot et al., 2005].



Abb. 2: Chemische Struktur von Rapamycin [modifiziert nach Vignot et al., 2005]

#### 1.3.2. Wirkungsweise von Rapamycin und seinen Analoga

Da Rapamycin durch schlechte Wasserlöslichkeit gekennzeichnet ist, wurden Analoga für den klinischen Einsatz entwickelt [Mayerhofer et al., 2005]. CCI-779 (cell cycle inhibitor-779; Temsirolimus) der Firma Wyeth Ayest ist intravenös verabreichbar, die Effektivität dieser Substanz wurde in präklinischen Modellen (in vitro und in Tierversuchen) bei verschiedenen Tumoren, wie dem Rhabdomyosarkom, dem Medulloblastom, dem Pankreasund Nierenzellkarzinom und dem Mammakarzinom demonstriert. Mittlerweile befindet es sich bereits in Phase III klinischer Studien bei Patienten mit Nierenzellkarzinom, Lungenkrebs oder Adenokarzinom der Mamma [Law, 2004; Smolewski, 2006]. In Phase I-II klinischer Studien befindet sich das von Novartis Pharma hergestellte RAD001 (Everolimus) zur oralen Einnahme, dessen wachstumsinhibierende Wirkung in Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt wurde. Von der Firma Ariad Pharmaceuticals wird AP23573 zur intravenösen Gabe hergestellt, welches sich in Phase I klinischer Studien befindet. All diese Analoga zeigen keine Anzeichen von immunosuppressiven Effekten. Die dosislimitierenden Nebenwirkungen sind Hautreaktionen, Mukositis und minimale Myelosuppression. Die zytostatische Wirkung konnte bei mehreren Patienten mit Nierenzellkarzinom und Patientinnen mit Mammakarzinom gezeigt werden [Vignot et al., 2005]. Rapamycin und seine Analoga sind sehr spezifische Kinase-Inhibitoren und haben einen gemeinsamen Wirkmechanismus. Zuerst bindet Rapamycin das 12-kDa große FK506-bindende Protein (FKBP12), einen zellulären Proteinrezeptor. Dieser Komplex wiederum inhibiert dann die Funktion von TOR durch die Interaktion mit der FKBP12-Rapamycinbindenden Domäne des mTOR Proteins. Durch die Hemmung des oben beschriebenen Signalwegs kommt es nun zum Wachstumsstillstand und Hemmung der Zellzyklusprogression [Bjornsti et al., 2004; Huang et al., 2003]. Der Weg über eIF4E scheint hierbei wichtig zu sein, denn in Zellen, die Rapamycin gegenüber resistent sind, wurde eine Herunterregulierung von 4E-BP1 beschrieben. In diesen Zellen ist also die Hemmung von mTOR unfähig die Capabhängige Translation zu inhibieren. Andererseits konnte festgestellt werden, dass Zellen, die eine Rapamycinsensitivität wiedererlangen, ein zum Wildtyp vergleichbares 4E-BP1-Level aufwiesen [Dilling et al., 2002]. Des Weiteren kann Rapamycin ein effektives Medikament gegen Tumorzellen sein, die einen Funktionsverlust von PTEN aufweisen. Eine weit verbreitete Hypothese ist, dass der Mangel PTEN den Rapamycin-sensitiven mTORan Wachstumssignalweg aktiviert [Guertin et al., 2005].

### 2. Zielstellung

Rapamycin und seine Analoga sind vielversprechende potentielle neue molekulare Tumortherapeutika. In Zellkulturversuchen zeigte sich Rapamycin als potentiell wirksam bei der Therapie von Prostatakarzinom, kleinzelligem Lungenkarzinom, den T-Zell-Leukämien, dem Nierenzellkarzimom und dem Mammakarzinom. Allerdings gibt es bislang noch keine ausreichenden Studien über die Wirkung beim Ovarialkarzinom. Daher ergaben sich die im Folgenden beschriebenen Fragestellungen als Grundlage für die vorliegende Arbeit.

- Wie werden die Proteine des mTOR–Signalweges (im Einzelnen: Phospho-AKT, Phospho-mTOR, 4E-BP1, Phospho-4E-BP1 und eIF-4E) in elf verschiedenen Ovarialkarzinomzellinien (vgl. 3.1.1.) im Vergleich zu der Oberflächenepithelzelllinie des Ovars (HOSE) exprimiert?
- Kann bei den Zelllinien, die eine erhöhte Expression der Proteine des mTOR– Signalweges zeigen eine Proliferationshemmung durch die Behandlung mit Rapamycin erzielt werden?
   Wenn ja, ist diese Hemmung konzentrations- und zeitabhängig?
- 3. Wie ändert sich in diesen Zelllinien die Expression der Proteine des mTOR–Signalweges durch die Rapamycinbehandlung?
- 4. Kann in diesen Zelllinien ein Effekt durch die Rapamycin-Behandlung in Bezug auf Apoptose und den Zellzyklusstillstand in einer bestimmten Phase gezeigt werden?
- 5. Wie wird Phospho-mTOR im Ovarialkarzinomgewebe exprimiert? Besteht eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Merkmalen und dem Überleben der Patientinnen?

## 3. Material und Methoden

## 3.1. Material

### 3.1.1. Zellinien

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit untersucht:

<b>Bezeichnungen</b> (Bestellnummern)	Beschreibungen	Bezugsquellen
<b>SK-OV-3</b> (ATCC# HTB-77)	humanes Adenokarzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel, D
OVCAR-3 (ATCC# HTB-161)	humanes Adenokarzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel, D
OAW42	humanes Adenokarzinom des Ovars	CLS-Cell Lines Service, Eppelheim, D
Caov-3 (ATCC# HTB-75)	humanes Adenokarzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel, D
<b>A27/80</b> (ECACC# 93112519)	humanes Ovarialkarzinom	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England
<b>ES-2</b> (ATCC# CRL-1978)	humanes klarzelliges Karzinom des Ovars	LGC Promochem, Wesel, D
<b>MDAH 2774</b> (ATCC# CRL-10303)	seröses Karzinom des Ovars	WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach, D
<b>PA-1</b> (ATCC# CRL-1572)	humanes Teratokarzinom des Ovars	Cell Lines Service, Eppelheim, D
<b>EFO-21</b> (DSM# ACC 235)	humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
<b>EFO-27</b> (DSM# ACC 191)	humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D
<b>FU-OV-1</b> (DSMZ# ACC 444)	humanes Adenokarzinom des Ovars	DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D

HOSE Normales Oberflächenepithel Dr. des Ovars, durch HPV- VR Transfektion immortalisiert

Dr. S.W. Tsao, Hong Kong, VR China

#### 3.1.2. Antikörper

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden zur Herstellung der Western-Blots und immunhistochemischen Färbungen verwendet. Bis auf den Antikörper gegen Aktin, welcher in der Maus produziert wurde, haben alle Erstantikörper das Kaninchen als Herstellungsquelle. Die Herstellung der Zweitantikörper geschieht in der Ziege.

	Bezeichnungen und Bestellnummern	Bezugsquellen
Primär- antikörper:	Phospho-Akt (Ser473) polyclonal Antibody #9271 (verwendet für Western-Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody #2971 (verwendet für Western Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit monoclonal mAb (IHC Specific) #2976 (verwendet für Immunhistochemie)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	eIF4E Antibody #9742 (verwendet für Western Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	Phospho-eIF4E (Ser209) Antibody #9741 (verwendet für Western Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	4E-BP1 Antibody #9452 (verwendet für Western Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) Antibody #9459 (verwendet für Western Blot)	Cell Signaling Technology, Frankfurt, D
	Ms X Actin (verwendet für Western Blot)	Chemicon International, USA

Goat anti mouse Antibody conjugated to Sekundär-TROPIX, antikörper Alkaline Phosphatase #AC32ML Applera Deutschland GmbH, (polyklonal): Darmstadt, D

Goat anti rabbit Antibody conjugated to Alkaline Phosphatase #AC31RL

TROPIX,

Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, D

#### 3.1.3. Chemikalien

Zur Durchführung der Versuche kamen folgende Chemikalien zum Einsatz:

Chemikalien	Bezugsquellen
Acrylamid – Bis-Acrylamid 19:1 40% (w/v) Solution	Qbiogene, Heidelberg, D
Annexin V-Fluos	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	ROTH, Carl Roth + Co., Karlsruhe, D
Bromphenolblau	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
BSA (Albumin, Bovine)	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Calciumchlorid (CaCl2)	Merck, Darmstadt, D
CDP-Star Ready-to-use	Tropix, Bedford, USA
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
Color Markers for SDS-Page and Pro- tein Transfer; Wide Range	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Coumassie Brilliantblau R 250	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
DTT	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Essigsäure	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

Ethanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Foetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]-piperazine-N´-2- ethane sulfonic acid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
I-Block	Tropix, Bedford, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	Bio Whittaker, Verviers, Niederlande
Methanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
$MgCl \cdot 6 H_2O$	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Natrium-di-hydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl <sup>2</sup> )	Merck, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Nitro-Block	Tropix, Bedford, USA
N, N, N´,N´-Tetramethyl- ethylendia- mine (TEMED)	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Propidiumjodid 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethyl- ammonio)propyl]-6- phenylphenanthridinium diiodide	SIGMA – Aldrich Co., Hamburg, D
Rapamycin in Lösung	Calbiochem, EMD Biosciences, Darmstadt, D
Tri-Natrium-Dihydrat	Merck, Darmstadt, D
Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan (Tris-Base)	Merck, Darmstadt, D

Tris(Hydroxymethyl)- aminomethan- hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck, Darmstadt, D
Triton X 100 (0,1%) (Alkylphenyl- polyaethylenglycol)	FERAK, Laborat GmbH, Berlin, D
Trypsin/EDTA-Lösung 0,5% / 0,2% (w/v) in PBS (10-fach konzentriert)	Biochrom KG, Berlin, D
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Vitro-Clud, Einschlussmittel für die mikroskopische Technik	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande

## 3.1.4. Kits

Diese Kits wurden für die vorliegende Arbeit verwendet:

Kit-Bezeichnungen	Komponenten	Bezugsquellen	
BCA Protein Assay Reagent	BCA Reagent A: Natrium- karbonat, Natrium- bikarbonat, bicinchoninic Säure, Natriumtartrat in 1M Natriumhydroxid BCA Reagent B: 4% Kupfersulfat	Pierce, Rockford USA	
Cell Proliferation Kit II (XTT)	XTT labeling reagent Electron-coupling reagent	Roche Molecular Bio- chemicals, D	
Chem Mate Detection Kit Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	<ul> <li>A: Link, Biotinylated Secondary Antibodies</li> <li>B: Streptavidin Peroxidase</li> <li>C: HRP Substrate Buffer</li> <li>D: DAB+ Chromogen (50x)</li> </ul>	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark	
Chem Mate Peroxidase-Blocking Solution		Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark	
Western Blot Recycling Kit	Antibody Stripping Solution Blocking Buffer	ALPHA Diagnostic Inter- national, USA	

## 3.1.5. Lösungen, Kulturmedien

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Kulturmedien beschrieben:

Lösungen	Menge	en	Chemikalien		
APS 10%	1	g	APS		
Ammonium-peroxidsulfat	10	ml	H <sub>2</sub> O		
Assay-Puffer 10 x (WB)	24,2	g	Tris-Base		
	2,033	g	$MgCl_2 \bullet 6 H_2O$		
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O		
		pH 9	9,8 einstellen		
<b>Bindungspupper FACS</b>	119	mg	Hepes (pH 7,4)		
(Apoptose)	409	mg	Natriumchlorid		
	36	mg	Kalziumchlorid		
	ad 50	ml	H <sub>2</sub> O		
<b>Blocking-Puffer</b> (IHC)	5	ml	Pferde-/ Ziegenserum		
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O		
Blocking-Puffer (WB)	300	ml	1 x PBS		
	0,6	g	I-Block		
		auf	auf ca. 80°C erhitzen		
	300	μl	Tween 20		
Citratpuffer 10x	3,78	g	Citronensäure-Monohydrat		
	24,21	g	Tri-Natrium-Dihydrat		
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O		
		pH 6	5,0 einstellen		
Coomassie- Färbelösung	0,6	g	Coomassie		
	100	ml	Essigsäure		
	ad 1000	μl	H <sub>2</sub> O		
Destain Soulution II	70	ml	Essigsäure		
	50	ml	Methanol		
	ad 1000	ml	$H_2O$		

