UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Diagnostikzentrum Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

AKT Amplifikationen im humanen Lungenkarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Christian Heupel aus Bremen

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.10.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Bockhorn

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	3
	1.1 Das Lungenkarzinom	3
	1.1.1 Prävalenz	3
	1.1.2 Diagnostik	
	1.1.3 Klassifikation	
	1.1.4 Therapie	
	1.2 Struktur und Funktion von AKT	
	1.2.1 Rolle von AKT für die Tumorentstehung	
	1.3 Ziel der Arbeit	
2	MATERIAL UND METHODEN	20
	2.1 Untersuchungsmaterial	20
	2.2 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung.	
	2.2.1 Auswahl und Anzucht von BAC Klonen	
	2.2.2 DNA-Extraktion	
	2.2.3 Sondenmarkierung	
	2.2.4 Hybridisierung	26
3	ERGEBNISSE	30
	3.1 Abschätzung der Prävalenz von AKT1, AKT2 und AKT3 Amplifikationen im	
	Bronchialkarzinom	30
	3.2 Detaillierte Analyse der AKT2-Amplifikation im Bronchialkarzinom	30
	3.2.1 Assoziation zum Tumorphänotyp	32
	3.2.2 Assoziation zur Patientenprognose	
	3.2.3 Assoziation von AKT2-Amplifikation zu p53-Expression	
	3.2.4 Assoziation der AKT2-Amplifikation zur Ki67-Expression	
	3.3 Vergleich von AKT2-Amplifikationen und PI3K Amplifikationen	
	3.3.1 Assoziation von AKT2-PI3K-Amplifikationen und Patientenprognose	39
4	DISKUSSION	40
5	ZUSAMMENFASSUNG	45
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	46
7	LITERATURVERZEICHNIS	48
8	DANKSAGUNG	55
9	LEBENSLAUFFEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFIN	IERT.
10	0 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	56

1 EINLEITUNG

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist das häufigste Karzinom weltweit.

Sieht man sich die Statistiken zum Lungenkarzinom an, so wird sehr schnell deutlich, wie maligne dieser Tumor ist. Die große Zahl der Neuerkrankungen und die Bösartigkeit des Tumors, verbunden mit dem Leid der Patienten und den immensen Kosten die mit der Diagnose und Therapie der Erkrankung einhergehen, führen zu großen Anstrengungen der Politik und unterstreichen die herausragende Bedeutung des Lungenkarzinoms in der Forschung. Hier wird intensiv nach neuen Möglichkeiten gesucht um die bestehenden Diagnose- und Therapieschemata zu erweitern und die heute oftmals sehr schlechte Prognose der Patienten mit Lungentumoren zu verbessern. Besonders mit der Gentherapie verbinden sich viele Hoffnungen und erste kleinere Erfolge befeuern die Suche auf diesem Gebiet.

Unstrittig ist, dass es, neben politischen Maßnahmen wie verstärktem Nichtraucherschutz und Präventionsprogrammen, segensreich wäre, die Diagnostik, sowie die Therapie der Lungenkarzinome zu verbessern.

1.1.1 Prävalenz

Weltweit betrachtet rangiert das Lungenkarzinom auf Platz 1 der Tumorstatistik (Colin D Mathers, 2001). In Deutschland ist Lungenkrebs sowohl bei Männern als auch bei Frauen die dritthäufigste Erkrankung. Etwa 34.000 jährliche Neuerkrankungen an Lungenkrebs entsprechen 14,3% aller Krebserkrankungen bei den Männern. Bei den Frauen macht der Lungenkrebs mittlerweile mit etwa 15.500 jährlichen Neuerkrankungen 6,4% aller bösartigen Neubildungen aus (Robert Koch Institut, 2008). Es wird erwartet, dass Inzidenz und Mortalität bei den Frauen weiter steigen werden (Patel et al., 2004). Der Anteil des Lungenkrebs an den Gesamt-Krebstodesfällen beträgt bei Männern 26,0% (Rang1) und bei Frauen 13% (Rang3) (Robert Koch Institut, 2008). Hauptrisikofaktor ist das Zigarrettenrauchen. Etwa 87% der Lungenkrebstodesfälle sind direkt auf Zigarrettenrauchen zurückzuführen (American Cancer Society, 2008). Weitere Karzinogene sind u.a. Arsen-, Asbest-, Cadmium- und Radonexposition (Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Die Prognose des an Lungenkrebs Erkrankten richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung (s. unten), sie ist im Allgemeinen aber sehr schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für männliche Lungenkrebspatienten beträgt 15%, die von Frauen 18% (Robert Koch Institut, 2008).

Zur schlechten Prognose trägt sicherlich bei, dass Lungenkrebs in der Regel sehr spät diagnostiziert wird. Häufig führen erst Allgemeinsymptome wie Husten mit und ohne Auswurf, Schmerzen, Atemnot oder Abgeschlagenheit zum Arztbesuch (Deutsches Krebsforschungszentrum, 2005).

1.1.2 Diagnostik

Neben einer ausführlichen Anamnese, sowie der körperlichen Untersuchung des Patienten besteht die Diagnostik des Lungenkarzinoms v.a. aus bildgebenden Verfahren, die durch eine gezielte Funktionsdiagnostik ergänzt werden. Die Röntgen Thorax-Übersichtsaufnahme ist die bildgebende Basisdiagnostik. Darüber hinaus wird bei Verdacht auf Lungenkarzinom eine kontrastmittelgestützte Spiral-CT-Untersuchung durchgeführt. Eine weitere bildgebende Untersuchung ist die PET-Untersuchung, bei der mithilfe eines Radiotracers der erhöhte Glucosestoffwechsel der Tumorzelle dargestellt werden kann. Bei jedem Verdacht auf ein Lungenkarzinom ist die Bronchoskopie obligatorisch, bei der auch Proben zur histologischen Aufarbeitung entnommen werden können. Ergänzt werden können diese Verfahren ggf. durch Sonographie, Szintigraphie oder durch MRT-Untersuchungen.

Die funktionelle Diagnostik hilft bei der Beantwortung der Frage, ob ein Patient prinzipiell operabel ist, oder nicht. Um die Belastbarkeit und die funktionellen Reserven des Patienten Abschätzen zu können, bedient man sich u.a. der Spirometrie, der Perfusionsszintigraphie und der Blutgasanalyse. Eine kardiale Diagnostik wir ebenfalls durchgeführt (Passlik, 2006).

1.1.3 Klassifikation

Die histologische Einteilung der bösartigen epithelialen Tumoren der Lunge folgt der WHO (World Health Organisation) Klassifikation von 2004. Man unterscheidet:

- 1. Plattenepithelkarzinom
- 2. Kleinzelliges Karzinom
- 3. Adenokarzinom
- 4. Großzelliges Karzinom
- 5. Adenosquamöses Karzinom
- 6. Sarkomatoides Karzinom
- 7. Karzinoidtumor
- 8. Karzinom der Bronchialwanddrüse
- 9. Andere Formen

Kleinzellige und nicht-kleinzellige Tumoren werden unterschiedlich klassifiziert. Die nicht-kleinzelligen Tumoren werden nach der TNM-Klassifikation bewertet. Dieses von der UICC (Union International Contre Le Cancer) ausgearbeitete Regel- und Klassifikationssystem ist heute internationaler Standard. Die TNM-Klassifikation beschreibt und kategorisiert die Größe und Ausdehnung des Primärtumors (T), den Lymphknotenstatus (engl. "Nodes" N), sowie das (fakultative) Vorhandensein von Metastasen (M). Die letzte Fassung stammt aus dem Jahre 2003. Basierend auf der TNM-Klassifikation werden die Tumoren einem Stadium zugeordnet. Es werden die Stadien "I", "II", "IIIA", "IIIB" und "IV" unterschieden. Die unterschiedlichen Stadien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Prognose und helfen bei der Wahl der geeigneten Behandlungsstrategie. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt im Stadium I ca.60%, im Stadium II ca.35%, im Stadium IIIA ca. 15%, im Stadium IIIB ca. 5-10%. Im Stadium IV gibt es nur sehr selten Langzeitüberlebende (Böcker et al, 2004; Classen und Kochsiek, 2004).

Die kleinzelligen Lungentumoren werden in ein "limitiertes Stadium" (LD "limited Disease) und in ein "extendiertes Stadium I" (EDI "extensive Disease") sowie ein "extendiertes Stadium II" (EDII) eingeteilt. Die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium LD beträgt etwa 6%, ab dem Stadium EDI liegt sie bereits unter 1%.

Neben der Stadieneinteilung der Tumoren erfolgt zusätzlich noch das histopathologische Grading (G) der Tumoren. Das Grading wird zur Bestimmung des geweblichen und zytologischen Differenzierungsgrades durchgeführt.

Grading der Lungenkarzinome

GX Differenzierung kann nicht beurteilt werden

G1 Gut differenziert

G2 Mäßig differenziert

G3 Schlecht differenziert

G4 Undifferenziert

(Donhijsen, 1998)

Je undifferenzierter ein Tumor ist, desto maligner ist er.

1.1.4 Therapie

Die Therapie der Lungenkarzinome basiert wie bei anderen soliden Tumoren auf der klassischen onkologischen Trias von Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. Neben dieser etablierten Therapie gibt es heute neuartige genetische Therapieverfahren die zunehmend an Bedeutung gewinnen.

Prinzipiell kann zwischen der Therapie von nicht-kleinzelligen und kleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden werden. Die Therapie der Wahl bei den nicht-kleinzelligen Karzinomen bis zum Stadium IIIA ist die Operation mit dem Ziel den Tumor vollständig zu entfernen. Sie hat somit kurativen Charakter. Die Operabilität wird neben dem Stadium des Tumors durch den, mithilfe der funktionellen Tests ermittelten Allgemeinzustand, sowie die präoperative Belastbarkeit des Patienten, bestimmt. Der chirurgische Standardeingriff bei operablen Tumoren ist die Lobektomie mit obligater mediastinaler Lymphknotendissektion. Bei Befall von mehr als einem Lappen, oder wenn der Hauptbronchus mit einbezogen ist, wird eine Bilobektomie oder die Pneumektomie durchgeführt (Jensik, 1986). Die chirurgische Therapie kann mit einer neoadjuvanten oder postoperativen Strahlen- oder Chemotherapie kombiniert werden. Die 5-Jahres Überlebensraten chirurgischer Interventionen mit vorangegangener neoadjuvanter Chemotherapie werden mit ca. 40-50% angegeben (Carretta et al., 2008) (Bolukbas et al., 2008) (Schneider et al., 2008). In den fortgeschrittenen Stadien IIIB und IV entfällt die Möglichkeit, den Tumor kurativ zu entfernen. Im Stadium IIIB wird eine simultane Radiochemotherapie durchgeführt. Bei fernmetastasierten Tumoren ist die palliative Chemotherapie erste Wahl. Moderne Zytostatika führen nicht nur zu einer Verbesserung der Lebensqualität, sondern auch zu einer Zunahme der Überlebenszeit (RKI, 2008) (Cheong et al., 2007).

Die Zytostatikaempfindlichkeit der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome ist geringer als die der kleinzelligen Lungenkarzinome. Man unterscheidet die initiale "first line chemotherapy" von der Rezidivtherapie ("second line chemotherapy"). Aktueller Standard in der first line Therapie ist die Kombination eines platinumhaltigen Medikaments wie Cisplatin oder Carboplatin mit einem zweiten Agens wie beispielsweise Paclitaxel, Vinorelbin, oder Docetaxel (Stinchcombe und Socinski, 2009) (Schiller et al., 2002). In der Rezidivtherapie kommen gegenwärtig drei verschiedene Präparate zum Einsatz. Die beiden zytotoxischen Chemotherapeutika Docetaxel und Pemetrexed, sowie der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Stinchcombe und Socinski, 2009).

Das kleinzellige Lungenkarzinom unterscheidet sich von den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen dadurch, dass zum Diagnosezeitpunkt in fast allen Fällen bereits eine Fernmetatstasierung vorliegt und in der Regel die Operabilität nicht mehr gegeben ist. Nur in sehr frühen Tumorstadien besteht die Möglichkeit einer Operation. Bei allen anderen Tumorstadien wird, soweit es der körperliche Zustand des Patienten zulässt, eine primäre Chemotherapie oder eine simultane Radiochemotherapie angestrebt. Bei adäquater Therapie können so Überlebenszeiten von bis zu 12 Monaten erreicht werden (Duale Reihe 2001). Gängige first line Therapieschemata sind die Kombinationen *Adriamycin/Cyclophosphamid/Vincristin*, oder die Kombination aus *Cisplatin* und *Etoposid*. In der Rezidivtherapie kann *Topotecan* versucht werden.

