

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. G. Sauter

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. R. Simon

PIK3CA-Amplifikationen in humanen Lungenkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Hannes Schacht
aus Hamburg

Hamburg 2011

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.11.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. E. Yekebas

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	4
1.1	Das Lungenkarzinom	4
1.2	Genamplifikationen	6
1.3	PIK3CA und seine Bedeutung in Lungenkarzinomen	8
1.4	Ziel der Arbeit	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Untersuchungsmaterial	12
2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	16
2.3	FISH-Auswertung	16
2.4	Statistik	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Assoziation zwischen dem Tumorphänotyp und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis	19
3.2	Assoziation zwischen der Zellproliferation und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis	22
3.3	Assoziation zwischen dem p53-Status und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis	24
3.4	Einfluss des PIK3CA-Status auf die Patientenprognose	24
4	Diskussion	26
5	Zusammenfassung	32
6	Abkürzungsverzeichnis	33
7	Literaturverzeichnis	35
8	Danksagung	42
9	Lebenslauf	43
10	Eidesstattliche Versicherung	44

1 EINLEITUNG

1.1 Das Lungenkarzinom

Das Lungenkarzinom ist mittlerweile die häufigste Krebserkrankung weltweit. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 10% in den meisten Ländern zeichnet es sich durch eine besonders ungünstige Prognose aus (Travis et al. 2004).

In Deutschland ist das Lungenkarzinom nach dem Prostata- und dem kolorektalen Karzinom bei Männern und nach dem Mamma- und dem kolorektalen Karzinom bei Frauen die dritthäufigste bösartige Tumorerkrankung. Unter den krebsbedingten Todesfällen belegt es hier bei Männern den ersten, bei Frauen den dritten Platz. Als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms ist das aktive Tabakrauchen zu nennen. Durch Veränderung der Rauchgewohnheiten kann bei Männern seit den 1990er Jahren ein Rückgang von Inzidenz und Mortalität beobachtet werden, während bei Frauen Inzidenz und Mortalität weiterhin wachsen. Diese Entwicklungen entsprechen denen in anderen europäischen Industrienationen (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008). In den USA ist der positive Trend bei den Männern sogar noch stärker ausgeprägt, bei den Frauen haben Inzidenz und Mortalität eine Plateauphase erreicht und es darf auf einen Trendwechsel nach unten in den nächsten Jahren gehofft werden (Huber 2009).

Histologisch handelt es sich bei den bösartigen Tumoren der Lunge in über 99% der Fälle um Karzinome, wovon 20% kleinzellige Karzinome (SCLC) sind. Den Anteil der nicht-kleinzelligen Karzinome (NSCLC) bilden größtenteils Plattenepithelkarzinome (SCC), Adenokarzinome (ADC) und großzellige Karzinome (LCC). Großzellige Karzinome finden sich in 9%, Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome unterscheiden sich je nach Geschlecht der Patienten in ihrem Auftreten. So kommen bei Männern insgesamt überwiegend Plattenepithelkarzinome vor (SCC: 44%, ADC: 28%), wobei jedoch in bestimmten Regionen Nordamerikas (USA, Kanada) und Asiens (China, Japan) Adenokarzinome überwiegen. Bei Frauen dominiert insgesamt das Adenokarzinom (SCC: 25%, ADC: 42%). Auch hier gibt es jedoch regionale Abweichungen. So treten bei Frauen aus England und Polen überwiegend

Plattenepithelkarzinome auf, bei Frauen aus Schottland überwiegend kleinzellige Karzinome (Travis et al. 2004).

Bei der Therapie des Lungenkarzinoms kommen je nach Art und Stadium des Tumors, meist in Kombination als multimodale Therapie, Chirurgie, systemische Chemotherapie, Strahlentherapie und seit einigen Jahren auch zielgerichtete Therapien zum Einsatz. Bei kleinzelligen Karzinomen im lokal begrenzten Stadium ist in den seltenen Fällen eines peripher gelegenen kleinen Tumors die chirurgische Tumorentfernung mit kurativer Zielsetzung möglich. Bei anschließender Chemotherapie, die grundsätzlich einen unabdingbaren Bestandteil der Therapie in jedem Stadium des kleinzelligen Lungenkarzinoms darstellt, besteht hier eine relativ günstige Prognose. Eine zusätzliche thorakale Bestrahlung ist beim Befall hilärer oder mediastinaler Lymphknoten erforderlich. Gelingt eine Vollremission, so bringt eine zusätzliche präventive Bestrahlung des Schädels einen Überlebensvorteil. Meistens ist jedoch im lokal begrenzten Stadium keine Operabilität gegeben, sodass eine primäre Chemotherapie in Kombination mit einer lokoregionären Strahlentherapie indiziert ist. Sekundäre Operationen zur Senkung des Risikos von Lokalrezidiven werden diskutiert, jedoch konnte bisher kein eindeutiger Nutzen hierfür nachgewiesen werden. Im metastasierten Stadium des kleinzelligen Karzinoms steht die Chemotherapie ganz im Vordergrund. Operative Verfahren kommen allenfalls als Palliativmaßnahme zum Einsatz. Eine Bestrahlung von Thorax oder Schädel kann unter Umständen sinnvoll sein. Bei nicht-kleinzelligen Karzinomen erfolgt im nicht metastasierten Stadium wenn möglich die komplette chirurgische Tumorentfernung, bei Inoperabilität ein strahlentherapeutischer Therapieansatz. Insgesamt lassen sich so nur bescheidene Langzeitergebnisse erzielen, die man deshalb durch adjuvante Radio- und/oder Chemotherapie zu verbessern versucht. Im metastasierten Stadium steht auch bei nicht-kleinzelligen Karzinomen die Chemotherapie als Therapieoption im Vordergrund, zusätzlich besteht die Möglichkeit der Bestrahlung von Hirnmetastasen (Huber 2009).

Die Ergebnisse der Chemotherapie beim Lungenkarzinom sind bislang nicht befriedigend. Einen neuen, Erfolg versprechenden Therapieansatz stellen die sogenannten zielgerichteten Therapien dar, die sich derzeit aus den wachsenden Erkenntnissen der tumorbiologischen Forschung entwickeln und sich im Vergleich zu den herkömmlichen systemischen Chemotherapeutika durch wesentlich geringere

Nebenwirkungen auszeichnen. Bei fortgeschrittenen und chemotherapierefraktären nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen zeigte der Einsatz von Substanzen, die die intrazelluläre Rezeptor-Tyrosinkinase des *Epidermal growth factor*-Rezeptors (EGFR) hemmen (Gefitinib, Erlotinib) im Rahmen von Phase-II-Studien vielversprechende Ergebnisse. In vier großen randomisierten Studien (INTACT 1, INTACT 2, TALENT und TRIBUTE) zeigte für die Erstlinientherapie mit Kombinationen wie Cisplatin/Gemzar oder Carboplatin/Paclitaxel die Zugabe dieser beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) allerdings keine Vorteile im Vergleich zur Therapie ohne die TKI (Vokes und Chu 2006). Ein weiterer Angriffsort zielgerichteter Therapien ist die Tumorangiogenese. Als Angiogenese-Inhibitor ist in Deutschland bereits der monoklonale Antikörper Bevacizumab, der sich gegen den von vielen Tumoren überexprimierten *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) richtet, für die Erstlinienbehandlung von fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, die keine vorwiegend plattenepitheliale Histologie aufweisen, in Kombination mit einer platinhaltigen Chemotherapie zugelassen (Huber 2009).

Die Prognose beim Lungenkarzinom hängt ab vom Tumorstadium und vom Tumortyp. In Deutschland liegt die 5-Jahres-Überlebensrate, bezogen auf die Gesamtheit der Lungenkarzinome, im lokal begrenzten Stadium noch bei über 50%, bei Vorliegen von Fernmetastasen jedoch nur noch im Bereich von 5%. Insgesamt ist die Überlebensrate für das nicht-kleinzellige Karzinom größer als für das kleinzellige (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2008).

1.2 Genamplifikationen

Unter einer Genamplifikation versteht man eine Erhöhung der Kopiezahl eines chromosomalen Abschnittes. Dieser Abschnitt, das sogenannte Amplikon, kann wenige bis zu mehr als hundert Gene enthalten. Genamplifikationen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Tumoren, da sie oft Onkogene betreffen und so Tumorzellen durch die Überexpression entsprechender Genprodukte zu Überlebens- und Wachstumsvorteilen gegenüber normalen Zellen verhelfen. Als Beispiele seien hier die Amplifikation von MYCN in Neuroblastomen (Schwab und

Amler 1990) und von HER2 in Mammakarzinomen (Kallioniemi et al. 1992) genannt. Weiterhin können Genamplifikationen unter Therapien auftreten und so Resistenzen verursachen, wie z.B. bei der Gefitinib-Resistenz von Lungenkarzinomen durch MET-Amplifikationen (Engelman et al. 2007) oder bei Amplifikationen des Androgenrezeptor-Gens bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen (Attar et al. 2009).

Die amplifizierte DNA-Sequenz kann entweder innerhalb des Chromosoms als sogenannte *homogenously staining region* (HSR) oder als mehrere kleine extrachromosomale DNA-Fragmente in Form sogenannter *double minutes* (DMs) vorliegen (Schwab 1999). Die zu Amplifikationen führenden Mechanismen sind bislang noch nicht gänzlich geklärt. Als Entstehungsmöglichkeit für DM-Amplifikationen wurde der Zerfall von HSRs in DMs vorgeschlagen (Balaban-Malenbaum und Gilbert 1977, Brookwell und Hunt 1988). Weiterhin existiert die Theorie, dass DMs durch den Zerfall von chromosomalen, zentromerlosen Fragmenten entstehen, die im Rahmen von nicht oder unzureichend reparierten DNA-Schäden auftreten (Hahn 1993). Bezüglich HSRs wird vermutet, dass sie durch einen Mechanismus entstehen, der als *breakage-fusion-bridge*-Zyklus (Bruch-Fusions-Brücken-Zyklus, BFB) bezeichnet wird (Toledo et al. 1992). Dabei kommt es nach einem Bruch (*breakage*) eines Chromatids an einer Stelle zwischen einem später amplifiziert vorliegenden Gen bzw. DNA-Abschnitt und dem Telomer nach der Replikation zu einem Zusammenschluss (*fusion*) mit dem ebenfalls telomerlosen Schwesterchromatid, sodass ein dizentrisches Chromosom entsteht. In der Anaphase besteht dann zwischen den auseinanderweichenden Zentromeren dieses Chromosoms eine Brücke (*bridge*), die letzten Endes so zerreißt, dass nach der Zellteilung in der einen Zelle das Amplikon gar nicht mehr, dafür in der anderen Zelle in zweifacher Ausführung vorliegt. Für eine höhergradige Amplifikation ist entsprechend ein mehrmaliges Durchlaufen dieses Zyklus erforderlich. Die Orte der hierfür erforderlichen Chromatidbrüche sind dabei nicht zufällig, sondern an spezifischen chromosomalen Loci minoris resistentiae lokalisiert, die als *common fragile sites* (CFSs) bezeichnet werden (Hellman et al. 2002).

1.3 PIK3CA und seine Bedeutung in Lungenkarzinomen

Für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms aus Epithelzellen ist in der Regel die Akkumulation mehrerer genetischer sowie epigenetischer Veränderungen im Laufe der Zeit im Sinne einer Mehrschritt-Karzinogenese erforderlich. Diese Veränderungen führen zum einen zu einer Ausschaltung, dem Verlust oder der verminderten Expression von Tumorsuppressorgenen. Zum anderen führen sie zur Aktivierung bzw. Überexpression von Onkogenen. Die Ursachen, die dies zur Folge haben sind vielfältig: Neben der Aktivierung von Onkogenen bzw. der Ausschaltung von Tumorsuppressorgenen durch Genmutationen umfassen sie Allelverluste (*loss of heterozygosity*, LOH), chromosomale Instabilitäten und Imbalancen, aber auch epigenetische Veränderungen wie Promotor-Hypermethylierungen mit resultierender „Stummschaltung“ oder die aberrante Expression von Genen, die von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Zellzyklus sind (Travis et al. 2004).

Bislang wurden in Lungenkarzinomen viele verschiedene genetische Aberrationen entdeckt. Innerhalb der Vielzahl dieser Veränderungen gibt es drei, die gehäuft und unabhängig vom histologischen Subtyp vorkommen: Inaktivierende Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens finden sich in über 70% bei kleinzelligen und in bis zu 50% bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Pfeifer et al. 2002). Weiterhin finden sich in den meisten Lungenkarzinomen Veränderungen des für die Regulation des Zellzyklus wichtigen Retinoblastoma-Signalweges (Brambilla et al. 1999, Gazzeri et al. 1998) und ein Heterozygotieverlust auf dem kleinen Arm des Chromosoms 3 (Brauch et al. 1987, Lu et al. 1999, Naylor et al. 1987), auf dem sich mehrere mögliche Tumorsuppressorgene wie FHIT, RASSF1 und SEMA3B befinden (Lerman und Minna 2000, Mitsuushi und Testa 2002, Yokota und Kohno 2004). Neben diesen allgemeinen Aberrationen gibt es aber auch solche, die eine Affinität zu bestimmten histologischen Subtypen haben. So zeigen sich z.B. in Adenokarzinomen der Lunge in 30-40% aktivierende K-ras-Mutationen, die bei anderen nicht-kleinzelligen oder bei kleinzelligen Lungenkarzinomen so gut wie nie auftreten (Rodenhuis et al. 1997).

