

Untersuchungen zur Funktion von  
AKT-Isoformen in murinen ErbB2-positiven  
Mammakarzinomzellen und humanen  
disseminierten Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nicole Grabinski

aus Hamburg

Hamburg 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Prof. Dr. G. W. MAYR  
Weiterer Gutachterin der Dissertation:  
Frau Prof. Dr. S. DOBLER  
Tag der Disputation: 01. Juli 2011

Hamburg, den 17. Juni 2011

*A. Temming*

Professor Dr. Axel Temming  
Leiter des Fachbereichs Biologie

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung . . . . .	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Das Mammakarzinom . . . . .	3
1.1.1 Karzinogenese und histologische Einteilung . . . . .	3
1.1.2 Einteilung nach dem Rezeptorstatus . . . . .	4
1.1.3 Die ErbB-Rezeptoren . . . . .	6
1.1.4 Balb-neuT: Ein Mausmodell für das ErbB2 <sup>+</sup> -Mammakarzinom . .	8
1.2 Disseminierung von Tumorzellen . . . . .	10
1.2.1 Disseminierte Tumorzellen (DTC) . . . . .	10
1.2.2 Frühe Disseminierung und Tumorschlaf ( <i>tumor dormancy</i> ) . . . .	11
1.2.3 DTC-Zelllinien als Modellsystem zur Analyse von DTC . . . . .	13
1.3 Der PI3K/AKT-Signalweg . . . . .	14
1.3.1 Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) . . . . .	14
1.3.2 Die Proteinkinase B/AKT . . . . .	15
1.3.3 Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs . . . . .	17
1.3.4 Spezifität von AKT-Isoformen . . . . .	18
1.3.5 Die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs beim Krebs . . . . .	21
1.4 Ziel der Arbeit . . . . .	23
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1 Materialien . . . . .	25
2.1.1 Chemikalien . . . . .	25
2.1.2 Geräte . . . . .	25
2.1.3 Verbrauchsmaterialien . . . . .	27
2.1.4 Kits, Reagenzien und Marker . . . . .	28
2.1.5 Antikörper für Western Blot, Immunpräzipitation und Färbungen	29
2.1.6 Vektoren für die lentivirale Transduktion . . . . .	29
2.1.7 Primer für die quantitative PCR (qPCR) . . . . .	30

2.1.8	Puffer und Lösungen . . . . .	30
2.1.9	Zelllinien . . . . .	33
2.1.10	Zellkulturreagenzien . . . . .	34
2.1.11	Mausstämme . . . . .	35
2.1.12	Patientenmaterial . . . . .	35
2.1.13	Computerprogramme . . . . .	35
2.2	Methoden . . . . .	36
2.2.1	Zellkultur . . . . .	36
2.2.2	Etablierung von Mammakarzinomzellen aus Balb-neuT-Tumoren .	37
2.2.3	Stimulation und Behandlung von adhärenen Zellen . . . . .	37
2.2.4	Transfektion und lentivirale Transduktion adhärenter Zellen . . .	38
2.2.5	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung . . . . .	39
2.2.6	Immunhistochemische (IHC)-Färbung . . . . .	40
2.2.7	Immunfluoreszenz (IF)-Färbung . . . . .	40
2.2.8	RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung . . . . .	41
2.2.9	cDNA-Synthese . . . . .	41
2.2.10	Quantitative PCR (qPCR) . . . . .	42
2.2.11	Herstellung von Proteinlysaten . . . . .	44
2.2.12	Protein-Konzentrationsbestimmung . . . . .	44
2.2.13	Western-Blot . . . . .	45
2.2.14	Immunpräzipitation der AKT-Isoformen . . . . .	46
2.2.15	AKT-Isoform-spezifischer <i>in vitro</i> Kinaseassay . . . . .	48
2.2.16	Zellvitalitätsassay . . . . .	49
2.2.17	Proliferationsassay . . . . .	50
2.2.18	Apoptoseassay . . . . .	51
2.2.19	Migrationsassay . . . . .	51
2.2.20	Mausexperimente . . . . .	52
2.2.21	Statistik . . . . .	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
3.1	Untersuchungen zur Funktion von AKT-Isoformen beim ErbB2 <sup>+</sup> -Mamma- karzinom . . . . .	53
3.1.1	Aktivierung des ErbB2/PI3K/AKT-Signalwegs in transgenen Balb- neuT-Mammatumoren . . . . .	53

3.1.2	Etablierung von murinen ErbB2 <sup>+</sup> -Mammakarzinom-Zellkulturen aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren . . . . .	57
3.1.3	Tumorigenität der murinen ErbB2 <sup>+</sup> -Mammakarzinomzellen (C4-Zellen) <i>in vivo</i> . . . . .	59
3.1.4	Aktivierung des ErbB2/AKT-Signalwegs in ErbB2 <sup>+</sup> -C4-Zellen . . . . .	61
3.1.5	Aktivierung des AKT-Signalwegs in ErbB2 <sup>+</sup> -C4-Zellen unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition von HSP90 . . . . .	62
3.1.6	ShRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der AKT-Isoformen in ErbB2 <sup>+</sup> -C4-Zellen . . . . .	64
3.1.7	Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem- <i>knockdown</i> . . . . .	65
3.1.8	Expression und Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 in C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem- <i>knockdown</i> . . . . .	66
3.1.9	Expression des Östrogenrezeptor $\alpha$ (ER $\alpha$ ) in C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem- <i>knockdown</i> . . . . .	68
3.1.10	Effekte des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen auf das Wachstum von C4-Zellen nach AKT3-spezifischem- <i>knockdown</i> . . . . .	70
3.1.11	Untersuchungen des PI3K/AKT-Signalwegs in humanen Mammakarzinomen . . . . .	72
3.2	Untersuchungen zur Funktion von AKT-Isoformen in disseminierten Tumorzellen (DTC) . . . . .	75
3.2.1	Aktivierung des AKT-Signalwegs in DTC-Zelllinien . . . . .	75
3.2.2	Aktivität der AKT-Isoformen in LC-M1- und H1299-Zellen . . . . .	77
3.2.3	Wachstumsfaktorabhängigkeit der Aktivierung des AKT-Signalwegs in LC-M1-Zellen . . . . .	79
3.2.4	Proliferation und Apoptose der LC-M1-Zellen unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition der PI3K . . . . .	81
3.2.5	ShRNA-vermittelter <i>knockdown</i> der AKT-Isoformen in LC-M1-Zellen . . . . .	82
3.2.6	Proliferation der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	83
3.2.7	Apoptose der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	84

3.2.8	Migration der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	85
3.2.9	Expression der u-PAR und u-PA mRNA-Menge in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	86
3.2.10	Expression von EGFR, ErbB2, ErbB3 und dem Östrogenrezeptor $\alpha$ in DTC-Zelllinien . . . . .	87
3.2.11	Stimulation von LC-M1- und H1299-Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) . . . . .	89
3.2.12	Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Stimulation mit EGF in LC-M1- und H1299-Zellen . . . . .	90
3.2.13	Proliferation und Apoptose der AKT-Isoform-spezifischen LC-M1- <i>knockdown</i> -Zellen nach EGF-Stimulation . . . . .	92
3.2.14	Expression der u-PAR mRNA-Menge nach EGF-Stimulation in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	93
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
4.1	Funktionen von AKT-Isoformen beim ErbB2 <sup>+</sup> -Mammakarzinom . . . . .	95
4.1.1	ErbB2 <sup>+</sup> -Balb-neuT-Tumore und davon etablierte Mammakarzinomzellen (C4-Zellen) besitzen eine starke AKT3-Aktivität . . . . .	96
4.1.2	Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) reguliert die Stabilität und Aktivität von AKT1 und AKT2, aber nicht von AKT3 . . . . .	99
4.1.3	AKT-Isoformen haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation der C4-Zellen . . . . .	100
4.1.4	Der Verlust von AKT3 reduziert die Expression des ErbB2-Rezeptors in den C4-Zellen über einen post-transkriptionellen Mechanismus . . . . .	101
4.1.5	Die Expression des ER $\alpha$ wird durch den Verlust von AKT3 in den C4-Zellen induziert und führt zur gesteigerten Sensitivität gegenüber dem ER-Antagonisten Tamoxifen . . . . .	103
4.1.6	Eine Aktivität von AKT3 kann in primären humanen Mammakarzinomen nachgewiesen werden . . . . .	105
4.1.7	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	106

## *Inhaltsverzeichnis*

---

4.2	Funktionen von AKT-Isoformen in disseminierten Tumorzellen . . . . .	107
4.2.1	Die DTC-Zelllinie LC-M1 besitzt eine starke Aktivierung des AKT-Signalwegs . . . . .	107
4.2.2	AKT-Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen bei der Regulation von Proliferation, Überleben und Migration in LC-M1-Zellen . . . . .	109
4.2.3	Die an der Regulation von Tumorschlaf und Proliferation beteiligten Komponenten u-PA und u-PAR werden über AKT-Isoformen reguliert . . . . .	111
4.2.4	Die u-PAR-mRNA-Menge wird über EGF in den LC-M1-Zellen AKT3-abhängig induziert . . . . .	112
4.2.5	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	113
<b>Anhang</b>		<b>115</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>115</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>141</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>144</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>145</b>

## Zusammenfassung

Der PI3K/AKT-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Proliferation, Apoptose und Migration, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen. Eine konstitutive Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs findet man häufig bei Tumoren verschiedener Entitäten, was mit einer aggressiven Karzinogenese assoziiert ist. Der Effektor der PI3K, das AKT, ist eine Serin/Threonin Kinase, von der in Säugern drei Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 identifiziert wurden. Das Ziel dieser Arbeit war es, Funktionen von AKT-Isoformen in ErbB2-positiven (ErbB2<sup>+</sup>)-Mammakarzinomzellen und in disseminierten Tumorzellen (DTC) zu untersuchen.

Das ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom nimmt einen Anteil von ca. 20% aller Mammakarzinome ein und ist mit einer besonders aggressiven Karzinogenese verbunden. Im Vergleich zum Östrogenrezeptor (ER)-positiven (ER<sup>+</sup>)-Mammakarzinom ist das ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom mit einem signifikant verkürztem krankheitsfreien Überleben assoziiert. Die schlechte klinische Prognose von ErbB2<sup>+</sup>-Tumoren erklärt sich aus einer gesteigerten Tumorprogression und Metastasierungsfähigkeit. Im Gegensatz zu den ER<sup>+</sup>-Mammakarzinomen sind die ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinome meist ER<sup>-</sup>, was zu einem hormonunabhängigen Wachstum und einer Resistenz gegenüber einer endokrinen Therapie führt. Der ErbB2-Rezeptor gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und aktiviert im Dimer mit dem ErbB3-Rezeptor vor allem den PI3K/AKT-Signalweg. An Hand des transgenen Mausmodells Balb-neuT, welches eine aktivierte Form des ErbB2-Rezeptors unter der Kontrolle des MMTV-Promotors trägt, wurden Funktionen von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom untersucht. In dieser Arbeit wurden erstmalig die enzymatischen Aktivitäten der drei AKT-Isoformen in Balb-neuT-Tumoren bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass AKT3 in Balb-neuT-Tumoren besonders stark aktiviert ist. Darüber hinaus konnte an Hand von neu etablierten Zellkulturen von Balb-neuT-Mammatumoren gezeigt werden, dass der Verlust von AKT3 die Expression des ErbB2-Rezeptors post-transkriptionell hemmt, während die Expression des ER $\alpha$  induziert wird. Diese Ergebnisse lassen auf eine wichtige Funktion von AKT3 bei der Regulation der Expression von ErbB2 und ER $\alpha$  in Mammakarzinomzellen schließen. Darüber hinaus wurde in den ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen gezeigt, dass durch den Verlust von AKT3 und die hierdurch induzierte Expression des ER $\alpha$ , die Proliferation der Zellen unter Einfluss des ER-Antagonisten Tamoxifen signifikant stärker reduziert wird. An Hand dieser Daten wäre ein Therapieansatz mit AKT3-spezifischen Inhibitoren

beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom zur Induktion der ER-Expression und einer möglichen Therapie mit Tamoxifen denkbar.

Ein verbessertes Verständnis über die molekularen Mechanismen der Metastasierung ist klinisch von größter Bedeutung, da Krebspatienten zumeist nicht am Primärtumor, sondern an der systemischen Ausbreitung und an den Folgen von Metastasen versterben. Einzelne disseminierte Tumorzellen (DTC) findet man im Knochenmark (KM) bei 20-60% von Krebspatienten mit verschiedenen soliden Tumoren. Klinische Studien haben eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von DTC im KM und einem verkürztem krankheitsfreien Überleben gezeigt. Es wird angenommen, dass DTC selbst nach früher Tumordiagnose und vollständiger chirurgischer Entfernung des Primärtumors die Ursache für Metastasen sein könnten. Auf Grund der niedrigen Frequenz von DTC im KM ist die Analyse von DTC schwierig und die molekularen Mechanismen, welche an der Regulation der Proliferation und an Überlebensstrategien von DTC beteiligt sind, weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit wurden DTC-Zelllinien, welche aus dem Knochenmark von Patienten mit Brust-, Lungen- oder Prostatakarzinom etabliert wurden, als *in vitro* Modellsystem zur Analyse der Aktivierung und Funktion von AKT-Isoformen in DTC verwendet. Die Ergebnisse an der DTC-Zelllinie LC-M1, welche von einem Patienten mit einem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) abstammt, zeigen eine starke Aktivierung von AKT, insbesondere von AKT3. Zudem besitzen AKT1 und vor allem AKT3, nicht aber AKT2, einen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der LC-M1 Zellen. Im Gegensatz dazu beeinflussen alle AKT-Isoformen, insbesondere AKT2, die Migration der LC-M1 Zellen. Der AKT1- und AKT3-vermittelte Effekt auf die Proliferation ist durch eine reduzierte Expression von Cyclin D1 begleitet und lässt auf eine AKT1- und AKT3-vermittelte Regulation des Zellzyklus am Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase schließen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass zusätzlich über AKT3, die Expression von Cyclin D3 reguliert wird, wodurch eine gesteigerte Hemmung der Proliferation nach *knockdown* von AKT3 im Vergleich zum Verlust von AKT1 erklärt werden könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass via EGF alle AKT-Isoformen in DTC aktiviert werden und dass nach EGF-Stimulation die u-PAR-mRNA-Menge AKT3-abhängig ansteigt. Dies ist von besonderem Interesse, da bereits gezeigt wurde, dass die Expression von u-PAR mit einem gesteigerten proliferativen Potential von DTC assoziiert ist. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass insbesondere die Aktivierung von AKT3 wichtig für Proliferation und Überleben von DTC ist und dass AKT3 ein interessantes Zielmolekül zur Behandlung von DTC sein könnte.

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die weltweit häufigste maligne Erkrankung der Frau mit einem Anteil von 23% an allen Malignomen. Jährlich treten über eine Million Neuerkrankungen auf [Parkin et al., 2005]. Allein in Deutschland erkranken jährlich über 57.000 Frauen an Brustkrebs, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 63 Jahren liegt. Der prozentuale Anteil an den geschätzten Krebsneuerkrankungen in Deutschland betrug im Jahr 2004 27,8%. Im Jahr 2005 starben 17.455 Frauen an der Erkrankung bzw. ihren Folgen, was knapp 30% aller krebsbedingten Todesfälle entspricht. Während die Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland seit 1980 zunimmt, ist die Mortalitätsrate seit Mitte der 1990er Jahre leicht rückläufig [RKI, 2008].

#### 1.1.1 Karzinogenese und histologische Einteilung

Die Karzinogenese des Mammagewebes ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich das invasive Karzinom über eine Reihe von hyperplastischen und neoplastischen Stadien entwickelt [Lakhani, 1999]. Die Erkenntnisse über die Existenz solcher Vorstufen und die Klassifizierung des Mammakarzinoms beruhen auf histo-pathologischen Untersuchungen von Gewebepräparaten und der genetischen Analyse möglicher Vorläuferläsionen in der humanen Brust sowie aus Tiermodellen. In einem ersten Schritt entstehen Hyperplasien der luminalen Epithelzellen, wodurch sich ein mehrschichtiges Epithel bildet. Man unterscheidet hierbei zwischen normalen und atypischen Hyperplasien, wobei normale Hyperplasien (usual ductal hyperplasia, UDH) relativ häufig auftreten und nicht mit einem erhöhten Krebsrisiko korrelieren und daher nicht als Vorstufe bezeichnet werden. Das Auftreten von atypischen duktalem Hyperplasien (ADH) in Brustbiopsien korreliert mit einer 4- bis 5-fach höheren Inzidenz an einem invasiven Mammakarzinom zu

erkranken [Knapp and Coady, 1962; Tavassoli and Norris, 1990]. Die atypische Hyperplasie ist aus histologischer Sicht eine Übergangsform zum Carcinoma in situ, da die uniformen Zellhaufen aufgrund von vergrößerten Zellkernen bereits neoplastische Anzeichen aufweisen. Eine klare Abgrenzung ist daher nach morphologischer Betrachtung nicht möglich [Schnitt and Connolly, 1992]. Es gibt zwei Arten von in situ Karzinomen, die an Hand ihrer Morphologie unterschieden werden. Zum einen gibt es das duktales Carcinoma in situ (DCIS), welches 80% der Fälle ausmacht. Zum anderen gibt es das seltenere lobuläre Carcinoma in situ (LCIS), welches epidemiologisch, molekular und genetisch betrachtet Unterschiede zum DCIS aufweist und prognostisch mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einhergeht [Lakhani, 1999]. Beide Formen des Carcinoma in situ entstehen jedoch in den tubuloalveolären Lobuli und besitzen definitionsgemäß noch eine intakte Basalmembran. Mit dem Durchbruch durch die Basalmembran, welche das Epithelium vom umgebenden Stroma abgrenzt, liegt ein invasives Mammakarzinom vor. Bei den invasiven Karzinomen existieren ebenfalls unterschiedliche Formen, wobei das duktales Karzinom mit 80% am häufigsten diagnostiziert wird.

### 1.1.2 Einteilung nach dem Rezeptorstatus

Die Einteilung der Mammakarzinome nach ihrem Rezeptorstatus hat prognostische und therapeutische Relevanz. Derzeit werden der Hormonrezeptorstatus von dem Östrogenrezeptor (ER) und dem Progesteronrezeptor (PR) sowie der *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2* (ErbB2)-Status routinemäßig als prädiktive Marker für die Auswahl einer spezifischen adjuvanten Therapie eingesetzt.

Steroidhormone, wie Östrogen, spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Brustkrebs. Dabei scheint die Signaltransduktion von Östrogen hauptsächlich über den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) und ER $\beta$  vermittelt zu sein [Couse and Korach, 1999]. Etwa 60% der Mammakarzinome exprimieren den ER und werden damit als ER-positiv (ER<sup>+</sup>) klassifiziert [Keen and Davidson, 2003]. Die Expression des ER korreliert mit einem hohen Differenzierungsgrad des Tumors und einer guten klinischen Prognose [McCarty et al., 1980; Mossler et al., 1981]. Der Hormonrezeptor-Status ist vor allem für das Ansprechen auf eine Hormontherapie mit ER-Modulatoren, wie dem Tamoxifen, entscheidend. Der Progesteronrezeptor (PR) ist ein Marker für die Funktionalität des ER, da PR ein Östrogen-reguliertes Gen ist. Mehr als die Hälfte der ER<sup>+</sup>-Mammakarzinome exprimieren auch den PR [Nadji et al., 2005; Idirisinghe et al., 2010]. Einige Studien

haben gezeigt, dass der PR-Status besonders geeignet ist, um Vorhersagen über das Ansprechen auf eine Hormontherapie zu treffen [Skinner et al., 1980; Arpino et al., 2005].

Der ErbB2-Rezeptor (auch bekannt unter dem Namen humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2, Her2) ist ein Proto-Onkogen, welches auf dem Chromosom 17 lokalisiert ist und für eine 185 kDa große Rezeptortyrosinkinase kodiert. Eine Genamplifikation und/ oder Überexpression von ErbB2 findet man bei etwa 20% der Mammakarzinompatientinnen [Liu et al., 1992; Slamon et al., 1987, 1989]. Solch eine Überexpression führt zur gesteigerten Aktivierung der ErbB2-vermittelten Signaltransduktion, wodurch Zellwachstum, Angiogenese und Metastasierung gefördert werden [Muss et al., 1994; Ross and Fletcher, 1999; Nahta et al., 2003]. Das ErbB2-positive (ErbB2<sup>+</sup>)-Mammakarzinom ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und mit einem verkürzten Krankheitsfreiem (*disease free survival*, DFS) sowie Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) assoziiert [Dowsett, 2001; Morrow et al., 2009]. Diese Patientinnen können vor allem von einer Therapie mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Herceptin, welcher gegen den ErbB2-Rezeptor gerichtet ist, profitieren [Konecny et al., 2006]. Die Bindung von Herceptin an ErbB2 führt zur Wachstumsinhibition und Apoptose der Tumorzellen [Simon et al., 2001]. Durch die Gabe von Herceptin in Kombination mit Chemotherapeutika konnten sowohl das DFS als auch das OS bei ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinompatientinnen verbessert werden [Slamon, 2000]. Allerdings sprechen nur 22 - 50% der ErbB2<sup>+</sup>-Patientinnen überhaupt auf eine Therapie mit Herceptin an und häufig treten Resistenzmechanismen im Verlauf der Therapie auf [Piccart-Gebhart et al., 2005], welche wenig verstanden sind [Nahta et al., 2006]. Einige Studien haben gezeigt, dass für die Resistenzentstehung der Phosphorylierungszustand von ErbB2 [Ginestier et al., 2007], sowie der PTEN- und PI3K-Status [Berns et al., 2007] wichtige Faktoren sein können.

Neben dem ER<sup>+</sup>- und dem ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom gibt es noch das Tripel-negative, welches in weniger als 10% der Fälle auftritt. Das Tripel-negative-Mammakarzinom exprimiert weder den ER noch den PR und auch nicht den ErbB2-Rezeptor. Dieser seltene Typ von Mammakarzinom ist besonders aggressiv und folglich mit der schlechtesten klinischen Prognose assoziiert. Einen spezifischen Therapieansatz gibt es hierbei noch nicht [Podo et al., 2010].

### 1.1.3 Die ErbB-Rezeptoren

Die *v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog* (ErbB)-Rezeptoren werden von Zellen aus unterschiedlichen Geweben mit epitheliale, mesenchymalem oder neuronalem Ursprung exprimiert, wo sie eine fundamentale Rolle bei der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung spielen [Olayioye et al., 2000]. Die ErbB-Rezeptoren gehören zur Subklasse I der Superfamilie der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), welche aus vier Mitgliedern dem ErbB1 (auch bekannt unter dem Namen epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, EGFR), ErbB2, ErbB3 und ErbB4 besteht. Alle Familienmitglieder besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine membrandurchspannende Region und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Über eine Familie von Liganden, den EGF-verwandten Peptidwachstumsfaktoren, welche an die extrazelluläre Domäne der ErbB-Rezeptoren binden, werden diese aktiviert [Moasser, 2007; Hynes and MacDonald, 2009]. Der komplexe Mechanismus der Aktivierung der ErbB-Rezeptoren wurde, auf Grund ihrer besonderen Bedeutung beim Krebs, vielseitig untersucht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der EGFR unabhängig von einer Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne aktiviert wird, sondern durch Stabilisierung der aktiven Konformation, ähnlich wie bei AGC-Kinasen [Jura et al., 2011].

#### 1.1.3.1 Die ErbB2-vermittelte Signaltransduktion

Der ErbB2-Rezeptor spielt eine besondere Rolle bei der Karzinogenese des Mammakarzioms. In Abbildung 1.1 ist die ErbB2-vermittelte Signaltransduktion vereinfacht dargestellt. Nach Bindung eines EGF-verwandten Peptidwachstumsfaktors an den ErbB1-, ErbB3- oder ErbB4-Rezeptor kann es zur Heterodimerisierung von ErbB2 mit einem der ErbB-Familienmitgliedern kommen (siehe Abb. 1.1).

Als Folge der ligandeninduzierten Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren stimuliert, was zur Auto- und Transphosphorylierung von bestimmten Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors führt. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für Adaptermoleküle verschiedener Signalkaskaden. Auf Grund der Vielzahl von Liganden und Dimerisierungsmöglichkeiten des ErbB2-Rezeptors resultiert die Aktivierung eines komplexen, vielfältigen Signalnetzwerkes [Moasser, 2007; Morrow et al., 2009; Hynes and MacDonald, 2009]. Im Folgenden wird die ErbB2-vermittelte Signaltransduktion an dem Beispiel der ErbB2/ErbB3-Heterodimerisierung näher beschrieben. Für die Heterodimerisierung

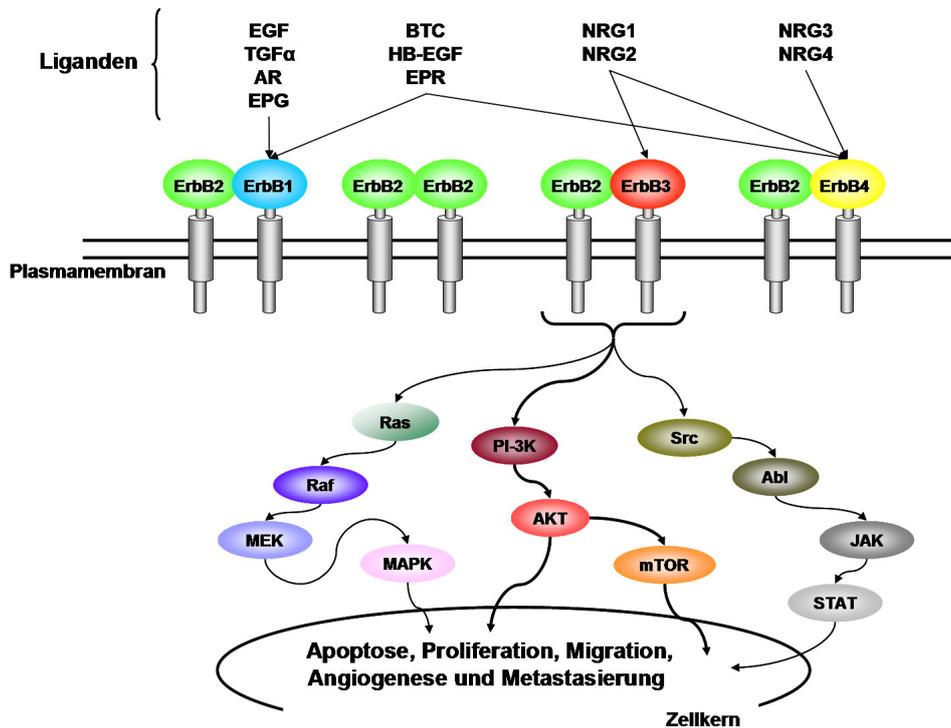


Abbildung 1.1: **ErbB2-vermittelte Signaltransduktion.** Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Dimerisierung von ErbB2 mit den ErbB-Familienmitgliedern. Als Folge der ligandeninduzierten Dimerisierung wird die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren stimuliert, was zur Auto- und Transphosphorylierung von bestimmten Tyrosinresten der cytoplasmatischen Domäne führt. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für Adaptermoleküle verschiedener Signalkaskaden. Als Beispiel führt die Dimerisierung von ErbB2 und ErbB3 zur Aktivierung des Ras/Raf/MAPK- und JAK/STAT-Signalwegs, aber vor allem zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs. Als Folge werden zelluläre Prozesse wie Proliferation, Überleben und Angiogenese reguliert. (In Anlehnung an Morrow *et al.* 2009)

von ErbB2 und ErbB3 ergibt sich eine Besonderheit. Es wird angenommen, dass ErbB2 keinen Liganden besitzt, da bislang keiner identifiziert wurde. Aus diesem Grund wird ErbB2 auch als Co-Rezeptor bezeichnet, da er auf die ligandeninduzierte Aktivierung eines Familienmitglieds angewiesen ist [Sliwkowski, 2003]. Der ErbB3-Rezeptor besitzt hingegen keine intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität, weshalb ErbB3-Homodimere keine Signaltransduktion vermitteln können [Sierke *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2004]. Interessanterweise zeigte sich, dass gerade aus dem ligandemlosen (ErbB2) und kinaseinaktivem (ErbB3) Rezeptor das aktivste Dimer entsteht [Sliwkowski *et al.*, 1994; Tzahar *et al.*, 1996; Horan *et al.*, 1995]. Nach Dimerisierung und Autophospho-

rylierung kommt es zum einen zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK), was zum Zellwachstum führt. Zum anderen kommt es nach Dimerisierung von ErbB2 und ErbB3, auf Grund multipler Bindungsstellen für die p85-Untereinheit der Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) im intrazellulären Bereich von ErbB3, vor allem zur Aktivierung der PI3K [Prigent and Gullick, 1994], was eine gesteigerte Proliferations- und Überlebensrate der Zellen zur Folge hat. Darüber hinaus kann es zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs kommen, welcher ebenfalls Zellproliferation auslöst [Olayioye et al., 2000; Morrow et al., 2009] (siehe Abb. 1.1).

### 1.1.3.2 Die Bedeutung von ErbB2 bei der Karzinogenese

Es hat sich gezeigt, dass die Überexpression der ErbB-Rezeptoren die Entwicklung und Malignität einer Vielzahl von Tumoren, inklusive des Mammakarzinoms, stark beeinflusst. Dabei nimmt der ErbB2-Rezeptor beim Mammakarzinom auf Grund verschiedener Eigenschaften eine besondere Stellung ein. Zum einen kann ErbB2 im Zuge einer Überexpression ohne die Bindung von Liganden Heterodimere bilden, zum anderen ist es der bevorzugte Dimerisierungspartner der anderen ErbB-Rezeptoren [Tzahar et al., 1996; Graus-Porta et al., 1997]. Darüber hinaus besitzt ErbB2 die stärkste intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, und ErbB2-Dimere weisen eine besonders hohe Stabilität auf, was eine verlängerte Signalweiterleitung zur Folge hat [Graus-Porta et al., 1997; Ropstorff et al., 2008]. Eine ErbB2-Überexpression korreliert daher mit einem malignen, aggressiven Tumorwachstum und folglich mit einem schlechten Überleben der Patientinnen [Slamon et al., 1987]. Außerdem wird die Überexpression von ErbB2 mit einer erhöhten Angiogenese, Invasivität, Befall der Lymphknoten und Metastasierung assoziiert [Slamon et al., 1989; Ross and Fletcher, 1999].

### 1.1.4 Balb-neuT: Ein Mausmodell für das ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom

Es gibt mehrere transgene Mausmodellen, bei denen Mammakarzinome in den transgenen Mäusen erzeugt werden, um die molekularen Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung zu untersuchen. Hierbei steht das transgene Konstrukt häufig unter der Kontrolle des Mausmammatumovirus (MMTV)-Promotors. Der Vorteil des MMTV-Promotors liegt in einer gewebespezifischen Expression des Transgens im Mammarygewebe. Der MMTV-Promotor wird mit Beginn der Pubertät der Mäuse, etwa in der dritten bis vierten Woche, durch Sexualhormone induziert [Muller et al., 1988].

Die Karzinogenese des transgenen Balb-neuT-Modells basiert auf der Integration einer konstitutiv aktiven Form des ErbB2 der Ratte (neu). Das transgene ErbB2, wurde aus chemisch induzierten Gehirntumoren von BDIX-Ratten isoliert und trägt eine aktivierende Punktmutation in der Transmembrandomäne des Rezeptors an der Position 2012. Auf Grund der Punktmutation kommt es zum Aminosäureaustausch an Position 664 von Valin zu Glutaminsäure und letztlich zur konstitutiven Aktivierung von ErbB2 und seinen nachgeschalteten Signalkaskaden, was eine aggressive Karzinogenese zur Folge hat [Muller et al., 1988]. Auf Grund der Mutation in der Transmembran-Domäne des ErbB2-Rezeptors wird die Kinaseaktivität etwa 100-fach verstärkt. Diese Aktivitätssteigerung ist dadurch zu erklären, dass die mutierte Form des ErbB2 im Vergleich zur Wildtyp-Variante in einem höheren Maße phosphoryliert ist [Bargmann and Weinberg, 1988]. Darüber hinaus kommt es zu einer bevorzugten konstitutiven Dimerisierung des mutierten ErbB2-Rezeptors.

Das in das Genom der Mäuse integrierte Konstrukt besteht also aus der transkriptionell aktiven MMTV-LTR-Region, dem Onkogen (neuT) und der SV40 polyA-Erkennungssequenz. Das ursprüngliche Mausmodell mit dem Konstrukt MMTV-neu-NT wurde auf dem genetischen Hintergrund des FVB Inzucht-Mausstamms etabliert [Muller et al., 1988]. Das Transgen-Konstrukt wurde im Folgenden in den genetischen Hintergrund des CD1-Mausstamms integriert [Lucchini et al., 1992]. Durch Verpaarung dieser CD1-ErbB2-positiven Mäuse mit WT-Balb/c-Mäusen wurde das ErbB2-Transgen in den genetischen Hintergrund der Balb/c-Maus eingebracht [Boggio et al., 1998]. Daraus folgt die Bezeichnung „Balb-neuT“. Das Balb-neuT-Mausmodell eignet sich besonders gut zur Analyse des ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinoms. Nach Induktion des Transgens, etwa in der 3. bis 4. Woche, entwickeln sich im Mammagewebe der Balb-neuT Mäuse atypische Hyperplasien ab der 7. bis 9. Woche [Carlo et al., 1999]. Der Übergang zum in situ Carcinoma findet zwischen der 14. und 18. Woche statt. Die Tumoren lassen sich ab der 18. Woche ertasten und ab der 23. bis 30. Woche liegt ein invasives Karzinom vor. Die Latenzzeit der Mäuse beträgt etwa 27 bis 33 Wochen. Wichtige Eigenschaften der primären Balb-neuT Tumoren sind ein multifokaler Ursprung, die Expression von ErbB2 sowie ein metastatischer Phänotyp. Metastasen bilden sich sowohl in der Pleura als auch im Lungenparenchym [Hüsemann et al., 2008]. Hüsemann et al., konnten an Hand des Balb-neuT-Modells erstmalig zeigen, dass Tumorzellen bereits früh, noch in der Phase der atypischen Hyperplasi, ins Knochenmark disseminieren.

## 1.2 Disseminierung von Tumorzellen

Im Verlauf der Tumorprogression solider Tumoren werden immer wieder Tumorzellen vom primären Tumor in das Gefäßsystem abgegeben und können somit in sekundäre Organe gelangen. Disseminierte Tumorzellen (DTC) lassen sich auch nach der Resektion des Primärtumors im Knochenmark (KM) in 20-60% der Krebspatienten mit verschiedenen soliden Tumoren, wie Lungen- und Brustkrebs, nachweisen. Es wird angenommen, dass DTC als minimale residuale Erkrankung (*minimal residual disease* (MRD)), auch lange nach der Entfehrnung des Primärtumors, Ursache für Metastasen sein könnten [Pantel et al., 2009; Müller et al., 2010].

### 1.2.1 Disseminierte Tumorzellen (DTC) - Identifizierung und Charakterisierung

Bereits 1954 postulierten Schreiber et al, dass sich disseminierte Tumorzellen (DTC) im Knochenmark von Patienten mit nicht-metastatischem Brustkrebs befinden. Schreiber identifizierte die DTC in den KM-Ausstrichen von Brustkrebspatientinnen ausschließlich an Hand morphologischer Eigenschaften der Zellen [Schreiber, 1954]. Spezifische Nachweismethoden zur Detektion von DTC standen damals noch nicht zur Verfügung. Erst 20 Jahre später, zur Zeit der Entwicklung spezifischer Antikörper und Färbemethoden, wurde erneut versucht DTC an Hand epithelialer Zellmarker, welche von den mesenchymalen Zellen des Knochenmarks nicht exprimiert werden, wie die Zytokeratine (CK), zu identifizieren. Heutzutage können DTC mit Hilfe von immunzytochemischen Färbemethoden (ICC) und CK-spezifischen Antikörpern eindeutig im KM von Krebspatienten als CK<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden [Pantel et al., 1993]. Umfangreiche klinische Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von DTC im KM mit einem gesteigerten Auftreten eines Rezidivs korreliert und einen unabhängigen Prognosemarker darstellt [Braun et al., 2005].

In den letzten Jahre wurden viele Studien zur Charakterisierung von DTC durchgeführt, um potentielle therapeutische Zielmoleküle zu identifizieren und neue Therapiestrategien gegen MRD zu entwickeln. Diese Studien haben gezeigt, dass DTC häufig Chromosomenaberrationen aufweisen, welche sich in ihrer Art vom Primärtumor unterscheiden können. Außerdem scheinen DTC ein unterschiedliches proliferatives Potential zu besitzen [Gangnus et al., 2004]. Weitere Studien haben gezeigt, dass DTC proliferative und prometastatische Marker, wie ErbB2 und den Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator (u-PA) und seinen Rezeptor (u-PAR), exprimieren können [Braun and Naume, 2005;

Cote et al., 1995; Reimers et al., 2004], was mit einem gesteigerten proliferativen Potential der DTC und einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist [Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008].

### 1.2.2 Frühe Disseminierung und Tumorschlaf (*tumor dormancy*)

Das gängige Modell der Karzinogenese beschreibt die Tumorprogression von den frühen Läsionen über das invasive Karzinom hin zur soliden Metastase als mehrstufigen Prozess. Während der ersten Schritte akkumulieren die Zellen des Primärtumors genetische und epigenetische Veränderungen, die zu einem invasiven Wachstum des Primärtumors führen. Schließlich erlangen einige Tumorzellen durch weitere Veränderungen die Fähigkeit in sekundäre Organe zu metastasieren. Die Disseminierung von Tumorzellen ist demnach ein spätes Ereignis [Fearon and Vogelstein, 1990; Bernards and Weinberg, 2002].

Studien der letzten Jahre haben allerdings gezeigt, dass die Disseminierung von Tumorzellen auch ein frühes Ereignis der Metastasierungskaskade sein kann. Insbesondere beim Mammakarzinom zeigte sich häufig, dass selbst nach früher Diagnose und vollständiger chirurgischer Entfernung des Primärtumors viele Jahre später ein Rezidiv auftreten kann [Pantel et al., 2009]. Außerdem weisen die Unterschiede in den genetischen Veränderungen der DTC im Vergleich zum Primärtumor darauf hin, dass diese bereits früh von einander getrennt wurden. Das Auftreten von Metastasen Jahre nach der Resektion des Primärtumors impliziert eine Phase der Ruhe, des sogenannten Tumorschlafs (*tumor dormancy*) [Almog, 2010]. In dieser Phase schläft der Tumor quasi an sekundären Orten ohne zu klinisch detektierbaren Metastasen heran zu wachsen. Die molekularen Mechanismen des Tumorschlafs sind weitgehend unerforscht. Verschiedene Mechanismen wurden vorgeschlagen, um Tumorschlaf zu erklären (siehe Abb. 1.2).

Einer dieser Mechanismen der Tumorschlaf erklären könnte, basiert auf der ineffizienten Induktion einer Angiogenese. Tumoren sind abhängig vom Anschluss an funktionelle Blutgefäße, die sie mit Nährstoffen versorgen und beim Wachstum unterstützen. Tumoren, welche nicht in der Lage sind erfolgreich eine Angiogenese zu induzieren und funktionelle Blutgefäße zu bilden, verbleiben avaskulär und in einer mikroskopischen Größe [Gimbrone et al., 1972; Watnick et al., 2003; Naumov et al., 2006]. Unter avaskulären Bedingungen besitzen Tumorzellen eine sehr hohe Proliferationsrate, die allerdings auf Grund einer gesteigerten Apoptoserate die Tumorgöße im Gleichgewicht hält [Holmgren et al., 1995]. Der Übergang von einer prävasculären Lesion zu einem hochgradig

vaskularisiertem und stufenweise auswachsendem Tumor wird als *angiogenic switch* bezeichnet. Ein nicht-angiogenetischer Tumor verbleibt solange im Tumorschlaf, bis eine effiziente Angiogenese induziert werden kann.

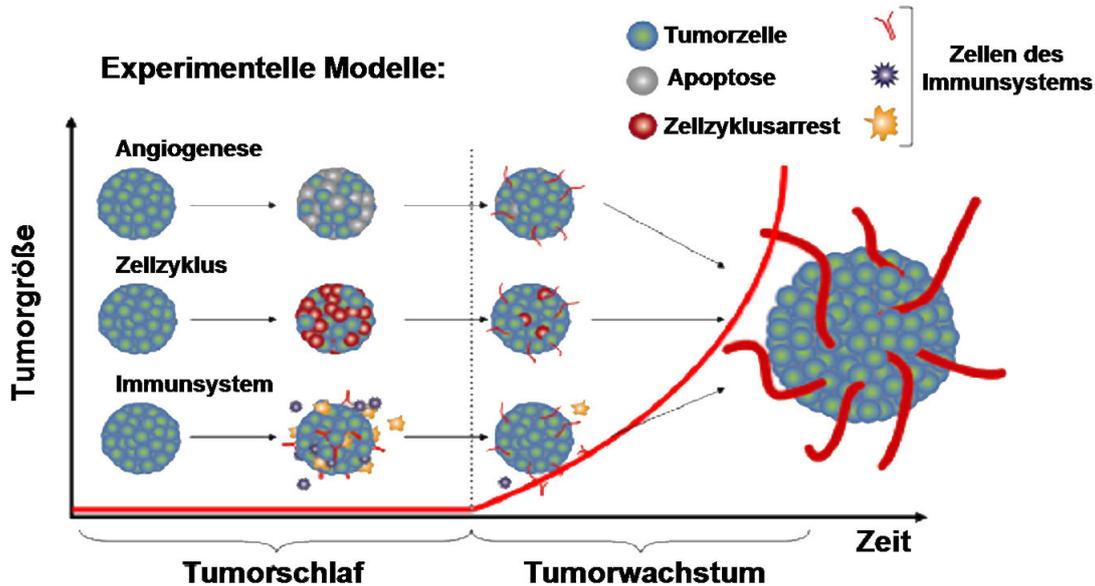


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen des Tumorschlafs. Der Tumorschlaf kann durch ineffiziente Angiogenese entstehen, wobei die ausbleibende Bildung neuer und funktionaler Blutgefäße das Tumorwachstum inhibiert. Die Tumorgröße verbleibt auf Grund einer Balance zwischen Proliferation und Apoptose der Tumorzellen gleich. Der Ausbruch aus dem Ruhezustand geht mit einer Neovaskularisierung und einer reduzierten Apoptose einher. Der Tumorschlaf kann außerdem durch Zellzyklusarrest induziert werden, wobei die Tumorzellen in einen nicht-proliferativen Ruhezustand fallen. Auf Grund einer gesteigerten Proliferation kommt es zum Ausbruch aus dem Tumorschlaf. Ein weiterer Mechanismus basiert auf der Kontrolle des Immunsystems, wobei das Wachstum des Tumors durch eine aktive Immunantwort blockiert wird [Almog, 2010]

Ein zweites Modell schlägt vor, dass Tumorschlaf auf ein nicht-proliferatives Potential der einzelnen Tumorzellen zurückzuführen ist und wird deshalb auch als Tumorzellschlaf (*tumor cell dormancy*) bezeichnet. Die Tumorzellen befinden sich im Ruhezustand also in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus und beginnen erst zu proliferieren, wenn die Mikroumgebung entsprechende Bedingungen anbietet [Barkan et al., 2008, 2010; Goodison et al., 2003]. Hierbei scheint eine Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator-Rezeptor (u-PAR)-vermittelte Signalweiterleitung für die Regulation zwischen Tumorzellschlaf und Proliferation von

großer Bedeutung zu sein [Ghiso, 2002; Aguirre-Ghiso et al., 2003; Ranganathan et al., 2006; Schewe and Aguirre-Ghiso, 2008]. Das u-PAR-System reguliert neben Proliferation und Apoptose auch Migration und Invasion verschiedener Tumorzellen. Die Expression von u-PAR auf DTC kann möglicherweise als klinischer Prognosemarker Anwendung finden. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von u-PAR auf DTC von Magenkrebspatienten zum Zeitpunkt der Primärtumor-Resektion, mit einer gesteigerten Anzahl von DTC im Knochenmark während der klinischen Nachuntersuchungen assoziiert ist und mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergeht [Allgayer et al., 1997; Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008].

Der dritte Mechanismus, der dem Tumorschlaf zu Grunde liegen könnte, wird über eine aktive Immunantwort vermittelt. Das Tumorstadium wird vom aktiven Immunsystem effizient unterdrückt. Es entsteht ein Gleichgewicht zwischen der aktiven Immunabwehr und dem Wachstum der Tumorzellen, so dass der Tumor in einer mikroskopischen Größe verharrt [Koebel et al., 2007; Uhr et al., 1991; Quesnel, 2008].

Trotz aller Anstrengungen der letzten Jahre sind die molekularen Mechanismen, die zum Überleben und zur Proliferation von DTC sowie zum Ausbruch aus dem Tumorschlaf führen weitgehend unerforscht. Tatsache ist, dass Krebspatienten zumeist nicht am Primärtumor, sondern an der systemischen Ausbreitung und an den Folgen von Metastasen versterben, was die Notwendigkeit der Erforschung der molekularen Prozesse einer Metastasierung in den Vordergrund stellt.

### 1.2.3 DTC-Zelllinien als Modellsystem zur funktionellen Analyse von DTC

Auf Grund der niedrigen Frequenz von DTC (weniger als 10 CK<sup>+</sup>-Zellen pro 8 x 10<sup>5</sup> mononukleare Zellen) im KM von Krebspatienten sind funktionelle Analysen an DTC besonders schwierig [Pantel et al., 1999]. In dieser Arbeit wurden DTC-Zelllinien, welche aus dem Knochenmark von Krebspatienten etabliert wurden [Pantel et al., 1995], als *in vitro* Modellsystem zur funktionellen Analyse von DTC verwendet. Diese Zelllinien wurden bereits erfolgreich als Modellsystem für Analysen von DTC auf DNA- [Gangnus et al., 2004; Kraus et al., 2003; Offner et al., 1999], RNA- [Putz et al., 1999] und Proteinebene [Putz et al., 1999; Bartkowiak et al., 2009] eingesetzt. Die DTC-Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1 wurden aus dem Knochenmark von Patienten mit einem Lungen-, Brust- bzw. Prostatakarzinom etabliert.

## 1.3 Der PI3K/AKT-Signalweg

Der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalweg ist einer der wichtigsten Signalwege bei der Regulation von Zellwachstum und Überleben. Die PI3K wird hauptsächlich über Wachstumsfaktoren wie EGF oder PDGF, über Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR und ErbB2, aktiviert. Neben seiner physiologischen Funktion besitzt der PI3K/AKT-Signalweg eine große Bedeutung bei der Tumorprogression und Metastasierung verschiedener Tumorentitäten, wie Lungen- und Brustkrebs [Cantley, 2002; Vogt et al., 2010; Franke, 2008; Castaneda et al., 2010].