Diese klassischen Therapieformen sind in jüngster Vergangenheit durch eine neuartige so genannte "genspezifische" Therapie ergänzt worden. Diese neuartigen Therapeutika unterscheiden sich von den klassischen zytotoxischen Medikamenten dadurch, dass sie nicht direkt in die Zellreplikation eingreifen, sondern für die Tumorzelle essentielle Signalwege modulieren. Man nennt dies auch "targeted" Therapie. Bei den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zielt diese Therapie auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor; syn. HER1). Die EGFR-Familie umfasst vier strukturell und funktionell nahe verwandte Rezeptoren HER1, HER2, HER3 und HER4. Es handelt sich hierbei um in der Zellmembran verankerte Moleküle die sich aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne zusammensetzen. Nach extrazellulärer Bindung von spezifischen Liganden (z.B. EGF) kommt es zu einer Konformationsänderung der EGF-Rezeptoren von inaktiven Monomeren zu Homo- oder Heterodimeren mit Aktivierung einer intrazellulär gelegenen Tyrosinkinasedomäne und nachfolgender Aktivierung verschiedener Signalkaskaden (z.B. MAPK und

PI3K/AKT-Signalwege). Diesen unterschiedlichen Signalkaskaden ist gemein, dass die initial extrazellulären Wachstumssignale durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungskaskaden in den Zellkern weitergeleitet werden (*Abb. Nr.1*). Die Interaktion der Signalwege ist sehr komplex und heute noch nicht vollständig verstanden. Alle Signaltransduktionskaskaden führen jedoch letztendlich durch Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren zu Zellwachstum und Zellproliferation.

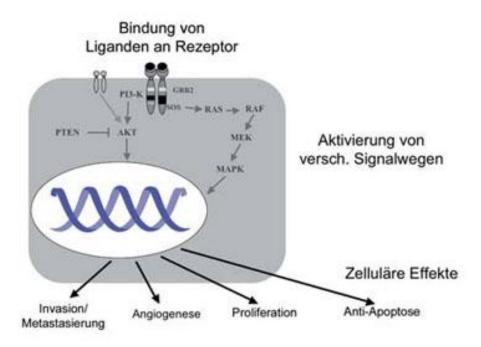


Abb. Nr.1: Aktivierung und Funktionen des EGFR. Nach Bindung spezifischer Liganden an den EGF-Rezeptor werden verschiedene Signalwege einschließlich der MAPK und PI3-K/AKT Signalwege aktiviert, die eine Veränderung der Genexpression im Nukleus auslösen können. Insgesamt können durch Aktivierung des EGFR unterschiedliche Zellfunktionen verändert werden wie Erhöhung von Proliferation, Zell-Invasion, Angiogenese (z.B. durch Induktion von VEGF) und Hemmung der Apoptose (J. R. Brahmer, 2007).

Dadurch, dass die EGF-Signalwege eine Zentrale Rolle hinsichtlich des Zellwachstums der Zelle einnehmen, besitzt eine unkontrollierte Aktivierung hohes onkogenes Potential. Die onkogene Aktivierung kann sowohl durch eine Überexpression (z.B. aufgrund einer Genamplifikation, aber auch durch eine physiologische Hoch-Regulierung) als auch durch aktivierende Gen-Mutationen verursacht werden. So wurde in den meisten humanen Tumortypen zumindest gelegentlich eine EGFR-Überexpression nachgewiesen (Sauter et al., 2003). Besonders häufig findet sich eine stark erhöhte EGFR Expression in Tumoren von Hirn, Niere, Lunge, Harnwegen, Kolon und Schilddrüse (Brandes et al., 2008, Kersting et al., 2007, A. Li

et al., 2008, Zaczek et al., 2008) (Al-Kuraya et al., 2007, Rakosy et al., 2007). Eine EGFR-Genamplifikation oder zumindest eine erhöhte Genkopiezahl als Ursache für die Expression ist seltener, wird aber z.B. bei ~50 % der Hirntumoren (Glioblastoma) (Brandes et al., 2008). ~6 % der Lungenkarzinomen (NSCLC) (A. Li et al., 2008), ~4 % der Kolon- (Al-Kuraya et al., 2007), 79% der Haut- (maligne Melanome) (Rakosy et al., 2007), ~16 % der Brust-(Zaczek et al., 2008), >20 % der Knochen- (Kersting et al., 2007) und 61% der Schilddrüsentumoren (anaplastisches Thyroidkarzinom) gefunden (D. H. Lee et al., 2007). Schließlich können Mutationen in der intrazellulären ATP-Bindungsdomäne des EGFR zu einer permanenten, ligandenunabhängigen onkogenen Aktivierung führen (Abb. Nr.2, S.10). Solche Mutationen werden vor allem in Lungen- und Kopf-Hals-Tumoren gefunden, wenn auch nur vergleichsweise selten (Schwentner et al., 2008). Bei Lungentumoren treten diese Mutationen interessanterweise häufiger bei Asiaten (25-40%) als bei Europäern oder Amerikanern auf (10% oder weniger) und kommen vermehrt bei dem sehr seltenen Subtyp der bronchioalveolären Karzinome vor (Pao und Miller, 2005). Die Tatsache, dass zudem vor allem jüngere Frauen und Nichtraucher von Lungentumoren mit EGFR Mutationen betroffen sind, lässt darauf schließen, dass EGFR Mutationen eine distinkte Ursache für die Entstehung von Lungentumoren darstellen, die unabhängig von z.B. durch Zigarettenrauchen verursachten DNA Schäden und genereller genetischer Instabilität sind (Rudin et al., 2009).

Zur Zeit sind mit *Gefitinib (Iressa)*, *Erlotinib (Tarceva)* und *Cetuximab (Erbitux)* drei Medikamente zugelassen, die direkt am EGF-Rezeptor angreifen und die Signaltransduktion blockieren. Bei den ersten beiden handelt es sich um kleine Moleküle, die analog zum natürlichen Substrat ATP (Adenosintriphosphat) im aktiven Zentrum binden, aber die Tyrosinkinaseaktivität blockieren und so die Signaltransduktion unterbrechen (*Abb. Nr.2, S.10*). *Gefitinib* und *Erlotinib* haben sich in klinischen Studien jedoch praktisch nur bei Bronchialkarzinom-Patienten mit aktivierenden EGFR-Mutationen als effektiv erwiesen, während bei Patienten mit Tumoren ohne solche Mutationen die Therapie offensichtlich keinen Vorteil bietet.

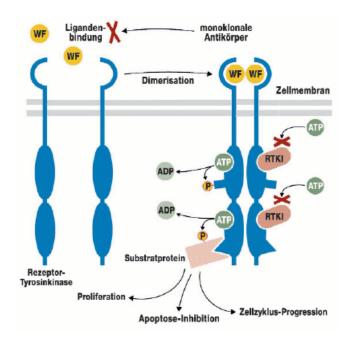


Abb. Nr.2.: Angriffspunkte für eine Anti-EGFR-Therapie. RTKI (=Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor) als Angriffspunkte für neuartige "Gentherapeutika (2007)

Cetuximab ist ein selektiver Antikörper gegen den EGFR. Durch seine Bindung werden die Aktivierung des Rezeptors und die nachfolgende Signaltransduktion gehemmt. Darüber hinaus wird angenommen, dass er die Fähigkeit der Tumorzellen, die durch Chemo- und Strahlentherapie verursachten Schäden zu reparieren, hemmt, sowie die Ausbildung neuer Blutgefäße in den Tumoren verringert, was zu einer generellen Hemmung des Tumorwachstums zu führen scheint.

Die Wachstumssignale der HER 1-4-Rezeptoren werden intrazellulär durch verschiedene Signalkaskaden weitergeleitet. Die wichtigste Signalkaskade ist der PI3K/AKT Signalweg.

Die Schlüsselenzyme dieses Signalwegs sind die namengebenden Kinasen PI3K und AKT. Nach der Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen (HER1-HER4-RTK und andere) durch spezifische Liganden wird der PI3K/AKT Signalweg aktiviert. Dabei wird eine phosphorylierungs-Kaskade in Gang gesetzt die zunächst über den sog. Tyrosinkinase-Rezeptor die PI3K aktiviert. PI3K besteht aus der regulatorischen Untereinheit p85, sowie aus der katalytischen Untereinheit p110.

p85, die regulatorische Untereinheit der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K), kann über ihre SH2-Domäne direkt, oder indirekt, an aktive RTK binden, wodurch die katalytische Untereinheit p110, aktiviert wird (Hiles et al., 1992, Holt et al., 1994). Die aktivierte PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidolinositol-2Phosphat (PIP2) zu Phosphatidolinositol-3Phosphat (PIP3). Der second Messenger PIP3 lagert sich jetzt auf der Zytosolseite der Zellmembran an und dient als Anker für zahlreiche Signalproteine.

AKT/PKB transloziert jetzt vom Zytosol an die innere Zellmembran und bindet über seine Pleckstrin-homologe-Domäne an zwei PIP3 (Stokoe et al., 1997, Toker und Cantley, 1997).

Diese Bindung führt dazu, dass sich die Konformation von AKT/PKB ändert und die zwei katalytischen Domänen freigelegt werden (Fresno Vara et al., 2004).

Den spezifischen Signalkomplex komplettiert die Serin-Threonin-Kinase PDK1 (engl. 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase) die sich ebenfalls mithilfe von PIP3 über ihre Pleckstrin-homologe-Domäne an die Zellmembran anlagert.

Die Aktivierung von AKT/PKB erfolgt über die PDK1 vermittelte Phosphorylierung der katalytischen Domänen Thr308 ("Activation-Loop"), sowie die Phosphorylierung von Ser473, die zur vollständigen Aktivierung benötigt wird ("Hydrophobic-Motif") (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000).

Die Phosphorylierung von Ser473 ist bis heute nicht vollständig verstanden. Man nimmt an, dass die sog. PDK2-Kinase Ser473 phosphoryliert, dies ist allerdings umstritten und Gegenstand aktueller Forschungen (Chan und Tsichlis, 2001, Kawakami et al., 2004). Die Aktivität der Kinase PDK1 ist ebenfalls PIP3 abhängig (Coffer et al., 1998). PDK1 hat jedoch eine 10fach höhere Affinität zu PIP3 als AKT/PKB (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000).

Ein negativer Effektor auf die AKT Aktivierung ist die Phosphatase PTEN (engl. phosphatase and tensin homolog). Diese wirkt über PIP3-Dephosphorylierung der Aktivierung von AKT entgegen (Kim und Mak, 2006). Ein Verlust der PTEN Funktion führt zu einer erhöhten Konzentration der PIP3 Substrate und infolge zu einer konstitutiven Aktivierung der "downstream" gelegenen Komponenten des PI3K Signalweges, also auch von AKT (Di Cristofano und Pandolfi, 2000). Nachdem AKT/PKB durch die PDK1 vermittelte Phosphorylierung aktiviert wurde, transloziert AKT/PKB in den Zellkern.

Dieser Prozess ist noch nicht vollends verstanden. Neuere Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass die AKT-Translokation in den Zellnukleus ein aktiver Prozess ist. Dabei soll AKT im Verbund mit anderen nukleären Proteinen in den Zellkern transloziert werden. AKT verfügt also nicht über eine umschriebene Signalregion, die alleine die Translokation in den Zellkern vermittelt (Wang und Brattain, 2006). Nach seiner Aktivierung wirkt AKT/PKB über Phosphorylierung auf eine große Anzahl von Substraten , die sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert sind, ein (Fresno Vara et al., 2004).

AKT/PKB phosphoryliert seine Substrate an Serin/Threonin–Aminosäuresequenzen, die immer aus derselben Domäne, der sog. "consensus motif" RXRXXS/T bestehen.

AKT nimmt als letztes Glied dieser Signalkette eine Schlüsselposition für die Tumorentstehung ein. Veränderungen, die zu einer permanenten Aktivierung von AKT führen, setzen

zwangsläufig alle Regulationsmechanismen des Signalwegs oberhalb von AKT außer Kraft. Weil AKT grundsätzlich in allen Körperzellen benötigt und exprimiert wird, ist es an der Entstehung und Progredienz einiger humaner Tumortypen beteiligt (Bellacosa et al., 1995, Cheng und Ruggeri, 1996).

1.2 Struktur und Funktion von AKT

AKT, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB) oder v-AKT-Kinase, gehört zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Es ist ein zelluläres Homolog zum viralen Onkogen v-akt (Staal, 1987).

Beim Menschen wurden bislang drei Isoformen gefunden:

- AKT 1 (=PKBα) auf Chromosom 14q32.3
- AKT 2 (=PKBβ) auf Chromosom 19q13.1-q13.2
- AKT 3 (=PKBχ) auf Chromosom 1q43-q44

Trotz der Tatsache, dass die drei AKT-Isoformen auf unterschiedlichen Genen liegen, sind sie sich strukturell sehr ähnlich. Sie verfügen über eine 80% Aminosäuren-Sequenz- Homologie (Altomare DA, 2007). Das Protein ist ca. 56kDa schwer und besteht aus einer N-terminalen sog "Pleckstrin-Homologen-Domäne", einer Zentralen katalytischen Domäne und einer hydrophoben C-terminalen regulatorischen Domäne.

Für die Aktivierung spielen zwei Regionen der katalytischen Domäne eine entscheidende Rolle, sie werden als "Activation-Loop" (Thr 309 bei AKT 2) und als "Hydrophobic-Motif" (Ser 474) bezeichnet. Die "Pleckstrin-Homologie-Domäne" ist entscheidend für das Andocken von AKT an die Zellmembran. AKT ist als sog "downstream-effector" eines der Schlüsselenzyme innerhalb des PI3K/AKT-Signalweges, der an multiplen Zellregulationsprozessen beteiligt ist. AKT beeinflusst auf diesem Wege die Regulation von Zellwachstum und des Zelltodes, sowie das Voranschreiten des Zellzyklusses. Darüber hinaus spielt AKT eine entscheidende Rolle im Insulinstoffwechsel (Jiang et al., 2003).