Bei der Suche nach tumorspezifisch veränderten Genprofilen zeigten Analysen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) bei kleinzelligen (Levin et al. 1995, Petersen et al. 1997a, Ried et al. 1994) und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Björkqvist et al. 1998, Luk et al. 2001, Pei et al. 2001, Petersen

et al. 1997b) neben vielen chromosomalen Verlusten auch Amplifikationen, insbesondere auf dem langen Arm des Chromosoms 3 und hier wiederum am häufigsten im Bereich um 3q26 (in 50% der untersuchten kleinzelligen und in 66% der untersuchten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome) (Balsara und Testa 2002). Im 3q26-Amplikon wurden mehrere Gene identifiziert, darunter bei 3q26.3 das für die katalytische Untereinheit „p110 α “ der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) kodierende Gen PIK3CA (Volinia et al. 1994). PI3K spielt eine wichtige Rolle im PI3K/Akt-Signalweg, der als einer der am häufigsten aktivierten Signalwege in malignen humanen Tumoren überhaupt angesehen wird (Brugge et al. 2007). Sie ist Rezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. HER2, EGFR oder MET nachgeschaltet. PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) und ermöglicht dadurch das Binden von Proteinen, die über die dafür erforderliche „Pleckstrin-Homologie-Domäne“ verfügen, an PIP₃. Durch das Binden an PIP₃ werden diese Proteine an die Zellmembran rekrutiert, wo sie dann aktiviert werden können. Ein wichtiger Vertreter dieser Proteine, die über weitere Signalkaskaden unter anderem Zellwachstum, -proliferation, -migration, -stoffwechsel, Proteinsynthese und Apoptose regulieren, ist Akt (Synonym: Proteinkinase B). Das Tumorsuppressorprotein PTEN wirkt als Gegenspieler von PI3K, indem es PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert (Cantley 2002, Liu et al. 2009). Abbildung 1 gibt einen Überblick über den PI3K/Akt-Signalweg.

Alterationen des PIK3CA-Gens wurden in vielen humanen Malignomen gefunden. Amplifikationen fanden sich in Mamma- (9%) (Wu et al. 2005a), Endometrium- (10%), Cervix- (9%) (Miyake et al. 2008), Ovarial- (12%) (Nakayama et al. 2006 und 2007), Ösophagus- (6%) (Miller et al. 2003), Magen- (36%) (Byun et al. 2003) und Schilddrüsenkarzinomen (9%) (Wu et al. 2005b), in Glioblastomen (6%) (Kita et al. 2007, The Cancer Genome Atlas Research Network 2008) und in Kopf-Hals-Tumoren (32%) (Fenic et al. 2007, Pedrero et al. 2005, Woenckhaus et al. 2002). Bei Lungenkarzinomen wurden PIK3CA-Amplifikationen in 33-61% bei Plattenepithelkarzinomen, in 0-17% bei Adenokarzinomen, in 17-25% bei großzelligen Karzinomen und in 17-50% bei kleinzelligen Karzinomen gefunden, wobei den Ergebnissen für groß- und kleinzellige Karzinome relativ kleine Fallzahlen zu Grunde liegen (Angulo et al. 2008, Kawano et al. 2007, Massion et al. 2002 und 2004, Okudela et al. 2007, Yamamoto et al. 2008). Auch aktivierende Mutationen von

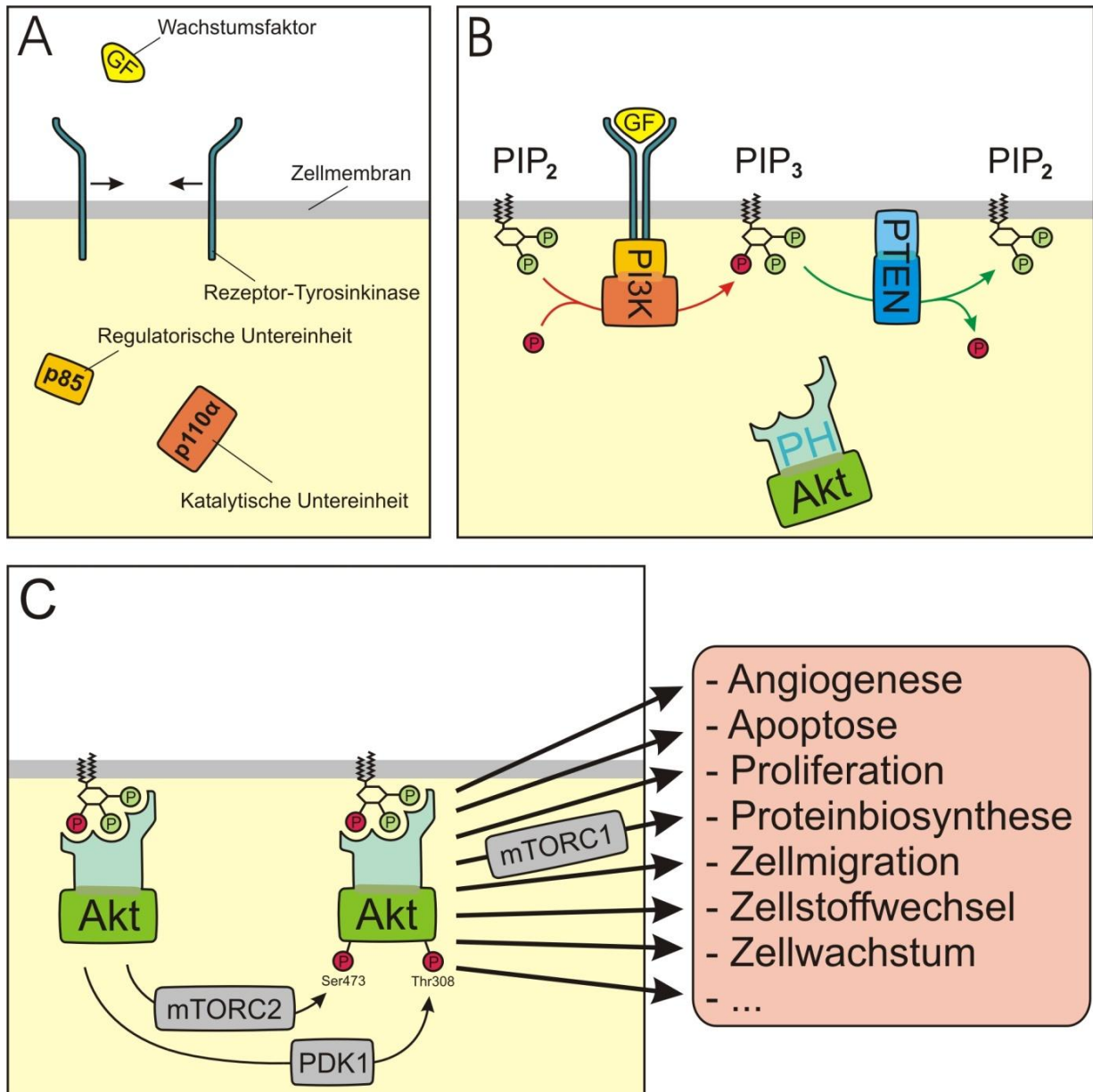


Abbildung 1: Vereinfachte Übersicht über den Ablauf des PI3K/Akt-Signalweges: **(A)** Am Beginn des Signalweges steht das Binden eines Wachstumsfaktors wie z.B. EGF, IGF1 oder PDGF an einen Rezeptor mit intrazellulärer Tyrosinkinasedomäne (Rezeptor-Tyrosinkinase). Es folgt die ligandeninduzierte Dimerisierung zweier Rezeptor-Tyrosinkinasen mit anschließender Aktivierung durch Autophosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosylreste. **(B)** Hiernach kann PI3K mit seiner regulatorischen Untereinheit „p85α“ an den aktivierten Rezeptor binden und PIP₂ zu PIP₃ phosphorylieren. Der Tumorsuppressor PTEN wirkt als Gegenspieler von PI3K indem er PIP₃ zu PIP₂ dephosphoryliert. **(C)** Akt bindet mit seiner Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) an PIP₃ und wird so an die Zellmembran rekrutiert, wo sie am Serinrest 473 durch mTORC2 und durch Phosphorylierung am Threoninrest 308 durch PDK1 aktiviert werden kann (Löffler et al. 2007, Sarbassov et al. 2005). Durch die aktivierte Akt kann nun z.B. über die Aktivierung des mTORC1-Signalweges die Proteinbiosynthese gesteuert werden. Akt kann aber auch verschiedene weitere Signalwege aktivieren oder hemmen, die unter anderem Zellwachstum, -proliferation, -stoffwechsel, -migration, Apoptose und Angiogenese regulieren (Manning und Cantley 2007).

PIK3CA wurden, wenn auch seltener als Amplifikationen, in Lungenkarzinomen gefunden. Bei nicht-kleinzelligen Karzinomen fanden sich PIK3CA-Mutationen in 1,6-3,4% (Angulo et al. 2008, Board et al. 2008, Kawano et al. 2006, Yamamoto et al. 2008). Shibata et al. fanden 13% aktivierende Mutationen in kleinzelligen Karzinomen (Shibata et al. 2009).

PIK3CA-Alterationen gehen mit einer erhöhten PI3K-Aktivität sowie einer erhöhten Konzentration von aktivierter Akt einher und begünstigen das Tumorwachstum. Das Stummschalten der PIK3CA-Expression mittels siRNA und shRNA hob in Lungenkarzinom-Zelllinien mit Amplifikationen und in solchen mit Mutationen von PIK3CA deren Fähigkeit zur Koloniebildung auf (Yamamoto et al. 2008). Die Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor „LY294002“ ergab bei gefitinibresistenten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen in Kombination mit Gefitinib eine erhöhte Zytotoxizität (Janmaat et al. 2006). „PI-103“, ein PI3K-Inhibitor, der gleichzeitig auch das *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) hemmt, zeigte eine deutliche Antitumor-Aktivität bei gefitinibresistenten Zelllinien nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome (Zou et al. 2009) (mTOR liegt im PI3K/Akt-Signalweg im mTORC2-Komplex oberhalb von Akt als einer ihrer Aktivatoren und im mTORC1-Komplex unterhalb als ein Effektor von Akt (Chapuis et al. 2010)). Dies verdeutlicht die Relevanz von PIK3CA für das Überleben von Tumorzellen und macht den PI3K/Akt-Signalweg zu einem vielversprechenden Angriffsort einer gezielten Krebstherapie.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Prävalenz von PIK3CA-Amplifikationen in einer größeren Anzahl von Lungenkarzinomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu untersuchen und die Ergebnisse in Zusammenschau mit klinischen Nachbeobachtungsdaten auf ihre prognostische Relevanz zu überprüfen. Weiterhin sollten die Ergebnisse mit der Zellproliferation (gemessen am Expressionsniveau des Proliferationsmarkers Ki67) und der p53-Inaktivierung (gemessen am immunhistochemischen Nachweis einer nukleären p53-Akkumulation) verglichen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial stand für diese Arbeit der „LUN1.1“-Tumor-Array (*Tissue micro array*, TMA) zur Verfügung, der nach bereits beschriebenem Verfahren (Kononen et al. 1998) am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erstellt worden war. Dieser TMA umfasste 647 Tumorgewebeproben, die in zwei separaten Paraffinblöcken à 369 und 278 Proben mit zusätzlich jeweils 44 Standard-Kontrollgewebeproben (SCT) eingebettet vorlagen. Die Proben stammten von 616 Patienten mit einem mittleren Alter von 62 Jahren (4-92 Jahre) (medianes Alter: 63 Jahre). Bei 12 Proben handelte es sich um Gewebe von Rezidivtumoren, weitere 19 Proben waren bei der Herstellung des Arrays versehentlich doppelt gestanzt worden, sodass diese insgesamt 31 Proben nicht mit in die Untersuchung einfließen. Daten zur Überlebenszeit der zugehörigen Patienten konnten für eine Untergruppe von 290 Tumoren erhoben werden. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 29 Monate (1-155 Monate). Bei den Gewebeproben handelte es sich um formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material, welches in den Jahren 1992 – 2006 am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eingegangen war. Die Gewebeschnitte jeder Probe wurden jeweils von 2 Fachärzten für Pathologie des Instituts befundet. Aus den jeweiligen schriftlichen pathologischen Befunden wurden für diese Arbeit die Informationen bezüglich der Ausdehnung des Primärtumors (pT), des Nodalstatus (pN) und des Differenzierungsgrades (G) der einzelnen Tumoren entnommen.