DMEM, serumhaltig:	500	ml	DMEM
	10	ml	L-Glutamin
	50	ml	FCS
Diluentpuffer FACS	50	μl	Triton X 100
(Zellzyklus)	250	mg	BSA
	ad 50	ml	PBS
Elektrophoresepuffer 10 x	30,3	g	Tris-Base
(WB)	144,0	g	Glycin
	2,8	g	SDS
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O
		pH 8	3,3-8,4 einstellen
PBS 10 x	82,3	g	Di-Natriumhydrogenphosphat
	23,5	g	Natrium-di-hydrogenphosphat
	40,0	g	Natriumchlorid
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O
		pH 7	7,2 einstellen
Protein-Lysispuffer:	1,2	ml	0,5M Tris-HCl
	2,0	ml	10% SDS
	1,0	ml	Glycerol
	0,5	ml	DTT (1M)
	5,3	ml	H <sub>2</sub> O
Sammelgel (WB)	3,20	ml	H <sub>2</sub> O
(4%)	0,50	ml	Acrylamid
	1,25	ml	0,5M Tris-HCl
	50	μl	10% SDS
	50	μl	10% APS
	10	μl	TEMED
Stripping-Puffer	1,5	g	Glycin
	1	ml	Tween 20
	1	ml	SDS 10%
	ad 1000	ml	H <sub>2</sub> O
		pH 2	2,2 einstellen

TBS 10 x	24,2	g	Tris-Base
	80	g	Natriumchlorid
	ad 1000	ml	$H_2O$
		pН	7,6 einstellen
Transferpuffer 10 x (WB)	58,0	g	Tris-Base
(nach Verdünnung	29,0	g	Glycin
20 Vol% Methanol	3,7	g	SDS
frisch zugeben)		pН	8,3 einstellen
	ad 800	ml	H <sub>2</sub> O
Trenngel (WB)	3,2	ml	H <sub>2</sub> 0
(12%)	3,0	ml	Acrylamid
	2,5	ml	1,5M Tris–HCl
	100	μl	10% SDS
	50	μl	10% APS
	5	μl	TEMED
Tris–HCl 0,5M:	30,25	g	Tris-Base
	ad 500	ml	$H_2O$
		pН	6,8 einstellen
Tris–HCl 1,5M:	90,75	g	Tris-Base
	ad 500	ml	$H_2O$
		pН	8,8 einstellen
Waschpuffer (IHC)	1000	ml	1 x TBS
	1	ml	Tween 20
Waschpuffer (WB)	1000	ml	1 x PBS
	1	ml	Tween 20

### 3.1.6. Verbrauchsmaterial

Die im Folgenden genannten Experimentematerialien wurden verbraucht:

Materialien	Bezugsquellen
Chromatographiepapier	Whatman, Maidstone, UK
Combitips plus 1ml, 5ml (Multipette)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Deckgläser	MENZEL-GLASER, Menzel GmbH & Co, Braunschweig, D
FACS-Tube: Polystyrene Round-Bottom 5ml	FALCON, Erembodegem, Belgien
Filter gebrauchsfertig steril 0,2µm, Celluloseacetat	Schleicher & Schuell, BioScience GmbH, Dasel, D
Hyperfilm	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Insulinspritzen 1ml: BD Plastipak	Becton Dickinson, Oxford, UK
Kanülen, Sterican	B. BRAUN Melsungen AG, Melsungen, D
Microtest 96 Well Zellkulturplatte	FALCON Becton Dickinson, USA
Multiwell 6 Well Zellkulturplatte	FALCON Becton Dickinson, USA
Objektträger, Super Frost, gebrauchsfertig	MENZEL-GLASER, Menzel GmbH & Co, Braunschweig, D
Pipetten	FALCON Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen ohne Filter	Eppendorf AG, Hamburg, D
PROTRAN Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher <b>&amp;</b> Schuell, BioScience GmbH, Dasel, D
Röhrchen 10ml, 50ml	NalgeNuc International, New York, USA
Safe-Lock Tubes: 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Spritzen 20ml: BD Discardit II	Becton Dickinson, Oxford, UK
Untersuchungshandschuhe aus Latex – puderfrei, unsteril: Derma Clean	Ansell, Bangkok, Thailand

Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	FALCON Bedford, USA
Zellschaber	Costar, Corning, USA
Zellstoff	Hartmann, Heidenheim, D

## 3.1.7. Geräte

Unter Verwendung dieser Geräte konnten die Versuche durchgeführt werden.

Geräte	Bezugsquellen
Abzug	Captair, Düsseldorf, D
Elektrophoresekammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Elektrophoresenetzgerät	Biometra, Göttingen, D
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
FACS Calibur - System	BD Biosciences, Heidelberg, D
Kühlzentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlschrank	LIEBHERR
Heizblock 100°C	Roth, Karlsruhe, D
Magnetrührer: Variomag	H+P Labortechnik, München, D
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, D
Schüttelinkubator 3032	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D
Schüttler: PROMAX 1020	Heidolph Instruments Schwabach, D
Semi dry Blot	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermocycler: TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, D

Tischzentrifuge: Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Überdruckkochtopf	TEFAL
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, D
Wasserbad 37°C	GFL
Zellkulturmikroskop IMT-2	Olympus Optical, Hamburg, D
Zellkulturbrutschrank: FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH, Berlin, D
Zellkulturwerkbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, D

### 3.2. Patientenkollektiv

Die immunhistochemischen Färbungen zur Untersuchung der Proteinexpression (Gesamtproteine und aktivierte Proteine des mTOR-Signalweges) wurden retrospektiv anhand eines sogenannten Gewebe-Mikro-Array (Tissue micro array, TMA) von primären Ovarialkarzinomen eines 83 Patientinnen umfassenden Kollektives durchgeführt. Es wurden standardisierte Hämatoxylinund Eosin-Färbungen zur histopathologischen Klassifizierung verwendet. Das Tumorstadium wurde anhand des FIGO-Systems (International Federation of Gynecology and Obstetrics) festgelegt. Zum Grading wurde nach dem Silverberg-Grading-System verfahren, das sich an der Zellarchitektur und den Kern- und Mitosemerkmalen orientiert.

Das Diagnosealter der Patientinnen lag zwischen 32 und 85 Jahren, im Median bei 58 Jahren. Die Gewebeprobenentnahme erfolgte zu routinediagnostischen Zwecken in den Jahren zwischen 1992 und 2003. Am Institut für Pathologie der Charité (Campus Mitte) in Berlin wurden die Karzinome histologisch diagnostiziert. In der folgenden Tabelle ist die detaillierte Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinome mit der jeweiligen Häufigkeit und Prozentangabe aufgeführt. Zusammenfassend handelt es sich in der Mehrheit um seröse Karzinome, die sich zum Zeitpunkt der Diagnose in bereits fortgeschrittenen Stadien befanden. Das FIGO-Stadium III, das Tumorstadium pT3 und der undifferenzierte Typ wurden am häufigsten während der Diagnosestellung ermittelt. Über 50% der Patientinnen waren jünger als 60 Jahre, 74,7% erhielten eine platinbasierte Chemotherapie. Eine neoadjuvante Chemotherapie hatte nicht stattgefunden.

		Häufigkeit	%
Histologischer Typ	serös	53	63,9
	nicht-serös <sup>*</sup>	23	27,7
	undifferenziert	7	8,4
FIGO-Stadium	Ι	16	19,3
	П	9	10,8
	III	53	63,9
	IV	5	6,0
рТ	pT1	18	21,7
	pT2	10	12,0
	pT3	55	66,3
Histologisches Grading (Silverberg)	G1	10	12,0
	G2	36	43,4
	G3	37	44,6
Diagnosealter (32–85 Jahre)	<60 Jahre	45	54,2
	>60 Jahre	38	45,8
Intraoperativer Residualtumor	ohne	30	36,1
	<2 cm	14	16,9
	>2 cm	7	8,4
	Keine Angaben (FIGO I)	17	20,5
	Keine Angaben	15	18,1
Chemotherapie	Platin basiert	62	74,7
	nicht Platin-haltig	2	2,4
	Keine Chemotherapie	4	4,8
	Keine Angabe	15	18,1

\*nicht seröse Ovarialkarzinome beinhalten: muzinöse, endometroide und transitionszellige Ovarialkarzinome.

#### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Zellkultur

Die unter 3.1.1. aufgelisteten humanen Ovarialkarzinomzellinien wurden in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% FCS und 2% L-Glutamin versetzt ist, kultiviert. Die Inkubation im Zellkulturschrank erfolgte in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einem 5% igen Volumenanteil CO<sub>2</sub>. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank und mit Verwendung steriler Materialien und Lösungen. Die Trypsin-Lösung wurde zusätzlich während der Zugabe filtriert.

Das Kulturmedium wurde alle 3 bis 4 Tage ausgetauscht. Bei ca. 80%iger Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen folgendermaßen: Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Trypsin gespült. Nach erneutem Absaugen wurden 2 ml frisches Trypsin über den gesamten Flaschenboden verteilt. Zur Inkubation, bis sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen vom Untergrund gelöst und vereinzelt hatten, wurden die Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C verwahrt. Um die Trypsinwirkung zu stoppen erfolgte die Zugabe von 4 ml Medium. Von der resultierenden Zellsuspension wurden, abhängig vom Wachstumsverhalten der jeweiligen Zelllinie, 0,25 ml bis 1 ml in der Kulturflasche belassen und mit 14 ml Medium ergänzt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte maximal über 10 Passagen.

#### 3.3.2. Behandlung der Zellen

Die aus der Passagierung zur Verfügung stehende Zellsuspension wurde je nach Bedarf mit Medium verdünnt, gleichmäßig in 6-Well-Platten ausgesät und das Volumen mit DMEM jeweils auf 2 ml ergänzt. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Behandlung mit Rapamycin in aufsteigender Konzentration (von 20 nM bis 1000 nM). Pro Versuchsreihe wurden eine Kontrolle, die bis auf die Zugabe von Rapamycin gleiche Behandlung erfuhr, und eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO) in der Konzentration, die bei der Behandlung der Zellen mit 1000 nM Rapamycin appliziert wurde mitgeführt.

#### 3.3.3. Proteinisolierung

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 100 µl Protein-Lysis-Puffers pro Well der 6-Well-Platten. Nach 5-minütiger Inkubationszeit auf Eis folgten die mechanische Ablösung mit Hilfe eines Zellschabers und die Überführung der
Zellsuspension in Tubes. Das Lysat wurde durch mehrmaliges Aufziehen in eine Insulinspritze (0,45 mm Kanüle) mechanisch degradiert und anschließend zentrifugiert, um die Proteinlösung von Zelldetritus zu befreien. Die Lagerung bis zur Analyse im Western-Blot erfolgte im Gefrierfach bei –20°C.

#### 3.3.4. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die colorimetrische Detektion und Quantifizierung der Totalproteinmenge erfolgte mithilfe des BCA Protein Determination Kits nach Pierce. Diese Methode kombiniert die Biuret-Reaktion (Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> durch Proteine) mit der sehr sensitiven colorimetrischen Messung des violettfarbenen Komplexes aus Cu<sup>1+</sup> und Bicinchoninsäure. Der Komplex weist eine starke Absorption von Licht mit der Wellenlänge 562 nm auf, wodurch die Intensität bei entsprechender Einstellung im ELISA-Reader quantifiziert werden kann. Durch die Mitführung einer Protein-Standardreihe konnten die Protein-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

#### 3.3.5. Western Blot

Zur Elektrophorese und damit zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben angeglichen. Dies erfolgte durch die Zugabe von mit Bromphenolblau versetztem Lysispuffer. Anschließend mussten die Probengemische für 15 Minuten auf 95°C erhitzt werden, wodurch die Proteine denaturierten. Somit waren die Proben für die Beladung der Taschen im Sammelgel vorbereitet. Das 4%ige Sammelgel ist dem eigentlichen Trenngel aufgelagert und muss zuerst von den Proteinen durchlaufen werden, es dient zur gleichmäßigen Auftrennung der Proben. Die Dichte des Trenngels zwischen 6% und 14% war durch die Größe des jeweils zu bestimmenden Proteins vorgegeben. Zur Auftrennung der Proteine und des Regenbogenmarkers (Color Marker, Wide Range) im Gel wurde für 2,5 bis 3,5 Stunden über den Elektrophoresepuffer eine Spannung von 100 V angelegt.

Mit dem Semi-Dry-System erfolgte der 90minütige Transfer der aufgetrennten Proteine vom Elektrophoresegel auf eine Nitrozellulose-Membran bei einer Stromstärke von 144 mA pro Membran. Anschließend inkubierte die Membran bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Blocking-Puffer, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Die Primärantikörper gegen Phospho-AKT, Phospho-m-TOR, 4E-BP1, Phospho-4E-BP1 und eIF-4E wurden 1:1000 mit dem Blocking-Puffer verdünnt. Zur Beladungskontrolle wurde der Antikörper gegen Aktin in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Über Nacht inkubierten die Membranen in der jeweiligen Antikörper-Lösung bei 4°C. Am Folgetag wurden die ungebundenen Antikörper durch 3 x 10-minütiges schnelles Schwenken im Waschpuffer herunter gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation des entsprechenden (Anti-Mouse für Aktin und Anti-Rabbit für alle anderen Antikörper) AP-gekoppelten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen und 4minütiger Pufferung in Assay-Puffer wurde die Membran für 5 Minuten mit dem aktivierten Chemolumineszens-Systems CDP-Star benetzt, was die Belichtung von ECL-Hyperfilmen über unterschiedliche Zeiträume ermöglichte.

Mit Hilfe des Molekulargewichtsmarkers, der bei jeder Elektrophorese mitgelaufen ist, konnten die jeweiligen Proteine durch die Position Ihrer Banden und die spezifischen Antikörper identifiziert werden. P-AKT ist ein 60 kDa großes Protein, P-mTOR ist ein sehr großes Protein (289 kDa) und verursacht an entspechender Stelle eine Bande. Die dem mTOR nachgeschalteten Proteine 4E-BP1 und eIF-4E sind sehr kleine Proteine mit Molekulargrößen zwischen 15 bis 25 kDa.

#### 3.3.6. Zellproliferations Assay (XTT)

Zur Untersuchung der Zellviabilität und Zellproliferation wurde ein colorimetrischer Test verwendet [Scudiero et al., 1988]. Der Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) Benzen-Sulfonsäure Hydrat) zum orangefarbenem Formazan. Diese Umsetzung findet nur durch lebende (metabolisch aktive) Zellen statt, da die biochemische Prozedur auf der Aktivität von mitochondrialen Enzymen basiert, welche kurz nach dem Zelltod inaktiviert werden. Ein Anstieg der Zellzahl resultiert also in einem proportionalen Anstieg des Gehaltes an Formazan, das wasserlöslich ist und bei einer Wellenlänge zwischen 450 und 500 nm mit einem Spektralphotometer (ELISA-Reader) gemessen wird.

Die aus der Passagierung zur Verfügung stehende Zellsuspension wurde je nach Bedarf mit Medium verdünnt und gleichmäßig in die 94-Well-Platten in einem Volumen von 100µl ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Behandlung mit Rapamycin in aufsteigender Konzentration (20 nM bis 1000 nM). Es wurde wie bei der Behandlung für den Western-Blot pro Versuchsreihe eine bis auf die Zugabe von Rapamycin gleich behandelte Kontrolle und eine Kontrolle, die ausschließlich das Lösungsmittel DMSO verabreicht bekommen hat, mitgeführt. Pro Konzentration wurde jeweils eine sechsfach-Bestimmung durchgeführt. Nach 72 Stunden, sechs Tagen und acht Tagen Inkubation im Brutschrank erfolgte die 2- bis 4-stündige Inkubation mit der XTT-Lösung (Endkonzentration 0,3 mg/ml), um nun das Formazan im ELISA-Reader bei entsprechender Wellenlänge zu messen. An Tag 3 fand für die 6-Tagesmessung ein Mediumwechsel mit entsprechenden Rapamycin- bzw. DMSO-Konzentrationen statt, für die Messungen am Tag 8 erfolgte der Mediumwechsel sowohl am dritten als auch am sechsten Tag.

#### 3.3.7. Durchflusszytometrie (FACS)

In der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen im fluoreszenzaktivierten-Zellsortierer (FACS) wird das Fluoreszenz- und Streulichtverhalten einzelner Zellen aufgezeichnet, die einen Laserstrahl definierter Wellenlänge passieren. Dadurch können biochemische und biophysikalische Eigenschaften von vitalen und abgestorbenen Zellen ermittelt und Zellpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften quantitativ getrennt werden. Die Messung des Streulichts bei einem Winkel von 180° (Forward scatter, FSC) gibt Aufschluss über die Größe der Zellen, während das Streulicht im 90° Winkel (Sideward scatter, SSC) von der Granularität der Zellen bestimmt wird. Die Streu- und Fluoreszenzstrahlungen werden über Spiegelsysteme auf verschiedene gefilterte Photodetektoren gelenkt und die Signale von Photoverstärkern aufgenommen. Dabei wird die Fluoreszenzstrahlung logarithmisch verstärkt. Jedes Signal wird digitalisiert und getrennt von den anderen als binärer Wert elektronisch gespeichert. Bei der Auswertung lassen sich alle Parameter beliebig gegeneinander auftragen. In der Praxis bedeutet dies, dass es möglich ist, in einer inhomogenen Zellpopulation diejenigen Zellen gezielt herauszusuchen, die bestimmte Eigenschaften besitzen. Die Anregungswellenlänge des hier benutzten Durchflusszytometers (FACS Calibur-System) lag bei 488 nm (blauer Argon-Laser). Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu benutzt, den Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen zu ermitteln und die Phasen des Zellzyklus der Zellen zu bestimmen.

Entsprechend oben angegebener Versuchanordnung wurden die Zellen ausgesät und behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Zellen trypsiniert und in Tubes überführt. Durch zellerhaltende Zentrifugation bei 2000 Umdrehungen pro Minute und zweimaliges Waschen mit kaltem PBS wurde die Trypsinwirkung gestoppt.

#### Zellzyklusanalyse:

Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen nun in 70% igem Ethanol über Nacht bei -20°C fixiert. Am Folgetag fand eine erneute 5 minütige Zentrifugation der in Ethanol fixierten Zellen bei 2000 rpm statt, um die Pellets in jeweils 500 µl Diluent-Puffer aufnehmen zu können. Vor der eigentlichen FACS-Messung erfolgten die Zugabe von 20 µl Propidiumjodid und eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das Propidiumiodid bindet in einem exakten stöchiometrischen Verhältnis an die DNA. So wird der DNA-Gehalt der einzelnen Zelle anhand der Fluoreszenzintensität durch die FACS-Messung quantifizierbar. Die Auswertung der Messungen zur Darstellung der phasenunterscheidenden Histogramme erfolgte mit Hilfe der Software-Programme WinMDI 2.8 und Cylched.

Die Phasen des Zellzyklus werden als Mitosephase (Kernteilung) und Interphase (Zwischenphase) bezeichnet. Die Interphase ist durch die Replikation der DNA und Proteinsynthese gekennzeichnet und gliedert sich wiederum in die G1-, S- und G2-Phase. Postmitotisch durchläuft die Zelle die G1- oder Präsynthesephase, die im Wesentlichen durch das Wachstum der Zelle und die RNA-Replikation gekennzeichnet ist. Es findet aber keine Synthese von DNS statt (G kommt von "gap" = Pause, bezüglich der Verdopplung von Erbmaterial. In der nachfolgenden S-Phase wird die DNA zur Verdopplung des Chromatins repliziert. Die G2-Phase dient zur Vorbereitung auf die erneute Mitose. Hier kondensieren sich die Chromosomen und der Spindelapparat bildet sich aus, es ist wieder eine Phase ohne DNS-Synthese. Einige Zellen gehen in die Ruhephase (G0-Phase) über, die unterschiedlich lange andauern kann.

#### Apoptosemessung:

Die Apoptosemessung fand am Tag der Zellernte statt. Hierfür wurden die Zellen nach der PBS-Waschung in den Bindungspuffer in einer Konzentration von 1.000.000 Zellen pro ml aufgenommen. In den FACS-Tubes wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension (100.000 Zellen) mit 2,5  $\mu$ l Annexin V-Fluos und 5  $\mu$ l Propidiumjodid vermengt und abgedunkelt für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar vor der Messung erfolgte die Zugabe von 300  $\mu$ l Bindungspuffer. Die graphische Darstellung und Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes WinMDI 2.8.

Die Möglichkeit die apototischen Zellen von den vitalen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden darauf. dass die Zellen beruht im frühen Apoptoseprozess das Membranphospholipid Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Zellmembran verlagern. Annexin V bindet das Phosphatidylserin und markiert somit die apoptotischen Zellen. Durch die Kopplung von Annexin V an den Fluoreszenzfarbstoff FITC kann die Messung direkt im FACS erfolgen. Da auch nekrotische Zellen Phosphatidylserin exportieren, wird dem Reaktionsgemisch Propidiumiodid zugegeben. Bei nekrotischen Zellen und Zellen in der späten Apoptose ist die Membranintegrität nicht erhalten und das Propidiumiodid dringt in die Zelle ein. Das Signal von Propidiumiodid wird ebenfalls im FACS gemessen. In der Auswertung lässt sich also unterscheiden zwischen den vitalen Zellen (Annexin V negativ und Propidiumiodid negativ), die im unteren linken Quadranten der graphischen Darstellung erscheinen, den frühapoptotischen Zellen (Annexin V positiv, Propidiumiodid negativ) im unteren rechten Quadranten und den

nekrotischen und spätapoptotischen Zellen (Annexin V positiv und Propidiumiodid positiv) in den oberen Quadranten angeordnet.

#### 3.3.8. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung dient der Markierung von Proteinen im Gewebsschnitt durch die Bindung spezifischer Antikörper, so dass anschließend eine Beurteilung der Expression des jeweiligen Proteins im speziellen Gewebe, der Intensität der Färbung und dem Ort der Expression (nukleär, membranär, zytoplasmatisch) unter dem Lichtmikroskop erfolgen kann. Vor der Färbung musste das Paraffin von den Objektträgern, auf denen sich die Gewebeschnitte befinden, entfernt werden. Dies geschah durch 3mal 5minütiges Waschen der Schnitte in Xylol, anschließende Inkubation für jeweils 3 Minuten in Ethanol absteigender Konzentration (4 x 100%, 2 x 96%, 1 x 80%, 3 x 70%) und letztlich Wässerung in destilliertem Wasser. Um die Epitope der Gewebe für die Antikörper besser zugänglich zu machen, wurden die Proben im leicht sauren Milieu (pH 6) des Citratpuffers erhitzt und 5 Minuten im Überdruckkochtopf gekocht (unterhalb der Siedetemperatur). Zum Frischhalten der Proben bis zur Beladung mit den Antikörpern, verwahrten wir sie in der TBS-Pufferlösung. Die Inkubation des 1. Antikörpers erfolgte in entsprechender Verdünnung über 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurde der Überstand des 1.Antikörpers unter fließendem Leitungswasser, mit destilliertem Wasser, dann mit TBS/Tween und zuletzt mit reinem TBS mehrmals herunter gewaschen, woran sich die 15minütige Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper anschloss. Nach Spülung mit TBS wurde wieder für 15 Minuten mit der alkalischen Phosphatase aus dem "Chem Mate Detection Kit" inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Hilfe dem "HRP Substrate Buffer" und "DAB+ Chromogen", ebenfalls aus dem "Chem Mate Detection Kit", in einem Mischungsverhältnis von 50:1. Nun konnten die Zellkerne zur Kontrastierung für 10 Sekunden in Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt und unter fließendem Wasser gebläut werden. Vor dem Eindecken mit Vitro-Clud (Einschlußmittel für die mikroskopische Technik) und Deckgläschen zum Schutz der gefärbten Schnitte, fixierten wir sie in Ethanol aufsteigender Konzentration (4x 70%, 1x 80%, 1x 90%, 4x 100%) und in Xylol.

Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte anhand des im Folgenden beschriebenen immunoreaktiven Scores [Remmele et al. 1987]. Zum einen wurde die Intensität der Färbung durch die spezifischen Antikörper beurteilt und als 0 = keine Färbung, 1 =schwache, 2 = mittlere und 3 = starke Färbung vermerkt. Zum anderen wurde beschrieben, wie viel Prozent des Tumorgewebes eine Immunreaktion zeigten. Hierbei wurden Werte zwischen 0 und 4 vergeben, wobei der Wert 0 auch 0% Färbung entspricht, 1 steht für weniger als 10%, 2 für 11% bis 50%, 3 für 51% bis 80% und die 4 für eine Proteinexpression von mehr als 80% der Tumorzellen. Die ermittelten Zahlenwerte für Intensität und Prozent der Expression wurden multipliziert, daraus ergab sich ein maximaler Wert von 12. Anschließend erfolgte eine Gruppierung der Ovarialkarzinome in negativ (Score 0-6) und positiv (Score 7-12). Anhand dieser Werte konnten die statistischen Auswertungen im Software-Programm SPSS 13.0 erfolgen.

#### 3.3.9. Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz bezüglich der Zellproliferationsuntersuchungen (XTT-Assay) wurde mittels des zweiseitigen t-Testes unter Verwendung des Software-Programmes GraphPad Prism 4 berechnet. Als Signifikanzschwelle wurde hierbei die Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (p<0,05) gewählt.

Mit Hilfe des Software-Programmes SPSS 13.0 und unter Nutzung des  $\chi^2$ - bzw. des Fisher–Tests konnte die statistische Signifikanz der Assoziation zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und der Expression, der durch spezifische Antikörper markierten Proteine des untersuchten Signalweges, ermittelt werden. Die Überlebenskurven entstanden nach der Methode von Kaplan und Meier und die vergleichende Signifikanzberechnung erfolgte mit dem log-rank-Test. Generell wurden p-Werte <0,05 als signifikant betrachtet.

### 4. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit orientiert sich an den unter Punkt 2 genannten Fragestellungen in folgender Struktur:

- 1. Expression der Proteine des mTOR-Signalweges
- 2. Einfluß von Rapamycin auf die Proliferation
- 3. Expression der Signalweg-Proteine nach Rapamycin-Behandlung
- 4. Keine Apoptose durch Rapamycin
- 5. Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch Rapamycin
- 6. Immunhistochemische Untersuchung durch den P-mTOR-Antikörper und statistische Auswertung

Aus der ersten Untersuchung zur Proteinexpression einzelner Komponenten des mTOR-Signalweges wurden diejenigen Zelllinien abgeleitet, die für die Folgeversuche am geeignetsten erschienen. Der erste Versuch erfolgte unter der Verwendung von zehn humanen Ovarialkazinomzelllinien, einer Teratomzelllinie und einer Oberflächenepithel-Zellline des Ovars (HOSE) (vgl. 3.1.1.). Bei den nachfolgenden Experimenten zur Untersuchung der Rapamycin-Wirkung wurden die drei Karzinomzelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 verwendet.

# 4.1. Expression der Proteine des mTOR-Signalweges in benignen und malignen Zelllinien des Ovars

Zur Klärung welche Proteine des mTOR-Signalweges in den verschiedenen Zelllinien exprimiert vorkommen, wurden Western Blots mit fünf verschiedenen Antikörpern gegen spezifische Proteine dieses Signalweges angefertigt.



Abb. 3: Western Blot:

Untersuchung von 11 Ovarialkarzinomzelllinien und einer Oberflächenepithelzelllinie des Ovars (HOSE) auf die Expression von Proteinen des mTOR-Signalweges sowie Aktin. Darstellung jeweils eines repräsentativen Ergebnisses von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Aus dem Vergleich der Expressionsmuster ergaben sich folgende Beobachtungen: Die ovariale Oberflächenepithelzelllinie HOSE weist keine Expression der phosphorylierten Form des Proteins AKT auf. Auch die nachfolgenden Proteine des Signalweges, wobei es sich um mTOR und 4E-BP1 in aktivierter Form und die Gesamtproteine 4E-BP1 und eIF-4E handelt, werden nur in geringem Maße exprimiert (Abb.3, a).

Die Zelllinie A27/80 weist für alle untersuchten Proteine die stärksten Signale auf (Abb.3, b). Die Zelllinien OVCAR-3 und SK-OV-3 sind ebenfalls eindeutig positiv in der Expression aller Proteine (Abb.3, c). In teilweise etwas abgeschwächter Form lassen sich auch in den Zelllinien PA-1, FU-OV-1 und EFO-21 alle genannten Proteine nachweisen.

Keine Expression von Phospho-AKT zeigen die Zelllinien ES-2, CAOV-3, EFO-27 und MDAH-2774, während P-mTOR nahezu in allen Zelllinien nachweisbar ist. CAOV-3 und OAW-42 zeigen keine Expression des phosphorylierten, also aktivierten Proteins 4E-PB1.

Alle untersuchten Zelllinien weisen im Western Blot (Abb.3 unterste Reihe) eine gleichmäßige Intensität des Signals für den Antikörper gegen Aktin (45 kDa) auf. Dies stellt eine Kontrolle zur Beladung des Elektrophoresegels mit jeweils gleichen Proteinmengen dar.

#### 4.2. Einfluss von Rapamycin auf die Zellproliferation

Zur Untersuchung des antiproliferativen Effektes von Rapamycin wurden diejenigen Zelllinien ausgewählt, die in Abb.3 die deutlichste Aktivierung des mTOR-Signalweges zeigten. Mit Hilfe des XTT-Tests konnte untersucht werden, ob die Proliferation der Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 durch die Behandlung mit Rapamycin in unterschiedlichen Konzentrationen (20 nM bis 500 nM) gehemmt werden kann (Abbildungen 4 bis 6). Die Messungen erfolgten nach 72 Stunden sowie 6 Tagen. Um auszuschließen, dass die auftretenden Effekte durch das Lösungsmittel bedingt sind, wurde DMSO als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.



Abb. 4: Zellproliferationsassay: OVCAR-3; dargestellt in Prozent der Kontrolle

A) XTT-Messung nach 72 Stunden Rapamycin-Behandlung;

B) XTT-Messung nach 6 Tagen Rapamycin-Behandlung;

p ergibt sich aus dem zweiseitigen t-Test.

Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Versuchen.

Die Zellproliferationsmessungen zeigen in Abbildung 4 bei der Zelllinie OVCAR-3 eine signifikante (p<0,0041) Hemmung der Proliferation nach 72-stündiger Behandlung mit Rapamycin, prozentual im Vergleich zu den DMSO behandelten Kontrollen, die gleich 100% gesetzt wurden. Nach sechstägiger Behandlung mit Rapamycin konnte immer noch eine signifikante (p<0,019), jedoch weniger starke Proliferationshemmung festgestellt werden. Schon der Einsatz der geringsten Rapamycinkonzentration von 20 nM bewirkt den möglichen Hemmungseffekt von 100% auf ca. 63% nach 72-stündiger und auf ca. 73% nach sechstägiger Behandlung.



Abb. 5: Zellproliferationsassay: SK-OV-3; dargestellt in Prozent der Kontrolle
A) XTT-Messung nach 72 Stunden Rapamycin-Behandlung;
B) XTT-Messung nach 6 Tagen Rapamycin-Behandlung;
p ergibt sich aus dem zweiseitigen t-Test.
Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Versuchen.

Auch bei der Zelllinie SK-OV-3 zeigten sich signifikante (p<0,02) Proliferationshemmungen schon nach der Applikation der geringsten Konzentration von 20 nM Rapamycin nach 72 Stunden Einwirkzeit (Abb. 5 A). Die Proliferation konnte von 100% auf 65% reduziert werden. Bei dieser Zelllinie verstärkte sich der Effekt noch nach einer längeren (sechstägigen) Einwirkungszeit von 100% Proliferation der Kontrollen auf 48% der behandelten Zellen (p<0,02) (Abb. 5 B).



<sup>Abb. 6: Zellproliferationsassay: A 27/80; dargestellt in Prozent der Kontrolle
A) XTT-Messung nach 72 Stunden Rapamycin-Behandlung;
B) XTT-Messung nach 6 Tagen Rapamycin-Behandlung;
p ergibt sich aus dem zweiseitigen t-Test.
Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Versuchen.</sup> 

Die Zelllinie A 27/80 verhält sich ähnlich den beiden zuvor beschriebenen Zelllinien und zeigt, wie in der Abbildung 6 ersichtlich, sowohl nach 72-stündiger und sechstägiger Rapamycinbehandlung eine signifikante (p<0,006, bzw. p<0,022) Proliferationshemmung von 100% auf weniger als 58%, bzw. 100% auf ca. 53%.

# 4.3. Expression der Proteine des mTOR-Signalweges nach Rapamycin-Behandlung

Die Wirkung von Rapamycin hinsichtlich der Expressionsintensität der einzelnen Proteine des mTOR-Signalweges wurde durch Western Blots dargestellt (Abbildungen 7 bis 9). Es wurden die Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 untersucht, da diese die stärkste Proliferationshemmung durch Rapamycin zeigten. Die Rapamycin-Behandlung der Zelllinien erfolgte in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von 25 nM bis 1000 nM und einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Zum Vergleich wurden jeweils eine reine Medium-Kontrolle und eine DMSO-Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Western Blots mit dem Antikörper gegen Aktin kontrolliert.

#### Ergebnisse



Abb. 7: Western Blot: OVCAR-3 Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Versuchen; Untersuchung der Expression von Proteinen des AKT-mTOR-4E-BP1-Signalweges nach 48stündiger Rapamycin-Behandlung.

Die ersten zwei Spalten (Abb. 7) zeigen die Banden der Kontrollen (reines Medium, bzw. Zugabe von DMSO), dann folgen die Banden nach Rapamycinbehandlung in aufsteigender Konzentration.

Phospho-AKT ist in den Kontrollen gering exprimiert und zeigt eine Intensitätszunahme nach Rapamycinbehandlung. Die Signalintensität ist bei der höchsten Rapamycinkonzentration am stärksten, es ist also eine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Phospho-mTOR verhält sich umgekehrt und zeigt ein stärkeres Signal bei den Kontrollen im Vergleich zu den behandelten Proteinen. Noch eindeutiger wird der Effekt bei den Banden für 4E-BP1 und Phospho-4E-BP1, wobei die Kontrollen das stärkere Signal zeigen im Vergleich zu den behandelten Proteinen. Das Gesamtprotein 4E-BP1 ist ab einer Rapamycin-Konzentration von 150 nM nicht mehr nachweisbar. eIF-4E zeigt ebenfalls bei den Kontrollen die stärkeren Banden und eine Abschwächung durch die Rapamycinbehandlung.

#### Ergebnisse



Abb. 8: Western Blot: SK-OV-3 Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Versuchen; Untersuchung der Expression von Proteinen des AKT-mTOR-4E-BP1-Signalweges nach 48stündiger Rapamycin-Behandlung. Aktinnachweis zur Beladungskontrolle

Vergleichbar der Zelllinie OVCAR-3 können bei der Zelllinie SK-OV-3 ähnliche Effekte durch die Rapamycinbehandlung gezeigt werden (Abb. 8). Die Kontrollen zeigen jeweils stärkere Signale für die Proteine Phospho-mTOR, 4E-BP1 und Phospho-4E-BP1. Die Banden für Phospho-AKT zeigen wie bei der zuvor beschriebenen Zellinie eine leichte Intensitätszunahme nach der Behandlung mit Rapamycin. Einen Unterschied zur Zelllinie OVCAR-3 gibt es bei dem Translationsfaktor eIF-4E, dessen Expression bei SK-OV-3 durch Rapamycin nicht gehemmt wird.

#### Ergebnisse



Abb. 9: Western Blot: A 27/80 Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses aus mindestens drei unabhängigen Versuchen; Untersuchung der Expression von Proteinen des AKT-mTOR-4E-BP1-Signalweges nach 48stündiger Rapamycin-Behandlung. Aktinnachweis zur Beladungskontrolle

Die Zelllinie A 27/80 zeigt in der Abbildung 9 ebenfalls eine Intensitätszunahme für Phospho-AKT nach Rapamycinbehandlung und eine Intensitätsabschwächung für die Proteine PhosphomTOR, 4E-BP1 und Phospho-4E-BP1 im Vergleich zu den Kontrollen. Der Abschwächungseffekt für eIF-4E ist etwas schwächer als bei der Zelllinie OVCAR-3.

## 4.4. Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Rapamycin

Nachdem eine Proliferationshemmung durch Rapamycin bei den Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 erzielt werden konnte (vgl. 4.2.), sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Proliferationshemmung durch Apoptoseinduktion unter Rapamycin in den entsprechenden drei Ovarialkarzinomzelllinien bedingt ist. Um diese Frage zu beantworten wurden durchflusszytometrische Messungen in der Annexin/Propidiumiodid-Färbung durchgeführt.

Bei allen drei untersuchten Zelllinien (OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80) konnte keine relevante Apoptoseinduktion durch Rapamycin festgestellt werden (Abb. 10). Es zeigte sich lediglich bei der Zelllinie A 27/80 eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Apoptosezellzahl nach der Inkubation von 20 nM Rapamycin (Abb. 10; A 27/80 b). Eine vermehrte Nekrose der Zellen durch die Behandlung war ebenfalls nicht nachweisbar.

In zusätzlichen Versuchen wurden die eventuellen Einflüsse von Behandlungszeit und der Rapamycinkonzentration berücksichtigt (Ergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt). Die Konzentrationsreihe von Rapamycin umfasste Konzentrationen zwischen 20 nM und 1000 nM und die Messungen erfolgten nach 48 Stunden, 72 Stunden, sechs Tagen und acht Tagen. Bei der Zellgewinnung wurden sowohl die adhärenten Zellen, als auch die Zellen aus dem Überstand erfasst, da apoptotische und nekrotische Zellen oft den Zellkontakt zu den vitalen Zellen nicht aufrecht erhalten und in das Medium abschwimmen.



Abb. 10: FACS-Apoptosemessung

72 Stunden Rapamycin-Inkubation;

a) DMSO-Kontrolle, b) 20 nM Rapamycin, c) 1000 nM Rapamycin

Die Prozentangaben in den Quadranten beziehen sich auf die Gesamtzellzahl;

Abbildung eines repräsentativen Ergebnisses von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

## 4.5. Beeinflussung der Zellzyklusprogression durch Rapamycin

Da sich kein Hinweis auf einen apoptotischen oder nekrotischen Zelltod durch die Behandlung mit Rapamycin finden ließ (vgl. 4.4.) und dennoch eine Abnahme der Proliferation unter dem Einfluss von Rapamycin im XTT-Test gezeigt wurde (vgl. 4.2.), folgten Untersuchungen auf Effekte in der Zellzyklusprogression.

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung konnte in allen drei untersuchten Zelllinien (OVCAR-3, SK-OV-3, A 27/80) ein Anstieg im G1-Peak nach Behandlung der Zellen mit 20 nM Rapamycin und einer Inkubationszeit von 48 Stunden festgestellt werden (Abb. 11). Dies deutet auf einen Stillstand in der G1-Phase des Zellzyklus hin.

In der Abbildung 11 sind die Zellzyklus-Messungen der Zelllinie OVCAR-3 mit a) der Kontrolle und b) nach 48-stündiger Rapamycin-Behandlung in der Konzentration von 20 nM zu sehen. Unter Rapamycin ist eine Vermehrung der Zellen in der G1-Phase um ca. 30% (von 33,6% auf 64%) nachzuweisen. In der Kontrollsuspension befanden sich 33,6% der Zellen in der G1-Phase, die Suspension der behandelten Zellen wies 64% in der G1-Phase auf.

Auch in der Zelllinie SK-OV-3 wurde durch Rapamycin eine Akkumulation der Zellen nach Behandlung in der G1-Phase bewirkt. Während sich in der DMSO-Kontrolle 48,3% der Zellen in der G1-Phase befanden wurde dieser Anteil unter Rapamycin auf 68,3% gesteigert.

Auch die Zelllinie A 27/80 zeigt einen G1-Stillstand, welcher jedoch mit einem 10% igen Anstieg gegenüber der Kontrolle geringer ausgeprägt war als bei den anderen Zelllinien.



Abb. 11: FACS-Zellzyklus Messung nach 48-stündiger Inkubation

a) Kontrolle mit DMSO

b) 20 nM Rapamycin-Behandlung

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

# 4.6. Immunhistochemische Analyse von Phospho-mTOR und statistische Auswertung

Es erfolgte die immunhistochemische Expressionsanalyse von Phospho-mTOR an einem Kollektiv von invasiven Ovarialkarzinomen. Dabei zeigte sich eine zytoplasmatische, teils submembranär betonte Proteinexpression von Phospho-mTOR in den Tumorzellen. Eine positive Expression (Score von 7 bis 12) von Phospho-mTOR wurde in 39 (47%) von 83 Ovarialkarzinomen nachgewiesen. In der Abbildung 12 ist ein seröses Ovarialkarzinom zu erkennen, das eine deutliche zytoplasmatische Expression von Phospho-mTOR aufweist.



Abb. 12: Immunhistochemische Färbung mit dem Phospho-mTOR-Antikörper. Zytoplasmatische Expression von Phospho-mTOR in einem niedrig-differenzierten serösen Ovarialkarzinom (200x).

Im Anschluß an die immunhistochemische Expressionsanalyse erfolgte ein Vergleich zwischen den Expressionsdaten und klinisch-pathologischen Merkmalen sowie mit dem krankheitsfreien und dem Gesamtüberleben. Die Expression von Phospho-mTOR in Ovarialkarzinomen war signifikant (p=0.030, chi-square for trends) mit dem serösen histologischen Subtyp assoziiert. Die statistischen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

In der univariaten Kaplan-Meier-Überlebensanalyse zeigte sich hinsichtlich der Phospho-mTOR Expression ein signifikant besseres Gesamtüberleben (p=0.003, log-rank) für Patientinnen mit Phospho-mTOR positiven Karzinomen. Bezüglich des rezidivfreien Überlebens ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben ist in der Abbildung 13 zu sehen.



Abb. 13: Einfluss von Phospho-mTOR auf das Gesamtüberleben (Kaplan-Meier-Kurve; p=0,003; log-rank-Test).

	Phospho-mTOR				
	negativ		positiv		p-Wert
	Häufig- keit	(%)	Häufig- keit	(%)	
Alle Karzinome	44	(53,0)	39	(47,0)	
Histologischer Typ					0,030 <sup>a</sup>
Serös	23	(27,7)	30	(36,2)	
Nicht serös*	16	(19,3)	7	(8,4)	
undifferenziert	5	(6,0)	2	(2,4)	
FIGO - Stadium			·		0,722 <sup>a</sup>
I - II	14	(16,9)	11	(13,3)	
III - IV	30	(36,1)	28	(33,7)	
pT - Stadium			·		0,192 <sup>a</sup>
1	12	(14,5)	6	(7,2)	
2/3	32	(38,5)	33	(39,8)	
Lymphknoten -			·		0,163 <sup>a</sup>
Status (n=67)					
0	18	(26,9)	23	(34,3)	
1	16	(23,9)	10	(14,9)	
Grading					0,294 <sup>a</sup>
1 / 2	24	(28,9)	22	(26,5)	
3	22	(26,5)	15	(18,1)	

Tab. 2: Korrelation der Phospho-mTOR-Expression mit klinisch-pathologischen Merkmalen

 $a = \chi^2$ -Test; \* = nicht seröse Ovarialkarzinome beinhalten: muzinöse, endometroide und transitionszellige Ovarialkarzinome.

### 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Expression der einzelnen Proteine des mTOR-Signalweges in Ovarialkarzinomzelllinien und Ovarialkarzinomgeweben untersucht. Von besonderem Interesse waren die durch Rapamycin-Behandlung provozierten Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der Zelllinien. Es wurden Proteine untersucht, die dem Rapamycin-Angriffspunkt mTOR im Signalweg sowohl vor- als auch nachgeschaltet sind (vgl. Übersicht 4.1). Dazu wurden elf Karzinomzelllinien (vgl. 3.1.1.) und eine ovariale Oberflächenepithelzelllinie auf die Expression der einzelnen Proteine überprüft, um die geeigneten Zelllinien für Versuche zur Proliferationshemmung herauszufinden. Die Zelllinien OVCAR-3 und SK-OV-3 sind positiv für die Expression der aktivierten Form von AKT. Die Zellen der Linien ES-2 und CAOV-3 exprimierten das Phospho-AKT-Protein nicht [Noske et al., 2006]. Für die folgenden Proliferationsversuche mit dem Hemmstoff Rapamycin wurden die drei Zelllinien gewählt, die die stärkste Expression aller untersuchten Proteine zeigten (OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80), in der Annahme, dass bei diesen Zellen der mTOR-Signalweg am stärksten aktiviert ist. Auch alle weiteren Versuche wurden mit den Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 durchgeführt.

Zusätzlich zu den Zellkultur-Versuchen, wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebe-Mikroarrays aus Ovarialkarzinomen eines Patientenkollektivs von 83 Patientinnen (vgl. 3.2) mit einem ausgewählten Antikörper gefärbt, um Aussagen zu Überlebensprognosen und klinischpathologischen Korrelationen treffen zu können. Für die Expression von AKT konnte in der Arbeitsgruppe bereits eine Korrelation zu einem fortgeschrittenen Tumorstadium und zu positiven Lymphknotenmetastasen gezeigt werden. Hingegen konnten durch den Nachweis der AKT-Expression keine Rückschlüsse auf die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patientinnen gezogen werden [Noske et al., 2006].

# 5.1. Proliferationshemmung der Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 durch den Einsatz von Rapamycin

Alle Zelllinien, die im XTT-Test auf ihr Proliferationsverhalten hin untersucht wurden, zeigten eine deutliche Hemmbarkeit durch die Behandlung mit Rapamycin im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (vgl. 4.2.). Dieser Effekt konnte sowohl nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden, als auch nach sechs Tagen beobachtet werden. Die untersuchten Zelllinien verhielten sich in Bezug auf das Wachstum durch die unterschiedliche Einwirkzeit des Medikamentes uneinheitlich. Bei den Zellen der Linie SK-OV-3 verstärkte sich die Proliferationshemmung nach sechstägiger Behandlung, im Vergleich zur 72-stündigen Behandlung (vgl. Abb.5). Bei der Zelllinie OVCAR-3 wurde die Proliferation nach einer längeren Inkubation nicht ganz so stark gehemmt (vgl. Abb.4). In etwa unverändert hinsichtlich des Zeiteinflusses blieb der Hemmeffekt bei der Zelllinie A 27/80 (vgl. Abb.6). Dennoch zeigten alle Messungen einen signifikanten Rückgang der Proliferation im jeweiligen Vergleich mit den Kontrollen.

Die Wirkung durch Rapamycin war in allen Messungen dieser Arbeit unabhängig von der eingesetzten Konzentration. Die geringste Konzentration von 20 nM erzielte einen gleich starken Effekt in der Proliferationshemmung wie die höchste Konzentration von 1000 nM. Diese hohe Konzentration wurde gewählt, da Zelllinien, deren Proliferation selbst bei einer Rapamycin-Konzentration von 1000 nM nicht gehemmt werden konnte, als Rapamycin-resistent bezeichnet werden [Huang et al., 2003]. Bae-Jump und Mitarbeiter beschreiben in ihrer Arbeit bei Zervixund Ovarialkarzinomen eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung, allerdings in niedrigeren Konzentrationsbereichen. So werden die IC50 Werte für Rapamycin sensitive Zelllinien zwischen 5 und 18 nM angegeben. Für SK-OV-3 wurde beispielsweise eine IC<sub>50</sub> von 6 nM ermittelt [Bae-Jump et al., 2006]. Der proliferationshemmende Effekt auf Zelllinien durch Rapamycin auf verschiedene Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde auch in anderen Studien beschrieben [Huang et al., 2003; Aguirre et al., 2004]. In der Arbeit von Treeck und Mitarbeitern wurde der Effekt des Rapamycin-Analogons RAD 001 auf Ovarialkarzinom- (SK-OV-3 und OVCAR-3), Mammakarzinom- und Endometriumkarzinom-Zelllinien untersucht. Auch hier wurde die Proliferationshemmung bestätigt. Des weiteren wurde in der genannten Arbeit die kombinierte Gabe von RAD 001 mit Tamoxifen untersucht und ein additiver Effekt in der Hemmung des Tumorwachstums festgestellt [Treeck et al., 2006].

## 5.2. Beeinflussung der Proteinexpression des mTOR-Signalweges durch Rapamycin

Der Expressionsnachweis des Proteins Phospho-AKT nach Rapamycinexposition wurde in dieser Arbeit untersucht, obwohl es sich um ein in der Signalkette dem Rapamycin-Angriffspunktes vorgeschaltetes Protein handelt. Phospho-AKT stellt die aktivierte Form der Kinase AKT dar und wurde bei den Kontrollen der drei Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und 27/80 exprimiert. Die Untersuchungen ergaben bei allen drei Zelllinien eine Α Intensitätszunahme der Banden im Western Blot nach 48-stündiger Inkubation von Rapamycin (vgl. Abb. 7., 8. und 9.). Es ist denkbar, dass es durch einen Regelkreislauf mit positiver Rückkopplung, ausgelöst durch die Herrunterregulierung der dem mTOR nachgeschalteten Proteine, zu einer Überexpression der aktivierten AKT-Kinase kommt. In der Übersichtsarbeit von Sabatini wird beschrieben, dass die mTORC1-Inhibierung durch Rapamycin und seine Analoga in Tumoren eine AKT-Aktivierung nach sich zieht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der Komplex mTORC2, welcher nicht durch Rapamycin beeinflußt wird, AKT aktiviert. Sabatini sieht diesen Sachverhalt als möglichen Grund dafür, dass es bei Patienten bisher zu keiner ausreichenden Proliferationshemmung durch Rapamycin gegen Tumore mit hoher AKT-Aktivität kam [Sabatini, 2006]. Um den genauen Mechanismus zu klären, bedarf es weiterer Experimente. Interessante Ansätze stellen Untersuchungen mit kombiniertem Einsatz von Rapamycin mit einem PI3K-Inhibitor, der es vermag die durch Rapamycin gesteigerte AKT-Aktivität zu inhibieren. In Glioblastom-Zelllinien wurden durch die Gabe von PI-103 stärkere antiproliferative Effekte erzielt. PI-103 ist ein Molekül dass sowohl mTOR als auch PI3Kp110a, eine spezielle Isoform der PI3K, die AKT in Abhängigkeit von Insulin aktiviert, hemmt [Sabatini, 2006].

In den drei Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80 konnte durch den Proteinnachweis im Western-Blot gezeigt werden, dass der Einsatz von Rapamycin eine Herunterregulierung des aktivierten Proteins mTOR, welches den Angriffspunkt des Wirkstoffes darstellt, zur Folge hat. Die Interaktion von Rapamycin mit mTOR, beziehungsweise dem Komplex aus mTOR und Raptor, scheint dessen Phosphorylierung zu unterbinden. Ebenso zeigte sich die Herrunterregulation des nachgeschalteten Proteins 4E-BP1, sowohl in der aktivierten Form als auch des Gesamtproteins (vgl. 4.3.). Das heißt es wird nicht nur die Hyper-Phosphorylierung, sondern auch die Gesamtproteinexpression reguliert. Eine ähnliche Beschreibung ergab sich aus den Untersuchungen von Bae-Jump und Mitarbeitern. Hier wurde

das ribosomale Protein S6, das im Signalweg ebenfalls der mTOR-Kinase nachgeschaltet ist und durch die S6-Kinase1 phosphoryliert wird, auf seine Expression hin untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass sowohl die aktivierte Form (Phospho-S6) als auch das Gesamtprotein S6 nach der Behandlung mit Rapamycin herunterreguliert wird [Bae-Jump et al., 2006]. Für dieses Phänomen gibt es zwei Erklärungshypothesen, die zu weiterführenden Untersuchungen anregen. Zum einen könnte es durch die mangelnde Phosphorylierung des Proteins 4E-BP1 durch einen Rückkopplungsprozess zu einer Unterdrückung der Transkription für die 4E-BP1-mRNA kommen. Eine zweite Möglichkeit wäre es, dass die fehlende Phosphorylierung des Proteins zur Instabilität führt und so die Expression von Gesamt-4E-BP1 nicht mehr nachzuweisen ist.

Der Translationsfaktor eIF-4E, der erst aus seiner Bindung an 4E-BP1 freigegeben werden muss, um die Bildung des Initiationskomplexes zu vervollständigen, wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit als Gesamtprotein nachgewiesen. Hierbei zeigten sich in den drei Zelllinien unterschiedliche Effekte durch die Behandlung mit Rapamycin. Bei der Zelllinie OVCAR-3 konnte eine Abschwächung der Bande für eIF-4E im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden (vgl. Abb. 7). Bei der Zelllinie SKOV-3 ließ sich keine Veränderung nach Therapie erkennen (vgl. Abb. 8). A 27/80 zeigte wieder eine moderate Abschwächung der Banden (vgl. Abb. 9). Eine weitere interessante Untersuchung wäre es die Expression der phosphorylierten, also aktivierten Form von eIF-4E und das Verhalten nach Rapamycin-Behandlung festzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzliche Versuche mit einem Phospho-spezifischen eIF-4E-Antikörper durchgeführt, der aber im Western-Blot zu keiner auswertbaren Bande führte.

#### 5.3. Apoptose und Zellzyklusstillstand durch Rapamycin

### 5.3.1. Rapamycin bewirkt keine Apoptose in den Zelllinien OVCAR-3, SK-OV-3 und A 27/80

Rapamycin führte in Konzentrationen bis zu 1000 nM in keiner der drei untersuchten Zelllinien zu Apoptose oder Nekrose (vgl. 4.4.). Auch eine verlängerte Inkubationszeit von sechs und acht Tagen führte nicht zum programmierten Zelltod oder Nekrose. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Aussagen verschiedener Arbeiten, die sich mit der Wirkung von Rapamycin bzw. dessen Analoga auf Zellkulturen beschäftigt haben [Treeck et al., 2006; Bae-Jump et al., 2006]. Hingegen sind in einzelnen Arbeiten Hinweise zu finden, dass in Abhängigkeit von bestimmten intrazellulären Veränderungen, wie die Mutation des TSC2-Gens oder die Mutation im p53-Gen, Apoptose durch Rapamycin-Gabe induzierbar ist [Vignot et al., 2005; Aguirre et al., 2004; Bjornsti et al., 2004]. Auch wurde erwähnt, dass eventuell die Verwendung hoher Konzentrationen von Rapamycin einen proapoptotischen Effekt nach sich ziehe [Smolewski, 2006]. Diese Mechanismen sind bislang noch unzureichend charakterisiert, um detaillierte Aussagen zu treffen. Aguirre und Mitarbeiter untersuchten die Zelllinien SK-OV-3 und IGROV1 und bezeichneten SK-OV-3 als resistent für Rapamycin hinsichtlich der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion. Allerdings konnten sie auch einen Zellzyklusstillstand in der G1-Phase feststellen [Aguirre et al., 2004]. Diese Aussagen konnte durch die vorliegende Arbeit nur in sofern bestätigt werden, dass wie beschrieben keine Apotoseinduktion festzustellen ist, jedoch ein Zellzyklusstillstand in der G1-Phase und eine Proliferationshemmung gezeigt werden konnte.

# 5.3.2. Rapamycin führt zur Proliferationshemmung durch Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus

In allen drei Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnte ein Zellzyklusstillstand in der G1-Phase als Reaktion auf die Applikation von 20 nM Rapamycin beobachtet werden (vgl. 4.5.). Dieser Effekt kommt als Ursache für die bereits beschriebene Proliferationshemmung in Betracht, die ebenfalls bei allen drei Zelllinien festgestellt wurde (vgl. 4.2.). Die Erkenntnis der Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus durch Rapamycin deckt sich mit weiteren Arbeiten [Gao et al., 2004; Law, 2004; Altomare et al., 2004; Bae-Jump et al., 2006]. Gao und seine Mitarbeiter stellten den Effekt durch Rapamycin bei den Ovarialkarzinom-Zelllinien OVCAR-3 und A 27/80 fest und erklären den Zellzyklusstillstand durch eine Vermehrung der Proteine Cyclin D1, CDK4 und Rb, welche in die Zellzyklusregulation

involviert sind. Auch Law beschreibt einen Rapamycin-induzierten G1-Stillstand in Hepatozyten als Folge einer Herunterregulation von Cyclin D1, E und A. In der Arbeit von Altomare und Mitarbeitern aus dem Jahr 2004 wird ein Stillstand in der G1-Phase nach Rapamycin-Gabe nur bei Zelllinien gefunden, die AKT und mTOR in aktivierter Form exprimieren, z.B. SK-OV-3-Zellen.

Um eine statistische Relevanz der erzielten Ergebnisse zu belegen, müssten die Experimente dreimal durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit befand sich jedoch die Methode zur durchflusszytometrischen Messung in der Etablierungsphase und konnte daher im Rahmen dieser Arbeit nur zweimal durchgeführt werden. Aus diesem Grund haben die gezeigten Ergebnisse beispielhaften Charakter. Sie sind im Vergleich mit der zitierten Literatur jedoch plausibel.

# 5.4. Phospho-mTOR-Expression in Ovarialkarzinomgewebe korreliert mit dem Überleben der Patientinnen

Korrelationen des Proteins Phospho-m-TOR mit klinisch-pathologischen Daten sind bislang noch wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen an 83 Ovarialkarzinomen, des unter Punkt 3.2. näher charakterisierten Patientenkollektivs, durchgeführt. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Färbungen mit dem Antikörper Phospho-mTOR, da dieses Protein in immunhistochemischen Untersuchungen bei humanen Ovarialkarzinomen bisher noch wenig Beachtung fand, jedoch in dem beschriebenen Signalweg einen bedeutenden Faktor darstellt. Im Rahmen weiterer Projekte der Arbeitsgruppe wurden Färbungen mit allen spezifischen Antikörpern des zuvor beschriebenen mTOR-Signalweges angefertigt, hierbei handelt es sich im Einzelnen um Phospho-AKT, Phospho-mTOR, 4E-BP1, Phosphp-4E-BP1, eIF-4E und Phospho-eIF-4E.

Die Analyse der Phospho-mTOR-Expression ergab einen Zusammenhang zwischen der Expression des Proteins und einem verbesserten Gesamtüberleben der Patientinnen im Vergleich zu denjenigen ohne eine Phospho-mTOR-Expression.

Der Erwartung nach vermutet man bei einer erhöhten Expression der Proteine des mTOR-Signalweges eine verschlechterte Wahrscheinlichkeit der Überlebensprognose. Unter der Berücksichtigung, dass die große Mehrheit der Patientinnen aus dem Patientenkollektiv eine Chemotherapie erhalten haben und m-TOR positive sowie m-TOR negative Ovarialkarzinome vorlagen, besteht die Möglichkeit, dass die Karzinome mit starker Expression des mTOR-Proteins besser auf die Chemotherapie ansprechen. Für detailliertere Aussagen wäre noch ein Vergleich der Expressionen im Karzinomgewebe zu der Expression im gesunden Oberflächenepithel des Ovars und bei Borderlinetumoren zu erstellen.

In der Arbeit von Zhou und Mitarbeitern wurde das dem mTOR nachgeschaltete Protein 4E-BP1 durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Hier wird für das Brustdrüsengewebe eine Expressionszunahme des 4E-BP1-Proteins in seiner phosphorylierten Form vom Normalgewebe zum invasiven Karzinom festgestellt. Auch beim Mammakarzinom scheint die Expression des aktivierten 4E-BP1 mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben assoziiert zu sein [Zhou et al., 2004].

Der Zusammenhang der Expression des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF-4E) mit Tumoren wurde bereits häufiger beschrieben. Dieses Protein scheint ähnlich dem 4E-BP1 mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert zu sein. Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht von Karzinomen, die eine Dysregulation in der durch eIF-4E gesteuerten Capabhängigen Translationseinleitung aufweisen. Tab. 3: Dysregulation der Cap-abhängigen Translationsinitiation bei Tumoren [Bjornsti et al., 2004;

Nathan et al., 2000; Crew et al., 2000; Parker et al., 2004, Chen et al., 2004, Mc Clusky et al., 2005, Tao et al., 2002]

Tumortyp	Kommentar		
Plattenepithelkarzinom des Larynx	Überexpression von eIF4E korreliert bei 100% der Fälle mit einer Progression der Krankheit und dem bFGF-Level; Tumor- und Prognosemarker;		
	eIF-4E-Expression im tumorfreiem Resektionsrand korreliert mit Lokalrezidiv und schlechter Prognose		
Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs	Überexpression von eIF4E korreliert bei 98% der Fälle mit erhöhtem MMP9 und maligner Progression.		
bronchioalveoläres Karzinom	Expression von eIF4E ist im Adenokarzinom 3-7fach höher als im unveränderten Lungengewebe. Progressiver Anstieg von der atypischen adenomatösen Hyperplasie zum invasiven Karzinom.		
Schilddrüsenkarzinom	Signifikant erhöhtes eIF4E, eIF2α und Überexpression von Cyclin D1 im invasiven Karzinom im Vergleich zum papillären Karzinom.		
Mammakarzinom	Relatives Risiko ist erhöht für Rezidiv oder Tod bei Patienten mit mittlerer bis hoher Expression von eIF4E. Überexpression von eIF4E und Gen-Aktivierung beim infiltrativen duktalen Karzinom. Vermehrte eIF4E mRNA, VEGF mRNA und VEGF-Protein.		
Magenkarzinom	Assoziation von überexprimiertem eIF-4E mit der Gefäßinvasion des Tumors		
Kolonkarzinom	Expression von eIF4E ist am geringsten in normalem Kolongewebe und am höchsten im kolorektalen Adenokarzinom. Der histologische Typ korreliert mit der eIF4E Expression.		
Gastrointestinales Karzinom	Erhöhte Expression von eIF4E und 4E-BP1 in den meisten Tumoren. Umgekehrte Relation zwischen 4E-BP1 und eIF4E. Signifikanter Anstieg von 4E-BP1 bei Patienten ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen.		
Blasenkarzinom	Erhöhte Expression in Tumorgewebe verglichen mit unverändertem Blasengewebe, Korrelation mit vermehrtem VEGF und schlechter Prognose.		
Non-Hodgkin Lymphom	Hohe Expression von eIF4E und eIF2 $\alpha$ im aggressiven und hoch aggressiven Stadium.		
Neuroblastom	eIF-4E-Expression korreliert mit dem Diagnosealter (<12 Monate)		

eIF: eukaryotischer Initiationsfaktor; 4E-BP1: eIF4E-bindendes Protein 1; bFGF: basis Fibroblasten-

Wachstumsfaktor; MMP9: Matrix Metalloproteinase-9; VEGF: Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor

Bei der Bewertung Ergebnisse der der statistischen Auswertungen zu den immunhistochemischen Färbungen sollte bedacht werden, dass es sich um retrospektive Studien handelt. Dieses Studiendesign hat den Vorteil, dass alle Daten zum klinischen Verlauf bereits vorliegen, hat aber den Nachteil, dass die Rahmenbedingungen, insbesondere die durchgeführte Therapie, im Patientenkollektiv nicht einheitlich sind. Zur weiteren Bewertung sind daher zusätzliche Untersuchungen an einem weiteren Patientenkollektiv sowie prospektive Untersuchungen notwendig.

#### 6. Ausblick

Der Einsatz von Rapamycin zur Therapie maligner Tumoren ist ein vielversprechendes Konzept. der vorliegenden Arbeit konnte für Ovarialkarzinomzelllinien verlässlich eine In proliferationshemmende Wirkung durch die Substanz dargestellt werden. Ebenso wird eine Herrunterregulierung der Proteine des mTOR-Signalweges bewirkt. Die Einleitung der Translation von prokarzinogenen Faktoren wird durch diese Hemmung verhindert. Allerdings muss jedoch festgestellt werden, dass es bisher nicht gelungen ist das Tumorwachstum durch Rapamycin-Gabe vollständig zu verhindern. Einige Arbeiten machen Hoffnung auf einen größeren therapeutischen Erfolg durch die kombinierte Gabe von Rapamycin mit einem herkömmlichen Zytostatikum wie Cisplatin oder Paclitaxel [Shi et al., 1995; Jiang et al., 2006; Nathan et al., 2004]. Zu erhoffen ist zum einen eine sich potenzierende Wirkung. Einzeldosen könnten reduziert werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Die Relevanz für den klinischen Einsatz bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom sollte durch weiterführende Zellkulturexperimente untersucht werden. Denkbar ist der Einsatz von Rapamycin in und/oder Kombination mit Cisplatin Paclitaxel und einer Analyse des Zellproliferationsverhaltens sowie Expressionsnachweise der Signalwegproteine.

Zum anderen gibt es Hinweise, dass durch die Rapamycin-Wirkung auf die Zelle eine bereits eingetretene Resistenz gegen das herkömmliche Chemotherapeutikum wieder aufgehoben werden kann [de Graffenried et al., 2004; Wu et al., 2005]. Um diese synergistischen Wirkungsweisen zu verstärken, ist es sinnvoll die zellulären Mechanismen weiter zu untersuchen. Die Untersuchung des mRNA-Status der einzelnen Proteine vor und nach Rapamycingabe stellt ein sinnvolles Folgeexperiment dar, zur Klärung wie der Gesamtproteinverlust von 4E-BP1 durch Rapamycin zustande kommt.

Ein weiterer Ansatz wäre die Untersuchung der Lipid-Phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), welche als Tumorsuppressor einen negativen Regulator des AKT-Signalweges darstellt. PTEN dephosphoryliert Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3) und Phosphatidylinositol (3,4)-diphosphat (siehe Abbildung 1), wodurch die Aktivierung von AKT inhibiert und die Proliferation der Zelle unterdrückt wird. Hingegen führt ein Verlust der PTEN-Funktion zu einer erhöhten Konzentration des PIP3-Substrates und folglich zu einer Aktivierung der Downstream-Komponenten des PI3K-Signalweges, der die Kinasen AKT und mTOR beinhaltet. Eine Mutation im PTEN-Gen wurde in verschiedenen humanen Tumoren wie beispielsweise bei Brust-, Endometrium-, Ovarial-, Nieren-,

Prostatakarzinom und dem Melanom gefunden [Guertin et al., 2005; Tee et al., 2005; Vignot et al., 2005]. Tumore, die einen Verlust von PTEN aufweisen, stellen sich vorwiegend als Rapamycin-sensitiv heraus [de Graffenried et al. (2), 2004].

Da es sich in dieser Arbeit um Versuche mit Zellkulturen handelt, sind die Ergebnisse nicht unmittelbar auf Patienten übertragbar. Auch die Analysen durch das Patientenkollektiv haben aufgrund des retrospektiven Designs methodenbedingte Limitierungen.

Die vorliegende Arbeit soll anregen zu weiterführenden Untersuchungen des mTOR-Signalweges. Western-Blot-Versuche mit einem Phospho-eIF-4E-Antikörper würden eine sinnvolle Ergänzung darstellen. Ebenso immunhistochemische Färbungen von Normalgewebe und Borderlinetumoren zum Expressionsvergleich.

Durch ein Verstehen der genauen Wirkungsweisen und Folgen von Rapamycin im Signalweg könnten Screening-Marker gefunden werden, die zuverlässig diejenigen Patientinnen identifizieren, die von einer spezifischen Therapie profitieren werden. Exprimiert ein Tumor den spezifischen Marker, der mit einem schlechteren Überleben oder weiteren reduzierenden klinischen Parametern assoziiert ist, müsste eine aggressivere Therapie in Erwägung gezogen werden. Umgekehrt könnten Patientinnen mit Marker-negativen Tumoren durch geringere Dosen vor Nebenwirkungen verschont bleiben.

### 7. Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom steht an achter Stelle der weiblichen Krebserkrankungen und ist von allen gynäkologischen Tumoren derjenige mit der höchsten Mortalitätsrate. Die Therapie des Ovarialkarzinoms basiert auf der operativen Resektion und der Chemotherapie, wobei bisher bei nur 15-20% der Patientinnen eine Langzeitremission nach Chemotherapie erreicht wird.

Daher werden im Rahmen aktueller Forschungsprojekte die veränderten molekularen Mechanismen im Tumorgewebe untersucht, um aus diesem Verständnis neue und molekular definierte individualisierte Therapien abzuleiten. Rapamycin und seine Analoga sind dabei viel versprechende potentielle neue molekulare Tumortherapeutika. Rapamycin bindet das Enzym mTOR, wodurch die Kaskade zur Translationseinleitung unterbrochen wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Ovarialkarzinomzelllinien den Einfluß von Rapamycin auf die Zellproliferation und den mTOR-Signalweg zu untersuchen. Parallel wurde die PhosphomTOR Expression im Tumorgewebe untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zellkulturversuche an drei Ovarialkarzinomzelllinien durchgeführt. Eine signifikante Inhibition der Zellproliferation war in allen drei Zelllinien nach Inkubation mit Rapamycin im XTT –Test nachweisbar. In OVCAR-3 bis zu 63% (p<0,0041 nach 72-stündiger Behandlung, p<0,019 nach sechstägiger Behandlung), in SK-OV-3 bis zu 48% (p<0,02, sowohl nach 72-stündiger als auch nach sechtägiger Behandlung) und in A 27/80 bis zu 53% (p<0,006 nach 72-stündiger Behandlung, bzw. p<0,022 nach sechstägiger Behandlung). Durch FACS-Analysen konnte bei allen drei Zelllinien ein Zellzyklusstillstand in der G1-Phase als Reaktion auf die Rapamycinwirkung beobachtet werden. Dieser Effekt kommt als Ursache für die beschriebene Proliferationshemmung in Betracht. Eine vermehrte Apoptose oder Nekrose war dagegen mittels Durchflusszytometrie in keiner der Zelllinien nachweisbar.

Unter Rapamycin-Inkubation wurde die Expression verschiedener Proteine des mTOR-Signalweges im Western-Blot untersucht. Rapamycin führte in allen drei Zellinien zu einer verminderten Expression von Phospho-mTOR. Ebenso zeigte sich die Herunterregulation des nachgeschalteten Proteins 4E-BP1. Unter Wirkung von Rapamycin kam es bei allen drei Zelllinien zu einer erhöhten Phospho-AKT Proteinexpression. Das Protein AKT ist im Signalweg dem mTOR vorgeschaltet und wird unter Rapamycin möglicherweise im Rahmen eines kompensatorischen Mechanismus hochreguliert. Im **zweiten Teil** der Arbeit wurde die Expression von Phospho-mTOR in einer Kohorte von 83 Ovarialkarzinomen mittels **Immunhistochemie** untersucht. Die Analyse der Phospho-mTOR-Expression und Korrelation mit klinisch-pathologischen Daten ergab einen Zusammenhang zwischen vermehrter Phospho-mTOR-Expression und einem verbesserten Gesamtüberleben der Patientinnen im Vergleich zu denjenigen ohne eine Phospho-mTOR-Expression (p=0.003, logrank-Test).

Insgesamt sind die Studien ein Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und Progression, um letztlich neue und molekular definierte individualisierte Therapien abzuleiten. Die Ergebnisse dieser Arbeit regen zu weiteren Untersuchungen des mTOR-Signalweges an. Hierbei könnten Untersuchungen mit kombinierter Gabe von Rapamycin und Zytostatika interessante Ansätze für neue therapeutische Konzepte darstellen. Durch das Verstehen der genauen Wirkungsweisen und Folgen von Rapamycin im Signalweg könnten Biomarker gefunden werden, die prädiktiv diejenigen Patientinnen identifizieren, welche von einer spezifischen Therapie profitieren werden.
#### 8. Abstract

Ovarian cancer has the highest mortality-rate of all gynaecological tumours. The therapy of ovarian cancer is based on surgery and chemotherapy. A long-term remission is reached for no more than 15-20% of all treated patients.

Current research projects investigate alterations of the molecular mechanisms in the tumour tissue in order to develop new molecular and individual therapy strategies. Rapamycin and its analogues are promising and potential agents in anticancer therapy. The cascade of translation initiation is interrupted by the binding of Rapamycin to the enzyme mTOR.

The aim of the present study was to investigate the effect of Rapamycin on cell proliferation and the mTOR-pathway in ovarian carcinoma cell lines. The phospho mTOR expression in carcinoma-tissue was analysed.

Cell culture experiments on three ovarian carcinoma cell lines represent the first part of this study. A significant inhibition of the cell proliferation after treatment with Rapamycin in all cell lines was observed by XTT-test: in OVCAR-3 up to 63% (p<0,0041 after 72 hours of treatment, p<0,019 after 6 days of treatment), in SK-OV-3 up to 48% (p<0,02 after 72 houres and 6 days of treatment) and in A 27/80 up to 53% (p<0,006 after 72 houres of treatment, p<0,022 after 6 days of treatment). The FACS analysis showed a cell cycle arrest at the G1 phase as a result of Rapamycin treatment. This fact might be the reason for the previously described inhibition of proliferation. Increased apoptosis or necrosis was not recognised by FACS-analysis.

The expression of different proteins belonging to the mTOR pathway was examined by western blot after Rapamycin incubation. The result was a reduced expression of phospho mTOR in all three cell lines. The same phenomenon was found for the downstream protein 4E-BP1. An upregulation of phospho AKT was shown in all three cell lines after Rapamycin treatment. The protein AKT is localised upstream of mTOR and its upregulation might be explained by mTOR in a compensatory mechanism.

The second part of this study investigated the expression of phospho mTOR in a cohort of 83 ovarian carcinomas using immunohistochemistry. The analysis of the phospho mTOR expression and correlation to clinicopathological data could show a relationship between elevated phospho mTOR expression and a better overall survival in comparison to patients without phospho mTOR expression (p=0.003, log-rank-test).

Taken together, these studies are a contribution to the understanding of the molecular mechanisms of tumour development and progression, and they might help to create new and molecularly defined and individualised therapy modalities. The findings of the present study are a motivation for further experiments on the mTOR signalling pathway. Treatment with Rapamycin in combination with cytostatics could be an interesting approach for new therapeutic strategies. Understanding the exact function and consequences of Rapamycin application in the mTOR pathway could help to find biological markers for the predictive identification of those patients who will benefit from a specific therapy.

#### Literatur

- <u>Aguirre et al., 2004</u> Aguirre D, Boya P, Bellet D, Faivre S, Troalen F, Benard J, Saulnier P, Hopkins-Donaldson S, Zangemeister-Wittke U, Kroemer G, Raymond E, Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. Apoptosis; <u>2004</u>; *9*: <u>797-805</u>.
- <u>Altomare et al., 2004</u> Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, De Rienzo A, Klein-Szanto AJ, Godwin AK, Testa JR, AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer. Oncogene; <u>2004</u>; 23: <u>5853-57</u>.
- <u>Altomare et al., 2005</u> Altomare DA, Testa JR, Pertubations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene; 2005; 24: 7455-64</u>.
- AWMF Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften; Interdisziplinäre Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe [Informationszentrum für Standards in der Onkologie - ISTO], Leitlinie Onkologie/Gynäkologie; Maligne Ovarialtumoren. AWMF online: www.awmf.de,
- <u>Bae-Jump et al., 2006</u> Bae-Jump VL, Zhou C, Gehrig PA, Whang YE, Boggess JF, Rapamycin inhibits hTERT telomerase mRNA expression, independent of cell cycle arrest. Gynecol Oncology; <u>2006</u>; 3: <u>487-94</u>.
- Bjornsti et al., 2004 Bjornsti MA, Houghton PJ, The TOR pathway: a target For cancer therapy. Nature; 2004; 4: 335-48.
- <u>Böcker et al., 2004</u> Lax S, Dietel M, Löning T, Böcker W, Weibliche Geschlechtsorgane, Ovar, Tumoren. Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie; <u>3.</u>: München, Urban und Fischer, <u>2004</u>; <u>909-18</u>. 3-437-42381-9.
- Castellvi et al. 2006 Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, Ramon y Cajal S, Phosphorylated 4E Binding Protein 1: A Hallmark of Cell Signaling That Correlates With Survival in Ovarian Cancer. Cancer; <u>2006</u>; *107*: <u>1801-11</u>.
- <u>Chen et al., 2004</u> Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Lee PH, Chang KJ, Expression of eukaryotic initiation factor 4E in gastric adenocarcinoma and its association with clinical outcome. Surgical Oncology; <u>2004</u>; 86: <u>22-7</u>.

- <u>Cheng et al., 1992</u> Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Tauguchi T, Franke TF, Hamilton TC,
  Tsichlis PN, Testa JR, AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serin/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas.
  Medical Sciences; <u>1992</u>; 89: <u>9267-71</u>.
- <u>Crew et al., 2000</u> Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, Cranston DW, de Benedetti A, Harris AL, Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumor progression. British Journal of Cancer; <u>2000</u>; 82: <u>161-6</u>.
- <u>de Graffenried et al., 2004</u> de Graffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, Roth RA, Hidalgo M, Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer with aberrant AKT Activity. Clin Cancer Res; <u>2004</u>; *10*: <u>8059-67</u>.
- <u>de Graffenried et al. (2), 2004</u> de Graffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray
  RB, Hidalgo M, Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/ Akt pathway. Ann Oncol.; <u>2004</u>; 15: <u>1510-6</u>.
- <u>Dilling et al., 2002</u> Dilling MB, Germain GS, Dulkin L, Jayaraman AL, Zhang X, Harwood FC, Houghton PJ, 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. The Journal of Biological Chemistry; <u>2002</u>; 277: <u>13907-17</u>.
- Gao et al., 2004 Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH, G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. Physiol Cell Physiol; 2004; 287: 281-91.
- <u>GBE des Bundes, 2006</u> Statistische Landesämter, Diagnosedaten der Krankenhäuser (Eckdaten der vollstationären Patientinnen), Deutschland, ICD10:C56, Bösartige Neubildung des Ovars. Statistisches Bundesamt, Robert-Koch-Institut: Gesundheitsberichterstattung des Bundes; <u>2006</u>; www.gbe-bund.de.
- <u>Gingras et al., 2001</u> Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N, Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. Genes and Develppment; <u>2001</u>; *15*: <u>2852-64</u>.

- <u>Guertin et al., 2005</u> Guertin DA, Sabatini DM, An expanding role for mTOR in cancer. TRENDS in Molecular Medicine; <u>2005</u>; *Vol.11 No.8*: <u>353-61</u>.
- Hay et al., 2004 Hay N, Sonenberg N, Upstream and downstream of mTOR. Genes and Development; 2004; 18: 1926-45.
- Huang et al., 2003 Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ, Rapamycins Mechanism of Action and Cellular Resistence. Cancer Biology and Therapy; <u>2003</u>; *2:3*: <u>222-32</u>.
- Jemal et al, 2007 Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ, Cancer Statistics, 2007. CA Cancer J Clin; 2007; 57: 43-66.
- <u>Jiang et al., 2006</u> Jiang H, Feng Y, Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer. Gynecol Cancer; <u>2006</u>; *16*: <u>405-12</u>.

Kaufmann et al., 1996 Kaufmann M, Costa S, Schmid H, von Minckwitz G,

Das OvarialKarzinom. Deutsches Krebsforschungszentrum: Empfehlungen für eine standartisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge; www.dkfz.de, <u>1996, 04/2006</u>;

- <u>Kelland, 2005</u> Kelland LR, Emerging drugs for ovarian cancer. Expert Opin Emerg Drugs; <u>2005</u>; *10*: <u>413-24</u>.
- Law, 2004 Law BK, Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant?. Oncology / Hematology; 2005; 56: 47-60.
- Mayerhofer et al., 2005 Mayerhofer M, Boehm A, Aichberger KJ, Esterbauer H, Derdak S, Piekl
  WF et al., In vitro and in vivo antileukemic effects of the mTOR-targeting drug rapamycin in patients with imatinib-resistant CML. Blood; 2005; 106: abstr.4834
- Mc Clusky et al., 2005 Mc Clusky DR, Chu Q, Yu H, De Benedetti A, Johnston LW, Meschonat C, Turnage R, Mc Donald JC, Abreo F, Li BDL, A Prospective Trial on Initiation Factor 4E (eIF4E) Overexpression and Cancer Recurrence in Node-Positive Breast Cancer. Annals of Surgery; 2005; 242: 584-92.
- Nathan et al., 2000 Nathan CA, Sanders K, Abreo FW, Nasser R, Glass J, Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF-4E in larynx cancers: prognostic implications. Cancer Resarch; 2000; 60: 3599-604.
- <u>Nathan et al., 2004</u> Nathan CA, Amirghahari N, Abreo F, Rong X, Caldito G, Jones ML, Zhou H, Smith M, Kimberly D, Glass J, Overexpressed eIF4E Is Functionally Active in Surgical

Margins of Head and Neck Cancer Patients via Activation of the Akt/Mammalian Target of Rapamycin Pathway. Clinical Cancer Research; <u>2004</u>; *10*: <u>5820-7</u>.

- Noske et al., 2006 Noske A, Kaszubiak A, Weichert W, Sers C, Niesporek S, Koch I, Schaefer B, Sehouli J, Dietel M, Lage H, Denkert C, Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: Increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. Cancer Letters; 2006; 1-11.
- Parker et al., 2004 Parker A, Anderson C, Lancaster Weiss K, Grimley M, Sorrells D,
  Eukaryotic Initiation Factor 4E Staining as a Clinical Marker in Pediatric Neuroblastoma.
  Pediatric Hematological Oncology; 2004; 26: 484-7.
- Prat et al., 2005 Prat J, Ribé A, Alberto G, Heriditary ovarian cancer. Human Pathology; <u>2005</u>; <u>36</u>: <u>861-70</u>.
- <u>Remmele et al., 1987</u> Remmele W, Stegner HE, Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. Pathologe; <u>1987</u>; 8: <u>138-40</u>.
- <u>Richardson et al. 2005</u> Richardson A, Kaye SB, Drug resistance in ovarian cancer: The emerging importance of gene transcription and spatio-temporal regulation of resistance. Drug Resistance Updates; <u>2005</u>; 8: <u>311-21</u>.
- <u>Rosenwald 2004</u> Rosenwald IB, The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. Oncogene; <u>2004</u>; 23: <u>3230-47</u>.
- Sabatini, 2006 Sabatini M, mTOR and Cancer: insights into a complex relationship. Cancer; 2006; 6: 729-34.
- Scudiero et al., 1988 Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR, Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. Cancer Research; 1988; 48: 4827-33.
- <u>Sehgal, 2003</u> Sehgal SN, Sirolimus:its discovery, biological properties, and mechanisms of action. Transplant Proc; <u>2003</u>; 35: <u>7S-14S</u>.
- Shi et al., 1995 Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB, Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. Cancr Res.; 1995; 55: 1982-8.

- Shih et al., 2003 Shih le-M, Kurman RJ, A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. American Journal of Pathology; <u>2004</u>; *164*: <u>1511-8</u>.
- Smolewski, 2006 Smolewski P, Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. Anti-Cancer Drugs; 2006; 17: 487-94.
- Tao et al., 2002 Tao L, Zhou L, Zheng L, Gao Y, Study on the expression of proto-oncogene eIF4E in laryngeal squamous carcinoma. Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi; 2002; 16: 62-4.
- Tee et al., 2005 Tee AR, Blenis J, mTOR, translational control and human disease. Seminars in Cell and Developmental Biology; 2005; 16: 29-37.
- <u>Treeck et al., 2006</u> Treeck O, Wackwitz B, Haus U, Ortmann O, Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells. Gynecologic Oncology; <u>2006</u>.
- <u>Vignot et al., 2005</u> Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E, mTOR-targeted therapiy of cancer with rapamycin derivates. Annals of Oncology; <u>2005</u>; *16*: <u>525-37</u>.
- <u>Wu et al., 2005</u> Wu C, Wangpaichitr M, Feun L, Kuo MT, Robles C, Lampidis T, Savaraj N,
  Overcoming cisplatin resistence by mTOR inhibitor in lung cancer. Mol Cancer; 2005; 4:
  <u>25</u>.

www.ovariancancer.org Ovarian Cancer. Http://www.ovariancancer.org,

- Xia et al., 2003 Xia LP, Xu GP, Zeng ZY, Rao HL, Zeng J, Hou JH, Correlation between prognosis and the expression of eukaryotic translation initiation factor 4E in surgical margin specimen of laryngeal squamous cell. Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi; 2003; *38*: <u>139-42</u>.
- <u>Zhou et al., 2004</u> Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, Yang W,
  <u>Smith TL, Shi D, Yu D, Activation of the Akt/Mammalian Target of Rapamycin/4E-BP1</u>
  Pathway by ErbB2 Overexpression Predicts Tumor Progression in Breast Cancers.
  Clinical Cancer Research; <u>2004</u>; *10*: <u>6779-88</u>.

# Anhang

### Persönliche Angaben

Name:	Juliane Lena Lindenberg
Geburtsdatum / -ort:	10. Juni 1979 / Berlin
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulabschluß:	allgemeine Hochschulreife

## Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wir aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

### Erklärung an Eides Statt

Ich, Juliane Lena Lindenberg, geboren am 10.06.1979, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Untersuchung der Regulation und der prognostischen Bedeutung des mTOR-Signalweges in Ovarialkarzinomen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

#### Danksagung

Hiermit möchte ich meine Freude über die endgültige Fertigstellung dieser Arbeit verkünden, auch wenn das "geopferte" Jahr und die nachfolgenede mühsame Korrekturphase viele schöne Momente, interessante Eindrücke und Erfahrungen und neue Freunde in meinem Leben bescheerte.

Mein erster Dank gilt Carsten Denkert, der mir als Dr. Vater das Thema dieser Arbeit anvertraut hat und mir auch als Betreuer stets mit gutem Rat zur Seite stand. Aurelia Noske danke ich sehr für die Betreuung, dafür dass sie mich nicht müde werdend motivierte und jederzeit bei Problemen erreichbar war. Vielen Dank auch an Silvia Niesporek für die wertvollen Ratschläge bei den Korrekturen!

Die praktischen Fertigkeiten, vom anfangs sehr grobmotorischen Pipettieren bis zum Ausführen komplex geschachtelter Versuchsanordnungen, erlernte ich unter der fürsorglichen Obhut aller Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe. Insbesondere möchte ich Ines Koch, für die geduldige Einarbeitung danken und dafür, dass sie mir immer und unverzüglich bei aufkommenden Problemen Hilfe bot. Auch Petra Wachs und Lisa Glanz konnte ich jederzeit mit Fragen überrumpeln. Wilko Weichert danke ich für die Einarbeitung in die verwendeten Softwareprogramme. Und für die stets motivierenden und auflockernden Gespräche, die Tee-Sessions mit immer neuen Geschmacksrichtungen und den Austausch über das Problem mit den Markern in der -80°C-Truhe im Keller danke ich Annika Röske und Bruno Sinn.

Meinen Eltern Ursula und Günter gilt der besondere Dank, dass sie mir dieses zusätzliche Promotions-Jahr überhaupt ermöglichten.

Thom danke ich für die Unterstützung und Aufmunterung bei zwischenzeitigen Motivationstiefs, Korrekturlesen dafür, Zeit fürs und dass er mir in dieser beiseite stand. Wendy danke ich für ihre treue, lebenslange Freundschaft und viele weitere an dieser Stelle nicht namentlich erwähnten lieben Freunde sorgten für erfrischende Ablenkungen um nicht zu vergessen, dass es neben dem Kosmos Labor viele andere schöne Dinge im Leben zu entdecken gibt. Erinnerungen sagen mehr als niedergeschriebene Worte.