1.2.1 Rolle von AKT für die Tumorentstehung

Das Gen AKT ist einer der "Key-Player" des PI3K/AKT-Signalweges (Paez und Sellers, 2003). Als wichtiges Glied einer Kette von Molekülen vermittelt AKT, durch gezielte Phosphorylierungen "downstream" gelegener Gene, extrazellulär ankommende Signale in den Zellkern (Downward, 2004) (*Abb. Nr.3, S.14*). So werden diverse wichtige zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, die Zellgröße und das Zellüberleben gesteuert. Auch an der zellulären Antwort auf unterschiedliche Nährstoffangebote, sowie an der Gewebeinvasion und der Angiogenese ist der PI3K/AKT-Signalweg beteiligt (Altomare und Testa, 2005). Dieses

"Leistungsspektrum" macht deutlich, weshalb dem PI3K/AKT- Signalweg so immenses forscherisches Interesse entgegengebracht wird. Man hat hier einen Signalweg, der maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Zellproliferation und Zellüberleben beteiligt ist (Osaki et al., 2004). Zu verlockend ist die Aussicht, hier evtl. Gene zu finden, durch deren gezielte Blockade oder Modifikation Tumorprogression beeinflusst werden kann. Auch ist es vorstellbar, dass man durch funktionelle Analysen Gene identifiziert, durch deren Veränderung das Ansprechen auf Radio- und/oder Chemotherapie verbessert werden könnte (Hennessy et al., 2005, Liang und Slingerland, 2003).

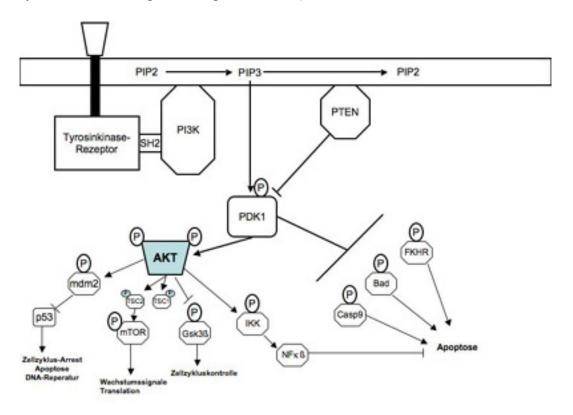


Abb. Nr.3: PI3K/AKT-Signalweg: AKT als Schlüsselmolekül

Die Ergebnisse der bisherigen Forschung zum Thema PI3K/AKT-Signalweg und Tumorentstehung zeigen sehr deutlich, dass es häufig zu genetischen Instabilitäten eines – oder mehrerer – Komponenten innerhalb des Signalweges kommt. Die veränderte Aktivität ist das Ergebnis von Mutationen, Amplifikationen, oder sie entsteht als Folge veränderter Expressionsmuster. Die daraus entstehende Disbalance zwischen Zellproliferation und Zellüberleben (Apoptose) kann Tumorwachstum, oder das Entstehen maligner Entartung fördern (siehe kurze Übersichtstabelle Nr.1, S.18).

AKT-Amplifikationen sind bisher in einem Magenkarzinom (AKT1; Staal, 1987), in Ovarial-tumoren (AKT2; Cheng et al., 1992; Nakayama et al., 2006), in Pankreastumoren (AKT2; Cheng et al., 1996), im Gliosarkom (AKT1; Knobbe und Reifenberger, 2003), sowie im

Mammakarzinom gefunden worden (AKT2; Bellacosa et al., 1995). Neben diesen Amplifikationen ist AKT häufig in Tumoren überexprimiert, so z.B. in hepatozellulären Karzinomen (Xu et al., 2004). Gen-Mutationen sind bisher für keines der AKT-Gene beschrieben (Osaki et al., 2004).

Onkogenes Potential erlangt AKT durch erhöhte Aktivierung. Grund für die erhöhte Aktivierung von AKT ist die Rezeptortyrosinkinase, die ihrerseits durch vermehrte extrazelluläre Aktivierung dauerhaft Signale nach intrazellulär übermittelt. Dadurch, dass AKT massiv überexprimiert ist, z.B. aufgrund von Amplifikation, wird jedes in die Zelle geleitete, potentiell onkogene Signal weitergeleitet. Auf diesem Wege kann es zu übermäßiger onkogener Aktivierung der Zellen kommen.

Infolge veränderter AKT-Aktivität kann es zu Veränderungen wichtiger "zellhomäostatischer" Prozesse kommen. An diesem Punkt rücken dann die Veränderungen der "upstream" und "downstream" von AKT gelegenen Komponenten des PI3K/AKT-Signalwegs in den Fokus. Häufig sind die zellulären Veränderungen als Ergebnis eines, an mehreren Stellen veränderten Signalweges, zu sehen. Wie eingangs erwähnt kann eine Vielzahl der Komponenten des PI3K/AKT-Signalwegs genetisch verändert sein (Hennessy et al., 2005).

Neben den in 1.1.4 erwähnten aktivierenden EGFR-Mutationen sind PI3K und PTEN zwei weitere wichtige Komponenten des PI3K/AKT-Signalwegs.

Beide Moleküle beeinflussen AKT direkt über Phosphorylierung (PI3K) bzw. Dephosphorylierung (PTEN). PTEN und PI3K Veränderungen finden sich in einer Vielzahl von Tumoren. Amplifikationen oder Mutationen des PI3K Gens kommen – um nur einige zu nennen – häufig in Ovarialtumoren, in Magenkarzinomen, in Lungenkarzinomen, oder in Medulloblastomen vor (Hennessy et al., 2005).

Patel et al. konnten zeigen, dass PI3K-Amplifikationen zu vermehrter AKT-Aktivierung führen und das diese Aktivierung bei der Entstehung des Plattenepithel-Karzinoms des Anus eine Rolle spielen könnte (Patel et al., 2007). Amplifikationen und onkogenetische aktivierende Mutationen von PI3K, die zu einer vermehrten AKT Aktivität führen, wurden darüber hinaus in kolorektalen Karzinomen (32%), in Magenkarzinomen (25%), im hepatozellulären Karzinom (36%), so wie in Brusttumoren (18-40%) gefunden (Samuels et al., 2004; Samuels et al., 2006). Bertelsen et al. entdeckten PI3K-Amplifikationen in 70% (28/40) der untersuchten Gebärmutterkarzinome und fanden eine positive Korrelation zwischen der PI3K-Genkopiezahl und phosphoryliertem, also aktiviertem AKT (Bertelsen, 2006).

Mutationen von PTEN sind u.a. für Brusttumoren, Prostatakarzinome, sowie Gehirntumoren beschrieben worden (J. Li et al., 1997). In einer interessanten Studie konnten Sos et al. zeigen,

dass PTEN-Funktionsverlust in EGF-Rezeptor mutierten Lungenkarzinomen zur Erlotinib-Resistenz führt (Sos et al., 2009). Hay et al. zeigen, dass PTEN als "Bremse" von AKT agiert und das diese Funktion unmittelbaren Einfluss auf Tumorprogression haben kann (Hay, 2005). Diverse Arbeiten konnten darüber hinaus zeigen, dass genetisch verändertes PTEN in einer Reihe von Tumoren zu veränderter Aktivität downstream gelegener Gene des PI3K/AKT-Signalweges führt (Hennessy et al., 2005). Sehr häufig geht der Verlust von PTEN mit einer deutlichen Konzentrationserhöhung von phosphoryliertem, also aktiviertem AKT einher. So berichten Lopez-Knowles et al. über einen sehr starken Zusammenhang zwischen PTEN-Verlust und AKT-Aktivierung in Brusttumoren (Lopez-Knowles et al., 2010). Wen et al. zeigten an einem Kollektiv von 144 Magenkarzinompatienten, dass PTEN- Mutationen unter anderem mit deutlich erhöhter AKT-Expression einhergingen (Wen et al., 2010). Ein wichtiges Zielgen von AKT ist das Gen mTOR (engl. mammalian Target Of Rapamycin). mTOR, wie AKT eine Serin/Threonin-Kinase, ist über die Phosphorylierung von S6K (ribosomale Protein S6 Kinase) und 4E-BP1 (engl. 4E binding protein) direkt an der Regulierung der Zelltranslation beteiligt und integriert so an prominenter Stelle Nährstoffsignale (Aminosäuren, Fette) und Signale von Wachstumsfaktoren um Zellwachstum und Zellzyklus-Progression zu steuern (Fingar und Blenis, 2004). Das mTOR aufgrund seiner wichtigen zellregulatorischen Funktion im Falle veränderter Aktivität zur Tumorentstehung- sowie Tumorprogression beitragen kann, darf heute als gesichert gelten. Das ist auch der Grund dafür, dass die Pharmaindustrie bestrebt ist, selektive mTOR-Blocker zu entwickeln, um der Tumorprogression Einhalt zu gebieten (Dancey, 2006). Getestet werden aktuell z.B. Rapamycin, oder Everolimus. AKT ist ein positiver Regulator von mTOR und entfaltet seine aktivierende – und damit onkogene – Wirkung über die Phosphorylierung des Gens TSCII (Tuberin). TSCII liegt in einem Komplex mit TSCI (Harmatin) vor und ist ein negativer Regulator von mTOR. Die Phosphorylierung von TSCII führt über - jetzt enthemmte - Aktivität von RHEB zu übermäßiger Aktivierung von mTOR (Hay und Sonenberg, 2004). Der Signalweg Tyrosin $kinaserezeptor~(z.B.~EGFR) \rightarrow PI3K/PTEN \rightarrow AKT \rightarrow mTOR$ wird mit einer Reihe von Tumoren assoziiert wie z.B. Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Gallenwegskarzinomen, oder Leiomyosarkomen. (Hudes, 2009) (Dai et al., 2009) (Chung et al., 2009) (Hernando et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der PI3K/AKT- Signalweg in einer Vielzahl unterschiedlichster Tumortypen genetisch verändert ist. Neben einigen anderen Genen dieses Signalweges ist AKT in den Fokus forscherischen Interesses gerückt.

Grund dafür sind die zentrale Lage innerhalb des Signalweges, sowie die Beobachtung, dass AKT-Veränderungen im Zuge anderer onkogenetischer Veränderungen des Pi3K/AKT-Signalweges, positiv mit Tumorentstehung und Tumorprogression korrelieren.

Erste pharmazeutische Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass es lohnenswert sein könnte, spezielle, gegen AKT gerichtete Substanzen, zu entwickeln.

Beeinflusste Gene	Funktion (Downward, 2004) (Nicholson und Anderson, 2002)	→ Modifikation / Zusammenhang mit AKT Krankheitsbild/Auswirkung (Downward, 2004) (Nicholson und Anderson, 2002)
Tumorsuppressorgene:		
PTEN	Tumorsuppressor Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 Folge: Negativer Regulator PI3K/Akt- Kinase Aktivität	→Ungehemmte Aktivität von AKT
TSC2/TSC1/mTOR	Tumorsuppressor Reguliert mTOR-Aktivität	→Phosphorylierung <i>Tuberöse Sklerose</i>
LKB1/STK11	Tumorsuppressor kontrolliert über TSC die mTOR Funktion (entgegengesetzt zu AKT)	→Gegenspieler von AKT bei mTOR (negative Kontrolle) Peutz–Jeghers-Syndrom
NF1	Ras-GTPase aktivierendes Protein, darüber negative Kontrolle von mTOR	→Gegenspieler von AKT bei mTOR Neurofibromatose Typ I
VHL	Kontrolliert NFκB Aktivität	→Verlust führt über EGF-Rezeptor zu höherer AKT Aktivität Von-Hippel–Lindau Syndrom
p21 und p27	Zellzyklus-Inhibitoren	→ Phosphorylierung zytoplasmatisches Verharren der Zell- zyklus-Inhibitoren
Bad	Wirkung auf Apoptose (direkt/indirekt)	→Phosphorylierung Stoppt proapoptotische Wirkung von Bad
YAP	Coaktivator von p73 Hierüber Beeinflussung der Expression vieler proapoptotischer Proteine i	→Abspaltung von YAP von p73
FKHR/ ("Forkhead")	Transkriptionsfaktor mit Wirkung auf Apoptose	→ Phosphorylierung Abwanderung aus Zellkern in Zytosol, gleichbedeutend mit Wirkungsverlust
Onkoproteine:		
MDM2	Inaktivierung von p53 im Zellkern	→Phosphorylierung Ausfall als Promotor für Aktivierung von proapoptotischen Genen
GSK3ß	Regulierung der Glykogensynthetase (Glykogenspiegel \(\psi \))	→ Phosphorylierung Inaktivierung von GSK3B. Folge: Förderung der Speicherung von Glucose als Glycogen
NFκB	Kontrolle der Transkription anti- apoptotischer Gene (Bcl-2)	→ über Phosphorylierung von Verlängertes Zellüberleben
Caspase-9	Kontrolle der der Apoptose	→ Phosphorylierung Blockung der intrinsischen Proteaseakti- vität des Enzyms= Funktionsverlust

Tab.Nr.1: Auswahl von Genen, die mit AKT in Verbindung stehen: Funktion und Auswirkung (ausführliche Genbezeichnungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

1.3 Ziel der Arbeit

Amplifikationen der Genorte für AKT1 (14q32.3), AKT2 (19q13.1-q13.2), und AKT3 (1q43-q44) sind in diversen Tumortypen beschrieben worden.

Bei Lungentumoren existieren bisher nur sehr wenige Daten zu AKT Mutationen. Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass Cisplatin-Resistenz in einem Subset von Lungentumoren einhergeht mit Überexpression und Amplifikation von AKT1 (Liu et al. 2007).

