

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Prognostische Bedeutung von Polymorphismen des Signalwegs
PI3K/PTEN/AKT/mTor bei Patienten
mit fortgeschrittenem Kopf-Hals-Karzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Judith Paz Mejía (geb. Pfisterer)

aus Kaiserslautern

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	2
2	Abstrakt	4
3	Einleitung.....	6
3.1	Kopf-Hals-Karzinom	6
3.1.1	Epidemiologie	6
3.1.2	Risikofaktoren	7
3.1.3	Pathogenese.....	9
3.1.4	Pathologie	13
3.1.5	Prognose	15
3.1.6	Symptomatik	17
3.1.7	Therapie.....	18
3.2	Der PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg	22
3.2.1	Die einzelnen Komponenten des PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalwegs	23
3.2.2	Der PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg im Kopf-Hals-Karzinom	25
3.3	Polymorphismus.....	26
3.3.1	Häufige genetische Veränderungen und Polymorphismen des PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalwegs in Karzinomen	27
4	Zielsetzung	30
5	Arbeitsprogramm.....	31
6	Material und Methoden.....	32
6.1	Patienten und Therapie	32
6.2	DNS-Extraktion.....	32
6.3	Quantitative Nukleinsäureanalyse	34
6.4	Qualitative Nukleinsäureanalyse	34
6.5	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	35
6.6	Gelelektrophorese	38
6.7	Statistische Analyse	39
7	Ergebnisse	41
7.1	Patientencharakteristika	41
7.2	Etablierung der PCR und Messung der Patientenproben.....	42
7.3	Genotypenfrequenz der Patienten.....	45
7.4	Korrelation zwischen SNPs und Therapieansprechen.....	45
7.5	Korrelation zwischen SNPs und Progressionsrisiko sowie PFS	45
7.6	Korrelation zwischen SNPs und Mortalitätsrisiko sowie OS	46
8	Diskussion	57
8.1	Die Bedeutung von Polymorphismen für Therapieansprechen und Erkrankungsverlauf.....	61
9	Zusammenfassung.....	63
10	Literaturverzeichnis	65
11	Eidesstattliche Versicherung/Anteilserklärung.....	72
12	Lebenslauf.....	74
13	Publikation.....	75
14	Danksagung	76

1 Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	v- <u>akt</u> murine <u>thymoma</u> viral oncogene homolog
BDNF	<u>B</u> rain <u>d</u> erived <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor
CI	Konfidenzintervall
Cis	<u>C</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu
CpG	<u>C</u> ytosin- <u>p</u> hosphatidyl- <u>G</u> uanin
CR	Komplette Remission
CUP	<u>C</u> ancer of <u>u</u> nknown <u>p</u> rimary
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid, Desoxyribonukleinsäure
EBV	<u>E</u> bstein <u>B</u> arr <u>V</u> irus
ECOG	<u>E</u> astern <u>C</u> ooperative <u>O</u> ncology <u>G</u> roup
EGFR	<u>E</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FRAP1	<u>F</u> K506 binding protein 12- <u>R</u> apamycin <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein <u>1</u>
FRET	<u>F</u> luorescence <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer
hhV	<u>h</u> äufige <u>h</u> omozygote <u>V</u> ariante
HPV	<u>H</u> umanes <u>P</u> apillom <u>v</u> irus
HR	<u>H</u> azard <u>R</u> isk, Risikoquotient
IRF6	<u>I</u> nterferon <u>r</u> egulatory <u>f</u> actor <u>6</u>
KHK	<u>K</u> opf- <u>H</u> als- <u>K</u> arzinom
LOH	<u>L</u> oss of <u>h</u> eterozygosity
MDR1	<u>M</u> ulti- <u>d</u> rug <u>r</u> esistance <u>1</u>
mTor	<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget of <u>R</u> apamycin
mTORC1+2	<u>M</u> ammalian <u>t</u> arget of <u>R</u> apamycin <u>c</u> omplex <u>1+2</u>
NSCLC	<u>N</u> on <u>s</u> mall <u>c</u> ell <u>l</u> ung <u>c</u> ancer
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
OR	<u>O</u> dds <u>R</u> atio, Quotenverhältnis
OS	<u>O</u> verall <u>s</u> urvival, Gesamtüberleben
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD	Progressive Erkrankung
PFS	<u>P</u> rogression <u>f</u> ree <u>s</u> urvival, progressionsfreies Überleben

PI3K	<u>P</u> hosphat <u>i</u> dylinositol- <u>K</u> inase- <u>3</u>
PI3KCA	Katalytische Untereinheit von PI3K
PIP2	<u>P</u> hosphat <u>i</u> dylinositol 4,5- <u>B</u> isphosphat
PIP3	<u>P</u> hosphat <u>i</u> dylinositol 3, 4, 5- <u>T</u> risphosphat
PKB	<u>P</u> roteink <u>i</u> nase <u>B</u>
PR	<u>P</u> artielle <u>R</u> emission
PRAS40	<u>P</u> rolin- <u>r</u> eiches <u>A</u> kt- <u>S</u> ubstrat <u>40</u> kDa
pRb	<u>R</u> etinoblastom- <u>P</u> rotein
PTEN	<u>P</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog
Ras	<u>R</u> at <u>s</u> arcoma protein
RECIST	<u>R</u> esponse <u>E</u> valuation <u>C</u> riteria in <u>S</u> olid <u>T</u> umors
Rheb	<u>R</u> as <u>h</u> omolog <u>e</u> nriched in <u>b</u> rain
RNA	<u>R</u> ibon <u>u</u> leic <u>a</u> cid, Ribonukleinsäure
rtPCR	<u>R</u> eal <u>t</u> ime <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
SD	Stabile Erkrankung
shV	<u>s</u> eltene <u>h</u> omozygote <u>V</u> ariante
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
SYNE1	<u>S</u> ynaptic <u>n</u> uclear <u>e</u> nvelope <u>1</u>
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA
TP	<u>T</u> umor- <u>P</u> rotein
TrkB	<u>T</u> ropomyosin- <u>r</u> elated <u>k</u> inase <u>B</u> receptor
TSC1+2	<u>T</u> uberöse <u>S</u> klerose Komplex <u>1+2</u>
TTP	<u>T</u> ime <u>t</u> o <u>p</u> rogression
VEGF	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
XRCC1	<u>X</u> -ray <u>r</u> epair <u>c</u> ross- <u>c</u> omplementing grou

2 Abstrakt

Deutsch

Hintergrund: Ziel der Studie war es zu ermitteln, ob Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in *AKT1*, *AKT2*, *FRAP1* (Proteinname: *mTor*), *PIK3CA* und *PTEN* mit Therapieansprechen und klinischem Outcome in Patienten mit fortgeschrittenem, plattenepithelialem Kopf-Hals-Karzinom assoziiert sind (HNSCC).

Material und Methoden: Genomische DNA wurde aus formalinfixiertem Gewebe von 45 Patienten mit rezidiviertem und/oder metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom extrahiert. SNPs wurden mittels real-time-Polymerase-Ketten-Reaktion (rtPCR) genotypisiert.

Ergebnisse: Die beiden homozygoten Varianten von *AKT2:rs8100018* und *PTEN:rs12569998* resultieren in ein signifikant höheres Risiko der Krankheitsprogression [HR 4.83 (95% CI, 1.11-21.03) und HR 2.36 (95% CI, 1.24-4.50)]. Zudem konnte bei diesen SNPs ein additiver Effekt bezüglich des Progressionsrisikos festgestellt werden. Die homozygote Variante von *AKT2:rs8100018* war signifikant mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert [HR of 3.57 (95% CI, 1.06-12.00)], während das Vorhandensein zumindest eines varianten Allels von *AKT1:rs3803304* mit einem erniedrigten Mortalitätsrisiko zusammenhing (HR: 0.51; 95% CI, 0.27-0.97).

Schlussfolgerung: Wir fanden Genotypen, die mit dem klinischem Outcome von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom assoziiert waren, welche eventuell eine Bedeutung bei der Identifizierung einer Zielpopulation für die Therapie mit Cetuximab und Docetaxel innehaben. Diese Ergebnisse sollten als vorerst richtungsweisend angesehen werden und bedürfen weiterer Validierung durch größere klinische Studien.

Englisch

Background: The purpose was to determine whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *AKT1*, *AKT2*, *FRAP1* (name of protein: *mTor*), *PIK3CA* and *PTEN* were associated with treatment response and clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

Material and Methods: Genomic DNA was extracted from formalin-fixed tissue of 45 patients with recurrent or initially metastatic HNSCC and SNPs were genotyped by means of Real Time PCR system or direct sequencing.

Results: The *AKT2:rs8100018* and the *PTEN:rs12569998* homozygous variants resulted associated with an increased risk of progression [HR 4.83 (95% CI, 1.11-21.03) and 2.36 (95% CI, 1.24-4.50), respectively]. An additive effect on risk of progression in these SNPs was observed. The *AKT2:rs8100018* homozygous variant was significantly associated with higher risk of death with HR of 3.57 (95% CI, 1.06-12.00) while presence of at least one variant allele of *AKT1:rs3803304* was associated with a lower risk of death (HR: 0.51; 95% CI, 0.27-0.97).

Conclusion: We identified combined genotypes associated with outcome of HNSCC which might have an impact for identification of a target population for cetuximab-docetaxel treatment. Results should be considered as initial finding and warrant validation in larger clinical trials.

3 Einleitung

3.1 Kopf-Hals-Karzinom

3.1.1 Epidemiologie

In Industrienationen ist heutzutage Krebs die häufigste und in Entwicklungsländern die zweithäufigste Todesursache (World Health Organization. The global burden of disease: 2004 Update, 2008). Im Jahr 2008 traten weltweit insgesamt ungefähr 12,7 Millionen Krebsfälle und 7,6 Millionen Krebstodesfälle auf. Davon waren ungefähr 348.300 bzw. 179.600 durch das Kopf-Hals-Karzinom (im Weiteren als KHK bezeichnet) bedingt. Somit ist es das sechsthäufigste Tumorleiden weltweit. Das mediane Alter bei Diagnosestellung in Deutschland beträgt bei Männern 61 und bei Frauen 66 Jahre; im Jahre 2008 wurden ca. 17.130 Neuerkrankungen und 6.430 Sterbefälle dokumentiert (RKI-Register, 8. Ausgabe, 2012). Interessanterweise besitzen Industrienationen eine annähernd zweifach höhere Inzidenz aller Krebsarten als Entwicklungsländer, wohingegen vergleichsweise die Mortalitätsrate in Industriestaaten nur um 21% für Männer und 2% für Frauen erhöht ist. So rangiert die Inzidenz von Mundhöhlenkrebs in Entwicklungsländern beispielsweise bei Männern auf Platz 9 und befindet sich auf Platz 10 aller letal verlaufenden Krebsfälle. Diese eklatanten Unterschiede in Inzidenz und Mortalität in Entwicklungs- oder Industrieländern sind durch regionale Besonderheiten bedingt, wie durch die Verteilung der Risikofaktoren, das Vorhandensein von Präventions- und Aufklärungsmaßnahmen, wirtschaftliche Verhältnisse, das Herrschen ethnischer Sitten und Bräuchen bei Genussmitteln und die Verfügbarkeit medizinischer Diagnostik und anschließender Therapie (Jemal u. a., 2011). Eine Übersicht der Inzidenz und Mortalität gibt Tab. 1 und 2.

In den letzten Jahrzehnten gelang es, einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) und der Entstehung einer eigenen Entität des Kopf-Hals-Karzinoms, des HPV-positiven KHK, festzustellen. Die Bedeutung dieses Erkenntnis wuchs auch aufgrund der Tatsache, dass sich die Inzidenz der HPV-negativen zu Gunsten der HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinome verschob. Jener Trend im Rückgang der HPV-negativen Karzinome steht wohl einerseits mit einem verminderten Tabakkonsum der jüngeren Vergangenheit und andererseits mit einer Verbreitung des HPV in Verbindung (Sturgis u. a., 2007).

<u>Inzidenz</u>	gesamt	Männer	Frauen
Alle Krebsarten	1.596.670	822.300	774.370
KHK insgesamt	39.400	27.710	11.690
• Mundhöhle	11.510	6.950	4.560
• Pharynx	13.580	10.600	2.980
• Zunge	12.060	8.560	3.500
• Andere	2.250	1.600	650

Tabelle 1: Inzidenz des Kopf-Hals-Karzinoms in den Vereinigten Staaten unterteilt in Untergruppen; geschlechtergetrennt und gesamt.

<u>Mortalität</u>	gesamt	Männer	Frauen
Alle Krebsarten	571.950	300.430	271.520
KHK insgesamt	7.900	5.460	2.440
• Mundhöhle	1.790	1.130	660
• Pharynx	2.430	1.740	690
• Zunge	2.030	1.320	710
• Andere	1.650	1.270	380

Tabelle 2: Mortalität des Kopf-Hals-Karzinoms in den Vereinigten Staaten unterteilt in Untergruppen; geschlechtergetrennt und gesamt. (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2011. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2011)

3.1.2 Risikofaktoren

Mittlerweile sind viele Risikofaktoren für die Entstehung des KHK bekannt. Tabakrauch, rauchfreie Tabakprodukte, der Genuss von Betelnüssen, fruchte- und gemüsearme Ernährung, hochprozentiger Alkohol, schlechte Mundhygiene, Infektion mit HPV, Infektion mit EBV (bei genetischer Disposition, insbesondere die Entstehung von Nasopharynxkarzinomen) sowie die seltene autosomal rezessive Fanconi-Anämie tragen zur Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen bei, wobei gleichzeitiger Alkohol- und Tabakgenuss nicht nur additive, sondern auch synergistische Effekte aufweist (Blot u. a., 1988; Macfarlane u. a., 1995; Mork u. a., 2001; Abdulmir u. a., 2008; Hashibe u. a., 2009; Thompson, 2005).

Einleitung: Kopf-Hals-Karzinom, Risikofaktoren

Tabak und Alkohol, insbesondere hinsichtlich der Stärke und der Dauer des Genusses, sind die beiden Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des KHK. Bei Nichtrauchern stellt Alkoholgenuss und bei Nichttrinkern Tabakrauch den stärksten Risikofaktor dar. Alkohol wirkt nicht direkt karzinogen, sondern erleichtert als „Lösungsmittel“ Karzinogenen den Zugang und Angriff auf die Mukosa. Tabak enthält mehr als 50 bekannte Karzinogene (z. B. Nitrosamine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), die zur Genese des KHK beitragen (Brooks u. a., 2005). Im Vergleich zu anderen, helleren Tabakarten erwies sich besonders der schwarze Tabak mit einer OR von 5,4 als erheblich krebserregend (Castellsagué u. a., 2004).

Um den Einfluss dieser beiden Risikofaktoren zu verdeutlichen, seien hier die Ergebnisse von Marur und Forastiere (2008) sowie von Castellsagué u. a. (2004) erwähnt: Das Erkrankungsrisiko bei starken Rauchern sei zwanzigfach, bei starken Trinkern fünffach erhöht. Durch oben erwähnte synergistische Wirkung steigt bei gleichzeitig starkem Rauch- und Trinkverhalten das Erkrankungsrisiko für KHK auf das bis zu 40- bis 50-Fache an. In Anbetracht der Lokalisation der Karzinome zeigte sich, dass Alkoholabusus eher zur Krebsentstehung im Oropharynx-Bereich als im Mund-Bereich beiträgt. Bezüglich des Tabakgenusses wurde solch eine starke Unterscheidung nicht gefunden (Castellsagué u. a., 2004).

Auch die Kombination von Betelnusskauen, welches vornehmlich in Ostafrika und Asien gebräuchlich ist, mit Alkoholgenuss steigert das Risiko für Karzinome der Mundhöhle um den Faktor 24 (Znaor u. a., 2003).

Des Weiteren fanden Hashibe und Kollegen (2006) heraus, dass bestimmte Polymorphismen in den Enzymen von Tabak- und Alkoholmetabolisierung mit einem erhöhten KHK-Risiko in Verbindung gebracht werden konnten.

Das humane Papillomavirus kommt ubiquitär vor und ist sexuell übertragbar. Dank eines intakten Immunsystems können die allermeisten Infektionen erfolgreich bekämpft werden und bleiben für den Betroffenen asymptomatisch. Heute kann eindeutig belegt werden, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem HPV (vornehmlich HPV 16) und der Entstehung von Oropharynxkarzinomen, insbesondere an Zungengrund und Tonsillen, besteht. Einige Studien zeigten, dass sowohl Oralverkehr und Marihuana-Konsum mit der Entstehung HPV-positiver KHK assoziiert sind, als auch, dass deren Tumorgenese von Tabak- und/oder Alkoholgenuss sowie mangelnder Mundhygiene unabhängig ist. Hieraus lässt sich erklären, weshalb sich in der HPV-positiven KHK-

Patientengruppe mehr Nichtraucher finden lassen als in der HPV-negativen-Gruppe (Gillison u. a., 2008, 2004; D'Souza u. a., 2007). (Weiterführende Informationen über die Entstehungsmechanismen des HPV-positiven KHK siehe Pathogenese).

Eine häufigere Tumorlokalisation bei Nichtrauchern ist das Zungenrandkarzinom. Larynx-, Hypopharynx- und Zungengrundkarzinome sind dagegen besonders zahlreich unter Rauchern zu finden (Koch u. a., 1999).

3.1.3 Pathogenese

Ebenso wie andere Karzinome entsteht das HPV-negative KHK etappenweise von der gutartigen Hyperplasie, über die Dysplasie, das Carcinoma in situ (Cis), bis hin zum invasiven Karzinom. Der Übergang eines Stadiums in das nächste geht mit dem Funktionsverlust einzelner Chromosomenabschnitte einher (siehe Abb. 1).

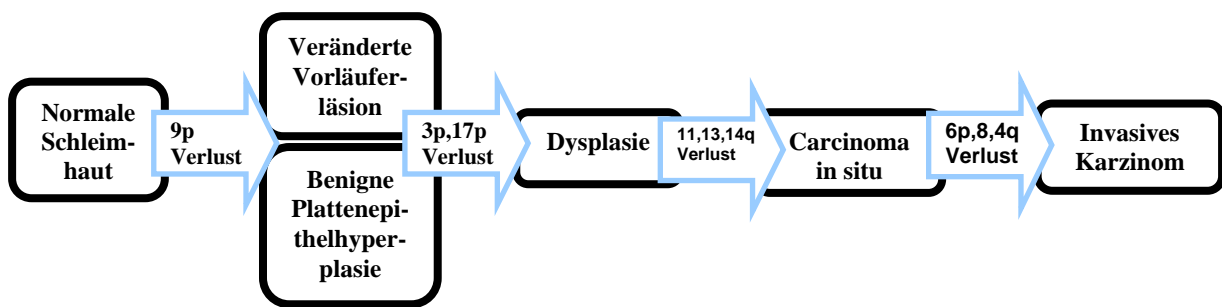


Abbildung 1: Genetisches Progressionsmodell für plattenepitheliale Kopf-Hals-Karzinome (Califano et al., 1996).

Eine fakultative Präkanzerose mit Entartungspotenzial stellt die Leukoplakie und die Erythroplakie dar, wobei die Erkrankungswahrscheinlichkeit für ein KHK bei erstgenannter bei 2-5 % und bei letztgenannter sogar bei über 50 % innerhalb von zehn Jahren liegt (Mashberg, 1977).

Leider stellen sich 2/3 aller Patienten mit KHK erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ärztlich vor, meist mit Befall der regionalen Lymphknoten. Schon vorhandene Fernmetastasen weisen 10 % der Patienten auf (Cooper u. a., 2009).

In entwicklungsrückständigen Ländern könnten unregelmäßige oder fehlende Routineuntersuchungen beim Zahnarzt dafür verantwortlich sein, dass „Vorwarnstufen“, wie die Dysplasie oder das Cis, nicht erkannt werden; ebenfalls mögen Risikodysplasien oft nicht als solche zu erkennen sein.

Bereits im Stadium der Dysplasie ergaben Untersuchungen von genetischen Markern, dass auffällige Gewebe häufig Alterationen aufweisen:

- Chromosom 9: 9p-Verlust im p16- und p14ARF-Gen
- Chromosom 3: 3p-Deletion im FHIT-, MLH1- und XPC-Gen
3q-Amplifikation im LAZ3-, BCL-6-, PI3KCA- und AIS-Gen
- Chromosom 17: 17p-Verlust im p53-Gen
(Califano u. a., 1996; Patmore u. a., 2005)

P53 ist im KHK nahezu vollständig inaktiviert, sei dies durch somatische Mutation oder HPV-Infektion bedingt. In mehr als 50 % der Fälle ist eine Mutation dafür verantwortlich (Stransky u. a., 2011). Der Funktionsverlust von p53 auf Chromosom 17 ist an der Progression des präinvasiven in das invasive Karzinom beteiligt und begünstigt außerdem die Entstehung weiterer Malignome (Hartwell u. a., 1994).

Die chromosomalen Veränderungen im Stadium des Karzinoms betreffen eine Vielzahl von zellulären Regulationsmechanismen (siehe Abb. 2), wie sie auch in anderen Tumorentitäten häufig anzutreffen sind; zu nennen sind hier die wesentlichen Angriffspunkte:

- Chromosom 13: 13q-Verlust im Rb-Gen
- Chromosom 11: 11q-Amplifikation im PRAD1-Gen
- Chromosom 8: 8q-Amplifikation im C-myc- und lyn-Gen
(Califano u. a., 1996; Patmore u. a., 2005)

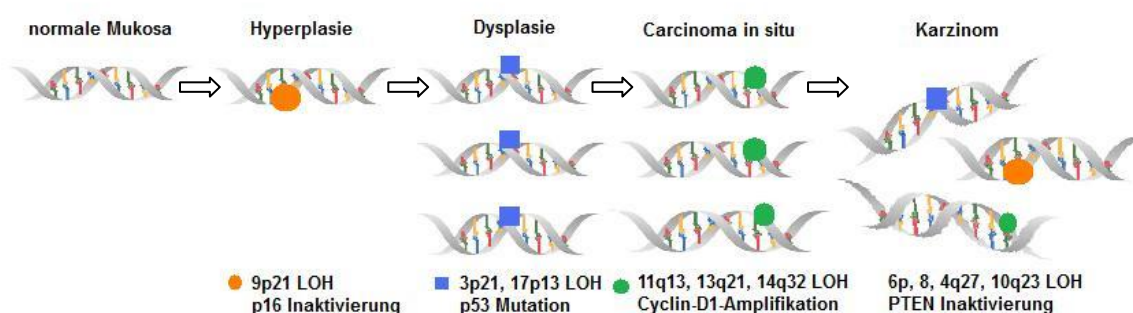


Abbildung 2: Genetische Veränderung im Laufe der Entstehung des KHK. LOH: Loss of heterozygosity (Forastiere u. a., 2001, geändert).