### 1.3.1 Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)

Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) gehören zu einer Familie von Lipidkinasen, welche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, die ein breites Spektrum an zellulären Funktionen regulieren. Die PI3K phosphorylieren spezifisch die 3'-OH-Gruppe des Inositolrings von membranständigen Phosphoinositiden, wodurch die D3-Phosphoinositide  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ ,  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  und  $\text{PtdIns}3\text{P}$  in der Membran entstehen [Vanhaesebroeck et al., 2001], Das  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  ist das Hauptprodukt der PI3K nach Rezeptorstimulation und übernimmt eine wichtige Funktion bei der Aktivierung des AKT-Signalwegs.  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  rekrutiert und lokalisiert Signalproteine mit Lipid-bindenden Pleckstrin-Homologie (PH)-Domänen, wie AKT, an die Innenseite der Plasmamembran, was zu ihrer Aktivierung führt [Vanhaesebroeck et al., 2001].

Es gibt drei Klassen von PI3K, Klasse I, II und III, wobei Klasse I in IA und IB unterteilt wird. Die PI3K der Klasse I generieren das  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ , wobei die PI3K IA am besten charakterisiert ist und am häufigsten mit Krebs in Verbindung gebracht wird [Engelman, 2009]. Klasse IA PI3K sind heterodimere Enzyme aus einer regulatorischen (p85) und einer katalytischen (p110) Untereinheit. Bei Säugetieren gibt es drei Gene, die für Klasse IA katalytische Untereinheiten der PI3K,  $\text{p110}\alpha$ ,  $\text{p110}\beta$  und  $\text{p110}\delta$  codieren sowie drei Gene, die für Klasse IA regulatorische Untereinheiten der PI3K,  $\text{p85}\alpha$ ,  $\text{p85}\beta$  und  $\text{p55}\gamma$  codieren [Liu et al., 2009]. Die Klasse IB der PI3K stellt ein Heterodimer aus der katalytischen Untereinheit  $\text{p110}\gamma$  und einer regulatorischen Untereinheit  $\text{p101}$ ,  $\text{p87}$  oder  $\text{p84}$  dar. Während Klasse IA PI3K über die Rekrutierung von p85 an aktivierte Rezeptortyrosinkinasen oder daran assoziierte Adapterproteine aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der Klasse IB über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled*

*receptors*, GPCRs) durch direkte Interaktion der regulatorischen Untereinheit mit  $G\beta\gamma$  von trimeren G-Proteinen [Katso et al., 2001].

### 1.3.2 Die Proteinkinase B/AKT

Die Serin/Threonin Kinase AKT gehört zur Superfamilie der AGC-Kinasen (*cAMP-dependent protein kinase A/protein kinase G/protein kinase C*), zu denen unter anderem auch die Proteinkinase A (PKA) und PKC zählen. AGC-Kinasen teilen strukturelle Eigenschaften, insbesondere in der Kinasedomäne und besitzen einen ähnlichen Mechanismus der Aktivierung [Pearce et al., 2010]. Unabhängig voneinander identifizierten 1991 drei Arbeitsgruppen ein 60 kDa schweres cytosolisches Protein, das AKT. Während Bellacosa et al. AKT als das humane Homolog des viralen Onkogens v-akt des transformierenden Retrovirus AKT8 identifizierten, suchten und fanden Coffey et al. und Jones et al. eine Kinase mit starker Homologie zur PKA und PKC, welche sie PKB bzw. rac-PK nannten [Bellacosa et al., 1991; Coffey and Woodgett, 1991; Jones et al., 1991]. Es stellte sich heraus, dass in allen drei Arbeiten das gleiche Protein beschrieben wurde. In der Literatur haben sich vor allem die Namen AKT und PKB durchgesetzt. In dieser Arbeit wird durchgehend die Bezeichnung AKT verwendet.

#### 1.3.2.1 Die AKT-Isoformen

In Säugetierzellen wurden drei AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 identifiziert, welche von drei unterschiedlichen Genen kodiert werden und auf den Chromosomen 14q32 (12F1-2), 19q13 (7B1) bzw. 1q44 (1H4-6) lokalisiert sind [Chan et al., 1999; Murthy et al., 2000]. Die AKT-Isoformen weisen eine starke Sequenzhomologie auf, die etwa bei 85% liegt und besitzen eine konservierte Domänenstruktur (siehe Abb. 1.3). Alle drei AKT-Isoformen besitzen N-terminal eine Plekstrin Homologie-Domäne (PH), eine zentral gelegene Kinasedomäne sowie eine C-terminale regulatorische Domäne mit einem hydrophoben Motiv. Die N-terminale PH-Domäne besteht aus etwa 100 Aminosäuren (AS) und interagiert mit membranassoziierten Lipidprodukten wie dem  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ , welches von der PI3K generiert wird [Thomas et al., 2002; Kumar and Madison, 2005]. Die Kinasedomäne der AKT-Isoformen ist besonders Homolog zu anderen AGC-Kinasen, außerdem befindet sich in dieser Region ein konservierter Threoninrest (T308 in AKT1, T309 in AKT2 und T305 in AKT3), dessen Phosphorylierung für die Aktivierung von AKT und anderen AGC-Kinasen essentiell ist [Alessi et al., 1996a]. Im Anschluss an

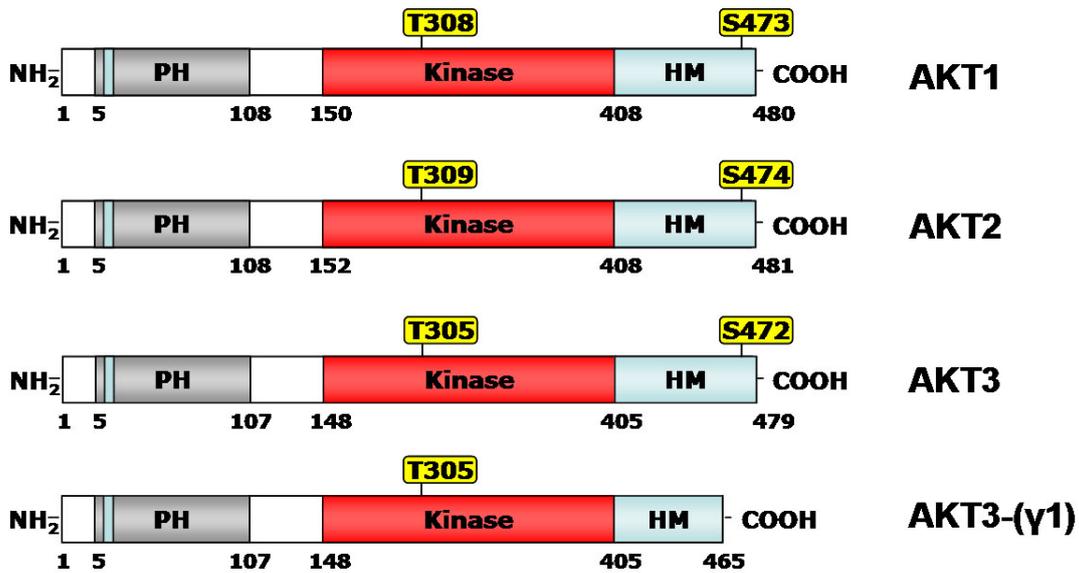


Abbildung 1.3: **Domänenstruktur der AKT-Isoformen.** Die AKT-Isoformen besitzen N-terminal eine Plekstrin-Homologie (PH)-Domäne, zentral gelegen eine Kinasedomäne und C-terminal eine regulatorische Domäne mit einem hydrophoben Motiv (HM).

die Kinasedomäne folgt C-terminal die regulatorische Domäne, welche ein hydrophobes Motiv (HM) beinhaltet. Das HM ist durch die Sequenz F-X-X-F/Y-S/T-Y/F (X = jede AS) definiert und ist für AGC-Kinasen typisch [Peterson and Schreiber, 1999]. Bei allen AGC-Kinasen ist die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrests innerhalb des HM (S473 in AKT1, S474 in AKT2 und S472 in AKT3) für die vollständige Aktivierung der Kinase notwendig [Andjelkovic et al., 1996]. Interessanterweise existiert beim AKT3 der Ratte sowie bei AKT3-( $\gamma$ 1), der C-terminal verkürzten humanen Splicevariante von AKT3, dieser konservierte Serinrest im HM nicht, weshalb angenommen wird, dass diese AKT-Varianten unabhängig von der Phosphorylierung im HM aktiviert werden [Konishi et al., 1994; Brodbeck et al., 2001].

Sowohl AKT1 als auch AKT2 werden ubiquitär exprimiert, wobei AKT2 einen Expressionsschwerpunkt in Insulin-sensitiven Organen wie Leber, Fett und Muskelgewebe besitzt [Altomare et al., 1998; Yang et al., 2005]. Die AKT-Isoform 3 wird dominant in Gehirn, Testis und Ovarien exprimiert, konnte aber in geringen Mengen auch in anderen Organen, wie Mamma und Lunge nachgewiesen werden [Zinda et al., 2001; Yang et al., 2005; Easton et al., 2005]. Unterschiedliche Expressionslevel der AKT-Isoformen müssen allerdings nicht unbedingt etwas über ihre Aktivität aussagen. In einigen Gewe-

ben und bei Differenzierungsprozessen konnten unterschiedliche Kinaseaktivitäten der AKT-Isoformen beobachtet werden ohne mit dem Expressionslevel der entsprechenden AKT-Isoform zu korrelieren [Walker et al., 1998; Fujio et al., 1999].

### 1.3.3 Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs

Der PI3K/AKT-Signalweg wird für gewöhnlich wachstumsfaktorabhängig über membranständige Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert (siehe Abb. 1.4).

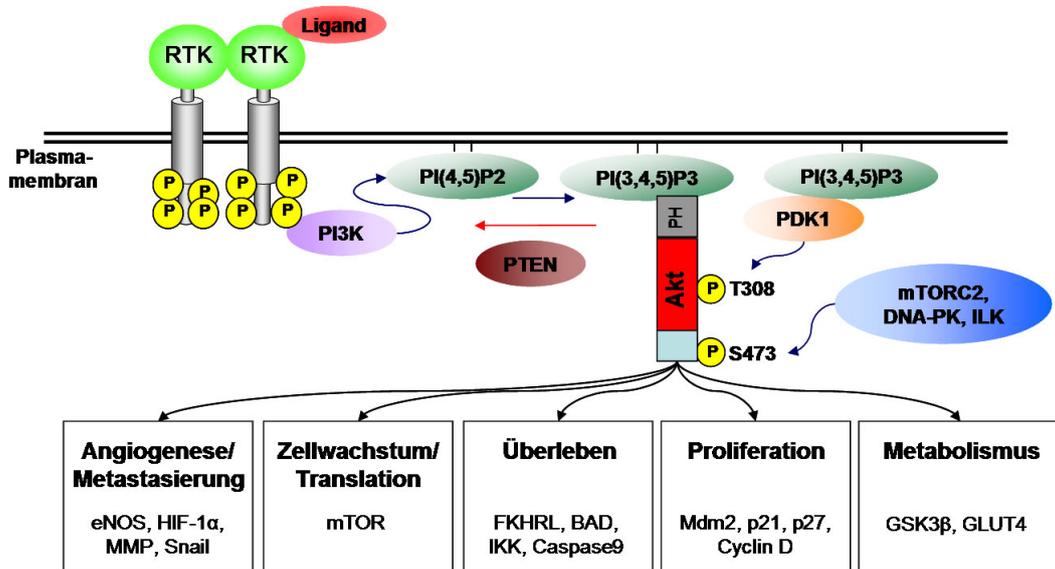


Abbildung 1.4: **Der PI3K/AKT-Signalweg.** Der PI3K/AKT-Signalweg wird Liganden-induziert über membranlokalisierte Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert. Die PI3K katalysiert die Phosphorylierung von membranständigem PI(4,5)P<sub>2</sub> zu PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Auf Grund der hohen Affinität der PH-Domäne von AKT zum PI(3,4,5)P<sub>3</sub> kommt es zur Membranrekrutierung von AKT. An der Membran lokalisiert wird AKT vom mTORC2, der ILK oder der DNA-PK am S473 und von der PDK1 am T308 phosphoryliert und dadurch vollständig aktiviert. AKT reguliert zelluläre Funktionen, wie Metabolismus, Proliferation und Apoptose, über die Phosphorylierung verschiedener Substrate, wie GSK3β, p21 und BAD. Der PI3K/AKT-Signalweg wird über die Phosphatase PTEN negativ reguliert.

Hierbei kommt es zur Liganden-induzierten Dimerisierung zweier monomerer Rezeptoruntereinheiten und folgend zur Auto- und Transphosphorylierung von intrazellulär gelegener Tyrosinreste des Rezeptors. Diese phosphorylierten Tyrosinreste (pY) fungieren als neue Bindungsstellen für Proteine mit einer *Src homology domain 2* (SH2)-Domäne, wie der p85-Untereinheit der PI3K [Coffer and Woodgett, 1991; Chan et al., 1999; Blume-

Jensen and Hunter, 2001; Schlessinger, 2000]. Nach Bindung der p85-Untereinheit der PI3K an pY kommt es zur Konformationsänderung und zur Aktivierung der katalytischen p110-Untereinheit der PI3K. Die p110-Untereinheit katalysiert die Phosphorylierung von membranständigem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>. Auf Grund der Entstehung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> kommt es zur Membranrekrutierung von AKT und der Phosphoinositid-abhängigen-1-Kinase (PDK1), welche über ihre PH-Domänen an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binden [M. Andjelkovic et al., 1997; Lemmon and Ferguson, 2000; Wymann et al., 2003]. An der Membran lokalisiert kommt es durch Phosphorylierung der konservierten AS-Reste von AKT nämlich T308 (AKT1) und S473 (AKT1) zur Aktivierung von AKT. Die genaue Abfolge der Aktivierung von AKT ist nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich kommt es zunächst, wie für AGC-Kinasen üblich, zur Phosphorylierung des C-terminalen hydrophoben Motivs am S473 von AKT1. Diese Phosphorylierung wird durch den mTORC2 (*mammalian target of rapamycin complex 2*) [Sarbasov et al., 2005], der DNA-PK (DNA-abhängigen Proteinkinase) [Feng et al., 2004] oder der ILK (*integrin-linked kinase*) [Delcommenne et al., 1998] vermittelt. Auf Grund der Phosphorylierung im HM kommt es zur Konformationsänderung von AKT. Als Folge wird die Bindung der Aktivierungsschleife (T-Schleife), welche sich in der Kinasedomäne von AKT befindet, an die PIF-Tasche (*PKC related kinase 2 (PRK2)- interacting factor pocket*) der PDK1 begünstigt. Die PDK1 phosphoryliert AKT in der Kinasedomäne am T308 (AKT1), wie andere AGC Kinasen auch [Bayascas, 2008]. Im doppelphosphorylierten Zustand ist AKT vollständig aktiviert und reguliert durch Phosphorylierung zahlreicher Substrate, wie GSK3 $\beta$ , p21 und BAD, verschiedene zelluläre Funktionen, wie Metabolismus, Proliferation und Apoptose [Bellacosa et al., 1998; Woodgett, 2005]. Der PI3K/AKT-Signalweg wird durch die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin-homolog deleted on chromosome 10*) negativ reguliert. Der Tumorsupressor PTEN dephosphoryliert PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und wirkt der PI3K damit direkt entgegen und schaltet die AKT Aktivierung ab [Simpson and Parsons, 2001](siehe Abb. 1.4).

#### 1.3.4 Spezifität von AKT-Isoformen

Obwohl die AKT-Isoformen hoch konserviert und Sequenzhomolog sind gibt es Hinweise für die Spezifität von AKT-Isoformen. Mehrere Arbeiten, insbesondere an AKT-Isoform-spezifischen *knockout* Mäusen, konnten Unterschiede in den Funktionen der AKT-Iso-

formen nachweisen. Der *knockout* von AKT1 führt zur Kleinwüchsigkeit, einer gesteigerten Apoptoserate in verschiedenen Gewebetypen sowie zu einer gesteigerten postnatalen Mortalität. Im Gegensatz dazu weisen AKT2<sup>-/-</sup> Mäuse eine Glukoseintoleranz auf, ähnlich einer Diabetes Typ2-Erkrankung. Hieraus ergibt sich für AKT1 eine spezifische Funktion für Wachstum und Apoptose und für AKT2 eine Funktion bei der Regulation der Glukosehomöostase. Die AKT3<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen außer einer verkleinerten Gehirngröße, auf Grund kleinerer Zellen, keinen Phänotyp, weshalb AKT3 eine spezifische Funktion bei der neuronalen Entwicklung zugewiesen wird. Die Kombinationen der einzelnen *knockout* Mäuse haben ergeben, dass nur der Doppel-*knockout* von AKT2 und AKT3 lebensfähig ist. Damit ergibt sich für die AKT-Isoform 1 die bedeutendste Funktion bei der Entwicklung, welche von den AKT-Isoformen 2 und 3 alleine nicht kompensiert werden kann [Cho et al., 2001b,a; Tschopp et al., 2005; Dummler et al., 2006].

Auf Grund der starken Homologie der Kinasedomäne der AKT-Isoformen sind spezifische Substrate von AKT-Isoformen als Grundlage spezifischer Funktionen der AKT-Isoformen eher unwahrscheinlich. Es wird davon ausgegangen, dass die AKT-Isoformen *in vitro* eine identische Substratspezifität aufweisen, wobei eine minimale Konsensussequenz R-X-R-XX-S/T-Hyd (X = jede AS; Hyd = hydrophobe AS) für die *in vitro* Phosphorylierung von AKT definiert wurde [Alessi et al., 1996b]. Auch der Mechanismus der Aktivierung der AKT-Isoformen scheint identisch zu sein. Eine mögliche *in vivo* Substratspezifität von AKT-Isoformen könnte durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der AKT-Isoformen bedingt sein. Erste Studien zeigen, dass AKT-Isoformen in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind. Während AKT1 im Zytoplasma und im Zellkern gleichermaßen lokalisiert ist, findet man AKT2 an der Mitochondrienmembran assoziiert. Im Gegensatz dazu ist AKT3 vor allem im Zellkern und an der Zellkernmembran lokalisiert [Santi and Lee, 2010].

Eine weitere Möglichkeit der *in vivo* Substratspezifität von AKT-Isoformen könnte durch spezifische Bindungspartner der AKT-Isoformen vermittelt werden. Eine Reihe von AKT-bindenden Proteinen wurde bislang identifiziert, die an unterschiedliche Regionen von AKT binden. Durch die Bindung von Interaktionspartnern kann sowohl die Aktivität als auch die Lokalisation und Stabilität von AKT beeinflusst werden. Interessanterweise hat sich hierbei gezeigt, dass es AKT-Isoform-spezifische Bindungspartner gibt. Das Protein JIP1 bindet beispielsweise bevorzugt an AKT1, nicht aber an AKT2 [Kim et al., 2002]. Im Gegensatz dazu bindet PHB2 bevorzugt an AKT2 und nicht

an AKT1 [Héron-Milhavet et al., 2008], während die Tcl-1 Familienmitglieder Tcl-1b und MTC1 an AKT1 und AKT2, nicht aber an AKT3 binden [Noguchi et al., 2007]. Desweiteren könnte die Spezifität der AKT-Isoformen über die Inaktivierung von AKT vermittelt werden (siehe Abb 1.5).

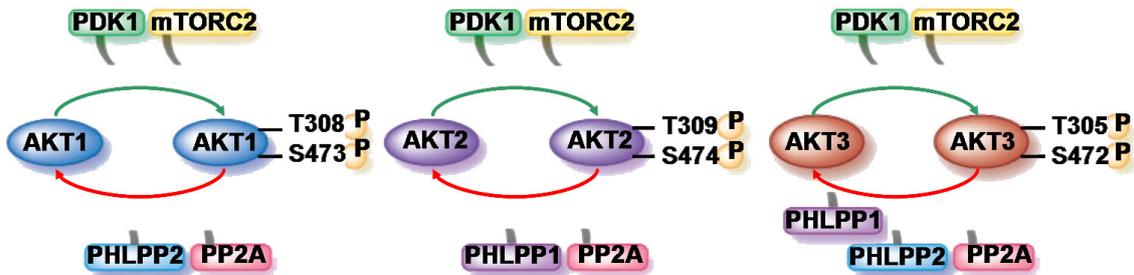


Abbildung 1.5: **Regulation der Aktivierung von AKT.** Alle AKT-Isoformen werden von mTORC2 am Serinrest im HM und von der PDK1 am Threonin in der Kinasedomäne phosphoryliert. Die Dephosphorylierung am Threoninrest wird bei allen AKT-Isoformen von der PP2A vermittelt. Der Serinrest im HM der AKT-Isoformen wird spezifisch von PHLPP1 und PHLPP2 reguliert (in Anlehnung an Dillon and Muller, 2010).

Während der Mechanismus der Aktivierung von AKT-Isoformen identisch zu sein scheint, wird die Inaktivierung von AKT mittels Dephosphorylierung über spezifische Phosphatasen reguliert. Hierbei spielt die *PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase* (PHLPP) eine wichtige Rolle. PHLPP dephosphoryliert AKT am S473 im HM. Die PHLPP Familie besteht aus drei Mitgliedern: PHLPP1 $\alpha$ , PHLPP1 $\beta$  und PHLPP2 [Gao et al., 2005], wobei  $\alpha$  und  $\beta$  Splicevarianten desselben Gens sind [Brognard et al., 2007]. PHLPP Familienmitglieder bestehen aus einer PH-Domäne, einer Region mit Leucin-reichen Wiederholungen, einer Proteinphosphatase 2C Domäne und einem C-terminalen PDZ-Bindemotiv. Sie gehören der Familie der Mg<sup>2+</sup>-aktivierten Proteinphosphatasen an, die Mg<sup>2+</sup> (Magnesium) oder Mn<sup>2+</sup> (Mangan) für ihre katalytische Aktivität benötigen. An Hand von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die PH-Domäne von PHLPP nicht für deren Regulation von AKT benötigt wird. Hingegen kann bei einem Verlust des PDZ-Bindemotivs AKT nicht mehr dephosphoryliert werden [Gao et al., 2005]. Die AKT-Isoformen werden spezifisch von PHLPP1 und PHLPP2 reguliert. Studien zeigten, dass PHLPP1 die Phosphorylierung von AKT2 und AKT3,

nicht aber von AKT1, beeinflusst, während PHLPP2 sowohl AKT1 als auch AKT3 dephosphoryliert [Brognard et al., 2007].

### 1.3.5 Die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs beim Krebs

Der PI3K/AKT-Signalweg ist in verschiedenen Tumorentitäten häufiger durch genetische Veränderungen betroffen, als jeder andere Signalweg. Als Folge dieser genetischen Veränderungen kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, was die Tumorigenese vorantreibt. Hierbei kann jedes Mitglied dieser Signalkaskade mutiert, amplifiziert oder deletiert sein. Es wurden sowohl Mutationen in der katalytischen p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K als auch der Verlust von PTEN sowie Mutationen im AKT und Amplifikation von Rezeptortyrosinkinasen beschrieben. Beim Mammakarzinom wurde eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in mehr als 70% der Fälle beobachtet [López-Knowles et al., 2010]. Die Expression von pAKT(S473) ist mit einem aggressiven Phänotyp assoziiert und korreliert mit einer schlechten klinischen Prognose [Wu et al., 2008], was die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs bei der Tumorprogression und Metastasierung in den Vordergrund stellt [Yuan and Cantley, 2008; Castaneda et al., 2010].

#### 1.3.5.1 Genetische Veränderungen des PI3K/AKT-Signalwegs beim Krebs

Somatische Mutationen in dem PIK3CA Gen (p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K) sind besonders häufig und treten beim Mammakarzinom in 28-40% der Fälle auf [Oda et al., 2005; Pérez-Tenorio et al., 2007]. Hierbei stehen drei Mutationen im Vordergrund, zwei davon befinden sich im Exon 9 und haben die Entkopplung der inhibitorischen Interaktion der p85-Untereinheit von der helikalen Domäne der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K zur Folge. Die dritte Mutation befindet sich im Exon 20 und resultiert in einer begünstigten Membranassoziation der p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K. Diese drei Mutationen machen etwa 80% der PI3K Mutationen aus, haben eine gesteigerte Aktivität von AKT zur Folge und sind mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert [Castaneda et al., 2010].

Die Inaktivierung von PTEN führt zur Akkumulation von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, was die Tumorigenese beim Mammakarzinom fördert. Die Inaktivierung von PTEN kann entweder über somatische Mutationen zu einem trunkierten Protein führen oder durch Deletion, Repression der Transkription sowie epigenetische Mechanismen die Expression von PTEN reduzieren. PTEN Mutationen findet man beim Mammakarzinom in weniger

als 5% der Fälle, während eine reduzierte Expressionsrate auf Grund der Hypermethylierung oder Deletionen des Promotors in mehr als 48% der Fälle beobachtet wird [Saal et al., 2005; Vitolo et al., 2009].

Zudem wurde kürzlich eine Mutation in der PH-Domäne von AKT1 (E17K) identifiziert, bei der es auf Grund eines AS-Austausches zur veränderten Lipidbindung kommt, was in einer konstitutiven Membranlokalisation und folgend in einer konstitutiven Aktivierung von AKT1 resultiert. Diese AKT1 Mutation tritt sehr selten auf (1,4-8%) und ist mit einem positiven Hormonrezeptorstatus assoziiert [Carpten et al., 2007; Brugge et al., 2007; Stemke-Hale et al., 2008]. Beim Melanom konnte diese Mutation auch im AKT3 nachgewiesen werden [Davies et al., 2008].

Darüber hinaus findet man häufig eine Überexpression verschiedener RTKs, wie EGFR und ErbB2, was neben einer gesteigerten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs auch zur Aktivierung anderer Signalkaskaden wie dem Ras/MAPK-Signalweg führt und damit die Tumorigenese besonders begünstigt [Yuan and Cantley, 2008].

### 1.3.5.2 Rolle des PI3K/AKT-Signalwegs bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen

In den letzten Jahren haben einige Studien gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg eine prädiktive Rolle bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber verschiedener Therapeutika haben kann. Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs wurde mit einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht [West et al., 2002]. Darüber hinaus kann die Aktivierung dieses Signalwegs beim Mammakarzinom vor allem Auskunft über das Ansprechen auf eine Hormontherapie geben, wobei ER<sup>+</sup>-Mammakarzinome mit einer gesteigerten AKT-Aktivität schlechter auf eine Hormontherapie ansprechen [Kirkegaard et al., 2005]. Außerdem wird eine gesteigerte Aktivierung von AKT beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom mit einer Resistenz gegenüber einer Therapie mit dem ErbB2-Antikörper Herceptin in Verbindung gebracht [Berns et al., 2007].

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von kleinen Molekülinhibitoren (*small molecule inhibitors*), welche auf den PI3K/AKT-Signalweg abzielen, entwickelt und es konnte gezeigt werden, dass diese das Wachstum und die Vaskularisierung von Tumorzellen blockieren. Während eine Monotherapie mit diesen Inhibitoren weniger effizient zu sein scheint, bietet die Kombination mit anderen Therapieansätzen wie Chemotherapeutika, Hormontherapie oder Herceptin eine viel versprechende Aussicht auf verbes-

serte Therapieansätze. Der PI3K-Inhibitor BEZ235 (Novartis, Basel, Schweiz), welcher die PI3K und mTOR inhibiert sowie der AKT-Inhibitor MK2206 (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) befinden sich derzeit in klinischen Studien der Phase I [Tolcher AW, 2009; Pao and Girard, 2011].

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, Funktionen von AKT-Isoformen in ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen und in disseminierten Tumorzellen (DTC) zu untersuchen.

Als Modellsystem zur Analyse von Funktionen von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom sollte das transgene Mausmodell Balb-neuT dienen, welches eine aktivierte Form von ErbB2 als Transgen unter der Kontrolle des MMTV-Promotors trägt. Zum einen sollte die Aktivierung des AKT-Signalwegs sowie die Expression der drei AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 in den primären Balb-neuT-Mammtumoren untersucht werden. Zum anderen sollte mit Hilfe eines neu etablierten AKT-Isoform-spezifischen *in vitro* Kinaseassays die Aktivitäten der AKT-Isoformen in den Balb-neuT-Tumoren bestimmt werden, um die Bedeutung der einzelnen AKT-Isoformen näher zu charakterisieren. Darüber hinaus sollten Zellen aus den Balb-neuT-Mammatumoren kultiviert werden, an Hand derer funktionelle Analysen der AKT-Isoformen *in vitro* durchgeführt werden sollten. Dafür sollte die Expression der AKT-Isoformen mittels AKT-Isoform-spezifischer shRNA-Vektoren gehemmt werden, um funktionelle Effekte auf die Proliferation und die Genexpression der Zellen nach Verlust von jeweils einer der AKT-Isoformen zu studieren. Durch Expressionsanalysen der AKT-Isoform-spezifischen *knockdown*-Zellen sollten die an den beobachteten Effekten beteiligten AKT-Substrate näher untersucht werden. An Hand der Analyse von humanen Mammakarzinomproben sollte die Bedeutung von AKT-Isoformen auch *in vivo* analysiert werden.

Als Modellsystem zur Untersuchung von Funktionen von AKT-Isoformen in DTC sollten humane DTC-Zelllinien, welche aus dem Knochenmark von Patienten mit Lungen-, Brust- oder Prostatakarzinom etabliert wurden, verwendet werden. Auch hier sollte die Aktivierung der AKT-Isoformen mit Hilfe eines neu etablierten AKT-Isoform-spezifischen *in vitro* Kinaseassays in DTC bestimmt werden, sowie die Hemmung einzelner AKT-Isoformen mittels lentiviraler shRNA-Vektoren Aufschluss über spezifische Funktionen von AKT-Isoformen für Proliferation, Apoptose und Migration in DTC geben. Außerdem sollte die Rolle der EGF-vermittelten Signaltransduktion auf die Pro-

liferation und Apoptose sowie die daran beteiligten AKT-Isoformen in DTC analysiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen zu einem verbesserten molekularem Verständnis der Signaltransduktion von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom und in DTC führen und helfen, neue spezifische Therapieansätze in der Krebsforschung zu entwickeln.

# Kapitel 2

## Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Merck, Darmstadt (Deutschland), Fluka, Buchs (Schweiz), Biomol, Hamburg (Deutschland), Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland), Calbiochem, Bad Soden (Deutschland), Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland), Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland) und Bio-Rad, München (Deutschland) bezogen.

#### 2.1.2 Geräte

**Protein-Gelelektrophoresekammern:** SE 600 Cooled Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 16 cm<sup>2</sup>, Hoefer, MA, (USA). SE 640 Wide-Mini Vertical Electrophoresis Unit, 18 x 8 cm<sup>2</sup>, Hoefer, MA (USA). PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad, München (Deutschland); XCell SureLock Mini-Cell, Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland).

**Blotkammer:** Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, München (Deutschland).

**Horizontalschüttler:** Schüttler RO 10, Gerhardt, Königswinter (Deutschland).

**Schüttelinkubator:** G25 Incubator shaker, New Brunswick scientific Edison (USA).

**Wipptisch:** Rocky N, Fröbel Labortechnik, Lindau (Deutschland).

**Heizblöcke:** STK Schnipptherm, Schutron Labortechnik, Quedlinburg (Deutschland); Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg (Deutschland).

**Stromversorgungsgeräte:** Electrophoresis Power Supply EPS 200, Amersham Phar-

macia (Biotech, Uppsala, Schweden); PowerPac 200, PowerPac 1000 und PowerPac Universal, Bio-Rad, München (Deutschland).

**Mikrowelle:** R-3A55, Sharp, Hamburg, (Deutschland).

**Zentrifugen:** Galaxy Mini, VWR, Darmstadt (Deutschland); Biofuge pico und Varifuge OR.3, Heraeus, Hanau (Deutschland); Sorvall RC-5B refrigerated superspeed; Centrifuge, DuPont Instruments, Cincinnati, OH (USA); 5415 C und 5415 R, Eppendorf, Hamburg (Deutschland).

**Thermocycler:** T3, Biometra, Göttingen (Deutschland).

**Heizplatte/Magnetrührer:** IKAMAG RH, IKA-Werke, Staufen (Deutschland); MR 1, Heidolph Instruments, Schwabach (Deutschland).

**pH-Meter:** CG 820, Schott-Geräte, Ludwigshafen (Deutschland).

**pH-Elektrode:** pH-Electrode Sentix 21, WTW, Weilheim (Deutschland).

**Brutschränke:** Bakterien: BE 400, Memmert, Schwabach (Deutschland); Zellkultur: Heraeus, Hanau (Deutschland).

**Werkbänke:** Bakterien: Typ 20229, MDH, Saskatoon, Saskatchewan (Kanada); Zellkultur: HERA safe Type HS 12, Heraeus, Hanau (Deutschland).

**Photometer:** Ultrospec III, Pharmacia, Uppsala (Schweden); Flow Titertek Multiskan PLUS Mk 11, ICN Biomedicals, Frankfurt (Deutschland); BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg (Deutschland) mit Thermodrucker DPU 414, Seiko Instruments, Neu-Isenburg (Deutschland).

**Waagen:** Type PM 200 und Type PM 2000, Mettler Instrumente, Gießen (Deutschland).

**Vortexer:** MS2 Minishaker, IKA-Werk, Staufen (Deutschland).

**Zählkammer:** Neubauer, Braun, Meslungen (Deutschland).

**Wasserbäder:** Typ 1012 und Typ 1002, GFL, Burgwedel (Deutschland).

**UV-Tisch:** IL-350-M, Bachofer, Reutlingen (Deutschland) mit Video Monitor WV-BM900 (Panasonic), Video Graphic Printer UP-890CE, (Sony) FMC (Kappa).

**Luminescent Image Analyzer:** LAS-3000, Fujifilm, Düsseldorf (Deutschland).

**Light Cycler:** Carousel-based System, Rosch, Grenzach (Deutschland).

**Gewebehomogenisator:** Tissue Lyser, MP (USA).

**Mikroskope:** Labovert Typ 090-122.012, Leitz, Wetzlar (Deutschland); Axiovert 25 und LSM 510 META, Zeiss, Jena (Deutschland);.

**Nanodrop Spectrophotometer:** Nad-1000, Thermo Scientific, Bonn (Deutschland).

**Durchflusszytometer:** BD FACS Canto, BD, Franklin Lakes, NJ (USA).

**Rotoren:** Sorvall GSA und Sorvall SS-34, DuPont Instruments, Cincinnati, OH (USA).

### **2.1.3 Verbrauchsmaterialien**

**Reaktionsgefäße:** 2, 1,5, 0,5 und 0,2 ml, Eppendorf, Hamburg (Deutschland).

**Röhrchen:** 15 und 25 ml, **Platten:** 96-, 24-, 12- und 6-Loch und **Schalen:** 10 cm, Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland).

**Kryoröhrchen:** 1,5 ml, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Bonn (Deutschland).

**Light Cycler Kapillaren:** Roche, Grenzach (Deutschland)

**Plastikgefäße:** VWR, Darmstadt (Deutschland).

**Glasgeräte:** Schott, Mainz (Deutschland).

**Pipettenspitzen:** 1000, 200 und 10  $\mu\text{l}$ , Eppendorf, Hamburg (Deutschland), 2,5  $\mu\text{l}$ , Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland).

**Einmalpipetten:** 5, 10 und 25 ml, Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland).

**Transwell:** Einsatz für 24-Loch Platten mit 8  $\mu\text{m}$  Porengröße, Costar, NY (USA).

**Gewebehomogenisationstubes:** Lysis Matrix-D, MP (USA).

**Zellschaber:** Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland).

**Acrodisc-Spritzenfilter mit HT Tuffryn-Polysulfonmembran:** 0,45  $\mu\text{m}$ , Pall, Port Washington, NY (USA).

**Spritzen:** 10 ml, Braun, Melsungen (Deutschland).

**Parafilm:** Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL (USA)).

**Nitrocellulose und Whatman-Papier,** Schleicher und Schuell, Dassel (Deutschland)

#### 2.1.4 Kits, Reagenzien und Marker

**Proliferationsassay:** Kalorimetrischer BrdU ELISA, Rosch, Grenzach (Deutschland); BrdU Flow Kit, BD Pharmingen, CA (USA).

**Apoptoseassay:** Cell Death Detection ELISA, Rosch, Grenzach (Deutschland); AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit, Calbiochem, Bad Soden (Deutschland).

**RNA-Isolation:** RNA NucleoSpin II, Macherey-Nagel, Düren, (Deutschland).

**cDNA-Synthese:** SuperScript III (200 U/ $\mu$ l), dNTPs (10 mM von jedem), 0,1 M DTT und Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer (0,5 mg/ml), Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland).

**qPCR:** LightCycler Kit, Rosch, Grenzach (Deutschland).

**AKT Kinaseassay:** AKT kinase assay Kit, Cell Signaling Technology, MA (USA).

**IHC DAB-Kit:** Envision+ System, HRP (DAB), DAKO, Hamburg (Deutschland) .

**RotiHistol:** Carl Roth, Karlsruhe (Deutschland).

**0,3% Eosin G9:** wässrig, Merck, Darmstadt (Deutschland).

**Eukitt:** O. Kindler GmbH, Freiburg (Deutschland).

**Mounting Medium mit DAPI:** Vector Laboratories, Burlingame, CA (USA).

**ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektionsreagenzien:** SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate und SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Fisher Scientific, Bonn (Deutschland)).

**Protein-G-Sepharose:** 4 Fast Flow, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala (Schweden). **High range und Low range biotinylated SDS-PAGE Standards:** Bio-Rad, München (Deutschland).

**Spectra Multicolor:** Fermentas, St. Leon-Rot (Deutschland).

### 2.1.5 Antikörper für Western Blot, Immunpräzipitation und Färbungen

#### Primäre Antikörper

Phospho-AKT(Ser473) (193H12) Rabbit mAb (#4058), Phospho-AKT(Thr308) Rabbit mAb (#9275), AKT (pan) (11E7) Rabbit mAb (#4685), AKT1 (C73H10) Rabbit mAb (#2938), AKT1 (2H10) Mouse mAb (#2967), AKT2 (5B5) Rabbit mAb (#2964), Cyclin D1 (DCS6) Mouse mAb (#2926), Cyclin D3 (DCS22) Mouse mAb (#2936), Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877) Antibody (#2241), Phospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289) 21D3 Rabbit mAb (#4791), Cell Signaling Technology, MA (USA). Lagerung bei -20°C. AKT2 (8B7) (#sc-81436), pER $\alpha$  (Ser167) (#sc-101676), HSC70 (B-6) (#sc-7298), Santa Cruz Biotechnology, CA (USA). Lagerung bei 4°C. Anti-AKT3/ PKB $\gamma$ , clone GMA104 (#05-780), Millipore GmbH, Schwallbach (Deutschland). Lagerung bei 4°C. Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (#P1951) Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland). c-erbB-2 (#OP-15), Calbiochem, Bad Soden (Deutschland) und c-erbB-2 (#A0485), Dako, Hamburg (Deutschland). Lagerung bei 4°C.

#### Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert ; Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Streptavidin-HRP-Konjugat (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Kaninchen IgG und Alexa Fluor 594 Ziege-Anti-Maus IgG, Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland). Lagerung bei 4°C.

### 2.1.6 Vektoren für die lentivirale Transduktion

**psPAX2 lenti gag-pol:** Codiert lentivirale gag- und pol-Proteine unter der Kontrolle des SV40-Promotors. Diese Proteine werden benötigt, um die Zielsequenz in das Wirtsgenom zu integrieren.

**pMD2.G VSV-G:** Codiert für das Vesikuläre Stomatitis Virus G (VSV-G) Hüllprotein, welches für den Viruseintritt verantwortlich ist.

**pLKO-1.puro** Lentiviraler Vektor, welcher entweder die AKT1, AKT2 oder AKT3 spezifische shRNA, sowie die scrambled shRNA als Kontrolle codiert. Zusätzlich liegt auf diesem Vektor, als Reportergen eine Puromycinresistenz codiert vor. Bei der lentiviralen Transduktion (siehe 2.2.4) kommt es zur Genomintegration dieser codierenden Sequenz.

Spezies	shRNA	TRC.-Nr.	Sequenz
human und murin	Kontrolle	0000039797	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC- GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTGTTTTT
human	AKT1	0000039797	CCGGCGCGTGACCATGAACGAGTTTCTC- GAGAAACTCGTTCATGGTCACGCGTTTTTG
human	AKT2	0000039970	CCGGGCAGAGATTGTCTCGGCTCTTCTC- GAGAAGAGCCGAGACAATCTCTGCTTTTTG
human	AKT3	0000039891	CCGGCCAAAGCCAAACACATTTATACTC- GAGTATAAATGTGTTTGGCTTTGGTTTTTG
murin	AKT1	0000022935	CCGGGCACATCAAGATAACGGACTTCTC- GAGAAGTCCGTTATCTTGATGTGCTTTTTT
murin	AKT2	0000055258	CCGGGCCACGGTACTTCCTTCTGAACTC- GAGTTCAGAAGGAAGTACCGTGGCTTTTTG
murin	AKT3	0000054724	CCGGCTATGCTATGAAGATTCTGAACTC- GAGTTCAGAATCTTCATAGCATAGTTTTTG

Tabelle 2.1: Sequenzen der AKT-Isoform-spezifische shRNAs und der *non-target* Kontrolle

Der pLKO-1.puro Vektor mit den entsprechenden Zielsequenzen wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland) bezogen. Die Sequenzen der shRNAs sowie der Kontrolle (*non-target*) sind in der Tabelle 2.1 angegeben.

### 2.1.7 Primer für die quantitative PCR (qPCR)

Die in der Tabelle 2.2 aufgeführten Primerpaare wurden für die quantitative PCR (qPCR) der entsprechenden humanen sowie murinen Zielgene eingesetzt. Die Primerpaare wurden an Hand der cDNA-Sequenzen der NCBI Datenbak mit Hilfe der Software Vector NTI8.0, Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland) generiert und von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg (Deutschland) bezogen. Die Primer wurden in DEPC-H<sub>2</sub>O (siehe 2.1.8) auf 3  $\mu$ M verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

**DEPC-H<sub>2</sub>O** 0,1% DEPC. Der Ansatz wurde ü.N. bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.

*Kapitel 2 Materialien und Methoden*

humane Primer	Sequenz	GeneBank Accession
AKT1	5'-GCTGACGGCCTCAAGAAGCA-3' 3'-ACCTTGCCGAAAGTGCCCTT-5'	NM_001014432
AKT2	5'-CCGCCTGTGCTTTGTGATGG-3' 3'-TTTCCAGCTTGATGTGCGGG-5'	NM_001626
AKT3	5'-ACAGATGGCTCATTCATAGG-3' 3'-CCCTTTCCTCTGGAGTATCT-5'	NM_005465
u-PAR	5'-AGGGCGTCCAAAGGATGACC-3' 3'-GCTGTAACACTGGCGGCCAT-5'	NM_001005376
u-PA	5'-GAGTAAAAAAGGGCAGGGCATC-3' 3'-CACATTGGCTAAGCTCCCTCAA-5'	NM_001145031
HSC70	5'-GCTGCTGCTATTGCTTACGGC-3' 3'-TGCTGGAAGAGAGGGTACGCT-5'	NM_006597
GAPDH	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' 3'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-5'	NM_002046
murine Primer	Sequenz	GeneBank Accession
AKT1	5'-CGTTTCGAGCTGATCCTCATGG-3' 3'-AAGGTGGGCTCAGCTTCTTCTC-5'	NM_001165894
AKT2	5'-CACCTCAGCTGCCTTCCATGCT-3' 3'-AAGGCAGCTCCTGCTCCTGGAT-5'	NM_001110208
AKT3	5'-AAACCTGACAGCATCATGTCCG-3' 3'-TGCAAGAAGTCAGCTCCGAGAA-5'	NM_011785
Keratin-8	5'-GCGCGAGTACCAGGAGCTTAT-3' 3'-AGCTGAAGCCAGGGCTAGTGA-5'	NM_031170
Keratin-18	5'-CAAGGCACAGATGGAGCAGC-3' 3'-GGCGGTAGGTGGCAATCTCT-5'	NM_010664
Keratin-5	5'-TCTGAGATGAACCGAATGATCCA-3' 3'-CAGCTTGTTTCTGGCATCTTTGA-5'	NM_027011
Acta2	5'-CCGAGATCTCACCGACTACCTCA-3' 3'-CGTCAGGCAGTTCGTAGCTCTTC-5'	NM_007392
ErbB2	5'-CTGACCAGTGTGAGGCTTGTGC-3' 3'-CGTCCAGGTCCACACATGATGG-5'	NM_001003817
FOXM1	5'-TGGTACTGCATGAAGAAATCCTGC-3' 3'-TGCCACGGGCTTTATTTAGTAGGT-5'	NM_008021
$\alpha$ 6-Integrin	5'-TTACGATGCCACCTATCACAAGG-3' 3'-CATTCCACTTGGTGATCCACTGT-5'	NM_008397
$\beta$ 1-Integrin	5'-TAATGTTATAATCCATGCCAGGGAC-3' 3'-GAAAATCAGTCATGGTTCAGATGCT-5'	NM_010578
ER $\alpha$	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' 3'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-5'	NM_007956
HSC70	5'-GCTGCTGCTATTGCTTACGGC-3' 3'-TGCTGGAAGAGAGGGTACGCT-5'	NM_031165

Tabelle 2.2: Oligonukleotidprimer für die qPCR.

**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4. Das PBS für die Zellkultur wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**Nonidet P40 (NP-40)-Puffer** 5 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 2% Aprotinin, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na-Pyrophosphat, 10% Glycerin, 1 mM Na-Orthovanadat, 1 mM PMSF. Der NP-40-Puffer wurde direkt vor Gebrauch angesetzt und bei 4°C gelagert.

**Trenngel** 8-12% Acrylamid, 0,2% N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8; 0,07% (v/v) TEMED, 0,07% (w/v) APS zur Polymerisation.

**Sammelgel** 375 mM Tris/HCl, 4% Acrylamid, 0,1% N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,1% (w/v) SDS, pH 6,7; 0,07% (v/v) TEMED, 0,14% (w/v) APS zur Polymerisation.

**SDS-PAGE-Laufpuffer** 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS.

**3x SDS-Probenpuffer** 0,18 M Tris, 6% (w/v) SDS, 30% Glycerin, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8.

**1x SDS-Probenpuffer** 0,0625 M Tris, 10% (w/v) SDS, 10% Glycerin, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8.

**Transferpuffer** 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol.

**Blockierlösung** 144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver.

**Waschlösung** 144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% (v/v) Tween 20, 2,5% (w/v) Magermilchpulver.

**Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T)** 144 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 0,5% (v/v) Tween 20.