Vor allem in Lungentumoren wären AKT-Amplifikationen von potentieller klinischer Bedeutung, da sie möglicherweise zu einer Resistenz gegen anti-EGFR Medikamente beitragen könnten. Systematisch erhobene Daten zur AKT-Amplifikationen in Lungentumoren liegen in der Literatur bislang nicht vor.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die Prävalenz und klinische Relevanz von AKT-Amplifikationen an einem großen Kollektiv von Lungenkarzinomen mit klinischen Follow-up Daten umfassend zu validieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Für ein erstes Screening der Häufigkeit von AKT1-3 Amplifikationen im Lungenkarzinom wurde ein kleines Set von 130 Lungenkarzinomen ohne Verlaufsdaten (Teil des Hamburger Multitumor-TMA's) analysiert.

Für die ausführlichere Analyse wurde ein existierender Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA) verwendet, der aus 763 Gewebeproben hergestellt worden war. Dabei handelt es sich um 647 Gewebeproben von primären Lungen-Karzinomen, sowie 116 Kontrollgewebe (verschiedenen Normal- und Tumorgewebe zur Kontrollen der Immunhistochemie). Die 647 Tumorgewebe stammen von jeweils einem Patienten. Das Tumorstadium war pT1 in 104, pT2 in 218, pT3 in 32, und pT4 in 33Tumoren. Der Nodalstatus war pN0 bei 176 Karzinomen, pN1 bei 104 Karzinomen, pN2 bei 70 Karzinomen und pN3 bei 16 Karzinomen. Der pM Status betrug pM0 bei 377 Karzinomen, sowie pM1 bei 21 Karzinomen.

Der histologische Subtyp war Plattenepithelkarzinom bei 250, Adenokarzinom bei 219, großzelliges Bronchialkarzinom bei 121 und kleinzelliges Bronchialkarzinom bei 23 Patienten. Das mittlere Patientenalter betrug 65,6 Jahre (min. 10,7Jahre- max. 92,3 Jahre). Klinische Verlaufsdaten waren von 269 der 647 Patienten verfügbar. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 18,2 Monate (3 Tage min. – 155 Monate max.) (siehe Tab. Nr.2 S. 21).

Alle Fälle		n=647
Histologie	Adeno-Karzinom	219
	Plattenepithelkarzinom	250
	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	23
	Großzelliges Bronchialkarzinom	121
Stadium des Primärtumors	pT1	104
	pT2	218
	pT3	32
	pT4	33
Lymphknoten-	pN0	176
metastasierung	pN1	104
	pN2	70
	pN3	16
Metastasen	pM0	377
	pM1	21
Überlebensdaten		269

Tabelle Nr.2: TMA Zusammenstellung. Die Anzahl der Beispiele lassen sich nicht immer auf 647 aufsummieren, da in einigen Fällen nötige Informationen fehlen

.

2.2 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden 4μm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des "Paraffin Pretreatment Reagent Kit" (*Vysis*, Downers Grove, IL). Zur Hybridisierung wurden selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonden für die Gene AKT1-3 eingesetzt (siehe 2.2.1). Als Referenz wurden kommerzielle Sonden für die Telomere der Chromosome 14 und 19 (für AKT1 und AKT2)sowie für das Zentromer des Chromosoms 1 (für AKT3) (alle Spectrum orange, *Vysis*) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem "Nick Translation System" (*Invitrogen*) durchgeführt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem "Fluorescent Antibody Enhancer Set" (*Roche*) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt. Diese umfassen:

- 1) pBAC-E.coli-Klon (Escherichia Coli)-Kultivierung
- 2) DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur
- 3) DNA-Markierung mittels Nick-Translation
- 4) Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- 5) Hybridisierung
- 6) Waschen
- 7) Detektion

2.2.1 Auswahl und Anzucht von BAC Klonen

Verwendete Materialien

- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: B737B091023D (AKT1) (stab-stock-Kultur)
- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: B737E101007D (AKT2) (stab-stock-Kultur)
- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: B737D112079D (AKT3) (stab-stock-Kultur)
- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (25g7l dH₂O); autoklaviert
- Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.)

(RZPD= Ressourcen Zentrum Primärdatenbank)

Laborprotokoll: pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

- 1) 10ml Medium in einen 100ml Erlenmeyerkolben füllen
- 2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol
- 3) Mit abgeflammter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und einen Abstrich aus der stab-stock-Kultur machen
- 4) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- 5) Inkubation der angeimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage
- 6) Überimpfen von 10μl der trüb gewordenen Kultur in einen mit 10ml Medium und 30μl versetzten 100ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette
- 7) Inkubation der angeimpften Kultur bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator über Nacht

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mit Hilfe des "*QIAprep Spin Miniprep Kit*" von Qiagen nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die "QIAprep spin Säulen" waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- 1) 3ml (2ml + 1ml) der Flüssigkultur im 2ml-Tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 x g) für 90sec bei 13.000rpm pelletieren
- 2) Pellet in 250µl Puffer P1 vollständig resuspensieren
- 3) Zugabe von 250µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges Invertieren (nicht länger als 5min mit dem folgenden Schritt warten)
- 4) Zugabe von 350μl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges Invertieren
- 5) 10 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 6) Überstand in eine "QIAprep spin Säule" überführen
- 7) 1 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 8) Durchfluss verwerfen
- 9) "QIAprep spin Säule" mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 10) Durchfluss verwerfen
- 11) "QIAprep spin Säule" erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 12) Durchfluss verwerfen
- 13) "QIAprep spin Säule" erneut 1min bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge Zentrifugieren
- 14) Durchfluss verwerfen; "QIAprep spin Säule" in ein 1,5ml-Tube setzen
- 15) "QIAprep spin Säule" mit 50µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen
- 16) 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- 17) 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 18) Säule entfernen und Quantifizierung der DNA im Nanodrop und Aufbewahrung im 1,5ml-Tube bei 4°C

2.2.3 Sondenmarkierung

Die Nick-Translation ist eine Methode zum gleichmäßigen Einbau markierter Nukleotide in den DNA-Doppelstrang, wobei die DNA gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt wird. Diese kann durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden. Die Nick-Translation wurde mit dem "Nick Translation System" (*Invitrogen*) durchge-

führt, wobei eine Mindestmenge von 1µg DNA zu einem Ansatz von 50µl gegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNA-Lösung von 38µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1,5 bis 2,5µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiteres Mal Pol 1-/DNAse-Enzym-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Verwendete Materialien

- Nick Translation System (*Invitrogen*)
- Digoxigenin 11-dUTP (*Roche*)
- Polymerase I (*Invitrogen*)

Pipettieransatz im 0,5ml-Tube

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1μl
pBAC-DNA-Lösung	38μ1
Pol I-/ DNAse Enzym Mix	5μ1
DNA Polymerase I	1µl
Ansatzmenge	50μ1

Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation

- 1) Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren
- 2) Inkubation für 90min bei 15°C im Thermocycler
- 3) Zugabe von weiteren 5µl Pol I-/ DNAse Enzym Mix; mit der Pipette durchmischen
- 4) Inkubation für 15min bei 15°C im Thermocycler
- 5) Zugabe von 5µl Stop Buffer
- 6) Durchmischen (auf dem Vortex) und danach Zentrifugieren
- 7) Lagerung bei 4°C

2.2.4 Hybridisierung

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des "Paraffin Pretreatment Reagent Kit" (*Vysis*) behandelt.

Verwendete Materialien

- Destilliertes Wasser (dH₂O)
- Ethanol (70% / 80% / 95%)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

- 1) TMA-Schnitte 3×10min ins Xylol stellen
- 2) TMA-Schnitte 2×5min in Ethanol (95%) stellen
- 3) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
- 4) TMA-Schnitte 15min in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
- 5) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 6) TMA-Schnitte 150min in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
- 7) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 8) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (70%) stellen
- 9) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (80%) stellen
- 10) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (95%) stellen
- 11) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

Die Hybridisierung wurde mit selbst hergestellten genspezifischen Sonden für AKT1 (14q32.33 RZPD Nr.: B737B091023D), AKT2 (19q13.1-q13.2 RZPD Nr.: B737E101007D) und AKT3 (1q44 RZPD Nr.: B737D112079D) durchgeführt, außerdem wurden kommerzielle Sonden als Referenz für das Telomer 14 des Chromosoms 14 (für AKT1; Spectrum orange, *Vysis*), Telomer 19 als Referenz des Chromosoms 19 (für AKT2 Spectrum orange, *Vysis*) und Zentromer 1 als Referenz für das Chromosom 1 (für AKT3 Spectrum orange, *Vysis*) eingesetzt. Die kommerziellen Sonden wurden nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden (kommerzielle Referenzsonde und selbsthergestellte Gensonde) wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer

Bindungsstellen / repetetiver Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (*Vysis*) durchgeführt.

Verwendete Materialien

- 20×SSC
- Cot-DNA
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: HerStellen des Basis-Hybridisierungsmix

- 1) 5ml deionisiertes Formamid, 1,5ml 20×SSC und 1g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
- 2) bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- 3) Suspension mit HCl auf pH7 einstellen
- 4) mit dH₂O auf 7ml auffüllen
- 5) bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (Master-mix 1.0)

Basis-Hybridisierungsmix	14µl	
Cot-DNA	2μ1	
Sonden-DNA	4µl	
Ansatz	20μ1	

Laborprotokoll: Hybridisierung

- 1) Hybridisierungsmix auf den TMA geben
- 2) Eindeckeln mit einem 24×32mm Deckgläschen
- 3) mit Rubbercement versiegeln
- 4) bei 75°C für 10min im Hybrite denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien

- 2×SSC
- dH₂O
- NP40

Laborprotokoll: Waschen

- TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbercement und Deckgläschen entfernen
- 2) Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- 3) Schnitte 2min bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- 4) Schnitte kurz in dH₂O waschen
- 5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

2.2.3 Fluoreszenz-Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbsthergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde "Enhancer Detection Kit" von Roche eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)) und einem 24×32mm Deckgläschen eingedeckelt.

2.3 Auswertung

Um eine schnelle Evaluierung des Arrays zu gewährleisten, wurde die Ratio AKT1-Signale/Telomer 14-Signale, AKT2-Signale/Telomer 19-Signale und AKT3-Signale/Zentromer 1-Signale in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe geschätzt und anschließend ausgezählt. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen AKT1-, AKT2-, AKT3-Signalen wie Telomer 14-,19-, bzw Zentromer-1-Signalen (Ratio AKT1-;2-;3-/ Tel 14/19/Zen1≥ 2,0) definiert. Gewebeproben, die eine AKT1/Tel 14-Ratio, eine AKT2/Tel19-Ratio, oder eine AKT3/Zen1-Ratio von über 1,0, aber unter 2,0 auf-

wiesen (1,0 < Ratio AKT1/Tel 14, Ratio AKT2/Tel 19; Ratio AKT3/Zen1 < 2,0), wurden als "Gains" bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben (Ratio AKT1/Tel14 \leq 1,0; Ratio AKT2/Tel $19 \leq 1,0$; Ratio AKT3/Zen1 $\leq 1,0$) wurden als normal definiert.

2.4 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Grad des Tumors, "Staging" und Genamplifikationen darzustellen, wurden *Kontingenz-Tabellen* und *der Chi-Quadrat-Te*st angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Logrank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der *Cox Regression* wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Abschätzung der Prävalenz von AKT1, AKT2 und AKT3 Amplifikationen im Bronchialkarzinom

In einem ersten Versuch wurde an einem Subset des Hamburger Multitumor-Arrays (Block E mit 71 Adenokarzinomen und 59 Plattenepithelkarzinomen der Lunge) die Prävalenz von Amplifikationen von AKT1, AKT2 und AKT3 abgeschätzt. Hierbei wurden die FISH-Signale nicht explizit gezählt, sondern es wurde lediglich nach auffälligen Clustern von FISH-Signalen gesucht. Zwei sichere Amplifikationen in Form von großen Signalclustern wurden nur für AKT2 gefunden, sodass die weiteren Arbeiten auf AKT2 beschränkt wurden.

3.2 Detaillierte Analyse der AKT2-Amplifikation im Bronchialkarzinom

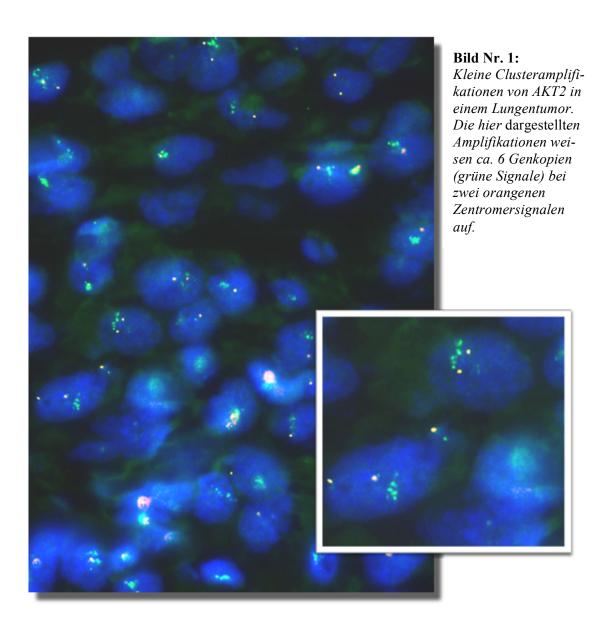
Die FISH Analyse für AKT2 war für 421/647 (65%) Tumoren des Lungen-TMA's erfolgreich. Die restlichen Gewebe konnten nicht analysiert werden, weil entweder keine oder zu schwache Fluoreszenzsignale zu sehen waren, oder weil Gewebespots während des FISH-Experiments vom Objektträger abgeschwommen waren.