Eine genaue Übersicht über Stadium, Differenzierungsgrad und die histologischen Subtypen der Tumoren auf dem Array finden sich in Tabelle 1 und den Abbildungen 2-3.

Tabelle 1: Primärtumor-Ausdehnung, Nodalstatus, Differenzierungsgrad und die histologischen Subtypen der Tumoren auf dem TMA

LUN1.1		n	(%)
Alle Proben		616	(100,0)
pT	1	185	(30,0)
	2	320	(52,0)
	3	51	(8,3)
	4	53	(8,6)
	Keine Angabe	7	(1,1)
pN	0	266	(43,2)
	1	162	(26,3)
	2	108	(17,5)
	3	22	(3,6)
	Keine Angabe	58	(9,4)
G	1	16	(2,6)
	2	339	(55,0)
	3	187	(30,4)
	4	41	(6,6)
	Keine Angabe	33	(5,4)
Nachbeobachtungsdaten		290	(47,1)
Histologischer Subtyp	SCC	247	(40,1)
	ADC	210	(34,1)
	LCC	105	(17,0)
	SCLC	19	(3,1)
	LCNEC	15	(2,4)
	BAC	12	(2,0)
	cSCLC	5	(0,8)
	cNSCLC	2	(0,3)
	SC	1	(0,2)

SCC	Plattenepithelkarzinom
ADC	Adenokarzinom
LCC	Großzelliges Karzinom
SCLC	Kleinzelliges Karzinom
LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom
BAC	Bronchioloalveoläres Karzinom
cSCLC	Kombinierter Tumor mit Anteilen eines kleinzelligen Karzinoms
cNSCLC	Kombinierter Tumor ohne Anteile eines kleinzelligen Karzinoms
SC	Sarkomatoides Karzinom

Abbildung 2: Übersicht über den Aufbau des TMAs, Objektträger A

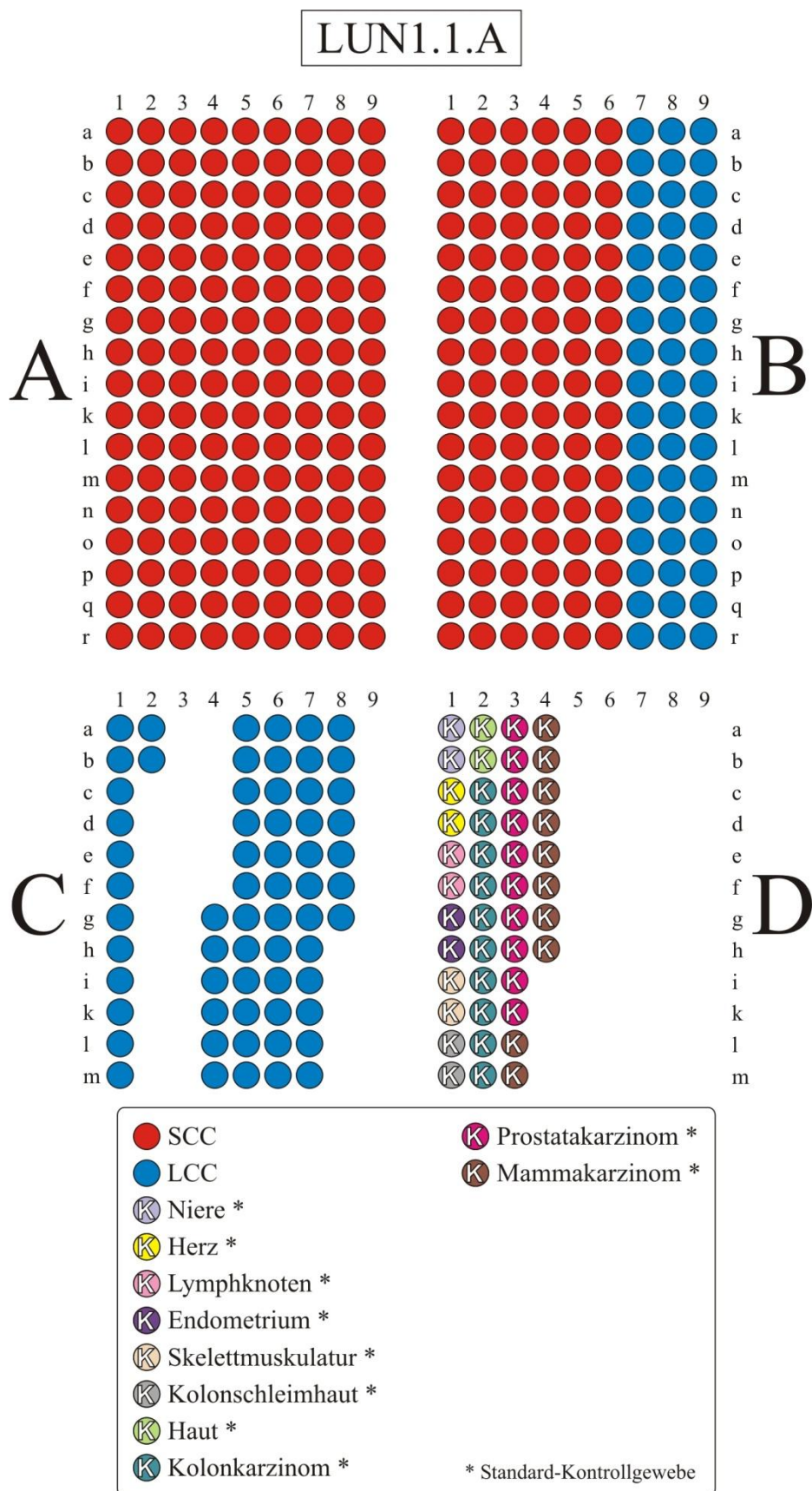
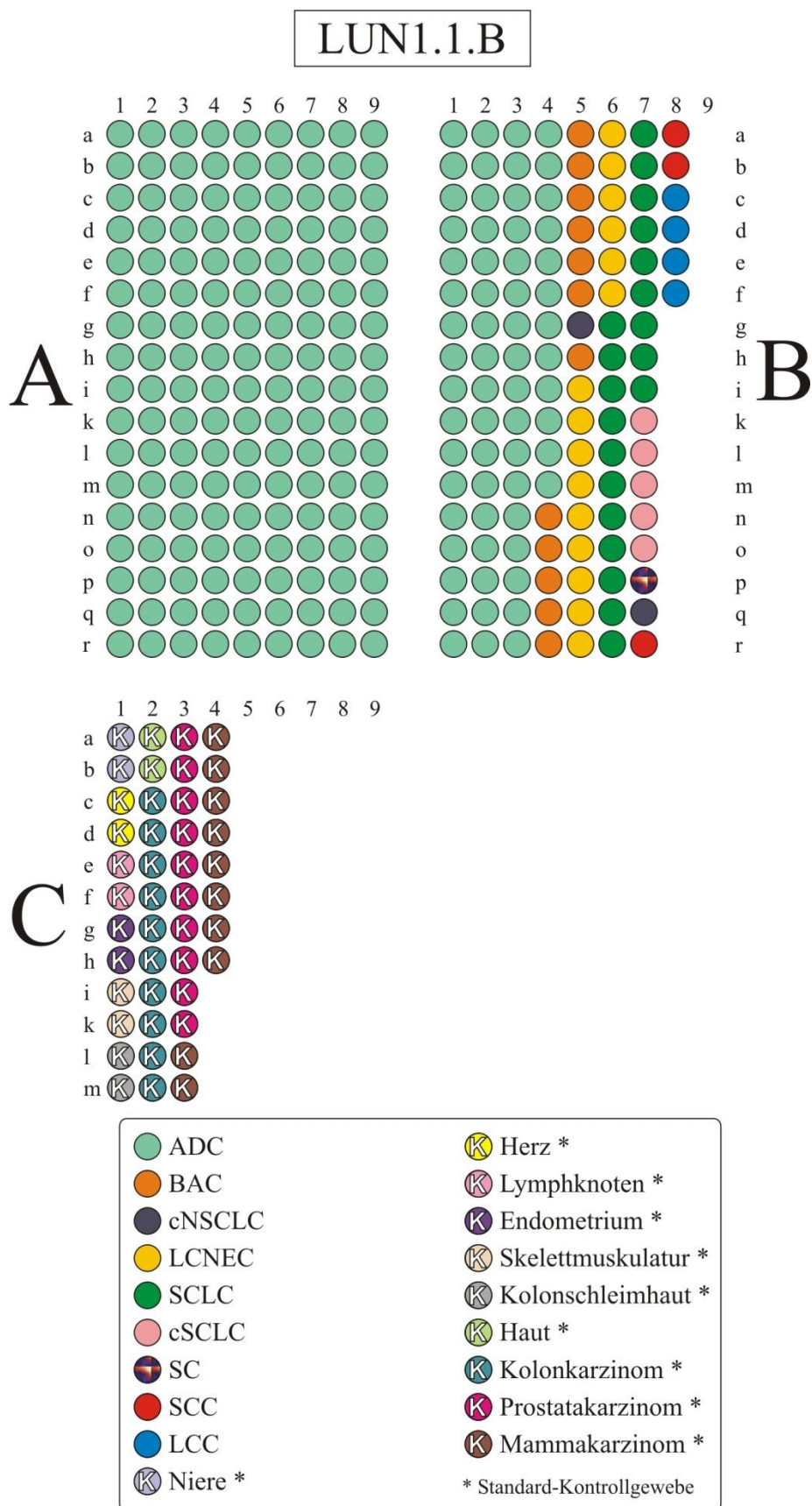


Abbildung 3: Übersicht über den Aufbau des TMAs, Objektträger B



2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden 4 µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung gemäß dem Protokoll des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downer's Grove, IL, USA) bei 80 °C für 15 Minuten in VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis) entparaffiniert und bei 37 °C 150 Minuten in VP 2000 Protease Buffer (0,01 N HCl) (Vysis) proteolytisch vorbehandelt. Zur Hybridisierung wurde für PIK3CA eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (3q26.3; BAC RP11-245C23, RZPD Deutschland) eingesetzt, die das komplette PIK3CA-Gen einschließt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde erfolgte mittels Nick-Translation (Rigby et al. 1977) unter Verwendung des „Nick Translation System“ (Invitrogen). Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 3 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht in den mitgelieferten Hybridisierungsmixen verdünnt. Jeweils 4 µl der genspezifischen Sonde und der Referenzsonde wurden gemeinsam in einem Gemisch mit 2 µl humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen oder repetitiver Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (14 µl) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10 Minuten bei 72 °C kodenaturiert und über Nacht bei 37 °C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt.

2.3 FISH-Auswertung

Um eine schnelle Evaluierung des Arrays zu gewährleisten, wurde die Ratio PIK3CA-Signale / Zentromer 3-Signale in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe geschätzt. Als Amplifikation (AMP) wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen Signalen der genspezifischen Sonde wie von Signalen der Referenzsonde (Ratio PIK3CA/Zen3 $\geq 2,0$) definiert. Gewebeproben, die eine Gen-/Referenzsonden-Ratio von über 1,0 aber unter 2,0 aufwiesen ($1,0 < \text{Ratio PIK3CA/Zen3} < 2,0$), wurden als „Gains“ (GAIN) bezeichnet. Als normal (NORM) wurden alle Gewebeproben gewertet, bei denen die Anzahl der Signale der Gensonde der der

Referenzsonde entsprach ($\text{Ratio PIK3CA/Zen3} = 1,0$). Alle anderen Gewebeproben ($\text{Ratio PIK3CA/Zen3} < 1,0$) wurden als „Deletion“ (DEL) definiert.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der JMP Software durchgeführt (SAS Institute Inc., NC, USA). Der Chi-Quadrat-Test wurde benutzt, um die PIK3CA-Amplifikation mit den klinisch-pathologischen Variablen und dem p53-Status zu vergleichen. Eine Varianzanalyse (ANOVA-Test) wurde durchgeführt, um den PIK3CA-Status mit der Zellproliferation, gemessen am „Ki67-labeling index“ (Ki67-LI), zu korrelieren. Eine Kaplan-Meier-Analyse wurde verwendet, um Zusammenhänge zwischen dem PIK3CA-Status und dem Patientenüberleben zu analysieren. Signifikanz wurde hierbei mit dem Logrank-Test überprüft.

3 ERGEBNISSE

Von den 647 Gewebeproben des TMAs konnten 581 (89,8%) erfolgreich für die PIK3CA-Kopiezahl ausgewertet werden. Die restlichen 66 Gewebespots wurden entweder von der Analyse ausgeschlossen, weil es sich um doppelte Stenzen (n=19) oder Rezidive (n=12) desselben Patienten handelte, weil der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (n=21), oder weil keine FISH-Signale erkennbar waren (n=14). Abbildung 4 zeigt beispielhaft einige Befunde der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenz-Mikroskopie.