### 2.1.9 Zelllinien

**Disseminierte Tumorzelllinien des Knochenmarks** Es wurde mit den disseminierten Tumorzelllinien des Knochenmarks LC-M1, BC-M1 und PC-E1 gearbeitet, die von Prof. Dr. med. Klaus Pantel (Institut für Tumorbiologie, UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen wurden aus dem Knochenmark von Patienten mit Lungen-, Brust- beziehungsweise Prostatakarzinom etabliert [Pantel et al., 1995] und dienten als *in vitro* Zellkultur-Modellsystem für disseminierte Tumorzellen (DTC).

**Humane Lungenkarzinomzelllinien** Es wurde die aus einer Lymphknotenmetastase isolierten, von einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) abstammende, Tumorzelllinien H1299 verwendet. Außerdem wurde mit der, aus einem Alveolarkarzinom isolierten, Zelllinie A549 gearbeitet.

**Humane primäre Lungenfibroblasten** Proteinlysate von primären Lungenfibroblasten (IMR-90) wurden von Frau Dr. rer. nat. Sabine Windhorst (IBM I, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

**Humane Mammakarzinomzelllinien** Es wurden die humanen Östrogenrezeptor negativen ( $ER^-$ ) Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 468 ( $EGFR^+$ ) sowie SKBR-3 ( $ErbB2^+$ ) verwendet. Außerdem wurde die humane Östrogenrezeptor positive ( $ER^+$ ) Zelllinie MCF-7 benutzt.

**Humane embryonale Nierenzelllinie** Zur Virusproduktion wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T verwendet. HEK293 Zellen wurden durch Transformation humaner embryonaler Nierenzellen mit dem Adenovirus Typ 5 generiert [Graham et al., 1977]. In dieser Arbeit wurde eine Variante dieser HEK293 Zelllinie, HEK293T, welche zusätzlich mit SV40 Large-T transduziert wurde, benutzt.

**Murine Balb-neuT-Mammakarzinomzellen** Murine Mammakarzinomzellen wurden aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren wie unter 2.2.2 beschrieben isoliert und kultiviert.

**Murine Fibroblastenzelllinie** Es wurde mit der murine Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 gearbeitet [Todaro and Green, 1963].

### 2.1.10 Zellkulturreagenzien

#### Medien und Zusätze

**DMEM** (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) und **RPMI** (**Roswell Park Memorial Institute**)-**Medium 1640 GlutaMAX I** (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe). Lagerung bei 4°C. **FCS** (*fetal calf serum, fötales Kälberserum*) wurde in 50 ml und **Penicillin/ Streptomycin-Lösung** in 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). **Humanes rekombinantes EGF**, PreproTech GmbH, Hamburg (Deutschland) wurde in sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst (500 µg/ml) und bei -20°C gelagert. **bFGF**, PreproTech GmbH, Hamburg (Deutschland) wurde in sterilem Tris/HCl pH 7,3 gelöst (100 µg/ml) und bei -20°C gelagert. **Puromycin** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde mit sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst (25 mg/ml) und bei -20°C gelagert. **Insulin/Transferin-Lösung**, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland) wurde bei 4°C gelagert.

#### Transfektionsreagenzien

**Lipofectamine Reagenz**, eine 3:1 (w/w)-Zusammensetzung des polykationischen Lipids 2,3-Dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoracetat (DOSPA) und des neutralen Lipids Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und **PLUS Reagenz**, GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland).

#### Hemmstoffe

**LY 4294002**, Calbiochem, Bad Soden (Deutschland) wurde in DMSO gelöst (25 mM), aliquotiert und bei -20°C gelagert. **17-DMAG**, Calbiochem, Bad Soden (Deutschland) wurde in DMSO gelöst (500 µM), aliquotiert und bei -20°C gelagert. **4-OH-Tamoxifen**, Calbiochem, Bad Soden (Deutschland) wurde in Ethanol gelöst (10 mM), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### Sonstige Reagenzien für die Zellkultur

**Trypsin/EDTA in PBS**, Biochrom, Berlin (Deutschland) wurde 1:10 mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnt in 30 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert. **Trypanblau-Lösung**, Sigma-Aldrich, Taufkirchen (Deutschland) wurde bei RT gelagert. **Dimethylsulfoxid (DMSO)** Fluka, Buchs (Schweiz) wurde bei RT gelagert.

### **2.1.11 Mausstämme**

#### **Balb/c**

Wildtyp Balb/c-Mäuse wurden von Prof. Dr. med. Udo Schumacher (Institut für Anatomie II, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt und von den technischen Mitarbeitern Herrn Carsten Köpke und Frau Susanne Feldhaus betreut, behandelt und präpariert. Außerdem wurde vom Institut für Anatomie II (UKE, Hamburg) Gewebe der Primärtumoren in Paraffin eingebettet und Paraffinschnitte hergestellt, welche anschließend für Färbungen zur Verfügung gestellt wurden.

#### **Balb-neuT**

Das transgene Mausmodell Balb-neuT wurde 1988 vom W. Muller erstmals publiziert [Muller et al., 1988]. Der hier verwendete, transgene Balb-neuT Mausstamm, wurde von Boggio et al. [Boggio et al., 1998] hergestellt und von Prof. Dr. med. Klaus Pantel und Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt (Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Balb-neuT Mäuse wurden von Frau Katharina Möllmann (Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg) betreut und präpariert.

#### **Lagerung von primärem Gewebe**

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurde das Gewebe direkt nach Entnahme in PBS (siehe 2.1.8) gespült und in flüssigem Stickstoff schock gefroren und gelagert.

### **2.1.12 Patientenmaterial**

Alle Proteinlysate der humanen Mammakarzinome wurden von Frau Dr. rer. nat. Karin Milde-Langosch (Klinik für Gynäkologie, UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

### **2.1.13 Computerprogramme**

In dieser Arbeit wurde mit den Computerprogrammen Excell, PowerPoint (Microsoft), GraphPad Prism 4.0 (Prism), Sigma Statistics (Sigma), AIDA (Raytest), DIVA (BD), Light Cylcer Software (Roche), LinReg (Freeware), Vector NTI8.0 (Invitrogen), Photoshop 4.0 (Adobe) und ZEN Light (Zeiss) gearbeitet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### Kultivierung der Zellen

Für die Kultivierung der disseminierten Tumorzelllinien des Knochenmarks: LC-M1, BCM1 und PC-E1 wurde RPMI-Medium mit 10% (v/v) FCS, 50 ng/ml EGF, 100 ng/ml bFGF, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Insulin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Transferin und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet. Für die Kultivierung aller anderen Zelllinien: HEK293T, MDA-MB 468, MDA-MB 231, MCF-7, SKBR-3, A549, H1299 und NIH/3T3 wurde DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung benutzt. Alle Zellen wurden in 25 oder 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflasche bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  in einem Brutschrank nach Standardbedingungen kultiviert.

Die Zelllinien wurden je nach Wachstum 1 bis 2 mal pro Woche subkultiviert d.h. verdünnt. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 0,05% Trypsin/0,02% (w/v) EDTA in PBS für etwa 5 min bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst hatten. Durch Zugabe von frischem FCS haltigem Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt und die Zellen in eine Suspension überführt. Je nach Wachstum und Bedarf der Zellen wurden die Linien 1:10 bis 1:2 mit frischem Medium verdünnt und weiter kultiviert.

#### Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl aus einer Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierfür wurden 20  $\mu\text{l}$  der gut resuspendierten Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  Trypanblau vermischt und davon etwa 15  $\mu\text{l}$  unter das Deckgläschen der Zählkammer pipettiert. Unter einem Mikroskop wurden die vier Großquadranten der Zählkammer ausgezählt, anschließend wurde der Mittelwert aus den vier Quadranten gebildet und mit dem Trypanblauverdünnungsfaktor verrechnet. Da alle Felder des Zählfeldes dieselbe Größe haben, entsteht ein genau definierter Raum mit einem Volumen von 0,1  $\mu\text{L}$ , so dass die anschließende Multiplikation mit  $10^4$  die Zellzahl pro ml ergibt.

### **Einfrieren von Zellen**

Es wurden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 900  $\mu\text{L}$  FCS und 100  $\mu\text{L}$  DMSO aufgenommen und in 1 ml Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde in eine, auf  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlte, Isopropanolbox gesetzt und bei  $-80^\circ\text{C}$  langsam eingefroren.

### **Auftauen von Zellen**

Die angetauten Zellen wurden in 10 ml auf  $37^\circ\text{C}$  vorgewärmtes Medium überführt und 7 min bei RT und 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

### **2.2.2 Etablierung von Mammakarzinomzellen aus Balb-neuT-Tumoren**

Um funktionale Effekte der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren zu untersuchen wurden Mammakarzinomzellen aus frisch präparierten Balb-neuT-Mammatumoren isoliert. Nach Entnahme der Tumoren wurden diese sofort in steriles DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung überführt. Es wurde fortan unter sterilen Bedingungen weiter gearbeitet.

Die Isolation der Zellen geschah nach dem Prinzip der Explantkultur. Hierfür wurde der Tumor in einer 10 cm Schale mit Medium mit Hilfe eines Skalpells und Pinzette vorsichtig zerkleinert. Das Medium, welches Gewebestücke bis zu einer Größe von etwa 5 mm beinhaltete, wurde direkt in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Aus diesen Explantkulturen wuchsen bei etwa 70% der Ansätze Mammatumorzellen mit charakteristischen Balb-neuT-Mammatumor-Eigenschaften aus und lassen sich wie normale Zelllinien kultivieren. In dieser Arbeit wurden die murinen Balb-neuT-Zelllinien C4, C8, C9 und C10 etabliert und charakterisiert (siehe 3.1.2).

Für die Kultivierung der Balb-neuT-Mammakarzinomzelllinien wurde DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben 2 mal pro Woche subkultiviert.

### **2.2.3 Stimulation und Behandlung von adhärennten Zellen**

#### **Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)**

Die Zellen wurden 42 h vor Beginn der EGF Stimulation in 10 cm Schalen (Proteinlysate) oder 12-Loch-Platten (RNA-Isolation) ausplattiert. Es wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen

pro 10 cm Schale in 10 ml (Proteinlysate),  $3 \times 10^5$  Zellen pro 12-Loch Platte in 1 ml (RNA-Isolation) oder  $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch Platte in 100  $\mu$ l (BrdU- und Apoptose-ELISA) Medium mit Zusätzen ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das alte Medium entfernt und durch Serum- und Zusatz-freies Medium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 18 h bis zum Beginn der Stimulation unter Serum-reduzierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehungert. Das EGF wurde in Serum- und Zusatz-freiem Medium auf 50 ng/ml verdünnt. Für die EGF Stimulation wurde das alte Medium der Zellen entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schalen oder Platten mit 10 ml (Proteinlysate), 1 ml (RNA-Isolation) oder 100  $\mu$ l (MTT-Assay und BrdU-ELISA) Medium ohne EGF (Kontrolle) oder mit EGF aufgefüllt. Folgend wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **Behandlung mit inhibitorischen Substanzen**

Vor der Behandlung mit dem PI3K Inhibitor LY 294002, dem HSP90 Inhibitor 17-DMAG oder dem Östrogenrezeptorantagonisten 4-OH-Tamoxifen wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale in 10 ml oder  $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch Platte in 100  $\mu$ l (MTT-Assay und BrdU-ELISA) Medium mit Zusätzen ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Inhibitoren wurden je nach Versuchsaufbau in Medium mit 10% FCS, 1% FCS oder FCS-frei auf 25  $\mu$ M (LY 294002), 500 nM (17-DMAG) bzw. 1  $\mu$ M (4-OH-Tamoxifen) verdünnt. Das alte Medium der Zellen wurde entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schalen mit 10 ml oder die Platten mit 100  $\mu$ l Medium mit DMSO (Kontrolle) oder mit Inhibitor aufgefüllt und die Zellen für die angegebenen Zeiträume bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.4 Transfektion und lentivirale Transduktion adhärenter Zellen**

Die Verpackungszelllinie HEK293T (siehe 2.1.9) wurde 72 h vor Beginn der Transfektion ausgesät. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm Schale in 10 ml DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausplattiert. Für einen Transfektionansatz wurden die folgenden DNA-Plasmide in den angegebenen Mengen eingesetzt: 2,5  $\mu$ g pLKO.1-puro (mit entsprechender shRNA-Sequenz oder Kontroll-Sequenz), 8  $\mu$ g psPAX2 lenti gag-pol und 1  $\mu$ g pMD2.G VSV-G (siehe 2.1). Die Plasmid-DNA wurde in 750  $\mu$ L DMEM ohne Zusätze aufgenommen und vorsichtig gemischt. Dem Ansatz wurden 20  $\mu$ L PLUS

Reagenz zugegeben, dann wurde der Ansatz 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden 30  $\mu\text{L}$  Lipofectamine Reagenz in 750  $\mu\text{L}$  DMEM ohne Zusätze aufgenommen und vorsichtig gemischt. Nach der Inkubationszeit wurde der DNA-Ansatz mit dem Lipofectamine-Ansatz gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert.

Das Medium der HEK293T Zellen wurde abgenommen und durch 5 ml frisches DMEM mit 10% FCS ersetzt. Die DNA-Lipofectamine-Mischung wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben, anschließend wurden die Schalen 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Folgend wurde das Medium der Zellen mit Medium mit 10% FCS auf 9 ml aufgefüllt und die Zellen weitere 16 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium abgenommen und durch 7 ml frisches Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ersetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (48 h nach der Transfektion) wurde der virenhaltige Überstand mit einer Pipette abgenommen, in eine 10 ml Spritze überführt und durch einen 0,45  $\mu\text{m}$ - Acrodisc-Spritzenfilter mit HT Tuffryn-Polysulfonmembran in ein 50 ml Röhrchen filtriert. Es wurden 7 ml frisches DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin auf die HEK293T Zellen gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Weitere Virenüberstände wurden 48 h und 72 h später (72 h und 96 h nach der Transfektion) von den HEK293T Zellen abgenommen und zur Transduktion verwendet, so dass die Ziel-Zellen insgesamt dreimal mit frischem Virenüberstand transduziert wurden.

Für eine Transduktion wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen, 24 h vor Beginn der Transduktion, in 6-Loch-Platten ausgesät. Es wurden jeweils 2 ml des virushaltigen Überstands und 2 ml frisches Medium mit Zusätzen auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde dann abgenommen und durch frischen Virusüberstand ersetzt, bis die Zellen dreimal transduziert waren. Im Anschluss der letzten Transduktion wurden die Zellen in 5 ml Medium mit Zusätzen für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor die Selektion mit 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin begann. Vor Beginn der Experimente wurden die transduzierten Zellen für eine Woche selektioniert. Die stabil transduzierten Zellen wurden kontinuierlich in Anwesenheit von 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Puromycin kultiviert.

### 2.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Für (HE)-Färbung wurden die Paraffinschnitte (siehe 2.1.11) mit RotiHistol entparaffiniert (2 x 15 min), in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 80%, 70%) für jeweils 5 min rehydriert und 5 min in Mayers Hämalaunlösung (1:5 verdünnt, 1%

Hämatoxylin, 0,2% NaJO<sub>3</sub>, 50% KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 50% Chloralhydrat, 1% Zitronensäure) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für wenige Sekunden in 1%-HCl-Alkohol inkubiert und umgehend in Wasser gespült und zum Bläuen für 10 min in lauwarmes Leitungswasser gegeben. Dann wurden die Präparate für 0,5-3 min in Eosinlösung (0,3% Eosin G9) überfärbt und abschließend mit Wasser ausgewaschen werden. In einer anschließenden aufsteigenden Ethanolreihe (96%, 100%, je 2 x 2 min) wurden die Schnitte dehydriert, 3-5 min in RotiHistol inkubiert und mit Eukitt-Einschlussmedium für die Histologie eingebettet. Zur Analyse wurden Ausschnitte mit einem Mikroskop (Zeiss-Axiovert 25) fotografiert (Zeiss-Axiocam).

### 2.2.6 Immunhistochemische (IHC)-Färbung

Für die IHC-Färbung wurden die Paraffinschnitte (siehe 2.1.11) ü.N. bei 60°C inkubiert und dann mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert und rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte zur Hemmung der endogenen Peroxidase für 10 min in Peroxidase-Blockierungslösung vorinkubiert. Nach Waschen in ddH<sub>2</sub>O und PBS wurden die Präparate für 1 h bei RT mit dem c-ErbB2 Antikörper (DAKO) inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein Kontrollpräparat mitgeführt, auf das, anstelle des primären Antikörpers, nur die IgG des Kaninchens gegeben wurde. Die Objektträger wurden gut in PBS gewaschen und es folgte eine 30 minütige Inkubation in Envision rabbit Peroxidase. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS wurde die Farbreaktion mit dem DAB Kit (siehe 2.1.4) entsprechend dem Protokoll des Herstellers entwickelt. Die Kerngegenfärbung wurde mit Hämatoxylin (1 min) durchgeführt. Nach 5 minütigem Spülen in fließendem Leitungswasser und kurzem Waschen in ddH<sub>2</sub>O, wurden die Präparate mit wasserlöslichem Medium eingedeckt.

### 2.2.7 Immunfluoreszenz (IF)-Färbung

Für die IF-Färbung von adhärennten Zellen wurden sterile Deckgläschen in 6-Loch Platten vorgelegt und 10<sup>5</sup> Zellen pro Loch der 6-Loch Platte ausplattiert und ü.N. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden entsprechend wie angegeben behandelt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und folgend mit 4% Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Nach weiteren 10 min Inkubation mit 1% Triton-X 100 bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 2 h in Blockierlösung (5% BSA, 10% FCS in PBS) geblockt. Der pri-

märe Antikörper wurde in 3% BSA in PBS verdünnt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Deckgläschen wurden anschließend dreimal mit 0,1% Tween in PBS gewaschen bevor sie 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne wurden folgend mit DAPI (2 µg/ml in PBS) angefärbt, dann wurden die Zellen noch dreimal mit 0,1% Tween in PBS gewaschen bevor die Deckgläschen mit Mounting Medium auf Objektträgern fixiert wurden.

### 2.2.8 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

Zur Isolation der RNA wurden  $3 \times 10^5$  Zellen pro 12-Loch Platte ausplatiert. Die Zellen wurden für 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder wie unter 2.2.3 beschrieben behandelt oder es wurde die RNA sofort mit dem RNA NucleoSpin II Kit (siehe 2.1.4) nach dem Protokoll des Herstellers für adhärenente Zellen isoliert. Die isolierte RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert und bei -80°C gelagert. Die Menge an extrahierter RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop Spectrophotometers bei 260nm ermittelt. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Aufreinigung mittels des RNA NucleoSpin II Kits war standardisiert durchführbar und führte immer zu sauberen Ergebnissen (Quotient 260/280 nm: 2,0).

### 2.2.9 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe der SuperScript III, einer modifizierten Variante der *Moloney Murine Leukemia Virus* Reversen Transcriptase (M-MLV RT) durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz wurde zunächst 1 µg RNA (siehe 2.2.8) in 11 µl DEPC-H<sub>2</sub>O (siehe 2.1.8) mit 0.5 µg Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primern und 0.5 mM dNTPs für 5 min bei 65°C in einem Thermocyclers inkubiert. Hierdurch wurden die Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren denaturiert und damit die Zugänglichkeit der Matrizen-Moleküle optimiert. Anschließend wurde jedem Ansatz 4 µl 5x cDNA-Synthese Puffer, 5mM DTT sowie 200 U SuperScript III (siehe 2.1.4 beigefügt. Die Ansätze wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Alle Proben wurden gemischt und abzentrifugiert. Für die Synthese der cDNA wurden die Proben für 60 min bei 55°C inkubiert. Folgend wurde die Reverse Transkriptase durch 5 minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert. Nachdem die Reaktion beendet war, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.2.10 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine Methode zur Amplifikation von DNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basiert [Kubista et al., 2006]. Die herkömmliche PCR beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Temperaturschritten. Dabei wird die Reaktionslösung zunächst auf 95°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA (dsDNA) zu denaturieren. Durch Herabsetzen der Temperatur auf 55°C kommt es anschließend zur Hybridisierung der Primer an das Template. Für den letzten Schritt, wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht. Dies ist die optimale Arbeitstemperatur für die am häufigsten verwendete Polymerase, die jetzt durch Bindung an die hybridisierten Primer mit der DNA-Synthese beginnen kann. Durch die ständige Wiederholung dieser drei Schritte verdoppelt sich die Menge an cDNA von Zyklus zu Zyklus, so dass die cDNA-Konzentration während der PCR-Reaktion exponentiell ansteigt. Mit dieser Methode wurde die Möglichkeit geschaffen spezifisch geringste DNA Mengen millionenfach zu kopieren.

Die Methode der qPCR bietet zusätzlich die Möglichkeit der sofortigen Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt und unterscheidet sich somit von herkömmlichen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden können. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR ist die Nutzung von DNA-Fluoreszenzfarbstoffen, wie zum Beispiel dem SYBR Green [Morrison et al., 1998]. Dieser Farbstoff interkaliert in dsDNA, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Nach abgelaufener PCR-Reaktion kann eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, anhand derer die Fragmentlänge und dadurch auch die Spezifität der Primerpaare bestimmt werden kann. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen und dann die Temperatur langsam erniedrigt. Bei einer für jede Sequenz spezifischen Temperatur bildet sich aus den Einzelsträngen wieder ein Doppelstrang, so dass die Fluoreszenz ansteigt.

Theoretisch kann man bei der PCR einen exponentiellen Anstieg an PCR-Produkt erwarten, da sich die Menge an cDNA mit jedem Zyklus verdoppeln sollte. Selbst wenn alle Parameter (Temperatur, Primer- und Primerkonzentrationen sowie cDNA-, MgCl<sub>2</sub>-, dNTP-, Puffer- und Enzym-Konzentration) optimiert sind, stellt sich nach etwa 30

Zyklen eine Plateauphase ein. Diese ist auf Verbrauch der Primer und dNTPs, sowie den Verschleiß des Enzyms zurückzuführen. Eine Quantifizierung ist also nur während der exponentiellen Phase der PCR möglich. Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen wurde die Schwellenwert-Methode angewendet. Hierbei wird ein Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) in die Mitte der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion gelegt. Die Anzahl an Zyklen, die benötigt wird, um diesen  $C_T$ -Wert zu erreichen, gibt Aufschluss über die Menge an Ausgangsprodukt. Es gilt, je mehr Ziel-cDNA zu Beginn der PCR-Reaktion in einer Probe enthalten war, desto weniger Zyklen sind nötig, um den  $C_T$ -Wert zu erreichen.

Zur Auswertung der qPCR wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu verbessern, wurde zunächst die PCR-Effizienz jeder einzelnen Probe mit Hilfe der LinReg Software [Ramakers et al., 2003] ermittelt und darauf geachtet, dass diese vom Median nicht um mehr als 0,05 abwichen. Dann wurde von jeder Probe der  $\Delta C_T$ -Wert bestimmt. Zur Berechnung des  $\Delta C_T$ -Wertes wurde der  $C_T$ -Wert des Referenzgens vom  $C_T$ -Wert des untersuchten Gens (Zielgen) abgezogen ( $\Delta C_T = C_{T\text{Zielgen}} - C_{T\text{Referenzgen}}$ ). Mit Hilfe des  $\Delta C_T$  Wertes konnte der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt werden, der den Genexpressionsunterschied zwischen der Kontrolle und den zu untersuchenden Proben verdeutlicht:  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Proben}} - \Delta C_{T\text{Kontrolle}}$ . Der relative Genexpressionsunterschied zwischen Kontrolle und den zu untersuchenden Proben wird wie folgt bestimmt:  $2E^{-\Delta\Delta C_T}$ . Die  $2E^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte der Mehrfachbestimmungen wurden zusammengefasst und ein Mittelwert mit Standardabweichung bestimmt [Livak and Schmittgen, 2001].

Für die qPCR wurde das LightCycler Kit von Roche (siehe 2.1.4) verwendet. Ein 20  $\mu\text{l}$  PCR-Ansatz enthielt 11  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM *sense* und *antisense* Primer sowie 2  $\mu\text{l}$  SYBR Green/DNA-Polymerase-Mix (1a/b) in DEPC-H<sub>2</sub>O. Es wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle bzw. 1  $\mu\text{l}$  Probe zupipettiert, anschließend wurden die Kapillaren 30 sek bei 1000 rpm zentrifugiert. Die PCR-Reaktion wurde mit dem LightCycler von Roche durchgeführt. Eine primäre Temperaturerhöhung für 10 min auf 95°C führte zum einen zur Aktivierung der hier verwendeten HotStar-DNA-Polymerase, zum Anderen zur Denaturierung der RNA. Die PCR wurde anschließend in 40 Zyklen durchlaufen. Je Zyklus 1 sek bei 95°C und dann 60 sek bei 60°C. Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR zu überprüfen. Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe der LightCycler System Software analysiert und mittels der oben beschriebenen  $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ quantifiziert.

### 2.2.11 Herstellung von Proteinlysaten

#### Herstellung von Proteinlysaten aus adhärenter Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus der Zellkultur wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale in 10 ml Medium mit Zusätzen ausgesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entweder wie unter 2.2.3 beschrieben behandelt oder sofort lysiert. Der NP-40-Puffer (siehe 2.1.8) wurde direkt vor Gebrauch auf Eis angesetzt. Für die Lyse der Zellen wurden die 10 cm Schalen auf Eis gestellt, das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS (siehe 2.1.8) gewaschen. Anschließend wurden 800  $\mu$ l NP40-Puffer pro 10 cm Schale zupipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schale gelöst und die Suspension mit den lysierten Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden 10min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (das Proteinlysate) wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei -80°C gelagert.

#### Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Gewebe

Zur Herstellung von Proteinlysaten aus primärem Tumorgewebe wurde das Gewebe (etwa 100 mg) zunächst unter flüssig Stickstoff mit Hilfe eines Stempelmörser mechanisch pulverisiert. Mit einem Spatel wurde das Proben-Pulver in Lysis Matrix-D Tubes überführt und sofort mit 800  $\mu$ l NP-40-Puffer (siehe 2.1.8) überschichtet. Die Proben wurden für 20 sek auf Stufe 4 im Gewebehomogenisator aufgeschlossen und anschließend für 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (das Proteinlysate) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.12 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration aus Proteinlysaten wurde mit dem DC (detergent compatible) Protein Assay bestimmt. Dieser kolorimetrische Assay beruht auf dem Lowry-Assay [Lowry et al., 1951]. Hierfür wurden 5  $\mu$ l der Probe in Mikrotiterplatten mit 25  $\mu$ l Reagenz A (Mix aus 1:50 Reagenz S:Reagenz A) versetzt und 200 $\mu$ l Reagenz B (Folinreagenz) zugegeben. Nach 15 min. Inkubation bei RT wurde die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe von BSA in NP-40-Puffer (0 mg, 0,125 mg, 0,25 mg, 0,5 mg, 0,75 mg, 1 mg, 1,25 mg, 1,5 mg). Standards und Proben wurden in Triplikaten vermessen. Anhand der Messwerte des BSA-Standards

wurde eine Eichgerade erstellt und mittels linearer Regression die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

### 2.2.13 Western-Blot

#### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Proteine wurden in vertikalen Gelen nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Zonenelektrophorese aufgetrennt [Davis, 1964]. Dazu wurden Trenngele (siehe 2.1.8) gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isobutanol abgegossen und anschließend das Sammelgel (siehe 2.1.8) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesteckt. Die Taschen wurden vor dem Probenauftrag mit Kathodenpuffer (siehe 2.1.8) gespült. Der 3x SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.8) wurde vor der Zugabe zur Probe im Verhältnis 3:7 mit 1 M DTT versetzt. Es wurden zwischen 50-100  $\mu\text{g}$  (große Gele) oder 10-50  $\mu\text{g}$  (kleine Gele) Protein aufgetragen. Als Marker für Proteingrößen im Western-Blot dienten je 0,1  $\mu\text{L}$  (kleine Gele) oder 0,5  $\mu\text{L}$  (große Gele) High range und Low range biotinylated SDS-PAGE Standards und 5  $\mu\text{l}$  (kleine Gele) oder 8  $\mu\text{l}$  (große Gele) Spectra Multicolor (siehe 2.1.4) in 1x SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.8). 1x SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.8) wurde direkt vor Gebrauch im Verhältnis 9:1, mit 1 M DTT versetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5min bei 100°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert. Die Gelelektrophorese erfolgte über 16-18h bei 10-12 mA pro Gel (große Gele) oder über 2 h bei 180 V (kleine Gele).

#### Transfer und Detektion von Proteine

Für die immunchemische Analyse wurden Proteingele auf Membranen aus Nitrocellulose gebロットet. Dazu wurden die Membranen zugeschnitten (15 x 14cm<sup>2</sup> für große Gele, 15 x 7 cm<sup>2</sup> für kleine Gele, 9 x 9 cm<sup>2</sup> für Minigele) und kurz in ddH<sub>2</sub>O gelegt. Membranen und zugeschnittenes Whatman-Blotpapier wurden in Transferpuffer (siehe 2.1.8) getränkt und in folgender Reihenfolge Sandwich-artig aufeinandergelegt: Blotpapier, Membran, Gel, Blotpapier. Nachdem Luftblasen mit einer Pipette durch Rollen entfernt wurden, wurde das Sandwich mit der Membran zur Anode zwischen Schwämmen in die Blotapparatur eingebaut und mit 4°C kaltem Transferpuffer befüllt. Gebლობet wurde bei 70 V und 4°C für 2 h mit Rührfisch zur Pufferwärmeverteilung. Anschließend wurden die Membran für 1 h bei RT in Blockierlösung (siehe 2.1.8) unter Schwenken inku-

biert. Bei Verwendung biotinylierten Markers wurde die Markerlane abgeschnitten und unter Schwenken weiter in Blockierlösung inkubiert, während die Membran mit primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung in Waschlösung (siehe 2.1.8) ü.N. bei 4°C unter Schwenken inkubiert wurde. Die Membran wurde bei RT dreimal 10min mit Waschlösung gewaschen, der Markerstreifen dreimal 10 min in TBS-T (siehe 2.1.8). Der Markerstreifen wurde 1:3000 mit Streptavidin-HRP-Konjugat in TBS-T, die Membran mit sekundärem Antikörper in entsprechender Verdünnung in Waschlösung für 1h bei RT inkubiert. Membran und Markerstreifen wurden viermal für 15min mit TBS-T gewaschen.

Für den (*Horseradish peroxidase*) HRP-basierten Proteinnachweis wurden der Markerstreifen und die übrige Membran aneinander auf eine Plastikfolie gelegt und je 1 ml der ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Detektionsreagenzien, d.h. eines 1:1(v:v)-Gemischs aus Luminol/Enhancer und Peroxidpuffer (entweder nur SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate oder, für höhere Sensitivität, 1:10-gemischt mit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate auf die Membran gegeben und durch Auflegen der Deckfolie verteilt. Nach 5min Inkubation bei RT wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt. HRP katalysiert die Oxidation von Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid) zu 3-Aminophthalat über mehrere Zwischenprodukte. Bei der Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 428 nm emittiert. In Anwesenheit von Enhancern, am effektivsten sind modifizierte Phenole, wird die Lichtemission um bis zu 1000-fach verstärkt. Die Chemilumineszenz wurde mit dem Luminescent Image Analyzer mit CCD-Kamera entwickelt und mit der Software AIDA bearbeitet.

#### 2.2.14 Immunpräzipitation der AKT-Isoformen

Für die AKT-Isoform-spezifische Immunpräzipitation (IP) wurden AKT-Isoform-spezifische Antikörper benötigt, welche die AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 spezifisch und quantitativ präzipitieren. Wie in Abbildung 2.1 für humane Proben gezeigt, wurde dies für die Antikörper AKT1 (2H10) Mouse mAb (Cell Signaling Technology, MA, USA), AKT2 (8B7) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)) und AKT3 clone GMA104 (Millipore GmbH, Schwallbach, Deutschland) validiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die AKT-Isoform-spezifischen Antikörper die AKT-Isoformen quantitativ präzipitieren, da sich im Überstand der Immunpräzipitation (ÜS), die präzipitierte AKT-Isoform nicht mehr nachweisen lässt. Die AKT-Isoform Spezifität

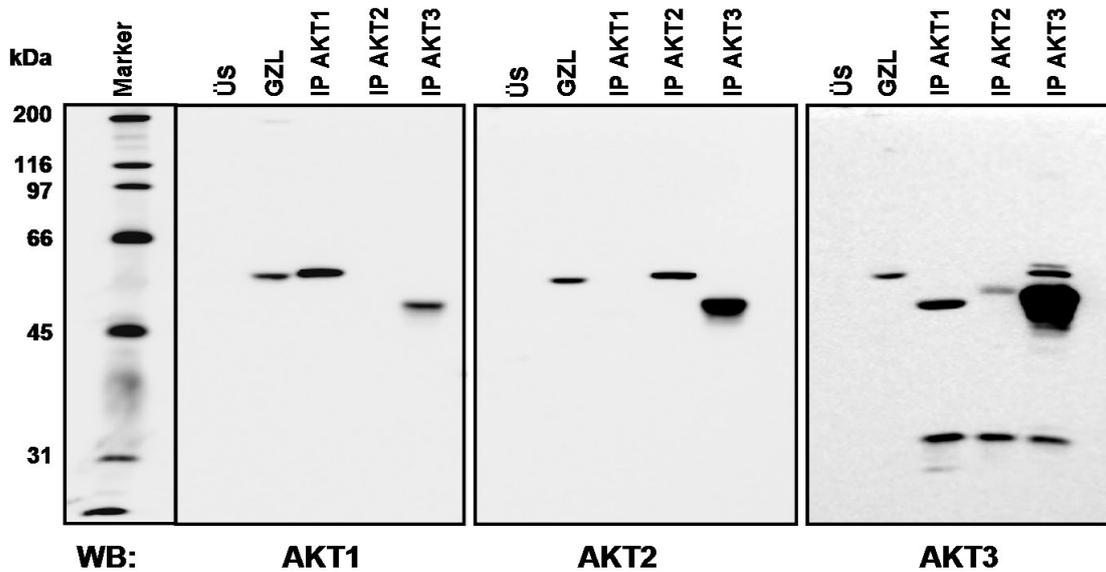


Abbildung 2.1: **Spezifität und Quantität der Immunpräzipitation (IP) der AKT-Isoformen.** Die AKT-Isoformen wurden aus Gesamtzelllysaten (GZL) von humanen H1299 Zellen präzipitiert und anschließend zusammen mit dem Überstand der IP (ÜS) und dem GZL mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern im Western-Blot-Verfahren (WB) analysiert.

wurde getestet, indem das Präzipitat eines AKT-Isoform Antikörpers mit spezifischen Antikörpern gegen die beiden anderen AKT-Isoformen geblottet wurde. Wie in Abb. 2.1 gezeigt wird im WB mit AKT1 Antikörper nur nach IP mit AKT1 Antikörper, AKT1 detektiert, nicht aber in den IPs mit AKT2 oder AKT3 Antikörper. Analog ist dies für den AKT2 und AKT3 Antikörper aus der Abb. 2.1 zu entnehmen. Zwischen dem AKT3 Antikörper und den Immunglobulinen (IgG) scheint es eine Kreuzreaktion zugegen, welche die Spezifität gegenüber den AKT-Isoformen 1 und 2 aber nicht einschränkt. Die Spezifität der AKT-Isoform-spezifischen Antikörper wurde zusätzlich in AKT-Isoform-spezifischen *knock down* Zellen analysiert. Analoge Ergebnisse wurden mit murinen Proben erzielt, sodass die Methode der AKT-Isoform-spezifischen Immunpräzipitation für humane und murine Proben etabliert wurde.

Die direkte Immunpräzipitation der AKT-Isoformen wurde wie folgt durchgeführt. Es wurde zunächst die Protein-G-Sepharose dreimal mit NP40-Puffer (siehe 2.1.8) gewaschen und anschließend eine 50:50-Suspension von Protein-G-Sepharose und NP40-Puffer angesetzt. Davon wurden pro Ansatz je 40  $\mu\text{L}$  in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 250  $\mu\text{L}$  NP40-Puffer pipettiert. Für die Kopplung der Antikörper wurden jeweils 2,5  $\mu\text{g}$

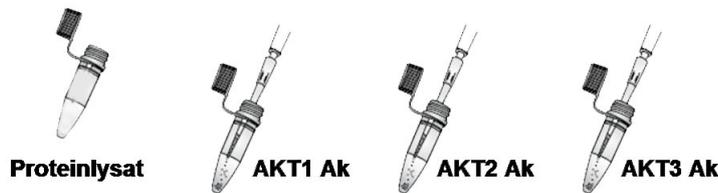
eines AKT-Isoform Antikörpers dazu pipettiert und zwei Stunden bei 4°C rotiert. Die Antikörper-gekoppelte Protein-G-Sepharose wurde dreimal mit NP40-Puffer gewaschen, anschließend wurden 100 µg eines Proteinlysats (siehe 2.2.11) in einem Volumen von 250 µl dazu gegeben. Die AKT-Isoformen wurden ü.N. bei 4°C rotierend präzipitiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zum Gelauftrag bei 4°C gelagert. Die Protein-G-Sepharose wurde viermal mit NP-40-Puffer gewaschen, bevor 12,5 µl 3x SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.8) zugegeben wurden. Die Proben wurden 5 min bei 100°C erhitzt und anzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben vollständig im Western-Blot-Verfahren (siehe 2.2.13) analysiert.

### 2.2.15 AKT-Isoform-spezifischer *in vitro* Kinaseassay

Um die Aktivierung der AKT-Isoformen genauer zu untersuchen wurde ein AKT-Isoform-spezifischer *in vitro* Kinaseassay etabliert. Hierfür wurden die AKT-Isoformen mit AKT-Isoform spezifischen Antikörper wie unter 2.2.14 beschrieben präzipitiert, mit einem Substrat inkubiert und anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad des Substrats im Western-Blot-Verfahren bestimmt. Die spezifische und quantitative Immunpräzipitation der AKT-Isoformen ist die Basis für den AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassay der mit den Kit Komponenten des AKT Kinase Assay Kit der Firma Cell Signaling Technology, MA (USA) in Anlehnung des Protokolls des Herstellers durchgeführt wurde.

Für den Kinaseassay wurde die Protein-G-Sepharose nach der Immunpräzipitation der AKT-Isoformen (siehe 2.2.14) zweimal mit NP-40-Puffer (siehe 2.1.8) und zweimal mit Kinasepuffer (siehe 2.1.4) gewaschen. Die immunpräzipitierten AKT-Isoformen wurden mit 1 µg GSK3α/β Fusionsprotein, einem Substrat von AKT, und 0,2 mM ATP in 50 µl Kinasepuffer 30 min bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit wurde das Substrat GSK3α/β von der präzipitierten AKT-Isoform, abhängig von der Aktivierung, entsprechend an den AS-Resten Ser21 und Ser9 phosphoryliert (pGSK3α(S21)/β(S9)). Nach der Inkubation wurden 12,5 µl 3x SDS-Ladepuffer (siehe 2.1.8) zupipettiert und die Proben wurden gevortext. Nach 5 min Inkubation bei 100°C wurden die Proben vollständig im Western-Blot-Verfahren (siehe 2.2.13) analysiert. Es wurde die pGSK3α/β Menge mit pGSK3α(S21)/β(S9) spezifischem Antikörper bestimmt. Je stärker die pGSK3α/β Signalintensität war, desto größer war die Aktivität der entsprechenden AKT-Isoform. Zusätzlich wurde mit einem pan AKT die Menge an präzipitierter AKT-Isoform nachgewiesen. Im Anschluß wurde die Membran mit Ziege-anti-Maus sekundärem Antikörper

**1. Immunpräzipitation mit Protein-G-Sepharose und AKT1, AKT2 oder AKT3 Antikörper (Ak)**



**2. Inkubation der Immunpräzipitation (IP) mit GSK3 $\alpha$ / $\beta$  Fusionsprotein und ATP**

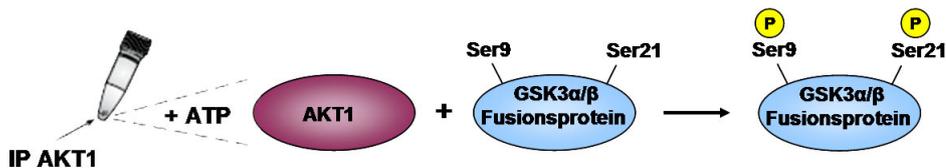


Abbildung 2.2: **AKT-Isoform-spezifischer *in vitro* Kinaseassay.** Für den AKT-Isoform-spezifischen *in vitro* Kinaseassay wurden die AKT-Isoformen mit a) AKT1, b) AKT2 oder c) AKT3 Antikörper und Protein G-Sepharose direkt aus 100  $\mu$ g Gesamtzelllysat präzipitiert. Anschließend wurden die IPs mit einem AKT-Substrat, dem GSK3 $\alpha$ / $\beta$  Fusionsprotein und ATP bei 30°C inkubiert. In Abhängigkeit der Aktivität der entsprechenden AKT-Isoform (z.B a) AKT1) wird das Substrat am Ser21 (GSK3 $\alpha$ ) und am Ser9 (GSK3 $\beta$ ) phosphoryliert. Folgend wurde die Menge an phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha$ (S21)/ $\beta$ (S9)) im Western-Blot-Verfahren bestimmt.

inkubiert, um die Maus IgG-Mengen zu detektieren. Zur Auswertung wurde jede Probe auf die entsprechende IgG-Menge abgeglichen.

**2.2.16 Zellvitalitätsassay**

Um die Vitalität von Zellen zu untersuchen wurde der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay angewendet. Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Diese Reduktion findet nur in lebenden Zellen statt, wenn Reduktasen aktiv sind. Für den MTT-Assay wurden  $5 \times 10^3$  -  $1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch einer 96-Loch Platte ausgesät. Für den Fall, dass eine Kinetik untersucht werden sollte, wurde für jeden Messpunkt eine 96-Loch Platte ausplatziert und die Zellen wurden ü.N. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde der Messwert 0h sofort analysiert, während die Zellen der folgenden Messwerte entsprechend

wie angegeben behandelt wurden (siehe 2.2.3) und bis zur Analyse bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

Für die Analyse der Zellvitalität wurde das Medium der Zellen mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Pro 96-Loch wurden je 200µl Medium mit 0,5mg/ml MTT zugegeben und 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium der Zellen erneut mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor 200µl DMSO zupipettiert und resuspendiert wurden. Es wurde die Absorption bei 560nm in einen Plattenphotometer gemessen.

### 2.2.17 Proliferationsassay

Die Proliferation der Zellen wurde entweder durchflusszytometrisch mit einem *fluorescence activated cell sorter* (FACS) bestimmt oder kalorimetrisch im *enzym-linked immunoabsorbant assay* (ELISA)-Verfahren analysiert. In beiden Assays wurde den Zellen zunächst das Basenanaloga 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) angeboten, welches anstelle der Base Thymin, während der DNA-Synthesephase des Zellzyklus, in die DNA eingebaut wird. Der Nachweis von eingebautem BrdU spiegelt die DNA-Syntheserate und damit die Proliferation der Zellen wieder.

Für den FACS-basierten Proliferationsassay wurde das APC BrdU Flow Kit (siehe 2.1.4) verwendet. Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät und ü.N. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen exakt wie im Protokoll des Herstellers beschrieben für 16h mit BrdU inkubiert, folgend fixiert und mit Allophycocyanin (APC)-gekoppeltem anti-BrdU Antikörper fluoreszierend markiert. Die APC positiven Zellen wurden an einem FACS-Gerät mit der Software DIVA, am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg, vermessen.

Für den kalorimetrischen BrdU ELISA (siehe 2.1.4) wurden  $5 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$  Zellen pro 96-Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und ü.N. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen exakt wie im Protokoll des Herstellers beschrieben für 16h mit BrdU inkubiert, folgend fixiert und mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper markiert. Nach Zugabe der Substratlösung Tetramethylbenzidin (TMB) wurde die Reaktion nach 20min durch Zugabe von 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption in einem Plattenphotometer bei 480 nm und die Referenz bei 570 nm vermessen.

### 2.2.18 Apoptoseassay

Die Apoptose wurde entweder durchflusszytometrisch mit einem FACS oder im ELISA-Verfahren analysiert. Für den FACS-basierten Apoptoseassay wurde das AnnexinV-Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) Death Detection Kit (siehe 2.1.4) benutzt. Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät und ü.N. bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 18h in Medium ohne Zusätze gehungert und folgend exakt wie im Protokoll des Herstellers für adhärente Zellen beschrieben trypsiniert, mit AnnexinV-FITC und mit Propidiumjodid (PI) markiert. Das AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches in der frühen Phase der Apoptose an der Außenseite der Plasmamembran exponiert wird. PI gelangt erst in einer späten Phase der Apoptose durch Löcher in der Plasmamembran in die Zelle und bindet an freie DNA. Während das AnnexinV also ein Marker für die frühe Phase der Apoptose ist, stellt das PI einen Marker für die späte Apoptose dar. Es wurde die Anzahl FITC und FITC-PI positiver Zellen (frühe und späte Apoptose) im FACS bestimmt.

Das Prinzip von dem Apoptose-ELISA (siehe 2.1.4) basiert auf dem *in vitro* Nachweis von zytoplasmatischen Histon-assoziierten-DNA-Fragmenten (Nucleosomen) nach induziertem Zelltod. Das Kit wurde nach Herstellerempfehlung eingesetzt. Es beinhaltete eine Microtiterplatte, welche mit Streptavidin beschichtet war. Mit Hilfe eines (POD)-gekoppeltem anti-DNA Antikörpers wurden die Nucleosomen aus dem Zelllysat markiert und über Streptavidin gebunden. Nach Zugabe des Substrats ABTS wurde die Absorption in einem Plattenphotometer bei 405 nm vermessen.

### 2.2.19 Migrationsassay

#### Transwellassay

Für den Transwellassay, bei dem Zellen durch ein Transwell mit einer definierten Porengröße (hier:  $8 \mu\text{m}$ ) migrieren, wurden zunächst  $500 \mu\text{l}$  Medium mit Zusätzen in ein Loch einer 24-Loch Platte vorgelegt und anschließend ein Transwell eingesetzt. Es wurden  $7 \times 10^3$  Zellen in  $100 \mu\text{l}$  in die obere Kammer des Transwells pipettiert und ü.N. bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Folgend wurden die Transwells dreimal mit PBS (siehe 2.1.8) gewaschen. Die Zellen, welche sich an der oberen Seite der Transwellmembran befanden und somit nicht migriert waren, wurden zusätzlich vorsichtig mit einem Q-Tipp von der Membran entfernt. Die Zellen, welche sich an der unteren Seite der Transwellmembran

befanden und somit migriert waren wurden für 10 min bei 37°C mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Die Transwells wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend wurde die Transwellmembran vorsichtig mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten. Die Membran wurde so auf einen Objektträger gelegt, dass die Seite mit den migrierten Zellen oben auflag. Es wurde 1 Tropfen Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) auf die Membran gegeben, bevor das Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt wurde. Die DAPI gefärbten Zellkerne der migrierten Zellen wurden mit Hilfe eines Zählers am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Es wurde eine Dreifachbestimmung in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt, bevor eine Aussage über das migrative Verhalten getroffen wurde.