Beispiele für Tumoren mit und ohne AKT2-Amplifikation sind in *Bild Nr.1 auf Seite 31* zu sehen.

Eine AKT2-Amplifikation gemäß der vordefinierten Kriterien (siehe 2.3) wurde bei 57/421 (13,5%) der Lungenkarzinome gefunden. Hierbei handelte es ich in der Mehrzahl der Fälle um kleine Signalcluster mit 5-10 FISH-Signalen (in 50/57 Tumoren mit Amplifikation), große Signalcluster mit mehr als 10 FISH-Signalen wurden in 7 der insgesamt 57 amplifizierten Tumoren gefunden (siehe Tabelle Nr.1, S.31).

AKT2-FISH-Signale	Anzahl Tumoren
5-6	26
7-8	14
9-10	10
>10	7

 Tabelle Nr.1: AKT2-Genkopiezahl in 57 Lungentumoren mit Genamplifikation.



3.2.1 Assoziation zum Tumorphänotyp

Die Assoziation der AKT2-Amplifikationen mit dem Tumorphänotyp ist in *Tabelle Nr.2* auf der folgenden Seite dargestellt. Die Daten zeigen trotz geringer Anzahl an auswertbaren Tumoren im pT4 Stadium einen deutlichen Trend hinsichtlich einer höheren Amplifikationsrate in fortgeschrittenen Tumoren. Im pT1 Stadium sind 11/104 (10,6%) der Tumoren amplifiziert, im pT4 Stadium hingegen sind 7/33 (21,2%) der untersuchten Tumoren amplifiziert. Dieser Trend zeigt sich auch bei den als Gain bewerteten Tumoren (3,9% vs. 18,2%), was die These zusätzlich stützt.

Unter Berücksichtigung der Fallzahlen lässt sich ein ähnlicher Trend andeutungsweise auch beim Nodalstatus (N) und beim Metastasierungsgrad (M) erkennen. Bei pN0 Tumoren sind 21/176 (11.9%) amplifiziert, bei pN2 Tumoren sind es 13/70 (18,6%) und bei pN3 Tumoren sind es 2/16 (12,5%). Diese Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz.

Hinsichtlich des Metastasierungsgrades zeigt sich, dass im pM0 Stadium 49/377 (13%) und im pM1 Stadium 3/21 (14,3%) amplifiziert sind. Beim Grading zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Grad der Tumoren und der AKT2-Amplifikationsrate.

Die AKT2-Amplifikationen wurden in allen histologischen Subtypen gefunden. Hier zeigte sich, dass die Amplifikationsrate in Plattenepithelkarzinomen (18,5%) deutlich höher war, als in den anderen histologischen Tumortypen (p=0.0014). Tumoren mit geringgradigem AKT2 Genkopiezahlzugewinn ("Gains") wurden in 5% aller Tumoren gefunden. Auch bei den Gains zeigte sich der signifikante Unterschied hinsichtlich des pT Tumorstadiums, sowie eine klare Tendenz für eine erhöhte Prävalenz in Tumoren mit fortgeschrittener Metastasierung (pM0=4,8% vs. pM1=9,5%).

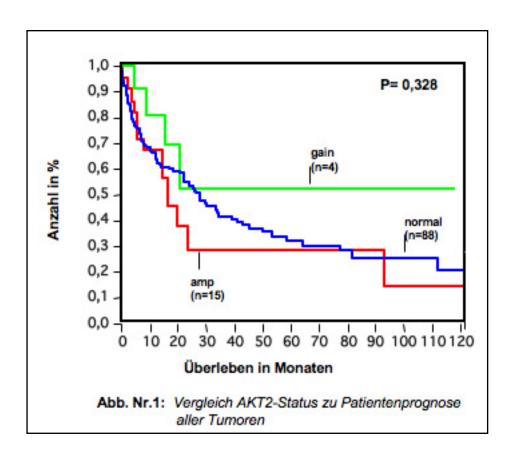
Anzahl	n	Auswertbar	Normal (%)	Gain (%)	Amp (%)	р
Alle Tumoren	647	421	81,5	5	13,5	
Adenokarzinom	219	130	91,5	0,8	7,7	
Plattenepithelkarzinom	250	168	74,4	7,1	18,5	
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	23	17	88,2	0,0	11,8	
Grosszelliges Bronchialkarzinom	121	83	80,8	8,4	10,8	
pT1	179	104	85,5	3,9	10,6	
pT2	318	218	82,1	4,1	13,8	p=0,0348
pT3	50	32	90,6	3,1	6,3	
pT4	52	33	60,6	18,2	21,2	
pN0	265	176	84,7	3,4	11,9	
pN1	162	104	78,8	7,7	13,5	p=0,5394
pN2	108	70	74,3	7,1	18,6	
pN3	21	16	81,2	6,3	12,5	
pM0	577	377	82,2	4,8	13,0	p=0,660
pM1	36	21	76,2	9,5	14,3	
G1	16	7	85,7	14,3	0,0	
G2	335	218	77,5	5,5	17,0	p=0,207
G3	167	114	86,8	4,4	8,8	
G4	36	23	82,6	8,7	8,7	

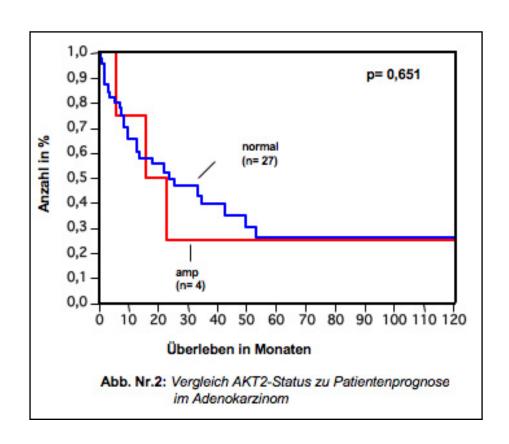
 Tabelle Nr.2: Assoziation der AKT2-Amplifikation mit dem Tumorphänotyp

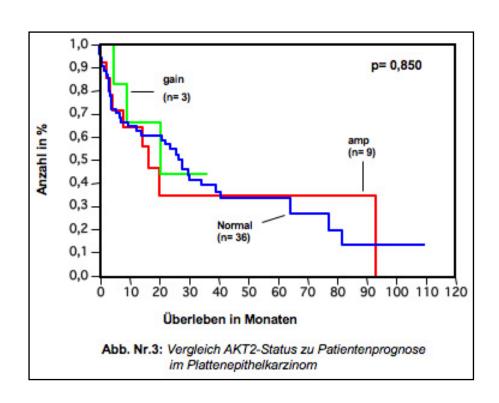
(Gain: Ratio von Gensignalen zu Zentromersignalen ist größer als 1 (normal) und kleiner als 2 (amplifiziert)); der p-Wert gibt hier die Wahrscheinlichkeit für den Irrtum an, dass ein Zusammenhang des Primärtumorstadiums (pT) oder des Nodalstadiums (pN), sowie des Gradings (G) oder der Metastasierung (M) mit der Amplifikationsrate existiert.

3.2.2 Assoziation zur Patientenprognose

Für 107 der untersuchten Tumore konnte die Überlebenszeit nach Operation in Verbindung mit der AKT2 Genkopiezahl untersucht werden. Um den Einfluss der AKT2-Amplifikation hinsichtlich des Verlaufes der Erkrankung zu untersuchen, wurde eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier durchgeführt (*Abb. Nr.1-3*). Es zeigte sich, dass weder hochgradige noch geringgradige (Gains) Erhöhung der AKT Genkopiezahl einen signifikanten Einfluss auf die Prognose ausübten. Dies gilt auch für die besonders von Amplifikationen betroffenen Plattenepithelkarzinome (*Abb. Nr.3, S.35*).







3.2.3 Assoziation von AKT2-Amplifikation zur p53-Expression

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der AKT2-Amplifikation und der genetischen Instabilität zu untersuchen, wurde der AKT2 Status mit vorhandenen Daten zur p53-Expression verglichen (*Abb. Nr. 4*). Daten von AKT2 und p53 waren von insgesamt 401 Tumoren verfügbar.

Es zeigte sich, das eine starke p53-Expression signifikant (p=0,0162) häufiger in Tumoren mit einer erhöhten Genkopiezahl von AKT2 gefunden wurde, verglichen mit Tumorgewebe ohne AKT2-Amplifikation.

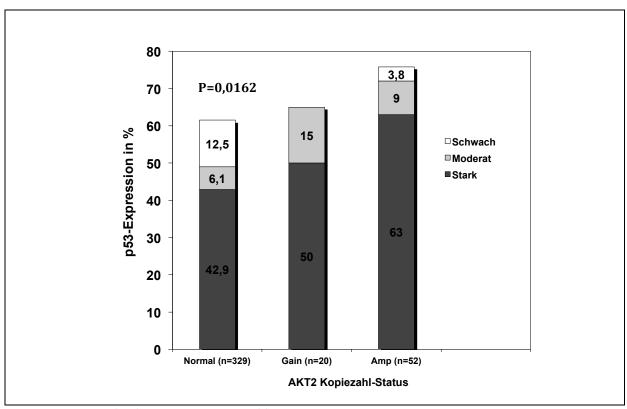


Abb. Nr.4: Vergleich von AKT2 Kopiezahl-Status zu p53-Expression

3.2.4 Assoziation der AKT2-Amplifikation zur Ki67-Expression

Immunhistochemische Daten zur Expression des Proliferationsmarkers KI67 waren von 392 Tumoren (323 Normal; 18 Gain; 52 Amplifiziert) mit AKT-Status vorhanden. Das KI67-Antigen ist ein Proliferationsmarker der Zellen im Gewebe anfärbt, die sich vermehren, die sog. Wachstumsfraktion. KI67 IHC Daten waren für den Lungen-TMA aus einer früheren Studie vorhanden. Während des Zellzyklus wird dieses Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase exprimiert. Ruhende Zellen der G0-Phase exprimieren das KI67-

Antigen nicht. KI67 gibt also unmittelbar Aufschluss über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors. Ein Vergleich des KI67-Färbeindex (KI67IHC) in Plattenepithel- und Adenokarzinomen zeigte eine signifikant höhere Proliferationsrate in Plattenepithelkarzinomen (p=<0,001, Abb.5A). Ebenso zeigten Tumoren mit AKT-Kopiezahlveränderungen (Gains und Amplifikationen) eine signifikant erhöhte Proliferation (p=0,0190, Abb.5B). Um zu analysieren, ob die höhere Proliferation von AKT2 amplifizierten Tumoren auf das häufigere Vorkommen der Amplifikationen in den proliferationsaktiveren Plattenepithelkarzinomen zurückzuführen ist, wurde der Vergleich zwischen dem AKT-Status und dem KI67-Status in den Subsets der Plattenepithel- und Adenokarzinome wiederholt $(Abb.5 \ C \ und \ D)$. Es zeigte sich, dass der proliferationsfördernde Effekt der AKT2-Amplifikationen auch innerhalb der Subpopulation der Plattenepithelkarzinome $(p=0,0232, Abb.5 \ C)$ nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Effekt in den Adenokarzinomen (Abb.5D).

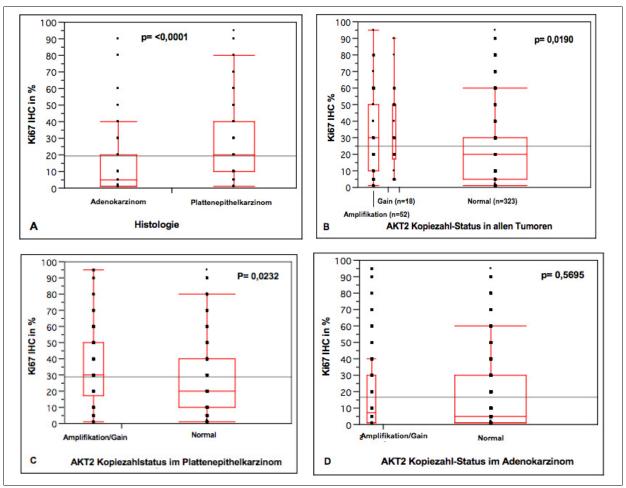


Abb.Nr 5 A-D: Assoziation des AKT2 Kopiezahl-Status zur Ki67-Expression

3.3 Vergleich von AKT2-Amplifikationen und PI3K Amplifikationen

In einer parallel durchgeführten Dissertation (Dissertation H.Schacht) wurden am selben TMA Amplifikationen von PI3K untersucht.

Ein Vergleich der Häufigkeit von AKT2- und PI3K- Amplifikationen und Gains in einem Subset von 482 Tumoren, für das Ergebnisse für beide Gene vorlagen, ist in Abb. Nr. 6 dargestellt. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen AKT2- Genkopiezahl und der PI3K-Genkopiezahl (p=0.0480). 26,98% der AKT2 amplifizierten Tumore waren AKT2/PI3K coamplifiziert.