Einleitung: Kopf-Hals-Karzinom, Pathogenese

Gene, die die epidermale Entwicklung beeinflussen, sind mit hoher Frequenz bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs mutiert. Hierzu zählen z. B. das IRF6-, das TP63- und das NOTCH1-Gen, welche an der Plattenepithel-Differenzierung maßgeblich beteiligt sind. Punktmutationen der NOTCH-Gene (Gen 1→Chromosom 9q, Gen 2→Chromosom 1p, Gen 3→Chromosom 19p) spielen in der Karzinogenese eine wichtige Rolle. Missense-, Nonsensemutationen, Deletionen, Indels (Kombination aus Insertion und Deletion) und Mutationen in der Splice-Region zwischen Intron und Exon sind Funktionsverlustmutationen und resultieren in einer gestörten Zelldifferenzierung und somit in der Entstehung oder Progression des KHK. TP63 und IRF6 sind NOTCH vorgeschaltet und bewirken eine Änderung seiner Aktivität.

IRF6 –| TP63 –| NOTCH1,2,3 → Zelldifferenzierung.

Diese genannten Gene, aber auch CDKN2A (=p16, Zellzyklus-Regulation, Apoptose), VEGF (Angiogenese), CXCR4 (Transkription, Chemokine), CDH1 (Adhäsion), CASP8, FAT1, SYNE1, HRAS, PIK3CA, EGFR sowie PTEN und viele mehr sind oftmals von Alterationen im Genom betroffen (Forastiere u. a., 2001; Hunter u. a., 2005; Stransky u. a. 2011).

Während bei der Entstehung von HPV-negativen Karzinomen sehr häufig eine Mutation des Tumorsuppressor-Gens p53 beteiligt ist (s.o.), spielen dagegen die viralen Onkogene E6 und E7 beim HPV-positiven KHK für eine Inaktivierung von p53 und pRb (Retinoblastom-Protein) eine enorme Rolle. Die Onkogen-Produkte E6 und E7 binden an die unveränderten, nicht mutierten p53- und Rb-Proteine und inaktivieren diese (siehe Abb. 3), wodurch die Apoptosein-

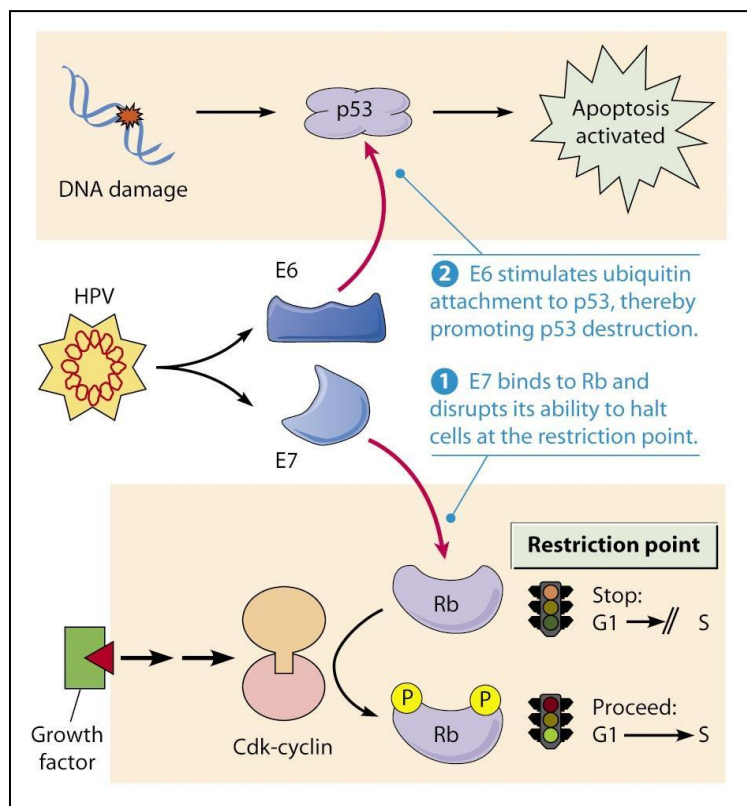


Abbildung 3: Rolle der viralen Onkogene E6 und E7 bei der Inaktivierung von p53 und Rb. (<http://liveonearth.livejournal.com/612978.html>, 15.01.2015)

Einleitung: Kopf-Hals-Karzinom, Pathogenese

duktion gestört, die Zellzyklus-Proliferation angetrieben und somit die Tumorgenese im Plattenepithel initiiert wird (Gasco u. a., 2003). Oben erwähnte Tatsache stützend, zeigten Studien, dass HPV-positive Karzinome eine sehr niedrige Mutationsrate des p53 und hingegen HPV-negative eine Rate von bis zu 78 % aufwiesen; der HPV-Status ist folglich invers mit der Mutation von p53 korreliert (Stransky u. a., 2011; Agrawal u. a., 2011). Stransky und Kollegen konnten weiterhin einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Tabakgenuss und einer Transversion von Guanin zu Thymin (G→T) in nicht CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln) im Genom belegen. Darüber hinaus wiesen Patienten mit Nikotingenuss in der Vorgeschichte und häufigen G→T-Transversionen eine erhöhte „overall“-Mutationsrate auf.

3.1.4 Pathologie

Wie die meisten Tumorerkrankungen kann das KHK anhand verschiedener Kriterien in Stadien (sog. **Staging**) unterteilt werden. In die Beurteilung fließen die Tumorlokalisation und -größe (**T**), der Lymphknotenbefall und dessen Anzahl (**N**) sowie das eventuelle Vorhandensein von Fernmetastasen (**M**) ein. Ferner kommen noch andere Kriterien, außerhalb des TNM-Stagings, für die Bewertung eines Tumors hinzu, wie z. B. Ausbreitungsmuster, zelluläre Pleomorphie, Anzahl und Art von Mitosefiguren, Art des zugrunde liegenden Zelltyps und ebenfalls dessen Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe (Grading 1-3). Anhand des American Joint Committee on Cancer (AJCC) ist es möglich, das KHK in die Stadien I-IV zu unterteilen (siehe Tab. 3).

Stage	TNM-Klassifikation		
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	oder T1-T3	N1	M0
IVA	T4a	N0-N2	M0
	oder T1-T3	N2	M0
IVB	T4b	any N	M0
	oder any T	N3	M0
IVC	any T	any N	M1

Tabelle 3: Schweregradeinteilung (Staging) des Kopf-Hals-Karzinoms
 (Cancer Staging Manual, 7. Auflage, New York, Springer 2009, S. 65)
 (<http://www.cancer.org/Cancer/OralCavityandOropharyngealCancer/DetailedGuide/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer-staging>, 15.01.2015).

Das Kopf-Hals-Karzinom ist ein Überbegriff für eine Vielzahl an einzelnen Tumorentitäten mit unterschiedlichen Ursprungsgeweben, Ätiologien und Prognosen, aber durchaus gemeinsamen Risikofaktoren; bezüglich der Lokalisation werden folgende Karzinome hinzugezählt:

Karzinome

- **der Mundhöhle** (Mundschleimhaut, Zunge, Mundboden, harter Gaumen, Zahnfleisch, Trigonum retromolare),
- **des Naso-, Oro- und Hypopharynx,**
- **der Nasenhöhle,**
- **der paranasalen Nebenhöhlen** (maxilläre, ethmoidale, sphenoidale, frontale Sinus), sowie
- **der Trachea,**
- **des Larynx** (supra- und subglottisch, Stimmbänder) und der
- **großen Speicheldrüsen** (Parotis, Submandibular- und Sublingualdrüsen).

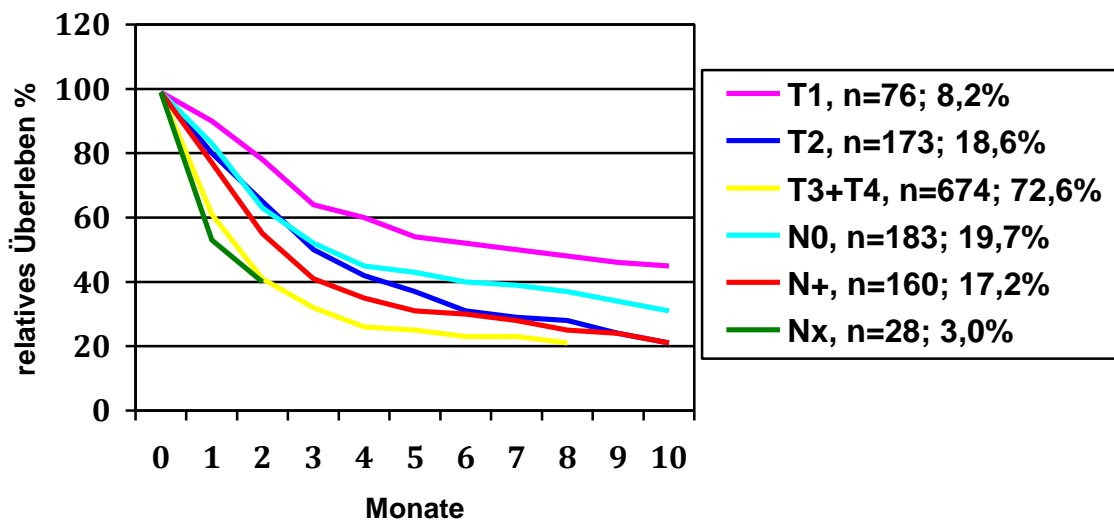
Einige Patienten jedoch präsentieren sich bei erstmaligem Arztkontakt alleinig mit zervikalen Lymphknotenmetastasen eines Plattenepithelkarzinoms bei unbekanntem Primärtumor (CUP). Im weiteren Krankheitsverlauf kann häufig dann das Lymphepithel des Waldeyer-Rachenrings oder der Zungengrund als Primarius detektiert werden (Califano u. a., 1999).

Das Plattenepithelkarzinom, verhornend oder nicht verhornend, stellt unter den KHK den Großteil mit über 95 % dar. Besonders häufig findet es sich am Mundboden, der Zunge und am harten Gaumen. Der Differenzierungsgrad reicht vom gut differenzierten verhornenden über das schlecht differenzierte nicht-verhornende Karzinom bis hin zum anaplastischen Karzinom mit sarkomatoidem oder verrukösem Wachstumsmuster.

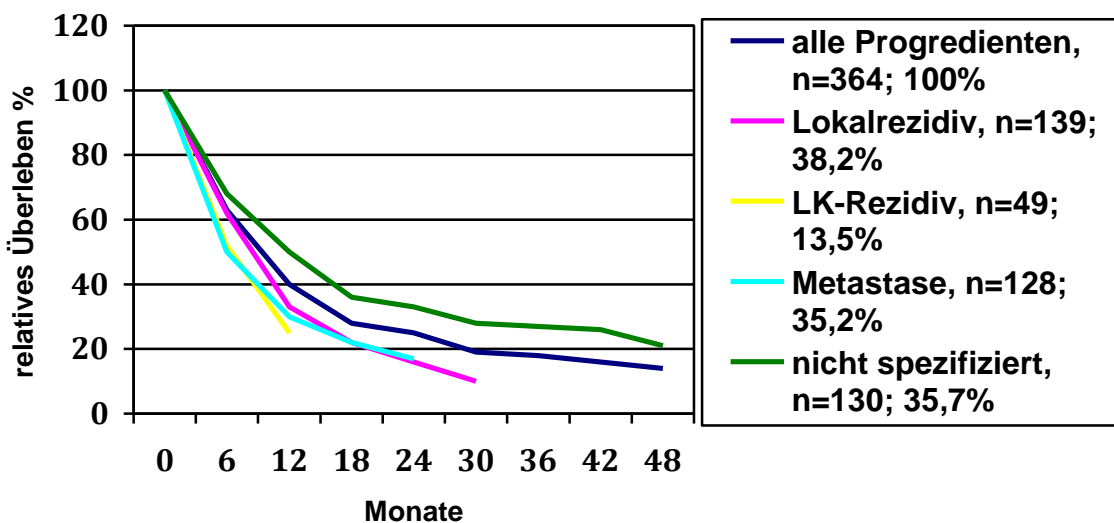
Die anderen histologischen Karzinomtypen sollen aufgrund ihrer sehr seltenen Inzidenz nur der Vollständigkeit halber Erwähnung finden: Adenokarzinome (tubulär, papillär), adenoidzystische Karzinome und polymorphe low-grade Karzinome (v. a. der kleinen Speicheldrüsen), Azinus-Zell-Karzinom (90 % in Parotis), gemischte Tumore, Speichelgangkarzinome (bes. beim männlichen Geschlecht) und lymphoide Tumore (Hunter u. a., 2005; Abeloff MD u. a. Abeloff's Clinical Oncology, 2008: S. 1177 ff).

3.1.5 Prognose

Bei Zusammenfassung aller Tumorstadien des KHK vom Plattenepithel-Typ liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 50-60 % (Jemal u. a., 2011). Von besonderem Interesse ist die Therapieverbesserung für Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem KHK. Trotz erheblicher Fortschritte der Onkologie in der systemischen Therapie für diese Patientengruppe beträgt auch heute noch das mediane progressionsfreie Überleben sechs Monate sowie das Gesamtüberleben (sowohl HPV+/-) weniger als ein Jahr (Price u. a., 2012; Vermorken u. a., 2008; Forastiere u. a., 2001; Haddad u. a., 2008). Grafik 1 und 2 zeigen beispielhaft die Prognosen des Hypopharynx-Malignoms.



Grafik 1: Relatives Überleben nach pT und pN für Malignome des Hypopharynx (Manual Kopf-Hals-Malignome, Tumorzentrum München, 2009).



Grafik 2: Relatives Überleben ab der 1. Progression beim Hypopharynxkarzinom innerhalb der ersten fünf Jahre (Manual Kopf-Hals-Malignome, Tumorzentrum München, 2009).

Leider gibt es keinen idealen prognostischen Faktor, der sowohl das biologische Verhalten des Karzinoms, sein Therapieansprechen, als auch das klinische Outcome der Patienten vorhersagt. Bisher haben sich aber einige Faktoren als richtungsweisend herausgestellt: Tumorstadium (s.o. bei Pathologie), Gesundheitszustand, Komorbidität sowie die Fähigkeit der Patienten, die lokoregionale aggressive Therapie einzuhalten und zu tolerieren, haben starke Auswirkungen auf die Therapieentscheidung und folglich ebenfalls auf die Prognose der Patienten. Die Aggressivität der Therapieschemata ist durch die z. T. sehr hohe Toxizität der Radiochemotherapie und die besondere Sensibilität des Zielgewebes bedingt und birgt die Gefahr der Behandlungsunterbrechung oder gar des Behandlungsabbruchs (z. B. durch Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Fatigue, die Entwicklung einer Anämie, Schmerzen durch Strahlendermatitis und Schleimhautablösung). Sowohl die Zeitspanne zwischen Operation und Beginn der Radiochemotherapie als auch die Gesamtbehandlungszeit von Operation bis Therapieende sind von herausragender Bedeutung. Therapieverzögerungen von mehr als sechs Wochen sind zu vermeiden; als optimal wird eine Gesamtbehandlungszeit von weniger als elf Wochen angesehen.

Unter Miteinbeziehung aller genannten Faktoren ergibt sich die Einschätzung, ob eine Therapie in kurativer oder palliativer Absicht eingeleitet bzw. fortgeführt wird.

Die Prognose eines Karzinoms hängt ebenfalls maßgeblich von der Rezidivrate der ausgewählten Therapie ab. Die Entscheidungskriterien, welche Therapieform bei welcher Art des KHK angewendet wird, sind in der Onkologie/Onkochirurgie sehr komplex. Da bisher die Rezidivraten sowohl nach Operation als auch nach primärer Radiochemotherapie sehr ähnlich sind, muss im Einzelfall abgewogen werden, welche Konsequenzen die jeweilige Therapieoption mit sich bringt. Hierbei stehen Mutilation, schmerzhaftes Vernarben und Funktionseinschränkung nach Operation den Nebenwirkungen und Spätkomplikationen der Radiochemotherapie (Zweitumore, Organtoxizität, eingeschränkte Fertilität, Fatigue-Syndrom etc.) gegenüber. Die Entscheidung über die passende Therapieform sollte durch einen Konsens von Onkologen, Chirurgen und Patienten erfolgen (Abeloff MD u. a. *Abeloff's Clinical Oncology*, 2008: S. 1177 ff).

Letztendlich beeinflussen vielerlei Faktoren die Therapieform und Prognose eines Patienten. Auch die Heterogenität der Patientenkonstitution im Hinblick auf das Ansprechen der Radio- und/oder Chemotherapie wird wahrscheinlich durch mehrere zusammentreffende Kriterien bedingt. Hierzu zählen sowohl Alter, Geschlecht, Ethnizität als auch Medikamentenwechselwirkungen (Evans u. a., 1999). Ebenso verhält es sich mit genetischen Variatio-

nen (Polymorphismen) in der Pharmakokinetik, -dynamik und dem Medikamentenwirkungsprinzip, die als bedeutende Determinanten bezüglich der Sensitivität und Resistenz gegenüber der Behandlung gelten. Es gibt bisher einige Studien, die sich mit dem fortgeschrittenen KHK und dem Ansprechen einer Behandlung in Bezug auf genetische Alterationen oder Ausprägungen von Schlüsselproteinen beschäftigen (Farnebo u. a., 2013; Bontognali u. a., 2013; Hildebrandt u. a., 2012).

Des Weiteren besitzen Patienten, die an einem HPV-assoziierten Malignom erkrankten, ein signifikant niedrigeres Risiko, an ihrem Tumorleiden zu versterben, als HPV-negative Patienten. Unter Umständen könnte diese Tatsache darauf zurückzuführen sein, dass bei Erstgenannten eine erhöhte Strahlensensitivität und keine Feldkanzerisierung besteht (Gillison u. a., 2000).

3.1.6 Symptomatik

Symptome von Patienten, die an einem KHK erkranken, sind u.a. Schmerz, Dysphagie, Dysphonie, Otalgie, Heiserkeit, häufige Epistaxis, nasale Obstruktion bis zu respiratorischer Insuffizienz, oropharyngealer Soor und Zitrusintoleranz. Die Patienten suchen deshalb häufig den Allgemeinmediziner oder Hals-Nasen-Ohren-Arzt auf.

HPV-positive Oropharynxkarzinome weisen häufig folgende Besonderheiten auf: Die betroffenen Patienten sind bei Diagnosestellung im Durchschnitt fünf bis zehn Jahre jünger als HPV-negative KHK-Patienten. Der Primärtumor ist eher klein (T1-T2) und es bestehen meist frühzeitig schmerzlose, geschwollene, zervikale Lymphknotenmetastasen, die oft zystische Anteile besitzen. Bei Interpretation eines negativen Ergebnisses der Feinnadelpunktion des verdächtigen Lymphknotens zur Diagnosesicherung muss bedacht werden, dass es hierdurch zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann. Die Karzinomzellen stellen sich als weniger differenziert mit mehr basaloiden Anteilen dar.

Lokalrezidive des HPV-positiven und -negativen KHK werden meist in der klinischen Untersuchung oder durch die Nasopharyngoskopie diagnostiziert, eventuell begleitet von neu aufgetretenem Schmerz. Meist durch bildgebende Verfahren in der Nachsorge können asymptomatische Metastasen aufgedeckt werden; Husten und ebenfalls Schmerzen können hier auftreten. Zusätzlich kann die Blutuntersuchung auffällige Laborparameter ergeben, wie Erhöhungen des Kalziumspiegels, der alkalischen Phosphatase oder suspekter

Leberwerte, welche durch distale Metastasen v. a. in Lunge, Lymphknoten, Knochen und Leber entstehen können (Price u. a., 2012). Bei Epstein-Barr-assoziierten Karzinomen kann die DNA-Viruslast im Plasma und Serum als Monitorinstrument verwendet werden (Lo u. a., 1999).

3.1.7 Therapie

Therapieoptionen des KHK sind Operation, Radio- und/oder Chemotherapie sowie die Antikörpertherapie.

Lokal fortgeschrittene Erkrankung:

Operation und gleichzeitige Radiochemotherapie sind Mittel der Wahl, um Stadium III und IV zu behandeln. Die Radiochemotherapie des fortgeschrittenen KHK hat sich im Laufe der Zeit von einer rein palliativen zu einem zentralen Aspekt der kurativen Therapie gewandelt (Cohen u. a., 2004). Bei nicht resezierbaren Karzinomen, die z. B. wegen ihrer anatomischen Ausdehnung/Lage limitieren, ist die alleinige Radiochemotherapie indiziert, wenn es der Gesundheitszustand oder eventuelle Begleiterkrankungen zulassen (Matzinger u. a., 2009). Der Organerhalt kann ebenfalls bevorzugt werden, wenn die Erhaltung für die Lebensqualität der Patienten eine besonders wichtige Rolle einnimmt (Adelstein u. a., 2003). Der Einsatz von Induktions-Chemotherapie (also einer neoadjuvanten Gabe) in diesem Erkrankungsstadium wird in der Medizin diskutiert. Ziel ist es, in diesen Fällen, das initiale Tumolvolumen zu verkleinern, um nicht resezierbare Tumore gegebenenfalls resezierbar zu machen oder systemische Mikrometastasen vor der lokalen Strahlenbehandlung zu eliminieren. Es wurde beobachtet, dass sich durch die Induktions-Chemotherapie zwar das Risiko der Ausbildung von Fernmetastasen des Tumors verringert, nicht aber das Risiko der lokoregionalen Ausbreitung. Zum heutigen Zeitpunkt wird die Induktions-Chemotherapie noch nicht zum Standardverfahren in der Therapie des lokal fortgeschrittenen KHK gezählt. Die Auswahl des jeweiligen Verfahrens ist selbstverständlich von der Konstitution und dem Wunsch des Patienten, seinen weiteren Erkrankungen, der Tumorlokalisation, seiner Zugänglichkeit und Resezierbarkeit sowie der Erfahrung des Operateurs abhängig (Matzinger u. a., 2009).

