

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der PI3K/Akt Signalweg scheint wesentlich zum verbesserten Überleben und der malignen Entwicklung des Multiplen Myeloms beizutragen. Da der Großteil der Daten aus Experimenten mit pharmakologischen Inhibitoren stammt, ist unklar, ob sie der Inhibition von Akt zuzuordnen sind oder unspezifische Effekte widerspiegeln. Die Akt-Kinase-Familie besteht aus drei homologen Isoenzymen, die trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit individuelle Funktionen haben könnten. In dieser Arbeit wurden genetische "knock-down"-Experimente mit Akt-siRNA-Konstrukten durchgeführt. Dabei bestand die Möglichkeit, die Isoenzyme einzeln und in Kombinationen auszuschalten und die Effekte auf die Viabilität der MM Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden durch eine ausführliche Analyse des Aktivierungsstatus und der funktionellen Bedeutung der Akt-Kinase für die Viabilität in primären MM Zellen vervollständigt (n=30).

Die Experimente mit siRNAs zeigten, dass in MM.1S, einer MM Zelllinie mit konstitutiver Akt Phosphorylierung, Akt1 und Akt2 zum Überleben beitragen, wohingegen Akt3 von geringerer Bedeutung war. Im Gegensatz dazu wurde die Viabilität von AMO-1, einer MM Zelllinie ohne erkennbare Akt Phosphorylierung, von einer Ausschaltung von Akt1 und Akt2 nicht beeinträchtigt. Die Behandlung dieser Zelllinien mit dem Akt1 und Akt2 spezifischen Inhibitor Akti-1/2 blockierte die Phosphorylierung von Akt und seines Substrates FoxO1 bei einer Konzentration von 10 μ M. Das löste in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen, Apoptose aus und spiegelte so das Ergebnis der siRNA-Experimente wider.

Im Folgenden wurde die Akt-Aktivität in einer größeren Anzahl MM Patientenproben mittels immunhistochemischer Analyse auf phospho-Akt und intrazellulärer phospho-Akt Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Eine konstitutive Akt-Aktivierung wurde in ungefähr 58% der MM Patientenproben festgestellt. Dieses konstitutive Akt-Signal wurde von dem Akt-Inhibitor Akti-1/2 in primären MM Zellen sowohl in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen als auch ohne inhibiert und führte in 50% der Proben zu deutlicher Apoptose. Die Patientenproben mit konstitutivem Akt-Signal reagierten größtenteils sensitiv auf Akt-Inhibition, wohingegen alle ohne sichtbare Akt-Aktivierung resistent waren.

Um die Ursache für die konstitutive Akt Aktivierung zu bestimmen, wurden MM Zellen von 20 Patientenproben auf eine beschriebene Akt1 Mutation untersucht. Diese wurde nicht gefunden. Da Deletionen des Tumorsuppressors *PTEN* aufgrund ihres selteneren Vorkommens nur in einer geringen Anzahl von Fällen für die Akt Aktivierung verantwortlich

sein können, wird es Bestandteil weiterer Untersuchungen sein, die Ursache für die konstitutive Akt-Aktivität zu finden.

Diese Arbeit zeigt grundlegende Unterschiede in der Akt Aktivierung von MM Zellen und definiert Untergruppen, die entweder abhängig oder unabhängig von der Aktivität von Akt überleben. Dabei scheinen Akt1 und Akt2 die im MM wichtigen Isoformen zu sein.

5. SUMMARY

The relevance of the Akt kinase for the viability of tumor cells and as a therapeutic target in multiple myeloma

The PI3K/Akt pathway has been reported to critically contribute to survival and malignant growth of multiple myeloma (MM). Because most of these data are based on pharmacologic inhibition it is not clear if the effects are due to Akt inhibition or off-target effects. Furthermore, the Akt family of kinases consists of three highly homologous isoforms, that may, nonetheless, display individual functional properties. We therefore conducted siRNA experiments to knock-down the isoforms individually and in combinations to assess their role for the viability of MM cells. This was complemented with extensive analyses into the functional and signaling properties of the Akt kinase in primary MM cells (n = 30).

Our knock-down experiments revealed that in MM.1S, an MM cell line with constitutive phospho-Akt signaling, Akt1 and Akt2 both contributed to MM cell survival whereas Akt3 seemed to be of less relevance. Conversely, survival of MM cell line AMO-1 which has no constitutive phospho-Akt signal was completely unaffected. Treatment of these MM cell lines with the Akt1 and Akt2 specific inhibitor Akti-1/2 showed that this drug totally abolished the phospho-Akt signal in MM.1S at a concentration of 10 μ M. Again, MM.1S cells underwent apoptosis whereas AMO-1 cells were resistant. Next, we analyzed Akt signaling in a large panel of primary MM samples. Phosphorylated Akt was determined with immunohistochemical staining in bone marrow biopsies and with intracellular staining and flow cytometry analysis in primary tumor samples and could be detected in about 58% of MM cases. This constitutive signal could be blocked with Akti-1/2 in the presence and absence of bone marrow stromal cells. Pharmacologic inhibition of Akt led to strong induction of cell death in 50% of primary MM samples, whereas the rest was largely resistant to Akt inhibition. The samples sensitive to Akt inhibition were mostly identical to those that displayed a constitutive phospho-Akt signal. Of interest, Akt1 mutation could be excluded as reason for constitutive Akt activation. Because the rare occurrence of *PTEN* deletions in MM there have to be performed further investigations to clarify the cause for the activation of Akt. This analysis indicates substantial heterogeneity in MM cells that defines Akt dependent and Akt independent MM subgroups. Akt1 and Akt2 proved relevant for the survival of subsets of MM cell lines and primary samples. Taken together, with this comprehensive functional and

molecular signaling analysis of primary MM samples it was possible to identify novel functionally defined myeloma subgroups.