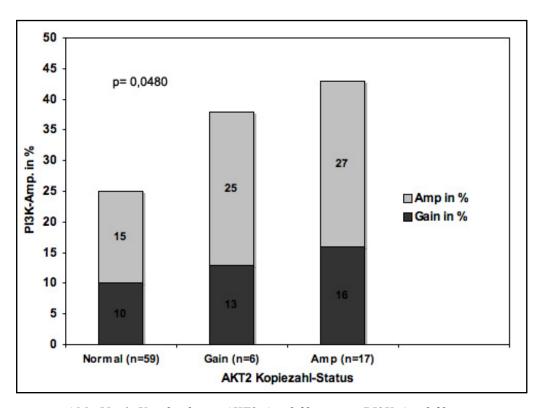
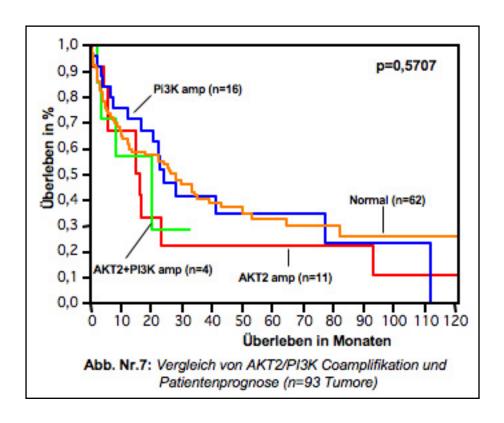


Abb. Nr.6: Vergleich von AKT2-Amplifikation zu PI3K-Amplifikation

3.3.1 Assoziation von AKT2-PI3K-Amplifikationen und Patientenprognose

Um einen möglichen Einfluss der Coamplifikation von AKT2 und PI3K auf das Patientenüberleben nachzuweisen, wurde der verfügbare Datensatz (n=93) in 4 Untergruppen aufgeteilt (normal n=62, PI3K amp n=16, AKT2 amp n=11, PI3K/AKT2 amp n=4). Es konnte bei dieser geringen Patientenzahl kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens der unterschiedlichen Amplifikationsgruppen nachgewiesen werden (p=0,5707, Abb. Nr.7). Es erscheint jedoch durchaus vorstellbar, dass es einen signifikanten Unterschied im Überleben zwischen der Patientengruppe der weder AKT2 noch PI3K amplifizierten Tumorgewebe und der AKT3/PI3K-coamplifizierten Patientengruppe gibt. Um dies zu überprüfen sind jedoch höhere Fallzahlen nötig.



4 DISKUSSION

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, die Prävalenz und klinische Relevanz von AKT-Amplifikationen beim Lungenkarzinom zu untersuchen. Dazu wurden zunächst 130 Lungenkarzinome auf Amplifikationen von AKT1, AKT2 und AKT3 analysiert. Hierbei handelte es sich um ein relativ grobes Screening, um rasch zu evaluieren, ob eines der drei AKT-Gene mit besonderer Prävalenz oder besonders hoher Kopiezahl in Lungentumoren amplifiziert ist. Weil sich deutliche Signalcluster nur für AKT2 fanden, wurde die weitere Analyse auf dieses Gen fokussiert. Allerdings kann dieses Vorgehen nicht ausschließen, dass Amplifikationen von AKT1 oder AKT3 zumindest in einigen wenigen Lungenkarzinomen existieren. 130 Tumoren sind für den Nachweis von Amplifikationen, die oft nur in weniger als 5% der Fälle vorkommen, eine relative geringe Fallzahl, sodass ein gewisses Risiko besteht, seltene Amplifikationen bei der Analyse kleiner Fallzahlen zu verpassen. Zudem ist es möglich, dass das relativ grobe Abschätzen des Amplifikationsstatus (ohne die FISH-Signale explizit zu zählen), dazu geführt haben könnte, dass vielleicht einige geringgradige Amplifikationen übersehen worden sind. Der Vorteil dieses Vorgehens liegt jedoch darin, dass in dieser Studie die auffälligen und biologisch vermutlich deutlich relevanteren großen Signalcluster des AKT2-Gens sehr rasch identifiziert werden konnten.

Bislang ist nur wenig über AKT-Amplifikationen in humanen Tumoren bekannt. Lediglich 4 Studien haben gezielt nach solchen Veränderungen in kleinen Tumorkollektiven gesucht und bislang Amplifikationen von AKT1 in jeweils einem einzigen Magenkarzinom (Knobbe, Reifenberger brain pathol 2003), sowie im Glioblastom gefunden (Staal PNAS 1987). AKT2-Amplifikationen fanden sich mit Southern Blotting in Ovarial- (16/132, 12%), Pankreas- (1/10, 10%) und Mammakarzinomen (3/106, 2.8%) (Bellacosa, de Cosa, Godwin Int J Cancer 1995, Cheng Ruggeri, PNAS 1996). Diese Daten zeigen, dass AKT2-Amplifikation möglicherweise vor allem bei Ovarialkarzinomen mit höherer Prävalenz auftreten. Literaturdaten über AKT2-Amplifikationen beim Lungenkarzinom liegen bislang nicht vor.

In einem zweiten Schritt wurde daher speziell AKT2 an einem großen Kollektiv von Lungenkarzinomen mit bekannten histo-pathologischen Parametern und (zum Teil) klinischen Verlaufsdaten untersucht. Es zeigte sich eine Amplifikationsrate von 13%. Hierbei handelte es sich jedoch in der Regel um eher geringgradige Amplifikationen mit meist fünf bis sechs Genkopien. Eine hochgradige Amplifikation mit Clustern von mehr als zehn Gensignalen fand sich in sieben Tumoren, d.h. in etwa 1 bis 2% aller Lungenkarzinome. Dieser Wert passt gut zu den 2 Tumoren mit deutlichen AKT2-Clustern, die an den 130 Tumoren gefunden

wurden und bestätigt so die Praktikabilität des gewählten Untersuchungsansatzes. Eine erhöhte Genkopiezahl, die nicht die Definition einer Amplifikation erfüllte, d. h. ein sog. Gain, wurde in weiteren 5% der Tumoren gefunden. 13% Amplifikation sind ein vergleichsweise hoher Wert, da Amplifikationen von anderen Onkogenen oft nur in weniger als 5% der Tumoren gefunden werden. So kommen z. B. Amplifikationen des MYC-Genes in ca. 4 bis 5% der Mammakarzinome vor (Al-Kuraya et al., 2004), Amplifikationen des EGFR-Genes in 1% von Kolonkarzinomen (Al-Kuraya et al., 2007), RAF und FGFR1-Amplifikationen in ca. 3 bis 4% von Harnblasenkarzinomen oder 5% MDM2-Amplifikationen ebenfalls in Harnblasentumoren (Simon et al., 2001, Simon et al., 2002). Zu den häufigsten bekannten Amplifikationen zählen das HER2-Gen mit ca. 15% beim Mammakarzinom oder das Cyclin-D1-Gen mit ebenfalls 15 bis 20% Amplifikationsrate (Al-Kuraya et al., 2004). Angesichts dieser Zahlen wären 13% bei Lungenkarzinom ein nahezu spektakulär hoher Amplifikationswert. Allerdings muss man bedenken, dass eine selbsthergestellte FISH-Gensonde benutzt worden ist. Diese Sonden sind nicht immer von optimaler Qualität bzw. von derartiger Qualität, dass sie sich mit der von kommerziellen Herstellern vergleichen lassen würden. Unsere Sonde bestand nur aus einem etwa 175 kb großen Klon, der relativ kleine Signale produziert. Durch das verwendete indirekte Detektionssystem kann es in einzelnen Fällen durch Antikörperaggregate zu kleinen Fluoreszenzsignalen kommen, die "echten" FISH-Signalen täuschend ähnlich sehen. Es ist also insbesondere bei den Amplifikationen mit geringer Kopiezahl denkbar, dass in einzelnen Fällen ein falsch positiver Befund erhoben worden sein könnte.

Um die Qualität der Untersuchung und um die Richtigkeit der gefundenen hohen Amplifikationsrate zu validieren, verglichen wir die Tumoren des untersuchten Arrays mit den ihnen zugehörigen klinisch-pathologischen Daten. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von AKT2-Amplifikationen und der p53-Expression und der Zellproliferationsrate (gemessen am Proliferationsmarker Ki67). Ein weiteres signifikantes Ergebnis der Studie ist, dass die AKT2-Amplifikationen im Vergleich zwischen Plattenepithelkarzinom und Adenokarzinom der Lunge signifikant häufiger im Plattenepithelkarzinom vorkamen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass ein solcher Zusammenhang zufällig ist und spricht daher für die Validität der erhobenen Daten.

Genetische Unterschiede zwischen Adeno- und Plattenepithelkarzinom sind unter anderem auch von Ösophaguskarzinomen bekannt. So wurde in einer Studie von Reichelt et al, in der die HER2-Amplifikation im Ösophaguskarzinom untersucht wurde, berichtet, dass HER2-Amplifikationen in 15% der Adenokarzinome aber nur in 5% der Plattenepithelkarzinome auftreten (Reichelt et al., 2007). Amplifikationen des hTERT-Genes waren in einer Studie

von Zhu et al häufiger in Adenokarzinomen als in Plattenepithelkarzinomen der Lunge (Zhu et al., 2006). Ein umgedrehtes Verhältnis wurde in einer anderen Studie an unserem Institut (Bachelorarbeit von Marcel Waschow) für Amplifikationen des K-RAS-Genes gefunden. Hier zeigten 2,7% der Plattenepithelkarzinome, aber nur 0,9% der Adenokarzinome der Lunge eine K-RAS-Amplifikation. Auch konnten Okudela et al. zeigen, dass PIK3-Amplifikationen in Plattenepithelkarzinomen der Lunge häufiger vorkommen als in Adenokarzinomen (Okudela et al., 2007).

Weiterhin für die Validität der Daten spricht die Assoziation zur Zellproliferation. Dieser Zusammenhang ist für amplifizierte Tumoren nicht unerwartet. So konnte in einer Arbeit von Ruiz et al. gezeigt werden, dass praktisch alle analysierten Gen-Amplifikationen beim Mammakarzinom hochgradig mit dem Ki-67-Labeling-Index assoziiert sind (Ruiz et al., 2006). Diese Beobachtung wird auch durch eine Studie von Park et al. bestätigt, die eine enge Assoziation der HER2- und MYC-Amplifikation mit der Zellproliferation ebenfalls beim Brustkrebs beobachteten (Park et al., 2005). Auch die starke Assoziation der AKT2-Amplifikation zur p53-Überexpression ist erwartet. Immunhistochemische p53-Expression deutet oft auf eine Mutation und damit Inaktivierung des p53-Genes hin (Karim und Ali, 2009) (De Paula et al., 2009). Die hieraus resultierende genetische Instabilität ist häufig die Voraussetzung für das Entstehen von Gen-Amplifikationen. Der enge Zusammenhang zwischen der AKT2-Amplifikation und erhöhter Zellproliferation könnte aber auch auf eine funktionelle Rolle der AKT2-Amplifikation hinweisen. Das AKT-Protein nimmt eine zentrale Position in einem der wichtigsten proliferationsassoziierten Signalwege der Zelle ein. Es steht an prominenter Stelle innerhalb des Tyosinkinase-Rezeptor vermittelten Signalweges, über den die so wichtigen Tyrosinkinasen wie EGFR und HER2 ihre Signale vermitteln. Es ist somit zu erwarten, dass eine Amplifikation von AKT2 zu verstärkter Proliferation führen muss, sofern die Amplifikation mit einer onkogenen Aktivierung des Proteins einhergeht. Zwar wird AKT gewöhnlicherweise durch Phosphorelierung aktiviert, aber es ist denkbar, dass allein durch die hohe Konzentration von AKT-Protein in der Zelle aufgrund der Amplifikation ein Fließgleichgewicht eingestellt wird, in dem permanent eine erhöhte Konzentration an phosphoreliertem und somit aktiviertem AKT vorliegt. Cheng et al berichteten, dass eine AKT2-Amplifikation und Überexpression des Proteins in etwa 10% von Pankreaskarzinomen auftritt (Cheng et al., 1996). In einer nachfolgenden Studie konnten die Autoren zeigen, dass die erhöhte AKT2-Expression auch mit einer erhöhten Aktivierung des AKT einhergeht (Altomare et al., 2002). Es scheint also wahrscheinlich, dass eine ähnliche Situation auch beim Lungenkarzinom vorliegen kann und eine onkogene Aktivierung durch die AKT2Amplifikation auftritt. Eine alternative Erklärung für diesen Effekt wäre allerdings, dass Plattenepithelkarzinome generell ein höheres Proliferationsniveau als Adenokarzinome zeigen und dass die erhöhte Proliferation bei AKT2-amplifizierten Tumoren lediglich ein Nebeneffekt dieses Zusammenhanges ist. Um den möglichen Einfluss des histologischen Subtyps auszuschließen, wurde daher die Analyse der Proliferationsrate in AKT-amplifizierten und – nicht-amplifizierten Tumoren innerhalb der Plattenepithelkarzinome und der Adenokarzinome wiederholt. Es zeigte sich jedoch, dass der proliferationsfördernde Effekt der AKT2-Amplifikation unabhängig vom histologischen Subtyp war.

Somit kann tatsächlich eine wichtige biologisch Rolle der AKT2-Amplifikation für die Zell-proliferation vermutet werden.

In unserer Analyse konnte kein Zusammenhang zwischen AKT2-Amplifikationen und dem Tumorstadium bzw. dem Tumorgrad gefunden werden. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Bedeutung der Amplifikation für die Tumorprogression und passt gut zu einer Studie von Lee et al, die zeigten, dass phosphoryliertes AKT in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen in ca. 65% der Tumoren – unabhängig vom histologischen Subtyp – vorkommt und eventuell mit der Entstehung, jedoch nicht mit dem Fortschreiten des Tumors assoziiert ist (S. H. Lee et al., 2002).