### **Gelantineassay**

Bei dem Gelatineassay wird beobachtet, ob Zellen in der Lage sind, in einer Gelatine-Matrix zu migrieren und sich zu vereinzeln. Dieser Assay ist nicht quantifizierbar und kann verwendet werden, um einen ersten Eindruck über das migrative Potential von Zellen zu erhalten. Für diesen Assay wurden 100  $\mu$ l sterile und auf 37°C vorgewärmte Gelatine-Lösung (15% w/v) in eine 96-Loch Platte vorgelegt. Die Platte wurde 15 min bei RT inkubiert, anschließend wurden  $1 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu$ l pro 96-Loch auf die Gelatine-Lösung pipettiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und folgend nach 24 h, 48 h und 72 h unter dem Mikroskop beobachtet und fotografiert.

#### **2.2.20 Mausexperimente**

Die Mausexperimente zur Analyse der Tumorigenität der C4-Zellen wurden vom Institut für Anatomie II am UKE, Hamburg durchgeführt. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  C4 Zellen subkutan in Balb/c Mäuse injiziert.

#### **2.2.21 Statistik**

Eine statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Zur Bestimmung der Signifikanzen ( $p < 0,05$ ) zwischen zwei Gruppen wurde ein Students t-Tests durchgeführt.

## Kapitel 3

### Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Funktion von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom

Um die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs und Funktionen von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom zu untersuchen, wurde das Mausmodell Balb-neuT verwendet. Balb-neuT ist ein transgenes Mausmodell, bei welchem die Rezeptortyrosinkinase ErbB2 (neu) als Transgen überexprimiert wird. Unter der Kontrolle des *mouse mammary tumor virus promoters* (MMTV-Promotor) wird während der Pubertät der Mäuse, etwa in der dritten bis vierten Woche, die Expression des transgenen ErbB2 durch Sexualhormone induziert. Hierdurch entsteht eine gewebespezifische Expression des Transgens im Mammagewebe was zu einer aggressiven Karzinogenese führt [Muller et al., 1988].

##### 3.1.1 Aktivierung des ErbB2/PI3K/AKT-Signalwegs in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren

Um die Aktivierung des ErbB2/PI3K/AKT-Signalwegs in ErbB2<sup>+</sup> transgenen Balb-neuT-Mammatumoren zu analysieren, wurde zunächst die Expression von ErbB2 im Western-Blot-Verfahren in zehn Balb-neuT-Mammatumoren untersucht. Es zeigte sich im Vergleich zu Balb/c Wildtyp (WT)-Mammagewebe, dass alle zehn untersuchten Mammatumoren stark positiv für den ErbB2-Rezeptor waren (Abb. 3.1). Der ErbB3-Rezeptor, welcher bevorzugt mit ErbB2 heterodimerisiert, besitzt von allen ErbB-Rezeptoren die meisten Bindungsstellen für die PI3K [Olayioye et al., 2000], so dass die Aktivierung des ErbB3-Rezeptors den PI3K/AKT-Signalweg effizient anschalten kann. Die Aktivierung des ErbB3-Rezeptors wurde mit pErbB3(Y1289)-spezifischen Antikörpern im Western-Blot-Verfahren bestimmt. Die Aktivierung des AKT-Signalwegs wurde mit

pAKT(S473) und pAKT(T308) spezifischen Antikörpern untersucht. Aus der Abbildung 3.1 geht hervor, dass die Aktivierung des ErbB3-Rezeptors weitgehend mit der Aktivierung des AKT-Signalwegs übereinstimmt. Die Balb-neuT-Mammatumoren zeigten im Vergleich zum WT-Mammagewebe eine gesteigerte Aktivierung des ErbB3-Rezeptors.

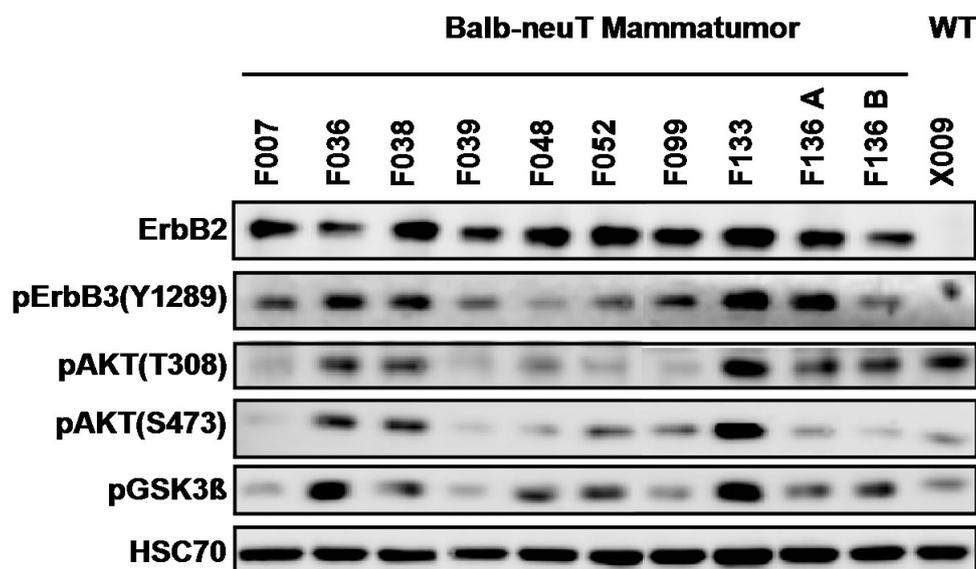


Abbildung 3.1: Aktivierung des ErbB2/PI3K/AKT-Signalwegs in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren. Western-Blot-Analyse mit ErbB2, pErbB3(Y1289), pAKT(T308), pAKT(S473) und pGSK3β(S9) spezifischen Antikörpern in zehn Balb-neuT-Mammatumoren und WT-Mammagewebe von einer Balb/c-Maus (X009).

Die Aktivierung des AKT-Signalwegs zeigte sich im Vergleich zum WT-Mammagewebe in einigen Balb-neuT-Mammatumoren ebenfalls verstärkt. Die Phosphorylierung am Threonin308 von AKT war zwar nur in einem Fall stärker (F133), als im WT-Mammagewebe, allerdings war in fünf von zehn Balb-neuT Mammatumoren (50%) eine stärkere Phosphorylierung am Serin473 von AKT nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung am Threonin308 alleine die Aktivität von AKT um den Faktor 10 steigert, während die doppelt-phosphorylierte Form die Aktivität von AKT nochmal um den Faktor 100 steigert [Alessi et al., 1996a; Guertin et al., 2006]. Daraus folgt, dass die Threonin308-Phosphorylierung in Verbindung mit der Serin473-Phosphorylierung eine höhere Aktivität von AKT zur Folge hat, als die Threonin308-Phosphorylierung alleine.

Weiterführend wurde die Phosphorylierung eines Substrats von AKT, dem GSK3β, am Serin9 analysiert (pGSK3β(S9)). Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung von GSK3β

in sieben von zehn Mammatumoren (70%) höher war als im WT-Mammagewebe und gut mit der Phosphorylierung von AKT übereinstimmt (Abb. 3.1). Dieses Ergebnis deutet ebenfalls darauf hin, dass die Balb-neuT-Mammatumoren eine gesteigerte Aktivität von AKT besitzen.

### 3.1.1.1 Expression der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren

Im folgenden wurde die Expression der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren untersucht. Hierfür wurden zehn Balb-neuT-Mammatumoren im Vergleich zu WT-Mammagewebe im Western-Blot-Verfahren analysiert.

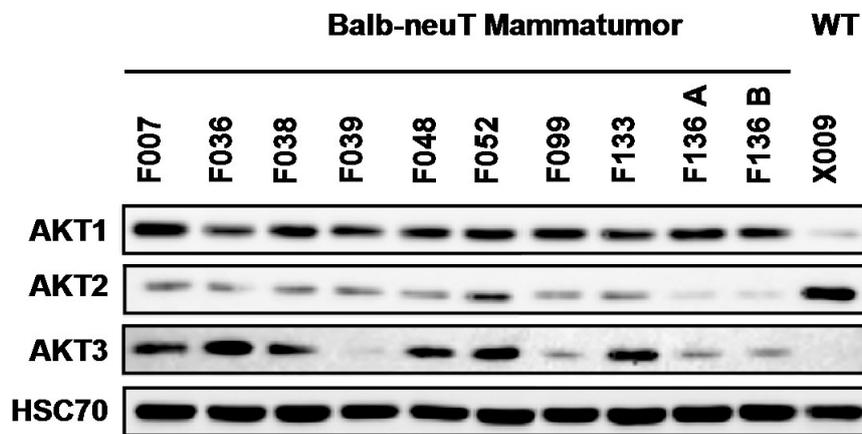


Abbildung 3.2: Expression der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren. Western-Blot-Analyse mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern in zehn Balb-neuT-Mammatumoren und WT-Mammagewebe von einer Balb/c Maus.

Hierbei ergab sich, dass alle Balb-neuT-Mammatumoren die AKT-Isoform 1 überexprimierten, während die Expression der AKT-Isoform 2 reduziert war (Abb. 3.2). Die AKT-Isoform 3 ist in allen Balb-neuT-Mammatumoren im Vergleich zum WT-Mammagewebe überexprimiert, dabei war AKT3 in sechs von zehn der Balb-neuT-Mammatumoren stark überexprimiert (Abb. 3.2).

### 3.1.1.2 Aktivitäten der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren

Um die Aktivierung des AKT-Signalwegs genauer zu analysieren, wurden die Aktivitäten der einzelnen AKT-Isoformen mit Hilfe eines neu etablierten AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays (siehe 2.2.15) untersucht. Hierfür wurden acht Balb-neuT-Mammatumoren und ein WT-Mammagewebe analysiert. Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) bestimmt.

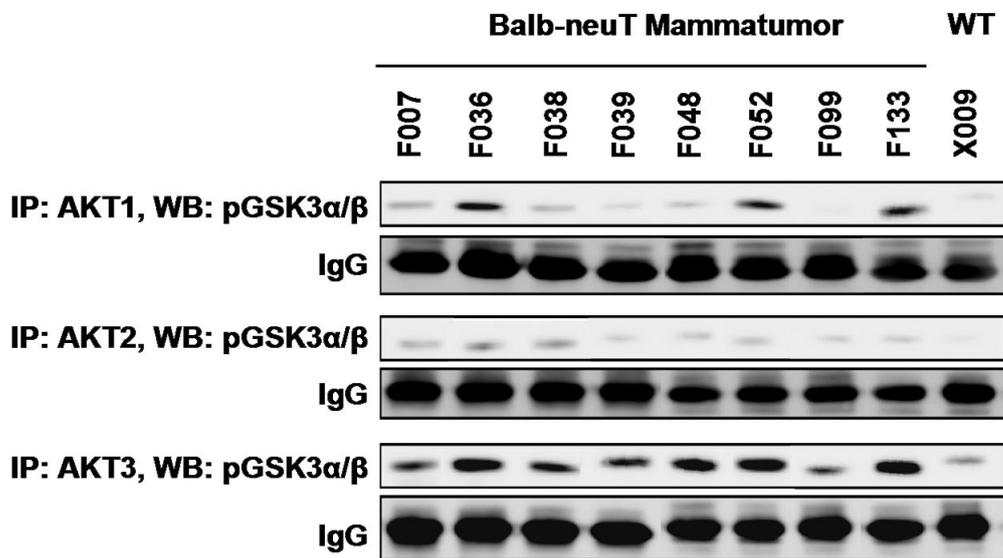


Abbildung 3.3: **Aktivitäten der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3 $\alpha/\beta$  und ATP im Western-Blot-Verfahren an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) in acht Balb-neuT-Mammatumoren und WT-Mammagewebe von einer Balb/c Maus analysiert.

Der Abbildung 3.3 ist zu entnehmen, dass drei der acht Mammatumoren eine gesteigerte AKT1-Aktivität besaßen. Die AKT2-Aktivität zeigte sich weitgehend konstant, während die AKT3-Aktivität in allen Mammatumoren stärker war als im WT-Mammagewebe. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tumoren heterogen bezüglich ihrer AKT1-Aktivität sind. Obwohl die Expression der AKT-Isoform 2 gegenüber dem

WT-Mammagewebe reduziert war (Abb. 3.2), konnte eine leichte Aktivitätssteigerung von AKT2 nachgewiesen werden. Interessanterweise ergab sich, dass die AKT-Isoform 3 in allen Balb-neuT-Mammatumoren eine gesteigerte Aktivität gegenüber dem WT-Mammagewebe besaß. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AKT3 in Balb-NeuT Mammatumoren im Vergleich zum WT-Mammagewebe überexprimiert wird und überaktiviert ist und somit eine bedeutende Funktion für das Wachstum und Überleben von ErbB2<sup>+</sup>-Mammatumoren haben könnte.

### 3.1.2 Etablierung von murinen ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom-Zellkulturen aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren

Damit Funktionen der AKT-Isoformen in Balb-neuT-Mammatumoren untersucht werden können, ist ein *in vitro* Modell hilfreich. Folgend wurden primäre Mammatumorzellen aus frisch isolierten Balb-neuT-Mammatumoren isoliert. Hierfür wurde ein Balb-neuT Mammatumor direkt nach Isolation in sterilem Medium aufgenommen und unter sterilen Bedingungen in die Zellkultur überführt (siehe 2.2.2).

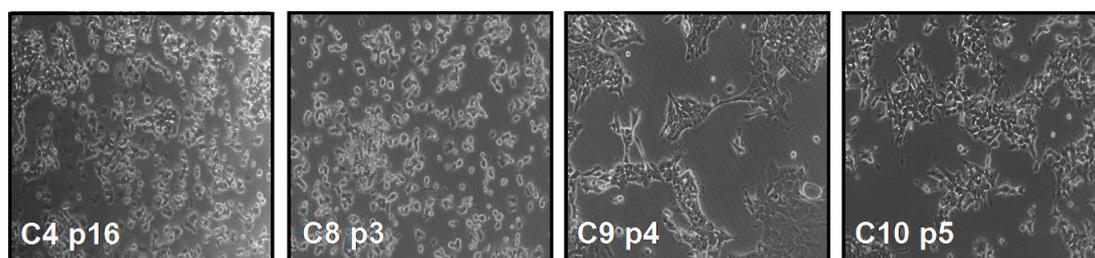


Abbildung 3.4: **Etablierung von murinen Mammakarzinomzelllinien aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren.** Die Zellen wurden aus einem frisch präparierten Balb-neuT Mammatumor mittels Explantkultur isoliert und kultiviert. Gezeigt sind verschiedene Zellkulturansätze in den angegebenen Passagen (p).

In Abbildung 3.4 sind vier primäre Balb-neuT Mammatumor-Zellkulturen abgebildet. Die aus Balb-neuT-Mammatumoren etablierten Zelllinien wurden im Vergleich zum primären Balb-neuT Mammatumor näher charakterisiert. Das Expressionsprofil einiger Marker- und tumorassoziierter Proteine wurde im folgenden analysiert. Zur Überwachung einer Fibroblasten-Kontamination der primären Zellkulturen wurde eine murine Fibroblastenzelllinie, NIH/3T3, als Kontrolle eingesetzt.

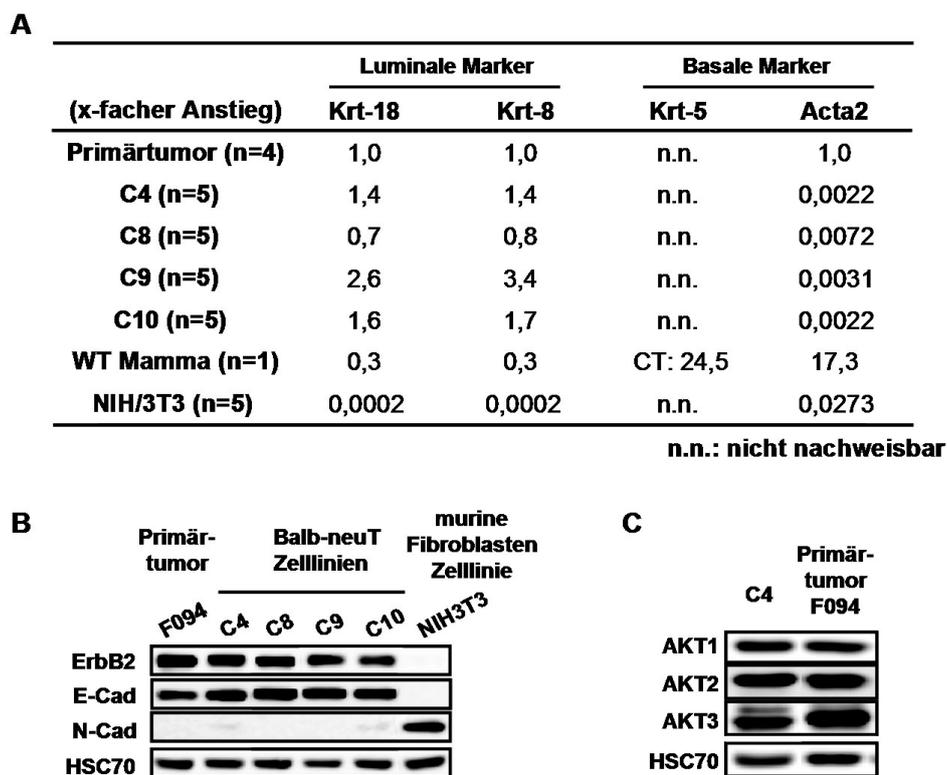


Abbildung 3.5: Charakterisierung von murinen Mammakarzinomzelllinien aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren. **A.** Die Relative mRNA-Menge der Zytokeratine-8, -18 und -5 (Krt-8, -18 und -5), sowie dem *smooth muscle actin* (Acta2) wurde mit Hilfe der qPCR bestimmt. **B.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2, E-Cadherin und N-Cadherin spezifischen Antikörpern und **C.** mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern in Balb-neuT-Mammatumoren, Mammatumorzelllinien aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren und NIH/3T3 Zellen.

Mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) wurden die Zellen bezüglich ihres Zytokeratinmusters untersucht. Es zeigte sich, dass die für den Balb-neuT-Tumor typischen luminalen Marker Keratin-8 und -18 in den Zellkulturen in hohen mRNA-Mengen vorlagen. Die Zellkulturen waren für die basalen Marker Keratin-5 und *smooth muscle actin* negativ, wie auch der Primärtumor (Abb. 3.5 A). Hieraus ergibt sich, dass Zellkulturen aus Balb-neuT Mammatumoren etabliert wurden, welche die typischen Charakteristika des ErbB2<sup>+</sup> Balb-neuT-Mammatumors besitzen.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Balb-neuT Mammatumor-Zellkulturen den ErbB2-Rezeptor stark exprimierten (Abb. 3.5 B). Die Zellekulturen, sowie der Primärtumor, waren ebenfalls stark positiv für den epithelialen Marker E-Cadherin. E-Cadherin ist ein

Calciumionen-abhängiges Transmembran-Glycoprotein aus der Gruppe der Adhäsionsproteine, welches vor allem in den Epithelzellen exprimiert wird. Die Zellkulturen und der primäre Tumor waren für den mesenchymalen Marker N-Cadherin negativ, nicht aber die vom Mesoderm abstammenden Fibroblasten (Abb. 3.5 B).

Für weiterführende Experimente wurde die Zellkultur C4 ausgewählt. Es wurde die Expression der AKT-Isoformen in den C4-Zellen im Vergleich zum Primärtumor analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle AKT-Isoformen in den C4-Zellen exprimiert wurden (Abbildung 3.5 C).

### 3.1.3 Tumorigenität der murinen ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen (C4-Zellen) *in vivo*

Um die Tumorigenität, der etablierten murinen ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie C4 *in vivo* zu untersuchen, wurden 1 x 10<sup>6</sup> C4-Zellen subkutan in Balb/c Wildtyp (WT) Mäuse injiziert.

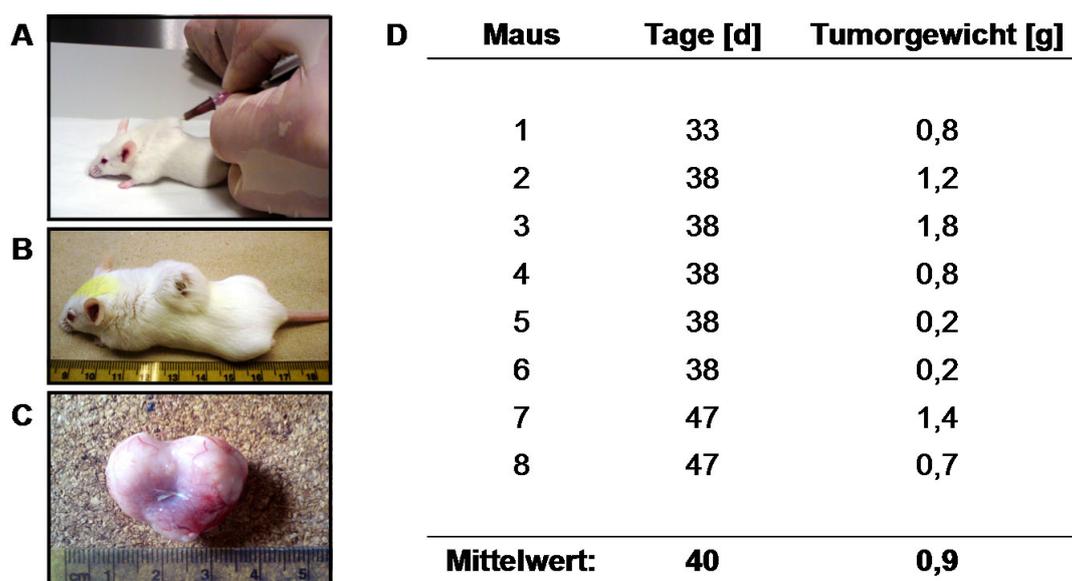


Abbildung 3.6: Tumorigenität der etablierten murinen ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie C4 *in vivo*. **A.** Subkutane Injektion von 10<sup>6</sup> C4-Zellen in Balb/c WT Mäuse, **B.** Tumorendstadium (Ulcus) und **C.** isolierter C4 Tumor. **D.** Anzahl der Tage von der Injektion bis zur Tötung und Tumorgewicht der C4 Tumoren (n=8).

Für die C4-Zellen ergab sich *in vivo* eine Tumorfrequenz von 100%, d.h. alle Mäuse haben Tumore entwickelt. Das Abbruchkriterium war in jedem Fall ein Ulcus. Die Tu-

moren sind im Mittel nach 40 Tagen mit einem Gewicht von 0,9 g ulzeriert (Abbildung 3.6). Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Tumorgewicht und der Anzahl der Tage von der Injektion bis zur Tötung. Die Metastasierungsfähigkeit dieser Zellen wird derzeit noch untersucht. Von den Tumoren wurden Gewebestücke direkt nach Entnahme des Tumors in flüssigem Stickstoff eingefroren oder in Paraffin eingebettet. Aus den C4-Tumoren wurden Proteinlysate hergestellt und die Expression von ErbB2 und ErbB3 sowie die Aktivierung des AKT-Signalwegs und die Expression der AKT-Isoformen im Western-Blot-Verfahren untersucht.

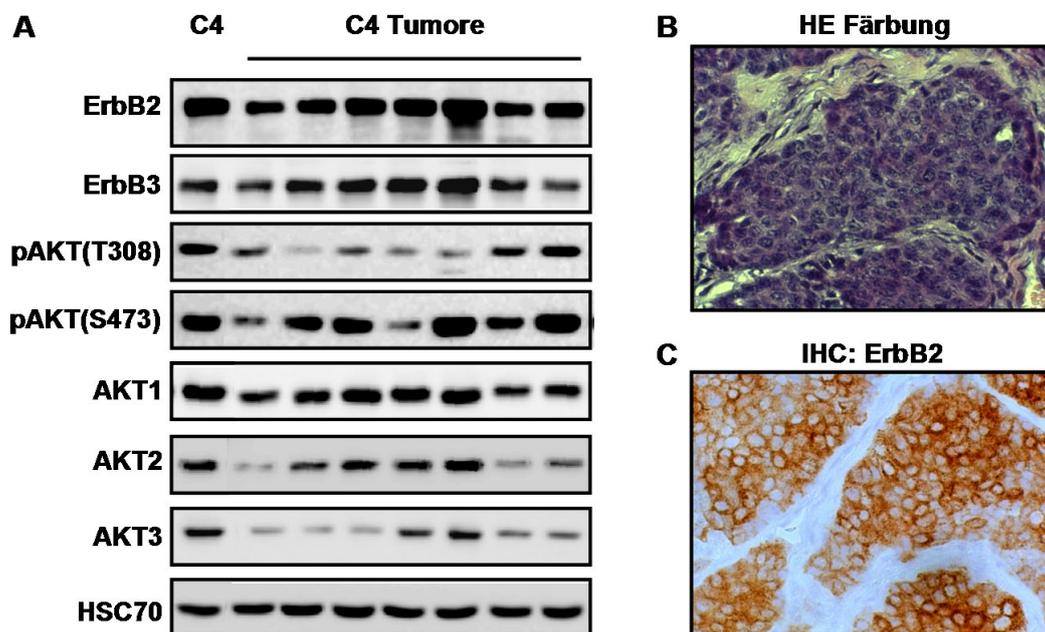


Abbildung 3.7: Expression von ErbB2, ErbB3, pAKT und den AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 in C4 Tumoren. **A.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2 und pAKT sowie mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern. **B.** Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und **C.** Immunhisochemische (IHC)-Färbung von ErbB2 eines C4-Tumors (40x).

Aus der Abbildung 3.7 A geht hervor, dass alle C4-Tumoren den ErbB2- und ErbB3-Rezeptor in vergleichbaren Mengen zur parentalen Zelllinie C4 exprimierten. Der AKT-Signalweg war in fünf von sieben C4-Tumoren stark aktiviert (Abb. 3.7 A). Die AKT-Isoform 1 ließ sich in allen C4-Tumoren eindeutig nachweisen, während die AKT-Isoformen 2 und 3 nur in vier bzw. zwei von sieben Tumoren eine starke Expression zeigten (Abb. 3.7 A). Auch die IHC-Färbung mit ErbB2-spezifischen Antikörpern ergab, dass die C4-Tumoren stark ErbB2 positiv waren (Abb. 3.7 C). Diese Ergebnisse zeigen, dass C4-

Zellen nach subkutaner Injektion eine hohe Tumorigenität besitzen und effizient ErbB2<sup>+</sup> Tumore in WT Balb/c Mäusen generieren können.

### 3.1.4 Aktivierung des ErbB2/AKT-Signalwegs in ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen

Die C4-Zellen wurden bezüglich ihrer Expression von ErbB2 und dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) mit den humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (ER $\alpha$ <sup>+</sup>) und SKBR-3 (ErbB2<sup>+</sup>/ER $\alpha$ <sup>-</sup>) verglichen.

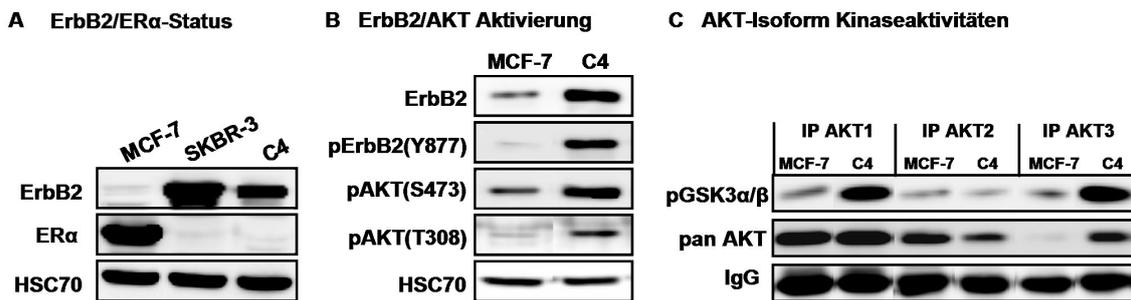


Abbildung 3.8: **Aktivierung des ErbB2/AKT-Signalwegs in ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen.** **A.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2 und ER $\alpha$  spezifischen Antikörpern der humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und SKBR-3, sowie der murinen Mammakarzinomzelllinie C4. **B.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2, pErbB2(Y877), pAKT(S473) und pAKT(T308) spezifischen Antikörpern in MCF-7 und C4-Zellen. **C.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3 $\alpha/\beta$  und ATP im Western-Blot-Verfahren an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) analysiert. Die Menge an präzipitierter AKT-Isoform wurde zusätzlich mit einem pan AKT Antikörper bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die C4-Zellen zwar weniger ErbB2 exprimierten als die ErbB2<sup>+</sup> Zelllinie SKBR-3, aber eindeutig mehr als die ER1<sup>+</sup> Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Abb. 3.8 A). Eine Expression des ER1 konnte in den C4- und den SKBR-3-Zellen im Vergleich zu den MCF-7 Zellen nicht nachgewiesen werden. Hieraus ergibt sich, dass die C4-Zellen, wie die SKBR-3 Zellen, einen ErbB2<sup>+</sup>/ER $\alpha$ <sup>-</sup>-Phänotyp besitzen.

Die Aktivierung des ErbB2-Rezeptors wurde in den C4-Zellen an Hand der Phosphorylierung des ErbB2-Rezeptors an dem Tyrosinrest877 analysiert. Im Vergleich zu den ER $\alpha$ <sup>+</sup> MCF-7 Zellen, zeigten die C4-Zellen eine wesentlich stärkere Aktivierung des ErbB2-Rezeptors (Abb. 3.8 B). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der AKT-Signalweg in den C4-Zellen stärker aktiviert ist als in den MCF-7 Zellen. Sowohl die

Phosphorylierung am Serin473 als auch am Threonin308 von AKT war in den C4-Zellen erhöht (Abb. 3.8 B).

Zur genaueren Analyse des AKT-Signalwegs wurden die Aktivitäten der drei AKT-Isoformen in den C4-Zellen untersucht. Im Vergleich zu den ER1<sup>+</sup> MCF-7 Zellen, zeigten die C4-Zellen eine gesteigerte Aktivität der AKT-Isoformen 1 und 3 (Abb. 3.8 C.). Diese Ergebnisse zeigen, dass die ErbB2<sup>+</sup>/ER1<sup>-</sup> C4-Zellen eine gesteigerte Aktivität der AKT-Isoformen 1 und 3 gegenüber der ER1<sup>+</sup> humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 haben. Diese Ergebnisse könnten darauf hin deuten, dass die gesteigerte Expression und Aktivität des ErbB2-Rezeptors die AKT-Isoformen 1 und 3 in ErbB2<sup>+</sup>-Mammatumoren effizient aktiviert.

### 3.1.5 Aktivierung des AKT-Signalwegs in ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition von HSP90

Weiterführend wurde die Aktivierung des AKT-Signalwegs und die Expression von ErbB2 und den AKT-Isoformen unter Wachstumsfaktorentzug, sowie unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition des *heat shock protein 90* (HSP90) in den C4-Zellen analysiert. Inhibitoren von HSP90 wurden bereits in Studien der klinischen Phase I getestet [Kummar et al., 2010]. Klientenproteine von HSP90 sind unter anderem ErbB2 und AKT, so dass es unter Inhibition von HSP90 zur Degradation von ErbB2 und AKT kommt [Neckers and Ivy, 2003; Fortugno et al., 2003].

Es konnte gezeigt werden, dass unter Wachstumsfaktorentzug die Aktivierung von AKT, gemessen an der pAKT(S473) und pAKT(T308) Menge, abnahm (Abb. 3.9 A). Während die Expression der AKT-Isoformen 1 und 2 unter Wachstumsfaktorentzug keine Veränderungen zeigte, ergab sich für die AKT-Isoform 3 eine Zunahme der Expression. Auf Grund dieser Ergebnisse könnte man vermuten, dass die AKT-Isoform 3 unter Wachstumsfaktorentzug eine besondere Rolle spielt, da die Verfügbarkeit von AKT3 ansteigt.

Durch zusätzliche Inhibition von HSP90 mit dem HSP90 Inhibitor 17-DMAG nach Wachstumsfaktorentzug zeigte sich, dass die Proteinmenge von ErbB2 reduziert wurde (Abb. 3.9 A). Ebenfalls ergab sich eine reduzierte pAKT Menge, sowie eine verringerte Expression der AKT-Isoformen 1 und 2. Die Expression der AKT-Isoform 3 hingegen zeigte auch nach Inhibition von HSP90 keine Reduktion in der Expression. Dieses Ergebnis könnte darauf hin deuten, dass von den AKT-Isoformen nur AKT1 und AKT2,

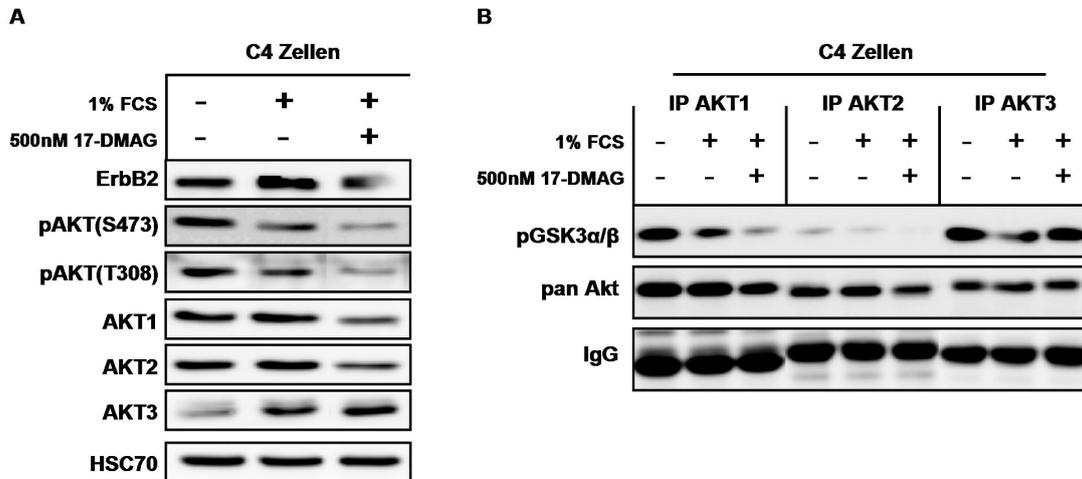


Abbildung 3.9: Aktivierung des AKT-Signalwegs unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition von HSP90. **A.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2, pAKT und AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern in C4-Zellen. **B.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3α/β und ATP im Western-Blot-Verfahren an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3α/β) analysiert. Die Menge an präzipitierter AKT-Isoform wurde zusätzlich mit einem pan-AKT-Antikörper bestimmt.

nicht aber AKT3, Klientenproteine von HSP90 sind. Weiterführende Experimente sind erforderlich, um diese Annahme zu bestätigen.

Inwiefern sich die Aktivitäten der AKT-Isoformen unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition von HSP90 in den C4-Zellen verändern, wurde mit dem AKT-Isoform-spezifischen Kinaseaktivitätsassay bestimmt. Aus der Abbildung 3.9 B ist zu entnehmen, dass die Aktivitäten aller AKT-Isoformen unter Wachstumsfaktorentzug abnahmen. Obwohl die Expression von AKT3 unter Wachstumsfaktorentzug anstieg, wurde die AKT3-Aktivität reduziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle AKT-Isoformen in den C4-Zellen wachstumsfaktorabhängig aktiviert werden können.

Durch zusätzliche Inhibition von HSP90 zeigte sich, dass die Aktivität der AKT-Isoformen 1 und 2 weiter abnahm, während die AKT3 Aktivität zunahm (Abb. 3.9 B). Diese Ergebnisse könnten vermuten lassen, dass bei Verlust von AKT1 und AKT2 Aktivität, die AKT3 Aktivität ansteigen kann, um Effekte von AKT1 und AKT2 zu kompensieren.

### 3.1.6 ShRNA-vermittelter *knockdown* der AKT-Isoformen in ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen

Mit den etablierten Zellkulturen aus den primären Balb-neuT-Mammatumoren wurden *in vitro* Studien zur Funktion der AKT-Isoformen durchgeführt. Hierfür wurden die AKT-Isoformen mittels AKT-Isoform-spezifischer lentiviraler shRNA-Vektoren in den C4-Zellen runter reguliert. Nach Transfektion der C4-Zellen mit den entsprechenden lentiviralen shRNA-Vektoren wurden stabile, AKT-Isoform-spezifische *knockdown*-Zelllinien selektioniert (siehe 2.2.4).

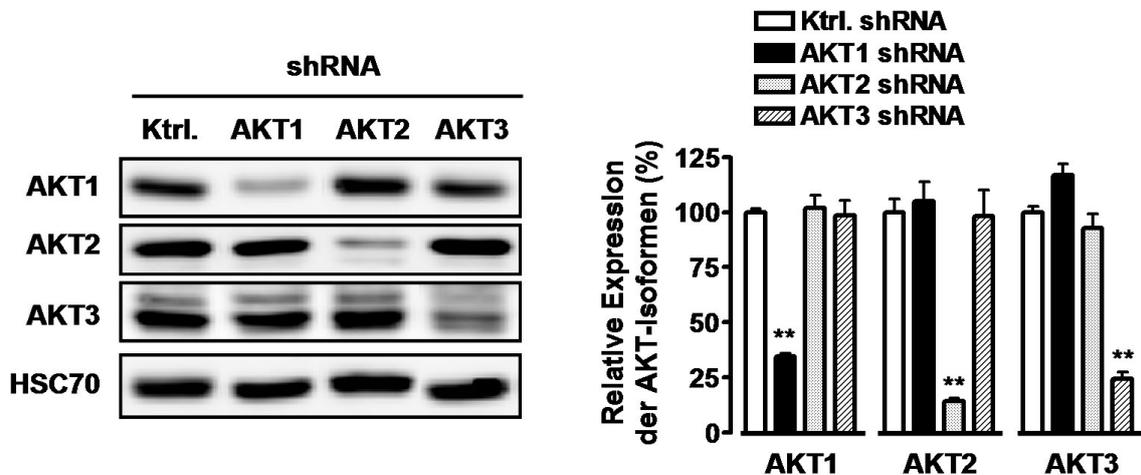


Abbildung 3.10: **Hemmung der Expression der AKT-Isoformen nach lentiviraler Transduktion mit AKT-Isoform-spezifischen shRNA-Vektoren in C4-Zellen.** A. Nach lentiviraler Transduktion mit AKT-Isoform-spezifischen shRNA-Vektoren und anschließender Selektion mit Puromycin wurden Proteinlysate der C4-Zellen hergestellt. Die Expression der AKT-Isoformen wurde mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern im Western-Blot-Verfahren analysiert und quantitativ ausgewertet (n=3, +/- SD). Die Signifikanzen (\*\*, p<0,01) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Aus der Abbildung 3.10 geht hervor, dass sich alle AKT-Isoformen in den C4-Zellen spezifisch und signifikant auf Proteinebene herunter regulieren ließen. Hierbei ergaben sich *knockdown*-Effizienzen von 66%, 90% und 75% für AKT1, AKT2 beziehungsweise AKT3 im Vergleich zu den mit einer Kontroll-shRNA transfizierten C4-Zellen (Ktrl.) (Abb. 3.10 B). Im folgenden wurden Effekte nach Reduktion der Expression einer AKT-Isoform in den ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen analysiert.

### 3.1.7 Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Um den Einfluss der AKT-Isoformen auf das Wachstum der C4-Zellen zu untersuchen, wurde die Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* im Vergleich zu den C4 Ktrl.-Zellen betrachtet. Die Proliferation der Zellen wurde an Hand der DNA-Syntheserate mit einem kalorimetrischen BrdU ELISA (siehe 2.2.17) analysiert.

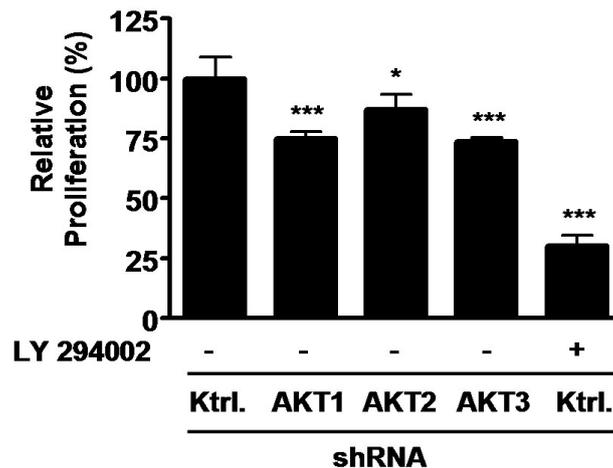


Abbildung 3.11: **Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* und Inhibition der PI3K.** Die Proliferation der C4-Zellen wurde mit einem kalorimetrischen BrdU-ELISA gemessen. Die Zellen wurden 48 h mit 25  $\mu$ M PI3K-Hemmstoff LY-294002 behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=5, +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*\*, p<0,001 und \*, p<0,05) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Die Ergebnisse zeigten, dass alle AKT-Isoformen die Proliferation der Zellen beeinflussten (Abb. 3.11). Durch den Verlust von AKT1 oder AKT3 ergab sich eine Hemmung der Proliferation um 25%. Durch den Verlust von AKT2 wurden die C4-Zellen nur um 13% in der Proliferation inhibiert (Abb. 3.11). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die AKT-Isoformen 1 und 3 die Proliferation der C4-Zellen in gleichem Maße fördern, während die AKT-Isoform 2 einen geringeren Effekt zeigt, jedoch auch Einfluss nimmt. Unter Inhibition der PI3K mit dem Hemmstoff LY-294002 wobei alle AKT-Isoformen inhibiert werden, ergab sich eine Hemmung der Proliferation von 70%. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Wachstum der ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen stark vom PI3K/AKT-Signalweg abhängig ist und alle AKT-Isoformen, insbesondere AKT1 und AKT3, die Proliferation positiv beeinflussen können.

### 3.1.8 Expression und Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 in C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Die AKT-Isoform-spezifischen *C4-knockdown*-Zellen wurden bezüglich ihrer ErbB2- und ErbB3-Rezeptor Expression, sowie der Aktivierung dieser beiden Rezeptoren analysiert.

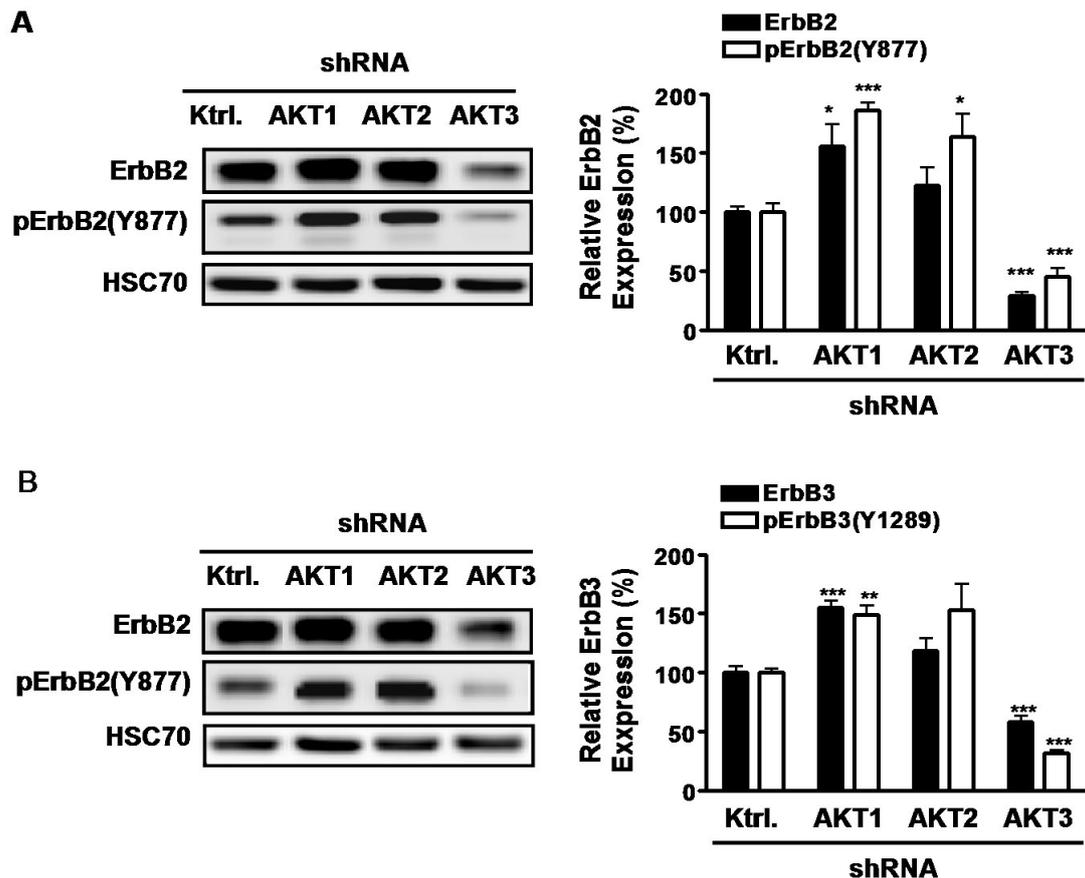


Abbildung 3.12: Expression und Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 in AKT-Isoform-spezifischen *knockdown* C4-Zellen. **A.** Western-Blot-Analyse mit ErbB2- und pErbB2(Y877)-spezifischen Antikörpern und quantitative Auswertung der Western-Blot Ergebnisse (n=3, +/- SD). **B.** Western-Blot-Analyse mit ErbB3- und pErbB3(Y1289)-spezifischen Antikörpern und quantitative Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse (n=3, +/- SD). Die Signifikanzen (\*, p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*, p<0,001) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Interessanterweise zeigte sich, dass sowohl die ErbB2- als auch die ErbB3-Expression, sowie die Aktivierung dieser Rezeptoren durch den Verlust von AKT1 oder AKT2 anstieg(Abb. 3.12). Auf Grund des Verlusts von AKT3 kam es hingegen zur signifikanten

Abnahme der Expression und der Abnahme der Aktivierung des ErbB2- und ErbB3-Rezeptors (Abb. 3.12).

Während das endogene ErbB2 unter der Kontrolle des endogenen ErbB2-Promotors steht, wird das transgene ErbB2 durch den MMTV-Promotor reguliert. Auf Grund der starken Homologie zwischen dem Maus ErbB2 (endogen) und dem Ratten ErbB2 (transgen) ist eine Differenzierung mit Antikörpern nicht möglich. Es stellt sich die Frage, ob die Expression des ErbB2-Rezeptors in den *knockdown*-Zellen auf Gen- oder Proteinebene reguliert wird. Eine Regulation des MMTV-Promotors durch AKT-Isoformen kann nicht ausgeschlossen werden. Da das endogene ErbB2 nicht durch den MMTV-Promotor reguliert wird, wäre solch ein Effekt physiologisch nicht relevant. Inwiefern die gemessene Abnahme des ErbB2-Rezeptors durch den Verlust von AKT3 auf Genexpressionsebene reguliert ist, wurde mit der Methode der quantitativen PCR (qPCR) untersucht.