Rezidierte oder metastasierte Erkrankung:

Ungefähr die Hälfte aller Patienten mit einem KHK im lokal fortgeschrittenen Stadium erkrankt innerhalb von zwei Jahren an einem lokoregionalen Rezidiv oder an Fernmetastasen. Chemotherapie galt diesenfalls als Standardtherapie und war als alleinige Palliativmaßnahme anzusehen (Colevas, 2006). In einer Studie von Janot und Kollegen (2008) erfuhren Patienten mit potenziell resezierbarem lokoregionalem Rezidiv nach der Operation durch erneute Bestrahlung und Chemotherapie ein signifikant verlängertes PFS (progressionsfreies Überleben). In diesem Stadium der Erkrankung zählen sowohl die adäquate Symptombehandlung, der bestmögliche Erhalt der Lebensqualität als auch die Lebensverlängerung zu den Behandlungszielen. Zurzeit herrscht noch kein einheitlicher Konsens über die Zweitlinientherapie bei rezidiertem oder metastasiertem KHK (Argiris u. a., 2008). Therapieauswahlmöglichkeiten stellt Tab. 4 dar.

<u>stabile Patienten</u> mit aggressivem symptomatischem KHK	<u>guter Allgemeinzustand</u> aktive Erkrankung, aber geringe Krankheitsbe- lastung	<u>Gebrechlichkeit</u> oder nicht schmerzhaftes asymp- tomatisches KHK
Cisplatin/Carboplatin + 5-FU + Cetuximab <u>Platinbasierte Kombi- nationen*</u> : Cisplatin/Paclitaxel Cisplatin/Docetaxel Carboplatin/Paclitaxel * +/- Cetuximab	<u>Monotherapie:</u> Paclitaxel/Docetaxel Pemetrexed Methotrexat Capecitabin Vinorelbin Cetuximab	<u>Beobachtung</u> bestmöglich unterstützende Behandlung

Tabelle 4: Algorithmus für die Auswahl eines geeigneten Chemotherapie-Regimes für Patienten mit rezidiertem oder metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom und deren Gesundheitszustand (nach Fury u.a., 2011; Price u. a., 2012).

Cetuximab ist das erste Medikament auf molekularer Ebene, welches positive Ergebnisse in der Therapie des KHK erzielte. Die signifikanten Verbesserungen beziehen sich sowohl auf das Auftreten lokoregionaler Rezidive, das progressionsfreie Überleben, die Ansprechrate und die gesamte Überlebenszeit, nicht aber auf die Entstehung von Fernmetastasen (Bonner u. a., 2006; Vermorken u. a., 2008). Bonner u. a. untersuchten in einer multinationalen, randomisierten Studie mit über 400 Teilnehmern den Unterschied im Outcome von Patienten mit lokoregional-fortgeschrittenem KHK (Stadium III/IV), die entweder alleinig

Radiotherapie oder Radiotherapie und Cetuximab mit wöchentlicher Gabe erhielten. Sie bestätigten damit die Theorie von Liang u. a. aus dem Jahre 2003, dass eine gesteigerte Expression von EGFR zu einer zellulären Resistenz für ionisierte Strahlung führt und somit Cetuximab diese gesteigerte Expression von EGFR in Tumorzellen verringert und die Krebszellen auf diesem Wege für die Effekte der Radiotherapie sensitiviert werden können. Die Zeit der lokoregionalen Tumorfreiheit und das Gesamtüberleben waren signifikant länger in derjenigen Patientengruppe, die Radiotherapie und Cetuximab erhielt.

Die Studie von Vermorken u. a. mit über 440 Patienten mit unbehandeltem, rezidivierendem/metastasiertem KHK zeigte einen signifikanten Vorteil bezüglich Ansprechrate, progressionfreiem Überleben und Gesamtüberleben in der Kombinationstherapie aus Platin-Fluorouracil und Cetuximab im Vergleich zur Erstlinientherapie mit Platin-Fluorouracil alleine.

Interessanterweise fand eine Studie von Jhaver u. a. im Jahre 2008 heraus, dass ein funktionstüchtiger PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg beim kolorektalen Karzinom für das Ansprechen auf Cetuximab von besonderer Bedeutung ist. Denn durch aktivierende Mutationen in PI3K und Funktionsverlust von PTEN konnte eine Resistenz gegenüber Cetuximab beobachtet werden.

Hier sollen nun Anmerkungen zur Wirkungsweise der für diese Arbeit relevanten Zytostatika folgen:

Taxane wie Docetaxel und Paclitaxel sind der Gruppe der Mitosehemmstoffe zugehörig. Durch eine Hemmung der Depolymerisation werden die in den Zellen befindlichen Mikrotubuli funktionsunfähig und folglich kann die für die Zellteilung essenzielle Mitosespindel aus Mikrotubuli nicht aufgebaut werden. Zu den Nebenwirkungen zählen Knochenmarksuppression, insbesondere Neutropenie, aber auch neuromuskuläre, gastrointestinale und kardiale Störungen. (Lüllmann, Mohr und Hein. Pharmakologie und Toxikologie. 17. Auflage, 2010: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 464)

Cetuximab ist ein chimärer, humaner/muriner, monoklonaler IgG-Antikörper, der gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet ist, um das Wachstum derjenigen Zellen zu unterdrücken, die EGFR exprimieren. EGFR ist als Transmembranglykoprotein der Tyrosin-Kinase-Familie in den verschiedensten Gewebetypen exprimiert. Er ist in mannigfaltige Signalprozesse involviert, in beispielsweise Zellüberleben, -proliferation, -differenzierung und Tumorentstehung. Wie in vielerlei anderen Tu-

morentitäten ist EGFR in mehr als 90 % der KHK überexprimiert (Schneider u. a., 2009). Diese Überexpression ist nachweislich mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Ang u. a., 2002). Bindet Cetuximab dann an die Rezeptoren der Zelloberfläche, so wird die EGFR exprimierende Zelle durch das Immunsystem eliminiert. Als Nebenwirkungen von Cetuximab zu erwähnen sind akneiforme Hautausschläge sowie Hypomagnesiämie (Price u. a., 2012).

Trotz aller Studienversuche hat sich aber bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein Standardregime als Zweitlinienchemotherapie beim rezidivierten oder metastasierten KHK etabliert (Argiris u. a., 2008).

3.2 Der PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg

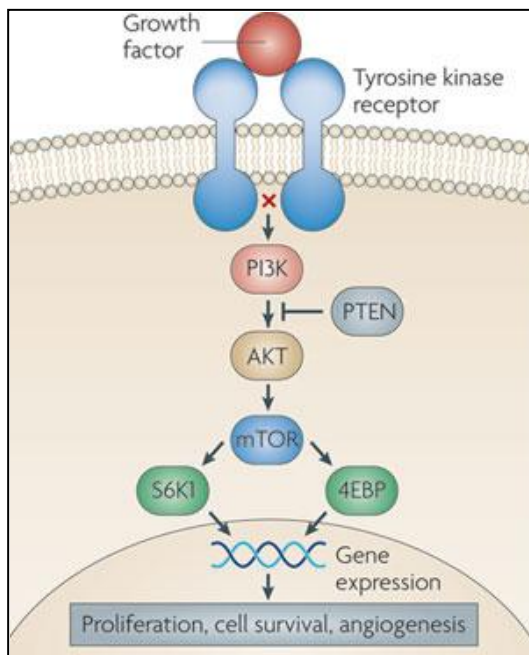


Abbildung 4: Schematische Darstellung des PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Signalwegs (Holmes, 2011).

Die Hauptkomponenten dieses Signalwegs setzen sich aus PI3K (Phosphatidylinositol-Kinase-3), PTEN (phosphatase and tensin homolog), AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) und mTor (mammalian target of rapamycin) und deren Bindungspartnern zusammen (siehe Abb. 4).

Der PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Signalweg ist besonders für das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Apoptose verantwortlich. Jenes empfindliche Gleichgewicht des Signalwegs ist bei Krebs durch mannigfaltige Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismen gestört. Deshalb ist dieser Pfad auch ein strategisch wichtiger Ansatzpunkt

für die gezielte Krebstherapie, welche darauf zielt, die veränderten Signale durch Pharmaka wieder neu zu programmieren. In einigen Arbeiten fand man heraus, dass dieser Signalweg in verschiedenen Karzinomenarten besonders stark verändert ist (Nicholson u. a., 2002; Bellacosa u. a., 2005; Manning u. a., 2007).

Ursächlich für Veränderungen des Signalwegs der besagten Gene, sowohl Aktivierungen als auch Inaktivierungen, sind z. B. die gezielte Vermehrung von DNA-Abschnitten (Amplifikationen) oder Mutationen von Onkogenen (z. B. PIK3) oder Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen (z. B. PTEN) in bestimmten Komponenten des Genoms.

3.2.1 Die einzelnen Komponenten des PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalwegs

PI3K ist ein bekanntes Protoonkogen und verantwortlich für eine Aktivierung des PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweges, welcher Zellüberlebenssignale vermittelt (Shayesteh u. a., 1999). Als Protoonkogene bezeichnet man normale Gene, die für Proteine kodieren, welche für Rezeption, Transduktion oder Wachstumssignalumsetzung verantwortlich sind. Produkte der Protoonkogene sind Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Proteinkinasen, nukleäre Transkriptionsfaktoren oder G-Proteine. Alterationen dieser Protoonkogene durch aktivierende Mutationen können sowohl die Struktur, ihre Stabilität als auch die Expression der Proteine betreffen. Durch diese Mutationen zu Onkogenen geworden, entstehen nun schnell wachsende Tumorzellen (Weinberg, 1996; Bishop, 1991). Es existieren verschiedene Gruppen der PI3K-Familie. Die Gruppe 1A wird durch Tyrosin-Kinasen aktiviert und ist besonders bedeutsam aufgrund ihrer Fähigkeit, die Zellteilung und die Tumorgenese zu beeinflussen. Deshalb soll nun hier das Hauptaugenmerk auf der katalytischen Untereinheit p110 α (kodiert durch PI3KCA) und ihrer regulatorischen Untereinheit p85 α liegen (Kumar u. a., 2007). PI3K wandelt PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-Trisphosphat) um, das wiederum AKT aktiviert (siehe Abb. 5).

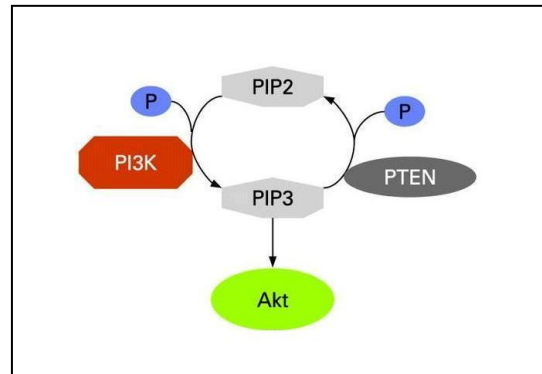


Abbildung 5: Umwandlung von PIP-3 und PIP-2 durch PTEN und PI3K (Weichhart und Saemann, 2008, geändert).

PTEN ist der Gruppe der Tumorsuppressorgene zugehörig. Diese unterdrücken Wachstumsfaktoren, leiten den Zellzyklus-Arrest bei DNA-Schäden ein oder induzieren die Apoptose; in der Karzinogenese sind sie inaktiviert (Weinberg, 1996). PTEN ist nicht nur daran beteiligt, den Zellzyklus-Arrest und die Apoptose von Zellen mit chromosomalen Defekten zu induzieren, sondern greift auch regulierend in Zelladhäsion, -differenzierung sowie -migration ein (Di Cristofano u. a., 2000). Durch die Dephosphorylierung von PIP-3 zu PIP-2 reguliert PTEN sowohl AKT als auch konsekutiv mTor negativ und arbeitet somit gegenläufig zum generierten Signal von PI3K (Stambolic u. a., 1998) (siehe Abb. 5). Folglich resultiert bei Verlust eine erhöhte PIP-3 Konzentration, wodurch es zu einer AKT-Hyperphosphorylierung kommt, die Tumorzellen für apoptotische Stimuli unsensibel macht (Di Cristofano u. a., 2000).

Die Serin-Threonin-Kinase AKT (auch Proteinkinase B, PKB genannt) ist ein Dreh- und Angelpunkt der Signalkaskade, die Vorgänge wie Zellüberleben (Antiapoptose), Proliferation, Proteinsynthese, Zellgröße, Angiogenese, Genomstabilität, Neovaskularisation, Glukosestoffwechsel und Gewebeinvasion reguliert. Vertreter der AKT-Familie sind die Gene AKT 1, 2 und 3, die sich in ihrer Aufgabenverteilung etwas unterscheiden (Vivanco u. a., 2002; Mendelsohn u. a., 2003; Bellacosa u. a., 2004; Manning u. a., 2007).

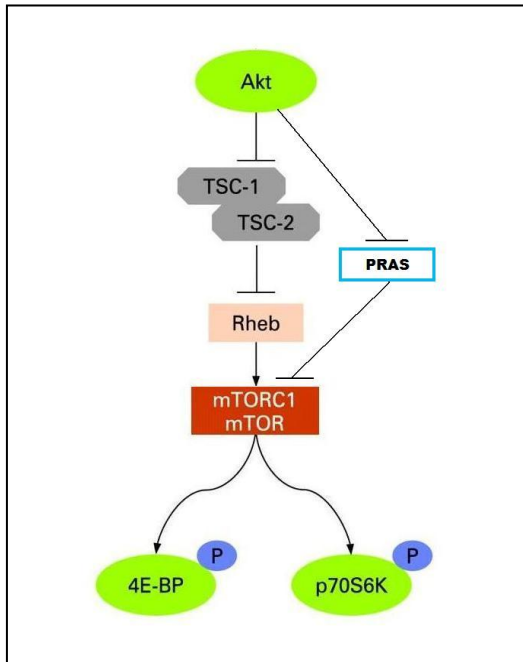


Abbildung 6: Signalweg von AKT über TSC, PRAS, Rheb zu mTor (Weichhart und Saemann, 2008, geändert).

PIP-3, das nun als sog. „second messenger“ fungiert, ist für die Translokation von AKT in die Plasmamembran verantwortlich. Ist diese Lokalisation erreicht, phosphoryliert AKT nun einerseits PRAS40 (Prolin-reiches Akt Substrat 40 kDa) und inaktiviert jenes damit. Die hemmende Wirkung von PRAS40 auf mTor wird also unterdrückt und es kommt hierdurch zur Aktivierung von mTor (siehe Abb. 6).

Andererseits hemmt AKT die Tumorsuppressorgene TSC1 und TSC2 (tuberöse Sklerose Komplex 1 und 2) durch Phosphorylierung von TSC2; hierdurch resultiert eine Destabilisierung der Interaktion von TSC1 und TSC2. Diese Destabilisierung führt zu einer verminderten Hemmung von Rheb (Ras homolog enriched in brain), was wiederum eine erhöhte mTor-Aktivität (Potter u. a., 2002) bedingt. Eine AKT-Überaktivität kann durch vielerlei verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden:

Einerseits direkt durch Amplifikation oder übermäßige Genexpression, andererseits durch Verlust oder verminderte PTEN-Aktivität, Amplifikation, übermäßige Genexpression oder Mutation von PI3K, Überexpression der Wachstumsfaktorrezeptoren oder Ras-Aktivierung, einem G-Protein (Bellacosa u. a., 2005).

Einerseits direkt durch Amplifikation oder übermäßige Genexpression, andererseits durch Verlust oder verminderte PTEN-Aktivität, Amplifikation, übermäßige Genexpression oder Mutation von PI3K, Überexpression der Wachstumsfaktorrezeptoren oder Ras-Aktivierung, einem G-Protein (Bellacosa u. a., 2005).

mTor wird als das wichtigste nachgeschaltete Ziel von AKT angesehen. In Zellen tritt es in zwei verschiedenen Komplexformen mTORC1 und mTORC2 auf, die beide durch Rapamycin inhibiert werden können. Die Funktion von mTORC2 besteht unter anderem darin, AKT weiter zu phosphorylieren und hierdurch Zellüberleben und Proliferation zu fördern

(positive Rückkopplung). Als mTORC1 phosphoryliert es zwei Strukturen und fördert dadurch deren Proteinsynthese: P70 S6K und 4E-BP (Martin u. a., 2002). P70 S6K wiederum sorgt für die Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6, das im Sinne einer positiven Rückkopplung die mTor-Aktivität erneut stimuliert. Das durch mTor phosphorylierte 4E-BP setzt den Faktor eIF-4E frei, der Translations-Initiations-Komplexe aktiviert, wodurch Mechanismen wie Proteintranslation und Zellwachstum beschleunigt werden (Bellacosa u. a., 2005).

3.2.2 Der PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg im Kopf-Hals-Karzinom

Auch im KHK sind besonders häufig Alterationen im PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg anzutreffen. So ergab eine Studie von Pedrero und Kollegen im Jahr 2005, dass PIK3CA- und AKT2-Amplifikationen in Tumorgewebe von Patienten zu 37 % bzw. 30 % zu finden waren. In prämaligen Läsionen wie Hyperplasie oder milder bis schwerer Dysplasie war ebenfalls in 39 % die Genkopienanzahl von PIK3CA erhöht. Eine Steigerung der AKT-Aktivität fand zudem in 17 % der Patientenproben statt. Korrelationen zwischen PIK3CA-, AKT2-Amplifikationen einerseits sowie erhöhter AKT-Aktivität andererseits und klinikopathologischen Parametern waren nicht feststellbar. Die Hinabregulierung von PTEN konnte des Weiteren in der Mehrzahl der Tumoren entdeckt werden und war signifikant mit dem pT-Stadium assoziiert. Ferner zeigte sich eine Tendenz der PTEN-Hinabregulierung zur Karzinomlokalisierung im Pharynxbereich.

3.3 Polymorphismus

Das Wort Polymorphismus stammt aus der griechischen Sprache und bedeutet Vielgestaltigkeit. Der Polymorphismus meint das Auftreten verschiedener genetischer Varianten innerhalb einer Population. Beträgt die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Variante weniger als 1 %, ist von einer Mutation die Rede. Ist sie aber größer als 1 %, so spricht man von Polymorphismus. Es werden drei verschiedene Arten von Polymorphismus unterschieden:

- Insertions- und Deletionspolymorphismus. In der Regel variieren weniger als 50 Nukleotide im Genabschnitt durch Insertion und Deletion.
- Kopienzahlvarianten. Sie resultieren in einer Abweichung der Anzahl der Kopien eines bestimmten DNA-Abschnitts.
- Einzelnukleotidpolymorphismus oder Single Nucleotide Polymorphism (sog. **SNP**). Hier kommt es zum alleinigen Austausch einer Base im DNA-Molekül (siehe Abb. 7). SNPs tragen zu über 90 % der

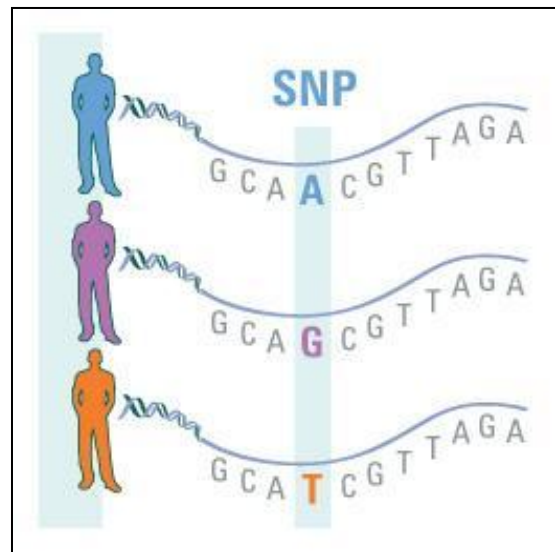


Abbildung 7: Single nucleotide polymorphism (SNP).

Sie finden sich durchschnittlich mit einer Frequenz von 1 : 1910 Basen (Collins u. a., 1998).

Um nochmals die Bedeutung und Folgen von Polymorphismen zu veranschaulichen, seien hier zwei Beispiele angeführt:

Der Zweipunkt-Marienkäfer tritt sowohl in einer roten als auch in einer schwarzen Form auf. Ein Polymorphismus im Gen, der die Punktfarbe determiniert, entscheidet daher darüber, ob ein Tier rote oder schwarze Punkte aufweist.

Ebenso kommen auch Polymorphismen innerhalb menschlicher Gene vor. Sie können Intronabschnitte des Genoms betreffen - und damit Einfluss auf die Proteinkonzentration haben -, aber auch Exonabschnitte, welche sich dann auf die Proteinfunktion auswirken. Ein weiteres Beispiel für einen Polymorphismus stellt die Sichelzellanämie dar, bei der das Hämoglobinmolekül auf Chromosom 11 eine Variation aufweist. Diese Veränderung, die durch einen SNP hervorgerufen wird, trägt dafür Verantwortung, dass sich die Betakette

des Hämoglobins andersartig konfiguriert und die Erythrozyten somit keine runde, sondern eine Sichelform erhalten.

SNPs, die die häufigste Form von Sequenzvariationen darstellen, können zu einem Aminosäureaustausch im entsprechenden Protein führen. Durch diese Veränderung sind die unterschiedlichsten Auswirkungen auf z. B. Phänotyp, Metabolismus, die Entstehung von Krankheiten oder Resistenzen vorstellbar. So ist es weiterhin möglich, dass SNPs in bestimmten Signalwegen, wie dem PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg, dafür verantwortlich sind, ob Medikamente zum klinischen Erfolg bei Patienten beitragen oder nicht. Es gibt viele Hinweise in Studien darauf, dass SNPs in besagtem Signalweg mit einer Resistenzentwicklung für bestimmte Chemotherapeutika im Zusammenhang stehen und daraus eine schwache bis fehlende Wirkung resultiert. Für platinbasierte Chemotherapeutika, Fluoropyrimidine und Taxane konnte bisher eine Resistenzbildung festgestellt werden (Lee u. a., 2005; Yang u. a., 2006; Kim u. a., 2007; Liu u. a., 2007; Murakami u. a., 2007; Gagnon u. a., 2008). Offen bleibt die Frage, ob sich auch Veränderungen bezüglich Therapieansprechen und klinischem Outcome für SNPs dieses Signalwegs für die Therapie mit Docetaxel und Cetuximab für KHK-Patienten ergeben.

3.3.1 Häufige genetische Veränderungen und Polymorphismen des PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalwegs in Karzinomen

PI3KCA: Schon in den Jahren 1999 und 2000 zeigte sich, dass eine übermäßige Aktivität von PI3KCA einen onkogenetischen Faktor für Ovarial- und Zervikalkarzinome darstellt (Shayesteh u. a.; Ma u. a.). Redon u. a. (2001) berichteten über eine Assoziation einer erhöhten Genkopie-Anzahl mit einer Überexpression von PI3KCA in Lymphknoten-negativen KHK. Ebenfalls konnte beim Magenkarzinom eine übermäßige Expression von PI3KCA zusammen mit einem PTEN-Verlust beobachtet werden (Byun u. a., 2003), ebenso wie somatische „Missense“-Mutationen in PI3K v. a. beim kolorektalen Karzinom, Magenkrebs und Glioblastom (Samuels u. a., 2004). Eine Studie von Slattery (2010) und Kollegen hat einen signifikanten Zusammenhang zwischen SNP *rs7640662* des GG-Genotyps in PI3KCA und einem verringerten Risiko für die Entwicklung eines Rektumkarzinoms entdeckt. In einer neuen Arbeit aus dem Jahre 2013 (Schneck u. a.) konnte eine Korrelation von Polymorphismen im Exon 9/E545K mit Austausch G→A und im Exon 20/H1047R mit Austausch A→G im Gen PI3KCA mit der Inzidenz hormonrezeptorpositiver Brusttumoren

nachgewiesen werden. Ferner zeigten Xing und Kollegen (2012) eine signifikant niedrigere Prävalenz des heterozygoten SNPs G/T *rs17849071* in PI3KCA bei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkrebs.

PTEN: Der bereits erwähnte Verlust von PTEN kann durch vielerlei Mechanismen entstehen wie z. B. die mono- oder biallelische inaktivierende Mutation oder epigenetische Stilllegung eines Gens. Diese Veränderungen können bei verschiedenen sporadischen Tumorformen, wie im Brust-, Prostata-, Blasen-, Ovarial-, Lungen-, Endometrium- und kolorektalen Karzinom, Glioblastom und Melanom beobachtet werden (Perren u. a., 1999; Zhou u. a., 2002; Marsit u. a., 2005; Sansal u. a., 2004). Des Weiteren fanden Loupakis und Kollegen (2009) heraus, dass ein PTEN-Verlust mit fehlendem Therapieansprechen auf Cetuximab und Irinotecan beim metastasierten kolorektalen Karzinom in Verbindung gebracht werden konnte. Keimbahnmutationen in PTEN sind in genetischen Erkrankungen, beispielsweise beim Cowden-Syndrom oder Bannayan-Zonana-Syndrom, anzutreffen. Dies sind beides Krankheiten, die mit erhöhtem Auftreten von Brust- und Schilddrüsenkrebs einhergehen (Liaw u. a., 1997). Ebenfalls korreliert das Vorhandensein eines SNPs in PTEN (*rs532678* CT/TT) mit erhöhtem Risiko für die Entstehung eines Rektumkarzinoms (Slattery u. a., 2010).

AKT: Schon seit längerer Zeit ist man sich sicher, dass eine AKT-Überaktivität stark zur Entstehung von malignen Prozessen beiträgt, weil hierdurch normale Zellabläufe wie Antiapoptose, Zellproliferation, Proteinsynthese u.v.m. überschießend arbeiten. In der Vergangenheit konnte eine Assoziation von AKT-Amplifikationen und übermäßiger Genexpression mit dem Auftreten von Ovarial- (Bellacosa u. a., 1995), Brust- (Stal u. a., 2003), Leber- und Kolon- (Xu u. a., 2004) sowie Pankreaskarzinomen (Ruggeri u. a., 1998; Cheng u. a., 1996) aufgezeigt werden. Im fortgeschrittenen großzelligen Lungenkarzinom beispielsweise wirkt sich eine stärkere Phosphorylierung von AKT positiv auf das Ansprechen einer Gefitinib-Therapie aus (Cappuzzo u. a., 2004). Eine Studie von Kim u. a. (2012) ergab, dass das Vorliegen der SNPs *rs3803300*, *rs1130214* und *rs2494732* in AKT1 mit einer Verringerung des krankheitsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom im frühen Stadium assoziiert sind. Die Verschlechterung des Outcomes stieg mit der Anzahl der ungünstigeren SNPs.

TSC und mTOR: Keimbahnmutationen in Gen TSC1 oder TSC2 führen zur Entstehung des Krankheitsbildes der tuberösen Sklerose. Die biallelische Inaktivierung von TSC mündet in

eine konstitutive mTor-Aktivität, welche völlig unabhängig von der AKT-Aktivität ist (Zhang u. a., 2003). In einer Studie von Seki u. a. (2002) konnte bei Lymphomen und Lungenkarzinomen eine übermäßige eIF-4E-Genexpression beobachtet werden. Insgesamt wird die gesteigerte Aktivität beider Komplexe TORC1 und TORC2 als wichtiger Bestandteil zur Entstehung der Tumorgenese angesehen (Memmott u. a., 2009). Ein geringeres Risiko für Kolonkarzinome erwies sich für den TT-Genotyp des SNPs TSC2 *rs3087631* ebenso wie der GG-Genotyp des SNPs TSC1 *rs13295634* für das Risiko eines Rektumkarzinoms (inverse Korrelation). Das Bestehen des Genotyps AG/GG im SNP *rs1057079* in mTOR hingegen ist mit einem signifikant höherem Risiko für die Entwicklung eines Kolonkarzinoms assoziiert (Slattery u. a., 2010).

4 Zielsetzung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die prognostische Bedeutung von SNPs des Signalwegs PI3K/PTEN/AKT/mTor im Genom von Patienten mit rezidiviertem und/oder metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom zu untersuchen. Die wissenschaftliche Arbeit soll retrospektiv den Zusammenhang zwischen

- **Therapieansprechen,**
- **Überleben** (progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben)

und den SNP-Varianten

- **PI3K** (*rs2699887, rs7640662*),
- **PTEN** (*rs12569998, rs2299939*),
- **AKT1** (*rs2494738, rs2498804, rs3803304*),
- **AKT2** (*rs892119, rs8100018*), und
- **FRAP1** (*rs11121704, rs2295080*)

des Signalwegs PI3K/PTEN/AKT/mTor untersuchen.

5 Arbeitsprogramm

Zu diesem Zwecke wurden 11 SNPs aus den Genen PI3K (*rs2699887*, *rs7640662*), PTEN (*rs12569998*, *rs2299939*), AKT1 (*rs2494738*, *rs2498804*, *rs3803304*), AKT2 (*rs892119*, *rs8100018*) und FRAP1 (*rs11121704*, *rs2295080*) ausgewählt, die in vergangenen Studien eine prognostische Bedeutung bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen aufzeigten (Pu u. a., 2011; Hildebrandt u. a., 2009; Loupakis u. a., 2009). Das Gewebe stammte von Patienten einer früheren multizentrischen Studie der Jahre 2006- 2007 (CETAX), die am Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin durchgeführt worden ist; eingeschlossen waren Kopf-Hals-Karzinom-Patienten im Stadium III oder IV ihrer Erkrankung, die als Zweitlinientherapie eine Kombination aus Docetaxel und Cetuximab erhielten. Mittels Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (rtPCR) sollte detektiert werden, welchen Genotyp, also welchen SNP, die Patienten hinsichtlich der elf untersuchten Gene aufwiesen. Im anschließenden Schritt sollte die statistische Analyse klären, ob die SNP-Varianten mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung zusammenhängen.

Mithilfe dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob bestimmte Genotypen im Vergleich zu anderen Genotypen besagter SNPs eine prognostische Bedeutung unter Chemotherapie mit Docetaxel und Cetuximab besitzen. Falls sich die genetische Konstitution tatsächlich als wichtige Größe für die Prognose der Patienten herausstellt, könnte je nach Prognose eines SNPs die patientenorientierte individualisierte Therapie für das Kopf-Hals-Karzinom zukünftig zur Diskussion stehen.

6 Material und Methoden

6.1 Patienten und Therapie

Die Gewebeproben der 45 Patienten mit histologisch gesichertem lokal-rezidiviertem oder metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom (Stage III/IV) stammten aus einer klinischen multizentrischen Phase-II-Studie (CETAX, insgesamt 84 Patienten), die ebenfalls am Campus Benjamin Franklin in Berlin mit platin-refraktären Patienten durchgeführt wurde. Zehn verschiedene Zentren in Deutschland waren insgesamt daran beteiligt, die Effektivität der Therapiekombination von Docetaxel und Cetuximab zu beurteilen. Alle Probanden erkrankten nach Cisplatin-haltiger Radiochemotherapie oder alleiniger platinhaltiger Chemotherapie (Erstlinientherapie) an einem Rezidiv oder Metastasen und wurden darauf folgend mit Cetuximab und Docetaxel behandelt (Zweitlinientherapie). Es wurde keine weitere tumorbekämpfende Therapie nach Platintherapieversagen durchgeführt. Der Eastern Cooperative Oncology Group-Performance-Status (ECOG) der Patienten lag bei 0-1 (= Karnofsky-Index 80-100 %) (Oken u. a., 1982). Auch Knochenmark-, Leber- und Nierenfunktion mussten ausreichend sein. Die eingeschlossenen Patienten erhielten 35 mg/m² Docetaxel in maximal sechs Zyklen an Tag 1, 8 und 15 mit Wiederholung an Tag 29. Dazu wurden anfangs 400 mg/m² und darauf wöchentlich eine Dosis von 250 mg/m² Cetuximab verabreicht, bis eine Progression oder eine limitierende Toxizität auftrat. Studienendpunkte waren Therapieansprechen auf Docetaxel und Cetuximab, Therapieansprechen in Bezug auf Cisplatin-sensitivität, progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben. Patienten, deren Biopsiematerial verfügbar war (n=48 aus acht von zehn teilnehmenden Zentren), wurden in diese Studie aufgenommen. Alle Patienten erhielten eine gründliche Aufklärung und unterschrieben die entsprechende Einwilligung.

6.2 DNS(Desoxyribonukleinsäure)-Extraktion

Für die Extraktion der DNS aus den Patientenproben wurde das Gentra Puregene Tissue Kit (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland, Bestellnr. 158667) benutzt. Es wurde dazu verwendet, in Formalin fixierte und Paraffin eingebettete Proben zu behandeln. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen:

Anfänglich muss die Gewebeprobe vom Objektträger in ein Reagenzglas gegeben werden. Nach Hinzufügen von 300 µl des Lösungsmittels Xylene wird das Röhrchen anschließend bei Raumtemperatur (15-25°C) und unter leichtem Schütteln fünf Minuten inkubiert. Darauf folgt eine ein- bis dreiminütige Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g, um ein Sediment (sog. Pellet) zu erhalten. Als Nächstes kann der Überstand vorsichtig verworfen werden. Anschließend wird die Beimengung von Xylene, die Inkubations- und Schüttelphase, die Zentrifugation und das darauf folgende Abschütten des Überstandes noch zwei weitere Male wiederholt. Im nächsten Schritt folgt das Auffüllen mit 300 µl des Lösungsmittels Ethanol (96-100 %) auf das Pellet; die vorherige Prozedur wiederholt sich bis zum Verwerfen des Überstandes. 300 µl des Zell-Lyse-Puffers werden aufgefüllt und mit dem Pellet homogenisiert. Nach Hinzufügen von 1,5 µl Proteinase K und gutem Durchmischen wird das Röhrchen für mindestens drei Stunden bei 55 °C inkubiert und in Abständen geschüttelt. Proteinase K ist ein Enzym, welches sowohl die Funktion einer Endo- als auch einer Exopeptidase innehat, die den Abbau von Proteinen in Zelllysaten und die Freisetzung von Nukleinsäuren initiiert. Eine erneute Gabe von 1,5 µl Proteinase K mit anschließender Inkubation kann nötig sein, falls das Gewebe nicht vollständig homogenisiert ist. Im nächsten Schritt werden 1,5 µl RNase hinzugegeben, vermischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert; dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente. Danach erfolgt eine Inkubation für ein bis drei Minuten auf Eis. Nach Hinzufügen von 100 µl Protein-Präzipitations-Lösung zur Ausfällung der Proteine muss das Röhrchen kräftig mit einem speziellen Rüttelgerät (sog. Vortex) geschüttelt und anschließend für drei Minuten bei 13.000-16.000 x g zentrifugiert werden. Zur erneuten Präzipitation und Reinigung werden nun 300 µl Isopropanol und der Überstand aus dem vorherigen in ein frisches Reagenzglas gegeben. Das Proteinpellet muss dabei unbedingt am Boden verbleiben und darf nicht übertragen werden. Im Anschluss kann 0,5 µl Glykogen-Lösung hinzugefügt werden; diese fungiert hier als beschwerender Anker, damit die DNA nicht versehentlich weggespült wird. Nach Schütteln und fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000-16.000 x g ist der Überstand erneut zu verwerfen und der verbleibende Rest im Röhrchen mit dem Pellet zu trocknen. Ein letztes Mal werden 300 µl Ethanol (70 %) hinzugegeben, um das Pellet endgültig zu reinigen. Letztmalige Zentrifugation, Abschütten des Überstandes und fünfminütige Lufttrocknung beenden die Prozedur. Nun werden noch 50 µl DNA-Hydratations-Lösung hinzupipettiert und anschließend mit dem Rüttelgerät gemischt. Um die isolierte DNA aufzulösen, muss sie bei 65 °C mindestens eine Stunde lang inkubiert und darauf über Nacht leicht geschüttelt werden.

Nach diesem Schema wurden die Gewebeproben der Patienten behandelt und deren gereinigte DNA gewonnen.

Im Anschluss folgte die quantitative und qualitative Analyse dieser erworbenen DNA-Proben.

6.3 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Das NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (Firma NanoDrop Technologies, Wilmington, Deutschland, USA) ist ein Messinstrument für die Bestimmung der Konzentration von isolierten DNA- oder RNA-Proben. Die Konzentration wird mittels Lichtabsorption bestimmt, die von der optischen Dichte (OD) der jeweiligen Proben abhängig ist. Dabei wird die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen [nm] gemessen. Dieser Messmethode liegt zugrunde, dass Nukleinsäuren bei Anregung durch Licht dieses bei 260 nm absorbieren. Verantwortung tragen hierfür die Aminosäuren Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin bzw. Uracil. Des Weiteren ist neben der gemessenen Absorption bei 260 nm Wellenlänge ein konstanter Faktor für DNA oder RNA vonnöten. Liegt doppelsträngige DNA vor, so entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 50 ng/ µL DNA. Die Konzentration der Nukleinsäure wird durch den Nanodrop automatisch nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration [ng/ µL]} = \text{OD}_{260} \times \text{konstanter Faktor für Nukleinsäure [ng/ µL]}$$

6.4 Qualitative Nukleinsäureanalyse

Zur Bestimmung der Qualität/Reinheit der DNA oder RNA wird mittels NanoDrop® das Verhältnis der Absorption bei 260/280 nm herangezogen. Dabei liegt der Wert des Verhältnisses für RNA höher als für DNA. Ausschlaggebender Faktor für diesen Unterschied ist die Aminosäure Uracil, die in der RNA mehr Licht absorbiert als die äquivalente Aminosäure Thymin in der DNA. Ein gutes Ergebnis wird erzielt, wenn sich das besagte Verhältnis zwischen den Werten 1,85 und 1,98 befindet. Liegt der Wert niedriger, so ist die Probe möglicherweise mit Proteinen verunreinigt, da sich ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm befindet. Ist der Wert höher, kann sich noch zusätzlich RNA in der DNA-Probe befinden. Die Durchführung erfolgt folgendermaßen: Anfangs muss eine Nullwertbestimmung mit 1 µl H₂O erfolgen. Hierzu wird das Wasser mit einer Pipette auf den Pipettiersockel aufgebracht

und dann der obere Arm auf den Sockel geklappt. Anschließend wird die Art der Nukleinsäure (DNA) festgelegt. Nach Entfernen des Wassertropfens kann nun 1 µl der zu bestimmenden Probe auf den Probensockel unter Vermeidung von Luftblasen gegeben werden. Nach Zuklappen des oberen Arms und nach Beendigung der Messung wird der Sockel jedes Mal mit einem fusselreien Tuch gereinigt. Zusätzlich zum Messwert kann das Absorptionsspektrum innerhalb der Wellenlängen von 230- 350 nm grafisch dargestellt werden. In diesem Wellenlängenbereich können Substanzen wie Lösungsmittelpartikel und Proteinreste, die die Absorptionsmessung beeinflussen, in der isolierten DNA grafisch sichtbar gemacht werden.

6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (Real-Time-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction, qRT-PCR)

Die PCR ist eine Methode, um einen bestimmten Abschnitt der zu untersuchenden Nukleinsäure (sog. Template) zu vervielfältigen. Sie wird *in vitro* durchgeführt, also außerhalb des menschlichen Organismus in einem Glas oder Röhrchen. Die quantitative Komponente der PCR besteht darin, dass durch die Vervielfältigung der gewonnenen DNA-Abschnitte in jedem Zyklus Fluoreszenzsignale entstehen, die proportional zur Menge der entstehenden DNA-Produkte sind und dann gemessen werden können. Das fundamentale Enzym ist die Polymerase: Sie ist für die Strangsynthese neuer identischer Genprodukte verantwortlich. Die besonders hitzestabile Taq-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird, hat ihre maximale Enzymaktivität bei sehr hohen Temperaturen (~100°C). Ein Gemisch an Desoxyribonukleosidtriphosphaten dient als Baustein zur Synthetisierung neuer Stränge für die DNA-Polymerase. Sogenannte Primer, auch als Oligonukleotide bezeichnet, sind dafür verantwortlich, auf beiden Einzelsträngen jeweils einen Startpunkt für die DNA-Synthese zu markieren. Ebenfalls ist die Konzentration von Mg²⁺-Ionen während einer PCR von entscheidender Bedeutung: Sie beeinflusst sowohl die Spezifität als auch die Effektivität der Synthetisierung. So ist bei hohen Konzentrationen (z. B. 8 mM MgCl₂) die Effektivität geringer, da die Ionen doppelsträngige DNA stabilisieren und somit eine vollständige Denaturierung verhindern. Im Gegensatz dazu sind sehr geringe Mg²⁺-Konzentrationen für die Polymerisation hinderlich, weil Mg²⁺ ebenfalls einen Kofaktor der enzymatischen Aktivität für viele Polymerasen darstellt. Folglich ergibt sich für jede einzelne PCR ein eigenes MgCl₂-Konzentrationsoptimum, welches zum bestmöglichen PCR-Ergebnis beiträgt. Die Quantifizierung erfolgte in diesem Falle mit dem

LightCycler®-Gerät der Firma Roche und den dazugehörigen Sonden, die für die o. g. Fluoreszenzsignale maßgeblich sind. Diese Sonden sind zwei mit „Fluorescence resonance energy transfer“ (sog. FRET) versehene Oligonukleotide. Es ergibt sich dann ein Fluoreszenz-Signal, wenn sich der sog. FRET-Donor (angeregtes Fluorophor) und der dazu gehörige FRET-Akzeptor (absorbierendes Molekül) bei der Hybridisierung in ausreichender Nähe befinden und der Donor Photonenenergie übertragen kann. Das Ausmaß an Fluoreszenz, das der Donor in diesem Moment abgibt, verhält sich gleichsinnig zur entstandenen DNA-Produktmenge (Bernard, Reiser und Pritham. 2001: Mutation Detection by Fluorescent Hybridization Probe Melting Curves from: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications, Springer Verlag, S. 11 ff).

Grundsätzlich gliedert sich eine PCR in drei unterschiedliche Phasen:

1. **Denaturierung**,
2. **Annealing** und
3. **Elongation**

1. Während der **Denaturierung** wird die DNA geschmolzen, d. h. die doppelsträngigen Nukleinsäuren werden bei 94-96 °C voneinander getrennt. In dieser Phase liegen die Primer ebenfalls getrennt in Einzelsträngen vor.

2. In der **Annealing-Phase** (Primerhybridisierung) lagern sich die Primer der DNA (Template) an. Die Temperatur der Annealing-Phase ist hierbei von großer Bedeutung. Sie beschreibt jene Temperatur, bei welcher sich die Primer an die komplementäre, einzelsträngige Ziel-DNA spezifisch binden. Ist sie zu hoch, lagern sich die Primer nicht korrekt oder gar nicht an die DNA-Template und es resultiert eine mangelhafte oder fehlende Produktbildung. Ist sie dagegen zu niedrig, kommt es zur unspezifischen Primer-Bindung an zu viele Sequenzen und damit zu unspezifischen, unerwünschten Produkten. Das bedeutet: Je höher die Temperatur ist, desto spezifischer geschieht die Primer-Bindung an die gewünschte Region, bis sie nach dem Optimum wieder zurückgeht. Die zur Fluoreszenz fähigen Sonden, ebenfalls Oligonukleotide, binden sich nun an ihre komplementären Stränge und erzeugen durch oben beschriebenen Mechanismus das Fluoreszenzsignal. Anschließend an die Annealing-Phase wird eine Fluoreszenzmessung in jedem Zyklus durchgeführt.

3. Anschließend folgt die **Elongation**; sie bezeichnet die Phase der Amplifikation der Nucleotide mithilfe der DNA-Polymerase. Diese beginnt am 3'-Ende des Primers und arbeitet zum 5'-Ende hin. Die Taq-Polymerase kann hierbei ungefähr 25 Basenpaare pro Sekunde synthetisieren. In Abhängigkeit von der Größe des erwarteten Produkts wird die Elongationszeit gewählt. So wird z. B. anfänglich bei einem Produkt mit 225 Basenpaaren eine Elongationszeit von neun Sekunden ($225:25=9$) eingestellt. Stellt sich im Verlauf der PCR-Etablierung heraus, dass neben dem gewünschten auch unerwünschte DNA-Produkte entstehen, so muss die Elongationszeit verringert werden.

Eine weitere wichtige Funktion der Echtzeit-PCR-Geräte besteht in der Möglichkeit, eine Schmelzkurvenanalyse (LightCycler Software, Version 3, Roche Diagnostic) durchzuführen, anhand derer die Bindungsspezifität der Sonden an die Amplifikate bestimmt und somit beispielsweise Polymorphismen aufgedeckt werden können. Bei der Schmelzkurvenanalyse, die sich der DNA-Amplifikation anschließt, wird die Temperatur in vorgegebener Zeit und vorgegebener Schnelligkeit (sog. „slope“, Steilheit des Temperaturanstiegs) kontinuierlich erhöht. Mit zunehmender Hitze lösen sich nun die an der DNA befindlichen Sonden, die dadurch ihre Fluoreszenzkraft verlieren. Die ausgewählten Sonden sind komplementär zur häufigeren homozygoten SNP-Variante (hhV) - zum „Wildtyp“- aufgebaut. Das bedeutet, dass die Sonden auch besser, genauer und vor allem fester an diese häufigere Variante binden, als es die gleichen Sonden bei der selteneren homozygoten Variante (shV) - der „Mutante“- vermögen. Hier hat durch den „single nucleotide polymorphism“ dieser Variante nicht jede Base der Sonde ihren korrespondierenden Basenpartner auf der DNA; es entsteht eine weniger feste Bindung als bei der häufigeren homozygoten Variante. Diesen Unterschied in der Bindungsfestigkeit der Sonden macht sich die Schmelzkurvenanalyse zum Vorteil, da die Sondenablösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten als Fluoreszenzausschlag oder -peak detektiert werden kann. Sich schneller ablösende Sonden bei niedrigerer Temperatur sprechen für eine Bindung an die shV und später ablösende Sonden bei höheren Temperaturen für eine Bindung an die hhV. Ein zweigipfliger Ausschlag wird als Vorliegen beider SNP-Varianten in der DNA (heterozygote Allelbesetzung) gewertet, da sich die Sonden von beiden Varianten lösen (siehe Abb. 8).

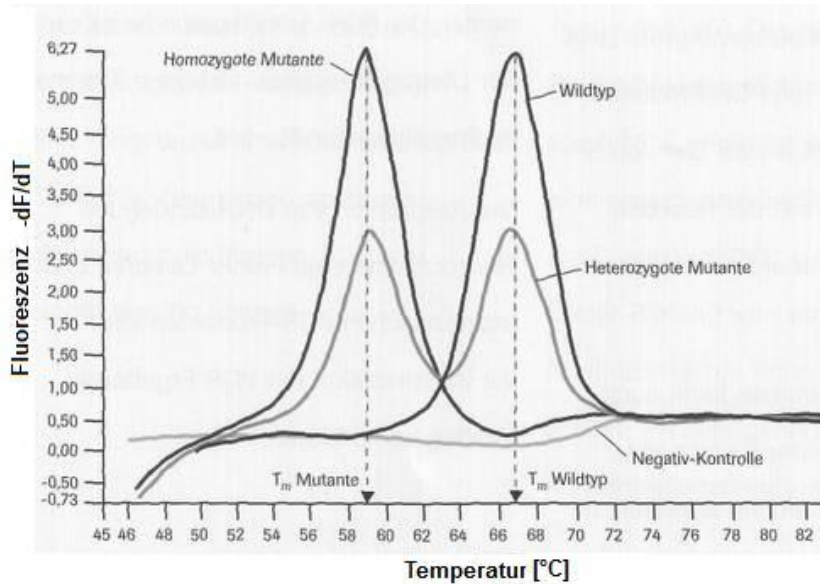


Abbildung 8:
Beispiel-Schmelzkurve
Wildtyp:
häufigere homozygote Variante
Homozygote Mutante:
seltenerer homozygote Variante
Heterozygote Mutante:
Beide SNP-Varianten in DNS vorhanden

6.6 Gelelektrophorese

Um die in der PCR entstandenen Produkte auf ihre Größe, Anzahl und Richtigkeit zu überprüfen, wurde das Verfahren der Gelelektrophorese eingesetzt. Für die Erhaltung eines 1,5-prozentigen Agarose-Gels müssen 45 mg Agarosepulver mit 35 ml von 0,5-fach konzentriertem TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer gemischt und unter Hitze zu einem trüben Gel verarbeitet werden. Dieses Gel funktioniert als enges Maschwerk, durch das die zu trennenden Nukleinsäuren in ihrer Fortbewegung behindert werden, wenn elektrischer Strom durch das Gel fließt. Das Hinzufügen von 2,0 µl RedSafe® (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Südkorea), mit dessen Hilfe Nukleinsäuren gefärbt werden, hilft anschließend, die Nukleinsäurebanden im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar zu machen. RedSafe® gilt als sichere, nicht toxische, nicht mutagene und nicht karzinogene Alternative zum früher verwendeten Ethidiumbromid. Nun kann das noch flüssige Gel in die Elektrophoreseapparatur gegossen werden und muss für

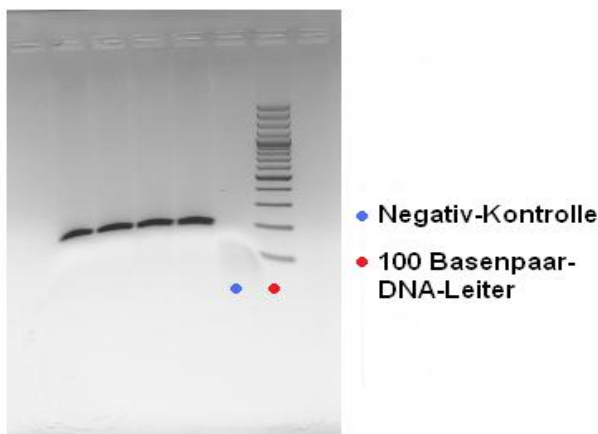


Abbildung 9: Vier Gelelektrophorese-Banden der Patientenproben eines SNPs, Wasser als Negativkontrolle und Basenpaar-Leiter.

Das Hinzufügen von 2,0 µl RedSafe® (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Südkorea), mit dessen Hilfe Nukleinsäuren gefärbt werden, hilft anschließend, die Nukleinsäurebanden im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar zu machen. RedSafe® gilt als sichere, nicht toxische, nicht mutagene und nicht karzinogene Alternative zum früher verwendeten Ethidiumbromid. Nun kann das noch flüssige Gel in die Elektrophoreseapparatur gegossen werden und muss für

ca. 20 Minuten aushärten. Anschließend wird das Gel mit TBE-Pufferlösung bedeckt. Jedes PCR-Produkt, die Positivkontrolle mit beliebiger DNA sowie die Negativkontrolle aus Wasser werden nun mit 10 µl Bromphenolblau versehen. Bromphenolblau hat die Aufgabe, die verschiedenen Lösungen für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Diese Proben und eine 100-Basenpaar-DNA-Leiter können jetzt jeweils in eine Gelkammer pipettiert werden. Die Basenpaar-Leiter enthält Moleküle mit Gewichten im Abstand von 100 Basenpaaren; durch das Stromfeld der Elektrophorese entstehen auf diese Weise Referenzbanden in 100 Basenpaarschritten. Nun ist die Bestimmung der Basenpaargröße von genomischer Patienten-DNA möglich. Sobald die Elektroden angeschlossen sind, kann die Gelelektrophorese mit ca. 125 mV für 25 Minuten laufen (abhängig je nach Gelkammer und Produktgröße). Nach Auflegen des Gels auf eine UV-Lampe ist es möglich, die Banden, ihre Anzahl und Basenpaarlänge zu analysieren (siehe Abb. 9).

6.7 Statistische Analyse

Um das Quotenverhältnis (sog. Odds Ratio, OR) für das Therapieansprechen zu errechnen, wurde eine uneingeschränkte multinomiale, logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Für die Bewertung des Ansprechens wurden gemäß RECIST 1.0 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, Version 1.0) die Kriterien (komplette Remission, CR; partielle Remission, PR; stabile Erkrankung, SD; progressive Erkrankung, PD) alle acht Wochen untersucht. Unter Verwendung des Cox-proportionalen Hazard Modells konnte der Risikoquotient (sog. Hazard Risk, HR) für Progression und Überleben bestimmt werden. Aufgrund der relativ geringen Patientenzahl wurde keine Kovariatenanalyse durchgeführt. Mittels der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse (sog. Kaplan-Meier survival function) wurden Unterschiede bezüglich der progressionsfreien Lebenszeit (sog. progression free survival, PFS) und der Gesamtüberlebenszeit (sog. overall survival, OS) berechnet; für die Signifikanztestung kam der Logarithmische-Rangreihen-Test (log-rank-test) zum Einsatz. Das Signifikanzniveau (Alphaniveau) wurde immer bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ angesetzt. Die PFS-Zeiten wurden von Beginn der Cetuximab/Docetaxel Behandlung an bis entweder erstens zur Progression der Erkrankung, zweitens bis zum Tod, wenn dieser vor der dokumentierten Progression eintrat, oder drittens bis zum letzten Patientenkontakt gewertet. Die Zeitspanne vom Therapiebeginn bis zum Versterben der Patienten

oder dem letzten Kontakt war als OS-Zeit definiert. Um die Homogenität der Genotypfrequenzen der einzelnen SNPs zu erfahren, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Mit ihm kann geprüft werden, ob zwei oder mehr Stichproben derselben Verteilung bzw. einer homogenen Grundgesamtheit entstammen. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS durchgeführt (Version 19, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

7 Ergebnisse

7.1 Patientencharakteristika

Aus den 48 rekrutierten Patientenproben wiesen 45 eine gute Qualität auf. Das mediane Alter betrug 60 Jahre und 76 % der Patienten waren männlich. Folgende Lokalisationen der Primärtumore waren zu verzeichnen: Mundhöhle (27 %), Oropharynx (27 %), Hypopharynx (31 %), Larynx (2 %) und andere (13 %). 73 % waren Raucher (aktiv oder früher) und 44,5 % trockene Alkoholiker oder regelmäßige Trinker. 58 % der Patienten sprachen auf die vorherige Platintherapie an. Die mediane Nachuntersuchungszeit betrug 8,8 Monate mit 39 dokumentierten Progressionen und 41 Todesfällen. Das mediane progressionsfreie Überleben belief sich auf 3,12 Monate, das mediane Gesamtüberleben auf 7,75 Monate (siehe Tab. 5). Von allen Patienten konnte eine Überlebensanalyse durchgeführt werden; die Auswertung des Therapieansprechens war bei 43 der 45 Personen möglich, da zwei vor der ersten Evaluation verstorben waren.

Charakteristik	n Patienten	% Patienten
Median Alter (Spannbreite)	60 (46-76)	
Geschlecht		
männlich	34	76
weiblich	11	24
Tumorlokalisation		
Mundhöhle	12	27
Oropharynx	12	27
Hypopharynx	14	31
Larynx	1	2
Andere	6	13
Raucher		
niemals	12	27
aktiv oder früher	33	73
Alkoholgewohnheiten		
nein	13	29
selten	12	27
trocken	12	27
regelmäßig	8	18
Platinsensitivität		
ja	26	58
nein	12	27
nicht auswertbar	7	15,5
Median PFS Monate (95% CI)	3,12 (0,44-16,30)	
Median OS Monate (95% CI)	7,75 (1,54-17,51)	

Tabelle 5: Patientencharakteristika (n=45)

7.2 Etablierung der Polymerase-Ketten-Reaktion und Messung der Patientenproben

Um eine PCR inklusive Schmelzkurvenanalyse mit möglichst guten und eindeutigen Ergebnissen zu erhalten, ist es nötig, verschiedene Variablen zu berücksichtigen und unter Umständen zu verändern. So spielen hierbei, wie oben im Grundlagenteil bereits erwähnt, die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit und die $MgCl_2$ -Konzentration eine besonders wichtige Rolle. Als Anhaltspunkt für die anfängliche Annealing-Temperatur wurde sich an die Schmelztemperatur der Sonden gehalten. Sie ist definiert als jene Temperatur, bei der 50 % der Sonden schmelzen, also zerfallen. Deshalb begannen die Etablierungsversuche 2 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Sonden. Die Annealing-Zeit war stets auf zwölf Sekunden angelegt. Die Elongationszeit wurde anhand der Basenpaarlänge ermessen; die Länge geteilt durch die Polymerase-Umsatzrate ergab die anfängliche Elongationszeit (siehe 6.5). Die Elongationstemperatur war auf 72 °C festgesetzt, da die Taq-Polymerase bei dieser Temperatur am besten arbeitet. Die PCRs wurden mit 2, 3, 4 und 5 mM $MgCl_2$ -Konzentrationen ausgetestet und im Verlauf gegebenenfalls korrigiert, bis die optimale Konzentration gefunden wurde. Als Referenz-DNA für die Etablierungen sollte eine Kolonkarzinom-Zelllinie (Colo 320) dienen. Wenn es im Verlauf der Versuche nicht möglich war, eine PCR durch o. g. Veränderung dieser Variablen zu optimieren, so mussten neue Primer, die an anderen Stellen derselben Region ansetzten, bestellt und wieder ausgetestet werden. Solche Neuversuche waren bei fünf der elf Gene vonnöten.

Um nun zu wissen, ob durch die jeweiligen Primer und Sonden (Metabion, Martinsried, Deutschland, Sequenzen siehe Tab. 6) auch wirklich nur das beabsichtigte DNA-Stück mittels PCR amplifiziert wurde, kam im Anschluss an jede PCR die Gelelektrophorese mit diesen PCR-Produkten zum Einsatz. War man sich schließlich der PCR-Bedingungen sicher, wurden andere Karzinom-Zelllinien unter diesen Bedingungen gemessen; so war es möglich, Referenzkurven aus genomischer DNA zu erhalten, die der hhV, shV oder der heterozygoten Variante entsprachen. Als Bestätigung wurden die Referenzkarzinomlinien dieses Abschnitts sequenziert, um sicherzustellen, dass es sich hierbei um die beabsichtigten genomischen Varianten handelte. Letztendlich besaß man zwei oder sogar drei Referenzzell-

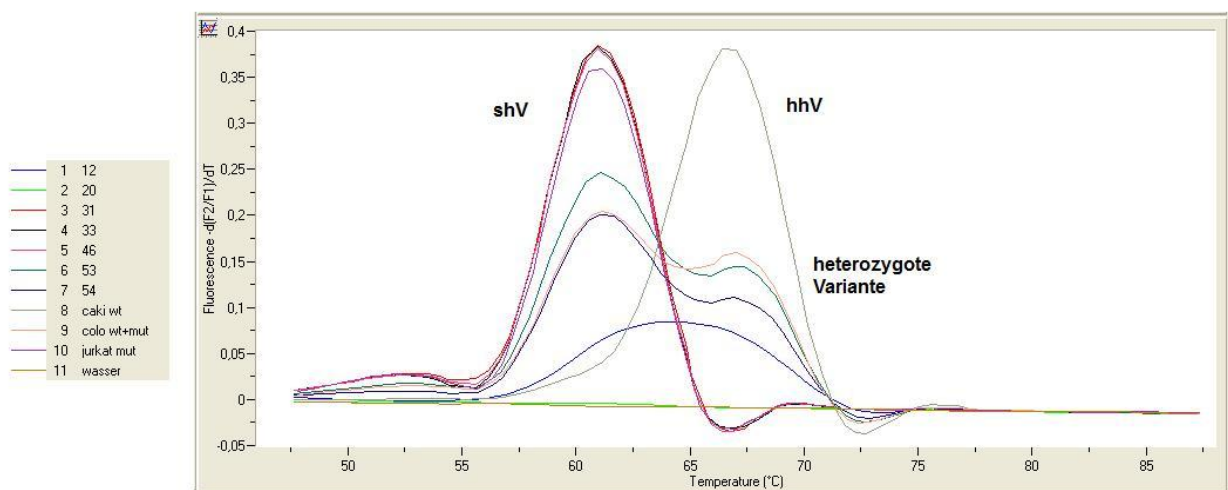
linien, für hhV, shV und/oder die heterozygote Variante, mit deren Hilfe nun die Patientenproben in der Schmelzkurvenanalyse verglichen werden konnten.

Eine PCR galt dann als etabliert, wenn

1. in der Schmelzkurvenanalyse der PCR mindestens zwei Referenz-Karzinomzelllinien eindeutig einem SNP entweder der hhV, der shV oder der heterozygoten genetischen Variante zugeordnet werden konnten,
2. jene Referenzzelllinien anschließend sequenziert, also genotypisiert waren,
3. das dazugehörige Elektrophoresegel nur eine Bande, die das Produkt der PCR darstellt, mit der richtigen Größe aufwies.

Auf diese Weise wurden nun die PCR-Bedingungen für alle elf Gene etabliert, deren Ergebnisse weiter unten in Tab. 7 aufgeführt sind.

Die Patientenproben wurden unter den elf etablierten PCR-Bedingungen gemessen, um herauszufinden, welchen Genotyp sie bezüglich der SNPs aufwiesen. Um die Patientenkurven in der Mutationsanalyse eindeutig einem Genotyp zuzuordnen, wurden die Referenzzelllinien des jeweiligen SNPs mitgemessen. So entstanden folgende Bilder durch die Analysen:



Grafik 3: Schmelzkurven der Patientenproben eines SNPs im Vergleich zu den Referenz-Zelllinien Caki für die hhV, Colo 320 für die heterozygote Variante, Jurkat für die shV und H₂O als Negativkontrolle.

Bei manchen Proben gelang es allerdings nicht, sie eindeutig einer Referenzzelllinie bzw. einem SNP zuzuordnen, da ihr Verlauf und/oder ihre Schmelztemperatur nicht exakt mit der Referenz übereinstimmten. Daraufhin wurden sie nochmals gemessen und, bei unverändert fraglichem Ergebnis, die PCR-Produkte sequenziert. Durch die Sequenzierung konnte dann festgestellt werden, um welche SNP-Variante es sich handelte (siehe Tab. 6). Bei vier Patientenproben gelang es auch nach mehrmaligen PCR-Versuchen nicht, ihren Genotyp bezüglich zweier SNPs zu ermitteln. Dies äußerte sich in Mutationsanalyse-Kurven, die der Negativkontrolle mit Wasser glichen.

7.3 Genotypenfrequenz der Patienten

Durch den sog. Chi-Quadrat-Homogenitätstest (siehe Tab. 8) sollte geprüft werden, ob die Genotypen der Patienten homogen über die Grundgesamtheit verteilt waren.

7.4 Korrelation zwischen SNPs und Therapieansprechen

Die elf SNPs wurden auf einen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen der Patienten auf Docetaxel und Cetuximab untersucht. Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen SNPs und Ansprechen (siehe Tab. 9). Bei 38 Patienten konnte ein vorheriges Platinansprechen (Platinansprechen versus Progression innerhalb von drei Monaten nach Beginn der Platintherapie) dokumentiert werden. Es ergab sich keinerlei Zusammenhang zwischen SNPs und der Cisplatinempfindlichkeit.

7.5 Korrelation zwischen SNPs und Progressionsrisiko sowie progressionsfreiem Überleben

Die Untersuchung von einem Zusammenhang zwischen den genetischen Varianten des Signalwegs und Progressionsrisiko sowie PFS ergab folgende signifikante Ergebnisse der SNPs *AKT2: rs8100018* und *PTEN: rs12569998* (siehe Tab. 10 und Graf. 4-6):

AKT 2: Patienten, die die seltenere homozygote Variante für *AKT2: rs8100018* aufwiesen, erlitten ein fast fünffach erhöhtes Risiko für eine schnellere Krankheitsprogression als diejenigen der häufigeren homozygoten Variante (HR 4,83; 95 % CI 1,109-21,027).

PTEN: Die seltenere homozygote Variante von *PTEN: rs12569998* resultierte in ein über zweifach erhöhtes Progressionsrisiko im Vergleich zur anderen genetischen Variante (HR 2,358; CI 1,235-4,505). Unter allen Patienten konnte für diesen SNP keine heterozygote Variante entdeckt werden.

Aufgrund der Beobachtung, dass diese beiden SNPs im Zusammenhang mit einem höheren Progressionsrisiko zu stehen scheinen, wurde eine Analyse für ungünstige Genotypen erstellt. Auf diese Weise konnte geprüft werden, ob die Anwesenheit von einem oder zwei nachteiligen Varianten der SNPs zusätzliche Effekte erzielte: Patienten, die beide ungünstigen SNPs in *AKT2: rs8100018* und *PTEN: rs12569998* trugen, wiesen ein zwölfach höheres signifikantes Progressionsrisiko auf (HR 12,53; CI 1,53-102,10; p=0,018), während das Risiko bei Anwesenheit nur eines unvorteilhaften SNPs über 4,5-fach erhöht war als ganz ohne sie.

Patienten mit den SNPs *AKT2: rs8100018* und *PTEN: rs12569998* erfuhren signifikante Unterschiede im progressionsfreien Überleben (siehe Graf. 4-5). Für *AKT2: rs8100018* betrug das mediane PFS 7,2 Monate beim Vorhandensein der hhV, während Patienten mit der heterozygoten Variante nach 5,4 Monaten und mit der shV im Median nach 3,1 Monaten progredierte ($p=0,034$). Für *PTEN: rs12569998* zeigte sich beim Vorhandensein der hhV ein medianes PFS von 10,4 Monaten und für shV von 5,1 Monaten ($p=0,007$). Patienten mit zwei unvorteilhaften Genotypen erfuhren ein medianes PFS von 2,1 Monaten, mit einem nachteiligen Genotyp von 5,5 Monaten sowie gänzlich ohne ungünstige Genotypen von 7,3 Monaten ($p=0,001$) (siehe Graf. 6).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die SNPs *AKT2: rs8100018* und *PTEN: rs12569998* einen additiven Effekt auf das Progressionsrisiko und das progressionsfreie Überleben im KHK haben. Unter den übrigen SNPs konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden.

7.6 Korrelation zwischen SNPs und Mortalitätsrisiko sowie Gesamtüberleben

Alle elf SNPs wurden auf einen Zusammenhang mit ihrem Mortalitätsrisiko und OS untersucht, wobei zwei davon signifikante Ergebnisse zeigten:

AKT1: rs3803304 und *AKT2: rs8100018* (siehe Tab. 11, Graf. 7 und 8).

AKT 1: Patienten mit mindestens einem der beiden ungünstigen Varianten in *AKT1: rs3803304* (heterozygote Variante oder shV) erfuhren ein geringeres Mortalitätsrisiko mit einem HR von 0,51 (95 % CI 0,27-0,97). Sie wiesen ein medianes OS von 8,9 Monaten im Gegensatz zur hhV von 4,3 Monaten ($p=0,037$) auf.

AKT 2: Das Vorhandensein der shV für *AKT2: rs8100018* barg ein über 3,5-fach erhöhtes Mortalitätsrisiko (HR 3,57; CI 1,06-12,0). Patienten, die die shV trugen, hatten ein medianes OS von 5,6 Monaten und mit heterozygoter Allelbesetzung von 8,9 Monaten und mit der hhV von 13,8 Monaten ($p=0,044$).

Zwischen keinerlei anderen SNPs konnte ein Zusammenhang von Mortalitätsrisiko und OS hergeleitet werden. Die Analyse mit mehreren unvorteilhaften SNPs mit additiven Effekten ergab keine signifikanten Unterschiede im OS.

Ergebnisse: Basenfolge der SNPs

SNP	Primer-Sequenz	Sonden-Sequenz
AKT 1: <i>rs2494738</i>	GTGTGCCAGGACAGATG GGTGGCTCTTCTGAGAGG	GCTCC <u>C</u> GTACCGCGC CCGTTTCTGTCTGCTGGCCCTAAGAAA
AKT 1: <i>rs2498804</i>	CTGCAGAGCCTTCAGTTAC GTCTCTGAGGTCTCTGAGTC	CTAAGTGCT <u>C</u> AAGTCACTTTTATTATCTTCCT CTTCCAGGCCGGCCTTGTC
AKT 1: <i>rs3803304</i>	ATCAAGCTTTGGCTATCAGT TTCAGGGCTGCTCAAGA	GCG <u>C</u> AGGGGCAGGT AGCCTGGGGATGAGGGGAT
AKT 2: <i>rs892119</i>	GTGATTAAGTGGGGGGC GGACCTACATTCTTAATGAGCA	TTTGAAATAGATGAGTCTTTATCATCTCTT <u>C</u> TGAT GAAGCTCCCACTAGACACCTCCTTATACTGTTTCA
AKT 2: <i>rs8100018</i>	TCTCAACTTGCTTTAACCCAT AGCAAAGCGAGACTCTG	AGGGG <u>C</u> CGGGGACAG CAGGAGCCCATTCCATGACAGGC
FRAP 1: <i>rs11121704</i>	TCTAATGTGTTGAGATTTGAAGGTT CTTATCAGTTGCAGGAAAGTG	TTCTCCTTTCCAAACATCTG <u>C</u> GATGAT GCCTGAAGCATTAACTCTTACCTCTTGTAAGGAC
FRAP 1: <i>rs2295080</i>	CCAGGCCCTAGACTCAC TCCTGAAGCTTCTCTTCTTCATT	GGG <u>C</u> TGGGAACCCTCCT TCTTCTCCCTATACCTGTCTGATTGGTCCT
PIK3: <i>rs2699887</i>	GACCCGATGCGGTTAGA AGCTAGGAGAGGCCAGA	GCGCGGA <u>C</u> TGGCCG AGCGGGTGCGGTGGG
PIK3: <i>rs7640662</i>	AGACACATTCAAGAAGTATTCCATA ATGACACTGTCTGGACTG	TCCATTTACACCTTCTC <u>C</u> TTAGCCTATAAGT TGGCAGAATCACCACCACGATCACA
PTEN: <i>rs12569998</i>	GGGATTTAAAGATCCAGAGCTAT TGCTGGGTGTAATCTTAAGATCTTC	GCAGTAGTATCCTCCTTAAATGTT <u>I</u> GGC GTGACTTTCTAAATTGCCCTATGTATGCAGTTCTT
PTEN: <i>rs2299939</i>	TCTCAAAGGACTCTGAGTACC CGGAGCAGCTGGGATTAT	GAGGGATATGATTTGTTATGGAATG <u>C</u> GAAG CCACGCCTGGCTAAATTGATCAGTATTATTTAACT

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden der jeweiligen SNPs in der rtPCR. Fettgedruckte Basen entsprechen der Basenvariante.

SNP \ Bedingungen	MgCl ₂ [mM]	Annealing-temperatur [C°]	Elongationszeit [s]	hhV	heterozygot	shV
AKT1:rs2494738	2,5	58	6	Colo 320	-	MDAMB
AKT1:rs2498804	2	63	6	Colo 320	HCT	Jurkat
AKT1:rs3803304	5	61	5	Colo 320	-	Jurkat
AKT2:rs892119	5	65	7	Colo 320	Hela	-
AKT2:rs8100018	3	59	6	Colo 320	Hela	A498
FRAP1:rs11121704	6	65	5	Caki	Colo 320	Jurkat
FRAP1:rs2295080	2,5	60	6	Colo 320	-	MDAMB
PIK3:rs2699887	2	54	8	A498	Colo 320	SN12
PIK3:rs7640662	5	56	7	Miapaca	-	Colo 320
PTEN:rs12569998	4	61	8	Colo 320	-	HCT
PTEN:rs2299939	7	67	10	Colo 320	CGTHW1	-

Tabelle 7: PCR-Bedingungen der 11 SNPs mit MgCl₂-Konzentration, Annealingtemperatur, Elongationszeit und den Referenzzelllinien.

SNP	Genotyp	Anzahl Patienten	Patienten %	p
AKT 1: rs2494738	GG	38	84,4	≤0,001
	GA	6	13,3	
	AA	1	2,2	
AKT 1: rs2498804	GG	28	62,2	≤0,001
	GT	8	17,7	
	TT	9	20	
AKT 1: rs3803304	CC	26	57,7	≤0,001
	CG	16	35,5	
	GG	3	6,6	
AKT 2: rs892119	GG	23	51,1	0,002
	GA	18	40	
	AA	4	8,8	
AKT 2: rs8100018	CC	4	8,8	≤0,001
	CG	13	28,8	
	GG	28	62,2	
FRAP 1: rs11121704	CC	2	4,4	≤0,001
	CT	18	40	
	TT	25	55,5	
FRAP 1: rs2295080	GG	9	20	0,031
	GT	13	28,8	
	TT	23	51,1	
PI3K: rs2699887	GG	27	60	≤0,001
	GA	5	11,1	
	AA	9	20	
	n.b.	4	8,8	-
PI3K: rs7640662	CC	31	68,8	≤0,001
	CG	12	26,6	
	GG	2	4,4	
PTEN: rs12569998	TT	27	60	0,180
	GG	18	40	
PTEN: rs2299939	CC	21	46,6	≤0,001
	CA	21	46,6	
	AA	1	2,2	
	n.b.	2	4,4	-

Tabelle 8: Genotypfrequenzen und deren Homogenität mittels χ^2 -Test.

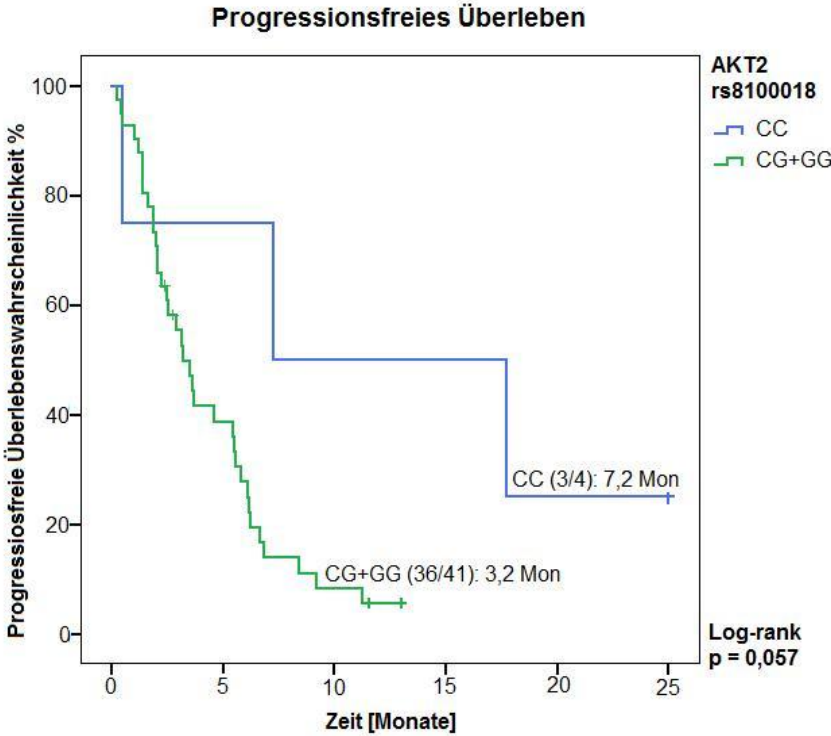
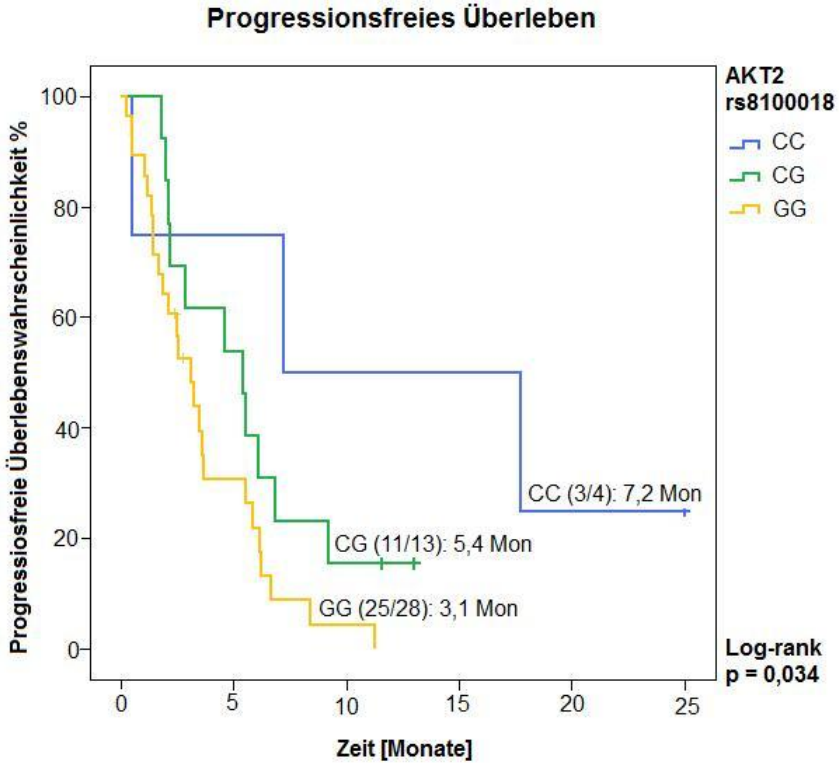
Ergebnisse: SNPs und Therapieansprechen

PI3K/PTEN/AKT/mTOR Signalweg: Genotypen und Therapieansprechen (n=43)				
SNP und Genotyp	Anzahl Therapieansprechen/ Genotyp	OR	95% Konfidenzintervall	p
AKT 1: rs2494738				
AA	22/37	1(Referenz)		
AG	1/5	5,867	0,596-57,787	0,130
GG	1/1	n.b.	n.b.	n.b.
AG+GG	2/6	2,933	0,475-18,101	0,246
AKT 1: rs2498804				
GG	15/27	1(Referenz)		
GT	5/7	0,500	0,082-3,046	0,452
TT	4/9	1,562	0,342-7,131	0,565
GT+GG	9/16	0,972	0,280-3,379	0,965
AKT 1: rs3803304				
CC	14/24	1(Referenz)		
CG	9/16	1,089	0,303-3,910	0,896
GG	1/3	2,800	0,222-35,288	0,426
CG+GG	10/19	1,260	0,375-4,235	0,709
AKT 2: rs892119				
GG	11/22	1(Referenz)		
GA	10/17	0,700	0,195-2,511	0,584
AA	3/4	0,333	0,030-3,721	0,372
GA+AA	13/21	0,615	0,183-2,072	0,431
AKT 2: rs8100018				
CC	3/4	1(Referenz)		
CG	8/12	1,500	0,116-19,437	0,756
GG	13/27	3,231	0,297-35,110	0,335
CG+GG	21/39	2,571	0,245-26,939	0,431
FRAP 1: rs11121704				
TT	16/24	1(Referenz)		
TC	8/17	2,250	0,628-8,057	0,213
CC	0/2	n.b.	n.b.	n.b.
TC+CC	8/19	2,750	0,792-9,549	0,111
FRAP 1: rs2295080				
GG	3/9	1(Referenz)		
GT	6/12	0,500	0,084-2,992	0,448
TT	15/22	0,233	0,045-1,216	0,084
GT+TT	21/34	0,310	0,066-1,457	0,138
PI3K: rs2699887 *				
GG	15/26	1(Referenz)		
GA	4/5	0,341	0,033-3,488	0,364
AA	4/9	1,705	0,370-7,854	0,494
GA+AA	8/14	1,023	0,275-3,804	0,973
PI3K: rs7640662				
CC	19/29	1(Referenz)		
CG	4/12	3,800	0,915-15,775	0,066
GG	1/2	1,900	0,107-33,700	0,662
CG+GG	5/14	3,420	0,900-12,992	0,071
PTEN: rs12569998				
TT	18/27	1(Referenz)		
GG	6/16	3,333	0,917-12,112	0,067
PTEN: rs2299939 *				
AA	10/20	1(Referenz)		
AC	13/21	0,615	0,178-2,132	0,444
CC	0/1	n.b.	n.b.	n.b.
AC+CC	13/22	0,692	0,204-2,347	0,555

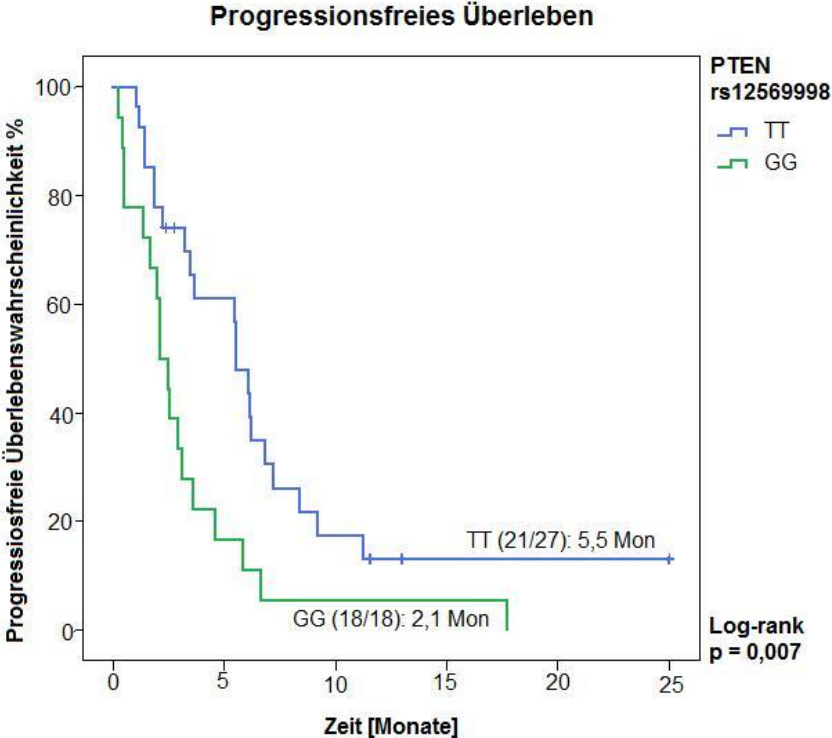
Tabelle 9: Multinomiale, logistische Regressionsanalyse. n.b.: nicht bestimmbar durch zu kleine Patientenzahl. *Analyse konnte nicht bei allen 43 Patienten durchgeführt werden wegen fehlender PCR-Ergebnisse (PI3K: 40 Pat., PTEN: 42 Pat.).

PI3K/PTEN/AKT/mTOR Signalweg: Genotypen und Progression (n=45)				
SNP und Genotyp	Anzahl Pro- gression/ Genotyp	HR	95% Konfidenz- intervall	p log-rank
AKT 1: rs2494738				
AA	32/38	1(Referenz)		} 0,121
AG	6/6	2,488	0,979-6,320	
GG	1/1	0,675	0,091-5,007	
AG+GG	7/7	1,763	0,761-4,083	
AKT 1: rs2498804				
GG	24/28	1(Referenz)		} 0,983
GT	7/8	0,971	0,419-2,277	
TT	8/9	1,068	0,476-2,396	
GT+GG	15/17	1,023	0,535-1,957	
AKT 1: rs3803304				
CC	22/26	1(Referenz)		} 0,080
CG	14/16	0,698	0,349-1,395	
GG	3/3	2,866	0,826-9,942	
CG+GG	17/19	0,823	0,430-1,574	
AKT 2: rs892119				
GG	18/23	1(Referenz)		} 0,996
GA	17/18	1,026	0,527-1,995	
AA	4/4	1,033	0,348-3,070	
GA+AA	21/22	1,027	0,546-1,932	
AKT 2: rs8100018				
CC	3/4	1(Referenz)		} 0,034
CG	11/13	2,615	0,574-11,918	
GG	25/28	4,830	1,109-21,027	
CG+GG	36/41	3,696	0,874-15,639	
FRAP 1: rs11121704				
CC	2/2	1(Referenz)		} 0,591
CT	16/18	0,834	0,186-3,735	
TT	21/25	0,616	0,141-2,700	
CT+TT	37/43	0,693	0,162-2,956	
FRAP 1: rs2295080				
GG	9/9	1(Referenz)		} 0,275
GT	11/13	0,674	0,273-1,663	
TT	19/23	0,518	0,228-1,175	
GT+TT	30/36	0,567	0,263-1,224	
PI3K: rs2699887*				
GG	22/27	1(Referenz)		} 0,923
GA	5/5	1,162	0,430-3,139	
AA	8/9	1,147	0,506-2,597	
GA+AA	13/14	1,153	0,573-2,319	
PI3K: rs7640662				
CC	26/31	1(Referenz)		} 0,593
CG	11/12	1,285	0,631-2,618	
GG	2/2	1,860	0,433-7,995	
CG+GG	13/14	1,348	0,687-2,643	
PTEN: rs12569998				
TT	21/27	1(Referenz)		} 0,007
GG	18/18	2,358	1,235-4,505	
PTEN: rs2299939*				
AA	19/21	1(Referenz)		} 0,270
AC	17/21	0,668	0,341-1,306	
CC	1/1	2,462	0,314-19,335	
AC+CC	18/22	0,699	0,361-1,353	
AKT 2: rs8100018 PTEN: rs12569998 Unvorteilhafte Geno- typenanalyse				
0	1/2	1(Referenz)		} 0,001
1	22/27	4,27	0,56-32,62	
2	16/16	12,53	1,54-12,11	

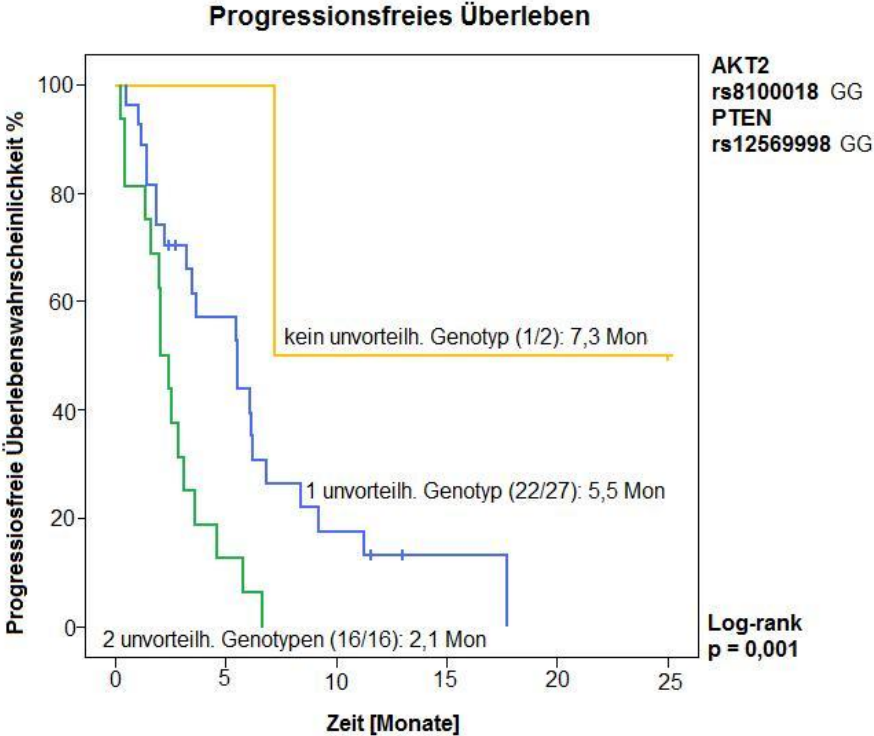
Tabelle 10: Cox Regressionsanalyse. *Analyse konnte nicht bei allen 45 Patienten durchgeführt werden wegen fehlender PCR-Ergebnisse (PI3K: 41 Pat., PTEN: 43 Pat.).



Grafik 4: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben des SNPs AKT2:rs8100018. Oben: hhV, shV und heterozygote Variante gegeneinander, unten: hhV gegen shV und heterozygote Variante.



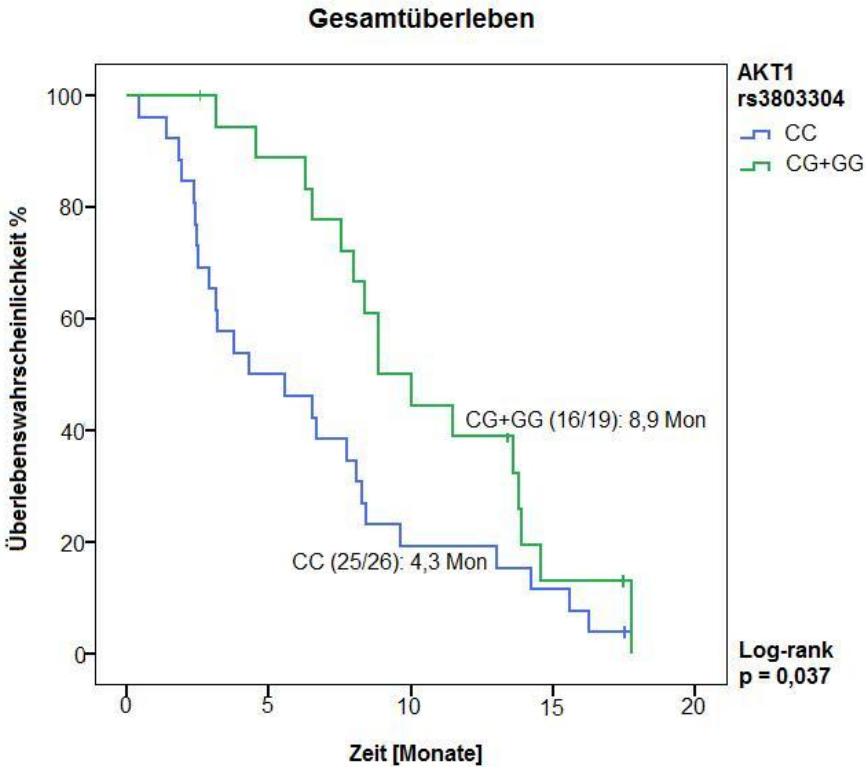
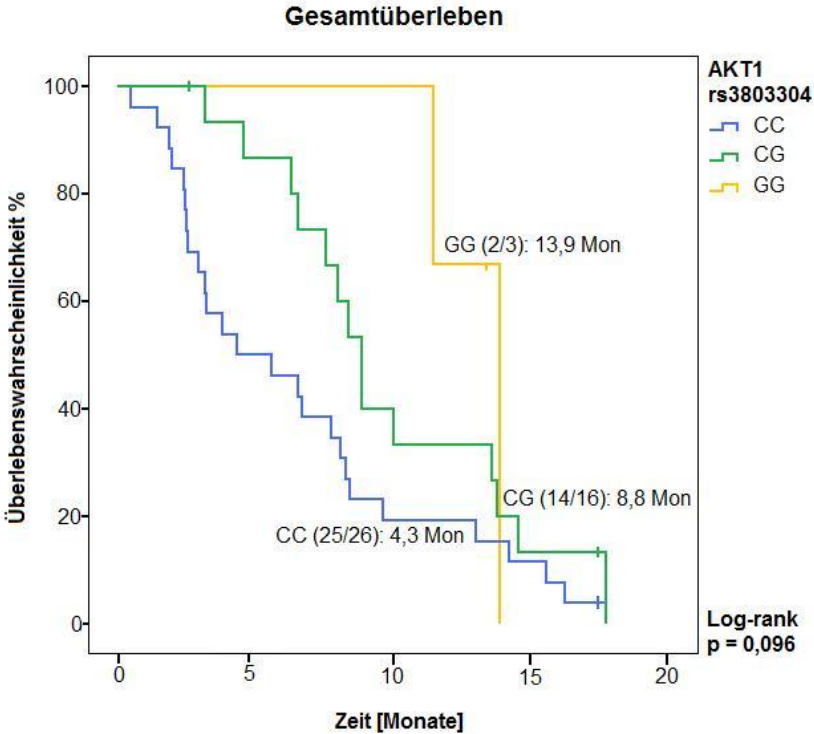
Grafik 5: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben des SNPs PTENrs:12569998, hhV gegen shV.



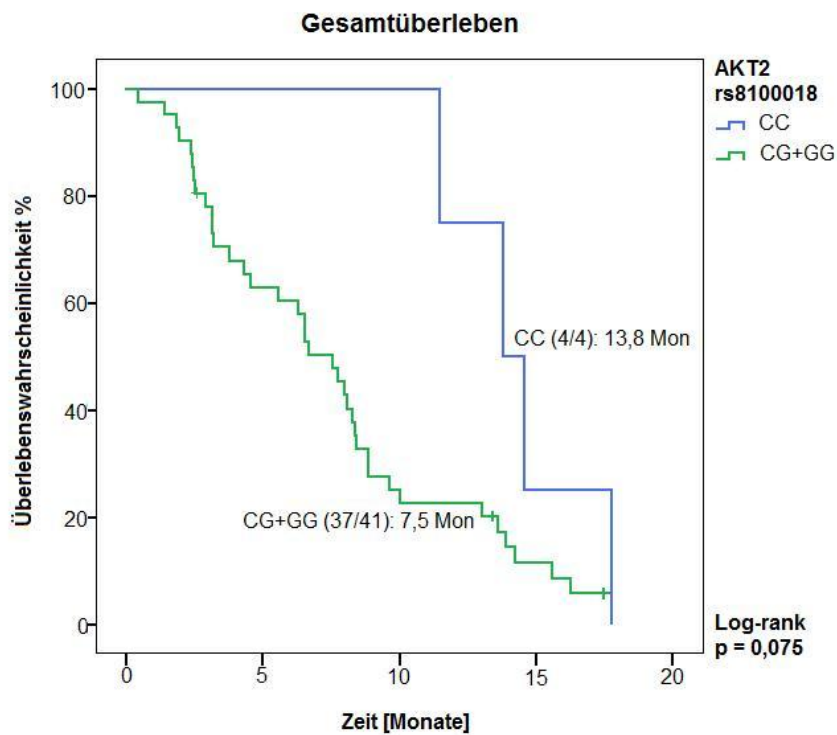
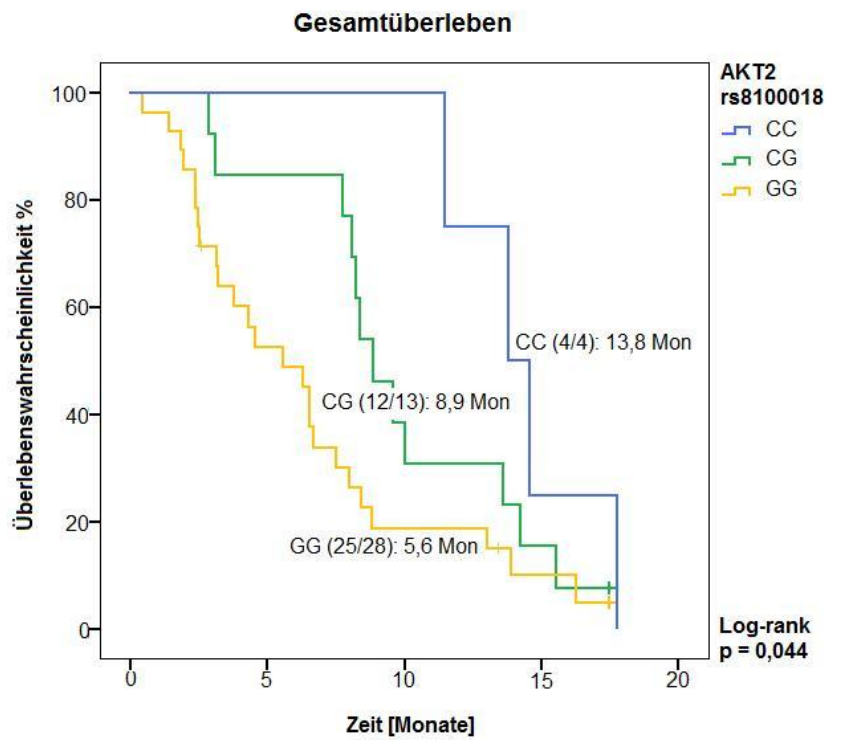
Grafik 6: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben für die unvorteilhaften SNPs AKT2:rs8100018 und PTENrs:12569998.

PI3K/PTEN/AKT/mTOR Signalweg: Genotypen und Überleben (n=45)				
SNP und Genotyp	Nr. gestorben/Genotyp	HR	95% Konfidenzintervall	P log-rank
AKT 1: rs2494738				
AA	34/38	1(Referenz)		} 0,452
AG	6/6	1,755	0,721-4,274	
GG	1/1	1,036	0,139-7,694	
AG+GG	7/7	1,597	0,692-3,689	
AKT 1: rs2498804				
GG	27/28	1(Referenz)		} 0,711
GT	7/8	0,870	0,376-2,009	
TT	7/9	0,705	0,302-1,647	
GT+GG	14/17	0,780	0,404-1,507	
AKT 1: rs3803304				
CC	25/26	1(Referenz)		} 0,096
CG	14/16	0,553	0,282-1,085	
GG	2/3	0,334	0,078-1,428	
CG+GG	16/19	0,510	0,268-0,972	
AKT 2: rs892119				
GG	20/23	1(Referenz)		} 0,921
GA	17/18	0,874	0,449-1,700	
AA	4/4	0,982	0,333-2,898	
GA+AA	21/22	0,894	0,477-1,674	
AKT 2: rs8100018				
CC	4/4	1(Referenz)		} 0,044
CG	12/13	2,002	0,561-7,141	
GG	25/28	3,569	1,061-12,000	
CG+GG	37/41	2,808	0,857-9,203	
FRAP 1: rs11121704				
CC	2/2	1(Referenz)		} 0,434
CT	17/18	1,210	0,277-5,283	
TT	22/25	0,793	0,184-3,426	
CT+TT	39/43	0,944	0,226-3,953	
FRAP 1: rs2295080				
GG	8/9	1(Referenz)		} 0,731
GT	12/13	0,724	0,288-1,823	
TT	21/23	0,726	0,313-1,684	
GT+TT	33/36	0,725	0,325-1,615	
PI3K: rs2699887*				
GG	26/27	1(Referenz)		} 0,609
GA	4/5	0,613	0,212-1,768	
AA	7/9	0,792	0,342-1,834	
GA+AA	11/14	0,716	0,352-1,459	
PI3K: rs7640662				
CC	28/31	1(Referenz)		} 0,483
CG	11/12	1,553	0,754-3,200	
GG	2/2	1,202	0,281-5,141	
CG+GG	13/14	1,487	0,749-2,950	
PTEN: rs12569998				
TT	26/27	1(Referenz)		} 0,686
GG	15/18	1,145	0,593-2,208	
PTEN: rs2299939*				
AA	19/21	1(Referenz)		} 0,316
AC	19/21	0,782	0,408-1,500	
CC	1/1	3,245	0,407-25,907	
AC+CC	20/22	0,817	0,430-1,552	

Tabelle 11: Cox Regressionsanalyse. *Analyse konnte nicht bei allen 45 Patienten durchgeführt werden wegen fehlender PCR-Ergebnisse (PI3K: 41 Pat., PTEN: 43 Pat.).



Grafik 7: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben des SNPs AKT1:rs3803304. Oben: hhV, shV und heterozygote Variante gegeneinander, unten: hhV gegen shV und heterozygote Variante.



Grafik 8: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben des SNPs AKT2:rs8100018. Oben: hhV, shV und heterozygote Variante gegeneinander, unten: hhV gegen shV und heterozygote Variante.

8 Diskussion

In einem medizinischen Zeitalter, in dem beispielsweise die Therapie mit monoklonalen Antikörpern möglich ist, scheint die personalisierte Behandlung mit Chemotherapeutika die neueste Herausforderung der Onkologie zu sein, um die besonderen Merkmale eines bestimmten Tumors gezielt als Angriffspunkt nutzen zu können. Eine weitere Errungenschaft der heutigen Medizin ist es, innerpersonelle Voraussetzungen, wie genetische Faktoren der Patienten, in die Therapieplanung mit einzubeziehen. Solche genetischen Faktoren oder Marker stellen u. a. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) dar. Die genetischen Variationen können das Risiko für die Entstehung von Tumoren beeinflussen. Seit einiger Zeit ist ebenso bekannt, dass SNPs mit dem Therapieansprechen, der Toxizität der Therapie und dem Outcome der Patienten assoziiert sind (Pu u. a., 2011; Hildebrandt u. a., 2009; Quintela-Fandino u. a., 2006; Zhang u. a., 2007; Park u. a., 2001). Der hier thematisierte PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg und seine Veränderungen sind häufig Mitverursacher vielerlei menschlicher Krebsarten. So treten auch besonders beim Kopf-Hals-Karzinom Alterationen dieses Signalwegs auf (Hunter u. a., 2005). Studien über die Art der Veränderungen ergaben, dass Amplifikation, Mutation und vermehrte Expression von PIK3CA, Amplifikation von AKT2 sowie die Hinabregulation von PTEN im KHK auffindbar sind (Qiu u. a., 2006; Or u. a., 2005; Pedrero u. a., 2005). Polymorphismen des hier untersuchten Signalweges zeigten in anderen Tumorentitäten wie z. B. dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom und Ösophaguskarzinom einen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen, Wiederauftreten und Überleben (Hildebrandt u. a., 2009; Pu u. a., 2011).

In der vorliegenden Studie sollte nun hinterfragt werden, ob ebenfalls eine Assoziation von Polymorphismen in den Genen PIK3CA, AKT1, AKT2, PTEN und FRAP 1 (mTOR) mit Therapieansprechen, Krankheitsprogression und Gesamtüberleben in einer Gruppe von Patienten mit rezidiviertem oder erstmalig metastasiertem Kopf-Hals-Karzinom besteht, die in einer Phase-II-Studie als Zweitlinientherapie mit Docetaxel und Cetuximab behandelt wurden.

Es ergab sich keinerlei Korrelation zwischen den elf untersuchten SNPs und dem Therapieansprechen. Eine Studie von Hildebrandt und Kollegen (2009) hinterfragte ähnlich, ob es einen Zusammenhang zwischen den genetischen Varianten im PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg und dem klinischen Outcome von Patienten mit Ösophaguskarzinom gibt, die mit Radiochemotherapie behandelt wurden. Studienendpunkte

waren pathologisches Therapieansprechen, Tumorrezidiv und Tod. Alle 210 rekrutierten Patienten erhielten entweder Radiochemotherapie mit anschließender Operation oder eine Induktions-Chemotherapie mit nachfolgender Radiochemotherapie und Operation. Nur die Minderheit der Tumore mit 36 Fällen stellten Plattenepithelkarzinome dar; die anderen 174 Fälle waren Adenokarzinome. 59 % der Patienten waren jemals Raucher und 33,1 % konsumierten täglich Alkohol. Aufgrund der ähnlichen Kardinalrisikofaktoren von Ösophaguskarzinom und KHK sowie derselben plattenepithelialen Herkunft (die oberen 2/3 des Ösophagus) ist ein Vergleich jener Ergebnisse mit denen des hier untersuchten KHK insbesondere von Interesse. 182 (97 %) der Patienten erhielten eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika. Von ihnen wurden 177 (95 %) mit Fluoropyrimidinen, 132 (71 %) mit Platinverbindungen und 94 (51 %) mit Taxanen behandelt. Gegensätzlich zu den hier erhaltenen, nicht signifikanten Ergebnissen im KHK konnten Hildebrandt u. a. signifikante Zusammenhänge zwischen den ebenfalls untersuchten SNPs *AKT1:rs3803304*, *AKT2:rs892119* sowie *FRAP1:rs1121704* und dem Therapieansprechen des Ösophaguskarzinoms herstellen. Bei den zwei letztgenannten SNPs, *AKT2:rs892119* und *FRAP1:rs1121704*, zeigte sich dieser Effekt auch in der Patientenuntergruppe, die mit Taxanen behandelt worden waren.

Interessanterweise bestanden auch Korrelationen der beiden erstgenannten SNPs (*AKT1:rs3803304* und *AKT2:rs892119*) und einem weiteren SNP in *PTEN:rs12357281* mit dem Rezidivrisiko. Patienten eines bestimmten SNPs in *AKT2:rs892119* wiesen des Weiteren einen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben auf. Durch eine Analyse, bei der die unvoreilhaftigen Genotypen der beiden AKT1- und AKT2 Varianten untersucht wurden, konnten additive Effekte dieser SNPs auf das Rezidivrisiko und das rezidivfreie Überleben bestätigt werden.

Insgesamt ist zu bedenken, dass die Teststärke (=Power, richtige Entscheidung für H1-Hypothese durch statistischen Test) beider Studien sehr unterschiedlich ausfällt. Es stehen einerseits 18 Jahre Rekrutierungszeit und 210 eingeschlossene Patienten einem andererseits sehr kleinen Patientenkollektiv (45 Patienten) im Rahmen dieser Dissertation gegenüber. Die Teststärke eines Tests ist proportional zum Stichprobenumfang. Das bedeutet, dass in der vorliegenden Arbeit die Teststärke geringer und damit dessen Aussagekraft über die statistische Testung eingeschränkt ist.

Zudem ist beim Vergleich der beiden Studien Vorsicht geboten, da die Mehrheit der Hildebrandt-Studie mit Adenokarzinomen durchgeführt wurde.

Einschlusskriterium der CETAX-Studie, die dieser wissenschaftlichen Arbeit zugrunde liegen, war das Auftreten eines Rezidivs nach Cisplatin-haltiger Erstlinien-Radiochemo- oder Chemotherapie. In einer retrospektiven Untersuchung des Patientenkollektivs zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Therapieansprechen auf Docetaxel und Cetuximab nach Erstlinientherapie mit Cisplatin und den untersuchten SNP-Varianten.

Interessanterweise konnte jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen den SNPs *PTEN:rs12569998* und *AKT2:rs8100018* und dem Progressionsrisiko sowie dem progressionsfreien Überleben festgestellt werden. Die Patienten einer gewissen genetischen Variante von *PTEN:rs12569998* (GG) und *AKT2:rs8100018* (GG) bargen ein signifikant höheres Progressionsrisiko (fast 2,5-fach bzw. fast fünffach) nach Docetaxel- und Cetuximabtherapie und erfuhren ein kürzeres PFS. Die gleichzeitige Anwesenheit dieser beiden unvorteilhaften Polymorphismen in einem Individuum erzielte auf Progressionsrisiko (ca. 12,5-fach) und PFS sogar additive Effekte. Diese Ergebnisse sollten aber keinen allzu großen Interpretationsspielraum bieten, da es ausschließlich zwei Patienten waren, die keinen der beiden nachteiligen SNPs im Genom trugen. Aufgrund der Tatsache, dass die Kohorte aus Patienten besteht, die bereits nach Cisplatintherapie rezidierten, könnte man spekulieren, ob nicht schon ohnehin eine Vorselektion der Patienten mit ungünstigen prognostischen Faktoren stattfand. Diese Überlegung würde die sehr geringe Anzahl an Patienten erklären, die weder die unvorteilhafte Variante von *PTEN:rs12569998* noch die von *AKT2:rs8100018* trugen.

In einer Studie von Squarize u. a. (2002) konnte demonstriert werden, dass eine gänzliche Inaktivierung von PTEN in Tumoren der Mundhöhle einerseits mit späteren Tumorstadien und andererseits mit aggressiveren und metastasierten Karzinomen vergesellschaftet ist, d. h. im Allgemeinen mit einer schlechteren Prognose. In späten Stadien kann ein kompletter PTEN-Verlust zum metastatischen Wachstum anstoßen. Die PTEN-Expression hat des Weiteren negative Auswirkungen auf das Ansprechen einer Anti-EGFR-Therapie beim kolorektalen Karzinom (Jhawer u. a., 2008; Bianco u. a., 2003). Auch unsere Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass der SNP *PTEN:rs12569998* die Aktivität von PTEN moduliert und Auswirkungen auf das Outcome der Patienten besitzt.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit war es derselbe SNP *AKT2:rs8100018* (GG), bei dem ein signifikanter Zusammenhang mit Progressionsrisiko (fast fünffach) und progres-

sionsfreiem Überleben hergestellt wurde, der ebenfalls signifikant mit erhöhtem Mortalitätsrisiko (fast 3,5-fach) und kürzerem Gesamtüberleben assoziiert war. Des Weiteren ergab sich eine signifikante Korrelation von denjenigen Patienten, die mindestens ein variantes Allel des SNPs in *AKT1:rs3803304* (CG+GG) trugen, mit einem längeren Gesamtüberleben (ca. zweifach). Eine Aktivierung von AKT ist einerseits durch Überexpression oder aktivierende Mutationen im AKT-Gen oder andererseits durch eine übermäßige Aktivität des vorgeschalteten EGFR möglich. Zu einem überwiegenden Teil (mehr als 90 %) weisen KHK eine sehr starke Expression des EGFR auf (Kong u. a., 2006). Aus diesem Grunde sind AKT- und PTEN-Polymorphismen für die Behandlung des EGFR-Rezeptor-Antikörpers Cetuximab von wichtiger Bedeutung. Studien von Molinolo und Kalyankrishna konnten verdeutlichen, warum die alleinige Suppression von Zellwachstum und Progression durch Inhibition von EGFR nicht gänzlich zu den gewünschten Ergebnissen im KHK führt. Sie untermauerten die These der Existenz eines EGFR-unabhängigen Signalwegs mit Aktivierung von AKT und seinen nachgeschalteten Mitspielern, der die ungenügende Effektivität von alleiniger EGFR-Inhibition erklären könnte (Molinolo u. a., 2007; Kalyankrishna u. a., 2006).

Eine Studie von Pu und Kollegen aus dem Jahr 2011 untersuchte ebenfalls genetische Varianten des Signalwegs PI3K/PTEN/AKT/mTor auf eine Korrelation mit Toxizität und der Entstehung von Fernmetastasen bei nicht-kleinzelligen Lungenkrebspatienten, die eine platinbasierte Chemotherapie erhielten. Es wurden 168 Patienten im Stadium IIIB oder IV eingeschlossen; 28,6 % davon waren Nichtraucher, 34,5 % ehemalige Raucher und 36,9 % gegenwärtige oder erst kürzliche Ex-Raucher. Die Mehrheit der Patienten (88,7 %) wurde mit Carboplatin-Basis und nur 11,3 % mit Cisplatin-Basis behandelt. Bezüglich der Fernmetastasierung erhielten sie gleichartige Ergebnisse für den ebenfalls hier untersuchten im KHK signifikanten SNPs *AKT1:rs3803304* (CG+GG) und zwei weitere AKT1 SNPs (rs2498804, rs1130214). Alle Patienten dieser gewissen SNPs hatten ein signifikant niedrigeres Risiko für die Entstehung von Fernmetastasen und ein längeres progressionsfreies Überleben. Gegensätzlich zu den Resultaten von Pu und den Ergebnissen dieser wissenschaftlichen Arbeit aber verhielten sich jene von Hildebrandt und Kollegen (2009), bei denen die hier untersuchten SNPs (*AKT1:rs1130214* (TT), *AKT2:rs892119* (AG+GG)) und zwei weitere SNPs in FRAP1 (rs11121704 (TT) und

rs2295080 (TT)) bei Taxan-behandelten Patienten im Zusammenhang mit einem signifikant erhöhten Versterbensrisiko standen.

Erst in neuerer Zeit konnte in vitro eine Korrelation zwischen verstärkter Hinaufregulation von TrkB (Tropomyosin-related kinase B receptor) sowie BDNF (brain derived neurotrophic factor) und der Entwicklung einer Cisplatin-Resistenz im KHK aufgezeigt werden. Der TrkB-Inhibitor AZ64 als „Chemotherapie-Sensitizer“ konnte in Studien von Yilmaz u. a. (2010) und Lee u. a. (2012) die Cisplatin-Resistenz überwinden und antiproliferative Wirkung erzielen.

Dieser Ansatz könnte eine weitere Option in der Erweiterung der KHK-Therapie darstellen.

Zudem darf der Gedanke nicht außer Acht gelassen werden, dass vielleicht eine Vorselektion der untersuchten Patienten/Patientenproben stattgefunden hat. Vielleicht besteht auch ohne Therapie mit Docetaxel und Cetuximab bei besagten SNPs ein signifikanter Unterschied in Progression und Mortalität. Auch der HPV-Status und dessen Korrelation mit Therapieansprechen und klinischem Outcome wäre von Interesse.

8.1 Die Bedeutung von Polymorphismen in Hinblick auf Therapieansprechen und Erkrankungsverlauf

Um den Stellenwert von kleinsten Veränderungen, den Einzelnukleotid-Polymorphismen, im Genom herauszustreichen, soll hier etwas genauer auf bisher entdeckte Polymorphismen und deren Auswirkungen auf die Karzinomtherapien eingegangen werden. Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (non small cell lung cancer, NSCLC) verdient hier, aufgrund der Anzahl an signifikanten Ergebnissen, eine etwas genauere Betrachtung: Giovannetti und Kollegen (2010) untersuchten die Assoziation von AKT1- und EGFR-Polymorphismen mit dem klinischen Outcome und der Therapietoxizität in einer Patientenkohorte mit Bronchialkarzinom, die mit Gefitinib (Tyrosin-Kinase-Inhibitor) behandelt wurden. Es wurden 96 Patienten rekrutiert, deren Erkrankung im Stadium IIIB oder IV einzuordnen war. 68,8 % davon waren Raucher/ehemalige Raucher und 31,2 % waren Nicht-Raucher. Analysen zeigten, dass zwar keine genetische Variation in EGFR und AKT1(rs3730350), dafür aber in AKT1 (rs1130233) eine signifikante Korrelation be-

Diskussion: Polymorphismus Therapieansprechen und Outcome

züglich Zeitraum bis zum Fortschritt der Tumorerkrankung (TTP, time to progression) und Gesamtüberleben zu verzeichnen war. Patienten eines gewissen Genotyps (shV) wiesen eine kürzere TTP (2 Monate) und ein kürzeres OS (2,2 Monate) im Vergleich zu Patienten mit hhV und der heterozygoten Allelbesetzung (3,2 bzw. 8 Monate) auf.

Eine weitere Studie (Yan u. a., 2011) hinterfragte den Einfluss von Polymorphismen im MDR1-Gen (multi-drug resistance 1, Codon 3435) auf das Outcome von Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC und Platin-basierter Chemotherapie. Sie ergab, dass Patienten eines bestimmten Genotyps (24,5 %) eine signifikant höhere Ansprechrate auf die Chemotherapie besaßen als die beiden anderen Genotypen (19 % bzw. 12,5 %).

Das XRCC1-Gen (X-ray repair cross-complementing group 1, DNA-Reparaturprotein) und seine Polymorphismen stehen ebenfalls im Zusammenhang mit signifikant veränderten Ansprechraten und Gesamtüberlebenszeiten von NSCLC-Patienten mit platinbasierter Chemotherapie (Cui u. a., 2012).

Hildebrandt und Kollegen belegten in ihrer Studie im Jahr 2012, dass Polymorphismen im hier thematisierten PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg sowohl Hochrisikopatienten (22 Hochrisikogenotypen, hierunter auch AKT2:rs892119) für Rezidive des KHK identifizierten als auch erfolgreiches Ansprechen auf 13-cis-Retinoidsäure (6 Genotypen; 4 in TSC1 und 2 in PI3CD und PTEN) vorhersagten. In dieser als auch in der Studie aus dem Jahr 2009 von Hildebrandt u. a. war der seltenere SNP in AKT2:rs892119 signifikant mit einem schlechteren Outcome assoziiert und konnte als Marker für eine ungünstige Prognose angesehen werden. In unserer Fragestellung konnte jener Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden.

Wie eine Reihe von Studien zweifellos belegen konnte, sind Untersuchungen im Hinblick auf Polymorphismen und Therapieansprechen sowie klinischem Outcome bei Malignompatienten vielversprechend und könnten die künftige Krebsbehandlung erweitern, umgestalten, individualisieren und auch verbessern.

9 Zusammenfassung

Das lokal rezidierte und/oder metastasierte KHK gehört zu den aggressiven Tumoren, bei denen bis dato nur moderate Errungenschaften und Verbesserungen bezüglich der therapeutischen Strategie erzielt werden konnten. Wissenschaftliche Ergebnisse der Vergangenheit machten deutlich, dass gewisse Signalwege - wie ebenfalls der PI3K/PTEN/AKT/mTor-Signalweg - an der Entstehung von Karzinomen maßgeblich beteiligt und deren genetische Varianten damit assoziiert sind, ob die medikamentöse Therapie anspricht und ob das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben eines Patienten beeinflusst werden. Auf Grund der Relevanz dieses Signalweges für die Karzinomentstehung und dessen Progression sollte die prädiktive Wertigkeit von genetischen Variationen (Polymorphismen) für das Ansprechen auf die Therapie mit Docetaxel und Cetuximab sowie das progressionsfreie und Gesamtüberleben im Mittelpunkt dieser wissenschaftlichen Arbeit stehen.

Als angewandte Methoden seien hier DNA-Extraktion, qualitative und quantitative Nukleinsäureanalyse, quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion, Gelelektrophorese sowie die statistische Auswertung zu nennen. Es wurden insgesamt elf gebräuchliche Genotypenvarianten der Proteine PI3K, PTEN, AKT und mTOR untersucht.

Es konnten in der Tat Genotypen von Kopf-Hals-Karzinom-Patienten identifiziert werden, die sich hinsichtlich ihres Progressionsrisikos, progressionsfreien Überlebens sowie ihres Mortalitätsrisikos und Gesamtüberlebens im Vergleich zum jeweiligen Referenzgenotyp signifikant unterschieden. Zudem zeigte die gleichzeitige Anwesenheit zweier ungünstiger Polymorphismen innerhalb eines Patienten additive Effekte auf das Progressionsrisiko und das progressionsfreie Überleben.

Diese Ergebnisse sind aufgrund des kleinen Patientenkollektivs und der bisweilen geringen Anzahl an Patienten eines Genotyps nur eingeschränkt aussagekräftig; um die Ergebnisse zu validieren, wäre es sinnvoll, eine ähnliche Studie mit größerer Patientenzahl zu wiederholen. Des Weiteren sollten Vergleichsgruppen kreiert werden, die entweder nur mit Taxanen, Cetuximab, mit einem Chemotherapeutikum einer gänzlich anderen Gruppe oder ohne Zweitlinientherapie behandelt werden, um objektiv vergleichen zu können. Ebenfalls ist es denkbar, dass das hier verwendete Patientengut durch die vorherige Therapie mit Cisplatin schon vorselektiert war und nicht dem allgemeinen Patientengut des rezidierten und/oder metastasierten KHK entspricht.

Trotz dieser Beschränkungen können die vorliegenden Daten dieser wissenschaftlichen Arbeit als Anfangs- und Anhaltspunkt für die Aufstellung weiterführender Hypothesen auf diesem Themengebiet angesehen werden.

Die Ergebnisse geben in erster Linie Anlass zur Schlussfolgerung, dass zukünftig Biomarker als Hinweis auf die genetische Patientenkonstitution vor Beginn der Therapie eingesetzt werden könnten, um dasjenige Patientenkollektiv ausfindig zu machen, das das beste Therapieansprechen auf Docetaxel und Cetuximab und den größtmöglichen Nutzen verspricht und umgekehrt.

10 Literaturverzeichnis

- Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE u. a. *Abeloff's Clinical Oncology*, 2008: S. 1177 ff.
- Abdulmir AS, Hafidh RR, Abdulmuhaimen N, Abubakar F, Abbas KA. The distinctive profile of risk factors of nasopharyngeal carcinoma in comparison with other head and neck cancer types. *BMC public health* 2008;8:400.
- Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, u. a. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:92–8.
- Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, u. a. Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1. *Science* 2011;333:1154–1157.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2011*. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2011
- American Joint Committee on Cancer (AJCC) *Cancer Staging Manual*, 7. Auflage, New York, Springer 2009, S. 65
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, u. a. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62:7350–7356.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371:1695–1709.
- Basu D, Nguyen T-TK, Montone KT, u. a. Evidence for mesenchymal-like sub-populations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity. *Oncogene* 2010;29:4170–4182.
- Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, u. a. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *International journal of cancer* 1995;64:280–5.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Advances in cancer research* 2005;94:29–86.
- Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer biology & therapy* 2004;3:268–75.
- Bernard PS, Reiser A, Pritham GH. 2001: *Mutation Detection by Fluorescent Hybridization Probe Melting Curves from: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, Springer Verlag, S. 11 ff
- Bianco R, Shin I, Ritter CA, u. a. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2003;22:2812–2822.
- Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991;64:235–248.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, u. a. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research* 1988;48:3282–7.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, u. a. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 2006;354:567-78.
- Bontognali S, Pless M, Brutsche MH, Fischer C, Rochlitz C, Buess M. Analysis of the EGFR mutation status in head and neck squamous cell carcinoma before treatment with Gefitinib. *Onkologie* 2013;36:161–166.
- Brooks PJ, Theruvathu JA. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* 2005;35:187–193.

- Byun DS, Cho K, Ryu BK, u. a. Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *International journal of cancer* 2003;104:318–27.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, u. a. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research* 1996;56:2488–92.
- Califano J, Westra WH, Koch W, u. a. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *Journal of the National Cancer Institute* 1999;91:599–604.
- Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, u. a. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96:1133–41.
- Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, u. a. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International Journal of Cancer* 2004;108:741–749.
- Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, u. a. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:3636–3641.
- Cohen EE, Lingen MW, Vokes EE. The expanding role of systemic therapy in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1743–52.
- Colevas AD. Chemotherapy options for patients with metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2006;24:2644–52.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research* 1998;8:1229–31.
- Cooper JS, Porter K, Mallin K, u. a. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head & neck* 2009;31:748–58.
- Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100:387–90.
- Cui Z, Yin Z, Li X, Wu W, Guan P, Zhou B. Association between polymorphisms in XRCC1 gene and clinical outcomes of patients with lung cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2012;12:71.
- D’Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, u. a. Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine* 2007;356:1944–1956.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science (New York, N.Y)* 1999;286:487–91.
- Farnebo L, Tiefenböck K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S, Roberg K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 2013;133:1994–2003.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2001;345:1890–900.
- Fury MG, Pfister DG. Current recommendations for systemic therapy of recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2011;9:681–689.
- Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008;13:259–71.
- Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2003;39:222–231.

- Gillison ML, D'Souza G, Westra W, u. a. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16–Positive and Human Papillomavirus Type 16–Negative Head and Neck Cancers. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2008;100:407–420.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, u. a. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92:709–20.
- Giovannetti E, Zucali PA, Peters GJ, u. a. Association of polymorphisms in AKT1 and EGFR with clinical outcome and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Mol. Cancer Ther.* 2010;9:581–593.
- Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2008;359:1143–54.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y)* 1994;266:1821–8.
- Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, u. a. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:696–703.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, u. a. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18:541–50.
- Hildebrandt MA, Yang H, Hung MC, u. a. Genetic variations in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway are associated with clinical outcomes in esophageal cancer patients treated with chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:857–71.
- Hildebrandt MAT, Lippman SM, Etzel CJ, u. a. Genetic variants in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict head and neck cancer patient second primary tumor/recurrence risk and response to retinoid chemoprevention. *Clin. Cancer Res.* 2012;18:3705–3713.
- Holmes D. PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nature reviews* 2011;10:563–4.
- Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews* 2005;5:127–35.
- Janot F, de Raucourt D, Benhamou E, u. a. Randomized trial of postoperative reirradiation combined with chemotherapy after salvage surgery compared with salvage surgery alone in head and neck carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2008;26:5518–5523.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011;61:69–90.
- Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, u. a. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer research* 2008;68:1953–61.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:2666–2672.
- Kim MJ, Kang H-G, Lee SY, u. a. AKT1 polymorphisms and survival of early stage non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2012;105:167–174.
- Kim SH, Juhn YS, Song YS. Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1095:82-9.
- Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in non-smokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 1999;109:1544-1551.
- Kong A, Leboucher P, Leek R, u. a. Prognostic value of an activation state marker for epidermal growth factor receptor in tissue microarrays of head and neck cancer. *Cancer Res.* 2006;66:2834–2843.

- Kumar A, Carrera AC. New functions for PI3K in the control of cell division. *Cell cycle* (Georgetown, Tex 2007;6:1696–8.
- Lee J, Jiffar T, Kupferman ME. A Novel Role for BDNF-TrkB in the Regulation of Chemotherapy Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 2012;7:e30246.
- Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecologic oncology* 2005;97:26–34.
- Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003;57:246–254.
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, u. a. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nature genetics* 1997;16:64–7.
- Liu LZ, Zhou XD, Qian G, Shi X, Fang J, Jiang BH. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer research* 2007;67:6325–32.
- Lo YM, Chan LY, Chan AT, u. a. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59:5452–5455.
- Loupakis F, Pollina L, Stasi I, u. a. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:2622–9.
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage, 2010: Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 464
- Ma YY, Wei SJ, Lin YC, u. a. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 2000;19:2739–2744.
- Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, u. a. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *European journal of cancer* 1995;31B:181–7.
- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–74.
- Manual Kopf-Hals-Malignome, Tumorzentrum München, 2009
- Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, u. a. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human pathology* 2005;36:768–76.
- Martin KA, Blenis J. Coordinate regulation of translation by the PI 3-kinase and mTOR pathways. *Advances in cancer research* 2002;86:1–39.
- Marur S und Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 2008;83(5):604.
- Mashberg A. Erythroplasia vs. leukoplakia in the diagnosis of early asymptomatic oral squamous carcinoma. *The New England journal of medicine* 1977;297:109–10.
- Matzinger O, Zouhair A, Mirimanoff RO, Ozsahin M. Radiochemotherapy in locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 2009;21:525–31.
- Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling* 2009;21:656–64.
- Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2787–99.
- Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, u. a. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res* 2007;13:4964–73.

- Mork J, Lie AK, Glattre E, u. a. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 2001;344:1125–31.
- Morris LGT, Taylor BS, Bivona TG, u. a. Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:19024–19029.
- Murakami D, Tsujitani S, Osaki T, u. a. Expression of phosphorylated Akt (pAkt) in gastric carcinoma predicts prognosis and efficacy of chemotherapy. *Gastric Cancer* 2007;10:45–51.
- Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular signalling* 2002;14:381–95.
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, u. a. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am. J. Clin. Oncol.* 1982;5:649–655.
- Or Y-Y, Hui AB-Y, Tam K-Y, Huang DP, Lo K-W. Characterization of chromosome 3q and 12q amplicons in nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 2005;26:49–56.
- Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res.* 2001;61:8654–8658.
- Patmore HS, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Ann. Surg. Oncol.* 2005;12:831–842.
- Pedrero JMG, Carracedo DG, Pinto CM, u. a. Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 2005;114:242–248.
- Perren A, Weng LP, Boag AH, u. a. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *The American journal of pathology* 1999;155:1253–60.
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology* 2002;4:658–65.
- Price KAR, Cohen EE. Current Treatment Options for Metastatic Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 2012.
- Pu X, Hildebrandt MA, Lu C, u. a. PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway genetic variation predicts toxicity and distant progression in lung cancer patients receiving platinum-based chemotherapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 2011;71:82–8.
- Qiu W, Schonleben F, Li X, u. a. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:1441–6.
- Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, u. a. DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol* 2006;24:4333–9.
- Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res.* 2001;61:4122–4129.
- RKI-Register, 8. Ausgabe, 2012
- Ruggeri BA, Huang L, Wood M, Cheng JQ, Testa JR. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Molecular carcinogenesis* 1998;21:81–6.

- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, u. a. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y)* 2004;304:554.
- Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* 2004;22:2954–63.
- Schneck H, Blassl C, Meier-Stiegen F, u. a. Analysing the mutational status of PIK3CA in circulating tumor cells from metastatic breast cancer patients. *Molecular Oncology* 2013;7:976–986.
- Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology* 2009;218:460–6.
- Seki N, Takasu T, Mandai K, u. a. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the human peripheral lung. *Clin Cancer Res* 2002;8:3046–53.
- Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, u. a. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature genetics* 1999;21:99–102.
- Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, Fitzpatrick FA, Curtin K, Wolff RK. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis* 2010a;31:1604–1611.
- Squarize CH, Castilho RM, Santos Pinto D Jr. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J. Oral Pathol. Med.* 2002;31:379–384.
- Stal O, Perez-Tenorio G, Akerberg L, u. a. Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res* 2003;5:R37–44.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, u. a. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 1998;95:29–39.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD, u. a. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011;333:1157–1160.
- Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007;110:1429–35.
- Thompson LH. Unraveling the Fanconi anemia-DNA repair connection. *Nat. Genet.* 2005;37:921–922.
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, u. a. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine* 2008;359:1116–27.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews* 2002;2:489–501.
- Weichhart T und Säemann MD. The PI3K/Akt/mTor pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:3:iii70-4.
- Weinberg RA. How cancer arises. *Sci. Am.* 1996;275:62–70.
- World Health Organization. The global burden of disease: 2004 Update, 2008
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, u. a. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 2008;27:3944–3956.
- Xing JC, Tufano RP, Murugan AK, u. a. Single nucleotide polymorphism rs17849071 G/T in the PIK3CA gene is inversely associated with follicular thyroid cancer and PIK3CA amplification. *PLoS ONE* 2012;7:e49192.
- Xu X, Sakon M, Nagano H, u. a. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncology reports* 2004;11:25–32.
- Yan P-W, Huang X-E, Yan F, Xu L, Jiang Y. Influence of MDR1 Gene Codon 3435 Polymorphisms on Outcome of Platinum-based Chemotherapy for Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011;12:2291–2294.

- Yang X, Fraser M, Moll UM, Basak A, Tsang BK. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer research* 2006;66:3126–36.
- Yilmaz T, Jiffar T, de la Garza G, u. a. Therapeutic targeting of Trk supresses tumor proliferation and enhances cisplatin activity in HNSCC. *Cancer Biol. Ther.* 2010;10:644-653.
- Zhang H, Cicchetti G, Onda H, u. a. Loss of Tsc1/Tsc2 activates mTOR and disrupts PI3K-Akt signaling through downregulation of PDGFR. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:1223–33.
- Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, u. a. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3712–8.
- Zhou XP, Loukola A, Salovaara R, u. a. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. *The American journal of pathology* 2002;161:439–47.
- Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, u. a. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *International Journal of Cancer* 2003;105:681–686.

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Judith Paz Mejía (geb. Pfisterer), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Prognostische Bedeutung von Polymorphismen des Signalwegs PIK3/PTEN/AKT/mTor bei Patienten mit fortgeschrittenem Kopf-Hals-Karzinom‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Katharina Judith Paz Mejía (geb. Pfisterer) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Head Neck. 2015 Apr;37(4):471-8. doi: 10.1002/hed.23604. Epub 2015 Feb 7. *PI3K/PTEN/AKT/mTOR polymorphisms: Association with clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cetuximab-docetaxel.*

Pfisterer K¹, Fusi A, Klinghammer K, Knödler M, Nonnenmacher A, Keilholz U.

Themenauswahl: Zuerst wurden von mir Untersuchungen zur Assoziation des o.g. Signalwegs im *Nierenzellkarzinom* durchgeführt. Da die Ergebnisse nicht wegweisend waren, wurde der Beschluss mit Betreuer und Doktorvater gefasst, die Untersuchungen für das Thema Kopf-Hals-Karzinom auszuweiten.

Methodenentwicklung: Etablierung der PCR und der Gelelektrophoresebedingungen.

Durchführung der Untersuchungen: Nach Anleitung meines Betreuers führte ich die Auswertung des Patientenkollektivs, die DNS-Extraktion, die quantitative und qualitative Nukleinsäureanalyse, die Real-Time PCR sowie die Gelelektrophorese durch. Die statistische Analyse erhob ich nach Planung und Anleitung meines Betreuers.

Interpretation: meine Interpretation, bei der statistischen Interpretation mit Denkanstößen durch das Team, vornehmlich durch Herrn Fusi.

Manuskript: Erstellung - Fusi A

Korrektur - Pfisterer K

Freigabe - Pfisterer K, Fusi A, Klinghammer K, Knödler M,
Nonnenmacher A, Keilholz U

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

12 Lebenslauf Katharina Judith Paz Mejía (geb. Pfisterer)

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 Publikation

Head Neck. 2015 Apr; 37(4):471-8. doi: 10.1002/hed.23604. Epub 2015 Feb 7.
PI3K/PTEN/AKT/mTOR polymorphisms: Association with clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma receiving cetuximab-docetaxel.

Pfisterer K¹, Fusi A, Klinghammer K, Knödler M, Nonnenmacher A, Keilholz U.

14 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Keilholz danke ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine große Unterstützung.

Herrn Dr. Alberto Fusi schulde ich großen Dank insbesondere für seine Hilfsbereitschaft, Geduld, Zeit und Liebenswürdigkeit, die er mir, trotz seiner starken Einbindung in die Forschung, entgegenbrachte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dipl.-Ing. (FH) Anika Nonnenmacher, Dr. rer. nat. Annett Niemetz-Rahn, Dr. med. Sebastian Ochsenreither, Dr. med. Antonia Busse, Rita Geppert (MTA), Yuehua Mai, Anna Puggina, Dr. med. Alexander Gross und Dipl.-Biol. Johannes Tucholski, die mir im Labor tatkräftig zur Seite standen und mir mit ihren Ratschlägen immer sehr behilflich waren.

Des Weiteren gilt mein Dank meiner Mutter, meinen Freunden Simon, Johannes, Lisa und Tamara für ihre orthografische, grammatikalische sowie Formatierungshilfe und dafür, dass sie für mich da waren.