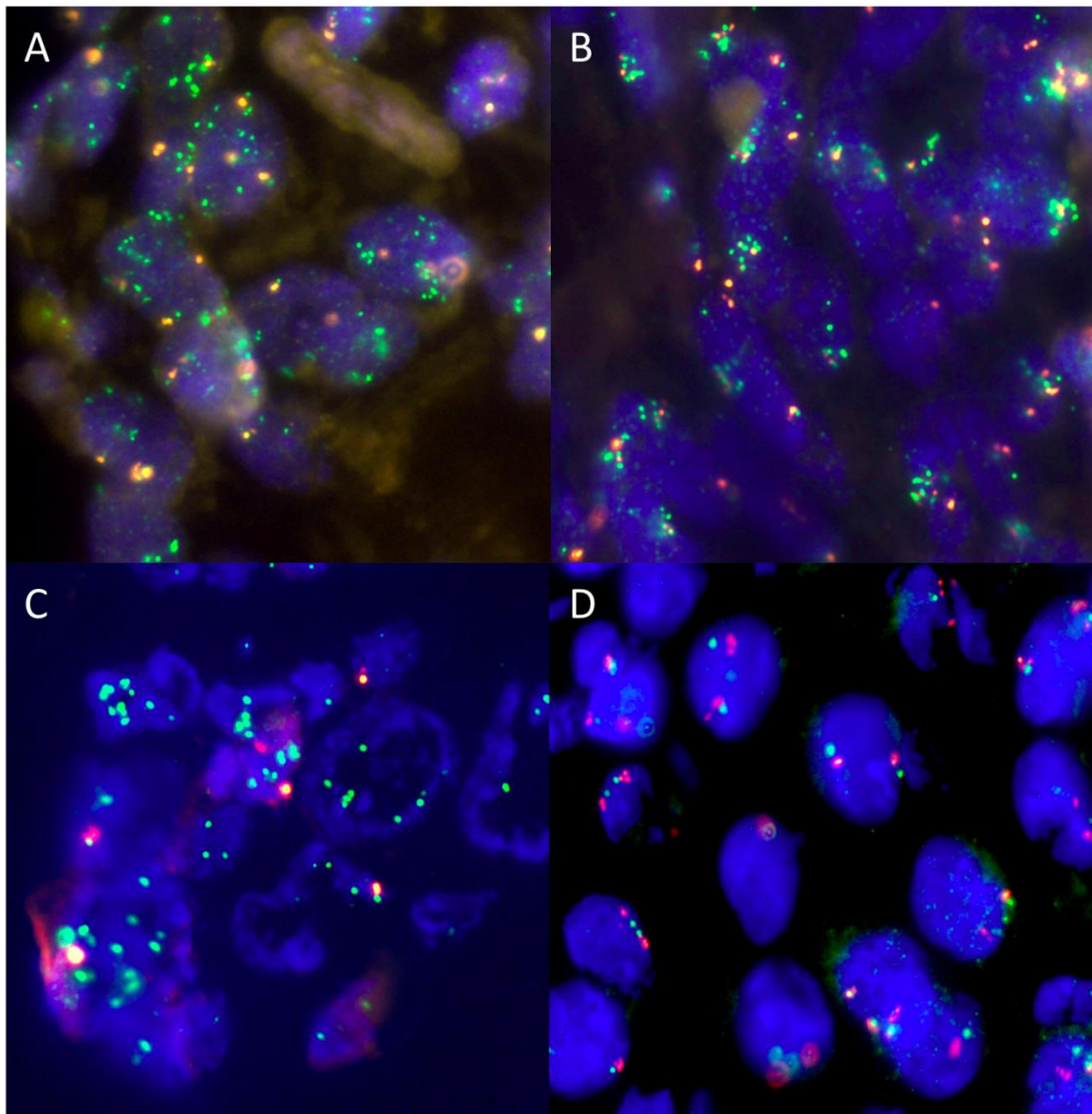


Abbildung 4: Beispiele für PIK3CA-FISH-Befunde. **A-C:** Amplifikationen. Großzelliges Karzinom **(A)** mit 6-15 grünen (PIK3CA) und 1-2 orangefarbenen (Zentromer 3) Signalen, Plattenepithelkarzinom **(B)** mit 20-25 grünen und 2-10 orangefarbenen Signalen, Adenokarzinom **(C)** mit 7-10 grünen und einem orangefarbenen Signal. **D:** Normalbefund (2 grün, 2 orange) bei einem Plattenepithelkarzinom.

3.1 Assoziation zwischen dem Tumorphänotyp und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis

In den 581 analysierbaren Geweben zeigten sich Amplifikationen und Gains gemäß den vordefinierten Kriterien (siehe 2.3) in 18,8% (Amplifikation) und 12,7% (Gain) der Tumoren. Zudem wurde in 8,8% der Tumoren ein relativer PIK3CA-Verlust (weniger Gen- als Zentromersignale) gefunden.

Tumoren mit Amplifikationen zeigten im Mittel 9,9 Genkopien, wobei knapp die Hälfte aller amplifizierten Tumoren (48,6%) High-level-Amplifikationen (10 oder mehr Genkopien) aufwiesen. Tumoren mit einem Gain hatten im Schnitt 4,7 Genkopien (s. Abbildung 5).

Es zeigte sich, dass sowohl Gains als auch Amplifikationen signifikant häufiger in Plattenepithel- (Gains: 19,4%, Amplifikationen: 34,1%, $p < 0,0001$) und großzelligen Karzinomen (Gains: 22,4%, Amplifikationen: 20,4%, $p < 0,0001$) vorkamen als in Adenokarzinomen (Gains: 3,0%, Amplifikationen: 4,0%).

Umgekehrt zeigten Adenokarzinome signifikant häufiger Deletionen des PIK3CA-Lokus als die beiden anderen histologischen Typen ($p < 0,0001$).

Ein klarer Zusammenhang zwischen dem PIK3CA-Status und dem pT-Stadium, dem Differenzierungsgrad oder dem Nodalstatus wurde nicht gefunden. Zwar zeigte ein Chi-Quadrat-Test signifikante p-Werte beim Vergleich der Gruppen, allerdings ist kein eindeutiger proportionaler Anstieg oder Abfall der PIK3CA-Kopiezahl mit zunehmendem pT, pN, oder G ersichtlich, der auf einen relevanten biologischen Zusammenhang schließen lassen könnte, wie Abbildung 6 verdeutlicht. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Abbildung 5: Genkopiezahlen bei Tumoren mit Amplifikationen **(A)** (n=109) und Gains **(B)** (n=74)

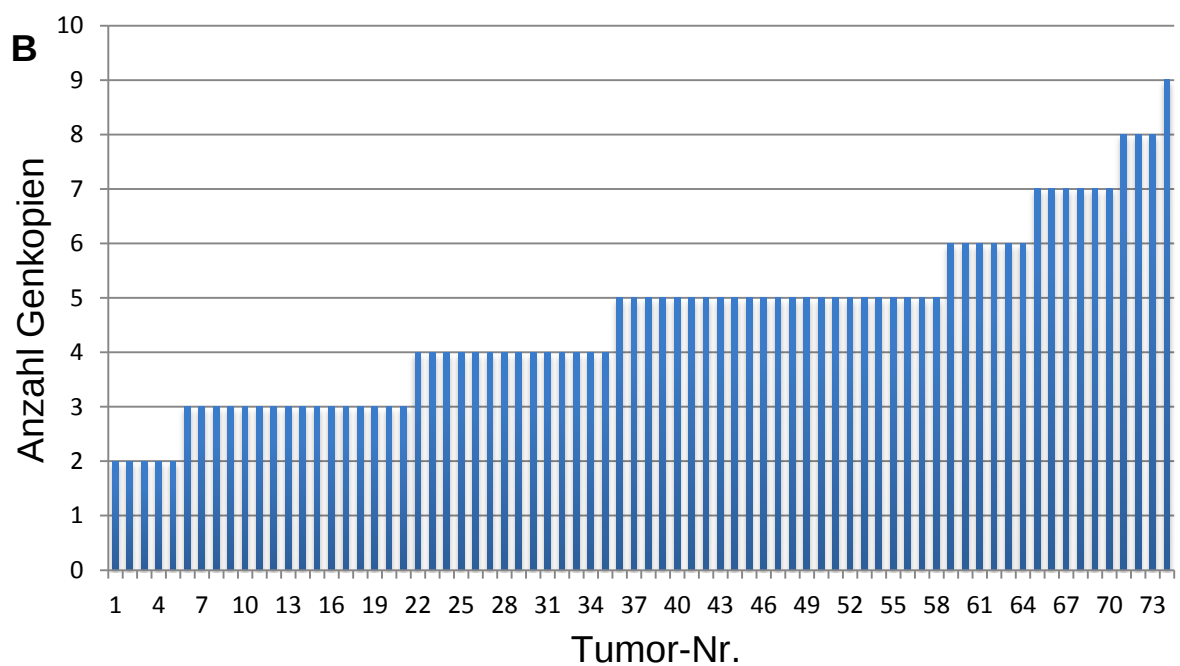
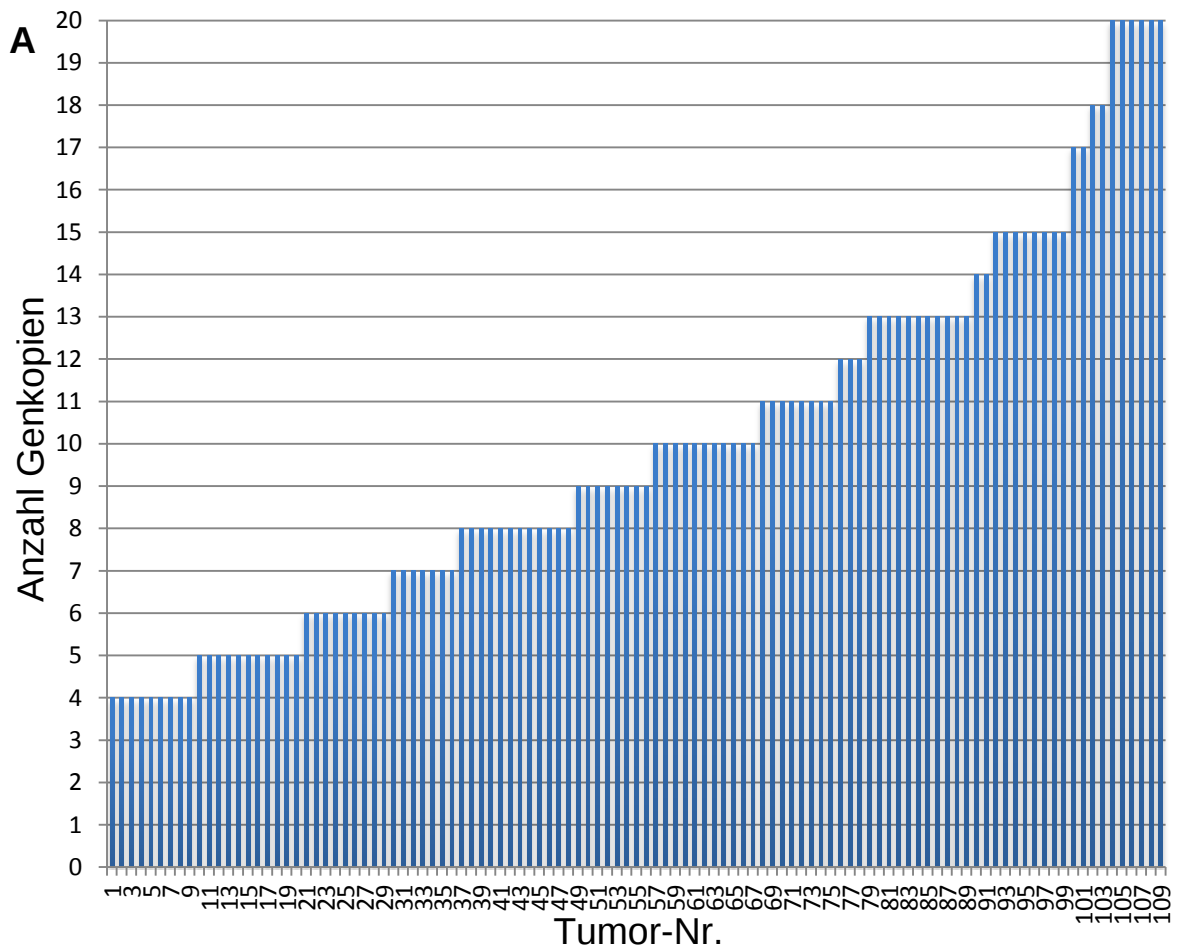


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen Primärtumorausdehnung (A), Nodalstatus (B), Differenzierungsgrad (C) und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis. Trotz signifikanter p-Werte ist keine biologisch relevante Assoziation erkennbar.