Die proliferationsfördernde Wirkung der AKT2-Amplifikation macht AKT2 zu einem potentiell interessanten Therapiezielgen. Auch deshalb, weil die herausragende Rolle des PI3K-AKT-Signalweges für die Entstehung vieler Tumoren unstrittig ist, denn er gilt als Knotenpunkt vieler zellulärer Wachstumsstimuli, die er integriert und weiterleitet. Innerhalb dieser Signaltransduktionskette steht AKT an prominenter Position, was die Attraktivität dieses Gens für etwaige Krebstherapien, oder als Marker einer Krebstherapie, unterstreicht (LoPiccolo et al., 2008). Tatsächlich sind bereits einige Therapeutika entwickelt worden, die direkt das AKT attackieren. Zu diesen gehören z. B. *Perifosine* und *PX-866*. Perifosine, ein oraler AKT-Blocker, wird zurzeit in klinischen Phase II Studien getestet (Gills und Dennis, 2009). Für PX-866 konnte gezeigt werden, dass es die Wirkung von EGFR-Inhibitoren wie *Gefitinib* bei der Behandlung von nicht-kleinzelligen Lungentumoren verstärkt und darüber hinaus auch einen Einfluss auf die Tumorzellmotilität hat (Ihle et al., 2005) (Howes et al., 2007).

AKT könnte sich vor allem auch deshalb als gutes Therapieziel erweisen, weil es relativ weit unten (*downstream*) im so wichtigen PI3K/AKT-Signalweg liegt. Bei den heute zugelassenen genspezifischen Therapien, z. B. den Anti-EGFR-Therapien, handelt es sich um Medikamen-

te, die ein Molekül am Anfang der Signaltransduktionskaskade angreifen. Häufig ist es der Tyrosinkinase-Rezeptor selbst, der als Angriffspunkt dient.

Dem entsprechend können Resistenzen gegen solche Medikamente auftreten, wenn die onkogene Wirkung von einem weiteren Molekül unterhalb des Zielgenes der Signaltransduktionskette auftritt. Eine solche Situation ist vom EGF-Rezeptor bekannt. Mit Iressa und Tarceva existieren zwei potente Medikamente, um den Oberflächenrezeptor zu inhibieren. Tatsächlich gibt es vor allem bei Lungenkarzinomen sehr gute Ansprechraten auf diese Medikamente, insbesondere wenn der EGF-Rezeptor durch eine Mutation permanent aktiviert ist. Allerdings hat sich bald gezeigt, dass Mutationen des K-RAS-Genes, welches im Signalweg unterhalb des EGFR liegt, zu einer Resistenz gegen die Iressa- oder Tarceva-Therapie führt (Massarelli et al., 2007). Es ist daher durchaus denkbar, dass ein Teil der Resistenzen bei EGFRmutierten Tumoren gegen die Anti-EGFR-Therapeutika auch durch Amplifikationen des AKT-Genes verursacht werden können. In einer weiteren Studie an unserem Institut wurde ein Molekül, das direkt oberhalb des AKT2 in der Signaltransduktionskaskade liegt, nämlich die PI3-Kinase, analysiert (Dissertation Hannes Schacht). In dieser Studie zeigten sich 17% Amplifikationen, auch hier bevorzugt in Plattenepitheltumoren. Eine Co-Analyse der AKTund PI3-Kinase-Daten zeigte, dass AKT2-Amplifikationen signifikant häufiger in PI3-Kinase-amplifizierten Tumoren auftraten, als in Karzinomen ohne PI3-Kinase-Amplifikation. Das gehäufte Auftreten von Amplifikationen ist schon vorher beschrieben worden. So berichteten Theillet et al und Al-Kuraya et al davon, dass bestimmte Co-Amplifikationen in Mammakarzinomen viel häufiger vorkommen als theoretisch zu erwarten wäre (Al-Kuraya et al., 2004). Es scheint sich hier um Tumoren zu handeln, bei denen durch genetische Instabilität und andere, möglicherweise amplifikationsfördernde Faktoren ein sog. Amplifier-Phänotyp herausgebildet wird.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass AKT2-Amplifikationen in einem relevanten Subset von Lungentumoren vorkommen, insbesondere in Plattenepithelkarzinomen. Die Zentrale Rolle von AKT2 für das Zellwachstum, und die Assoziation der AKT2-Amplifikation mit der Proliferationsrate lassen auf eine relevante biologische Bedeutung der AKT2-Amplifikation schließen. Im Hinblick auf die bekannten AKT2-Inhibitoren, die sich zur Zeit in der klinischen Testphase befinden, könnte es interessant sein, die Wirkung solcher Medikamente in AKT2 amplifizierten Tumoren eingehender zu testen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Serin/Threonin-Kinase AKT nimmt eine zentrale Rolle in einem der wichtigsten zellulären Signalwege für die Vermittlung von Wachstumsreizen ein. Aus diesem Grunde sind viele humane Tumoren durch eine Überaktivierung von AKT charakterisiert. Genamplifikationen, d.h. die unnatürliche Vermehrung der Kopiezahl von Genen, können eine onkogene Aktivierung durch eine starke Überexpression der betroffenen Gene verursachen. In Lungenkarzinomen werden häufig Amplifikationen gefunden, auch an den drei Genorten der AKT Isoformen AKT1 (14q32.3), AKT2 (19q13.1-q13.2) und AKT3 (1q43-q44).

Ziel dieser Dissertation war es, die Prävalenz und klinische Relevanz von AKT-Amplifikationen in Lungenkarzinomen zu klären. Dazu wurden mithilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) in einem ersten Schritt 130 Gewebeproben von Lungenkarzinomen auf ihre AKT1-3 Genkopiezahl hin überprüft. Deutliche Amplifikationen zeigten sich nur für AKT2. Im zweiten Schritt wurde ein Gewebemikroarray mit über 750 Lungenkarzinomen mit pathologischen Daten und klinischem Follow-up gezielt auf AKT2-Amplifikationen untersucht.

Eine AKT2 Amplifikation zeigte sich in 13,5 % der Tumoren und war insbesondere mit dem plattenepithelialen Phänoptyp assoziiert (PCA: 18,5%, ADC: 7,7%, p=0.0014). Zudem zeigten Tumoren mit AKT2-Amplifikation eine signifikant höhere Proliferationsrate (p<0.0001), immunhistochemische p53 Expression (p=0.0162) und Amplifikationen von PIK3CA (p=0.048). Ein Zusammenhang mit dem Tumorstadium, Malignitätsgrad, oder der Metastasierung wurde nicht gefunden.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten auf eine wichtige Rolle von AKT2 für die Biologie des Lungenkarzinoms hin. AKT2 Amplifikationen treten demnach häufiger in genetisch instabilen (p53 mutierten) Tumoren auf und können auch von den Veränderungen weiterer Faktoren im gleichen Signalweg (PIK3CA) begleitet sein. Die starke Assoziation von AKT2 Amplifikationen mit einer hohen Zellproliferation deutet auf einen kausalen Zusammenhang aufgrund von onkogen aktiviertem AKT2.

Im Hinblick auf die bereits verfügbaren selektiven AKT-Blocker könnten die erhobenen Daten nun dazu beitragen, klinische Studien zur weiteren Erforschung der potentiellen therapeutischen Relevanz von anti-AKT Medikamenten zu rechtfertigen.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb. = Abbildung

ATP = Adenosintriphosphat

Bad = engl.: Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death Promoter

CDC7 = engl.: Cell division cycle 7 homolog

DAPI = 4′,6-Diamidino-2-Phenylindol

dH₂O = destilliertes Wasser

dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphate

dTTP = Desoxythymidintriphosphat

dUTP = Desoxyuridintriphosphat

E.coli = Escherichia coli

EDI = engl.: Extensive Disease

EGFR = engl.: Epidermal Growth Factor Receptor (Synonym= HER1)

evtl. = eventuell

4E-BP1 = engl.: 4E Binding Protein

FISH = Fluoreszenz in situ Hybridisierung

FKHR = engl.: Forkhead Related Transcription Factor

ggf. = gegebenenfalls

GSK3 β = Glutathion S-Transferase 3 β

HCl = Salzsäure

HGF = engl.: Hepatocyte Growth Factor

hTERT = engl.: human Telomerase Reverse Transcriptase

ICH = Immunhistochemie

KI67 = Kiel67

LD = engl.: limited Disease

LKB1 = auch genannt: engl. "Serine/threonine kinase 11" STK11

MAPK = engl.: Mitogen Activated Protein Kinase

MDM2 = engl.: murine double minute2
MRT = Magnetresonanztomographie

mTOR = engl.: mammalian Target Of Rapamycin

NF1 = Neurofibromatose Typ1 Gen

NFκB = engl.: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NSCLC = eng.: Non Small Cell Lung Cancer

PDK1 = engl.: 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase

PIP2/3 = Phosphatidol-Inositol 2/3-Phosphat

PI3K = Phosphoinositid-3-Kinasen

PKB = Proteinkinase B

Pol 1 = Polymerase 1

PTEN = engl.: Phosphatase and Tension homology deleted on chromosome ten

RKI = Robert Koch Institut rpm = rounds per minute

RTKI/TKI = Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor

RZPD = Ressourzenzentrum Primärdatenbank

Ser = Serin

S6K = ribosomale Protein S6 Kinase

sog. = so genanntem

Tab. = Tabelle
Tel = Telomer
THR = Threonin

TMA = engl.: Tissue Micro Array

TNM = Tumor-Nodus-Metastase

TSC1/2 = engl.: Tuberous Sclerosis Complex

u.a. = unter anderem

UICC = Union International Contre Le Cancer

v.a. = vor allem

VEGF = engl.: Vascular Endothelian Growth Factor

VHL = Von Hippel-Lindau Gen

WHO = World Health Organisation

YAP = engl.: Yes Associated Protein

z.B. = zum Beispiel

Zen. = Zentromer

7 LITERATURVERZEICHNIS

Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross, F., Wilber, K., Simon, R. und Sauter, G. (2004) Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer Cancer Res (64): 8534-40

Al-Kuraya, K., Novotny, H., Bavi, P., Siraj, A. K., Uddin, S., Ezzat, A., Sanea, N. A., Al-Dayel, F., Al-Mana, H., Sheikh, S. S., Mirlacher, M., Tapia, C., Simon, R., Sauter, G., Terracciano, L. und Tornillo, L. (2007) HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer J Clin Pathol (60): 768-72

Altomare, D. A. und Testa, J. R. (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer Oncogene (24): 7455-64

Altomare, D. A., Tanno, S., De Rienzo, A., Klein-Szanto, A. J., Skele, K. L., Hoffman, J. P. und Testa, J. R. (2002) Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas J Cell Biochem (87): 470-6

American Cancer Society (2008) Detailed Guide on Lung Cancer www.cancer.org

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti Panici, P., Mancuso, S., Neri, G. und Testa, J. R. (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas Int J Cancer (64): 280-5

Blume-Jensen, P. undHunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling Nature (411): 355-65

Böcker, W., H.D., Phillip U. Heitz (2004) Pathologie Urban & Fischer Bei Elsevier Vol. 3.

Bolukbas, S., Beqiri, S., Bergmann, T., Trainer, S., Fisseler-Eckhoff, A. und Schirren, J. (2008) Pulmonary resection of non-small cell lung cancer: is survival in the elderly not affected by tumor stage after complete resection? Thorac Cardiovasc Surg (56): 476-81

Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Hegi, M. E. und Stupp, R. (2008) Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments Clin Cancer Res (14): 957-60

Burdett S, S. R., Stewart L, Tierney J, Auperin A, Le Chevalier T, Le Pechoux C, Pignon JP, Arriagada R, Higgins J, Johnson D, van Meerbeeck J, Parmar M, Souhami R, Bell D, Cartei G, Cormier Y, Cullen M, Ganz P, Gridelli C, Kaasa S, Quoix E, Rapp E, Seymour L, Spiro S, Thatcher N, Tummarello D, Williams C, Williamson I. (2008) Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials J Clin Oncol (26): 4617-25

- Carretta, A., Ciriaco, P., Melloni, G., Sayed, I., Bandiera, A., Ferla, L., Puglisi, A. und-Zannini, P. (2008) Results of surgical treatment after neoadjuvant chemotherapy for stage III non-small cell lung cancer World J Surg (32): 2636-42
- Center for Disease Control and Prevention (2007) Lung Cancer: Risk Factors http://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/risk_factors.htm
- Chan, T. O. und Tsichlis, P. N. (2001) PDK2: a complex tail in one Akt Sci STKE (2001): PE1
- Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K. und Testa, J. R. (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA Proc Natl Acad Sci U S A (93): 3636-41
- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N. und Testa, J. R. (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas Proc Natl Acad Sci U S A (89): 9267-71
- Cheong, K. A., Chrystal, K. und Harper, P. G. (2007) Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer Int J Clin Pract (61): 143-6
- Chung, J. Y., Hong, S. M., Choi, B. Y., Cho, H., Yu, E. und Hewitt, S. M. (2009) The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma Clin Cancer Res (15): 660-7
- **Classen, D., Kochsiek** (2004) Innere Medizin Urban & Fischer. S. 542-551
- Coffer, P. J., Jin, J. und Woodgett, J. R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation Biochem J (335 (Pt 1)): 1-13
- Colin D Mathers, C. B.-P. e. a. (2001) Cancer incidence, mortality and survivalby site for 14 regions of the world WHO Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion Paper (13):
- Dai, B., Kong, Y. Y., Ye, D. W., Ma, C. G., Zhou, X. und Yao, X. D. (2009) Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics BJU Int
- **Dancey**, **J. E. (2006)** Therapeutic targets: MTOR and related pathways Cancer Biol Ther (5): 1065-73
- **Deutsches Ärzteblatt, (2007)** Deutsches Ärzteblatt (p. A-1312/B-1165/C-1116):
- De Paula, A. M., Souza, L. R., Farias, L. C., Correa, G. T., Fraga, C. A., Eleuterio, N. B., Silveira, A. C., Santos, F. B., Haikal, D. S., Guimaraes, A. L. und Gomez, R. S. (2009) Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization Oral Oncol

- **Di Cristofano, A. und Pandolfi, P. P. (2000)** The multiple roles of PTEN in tumor suppression Cell (100): 387-90
- Donhijsen, K. (1998) Histologisches Malignitätsgrading Dt. Ärzteblatt (95): 2391-2395
- Downward, J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival Semin Cell Dev Biol (15): 177-82
- **Duale Reihe (2001)** Innere Medizin, Sonderausgabe, Tumoren der Bronchien und der Lunge, S.502-510, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- **Fingar, D. C. und Blenis, J. (2004)** Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression Oncogene (23): 3151-71
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C. und Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer Cancer Treat Rev (30): 193-204
- Gills, J. J. und Dennis, P. A. (2009) Perifosine: update on a novel Akt inhibitor Curr Oncol Rep (11): 102-10
- Hay, N. (2005) The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer Cancer Cell (8): 179-83
- **Hay, N. undSonenberg, N. (2004)** Upstream and downstream of mTOR Genes Dev (18): 1926-45
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. und Mills, G. B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery Nat Rev Drug Discov (4): 988-1004
- Hernando, E., Charytonowicz, E., Dudas, M. E., Menendez, S., Matushansky, I., Mills, J., Socci, N. D., Behrendt, N., Ma, L., Maki, R. G., Pandolfi, P. P. und Cordon-Cardo, C. (2007) The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas Nat Med (13): 748-53
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N. F. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit Cell (70): 419-29
- **Holt, K. H., Olson, L., Moye-Rowley, W. S. und Pessin, J. E. (1994)** Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits Mol Cell Biol (14): 42-9
- Howes, A. L., Chiang, G. G., Lang, E. S., Ho, C. B., Powis, G., Vuori, K. und Abraham, R. T. (2007) The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures Mol Cancer Ther (6): 2505-14
- Hudes, G. R. (2009) Targeting mTOR in renal cell carcinoma Cancer (115): 2313-2320
- Ihle, N. T., Paine-Murrieta, G., Berggren, M. I., Baker, A., Tate, W. R., Wipf, P., Abraham, R. T., Kirkpatrick, D. L. und Powis, G. (2005) The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor PX-866 overcomes resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib in A-549 human non-small cell lung cancer xenografts Mol Cancer Ther (4): 1349-57

- J. R. Brahmer, R. G., S. Novello, R. Rosell, C.P. Belani, J.N. Atkins, H.H. Gillenwater, L. Tye, R. Chao, M.A. Socinski (2007) Efficacy and safety of continuous daily sunitinib dosing in previously treated advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results from a phase II study. ASCO 2007
- **Jensik, R. J. (1986)** The extent of resection for localized lung cancer. Segmental resection. In: Kittle C.F. (ed.): Current controversies in thoracic surgery. Saunders; Philadelphia 175-182
- **Jiang, Z. Y., Zhou, Q. L., Coleman, K. A., Chouinard, M., Boese, Q. und Czech, M. P.** (2003) Insulin signaling through Akt/protein kinase B analyzed by small interfering RNA-mediated gene silencing Proc Natl Acad Sci U S A (100): 7569-74
- **Karim, S. und Ali, A. (2009)** Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer patients from India World J Gastroenterol (15): 1381-7
- Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R. M., Littman, D. R., Leitges, M., Rawlings, D. J. und Kawakami, T. (2004) Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion J Biol Chem (279): 47720-5
- Kersting, C., Gebert, C., Agelopoulos, K., Schmidt, H., van Diest, P. J., Juergens, H., Winkelmann, W., Kevric, M., Gosheger, G., Brandt, B., Bielack, S. und Buerger, H. (2007) Epidermal growth factor receptor expression in high-grade osteosarcomas is associated with a good clinical outcome Clin Cancer Res (13): 2998-3005
- Kim, R. H. und Mak, T. W. (2006) Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both Br J Cancer (94): 620-4
- **Knobbe, C. B. und Reifenberger, G. (2003)** Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidyl-inositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas Brain Pathol (13): 507-18
- Lee, D. H., Lee, G. K., Kong, S. Y., Kook, M. C., Yang, S. K., Park, S. Y., Park, S. H., Keam, B., Park do, J., Cho, B. Y., Kim, S. W., Chung, K. W. und Lee, E. S. (2007) Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma J Clin Pathol (60): 881-4
- Lee, S. H., Kim, H. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, K. Y., Kim, S. H., Lee, J. Y. und Yoo, N. J. (2002) Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study Apmis (110): 587-92
- Li, A., Chitale, D., Riely, G. J., Pao, W., Miller, V. A., Zakowski, M. F., Rusch, V., Kris, M. G. und Ladanyi, M. (2008) EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression J Mol Diagn (10): 242-8

- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H. und Parsons, R. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer Science (275): 1943-7
- Liang, J. und Slingerland, J. M. (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression Cell Cycle (2): 339-45
- LoPiccolo, J., Granville, C. A., Gills, J. J. und Dennis, P. A. (2007) Targeting Akt in cancer therapy Anticancer Drugs (18): 861-74
- **LoPiccolo**, **J.**, **Blumenthal**, **G. M.**, **Bernstein**, **W. B. und Dennis**, **P. A. (2008)** Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations Drug Resist Updat (11): 32-50
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J. und Haber, D. A. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib N Engl J Med (350): 2129-39
- Massarelli, E., Varella-Garcia, M., Tang, X., Xavier, A. C., Ozburn, N. C., Liu, D. D., Bekele, B. N., Herbst, R. S. und Wistuba, II (2007) KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer Clin Cancer Res (13): 2890-6
- Nakayama, K., Nakayama, N., Kurman, R. J., Cope, L., Pohl, G., Samuels, Y., Velcules-cu, V. E., Wang, T. L. und Shih Ie, M. (2006) Sequence mutations and amplification of PI3K and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms Cancer Biol Ther (5): 779-85
- **Nicholson, K. M. und Anderson, N. G. (2002)** The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy Cell Signal (14): 381-95
- Okudela, K., Suzuki, M., Kageyama, S., Bunai, T., Nagura, K., Igarashi, H., Takamochi, K., Suzuki, K., Yamada, T., Niwa, H., Ohashi, R., Ogawa, H., Mori, H., Kitamura, H., Kaneko, T., Tsuneyoshi, T. und Sugimura, H. (2007) PI3K mutation and amplification in human lung cancer Pathol Int (57): 664-71
- Osaki, M., Oshimura, M. und Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer Apoptosis (9): 667-76
- Paez, J. und Sellers, W. R. (2003) PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling Cancer Treat Res (115): 145-67
- **Pao, W. und Miller, V. A. (2005)** Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions J Clin Oncol (23): 2556-68
- Park, K., Kwak, K., Kim, J., Lim, S. und Han, S. (2005) c-myc amplification is associated with HER2 amplification and closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers Hum Pathol (36): 634-9

- **Passlik (2006)** Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms TumorZentrum Freiburg (3.Auflage):
- PaTel, J. D., Bach, P. B. und Kris, M. G. (2004) Lung cancer in US women: a contemporary epidemic Jama (291): 1763-8
- Rakosy, Z., Vizkeleti, L., Ecsedi, S., Voko, Z., Begany, A., Barok, M., Krekk, Z., Gallai, M., SZentirmay, Z., Adany, R. und Balazs, M. (2007) EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis Int J Cancer (121): 1729-37
- Reichelt, U., Duesedau, P., Tsourlakis, M., Quaas, A., Link, B. C., Schurr, P. G., Kaifi, J. T., Gros, S. J., Yekebas, E. F., Marx, A., Simon, R., Izbicki, J. R. und Sauter, G. (2007) Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus Mod Pathol (20): 120-9
- **Robert Koch Institut, (2008)** Krebs inDeutschland 2003-2004- Häufigkeiten und Trends (6 überarbeitete Auflage)
- Rudin CM, Avila-Tang E, Harris CC, Herman JG, Hirsch FR, Pao W, Schwartz AG, Vahakangas KH, Samet JM. (2009) Lung cancer in never smokers: molecular profiles and therapeutic implications Clin Cancer Res. (18): 5646-61
- Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A. K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S., Simon, R. und Sauter, G. (2006) Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer Int J Cancer (118): 2190-4
- **Sauter, G., Simon, R. und Hillan, K. (2003)** Tissue microarrays in drug discovery Nat Rev Drug Discov (2): 962-72
- Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J. und Johnson, D. H. (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer N Engl J Med (346): 92-8
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases Cell (103): 211-25
- Schneider, T., Pfannschmidt, J., Muley, T., Reimer, P., Eberhardt, R., Herth, F. J., Dienemann, H. und Hoffmann, H. (2008) A retrospective analysis of short and long-term survival after curative pulmonary resection for lung cancer in elderly patients Lung Cancer (62): 221-7
- Schwentner, I., Witsch-Baumgartner, M., Sprinzl, G. M., Krugmann, J., Tzankov, A., Jank, S., Zwierzina, H. undLoeffler-Ragg, J. (2008) Identification of the rare EGFR mutation p.G796S as somatic and germline mutation in white patients with squamous cell carcinoma of the head and neck Head Neck (30): 1040-4
- Simon, R., Struckmann, K., Schraml, P., Wagner, U., Forster, T., Moch, H., Fijan, A., Bruderer, J., Wilber, K., Mihatsch, M. J., Gasser, T. und Sauter, G. (2002) Amplification

- pattern of 12q13-q15 genes (MDM2, CDK4, GLI) in urinary bladder cancer Oncogene (21): 2476-83
- Simon, R., Richter, J., Wagner, U., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, G., Knonagel, H., Rist, M., Wilber, K., Anabitarte, M., Hering, F., Hardmeier, T., Schonenberger, A., Flury, R., Jager, P., Fehr, J. L., Schraml, P., Moch, H., Mihatsch, M. J., Gasser, T. und Sauter, G. (2001) High-throughput tissue microarray analysis of 3p25 (RAF1) and 8p12 (FGFR1) copy number alterations in urinary bladder cancer Cancer Res (61): 4514-9
- Sos, M. L., Koker, M., Weir, B. A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J. M., Weiss, J., Fischer, F., Frommolt, P., Michel, K., Peifer, M., Mermel, C., Girard, L., Peyton, M., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Garraway, L. A., Kashkar, H., Pao, W., Meyerson, M. und Thomas, R. K. (2009) PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR Cancer Res (69): 3256-61
- **Staal, S. P. (1987)** Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma Proc Natl Acad Sci U S A (84): 5034-7
- Stinchcombe, T. E. und Socinski, M. A. (2009) Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer Proc Am Thorac Soc (6): 233-41
- Stokoe, D., Stephens, L. R., Copeland, T., Gaffney, P. R., Reese, C. B., Painter, G. F., Holmes, A. B., McCormick, F. und Hawkins, P. T. (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B Science (277): 567-70
- **Stryer**, (2003) Biochemie (5.Auflage): 428-432
- **Toker, A. und Cantley, L. C. (1997)** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase Nature (387): 673-6
- **Vanhaesebroeck, B. und Alessi, D. R. (2000)** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB Biochem J (346 Pt 3): 561-76
- Wang, R. und Brattain, M. G. (2006) AKT can be activated in the nucleus Cell Signal (18): 1722-31
- Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., Hiraoka, N., Yamamoto, H., Hayashi, N., Dono, K., Nakamori, S., Umeshita, K., Ito, Y., Matsuura, N. und Monden, M. (2004) Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma Oncol Rep (11): 25-32
- Zaczek, A., Welnicka-Jaskiewicz, M., Bielawski, K. P., Jaskiewicz, J., Badzio, A., Olszewski, W., Rhone, P. und Jassem, J. (2008) Gene copy numbers of HER family in breast cancer J Cancer Res Clin Oncol (134): 271-9
- Zhu, C. Q., Cutz, J. C., Liu, N., Lau, D., Shepherd, F. A., Squire, J. A. und Tsao, M. S. (2006) Amplification of Telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer Br J Cancer (94): 1452-9

8 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Ronald Simon und seinem Team aus der Molekularpathologie (v.a. Antje Krohn und Frederik Holst) für die hervorragende Betreuung und Supervision meiner Dissertation bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Guido Sauter für die Möglichkeit, in der Pathologie meine Dissertation abzulegen und für seine Großzügigkeit, mich an einem Kongress in den USA teilnehmen zu lassen. Hier konnte ich die weite Welt der Forschung näher kennen lernen.

Natürlich bedanke ich mich auch bei meinen Eltern, die es mir durch ihre Unterstützung überhaupt erst möglich gemacht haben, das Medizinstudium aufzunehmen und mich immer in allen Phasen unterstützt haben.

Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Maxie, die es neben vielem anderen geschafft hat, selbst den längsten Labortagen einen schönen Abschluss zu bescheren.

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Christian Heupel