

4. DISKUSSION

Beim Multiplen Myelom handelt es sich um eine unheilbare Erkrankung, auch wenn die therapeutischen Erfolge der letzten Jahre das durchschnittliche Überleben der Patienten auf 5 Jahre erhöht haben. Der Nachteil der dabei zum Zuge kommenden klassischen Chemotherapeutika ist, dass sie die Entstehung und Selektion eines therapie-resistenten Tumorklons fördern. Aus diesem Grund versucht man die molekularen Ursachen für die Tumorentstehung und Entwicklung aufzuklären, um gezielter Angriffspunkte für therapeutisch nutzbare Substanzen zu finden. Dabei wurden in den letzten Jahren zwar große Fortschritte gemacht, jedoch ist der therapeutische Durchbruch hin zur Heilung oder zu einem chronischen, gutartigen Verlauf der Erkrankung bisher nicht gelungen (Barlogie *et al.*, 2004). Aus diesem Grund war es Ziel der Arbeit, die Bedeutung der Akt Kinase für das Überleben der MM Zellen und ihre Eignung als therapeutischen Angriffspunkt zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurde in einer großen Anzahl humaner solider und hämatologischer Tumore eine Überaktivierung von Akt festgestellt (Bellacosa *et al.*, 2005). In Mausmodellen wurde veränderte Akt Signaltransduktion direkt oder in Verbindung mit anderen genetischen Veränderungen als Ursache für maligne Entartung oder die Entstehung eines bösartigeren Phänotyps beschrieben (Bellacosa *et al.*, 2004).

Im Multiplen Myelom (MM) gibt es Hinweise darauf, dass der PI3K/Akt Signalweg zur Entwicklung und dem verbesserten Überleben der Tumorzellen beitragen könnte. Eine größere Anzahl Zytokine, darunter auch Interleukin-6 (IL-6) und "Insulin-like-growth-factor-1" (IGF-1), die vom Knochenmarkmilieu gebildet werden, aktivieren Akt in MM Zellen und tragen damit möglicherweise zum Wachstum, verbesserten Überleben und Chemotherapieresistenz der Tumorzellen bei (Lentzsch *et al.*, 2004; Hideshima *et al.*, 2001). Desweiteren wurde in 5 % der intramedullären Myelome, 20 % der Plasmazelleukämien und 20 % der MM Zelllinien Deletionen des Tumorsuppressorgens *PTEN* gefunden (Chang *et al.*, 2005). Heterozygote *PTEN*(+/-)-Mausmodelle entwickeln gehäuft Tumore (Di Cristofano und Pandolfi, 2000). *PTEN* ist eine Phosphatase, die Phosphoinositide an der Zellmembran dephosphoryliert und so die Rekrutierung von Akt an die Zellmembran, die für die Akt Phosphorylierung und Aktivierung nötig ist, verringert. Eine Inaktivierung von *PTEN* durch Deletion hat damit eine gesteigerte Aktivierung von Akt zur Folge. Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurde in Knochenmarkbiopsien von MM Patienten vermehrt phosphoryliertes Akt Protein gefunden (Hsu *et al.*, 2001). Da es bisher an selektiven und spezifischen Inhibitoren für Akt fehlte, wurden die Versuche zum PI3K/Akt Signalweg ausschließlich mit PI3K-Inhibitoren, wie LY294002 und Wortmannin durchgeführt (Pene *et*

al., 2002; *Tu et al.*, 2000). Dabei wird Akt gehemmt, aber auch alle anderen Signalwege in die PI3K eingreift.

Um herauszuarbeiten welchen Beitrag Akt zum verbesserten Überleben der MM Zellen leistet, wurden in dieser Arbeit die Akt Isoformen einzeln und in Kombination mittels eines pSUPER-Vektorkonstrukts, der die Synthese von "small interfering" RNA (siRNA) in Säugetierzellen vermittelt, ausgeschaltet. Für die transiente Transfektion mit diesen Vektorkonstrukten wurde AMO-1, eine Zelllinie bei der kein phosphoryliertes Akt in Western-Blot-Analysen darstellbar ist, und MM.1S Zellen, die unter unseren Kulturbedingungen ein starkes konstitutives phospho-Akt Signal zeigt, verwendet. Durch den Einsatz der siRNA wurde eine effiziente und spezifische Suppression der Akt-Expression in beiden Zelllinien erreicht. Über die Abnahme der phosphorylierten Form des Akt Substrates FoxO1 in MM.1S Zellen wurde die funktionelle Inaktivierung von Akt bestätigt.

Die siRNA-vermittelte Reduzierung von Akt1 und Akt2 und damit des gesamten Akt-Proteins in AMO-1 Zellen hatte keinen Einfluß auf das Überleben und das Wachstum dieser Zelllinie. Eine Erklärung dafür liefert die Beobachtung, dass Akt in AMO-1 Zellen nicht aktiviert zu sein scheint und damit wahrscheinlich keine Bedeutung für die Zellfunktion hat. Im Gegensatz zu MM.1S Zellen, bei denen Akt konstitutiv aktiviert ist und die Suppression von Akt1, und in geringerem Maße Akt2, zu Apoptose führt. In MM.1S Zellen hatte die Suppression von Akt3 nur eine geringe Abnahme der Viabilität zur Folge. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass die siRNA-vermittelte Reduzierung von Akt1 und Akt2 die stärkste Abnahme an phosphoryliertem Akt und der Akt Substrate zur Folge hat, wohingegen diese Effekte nach der Suppression von Akt3 gering waren. Das deutet darauf hin, dass Akt3 nicht phosphoryliert ist und damit nicht am Akt Signaling teilnimmt. Um diese Beobachtung zu bestätigen wären weitere Versuche, wie beispielsweise "In-vitro Kinase Assays" nötig.

Die Beobachtung, dass die einzelnen Akt Kinasen individuell zur verbesserten Viabilität der MM Zellen beitragen paßt zu der Feststellung, dass "knockout"-Mäuse einen unterschiedlichen Phänotyp entwickeln. So haben Akt1-"knockout"-Mäuse eine geringere Größe, Akt2-"knockout"-Mäuse entwickeln Diabetes mellitus-artige Symptome und Akt3-"knockout"-Mäuse haben eine verminderte Gehirngröße (Chen et al., 2001; Cho et al., 2001; Easton et al., 2005). Die Experimente von Chen *et al.* (2006), in denen die Nachkommen von *PTEN*(+/-) Mäusen, die mit Akt1(-/-) Mäusen gekreuzt wurden, deutlich weniger Tumore entwickelten, deuten auf eine herausragende Rolle von Akt1 zumindest in der *PTEN*-vermittelten Tumorentstehung hin.

Da es eine Zielstellung dieser Arbeit war, den Schwerpunkt auf die Untersuchung primärer MM Zellen zu legen und es aus technischen Gründen nicht möglich ist diese zu transfizieren, ist man auf die Verwendung eines Akt Inhibitors angewiesen. Als eine Folge der siRNA-Ergebnisse wurde Akti-1/2 gewählt, ein Akt1 und Akt2 spezifischer Inhibitor, um detaillierte funktionelle und Signaltransduktionsanalysen mit primären MM Zellen zu machen. Akti-1/2 ist ein allosterischer Inhibitor der die Phosphorylierung von Akt1 und Akt2 spezifisch in humanen Zellkulturzellen und in Mäusen hemmt. Es wird angenommen, dass die Bindung von Akti-1/2 an Akt zur Bildung einer inaktiven Konformation führt, in der Akt nicht von den "upstream"-Kinasen phosphoryliert werden kann und, dass dieser Prozess abhängig vom Vorhandensein der PH-Domäne ist. Diese Art isoform-spezifischer Inhibitoren werden zunehmend interessanter, da zahlreiche Untersuchungen sich mit den isoform-spezifischen Funktionen von Akt in unterschiedlichen Tumorentitäten beschäftigen, um dann die relevanten gezielt medikamentell zu beeinflussen (Toker *et al.*, 2006). Das ist vor dem Hintergrund von Bedeutung, dass die Akt Signaltransduktion in Zellfunktionen wie beispielsweise den Glukose-Metabolismus eingreift. Folglich ist es das Ziel nur die tumorrelevanten Isoformen auszugeschaltet, um die Toxizität für den Patienten zu minimieren. Falls sich im Falle des Multiple Myeloms das Ergebnis dieser Arbeit, dass Akt1 die für die Viabilität der Tumorzellen relevante Isoform ist, bestätigt, könnten durch den Einsatz Akt1-spezifischer Inhibitoren mögliche Nebenwirkungen wie Glukose-Intoleranz und Neurotoxizität vermieden werden.

Die Behandlung von MM.1S Zellen mit Akti-1/2 führte zu einer deutlichen Reduzierung der Phosphorylierung von Akt und dessen Substrat FoxO1. Desweiteren führte die Behandlung mit Akti-1/2 zur Induktion von Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen, was die Ergebnisse der siRNA Experimente widerspiegelte und so die Vermutung nahelegt, dass Akti-1/2 Akt spezifisch und selektiv hemmt. Da weder die siRNA-Konstrukte noch Akti-1/2 eine Beeinträchtigung der AMO-1 Zellen zur Folge hatte kann man ausschließen, dass es sich bei den Effekten in MM.1S Zellen um unspezifisch toxische Effekte der Substanzen handelte. Um den Einfluß der Akt Aktivität auf die Viabilität primärer MM Zellen zu untersuchen, wurden 30 MM Patientenproben mit Akti-1/2 behandelt und auf die Induktion von Apoptose untersucht. Dabei fiel die Aufteilung in eine gegenüber Akt Inhibition resistente und eine sehr sensitive Untergruppe auf. Die Phosphorylierung von Akt wurde in 26 dieser Patientenproben mittels IHC (n=19) oder intrazellulärer phospho-Akt Färbung und Durchflusszytometrie (n=20) untersucht. Die Korrelation des Vorhandenseins eines phospho-Akt Signals mit der Sensitivität gegenüber dem Inhibitor ergab, dass von den 10 phospho-Akt-positiven Proben in

der IHC 8 Akti-1/2-sensitiv und von 9 phospho-Akt-negativen Proben alle neun Akti-resistent waren. In den mittels intrazellulärer phospho-Akt Färbung und Durchflusszytometrie untersuchten Patientenproben zeigten 13 konstitutive Akt Aktivierung und davon waren 12 Akti-1/2-sensitiv, wohingegen alle 7 phospho-Akt-negativen resistent waren. Zusammengenommen zeigten 15 von 26 Patientenproben (58%) aktiviertes Akt und davon waren 13 sehr sensitiv gegenüber pharmakologischer Akt-Blockade mit Akti-1/2. Alle 13 phospho-Akt-negativen Proben waren Akti-1/2 resistent. Daraus ergibt sich eine starke Korrelation zwischen Akt Aktivität und der Sensitivität gegenüber Akt Inhibition ($p \leq 0.001$). Diese Beobachtung ist wichtig, wenn Akt Inhibitoren in Zukunft als therapeutisches Mittel in der Klinik eingesetzt werden sollen. Es wäre demnach zu erwarten, dass auf diese Therapie nur ungefähr 60% der Patienten ansprechen und, dass der Nachweis einer konstitutiven Akt Aktivierung ein prognostischer Hinweis für das Ansprechen wäre.

Als Ursache für eine konstitutive Aktivierung von Akt werden in anderen Tumoren unter anderem die autokrine Produktion von Zytokinen, Deletionen des Tumorsuppressors *PTEN*, aktivierende Mutationen in der katalytischen p110-Domäne von *PI3K*, *RAS* und, erst kürzlich beschrieben, von *Akt1* diskutiert (Altomare *et al.*, 2003; Eng *et al.*, 2003; Shayesteh *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1998; Carpten *et al.*, 2007). In MM Zelllinien verursachten *PTEN*-Deletionen eine konstitutive Akt Aktivierung, die durch die Transfektion eines *PTEN*-Konstruktes abgeschwächt wurde, was gleichzeitig die Sensitivität gegenüber PI3K-Inhibitoren verringerte (Hyun *et al.*, 2000). Da *PTEN*-Deletionen nur in 6% der intramedullären Myelome vorkommt, kann man einen geringen Teil der Akt-positiven Fälle (58% in unserer Untersuchung) damit erklären. Um eine weitere Ursache für die konstitutive Akt Aktivierung in den MM Patientenproben zu finden, wurde in 20 MM Patientenproben und 8 MM Zelllinien Akt1 im Bereich der beschriebenen Mutation sequenziert. Es wurde keine Mutation in Akt1 gefunden. In MM.1S Zellen könnte eine beschriebene *RAS*-Mutation die Ursache für die konstitutive Akt Aktivierung sein (Chesi *et al.*, 2001). *RAS*-Proteine sind membranständige GTPasen, die Signale verschiedener Zelloberflächenrezeptoren weitervermitteln und über die Bindung an die p85-regulatorische Untereinheit von PI3K Akt aktivieren können. In ungefähr 40% der intramedullären MM kommen aktivierende *RAS*-Mutationen vor (Neri *et al.*, 1989).

Diese Arbeit untersucht die Bedeutung der Akt Kinase für die Viabilität des MM. Dabei zeigte sich eine deutliche Heterogenität bei der Akt Signaltransduktion und es ergaben sich zwei funktionelle Gruppen: Akt-abhängige und Akt-unabhängige MM. Diese Feststellung könnte zu wichtigen Schlußfolgerungen für die Entwicklung neuer Therapien führen. Zum

einen könnte für einen Teil der Myelompatienten der Einsatz von Akt Inhibitoren eine sinnvolle Therapie darstellen. Desweiteren ist es möglich, dass die Akt Aktivität einen prognostischen Marker darstellt, der es abzuschätzen ermöglicht, ob ein Patient von einer bestimmten Therapie profitiert oder nicht.