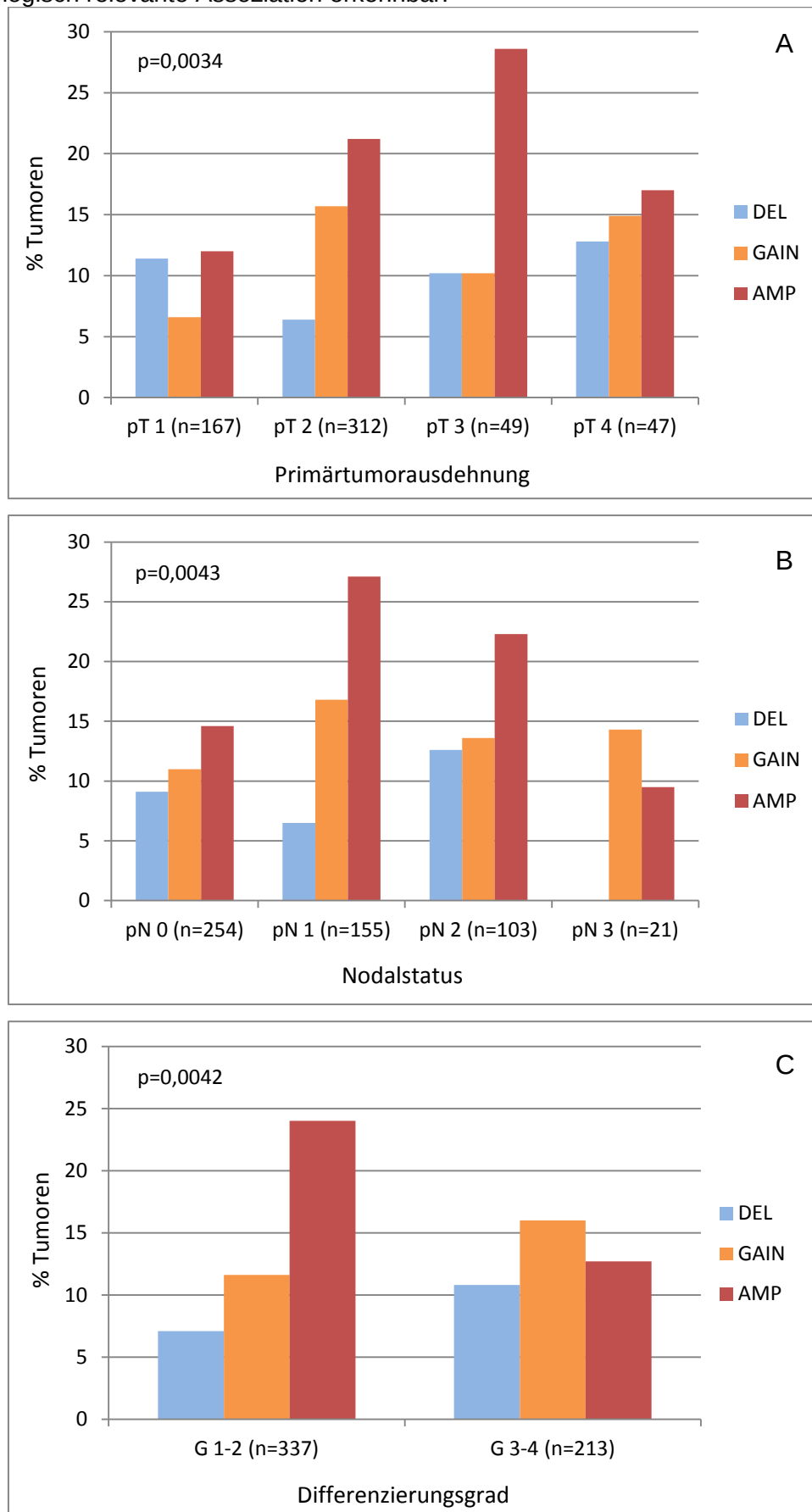


Tabelle 2: Assoziation zwischen dem Tumorphänotyp und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis

Array-Zusammensetzung		Auf TMA	Analysierbar (%)	FISH PIK3CA				p-Wert
				DEL (%)	NORM (%)	GAIN (%)	AMP (%)	
Alle Tumoren		647	581 (89,8)	51 (8,8)	347 (59,7)	74 (12,7)	109 (18,8)	
Histologie	SCC	247	232 (93,9)	4 (1,7)	104 (44,8)	45 (19,4)	79 (34,1)	<0,0001* 0,00145**
	ADC	210	199 (94,8)	31 (15,6)	154 (77,4)	6 (3,0)	8 (4,0)	
	LCC	105	98 (93,3)	5 (5,1)	51 (52,0)	22 (22,4)	20 (20,4)	<0,0001*
	SCLC	19	18 (94,7)	5 (27,8)	11 (61,1)	1 (5,6)	1 (5,6)	
	LCNEC	15	15 (100,0)	4 (26,7)	10 (66,7)	0 (0,0)	1 (6,7)	
	BAC	12	12 (100,0)	1 (8,3)	11 (91,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	cSCLC	5	4 (80,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	cNSCLC	2	2 (100,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	SC	1	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
pT	1	185	167 (90,3)	19 (11,4)	117 (70,1)	11 (6,6)	20 (12,0)	0,0034
	2	320	312 (97,5)	20 (6,4)	177 (56,7)	49 (15,7)	66 (21,2)	
	3	51	49 (96,1)	5 (10,2)	25 (51,0)	5 (10,2)	14 (28,6)	
	4	53	47 (88,7)	6 (12,8)	26 (55,3)	7 (14,9)	8 (17,0)	
pN	0	266	254 (95,5)	23 (9,1)	166 (65,4)	28 (11,0)	37 (14,6)	0,0043***
	1	162	155 (95,7)	10 (6,5)	77 (49,7)	26 (16,8)	42 (27,1)	
	2	108	103 (95,4)	13 (12,6)	53 (51,5)	14 (13,6)	23 (22,3)	
	3	22	21 (95,5)	0 (0,0)	16 (76,2)	3 (14,3)	2 (9,5)	
G	1-2	355	337 (94,9)	24 (7,1)	193 (57,3)	39 (11,6)	81 (24,0)	0,0042
	3-4	228	213 (93,4)	23 (10,8)	129 (60,6)	34 (16,0)	27 (12,7)	

* vs. ADC

** SCC vs. LCC

*** p=0,0086, wenn pN0 vs pN+ (pN 1-3)

3.2 Assoziation zwischen der Zellproliferation und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis

Daten zur Zellproliferation, gemessen am Ki67-LI (LI = „labeling index“; Anteil der immunhistochemisch positiven Tumorzellen in % aller Tumorzellen im mikroskopischen Gesichtsfeld) der einzelnen Tumoren, waren für den verwendeten TMA vorhanden. Für insgesamt 523 Tumoren war sowohl ein Ergebnis für den Ki67-LI, als auch für PIK3CA vorhanden. Ein Vergleich zeigte, dass der Ki67-LI mit steigender PIK3CA-Kopiezahl signifikant zunimmt. So hatten 47 Tumoren mit einer PIK3CA-Deletion einen mittleren Ki67-LI von 16, während 103 Tumoren mit Amplifikation einen LI von 28 zeigten (p=0,004, Abbildung 7). Die Assoziation

zwischen der Zellproliferation und PIK3CA war auch dann signifikant, wenn nur die reine Genkopiezahl berücksichtigt wurde (Abbildung 8).

Abbildung 7: Zusammenhang zwischen dem PIK3CA-Status und der Proliferationsrate.

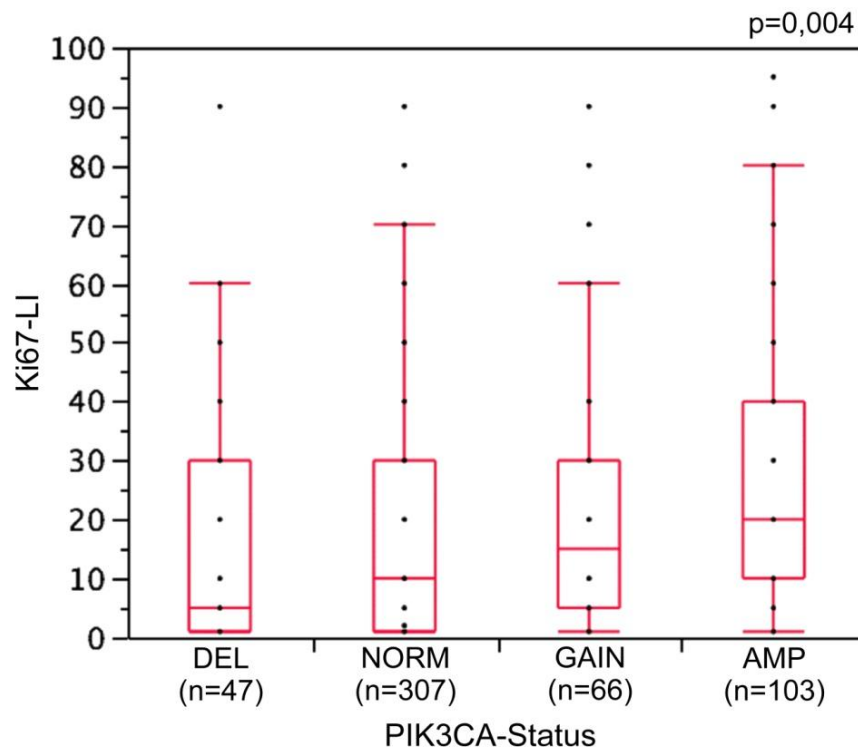
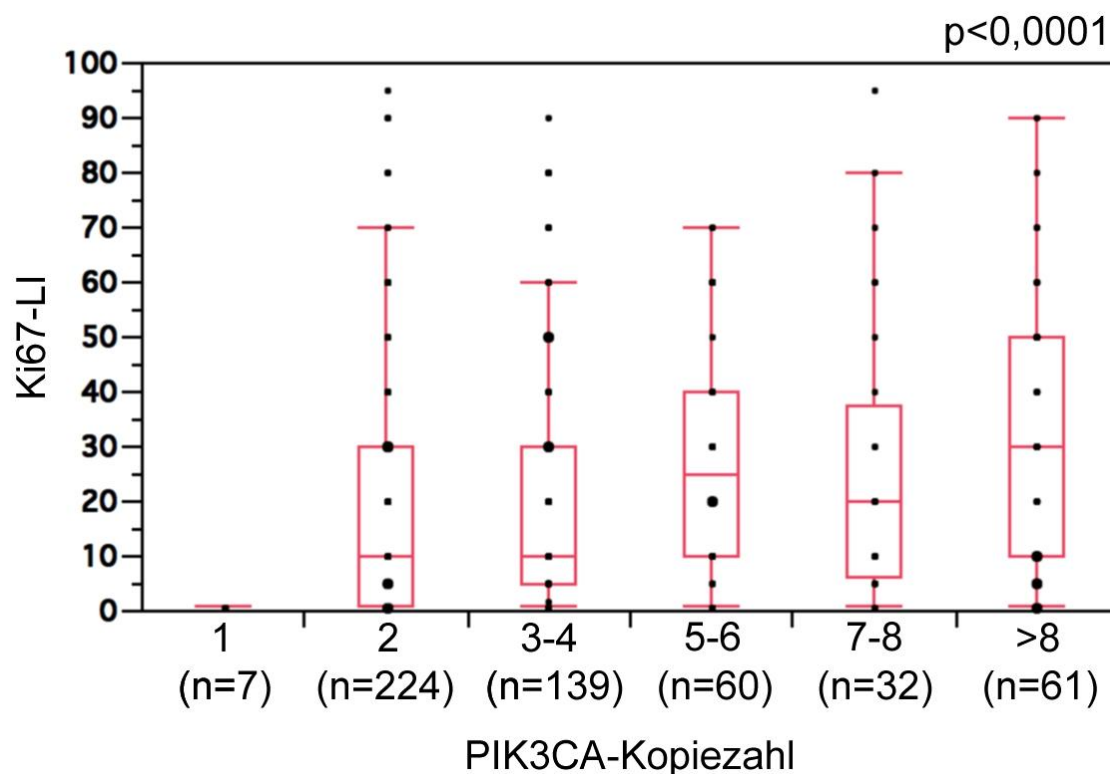


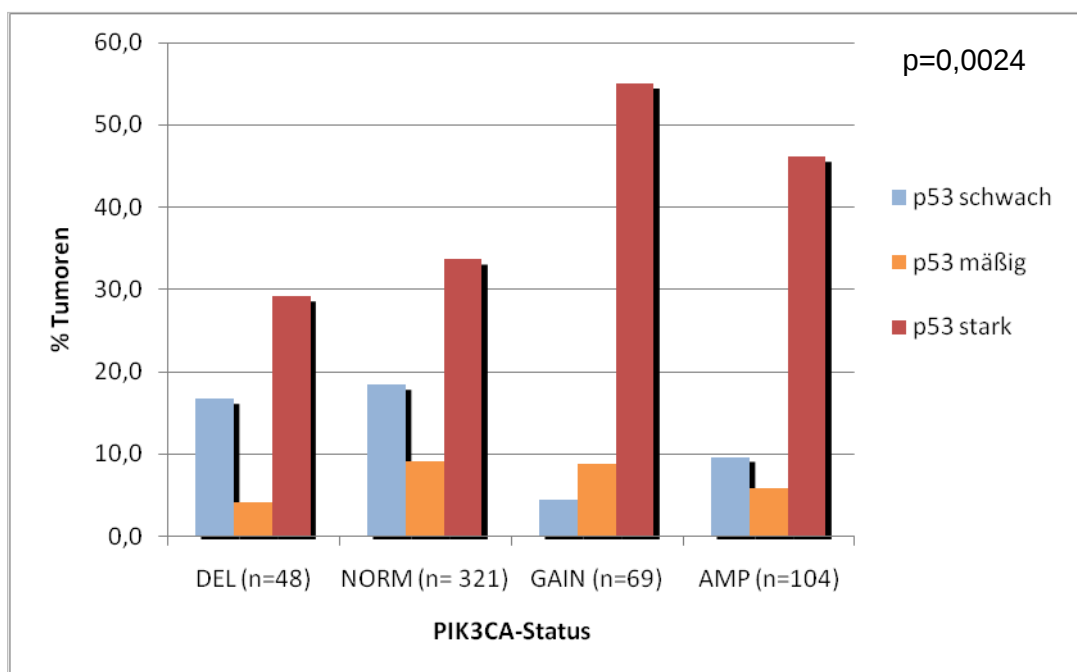
Abbildung 8: Zusammenhang zwischen PIK3CA-Kopiezahl und Proliferationsrate



3.3 Assoziation zwischen dem p53-Status und dem PIK3CA-FISH-Ergebnis

Der p53-Status der Tumoren des TMAs war in einer vorhergehenden Studie analysiert worden. Von insgesamt 542 Tumoren waren Ergebnisse sowohl für die p53-Expression als auch für den PIK3CA-Status vorhanden. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang. Tumoren mit PIK3CA-Gain oder -Amplifikation waren häufiger stark p53-positiv als Tumoren mit PIK3CA-Verlust oder normaler Kopiezahl ($p=0,0024$, Abbildung 9).

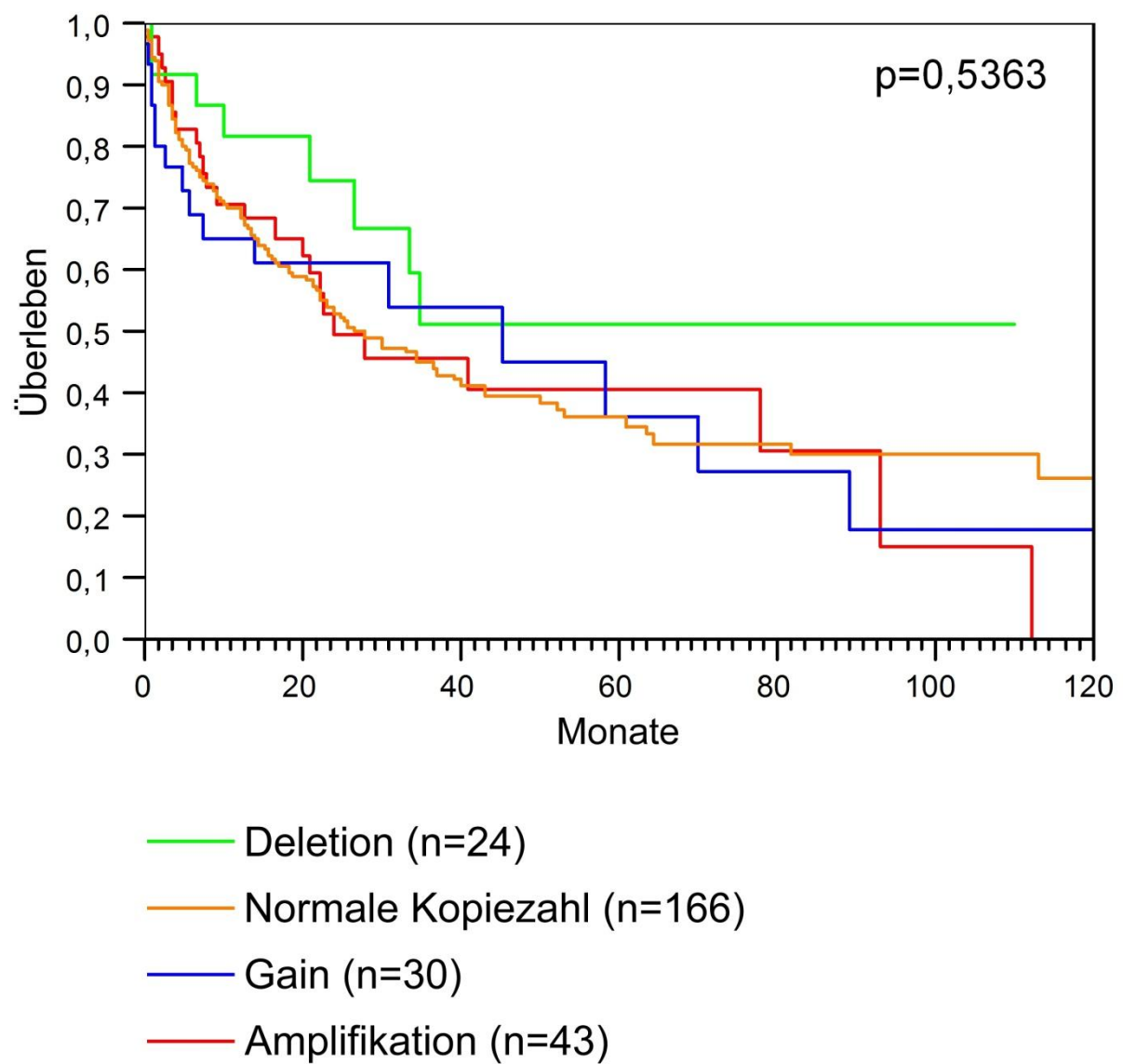
Abbildung 9: Zusammenhang zwischen dem PIK3CA- und dem p53-Status



3.4 Einfluss des PIK3CA-Status auf die Patientenprognose

Von 263 Patienten mit klinischen Verlaufsdaten konnte der PIK3CA-Status bestimmt werden. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Patientenüberleben und PIK3CA-Amplifikationen, -Gains oder -Deletionen zeigte sich jedoch nicht ($p=0,5363$, Abbildung 10).

Abbildung 10: PIK3CA-Status und Patientenüberleben



4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Lungenkarzinom-Gewebemikroarray mit mehr als 600 primären Lungenkarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten auf Amplifikationen des Onkogens PIK3CA untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass PIK3CA-Amplifikationen häufig beim Lungenkarzinom vorkommen, zeigen aber auch deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen histologischen Subtypen auf.

Insgesamt zeigten sich 18,8% Tumoren mit einer PIK3CA-Amplifikation und weitere 12,7% mit einer erhöhten Kopiezahl („Gain“), die den vordefinierten Schwellenwert einer Amplifikation nicht erreichten. Auffällig war, dass die Amplifikation nicht gleichmäßig in allen untersuchten histologischen Subtypen vorlag, sondern signifikant häufiger die Plattenepithelkarzinome (34%) und die großzelligen Karzinome (20%) betraf, während im ebenfalls häufigen Subtyp der Adenokarzinome nur vergleichsweise wenige (4%) Amplifikationen zu finden waren. Diese Ergebnisse unterstützen nicht nur die Hypothese, dass Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome eine unterschiedliche Tumorigenese haben könnten (Pei et al. 2001, Petersen et al. 1997b), sondern deuten auch darauf hin, dass großzellige Karzinome ebenfalls auf einem anderen Wege entstehen könnten als Adenokarzinome. Die gefundenen Amplifikationshäufigkeiten stimmen gut mit denen in anderen Studien überein. So zeigen die Studien von Angulo et al., Massion et al. und Okudela et al., die ebenfalls FISH an TMAs als Detektionsmethode verwendeten, PIK3CA-Amplifikationsraten von rund 18-33% (Angulo et al. 2008, Massion et al. 2002 und 2004, Okudela et al. 2007). Kawano et al. und Yamamoto et al. fanden mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) 12 bzw. 17% Amplifikationen (Kawano et al. 2007, Yamamoto et al. 2008). Neben der ähnlichen Gesamtamplifikationsrate zeigt sich in Zusammenschau mit den Ergebnissen der anderen Untersuchungen auch eine vergleichbare Verteilung der Amplifikationshäufigkeit auf die einzelnen histologischen Subtypen (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Amplifikationshäufigkeiten der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu anderen Untersuchungen:

	Massion et al. 2002	Massion et al. 2004	Kawano et al. 2007	Okudela et al. 2007	Angulo et al. 2008	Yamamoto et al. 2008	Vorliegende Arbeit
Methode	FISH an TMA	FISH an TMA	qRT-PCR	FISH an TMA	FISH an TMA	qRT-PCR	FISH an TMA
PIK3CA-Amplifikationen							
Gesamt	27%	33%	12%	18%	22%	17%	19%
SCC	60%	61%	36%	43%	42%	33%	34%
LCC	n. u.	25%	k. A.	17%	20%	k. A.	20%
ADC	0%	17%	k. A.	10%	3%	6%	4%
SCLC	n. u.	17%	n. u.	50%	n. u.	n. u.	6%

k. A.: keine Angaben

n. u.: nicht untersucht

Die Adenokarzinome auf dem LUN1.1-TMA zeigten dagegen häufig (16%) Deletionen des PIK3CA-Lokus. Dieses Ergebnis passt gut zu den Ergebnissen einer Studie von Petersen et al. (Petersen et al. 1997a), die beim Vergleich von 25 Adeno- und 25 Plattenepithelkarzinomen signifikant häufiger 3q-Deletionen in Adeno- (36%) als in Plattenepithelkarzinomen (20%) fanden. Der Befund untermauert daher weiterhin die Hypothese einer unterschiedlichen Tumorigenese der beiden Entitäten. Es ist allerdings zu vermuten, dass PIK3CA – alleine schon aufgrund seiner onkogenen Funktion – eher nicht das biologisch relevante Zielgen der 3q26-Deletion ist. Die gefundenen 3q26-Deletionen könnten alternativ auf ein bisher unbekanntes Tumorsuppressorgen mit Relevanz für die Entstehung von Adenokarzinomen deuten. Bisher wurde jedoch lediglich in einer Studie an Osteosarkomen (Kruzelock et al. 1997) in diesem Bereich ein Tumorsuppressorgen vermutet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte FISH-Analyse ist aber auch nicht geeignet, die Ausdehnung der Deletion auf dem Chromosom zu beurteilen. Es ist möglich, dass die gefundenen Deletionen zumindest in einem Teil der Fälle nicht spezifisch für den 3q26-Lokus sind, sondern auf großräumige Verluste bis hin zum gesamten 3q-Arm hinweisen. Komplette 3q-Verluste wurden in Lungenkarzinomen wiederholt beobachtet (Petersen et al. 1997a und 1997b).

Es wäre theoretisch auch denkbar, dass der PIK3CA-Verlust in diesen Tumoren nicht biologisch relevant ist, wenn gleichzeitig eine Inaktivierung des direkten molekularen Antagonisten von PIK3CA, nämlich des PTEN-Tumorsuppressorgens auf 10q23, vorliegen würde. Tatsächlich wird in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen häufig (34-74%) (Cetin et al. 2010, Marsit et al. 2005, Soria et al. 2002) eine Herabregulierung des PTEN-Proteins beobachtet, wobei jedoch genomische PTEN-Aberrationen (Mutationen oder Deletionen) eher selten (<5%) als Ursache zu sehen sind und die Herabregulierung nur teilweise einer epigenetischen Stummschaltung des PTEN-Gens durch Promotor-Hypermethylierung zugeordnet werden kann (Jin et al. 2010, Yokomizo et al. 1998). Allerdings finden sich in der bisherigen Literatur keine eindeutigen Hinweise darauf, dass PTEN-Verluste gehäuft in Adenokarzinomen auftreten, sodass eine mögliche Koinzidenz von PTEN-Inaktivierung und PIK3CA-Verlust weitestgehend spekulativ ist.

Auch die kleinzelligen Karzinome, die als besonders aggressiv gelten und nur sehr schlecht auf Chemotherapien ansprechen, zeigten nur verhältnismäßig selten PIK3CA-Amplifikationen (5,6%). Allerdings muss die Aussagekraft dieses Wertes mit Vorbehalt betrachtet werden, da der in dieser Arbeit verwendete Array mit 19 Gewebeproben von kleinzelligen Lungenkarzinomen (wovon 18 analysierbar waren) zwar im Vergleich zu bisherigen Studien relativ viele Proben enthält (2 bei Massion et al. 2004 und 12 bei Okudela et al. 2007), es sich aber absolut betrachtet immer noch um eine kleine Probenanzahl handelt.