Es zeigte sich keine messbare Veränderung der mRNA-Menge von ErbB2 in den AKT3 *knockdown*-Zellen, gegenüber den C4 Ktrl.-Zellen (Abb. 3.13 A). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Abnahme der Expression von ErbB2 in den AKT3 *knockdown*-Zellen auf post-transkriptioneller Ebene statt findet.

Weiterführend wurde die mRNA-Menge des Transkriptionsfaktors FOXM1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass FOXM1 über den ErbB2-Signalweg reguliert wird und einen Marker für eine Überexpression von ErbB2 beim Mammakarzinom darstellt [Francis et al., 2009]. Aus der Abbildung 3.13 B geht hervor, dass in den AKT3-*knockdown*-Zellen die mRNA-Menge von FOXM1 signifikant reduziert war im Vergleich zu den Ktrl.-Zellen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Verlust von ErbB2 in den AKT3-*knockdown*-Zellen tatsächlich eine reduzierte ErbB2-Signalweiterleitung in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen zur Folge hat.

Es wurde beschrieben, dass es durch  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinkomplexe zu einer Proteasom-vermittelten Degradation von ErbB2 kommen kann [Kuwada et al., 2005]. Im folgenden wurde überprüft, ob sich die mRNA-Mengen von  $\alpha 6$ - und  $\beta 1$ -Integrinen in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen verändert haben. Die  $\alpha 6$ -Integrin mRNA-Menge zeigte auf Grund des Verlustes von AKT3 keinen Unterschied, gegenüber den Ktrl.-Zellen (Abb. 3.13 C). Hingegen konnte gezeigt werden, dass die  $\beta 1$ -Integrin mRNA-Menge in den AKT3-*knockdown*-Zellen signifikant, um den Faktor 2,7, anstieg (Abb. 3.13 D). Diese Ergebnisse könnten darauf hin deuten, dass ErbB2 in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen post-translational über eine  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinkomplex-vermittelte Signaltransduktion abgebaut werden könnte. Weiterführende Experimente müssten diese Annahme bestätigen.

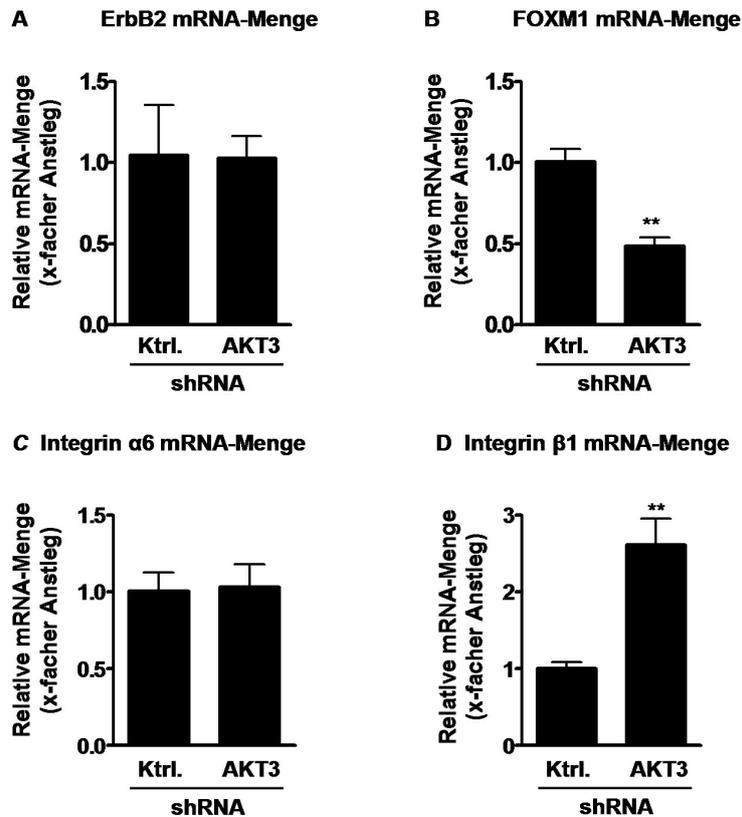


Abbildung 3.13: Relative mRNA-Mengen von ErbB2, FOXM1, Integrin  $\alpha 6$  und Integrin  $\beta 1$  in C4-Zellen nach AKT3-spezifischem *knockdown*. Die ErbB2 A, FOXM1 B, Integrin  $\alpha 6$  C bzw. Integrin  $\beta 1$  D mRNA-Menge wurde mit Hilfe der qPCR ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus einem n=6, +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*, p<0,01) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.9 Expression des Östrogenrezeptor $\alpha$ (ER $\alpha$ ) in C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem-*knockdown*

Wie in Abbildung 3.8 B gezeigt wurde, sind die ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen negativ für den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Häufig findet man beim Mammakarzinom eine reziproke Expression der Rezeptoren ErbB2 und ER $\alpha$  [Lee et al., 1996; Perou et al., 2000]. Es stellt sich die Frage, ob die Expression des ER $\alpha$  in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen, die eine verminderte ErbB2 Expression zeigten (Abb. 3.12), verändert ist. Im folgenden wurde die Expression des ER $\alpha$  in den C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem-*knockdown* analysiert.

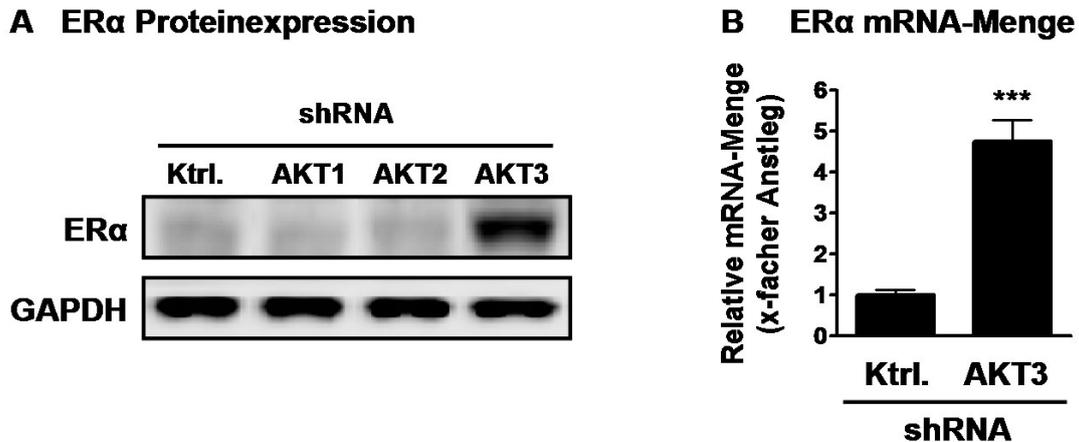


Abbildung 3.14: Protein und mRNA Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in AKT-Isoform-spezifischen C4 *knockdown*-Zellen. **A.** Western-Blot-Analyse mit ER $\alpha$ -spezifischen Antikörpern. **B.** Die relative ER $\alpha$  mRNA-Menge wurde in AKT3-spezifischen C4 *knockdown* und Ktrl.-Zellen mit Hilfe der qPCR ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=6, +/- SD. Die Signifikanz (\*\*\*, p<0,001) wurde mit einem Student's t-Test ermittelt.

Aus der Abbildung 3.14 geht hervor, dass die Expression des ER $\alpha$  in den AKT3-*knockdown*-Zellen gegenüber den Ktrl.-Zellen signifikant anstieg. In den AKT1- und AKT2-*knockdown*-Zellen zeigte sich hingegen keine Veränderung der ER $\alpha$  Expression. Die Hochregulation des ER $\alpha$  konnte in den AKT3-*knockdown*-Zellen auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 3.14 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass AKT3 die Genexpression des ER $\alpha$  in den C4-Zellen regulieren kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des ER $\alpha$  über den Transkriptionsfaktor FOXO3a induziert wird [Guo and Sonenshein, 2004]. Es ist bekannt, dass AKT den Transkriptionsfaktor FOXO3a an dem Serinrest253 phosphorylieren und damit inaktivieren kann [Anderson et al., 1998; Brunet et al., 1999]. Mittels Western-Blot-Analyse wurde untersucht, ob die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a am Aminosäurerest Serin253 in den C4-Zellen nach AKT3-spezifischem *knockdown* verändert ist.

Aus der Abbildung 3.15 geht hervor, dass die Phosphorylierung am Serin253 von FOXO3a in den AKT3 *knockdown*-Zellen signifikant reduziert war (66%) (Abb. 3.15). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FOXO3a in den AKT3 *knockdown*-Zellen weniger durch AKT3 phosphoryliert wird und dadurch aktiviert bleibt. Als Folge könnte der aktive Transkriptionsfaktor FOXO3a die ER $\alpha$  Expression induzieren.

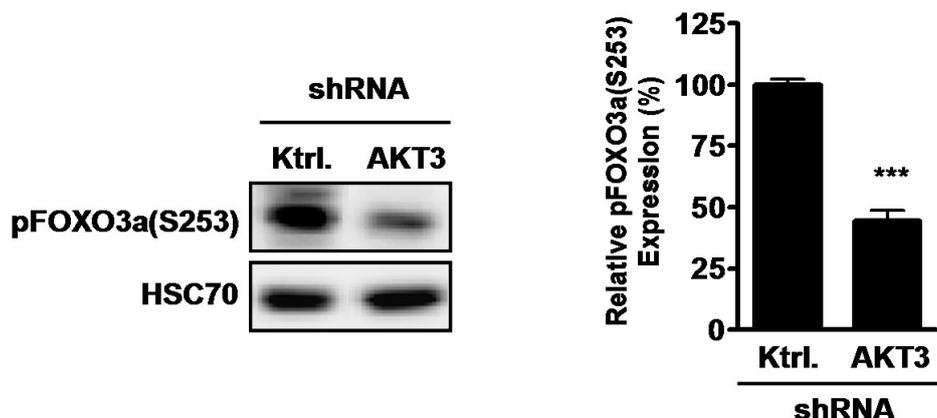


Abbildung 3.15: Expression von pFOXO3a(S253) in C4 AKT3 *knockdown*-Zellen. Western-Blot-Analyse mit pFOXO3a(S253) spezifischen Antikörper und quantitative Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse (n=3, +/- SD). Die Signifikanz (\*\*\*, p<0,001) wurde mit einem Student's t-Test ermittelt.

### 3.1.10 Effekte des Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen auf das Wachstum von C4-Zellen nach AKT3-spezifischem-*knockdown*

Weiterführend wurde die Abhängigkeit der ER-Signalkaskade für das Überleben und Wachstum der C4-AKT3-*knockdown*-Zellen untersucht. Hierbei wurde analysiert, ob die AKT3-*knockdown*-Zellen auf Grund der gesteigerten Expression des ER $\alpha$  und der reduzierten Expression von ErbB2 ein verändertes Verhalten gegenüber dem ER-Antagonisten Tamoxifen aufweisen. Seit über 100 Jahren findet eine endokrine Therapie bei der Behandlung vom Mammakarzinom Anwendung. In den letzten 30 Jahren hat sich Tamoxifen erfolgreich in der Tumorthherapie beim ER<sup>+</sup>-Mammakarzinom durchgesetzt. In vielen Fällen kommt es jedoch auf Grund verschiedener, größtenteils ungeklärter, Ursachen zu einer Tamoxifenresistenz, was die klinische Prognose verschlechtert [Musgrove and Sutherland, 2009].

Im folgenden wurde die Vitalität sowie die Proliferation der C4-AKT3-*knockdown*-Zellen im Vergleich zu den C4-Ktrl.-Zellen nach Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen, dem aktiven Metaboliten des Pro-Pharmakon Tamoxifen, gemessen. Dabei wurde zunächst die Zellvitalität im zeitlichen Verlauf in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M 4-OH-Tamoxifen im MTT Assay (siehe 2.2.16) verfolgt.

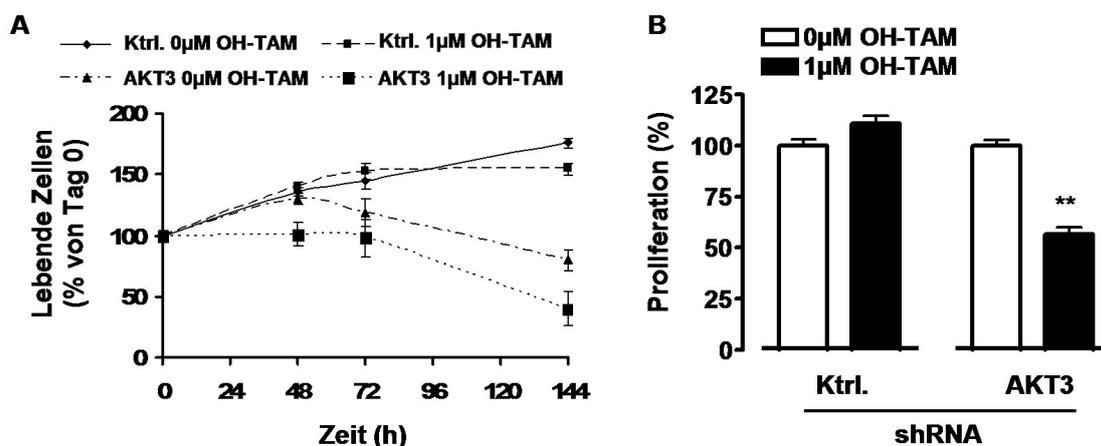


Abbildung 3.16: Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen auf das Wachstum von C4-Zellen nach AKT3-spezifischem-knockdown. **A.** Die Anzahl vitaler Zellen wurde im MTT-Assay nach 48 h, 72 h und 144 h in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M 4-OH-Tamoxifen bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus  $n=8$ ,  $\pm$  SD. **B.** Die Proliferation wurde mit einem kalorimetrischen BrdU-ELISA in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M 4-OH-Tamoxifen nach 48 h gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus  $n=6$ ,  $\pm$  SD. Die Signifikanz (\*\* $p<0,01$ ) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Aus der Abbildung 3.16 A geht hervor, dass die AKT3-knockdown-Zellen durch OH-Tamoxifen in ihrem Wachstum verglichen mit den unbehandelten AKT3-knockdown-Zellen über 144 h stark inhibiert wurden. Alleine der Verlust von AKT3 führte zu einem schlechteren Wachstum, welches durch Zugabe von OH-Tamoxifen vollständig inhibiert wurde und nach 48 h bereits nicht mehr zunahm. Die Ktrl.-Zellen zeigten unter Wachstumsfaktorentzug hingegen eine Wachstumszunahme über 144 h. Auf Grund der Anwesenheit von OH-Tamoxifen kam es erst nach 72 h zur Wachstumsinhibition.

Der Effekt von OH-Tamoxifen auf das Wachstum der C4- AKT3-knockdown-Zellen wurde in einem Proliferations-Assay genauer untersucht. Hierbei wurde die Proliferation der C4-Zellen an Hand der DNA-Syntheserate in einem kalorimetrischen BrdU-ELISA (siehe 2.2.17) in An- oder Abwesenheit von 1  $\mu$ M OH-Tamoxifen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die AKT3-knockdown-Zellen durch OH-Tamoxifen nach 48 h um über 40% in der Proliferation reduziert wurden, während die Ktrl.-Zellen in Anwesenheit von OH-Tamoxifen keinen Effekt auf die Proliferation zeigten (Abb. 3.16 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die C4-AKT3-knockdown-Zellen abhängig von der ER-Signalkaskade wachsen.

### 3.1.11 Untersuchungen des PI3K/AKT-Signalwegs in humanen Mammakarzinomen

Um die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs auch *in vivo* beim Menschen besser zu verstehen, wurden im folgenden 22 humane Mammakarzinome bezüglich ihrer Expression verschiedener AKT-Signalweg-Komponenten analysiert.

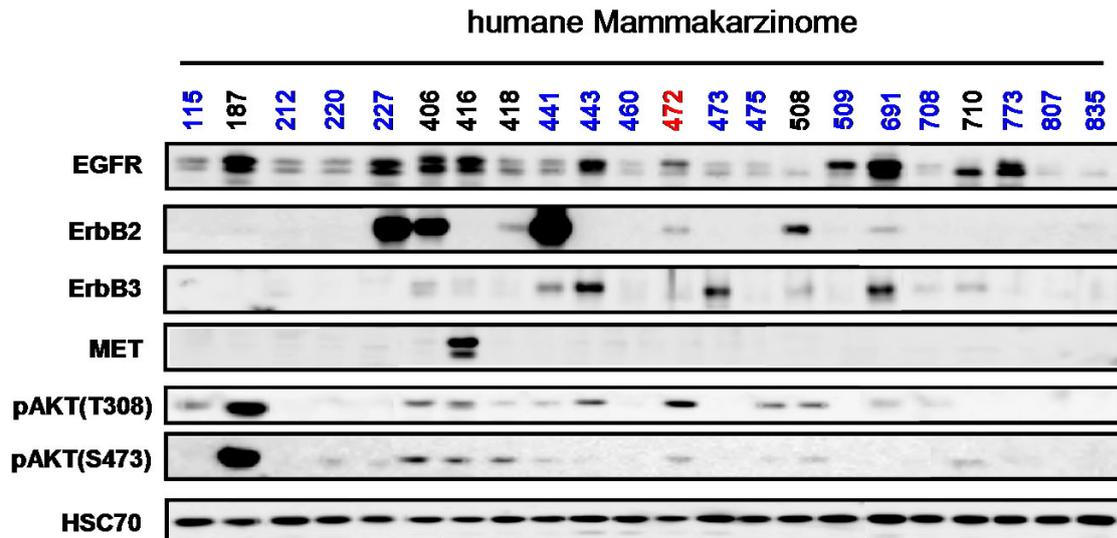


Abbildung 3.17: **Proteinexpression von AKT-Signalweg-Komponenten in humanen Mammakarzinomen.** Die Proteinexpression von EGFR, ErbB2, ErbB3, MET, pAKT(T308) und pAKT(S473) wurde in humanen Mammakarzinomen mit bekanntem ER-Status im Western-Blot-Verfahren untersucht. Blaue Proben-Nr.: ER<sup>+</sup>, schwarze Proben-Nr.: ER<sup>-</sup> oder rote Proben-Nr.: ER-Status unbekannt.

In der Abbildung 3.17 wurden die tumorassoziierten und AKT-aktivierenden Rezeptoren EGFR, ErbB2, ErbB3 und MET in 22 humanen Mammakarzinom-Proben im Western-Blot-Verfahren analysiert. Der Expressions-Status des ER wurde bereits von der Klinik für Gynäkologie (UKE, Hamburg) bestimmt und ist durch eine farbliche Kennzeichnung der Probennummer (Proben-Nr.) markiert (blaue Proben-Nr.: ER<sup>+</sup>, schwarze Proben-Nr.: ER<sup>-</sup>, rote Proben-Nr.: ER-Status nicht bekannt). Hierbei ergab sich, dass 68% (15/22) der Proben einen ER<sup>+</sup>-Status besitzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass 45% (10/22) der Proben EGFR<sup>+</sup> waren, während nur 18% (4/22) der Proben ErbB2<sup>+</sup> oder ErbB3<sup>+</sup> waren. Der MET-Rezeptor konnte nur in einem Tumor <5% (1/22) nachgewiesen werden.

Die Aktivierung des AKT-Signalwegs wurde mit pAKT-spezifischen Antikörpern im Western-Blot-Verfahren in den humanen Mammakarzinom-Proben untersucht. Aus der Abbildung 3.17 geht hervor, dass der AKT-Signalweg, gemessen an der Phosphorylierung von pAKT(T308) und pAKT(S473), in etwa 36% (8/22) der Tumoren aktiviert war. Es zeigte sich, dass insbesondere die ER<sup>-</sup>-Tumoren (schwarze Proben-Nr.) pAKT(S473) positiv waren. Die pAKT(S473)-positiven Proben waren weitgehend auch pAKT(T308) positiv, zusätzlich wurde pAKT(T308) aber auch in einigen ER<sup>+</sup>-Tumoren detektiert, welche pAKT(S473) negativ waren.

Um einen ersten Eindruck der Aktivierung der AKT-Isoformen in humanen Mammakarzinomen zu erhalten wurden vier Proteinlysate humaner Mamakarzinome mit Hilfe des AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays bezüglich ihrer AKT-Isoform-Aktivität untersucht. Für diesen Versuch wurden humane Mammakarzinome unterschiedlicher Typen ausgewählt: 115: ER<sup>+</sup>; 173: ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>; 187: Tripel-negativ sowie 192: ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup> und PTEN defizient. Diese vier Tumoren wurden zunächst im Western-Blot-Verfahren bezüglich ihres Rezeptorstatus und der Aktivierung des AKT-Signalwegs untersucht.

Aus der Abbildung 3.18 A geht hervor, dass die Aktivierung des AKT-Signalwegs, gemessen an der Phosphorylierung von AKT an den AS-Resten Ser473 und Thr308, in dem Tripel-negativen-Tumor (187) und dem ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>/PTEN<sup>-</sup>-Tumor (192) eindeutig am höchsten war. In dem ER<sup>+</sup>-Tumor (115) und dem ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Tumor (173) lässt sich im Vergleich hingegen kaum eine Aktivierung des AKT-Signalwegs nachweisen. Dafür zeigten diese beiden Proben eine starke Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs (pERK1/2), wobei das pERK1/2 Signal in der ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Probe (173) am stärksten war. Anhand dieser vier Proben zeigte sich, dass die Expression des ER1 invers zur Gesamt-AKT-Expression (pan AKT) war. Mit Hilfe des AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays wurde die Aktivierung der AKT-Isoformen genauer untersucht, Es ergab sich, dass der ER<sup>+</sup>-Tumor (115) eine deutliche AKT1-Aktivität besaß, kaum AKT2-Aktivität und keine AKT3-Aktivität. Die ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Tumoren 173 und 192 zeigten kaum AKT1-Aktivität und ein wenig AKT2-Aktivität. Die ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Probe 173 zeigte eine Aktivierung von AKT3, die im Vergleich zur ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>/PTEN<sup>-</sup>-Probe 192 allerdings wesentlich geringer war. Für den ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>/PTEN<sup>-</sup>-Tumor 192 ergibt sich damit eine besonders starke AKT3-Aktivität. Die Tripel-negative-Probe 187 zeigte ebenfalls eine besonders starke AKT3-Aktivität. Zusätzlich aber auch eine Aktivierung der Isoform AKT1. Hier zeigte sich, dass die Tripel-negative-Probe die stärkste Aktivierung des AKT-Signalwegs besaß, da die Isoformen AKT1 und AKT3 aktiviert waren.

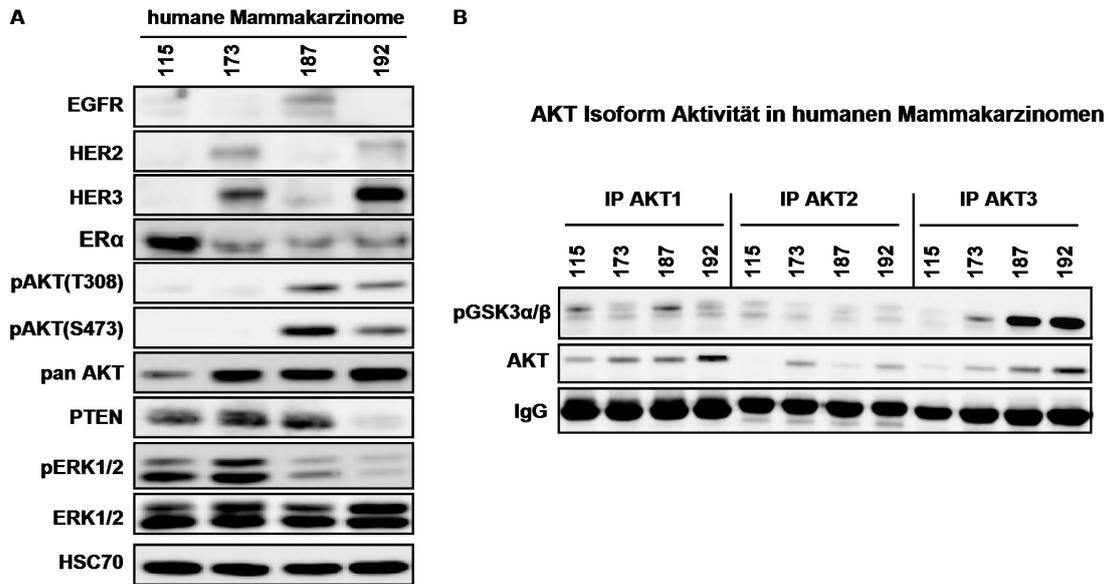


Abbildung 3.18: **Proteinexpression und AKT-Isoform-Aktivitäten in humanen Mammakarziomen.** **A.** Western-Blot-Analyse von humanen Mammakarzinomen unterschiedlicher Typen (115: ER<sup>+</sup>; 173: ErbB2<sup>+</sup>/ER1<sup>-</sup>; 187: Tripel-negativ sowie 192: ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>/PTEN<sup>-</sup>) mit spezifischen Antikörpern. **B.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3α/β und ATP im Western-Blot-Verfahren an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3α/β) analysiert. Die Menge an präzipitierter AKT-Isoform wurde zusätzlich mit einem pan-AKT-Antikörper bestimmt.

Während die ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Tumoren AKT3-Aktivität und kaum AKT1-Aktivität besaßen, zeigte die ER<sup>+</sup>-Probe hingegen AKT1-Aktivität und keine AKT3-Aktivität.

## 3.2 Untersuchungen zur Funktion von AKT-Isoformen in disseminierten Tumorzellen (DTC)

### 3.2.1 Aktivierung des AKT-Signalwegs in DTC-Zelllinien

Um die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs und die Funktionen der AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 in disseminierten Tumorzellen (DTC) des Knochenmarks zu untersuchen, wurde zunächst die Aktivierung dieses Signalwegs sowie die Expression der AKT-Isoformen betrachtet. Hierfür wurden drei DTC Zelllinien, LC-M1, BC-M1 und PC-E1, die aus dem Knochenmark von Patienten mit den Primärtumoren Lungen-, Brust- bzw. Prostatakarzinom etabliert wurden [Pantel et al., 1995], mit unterschiedlichen Zelllinien verglichen. Die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs wurde im Western-Blot-Verfahren (siehe 2.2.13) mittels phospho-AKT(S473) (pAKT(S473)) und phospho-AKT(T308) (pAKT(T308)) spezifischen Antikörpern analysiert. Da für die Kinaseaktivität der Serin/Threonin Kinasen der AKT-Isoformen die Phosphorylierung an zwei Resten, Serin473 und Threonin308 (AKT1), entscheidend ist [Song et al., 2005], kann der Phosphorylierungsgrad dieser beiden Aminosäurereste ein Maß für die Aktivierung des Signalwegs darstellen.

In der Abbildung 3.19 A sind IMR-90 (humane embryonale Lungenfibroblasten), A549 und H1299 (humane Lungenkarzinomzelllinien), MCF-7 (humane Mammakarzinomzelllinie: ER $\alpha$  positiv), SKBR-3, MDA-MB 468 und MDA-MB 231 (humane Mammakarzinomzelllinien: ER $\alpha$  negativ), sowie die humanen DTC Zelllinien: LC-M1 (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)), BC-M1 (Mammakarzinom) und PC-E1 (Prostatakarzinom) aufgetragen. Aus der Abbildung 3.19 A geht hervor, dass die DTC Zelllinien eine Aktivierung des AKT-Signalwegs besitzen. Im Vergleich zu den Mammakarzinomzelllinien SKBR-3 und MDA-MB 468, mit starker Aktivierung des AKT-Signalwegs, zeigte insbesondere die DTC Zelllinie LC-M1 eine vergleichbare pAKT Menge. Zur Analyse der Expression der AKT-Isoformen wurden AKT-Isoform-spezifische Antikörper verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die DTC Zelllinien alle AKT-Isoformen exprimieren, wobei die Expression der AKT-Isoform 3 sehr schwach war. Obwohl die Expression der AKT-Isoformen im Vergleich zu anderen Krebszelllinien (z.B H1299, MCF-7) gering war, ließ sich in den DTC Zelllinien eine höhere Menge pAKT nachweisen. Daraus lässt sich eine gesteigerte Aktivität von AKT ableiten. Dass die Expression der AKT-Isoformen nicht mit der Aktivierung des Signalwegs korreliert zeigte sich auch für die Zelllinien

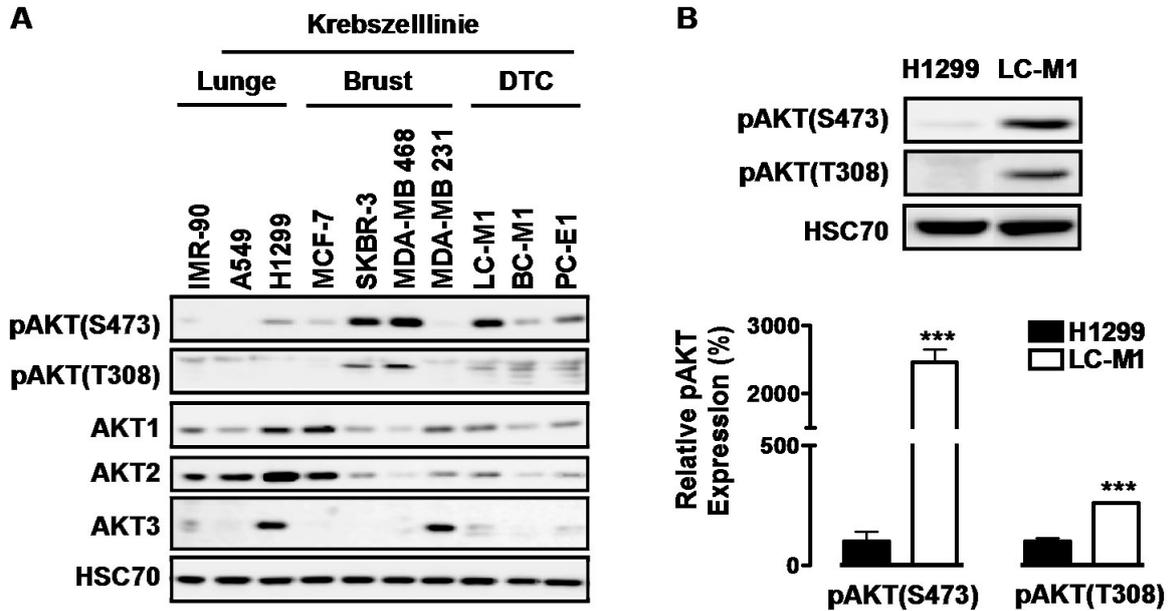


Abbildung 3.19: Aktivierung des AKT-Signalwegs und Expression der AKT-Isoformen in DTC Zelllinien. **A.** Western-Blot-Analyse mit pAKT(S473) und pAKT(T308), sowie AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern. Es wurden die DTC Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1, im Vergleich zu verschiedenen Karzinomzelllinien untersucht. **B.** Western-Blot-Analyse mit pAKT-spezifischen Antikörpern in H1299 und LC-M1-Zellen, sowie quantitative Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse. Gezeigt sind die Mittelwerte aus  $n=3$ ,  $\pm$  SD. Die Signifikanzen (\*\*\*,  $p<0,001$ ) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

SKBR-3 und MDA-MB 468, die ebenfalls vergleichsweise geringe Mengen der AKT-Isoformen exprimieren. Im Vergleich zur NSCLC Zelllinie H1299 zeigte die DTC Zelllinie LC-M1 einen 20-fachen Anstieg der pAKT(S473) und einen 2,5-fachen Anstieg der pAKT(T308) Expression (Abb. 3.19 B). Auf Grund der starken Homologien der AKT-Isoformen kann weder der pAKT(S473) noch der pAKT(T308) spezifische Antikörper zwischen den AKT-Isoformen unterscheiden. Die AKT-Isoform-spezifischen Antikörper können hingegen nicht zwischen aktivierter und nicht-aktivierter Form unterscheiden. Es bleibt also die Frage offen, welche der AKT-Isoformen in den DTC-Zelllinien aktiviert sind.

### 3.2.2 Aktivität der AKT-Isoformen in LC-M1- und H1299-Zellen

Im folgenden wurde der AKT-Signalweg in der DTC-Zelllinie LC-M1, welche eine starke AKT Aktivierung zeigte (Abb 3.19) genauer untersucht. Die LC-M1-Zellen, etabliert aus dem Knochenmark eines Patienten mit NSCLC, wurde im Vergleich zu der NSCLC-Zelllinie H1299 betrachtet. Es wurden zunächst die Aktivitäten der AKT-Isoformen bestimmt. Zur Messung der *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde ein AKT-Isoform-spezifischer Kinaseaktivitätsassay etabliert (siehe 2.2.15). Hierbei wurden die AKT-Isoformen mittels AKT-Isoform-spezifischer Antikörper aus einem Gesamtzelllysat präzipitiert. Es wurde sichergestellt, dass alle AKT-Isoformen vollständig und spezifisch präzipitiert wurden. Anschließend wurde die präzipitierte AKT-Isoform mit einem Substrat von AKT, dem GSK3, unter Zugabe von ATP inkubiert. Als Substrat wurde ein Fusionsprotein aus den beiden AKT Substraten GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  (GSK3 $\alpha/\beta$ ) verwendet. Es wurde der Phosphorylierungsgrad des Fusionsproteins GSK3 $\alpha/\beta$  (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) im Western-Blot-Verfahren analysiert und als Maß der *in vitro* Kinaseaktivität interpretiert (Abb 3.20 A). Zur Bestimmung der relativen AKT-Isoform Aktivität wurde jede Probe auf die entsprechende IgG Menge abgeglichen und folgend die Probe mit der geringsten Bandenintensität gleich 100% gesetzt; alle anderen Aktivitäten wurden relativ dazu betrachtet (Abb 3.20 B). Analog wurde die relative Expression der AKT-Isoformen bestimmt (Abb 3.20 C).

Für die LC-M1-Zellen zeigte sich, im Vergleich zur Zelllinie H1299, eine deutlich gesteigerte relative Aktivität von allen AKT-Isoformen (3-fach AKT1, 2-fach AKT2 und 37-fach AKT3) (Abb 3.20 A und B). Hieraus ergibt sich, dass insbesondere die relative AKT3-Aktivität der LC-M1-Zellen bedeutend (Faktor 37) über der relativen AKT3-Aktivität der H1299-Zellen liegt. Darüber hinaus zeigte sich für die LC-M1-Zellen, dass die relative AKT2-Aktivität am niedrigsten, während die AKT3 Aktivität am höchsten war. Im Vergleich zur relativen AKT2-Aktivität ergab sich für die relative AKT3-Aktivität eine Steigerung um den Faktor 115, während die AKT3-Aktivität der H1299-Zellen nur um den Faktor 7 höher war als die AKT2-Aktivität der H1299-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die LC-M1-Zellen im Vergleich zur Zelllinie H1299 eine besonders starke AKT3-Aktivität besitzen und dass die relative AKT3-Aktivität in den LC-M1-Zellen wesentlich höher ist als die relative Aktivität der AKT-Isoformen 1 und 2.

Die Expressionsmengen der AKT-Isoformen wurden mit einem pan AKT Antikörper nachgewiesen. Da dieser Antikörper für alle AKT-Isoformen die gleiche Affinität besitzt

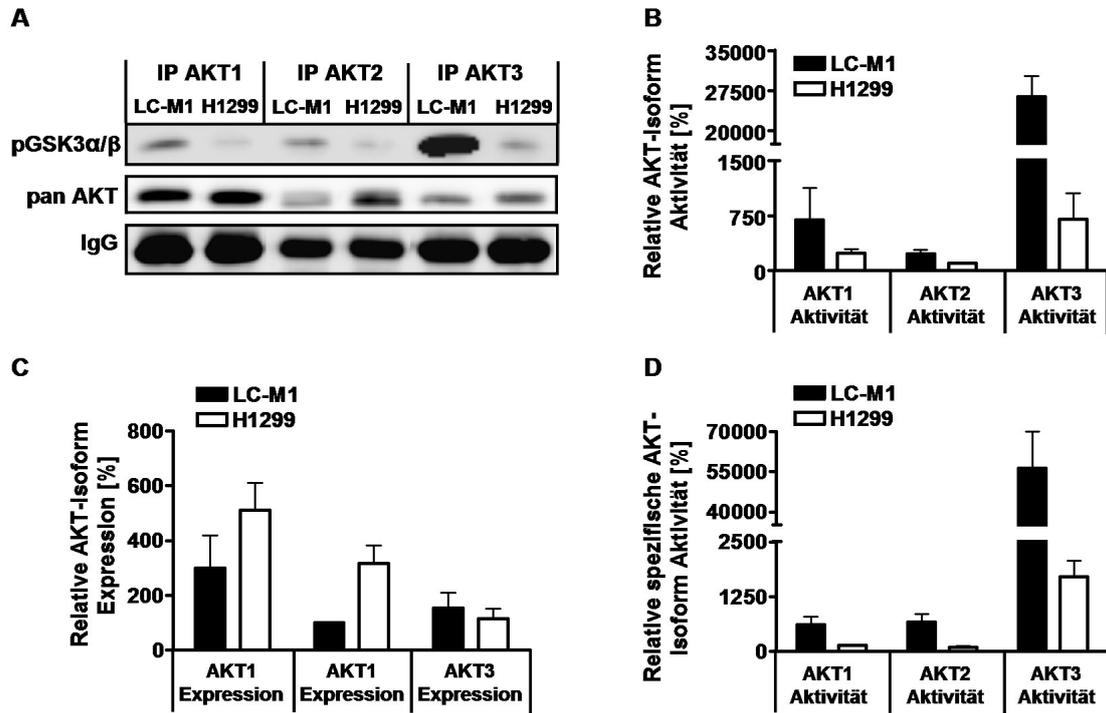


Abbildung 3.20: Aktivitäten der AKT-Isoformen in LC-M1 und H1299-Zellen. **A.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3α/β und ATP an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3α/β) im Western-Blot-Verfahren analysiert. Die Menge an präzipitierter AKT-Isoform wurde zusätzlich mit einem pan-AKT-Antikörper bestimmt. **B.** Die relative *in vitro* Kinaseaktivität, sowie **C.** die relative Expression der AKT-Isoformen, wurde nach Abgleich auf die IgG Mengen ermittelt. **D.** Die relative spezifische *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen entspricht der Enzymaktivität/Menge Enzym. Gezeigt sind für B-D die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten +/- SD.

und die AKT-Isoformen vollständig in den Proben präzipitiert wurden, kann die Expressionsmenge der AKT-Isoformen direkt miteinander verglichen werden (Abb. 3.20 C). Es zeigte sich, dass die LC-M1-Zellen im Vergleich zu den H1299-Zellen eine geringere Expression der AKT-Isoformen 1 und 2 besitzen, während die AKT3-Expression in den LC-M1 und H1299-Zellen ähnlich war. Es zeigte sich, dass die Isoform AKT1 gegenüber den AKT-Isoformen 2 und 3, sowohl in den LC-M1 als auch den H1299-Zellen am stärksten exprimiert war. Die Isoform AKT2 wird in den LC-M1-Zellen ähnlich stark exprimiert wie die AKT-Isoform 3. In den H1299-Zellen zeigte sich hingegen, dass die AKT-Isoform 2 stärker exprimiert wurde als die Isoform AKT3 (Faktor 3). Interessanter-

weise ergibt sich daraus, dass die AKT-Isoform 3 unabhängig von der Proteinmenge in den LC-M1-Zellen, eine wesentlich höhere relative Aktivität besitzt als die H1299-Zellen. Daraus ergibt sich, dass die relative spezifische Aktivität der AKT-Isoform 3 (relative Aktivität/relative Enzymmenge) in den LC-M1 sowie den H1299-Zellen gegenüber der AKT1- und AKT2-Aktivität stark erhöht ist (Abb. 3.20 D). Die LC-M1-Zellen zeigten eine um den Faktor 91 gesteigerte relative spezifische AKT3-Aktivität, im Vergleich zur relativen spezifischen AKT1-Aktivität. Die relative spezifische AKT3-Aktivität der H1299-Zellen war hingegen nur um den Faktor 12 höher als die relative spezifische AKT1-Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die AKT-Isoform 3, trotz schwacher Expression, in der DTC-Zelllinie LC-M1 besonders stark aktiviert ist und damit eine wesentlich höhere relative spezifische Aktivität besitzt als die AKT-Isoformen 1 und 2. Aus diesem Grund könnte die AKT-Isoform 3 eine besondere funktionelle Bedeutung für DTC haben. Inwiefern die Aktivierung des AKT-Signalwegs in der DTC-Zelllinie LC-M1 wachstumsfaktorabhängig ist, wurde im folgenden untersucht.

### **3.2.3 Wachstumsfaktorabhängigkeit der Aktivierung des AKT-Signalwegs in LC-M1-Zellen**

Um die Wachstumsfaktorabhängigkeit der Aktivierung des AKT-Signalwegs in den LC-M1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 18 h unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert und mit normal kultivierten Zellen bezüglich ihrer pAKT-Expression im Western-Blot verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AKT-Signalwegs zu einem großen Teil wachstumsfaktorabhängig ist (Abb. 3.21). Durch Wachstumsfaktorentzug reduzierte sich die pAKT(S473) Menge auf 20%, die pAKT(T308) Menge auf 45% (Abb. 3.21 A). Hieraus ergibt sich, dass LC-M1-Zellen eine wachstumsfaktorabhängige Aktivierung von AKT besitzen, da sich das pAKT Signal nach 18 h Wachstumsfaktorentzug um über 50% reduzieren ließ. Trotzdem verbleibt auch unter 18h Wachstumsfaktorentzug eine gewisse Menge AKT phosphoryliert und damit aktiviert. Ob alle AKT-Isoformen unter Wachstumsfaktorentzug in ihrer Aktivität reduziert werden bzw. welche AKT-Isoform unter Wachstumsfaktorentzug am stärksten aktiviert bleibt und somit stärker konstitutiv aktiviert ist, wurde mit Hilfe des AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays bestimmt. Hierfür wurden LC-M1 und H1299-Zellen 18h unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert und mit normal kultivierten Zellen bezüglich ihrer AKT-Isoform Aktivität verglichen.

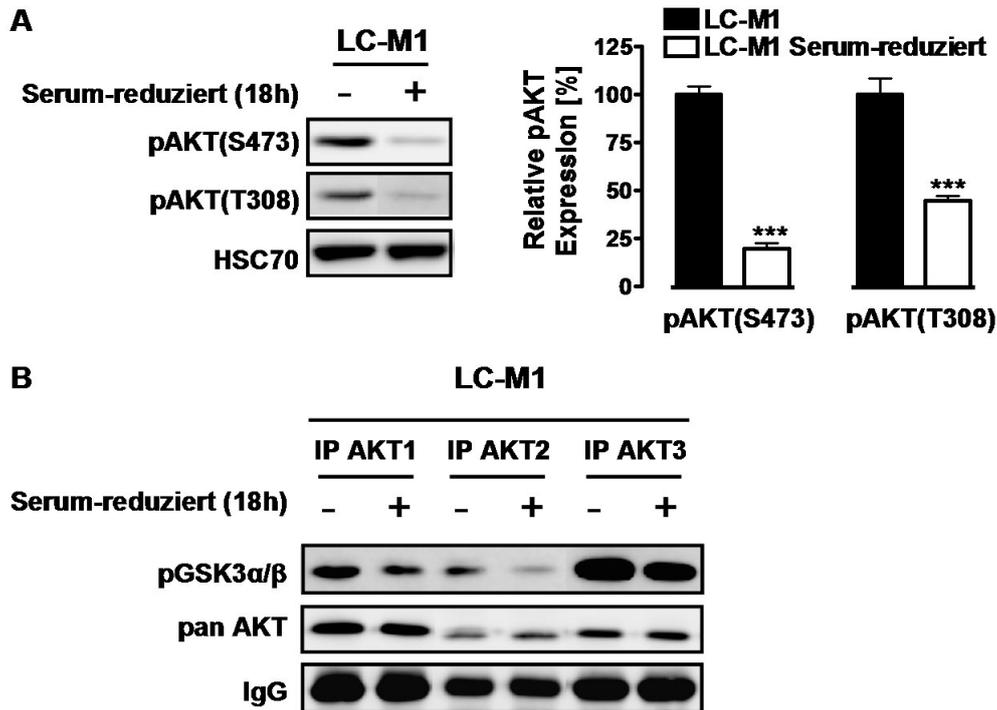


Abbildung 3.21: Aktivierung des AKT-Signalwegs und Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Wachstumsfaktorentzug (18 h) in LC-M1-Zellen. **A.** Western-Blot-Analyse der pAKT-Expression und quantitative Auswertung der Western-Blot Ergebnisse (n=3, +/- SD). Die Signifikanzen (\*\*\*, p<0,001) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt. **B.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3 $\alpha/\beta$  und ATP an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) im Western-Blot-Verfahren analysiert. Die Menge an präzipitierter AKT-Isoform wurde zusätzlich mit einem pan-AKT-Antikörper bestimmt.

Nach Wachstumsfaktorentzug zeigte sich, dass die Aktivität aller AKT-Isoformen in den LC-M1-Zellen reduziert wurde (Abb. 3.21 C). Die relative AKT3-Aktivität lag unter Serum-reduzierten Bedingungen immer noch weit über der relativen AKT1-Aktivität unter normalen Kulturbedingungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass AKT3 unter Wachstumsfaktorentzug am stärksten aktiviert bleibt (Abb. 3.21 D).

### 3.2.4 Proliferation und Apoptose der LC-M1-Zellen unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition der PI3K

Inwiefern sich die Reduktion der Aktivität von AKT nach Wachstumsfaktorentzug auf die Proliferation und die Apoptose der LC-M1-Zellen auswirkt, wurde an Hand der Proliferations- und Apoptoserate der LC-M1-Zellen nach Wachstumsfaktorentzug untersucht. Hierfür wurde die Proliferationsrate mit Hilfe eines kalorimetrischen BrdU-ELISA (siehe 2.2.17) und die Apoptoserate mit einem *Cell Death Detection ELISA* (siehe 2.2.18) gemessen.

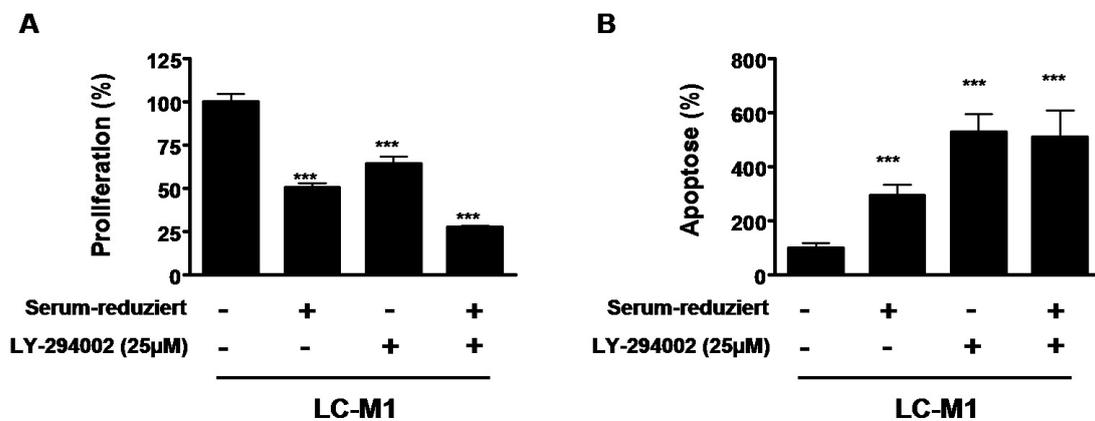


Abbildung 3.22: **Proliferation und Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug sowie unter Inhibition der PI3K in LC-M1-Zellen.** **A.** Die Proliferation der LC-M1-Zellen wurde nach Wachstumsfaktorentzug und/ oder Inhibition der PI3K (LY-294002) nach 48 h mit einem BrdU-ELISA bestimmt, n=6 +/- SD. **B.** Die Apoptose der LC-M1-Zellen wurde nach Wachstumsfaktorentzug und/ oder Inhibition der PI3K (LY-294002) nach 48 h mit einem Apoptose-ELISA vermessen, n=5 +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*\*) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Aus der Abbildung 3.22 A geht hervor, dass die Proliferation nach 72 h Wachstumsfaktorentzug um 50% inhibiert wurde. Die Apoptose stieg nach 48 h Wachstumsfaktorentzug auf 290% an (Abb. 3.22 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass Proliferation und Apoptose in den LC-M1-Zellen Wachstumsfaktorabhängig reguliert werden können. Ob Proliferation und Apoptose in den LC-M1-Zellen über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert werden können, wurde mit Hilfe eines PI3K Inhibitors LY-294002 untersucht. Hierfür wurden die Zellen 48 h mit 0,025 mM LY-294002 inkubiert und anschließend die Proliferation und die Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen analysiert. Es

zeigte sich eine Reduktion der Proliferation um 40% auf Grund der Inhibition der PI3K. Unter Wachstumsfaktorentzug führte die Inhibition der PI3K zur synergistischen Hemmung der Proliferation um 75% (Abb. 3.22 A). Die Apoptose stieg nach Inhibition der PI3K um über 500% an und konnte durch zusätzlichen Wachstumsfaktorentzug nicht weiter gesteigert werden (Abb. 3.22 B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Proliferation und Apoptose in der DTC-Zelllinie LC-M1 über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert werden können.

### 3.2.5 ShRNA-vermittelter *knockdown* der AKT-Isoformen in LC-M1-Zellen

Damit unterschiedliche Funktionen der AKT-Isoformen in den LC-M1-Zellen untersucht werden konnten, wurden die AKT-Isoformen spezifisch in den LC-M1-Zellen runter reguliert. Mittels lentiviraler AKT-Isoform-spezifischer shRNA-Vektoren wurden stabile AKT1, AKT2 oder AKT3 *knockdown* Zelllinien generiert (siehe 2.2.4).

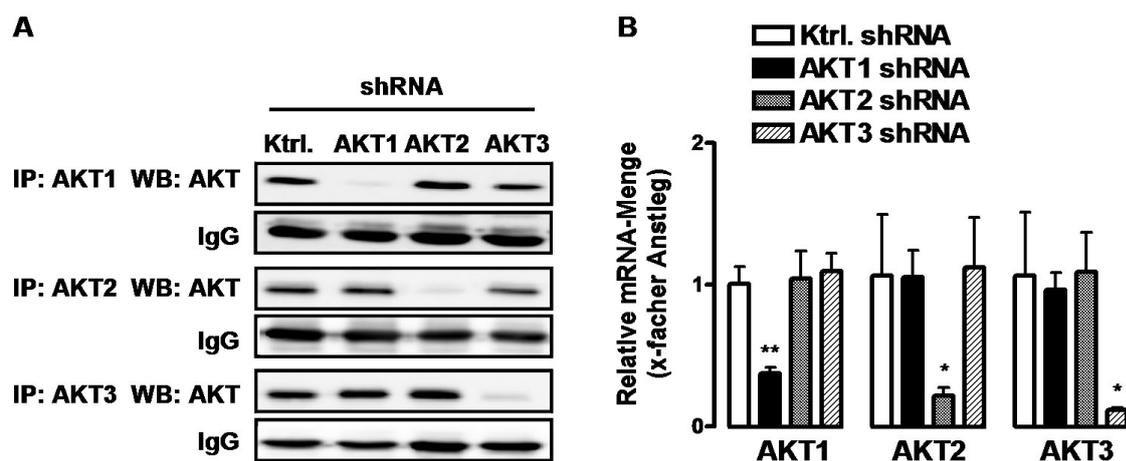


Abbildung 3.23: Hemmung der Expression der AKT-Isoformen mittels AKT-Isoform-spezifischer lentiviraler shRNA-Vektoren in LC-M1-Zellen. **A.** Nach lentiviraler Transduktion mit AKT-Isoform-spezifischen shRNA-Vektoren und anschließender Selektion mit Puromycin wurden Proteinlysate der LC-M1-Zellen hergestellt. Die AKT-Isoformen wurden mit AKT-Isoform-spezifischen Antikörpern präzipitiert und im Western-Blot-Verfahren mit pan-AKT-Antikörpern nachgewiesen. **B.** Die relative mRNA-Menge der AKT-Isoformen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* wurde mit Hilfe der qPCR bestimmt. Die Signifikanzen (\*,  $p < 0,05$  und \*\*,  $p < 0,01$ ) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

In der Abbildung 3.23 A ist die Proteinexpression der AKT-Isoformen in den LC-M1 *knockdown* Zelllinien gezeigt. Aus dem Mittelwert von drei unabhängigen Proben er-

gab sich für die einzelnen AKT-Isoformen eine *knockdown* Effizienz von 78% (\*\*,  $p < 0,01$ ) für AKT1, 89% für AKT2 (\*\*\*,  $p < 0,001$ ) und 72% (\*\*,  $p < 0,01$ ) für AKT3 im Vergleich zu den mit einer *scrambled* shRNA transduzierten Kontrolle (Ktlr.). Die Signifikanzen wurden mit einem Student's t-Test ermittelt. Weiterführend wurde die Expression der mRNA-Mengen der AKT-Isoformen mittels qPCR (siehe 2.2.10) analysiert. Auf der Ebene der mRNA zeigte sich ebenfalls eine spezifische signifikante Hemmung der entsprechenden AKT-Isoform (Abb. 3.23 B). Hieraus ergibt sich, dass LC-M1 Zelllinien etabliert wurden, welche entweder AKT1, AKT2 oder AKT3 spezifisch auf mRNA- und Proteinebene runter reguliert haben.

### 3.2.6 Proliferation der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Die AKT-Isoform-spezifischen *knockdown*-Zellen konnten zur Untersuchung der Funktionen der AKT-Isoformen in LC-M1-Zellen verwendet werden. Im folgenden wurden die Effekte des Verlustes einer AKT-Isoform auf die Proliferation der Zellen analysiert. Zur Messung der Proliferation wurde die DNA-Syntheserate der Zellen unter Serum-reduzierten Bedingungen bestimmt. Hierfür wurde den Zellen für 16 h das Basenanaloga Bromdesoxyuridin (BrdU) angeboten, welches anschließend mit Allophycocyanin (APC) fluoreszierend markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie vermessen wurde (siehe 2.2.17). Je mehr APC positive Zellen detektiert wurden, desto mehr Zellen haben das BrdU während der S-Phase des Zellzyklusses in die DNA eingebaut und befanden sich somit in der proliferativen Phase. Es zeigte sich, dass die Kontrollzellen etwa 50% APC positive Zellen aufwiesen. Das heißt, es befanden sich etwa die Hälfte der Zellen in der proliferativen Phase. In den AKT1 *knockdown*-Zellen hingegen zeigten sich nur noch 40% APC positive, proliferierende Zellen. Daraus ergibt sich eine Inhibition der Proliferation um 10% auf Grund des Verlusts von AKT1 (Abb. 3.24 A).

Kein signifikanter Effekt auf die Proliferation ergab sich durch reduzierte AKT2 Expression und Aktivität. Der Verlust von AKT3 wiederum führte zu einer Inhibition der Proliferation um 30% (Abb. 3.24 A). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass die AKT-Isoform 3 in den LC-M1 Zellen die Proliferation dominant reguliert, während die AKT-Isoform 1 einen geringeren Effekt und die Isoform AKT2 keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation zeigte. Weiterführend wurden die Cyclin D1- und D3-Expresionsmengen untersucht. Cyclin D1 und D3 sind Cycline, deren Anwesenheit für

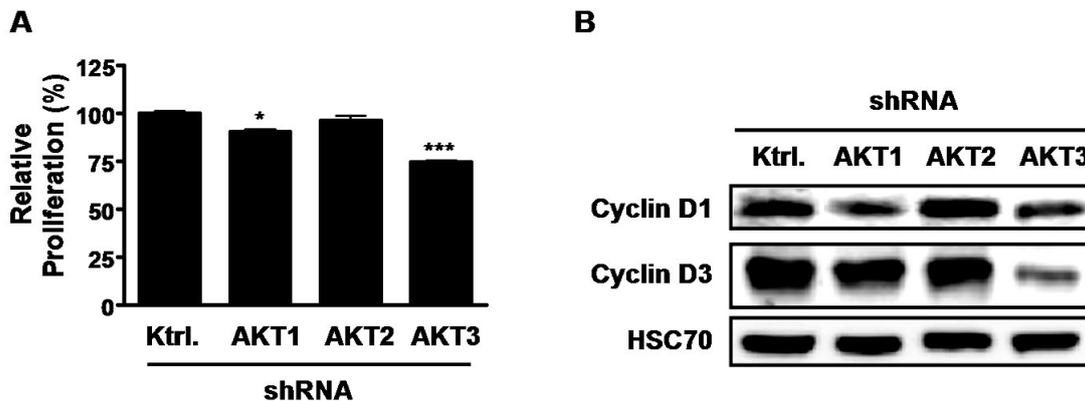


Abbildung 3.24: **Proliferation und Expression der Cycline D1 und D3 in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*.** **A.** Die Proliferation der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* wurde mit einem BrdU-APC Proliferationsassay im FACS analysiert, gezeigt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Versuchen mit  $n=3$ ,  $\pm$  SD. Die Signifikanzen (\*,  $p<0,05$  und \*\*\*,  $p<0,001$ ) wurden mit einem student's t-Test ermittelt. **B.** Western-Blot-Analyse der AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-Zellen mit Cyclin D1 und D3 spezifischen Antikörpern.

den erfolgreichen Verlauf der  $G_1/S$ -Phase entscheidend ist. Es zeigte sich eine reduzierte Cyclin D1-Expressionsmenge sowohl in den AKT1- als auch den AKT3-*knockdown*-Zellen. Die Cyclin D3-Menge war hingegen nur in den AKT3-*knockdown*-Zellen reduziert (Abb. 3.24 B).

### 3.2.7 Apoptose der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Die Apoptose der Zellen wurde an Hand der Menge an apoptotischen Zellen unter Serum reduzierten Bedingungen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen 18 h unter Serum reduzierten Bedingungen kultiviert, anschließend gerntet und mit AnnexinV - Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiert. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin, welches in der frühen Phase der Apoptose, an der Zelloberfläche auf der Membran exprimiert wird. Folgend wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) gefärbt, welches in Zellen mit einer geschädigten Plasmamembran eindringt und somit tote Zellen markiert. Zellen, die sowohl AnnexinV-FITC als auch PI-positiv sind, befinden sich in der späten Apoptosephase. Es wurde die Anzahl FITC-positiver und FITC/PI-doppelt-positiver Zellen im Durchflusszytometer gemessen und zusammen als apoptotische Zellen gezählt (Abb. 2.2.18).

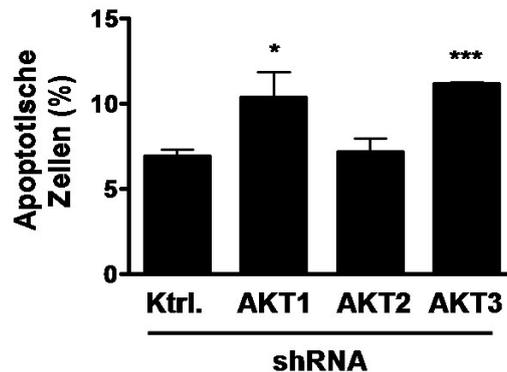


Abbildung 3.25: **Apoptose der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown***. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde nach AnnexinV-FITC- und PI-Färbung im FACS bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Versuchen mit  $n=3$ , +/- SD. Die Signifikanzen (\*,  $p<0,05$  und \*\*\*,  $p<0,001$ ) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Die Kontrollzellen wiesen 9,2% apoptotische Zellen auf. Der Verlust von AKT1 steigerte die Zahl apoptotischer Zellen um 4,3% auf 13,5%. Der AKT2 Verlust führte zu keinem signifikanten Effekt auf die Anzahl apoptotischer Zellen. Der Verlust von AKT3 führte, wie der Verlust von AKT1, zu einer Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen auf 12,7% (Abb. 3.25). Daraus ergibt sich, dass der Verlust von AKT1 oder AKT3 zu einer Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen in den LC-M1-Zellen führte.

### 3.2.8 Migration der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Die Migration der Zellen wurde im Transwellassay bestimmt. Die Zellen wurden über Nacht im Transwell inkubiert, anschließend wurden die Zellkerne der migrierten Zellen DAPI gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Abb. 2.2.19).

Hierbei ergab sich, dass die AKT-Isoform 2 die Migration am stärksten beeinflusst. Der Verlust der AKT2 Expression führte zu einer Reduktion der Migration um 67%. Auch die AKT-Isoformen 1 und 3 beeinflussen die Migration (29% AKT1 und 41% AKT3). Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass Veränderungen der Proliferation und Apoptose in den *knockdown*-Zellen, welche sich aus den Abbildungen 3.24 und 3.25 ergeben, den Transwellassay beeinflussen könnten. Allerdings zeigte der nicht quantitative Gelatinematrixassay nach 48h Wachstum ein reduziertes Potential, sich in der

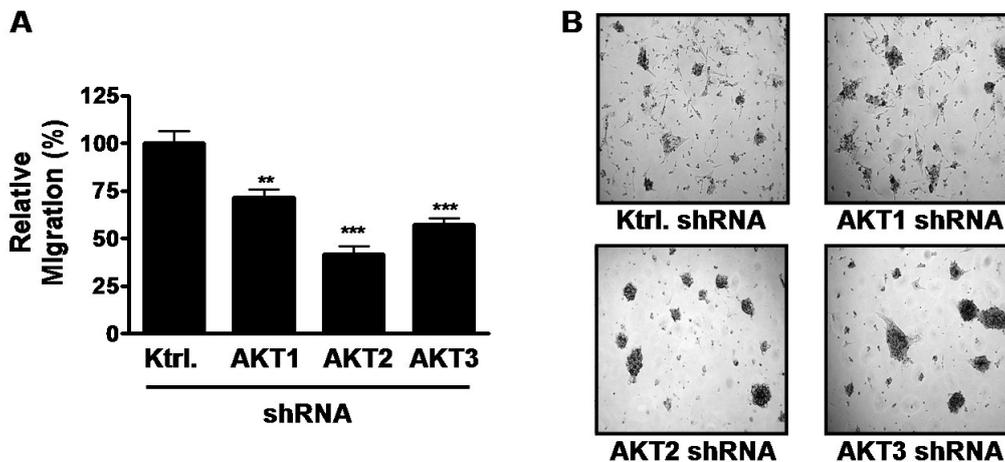


Abbildung 3.26: Migration und Wachstum in Gelatinematrix der LC-M1-Zellen nach **AKT-Isoform-spezifischem knockdown** **A.** Die Migration der LC-M1-Zellen wurde in einem Transwellassay analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit je  $n=3$ , +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*,  $p<0,01$  und \*\*\*,  $p<0,001$ ) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt. **B.** Wachstum der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* in Gelatinematrix nach 48 h.

Gelatine zu vereinzeln, auch in den AKT1 und AKT3 *knockdown*-Zellen (Abb. 3.26 B). Der deutlichste Effekt zeigte sich allerdings auch in diesem Assay bei Verlust von AKT2. Daraus ergibt sich, dass AKT2 in jedem Fall die Migration der LC-M1-Zellen stark fördert und dass die AKT-Isoformen 1 und 3 wahrscheinlich einen geringeren Effekt auf das migrative Potential der LC-M1-Zellen besitzen.

### 3.2.9 Expression der u-PAR und u-PA mRNA-Menge in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*

Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) und sein Rezeptor (u-PAR) an der Regulation von Proliferation, Apoptose und Migration in verschiedenen Tumorzellen beteiligt sind [Allgayer, 2010]. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass u-PAR eine zentrale Schaltfunktion zwischen dem Ruhezustand der Tumorzelle (*tumor cell dormancy*) und der Reaktivierung besitzt [Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Menge von u-PAR und in einem geringeren Maße von u-PA in den LC-M1-Zellen nach AKT1 und AKT3 spezifischem *knockdown* reduziert war (Abb. 3.27).

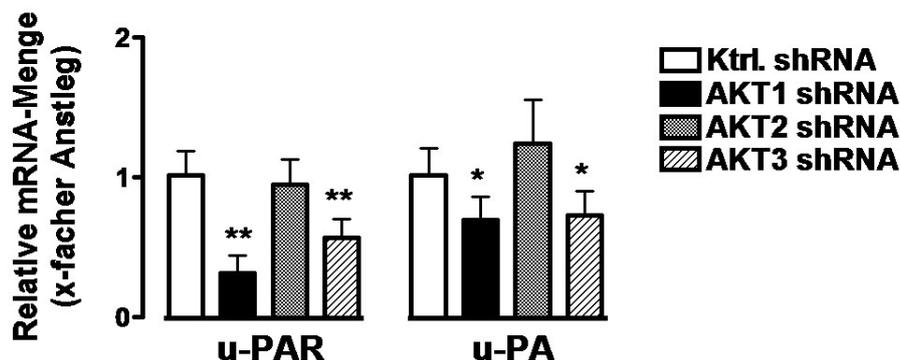


Abbildung 3.27: Relative mRNA-Menge von u-PAR und u-PA in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown*. Die u-PAR und u-PA mRNA-Menge wurde mit Hilfe der qPCR ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit einem n=6, +/- SD. Die Signifikanzen wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

### 3.2.10 Expression von EGFR, ErbB2, ErbB3 und dem Östrogenrezeptor $\alpha$ in DTC-Zelllinien

Die AKT-Isoformen werden durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen, über die Aktivierung der PI3K, aktiviert, d.h. an Serin473 und Threonin308 (AKT1) phosphoryliert. Es stellt sich die Frage über welche Rezeptoren der AKT-Signalweg in den DTC Zellen aktiviert wird. Die Familienmitglieder der ErbB-Rezeptoren (ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 und ErbB4), welche essentielle Funktionen bei der Regulation von Entwicklungsprozessen und der Gewebe-Homöostase besitzen, können neben dem Ras/MAPK Signalweg vor allem den PI3K/AKT-Signalweg anschalten [Olayioye et al., 2000]. Mutationen oder Genamplifikationen wurden in allen *ErbB* Genen bei Krebspatienten mit verschiedenen Tumorentitäten gefunden [Wieduwilt and Moasser, 2008]. Im folgenden wurde die Expression der ErbB1-3-Rezeptoren in den DTC-Zelllinien im Vergleich zu anderen Krebszelllinien untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die DTC-Zelllinien im Vergleich zu anderen Krebszelllinien weder den EGFR noch den ErbB3 Rezeptor in nachweisbaren Mengen exprimieren (Abb. 3.28 A). Geringe Mengen von ErbB2 lassen sich im Vergleich detektieren. Darüber hinaus wurde der Steroidhormonrezeptor, Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), für den 60% aller humanen Mammakarzinome positiv sind [Keen and Davidson, 2003], analysiert. Nur die ER-positive Zelllinie MCF-7, nicht aber die DTC-Zelllinie BC-M1, zeigte eine ER $\alpha$  Expression. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass keiner der hier untersuchten

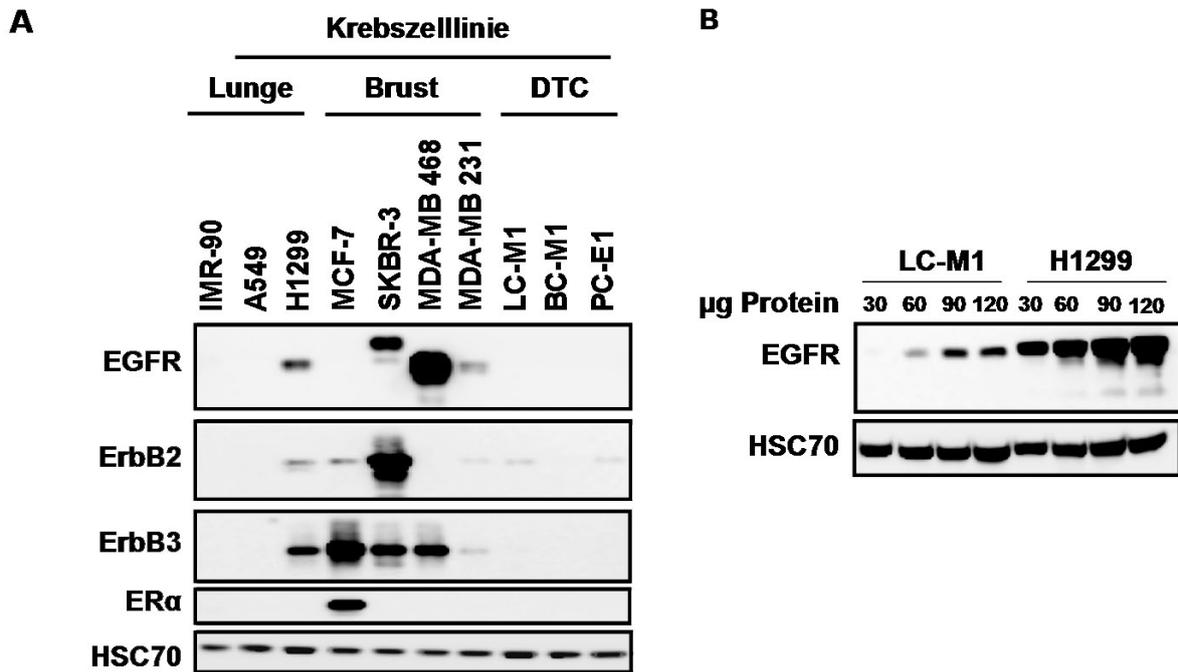


Abbildung 3.28: **Expression von ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ER $\alpha$  in DTC-Zelllinien.** A) Western-Blot-Analyse mit ErbB1-, ErbB2-, ErbB3- und ER $\alpha$ -spezifischen Antikörpern. Es wurden die DTC Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1, im Vergleich zu verschiedenen Karzinomzelllinien untersucht. **B.** Western-Blot-Analyse mit EGFR-spezifischem Antikörper, bei steigenden Proteinkonzentrationen, in LC-M1 und H1299-Zellen.

Rezeptoren in den DTC-Zelllinien überexprimiert wird. Dennoch lässt sich der EGFR in den LC-M1-Zellen eindeutig nachweisen (Abb. 3.28 B). Im Vergleich zu den H1299-Zellen exprimieren die LC-M1-Zellen wesentlich geringere Mengen des EGFR. Inwiefern diese Menge an EGFR ausreichend ist, um ligandeninduziert über EGF den AKT-Signalweg in LC-M1-Zellen effizient anzuschalten, wurde im Weiteren analysiert.

### 3.2.11 Stimulation von LC-M1- und H1299-Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)

Um die Aktivierung des AKT-Signalwegs durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) über den EGFR in den LC-M1-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach 18 h Wachstumsfaktorentzug und 10 minütiger Stimulation mit 50 ng/ml EGF lysiert und im Western-Blot-Verfahren analysiert.

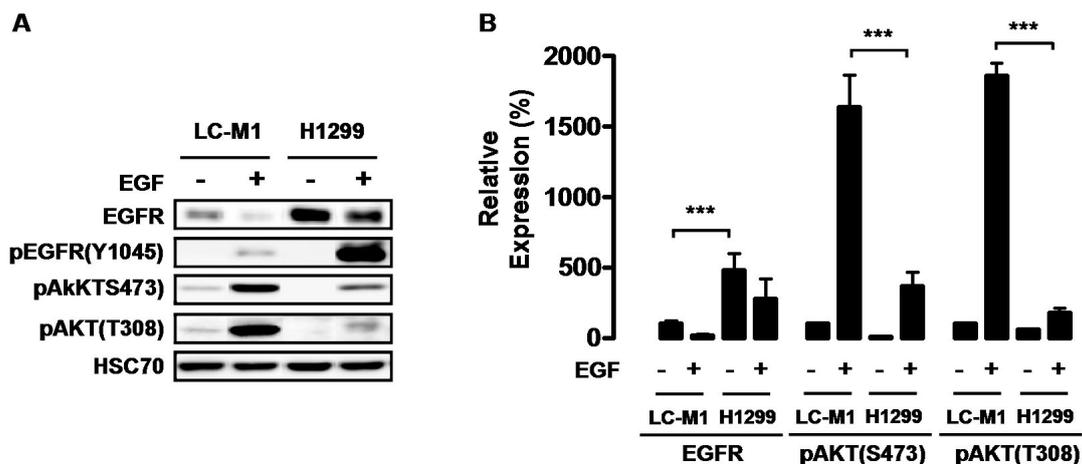


Abbildung 3.29: Aktivierung von AKT nach Stimulation mit EGF in LC-M1 und H1299-Zellen. **A.** Western-Blot-Analyse mit EGFR-, pEGFR(Y1045-), pAKT(S473-) und pAKT(T308)-spezifischen Antikörpern. **B.** Quantitative Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse für die Antikörper EGFR, pAKT(S473) und pAKT(T308); n=3, +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*\*)p<0,001) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Wie aus der Abbildung 3.30 zu entnehmen ist, reichen selbst vergleichsweise geringe Mengen des Rezeptors für eine effiziente Signalweiterleitung über den EGFR aus. Der AKT-Signalweg lässt sich in den LC-M1-Zellen mit EGF, über den EGFR, stark aktivieren. Die pAKT(S473) bzw. die pAKT(T308) Menge zeigte einen Anstieg auf 900 bzw. 1800% (Abb. 3.30). Auch die H1299-Zellen besitzen eine EGF-abhängige Aktivierung des AKT-Signalwegs. Hierbei wurde insbesondere die Phosphorylierung an dem AKT(S473)-Rest stimuliert, während die Phosphorylierung am AKT(T308)-Rest nur geringfügig zunahm.

Die LC-M1-Zellen zeigten auch in der Immunfluoreszenzfärbung (IF) nach Stimulation mit EGF einen Anstieg der pAKT(S473)-Menge (Abb. 3.30 C und D). Es wurde beschrieben, dass die EGFR-Signalweiterleitung für das Überleben von disseminierten

Tumorzellen im Knochenmark sowie dem Aufwachen von schlafenden Tumorzellen im Knochenmark eine Rolle spielen kann [Allgayer, 2010]. Die Bedeutung der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs nach Stimulation mit EGF wurde im folgenden untersucht.

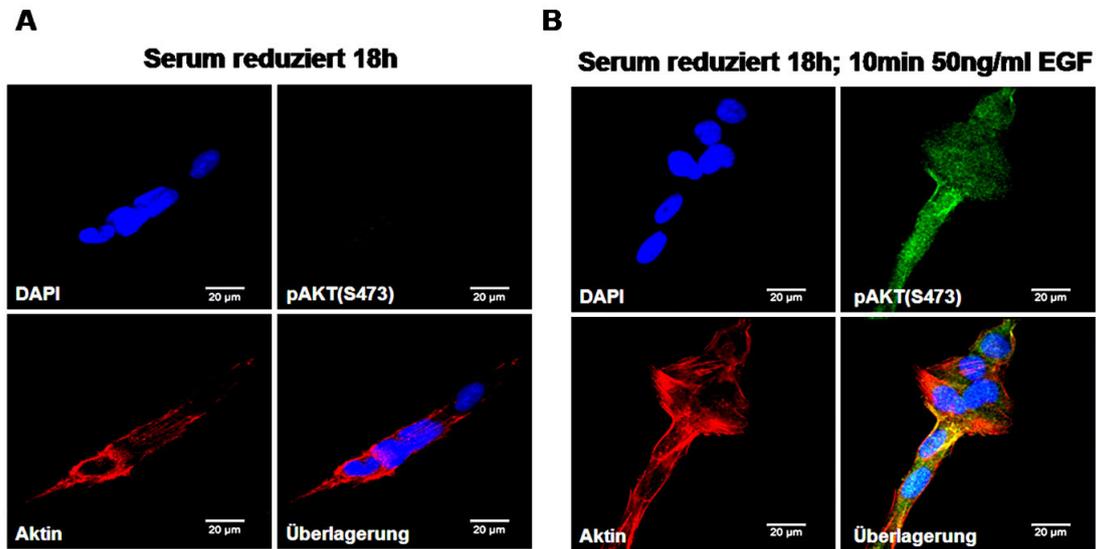


Abbildung 3.30: **Expression von pAKT(S473) nach Stimulation mit EGF.** Immunfluoreszenzfärbung von pAKT(S473) (grün) und Aktin (rot) vor **A.** und nach **B.** Stimulation mit EGF in LC-M1-Zellen.

### 3.2.12 Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Stimulation mit EGF in LC-M1- und H1299-Zellen

Um die Aktivität der AKT-Isoformen nach EGF-Stimulation zu untersuchen, wurde die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen nach EGF-Stimulation vermessen. Hierfür wurden LC-M1- und H1299-Zellen 18 h unter Wachstumsfaktorentzug kultiviert und folgend 10 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert. Es wurden Proteinlysate hergestellt und die Kinaseaktivität jeder AKT-Isoform im Vergleich zu unstimulierten Zellen betrachtet.

Aus der Abbildung 3.31 geht hervor, dass die Aktivität aller AKT-Isoformen nach EGF-Stimulation in den LC-M1- und H1299-Zellen gesteigert werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass durch EGF-Stimulation die Aktivität der AKT-Isoform 3 am stärksten bleibt. Der relative Anstieg der AKT3-Aktivität der H1299-Zellen beträgt 75-fach. Die LC-M1-Zellen, welche auch unter Serum reduzierten Bedingungen, eine über 35-fach stärkere AKT3-Aktivität als die H1299-Zellen besitzen, zeigten eine Steigerung der AKT3

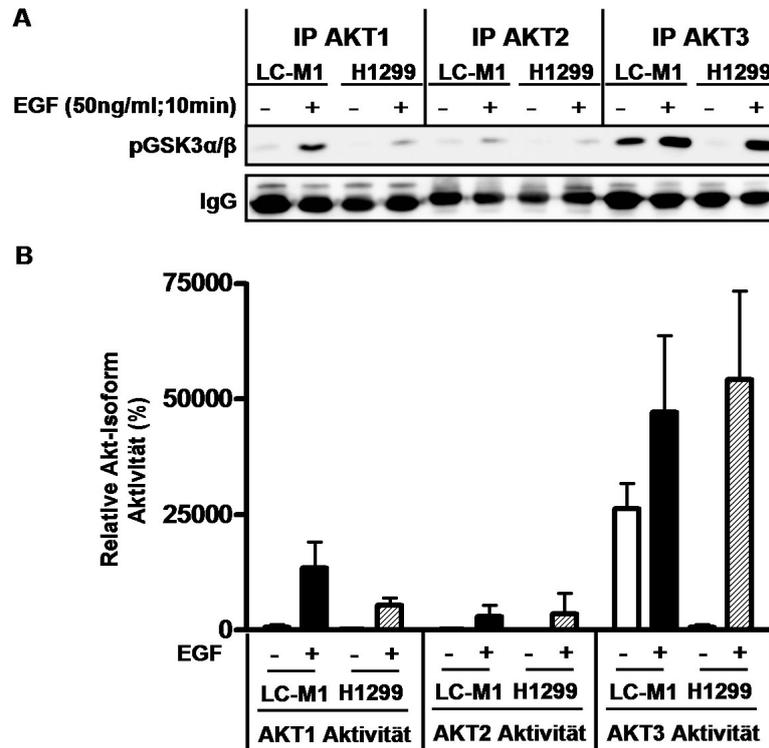


Abbildung 3.31: Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Stimulation mit EGF in LC-M1- und H1299-Zellen. **A.** Die *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen wurde nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Inkubation mit dem AKT-Substrat GSK3 $\alpha/\beta$  und ATP im Western-Blot-Verfahren an Hand der Menge von phosphoryliertem Substrat (pGSK3 $\alpha/\beta$ ) analysiert. **B.** Die relative *in vitro* Kinaseaktivität der AKT-Isoformen nach EGF-Stimulation wurde nach Abgleich auf die IgG-Mengen ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, +/- SD.

Aktivität um den Faktor 2. Nach EGF-Stimulation ist AKT3 in den LC-M1 und den H1299-Zellen etwa gleich stark aktiviert. Die AKT-Isoform 1 wurde in den LC-M1-Zellen nach EGF-Stimulation am stärksten, um den Faktor 25, gesteigert. Die H1299-Zellen zeigten einen 20-fachen Anstieg der AKT1 Aktivität verglichen zu den unstimulierten H1299-Zellen. Einen Anstieg der AKT2 Aktivität um den Faktor 10 lässt sich sowohl in den LC-M1 als auch den H1299-Zellen nachweisen. Diese Ergebnisse zeigen, dass nach EGF-Stimulation die AKT-Isoform 3 in den LC-M1-Zellen und den H1299-Zellen am höchsten ist. Denkmöglich wäre, dass die Aktivierung von AKT3 nach EGF-Stimulation eine entscheidende Bedeutung für die Regulation von Proliferation und Apoptose übernimmt.

### 3.2.13 Proliferation und Apoptose der AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen nach EGF-Stimulation

Für die Proliferation und das Überleben von DTC im Knochenmark könnten eine Reihe von Signalen entscheidend sein. Es konnte gezeigt werden, dass die EGFR-Signalkaskade die Pathogenese von Knochenmetastasen beeinflussen kann. Durch die Inhibition des EGFR mittels Gefitinib konnte das Tumorwachstum von Knochenmetastasen in Brustkrebspatientinnen reduziert werden [von Minckwitz et al., 2005]. Es wurde im folgenden die Proliferation sowie die Apoptose von LC-M1-Zellen nach EGF-Stimulation ermittelt.

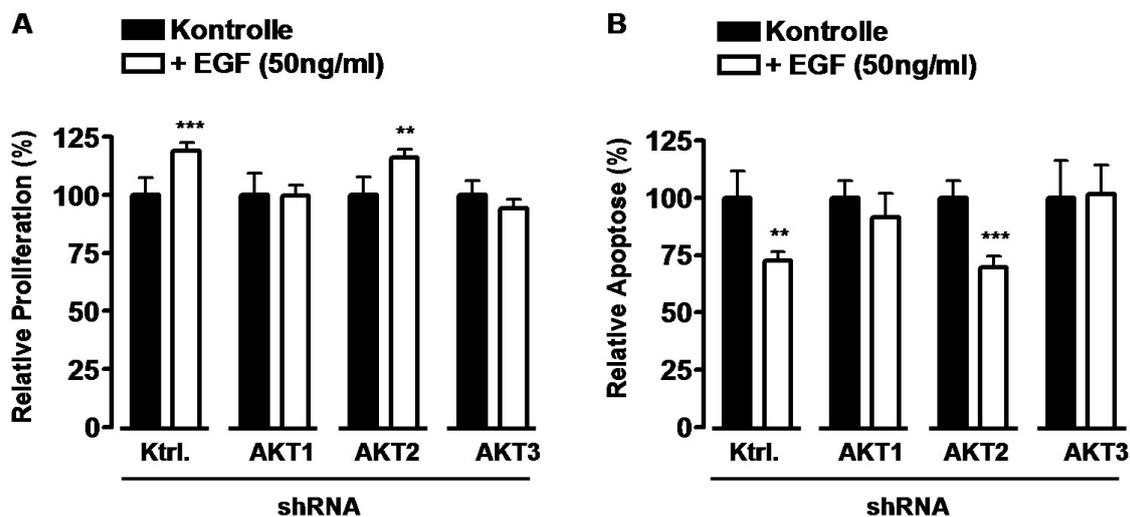


Abbildung 3.32: Proliferation und Apoptose nach Stimulation mit EGF in AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen. **A.** Die Proliferation der LC-M1-Zellen wurde mit einem BrdU-ELISA nach 72 h ohne oder mit EGF (50 ng/ml) bestimmt, n=6 +/- SD. **B.** Die Apoptose der LC-M1-Zellen wurde mit einem Apoptose-ELISA nach 48 h ohne oder mit EGF (50 ng/ml) vermessen, n=5 +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*, p<0,01 und \*\*\*, p<0,001) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

Nach Stimulation der LC-M1-Zellen mit EGF für 72 h wurde mit Hilfe eines kalorimetrischen BrdU-ELISA die DNA-Syntheserate gemessen (siehe 2.2.17). Hierbei ergab sich ein Anstieg der Proliferation von 18% (Abb. 3.32 A). Das bedeutet, dass EGF alleine die Proliferation der LC-M1-Zellen steigern kann. Darüber hinaus zeigte sich, dass EGF nach 48 h die Apoptoserate in LC-M1-Zellen signifikant reduzieren kann. Die Apoptose wurde um 28% reduziert (Abb. 3.32 B). Hierdurch wurde gezeigt, dass die Apoptoserate der LC-M1-Zellen EGF-abhängig reduziert werden kann. Diese Ergebnisse lassen

darauf schließen, dass LC-M1-Zellen über den EGF-Signalweg proliferative sowie anti-apoptotische-Signale erhalten können.

Um festzustellen, ob die gezeigten EGF-abhängigen Effekte auf die Proliferation und die Apoptose über AKT-Isoformen reguliert werden, wurden Proliferation und Apoptose nach EGF-Stimulation in den AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die Proliferation nach EGF-Stimulation in den AKT1- und AKT3-*knockdown*-Zellen nicht mehr induziert werden kann (Abb. 3.32 A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die EGF-induzierte Proliferation in den LC-M1-Zellen sowohl AKT1- als auch AKT3-abhängig ist. Die Apoptoserate reduzierte sich nach dem Verlust von AKT1 nicht mehr signifikant. Auf Grund des Verlusts von AKT3 kam es zu keiner Abnahme der Apoptose nach EGF-Stimulation mehr (Abb. 3.32 B). Hieraus ergibt sich, dass die EGF-abhängige Reduktion der Apoptose in den LC-M1-Zellen ebenfalls AKT1- und AKT3-vermittelt ist.

#### **3.2.14 Expression der u-PAR mRNA-Menge nach EGF-Stimulation in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown***

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das u-PA/u-PAR System Proliferation, Überleben, Migration und Invasion verschiedener Tumorzellen beeinflussen kann. Der u-PAR kann bei einigen soliden Tumorarten einen unabhängigen Prognosemarker darstellen, dabei korreliert die Expression von u-PAR mit einer schlechten Prognose [Jacobsen and Ploug, 2008; Allgayer et al., 1997]. Darüber hinaus ist die Expression von u-PAR auf DTC mit einem gesteigerten proliferativen Potential der DTC von Patienten mit Magenkrebs assoziiert [Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008]. Weiterführend konnten Hinweise dafür gesammelt werden, dass ein minimaler Komplex aus u-PAR/Fibronectin/FAK und EGFR über Proliferation und Tumorzellschlaf (*tumor cell dormancy*) von DTC im KM entscheiden kann [Almog, 2010]. Es konnte gezeigt werden, dass über EGF die Expression von u-PAR induziert werden kann [Baek et al., 2008]. Zunächst wurde überprüft, ob dies in den LC-M1-Zellen möglich ist.

Aus der Abbildung 3.33 geht hervor, dass die mRNA-Menge von u-PAR nach 2 h Stimulation mit EGF in den LC-M1 Ktrl.-Zellen anstieg. Da u-PAR ein Bestandteil des minimalen Komplexes für die Induktion des Wechsels zwischen Tumorzellschlaf und Proliferation der DTC darstellt, könnte die Verfügbarkeit von u-PAR für die Proliferation von DTC entscheidend sein. Ob der EGF induzierte Anstieg der u-PAR mRNA-Menge

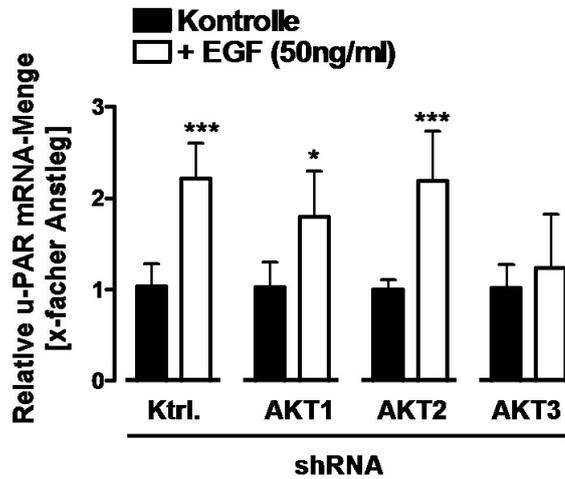


Abbildung 3.33: **Relative u-PAR mRNA-Menge nach Stimulation mit EGF in AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen.** Die relative u-PAR mRNA-Menge nach EGF-Stimulation in AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen wurde mit Hilfe der qPCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=5, +/- SD. Die Signifikanzen (\*\*\*, p<0,001 und \*, p<0,05) wurden mit einem Student's t-Test ermittelt.

abhängig vom AKT-Signalweg ist und welche AKT-Isoformen hierbei möglicherweise beteiligt sind, wurde an Hand der AKT-Isoform-spezifischen LC-M1-*knockdown*-Zellen untersucht. Es wurde die u-PAR mRNA-Menge nach EGF-Stimulation mit der qPCR ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulation der AKT1-*knockdown*-Zellen mit EGF weniger stark anstieg, während die AKT3-*knockdown*-Zellen keinen signifikanten Anstieg der u-PAR mRNA-Menge zeigten (Abb. 3.33). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die u-PAR mRNA-Menge in der DTC-Zelllinie LC-M1 EGF-abhängig über AKT1 und vor allem AKT3, nicht aber über AKT2, induziert werden kann.

## Kapitel 4

### Diskussion

#### 4.1 Funktionen von AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom

Eine Überexpression des ErbB2-Rezeptors findet man in 15-20% der humanen Mammakarzinome, was mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist [Liu et al., 1992; Slamon et al., 1987, 1989]. Mehr als 70% der Patientinnen mit einem sogenannten ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom sprechen schlecht auf eine Therapie an und versterben oft an den Folgen von Metastasen [Dowsett, 2001; Morrow et al., 2009]. Die Heterodimerisierung von ErbB2 und ErbB3 führt zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs [Prigent and Gullick, 1994; Soltoff et al., 1994; Olayioye et al., 2000] und wird für die Proliferation von ErbB2<sup>+</sup> Mammakarzinomzellen benötigt [Holbro et al., 2003]. Die Expression von pAKT(S473) korreliert mit einem schlechten klinischen Ausgang, sowie einer signifikant reduzierten 5-Jahres-Überlebensrate von ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom-Patientinnen [Wu et al., 2008]. Diese Ergebnisse zeigen, dass AKT eine bedeutende Funktion beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom besitzt.

Das Verständnis über die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von ErbB2 ist der Schlüssel zu einer erfolgreichen Therapie und der Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomen. An Hand des transgenen Mausmodells, Balb-neuT, welches eine aktivierte Form des Ratten-ErbB2 (neuT) unter der Kontrolle des MMTV-Promotors trägt [Muller et al., 1988], wurde die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs und die Funktion der AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom untersucht. Während die Funktionen der AKT-Isoformen 1 und 2 bereits vielseitig beim Mammakarzinom untersucht wurden, ist die Bedeutung und Funktion der AKT-Isoform 3 beim Mammakarzinom bislang weitge-

hend unerforscht [Dillon and Muller, 2010]. Auf Grund dessen wurde in dieser Arbeit insbesondere die Funktion von AKT3 beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom untersucht.

#### **4.1.1 ErbB2<sup>+</sup>-Balb-neuT-Tumore und davon etablierte Mammakarzinomzellen (C4-Zellen) besitzen eine starke AKT3-Aktivität**

Die Aktivierung des AKT-Signalwegs in Balb-neuT-Mammatumoren wurde an Hand der Phosphorylierung von AKT an den Aminosäureresten Serin473 und Threonin308 (pAKT(S473) und pAKT(T308)) bestimmt. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Mammatumoren von transgenen Balb-neuT-Mäusen eine starke Aktivierung des ErbB2/AKT-Signalwegs besitzen [Efferson et al., 2010]. Allerdings wurde erstmalig in Mammatumoren von Balb-neuT-Mäusen die enzymatischen Aktivitäten der drei AKT-Isoformen bestimmt und gezeigt, dass die AKT-Isoform 3 im Vergleich zu Wild-Typ (WT)-Balb/c-Mammagewebe besonders stark aktiviert ist. Während Maroulakou et al. im Vergleich zum WT-Balb/c-Mammagewebe keine Überexpression von AKT3 in Balb-neuT-Tumoren feststellen konnten, wobei zwei Tumore analysiert wurden [Maroulakou et al., 2007], konnte in dieser Arbeit in 10 Balb-neuT-Tumoren gezeigt werden, dass AKT3 im Vergleich zu WT-Balb/c-Mammagewebe unterschiedlich stark überexprimiert wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass Balb-neuT-Mammatumoren im Vergleich zu WT-Balb/c-Mammagewebe eine gesteigerte AKT3-Aktivität besitzen, die mit einer erhöhten AKT3 Expression einhergeht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AKT3 eine bedeutende, bislang unbekannte, Rolle beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom spielen könnte. Während die Gesamtaktivität von AKT, also die Aktivität aller AKT-Isoformen, gemessen an der pAKT(S473)- und pAKT(T308)-Menge beim Mammakarzinom bereits gut untersucht wurde [Wu et al., 2008], ist über die Aktivierung der einzelnen AKT-Isoformen kaum etwas bekannt. Ergebnisse an Mammakarzinomzelllinien haben gezeigt, dass ER $\alpha$ <sup>+</sup> MCF-7 Zellen nach Stimulation mit Östrogen vor allem AKT1-Aktivität aufweisen, während die Stimulation mit Östrogen in ER $\alpha$ <sup>-</sup> MDA-MB 231 Zellen vor allem zur Aktivierung von AKT3 führt [Stoica et al., 2003]. Dillon et al. haben Mammakarzinomzellen aus Balb-neuT-Tumoren isoliert und davon Zellklone generiert und diese orthotroph in Balb/c-Mäuse transplantiert. Während sich das Wachstum der Primärtumoren der einzelnen Zellklone nicht unterschied, variierte die Anzahl von Metastasen in der Lunge stark. Es zeigte sich, dass die Zellklone, die mehr Metastasen generierten, mehr phosphoryliertes und damit wahrscheinlich aktives AKT2 besitzen [Dillon et al.,

2009]. Sun et al. haben die Kinaseaktivität von AKT1 in 50 Mammakarzinomproben analysiert und konnten zeigen, dass 40% eine gesteigerte AKT1-Aktivität besitzen [Sun et al., 2001]. Bislang wurde weder die Kinaseaktivität von AKT2 noch von AKT3 in humanen Mamakarzinomproben untersucht. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays konnten also erstmalig Ergebnisse bezüglich der Aktivierung der AKT-Isoformen 2 und 3 in humanen Mammakarzinomen erzielt werden. Hierbei ergaben die präliminären Untersuchungen von vier humanen Mammakarzinomen, dass sich sowohl eine Kinaseaktivität von AKT2 als auch von AKT3 in humanen Mammakarzinomen nachweisen lässt.

Um spezifische Funktionen von den AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom genauer zu untersuchen wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* Zellkultur-Modellsystem aus Balb-neuT-Mammatumoren etabliert. Hierfür wurden Mammatumorzellen aus primären Balb-neuT-Mammatumoren mittels Explantkultur isoliert, kultiviert und charakterisiert. Die Balb-neuT-Mammatumoren exprimieren die mRNA typischer Marker für ein duktales Karzinom, welches aus den luminalen Zellen hervorgegangen ist. Neben E-Cadherin werden auch die luminalen Marker Zytokeratin-8 und -18 exprimiert. An Hand dieser Marker konnte mit Hilfe der qPCR gezeigt werden, dass epitheliale Mammakarzinomzellen aus Balb-neuT-Mammatumoren isoliert wurden, welche dem primären Balb-neuT-Mammatumor entsprechen. Das bedeutet, es konnte ein Zellkultur-Modellsystem etabliert werden, an Hand dessen der ErbB2/AKT-Signalweg, sowie die Funktionen der einzelnen AKT-Isoformen beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom *in vitro* analysiert werden kann.

Darüber hinaus eignet sich die in dieser Arbeit etablierte Balb-neuT Zelllinie C4 auch zur Untersuchung von Tumorwachstum und Metastasierung *in vivo*, da die C4-Zellen effizient ErbB2<sup>+</sup>-Tumoren nach subkutaner Injektion in WT Balb/c Mäusen induzieren können. Der Vorteil bei diesem Modellsystem ist, dass es ein allogenes System ist. Hierbei können die Tumorzellen in WT Balb/c Mäuse injiziert werden und müssen nicht wie bei xenogenen Modellsystemen mit humanen Zelllinien in SCID Mäuse mit defektem Immunsystem transplantiert werden. Es ist allgemein bekannt, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Tumorenstehung, -progression und Metastasierung besitzt, deren Effekte in SCID Mäusen nicht berücksichtigt werden können, weshalb die physiologische Relevanz von xenogenen Modellsystemen unter bestimmten Fragestellungen Einschränkungen erfährt. Da Balb-neuT-Mäuse den genetischen Balb/c-Hintergrund tragen, werden sie vom Immunsystem der Balb/c WT Mäuse nicht als kör-

perfremd, sondern als körpereigen identifiziert und somit vom Immunsystem nicht abgestoßen. Zellkultur-Modellsysteme von Balb-neuT-Mäusen wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen etabliert und für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Beantwortung verschiedenen Fragestellungen eingesetzt [Wang et al., 2006; Grange et al., 2008; Dillon et al., 2009]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die aus transgenen Balb-neuT-Tumoren etablierten Mammakarzinomzellen C4, wie die gut charakterisierte humane ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie SKBR-3, einen ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Phänotyp besitzt. Darüber hinaus konnte in den C4-Zellen eine gesteigerte Aktivierung von ErbB2 und AKT gegenüber der ER<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen werden. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu ER<sup>+</sup> MCF-7 Zellen, die Aktivitäten der AKT-Isoformen 1 und 3 in den C4-Zellen deutlich gesteigert waren. Während die gesteigerte Aktivierung von AKT1 nicht mit einer gesteigerten AKT1 Expression assoziiert war, war die AKT-Isoform 3 in den ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen wesentlich höher exprimiert, als in den ER<sup>+</sup> MCF-7 Zellen. Ein Unterschied in der Expression, sowie der Aktivität von AKT2 konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen eine gesteigerte Aktivität von AKT1 und AKT3 gegenüber ER<sup>+</sup> Mammakarzinomzellen besitzen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass über den ErbB2-Rezeptor die AKT-Isoformen 1 und 3 effizient aktiviert werden, was zu einer gesteigerten Gesamtaktivität von AKT führt. Eine gesteigerte Aktivität von AKT konnte bereits in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden und ist mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert [Tokunaga et al., 2006; Pérez-Tenorio et al., 2002; Beeram et al., 2007; David et al., 2004]. Beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom korreliert die Expression von pAKT(S473) mit einer signifikant reduzierten 5-Jahres Überlebensrate der Patientinnen und stellt somit einen unabhängigen Prognosemarker dar [Wu et al., 2008]. Darüber hinaus ist die Aktivierung von AKT mit einer Resistenz gegenüber chemotherapeutischen und anderen Therapieansätzen assoziiert [Schuurbijs et al., 2009; Tokunaga et al., 2006; Brognard et al., 2001]. Die gesteigerte Aktivierung von AKT1 und AKT3 könnte also mit der Aggressivität des ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinoms in Verbindung stehen.

#### 4.1.2 Das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) reguliert die Stabilität und Aktivität von AKT1 und AKT2, aber nicht von AKT3

Hitzeschockproteine (HSPs) sind Chaperone, welche die Aufgabe haben, Proteine korrekt zu falten und in ihrer aktiven Konformation zu stabilisieren. HSPs sind an der zellulären Stressantwort sowie dem Transport über verschiedene Zellkompartimente beteiligt [Hartl, 1996; Lindquist and Craig, 1988]. HSPs findet man in verschiedenen Tumorzellen überexprimiert [Ralhan and Kaur, 1995]. Viele Klientenproteine der HSPs sind an der Proliferation, Apoptose und der Zellzyklusprogression beteiligt [Burrows et al., 2004; Beliakov and Whitesell, 2004]. Auf Grund dieser wichtigen Funktion von HSPs für Wachstum und Überleben von Tumorzellen wurden Inhibitoren dieser Proteine entwickelt [Trepel et al., 2010]. Als Klientenproteine des HSP90 sind unter anderen ErbB2 und AKT identifiziert worden [Neckers and Ivy, 2003; Fortugno et al., 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition von HSP90 verschiedene Tumorzellen *in vitro* in ihrem Wachstum inhibiert werden können [Bull et al., 2004; Restall and Lorimer, 2010; Karkoulis et al., 2010]. Darüber hinaus ist die Behandlung mit dem HSP90 Inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) bereits in Studien der klinischen Phase I an metastatischen oder nicht-operablen Tumoren sowie Lymphomen untersucht worden [Shadad and Ramanathan, 2006; Kummar et al., 2010].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von HSP90 auch in ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen, wie bereits in anderen Zellen gezeigt, zur Degradation der Klientenproteine ErbB2 und AKT führt. Allerdings konnte erstmalig gezeigt werden, dass nur die AKT-Isoformen AKT1 und AKT2 durch den HSP90 Inhibitor 17-DMAG in ihrer Expression reduziert wurden, während die Proteinexpression von AKT3 unverändert blieb. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur AKT1 und AKT2, nicht aber AKT3, Klientenproteine von HSP90 sind. Ob AKT3, im Gegensatz zu AKT1 und AKT2, tatsächlich kein Klientenprotein von HSP90 ist, müssten weiterführende Experimente bestätigen. Zum Beispiel könnte nach AKT-Isoform-spezifischer Immunpräzipitation die Co-Präzipitation von HSP90 mittels HSP90-spezifischer Antikörper untersucht werden. Unter der Annahme dass AKT3 kein Klientenprotein von HSP90 ist, AKT1 und AKT2 aber schon, dürfte HSP90 nur in der AKT1 und AKT2, nicht aber in der AKT3, spezifischen Immunpräzipitation co-präzipitiert werden. Weiterführend könnte postuliert werden, dass eine Kombinationstherapie mit HSP90 und AKT3 spezifischen Inhibitoren die Effizienz von HSP90 Inhibitoren, in AKT3<sup>+</sup> Tumorzellen, möglicherweise verbessern könnte.

### 4.1.3 AKT-Isoformen haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation der C4-Zellen

Um Funktionen von AKT-Isoformen in ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden die aus Balb-neuT-Mammatumoren etablierten C4-Zellen mittels lentiviraler shRNA-Vektoren transduziert und stabile AKT-Isoform-spezifische *knockdown* C4-Zellen generiert. Es wurde die Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem *knockdown* analysiert. Es zeigte sich, dass alle AKT-Isoformen einen Einfluss auf die Proliferation der C4-Zellen haben, wobei AKT1 und AKT3 den stärksten Effekt zeigten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die AKT-Isoformen 1 und 3 für das Wachstum der ErbB2<sup>+</sup>-C4-Mammakarzinomzellen eine entscheidende Bedeutung besitzen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem in dieser Arbeit erbrachten Nachweis einer gesteigerten Aktivierung dieser beiden AKT-Isoformen in den ErbB2<sup>+</sup>-C4-Zellen gegenüber den ER $\alpha$ <sup>+</sup>-MCF-7 Zellen.

Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von W. Muller, welcher 1988 das Mausmodell Balb-neuT erstmals veröffentlichte [Muller et al., 1988], konnten bereits einschlägig zeigen, dass die AKT-Isoformen 1 und 2 die Tumorprogression und Metastasierung von Balb-neuT-Mammatumoren unterschiedlich beeinflussen können. Hier konnte mit Hilfe von bitransgenen Mäusen nämlich Balb-neuT/AKT1-DD bzw. Balb-neuT/AKT2-DD gezeigt werden, dass konstitutiv aktiviertes AKT1 (AKT1-DD) die Tumorprogression von Balb-neuT-Tumoren fördert, während es die Metastasierung hemmt [Hutchinson et al., 2004]. Im Gegensatz dazu zeigten die Balb-neuT-Mammatumoren unter Einfluss von konstitutiv aktiviertem AKT2 (AKT2-DD) eine gesteigerte Metastasierung [Dillon et al., 2009]. Die Funktion von AKT3 wurde bislang nur in Balb-neuT/AKT3<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht [Maroulakou et al., 2007]. Hierbei zeigte sich, dass Balb-neuT/AKT3<sup>-/-</sup>-Mäuse langsamer Tumore entwickelten als Balb-neuT-Mäuse, was im Einklang mit einer wichtigen Funktion von AKT3 für das Tumorstadium der Balb-neuT-Tumoren steht. Allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant. An Hand der Ergebnisse der bitransgenen Balb-neuT/AKT1-DD-Mäuse konnten Dillon et al. zeigen, dass durch die konstitutive Aktivierung von AKT1 die ErbB2-Expression in den Balb-neuT-Tumoren reduziert wurde [Dillon et al., 2009]. Diese Daten sprechen dafür, dass AKT1 die Expression des ErbB2-Rezeptors negativ reguliert. Die konstitutive Aktivierung von AKT2 führte hingegen nicht zu einer veränderten ErbB2-Expressionsmenge. Inwiefern AKT3 einen Effekt auf die ErbB2-Expression besitzt ist nicht untersucht.

#### 4.1.4 Der Verlust von AKT3 reduziert die Expression des ErbB2-Rezeptors in den C4-Zellen über einen post-transkriptionellen Mechanismus

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Verlust von AKT1 die Expression des ErbB2-Rezeptors in der Balb-neuT-Mammakarzinomzelllinie C4 anstieg. Diese Ergebnisse ergänzen sich mit den Ergebnissen der Balb-neuT/AKT1-DD Mäuse von Dillon [Dillon et al., 2009]. Während der Verlust von AKT1 in den C4-Zellen die Expression von ErbB2 steigert, führt die Aktivierung von AKT1 (AKT1-DD) in Balb-neuT-Mäusen zur reduzierten ErbB2-Expression. In den C4-Zellen zeigte sich allerdings auch ein Anstieg der Expression des ErbB2-Rezeptors nach Verlust von AKT2, was in den Balb-neuT/AKT2-DD Mäusen nicht gezeigt werden konnte. In den C4-Zellen führt der Verlust von AKT1 und von AKT2 nicht nur zur gesteigerten ErbB2-Expression, sondern auch zur verstärkten Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors, die sehr wahrscheinlich mit einer gesteigerten Aktivität einhergeht. Analoge Ergebnisse wurden für den ErbB3-Rezeptor erzielt, welcher bevorzugt mit ErbB2 heterodimerisiert und dabei effizient den PI3K/AKT-Signalweg anschaltet [Olayioye et al., 2000]. Außerdem findet man beim fortgeschrittenen ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom häufig auch eine gesteigerte Expression des ErbB3-Rezeptors [Bièche et al., 2003; Hudelist et al., 2003], was für eine Co-Regulation dieser beiden Rezeptoren spricht. Darüber hinaus scheint die Heterodimerisierung von ErbB2 und ErbB3 essentiell für das Wachstum von ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen zu sein [Holbro et al., 2003]. An Hand dieser Ergebnisse könnte angenommen werden, dass die Therapie mit AKT1- und/ oder AKT2-spezifischen Inhibitoren beim Mammakarzinom unerwünschte Nebeneffekte, nämlich eine gesteigerte Aktivierung von ErbB2 und ErbB3, zur Folge haben könnte. Allerdings zeigten bitransgene Balb-neuT/AKT1<sup>-/-</sup>-Mäuse ein signifikant reduziertes Tumorwachstum, was dafür spricht, dass AKT1 die Tumorrogression fördert. Andererseits zeigten Tumoren von Balb-neuT/AKT1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Balb-neuT-Mäusen auch einen signifikant höheren Grad an Invasivität, was dafür spricht, dass AKT1 das invasive Wachstum inhibiert. Das bedeutet durch den Verlust von AKT1 kann das Tumorwachstum reduziert und die Invasivität gesteigert werden [Maroulakou et al., 2007].

Für die AKT3-*knockdown*-Zellen ergab sich bezüglich der ErbB2- und ErbB3-Expression hingegen, dass sowohl der ErbB2- als auch der ErbB3-Rezeptor nach Verlust von AKT3 in seiner Expression und Aktivierung reduziert wurde. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass AKT3 die ErbB2 Expression positiv regulieren kann. Hierbei war die

mRNA-Menge von ErbB2 nicht reduziert, was darauf hindeutet, dass der Verlust von ErbB2 auf einen post-transkriptionellen Mechanismus zurückzuführen ist. Der Transkriptionsfaktor FOXM1, welcher mit einer ErbB2-Überexpression sowie einer Herceptinresistenz assoziiert ist und ein nachgeschaltetes Target von ErbB2 darstellt [Francis et al., 2009; Carr et al., 2010], zeigte hingegen eine Reduktion der mRNA-Menge. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die reduzierte Expression von ErbB2 in den AKT3-*knockdown*-Zellen tatsächlich zu einer reduzierten Signalweiterleitung über ErbB2 führt und dass die Expression von FOXM1 AKT3-spezifische reguliert werden kann. Unter dem Aspekt, dass ErbB2 ein Onkogen und ein therapeutisches Target darstellt, könnten diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Internalisierung und Degradation von ErbB2 beitragen und darüber hinaus AKT3 als ein interessantes therapeutisches Target beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom in den Vordergrund stellen.

Über den Mechanismus der Degradation von ErbB2 ist verhältnismäßig wenig bekannt. Während der EGFR nach Stimulation schnell internalisiert und degradiert wird [Roepstorff et al., 2008], ist der ErbB2-Rezeptor weniger anfällig gegenüber Internalisierung und Degradation. Dieses Verhalten von ErbB2 ist scheinbar auf eine ineffiziente Internalisierung zurückzuführen [Hommelgaard et al., 2004; Lerdrup et al., 2006]. Es konnte an Hand von Deletionsmutanten mit verkürztem C-Terminus von ErbB2, gezeigt werden, dass das C-terminale-Ende, also der intrazelluläre Bereich von ErbB2 für die Internalisierung von ErbB2 verantwortlich ist [Tikhomirov and Carpenter, 2003; Lerdrup et al., 2007]. Shimizu u.a. konnten zeigen, dass  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinkomplexe die Proteasomvermittelte Spaltung von ErbB2 induzieren [Shimizu et al., 2003]. Hierbei wird ErbB2 in Abhängigkeit von  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinkomplexen C-terminal durch eine noch unbekannt Protease gespalten. Dabei entsteht ein kurzlebiges, intrazelluläres 85 kDa großes Fragment und ein 100 kDa großes Fragment in der Plasmamembran.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C4-Zellen nach Verlust von AKT3 eine gesteigerte mRNA-Menge von  $\beta 1$ -Integrin besitzen. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass AKT3 die mRNA-Menge von  $\beta 1$ -Integrin regulieren kann. Weiterführend könnten diese Ergebnisse dafür sprechen, dass ErbB2, abhängig von  $\alpha 6\beta 1$ -Integrinkomplexen, auf Grund einer gesteigerten  $\beta 1$ -Integrin-Expression in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen, effizient internalisiert und degradiert wird. Als Folge könnte es zu einer reduzierten Expression, verminderten Aktivierung und abnehmender Signaltransduktion von ErbB2 kommen. Auf Grund der Kurzlebigkeit des intrazellulären Fragments kann dieses mit Antikörpern gegen die intrazelluläre Domäne von ErbB2, wie in dieser Arbeit verwendet, nicht

nachgewiesen werden. Wie von Shimizu et al. gezeigt, lässt sich nur das etwa 100 kDa große Bruchstück, welches in der Plasmamembran verbleibt, mit ErbB2-Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet sind, detektieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Antikörper, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von ErbB2, sowohl im WB als auch in der IP getestet, um den möglichen Abbau von ErbB2 in den AKT3-*knockdown*-Zellen eindeutig nachzuweisen. Während sich einer der Antikörper für beide Applikationen als gänzlich ungeeignet erwies, zeigte der andere Antikörper zumindest Erfolge in der IP. Erste Versuche zeigten, dass sich ErbB2 spezifisch aus Balb-neuT-Tumoren präzipitieren und mittels Comassie-Färbung nachweisen lässt. Weiterführende Experimente sind erforderlich, um den Abbau von ErbB2 eindeutig nachzuweisen.

#### **4.1.5 Die Expression des ER $\alpha$ wird durch den Verlust von AKT3 in den C4-Zellen induziert und führt zur gesteigerten Sensitivität gegenüber dem ER-Antagonisten Tamoxifen**

Beim Mammakarzinom konnte eine inverse Korrelation zwischen der Expression des ErbB2-Rezeptors und des Östrogenrezeptors (ER) $\alpha$  beobachtet werden [Lee et al., 1996; Perou et al., 2000]. Das bedeutet, dass Mammakarzinome mit starker ErbB2-Expression häufig keine nachweisbaren oder nur geringe Mengen des ER $\alpha$  exprimieren und umgekehrt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den C4-Zellen durch den Verlust von AKT3, der zur reduzierten Expression von ErbB2 führt, die Expression des ER $\alpha$  sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene ansteigt. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Befund der inversen Korrelation der Expression dieser Rezeptoren. Außerdem konnten Fadari et al. zeigen, dass ER $\alpha$ <sup>+</sup> MCF-7 Zellen, welche eine konstitutiv aktivierte Variante von AKT3 überexprimieren, eine reduzierte Expression des ER $\alpha$  aufweisen und ein hormonunabhängiges Wachstum *in vivo* zeigen [Faridi et al., 2003].

Guo und Sonenshein konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor *forkhead box transcription factor* FOXO3a die Genexpression des ER $\alpha$  induziert und über den ErbB2/PI3K/AKT-Signalweg reprimiert werden kann [Guo and Sonenshein, 2004]. AKT kann den Transkriptionsfaktor FOXO3a an dem Serinrest253 phosphorylieren, was zum Zellkernausschluss und damit zur Inaktivierung von FOXO3a führt [Brunet et al., 1999]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den C4 AKT3 *knockdown* Zellen der Transkriptionsfaktor FOXO3a weniger am Serinrest253 phosphoryliert ist und damit wahrscheinlich auch eine gesteigerte Aktivität aufweist. Weiterführend könnte angenommen

werden, dass die gesteigerte Aktivität von FOXO3a für die gesteigerte Expression des ER $\alpha$  in den C4-AKT3-*knockdown*-Zellen verantwortlich ist. Auf Grund dieser Ergebnisse wäre ein verbessertes Ansprechen auf eine Therapie mit ER-Modulatoren wie dem Tamoxifen nach Verlust von AKT3 in den C4-Zellen denkbar.

Mehr als 60% aller humanen Mammakarzinome sind ER $\alpha$ <sup>+</sup> [Keen and Davidson, 2003]. Die Expression des ER ist mit einer günstigen Prognose assoziiert. Der ER<sup>+</sup>-Status korreliert mit einem höheren Differenzierungsgrad des Tumors [McCarty et al., 1980; Mossler et al., 1981], sowie mit einem gesteigerten Krankheits-freien Überleben [Osborne, 1998]. Ein positiver ER-Status gilt als Hauptrichtlinie für eine Anti-Östrogen-Therapie mit ER-Modulatoren. Der ER-Antagonist Tamoxifen wird seit über 30 Jahren sowohl in der Therapie vom frühen als auch fortgeschrittenen Mammakarzinom eingesetzt [Gradishar, 2005]. Der Erfolg der Therapie mit Tamoxifen ist allerdings auf Grund verschiedener Resistenzmechanismen eingeschränkt [Musgrove and Sutherland, 2009]. Etwa 40% der Patientinnen mit ER<sup>+</sup> Mammakarzinom besitzen eine *de novo* Resistenz gegenüber Tamoxifen. Mehr als 62% der Patienten erwerben im Laufe der Therapie eine Tamoxifen-Resistenz [Fennessy et al., 2004; Lewis and Jordan, 2005]. Eine Resistenz gegenüber Tamoxifen ist bei 17-28% der Patienten mit dem Verlust der Expression des ER $\alpha$  assoziiert, eine Mutation im ER $\alpha$  findet man hingegen kaum [Gligorov et al., 2007].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der C4-AKT3-*knockdown*-Zellen durch Tamoxifen signifikant stärker reduziert werden kann als in den Kontrollzellen. Hieraus ergibt sich, dass durch den Verlust von AKT3 in den C4-Zellen, was zum signifikanten Anstieg der ER $\alpha$  Expression führt, eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem ER-Antagonisten Tamoxifen entsteht. Indirekt wird hierdurch auch gezeigt, dass die C4-AKT3-*knockdown* Zellen von der ER-Signalkaskade abhängiger sind als die C4-Kontrollzellen, welche ER $\alpha$ <sup>-</sup> sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass AKT3 bei der Entstehung von endokrinen Resistenzmechanismen, welche zum Teil mit einer gesteigerten Expression von ErbB2 einhergehen, eine wichtige Funktion besitzen könnte. Hinweise deuten darauf hin, dass komplexe Interaktionen zwischen dem ER und Wachstumsfaktor-Signalkaskaden existieren und an der Entstehung von endokrinen Resistenzmechanismen beteiligt sind [Musgrove and Sutherland, 2009]. Das ErbB-System konnte in mehreren Studien sowohl in Mammakarzinomzellen als auch in primären Mammakarzinomen mit einer endokrinen Resistenz in Verbindung gebracht werden. Klinische Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von AKT mit einer endokrinen Resistenz und einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert ist [Pérez-Tenorio et al., 2002; Tokunaga et al., 2006].

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von myristyliertem und dadurch konstitutiv aktiviertem AKT in ER<sup>-</sup> Zellen zu einer Tamoxifen-Resistenz führt [Campbell et al., 2001; Beeram et al., 2007].

#### 4.1.6 Eine Aktivität von AKT3 kann in primären humanen Mammakarzinomen nachgewiesen werden

An Hand der Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten 22 humanen Mammakarzinome konnte gezeigt werden, dass die Expression von pAKT(S473) mit einem ER<sup>-</sup>-Status assoziiert ist, was durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt wird [Tsai et al., 2001; Panigrahi et al., 2004]. Allerdings gibt es auch Studien die das Gegenteil zeigten [Al-Bazz et al., 2009]. Unterschiede in den Ergebnissen können verschiedene Ursachen haben, wie die Spezifität des verwendeten Antikörpers, die Variation der Patientenpopulation oder die Gesamtanzahl der untersuchten Proben.

Die in dieser Arbeit erzielten, präliminären Ergebnisse bezüglich der Aktivierung der AKT-Isoformen von vier humanen Mammakarzinomen decken sich mit den funktionalen *in vitro* Untersuchungen der AKT-Isoformen in den C4-Zellen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzen die C4-Zellen einen ErbB2<sup>+</sup>/ER $\alpha$ <sup>-</sup>/AKT3<sup>+</sup>-Phänotyp. Zusätzlich wurde eine gesteigerte AKT3-Aktivität im Vergleich zur ER<sup>+</sup>-Zelllinie MCF-7 nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust von AKT3 in den C4-Zellen einerseits zum Expressionsverlust von ErbB2 über einen post-transkriptionellen Mechanismus führt und andererseits die mRNA-Menge und Expression des ER $\alpha$  induziert.

Unter der Annahme, dass die Stabilität von ErbB2 auf Grund einer AKT3-vermittelten Reduktion der  $\beta$ 1-Integrin Expression steigt, könnte eine gesteigerte AKT3-Aktivität demnach eine gesteigerte ErbB2-Expression zur Folge haben, was für die humanen Proben 173 und 192 zutrifft. Außerdem könnte eine gesteigerte AKT3-Aktivität mit einem ER<sup>-</sup>-Phänotyp assoziiert sein, wie dies für die humanen Proben 173, 187 und 192 gezeigt wurde. Dieser Befund wird zusätzlich durch eine Veröffentlichung von Nakatani et al. gestützt, wobei gezeigt wurde, dass AKT3 in ER<sup>-</sup>-Mammakarzinomzellen überexprimiert wird und eine inverse Korrelation zwischen den mRNA-Mengen von ER $\alpha$  und AKT3 in humanen Mammakarzinomen besteht [Nakatani et al., 1999]. Zudem konnte in dieser Arbeit in dem ER<sup>+</sup>-Tumor keine und in der ER<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie MCF-7 kaum eine Aktivierung von AKT3 nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass ER<sup>+</sup>-Mammakarzinome wenig oder keine AKT3-Aktivität besitzen. Im Verlauf der Tumor-

progression von ER<sup>+</sup>-Mammakarzinomen könnte also durch den Zugewinn von AKT3-Aktivität die Expression des ER $\alpha$  abgeschaltet und die Expression von ErbB2 stabilisiert werden. Als Folge könnte eine Tamoxifen-Resistenz entstehen, wie dies vice versa in den C4-Zellen nach *knockdown* von AKT3 in dieser Arbeit gezeigt wurde.

#### 4.1.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier dargelegten Ergebnisse haben neue Einblicke und Erkenntnisse in die Funktion von AKT-Isoformen, insbesondere von AKT3, beim ErbB2<sup>+</sup>-Mammakarzinom erbracht. Auf Grund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass die AKT-Isoform 3 beim ErbB2<sup>+</sup>/ER $\alpha$ <sup>-</sup> Mammakarzinom die Expression des ER $\alpha$  über die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO3a reprimieren kann. Zudem wäre es möglich, dass durch AKT3 die Proteinstabilität von ErbB2 über die Reduktion von  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-Integrinkomplexen erhöht würde, was zu einer gesteigerten ErbB2 Expression und Signalweiterleitung führt. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass durch die Inhibition von AKT3 in ErbB2<sup>+</sup>/ER $\alpha$ <sup>-</sup>-Mammakarzinomzellen ein Ansprechen auf eine Behandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten Tamoxifen verbessert wird. An Hand dieser Daten wäre sowohl ein Therapieansatz mit AKT3 spezifischen Inhibitoren beim ErbB2<sup>+</sup>/ER<sup>-</sup>-Mammakarzinom zur Reduktion der ErbB2-Expression und der möglichen Verminderung einer Resistenz gegenüber Tamoxifen, als auch beim ER<sup>+</sup>-Mammakarzinomen, zur Verbesserung der Therapie mit Tamoxifen und Prävention einer Resistenz, denkbar.

Die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur Funktion der AKT-Isoformen, sollten in weiterführenden Experimenten zunächst *in vivo* validiert werden. Hierfür könnten die murinen C4- und C4-AKT3-*knockdown*-Zellen, welche in dieser Arbeit etabliert wurden, auch zur Analyse der Funktion von AKT3 bei der Tumorprogression und Metastasierung *in vivo* verwendet werden. Durch subkutane Injektion von C4- und C4-AKT3-*knockdown*-Zellen in Wild-Typ Balb/c Mäuse könnte das Tumorwachstum und die Metastasierung unter Verlust von AKT3 studiert werden. Auch die Effekte einer Kombinationstherapie mit beispielsweise HSP90-Inhibitoren könnten in diesem Modellsystem analysiert werden. Darüber hinaus könnte an Hand eines größeren Probensets von humanen Mammakarzinomen die Aktivierung aller drei AKT-Isoformen beim Mammakarzinom erstmalig charakterisiert werden. Ein größeres Probenkollektiv könnte Korrelationsanalysen zwischen den Aktivitäten der AKT-Isoformen und dem Rezeptorstatus oder dem Ansprechen auf eine Therapie beim Mammakarzinom erlauben.

## 4.2 Funktionen von AKT-Isoformen in disseminierten Tumorzellen

Disseminierte Tumorzellen (DTC) können im Knochenmark (KM) bei 20-60% von Krebspatienten mit verschiedenen soliden Tumoren wie Mamma- und Lungenkarzinom nachgewiesen werden. DTC lassen sich bereits in frühen Tumorstadien, auch im Lymphknotenmetastasefreien Zustand (N0) sowie ohne klinische Hinweise auf Fernmetastasen (M0) detektieren [Pantel et al., 2009]. Angenommen wird, dass DTC als minimale residuale Erkrankung (*minimal residual disease*, MRD) selbst nach früher Diagnose und vollständiger chirurgischer Entfernung des Primärtumors, auch nach langer Latenzzeit, Ursache für Metastasen sein könnten [Pantel et al., 2009; Almog, 2010]. In der Vergangenheit haben klinische Studien gezeigt, dass es eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von DTC im KM und dem Auftreten eines Rezidivs gibt, was die klinische Relevanz von DTC als unabhängigen Prognosemarker unterstreicht [Pantel and Brakenhoff, 2004; Riethdorf et al., 2008]. Die molekularen Mechanismen, die für das Überleben, Aufwachen und Auswachsen von DTC verantwortlich sind, sind weitgehend unerforscht [Pantel et al., 2008].

Ein besseres molekulares und funktionelles Verständnis der Signaltransduktion in DTC ist notwendig, um neue Medikamente zur Behandlung der MRD zu entwickeln. Auf Grund der geringen Anzahl von DTC im KM, ist die Analyse von DTC besonders schwierig und die molekularen Mechanismen, welche an der frühen Metastasierung beteiligt sind schlecht verstanden. In dieser Arbeit wurden Zelllinien, welche von DTC aus dem Knochenmark von Patienten mit soliden Tumoren wie Brust und Lunge abstammen [Pantel et al., 1995], als *in vitro* Modellsystem zur Untersuchung der Aktivierung und Funktion der drei AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 in reaktivierten DTC verwendet.

### 4.2.1 Die DTC-Zelllinie LC-M1 besitzt eine starke Aktivierung des AKT-Signalwegs

Der PI3K/AKT-Signalweg reguliert neben Proliferation und Apoptose auch Migration und Invasion [LoPiccolo et al., 2008]. Um die Bedeutung des PI3K/AKT-Signalwegs für Proliferation, Überleben und Migration in DTC zu untersuchen wurde zunächst die Aktivierung des AKT-Signalwegs in den DTC-Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1,

welche aus dem Knochenmark von Patienten mit Lungen-, Brust- bzw. Prostatakarzinom etabliert wurden [Pantel et al., 1995], analysiert. Eine Aktivierung von AKT, gemessen an der Phosphorylierung von AKT an den Aminosäureresten Serin473 und Threonin308 (pAKT(S473) und pAKT(T308)), konnte in den DTC-Zelllinien nachgewiesen werden. Im Vergleich zu verschiedenen gut charakterisierten Karzinomzelllinien, ergab sich insbesondere für die DTC-Zelllinie LC-M1 eine starke Aktivierung von AKT. Diese Ergebnisse deuten auf eine Aktivierung des AKT-Signalwegs in DTC hin. Die Aktivierung von AKT war nicht mit einer gesteigerten Expression der AKT-Isoformen AKT1, AKT2 oder AKT3 assoziiert.

Die DTC-Zelllinie LC-M1 wurde aus dem Knochenmark eines Patienten mit einem primären nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) etabliert [Pantel et al., 1995]. Lungenkrebs ist weltweit die häufigste Krebserkrankung, mit einer hohen Mortalitätsrate. Lungenkrebspatienten haben generell eine schlechte klinische Prognose und die 5-Jahres Überlebensrate beträgt nur 14% [Parkin, 2001]. Von den malignen Lungenerkrankungen ist das NSCLC mit 80% das häufigste. Die häufigste Todesursache solider Tumoren entsteht erst durch die Ausbreitung der primären Tumorzellen und die daraus resultierenden Metastasen in sekundären Organen. Selbst bei vollständiger Resektion des Tumors von NSCLC-Patienten, sogar im frühen Tumorstadium, ist der klinische Ausgang unbefriedigend [Martini et al., 1995]. Eine frühe Disseminierung von Tumorzellen könnten eine Erklärung hierfür sein. Bei 22-60% der NSCLC-Patienten wurden DTC im KM detektiert und in 8 von 13 klinischen Studien konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von DTC und einem schlechten klinischen Ausgang beobachtet werden [Riethdorf et al., 2008; Pantel and Brakenhoff, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung von AKT in NSCLC-Zellen zur Resistenz gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie führt [Brognard et al., 2001]. Außerdem ist die Expression von pAKT(S473) mit einer schlechten klinischen Prognose bei NSCLC-Patienten assoziiert [David et al., 2004]. Während die Aktivierung von AKT (Gesamtaktivität aller AKT-Isoformen), gemessen an der pAKT(S473)- und pAKT(T308)-Menge in verschiedenen Tumorantigenen bereits gut untersucht wurde, ist über die Aktivierung der einzelnen AKT-Isoformen in DTC noch nichts bekannt.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten AKT-Isoform-spezifischen Kinaseassays konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von AKT3 in der DTC-Zelllinie LC-M1 eindeutig am höchsten war. Im Vergleich zu der NSCLC Zelllinie H1299 konnte eine gesteigerte Aktivität von allen AKT-Isoformen in den LC-M1 Zellen nachgewiesen werden. Diese

Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion der Signalweiterleitung über AKT in der DTC-Zelllinie LC-M1 hin.

Der AKT-Signalweg kann sowohl wachstumsfaktorabhängig als auch wachstumsfaktorunabhängig nach DNA-Doppelstrangbrüchen oder zellulärem Stress und Hitzeschock aktiviert werden [Kandel and Hay, 1999]. Bei verschiedenen Krebserkrankungen, inklusive Lungen- und Brustkrebs, treten allerdings Mutationen in der katalytischen Domäne (p110 $\alpha$ ) der PI3K auf, welche eine konstitutive Aktivierung der PI3K und damit auch eine wachstumsfaktorunabhängige Aktivierung von AKT zur Folge haben. Diese Mutationen besitzen transformierendes Potential und treten etwa bei 27% der Patienten mit Brustkrebs auf [Vogt et al., 2007; Castaneda et al., 2010]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren einen signifikanten Abfall der pAKT(S473)- und pAKT(T308)-Menge in den LC-M1 Zellen zur Folge hat. Diese Ergebnisse zeigen, dass der AKT-Signalweg in den LC-M1 Zellen größtenteils Wachstumsfaktorabhängig aktiviert wird.

Die Wachstumsfaktorabhängigkeit der Proliferation sowie der Apoptose wurde weiterführend unter Wachstumsfaktorentzug untersucht. Es ergab sich sowohl eine Hemmung der Proliferation als auch eine Induktion der Apoptose für die LC-M1 Zellen nach Wachstumsfaktorentzug. Darüber hinaus zeigte sich nach Inhibition der PI3K mit dem PI3K-Inhibitor LY-294002 eine Hemmung der Proliferation, welche durch zusätzlichen Wachstumsfaktorentzug weiter reduziert werden konnte. Hieraus ergibt sich, dass der PI3K/AKT-Signalweg sowohl Wachstumsfaktorabhängig als auch unabhängig die Proliferation von LC-M1 Zellen fördern kann. Die Apoptose der LC-M1 Zellen zeigte sich durch die Inhibition der PI3K stark induziert und wurde durch zusätzlichen Wachstumsfaktorentzug nicht weiter induziert. Hieraus ergibt sich, dass die Apoptose der LC-M1 Zellen stark wachstumsfaktorunabhängig über den PI3K/AKT-Signalweg reguliert werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass der PI3K/AKT-Signalweg eine große Bedeutung für Proliferation und Überleben der DTC-Zelllinie LC-M1, sowohl unter Wachstumsfaktorpräsenz als auch unter Wachstumsfaktorentzug, besitzt.

#### **4.2.2 AKT-Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen bei der Regulation von Proliferation, Überleben und Migration in LC-M1-Zellen**

Um die Funktionen der AKT-Isoformen bezüglich der Proliferation, Apoptose und Migration in DTC zu untersuchen, wurden stabile AKT-Isoform-spezifische *knockdown*-

Zellen mittels lentiviraler Transduktion etabliert (Abb. 3.23). Hierbei wurden die AKT-Isoformen mit Hilfe von AKT-Isoform-spezifischen shRNAs über den Mechanismus der RNA-Interferenz in LC-M1 Zellen signifikant herunter reguliert.

Die LC-M1 Zellen zeigten auf Grund des Verlustes von AKT1, aber vor allem bei Verlust von AKT3 eine Hemmung der Proliferation (Abb. 3.24 A). Kein signifikanter Effekt auf die Proliferation konnte durch den Verlust von AKT2 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten von Heron-Milhavet et al. die zeigten, dass AKT2 den Zellzyklus antreibt, während AKT1 für die Proliferation der Zellen entscheidend ist [Héron-Milhavet et al., 2006]. Außerdem konnten Christiano et al. demonstrieren, dass der *knockdown* von AKT3 die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen reguliert [Christiano et al., 2006]. Han et al. zeigten, dass der Verlust von AKT1 in Magenkrebszellen zur Akkumulation von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase und einem verspäteten Übergang in die S-Phase des Zellzyklus führte [Han et al., 2008]. Für den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus sind hohe Mengen von Cyclin D erforderlich [Ekholm and Reed, 2000]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der Verlust von AKT1 als auch von AKT3 in den LC-M1 Zellen zur reduzierten Expression von Cyclin D1 führt (Abb. 3.24 B). Darüber hinaus ergab sich durch den Verlust von AKT3 eine reduzierte Cyclin D3 Expression. An Hand dieser Daten kann eine Funktion von AKT1 und AKT3 bei der Regulation des Zellzyklus am G<sub>1</sub>-S-Phase-Übergang durch hohe Cyclin D1-Mengen vorgeschlagen werden. Zusätzlich wird die Expression von Cyclin D3 in der DTC-Zelllinie LC-M1 AKT3-abhängig reguliert, wodurch die gesteigerte Hemmung der Proliferation der AKT3 *knockdown* Zellen gegenüber den AKT1 *knockdown* Zellen erklärt werden könnte. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Cyclin D3 die treibende Kraft des G<sub>1</sub>-S-Phase Übergangs ist und in Kooperation mit Cyclin D1 den Zellzyklus vorantreibt [Radulovich et al., 2010]. Eine spezifische Funktion von AKT3 bei der Regulation der Expression von Cyclin D3 in DTC ist an Hand dieser Ergebnisse anzunehmen.

Es ist bereits vielseitig gezeigt worden, dass der PI3K/AKT-Signalweg das Überleben von Zellen durch die Blockade von apoptotischen Signalen, z.B. durch die Phosphorylierung von AKT-Substraten wie BAD oder Forkhead Transkriptionsfaktoren, inhibiert [Duronio, 2008]. Die Überlebensstrategien von DTC sind weitgehend unerforscht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AKT-Isoformen 1 und 3 einen schwachen aber signifikanten Effekt auf die Apoptose der LC-M1 Zellen ausüben. Der Verlust von AKT1 und AKT3 führte zu einem Anstieg von apoptotischen Zellen. Kein signifikanter Effekt auf die Apoptose wurde nach Verlust von AKT2 beobachtet, was darauf hin deu-

tet, dass AKT2 nicht in der Lage ist, LC-M1 Zellen vor der Apoptose zu schützen oder deren Überlebenspotential zu steigern. Bezüglich der Apoptose könnte eine Inhibition mehrerer AKT-Isoformen vorteilhaft sein, um einen stärkeren Effekt auf die Apoptose auszuüben, wie dies mit dem PI3K-Inhibitor LY-294002 für LC-M1 Zellen gezeigt wurde. Tatsächlich zeigten Koseoglu et al., dass der *knockdown* aller AKT-Isoformen notwendig ist, um eine maximale apoptotische Antwort in verschiedenen Karzinomzelllinien zu induzieren [Koseoglu et al., 2007].

Das Migrationspotential von Tumorzellen ist ein entscheidender Faktor bei der Metastasierung solider Tumoren. Aus mehreren Arbeiten geht hervor, dass sowohl AKT1 als auch AKT2 die Migration verschiedener Karzinomzellen fördert [McKenna et al., 2007]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust von jeder der drei AKT-Isoformen die Migration der LC-M1 Zellen hemmt, was darauf hin deutet, dass alle AKT-Isoformen die Migration der LC-M1 Zellen positiv beeinflussen. Auf Grund des Verlusts von AKT2 wurde die Migration am stärksten gehemmt, wie dies bereits für Brustkrebszellen beschrieben wurde [Irie et al., 2005]. In den LC-M1 Zellen führte auch der Verlust von AKT1 und AKT3 zu einem reduzierten Migrationspotential. Die Funktion von AKT3 bei der Migration wurde bislang noch nicht beschrieben. Es ist von besonderem Interesse, dass der Verlust von AKT3 zur Inhibition von Proliferation, Überleben und Migration in der DTC-Zelllinie LC-M1 führt. Infolgedessen könnte AKT3 ein relevantes Zielmolekül zur Therapie von DTC im KM von NSCLC-Patienten durch Behandlung mit AKT3 spezifischen Inhibitoren darstellen.

#### **4.2.3 Die an der Regulation von Tumorschlaf und Proliferation beteiligten Komponenten u-PA und u-PAR werden über AKT-Isoformen reguliert**

Das Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) System ist an der Kontrolle der intravaskulären Homöostase, Matrixintegrität und der Signaltransduktion verschiedenster Prozesse, sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen, beteiligt [Allgayer, 2010]. Mitglieder dieser Familie, zu denen u-PA und sein Rezeptor (u-PAR) zählen, findet man häufig in verschiedenen malignen Tumoren überexprimiert [de Bock and Wang, 2004; McMahon and Kwaan, 2008]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von u-PAR auf DTC von Magenkrebspatienten einen molekularen Marker für das Potential der DTC darstellt, sich über die Zeit zu vermehren [Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008]. Möglicherweise spielt die Signalweiterleitung über

u-PAR eine entscheidende Rolle für das Aufwachen und Auswachsen von DTC. Es gibt Hinweise dafür, dass u-PAR eine der Komponenten des Komplexes ist, welcher über Proliferation und Schlaf von disseminierten Tumorzellen wacht [Ghiso et al., 1999; Ghiso, 2002; Aguirre-Ghiso et al., 2003]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust von AKT1 und AKT3 zu einer reduzierten mRNA-Menge der u-PA System Komponenten u-PA und u-PAR führt. Als einflußreicher Regulator von Proliferation, Überleben, Migration und Invasion verschiedener Karzinomzellen wird insbesondere u-PAR als therapeutisches Zielmolekül diskutiert [Hildenbrand et al., 2010]. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass die Signalweiterleitung über AKT1 und AKT3, nicht aber über AKT2, in LC-M1 Zellen zu einer gesteigerten Expression von u-PA und u-PAR führt, wobei möglicherweise das Aufwachen und Auswachsen von DTC begünstigt wird.

#### **4.2.4 Die u-PAR-mRNA-Menge wird über EGF in den LC-M1-Zellen AKT3-abhängig induziert**

Es wurde mehrfach beschrieben, dass EGF über den EGFR das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren entscheidend beeinflussen kann. Die EGF-Signalkaskade ist ein sehr wichtiger Vermittler bei der Entstehung von Knochenmetastasen [Lu and Kang, 2010]. EGF fördert das Wachstum der Knochenmetastasen zum einen direkt durch Induktion der Proliferation der Tumorzellen selbst, zum Anderen indirekt durch die Aktivierung von Stromazellen der Umgebung, die die Metastasierung fördern [Lu and Kang, 2010]. In dieser Arbeit wurde zunächst die Expression der krebsassoziierten Rezeptoren EGFR, ErbB2, ErbB3 sowie des Estrogenrezeptors  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass keiner der hier untersuchten krebsassoziierten Rezeptoren im Vergleich zu anderen Karzinomzelllinien überexprimiert war. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass in den LC-M1 Zellen, im Vergleich zu den H1299 Zellen, welche signifikant mehr EGFR exprimieren, der AKT-Signalweg über EGF eindeutig stärker aktiviert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation mit EGF alle AKT-Isoformen aktiviert wurden, wobei AKT3 nach EGF Stimulation sowohl in den LC-M1 als auch den H1299 Zellen, die stärkste Aktivierung aufwies. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Verlust von AKT1 als auch von AKT3, die EGF-induzierte Proliferation der LC-M1 Zellen inhibiert sowie die EGF-vermittelte Hemmung der Apoptose reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der DTC-Zelllinie LC-M1 EGF-vermittelte proliferative und anti-apoptotische Signale von AKT1 und AKT3 weitergeleitet werden.

Weiterführend konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation mit EGF die mRNA-Menge von u-PAR in den LC-M1 Zellen gesteigert werden kann. Dies ist bereits für Magenkrebszellen gezeigt worden [Baek et al., 2008]. Baek et al. konnten sogar zeigen, dass hierbei der Promotor von u-PAR über EGF induziert wird. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass die EGF-induzierte u-PAR mRNA-Expression über den AKT-Signalweg vermittelt werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt zu einem geringen Anteil AKT1- aber vor allem AKT3-abhängig ist. Hieraus ergibt sich, dass die Aktivierung von AKT3 über EGF in DTC eine gesteigerte Expression von u-PAR zur Folge haben kann, was weiterführend das Aufwachen und Auswachsen von DTC induzieren könnte [Allgayer and Aguirre-Ghiso, 2008; Allgayer, 2010]. Basierend auf diesen Ergebnissen, im Kontext des aktuellen Wissensstands, kann vermutet werden, dass die Aktivierung von AKT, insbesondere von AKT3, mit der Aggressivität von DTC korreliert bzw. essentiell an dem Prozess der Reaktivierung von schlafenden Tumorzellen beteiligt ist.

#### 4.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse haben neue Erkenntnisse und Einblicke in die AKT-Isoformvermittelte Signaltransduktion von DTC erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Aktivierung von AKT1 vor allem die Aktivierung von AKT3 für die Proliferation und das Überleben von DTC von Bedeutung ist. An Hand der mit DTC-Zelllinien erzielten Ergebnisse erscheint es möglich, dass auch primäre DTC zur Reaktivierung eine gesteigerte AKT3-Aktivität benötigen und dass AKT3-vermittelt die Proliferation der DTC über gesteigerte Cyclin D1- und D3-Mengen stark begünstigt wird. Via EGF könnte die u-PAR Expression, welche mit einem gesteigerten proliferativen Potential von DTC assoziiert ist, AKT3-abhängig induziert werden. Auf Grund dieser Ergebnisse kann postuliert werden, dass AKT3-spezifische Inhibitoren zur Behandlung von DTC relevant sein könnten.

Die erzielten Ergebnisse der *in vitro* Analysen an der DTC-Zelllinie LC-M1 sollten in weiterführenden Experimenten *in vivo* validiert werden. Unter der Annahme, dass AKT3 das proliferative Potential von DTC begünstigt, sollte sich bei Verlust von AKT3 die Anzahl an DTC reduzieren. Hüseemann et al. haben gezeigt, dass sich das transgene Mausmodell Balb-neuT als *in vivo* Modellsystem zur Analyse von DTC eignet, da sich bei diesen transgenen Mäusen bereits in frühen Tumorstadien, DTC im KM im-

muncytochemisch nachweisen lassen [Hüsemann et al., 2008]. Aus diesem Grund könnte an Hand von bitransgenen Balb-neuT/AKT3<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert werden, ob die Anzahl an DTC in Abwesenheit von AKT3 im Vergleich zu Balb-neuT-Mäusen mit AKT3 reduziert ist.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit auf humane Proben zu übertragen, könnten Immunfluoreszenz (IF)-Doppelfärbungen etabliert werden. Mit Hilfe von etablierten Antikörpern gegen epitheliale Marker wie die Zytokeratine (CK) ist es möglich einzelne DTC im KM von Krebspatienten nachzuweisen [Pantel et al., 2008]. Durch die Etablierung von pAKT- und AKT3-spezifischen Antikörpern für (IF)-Doppelfärbungen mit anti-Zytokeratin Antikörpern könnten pAKT-positive bzw. AKT3-positive DTC identifiziert werden. Inwiefern die Expression von pAKT und/ oder AKT3 mit der Aggressivität von DTC korreliert oder mit der klinischen Prognose assoziiert ist, könnte durch Untersuchungen von großen Patientenkohorten untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

- Aguirre-Ghiso, J. A., Estrada, Y., Liu, D., and Ossowski, L. (2003). ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*, 63(7):1684–1695.
- Al-Bazz, Y. O., Underwood, J. C. E., Brown, B. L., and Dobson, P. R. M. (2009). Prognostic significance of akt, phospho-akt and bad expression in primary breast cancer. *Eur J Cancer*, 45(4):694–704.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. (1996a). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15(23):6541–6551.
- Alessi, D. R., Caudwell, F. B., Andjelkovic, M., Hemmings, B. A., and Cohen, P. (1996b). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett*, 399(3):333–338.
- Allgayer, H. (2010). Translational research on u-par. *Eur J Cancer*, 46(7):1241–1251.
- Allgayer, H. and Aguirre-Ghiso, J. A. (2008). The urokinase receptor (u-PAR)—a link between tumor cell dormancy and minimal residual disease in bone marrow? *APMIS*, 116(7-8):602–614.
- Allgayer, H., Heiss, M. M., Riesenberger, R., Grützner, K. U., Tarabichi, A., Babic, R., and Schildberg, F. W. (1997). Urokinase plasminogen activator receptor (uPA-R): one potential characteristic of metastatic phenotypes in minimal residual tumor disease. *Cancer Res*, 57(7):1394–1399.
- Almog, N. (2010). Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett*, 294(2):139–146.

- Altomare, D. A., Lyons, G. E., Mitsuuchi, Y., Cheng, J. Q., and Testa, J. R. (1998). Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene*, 16(18):2407–2411.
- Anderson, M. J., Viars, C. S., Czekay, S., Cavenee, W. K., and Arden, K. C. (1998). Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics*, 47(2):187–199.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X. F., Han, J. W., and Hemmings, B. A. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12):5699–5704.
- Arpino, G., Weiss, H., Lee, A. V., Schiff, R., Placido, S. D., Osborne, C. K., and Elledge, R. M. (2005). Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst*, 97(17):1254–1261.
- Baek, M. K., Kim, M. H., Jang, H. J., Park, J. S., Chung, I. J., Shin, B. A., Ahn, B. W., and Jung, Y. D. (2008). EGF stimulates uPAR expression and cell invasiveness through ERK, AP-1, and NF-kappaB signaling in human gastric carcinoma cells. *Oncol Rep*, 20(6):1569–1575.
- Bargmann, C. I. and Weinberg, R. A. (1988). Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(15):5394–5398.
- Barkan, D., Green, J. E., and Chambers, A. F. (2010). Extracellular matrix: a gatekeeper in the transition from dormancy to metastatic growth. *Eur J Cancer*, 46(7):1181–1188.
- Barkan, D., Kleinman, H., Simmons, J. L., Asmussen, H., Kamaraju, A. K., Hoenorhoff, M. J., yao Liu, Z., Costes, S. V., Cho, E. H., Lockett, S., Khanna, C., Chambers, A. F., and Green, J. E. (2008). Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res*, 68(15):6241–6250.
- Bartkowiak, K., Wieczorek, M., Buck, F., Harder, S., Moldenhauer, J., Effenberger, K. E., Pantel, K., Peter-Katalinic, J., and Brandt, B. H. (2009). Two-Dimensional

- Differential Gel Electrophoresis of a Cell Line Derived from a Breast Cancer Micro-metastasis Revealed a Stem/Progenitor Cell Protein Profile. *J Proteome Res.*
- Bayascas, J. R. (2008). Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle*, 7(19):2978–2982.
- Beeram, M., Tan, Q.-T. N., Tekmal, R. R., Russell, D., Middleton, A., and DeGraffenried, L. A. (2007). Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann Oncol*, 18(8):1323–1328.
- Beliakoff, J. and Whitesell, L. (2004). Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 15(7):651–662.
- Bellacosa, A., Chan, T. O., Ahmed, N. N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, 17(3):313–325.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., and Tsichlis, P. N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 254(5029):274–277.
- Berger, M. B., Mendrola, J. M., and Lemmon, M. A. (2004). ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface. *FEBS Lett*, 569(1-3):332–336.
- Bernards, R. and Weinberg, R. A. (2002). A progression puzzle. *Nature*, 418(6900):823.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., Beijersbergen, R. L., Mills, G. B., van de Vijver, M. J., and Bernards, R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, 12(4):395–402.
- Bièche, I., Onody, P., Tozlu, S., Driouch, K., Vidaud, M., and Lidereau, R. (2003). Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer*, 106(5):758–765.
- Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835):355–365.

- Boggio, K., Nicoletti, G., Carlo, E. D., Cavallo, F., Landuzzi, L., Melani, C., Giovarelli, M., Rossi, I., Nanni, P., Giovanni, C. D., Bouchard, P., Wolf, S., Modesti, A., Musiani, P., Lollini, P. L., Colombo, M. P., and Forni, G. (1998). Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med*, 188(3):589–596.
- Braun, S. and Naume, B. (2005). Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol*, 23(8):1623–1626.
- Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., Schlimok, G., Diel, I. J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.-Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.-F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G. Y. C., Bliss, J., Vincent-Salomon, A., and Pantel, K. (2005). A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med*, 353(8):793–802.
- Brodbeck, D., Hill, M. M., and Hemmings, B. A. (2001). Two splice variants of protein kinase B gamma have different regulatory capacity depending on the presence or absence of the regulatory phosphorylation site serine 472 in the carboxyl-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*, 276(31):29550–29558.
- Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y., and Dennis, P. A. (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res*, 61(10):3986–3997.
- Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T., and Newton, A. C. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell*, 25(6):917–931.
- Brugge, J., Hung, M.-C., and Mills, G. B. (2007). A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell*, 12(2):104–107.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6):857–868.
- Bull, E. E. A., Dote, H., Brady, K. J., Burgan, W. E., Carter, D. J., Cerra, M. A., Oswald, K. A., Hollingshead, M. G., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2004). Enhanced

- tumor cell radiosensitivity and abrogation of G2 and S phase arrest by the Hsp90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin. *Clin Cancer Res*, 10(23):8077–8084.
- Burrows, F., Zhang, H., and Kamal, A. (2004). Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle*, 3(12):1530–1536.
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*, 276(13):9817–9824.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573):1655–1657.
- Carlo, E. D., Diodoro, M. G., Boggio, K., Modesti, A., Modesti, M., Nanni, P., Forni, G., and Musiani, P. (1999). Analysis of mammary carcinoma onset and progression in HER-2/neu oncogene transgenic mice reveals a lobular origin. *Lab Invest*, 79(10):1261–1269.
- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T. Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.-W., Zeckner, D. J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.-H. T., Blanchard, K. L., and Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 448(7152):439–444.
- Carr, J. R., Park, H. J., Wang, Z., Kiefer, M. M., and Raychaudhuri, P. (2010). FoxM1 mediates resistance to herceptin and paclitaxel. *Cancer Res*, 70(12):5054–5063.
- Castaneda, C. A., Cortes-Funes, H., Gomez, H. L., and Ciruelos, E. M. (2010). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 29(4):751–759.
- Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., and Tsichlis, P. N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem*, 68:965–1014.

- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., and Birnbaum, M. J. (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292(5522):1728–1731.
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M. J. (2001b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 276(42):38349–38352.
- Coffer, P. J. and Woodgett, J. R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 201(2):475–481.
- Cote, R. J., Beattie, E. J., Chaiwun, B., Shi, S. R., Harvey, J., Chen, S. C., Sherrod, A. E., Groshen, S., and Taylor, C. R. (1995). Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg*, 222(4):415–23; discussion 423–5.
- Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20(3):358–417.
- Cristiano, B. E., Chan, J. C., Hannan, K. M., Lundie, N. A., Marmy-Conus, N. J., Campbell, I. G., Phillips, W. A., Robbie, M., Hannan, R. D., and Pearson, R. B. (2006). A specific role for AKT3 in the genesis of ovarian cancer through modulation of G(2)-M phase transition. *Cancer Res*, 66(24):11718–11725.
- David, O., Jett, J., LeBeau, H., Dy, G., Hughes, J., Friedman, M., and Brody, A. R. (2004). Phospho-Akt overexpression in non-small cell lung cancer confers significant stage-independent survival disadvantage. *Clin Cancer Res*, 10(20):6865–6871.
- Davies, M. A., Stemke-Hale, K., Tellez, C., Calderone, T. L., Deng, W., Prieto, V. G., Lazar, A. J. F., Gershenwald, J. E., and Mills, G. B. (2008). A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer*, 99(8):1265–1268.
- Davis, B. J. (1964). DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. *Ann N Y Acad Sci*, 121:404–427.

- de Bock, C. E. and Wang, Y. (2004). Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer. *Med Res Rev*, 24(1):13–39.
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19):11211–11216.
- Dillon, R. L., Marcotte, R., Hennessy, B. T., Woodgett, J. R., Mills, G. B., and Muller, W. J. (2009). Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res*, 69(12):5057–5064.
- Dillon, R. L. and Muller, W. J. (2010). Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res*, 70(11):4260–4264.
- Dowsett, M. (2001). Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 8(3):191–195.
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.-Z., Dirnhofer, S., and Hemmings, B. A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol*, 26(21):8042–8051.
- Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*, 415(3):333–344.
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M.-Y., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., and Birnbaum, M. J. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol*, 25(5):1869–1878.
- Efferson, C. L., Winkelmann, C. T., Ware, C., Sullivan, T., Giampaoli, S., Tammam, J., Patel, S., Mesiti, G., Reilly, J. F., Gibson, R. E., Buser, C., Yeatman, T., Coppola, D., Winter, C., Clark, E. A., Draetta, G. F., Strack, P. R., and Majumder, P. K. (2010). Downregulation of Notch pathway by a gamma-secretase inhibitor attenuates AKT/mammalian target of rapamycin signaling and glucose uptake in an ERBB2 transgenic breast cancer model. *Cancer Res*, 70(6):2476–2484.

- Ekholm, S. V. and Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 12(6):676–684.
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*, 9(8):550–562.
- Faridi, J., Wang, L., Endemann, G., and Roth, R. A. (2003). Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo. *Clin Cancer Res*, 9(8):2933–2939.
- Fearon, E. R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):759–767.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., and Hemmings, B. A. (2004). Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 279(39):41189–41196.
- Fennessy, M., Bates, T., MacRae, K., Riley, D., Houghton, J., and Baum, M. (2004). Late follow-up of a randomized trial of surgery plus tamoxifen versus tamoxifen alone in women aged over 70 years with operable breast cancer. *Br J Surg*, 91(6):699–704.
- Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P. C., Sessa, W. C., and Altieri, D. C. (2003). Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24):13791–13796.
- Francis, R. E., Myatt, S. S., Krol, J., Hartman, J., Peck, B., McGovern, U. B., Wang, J., Guest, S. K., Filipovic, A., Gojic, O., Palmieri, C., Peston, D., Shousha, S., Yu, Q., Sicinski, P., Coombes, R. C., and Lam, E. W.-F. (2009). FoxM1 is a downstream target and marker of HER2 overexpression in breast cancer. *Int J Oncol*, 35(1):57–68.
- Franke, T. F. (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene*, 27(50):6473–6488.
- Fujio, Y., Guo, K., Mano, T., Mitsuuchi, Y., Testa, J. R., and Walsh, K. (1999). Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol*, 19(7):5073–5082.
- Gangnus, R., Langer, S., Breit, E., Pantel, K., and Speicher, M. R. (2004). Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 10(10):3457–3464.

- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A. C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*, 18(1):13–24.
- Ghiso, J. A. A. (2002). Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene*, 21(16):2513–2524.
- Ghiso, J. A. A., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1999). Tumor dormancy induced by downregulation of urokinase receptor in human carcinoma involves integrin and MAPK signaling. *J Cell Biol*, 147(1):89–104.
- Gimbrone, M. A., Leapman, S. B., Cotran, R. S., and Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*, 136(2):261–276.
- Ginestier, C., Adélade, J., Gonalvès, A., Repellini, L., Sircoulomb, F., Letessier, A., Finetti, P., Geneix, J., Charafe-Jauffret, E., Bertucci, F., Jacquemier, J., Viens, P., and Birnbaum, D. (2007). ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene*, 26(50):7163–7169.
- Gligorov, J., Azria, D., Namer, M., Khayat, D., and Spano, J.-P. (2007). Novel therapeutic strategies combining antihormonal and biological targeted therapies in breast cancer: focus on clinical trials and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*, 64(2):115–128.
- Goodison, S., Kawai, K., Hihara, J., Jiang, P., Yang, M., Urquidi, V., Hoffman, R. M., and Tarin, D. (2003). Prolonged dormancy and site-specific growth potential of cancer cells spontaneously disseminated from nonmetastatic breast tumors as revealed by labeling with green fluorescent protein. *Clin Cancer Res*, 9(10 Pt 1):3808–3814.
- Gradishar, W. J. (2005). Safety considerations of adjuvant therapy in early breast cancer in postmenopausal women. *Oncology*, 69(1):1–9.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74.
- Grange, C., Lanzardo, S., Cavallo, F., Camussi, G., and Bussolati, B. (2008). Sca-1 identifies the tumor-initiating cells in mammary tumors of BALB-neuT transgenic mice. *Neoplasia*, 10(12):1433–1443.

- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 16(7):1647–1655.
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., and Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, 11(6):859–871.
- Guo, S. and Sonenshein, G. E. (2004). Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Cell Biol*, 24(19):8681–8690.
- Han, Z., Wu, K., Shen, H., Li, C., Han, S., Hong, L., Shi, Y., Liu, N., Guo, C., Xue, Y., Qiao, T., and Fan, D. (2008). Akt1/protein kinase B alpha is involved in gastric cancer progression and cell proliferation. *Dig Dis Sci*, 53(7):1801–1810.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–579.
- Hildenbrand, R., Allgayer, H., Marx, A., and Stroebel, P. (2010). Modulators of the urokinase-type plasminogen activation system for cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 19(5):641–652.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., and Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):8933–8938.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1(2):149–153.
- Hommelgaard, A. M., Lerdrup, M., and van Deurs, B. (2004). Association with membrane protrusions makes ErbB2 an internalization-resistant receptor. *Mol Biol Cell*, 15(4):1557–1567.

- Horan, T., Wen, J., Arakawa, T., Liu, N., Brankow, D., Hu, S., Ratzkin, B., and Philo, J. S. (1995). Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J Biol Chem*, 270(41):24604–24608.
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. C. (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol Cell Biol*, 26(22):8267–8280.
- Héron-Milhavet, L., Mamaeva, D., Rochat, A., Lamb, N. J. C., and Fernandez, A. (2008). Akt2 is implicated in skeletal muscle differentiation and specifically binds Prohibitin2/REA. *J Cell Physiol*, 214(1):158–165.
- Hüsemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., and Klein, C. A. (2008). Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell*, 13(1):58–68.
- Hudelist, G., Singer, C. F., Manavi, M., Pischinger, K., Kubista, E., and Czerwenka, K. (2003). Co-expression of ErbB-family members in human breast cancer: Her-2/neu is the preferred dimerization candidate in nodal-positive tumors. *Breast Cancer Res Treat*, 80(3):353–361.
- Hutchinson, J. N., Jin, J., Cardiff, R. D., Woodgett, J. R., and Muller, W. J. (2004). Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res*, 64(9):3171–3178.
- Hynes, N. E. and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21(2):177–184.
- Idirisinghe, P. K. A., Thike, A. A., Cheok, P. Y., Tse, G. M.-K., Lui, P. C.-W., Fook-Chong, S., Wong, N. S., and Tan, P. H. (2010). Hormone receptor and c-ERBB2 status in distant metastatic and locally recurrent breast cancer. Pathologic correlations and clinical significance. *Am J Clin Pathol*, 133(3):416–429.
- Irie, H. Y., Pearline, R. V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J. S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 171(6):1023–1034.

- Jacobsen, B. and Ploug, M. (2008). The urokinase receptor and its structural homologue C4.4A in human cancer: expression, prognosis and pharmacological inhibition. *Curr Med Chem*, 15(25):2559–2573.
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B. A. (1991). Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul*, 2(12):1001–1009.
- Jura, N., Zhang, X., Endres, N. F., Seeliger, M. A., Schindler, T., and Kuriyan, J. (2011). Catalytic control in the EGF receptor and its connection to general kinase regulatory mechanisms. *Mol Cell*, 42(1):9–22.
- Kandel, E. S. and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*, 253(1):210–229.
- Karkoulis, P. K., Stravopodis, D. J., Margaritis, L. H., and Voutsinas, G. E. (2010). 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin induces downregulation of critical Hsp90 protein clients and results in cell cycle arrest and apoptosis of human urinary bladder cancer cells. *BMC Cancer*, 10:481.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M. D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17:615–675.
- Keen, J. C. and Davidson, N. E. (2003). The biology of breast carcinoma. *Cancer*, 97(3 Suppl):825–833.
- Kim, A. H., Yano, H., Cho, H., Meyer, D., Monks, B., Margolis, B., Birnbaum, M. J., and Chao, M. V. (2002). Akt1 regulates a JNK scaffold during excitotoxic apoptosis. *Neuron*, 35(4):697–709.
- Kim, H. H., Vijapurkar, U., Hellyer, N. J., Bravo, D., and Koland, J. G. (1998). Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J*, 334 ( Pt 1):189–195.
- Kirkegaard, T., Witton, C. J., McGlynn, L. M., Tovey, S. M., Dunne, B., Lyon, A., and Bartlett, J. M. S. (2005). AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol*, 207(2):139–146.

- Knapp, J. A. R. R. and Coady, C. J. (1962). Intraductal epithelial proliferation in the human breast—a comparative study. *Can J Surg*, 5:12–19.
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., and Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, 450(7171):903–907.
- Konecny, G. E., Pegram, M. D., Venkatesan, N., Finn, R., Yang, G., Rahmeh, M., Untch, M., Rusnak, D. W., Spehar, G., Mullin, R. J., Keith, B. R., Gilmer, T. M., Berger, M., Podratz, K. C., and Slamon, D. J. (2006). Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(3):1630–1639.
- Konishi, H., Shinomura, T., Kuroda, S., Ono, Y., and Kikkawa, U. (1994). Molecular cloning of rat RAC protein kinase alpha and beta and their association with protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1):817–825.
- Koseoglu, S., Lu, Z., Kumar, C., Kirschmeier, P., and Zou, J. (2007). AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. *Cancer Biol Ther*, 6(5):755–762.
- Kraus, J., Pantel, K., Pinkel, D., Albertson, D. G., and Speicher, M. R. (2003). High-resolution genomic profiling of occult micrometastatic tumor cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 36(2):159–166.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., and Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3):95–125.
- Kumar, C. C. and Madison, V. (2005). AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*, 24(50):7493–7501.
- Kummar, S., Gutierrez, M. E., Gardner, E. R., Chen, X., Figg, W. D., Zajac-Kaye, M., Chen, M., Steinberg, S. M., Muir, C. A., Yancey, M. A., Horneffer, Y. R., Juwara, L., Melillo, G., Ivy, S. P., Merino, M., Neckers, L., Steeg, P. S., Conley, B. A., Giaccone, G., Doroshow, J. H., and Murgu, A. J. (2010). Phase I trial of

- 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *Eur J Cancer*, 46(2):340–347.
- Kuwada, S. K., Kuang, J., and Li, X. (2005). Integrin  $\alpha 5/\beta 1$  expression mediates HER-2 down-regulation in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 280(19):19027–19035.
- Lakhani, S. R. (1999). The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*, 187(3):272–278.
- Lee, C. S., deFazio, A., Ormandy, C. J., and Sutherland, R. L. (1996). Inverse regulation of oestrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells treated with phorbol ester. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 58(3):267–275.
- Lemmon, M. A. and Ferguson, K. M. (2000). Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, 350 Pt 1:1–18.
- Lerdrup, M., Bruun, S., Grandal, M. V., Roepstorff, K., Kristensen, M. M., Hommelgaard, A. M., and van Deurs, B. (2007). Endocytic down-regulation of ErbB2 is stimulated by cleavage of its C-terminus. *Mol Biol Cell*, 18(9):3656–3666.
- Lerdrup, M., Hommelgaard, A. M., Grandal, M., and van Deurs, B. (2006). Geldanamycin stimulates internalization of ErbB2 in a proteasome-dependent way. *J Cell Sci*, 119(Pt 1):85–95.
- Lewis, J. S. and Jordan, V. C. (2005). Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res*, 591(1-2):247–263.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 22:631–677.
- Liu, E., Thor, A., He, M., Barcos, M., Ljung, B. M., and Benz, C. (1992). The HER2 (c-erbB-2) oncogene is frequently amplified in in situ carcinomas of the breast. *Oncogene*, 7(5):1027–1032.
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., and Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8):627–644.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4):402–408.
- LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., and Dennis, P. A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 11(1-2):32–50.
- Lowry, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265–275.
- López-Knowles, E., O’Toole, S. A., McNeil, C. M., Millar, E. K. A., Qiu, M. R., Crea, P., Daly, R. J., Musgrove, E. A., and Sutherland, R. L. (2010). PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer*, 126(5):1121–1131.
- Lu, X. and Kang, Y. (2010). Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br J Cancer*, 102(3):457–461.
- Lucchini, F., Sacco, M. G., Hu, N., Villa, A., Brown, J., Cesano, L., Mangiarini, L., Rindi, G., Kindl, S., and Sessa, F. (1992). Early and multifocal tumors in breast, salivary, hardierian and epididymal tissues developed in MMTY-Neu transgenic mice. *Cancer Lett*, 64(3):203–209.
- M. Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M., and Hemmings, B. A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, 272(50):31515–31524.
- Maroulakou, I. G., Oemler, W., Naber, S. P., and Tsiichlis, P. N. (2007). Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res*, 67(1):167–177.
- Martini, N., Bains, M. S., Burt, M. E., Zakowski, M. F., McCormack, P., Rusch, V. W., and Ginsberg, R. J. (1995). Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 109(1):120–129.

- McCarty, K. S., Barton, T. K., Fetter, B. F., Woodard, B. H., Mossler, J. A., Reeves, W., Daly, J., Wilkinson, W. E., and McCarty, K. S. (1980). Correlation of estrogen and progesterone receptors with histologic differentiation in mammary carcinoma. *Cancer*, 46(12 Suppl):2851–2858.
- McKenna, L. B., Zhou, G. L., and Field, J. (2007). Isoform-specific functions of Akt in cell motility. *Cell Mol Life Sci*, 64(21):2723–2725.
- McMahon, B. and Kwaan, H. C. (2008). The plasminogen activator system and cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 36(3-4):184–194.
- Müller, V., Alix-Panabières, C., and Pantel, K. (2010). Insights into minimal residual disease in cancer patients: implications for anti-cancer therapies. *Eur J Cancer*, 46(7):1189–1197.
- Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45):6469–6487.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6):954–8, 960, 962.
- Morrow, P. K. H., Zambrana, F., and Esteva, F. J. (2009). Recent advances in systemic therapy: Advances in systemic therapy for HER2-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 11(4):207.
- Mossler, J. A., McCarty, K. S., and Johnston, W. W. (1981). The correlation of cytologic grade and steroid receptor content in effusions of metastatic breast carcinoma. *Acta Cytol*, 25(6):653–658.
- Muller, W. J., Sinn, E., Pattengale, P. K., Wallace, R., and Leder, P. (1988). Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*, 54(1):105–115.
- Murthy, S. S., Tosolini, A., Taguchi, T., and Testa, J. R. (2000). Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 88(1-2):38–40.

- Musgrove, E. A. and Sutherland, R. L. (2009). Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(9):631–643.
- Muss, H. B., Thor, A. D., Berry, D. A., Kute, T., Liu, E. T., Koerner, F., Cirrincione, C. T., Budman, D. R., Wood, W. C., and Barcos, M. (1994). c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*, 330(18):1260–1266.
- Nadji, M., Gomez-Fernandez, C., Ganjei-Azar, P., and Morales, A. R. (2005). Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*, 123(1):21–27.
- Nahta, R., Hortobágyi, G. N., and Esteva, F. J. (2003). Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist*, 8(1):5–17.
- Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobágyi, G. N., and Esteva, F. J. (2006). Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3(5):269–280.
- Nakatani, K., Thompson, D. A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R. J., and Roth, R. A. (1999). Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*, 274(31):21528–21532.
- Naumov, G. N., Bender, E., Zurakowski, D., Kang, S.-Y., Sampson, D., Flynn, E., Watanick, R. S., Straume, O., Akslen, L. A., Folkman, J., and Almog, N. (2006). A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst*, 98(5):316–325.
- Neckers, L. and Ivy, S. P. (2003). Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol*, 15(6):419–424.
- Noguchi, M., Ropars, V., Roumestand, C., and Suizu, F. (2007). Proto-oncogene TCL1: more than just a coactivator for Akt. *FASEB J*, 21(10):2273–2284.
- Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y., and McCormick, F. (2005). High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 65(23):10669–10673.

- Offner, S., Schmaus, W., Witter, K., Baretton, G. B., Schlimok, G., Passlick, B., Riethmüller, G., and Pantel, K. (1999). p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12):6942–6946.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 19(13):3159–3167.
- Osborne, C. K. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, 51(3):227–238.
- Panigrahi, A. R., Pinder, S. E., Chan, S. Y., Paish, E. C., Robertson, J. F. R., and Ellis, I. O. (2004). The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol*, 204(1):93–100.
- Pantel, K., Alix-Panabières, C., and Riethdorf, S. (2009). Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(6):339–351.
- Pantel, K. and Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*, 4(6):448–456.
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H., and Brandt, B. (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 8(5):329–340.
- Pantel, K., Cote, R. J., and Fodstad, O. (1999). Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 91(13):1113–1124.
- Pantel, K., Dickmanns, A., Zippelius, A., Klein, C., Shi, J., Hoechtlen-Vollmar, W., Schlimok, G., Weckermann, D., Oberneder, R., and Fanning, E. (1995). Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst*, 87(15):1162–1168.
- Pantel, K., Izbicki, J. R., Angstwurm, M., Braun, S., Passlick, B., Karg, O., Thetter, O., and Riethmüller, G. (1993). Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 53(5):1027–1031.

- Pao, W. and Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 12(2):175–180.
- Parkin, D. M. (2001). cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*, 2(9):533–543.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2):74–108.
- Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1):9–22.
- Perou, C. M., Surlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lunning, P. E., Burresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797):747–752.
- Peterson, R. T. and Schreiber, S. L. (1999). Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr Biol*, 9(14):R521–R524.
- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C.-S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T. M., Rüschoff, J., Suto, T., Greatorex, V., Ward, C., Strahle, C., McFadden, E., Dolci, M. S., Gelber, R. D., and Team, H. A. H. T. S. (2005). Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*, 353(16):1659–1672.
- Podo, F., Buydens, L. M. C., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I. S., Huffel, S. V., van Laarhoven, H. W. M., Luts, J., Monleon, D., Postma, G. J., Schneiderhan-Marra, N., Santoro, F., Wouters, H., Russnes, H. G., Surlie, T., Tagliabue, E., Burresen-Dale, A.-L., and Consortium, F. E. M. M. E. (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*, 4(3):209–229.
- Pérez-Tenorio, G., Alkhorri, L., Olsson, B., Waltersson, M. A., Nordenskjöld, B., Rutqvist, L. E., Skoog, L., and Stål, O. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 13(12):3577–3584.

- Pérez-Tenorio, G., Stål, O., and Group, S. S. B. C. (2002). Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer*, 86(4):540–545.
- Prigent, S. A. and Gullick, W. J. (1994). Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera. *EMBO J*, 13(12):2831–2841.
- Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmüller, G., and Pantel, K. (1999). Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res*, 59(1):241–248.
- Quesnel, B. (2008). Tumor dormancy and immunoescape. *APMIS*, 116(7-8):685–694.
- Radulovich, N., Pham, N.-A., Strumpf, D., Leung, L., Xie, W., Jurisica, I., and Tsao, M.-S. (2010). Differential roles of cyclin D1 and D3 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 9:24.
- Ralhan, R. and Kaur, J. (1995). Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res*, 1(10):1217–1222.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., and Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, 339(1):62–66.
- Ranganathan, A. C., Zhang, L., Adam, A. P., and Aguirre-Ghiso, J. A. (2006). Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to drug resistance of dormant carcinoma cells. *Cancer Res*, 66(3):1702–1711.
- Reimers, N., Zafrakas, K., Assmann, V., Egen, C., Riethdorf, L., Riethdorf, S., Berger, J., Ebel, S., Jänicke, F., Sauter, G., and Pantel, K. (2004). Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 10(10):3422–3428.

- Restall, I. J. and Lorimer, I. A. J. (2010). Induction of premature senescence by hsp90 inhibition in small cell lung cancer. *PLoS One*, 5(6):e11076.
- Riethdorf, S., Wikman, H., and Pantel, K. (2008). Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, 123(9):1991–2006.
- RKI (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. *Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.)*, 6. überarbeitete Auflage, Berlin:RKI2008.
- Roepstorff, K., Grøvdal, L., Grandal, M., Lerdrup, M., and van Deurs, B. (2008). Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol*, 129(5):563–578.
- Ross, J. S. and Fletcher, J. A. (1999). The HER-2/neu oncogene: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin Cancer Biol*, 9(2):125–138.
- Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J. S., Malmström, P.-O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A., and Parsons, R. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res*, 65(7):2554–2559.
- Santi, S. A. and Lee, H. (2010). The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(3):C580–C591.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712):1098–1101.
- Schewe, D. M. and Aguirre-Ghiso, J. A. (2008). ATF6alpha-Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30):10519–10524.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2):211–225.
- Schnitt, S. J. and Connolly, J. L. (1992). Processing and evaluation of breast excision specimens. A clinically oriented approach. *Am J Clin Pathol*, 98(1):125–137.

- Schreiber, D. (1954). [demonstration of micrometastases in the bone marrow of clinically undiagnosed primary tumor]. *Z Arztl Fortbild (Jena)*, 48(11):389–392.
- Schuurbiers, O. C. J., Kaanders, J. H. A. M., van der Heijden, H. F. M., Dekhuijzen, R. P. N., Oyen, W. J. G., and Bussink, J. (2009). The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 4(6):761–767.
- Shadad, F. N. and Ramanathan, R. K. (2006). 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced-stage solid tumors and lymphoma: a phase I study. *Clin Lymphoma Myeloma*, 6(6):500–501.
- Shimizu, H., Seiki, T., Asada, M., Yoshimatsu, K., and Koyama, N. (2003). Alpha6beta1 integrin induces proteasome-mediated cleavage of erbB2 in breast cancer cells. *Oncogene*, 22(6):831–839.
- Sierke, S. L., Cheng, K., Kim, H. H., and Koland, J. G. (1997). Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein. *Biochem J*, 322 ( Pt 3):757–763.
- Simon, R., Nocito, A., Hübscher, T., Bucher, C., Torhorst, J., Schraml, P., Bubendorf, L., Mihatsch, M. M., Moch, H., Wilber, K., Schutzau, A., Kononen, J., and Sauter, G. (2001). Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93(15):1141–1146.
- Simpson, L. and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*, 264(1):29–41.
- Skinner, L. G., Barnes, D. M., and Ribeiro, G. G. (1980). The clinical value of multiple steroid receptor assays in breast cancer management. *Cancer*, 46(12 Suppl):2939–2945.
- Slamon, D. (2000). Herceptin: increasing survival in metastatic breast cancer. *Eur J Oncol Nurs*, 4(Sa):24–29.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785):177–182.

- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., and Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905):707–712.
- Sliwkowski, M. X. (2003). Ready to partner. *Nat Struct Biol*, 10(3):158–159.
- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L., and Carraway, K. L. (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem*, 269(20):14661–14665.
- Soltoff, S. P., Carraway, K. L., Prigent, S. A., Gullick, W. G., and Cantley, L. C. (1994). ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 14(6):3550–3558.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9(1):59–71.
- Stemke-Hale, K., Gonzalez-Angulo, A. M., Lluch, A., Neve, R. M., Kuo, W.-L., Davies, M., Carey, M., Hu, Z., Guan, Y., Sahin, A., Symmans, W. F., Pusztai, L., Nolden, L. K., Horlings, H., Berns, K., Hung, M.-C., van de Vijver, M. J., Valero, V., Gray, J. W., Bernardis, R., Mills, G. B., and Hennessy, B. T. (2008). An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 68(15):6084–6091.
- Stoica, G. E., Franke, T. F., Wellstein, A., Czubayko, F., List, H.-J., Reiter, R., Morgan, E., Martin, M. B., and Stoica, A. (2003). Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway. *Mol Endocrinol*, 17(5):818–830.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z. Q., Ma, X. L., Shelley, S. A., Jove, R., Tsihchlis, P. N., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol*, 159(2):431–437.
- Tavassoli, F. A. and Norris, H. J. (1990). A comparison of the results of long-term follow-up for atypical intraductal hyperplasia and intraductal hyperplasia of the breast. *Cancer*, 65(3):518–529.

- Thomas, C. C., Deak, M., Alessi, D. R., and van Aalten, D. M. F. (2002). High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol*, 12(14):1256–1262.
- Tikhomirov, O. and Carpenter, G. (2003). Identification of ErbB-2 kinase domain motifs required for geldanamycin-induced degradation. *Cancer Res*, 63(1):39–43.
- Todaro, G. J. and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, 17:299–313.
- Tokunaga, E., Kimura, Y., Oki, E., Ueda, N., Futatsugi, M., Mashino, K., Yamamoto, M., Ikebe, M., Kakeji, Y., Baba, H., and Maehara, Y. (2006). Akt is frequently activated in HER2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients. *Int J Cancer*, 118(2):284–289.
- Tolcher AW, Yap TA, F. I. e. a. (2009). A phase I study of MK-2206, an oral potent allosteric Akt inhibitor (Akti), in patients (pts) with advanced solid tumor (ST). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 27:15s (abstr 3503).
- Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer*, 10(8):537–549.
- Tsai, E. M., Wang, S. C., Lee, J. N., and Hung, M. C. (2001). Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(23):8390–8392.
- Tschopp, O., Yang, Z.-Z., Brodbeck, D., Dummler, B. A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., Michaelis, T., Frahm, J., and Hemmings, B. A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*, 132(13):2943–2954.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol*, 16(10):5276–5287.
- Uhr, J. W., Tucker, T., May, R. D., Siu, H., and Vitetta, E. S. (1991). Cancer dormancy: studies of the murine BCL1 lymphoma. *Cancer Res*, 51(18 Suppl):5045s–5053s.

- Vanhaesebroeck, B., Leervers, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J., and Waterfield, M. D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, 70:535–602.
- Vitolo, M. I., Weiss, M. B., Szmactinski, M., Tahir, K., Waldman, T., Park, B. H., Martin, S. S., Weber, D. J., and Bachman, K. E. (2009). Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 69(21):8275–8283.
- Vogt, P. K., Hart, J. R., Gymnopoulos, M., Jiang, H., Kang, S., Bader, A. G., Zhao, L., and Denley, A. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol*, 347:79–104.
- Vogt, P. K., Kang, S., Elsliger, M.-A., and Gymnopoulos, M. (2007). Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci*, 32(7):342–349.
- von Minckwitz, G., Jonat, W., Fasching, P., du Bois, A., Kleeberg, U., Lück, H.-J., Kettner, E., Hilfrich, J., Eiermann, W., Torode, J., and Schneeweiss, A. (2005). A multicentre phase II study on gefitinib in taxane- and anthracycline-pretreated metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 89(2):165–172.
- Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P., and Alessi, D. R. (1998). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J*, 331 ( Pt 1):299–308.
- Wang, S. E., Shin, I., Wu, F. Y., Friedman, D. B., and Arteaga, C. L. (2006). HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*, 66(19):9591–9600.
- Watnick, R. S., Cheng, Y.-N., Rangarajan, A., Ince, T. A., and Weinberg, R. A. (2003). Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 3(3):219–231.
- West, K. A., Castillo, S. S., and Dennis, P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*, 5(6):234–248.

- Wieduwilt, M. J. and Moasser, M. M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*, 65(10):1566–1584.
- Woodgett, J. R. (2005). Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17(2):150–157.
- Wu, Y., Mohamed, H., Chillar, R., Ali, I., Clayton, S., Slamon, D., and Vadgama, J. V. (2008). Clinical significance of Akt and HER2/neu overexpression in African-American and Latina women with breast cancer. *Breast Cancer Res*, 10(1):R3.
- Wymann, M. P., Zvelebil, M., and Laffargue, M. (2003). 7phosphoinositide 3-kinase signalling—which way to target?0. *Trends Pharmacol Sci*, 24(7):366–376.
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W., and Hemmings, B. A. (2005). Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol*, 25(23):10407–10418.
- Yuan, T. L. and Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41):5497–5510.
- Zinda, M. J., Johnson, M. A., Paul, J. D., Horn, C., Konicek, B. W., Lu, Z. H., Sandusky, G., Thomas, J. E., Neubauer, B. L., Lai, M. T., and Graff, J. R. (2001). AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin Cancer Res*, 7(8):2475–2479.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	ErbB2-vermittelte Signaltransduktion . . . . .	7
1.2	Molekulare Mechanismen des Tumorschlafs . . . . .	12
1.3	Domänenstruktur der AKT-Isoformen . . . . .	16
1.4	Der PI3K/AKT-Signalweg . . . . .	17
1.5	Regulation der Aktivierung von AKT . . . . .	20
2.1	Spezifität und Quantität der Immunpräzipitation (IP) der AKT-Isoformen	47
2.2	AKT-Isoform-spezifischer <i>in vitro</i> Kinaseassay . . . . .	49
3.1	Aktivierung des ErbB2/PI3K/AKT-Signalwegs in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren. . . . .	54
3.2	Expression der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren	55
3.3	Aktivitäten der AKT-Isoformen in transgenen Balb-neuT-Mammatumoren	56
3.4	Etablierung von murinen Mammakarzinomzelllinien aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren . . . . .	57
3.5	Charakterisierung von murinen Mammakarzinomzelllinien aus transgenen Balb-neuT-Mammatumoren . . . . .	58
3.6	Tumorigenität der etablierten murinen ErbB2 <sup>+</sup> -Mammakarzinomzelllinie C4 <i>in vivo</i> . . . . .	59
3.7	Expression von ErbB2, ErbB3, pAKT und den AKT-Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 in C4 Tumoren . . . . .	60
3.8	Aktivierung des ErbB2/AKT-Signalwegs in ErbB2 <sup>+</sup> -C4-Zellen . . . . .	61
3.9	Aktivierung des AKT-Signalwegs unter Wachstumsfaktorentzug und Inhibition von HSP90 . . . . .	63
3.10	Hemmung der Expression der AKT-Isoformen nach lentiviraler Transduktion mit AKT-Isoform-spezifischen shRNA-Vektoren in C4-Zellen . . . . .	64
3.11	Proliferation der C4-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> und Inhibition der PI3K . . . . .	65

3.12	Expression und Aktivierung von ErbB2 und ErbB3 in AKT-Isoform-spezifischen <i>knockdown</i> C4-Zellen . . . . .	66
3.13	Relative mRNA-Mengen von ErbB2, FOXM1, Integrin $\alpha 6$ und Integrin $\beta 1$ in C4-Zellen nach AKT3-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	68
3.14	Protein und mRNA Expression des Östrogenrezeptors $\alpha$ ( $ER\alpha$ ) in AKT-Isoform-spezifischen C4- <i>knockdown</i> -Zellen . . . . .	69
3.15	Expression von pFOXO3a(S253) in C4-AKT3- <i>knockdown</i> -Zellen . . . . .	70
3.16	Effekte des ER-Antagonisten Tamoxifen auf das Wachstum von C4-Zellen nach AKT3-spezifischem- <i>knockdown</i> . . . . .	71
3.17	Proteinexpression von AKT-Signalweg-Komponenten in humanen Mammakarzinomen . . . . .	72
3.18	Proteinexpression und AKT-Isoform Aktivitäten in humanen Mammakarzinomen . . . . .	74
3.19	Aktivierung des AKT-Signalwegs und Expression der AKT-Isoformen in DTC Zelllinien . . . . .	76
3.20	Aktivitäten der AKT-Isoformen in LC-M1 und H1299-Zellen . . . . .	78
3.21	Aktivierung des AKT-Signalwegs und Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Wachstumsfaktorentzug in LC-M1-Zellen . . . . .	80
3.22	Proliferation und Apoptose nach Wachstumsfaktorentzug sowie unter Inhibition der PI3K in LC-M1-Zellen . . . . .	81
3.23	Hemmung der Expression der AKT-Isoformen mittels AKT-Isoform-spezifischer lentiviraler shRNA-Vektoren in LC-M1-Zellen . . . . .	82
3.24	Proliferation und Expression der Cycline D1 und D3 in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	84
3.25	Apoptose der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> .	85
3.26	Migration und Wachstum in Gelatinematrix der LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	86
3.27	Relative mRNA-Menge von u-PAR und u-PA in LC-M1-Zellen nach AKT-Isoform-spezifischem <i>knockdown</i> . . . . .	87
3.28	Expression von ErbB1, ErbB2, ErbB3 und $ER\alpha$ in DTC-Zelllinien . . . . .	88
3.29	Aktivierung von AKT nach Stimulation mit EGF in LC-M1- und H1299-Zellen . . . . .	89
3.30	Expression von pAKT(S473) nach Stimulation mit EGF . . . . .	90

3.31	Aktivitäten der AKT-Isoformen nach Stimulation mit EGF in LC-M1- und H1299-Zellen . . . . .	91
3.32	Proliferation und Apoptose nach Stimulation mit EGF in AKT-Isoform-spezifischen LC-M1- <i>knockdown</i> -Zellen . . . . .	92
3.33	Relative u-PAR mRNA-Menge nach Stimulation mit EGF in AKT-Isoform-spezifischen LC-M1- <i>knockdown</i> -Zellen . . . . .	94

## Tabellenverzeichnis

2.1	Sequenzen der AKT-Isoform-spezifische shRNAs und der <i>non-target</i> Kontrolle . . . . .	30
2.2	Oligonukleotidprimer für die qPCR. . . . .	31

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
CK	Zytokeratin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTC	Diesseminierte Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>enzym-linked immunoabsorbant assay</i>
ER	Östrogenrezeptor
ErbB	<i>avian erythroblastosis oncogene B</i>
FACS	<i>flourescence activated cell sorter</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPR	Horseradish peroxidase

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kDa	kiloDalton
KM	Knochenmark
Krt	Keratin
min	Minute
MMTV	Mausmammatumovirus
MRD	minimale residuale Erkrankung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI	Pripidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
u-PAR	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
VSV-G	Vesikuläre Stomatitis Virus G
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
ü.N.	über Nacht

## Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. M. Jücker für die Anleitung und Betreuung der Arbeit sowie seine stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Prof. Dr. G. W. Mayr möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I durchführen zu können, sowie für die Betreuung meiner Arbeit als Erstgutachter.

Prof. Dr. S. Dobler möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und für die Erstellung des Zweitgutachtens danken.

Für das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Abteilung für Zelluläre Signaltransduktion bedanken.

Bei Prof. Dr. K. Pantel und Prof. Dr. B. Brandt vom Institut für Tumorbologie, (UKE, Hamburg) möchte ich mich für die hervorragende Kooperation bedanken. Zusätzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern K. Möllmann, Dr. K. Bartkowiak und Dr K. Effenberger für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Prof. Dr. U. Schumacher aus dem Institut für Anatomie II, (UKE, Hamburg) danke ich für die Möglichkeit und seinen technischen Mitarbeitern C. Köpke und S. Feldhaus für die Durchführung der Mausexperimente.

Dr. K. Milde-Langosch aus der Klinik für Gynokologie (UKE, Hamburg) möchte ich für die Proben der humanen Mammakarzinome danken.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern, die mein Studium durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben.