

mTOR-Inhibition als Therapieansatz zur Behandlung von Meningeomen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalis

(Dr. rer. nat)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Doreen Pachow
geb. 05.08.1980 in Hoyerswerda

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. C. Mawrin
Prof. Dr. med. M. Nakamura

Eingereicht am: 23. Februar 2015

Verteidigt am: 02. Juli 2015

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. habil. Christian Mawrin, für die Überlassung des Dissertationsthemas. Durch seine hervorragende Unterstützung und sein persönliches Engagement bei der Betreuung dieser Arbeit sowie seine konstruktiven Anmerkungen und Hinweise und nicht zuletzt seine jederzeitige Diskussionsbereitschaft hat er entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Ebenso geht mein Dank an Prof. Dr. rer. nat. habil. Elmar Kirches, der mich zu jeder Zeit mit seinem unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets in neue Sphären gelenkt hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Mitdotorandin Nadine Kliese sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuropathologie für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen, weshalb ich mich bei allen herzlich bedanken möchte.

Für die Durchführung der MRT-Aufnahmen danke ich dem Team um Prof. Dr. Frank Angenstein vom Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) Magdeburg - Funktionelles Neuroimaging. Vor allem danke ich Karla Krautwald und Cornelia Helbing für die nette Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei dem Team um Prof. Dr. Oliver Stork vom Institut für Biologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, der meiner Kollegin und mir das Verfahren der intrakraniellen Applikationen von Zellen näher brachte und die Räumlichkeiten für die Operationen zur Verfügung stellte.

Da PCR-System und Software am Kapillarsequenzier des Instituts nicht etabliert waren, danke ich Frau Dr. rer. nat. Juliane Sanft vom Rechtsmedizinischen Institut der Universität Jena für die Durchführung der Analysen.

Ich danke der Deutschen Krebshilfe für die finanzielle Unterstützung des Projektes. (Förderkennzeichen: 108987)

Bei meiner Familie möchte ich mich besonders für die Ausdauer, Ruhe und Geduld bedanken, womit sie mir stets zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben und auch in schweren Zeiten mir dabei half meine Ziele zu verfolgen.

Schließlich und keineswegs zuletzt möchte ich meinem Freund Elmar ganz herzlich danken. Er hat nicht nur unermüdlich und akribisch Kapitel für Kapitel Korrektur gelesen, sondern wusste mich in den richtigen Momenten zu motivieren, war für mich da und hat immer an mich geglaubt. Danke!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 mTOR - zentraler Regulator zellulärer Prozesse.....	1
1.1.1 mTOR-Komplex 1 - der Hauptknotenpunkt der Signalübertragung	3
1.1.2 mTOR-Komplex 2 wichtiger Regulator des Zytoskeletts	5
1.2 Die Bedeutung von mTOR für die Tumorgenese	6
1.3 mTOR-Inhibitoren in der klinischen Anwendung	8
1.4 Neue Generation von mTOR-Inhibitoren.....	10
1.5 Meningeome als untertherapierte Entität	11
2 Zielstellung der Arbeit	15
3 Material	16
3.1 Zellkulturlinien	16
3.2 RT-PCR Primer	17
3.3 Antikörper	18
3.4 Kit-Systeme und Fertiglösungen.....	19
3.5 Puffer und Lösungen	19
3.6 Feinchemikalien.....	22
3.7 Geräte	25
3.8 Verbrauchsmaterialien.....	27
4 Methoden	29
4.1 Zelllinien	29
4.2 Kultivierung der Zellen	29
4.3 Auftauen und Einfrieren der Zellen	30
4.4 Transwell®-Invasions Assay.....	30
4.5 Mikrotiter Tetrazolium Test (MTT-Test).....	31
4.6 Proliferationstest mit 5-Brom-2-deoxyuridin (BrdU).....	33
4.7 Spalt-Assay	34
4.8 Gesamt-RNA Isolierung aus kultivierten Zellen mit Trizol	35
4.9 Gesamt-RNA Isolierung aus Gewebe mit Trizol.....	36
4.10 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	36

4.11	Quantitative PCR (Real time PCR)	37
4.12	Proteinextraktion aus Zellkulturen und Kryogewebe	39
4.13	Konzentrationsbestimmung	40
4.14	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
4.15	Western blotting	41
4.16	Die immunologische Detektion von Proteinen	42
4.17	Xenograft-Meningeommausmodelle	43
4.17.1	Subkutanes Meningeommausmodell	43
4.17.2	Orthotopes Meningeommausmodell	43
4.17.3	Behandlung mit Temsirolimus	44
4.18	Humanes Probenmaterial und immunhistochemische Analysen	45
4.18.1	Untersuchtes Gewebe	45
4.18.2	Detektion der Proliferationsaktivität mittels Ki-67	47
4.18.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	48
4.19	Statistik	49
5	Ergebnisse	50
5.1	Expression und Aktivierungszustand von Komponenten des mTORC1-Signalwegs in Meningeomen	50
5.2	mTOR-Inhibition <i>in vitro</i>	56
5.3	Auswirkung von Temsirolimus auf die Zellmigration	60
5.4	Wirkung additiver Radiatio auf Temsirolimus-behandelte Meningeomzellen	62
5.5	mTORC1 Inhibition in Meningeom-Zelllinien in Abhängigkeit von Merlin	64
5.6	Wachstumshemmung von Meningeomen durch Temsirolimus-Behandlung <i>in vivo</i>	67
5.6.1	Subkutanes Meningeommausmodell	67
5.6.2	Orthotopes intrakranielles Meningeommausmodell	72
6	Diskussion	77
6.1	Sind Meningeome untertherapiert?	77
6.2	Darstellung von Meningeomen in Mausmodellen	80
6.3	Limitation von mTORC1-Inhibitoren bei intrakraniellen Tumoren	83
6.4	Spielt <i>NF2</i> eine Rolle für mTOR-Signalwege?	86
6.5	Ausblick	88
	Zusammenfassung	91
	Quellenverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

Λ	Lambda
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
A	Österreich
Akt	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATG1	Autophagy related Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BBRS	Bannayan-Ruvalcaba-Riley Syndrom
BE	Belgien
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CH	Schweiz
Cu ²⁺	Kupferionen
D	Deutschland
D	Tag
DAB+	Diaminobezidin
DEPC	Diethylcarbonat
Deptor	DEP-domain-containing mTOR interacting protein
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeccos' Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPS	Nikleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescent Substrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal regulated Kinase
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
EtOH	Ethanol
FBS	fetales Kälberserum
FKBP12	FK506bindendes-Protein
FOXO	Forkhead-Box Protein O3

FR	Frankreich
FRB	FKBP12-Rapamycin-bindende Domäne
G	Gramm
GMB	Glioblastoma multiforme
GTP	Guanintriphosphat
H	Stunde
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
HU	Hydroxyharnstoff
IL	Illinois
i.p.	intraperitoneal
IRS1	Insulin Rezeptor Substrat 1
JP	Japan
Kg	Kilogramm
LKB1	Leber Kinase B1
M	Mol
MA	Massachusetts
mA	Milliamper
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mM	Millimol
mm	Millimeter
MO	Missouri
mRNA	Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mSIN1	mammalian stress activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mammalian target of Rapamycin
mTORC	mTOR Komplex
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NF1	Neurofibromin 1
NF2	Neurofibromin 2 = Merlin
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer

OH	Hydroxygruppe
P	phospho
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
PHTS	PTEN Hamartoma Tumor Syndrome
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIKK	phosphatidylinositol kinase-related kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKC- α	Protein Kinase C alpha
PRAS40	40 kDa Prolin-Rich Akt Substrate
PRR5	Proline-Rich Protein 5
PS	Penicillin/Streptomycin
PTEN	Lipid-Phosphatase und Tensin Homolog deletiert auf Chromosom 10
Rac1	Ras-related C3 botulinium toxin substrate 1
Ras	G-Protein Ras
Raptor	regulatory associate protein of mTOR
Rheb	Ras Homolog enriched in Brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RIPA Puffer	Puffer für Radioimmunopräzipitations Assays
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese
SEGA	subependymale giant cell Astrocytoma (Riesenzell-Astrozytom)
SEN	subependymale Nodien
S.E.M.	Standardfehler
Ser	Serin
SGK1	Serum and glucocorticoid-regulated Kinase 1
S6K1	Ribosomal protein S6 Kinase beta 1
TBS	Tris gepufferte Lösung
Thr	Threonin
TOR	target of Rapamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Tuberous sclerosis Komplex
TSC1	Tuberous sclerosis 1 = Hamartin
TSC2	Tuberous sclerosis 2 = Tuberin
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten Amerika

V	Volt
vs.	versus
w/v	weight per volume
WHO	Weltgesundheits-Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktionswege von mTORC1 und mTORC2 [11].....	2
Abbildung 2: Immunhistochemische Darstellung von mTOR-Signalproteinen anhand eines Gewebe-Microarrays.....	52
Abbildung 3: Expressionsanalysen von Meningeomen unterschiedlicher Malignitätsgrade.....	53
Abbildung 4: Western Blots ausgewählter Meningeomproben.....	54
Abbildung 5: Western Blots des Phosphorylierungsgrads von p70S6K vor und nach Temsirolimus-Behandlung.....	55
Abbildung 6: Western Blot humaner Meningeom-Zelllinien	55
Abbildung 7: Dosisabhängige Wirkung von Temsirolimus auf IOMM-Lee-Zellen.....	57
Abbildung 8: Dosisabhängige Wirkung von Temsirolimus auf die Zellviabilität	58
Abbildung 9: Dosisabhängige Wirkung von Rapalogen auf die Proliferation von Zellen	59
Abbildung 10: Migrationshemmung von IOMM-Lee Zellen durch Temsirolimus-Behandlung.....	61
Abbildung 11: Migrationsverhalten von IOMM-Lee-Zellen unter Temsirolimus-Behandlung im Transwell®-Assay.....	62
Abbildung 12: Wirkung additiver Radiation auf Temsirolimus-behandelte Meningeomzellen	63
Abbildung 13: Western Blot der Merlin-Expression in NF2-defizienten Zelllinien.....	64
Abbildung 14: Dosisabhängige Wirkung von Rapalogen auf die Zellviabilität von MenII-1 und MenII-1-shNF2.....	65
Abbildung 15: Dichteabhängige Zellviabilität von MenII-1 und MenII-1-shNF2 unter mTOR-Inhibition	67
Abbildung 16: Tumorprogression im subkutanen Meningeommausmodell.....	69
Abbildung 17: Reduktion der Tumorgewichte durch Temsirolimus-Behandlung im subkutanen Meningeommausmodell	70
Abbildung 18: HE- und Ki-67-Färbung von explantierten subkutanen Maustumoren...71	
Abbildung 19: Western Blots explantierter subkutaner Maustumore	72
Abbildung 20: Tumorprogression im intrakraniellen Meningeommausmodell	74
Abbildung 21: Western Blots explantierter intrakranieller Maustumore.....	75
Abbildung 22: Tumorprogression im intrakraniellen Meningeommausmodell mit der Zelllinie KT21	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturlinien	16
Tabelle 2: Primer.....	17
Tabelle 3: Antikörper	18
Tabelle 4: Kit-Systeme und Fertiglösungen.....	19
Tabelle 5: Feinchemikalien.....	22
Tabelle 6: Geräte	25
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der Auswertung immunhistochemischen Färbung	51

1 Einleitung

1.1 mTOR - zentraler Regulator zellulärer Prozesse

Aus Bodenproben der Osterinsel, in der Sprache der Einheimischen auch Rapa Nui genannt, isolierten Wissenschaftler in den 70er des vergangenen Jahrhunderts den Bakterienstamm *Streptomyces hygroscopicus*. Diese Bakterien produzieren ein makrozyklisches Lacton, welches nach seinem Entdeckungsort Rapamycin benannt wurde. Erste wissenschaftliche Untersuchungen zeigten, dass sich Rapamycin wachstumshemmend auf Hefen, wie zum Beispiel *Candida albicans* auswirkt, jedoch nur eine sehr geringe antibakterielle Wirkung aufweist [1]. Heitmann *et al.* gelang 1991 [2] die Identifizierung des Rapamycin-Zielproteins in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bei Untersuchungen zeigte sich, dass Mutationen in den Proteinen TOR1-1 und TOR2-1 zu einer Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von Rapamycin führten [2]. Die Bezeichnung **TOR** wird vom englischen **T**arget **o**f **R**apamycin abgeleitet. Eukaryotische TORs sind große Proteine (280 kDa), die der Gruppe der PIKKs (*phosphatidylinositol kinase-related kinase*) zugeordnet werden. Mitglieder dieser Familien haben an ihrem Carboxylende eine Serin/Threonin Protein-Kinase-Domäne ähnlich der katalytischen Domäne von Phosphatidylinositol-3 Kinasen (PI3K) und PI4K [3]. Rapamycin bildet mit dem Protein FKBP12 (FK506 binding protein) einen Komplex, welcher aminoterminal zur Kinase-Domäne an TOR bindet. Findet in dieser Region ein Austausch einzelner Aminosäuren statt, erhält man TOR-Proteine, die nicht länger in der Lage sind den FKBP12-Rapamycin-Komplex zu binden und daher nicht mehr über diesen Mechanismus inhibiert werden können [3]

Im Jahr 1994 gelang Sabatini *et al* dann die Identifizierung des Rapamycin-Zielproteins in Säugetierzellen, genannt mTOR (*mammalian target of Rapamycin*) [4]. Einen weiteren Durchbruch auf dem Gebiet der TOR-Forschung brachte die Entdeckung, dass TOR zwei unterschiedliche Multi-Protein-Komplexe bildet: zum einen den Rapamycin-sensitiven TOR-Komplex 1 (TORC1 bzw. mTORC1) und zum anderen den Rapamycin-insensitiven TOR-Komplex 2 (TORC2 bzw. mTORC2). Beide

1.1.1 mTOR-Komplex 1 - der Hauptknotenpunkt der Signalübertragung

Der Rapamycin-sensitive mTOR-Komplex 1 wurde bisher am ausführlichsten charakterisiert. Der mTORC1-Signalweg kombiniert die Inputs von mindestens fünf intra- und extrazellulären Faktoren: Wachstumsfaktoren, Stress, Energiestatus, Sauerstoffkonzentration und Aminosäuren, und koordiniert dadurch viele wichtige anabolische Prozesse, einschließlich der Protein- und Lipid-Synthese, ribosomale Biogenese und Autophagozytose [12-15]. Somit stellt mTORC1 einen Hauptknotenpunkt der Signalübertragung dar, der durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert wird.

Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Insulin und IGF-1 (*insulin like growth factor 1*), regen über den Insulin- bzw. IGF-1-Rezeptor, den PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*)/Akt (*protein kinase B*) Signalweg an [12] (siehe Abbildung 1). Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert PIP₂ (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat*) an der 3'-OH Position und generiert damit den sekundären Botenstoff PIP₃ (*Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat*). PIP₃ rekrutiert anschließend Proteine, die eine PH (*Pleckstrin-Homology*)-Domäne aufweisen, wie PDK1 (*phosphatidylinositol-dependent kinase-1*) und Akt, an die Plasmamembran. Durch diese Annäherung wird die Phosphorylierung von Akt durch PDK1 ermöglicht [16]. Das Protein PTEN (*lipid phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) ist in der Lage, mittels Dephosphorylierung PIP₃ wieder in PIP₂ umzuformen und stellt dadurch einen zentralen negativen Regulator der PI3-Kinase dar. Frühere Studien bewiesen, dass Zellen mit PTEN-Verlust nicht mehr in der Lage sind auf Signale von Wachstumsfaktoren zu reagieren. Dennoch bleibt die Fähigkeit erhalten, Veränderungen des intrazellulären Energiehaushalts durch LKB1 (*serine threonine kinase 11*) und AMPK (*AMP activated kinase*) wahrzunehmen [17]. Diese Zellen zeigen zudem eine konstitutive Aktivierung des Akt-Signalwegs, welche downstream gelegene Zielproteine beeinflusst und sich damit auf die Angiogenese, den Zellzyklus, sowie auf die Invasion, die Proliferation und das Überleben der Zelle auswirkt und somit die Tumorgenese begünstigt [17].

Die Phosphorylierung von PDK1 aktiviert Akt und führt zur Phosphorylierung weiterer Schlüsselproteine, wie dem TSC (*tuberous sclerosis*

complex). Der TSC besteht aus den Proteinen Hamartin (TSC1) und Tuberin (TSC2) [18]. Während Hamartin den TSC-Komplex stabilisiert, wird das Tuberin durch Akt phosphoryliert und inaktiviert. Tuberin fungiert als GTPase-aktivierendes Protein für die kleine GTPase Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). Im Normalfall inhibiert Tuberin Rheb, indem es die GTPase in den inaktiven GDP-gebundenen Zustand konvertiert. Dies verhindert, dass Rheb mit mTORC1 interagiert und den Komplex aktiviert [19]. Von daher zeigen Zellen, die keinen Tuberin-Hamartin-Komplex haben, eine gesteigerte Rheb-Aktivität und daraus resultierend eine mTORC1-Aktivierung [20].

Der aktivierte mTOR-Komplex 1 reguliert die ribosomale Translation und Proteinbiosynthese durch Phosphorylierung der Schlüsselkomponenten S6K1 (*S6 Kinase 1*) und 4E-BP1 (*4E-bindendes Protein 1*). Wird 4E-BP1 phosphoryliert, wird der Translations-Initiationsfaktor eIF-4E freigesetzt und stimuliert die Cap-abhängige RNA-Translation [21]. S6K1 reguliert die Initiationsfaktoren der Translation während der Proteinbiosynthese und koordiniert die Ribosomen-Biogenese, um eine effiziente Translation zu gewährleisten [22].

Einen wichtigen Aspekt in der Regulierung von mTORC1 stellt die sogenannte negative Rückkopplungsschleife dar. Liegen mTORC1 und S6K1 überaktiviert in der Zelle vor, phosphorylieren sie das IRS1 (*Insulin-Rezeptor Substrat 1*) im Insulin-Signalweg. IRS1 ist ein intermediäres Molekül, das den Abstand zwischen Insulin-Rezeptor und PI3-Kinase durch direkte Bindung überbrückt [23, 24]. Aktiviertes S6K1 phosphoryliert IRS1 an vielen verschiedenen Aminosäureresten und bewirkt somit dessen Hemmung. Dies zieht dessen Degradierung nach sich [25]. O'Reilly *et al.* konnte zeigen, dass in verschiedenen Tumorzelllinien die Hemmung des mTORC1 durch Rapamycin zu einer Hochregulierung der Proteinmenge von IRS1 führt. Dadurch wird die Phosphorylierung von Akt induziert, was wiederum die Proteinkinase aktiviert und somit die Signalweiterleitung bedingt [26]. Es zeigte sich, dass diese paradoxe Akt-Aktivierung abhängig von der Dosierung ist. In diesem Zusammenhang gelang es darzulegen, dass niedrige Rapamycin-Dosen die Akt-Aktivierung steigern, wohingegen hohe Dosen die Akt-Aktivität verringern [27, 28].

1.1.2 mTOR-Komplex 2 wichtiger Regulator des Zytoskeletts

Im Vergleich zu den im vorangegangenen Abschnitt erläuterten Aufgaben von mTORC1 sind die Funktionen des mTOR-Komplexes 2 (mTORC2) weniger gut charakterisiert. Unterschiedliche Studien zeigen, dass mTORC2 an Regulation der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und des Zellzyklus beteiligt ist (**Abbildung 1**). Der Komplex ist nicht im oben dargelegten Sinne Rapamycin-insensitiv, jedoch wird durch eine verlängerte Rapamycin-Exposition verhindert, dass sich der Komplex zusammenfügt [29]. Obwohl die Signaltransduktionswege über mTORC2 weniger gut erforscht sind, lässt die Phosphorylierung von Akt an der Stelle Ser⁴⁷³ durch mTORC2 den Schluss zu, dass mTOR-Komplexe sowohl oberhalb, als auch unterhalb von Akt in den Signaltransduktionsketten agieren [30]. mTORC2 aktiviert Akt zum einen über post-translationale Modifikation an der Stelle Ser⁴⁷³ des hydrophoben Motivs [30] und zum anderen bei der Bildung des Proteins durch Phosphorylierung des Turn-Motivs an der Stelle Thr⁴⁵⁰, während das Polypeptid noch mit dem Ribosom verbunden ist [31]. Die co-translationale Modifikation des Proteins Akt am Ausgang des Ribosomentunnels deutet darauf hin, dass mTORC2 ebenfalls eine Rolle in der Proteinbiosynthese und –reifung spielt, ein Prozess der bisher zu großen Teilen mTORC1 zugesprochen wurde [22, 31, 32].

Knockdown-Experimente für mTOR, Rictor, mLST8, aber nicht für Raptor, resultierten in einer verminderten Aktivierung von Rac1 (*Ras-related C3 botulinium toxin substrate 1*) und einer defekten Aktin-Reorganisation. Rac1 ist eine GTPase und wird als Antwort auf Wachstumsfaktorstimuli sowohl assoziiert mit mTORC1, als auch mTORC2 vorgefunden [33]. Wie dies genau die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst, ist noch nicht bekannt. Eine andauernde Rekrutierung und Aktivierung von Rac1 könnte jedoch die Synthese von PIP₃ steigern und damit die Neuordnung von Aktin bewirken [33]. Da Rapamycin die Leucin-induzierte Zellwanderung nicht zu beeinflussen scheint, wird angenommen, dass mTORC2 eher in diesen Prozess involviert ist, als mTORC1 [34]. Studien, die mTORC2 mit der Zellmigration und Metastasenbildung bei Krebserkrankungen in Verbindung bringen, stützen die These, dass mTORC2 eine wichtige Rolle für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielt [35]. Gliom-Zelllinien mit einer Rictor-Überexpression

und gesteigerten mTORC2 Aktivität zeigten eine erhöhte Expression der Integrine $\beta 1$ und $\beta 3$ und verstärkte Motilität [36].

Des Weiteren phosphoryliert und aktiviert mTORC2 die Kinasen SGK1 (*serum- and glucocorticoid-inducible kinase*) und PKC- α (proteine kinase C-alpha). Diese beiden Proteine sind essentiell für das Überleben der Zelle, für die Regulierung der Zellzyklus-Progression und für anabole Prozesse innerhalb des Zellzyklus' [32, 37, 38].

Die bereits im vorangegangenen Abschnitt beschriebene negative Feedbackschleife, die bei mTORC1-Inhibierung via S6K IRS1 phosphoryliert, ist in der Lage die Insulin-Signalgebung abzuschwächen [25, 39] und demzufolge die PI3K-abhängige mTORC2-Signalgebung zu inhibieren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die mTORC1-Inhibierung zu einer mTORC2-Aktivierung führen kann. Dies ist ein Indiz für die Komplexität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs. Aus pharmazeutischer Sicht lassen sich somit auch die unterschiedlichen Ergebnisse erklären, die sich durch die Inhibierung nur eines der beiden mTOR-Komplexe oder beider zusammen erzielen lassen

1.2 Die Bedeutung von mTOR für die Tumorgenese

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits beschrieben, koordiniert der PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalweg zahlreiche zelluläre Prozesse. Werden diese durch Mutationen modifiziert, kann es zur Tumorentstehung kommen. Langjährige Untersuchungen familiärer vererbbarer Tumorsyndrome, basierend auf Mutation wichtiger Regulatoren des mTOR-Signalwegs, lieferten überzeugende Beweise für die Rolle von mTOR bei der Tumorentstehung. Keimbahnmutationen in einem Allel des *PTEN*-Gens prädestinieren die Träger für diverse Krankheiten, die sich durch ähnliche klinische Symptome ausweisen. Diese werden unter dem Oberbegriff PHTS (*PTEN Hamartoma Tumor Syndrome*) zusammengefasst. Zu diesem gehören das Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrom (BRRS), Cowden-Syndrom und das Proteus-Syndrom [40-42].

Bei dem BRRS handelt es sich um eine angeborene Erkrankung, gekennzeichnet durch Makrozephalie, Lipomatose und Hämangiomatose [43].

Ungefähr 50 bis 60 % der BRRS-Fälle weisen eine Keimbahnmutation von *PTEN* auf [44]. Entgegen früherer Annahmen ist man heute geneigt davon auszugehen, dass BRRS-Patienten mit derselben erhöhten Wahrscheinlichkeit an Krebs erkranken wie Patienten mit dem Cowden-Syndrom.

Das Cowden-Syndrom ist gekennzeichnet durch Ausbildung von Hamartomen der Haut und Schleimhäute und zusätzlich einer erhöhten Inzidenz für Erkrankung an Brust-, Schilddrüsen- und Gebärmutterkrebs [45]. Anhand von Mausmodellen zeigte Suzuki *et al.*, dass eine homozygote Deletion von *PTEN* embryonale Letalität zur Folge hat, wohingegen eine heterozygote Deletion in einer erhöhten Tumorinzidenz resultiert [46].

Eine somatische Inaktivierung von PTEN lässt sich in diversen menschlichen Tumoren nachweisen, unter anderem in Melanomen, Prostatakarzinomen und Gebärmutterkrebs [47-49] sowie in Glioblastomen [50] und anaplastischen Astrozytomen [51]. Der Funktionsverlust bzw. die Abschwächung von PTEN kann durch Deletion, Mutation, transkriptioneller Gen-Inaktivierung oder durch epigenetische Veränderungen verursacht werden. PTEN-Inaktivierung resultiert in einem erhöhten PIP₃-Level und bewirkt damit eine Aufhebung der Repression des PI3-Kinase/Akt-Signalwegs. Dies führt zu einem gesteigerten Zellwachstum und –überleben [52]. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass ein Funktionsverlust von PTEN sich deregulierend sowohl auf den upstream als auch auf den downstream gelegenen Bereich des PI3-Kinase-Signalwegs deregulierend auswirkt [17].

Eine gesteigerte mTOR-Aktivierung lässt sich aber auch beobachten, wenn die Funktion des TSC1-TSC2-Komplexes gestört ist. Die Auswirkung von Mutationen in diesem oberhalb von mTOR gelegenen Repressor lassen sich anhand der autosomal-dominant vererbten Tuberösen Sklerose (TSC) beschreiben. Charakteristisch für die TSC ist die Ausbildung von Hamartomen in unterschiedlichen Organen (Herz, Niere, Lunge, Augen, Haut, Gehirn) [53, 54] Ebenso finden sich Epilepsien, mentale Retardierung und Verhaltensstörungen wie zum Beispiel Autismus [55]. In circa 80 % der TSC-Fälle handelt es sich um sporadisch auftretende Mutationen, wohingegen die verbleibenden 20 % der Patienten ererbte Mutationen tragen [56]. Die TSC ist sozusagen der Krankheits-Prototyp, der durch eine abnormale mTOR-Signalgebung hervorgerufen wird. Dabei wird die Erkrankung entweder

ausgelöst durch Mutation des Tuberin-Gens oder des Hamartin-Gens [57]. Der Funktionsverlust von Hamartin bzw. Tuberin, resultiert in einer gesteigerten Aktivierung des mTOR-Signalweges, gekennzeichnet durch die erhöhte Phosphorylierung von S6K1, 4EBP-1 und ribosomalem S6 [18]. Durch die Entdeckung dieser Zusammenhänge konnte zum ersten Mal eine abnorme mTOR-Aktivierung mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht werden. Des Weiteren zeigte sich, dass 80 % aller TSC-Patienten an Epilepsie leiden, was die Vermutung nahe legt, dass auch andere Syndrome die Epilepsie hervorrufen auf eine gesteigerte mTOR-Aktivität zurückgeführt werden könnten [58]. Im Hirn verursacht die Tuberöse Sklerose Läsionen, die einhergehen mit kortikalen und subepiduralen Knötchen sowie Riesenzell-Astrozytomen (SEGA) [59].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein konstitutiv aktivierter mTOR-Signalweg mit einem erhöhten Tumorerkrankungsrisiko einhergeht. Aus diesem Grund richteten sich in den letzten Jahren zahlreiche Bemühungen darauf, die Konsequenzen, die sich aus einer abweichenden PI3-Kinase-Aktivierung ergeben, zu blockieren. Die Eigenschaft von Rapamycin und seinen Derivaten, mTORC1 zu inhibieren, zog verschiedene klinische Studien nach sich. Die Intention ist, die Progression solcher Krankheiten abzuschwächen, die durch abnormale mTOR-Aktivierung hervorgerufen werden oder mit einer solchen Aktivierung einhergehen.

1.3 mTOR-Inhibitoren in der klinischen Anwendung

In Säugetieren zeigt Rapamycin breitgefächerte immunmodulatorische und anti-entzündliche Effekte. Rapamycin supprimiert stark die Interleukin-2 (IL 2)-stimulierte T-Zell Proliferation, vergleichbar mit einer Immunsuppression. Aus diesem Grund wurde Rapamycin zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen eingesetzt. Von Vorteil ist dabei die allgemein gute Verträglichkeit und das Ausbleiben nephrotoxische Effekte, die im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva – z.B. Cyclosporin oder FK506 - auftreten können [60, 61].

Rapamycin interagiert in Säugetierzellen mit dem Immunophilin FKBP12 (*FK506 binding protein 12*). Der FKBP12-Rapamycin-Komplex bindet an die FRB-Domäne (*FKBP12-rapamycin binding domain*) von mTOR, die sich aminoterminal von der Kinasedomäne von mTOR befindet. Durch das Anlagern an die FRB-Domäne inhibiert der FKBP12-Rapamycin-Komplex mTORC1 allosterisch über einen noch unbekanntem Mechanismus [62, 63]. Im Allgemeinen bewirkt die mTORC1-Inhibition durch Rapamycin in der Zelle einen veränderten Glucose- und Lipid-Metabolismus, eine gesteigerte Autophagozytose und eine Verminderung der gesamten RNA-Translation [64]. Dadurch werden das Wachstum und die Proliferation der Zellen gehemmt. Aufgrund dieser Zusammenhänge zeichnete sich das Potential von Rapamycin als Medikament im Rahmen von Krebstherapien schon sehr früh ab [65]. In den Fokus der Wissenschaft rückte mTORC1 jedoch erst durch die genaue Charakterisierung seiner Funktion und des umgebenden Signalnetzwerkes. Dies schließt viele verschiedene Tumorsuppressoren und Onkoproteine (PI3K, PTEN, PDK1, AKT1, TSC1, TSC2 und LKB) mit ein. Ausgehend davon wurden kommerzielle semi-synthetische Rapamycin-Derivate - umgangssprachlich auch Rapaloge genannt - entwickelt. Diese Derivate zeichnen sich, verglichen mit dem parentalen Molekül, durch verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften aus. Der von Pfizer entwickelte Wirkstoff Temsirolimus (auch CCI1779 oder Torisel®) ist ein wasserlöslicher Ester, welcher sowohl oral als auch intravenös verabreicht werden kann [66]. Das Medikament wurde 2007 zur Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen von der US FOOD and Drug Administration (FDA) zugelassen. Hierbei dient es als Medikation der ersten Wahl. Ebenso zugelassen wurde Rapamycin zur Behandlung der seltenen Mantelzell-Lymphome [67]. Ein anderes Rapalog, entwickelt von Novartis, ist Everolimus (auch RAD001 oder Afinator®), ein Hydroxyethylether-Derivat, das oral appliziert werden kann [68]. Everolimus ist zugelassen für die Behandlung von fortgeschrittenen Brustkrebserkrankungen, neuroendokrinen Tumoren pankreatischen Ursprungs und fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen sowie für die Behandlung von subependymalen Riesenzell -Astrozytomen (SEGA) [69].

Obgleich mTOR-Inhibition eine vielversprechende Therapieform zur Krebsbekämpfung darstellt, blieb die klinische Leistungsfähigkeit der Rapaloge

weit hinter den Erwartungen, den Anwendungsbereich über die schon zugelassenen Indikationen hinaus auszudehnen, zurück. Insbesondere traf dies auf Therapieversuche zu, bei denen ausschließlich Rapaloge angewandt wurden. Gleichwohl wollte man auf die Vorteile, die diese Substanzen bieten, wie hohe Spezifität, minimale Nebenwirkungen und klinische Zulassung, nicht verzichten. Von daher ging man dazu über, Studien durchzuführen, bei denen Rapaloge in Kombination mit anderen Chemotherapeutika Anwendung fanden.

1.4 Neue Generation von mTOR-Inhibitoren

Aufgrund der Schwächen, welche die Behandlung mit Rapalogen aufweist, werden verstärkt neue Inhibitoren des PI3-Kinase/Akt/mTOR-Signalwegs entwickelt, einschließlich ATP-kompetitiver Inhibitoren für mTOR [70, 71]. Diese neue Generation von mTOR-Inhibitoren sind ATP-Analoga, die mit ATP um die Kinase-Domäne von mTOR konkurrieren. ATP ist ein physiologisches Substrat, das es mTOR durch die Bereitstellung einer Phosphatgruppe ermöglicht seine Zielproteine zu phosphorylieren. Im Gegensatz zu Rapalogen blockieren die ATP-kompetitiven Inhibitoren sowohl mTORC1 als auch mTORC2. Aufgrund der Ähnlichkeit der Kinase-Domäne von mTOR und PI3-Kinase wird bei einigen dieser Substanzen zugleich die PI3-Kinase gehemmt. Man unterscheidet zwischen dualen mTOR/PI3-Kinase-Inhibitoren (hemmen beide Kinasen bei gleicher effektiven Konzentration) und pan-mTOR-Inhibitoren (deren IC_{50} für die mTOR-Inhibition signifikant unter dem der PI3-Kinase-Inhibition liegt) [72]. Zu den pan-mTOR-Inhibitoren zählen AZD8055 und dessen Schwestersubstanz AZD2014 von AstraZeneca. AZD8055 inhibiert mTOR (IC_{50} 0,8 nM) mit einem hervorragenden Spezifitäts-Profil. Es senkt die mTORC2 spezifische Akt-Phosphorylierung am Ser⁴⁷³ und vermindert die 4EBP1-Phosphorylierung an der Rapamycin-resistenten Stelle Thr^{37/46}. Zudem induziert es die Autophagie und den Zelltod in Krebszellen [73]. *In vivo* Studien an Nacktmäusen deuten darauf hin, dass die Behandlung mit AZD8055 das

Tumorwachstum hemmt und in einigen Fällen sogar zu einer Tumorregression führen kann [74].

Eine der neueren Erkenntnisse ist, dass mTOR in der Lage ist, den Vorgang der Autophagozytose negativ zu regulieren [75-77]. In Phasen, in denen extrazelluläre Nährstoffe nur begrenzt der Zelle zur Verfügung stehen, stellt der Prozess der zellulären Autophagozytose Substrate zur Energieversorgung bereit. Als Autophagozytose wird der kontrollierte Abbau von beschädigten, überzähligen oder gefährlichen Komponenten der Zelle als Antwort auf einen Hungerzustand bezeichnet. Die Behandlung von Zellen mit AZD8055 induzierte die Autophagozytose vergleichsweise wirkungsvoller, als Rapamycin [74] oder dessen Analoga [78] es vermochten. Begründet liegt dies wahrscheinlich in der vollständigeren Hemmung von mTORC1 und/oder mTORC2. Huang *et al.* gelang der Nachweis, dass AZD8055 unabhängig von der Zellzyklus-Inhibition signifikant die Chemotherapie-induzierte DNA-Schädigung und den Zelltod vermindert. Zudem konnte eine Induktion von überlebenswichtiger Autophagozytose nachgewiesen werden [79]. Insgesamt zeigten sich ATP-kompetitive Inhibitoren jedoch in präklinischen Versuchen in der Regel den Rapalogen überlegen. AZD8055 wird zurzeit in klinischen Studien der Phase I getestet. Überdies ergeben sich vielversprechende therapeutische Strategien aus der Kombination von AZD8055 mit zytotoxischen Chemotherapien [80].

1.5 Meningeome als untertherapierte Entität

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren bei Erwachsenen. Sie entwickeln sich aus entarteten Zellen der Meningen (Hirnhäute), die sowohl das Hirn als auch das Rückenmark umgeben. Die Ausgangszellen sind arachnoidale Deckzellen. Das Haupterkrankungsrisiko liegt im 6. Lebensjahrzehnt. Zudem haben Frauen ein zweifach erhöhtes Erkrankungsrisiko [81]. Obgleich es sich bei der Mehrheit (~80 %) der Meningeome um langsam wachsenden benigne Tumore vom WHO Grad I handelt, ist das biologische Spektrum weit gefächert und es verbleibt eine nicht unerhebliche Gruppe von Meningeomen, deren klinische Entwicklung schwer

vorhersagbar ist [82]. Raumforderungen oder die Beeinträchtigung des umliegenden Gewebes können zu Komplikationen führen. Selbst histopathologisch als benigne eingestufte Meningeome können nach einer scheinbar vollständigen chirurgischen Entfernung erneut auftreten [82]. Bei den verbleibenden 20 % der Fälle handelt es sich um zum Teil, stark invasiv wachsende oder atypische (WHO Grad II) bzw. maligne (WHO Grad III) Meningeome, die eine hohe Rezidivneigung aufweisen und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen.

Verglichen mit Gliomen in adulten Patienten ist über den Ursprung von Meningeomen und die kritischen genetischen Veränderungen, die zur Tumorgenese führen, relativ wenig bekannt. Insbesondere die Rolle der genetischen Faktoren im Hinblick auf Aggressivität und Chemosensitivität, wurde bisher in Meningeomen nur sehr wenig erforscht. Das primäre genetische Ereignis bei der Meningeomentstehung ist die biallele Inaktivierung des *NF2*-Gens, welche sich in 30 - 70 % der sporadischen Meningeome und in allen Patienten mit Neurofibromatose vom Typ 2 finden lässt [83]. Bei der Untersuchung von 411 *NF2*-Patienten zeigte Smith *et al.*, dass verkürzende *NF2*-Mutationen und Mutationen in Richtung des 5'-Endes des *NF2*-Gens mit einer erhöhten Prävalenz für Meningeome einhergehen [84]. *NF2* codiert für den Tumorsuppressor Merlin (auch bekannt als Schwannomin), ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Protein-Familie. Es dient als Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem kortikalen Aktin-Zytoskelett [85, 86]. Merlin ist beteiligt an der Regulation der Membran-Organisation und an Prozessen das Zytoskelett betreffend, wie zum Beispiel: Migration, Zell-Zell-Kontakt, Adhäsion, Signaltransduktion und Proliferation [87, 88]. Die Auswirkungen eines Funktionsverlust von Merlin auf die Kontakt-abhängige Proliferationsinhibition, kann in vielen unterschiedlichen *NF2*-defizienten Zellen beobachtet werden [89, 90].

Merlin kontrolliert die Proliferation als Antwort auf den Zell-Kontakt durch CD44 [91]. Obgleich bekannt ist, dass Merlin in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert ist, bleibt der genaue Mechanismus, wie Merlin Wachstums-inhibierende Funktionen in humanen Arachnoidal- und Schwann-Zellen beeinflusst, noch weitestgehend unerforscht. Inwieweit der Verlust von Merlin auf molekularer Ebene zur Tumorgenese bei Patienten mit

Neurofibromatose vom Typ 2 (NF2) beiträgt, ist noch nicht gänzlich verstanden. NF2 ist eine dominant autosomal vererbte Erkrankung, für welche die Ausbildung von vielen verschiedenen Tumoren des Nervensystems – z.B. Schwannomen, Meningeomen und Ependymomen - charakteristisch ist [92]. *NF2*-Mutationen wurden auch in Schilddrüsentumoren, in Mesotheliomen und Melanomen detektiert, obgleich weniger häufig [93].

Eine kürzlich veröffentlichte Publikation zeigten, dass Mutationen in den Genen *Akt1*, *Smo*, *KLF4* und *TRAF-7* bedeutsam für das Meningeomwachstum sind [94-96]

Ergebnisse neuerer Studien weisen auf eine negative Regulation von mTORC1 durch Merlin hin [97], sodass im Bezug auf Untersuchungen zu mTOR-Komplexen oder deren therapeutischen Nutzbarkeit eine Stratifizierung von Patienten nach *NF2*-Status sowie eine Berücksichtigung von *NF2* in präklinischen Untersuchungen naheliegend wäre.

Die Standardtherapie besteht zurzeit aus der maximalen Resektion der Meningeome, gefolgt von Bestrahlung der verbleibenden Krebszellen [98]. Trotz verbesserter Operationsmethoden und Bestrahlungstherapien verbleibt dennoch eine Untergruppe aggressiv wachsender Meningeomen, die sich auf herkömmliche Weise nicht therapieren lassen. Hinzu kommt, dass nur sehr beschränkte alternative Behandlungsmethoden zur Verfügung stehen. So werden zum Beispiel in den Richtlinien, welche das US-amerikanische National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2011 veröffentlichte, lediglich drei Substanzen zur Behandlung von Meningeomen aufgeführt: Hydroxyharnstoff, Alpha-Interferon und Somatostatin-Analoga [98]. Allerdings basieren diese Empfehlungen auf einer kleinen Reihe von Studien, mit entsprechenden Einschränkungen [99]. Mit zunehmender Charakterisierung der Signalnetzwerke in Zellen und daraus resultierenden Erkenntnissen, insbesondere bei Meningeomentstehung und -verbreitung, ergeben sich neue potentielle Ansatzmöglichkeiten für ein breiteres Spektrum an chemotherapeutischen Substanzen, wie zum Beispiel zytotoxische Agenzien, hormonelle Substanzen, Rezeptor-Antagonisten oder -Inhibitoren. Diese Therapeutika, greifen unter anderem in eine abweichende Signalgebung ein und können Moleküle beeinflussen, die in der Signalkette unterhalb ihres Zielproteins angeordnet sind. Somit wirken sie sich auf die Differenzierung und

Proliferation von Zellen, sowie auf die Angiogenese und/oder Apoptose aus. Die meisten dieser in Entwicklung begriffenen Therapeutika sind also keine zelltoxischen Chemotherapeutika im klassischen Sinne, sondern beeinflussen zielgerichtet ein einzelnes Zielprotein in der Tumorzelle („*targeted therapy*“). Damit verbindet sich die Hoffnung auf einen gezielten und an Nebenwirkungen ärmeren pharmakologischen Eingriff, der auch bei der Mehrzahl der benignen Meningeome verantwortbar wäre.

Die Inhibierung bestimmter Signalwege in Gliomen und Metastasen aller Art, gestaltet sich durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) schwierig. Obgleich die BHS bei den meisten Tumoren Unregelmäßigkeiten aufweist [100], sind verstreute Teile des Tumors noch immer von einer funktionierenden Blut-Hirn-Schranke umgeben und damit auch geschützt durch Transporter, die in den Endothelzellen der Hirnkapillare exprimiert werden [101]. Daher können Hirntumoren und Metastasen im Hirn nur effektiv behandelt werden mit Molekülen, die in der Lage sind die BHS zu überwinden. Bei Meningeomen ist eher davon auszugehen, dass die BHS keine signifikante Rolle spielt, da diese Tumoren sich noch vor dieser Barriere befinden.

Das Verständnis der Zellbiologie von Meningeomen hat in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht. Dies ermöglicht die Entwicklung diverser zielgerichteter Therapien, die zur unterstützenden Behandlung von Patienten mit aggressiv wachsenden, höhergradigen Meningeomen angewandt werden können.

2 Zielstellung der Arbeit

Bisher gilt der Ribonukleosinsäure-Reduktase-Inhibitor Hydroxyharnstoff (HU), welcher die DNA-Synthese von Tumorzellen stark einschränkt, als vergleichsweise am besten untersuchter medikamentöser Therapieansatz [102]. Eigene *in vitro* Versuche der Arbeitsgruppe am Magdeburger Institut für Neuropathologie mit HU zeigten einen deutlichen antiproliferativen Effekt. Jedoch lag der Konzentrationsbereich selbst für HU an der oberen Grenze des *in vivo* Erreichbaren [103]. Ebenso wenig von Erfolg gekrönt waren zielgerichtete *in vitro* Experimente mit einer Palette weiterer Hemmstoffe, die auf einzelne Proteine abzielen [104-106]. Dem Einsatz von mTORC-Inhibitoren zur Behandlung von Meningeomen wurde bisher wenig Beachtung geschenkt, zudem wurde in bisherigen Therapiestudien der *NF2*-Status der Tumore nicht berücksichtigt.

Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit gab es noch keine systematischen Analysen zur mTORC1-Kinaseaktivität und der im mTORC1-Signalweg vorgeschalteten, sowie der nachgeschalteten Kinasen in Meningeomen. Von daher war zu untersuchen, in wie weit die Komponenten des mTORC1-Signalwegs in humanen Meningeomen aller WHO Grade sowie in Meningeom-Zelllinien exprimiert werden und ob diese Signalwege eine Überaktivierung aufweisen.

Des Weiteren sollte die Auswirkung von mTORC1-Inhibitoren *in vitro* untersucht werden im Hinblick auf Proliferation, Zellvitalität und Migration. Von besonderem Interesse war dabei, in wie weit der *NF2*-Status von Meningeomzellen die Wirkung der Rapaloge Temsirolimus und Everolimus beeinflusst.

Im Falle von positiven Ergebnissen der *in-vitro*-Versuche war vorgesehen, die mTORC1-Inhibitoren sowohl subkutan als auch im orthotopen Xenograft-Maus-Modell einzusetzen. Besonderes Augenmerk lag darauf zu beobachten ob und in welchem Umfang die mTORC1-Hemmung auf das Tumorwachstum wirkt. Zudem sollte durch die Tumorentnahme und -aufbereitung sichergestellt werden, ob die Effekte ggf. auf eine spezifische Hemmung der mTORC1-Aktivität zurückzuführen sind.

3 Material

3.1 Zellkulturlinien

Tabelle 1: Zellkulturlinien

Zelltyp	Name	Herkunft	Bezugsquelle
Meningeom-Zelllinien	BenMen-1	Humanes Meningeom (WHO Grad I)	Prof. Dr. Paulus, Institut für Neuropathologie, Universität Münster, Münster, Deutschland
	IOMM-Lee	Humanes Meningeom (WHO Grad III)	Prof. Dr. Gutmann, Institut für Neurologie, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA
	KT21	Humanes Meningeom (WHO Grad III)	Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA
Arachnoidal-Zelllinie	AC1	Humane Hirnhaut	
	AC1-sh <i>NF2</i>	<i>NF2</i> -defizient, abgeleitet von AC1	
Meningeom-Zelllinie	MenII-1	Humanes Meningeom (WHO Grad II)	Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA
	MenII-1-sh <i>NF2</i>	<i>NF2</i> -defizient, abgeleitet von MenII-1	
Meningeom-Zelllinie	SF4068	Humanes Meningeom (WHO Grad I)	Anita Lal, Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA

Mit Ausnahme der SF4068-Zelllinie wurden obig genannte Zelllinien bereits in der Literatur beschrieben. Die genaue Herkunft der Zellen, die Art der Immortalisierung durch hTERT oder E6/E7-Onkogene, sowie die Generierung stabil sh-RNA gegen *NF2* exprimierender, abgeleiteter Zellen kann den Erstbeschreibungen entnommen werden. Für die nicht-malignen Zellen aus dem Labor von Anita Lal ist dies die Publikation [107]. Die Linien AC1 und MenII-1 stellen Kontrolltransfektionen mit dem Vektor dar, über den auch die

NF2-shRNA in die korrespondierenden *NF2*-defizienten Linien eingeführt wurde. Die Erstbeschreibungen von BenMen-1, KT21 und IOMM-Lee finden sich bei Puttmann *et al.* [108], Tanaka *et al.* [109] und Lee [110].

3.2 RT-PCR Primer

Tabelle 2: Primer

Name	Gen	Sequenz	T _{annealing}	Hersteller
mTOR-hu-F		AGGCCGCATTGTCTCTATCAA	55°C	biomers.net
mTOR-hu-R		GCAGTAAATGCAGGTAGTCATCCA	55°C	biomers.net
p70S6K1- hu140-F		CTCATCCTTGAGTATCTCAGTG	55°C	biomers.net
P70S6K1- hu140-R		TAGATGATCCCCTTTTGATG	55°C	biomers.net
4EBP1-hu70-F		ATAGCCCAGAAGATAAGCGG	55°C	biomers.net
4EBP1-hu70- R		TGGCTGGTGCTTTAAATGTC	55°C	biomers.net
hNF2-ex1-2-fw		AAGCAACCCAAGACGTTTAC	55°C	biomers.net
hNF2-ex1-2- rev		GGCACACCAAATCAAAGAGG	55°C	biomers.net
GAPDH-161-F		AGGGCTGCTTTTAACTCTGG	55°C	biomers.net
GAPDH-R-2		GGGATTTCCATTGATGACAAG	55°C	biomers.net
D22S929-F- FAM	NF2	CTGCAGATCACAACTCCTTG	60°C	biomers.net
D22S929- 130R	NF2	GCATTTATGGAGTATCCACAG	60°C	biomers.net
D22S421-F- FAM	NF2	CTGCTGCCCCTAACATATCAC	60°C	biomers.net
D22S421- 163R	NF2	GGCCAGGAGTGTCTGAATTTA	60°C	biomers.net
D22S268-F- FAM	NF2	TACGTCCTCACAAATCCAGCGT	60°C	biomers.net
D22S268- 215R	NF2	CTGAGGTGGGAGGATTAC	60°C	biomers.net
β2MG-quant F		CCAGCAGAGAAAAGTC`	58°C	biomers.net

Name	Gen	Sequenz	T _{annealing}	Hersteller
β2MG-quant R		GATGCTGCTTGTCTCG	58°C	biomers.net
Randomprimer (cDNA-Synthese)		500 µg/ml Hexanukleotide	42°C	biomers.net

3.3 Antikörper

In der **Tabelle 3** sind die Antikörper aufgeführt, die für das Western blotting und für die Immunhistochemischen Färbungen eingesetzt wurden. Dabei wurden die Antikörper den Herstellerangaben entsprechend, in der angegebenen Konzentration in 1 x TBS-Tween (vgl. Abschnitt 3.5) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver bzw. 5 % (w/v) BSA eingesetzt.

Tabelle 3: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen phospho-Akt (Ser ⁴⁷³)	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	1:500
Anti-Kaninchen Akt	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Maus Aktin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA	1:2000
Anti-Maus Ig, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen Ig, HRP-gekoppelt	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Maus Ki67	Dako, Hamburg, D	1:500
Anti-Kaninchen phospho-mTOR (Ser ²⁴⁴⁸)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen mTOR	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Maus Phospho p70S6K (Thr ³⁸⁹)	Epitomics, Cambridge, UK	1:100
Anti-Maus phospho p70S6K1 (Thr ³⁸⁹)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen p70S6K1	Abcam, Cambridge, UK	1:1000

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Anti-Kaninchen p70S6K1	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen phospho 4EBP1 (Thr ^{37/46})	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen 4EBP1	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:1000
Anti-Kaninchen NF2	Santa Cruz, Dallas, TX, USA	1:200

3.4 Kit-Systeme und Fertiglösungen

Tabelle 4: Kit-Systeme und Fertiglösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
AmpFISTR® Profiler Plus® PCR Amplification Kit	Applied Biosystems, Waltham, PA, USA
5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III	Roche, Rotkreuz, CH
Cell Death Detection Elisa Plus	Roche, Rotkreuz, CH
DC Protein Assay Kit	BioRad, Hercules, CA, USA
Envision-Dual Link System HRP-(DAB+) Kit	Dako, Hamburg, D
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
SensiMix™ SYBR Hi-ROX Kit	Bioline, London, UK

3.5 Puffer und Lösungen

APS-Lösung (10 %): 10 g Ammoniumpersulfat (APS)
ad 100 ml Aqua dest.

Blockierungslösung (5 %) 5 g Milchpulver
Ad 100 ml TBS-Tween20

Einfriermedium	DMEM-Basalmedium 24 % (v/v) FBS 7 % (v/v) DMSO
Fixierungspuffer: (nach Vorschrift des BrdU Kits von Roche)	14 ml Ethanol 4,66 ml Aqua dest. 1,34 ml 25 % (v/v) HCl
LB-Medium:	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Pepton 5g/l NaCl
Laufpuffer (pH 8,3):	3 g/l Tris-Base 14,4 g/l Glycin 1 g/l SDS
Lysis-Puffer:	1 ml Ripa-Puffer 10 µl 100 mM Na-Vanadat 10 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (Serva) 1 µl 1 M DTT
Narkoselösung:	0,2 % Rompun 1 % Ketamin in physiologische Kochsalzlösung

Ripa-Puffer (pH 7,4):	1,2 g/l Tris-Base 8,75 g/l NaCl 2,1 g/l NaF 20 ml/l 0,5 M (w/v) Na ₂ EDTA 10 ml/l Triton-X 100 3,35 ml/l 30 % (w/v) SDS 5 g/l Deoxycholat
0,5 % (w/v) SDS-Lösung:	5 g/l SDS
Transferpuffer (pH 8,3):	3 g/l Tris-Base 11,3 g/l Glycin 200 ml/l (v/v) Methanol
1,88 M Tris/HCl (pH 8,8):	227,6 g/l Tris-Base
0,625 M Tris/HCl (pH 6,8):	75,6 g/l Tris-Base
1 x TBS-Tween-Puffer (pH 7,5):	0,9 g/l Tris-Base 6,8 g/l Tris/HCl 8,8 g/l NaCl 1 ml/l (v/v) Tween 20

3.6 Feinchemikalien

In der **Tabelle 5** sind die verwendeten Feinchemikalien aufgeführt, die für die Experimente eingesetzt wurden.

Tabelle 5: Feinchemikalien

Bezeichnung	Abkürzung / Summenformel / Trivialname	Bezugsquelle
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 3,5- diphenylformazan	MTT Formazan	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
1,4-Dithio-DL-threitol	DTT	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Acrylamid (30 %)		Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	APS	Merck, Darmstadt, D
Ampicillin		Merck, Darmstadt, D
Ampullenwasser	Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
AZD8055		AstraZeneca, London, UK
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe		Bayer, Leverkusen, D
Captisol		Cydex Pharmaceuticals, Lenexa, KS, USA
Chloroform	CHCl ₃	Roth, Karlsruhe, D
Citratpuffer		Dako, Hamburg, D
Deoxycholat		Serva, Heidelberg, D
Diaminobezidin	DAB+	Dako, Hamburg, D
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe, D
dNTPs		Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Dubelcco´s modifiziertes Eagle Medium	DMEM, <i>high glucose</i>	PAN, Aidenbach, D
Eosin		Merck, Darmstadt, D

Bezeichnung	Abkürzung / Summenformel / Trivialname	Bezugsquelle
Entwickler		Agfa, Mortsel, BE
Ethanol	EtOH	Fischar, Saarbrücken-Scheidt, D
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Everolimus		Novartis, Nürnberg, D
Fetales Rinderserum	FBS	PAN, Aidenbach, D
Fixierer		Agfa, Mortsel, BE
Formaldehyd	CH ₂ O	Roth, Karlsruhe, D
Galactose		Roth, Karlsruhe, D
Glycerin	Propan-1,2,3-triol	Roth, Karlsruhe, D
Glycin		Roth, Karlsruhe, D
Hämatoxylin		Dako, Hamburg, D
Hämatoxylin		Thermo, Waltham, PA, USA
Histoacryl®	Gewebekleber	B.Braun, Melsungen, D
Isofluran		Baxter, Deerfield, IL, USA
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Roth, Karlsruhe, D
Insulin		Sanofi aventis, Paris, FR
Kanamycin		Merck, Darmstadt, D
Ketamin		Intervet, Unterschleißheim, D
Ladepuffer	5 x Protein Loading Buffer	Fermentas, Waltham, PA, USA
	2 x Loading Buffer nach Laemmli	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
L-Leucin	L-Leu	Bio-sell, Nürnberg, D
L-Methionin	L-Met	Bio-sell, Nürnberg, D
Magermilchpulver		Roth, Karlsruhe, D
Matrigel™		BD Bioscience,

Bezeichnung	Abkürzung / Summenformel / Trivialname	Bezugsquelle
		Franklin Lakes, NJ, USA
Methanol		J.T.Baker, Deventer, NL
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamin	TEMED	Serva, Heidelberg, D
Natriumacetat	NaAc	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe, D
Natriumfluorid	NaF	Roth, Karlsruhe, D
Natriumlaurylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe, D
Natriummetavanadat	NaVO ₃	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin	PS	PAN, Aidenbach, D
Phosphatase-Inhibitor Cocktail		Serva, Heidelberg, D
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	PAN, Aidenbach, D
Physiologische Kochsalzlösung		Fresenius Kabi, Bad Homburg,
Rinderserumalbumin	BSA	Roche, Rotkreuz, CH
Rompun	Xylazin	Bayer, Leverkusen, D
Salpetersäure	HNO ₃	Roth, Karlsruhe, D
Salzsäure	HCl	Roth, Karlsruhe, D
Standardmarker für Proteine	PageRuler, PageRuler Plus	Fermentas, Waltham, PA, USA
Stripping Puffer	Restore	Thermo, Waltham, PA, USA
SensiMix SYBR-HiRox	SYBRgr	Quiagen, Venlo NL
Temsirolimus	Torisel	Pfizer, New York, NY, USA
Tris-Base		Roth, Karlsruhe, D
Tris-HCl		Roth, Karlsruhe, D
Triton X 100		Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Trizol®		Life Technologies,

Bezeichnung	Abkürzung / Summenformel / Trivialname	Bezugsquelle
		Waltham, PA, USA
Trypsin		PAN, Aidenbach, D
Tween 20		Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe, D
Wortmannin		Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Xylocain (2%)		AstraZeneca, London, UK
Xylol-Ersatz	Protax Clear	Quartett, Berlin, D

3.7 Geräte

Die für die Experimente verwendeten Geräte sind in der **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bohrer	Omnidrill 35 115/230V	WPI, Sarasota, FL,USA
Brutschränke	CB150	Binder, Tuttlingen, D
	Galaxy B	Nunc, Wiesbaden, D
Einfriergefäß	Mr. Frosty™	Nalgene®, Rochester, NY, USA
<i>Elisa</i> -Reader	Infinite M200	Tecan. Männedorf, CH
<i>Elisa</i> -Washer	HydroFlex™	Tecan, Männedorf, CH
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa, Mortsel, BE
Fluoreszenzmikroskop	Biozero	Keyence, Osaka, JP
Heizblock	Rotilab®Block-Heater H250	Roth, Karlsruhe, D
Homogenisator	Precellys24	Peqlab, Erlangen, D
Immunfärbeautomat	Dako Cytomation	Dako, Hamburg, D
Infrarotlampe	SIL06	Sanitas, Wals D

Gerät	Modell	Hersteller
Kraftlichtquelle	KL 1500 LCD	Zeiss, Oberkochen, D
Magnetrührer	Variomag Mono	Thermo Scientific, Waltham, PA, USA
Messschieber	Digital-Messschieber "ABS"	Promat, Hamburg, D
Microliter Spritze	Typ 1701 RNR 10 µl (22s/51 mm)	Hamilton, Bonaduz, CH
Phasenkontrastmikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, D
pH-Meter	CG 842	Schott, Mainz, D
Photometer	BIOPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Schlittenmikrotom		Leica, Solms, D
Schüttler	REAX-Top	Heidolph, Fürth, D
Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot Turbo™	BioRad, Hercules, CA, USA
Stabhomogenisator	T10 basic	IKA, Staufen im Breisgau, D
Stereotaxie-Rahmen	Für Mäuse	WPI, Sarasota, FL, USA
Stickstoff-Tank	CryoFreezer 350	Id Ingenieursdienst, Kiel, D
Sonicator	UP 100H Untraschallprozessor	Dr. Hielscher GmbH, Teltow, D
Temperaturecontroler	ATC1000	WPI, Sarasota, FL, USA
Thermoschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Waagen	Pioneer™	Ohaus, Nänikon, CH
		Satorius, Göttingen, D
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, D
Western Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell	BioRad, Hercules, CA, USA

Gerät	Modell	Hersteller
Zellzähler	Cellometer™ Auto T4	Peqlab, Erlangen, D
Zentrifuge	Multifuge X1R	Heraeus, Hanau, D
	Mikro 22R	Hettich, Kirchlengern, D

3.8 Verbrauchsmaterialien

In der **Tabelle 7** sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
6-Well-Platten (steril)	Cellstar®	Greiner, Kremsmünster, A
24-Well-Platten	Cellstar®	Greiner, Kremsmünster, A
96-Well-Platten (steril)	Nunclon™ Surface	Nunc, Wiesbaden, D
Cryo-Röhrchen	2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Dentalkanüle	100 Sterincan® 27 Gx1''	B.Braun, Melsungen, D
Einmalpipetten (steril)	1 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner, Kremsmünster, A
Einmal-Kultur-Einsätze		Ibidi, München, D
Einmalskalpell		B.Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen	Injekt®-F	B.Braun, Melsungen, D
Einmalzählkammern	SD 100	Peqlab, Erlangen, D
Einmalzellschaber		TPP®, Trasadingen, CH
Hyperfilm ECL	14 x 28 cm	Amersham, Fairfield, CT, USA
Keramikkügelchen	Precellys Keramik-Kügelchen 1,4 mm	Peqlab, Erlangen, D
Mikroreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Nitrocellulose Membran	Protran®	Whatman, Fairfield, CT, USA
Pipettenspitzen	1 µl – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, D

Verbrauchsmaterial	Typ	Hersteller
Transwell Einsätze	8 µm, 6,5 mm	Costar, Corning, NY, USA
Uretherkatheder	3F[1 mm]	Bard Angiomed, Grötzingen, D
Verpackungsfolie	Saran	The DOW Chemicals, Midland, MI, USA
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	BD-Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflaschen (steril)	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner, Kremsmünster, A

4 Methoden

4.1 Zelllinien

Allen Untersuchungen dieser Arbeit liegen humane Meningeom-Zelllinien zugrunde. Die benigne Zelllinie BenMen-1 wurde vom Institut von Werner Paulus (Institut für Neuropathologie, Universität Münster) und die maligne Meningeom-Zelllinie IOMM-Lee von David H. Gutmann (Washington University of Medicine, St. Louis, MO, USA) zur Verfügung gestellt. Zudem überließ uns Anita Lal (Brain Tumor Research Center, University of California, San Francisco, CA, USA) freundlicherweise sowohl die aus einem atypischen Meningeom gewonnenen Zelllinien MenII-1 und MenII-1-sh*NF2*, als auch die immortalisierten Arachnoidal-Zellen AC1 und AC-sh*NF2*. Die Identitätsprüfung der Zelllinien erfolgte mit Hilfe des AmpF/STR Kit und der Analysesoftware GeneMapper ID v3.2 auf einem ABI-Prism-Kapillarsequenzierer von Applied Biosystems (ABI, Foster City, CA, USA). Dieses Fluoreszenz-PCR-System umfasst hochpolymorphe (Längen-variable) short tandem repeats (STR) auf neun Chromosomen, sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Die Längen der Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte werden anhand mitlaufender Standards in der Kapillarelektrophorese bestimmt und durch die Software automatisch bekannten Allelen zugeordnet.

4.2 Kultivierung der Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in high-glucose DMEM-Medium (PAN, Aidenbach, D) kultiviert, dem 10 % FBS und 1 % einer Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (PAN, Aidenbach, D), welches im folgenden DMEM-Vollmedium genannt wird, zugesetzt wurden. Alle Zelllinien wachsen adhärent und wurden bei 37°C und 5 % CO₂ bei hoher Luftfeuchtigkeit in 25 cm² bis 175 cm² großen Zellkulturflaschen (Greiner, Kremsmünster, A) im Brutschrank (Binder, Tuttlingen, D) kultiviert. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden die Zelllinien alle 2 bis 4 Tage passagiert. Dazu wurde das alte Medium abpipettiert und die

Zellen einmal mit 1 x PBS (Calcium- und Magnesium-frei, PAN, Aidenbach, D) gewaschen, anschließend wurden die Zellen mit Trypsin (0,5 mg/ml, PAN, Aidenbach, D) abgelöst, in 1 x PBS aufgenommen und anschließend bei 1000 rpm 10 min zentrifugiert, Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Vollmedium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Cellometer™ Auto T4 (Peqlab, Erlangen, D). Abschließend wurden die Zellen in der gewünschten Dichte neu ausgesät.

4.3 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen in 37°C warmem Wasserbad verbracht und anschließend in einer T75-Zellkulturflasche (Greiner, Kremsmünster, A) in 15 ml DMEM-Vollmedium eingesät. Um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische Lösungsmittel DMSO (Roth, Karlsruhe, D) zu entfernen, erfolgte nach Anheften der Zellen ein vollständiger Mediumwechsel.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, abtrypsinisiert (Trypsin 0,5 mg/ml) und bei 1000 rpm 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und das Zellpellet in Einfriermedium (siehe Abschnitt 3.5) resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Proben in Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, D) verbracht und mit Hilfe eines Einfriergefäßes (Mr.Frosty™, Nalgene®, Rochester, NY, USA), das Isopropanol (Roth, Karlsruhe, D) enthält, langsam auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung der Kryokulturen erfolgte im Stickstofftank (CryoFreezer, Id Ingenieursdienst, Kiel, D) bei -180°C.

4.4 Transwell®-Invasions Assay

Der Transwell®-Invasions Assay ist eine Methode, mit der man die Auswirkung chemischer Substanzen wie etwa Inhibitoren zellulärer Signalwege, auf das Invasionsverhalten von Zellen bestimmen kann. Er basiert auf einem zwei Kompartimente enthaltenden Kultur-System (Transwell®, Costar, Corning, NY,

USA), bei dem die Kammern durch eine poröse Membran getrennt sind. Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche wurden 6,5 mm Transwell®-Einsätze mit einer Porengröße von 8 µm, der Firma Corning verwendet. Die Einsätze wurden steril in 24-Well-Platten überführt, 300 µl eines 1:1 Matrigel-DMEM-Gemischs in die obere Kammer pipettiert und für ca. 3 h bei RT inkubiert. Das Matrigel (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) verschließt die Poren und imitiert die natürliche Barriere, welche die Tumorzellen *in vivo* während des Invasionsprozesses überwinden müssen. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit abpipettiert und die untere Kammer mit 500 µl DMEM, versetzt mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus (Pfizer, New York, NY, USA), befüllt. Darauffolgend wurden in die obere Kammer $4,5 \times 10^4$ Zellen/Well in 300 µl DMEM appliziert (Dreifach-Werte) und zum Vergleich Ansätze mit $4,5 \times 10^4$ Zellen/Well ohne Transwell®-Einsätze verwendet. Die Zellkulturplatten wurden für 48 h unter Standardbedingungen inkubiert. In jedem Fall wurden Zellen ohne Behandlung mit Temsirolimus als Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Auszählung der Zellen, die durch die Membran in das untere Kompartiment gewandert waren. Dazu wurde das DMEM vorsichtig entfernt und die Zellen mit 300 µl 1 x PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen mit 500 µl Trypsin für 5 min bei 37°C sowohl vom Wellboden, als auch von der Unterseite des Transwell®-Einsatzes gelöst. Zum Auszählen der Zellen wurde eine Neugebauer-Zählkammer verwendet. Die berechneten Prozentsätze der durch die Membran in das zweite Kompartiment gewanderter Zellen, wurden stets auf mitgeführte Kulturen ohne Membraneinsatz normiert. Dies geschah zur Minimierung potenzieller Einflüsse der Zellcharge in jedem Einzelexperiment. Dennoch beruhten die Dreifachbestimmungen auf drei unabhängigen Experimenten mit jeweils neuen Zellchargen (Passagen).

4.5 Mikrotiter Tetrazolium Test (MTT-Test)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität diverser Substanzen, wurde die Zellvitalität mittels MTT-Tests bestimmt. Diesem Test liegt das Prinzip der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5-

diphenyl-tetrazolium-bromid) (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) zum blau-violett gefärbten Formazan-Reaktionsprodukt zugrunde. Die reduktive Spaltung des Tetrazoliumrings erfolgt durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums, durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase, die mitochondriale NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase oder andere Reduktasen. Sie findet somit nur in lebenden Zellen statt. Eine Schädigung der Zellen resultiert in einer verminderten Formazanbildung und daraus resultiert, dass die Umsetzung des Substrats proportional zur Anzahl lebender Zellen ist. Durch die Solubilisierung mit einem unpolaren Lösungsmittel, z.B. DMSO, wird das Formazanprodukt in eine dunkelviolette Lösung überführt und kann bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch quantifiziert werden [111, 112]. Zur Durchführung des MTT-Tests wurden Zellen mit Hilfe des CellometerTMAuto T4 gezählt und in gewünschter Dichte in 96-Well-Platten eingesät. Die Zahl der auszusäenden Zellen wurde experimentell ermittelt. Diese betrug je nach Zelllinie 1×10^4 bis 3×10^4 Zellen/well, um nach maximal 48 h Inkubationszeit die Messung der optischen Dichte nach dem MTT-Test einen Wert < 1 zu erreichen. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die zu testenden Substanzen (z.B. Temsirolimus, Everolimus) auf die mittlerweile adhärenierten Zellen in 3 verschiedenen Konzentrationen als 24-fach-Bestimmung appliziert. Hierzu wurde eine Stammlösung hergestellt, von der ausgehend entsprechende Konzentrationen pro Well hinzugegeben wurden. Die Lösungsmittelkonzentration betrug $< 0,1$ %. In jedem Fall wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Nach entsprechender Inkubationszeit (24 h bzw. 48 h) wurde der MTT-Test durchgeführt. Hierzu wurde der Überstand und somit die Testsubstanzen entfernt, um eine mögliche Reduktion des MTT-Salzes durch die Testsubstanzen zu vermeiden. Anschließend wurde 0,75 mg/ml 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan in DMEM gelöst und 100 μ l/Well auf die Zellen pipettiert. Der im Medium enthaltendem pH-Indikator Phenolrot, interferiert nicht mit der Messung [113]. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde das Medium entfernt und je Well 100 μ l DMSO auf die Zellen gegeben. Daran schloss sich ein 15-minütiger Inkubation-Schritt auf einem Schüttler (Heidolph, Fürth, D) an, bei dem die Zellen zerstört und der Farbstoff durch das Lösungsmittel extrahiert

wurde. Es folgte die Messung der Absorption zum einen bei 562 nm sowie bei 620 nm als Referenzwert im *ELISA*-Reader (Infinite M200, Tecan, Männedorf, CH). Der Prozentsatz der überlebenden Zellen wurde durch Bildung des Quotienten der Absorptionswerte mit dem Wert der unbehandelten Lebendkontrolle errechnet.

4.6 Proliferationstest mit 5-Brom-2-deoxyuridin (BrdU)

Die Bestimmung der Proliferation und Viabilität von Zellen sind Schlüsselfelder in einer Vielzahl biologischer Methoden. Der BrdU Assay stellt, neben dem MTT-Test, eine Möglichkeit dar, die Zellvermehrung anhand eines nicht-radioaktiven Tests zu quantifizieren. Die BrdU-labeling Technik wird angewandt, um einen Zell-*ELISA* zu generieren. Besonders hilfreich ist diese Methode, wenn eine lange Verdopplungszeit erwartet wird oder die Stimulation der DNA-Synthese im Vordergrund steht.

Die Zellen wurden zu Beginn in 96-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden, D), wie bereits beim MTT-Test (Abschnitt 4.5) beschrieben, kultiviert bzw. mit den zu testenden Substanzen behandelt. Der BrdU-Test wurde mit Hilfe des *5-Bromo-2'-deoxy-uridine labeling and Detection Kit III* (Roche, Rotkreuz, CH) durchgeführt und falls nicht ausdrücklich anders erwähnt, die darin enthaltenen Puffer verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bis 48 h wurde dem Kulturmedium BrdU zugesetzt und somit teilweise 5-Brom-2'-deoxyuridin anstelle des Nukleotids Thymidin in die neusynthetisierte DNA im Zuge des Zellwachstums eingebaut. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C unter Standardbedingungen wurden das Medium entfernt und die Platte zweimal mit Waschpuffer (1x PBS, dem 10 % FBS zugesetzt wurde) unter Verwendung des *ELISA-Washers* (HydroFlex™, Tecan, Männedorf, CH) gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen. Dazu wurden je Well 200 µl vorgekühlter Fixierpuffer (70 % EtOH in 0,5 M HCL) auf die Zellen gegeben und für 30 min bei -20°C inkubiert. Das Fixativ wurde im darauffolgenden Schritt entfernt und die Zellen abermals im *ELISA-Washer* mit Waschpuffer zweimal gewaschen. Im dritten Schritt erfolgt die teilweise Spaltung der zelluläre DNA durch Zugabe von 100 µl/well „Nucleases working“

Lösung, der Nuklease zugesetzt wurde. Dies erlaubt im folgendem das Angreifen des Testsystem-Antikörpers, der das inkorporierte BrdU detektieren soll. Nach einem 30 minütigen Inkubationsschritt bei 37°C wurde die Lösung entfernt und die 96-Well-Platte zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Im vierten Schritt wurde der primäre Antikörper zugegeben, dabei handelt es sich um einen Peroxidase-gekoppelten-Anti-BrdU-Antikörper. Überschüssige Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt. Das im Anschluss daran zugegebene Peroxidase-Substrat 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) wird durch die BrdU-Anti-BrdU-Komplex konjugierte Peroxidase zu einem grünen Farbstoff reduziert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm. Die entstehende optische Dichte korreliert mit der innerhalb von drei Stunden erfolgten DNA-Synthese. Je höher der Grad der Proliferationshemmung, z.B. durch Inhibitoren zellulärer Signalwege, desto niedriger ist der Gehalt inkorporierten BrdUs in neusynthetisierter DNA.

4.7 Spalt-Assay

Der Spalt-Assay ist eine einfache, gut entwickelte Methode, den Einfluss von Chemotherapeutika auf die Zellmigration *in vitro* zu messen [114]. Dazu wird als Initialschritt eine „Verletzung“ in einem Zellmonolayer verursacht und von diesem Spalt kontinuierlich in einem Zeitintervall Fotos gemacht. Anschließend werden die Bilder miteinander verglichen, um die Migrationsrate der Zellen zu quantifizieren. In den von uns durchgeführten Spalt-Assays wurde für die Erzeugung der „Verletzung“ ein Zwei-Kammer-Einsatz (Ibidi, München, D) verwendet. Dazu wurde in 6-Well-Platten mit einer sterilen Pinzette ein selbstklebender Einsatz eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2 beschrieben auf eine Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml DMEM eingestellt. In jede Kammer wurden 70 μ l pipettiert (entspricht $3,5 \times 10^4$ Zellen). Die 6-Well-Platte wurde dann für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Einsätze vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und das well mit 3 ml DMEM aufgefüllt. Bei

der Hälfte der wells wurde das Medium mit 2 μ M Temsirolimus supplementiert. Mit Hilfe des 2-Kammer-Einsatzes wurden so zwei Zellmonolayer erzeugt, die durch einen Spalt voneinander getrennt waren. Die Einsätze wurden vorsichtig ohne den Zellrasen zu verletzen entfernt und sowohl das obere, als auch das untere Ende des Spalts mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Oberkochen, D) und einer Kamera dokumentiert. Weitere Aufnahmen erfolgten nach 8 h, 24 h, 32 h und 48 h, bis der Spalt komplett geschlossen und ein einheitlicher Zellmonolayer zu sehen war. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, D) in dem die Spaltbreite in jedem Bild an 10 verschiedenen Punkten vermessen wurde. Die berechneten Prozentsätze der Spaltbreite der einzelnen Zeitpunkte wurden stets auf mitgeführte Kulturen ohne Temsirolimuszusatz normiert. Dies geschah zur Minimierung potenzieller Einflüsse der Zellcharge in jedem Einzelexperiment. Dennoch beruhten die Dreifachbestimmungen auf drei unabhängigen Experimenten mit jeweils neuen Zellchargen (Passagen).

4.8 Gesamt-RNA Isolierung aus kultivierten Zellen mit Trizol

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mittels der Trizol®-Methode, modifiziert nach Chomczynski und Sacchi [115]. Die zu untersuchenden Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen oder in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % unter Standardbedingungen kultiviert. Das Kulturmedium wurde abpipettiert und verworfen, anschließend wurden die Zellen mit 5 ml bzw. 2 ml 1 x PBS zweimal gewaschen, um Reste des Mediums zu beseitigen. Durch Zugabe von 1 ml bzw. 400 μ l Trizol® (Life Technologies, Waltham, PA, USA) lösten sich die Zellen vom Flaschenboden und konnten in ein 2 ml bzw. 800 μ l Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Suspension wurden 300 μ l Chloroform (Roth, Karlsruhe, D) zugegeben, für 15 s kräftig geschüttelt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Im anschließenden Zentrifugationsschritt für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C entstehen drei Phasen, die obere wässrige Phase, die proteinhaltige Interphase und die untere Phenol-Chloroform-Phase. Die obere wässrige Phase, welche

die RNA enthält, wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol und 10-minütige Inkubation bei RT gefällt. Im Anschluss daran wurde die Probe 10 min bei 14.0000 rpm und 4 °C zentrifugiert und das RNA-Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 % EtOH/DEPC-H₂O zweimal gewaschen. Das RNA-Pellet wurde im Vakuum-Konzentrator getrocknet und in einer adäquaten Menge DEPC-H₂O durch 10-minütige Erwärmung auf 55-65 °C im Heizblock (Roth, Karlsruhe, D) gelöst. Die Gesamt-RNA-Konzentration wurde photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, D) bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

4.9 Gesamt-RNA Isolierung aus Gewebe mit Trizol

Zur RNA-Isolierung, wurden Kryogewebe Proben von ca. 30 mg entnommen und in 2 ml Röhrchen, die Keramik-Kügelchen (precllys Keramik-Kügelchen, Peqlab, Erlangen, D) mit einem Durchmesser von 1,4 mm enthielten, überführt. Zu der Gewebeprobe wurde 1 ml Trizol gegeben und anschließend im Gewebe-Homogenisator Precellys24 (Peqlab, Erlangen, D) zweimal 20 s bei 5000 rpm zerkleinert. Waren nach dem ersten Durchlauf noch Gewebestücke gut sichtbar, wurde der Homogenisationsvorgang ein weiteres Mal wiederholt. Der Suspension wurde 300 µl Chloroform zugegeben und dann wurde nach dem Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNA (Abschnitt 4.8) weiter verfahren.

4.10 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die Methode der reversen Transkription erlaubt die Umschreibung von Gesamt-RNA (mRNA) in cDNA. Dazu wird RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Reverse Transkriptase, eingesetzt. Die dadurch gewonnene cDNA kann in weiterführenden Experimenten verwendet werden, wie zum Beispiel der *real time* PCR zu rein analytischen Zwecken oder – bei

Verwendung von Oligo-dT-Primern - zur Gewinnung vollständiger eukaryotischer Gene und ihrer Einbringung in andere Organismen.

Zur Herstellung von cDNA wurden gemischt:

2 µg Gesamt-RNA,
8 µl Random-Primer (25 µg/µl Hexanukleotide)
und mit DEPC-H₂O bis 20 µl aufgefüllt.

Die Reverse Transkriptase synthetisiert zunächst aus einer einzelsträngigen RNA ein RNA-DNA-Hybrid. Aufgrund dessen wurde die Gesamt-RNA zunächst für 10 min bei 70 °C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt, um vorhandene Sekundärstrukturen aufzubrechen. Im nächsten Schritt wurden:

8 µl 5-fach Puffer
0,8 µl dNTPs
0,25 µl Reverse Transkriptase
10,95 µl DEPC-H₂O

zu den 20 µl Gesamt-RNA-Ansätzen pipettiert. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler 55 min auf 42°C und 15 min bei 70°C inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.11 Quantitative PCR (*Real time PCR*)

Die quantitative PCR oder auch *Real time PCR* basiert auf dem Prinzip der Standard-PCR [116, 117]. Diese Methode erlaubt es jedoch zeitgleich, durch Fluoreszenzmessung am Ende eines Zyklus die amplifizierte DNA zu quantifizieren. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®-Green interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz mit der DNA-Menge zunimmt [118]. Es entsteht ein fluoreszierender Komplex, der Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494$ nm absorbiert und Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 521$ nm emittiert. SYBR®-Green bindet zudem auch einzelsträngige DNA und RNA. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal ist jedoch sehr viel geringer, verglichen mit dem, welches bei der Bindung von doppelsträngiger DNA entsteht.

Zur Bestimmung der Reinheit des PCR-Produktes wurde am Ende einer *Real time* PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Bestimmung der relativen Expression (E_r) einer Nukleinsäuresequenz in einer Probe erfolgte auf der Basis des logarithmischen Zusammenhangs zwischen Kopienzahl und C_t -Werten (cycle threshold). Als C_t -Wert bezeichnet man die Zykluszahl, bei der ein Fluoreszenzsignal erstmals einen zuvor festgelegten, für alle Proben identischen Grenzwert (threshold) übersteigt. Zudem ist die Repräsentierung einer ursprünglichen RNA-Sequenz im *real time* PCR-Ansatz abhängig von der Menge der eingesetzten cDNA und der cDNA-Synthese-Effizienz. Aufgrund dessen wird zur Quantifizierung in der Regel ein Referenz-Gen herangezogen (*House-keeping-Gen*, z.B. β 2-Mikrotubulin). Sofern im Ergebnisteil nichts Gegenteiliges angegeben ist, erfolgten die Angaben bei dieser Arbeit als relative Expression (E_r) des Zielgens (Z), normiert auf β 2-Mikroglobulin (β 2) gemäß der Beziehung:

$$E_r = 1/2^{\Delta C_t}, \text{ mit } \Delta C_t = C_t(z) - C_t(\beta 2)$$

Es fand folgender Reaktionsansatz für die *real time* PCR Anwendung:

8,26 μ l 2 x SensiMix SYBR®-HiRox

5,3 μ l HPLC-Wasser

1 μ l Forward-Primer

1 μ l Reverse Primer

Die Proben wurden zweifach gemessen. Es wurde jeweils 1 μ l cDNA eingesetzt. Die *real time* PCR wurde unter folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt: 50°C für 2 min., 95°C für 15 min., je 40 Zyklen bei 95°C für 30 s, 30 s bei der jeweiligen spezifischen Bindungstemperatur der Primer (**Tabelle 2**) und 72°C für 1 min.

Nach 40 Zyklen wurde die Reinheit der PCR Produkte anhand der Schmelzkurven analysiert. Die Berechnung der C_t -Werte erfolgte automatisch durch die ABI Prism SDS 7000-Software.

4.12 Proteinextraktion aus Zellkulturen und Kryogewebe

Die Extraktion von Proteinen wurde mit RIPA-Puffer (siehe Abschnitt 3.5) durchgeführt, dem vor Verwendung 10 µl/ml Protease-Inhibitor Cocktail (Serva, Heidelberg, D), zur Hemmung endogener Proteasen, 1 µl/ml 1 M DTT (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), sowie 10 µl/ml 100 mM Natriummetavanadat (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) hinzugefügt wurde.

Zur Proteinextraktion aus Zellkulturen wurde von den behandelten Zellen das Medium entfernt und diese zweimal durch vorsichtiges Schwenken mit 1 x PBS gewaschen. Das restliche PBS wurde entfernt und je nach Zelldichte RIPA-Puffer (T25-Flaschen 50-110 µl und T75-Zellkulturflaschen 150-350 µl) über die adhärennten Zellen verteilt. Alle Schritte der Proteinextraktion fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt, um den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen möglichst gering zu halten. Die Flaschen wurden für 15 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert und die Zellen mit einem Zellschaber (TPP®, Trasadingen, CH) vom Flaschenboden gelöst. Die suspensierten Zellen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend zu einem weiteren Zellaufschluss mit 10 bis 15 Impulsen bei 40 % Power mit dem UP 100H Ultraschall-Prozessor (Dr. Hielscher GmbH, Teltow, D) sonifiziert. Der Zelldebris wurde im Anschluss daran 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Proteinlysate wurde als Überstand abgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

Bei der Proteinextraktion von Geweben wurde aus bei -80°C gelagerten Gewebeproben ca. 30 mg entnommen und RIPA-Puffer im Verhältnis 10 µl/mg hinzugefügt. Auch hier fanden alle Extraktionsschritte auf Eis statt. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Stabhomogenisator (T10 basic, IKA, Staufen im Breisgau, D) auf Eis zerkleinert und die Gewebereste, durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C entfernt. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.13 Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *DC Protein Assay Kit* von BioRad in Mikrotiterplatten nach Herstellerangaben. Diese Methode basiert auf dem Biuret Assay, bei dem Proteine im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Die Reagenz B bildet mit Cu^+ einen bläulichfarbenen Komplex, dessen Extinktion bei 750 nm gemessen wird. Bei jeder Messung wurde eine Protein-Standardreihe mitgeführt, hergestellt aus einer 1 %igen BSA-Lösung (w/v). Die Konzentrationen betragen 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA in dH_2O . Bei der Messung wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden konnte.

Zunächst wurde durch Zugabe von 20 μl Reagenz S je 1 ml Reagenz A eine Arbeitslösung hergestellt. Je well einer 96-Well-Platte wurden 5 μl des Standards bzw. der Proteinprobe pipettiert und je 25 μl der Arbeitslösung hinzugefügt. Im Anschluss daran wurden 200 μl /well Reagenz B ergänzt. Die Lösungen bilden mit den Proteinen einen Farbkomplex, dessen optische Dichte in der Lösung nach der Inkubation direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Im Anschluss daran wurde die Platte für 15 min bei 300 rpm auf dem Thermoschüttler Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm und einer Referenzwellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Proteinkonzentration der Standardkurve und der Proben wurde mit Hilfe Software Magellan von Tecan ermittelt. Sowohl die Standardreihe, als auch die Proteinproben wurden doppelt gemessen.

4.14 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) [119] verwendet. Dieses System, basierend auf Tris/Glycin/Tris-HCl-Puffern, besteht aus einem großporigen Sammelgel, welches über ein kleinporiges Trenngel geschichtet wurde. Die unterschiedlichen Porengrößen und pH-Werte bewirken zunächst eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel. Im Trenngel erfolgt dann die

Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülgröße. Die Gelelektrophorese erfolgte in Elektrophoreseapparaturen der Firma BioRAD unter Verwendung eines 15%-igen bzw. 8%-igen Trenngels und eines 4%-igen Sammelgels. Damit eine problemlose Auftrennung gewährleistet werden kann, wurden die Proteine zuvor durch SDS denaturiert und mit Hilfe von β -Mercaptoethanol vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Dies wurde durch Aufnahme der Proteine in 2 x Laemmli-Probenpuffer bzw. bei Probenvolumina $>10 \mu\text{l}$ in 5 x Laemmli-Probenpuffer und anschließendem Erhitzen auf 95°C für 5 min realisiert. Zudem bewirkt SDS, da es sich an die Proteine in einem konstanten molaren Verhältnis anlagert, die Bildung negativ geladener SDS-Proteinkomplexe, welche eine gleichmäßige Wanderung der Proteine im elektrischen Feld vom Minus- zum Plus-Pol gewährleisten. Da SDS die natürlichen Ladungen der Amino- und Carboxylgruppen durch eine hohe und konstante negative Ladungsdichte überdeckt, ist die Wanderungsgeschwindigkeit nahezu ausschließlich eine Funktion des Molekulargewichts. Aufgetragen wurden Probenvolumina von $20 \mu\text{l}$ bis $45 \mu\text{l}$ mit Proteinmengen von $40 \mu\text{g}$ bis $60 \mu\text{g}$. Als Molekulargewichtsstandard wurden $5 \mu\text{l}$ des PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Waltham, PA, USA) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel, was im Sammelgel einer Spannung von ca. 80 V und im Trenngel von ca. 120 V entspricht. Die Zusammensetzung des für den Gellauf verwendeten Puffers ist in Abschnitt 3.5 aufgezeigt.

4.15 Western blotting

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine bezüglich ihrer Molekülgröße in der SDS-PAGE, erfolgte die Übertragung der Proteine im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran (Whatman, Fairfield, CT, USA) im Tank-Blot-Verfahren, mit Hilfe einer Mini Trans-Blot® Cell Apparatur von BioRAD. Beim Western Blot-Verfahren wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine zur Anode und somit aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran wandern. Der Tank-Blot wurde in Schichten aufgebaut, die in die Blotkassette, bestehend

aus zwei Kunststoffgittern, gestapelt wurden. Auf das Anodengitter wurden zunächst, ein Schwamm und 2 passgenaue Filterpapiere (VWR), die Nitrocellulose-Membran und anschließend das SDS-Gel, wieder 2-Filterpapiere und ein Schwamm aufgelegt. Mit einer Walze wurden vorsichtig sämtliche Luftblasen aus dem Stapel herausgedrückt. Den Abschluss bildet das Kathodengitter. Nach Verriegelung wird die Blotkassette in die Tank-Blot-Apparatur eingesetzt, sowie eine Kühleinheit, um Schädigungen der Proteine und des Blotters durch Überhitzung zu vermeiden. Die Blotkammer wurde anschließend mit Transferpuffer (siehe Abschnitt 3.5) aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte je nach Größe des zu untersuchenden Proteins 1 bis 2 Stunden bei 200 mA. Während des Blottens wurde der Puffer, durch einen in die Kammer gelegten Rührfisch ständig leicht bewegt.

Abschließend wurde die Membran sofort in die zum immunologischen Nachweis notwendige Blockierungslösung (siehe Abschnitt 3.5) überführt.

4.16 Die immunologische Detektion von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis wurde die Nitrocellulose-Membran nach dem Blotten für 1 h bei RT in 5 % (w/v) Magermilchpulver - gelöst in TBS-Tween20 - blockiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper vermieden. Nach dem Blocken wurde ein für das zu detektierende Protein spezifischer primärer Antikörper (vgl. **Tabelle 3**) auf die Membran gegeben und unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran mit TBS-Tween20 zweimal 5 min und zweimal 10 min mit PBS-Tween20 gewaschen. Es folgte eine 1-stündige Inkubation mit einem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper (vgl. **Tabelle 3**), der sich spezifisch an den konstanten Teil des primären Antikörpers bindet. Zuletzt wurde die Membran erneut zweimal 5 min und zweimal 10 min mit PBS-Tween20 gewaschen. Daran schloss sich die Detektion unter Verwendung des „Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate“ (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) nach Angaben des Herstellers an, sowie die Detektion des Substratumsatzes auf ECL-Film, der in einem Automaten für Röntgenfilme Curix 60 (Agfa, Mortsel, BE) entwickelt wurde.

Im Fall der Weiterverwendung der Membran zur Identifizierung eines zweiten Proteins, mussten die gebundenen Antikörper zuvor abgelöst werden (sog. Strippen).

Das Strippen der Membran erfolgte mit Restore Strippingbuffer (Thermo, Waltham, PA, USA) für 45 min. Daran schlossen sich zwei Waschschriffe von je 10 min mit TBS-Tween20 an. Vor der Behandlung der Membran mit einem zweiten primären Antikörper, wurde die Membran bei RT 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver gelöst in TBS-Tween20 geblockt.

4.17 Xenograft-Meningeommausmodelle

4.17.1 Subkutanes Meningeommausmodell

Die Tumorinduktion wurde an mindestens 8 Wochen alten Nacktmäusen (Swissnude, (Charles River, Wilmington, MA, USA) vorgenommen. Nach vorhergehender Inhalationsnarkose mit Isofluran (Baxter, Deerfield, IL, USA) und Desinfektion der Haut wurden der Maus beidseits im Nackenbereich subkutan (s.c.) 3×10^6 Zellen der Zelllinie IOMM-Lee injiziert. Die Zellen waren zuvor trypsinisiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Matrigel-PBS-Gemisch (1:1) auf 3×10^7 Zellen/ml eingestellt. Das Tumolvolumen wurde einmal wöchentlich mit Hilfe eines Messschiebers (Promat, Hamburg, D) durch äußerliche Messung an der lebenden Maus anhand von zwei senkrecht zueinander verlaufender Achsen gemäß der Formel $V = \pi/6 \times a \times b^2$ ($a > b$) geschätzt. Am 21. Tag nach Tumorapplikation wurden die Tiere getötet, der Tumor herausgeschnitten, gewogen und entweder für Western blotting bei -80°C gelagert oder in Paraffin für histochemische und immunhistochemische Färbungen eingebettet.

4.17.2 Orthotopes Meningeommausmodell

Die intrakranielle Applikation von Meningeomzellen wurde an mindestens 8 Wochen alten Nacktmäusen (Swiss Nude (Charles Rivers, Wilmington, MA, USA)) vorgenommen. Zunächst wurde das Gewicht der Tiere bestimmt und diese dann durch intraperitoneale (i.p.) Injektion eines Gemisches aus

1 % Ketamin und 0,2 % Rompun in PBS (ca. 8 µl/g Körpergewicht) anästhetisiert. Anschließend wurde das Tier in einem Stereotaxie-Instrument (WPI, Sarasota, FL, USA) fixiert. Druckpunkte, die für das Tier schmerzhaft wären, wurden zuvor lokal mit 2 %tiger Xylocain-Salbe (AstraZeneca, London, UK) behandelt. Da trotz Einsatz einer Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Zeiss, Oberkochen, D) die Gefahr besteht, dass die Augen der Mäuse austrocknen, wurden diese mit Augensalbe (Bepanthen®, Bayer, Leverkusen, D) davor geschützt. Zunächst wurden mittels eines 10 mm langen Sagittalschnittes Kopfhaut und Knochenhaut median eröffnet und das Operationsfeld mit 2%-iger H₂O₂-Lösung desinfiziert. Anschließend wurden rechts und links der Sagittalnaht des Schädelknochens zwischen Lambda und Bregma mit einem Dentalbohrer (Omnidril 35 115/230V, WPI, Sarasota, FL, USA) jeweils ein Loch von ca. 0,8 mm Durchmesser in den Schädelknochen gebohrt. Mit Hilfe einer Mikroliter-Spritze (1701 RNR (10 µl), Hamilton, Bonaduz, CH) wurden langsam 2,5 µl PBS mit $2,5 \times 10^5$ Tumorzellen pro Loch subarachnoidal appliziert. Herausgeschwemmte Zellen wurden mit Hilfe eines in 0,9 %-ige NaCl-Lösung getränkten Wattestäbchens entfernt. Die Trepanationswunden wurden offen gelassen, der Hautschnitt dagegen wurde mit Histoacryl® Gewebekleber (B.Braun, Melsungen, D) verschlossen. Um ein Auskühlen der Tiere während der Narkose zu verhindern, wurden die Mäuse während der Operation auf eine Wärmeplatte (ATC1000, WPI, Sarasota, FL, USA) gelegt und anschließend der Käfig, bis zum Aufwachen der Maus unter eine Infrarotlampe (Sanitas, Wals, D) verbracht.

4.17.3 Behandlung mit Temsirolimus

Ab dem 3. Tag nach der Zellapplikation wurde die Hälfte der Tiere intraperitoneal (i.p) täglich (5 Tage pro Woche) mit 20 mg/kg Körpergewicht Temsirolimus behandelt. Die andere Hälfte bekam physiologische Kochsalzlösung.

Zur Ermittlung der Kinetik des intrakraniellen Tumorwachstums wurden zwei MRT-Aufnahmen je Tier durchgeführt, die jeweils 7 Tage auseinander lagen.

Die Messung der Mäuse im Kleintier-MRT erfolgte durch das Labor für Nicht-Invasive Bildgebung des Leibniz-Instituts für Neurobiologie in Magdeburg. Die Tumorumfänge wurden mit Hilfe der frei zugänglichen Software ImageJ (imagej.nih.gov/ij/) ermittelt.

Nach Beendigung des Experiments wurden die Tiere durch Dekapitation getötet und ihr Gewicht bestimmt. Anschließend wurde das Fell vom Schädel entfernt. Die Köpfe wurden mindestens 48 Stunden in 4%igem Formaldehyd gelagert und anschließend für 4 h bei 60°C entkalkt in einem Gemisch aus 60%-iger Salpetersäure, 37%-igem Formalin und Natrium-Acetat. Anschließend wurde der tumortragende Bereich herausgeschnitten. Die Gewebeprobe wurde für weiterführende Färbungen standardmäßig in Paraffin eingebettet. Dazu erfolgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) gemäß in der humanen Histopathologie üblicher Standardmethoden, die Überführung in den Xylol-Ersatz (Protax Clear, Quartett, Berlin, D) und anschließend die Einbettung in 65°C warmes Paraffin auf in der Histopathologie üblichen Kunststoff-Trägern. Dies erlaubte die Herstellung von Paraffinschnitten (4 µm) auf einem Schlittenmikrotom (Leica, Solms, D) des histologischen Routinelabors für spätere Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) oder Antikörpern.

Zur Anwendung von Western blotting wurden die Mäuse wie oben beschrieben getötet, das Fell im Schädelbereich und die Schädelknochen entfernt. Anschließend wurde Tumormaterial entnommen und bei -80°C bis zur Durchführung vom Western blotting (vgl. Abschnitt 4.15) aufbewahrt. Die TV-Antragsnummer für die Versuche lautet: 203.-42502-2-956 Uni MD.

4.18 Humanes Probenmaterial und immunhistochemische Analysen

4.18.1 Untersuchtes Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebeproben humaner Meningeome sowie aus Mäusen präparierte Tumoren und Köpfe intrakraniell tumortragender Mäuse immunhistochemisch untersucht. Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden die Proben nach ihrer Entnahme in 4%-igem Formaldehyd

fixiert und standardmäßig in Paraffin eingebettet. Die Präparate von Meningeomen unterschiedlicher WHO Grade entstammen der Tumorbank des Instituts für Neuropathologie der Universitätsklinik Magdeburg. Bei Meningeomen handelt es sich um Tumore der Hirnhaut, die durch die Entartung von Zellen der Arachnoidea entstehen. Bei dieser Erkrankung lassen sich hinsichtlich der histologischen Ausprägung verschiedene Subtypen unterscheiden, die meist einem benignen biologischen Verhalten und damit dem WHO Grad I zuzuordnen sind. Von Interesse war hierbei die Unterscheidung zwischen WHO Grad I und den aggressiveren Subtypen mit ungünstigerer Prognose, d.h. atypische (WHO Grad II) und maligne Meningeome (WHO Grad III). Die Verwendung des Tumormaterials wurde von der zuständigen Ethikkommission zugelassen.

Immunhistochemische Färbungen erfolgten an Serienschnitten paraffineingebetteter humaner und muriner Tumorproben. Die Präparate wurden mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki-67 (1:500, Dako, Hamburg, D) und mit Antikörpern gegen phospho-p70S6K (Thr³⁸⁹, 1:100; Epitomics, Cambridge, UK), phospho-Akt (Ser⁴⁷³, 1:400, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸, 1:100; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), phospho-4EBP (Thr^{37/46}, 1:200; Cell Signaling, Danvers, MA, USA), mTOR (1:100, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 4EBP1 (1:100, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Akt (1:400, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), und p70S6K (1:100, Abcam, Cambridge, UK) behandelt und das jeweilige Antigen durch die Behandlung mit Diaminobezidin (DAB+) detektiert. Schnitte mit gleicher Behandlung, jedoch ohne Primärantikörper, dienten als Kontrolle. Bei der nukleären Ki67-Färbung wurde der mittlere prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellkerne an der Gesamtzahl der Kerne in mehreren Gesichtsfeldern im 40-er Objektiv bestimmt (sog. Ki67-Index). Bei den übrigen Immunfärbungen erfolgte eine visuelle Gradierung der Färbeintensität in drei Klassen: keine Färbung (-), schwache Färbung (+), mittelstarke Färbung (++) und starke Färbung (+++).

4.18.2 Detektion der Proliferationsaktivität mittels Ki-67

Einer der wichtigsten Proliferationsmarker ist das Ki-67 Antigen, da dieses Protein in allen proliferierenden Zellen während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird [120, 121]. MIB ist ein spezifischer Antikörper der gegen dieses im Zellkern lokalisierte Antigen gerichtet ist. Proliferierende Zellen erhalten dadurch eine starke Kernfärbung [122]. Vor der Verwendung des Antikörpers wurden die Präparate zunächst durch eine Behandlung mit Xylol Ersatz (Protax Clear, Quartett, Berlin, D) für 2 mal 10 min entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben durch eine absteigende Alkoholreihe (100, 96, 70 %) Ethanol rehydriert. Im nächsten Schritt wurde durch Wärmebehandlung im Dampfgarer mit 10 mM Citratpuffer (Dako, Hamburg, D) für 5 min eine Antigendemaskierung vorgenommen. Nach 20 minütiger Abkühlungsphase wurde mit 1 x TBS gewaschen und die Präparate in einen Immunfärbeautomaten (Dako Cytomation, Dako, Hamburg, D) überführt. Dort wurden maschinell nacheinander folgende Schritte vorgenommen: Zunächst wurde die Aktivität endogener Peroxidase durch eine 5-10 Minuten dauernde Inkubation der Proben mit Dual Endogenous Enzyme Block (Dako, Hamburg, D) ausgeschaltet. Die Probe wurde dann mit einem primären Ki67-Antikörper (Verdünnung 1:500, Dako, Hamburg, D) behandelt und anschließend mit dem HRP-markierten Polymer jeweils 30 Minuten inkubiert. Nach einer 5-10 min dauernden Inkubation mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB+) Substratchromogen wurde der Ort des Antigens, durch ein braun gefärbtes Präzipitat erkennbar. Des Weiteren erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (Dako, Hamburg, D) und die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert und mit Xylol-Ersatz (Protax Clear) behandelt. Die Konservierung der eingefärbten Proben erfolgte durch Eindecken mit Paramount (Quartett, Berlin, D).

4.18.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist ein Standardverfahren in der Histologie, mit dem verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbung können krankhafte Veränderungen in Gewebeproben untersucht werden. Die Kernfärbung erfolgt durch den Farbstoff Hämatoxylin nach DELAFIELD (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Hämatoxylin ist ein Naturstoff, der aus dem Blauholzbaum gewonnen wird. Um die färbenden Eigenschaften zu aktivieren wird der Stoff entweder durch Luftoxidation oder chemische Oxidation in Hämatein umgewandelt, mit dem die Färbung durchgeführt wird. Durch Bindungen an Alaune oder Metalle wird eine Umladung des negativ geladenen Hämatein vorgenommen, so dass die jetzt positiven Ladungen an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren im Zellkern anlagern können. Das Zytoplasma wird durch Eosin angefärbt. Im Ergebnis sind in den Präparaten die Kerne tiefblau angefärbt und das Zytoplasma sowie das Kollagen rosa gefärbt.

Zunächst wurden die Präparate durch eine Behandlung mit Xylol-Ersatz (Protax Clear, Quartett, Berlin, D) für 2 mal 10 min entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben durch eine absteigende Alkoholreihe (100, 96, 70 %) Ethanol rehydriert und vorsichtig mit H₂O abgespült. Im darauffolgenden Schritt wurden die Präparate 5 min in einer Hämatoxylin-Lösung (Fisher, Waltham, PA, USA) inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit H₂O gespült und in einer 1 %-igen Salzsäure-Ethanol-Lösung kurz differenziert. Nach erneutem Spülen mit H₂O wurden die Präparate mit heißem Leitungswasser gebläut. Daran schloss sich ein 3 minütiger Färbungsschritt mit 1 %-iger Eosin-Lösung an, bei dem das Zytoplasma angefärbt wird. Die Objektträger wurden abermals gründlich mit H₂O gespült und kurz nacheinander einmal mit 70 %-igem Ethanol und jeweils zweimal mit 96 und 100 %-igem Ethanol gespült, um das überschüssige Eosin ausziehen. Abschließend wurden die Präparate mit Xylol-Ersatz (Protax Clear, Quartett, Berlin, D) behandelt und zur Konservierung mit Paramount eingedeckt.

4.19 Statistik

Multiple Vergleiche von Behandlungsgruppen in MTT-, BrdU- und Migrations-Tests (*in vitro*), sowie multiple Vergleiche der relativen Genexpression (*Real time* PCR) zwischen humanen Tumorgruppen wurden im ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Tukey Post-Hoc-Test. Paarweise Vergleiche des Tumorwachstums (geschätztes Tumolvolumen subkutan, gemessene Tumorgewichte, MRT-geschätzte Tumolvolumina, Ki67-Proliferationsindizes) zwischen einer einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppe in den Tiermodellen erfolgten durch den Mann-Whitney U-Test. Zur Auffindung linearer Korrelationen zwischen Parametern wurde Pearson's Korrelationskoeffizient berechnet. Alle Berechnungen und statistischen Tests wurden ausgeführt mit SPSS (Version 21) und Signifikanz wurde angenommen für $p \leq 0,05$. Fehlerbalken in den Abbildungen sind als Standardabweichung (SD) oder Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) in den jeweiligen Abbildungen ausgewiesen.

5 Ergebnisse

5.1 Expression und Aktivierungszustand von Komponenten des mTORC1-Signalwegs in Meningeomen

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass somatische Mutationen die zu einer Überaktivierung bzw. zum Funktionsverlust von Schlüsselkomponenten des Akt/PI3K/mTOR-Signalwegs führen, in einer Reihe solider Tumoren unterschiedlicher Ausgangsgewebe und in einer Reihe hämatologischer Neoplasien zu finden sind. Die Überaktivierung des Akt/PI3K/mTOR-Signalwegs resultiert in einer tief reichenden Störung der Kontrolle des Zellwachstums und –überlebens, welche letztendlich zu einem kompetitiven Wachstumsvorteil führt. Gleichzeitig werden Angiogenese, Metastasierung und Therapieresistenz gefördert. Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit lagen noch keine systematischen Analysen des Proteins mTOR selbst und seiner im mTORC1-Signalweg vorgeschalteten Kinasen in Meningeomen vor, ebenso wenig Analysen der mTORC1 nachgeschalteten Kinasen. Obwohl die Phosphorylierung eines dieser unmittelbar nachgeschalteten Enzyme (p70S6K1) als etablierter Maßstab für die Kinaseaktivität des Komplexes mTORC1 gilt, gab es dazu ebenfalls keine systematischen Aussagen für Meningeome.

Anhand eines Gewebe-Mikroarrays, auf dem sowohl 52 Meningeomproben, als auch tumorfreies meningeales Gewebe als Kontrolle aufgebracht waren, wurde durch die Verwendung der Antikörper phospho-Akt, phospho-mTOR, phospho-p70S6K1 und phospho-4EBP1 zunächst mittels immunhistochemischer Färbung der Phosphorylierungsstatus von Akt, mTOR und der mTORC1-Substrate p70S6K1 und 4EBP1 überprüft. Generell fanden sich in Meningeomen aller Grade und für alle Antikörper hohe Prozentanteile zumindest moderat angefärbter Tumorzellen (**Tabelle 3**). Besonders wesentlich sind dabei die Färbungen mit dem phospho-p70S6K-Antikörper. Aus ihnen konnte abgeleitet werden, dass der mTORC1-Komplex in Meningeomen aller drei WHO Grade in einem hohen Prozentsatz der Fälle eine enzymatische Aktivität aufweist, welche sich bereits mit der Sensitivität der immunhistochemischen Methode erfassen lässt. Im Gegensatz dazu wiesen die als Kontrolle mitgeführten Meningen, lediglich die blaue Gegenfärbung der

Zellkerne auf, jedoch keine braune durch den Antikörper hervorgerufene zytoplasmatische Färbung (**Abbildung 2**). Somit war davon auszugehen, dass mTORC1 in Meningeomen aller Grade eine physiologische Rolle spielt und die Aktivität des Komplexes in der Mehrzahl der Fälle, gegenüber den Ausgangszellen erhöht ist. Zudem war der Anteil immunpositiver Fälle gerade in den therapeutisch kritischen atypischen (WHO Grad II) und malignen Meningeomen (WHO Grad III) mit 69 bzw. 78 % besonders hoch. Ähnliches galt auch für das zweite direkte mTORC1-Substrat 4EBP1. Grundsätzlich ließ sich die phosphorylierte Form dieses Proteins, bei schwacher bis kräftiger Immunpositivität, in allen Tumoren der Grade II und III als weiterer Beleg einer mTORC1-Enzymaktivität detektieren, welche deutlich über diejenige der Meningen hinausgeht (**Abbildung 2**). Aufgrund dessen waren sinnvolle Voraussetzungen gegeben, den mTORC1-Komplex als therapeutische Zielstruktur anzuvisieren. Gestützt wurde diese Schlussfolgerung durch den besonders in malignen Meningeomen mit je 78 %, sehr hohen Anteil immunpositiver Fälle für phospho-Akt und phospho-mTOR.

Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der Auswertung immunhistochemischen Färbung.

Immunhistochemische Färbung der phosphorylierten Formen von Akt, mTOR und mTOR-abhängigen Proteinen in 52 Meningeomproben, Angegeben ist die Anzahl immunpositiver Tumore des Gewebe-Arrays. Die Zahlen in Klammern geben die Prozentanteile für den jeweiligen Tumorgrad an

	WHO Grad I (n = 30)	WHO Grad II (n = 13)	WHO Grad III (n = 9)
<i>Phospho-p70S6K</i>			
-	13 (43)	4 (31)	2 (22)
+	15 (50)	9 (69)	7 (78)
++	2 (7)	0 (0)	0 (0)
+++	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Phospho-mTOR</i>			
-	10 (33)	7 (54)	2 (22)
+	5 (17)	3 (23)	5 (56)
++	7 (23)	3 (23)	2 (22)
+++	8 (27)	0 (0)	0 (0)
<i>Phospho-Akt</i>			
-	17 (57)	6 (46)	2 (22)
+	10 (33)	6 (46)	3 (33)
++	3 (10)	1 (8)	1 (11)
+++	0 (0)	0 (0)	3 (33)
<i>Phospho-4EBP</i>			
-	3 (10)	0 (0)	0 (0)
+	7 (23)	0 (0)	3 (33)
++	5 (17)	3 (23)	1 (11)
+++	17 (57)	10 (77)	5 (56)

(-) keine Expression, (+) schwache Expression, (++) moderate Expression, (+++) starke Expression

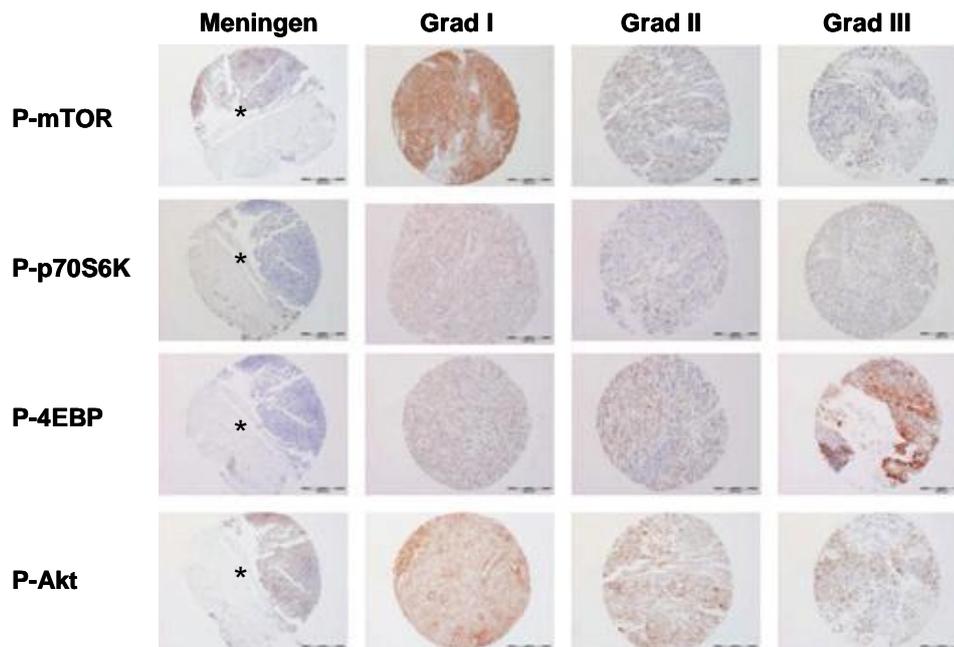


Abbildung 2: Immunhistochemische Darstellung von mTOR-Signalproteinen anhand eines Gewebe-Microarrays.

Der Gewebe-Microarray enthält Meningeomproben von WHO Grad I, II, III. Die mTOR-Signalproteine wurden durch die phosphorylierten Formen der Antikörper von mTOR, p70S6K, 4EBP1, Akt detektiert.

Um das basale Expressionslevel von mTOR und seiner Substrate p70S6K und 4EBP1 zu bestimmen, wurde eine *real time* PCR-Analyse an Meningeomproben unterschiedlicher Malignitätsgrade durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 3** dargestellt und zeigen die relative Expression der mTOR-RNA, bzw. p70S6K- und 4EBP1-mRNA im Verhältnis zu dem Referenzgen β 2-Mikroglobulin. Wie erwartet, waren aufgrund der Schmelzkurven als spezifisch einzustufende Produkte in allen Fällen zu sehen. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied der Transkriptmengen zwischen den WHO Graden feststellen. Dabei wurden aufgrund der zu geringen Zahl frisch eingefrorener Proben höherer Tumorgade die WHO Grade II und III zu einer Gruppe zusammengefasst und ein U-Test durchgeführt. Abgebildet wurde hierbei der Standardfehler des Mittelwertes ($\text{mean} \pm \text{SEM}$). Es ergab sich vor allem kein glaubhafter Hinweis auf eine höhere Verfügbarkeit einer Komponente des mTORC1-Signalwegs in den hochgradigen Meningeomen. Berücksichtigt man auch die Ergebnisse der Immunhistochemie, schienen sich höhergradige Tumore also eher durch eine gesteigerte Phosphorylierungsgesteuerte Aktivität von mTORC1 auszuzeichnen als durch eine höhere

Verfügbarkeit von mTOR selbst oder von Proteinsubstraten des Komplexes mTORC1. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Überaktivierung dieses Signalwegs in den besonders kritischen Tumoren eher auf hochregulierten Kinase-Kaskaden zu beruhen scheint als auf der erhöhten Genexpression einzelner Komponenten.

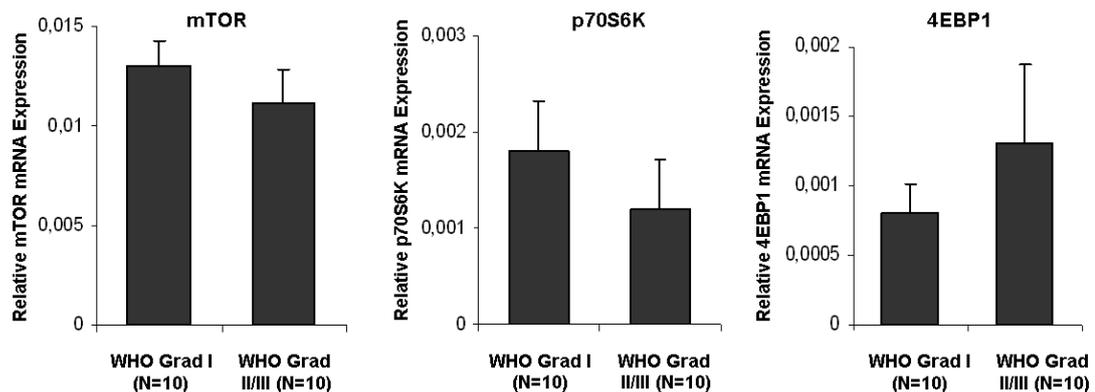


Abbildung 3: Expressionsanalysen von Meningeomen unterschiedlicher Malignitätsgrade
 Dargestellt ist die relative Expression der mTOR-RNA, p70S6K-mRNA und 4EBP1-mRNA, ermittelt durch *real time* Expressionsanalysen von Meningeomproben unterschiedlicher Malignitätsgrade im Verhältnis zum Referenzgen β 2-Mikrotubulin. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

An die immunhistochemische Charakterisierung und die Bestimmung des mRNA-Expressionslevels schloss sich die Bestätigung der Proteinexpression und -aktivierung durch Western blotting an ausgewählten Meningeomproben vom WHO Grad I und II. Es konnte gezeigt werden, dass alle genannten Proteine in den Meningeomen vorkommen und sich auch stets die phosphorylierte Form nachweisen lässt, wenngleich in variabler Menge (**Abbildung 4**). Die detektierte starke Expression und Aktivierung insbesondere von p70S6K und 4EBP1 unterstreicht, exemplarisch mit einer zweiten Methode, die in der Immunhistochemie erzielten Resultate.

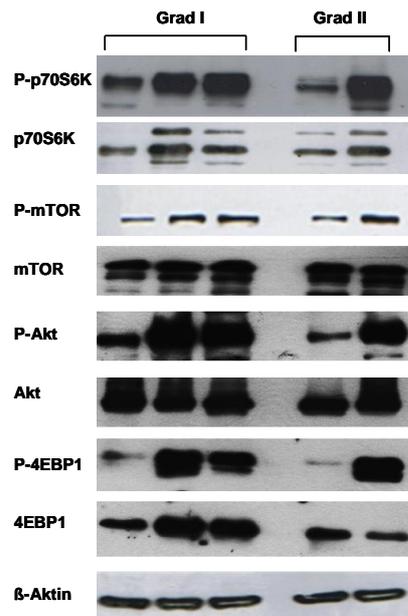


Abbildung 4: Western Blots ausgewählter Meningeomproben

Aufgetragen wurden Proteine von humanen Meningeomen vom WHO Grad I und II, die phosphorylierte Form des jeweiligen Antikörpers wurde durch das Präfix „P“ gekennzeichnet.

Mit den gleichen Antikörpern wurde nachgewiesen, dass bei den *in vitro* und zur Xenotransplantation verwendeten Zelllinien der Signalweg ebenfalls aktiviert vorliegt. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der malignen Meningeom-Zelllinie IOMM-Lee, da diese Linie als gut funktionierendes intrakranielles Xenograftmodell der Maus etabliert wurde und zur Evaluierung einer gezielten Therapie mit einem mTORC1-Hemmer eingesetzt wurde, wie in Abschnitt 5.4.2 dargestellt. In allen untersuchten Linien fand sich im Western Blot ein deutliches Signal für phosphorylierte p70S6K (Thr³⁸⁹) als Nachweis eines aktiven mTOR-Komplexes 1. Die Spezifität des phospho-p70S6K-Signals als Maß der mTORC1-Enzymaktivität war zuvor bereits überprüft worden durch Nachweis des selektiven Verlusts dieser Bande nach Behandlung der Zellen mit dem mTOR-Inhibitor Temsirolimus (**Abbildung 5**). Als Referenz wurde die detektierte p70S6K-Bande herangezogen, die im Gegensatz zu phospho-p70S6K phosphorylierungs-unabhängig ist.

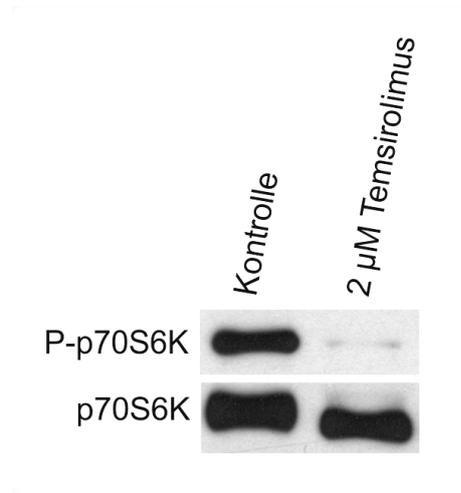


Abbildung 5: Western Blots des Phosphorylierungsgrads von p70S6K vor und nach Temsirolimus-Behandlung

Phosphorylierungsgrad von p70S6K nach Behandlung von IOMM-Lee-Zellen mit 2 µM Temsirolimus. Verwendet wurden die Antikörpern P-p70S6K (Thr³⁸⁹) und p70S6K.

Alle in der vorliegenden Arbeit genutzten Zelllinien wiesen im Western Blot die Komponenten des Signalwegs, einschließlich ihrer aktivierten Formen, auf (**Abbildung 6**).

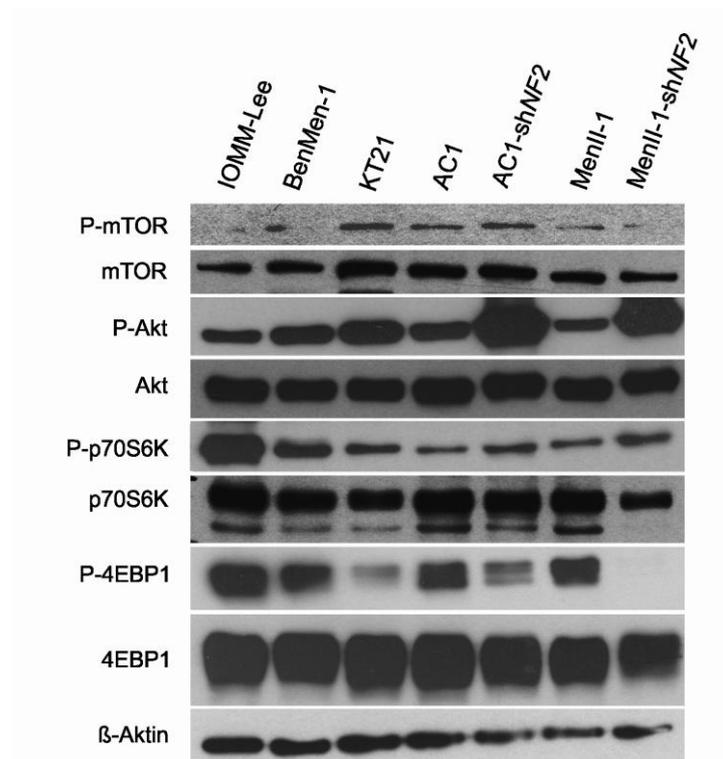


Abbildung 6 : Western Blot humaner Meningeom-Zelllinien

Western Blot der malignen Meningeom-Zelllinien IOMM-Lee, KT21, MenII-1, MenII-1-*shNF2*, benigne BenMen-1 und aus Hirnhaut gewonnenen AC1, AC1-*shNF2*. Die phosphorylierte Form des jeweiligen Antikörpers wurde durch das Präfix „P“ gekennzeichnet.

5.2 mTOR-Inhibition *in vitro*

Der mTOR-Komplex 1 gehört zu den am meisten untersuchten signalgebenden Proteinkinase-Komplexen, dessen Deregulation zu einer Reihe von Erkrankungen führt. Wie in Abschnitt 5.1 gezeigt, liegt in Meningeomen der PI3K/Akt/Mtor-Signalweg überaktiviert vor. Auch in den *in vitro* und zum Teil *in vivo* verwendeten Zelllinien IOMM-Lee, BenMen-1, KT21, AC1, AC1-sh*NF2*, MenII-1, MenII-1-sh*NF2* konnte eine Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs detektiert werden. Der mTOR-Inhibitor Temsirolimus wird seit Jahren bereits erfolgreich für die Behandlung von fortgeschrittenem Nierenzellkarzinomen und für das seltene Mantelzell-Lymphom eingesetzt und dient als Medikation erster Wahl. Bei Temsirolimus (Pfizer, New York, NY, USA) handelt es sich um ein Derivat von Rapamycin, das den mTOR-Komplex 1 allosterisch hemmt. Dadurch wird in der Zelle ein stark veränderter Glukose- und Lipidmetabolismus bewirkt, sowie eine gesteigerte Autophagozytose und eine Verminderung der Gesamt-RNA Translation. Daraus resultiert eine Hemmung des Wachstums und der Proliferation der Zellen. Die Auswirkung einer mTORC1-Hemmung auf Zellwachstum und Proliferation von Meningeomzellen bzw. immortalisierten meningealen Zellen wurde an diesem Punkt der Arbeit durch den Einsatz der beiden mTORC1-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus (Novartis, Nürnberg, D) überprüft. Die veränderte Zellmorphologie wurde mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops Axiovert 40 CFL und der dazugehörigen Software AxioVision LE (Zeiss, Oberkochen, D) nach 24 h Inkubation dokumentiert. In **Abbildung 7** sind beispielhaft die Veränderungen in der Zellmorphologie für die Anwendung von Temsirolimus dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass mit steigender Konzentration der mTOR-Inhibitoren die Dichte der Zellen signifikant abnimmt. Bei der Höchstkonzentration gehen die Zellen erkennbar in den Apoptose-Zustand über, dabei kugeln sie sich ab und lösen sich vom Flaschenboden.

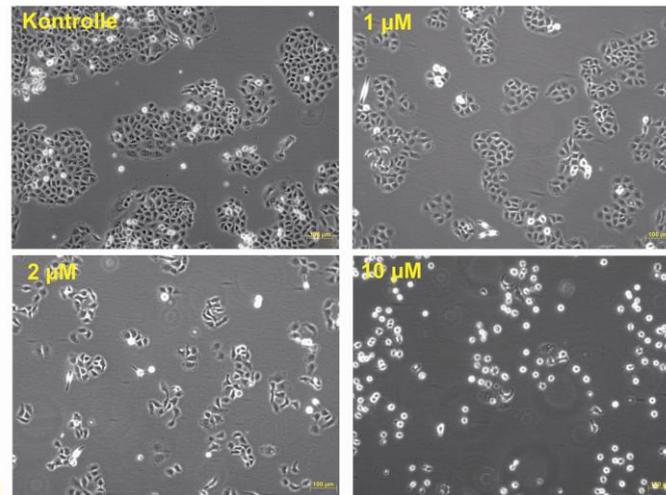


Abbildung 7: Dosisabhängige Wirkung von Temsirolimus auf IOMM-Lee-Zellen

Die Bilder entstanden unter Normalbedingungen und unter der Einwirkung von 1 µM, 2 µM bzw. 10 µM Temsirolimus. Die Fotos wurden mit dem 10-fach vergrößern Objektiv aufgenommen

Demzufolge stellte sich die Frage wie viel Prozent der Zellen die Behandlung mit mTOR-Inhibitoren in aufsteigender Konzentration überleben. Zur Bestimmung des Anteils überlebender Zellen in den einzelnen Versuchen, wurden MTT-Tests (siehe Abschnitt 4.5) durchgeführt. Jeder Messwert setzt sich aus 24 Einzelwerten (biologische Replikate) zusammen und insgesamt wurde jeder Versuch in drei unabhängig voneinander durchgeführten Anordnungen bestätigt. Die Auswertung der einzelnen Messwerte ergab, dass sich die Zellviabilität in allen verwendeten Zelllinien IOMM-Lee, Ben-Men1, MenII-1, MenII-1-sh*NF2* und AC1, AC1-sh*NF2* signifikant ($p < 0,001$) verringert mit ansteigender Konzentration der mTOR-Inhibitoren. In **Abbildung 8** sind die Ergebnisse für Temsirolimus dargestellt. Everolimus zeigte ebenso signifikante Verringerung der Zellviabilität (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigten beide Inhibitoren eine starke Wirkung auf die Zellviabilität. Die Zahl der überlebenden Zellen nach 24 stündiger Inkubation sank bei der Höchstkonzentration in allen durchgeführten Versuchen unter 50 %. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines ANOVA mit Tukey Post-Hoc-Test ermittelt (SPSS Version 21). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts zwischen unabhängigen Wiederholungen mit unterschiedlichen Zellchargen an verschiedenen Tagen. Die gezeigte signifikante Differenz bestand für jede der drei Temsirolimus-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle.

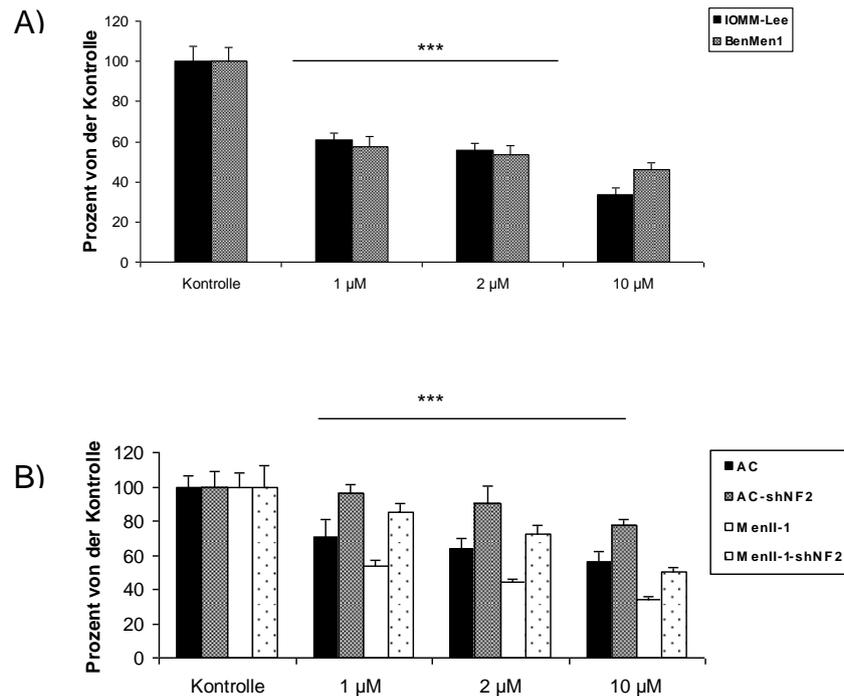


Abbildung 8: Dosisabhängige Wirkung von Temsirolimus auf die Zellviabilität

Die MTT-Tests wurden durchgeführt mit IOMM-Lee- und BenMen-1-Zellen (A) und AC1-, AC1-shNF2-, MenII-1- und MenII-1-shNF2-Zellen (B) mit den jeweiligen Temsirolimus-Konzentrationen 1 µM, 2 µM und 10 µM. (***) = signifikante Differenz aller Behandlungen ($p < 0.001$) gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Den Einfluss der mTORC1-Inhibitoren Temsirolimus und Everolimus auf die Proliferationsrate der Meningeom-Zelllinien IOMM-Lee (maligne) und BenMen-1 (benigne) wurde mit Hilfe des 5-Bromo-2'-deoxy-uridin Labeling und Detektions Kit von Roche (Rotkreuz, CH) durchgeführt. Die Anzahl der proliferierenden Zellen kann mittels Einbau von Bromdeoxyuridin in die DNA und dagegen gerichtete Antikörper, die letztendlich ein Substrat in ein farbiges Endprodukt umwandeln, detektiert werden. Die Auswertung ergab, dass die Proliferationsrate der behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit steigender Konzentration der Inhibitoren sank abnahm (**Abbildung 9**). Die Behandlung mit 10 µM Temsirolimus bzw. Everolimus ergab eine Absenkung der DNA-Syntheseraten auf ca. 40 bis 50 % des Referenzwertes, sowohl für die maligne, als auch für die benigne Meningeom-Zelllinie. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gemessene Proliferation (DNA-Synthese) signifikant ($p < 0,001$) sowohl durch Temsirolimus, als auch Everolimus herunterreguliert wird. Diese signifikante Differenz zum Referenzwert zeigt sich jeweils bereits ab der kleinsten Konzentration dieser Inhibitoren (ANOVA mit Tukey Post-Hoc-

Test). Im Fall der benignen Zelllinie BenMen-1 ist die Proliferationshemmung möglicherweise weniger stark ausgeprägt als bei der malignen Zelllinie IOMM-Lee, was sich auf der Basis der verfügbaren unabhängigen Wiederholungen jedoch nicht statistisch absichern ließ.

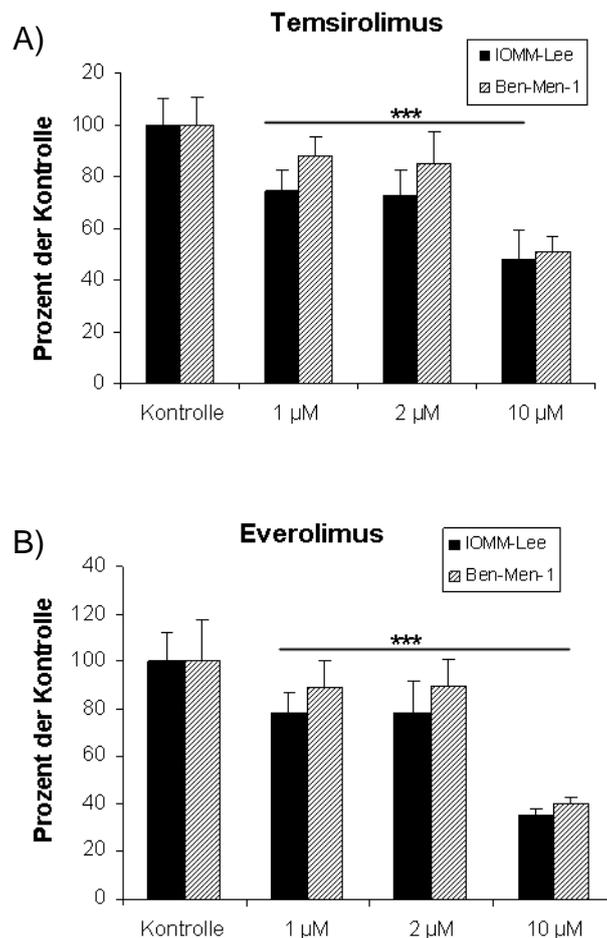


Abbildung 9: Dosisabhängige Wirkung von Rapalogen auf die Proliferation von Zellen

Die Proliferation der Zellen wurde in BrdU-Tests ermittelt an IOMM-Lee- und BenMen1-Zellen; die mit 1 µM, 2 µM und 10 µM Temsirolimus (A) bzw. 1 µM, 2 µM und 10 µM Everolimus (B) behandelt wurden, (***) = signifikante Differenz aller Behandlungen ($p < 0.001$) gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

5.3 Auswirkung von Temsirolimus auf die Zellmigration

Um den Einfluss von Temsirolimus auf die von mTOR-Komplexen beeinflusste Bewegung von Tumorzellen zu messen, wurden Migrationsassays durchgeführt, der sogenannte „Wundheilungs-Assay“ und der Transwell®-Assay.

Beim Wundheilungs-Assay oder auch „Scratch-Assay“ wird einem Monolayer aus Zellen eine Verletzung beigebracht und über einen gewissen Zeitraum, die Migration der Zellen mit Hilfe von Aufnahmen beobachtet. Die Spaltbreite wird in einem Intervall regelmäßig vermessen, bis der Spalt sich komplett geschlossen hat. Für diesen Versuch wurden Einsätze der Firma ibidi verwendet (**Tabelle 7**). Diese ermöglichen durch ein Zweikammersystem, die Bildung zweier durch einen Spalt getrennter Zellmonolayer. Nach entfernen des Einsatzes, migrieren die Zellen aufeinander zu, so dass sich der Spalt innerhalb von 48 h komplett schließt. Nach 8 h betrug die Spaltbreite bei den PBS-behandelten Zellen nur noch 63 ± 11 % der ursprünglichen Breite, wohingegen sich der Spalt der mit Temsirolimus-behandelten Zellen auf 67 ± 18 % des Ursprungswertes verkleinert hatte. Nach 16 h waren nur noch 25 ± 11 % des Spaltes bei den PBS-behandelten Zellen geöffnet, wohingegen die Spaltbreite bei den Temsirolimus-behandelten Zellen noch 40 ± 15 % des Ursprungswertes betrug. Es zeigte sich, dass der Spalt der mit Temsirolimus-behandelten Zellen sich nach 32 h noch nicht komplett geschlossen war, während der vollständige Spaltverschluss bei den PBS-behandelten Zellen bereits im Zeitraum zwischen der Messung nach 16 h und der darauffolgenden Messung nach 24 h erfolgt war (**Abbildung 10 B**). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zu den Zeitpunkten 16 h und 24 h eine signifikante ($p < 0,05$) Verminderung der Migration bei Temsirolimus-behandelten Zellen beobachtet werden konnte im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrollzellen. Inwieweit dieser Hemmeffekt auf die Wirkung von Temsirolimus auf die Aggregation des mTORC2 zurückzuführen ist, auf andere mTOR-abhängige Mechanismen der Migrationsbeeinflussung oder ggf. auf die ebenfalls den Spaltverschluss beeinflussende Proliferationshemmung der Zellen, ließ sich in diesem Experiment nicht ermitteln. Der ergänzend durchgeführte Transwell®-Assay (s.u.) sollte jedoch weit weniger durch die Proliferationswirkung der Hemmstoffe beeinflusst sein, weil seine Ausgangsbasis eine ohnehin maximale

Zelldichte auf der Startseite der Porenmembran ist und lediglich der aktive Durchtritt einer prozentual sehr kleinen Zellfraktion durch die Poren vermessen wird.

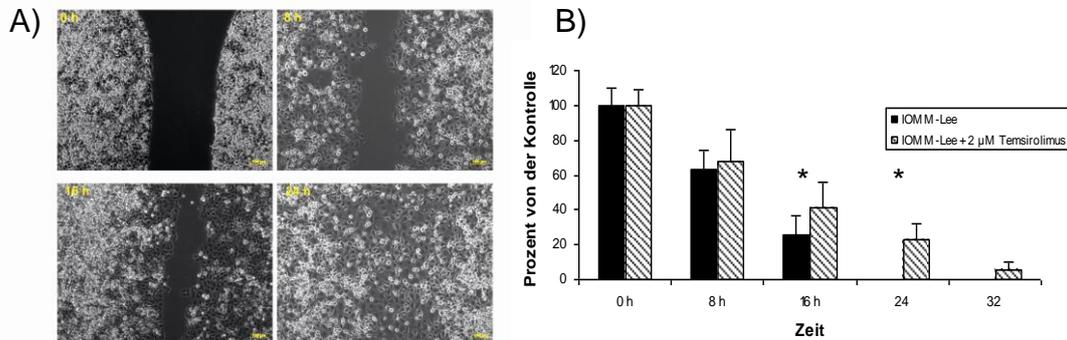


Abbildung 10: Migrationshemmung von IOMM-Lee Zellen durch Temsirolimus-Behandlung.

Die Messungen erfolgten 0, 8, 16, 24 und 32 h nach Entfernung der Ibidi-Kammer (A) zur Messung der Migrationshemmung mittels Spalt-Assays PBS- und Temsirolimus (2 µM)-behandelter IOMM-Lee Zellen (B), (*) = signifikante Differenz der Behandlungen ($p < 0.05$) gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle bei den Zeitpunkten 16 h und 24 h. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Ein weiterer Assay zur Bestimmung des Einflusses von Temsirolimus auf die Migration von IOMM-Lee Zellen ist der Transwell®-Assay. Dafür wurden Transwell®-Zelleinsätze der Firma Corning verwendet, die Porenmembranen aber zusätzlich mit Matrigel beschichtet, sodass neben der reinen Migration durch die Poren gleichzeitig eine Auflösung dieser Proteinmatrix durch die migrierenden Tumorzellen notwendig ist (Invasions-Assay). In jedem Fall wurden Zellen ohne Behandlung mit Temsirolimus als Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Auszählung der Zellen, die durch die Membran in das untere Kompartiment gewandert waren (**Abbildung 11**). Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit Temsirolimus, die Zellen nicht in der Migration gehemmt wurden, da ebenso viele Zellen bei Behandlung mit PBS ($17,7 \pm 7,6$ %) durch den Transwell® nach 48 h migrierten wie bei der Behandlung mit 2 µM Temsirolimus ($17,2 \pm 2,7$ %). Dies könnte darauf beruhen, dass eher die nicht von Temsirolimus beeinflusste Ausschüttung geeigneter Exoproteasen, z.B. Matrix-Metalloproteinasen, den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Migration/Invasion von IOMM-Lee in diesem Assay darstellt. Alternativ könnte jedoch auch der positive Effekt im Spalt-Assay

überwiegend der zweifellos vorhandenen Proliferationshemmung geschuldet sein. Insgesamt bedarf also der Migrationseffekt von mTORC1-Hemmern weiterer Analysen.

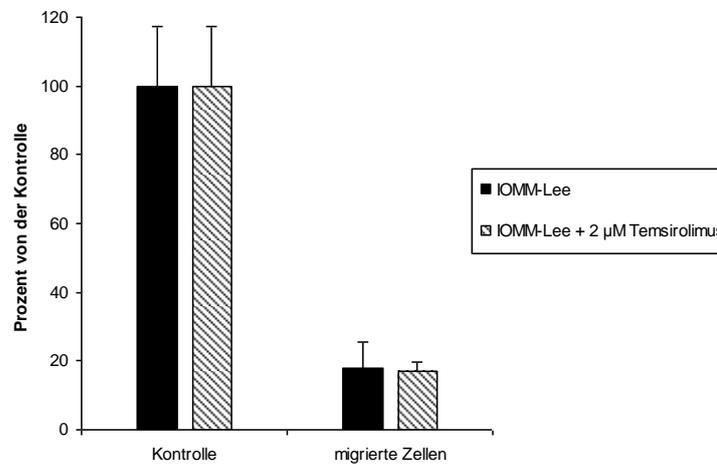


Abbildung 11: Migrationsverhalten von IOMM-Lee-Zellen unter Temsirolimus-Behandlung im Transwell®-Assay

Die Migration PBS- und Temsirolimus (2 µM)-behandelte IOMM-Lee Zellen wurde mittels Transwell®-Assay bestimmt. Es konnte keine signifikante Hemmung der Migration von IOMM-Lee-Zellen durch Temsirolimus-Behandlung detektiert werden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

5.4 Wirkung additiver Radiatio auf Temsirolimus-behandelte Meningeomzellen

Die Therapieform zur Behandlung aggressiv, invasiv wachsender Meningeome ist in der Regel die Resektion in Kombination mit Strahlentherapie. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob eine Bestrahlung von Meningeomzellen bei zeitgleicher mTORC1-Hemmung einen synergistischen Effekt erkennen lässt. Die Behandlung der Zellen mit Temsirolimus erfolgte 6 Stunden vor Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlung. Am darauffolgenden Tag wurde die Zellviabilität mittels MTT-Test (siehe Abschnitt 4.5) analysiert (**Abbildung 12**). Es zeigte sich, dass der Prozentsatz der Zellen, die eine kombinierte Therapie aus Temsirolimus-Behandlung und Bestrahlung überlebten in der Regel unter dem Prozentsatz der überlebenden Zellen bei Temsirolimus-Monotherapie lag. Obwohl alle durchgeführten Behandlungen einen hochsignifikanten Rückgang lebender Zellen aufzeigten ($p < 0,001$), konnte eine signifikante

Zusammenwirkung von mTORC1-Inhibition und Bestrahlung nicht statistisch nachgewiesen werden.

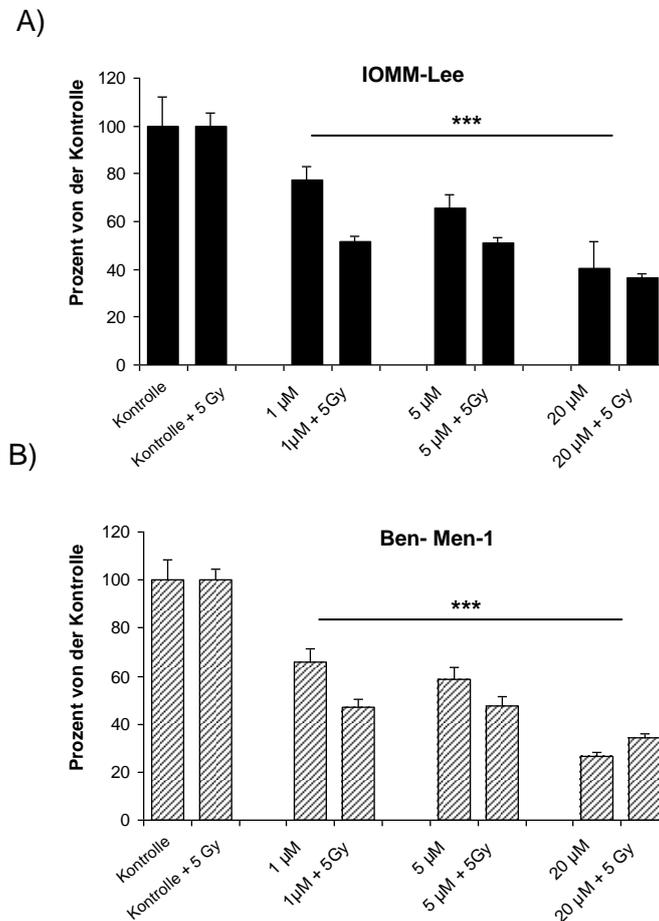


Abbildung 12: Wirkung additiver Radiation auf Temozolomid-behandelte Meningeomzellen

Behandelt wurden IOMM-Lee- (A) bzw. Ben-Men-1-Zellen mit 1, 5 und 20 µM Temozolomid (B). (***) = signifikante Differenz der Lebendzellzahl ($p < 0,001$) aller Behandlungen gegenüber der jeweiligen Kontrolle, die zu 100% gesetzt wurde. Für die Berechnung der in dieser Abbildung dargestellten mittleren Lebendzellzahlen (%) dienten zwei unterschiedliche Kontrollen als Referenzwert (100%), um den grafischen Vergleich von Monotherapie (Temozolomid) und Kombinationstherapie (Temozolomid + Bestrahlung) zu erleichtern. Als Kontrolle für die Monotherapie dienten unbehandelte Zellen, als Kontrolle für die Kombinationsbehandlungen hingegen Zellen mit alleiniger Bestrahlung (5 Gy). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

5.5 mTORC1 Inhibition in Meningeom-Zelllinien in Abhängigkeit von Merlin

In mehr als 50 % aller sporadisch auftretenden Meningeome im Menschen finden sich Veränderungen des Tumorsuppressor-Gens *NF2* [123]. *NF2* kodiert für den Tumorsuppressor Merlin, ein Protein des Zytoskelett das zu der Familie der ERM-Proteine gehört. Ausgehend davon, wurde an diesem Punkt der Arbeit untersucht, in wie weit sich das Fehlen des Proteins Merlin auf die Hemmung von mTORC1 durch Temsirolimus bzw. Everolimus auswirkt. Dazu wurden Zellen verwendet, die einen durch *short hairpin* RNA (shRNA)-erzeugten *NF2* knockdown aufweisen und die bereits eingehend charakterisiert wurden [107]. Wie in **Abbildung 13** gezeigt, wiesen sowohl die immortalisierten Arachnoidalzellen (AC1) als auch atypische Meningeom-Zelllinien (MenII-1) ein reduziertes Merlin-Level auf, nachdem sie stabil mit *NF2*-shRNA transfiziert worden waren.

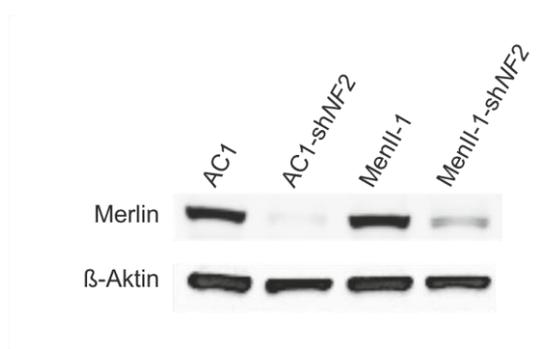


Abbildung 13: Western Blot der Merlin-Expression in *NF2*-defizienten Zelllinien
Durchgeführt mit Zellysaten von AC1, AC1-*shNF2*, MenII-1, MenII-1-*shNF2*-Zellen

Daher wird auf eine effektive *NF2*-Suppression geschlossen. Im Vergleich zur Kontrolle, d.h. aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem Leervektor transformierter Zellen, schienen Merlin-defiziente atypische Meningeom-Zelllinien (Grad II) weniger sensitiv auf die Behandlung mit Temsirolimus bzw. Everolimus im MTT-Test zu reagieren (**Abbildung 14**). Beide Inhibitoren verhielten sich gleichsinnig, was diese These stützt. Allein aus den in dieser Abbildung ersichtlichen Differenzen zwischen den syngenen Zelllinien konnte dennoch nicht zwingend auf eine Rolle von *NF2* bei der Responsivität gegen mTORC1-Inhibitoren geschlossen werden. Dies gilt zum einen deshalb, weil nur die Wirkungen der Inhibitoren klare Signifikanzen erreichten, nicht jedoch die

Differenzen zwischen den Genotypen. Zum anderen lässt sich ein alternativer Grund für die beobachteten Genotypen-Differenzen finden. Da die Kinase-Inhibitoren vermutlich stärker auf schnell proliferierende Zellen wirken, könnte ihre geringere Wirksamkeit in der mit *NF2*-shRNA-transfizierten Linie auf der verlangsamten Proliferationsrate der Zellen mit *NF2*-Verlust beruhen, die konstant während der Passagierung im Labor beobachtet wurde.

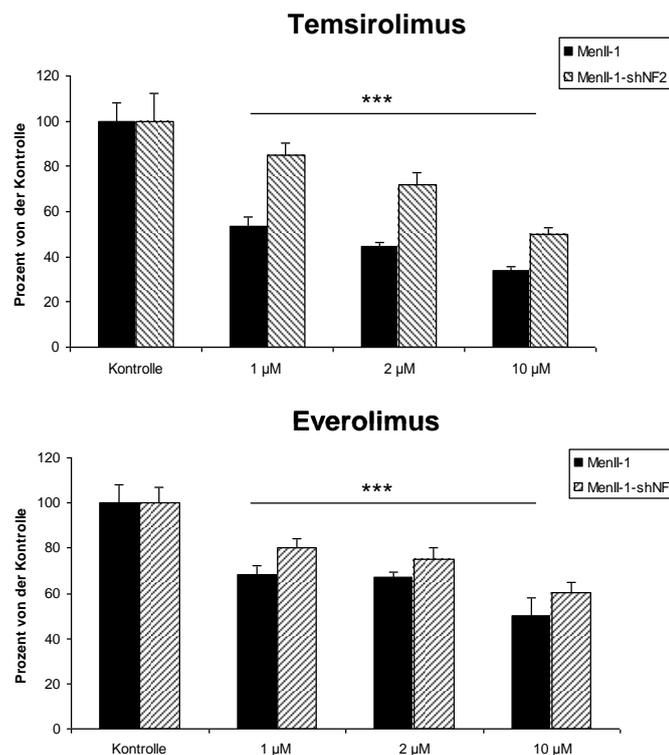


Abbildung 14: Dosisabhängige Wirkung von Rapalogen auf die Zellviabilität von MenII-1 und MenII-1-shNF2

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test ermittelt an MenII-1- und MenII-1-shNF2-Zellen, die mit 1 µM, 2 µM, und 10 µM Temsirolimus (A) bzw. 1 µM, 2 µM, und 10 µM Everolimus (B) behandelt wurden. (***) = signifikante Differenz aller Behandlungen ($p < 0.001$) gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Der *NF2*-Effekt könnte aufgrund der Funktion von Merlin bei der Kontakt-Inhibition nicht zuletzt von der Zelldichte wesentlich beeinflusst werden. Daher wurde trotz damit verbundener technischer Schwierigkeiten versucht, möglichst präzise identische Zelldichten für die syngenen Zellpaare in einer neuerlichen Versuchsserie herzustellen durch das Einsäen identischer Zellzahlen. Dies geschah durch automatische (Zellzählgerät, Cellometer™ Auto T4) und manuelle (Neubauer-Kammer) Zellzählung aus der Suspension, die unmittelbar in die Platten gegeben werden sollte, im Gegensatz zur nur

automatischen Zählung vor dem letzten Zentrifugenschritt zur Gewinnung der Zellen. Überdies wurde neben der Standard-Einsaat von 2000 Zellen pro well die deutlich verminderte Einsaatmenge von 500 Zellen pro well gewählt, bei der über den Beobachtungszeitraum hinweg noch weit weniger Zell-Zell-Kontakte entstehen. In der **Abbildung 15** sind alle Messwerte normiert auf die PBS-behandelte Kontrolle der jeweiligen Einsaatdichte (= 100%) abgebildet. Bei dieser möglichst genauen Kontrolle der Einsaatbedingungen ergab sich durchweg für die Substanz Everolimus eine signifikant geringere Wirksamkeit bei den Zellen mit *NF2*-Verlust für beide untersuchten Zelldichten. Allerdings ergab sich erneut keine Signifikanz der Genotypendifferenz für eine Behandlung mit Temsirolimus (nicht abgebildet). Somit ließen sich erste Hinweise auf eine mögliche Rolle des *NF2*-Status für die Therapiesensitivität ableiten, die zumindest für eine weitere Evaluierung dieses Effekts in Tiermodellen und zur Sicherheit für eine Stratifizierung von Patienten nach *NF2*-Status in eventuellen klinischen Studien sprechen.

Wie oben bereits beschrieben, könnte eine verminderte Responsivität der *NF2*-defizienten MenII-1-Zellen auf der geringeren basalen Proliferationsrate dieser Zellen im Vergleich zu den syngenen Zellen mit *NF2*-Wildtyp beruhen. Dies könnte mit dem zufälligen Integrationsorten der shRNA-Konstrukte (*NF2* bzw. Leervektor) in den beiden syngenen Linien zusammenhängen, also einen unspezifischen Effekt bedeuten. Zum Zeitpunkt dieser Versuche waren keine weiteren syngenen Meningeom-Zelllinien verfügbar, abgesehen von artifiziell immortalisierten meningealen Zellen, um die allgemeine Gültigkeit dieses *NF2*-Effektes in Meningeomzellen verschiedener WHO Grade zu prüfen.

Um zu bestimmen ob der *NF2*-Status unmittelbar mit der Aktivierung der mTORC1-Kinaseaktivität zusammenhängt, wurden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt. Es konnte jedoch keine Änderung des Phosphorylierungsstatus von p70S6K und 4EBP1 in den Merlin-defizienten Zellen im Vergleich zu den Parentallinien detektiert werden (**Abbildung 6**). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die beobachtete verringerte Temsirolimus-Sensitivität Merlin-defizienter Zellen nicht auf Veränderungen der mTOR-Signalgebung zurückzuführen ist.

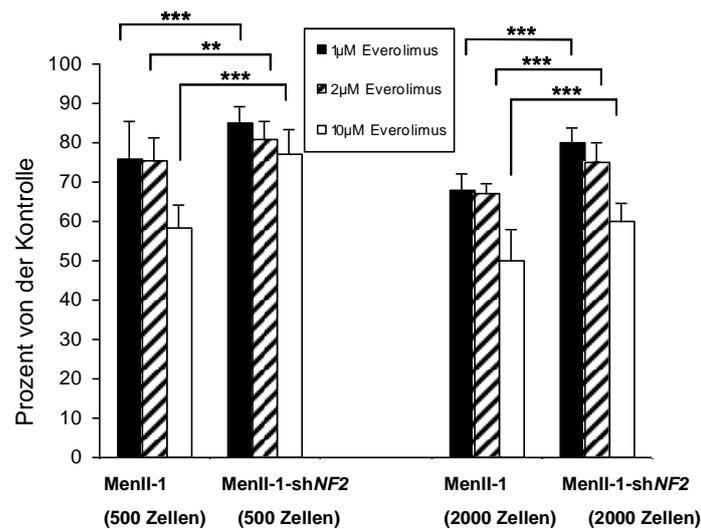


Abbildung 15: Dichteabhängige Zellviabilität von MenII-1 und MenII-1-shNF2 unter mTOR-Inhibition

Es wurden jeweils 500 und 2.000 Zellen/Well von MenII-1 und MenII-1-shNF2 eingesät. Bei genauester Kontrolle der Einsaatdichte sanken die Schwankungen zwischen Zellchargen (Passagen) und es ergaben sich signifikant höhere Prozentsätze lebender Zellen ($p < 0,001$, ***) nach mTORC1-Inhibition (Everolimus) NF2-defizienter atypischer Meningeomzellen im Vergleich zu syngenen Zellen mit NF2-Wildtyp. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

5.6 Wachstumshemmung von Meningeomen durch Temsirolimus-Behandlung *in vivo*

5.6.1 Subkutanes Meningeommausmodell

Nachdem in zahlreichen *in vitro* Versuchen nachgewiesen wurde, dass in den verwendeten Zelllinien der mTORC1-Signalweg aktiviert vorliegt und dass die Hemmung des mTOR-Komplex 1 durch Temsirolimus bzw. Everolimus einen Verlust der Zellviabilität und eine Absenkung der Proliferationsrate nach sich zieht, stand zu klären, ob sich ein entsprechender Behandlungserfolg auch im Tier erzielen lässt. Zur Evaluation der Auswirkung einer mTOR-Hemmung durch Temsirolimus auf das Tumorwachstum *in vivo* wurden drei verschiedene Xenograft Modelle herangezogen.

Bei dem subkutanen Xenograftmodell handelt es sich um ein ektopes Tumormodell, bei dem der Injektionsort der Tumorzellen im Tier nicht mit der normalen Lokalisation des Tumors bzw. seines Ausgangsgewebes im Menschen identisch ist. Für ektope Xenograftmodelle ist charakteristisch, dass sie ein schnelleres Wachstum aufweisen als vergleichbare Tumortypen im

Menschen. Das ermöglicht die Erstellung einer Wachstumskinetik anhand von Mehrfachmessungen. Somit lassen sich leicht mögliche Effekte applizierter Substanzen feststellen. Daher wurde für die ersten Versuche im Tier ein subkutanes Mausmodell in Swiss-Nude-Mäusen (Charles Rivers Willmington, MA, USA) gewählt. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 4.17.1 beschrieben durchgeführt. Die Volumenschätzung erfolgte mittels Messschieber an der lebenden Maus. Die Verwendung von Matrigel® die bei der malignen Meningeomlinie IOMM-Lee mögliche Metastasierung subkutaner Tumore in innere Organe minimiert werden. Fast alle später explantierten Tumore wiesen eine ovale Form auf und in den Organen aller Mäuse (s.u.) konnten keine Tumore gefunden werden. Von der ansonsten vielfach in der Literatur genutzten Applikation etwas weiter caudal an der Flanke wurde abgesehen, da bei zunehmender Tumorgöße die Tiere in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wären und nicht mehr ausreichend Futter zu sich nehmen könnten. Die Behandlung der Tiere mit Temsirolimus oder Lösungsmittel (Kontrollgruppe) begann drei Tage nach der Zellapplikation und geschah, wie im Methodenteil beschrieben. Die Messung der Tumorgöße erfolgte an Tag 7, 14 und 21 nach erfolgter Tumorzellapplikation mittels Messschieber. Gemäß dem genehmigtem Tierversuchsantrag wurde bei diesem Versuch darauf geachtet, dass eine Tumorausdehnung von 20 mm in keiner Tumorebene überschritten wurde. Bei einer Ausdehnung über diese 20 mm hinaus, wurde der Versuch beendet und das Tier getötet. **Abbildung 16** zeigt die Zunahme des durchschnittlichen Tumolvolumens von Tag 7 bis zum 21. Tag nach Tumorapplikation. Es ist abzulesen, dass die Tumore der acht behandelten Tiere nach drei Wochen kleiner ausfielen, als jene der Kontrollgruppe. Durchschnittlich stieg das Tumolvolumen bei den Tieren der Kontrollgruppe mit $82,84 \pm 8 \text{ mm}^3$ nach 7 Tagen, auf $295,43 \pm 28 \text{ mm}^3$ nach 14 Tagen und auf $674,05 \pm 124 \text{ mm}^3$ nach 21 Tagen sehr viel schneller an, als bei den behandelten Tieren. Bei diesen betrug das durchschnittliche Tumolvolumen nach 7 Tagen $14,7 \pm 17 \text{ mm}^3$, nach 14 Tagen $146,72 \pm 41 \text{ mm}^3$ und nach 21 Tagen $267,23 \pm 52 \text{ mm}^3$. Die Behandlung der Tiere mit Temsirolimus verlangsamte demzufolge auch *in vivo* die Proliferation der Tumorzellen und bewirkte ein um ca. 61 % reduziertes Tumolvolumen in den behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

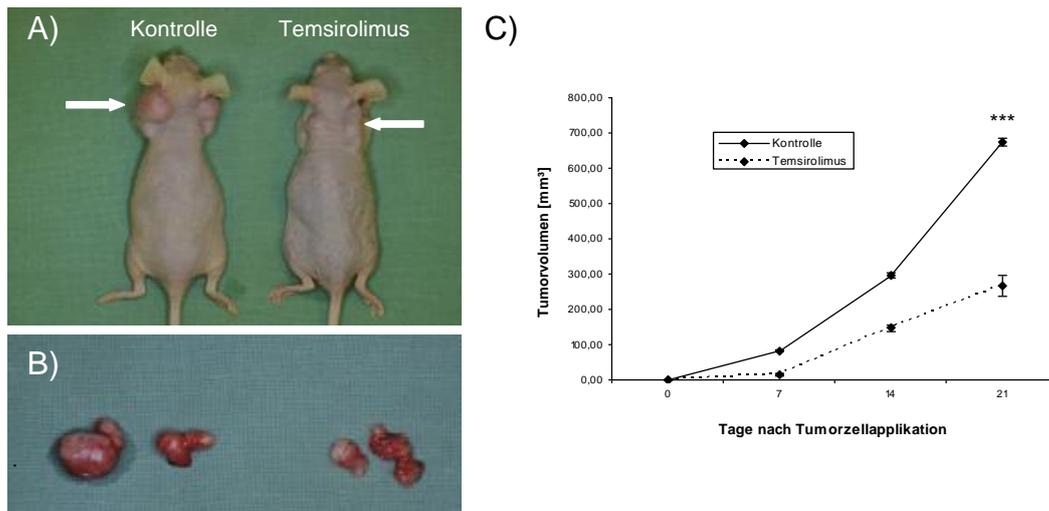


Abbildung 16: Tumorprogression im subkutanen Meningeommausmodell

Es wurden 3×10^6 Zellen je Seite in Swiss nude Mäuse (A), denen jeweils 3 Wochen lang physiologische Kochsalzlösung oder 20 mg/kg Körpergewicht Tamsirolimus i.p. verabreicht wurde. Herauspräparierte Tumore links eines Kontrolltieres und rechts einer Tamsirolimus-behandelten Maus (B), Tumolvolumen [mm³] dargestellt über einen Zeitraum von 21 Tagen gemessen mit Messschieber (C). Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Nach drei Wochen war bei drei Tieren die kritische Ausdehnung des Tumolvolumens auf 20 mm in einer Ebene erreicht, daher wurde der Versuch beendet und die Mäuse getötet. Allen Mäusen wurden die Leber, die Milz und die Nieren entnommen und histologisch auf Metastasen untersucht. In keinem der Tiere konnten in den entnommenen Gewebe Metastasen detektiert werden. In **Abbildung 17** ist das mittlere Tumorgewicht abgebildet. Es betrug 21 Tage nach Einbringung der Tumorzellen bei der Kontrolltiergruppe ca. 763 ± 580 mg [S.E.M.] und bei den Tieren, die mit Tamsirolimus behandelt wurden, ca. 275 ± 149 mg [S.E.M.]. Dies stellt eine Reduktion des Gewichts um etwa 64% ($p < 0,001$), was hervorragend mit der Volumenschätzung an den lebenden Mäusen korrespondierte.

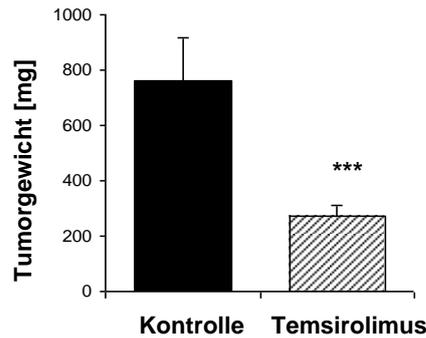


Abbildung 17: Reduktion der Tumorgewichte durch Temsirolimus-Behandlung im subkutanen Meningeommodell

Die Tumore wurden nach Tötung der Mäuse gemessen. (***) = signifikante Differenz von $p < 0,001$ von der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Das explantierte Tumorgewebe wurde anschließend halbiert, wobei die eine Hälfte in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch untersucht und die andere Hälfte bis zur Verwendung für Western blotting bei -80°C schockgefrostet und gelagert wurde.

Abbildung 18 zeigt die immunhistochemischen Untersuchungen mit einem Antikörper gegen das Ki67-Antigen. Es dient zur Markierung von Zellen, die sich in einer beliebigen Phase des mitotischen Zellzyklus außer G_0 befinden, also teilungsaktiv sind. Diese Färbung ist der in der gesamten humanen Tumorphathologie etablierte Standard zur Einschätzung der Proliferationsaktivität. Exemplarisch wurde von drei Tieren je Gruppe die Färbung gegen das Ki67-Antigen vorgenommen und anschließend ausgezählt. Die Auszählung ergab im Mittel eine Anfärbung von ca. 35,6 % der Kerne in der Kontrollgruppe, wohingegen in Tumorgeweben von Temsirolimus-behandelten Mäusen lediglich 12,5 % der Kerne eine Färbung aufwiesen. Das entspricht einer Absenkung der Zellproliferation um ca. 65% ($p < 0,05$), ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Tumorumfängen und -gewichten. Zudem war bei Betrachtung mit größeren Objektiven zu erkennen, dass die Tumorgewebe von Tieren die mit Temsirolimus behandelt wurden, im Vergleich zu Tumorgewebe der Kontrollgruppe, eine geringere Zelldichte und eine verminderte Anzahl mitotischer Figuren pro Gesichtsfeld in der H&E-Färbung aufwiesen. Dies unterstützt den klaren quantitativen Befund der Ki67-Färbung.

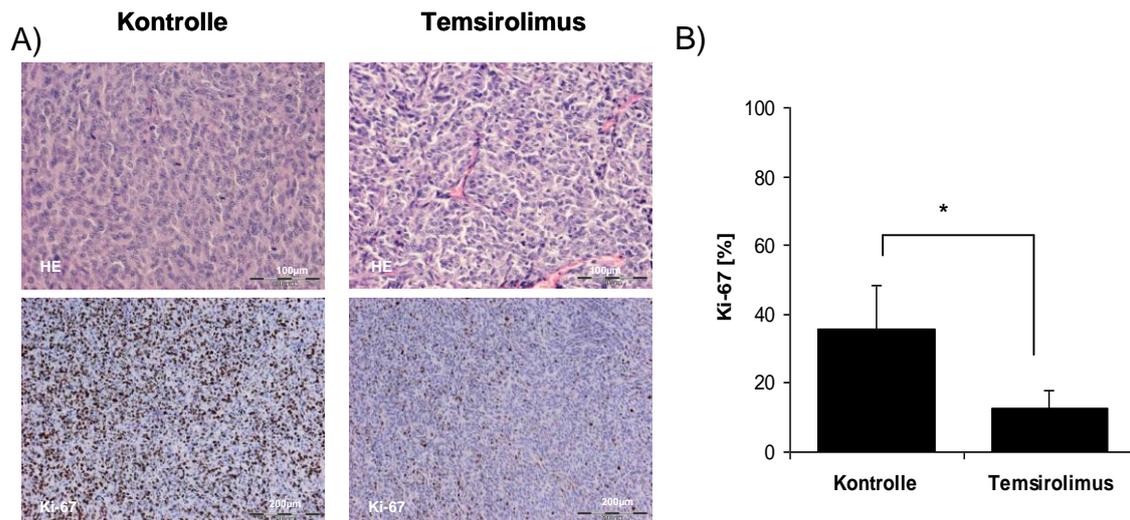


Abbildung 18: HE- und Ki-67-Färbung von explantierten subkutanen Maustumoren

Immunhistochemische Färbung subkutaner Maustumore (A), anhand der Ki-67 Färbung abgeschätzte reduzierte Proliferationsrate der Zellen aus Tumoren PBS- bzw. Temsirolimus-behandelter Tiere (B). Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein U-Test durchgeführt (*) = signifikante Differenz von $p < 0,1$ von der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Ebenso wurden an Tumorgeweben von jeweils drei Tieren pro Gruppe Western blotting durchgeführt, um zu zeigen, in wie weit in den Tumoren behandelter Tiere wirklich eine mTORC1-Hemmung vorlag. Der Schwerpunkt lag auf dem Grad der Phosphorylierung der mTOR-Substrate p70S6K und 4EBP1, als anerkanntes readout der mTORC1 Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von p70S6K bei manchen der behandelten Tiere deutlich reduziert vorlag gegenüber Tumorgewebeproben der Kontrollgruppe. Der Phosphorylierungsgrad von 4EBP1 zeigt zwischen den beiden Gruppen keinen Unterschied. Auf dem Sensitivitätsniveau von Western Blots konnte daher nicht mit letzter Gewissheit nachgewiesen werden, dass die beobachtete zytostatische Wirkung auf die mTORC1-Hemmung zurückzuführen war. Hinzukommt das die in der Literatur vielbeschriebene Überaktivierung von Akt bei der mTOR-Inhibition mit Rapalogen an den Tumoren der behandelten Tiergruppe ebenfalls festzustellen war, wie in **Abbildung 19** gezeigt. Insgesamt bestätigt der Tierversuch den Effekt einer intraperitonealen (systemischen) Temsirolimus-Behandlung eines malignen Meningeoms im Mausmodell.

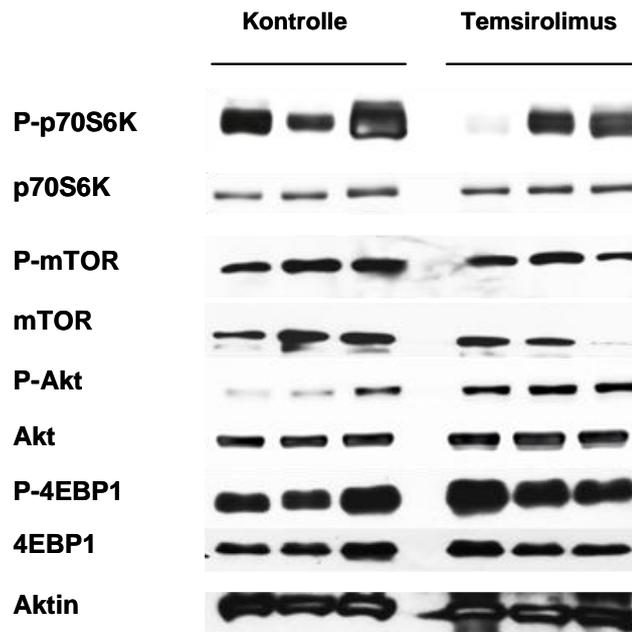


Abbildung 19: Western Blots explantierter subkutaner Maustumore

Es wurden Proteine aus subkutanen Tumoren jeweils 3 PBS- bzw. Temsirolimus-behandelter Tiere verwandt. Die phosphorylierte Form des jeweiligen Antikörpers wurde durch das Präfix „P“ gekennzeichnet

5.6.2 Orthotopes intrakranielles Meningeommodell

Entspricht der Injektionsort dem des Originalgewebes, aus dem die applizierten Zellen stammen, spricht man von einem orthotopen Xenograftmodell. Da auch die Umgebung Einfluss auf Wachstumsverhalten und Chemosensitivität des Tumor nimmt, ist das subkutane Modell nur bedingt auf die Situation bei menschlichen Meningeomkrankungen übertragbar. In vielen Studien konnte bewiesen werden, dass das orthotope Modell einen humanen Tumor von allen möglichen Xenograftmodellen am besten widerspiegelt. Sowohl die Morphologie als auch die Metastasierung und die Chemosensitivität entsprechen oft dem originalen humanen Tumor besser [124]. Demzufolge wurde im nächsten Schritt ein orthotopes Modell zur Untersuchung der Wirksamkeit von Temsirolimus herangezogen. Am dritten Tag nach der Tumorzellapplikation wurden die Tiere entweder mit Temsirolimus oder mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Das Tumorstadium wurde am 2. und am 9. Tag nach Tumorzellapplikation mittels Kleintier-MRT gemessen. Es wurden durch die Unterstützung des Forschungsteams um Professor Dr. Frank Angenstein Bilder der axialen Ebene erstellt und mit Hilfe der Software

Image J das Tumolvolumen bestimmt. **Abbildung 20 A** zeigt den Schädel je einer Maus aus der Temsirolimus-behandelten Gruppe und aus der Kontrollgruppe an Tag 2 und an Tag 9 nach Tumorinduktion. Es ist zu erkennen, dass bei der behandelten Maus der Tumor deutlich weniger Raum zwischen Kalotte und Großhirnoberfläche einnimmt, verglichen mit dem Tier aus der Kontrollgruppe. Zudem zeigte die H&E-Färbung (**Abbildung 20 B**) eine deutliche Reduzierung mitotisch aktiver Zellen in Temsirolimus-behandelten orthotopen Meningeomen. In **Abbildung 20 C** ist das mittlere Tumolvolumen an Tag 2 und an Tag 9 dargestellt. Zwei Tage nach der Applikation der Meningeomzellen ergab die Auswertung der MRT-Bilder noch keine messbaren Tumore. An Tag 9 betrug das mittlere Tumolvolumen in der Kontrollgruppe $43,58 \pm 20,1 \text{ mm}^3$ und in der Gruppe der behandelten Tiere $13,68 \pm 4,15 \text{ mm}^3$. Das entspricht einer Reduktion des via MRT geschätzten Tumolvolumens um ca. 69 %, was wiederum sehr gut mit den Befunden des subkutanen Modells übereinstimmt. Die statistische Auswertung mittels SPSS ergab unter Verwendung eines U-Tests, dass das Tumolvolumen der 8 behandelten Tiere signifikant unter dem der 8 Tiere aus der Kontrollgruppe lag ($p < 0,05$).

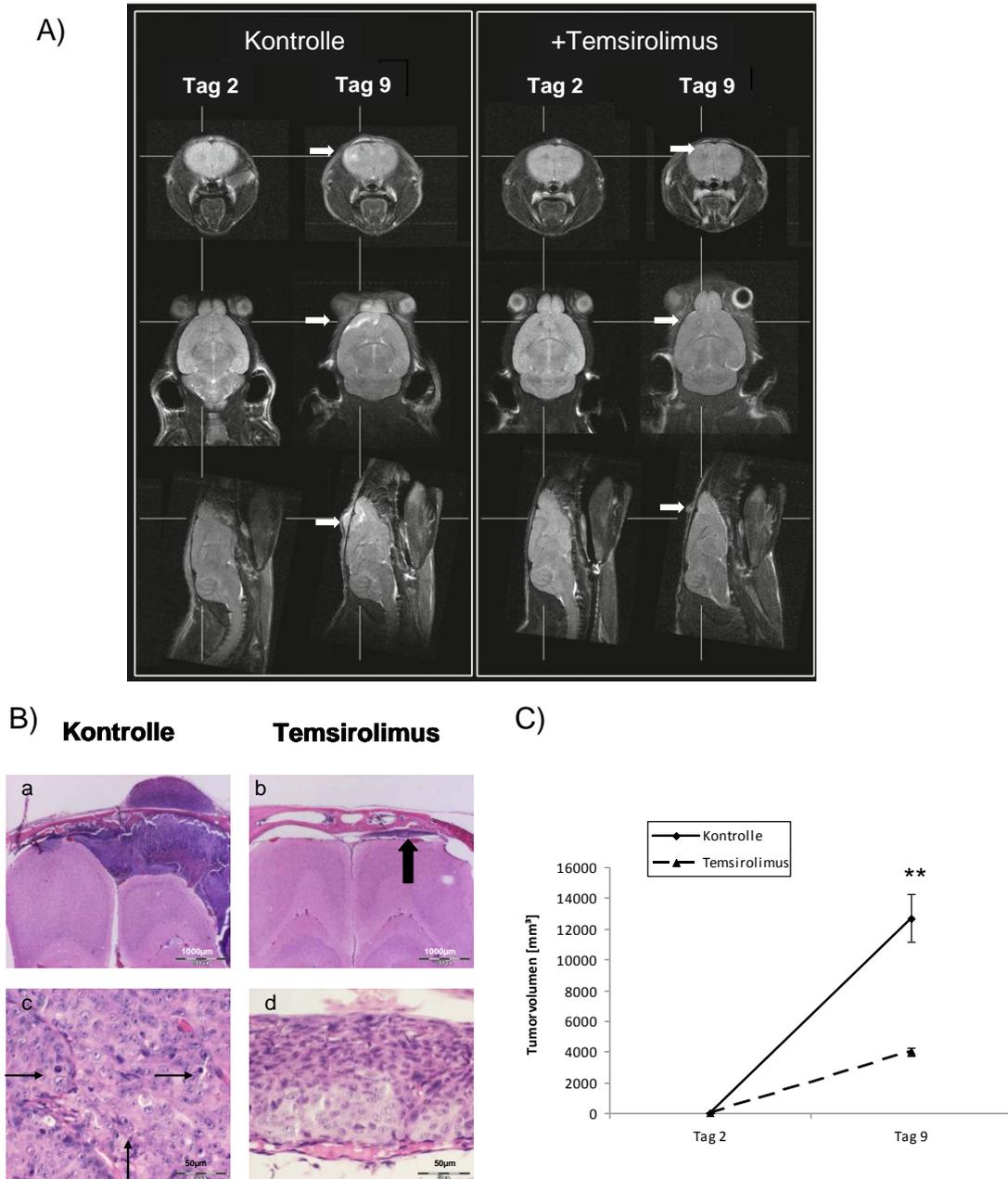


Abbildung 20: Tumorprogression im intrakraniellen Meningeommasmodell

MRT Darstellung jeweils einer mit PBS- und einer Temsirolimus-behandelten Maus am 2. bzw. 9 Tag nach Tumorzellapplikation (A), H&E-Färbung und Ki-67-Färbung von Paraffin eingebetteten Mäuseköpfen (B) geschätztes Tumolvolumen durch MRT-Messung jeweils an Tag 2 und Tag 9 nach Inokulation (C) (** = signifikante Differenz von $p < 0,05$ von der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

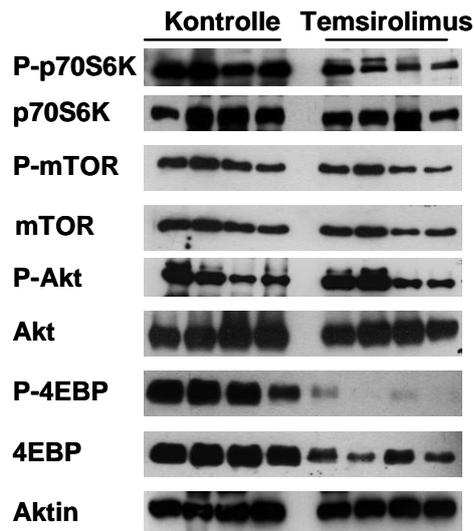


Abbildung 21: Western Blots explantierter intrakranieller Maustumore

Es wurden Proteine aus jeweils 4 Tumore PBS- und Temsirolimus-behandelter Tiere verwandt. Die phosphorylierte Form des jeweiligen Antikörpers wurde durch das Präfix „P“ gekennzeichnet

Auch in diesem Modell wurden von je vier Tumoren der Temsirolimus- und der Kontrollgruppe Western blotting durchgeführt (**Abbildung 21**). Sie zeigten diesmal deutlicher als die Tumore des subkutanen Modells eine Abnahme von phospho-p70S6K unter Temsirolimus. Da der Gesamtlevel des Proteins eher konstant blieb, lässt sich das verminderte Signal mit dem Phosphorylierungs-spezifischen Antikörper, als Hemmung der mTORC1-Enzymaktivität werten. Für 4EBP1 schien neben der erwarteten Abnahme des Phosphorylierungs-spezifischen Signals als Reflex der mTORC1-Aktivität auch eine Verminderung der Gesamtmenge des Proteins 4EBP1 unter Temsirolimus aufzutreten. In jedem Falle fanden sich hier also deutliche Hinweise darauf, dass die Tumor-hemmende Wirkung auch tatsächlich über einen hemmenden Eingriff in den mTORC1-Signalweg vermittelt wurde.

Das intrakranielle Xenograftmodell wurde ebenfalls mit den langsam wachsenden malignen Meningeom-Zelllinie KT21 durchgeführt. Hier ließ sich das mittlere Tumolvolumen an Tag 17 zu lediglich $1,26 \pm 0,25 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe (N = 5) durch MRT abschätzen (**Abbildung 22**). Dieses Volumen überschritt signifikant das Volumen, dass bei 5 Temsirolimus-behandelten Mäusen bei $0,36 \pm 0,037 \text{ mm}^3$ lag ($p < 0,01$). Die Dosis-abhängige Sensitivität von KT21 gegenüber Temsirolimus für die Konzentrationen 1, 2 und $10 \mu\text{M}$ war zuvor durch MTT Assay *in vitro* bestätigt

worden (nicht abgebildet) und war ebenso signifikant ($p < 0,01$) wie bei IOMM-Lee Zellen und BenMen-1.

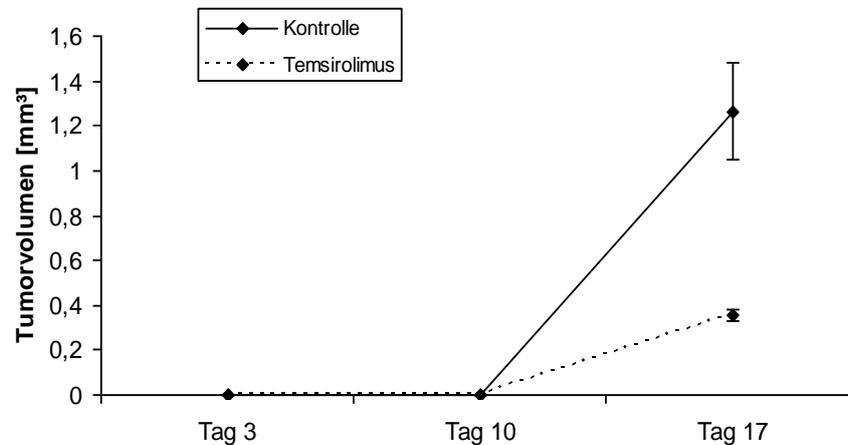


Abbildung 22 : Tumorprogression im intrakraniellen Meningeommodell mit der Zelllinie KT21

Das Tumolvolumen wurde anhand von MRT-Bildern vom 3., 10. und 17. Tag nach Tumorzellapplikation bestimmt, (**) = signifikante Differenz von $p < 0,05$ von der Kontrolle. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwertes.

Als Fazit lässt sich sagen, dass die Tumore in dem Tierversuch das erhoffte orthotope Wachstum zwischen Kalotte und Hirnoberfläche zeigten, wie es in den histologischen **Abbildungen 20 B** zu erkennen ist. Vor allem lässt sich eindeutig nachweisen, dass systemische Applikation von Temsirolimus auch das intrakranielle Tumorwachstum signifikant verringert. Zum Schluss gelang es uns noch, zu bestätigen, dass im orthotopen Modell entnommene Tumorproben eine starke Verringerung der p70S6K und 4EBP1-Phosphorylierung aufweisen, was wiederum eine spezifische Hemmung des mTORC1-Signalwegs durch Temsirolimus als Ursache der beobachteten Wachstumshemmung nahe legt.

6 Diskussion

6.1 Sind Meningeome untertherapiert?

Mit einem Anteil von 20-25 % gehören Meningeome zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren. Abstammend aus den Deckzellen der Arachnoidea, existieren sie in verschiedenen histologischen Subtypen, von denen 80 % als benigne WHO Grad I Tumore eingestuft werden. Die verbleibenden 20 % gehören zur aggressiv wachsenden Gruppe der atypischen (WHO-Grad II) bzw. malignen Meningeome (WHO-Grad III) [82]. Die Standardtherapie zur Behandlung von Meningeomen besteht zurzeit aus der maximalen Resektion und der anschließenden Bestrahlung verbleibender Tumorzellen [98]. Obgleich in den letzten Jahren deutliche Verbesserungen der Operationsmethoden und der Bestrahlungstherapie erzielt wurden, ist die vollständige Entfernung von Meningeomen aufgrund ihrer unzugänglichen Lokalisation oft nicht möglich. Infolgedessen wird eine komplette Resektion lediglich in 50 % der Fälle erreicht [125] und die Rezidivrate bei unvollständig entfernten Tumoren vom WHO Grad I betragen bis zu 32 % im Verlauf der darauffolgenden 15 Jahre [126]. Daher würden diese Patienten von einer unterstützenden pharmakologischen Behandlung zur Rezidiv-Prävention bzw. Rezidivverzögerung profitieren. Insbesondere aber die Untergruppe von aggressiv wachsenden, höhergradigen Meningeomen, die mit einer erheblichen Mortalität und Morbidität verbunden sind, lassen sich auf herkömmliche Weise nur schwer therapieren. Bisher existiert noch keine etablierte Chemotherapie. Eine Vielzahl starker zytotoxischer Agenzien sind an refraktären Fällen mit relativ schlechtem Ergebnis getestet worden. Im Jahr 2011 veröffentlichte das National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Richtlinien in denen, lediglich drei Substanzen zur Behandlung von Meningeomen aufgeführt wurden: Hydroxyharnstoff, Alpha-Interferon und Somatostatin-Analoga [98]. Der DNA-Synthesehemmer Hydroxyharnstoff (HU) wurde in den letzten 15 Jahren gelegentlich zur Behandlung von Meningeompatienten eingesetzt, da frühe Studien vielversprechende Erfolge verzeichneten. Größere Studien, die in jüngerer Zeit durchgeführt wurden, relativierten diese Ergebnisse jedoch. Auch wurden weitere Substanzen erforscht, welche die DNA chemisch direkt

angreifen. Dies geschah jedoch in einem kleineren Umfang als die bisherigen Untersuchungen mit HU. Es bleibt jedoch fraglich, ob der Nutzen einer Behandlung mit den klassischen, stark toxischen oder mutagenen Zytostatika, wie etwa Alkylantien, insbesondere bei der Mehrzahl der gutartigen Tumore nicht weit zurückbleibt hinter dem Schaden, den diese Substanzen im Organismus verursachen. Ein Beispiel dafür das vielfach erprobte Alkylanz Temozolomid. Die Substanz konnte die erwarteten Behandlungserfolge bei weitem nicht erfüllt. Sarkaria *et al.* zeigten, dass die Kombination von Bestrahlung, Temozolomid und Temsirolimus das Infektionsrisiko in neu diagnostizierten Glioblastomen erhöhte [127]. Ebenso die Behandlung von rekurrenten Meningeomen mit Temozolomid zeigte nur wenig Erfolg [128].

Kaley *et al.* veröffentlichte kürzlich Ergebnisse einer Phase II Studie bei der Patienten mit rekurrenten/progressiven atypischen und anaplastischen Meningeomen mit Sunitinib behandelt wurden. Es zeigte sich, dass trotz erfolgsversprechendem Behandlungsschema die Toxizität von Sunitinib ein Problem darstellte [129].

Daher mangelt es zurzeit an vergleichsweise milden Therapieansätzen, die sich gegen einzelne Enzyme oder Rezeptoren richten. Erste Versuche mit Rezeptortyrosinkinase-Hemmern und Hormonrezeptor-Modulatoren lieferten bis dato keine überzeugenden Ergebnisse. Eigene *in vitro* Versuche der Arbeitsgruppe am Magdeburger Institut für Neuropathologie mit dem Ribonukleinsäure-Reduktase-Inhibitor HU und einer weiteren Palette von Hemmstoffen, die auf einzelne Proteine abzielen, zeigten lediglich für HU eine deutliche Wirkung an Zellkulturen. Jedoch lag der Konzentrationsbereich, in dem ein antiproliferativer Effekt auftrat, selbst für HU an der oberen Grenze des *in vivo* Erreichbaren. Die übrigen getesteten Substanzen lagen sogar deutlich oberhalb dieser Grenze [103]. Aufgrund dieser fehlenden Chemotherapiemöglichkeiten bei Meningeomen wurden die Bemühungen zur Erforschung der Signalwege in letzter Zeit intensiviert. Dabei lag der Fokus insbesondere auf der Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, da die Überaktivierung dieses Signalweges von unterschiedlichen Forschungsteams mehrfach bestätigt wurde [130-133]. Sehr gut untersucht ist dabei die in den Signalwegen oberhalb von mTORC1 gelegenen Kinase Akt [3]. Gemäß Johnson *et al.* wird Akt in Meningeom-Zelllinien hauptsächlich durch den

Wachstumsfaktor PDGF (platelet-derived growth factor) aktiviert [131]. Ebenfalls bekannt ist, dass PDGF die Phosphorylierung von p70S6K induziert, dessen verstärkte Expression in malignen Meningeomen bereits nachgewiesen wurde [134, 135]. Erste Versuche *in vivo* zeigten, dass eine Überexpression von p70S6K1 ein vergrößertes Tumolvolumen in Mäusen bewirkt [135]. Bereits aufgrund dieser ersten Ergebnisse schien die Inhibition des mTORC1-Signalwegs ein potentielles Ziel für die Behandlung von Meningeomen darzustellen. Zu Beginn der hier vorgelegten Arbeit lagen jedoch noch keine systematischen Analysen zur mTORC1-Kinaseaktivität und zur Aktivität der im mTORC1-Signalweg vorgeschalteten sowie der nachgeschalteten Kinasen in Meningeomen vor. Eine gut etablierte Methode zur Bestimmung der Kinaseaktivität ist die Messung des Phosphorylierungsstatus der mTORC1-Substrate 4EBP1 und p70S6K.

Unsere Analysen zeigten, dass mTORC1 in Meningeomen aller WHO Grade eine physiologische Rolle spielt. Gerade auch in den therapeutisch kritischen atypischen (WHO Grad II) und malignen Meningeomen (WHO Grad III) war auch im erheblichen Anteil immunpositiver Fälle für die phosphorylierte Form der Effektormoleküle von mTORC1, p70S6K und 4EBP1 nachweisbar. Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen und der Expressionsanalyse ergab, dass sich anscheinend höhergradige Tumore eher durch eine erhöhte Phosphorylierungs-gesteuerte Aktivität von mTORC1 auszuzeichnen, als durch die höhere Verfügbarkeit von mTOR selbst oder der Proteinsubstrate des Komplexes mTORC1. Die Überaktivierung des Signalweges in den klinisch kritischen Tumoren könnte daher eher auf heraufregulierte Kinase-Kaskaden zurückgeführt werden, als auf die verstärkte Genexpression einzelner Komponenten. Aufgrund dessen erscheint bei der Therapie von Meningeomen die Inhibition von mTORC1 ein lohnenswerter Ansatzpunkt zu sein. Eine Aktivierung des Signalweges lässt sich in Meningeomen aller Grade detektieren. Von daher ist davon auszugehen, dass nicht nur die sehr kleine Gruppe von Patienten mit anaplastischen Meningeomen von mTORC1-Inhibierung als Therapieansatz profitieren würde, sondern auch Behandlungserfolge bei den häufiger auftretenden benignen Meningeomen erzielt werden könnten. Es kann ebenso davon ausgegangen werden, dass die mTORC1-Inhibition auch in langsam wachsenden Tumorarten

zum Erfolg führt. Dafür spricht, dass Everolimus bereits erfolgreich bei Patienten mit Tuberöser Sklerose eingesetzt wird, die ein langsam wachsendes Riesenzell-Astrozytom entwickelt haben [136].

Trotz sicherlich nicht restlos geklärter Fragen zum Wirkmechanismus von Temsirolimus in den Tiermodellen der vorliegenden Arbeit - z.B. der noch ungenügend nachgewiesenen Kinasehemmung *in vivo* - wird in dieser Arbeit erstmals an zwei Tiermodellen belegt, dass Temsirolimus prinzipiell das Wachstum maligner Meningeome im Tier substantiell hemmen kann.

6.2 Darstellung von Meningeomen in Mausmodellen

Bis heute wurden zahlreiche genetische Alterationen erforscht, die eine Rolle bei der Pathogenese von Meningeomen spielen. Infolgedessen ergaben sich neue molekulare Ziele, die als vielversprechende pharmakologische Ansatzpunkte in Betracht gezogen werden können. Zur Erforschung der Therapeutika kommen in präklinischen Studien häufig Transplantationsmodelle zum Einsatz. Dabei unterscheidet man zwischen syngenem Modellen bei denen die Spenderzellen dem identischen Zuchtstamm der gleichen Spezies entnommen werden, dem auch das Empfängertier angehört, und dem xenogenen Modell bei dem diese Spezies verschieden sind. Letzteres bietet den Vorteil, dass die Wirkungsweise von Substanzen an Geweben humanen Ursprungs getestet werden können, welches die entsprechenden Zielmoleküle enthält. Der Nachteil des Xenograftmodells besteht in der Abstoßungsreaktion, die bei der Transplantation fremden Gewebes im Tier unweigerlich auftritt. Aufgrund dessen ist es notwendig, immundefiziente Tierstämme zu verwenden. In der präklinischen Onkologie kommen häufig heterotope Xenograftmodelle zur Anwendung. Bei diesem Modell stimmt das Zielgewebe, in das die Tumorzellen eingebracht werden, nicht mit dem Herkunftsgewebe überein. Der Vorteil heterotoper Transplantationsmodelle, besteht in dem oft beschleunigten und vor allem, in der gewählten Nische (z.B. subkutan), mit einfachen Mitteln messbares Wachstum der induzierten Tumore. Tumorzellen können relativ einfach subkutan appliziert und das Wachstum der Tumore mit Hilfe eines Messschiebers verfolgt werden. Die dabei vorgenommene Mehrfachmessung in

Zeitintervallen bietet den Vorteil der Erstellung einer Wachstumskinetik. Zudem lassen sich chemotherapeutische Effekte leichter und schneller sichtbar machen. Die erste erfolgreiche subkutane Transplantation von humanen Meningeomzellen in immundefiziente Mäuse wurde von Rana *et al.* im Jahre 1977 beschrieben [137]. Dabei zeigte sich, dass das Xenograft nur vorübergehend morphologische Ähnlichkeiten zu humanen Tumoren aufwies und dass sich diese Tumore nur schwer in den Tieren induzieren ließen. Aufgrund dessen verbesserte Ende der 1990er Jensen *et al.* die Methodik dahingehend, dass er Meningeomzellen vor der subkutanen Injektion in Matrigel® einbettete. Die Histologie dieses Xenograft-Tumors glich denen humaner Meningeome [138] und die Induktionsrate stieg bis zu 60 % an. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden bei den subkutanen Xenograft-Mäusen Zellen der malignen Meningeom-Zelllinie IOMM-Lee vor der Applikation in Matrigel® eingebettet. Es zeigte sich, dass die Zellen zu 100 % einen Tumor in immundefizienten Swiss nude-Mäusen induzierten und sich die Wachstumskinetik mit einem Messschieber über einen Zeitraum von drei Wochen hinweg bequem und ohne große Beeinträchtigungen für die Tiere bestimmen ließ.

In dem Bemühen die Faktoren zu bestimmen, welche die Tumorinduktion im Flankenmodell beeinflussen, demonstrierte Ragel *et al.* erst kürzlich, dass innerhalb von immortalisierten Zelllinien und operativ gewonnenen primären Zellen benignen Meningeome ein komplexer Karyotyp assoziiert war. Dieser war assoziiert mit einer hohen Zellteilungsrate *in vitro* und einer hohen Tumorinduktionsrate *in vivo* [139]. Da zytotoxische Substanzen eine höhere Wirksamkeit bei schnell proliferierenden Zellen zeigen, ist dies eher nachteilig für Wirksamkeitsbetrachtungen im subkutanen Flankenmodell. Einen weiteren Nachteil des heterotopen Xenotransplantationsmodells wies Wilmanns *et al.* 1992 an murinen Kolonkarzinomzellen nach. Es zeigte sich, dass die Chemosensitivität zytotoxischer Substanzen vom Applikationsort der Zellen abhängig ist und somit die Lokalisation einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika hat [140]. Aufgrund dieser Limitationen des subkutanen Xenograftmodells ist das intrakranielle und damit orthotope Xenograftmodell diesem vorzuziehen. Mit dem Fortschreiten der Entwicklung in der bildgebenden Technologie der letzten Jahre konnten Mehrfachmessungen

an orthotopen Mausmodellen im lebenden Tier realisiert werden. Das erste orthotope Xenograftmodell für Meningeome in immundefizienten Mäusen wurde von McCutcheon *et al.* [141] beschrieben. Es wurden sowohl Meningeome aller drei Grade in Form von Primärkulturen als auch die immortalisierte Meningeom-Zelllinie IOMM-Lee verwendet. Obwohl die Tumoren ihren Malignitätsgrad beibehielten, zeigten sie verschiedene Wachstumsmuster, die sich in dem Maß nicht in humanen Meningeomen finden lassen [141]. Auch bei unseren Studien zur Wirksamkeit von Temsirolimus hat sich das orthotope Xenograftmodell in Verbindung mit dem bildgebenden Verfahren des Kleintier-MRT bewährt. Durch zwei Messungen, zum einen an Tag zwei nach Tumorzellapplikation und zum anderen an Tag neun, ließen sich Größenunterschiede der Tumore bei den behandelten Tieren im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dokumentieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Erforschung der Tumorgenese ist die Erzeugung von genetisch veränderten Tieren (genetically engineered mouse models (GEM)). GEM-Krebsmodelle werden zunehmend komplexer in ihrer Fähigkeit die Histologie und das biologische Verhalten von humanen Krebsarten zu imitieren. Die Entwicklung von Tumoren in gentechnisch veränderten Tieren wird möglich durch Expression von Onkogenen, spezifischen genetischen Mutationen oder durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. GEM-Modelle vergegenwärtigen die Tumorentwicklung und –progression durch die *de novo* Tumorentwicklung im Tier und bieten somit einen exzellenten Rahmen zur Evaluierung nicht nur chemotherapeutischer sondern auch chemopräventiver Medikation. Während GEM-Modelle bereits bei Gliomen weitläufig eingesetzt werden, um neue therapeutische Herangehensweisen zu untersuchen, verlässt man sich bis heute bei Meningeomen hauptsächlich auf Xenograftmodelle. Im Jahr 2002 entwickelte Kalamirides *et al.* eine Methode zur Erzeugung von Meningeomen in $NF2^{loxP/loxP}$ Mäusen. Bei diesem Verfahren werden zwei bis drei Tage alten Mäusejungen rekombinante Cre-Adenoviren direkt intrakraniell injiziert. Nach vier Monaten entwickeln 20 bis 30 % der Tiere mit Cre-vermittelter $NF2$ -Exzision langsam wachsende Meningeome. Wie beim Menschen konnte bei diesen Mäusen die am häufigsten vorkommenden histologischen Meningeom-Subtypen meningoethelial, fibroblastisch und transitional beobachtet

werden [142]. Der Nachteil von GEM-Modellen ist jedoch, dass sie mit hohem Kosten- und Zeitaufwand verbunden sind. Zudem ist es nicht möglich, die Komplexität humaner Tumore in Tieren verlässlich nachzuahmen. Es lässt sich nicht sicher vorhersagen, dass medikamentöse Wirkungen die sich an murinen Tumoren zeigen, sich ebenfalls bei humanen Tumoren einstellen. Außerdem lässt sich der Behandlungszeitraum aufgrund der spontanen Tumorentwicklung schwerer eingrenzen. Dieses Problem kann jedoch heute durch wiederholte Messungen im Kleintier-MRT in zeitaufwendigen Vorversuchen gelöst werden. Im Gegenzug könnten sich gerade durch die langsame Kinetik künftig bessere Chancen bieten zur Austestung solcher Therapeutika, die nicht primär das Größenwachstum des Tumors hemmen oder gar den Tumor einschmelzen sollen, sondern z.B. langsame Migrations- und Invasionsprozesse hemmen sollen.

Vor allem aber bietet das GEM-Modell einen unschätzbaren Vorteil bei der Ermittlung der Rolle des Wirts-Genotyps bzw. von Wirt-Tumor-Interaktionen. Es ist das einzige Modell, welches eine Analyse der modulierenden Rolle der spezifischen Genausstattung des betroffenen Organismus bei der Tumorentwicklung und -progression zulässt. Um aber ohne Rücksicht auf den genauen Wirtsgenotyp die Wirksamkeit solcher therapeutischer Substanzen quantitativ zu testen, bei denen aufgrund ihres Mechanismus eine sehr rasche Kinetik anzunehmen ist, empfiehlt sich die Anwendung des orthotopen Xenograftmodells wie in der vorliegenden Arbeit.

6.3 Limitation von mTORC1-Inhibitoren bei intrakraniellen Tumoren

Die Rolle von mTOR im Hinblick auf die Tumorgenese konnte durch die langjährige Erforschung familiärer vererbbarer Tumorsyndrome, die auf Mutationen wichtiger Regulatoren des mTOR-Signalwegs basieren, nachgewiesen werden [40-42].

Aufbauend auf dieser Charakterisierung wurde in unterschiedlichen Studien der Nachweis erbracht, dass der PI3K/Akt/mTORC1-Signalweg in intrakraniellen Tumoren überaktiviert vorliegt. Die Bedeutung des

PI3K/Akt/mTORC1-Signalwegs bei der Ausbildung und dem Wachstum von Hirntumoren wird unterstrichen durch die Beobachtung, dass viele der genetischen Veränderungen, die in Gliomen beschrieben wurden, zu einer gesteigerten mTORC1-Aktivierung führen. Die am häufigsten gefundenen genetischen Alterationen in Glioblastoma multiforme (GBM) betreffen den EGF-Rezeptor [143], eine Veränderung des *PI3KC α* Gens [144] und einem Verlust des *PTEN* Gens [145, 146].

Neben den GBM sind Meningeome die häufigsten intrakraniellen Tumoren bei Erwachsenen [81]. Bei diesen Tumoren ist die häufigste bekannte genetische Alteration die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *NF2* [147]. In *NF2*-defizienten Meningeomzellen konnte eine konstitutive Aktivierung von mTORC1 bereits früh nachgewiesen werden [97].

Die Fähigkeit von Rapamycin und dessen Derivate mTORC1 zu inhibieren, war die Initialzündung für verschiedene klinische Studien, mit dem Ziel, das Tumorwachstum von Tumoren mit deutlicher mTORC1-Überaktivierung einzudämmen. Rapaloge - insbesondere Everolimus – lassen sich heute bereits effizient für die Behandlung von Patienten mit TSC-assoziiertem SEGA einsetzen [148]. Auch unserer Arbeitsgruppe gelang es nachzuweisen, dass Temsirolimus *in vivo* in Mausmodellen eine deutliche Verlangsamung des Meningeomwachstums bewirkt. Dennoch können diese Ergebnisse nur bedingt auf die Behandlung von Meningeompatienten übertragen werden, da die Dosis von 20 mg/kg täglich höher ist, als die bei Menschen eingesetzte Höchstdosis von 25 mg/kg wöchentlich bei der Behandlung von Nierenzellkarzinom [149]. In den letzten Jahren fokussierten sich die Studien hauptsächlich auf die Behandlung höhergradiger Gliome mit Rapalogen. Und obwohl die mTOR-Inhibition eine vielversprechende Therapieform zur Krebsbekämpfung darstellt, blieb die klinische Leistungsfähigkeit der Rapaloge weit hinter den Erwartungen zurück, die Substanz über die schon zugelassenen Indikationen hinaus auszudehnen [150, 151]. Die enttäuschenden Ergebnisse könnten in der Aktivierung der negativen Feedback-Schleife durch die mTOR-Hemmung mit Rapamycin begründet liegen. Aufgrund dessen, sendet das aktivierte Akt ein anti-apoptotisches Signal aus und ermöglicht anscheinend das Überleben von Krebszellen. Diese Hypothese wird gestützt durch den Nachweis eines

erhöhten phospho-Akt-Level in Tumormaterial von Patienten, die mit Everolimus behandelt wurden gegenüber Vergleichsproben [26, 152]. Eine Phosphorylierung von Akt und damit Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs konnte am Mausmodell detektiert werden. Zum anderen wird die Hemmung der Phosphorylierung von mTOR-Zielproteinen durch Rapalogen nur bedingt erreicht. 4EBP1 wird zum Beispiel rephosphoryliert und ist zudem refraktär bei Langzeitbehandlung mit Rapalogen, wohingegen S6K1 unter denselben Bedingungen dauerhaft gehemmt bleibt [153, 154]. Diese Unfähigkeit die Dephosphorylierung von 4EBP1 aufrecht zu erhalten, bedingt unter Umständen ein Level an Proteinbiosynthese, das für die Proliferation von Zellen auch unter Einfluss von Rapalogen ausreichend ist. Aufgrund dieser Defizite von Rapalogen wird verstärkt auf die Entwicklung neuer Inhibitoren des PI3K/Akt/mTORC1-Signalwegs gesetzt. Vielversprechend zeigen sich dabei ATP-kompetitiver Inhibitoren wie zum Beispiel AZD8055, die im Gegensatz zu den Rapalogen sowohl mTORC1, als auch mTORC2 hemmen.

Doch auch erworbene Resistenzen gegen Medikamente können die Wirkung selbst vielversprechender Inhibitoren limitieren, wie zum Beispiel diejenigen von BCR-ABL und BRAF-Inhibitoren [155, 156]. Es erscheint sogar möglich, dass die Tumorzellen sich im Laufe der Zeit anpassen und ebenfalls Resistenzen gegen mTOR-Inhibitoren entwickeln. Cope *et al.* zeigte, dass Zellen die einer intensiven AZD8055-Behandlung ausgesetzt sind, mit einem Switch von cap-abhängiger Translation zur internal ribosome entry site (IRES)-abhängigen Translation reagieren. Im Gegensatz dazu ergibt sich die erworbene Resistenz gegenüber chronischer AZD8055-Exposition aus der selektiven Hochregulation nur eines Zweiges des mTORC1-Signalwegs, des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF4E [157].

Ein weiteres Problem könnte die Therapie-induzierte onkogene Transformation von Zellen darstellen. Beim Vergleich von primären niedriggradigen Tumoren mit höhergradigen Rezidiven wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Entwicklung von hochgradigen Rezidiven (inklusive GBM) durch andere genetische Alteration gesteuert werden, als die für die Tumorentstehung verantwortlichen. Johnson *et al.* sequenzierte das Exom aus 23 anfänglich niedriggradigen Gliomen und rezidivierenden Tumoren reseziert

aus denselben Patienten. In 43 % der Fälle konnten mindestens die Hälfte der Mutationen des Initialtumors im Rezidivtumor nicht mehr detektiert werden, einschließlich Treibermutationen in *TP53*, *ATRX*, *SMARCA4* und *BRAF*. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass der rezidivierende Tumor aus Zellen des Initialtumors eines sehr frühen Entwicklungszeitraums abstammt [158].

Als relevante Beobachtung in Bezug auf eine Chemotherapie zeigte sich, dass Mutationen die in einer Überaktivierung des PI3K/Akt/mTORC1-Signalwegs resultieren, zurückzuführen seien auf die Behandlung mit Temozolomid. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Überaktivierung von mTORC1 in malignen Gliomen auf Therapie-induzierten onkogenen Transformation basiert [158].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass abgesehen von der deutlich erkennbaren Aktivierung von mTORC1 zurzeit der klinische Wert von Rapalogen allein oder in Kombination zur Behandlung maligner Hirntumore unklar ist. Im Gegensatz dazu scheint aber mTORC1 ein realistisches Ziel zur Behandlung benigner intrakranieller Tumoren wie SEGA oder von Meningeomen.

6.4 Spielt *NF2* eine Rolle für mTOR-Signalwege?

Die Frage ob *NF2* eine Rolle für die mTOR-Signalgebung spielt, kann aus den in der vorliegenden Arbeit *in vitro* durchgeführten Experimenten nicht schlüssig beantwortet werden. Hierzu wären weitere Studien zukünftig sinnvoll, da laut Literatur potenziell denkbarer Zusammenhänge bestehen. Aufgrund dessen würde eine Stratifizierung von Patienten nach *NF2*-Status, im Falle einer auf mTOR-Komplexe abzielenden Therapie, Vorteile mit sich bringen.

Die Mehrheit der sporadischen Meningeome und fast alle Schwannome weisen eine biallelische Inaktivierung von *NF2* auf [159]. Basierend auf dem Nachweis von James *et al.* [97], dass Merlin als negativer Regulator innerhalb des mTORC1 Signalweges fungiert, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Wirksamkeit von Temsirolimus und Everolimus an *NF2*-defizienten Zelllinien untersucht und mit ansonsten syngenen Zelllinien mit *NF2*-Wildtyp verglichen.

Es zeigte sich jedoch, dass die ersichtliche Differenz, die sich zwischen Merlin-defizienten Zellen und Wildtyp-Zellen ergab, statistisch nicht signifikant war. Die verminderte Responsivität der *NF2*-defizienten MenII-1-Zellen könnte sehr einfach auf der geringeren basalen Proliferationsrate dieser Zellen im Vergleich zum syngenem Wildtyp beruhen, welche sich bereits ohne jeden pharmakologischen Eingriff in FBS-haltigen Kulturmedien zeigte. Zellen mit verminderter Proliferation könnten gegebenenfalls weniger stark von der Hemmung der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums betroffen sein, die vor der Zellteilung stattfinden. Diese Überlegung gilt unabhängig davon ob die durch stabile shRNA-Expression künstlich verminderte Merlin-Expression direkt in den mTORC1-Signalweg eingreift oder auf ganz andere Weise die Proliferation hemmt. Zudem kann letztendlich keineswegs ausgeschlossen werden, dass die beobachtete geringere Proliferation dieser Zellen ganz unabhängig von der erwünschten Unterdrückung der Merlin-Expression auf der ungewollten Bindung der shRNA-Sequenzen an andere mRNAs beruht (sogenannter Off-Target-Effekt). Dies bliebe der Prüfung durch Verwendung anderer Zelllinien vorbehalten. Insbesondere mit einer in der Sequenz nicht-identischen shRNA gegen *NF2*, die ebenfalls laut Western Blot-Untersuchungen stabil das Merlin-Signal vermindert. Western Blot-Untersuchungen mit MenII-1 ergab jedenfalls, dass die verringerte Sensitivität gegenüber Temsirolimus offenbar nicht auf eine Veränderung der mTOR-Signalgebung zurückzuführen ist.

Einen Zusammenhang zwischen mTORC1 und Merlin konnte James *et al.* nachweisen. Es gelang dem Team zu zeigen, dass Merlin als ein negativer Regulator von mTORC1 fungiert. In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zeigten *NF2*-defiziente arachnoidale Zellen bzw. Meningeomzellen eine konstitutive Aktivierung des mTORC1-Signalwegs. Diese Aktivierung ist unabhängig sowohl vom PI3K-Akt- als auch vom MAPK/ERK-Signalweg. Zudem wurde eine Abschwächung der Phosphorylierung von Akt an der Stelle S⁴⁷³ nach Insulin-Stimulation bei Zellen mit Merlin-Verlust beobachtet [97], was sich auf die negative Feedback Regulierung von IRS1 durch aktiviertes mTORC1 zurückführen lässt [160, 161]. Die Resultate der durchgeführten Experimente legen nahe, dass Merlin oberhalb des TSC-Komplexes wirkt, der als Hauptregulator für mTORC1

fungiert. Zudem interagiert der TSC-Komplex mit mTORC2 und reguliert dessen Kinaseaktivität [162]. Dieses Zusammenspiel könnte ursächlich sein sowohl für die verstärkte Akt-Inhibition als auch für die herunterregulierte mTORC2-Aktivierung in TSC-defizienten Zellen [163, 164]. Obwohl der Mechanismus durch den Merlin den TSC-Komplex reguliert noch unbekannt ist, wurde die Interaktion von Hamartin mit Proteinen der ERM-Familie bereits erfolgreich nachgewiesen [165, 166]. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass Merlin mTORC1 möglicherweise über einen von TSC unabhängigen Signalweg reguliert. Erst vor kurzem gelangte James *et al.* der Nachweis, dass Merlin nicht nur mTORC1 negativ reguliert, sondern auch die Kinaseaktivität von mTORC2 positiv beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von mTORC2-Substraten, einschließlich Akt, in Merlin-defizienten Zellen reduziert ist [167]. Die Beeinträchtigung der Akt-Signalgebung ist darüber hinaus abhängig vom Zelltyp und verschiedenen Wachstumsstimuli. Daher lässt sich vermuten, dass Primärzellen aus Meningeomen, die ein chronischer Merlin-Verlust auszeichnet ein anderes mTORC2-Signalgebungsprofil besitzen, als Arachnoidal- oder Schwannzellen, bei denen *in vitro* durch RNA-Interferenz ein *NF2*-Verlust erzeugt wurde [167]. Zudem könnte ein Zusammenspiel von Merlin und mTORC2 eine Erklärung für die beobachtbaren Defekte im Aufbau des Zytoskeletts von *NF2*-defizienten Zellen liefern. Aufgrund dessen sind weiterführende Studien notwendig, um den genauen Mechanismus zu verstehen, wie Merlin mTORC2 reguliert und ob dies von TSC abhängig oder unabhängig geschieht. Diese Aspekte könnten von besonderer Bedeutung sein, im Falle einer angedachten Therapie mit ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitoren, die auch den Komplex mTORC2 betrafen.

6.5 Ausblick

Gerade der von James *et al.* [167] beobachtete Unterschied in der Akt-Signalgebung von Primärzellen und artifiziell erzeugten *NF2*-defizienten Zellen zeigt, dass sich *in vitro* die Wirksamkeit von Pharmaka zur gezielten Meningeomtherapie wohl nur bedingt darstellen lässt und dass deren Erforschung an Tiermodellen unabdingbar ist. Am besten geeignet die Natur

eines Tumors nachzubilden, sind gentechnisch veränderte Säugetiere mit endogener, genetisch programmierter Tumorbildung oder mit Tumorgenese durch externe Auslösung einer hochspezifischen somatischen Mutation. Ein Beispiel dafür ist das ursprünglich von Kalamarides *et al.* publizierten Meningeommodells [142]. Doch gemessen am Kosten-Nutzen-Vergleich ist es oft effizienter, ein orthotopes Xenograftmodell anzuwenden, das schnelle Ergebnisse liefert und annähernd die natürliche Verhaltensweise dieser Tumore skizziert. Dies gilt zumindest solange komplexe Wechselwirkungen mit anderen Genen des Tumor-tragenden Organismus nicht untersucht werden sollen.

Für die Erforschung der Wirkung von Rapalogen (Temsirolimus und Everolimus) auf Meningeome wurde von unserer Arbeitsgruppe ein orthotopes Xenograft-Mausmodell entwickelt, das inzwischen auch in der Erprobung weiterer Therapeutika auf die Behandlung von Meningeomen und in modifizierter Form von Gliomen Anwendung findet. Ein Beispiel ist eine Wirksamkeitsstudie von Cilengitide, bei der das Modell um die Messung der Überlebenszeiten erweitert wurde. Zudem sind noch weitere Projekte, bei denen unterschiedliche Substanzen auf ihre Wirksamkeit an Meningeomen getestet werden sollen, bereits in Planung. Darunter sind künftig auch Tests mit Substanzen, die multiple Proteinkinasen gleichzeitig hemmen, auch Rezeptortyrosinkinasen. Jedoch bei Substanzen wie Cilengitide, denen in unserer Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld *in vitro* eine geringe Potenz zur Wachstumshemmung und eher eine gute Migrationshemmung attestiert wurde [168], waren die Erwartungen an ein Xenograft-Modell mit raschem Volumenwachstum eines hochmalignen Tumors begrenzt.

Da die von uns getesteten Rapaloge einer Limitierung in ihrer Wirkweise unterworfen sind – z.B. durch adverse Aktivierung von Akt - und die Ergebnisse klinischer Studien weit hinter den Erwartungen für die Behandlung maligner Gliome zurückblieben, rücken andere mTOR-Inhibitoren zunehmend in den Fokus. Allen voran ATP-kompetitive Inhibitoren, die in der Lage sind sowohl mTORC1 als auch mTORC2 zu inhibieren. Da mTORC1 die Proliferation der Zelle durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von 4EBP1 steuert, können Krebszellen, die eine konstitutive Überaktivierung von mTOR erworben haben, eine pharmakologisch erzeugte Proliferationshemmung umgehen [169]. Des Weiteren begreift man erst langsam die Rolle von mTORC2 bei der

Hyperphosphorylierung von Akt innerhalb von Krebszellen, die grundlegend zur Versorgung und Wachstums des Tumors beiträgt. Durch die Anwendung von Rapalogen wird die mTORC2-Aktivität jedoch nicht beeinflusst [170, 171].

Erste eigene Versuche *in vitro* mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor AZD8055 zeigen, dass dieser im Gegensatz zu Temsirolimus die Phosphorylierung von 4EBP1 hemmt und damit ein konstantes Level der Proteinbiosynthese unmöglich macht. Gerade in Bezug auf die mTORC2-Hemmung und den damit verbundenen Einfluss auf die Migration bedarf es noch weiterführender Experimente.

Zusammenfassung

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren bei Erwachsenen. Obwohl es sich bei der Mehrheit (~80 %) der Meningeome um langsam wachsenden benigne Tumore des WHO Grades I handelt, ist das biologische Spektrum weit gefächert und so verbleibt eine nicht unerhebliche Gruppe von Meningeomen, deren klinische Entwicklung schwer vorhersagbar ist. Bei den verbleibenden 20 % der Fälle handelt es sich um zum Teil stark invasiv wachsende, atypische (WHO Grad II) bzw. maligne (WHO Grad III) Meningeome, die eine hohe Rezidivneigung aufweisen und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen. Die Standardtherapie besteht zurzeit aus der maximalen Resektion der Meningeome, gefolgt von Bestrahlung der verbleibenden Krebszellen. Bisher konnte noch keine Chemotherapie etabliert werden. Aufgrund dieser fehlenden Chemotherapiemöglichkeiten bei Meningeomen wurden die Bemühungen zur Erforschung der Signalwege in letzter Zeit intensiviert. Im Fokus stand bei der hier vorgelegten Arbeit insbesondere die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, da die Überaktivierung dieses Signalweges von unterschiedlichen Forschungsteams mehrfach bestätigt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass alle Komponenten des mTORC1-Signalwegs in Meningeomen unabhängig vom WHO-Grad exprimiert werden und die Signalkaskade auch aktiv ist. Zudem wurde eine signifikante Dosis-abhängige Wachstums-Inhibierung durch Temsirolimus bzw. Everolimus *in vitro* nachgewiesen. Dabei schien der Verlust des *NF2*-Gens (Genprodukt Merlin) schützend gegenüber der Wirkung von Temsirolimus zu sein. Es zeigte sich jedoch, dass die Differenz, die sich zwischen Merlin-defizienten Zellen und Wildtyp-Zellen ergab, statistisch nicht signifikant war.

Sowohl im subkutanen, als auch im orthotopen Xenograftmodell konnte gezeigt werden, dass die Behandlung tumortragender Mäuse mit Temsirolimus zu einer signifikanten ($p < 0,01$) Reduktion des Tumolvolumens um 70 % führt. Die anschließend an den Tumoren durchgeführten Immunhistochemischen Färbungen zeigten eine signifikante Proliferationsreduktion an Temsirolimus-behandelten Tumoren im Vergleich zu Kontrollen. Um sicherzustellen, dass diese Reduktion ein Resultat der spezifischen Hemmung der mTORC1-

Kinaseaktivität durch Temsirolimus ist, wurde das Phosphorylierungslevel der mTORC1-Substrate p70S6K und 4EBP1 mittels Western Blot-Untersuchungen bestimmt. Diese ergaben ein reduziertes Phosphorylierungssignal für die Tumore der Temsirolimus-behandelten Tiere, was den Schluss zulässt, dass bei systemischer Verabreichung der mTORC1 Signalweg auch im orthotop wachsenden Tumor gehemmt werden kann. Zudem konnten wir beobachten, dass die verminderte Phosphorylierung von p70S6K einher ging mit einem gesteigerten Phosphorylierungslevel von Akt, was eine gesteigerte Aktivierung der PI3K impliziert. Diese negative Rückkopplung ist bekannt und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von mTORC1 das Wachstum von Meningeom sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* supprimiert. Dies impliziert, dass die Inhibierung des mTOR-Komplex 1 eine mögliche Strategie zur Behandlung von Meningeompatienten darstellt.

Quellenverzeichnis

1. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN: **Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.** *J Antibiot (Tokyo)* 1975, **28**(10):721-726.
2. Heitman J, Movva NR, Hall MN: **Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast.** *Science* 1991, **253**(5022):905-909.
3. Wullschlegler S, Loewith R, Hall MN: **TOR signaling in growth and metabolism.** *Cell* 2006, **124**(3):471-484.
4. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH: **RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs.** *Cell* 1994, **78**(1):35-43.
5. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN: **Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive.** *Nat Cell Biol* 2004, **6**(11):1122-1128.
6. Loewith R, Jacinto E, Wullschlegler S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN: **Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control.** *Mol Cell* 2002, **10**(3):457-468.
7. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM: **DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival.** *Cell* 2009, **137**(5):873-886.
8. Hall MN: **mTOR-what does it do?** *Transplant Proc* 2008, **40**(10 Suppl):S5-8.
9. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, Carr SA, Sabatini DM: **PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase.** *Mol Cell* 2007, **25**(6):903-915.
10. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL: **Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity.** *Genes Dev* 2006, **20**(20):2820-2832.
11. Pachow D, Wick W, Gutmann DH, Mawrin C: **The mTOR signaling pathway as a treatment target for intracranial neoplasms.** *Neuro Oncol* 2014.
12. Fingar DC, Blenis J: **Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression.** *Oncogene* 2004, **23**(18):3151-3171.
13. Laplante M, Sabatini DM: **mTOR signaling at a glance.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 20):3589-3594.
14. Noda T, Ohsumi Y: **Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.** *J Biol Chem* 1998, **273**(7):3963-3966.
15. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM: **mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(1):21-35.
16. Cantley LC: **The phosphoinositide 3-kinase pathway.** *Science* 2002, **296**(5573):1655-1657.
17. Chalhoub N, Baker SJ: **PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer.** *Annu Rev Pathol* 2009, **4**:127-150.
18. Huang J, Manning BD: **The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth.** *Biochem J* 2008, **412**(2):179-190.
19. Reiling JH, Sabatini DM: **Stress and mTOR signaling.** *Oncogene* 2006, **25**(48):6373-6383.

20. Weber JD, Gutmann DH: **Deconvoluting mTOR biology.** *Cell Cycle* 2012, **11**(2):236-248.
21. Schmelzle T, Hall MN: **TOR, a central controller of cell growth.** *Cell* 2000, **103**(2):253-262.
22. Ma XM, Blenis J: **Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(5):307-318.
23. Saltiel AR, Kahn CR: **Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.** *Nature* 2001, **414**(6865):799-806.
24. White MF: **IRS proteins and the common path to diabetes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, **283**(3):E413-422.
25. Shah OJ, Wang Z, Hunter T: **Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies.** *Curr Biol* 2004, **14**(18):1650-1656.
26. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL *et al*: **mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt.** *Cancer Res* 2006, **66**(3):1500-1508.
27. Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, Eyiah-Mensah G, Riveros M, Perruzzi C, Sun J, Monahan-Earley RA, Shiojima I, Nagy JA *et al*: **Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin.** *Cancer Cell* 2006, **10**(2):159-170.
28. Stoeltzing O, Meric-Bernstam F, Ellis LM: **Intracellular signaling in tumor and endothelial cells: The expected and, yet again, the unexpected.** *Cancer Cell* 2006, **10**(2):89-91.
29. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM: **Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB.** *Mol Cell* 2006, **22**(2):159-168.
30. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: **Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex.** *Science* 2005, **307**(5712):1098-1101.
31. Oh WJ, Wu CC, Kim SJ, Facchinetti V, Julien LA, Finlan M, Roux PP, Su B, Jacinto E: **mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide.** *EMBO J* 2010, **29**(23):3939-3951.
32. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ *et al*: **The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C.** *EMBO J* 2008, **27**(14):1932-1943.
33. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL: **Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size.** *Mol Cell* 2011, **42**(1):50-61.
34. Hernandez-Negrete I, Carretero-Ortega J, Rosenfeldt H, Hernandez-Garcia R, Calderon-Salinas JV, Reyes-Cruz G, Gutkind JS, Vazquez-Prado J: **P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration.** *J Biol Chem* 2007, **282**(32):23708-23715.
35. Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T *et al*: **mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways.** *Cancer Res* 2011, **71**(9):3246-3256.
36. Masri J, Bernath A, Martin J, Jo OD, Vartanian R, Funk A, Gera J: **mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor.** *Cancer Res* 2007, **67**(24):11712-11720.

37. Dunlop EA, Tee AR: **Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms.** *Cell Signal* 2009, **21**(6):827-835.
38. Garcia-Martinez JM, Alessi DR: **mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1).** *Biochem J* 2008, **416**(3):375-385.
39. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J *et al*: **Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity.** *Nature* 2004, **431**(7005):200-205.
40. Chow LM, Baker SJ: **PTEN function in normal and neoplastic growth.** *Cancer Lett* 2006, **241**(2):184-196.
41. Orloff MS, Eng C: **Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome.** *Oncogene* 2008, **27**(41):5387-5397.
42. Yin Y, Shen WH: **PTEN: a new guardian of the genome.** *Oncogene* 2008, **27**(41):5443-5453.
43. Gorlin RJ, Cohen MM, Jr., Condon LM, Burke BA: **Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome.** *Am J Med Genet* 1992, **44**(3):307-314.
44. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M *et al*: **PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome.** *Hum Mol Genet* 1999, **8**(8):1461-1472.
45. Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, de Lange GG, Gille JJ, Eriksson AW: **The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients.** *Clin Genet* 1986, **29**(3):222-233.
46. Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W *et al*: **High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice.** *Curr Biol* 1998, **8**(21):1169-1178.
47. Janku F, Hong DS, Fu S, Piha-Paul SA, Naing A, Falchook GS, Tsimberidou AM, Stepanek VM, Moulder SL, Lee JJ *et al*: **Assessing PIK3CA and PTEN in Early-Phase Trials with PI3K/AKT/mTOR Inhibitors.** *Cell Rep* 2014, **6**(2):377-387.
48. Sansal I, Sellers WR: **The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(14):2954-2963.
49. Tsimberidou AM, Iskander NG, Hong DS, Wheler JJ, Falchook GS, Fu S, Piha-Paul S, Naing A, Janku F, Luthra R *et al*: **Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**(22):6373-6383.
50. Bonneau D, Longy M: **Mutations of the human PTEN gene.** *Hum Mutat* 2000, **16**(2):109-122.
51. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD *et al*: **PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(16):1246-1256.
52. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW: **Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN.** *Cell* 1998, **95**(1):29-39.

53. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP: **The tuberous sclerosis complex.** *N Engl J Med* 2006, **355**(13):1345-1356.
54. Orlova KA, Crino PB: **The tuberous sclerosis complex.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1184**:87-105.
55. Napolioni V, Curatolo P: **Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex.** *Curr Genomics* 2008, **9**(7):475-487.
56. Au KS, Williams AT, Roach ES, Batchelor L, Sparagana SP, Delgado MR, Wheless JW, Baumgartner JE, Roa BB, Wilson CM *et al*: **Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States.** *Genet Med* 2007, **9**(2):88-100.
57. van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J *et al*: **Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34.** *Science* 1997, **277**(5327):805-808.
58. Crino PB: **mTOR: A pathogenic signaling pathway in developmental brain malformations.** *Trends Mol Med* 2011, **17**(12):734-742.
59. Mizuguchi M, Takashima S: **Neuropathology of tuberous sclerosis.** *Brain Dev* 2001, **23**(7):508-515.
60. Ingle GR, Sievers TM, Holt CD: **Sirolimus: continuing the evolution of transplant immunosuppression.** *Ann Pharmacother* 2000, **34**(9):1044-1055.
61. Martel RR, Klicius J, Galet S: **Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic.** *Can J Physiol Pharmacol* 1977, **55**(1):48-51.
62. Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL: **Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(11):4947-4951.
63. Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J: **Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP.** *Science* 1996, **273**(5272):239-242.
64. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M: **mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease.** *Nature* 2013, **493**(7432):338-345.
65. Eng CP, Sehgal SN, Vezina C: **Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors.** *J Antibiot (Tokyo)* 1984, **37**(10):1231-1237.
66. Rini BI: **Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**(5):1286-1290.
67. Hess G: **Temsirolimus for the treatment of mantle cell lymphoma.** *Expert Rev Hematol* 2009, **2**(6):631-640.
68. Gabardi S, Baroletti SA: **Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology.** *Pharmacotherapy* 2010, **30**(10):1044-1056.
69. Lebowohl D, Anak O, Sahmoud T, Klimovsky J, Elmroth I, Haas T, Posluszny J, Saletan S, Berg W: **Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2013, **1291**:14-32.
70. Garcia-Echeverria C, Sellers WR: **Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer.** *Oncogene* 2008, **27**(41):5511-5526.
71. Guertin DA, Sabatini DM: **The pharmacology of mTOR inhibition.** *Sci Signal* 2009, **2**(67):pe24.
72. Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN: **Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors.** *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**(11):868-880.

73. Sini P, James D, Chresta C, Guichard S: **Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells.** *Autophagy* 2010, **6**(4):553-554.
74. Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P *et al*: **AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity.** *Cancer Res* 2010, **70**(1):288-298.
75. Chang YY, Juhasz G, Goraksha-Hicks P, Arsham AM, Mallin DR, Muller LK, Neufeld TP: **Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**(Pt 1):232-236.
76. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH: **mTOR regulation of autophagy.** *FEBS Lett* 2010, **584**(7):1287-1295.
77. Sudarsanam S, Johnson DE: **Functional consequences of mTOR inhibition.** *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010, **13**(1):31-40.
78. Proud CG: **mTORC1 signalling and mRNA translation.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**(Pt 1):227-231.
79. Huang S, Yang ZJ, Yu C, Sinicrope FA: **Inhibition of mTOR kinase by AZD8055 can antagonize chemotherapy-induced cell death through autophagy induction and down-regulation of p62/sequestosome 1.** *J Biol Chem* 2011, **286**(46):40002-40012.
80. Asahina H, Nokihara H, Yamamoto N, Yamada Y, Tamura Y, Honda K, Seki Y, Tanabe Y, Shimada H, Shi X *et al*: **Safety and tolerability of AZD8055 in Japanese patients with advanced solid tumors; a dose-finding phase I study.** *Invest New Drugs* 2013, **31**(3):677-684.
81. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS: **CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010.** *Neuro Oncol* 2013, **15** Suppl 2:ii1-56.
82. Mawrin C, Perry A: **Pathological classification and molecular genetics of meningiomas.** *J Neurooncol* 2010, **99**(3):379-391.
83. Goutagny S, Yang HW, Zucman-Rossi J, Chan J, Dreyfuss JM, Park PJ, Black PM, Giovannini M, Carroll RS, Kalamarides M: **Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of meningioma malignant progression dependent on the underlying NF2 status.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(16):4155-4164.
84. Smith MJ, Higgs JE, Bowers NL, Halliday D, Paterson J, Gillespie J, Huson SM, Freeman SR, Lloyd S, Rutherford SA *et al*: **Cranial meningiomas in 411 neurofibromatosis type 2 (NF2) patients with proven gene mutations: clear positional effect of mutations, but absence of female severity effect on age at onset.** *J Med Genet* 2011, **48**(4):261-265.
85. Gronholm M, Sainio M, Zhao F, Heiska L, Vaheri A, Carpen O: **Homotypic and heterotypic interaction of the neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein merlin and the ERM protein ezrin.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 6):895-904.
86. Obremski VJ, Hall AM, Fernandez-Valle C: **Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells.** *J Neurobiol* 1998, **37**(4):487-501.
87. Curto M, McClatchey AI: **Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact.** *Br J Cancer* 2008, **98**(2):256-262.

88. McClatchey AI, Giovannini M: **Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin.** *Genes Dev* 2005, **19**(19):2265-2277.
89. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI: **NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions.** *Genes Dev* 2003, **17**(9):1090-1100.
90. Okada T, Lopez-Lago M, Giancotti FG: **Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane.** *J Cell Biol* 2005, **171**(2):361-371.
91. Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P: **The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44.** *Genes Dev* 2001, **15**(8):968-980.
92. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A: **Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas.** *Neurology* 1997, **49**(1):267-270.
93. Bianchi AB, Hara T, Ramesh V, Gao J, Klein-Szanto AJ, Morin F, Menon AG, Trofatter JA, Gusella JF, Seizinger BR *et al*: **Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types.** *Nat Genet* 1994, **6**(2):185-192.
94. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, Jones RT, McKenna A, Getz G, Ligon KL, Palessandolo E, Van Hummelen P, Ducar MD *et al*: **Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations.** *Nat Genet* 2013, **45**(3):285-289.
95. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K, Avsar T, Li J, Murray PB, Henegariu O *et al*: **Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO.** *Science* 2013, **339**(6123):1077-1080.
96. Reuss DE, Piro RM, Jones DT, Simon M, Ketter R, Kool M, Becker A, Sahm F, Pusch S, Meyer J *et al*: **Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations.** *Acta Neuropathol* 2013, **125**(3):351-358.
97. James MF, Han S, Polizzano C, Plotkin SR, Manning BD, Stemmer-Rachamimov AO, Gusella JF, Ramesh V: **NF2/merlin is a novel negative regulator of mTOR complex 1, and activation of mTORC1 is associated with meningioma and schwannoma growth.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**(15):4250-4261.
98. Brem SS, Bierman PJ, Brem H, Butowski N, Chamberlain MC, Chiocca EA, DeAngelis LM, Fenstermaker RA, Friedman A, Gilbert MR *et al*: **Central nervous system cancers.** *J Natl Compr Canc Netw* 2011, **9**(4):352-400.
99. Moazzam AA, Wagle N, Zada G: **Recent developments in chemotherapy for meningiomas: a review.** *Neurosurg Focus* 2013, **35**(6):E18.
100. Huse JT, Holland EC: **Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma.** *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(5):319-331.
101. de Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W, van Tellingen O: **Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors.** *Expert Rev Neurother* 2006, **6**(8):1199-1209.
102. Madaan K, Kaushik D, Verma T: **Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy.** *Expert Rev Anticancer Ther* 2012, **12**(1):19-29.

103. Wilisch-Neumann A, Pachow D, Wallesch M, Petermann A, Bohmer FD, Kirches E, Mawrin C: **Re-evaluation of cytostatic therapies for meningiomas in vitro.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2014, **140**(8):1343-1352.
104. Goodwin JW, Crowley J, Eyre HJ, Stafford B, Jaeckle KA, Townsend JJ: **A phase II evaluation of tamoxifen in unresectable or refractory meningiomas: a Southwest Oncology Group study.** *J Neurooncol* 1993, **15**(1):75-77.
105. Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Sitruk-Ware R: **Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma.** *Cancer Invest* 2006, **24**(8):727-733.
106. Norden AD, Drappatz J, Wen PY: **Advances in meningioma therapy.** *Curr Neurol Neurosci Rep* 2009, **9**(3):231-240.
107. Striedinger K, VandenBerg SR, Baia GS, McDermott MW, Gutmann DH, Lal A: **The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP.** *Neoplasia* 2008, **10**(11):1204-1212.
108. Puttmann B, Gerlach EM, Kruger M, Blottner D: **Neuromuscular contacts induce nitric oxide signals in skeletal myotubes in vitro.** *Neurosignals* 2005, **14**(3):85-95.
109. Tanaka K, Sato C, Maeda Y, Koike M, Matsutani M, Yamada K, Miyaki M: **Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified c-myc oncogene.** *Cancer* 1989, **64**(11):2243-2249.
110. Lee WH: **Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee.** *Neurosurgery* 1990, **27**(3):389-395; discussion 396.
111. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: **Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing.** *Cancer Res* 1987, **47**(4):936-942.
112. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**(1-2):55-63.
113. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: **Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.** *J Immunol Methods* 1989, **119**(2):203-210.
114. Liang CC, Park AY, Guan JL: **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** *Nat Protoc* 2007, **2**(2):329-333.
115. Chomczynski P, Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 1987, **162**(1):156-159.
116. Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream.** *Exp Hematol* 2002, **30**(6):503-512.
117. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y)* 1993, **11**(9):1026-1030.
118. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: **Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification.** *Biotechniques* 1997, **22**(1):130-131, 134-138.
119. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.

120. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H: **Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.** *J Immunol* 1984, **133**(4):1710-1715.
121. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: **Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.** *Int J Cancer* 1983, **31**(1):13-20.
122. Scholzen T, Gerdes J: **The Ki-67 protein: from the known and the unknown.** *J Cell Physiol* 2000, **182**(3):311-322.
123. Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP *et al*: **Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas.** *Nat Genet* 1994, **6**(2):180-184.
124. Hoffman RM: **Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic.** *Invest New Drugs* 1999, **17**(4):343-359.
125. Fathi AR, Roelcke U: **Meningioma.** *Curr Neurol Neurosci Rep* 2013, **13**(4):337.
126. van Alkemade H, de Leau M, Dieleman EM, Kardaun JW, van Os R, Vandertop WP, van Furth WR, Stalpers LJ: **Impaired survival and long-term neurological problems in benign meningioma.** *Neuro Oncol* 2012, **14**(5):658-666.
127. Sarkaria JN, Galanis E, Wu W, Dietz AB, Kaufmann TJ, Gustafson MP, Brown PD, Uhm JH, Rao RD, Doyle L *et al*: **Combination of temsirolimus (CCI-779) with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) (NCCTG trial N027D) is associated with increased infectious risks.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(22):5573-5580.
128. Chamberlain MC, Tsao-Wei DD, Groshen S: **Temozolomide for treatment-resistant recurrent meningioma.** *Neurology* 2004, **62**(7):1210-1212.
129. Kaley TJ, Wen P, Schiff D, Ligon K, Haidar S, Karimi S, Lassman AB, Nolan CP, DeAngelis LM, Gavriloic I *et al*: **Phase II trial of sunitinib for recurrent and progressive atypical and anaplastic meningioma.** *Neuro Oncol* 2015, **17**(1):116-121.
130. Johnson M, Toms S: **Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy?** *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**(12):1029-1036.
131. Johnson MD, Okedli E, Woodard A, Toms SA, Allen GS: **Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p7S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells.** *J Neurosurg* 2002, **97**(3):668-675.
132. Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U *et al*: **Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(11):4074-4082.
133. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, Lichter P: **Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression.** *Int J Cancer* 2005, **114**(2):249-256.
134. Cai DX, James CD, Scheithauer BW, Couch FJ, Perry A: **PS6K amplification characterizes a small subset of anaplastic meningiomas.** *Am J Clin Pathol* 2001, **115**(2):213-218.

135. Surace EI, Lusic E, Haipek CA, Gutmann DH: **Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression.** *Ann Neurol* 2004, **56**(2):295-298.
136. Campen CJ, Porter BE: **Subependymal Giant Cell Astrocytoma (SEGA) Treatment Update.** *Curr Treat Options Neurol* 2011, **13**(4):380-385.
137. Rana MW, Pinkerton H, Thornton H, Nagy D: **Heterotransplantation of human glioblastoma multiforme and meningioma to nude mice.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1977, **155**(1):85-88.
138. Jensen RL, Leppla D, Rokosz N, Wurster RD: **Matrigel augments xenograft transplantation of meningioma cells into athymic mice.** *Neurosurgery* 1998, **42**(1):130-135; discussion 135-136.
139. Ragel BT, Couldwell WT, Gillespie DL, Wendland MM, Whang K, Jensen RL: **A comparison of the cell lines used in meningioma research.** *Surg Neurol* 2008, **70**(3):295-307; discussion 307.
140. Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD, Fidler IJ: **Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil.** *Int J Cancer* 1992, **52**(1):98-104.
141. McCutcheon IE, Friend KE, Gerdes TM, Zhang BM, Wildrick DM, Fuller GN: **Intracranial injection of human meningioma cells in athymic mice: an orthotopic model for meningioma growth.** *J Neurosurg* 2000, **92**(2):306-314.
142. Kalamarides M, Niwa-Kawakita M, Leblois H, Abramowski V, Perricaudet M, Janin A, Thomas G, Gutmann DH, Giovannini M: **Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningioma development in the mouse.** *Genes Dev* 2002, **16**(9):1060-1065.
143. Mellingshoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ *et al*: **Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors.** *N Engl J Med* 2005, **353**(19):2012-2024.
144. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, Oba-Shinjo SM, Carlotti CG, Caballero OL, Simpson AJ *et al*: **PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme.** *Mol Cancer Res* 2006, **4**(10):709-714.
145. Masica DL, Karchin R: **Correlation of somatic mutation and expression identifies genes important in human glioblastoma progression and survival.** *Cancer Res* 2011, **71**(13):4550-4561.
146. Koul D: **PTEN signaling pathways in glioblastoma.** *Cancer Biol Ther* 2008, **7**(9):1321-1325.
147. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, Eldridge R, Kley N, Menon AG, Pulaski K *et al*: **A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor.** *Cell* 1993, **75**(4):826.
148. Curran MP: **Everolimus: in patients with subependymal giant cell astrocytoma associated with tuberous sclerosis complex.** *Paediatr Drugs* 2012, **14**(1):51-60.
149. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I *et al*: **Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma.** *N Engl J Med* 2007, **356**(22):2271-2281.
150. Chang SM, Wen P, Cloughesy T, Greenberg H, Schiff D, Conrad C, Fink K, Robins HI, De Angelis L, Raizer J *et al*: **Phase II study of CCI-779 in patients**

- with recurrent glioblastoma multiforme.** *Invest New Drugs* 2005, **23**(4):357-361.
151. Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, Abrey L, DeAngelis LM, Lieberman F, Robins HI, Chang SM, Yung WK, Drappatz J *et al*: **Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02.** *Neuro Oncol* 2012, **14**(12):1511-1518.
152. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L *et al*: **Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(10):1603-1610.
153. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J: **Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(45):17414-17419.
154. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, Shokat KM: **Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2.** *PLoS Biol* 2009, **7**(2):e38.
155. Little AS, Smith PD, Cook SJ: **Mechanisms of acquired resistance to ERK1/2 pathway inhibitors.** *Oncogene* 2013, **32**(10):1207-1215.
156. Rosenzweig SA: **Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases.** *Biochem Pharmacol* 2012, **83**(8):1041-1048.
157. Cope CL, Gilley R, Balmanno K, Sale MJ, Howarth KD, Hampson M, Smith PD, Guichard SM, Cook SJ: **Adaptation to mTOR kinase inhibitors by amplification of eIF4E to maintain cap-dependent translation.** *J Cell Sci* 2014, **127**(Pt 4):788-800.
158. Johnson BE, Mazor T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K *et al*: **Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma.** *Science* 2014, **343**(6167):189-193.
159. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB: **Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell.** *Curr Opin Genet Dev* 1996, **6**(1):87-92.
160. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR *et al*: **The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins.** *J Cell Biol* 2004, **166**(2):213-223.
161. Huang J, Manning BD: **A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes.** *Biochem Soc Trans* 2009, **37**(Pt 1):217-222.
162. Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD: **The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**(12):4104-4115.
163. Efeyan A, Sabatini DM: **mTOR and cancer: many loops in one pathway.** *Curr Opin Cell Biol* 2010, **22**(2):169-176.
164. Huang J, Wu S, Wu CL, Manning BD: **Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors.** *Cancer Res* 2009, **69**(15):6107-6114.
165. Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V: **The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton.** *J Biol Chem* 2002, **277**(46):44180-44186.

166. Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MW, Jay DG, Hall A: **The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho.** *Nat Cell Biol* 2000, **2**(5):281-287.
167. James MF, Stivison E, Beauchamp R, Han S, Li H, Wallace MR, Gusella JF, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V: **Regulation of mTOR complex 2 signaling in neurofibromatosis 2-deficient target cell types.** *Mol Cancer Res* 2012, **10**(5):649-659.
168. Wilisch-Neumann A, Kliese N, Pachow D, Schneider T, Warnke JP, Braunsdorf WE, Bohmer FD, Hass P, Pasemann D, Helbing C *et al*: **The integrin inhibitor cilengitide affects meningioma cell motility and invasion.** *Clin Cancer Res* 2013, **19**(19):5402-5412.
169. Dowling RJ, Topisirovic I, Alain T, Bidinosti M, Fonseca BD, Petroulakis E, Wang X, Larsson O, Selvaraj A, Liu Y *et al*: **mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs.** *Science* 2010, **328**(5982):1172-1176.
170. Bashir T, Cloninger C, Artinian N, Anderson L, Bernath A, Holmes B, Benavides-Serrato A, Sabha N, Nishimura RN, Guha A *et al*: **Conditional astroglial Rictor overexpression induces malignant glioma in mice.** *PLoS One* 2012, **7**(10):e47741.
171. Kim SJ, DeStefano MA, Oh WJ, Wu CC, Vega-Cotto NM, Finlan M, Liu D, Su B, Jacinto E: **mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8.** *Mol Cell* 2012, **48**(6):875-887.

Doreen Pachow
Helmstedter Str. 10a
39112 Magdeburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

mTOR-Inhibition als Therapieansatz zur Behandlung von Meningeomen

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an andere Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg,

Doreen Pachow

Lebenslauf

Name: Doreen Pachow

Adresse Helmstedter Str. 10a
39112 Magdeburg

Telefon: 01707505045

geboren: 05.08.1980

Geburtsort: Hoyerswerda

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Schulbildung:

09/1987 – 08/1992 *Grundschule POS Lohsa*

09/1992 – 08/1997 *Lessing-Gymnasium Hoyerswerda*

09/1997 – 08/2000 *Wirtschaftsgymnasium „Konrad-Zuse BSZ“
Hoyerswerda*

- Abitur: 1,4

Hochschulbildung:

10/2000 – 09/2003 *Technische Universität Dresden*

- Studiengang: Betriebswirtschaftslehre
- abgeschlossenes Vordiplom

10/2003 – 04/2009 *Technische Universität Dresden*

- Studiengang: Diplom Biologie
- abgeschlossenes Diplom: Gesamtnote 1,6

01/2010 – heute *Universitätsklinikum Magdeburg*

- Bearbeitung des Promotionsthemas
**„mTOR-Inhibition als Therapieansatz zur
Behandlung von Meningeomen“** am Institut
für Neuropathologie