Ein Einfluss der Amplifikationshäufigkeit auf den Tumorphänotyp (Primärtumorausdehnung, Differenzierungsgrad, Nodalstatus) wurde nicht ersichtlich. Dieser Befund stimmt gut mit den Studien von Kawano et al. und Massion et al. überein, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der PIK3CA-Amplifikation und der Primärtumorausdehnung, dem Nodalstatus oder dem Tumorstadium fanden (Kawano et al. 2007, Massion et al. 2004). Dies weist darauf hin, dass PIK3CA vermutlich keine biologische Rolle für die Tumorprogression ausübt. Es könnte sich daher eher um eine verhältnismäßig frühe Veränderung handeln, die möglicherweise mit der Tumorinitiation assoziiert ist. Auch die Ergebnisse der Untersuchung von plattenepithelialen Dysplasien und Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Halsbereich von Woenckhaus et al. deuten auf eine frühe Rolle von PIK3CA-Amplifikationen beim

Übergang von niedriggradigen über hochgradige Dysplasien zu invasiven Karzinomen hin. So fanden sich hier erhöhte Kopiezahl im Bereich von 3q26 bei 17% der untersuchten niedrig- bis mittelgradigen Dysplasien, sowie bei 78% in hochgradigen Dysplasien und bei 100% der untersuchten Karzinome. Gleichzeitig war mit der erhöhten Kopiezahl auch eine erhöhte p110 α -mRNA- und -Proteinexpression assoziiert (Woenckhaus et al. 2002). Auch Massion et al. fanden eine erhöhte PIK3CA-Kopiezahl in mittel- bis hochgradigen plattenepithelialen Dysplasien der Bronchialschleimhaut und Carcinomata in situ, wobei in normaler Schleimhaut und leichtgradigen Dysplasien nur normale Kopiezahlen beobachtet wurden (Massion et al. 2004).

Im Hinblick auf die generell schlechte Prognose ist es nicht überraschend, dass sich in dieser Untersuchung kein Einfluss des PIK3CA-Status auf die Überlebenszeit von Lungenkarzinom-Patienten fand. Auch dieser Befund wird durch publizierte Daten aus zumindest einer anderen Studie bestätigt (Massion et al. 2004). In einer anderen Studie (Kawano et al. 2007) fand sich jedoch eine geringere Überlebensrate für Patienten mit PIK3CA-amplifizierten Lungenkarzinomen, wobei den Ergebnissen von Kawano et al. eine geringere Fallzahl (n=92) zugrunde liegt, als denen von Massion et al. (n=132) und denen der vorliegenden Arbeit (n=263).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine starke Assoziation mit der Zellproliferation, gemessen am Ki67-LI. Dabei zeigte sich eine direkte Gen-Dosis-Abhängigkeit: Tumoren mit PIK3CA-Deletion oder wenigen Genkopien hatten die geringste Proliferationsrate, während Tumoren mit hochgradigen Amplifikationen oder hoher Kopiezahl die höchste hatten. Dieser Befund passt gut zu dem bekannten, direkten Einfluss von PIK3CA auf die Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges. Dieser Signalweg reguliert unter anderem Zellwachstum, -proliferation, -migration, Angiogenese und Apoptose (Manning und Cantley 2007). Bemerkenswert ist, dass für die Aktivierung des Signalweges die Amplifikation nur der katalytischen, von PIK3CA kodierten Untereinheit p110 α , unabhängig vom Vorliegen einer Amplifikation der regulatorischen Untereinheit von PI3K, p85 α , ausreicht. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass p85 α einen inhibitorischen Effekt auf p110 α hat (Yu et al. 1998). Für p110 α , welche durch Mutation die Bindungsstelle für p85 α verloren hat, konnte eine tumorigene Aktivität nachgewiesen werden (Zhao und Vogt 2008). Passend dazu

zeigte sich eine PI3K-vermittelte Tumorigenese durch mutierte und dadurch nicht mehr inhibierend auf p110 α wirkende p85 α (Jaiswal et al. 2009). So ist der Effekt der PIK3CA-Amplifikation nachvollziehbar, da in PIK3CA-amplifizierten Tumorzellen mehr p110 α vorliegen muss, als von p85 α inhibiert werden kann. Einige Studien belegen, dass PIK3CA-Amplifikationen die PIK3CA-Expression hochregulieren und somit auch die PI3K-Aktivität erhöhen (Angulo et al. 2008, Okudela et al. 2007, Woenckhaus et al. 2002).

Der beobachtete Zusammenhang zwischen nukleärer p53-Akkumulation und PIK3CA-Amplifikation war erwartet und stützt damit weiter die Validität der erhobenen Daten. Der immunhistochemische Nachweis von p53 ist weitestgehend gleichbedeutend mit einer p53-Genmutation zu sehen (Gemba et al. 2000). Wildtyp-p53-Protein kann aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit im Gewebe (6-20 Minuten) praktisch nicht mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden, während mutiertes p53, welches eine Halbwertszeit von mehreren Stunden aufweist, akkumuliert und dann oft immunhistochemisch darstellbar wird (Gannon et al. 1990). Ausnahmen sind jedoch Mutationen, die dazu führen, dass kein Epitop mehr gebildet wird, welches durch einen Antikörper detektierbar wäre, wie z.B. bei Nonsense-Mutationen. Tumoren mit mutiertem p53 sind durch Defekte in der Apoptose und DNA-Reparatur gekennzeichnet (Levine 1997) und akkumulieren daher genetische Veränderungen wie Genmutationen und strukturelle Chromosomveränderungen (Moll und Schramm 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass PIK3CA auch in Lungenkarzinomen ein lohnendes Ziel für neue, gezielte Therapien sein könnte. Tatsächlich sind bereits mehrere PI3K-Inhibitoren in Entwicklung (Kong und Yamori 2009). Vielversprechend scheint der Angriff an mehreren Orten des PI3K/Akt-Signalweges zu sein, so z.B. an PI3K und an mTOR, welches im PI3K/Akt-Signalweg Akt nachgeschaltet ist. Neben der dadurch erzielten höheren Wirksamkeit spielt auch die Verträglichkeit für die Patienten eine wesentliche Rolle. p110 α scheint eine kardioprotektive Wirkung zu haben, was mit zur Erklärung der kardialen Nebenwirkungen bei onkologischen Patienten unter der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren beiträgt. Bei mTOR-Inhibitoren wurden bisher keine Nebenwirkungen am Herzen beschrieben, weshalb sie sich für den Einsatz im

Rahmen gezielter Therapien, insbesondere bei kardial risikobehafteten Patienten, anbieten (Ayril-Kaloustian et al. 2010, McMullen und Jay 2007, Zou et al. 2009). Der oral verfügbare PI3K-Inhibitor „GDC-0941“ wird derzeit in klinischen Phase I-Studien getestet (Raynaud et al. 2009). Auch der duale PI3K/mTOR-Inhibitor „NVP-BEZ235“ befindet sich bereits in den Phasen I und II der klinischen Erprobung (Manara et al. 2010).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass PIK3CA-Amplifikationen häufig in Lungenkarzinomen, insbesondere in Plattenepithel- und großzelligen Karzinomen vorkommen. Es scheint sich dabei um ein früh auftretendes Ereignis bei der Tumorentwicklung zu handeln, da sich der PIK3CA-Amplifikationsstatus unabhängig von Primärtumorausdehnung, Nodalstatus und Differenzierungsgrad zeigte. Das Vorliegen einer PIK3CA-Amplifikation ist assoziiert mit einer hohen Tumorphiliferationsrate, gemessen am Ki67-LI, und dem Vorliegen einer p53-Mutation, gemessen am immunhistochemischen Nachweis der nukleären Akkumulation von p53. Das in Plattenepithel- und großzelligen Karzinomen signifikant häufiger als in Adenokarzinomen gefundene Auftreten von PIK3CA-Amplifikationen deutet auf eine unterschiedliche Tumorigenese hin. Die Ergebnisse sprechen weiterhin dafür, dass PIK3CA bzw. PI3K ein vielversprechendes Ziel für eine gezielte Krebstherapie sein könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Lungenkarzinom ist derzeit die weltweit häufigste Krebsart und zeichnet sich bei bislang unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten durch eine besonders ungünstige Prognose aus. Mit dem Wunsch nach einem besseren Verständnis der Tumorbilogie und im Hinblick auf die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten fanden sich in letzter Zeit bei der Identifizierung tumorspezifischer Genprofile in Lungenkarzinomen chromosomale Abschnitte mit erhöhter Kopiezahl, insbesondere auf dem langen Arm des Chromosoms 3 bei 3q26, einem Bereich in dem das Gen PIK3CA lokalisiert ist, welches eine wichtige Rolle im onkogenen PI3K/Akt-Signalweg spielt. In dieser Arbeit wurde ein Gewebearray mit 647 Lungenkarzinomen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf das Vorliegen von PIK3CA-Amplifikationen untersucht und die Ergebnisse mit zugehörigen histopathologischen und klinischen Nachbeobachtungsdaten, sowie mit Daten für den immunhistochemischen Nachweis von p53 und Ki67 verglichen. Von den 581 analysierbaren Tumorproben des Arrays zeigten insgesamt 18,8% eine PIK3CA-Amplifikation und 12,7% eine erhöhte Kopiezahl. Besonders häufig fanden sich Amplifikationen in Plattenepithel- (34,1%) und großzelligen Karzinomen (20,4%). Deletionen zeigten sich gehäuft in Adenokarzinomen (15,6%). Diese Befunde deuten auf eine unterschiedliche Tumorigenese von Adeno- und Plattenepithel- bzw. großzelligen Karzinomen hin. Der PIK3CA-Status zeigte sich unabhängig von der Patientenprognose und vom Tumorphänotyp (pT, pN, G), was vermuten lässt, dass PIK3CA-Amplifikationen mit einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung von Lungenkarzinomen verknüpft sind. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Amplifikation und einer erhöhten Proliferationsrate, gemessen am Ki67-LI, was für die Validität der Befunde spricht, da die der PI3K nachgeschaltete Proteinkinase B (Akt) unter anderem die Zellproliferation hochreguliert. Weiterhin zeigten sich die PIK3CA-Amplifikationen mit dem Vorliegen einer p53-Mutation, gemessen am immunhistochemischen Nachweis einer nukleären p53-Akkumulation, assoziiert. Dies war zu erwarten, da ein Verlust der p53-Funktion als wichtige Ursache für die Anhäufung genomischer Aberrationen wie Genamplifikationen gilt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass man sich vom Einsatz von PI3K-Inhibitoren einen Fortschritt bei der Therapie von Lungenkarzinomen, insbesondere bei Plattenepithel- und großzelligen Karzinomen erhoffen darf.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADC	Adenokarzinom
AMP	Amplifikation (Vorliegen einer erhöhten Kopiezahl mit Erreichen des definierten Schwellenwertes für das Vorliegen einer Amplifikation)
BAC	Bronchioloalveoläres Karzinom
CFS	Common fragile site
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
cNSCLC	Kombinierter Tumor ohne Anteile eines kleinzelligen Karzinoms
cSCLC	Kombinierter Tumor mit Anteilen eines kleinzelligen Karzinoms
DEL	„Deletion“ (Vorliegen einer verringerten Kopiezahl)
DM	Double minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	Differenzierungsgrad
GAIN	„Gain“ (Vorliegen einer erhöhten Kopiezahl, ohne den definierten Schwellenwert einer Amplifikation zu erreichen)
HSR	Homogeneously staining region
IGF1	Insuline like growth factor 1
Ki67-LI	Ki67-labeling index
LCC	Großzelliges Karzinom
LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom
MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
mTORC	mTOR-Komplex
NORM	„Normal“ (Vorliegen einer normalen Kopiezahl)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-3-Kinase - Katalytische Untereinheit
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pN	Nodalstatus

pT	Ausdehnung des Primärtumors
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
SC	Sarkomatoides Karzinom
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SCT	Standard controll tissue
shRNA	small hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMA	Tissue micro array
Zen	Zentromer

7 LITERATURVERZEICHNIS

Angulo B, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Medina PP, Conde E, Tang M, Soler G, Lopez-Encuentra A, Cigudosa JC, Sanchez-Cespedes M (2008) Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol* 214(3):347-56.

Attar RM, Takimoto CH, Gottardis MM (2009) Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res* 15(10):3251-5.

Ayral-Kaloustian S, Gu J, Lucas J, Cinque M, Gaydos C, Zask A, Chaudhary I, Wang J, Di L, Young M, Ruppen M, Mansour TS, Gibbons JJ, Yu K (2010) Hybrid inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR): design, synthesis, and superior antitumor activity of novel wortmannin-rapamycin conjugates. *J Med Chem* 53(1):452-9.

Balaban-Malenbaum G, Gilbert F (1977) Double minute chromosomes and the homogeneously staining regions in chromosomes of a human neuroblastoma cell line. *Science* 198(4318):739-41.

Balsara BR, Testa JR (2002) Chromosomal imbalances in human lung cancer. *Oncogene* 21(45):6877-83.

Björkqvist AM, Tammilehto L, Nordling S, Nurminen M, Anttila S, Mattson K, Knuutila S (1998) Comparison of DNA copy number changes in malignant mesothelioma, adenocarcinoma and large-cell anaplastic carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 77(2):260-9.

Board RE, Thelwell NJ, Ravetto PF, Little S, Ranson M, Dive C, Hughes A, Whitcombe D (2008) Multiplexed assays for detection of mutations in PIK3CA. *Clin Chem* 54(4):757-60.

Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C (1999) Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol* 188(4):351-60 [Comment in: *J Pathol* 188(4):341-3].

Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, Graziano S, Sorenson GD, Poiesz BJ, Minna J, et al. (1987) Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 317(18):1109-13.

Brookwell R, Hunt FA (1988) Formation of double minutes by breakdown of a homogeneously staining region in a refractory anemia with excess blasts. *Cancer Genet Cytogenet* 34(1):47-52.

Brugge J, Hung MC, Mills GB (2007) A new mutational Aktivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell* 12(2):104-7.

Byun DS, Cho K, Ryu BK, Lee MG, Park JI, Chae KS, Kim HJ, Chi SG (2003) Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 104(3):318-27.

Cantley LC (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296(5573):1655-7.

Cetin Z, Ozbilim G, Erdogan A, Luleci G, Karauzum SB (2010) Evaluation of PTEN and Mcl-1 expressions in NSCLC expressing wild-type or mutated EGFR. *Med Oncol* 27(3):853-60.

Chapuis N, Tamburini J, Green AS, Vignon C, Bardet V, Neyret A, Pannetier M, Willems L, Park S, Maccone A, Maira SM, Ifrah N, Dreyfus F, Herault O, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D (2010) Dual inhibition of PI3K and mTORC1/2 signaling by NVP-BEZ235 as a new therapeutic strategy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 16(22):5424-35.

Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316(5827):1039-43.

Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J (2007) Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 18(1):253-9.

Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP (1990) Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 9(5):1595-602.

Gazzeri S, Della Valle V, Chaussade L, Brambilla C, Larsen CJ, Brambilla E (1998) The human p19ARF protein encoded by the beta transcript of the p16INK4a gene is frequently lost in small cell lung cancer. *Cancer Res* 58(17):3926-31.

Gemba K, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Harada M (2000) Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in small-cell lung cancer: relationship to treatment outcome. *Lung Cancer* 29(1):23-31.

Hahn PJ (1993) Molecular biology of double-minute chromosomes. *Bioessays* 15(7):477-84.

Hellman A, Zlotorynski E, Scherer SW, Cheung J, Vincent JB, Smith DI, Trakhtenbrot L, Kerem B (2002) A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. *Cancer Cell* 1(1):89-97.

Huber RM (Bd.Hrg), Tumorzentrum München (Hrg) (2009) Tumoren der Lunge und des Mediastinums: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 8. Auflage, Zuckschwerdt, München, Wien, New York.

Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, Dela Vega T, Kenski DM, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Modrusan Z, Stinson J, Eby M, Yue P, Kaminker JS, de Sauvage FJ, Backer JM, Seshagiri S (2009) Somatic mutations in p85alpha promote tumorigenesis through class IA PI3K activation. *Cancer Cell* 16(6):463-74 [Comment in: *Cancer Cell* 16(6):449-50].

Janmaat ML, Rodriguez JA, Gallegos-Ruiz M, Krut FA, Giaccone G (2006) Enhanced cytotoxicity induced by gefitinib and specific inhibitors of the Ras or phosphatidylinositol-3 kinase pathways in non-small cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 118(1):209-14 [Erratum in: *Int J Cancer* 118(9):2370].

Jin G, Kim MJ, Jeon HS, Choi JE, Kim DS, Lee EB, Cha SI, Yoon GS, Kim CH, Jung TH, Park JY (2010) PTEN mutations and relationship to EGFR, ERBB2, KRAS, and TP53 mutations in non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 69(3):279-83.

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, Smith HS, Waldman FM, Pinkel D, Gray JW (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12):5321-5.

Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, Kobayashi Y, Yano M, Fujii Y (2006) PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer* 54(2):209-15.

Kawano O, Sasaki H, Okuda K, Yukiue H, Yokoyama T, Yano M, Fujii Y (2007) PIK3CA gene amplification in Japanese non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58(1):159-60.

Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H (2007) PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* 113(3):295-302.

Kong D, Yamori T (2009) Advances in development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Curr Med Chem* 16(22):2839-54.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4(7):844-7 [Comment in: *Nat Med* 4(7):767-8].

Kruzelock RP, Murphy EC, Strong LC, Naylor SL, Hansen MF (1997) Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Res* 57(1):106-9.

Lerman MI, Minna JD for the International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium (2000) The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *Cancer Res* 60(21):6116-33.

Levin NA, Brzoska PM, Warnock ML, Gray JW, Christman MF (1995) Identification of novel regions of altered DNA copy number in small cell lung tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 13(3):175-85.

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-31.

Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8(8):627-44.

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrg) (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. völlig neu bearbeitete Auflage. Springer, Heidelberg.

Lu YJ, Dong XY, Shipley J, Zhang RG, Cheng SJ (1999) Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 23(1):61-6.

Luk C, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F, Squire JA (2001) Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 125(2):87-99.

Manara MC, Nicoletti G, Zambelli D, Ventura S, Guerzoni C, Landuzzi L, Lollini PL, Maira SM, García-Echeverría C, Mercuri M, Picci P, Scotlandi K (2010) NVP-BEZ235 as a new therapeutic option for sarcomas. *Clin Cancer Res* 16(2):530-40.

Manning BD, Cantley LC (2007) Akt/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7):1261-74.

Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT (2005) PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol* 36(7):768-76.

Massion PP, Kuo WL, Stokoe D, Olshen AB, Treseler PA, Chin K, Chen C, Polikoff D, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG, Jablons DM, Gray JW (2002) Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res* 62(13):3636-40.

Massion PP, Taflan PM, Shyr Y, Rahman SM, Yildiz P, Shakthour B, Edgerton ME, Ninan M, Andersen JJ, Gonzalez AL (2004) Early involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in lung cancer progression. *Am J Respir Crit Care Med* 170(10):1088-94.

McMullen JR, Jay PY (2007) PI3K(p110alpha) inhibitors as anti-cancer agents: minding the heart. *Cell Cycle* 6(8):910-3.

Miller CT, Moy JR, Lin L, Schipper M, Normolle D, Brenner DE, Iannettoni MD, Orringer MB, Beer DG (2003) Gene amplification in esophageal adenocarcinomas and Barrett's with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res* 9(13):4819-25.

Mitsuuchi Y, Testa JR (2002) Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* 115(3):183-8.

Miyake T, Yoshino K, Enomoto T, Takata T, Ugaki H, Kim A, Fujiwara K, Miyatake T, Fujita M, Kimura T (2008) PIK3CA gene mutations and amplifications in uterine cancers, identified by methods that avoid confounding by PIK3CA pseudogene sequences. *Cancer Lett* 261(1):120-6.

Moll UM, Schramm LM (1998) p53--an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 9(1):23-37.

Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ, Cope L, Pohl G, Samuels Y, Velculescu VE, Wang TL, Shih IeM (2006) Sequence mutations and amplification of PIK3CA and Akt2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther* 5(7):779-85 [Comment in: *Cancer Biol Ther* 5(7):786-7].

Nakayama K, Nakayama N, Jinawath N, Salani R, Kurman RJ, Shih IeM, Wang TL (2007) Amplicon profiles in ovarian serous carcinomas. *Int J Cancer* 120(12):2613-7.

Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY (1987) Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* 329(6138):451-4.

Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY (1987) Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* 329(6138):451-4.

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, Sugimura H (2007) PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int* 57(10):664-71 [Erratum in: *Pathol Int* 57(11):757].

Pedrero JM, Carracedo DG, Pinto CM, Zapatero AH, Rodrigo JP, Nieto CS, Gonzalez MV (2005) Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/Akt/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 114(2):242-8.

Pei J, Balsara BR, Li W, Litwin S, Gabrielson E, Feder M, Jen J, Testa JR (2001) Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 31(3):282-7.

Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M. (1997a) Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 75(1):79-86.

Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T (1997b) Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 57(12):2331-5.

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P (2002) Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21(48):7435-51.

Raynaud FI, Eccles SA, Patel S, Alix S, Box G, Chuckowree I, Folkes A, Gowan S, De Haven Brandon A, Di Stefano F, Hayes A, Henley AT, Lensun L, Pergl-Wilson G, Robson A, Saghir N, Zhyvoloup A, McDonald E, Sheldrake P, Shuttleworth S, Valenti M, Wan NC, Clarke PA, Workman P (2009) Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol Cancer Ther* 8(7):1725-38.

Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schröck E, du Manoir S, Cremer T (1994) Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 54(7):1801-6.

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113(1):237-51.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage, Berlin.

Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, Slebos RJ, Mooi WJ, van't Veer L, van Zandwijk N (1997) Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J Clin Oncol* 15(1):285-91.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712):1098-101.

Schwab M (1999) Oncogene amplification in solid tumors. *Semin Cancer Biol* 9(4):319-25.

Schwab M, Amler LC (1990) Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1(3):181-93.

Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Hirohashi S (2009) Oncogenic mutation of PIK3CA in small cell lung carcinoma: a potential therapeutic target pathway for chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Lett* 283(2):203-11.

Soria JC, Lee HY, Lee JI, Wang L, Issa JP, Kemp BL, Liu DD, Kurie JM, Mao L, Khuri FR (2002) Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clin Cancer Res* 8(5):1178-84.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455(7216):1061-8.

Toledo F, Le Roscouet D, Buttin G, Debatisse M (1992) Co-amplified markers alternate in megabase long chromosomal inverted repeats and cluster independently in interphase nuclei at early steps of mammalian gene amplification. *EMBO J* 11(7):2665-73.

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (Hrg) (2004) World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon.

Vokes EE, Chu E (2006) Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers. *Oncology (Williston Park)* 20(5 Suppl 2):15-25.

Volinia S, Hiles I, Ormondroyd E, Nizetic D, Antonacci R, Rocchi M, Waterfield MD (1994) Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics* 24(3):472-7.

Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U (2002) Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol* 198(3):335-42.

Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B, Sidransky D (2005a) Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7(5):R609-16.

Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, Trink B, Ladenson PW, Sidransky D, Xing M (2005b) Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90(8):4688-93.

Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, Soh J, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Date H, Lam WL, Minna JD, Gazdar AF (2008) PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res* 68(17):6913-21.

Yokomizo A, Tindall DJ, Drabkin H, Gemmill R, Franklin W, Yang P, Sugio K, Smith DI, Liu W (1998) PTEN/MMAC1 mutations identified in small cell, but not in non-small cell lung cancers. *Oncogene* 17(4):475-9.

Yokota J, Kohno T (2004) Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci* 95(3):197-204.

Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18(3):1379-87.

Zhao L, Vogt PK (2008) Helical domain and kinase domain mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(7):2652-7.

Zou ZQ, Zhang XH, Wang F, Shen QJ, Xu J, Zhang LN, Xing WH, Zhuo RJ, Li D (2009) A novel dual PI3Kalpha/mTOR inhibitor PI-103 with high antitumor activity in non-small cell lung cancer cells. *Int J Mol Med* 24(1):97-101.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, ohne deren Unterstützung die vorliegende Dissertationsschrift nicht zustande gekommen wäre.

Mein ganz spezieller Dank gilt meinem Doktorvater, **Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon**, dessen fachliche Kompetenz und unermüdliche Unterstützung maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich **Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter**, Leiter des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Arbeit in seinem Institut.

Für die freundliche Unterstützung im FISH-Labor bedanke ich mich sehr herzlich bei **Frau Silvia Schnöger** und **Herrn Sascha Eghtessadi**.

Meinen Eltern, **Susanne und Hans-Heinrich Schacht** danke ich für die Unterstützung während meines Studiums.

Außerdem bedanke ich mich bei **Viktor Brommer**, ohne den das Zusammentragen der Nachbeobachtungsdaten nicht halb so angenehm gewesen wäre.

9 LEBENS LAUF

Name: Hannes Schacht

Geboren: 04.05.1982 in Hamburg

Ausbildung:

1988-1992 Grundschule Ratsmühlendamm in Hamburg.

1992-2001 Gymnasium Alstertal in Hamburg; Abitur.

2001-2002 Zivildienst, Krankenhaus Bethanien in Hamburg.

10/2002-11/2009 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Ärztliche Approbation am 10.12.2009.

01/2007-03/2011 Bearbeitung der vorliegenden Doktorarbeit unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. R. Simon am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

03/2010-09/2010 Assistenzarzt in der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Ab 04/2011 Assistenzarzt in der Abteilung für Radiologie der Schön Klinik Hamburg Eilbek.

10 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.

Unterschrift: