

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor Univ.-Prof. Dr. Frank Dombrowski
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Zur Bedeutung von Phosphatidylinositol-3-Kinase-Mutationen in der
Hepatokarzinogenese – ein Mausmodell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2019

vorgelegt von:
Katharina Viktoria Annweiler
geb. am: 29.03.1990 in Essen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Frank Dombrowski

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena-Wilbeth Sailer

Tag der Disputation: 09.11.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1. Hepatozelluläres Karzinom	1
Epidemiologie	1
Ätiologie	1
Therapie	2
1.2. Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg	3
Physiologische Funktionen des PI3K-Signalwegs	3
PI3K-Signalweg in Tumoren	5
1.3. Phosphatidylinositol-3-Kinase und PIK3CA-Mutationen	5
Phosphatidylinositol-3-Kinase – Aufbau und Isoformen	5
PIK3CA-Mutationen und Krebs	6
1.4. Aufbau des Experiments und Ziele der Arbeit	7
Allgemeiner Versuchsaufbau	7
Ziele dieser Doktorarbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Tierhaltung	9
2.2. Zucht und Typisierung	9
DNA-Isolierung	10
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	10
Gelelektrophorese	11
2.3. Hydrodynamischer Gentransfer	12
Prinzip der Methode	12
Ablauf der Injektion	13
Dokumentation	14
Ausschlusskriterien	14
2.4. Somatische Integration des Plasmids	14
2.5. Klonierung	15
Transformation und Selektion	16
Restriktionsverdau	17
Gelelektrophorese	17
2.6. Übersicht der Tiergruppen	17
2.7. Obduktion und histologische Aufarbeitung	18
Obduktion und Zuschnitt	18
Histologische Aufarbeitung	19
2.8. Elektronenmikroskopie	19

2.9.	Immunhistochemie.....	20
	Geräte und Chemikalien	20
	Durchführung	21
2.10.	Western Blot	22
	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
	Proteinextraktion	25
	Gelelektrophorese (SDS-Page).....	26
	Western Blot	26
2.11.	Microarray.....	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Statistische Auswertung.....	28
	Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-E545K	28
	Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-H1047R	29
	Überlebenszeiten	30
	Lebergewichtsentwicklung und Körpergewichtsentwicklung.....	32
3.2.	Morphologische Auswertung.....	35
	Makroskopie.....	35
	Histologie	36
	Immunhistologie.....	39
	Elektronenmikroskopie	41
	Western Blot	41
	Microarray	43
3.3.	Nebenbefunde	43
	Metastasierung	44
4.	Diskussion	45
4.1.	PIK3CA-Mutationen wirken onkogen in der Mausleber	45
4.2.	Gesteigerte Lipidsynthese in der Hepatokarzinogenese	46
4.3.	Bedeutung für das Verständnis der Hepatokarzinogenese	47
4.4.	Neue und unbekannte Gene im PI3K-Signalweg	48
4.5.	Chancen des Tumormodells und Target Therapies	48
4.6.	Ausblick.....	49
5.	Zusammenfassung.....	50
6.	Anhang.....	IV

8.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
9.	Abbildungsverzeichnis.....	IX
10.	Literaturverzeichnis.....	X
11.	Publikationen	XVII
12.	Eidesstattliche Erklärung	XVIII
13.	Lebenslauf.....	XIX
14.	Danksagung	XXII

1. Einführung

Diese Forschungsarbeit ist im Rahmen eines Tierversuchs zum Thema „Die Rolle des Tumorsuppressors RASSF1a in der Hepatokarzinogenese“ entstanden. Hierbei wurde an ca. 660 Mäusen der Zusammenhang des Verlustes von RASSF1a sowie die Überexpression verschiedener Onkogene bei der Hepatokarzinogenese in vivo untersucht. In dieser Doktorarbeit werden die karzinogenen Phosphatidylinositol-3-Kinase-Mutationen E545K und H1047R und ihre Auswirkung auf die zugehörigen Wildtyp-Mäuse des o.g. Versuchs, d.h. ohne RASSF1a-Knockout, vorgestellt.

1.1. Hepatozelluläres Karzinom

Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist bei Männern die fünfthäufigste, bei Frauen die siebthäufigste Krebsart weltweit. Von etwa 749.000 Fällen pro Jahr treten über 80% in den Entwicklungsländern südlich der Sahara oder in Ostasien auf. Die Inzidenzraten liegen hier zum Teil weit über 20 Neuerkrankungen bei Männern und mehr als 11 Neuerkrankungen bei Frauen pro 100.000 Einwohner [EL-SERAG 2012]. In Deutschland liegt die Inzidenzrate mit 5.764 (Männer) und 2.994 (Frauen) Neuerkrankungen bei 9,6 (Männer) bzw. 3,7 (Frauen) pro 100.000 Einwohner [Krebsdaten.de, Robert Koch Institut 2013]. In den letzten Jahren wird jedoch eine Zunahme in westlichen Industrienationen beobachtet.

Männer haben demzufolge ein höheres Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken. Dies wird zum Teil auf die höhere Inzidenz von Virushepatitiden und alkoholischer Leberzirrhose bei Männern zurückgeführt, sowie auf einen stärkeren Nikotinkonsum und erhöhten Body-Mass-Index [NORDENSTEDT et. al. 2010, EL-SERAG 2012].

Ätiologie

Bei der Mehrheit der Patienten liegt als Grunderkrankung zuerst eine Leberzirrhose vor [FATTOVICH et. al. 2004, BURT et. al. 2012]. Hierfür gibt es verschiedene Ursachen und Risikofaktoren. Bis zu 80% aller Erkrankungen an einem HCC weltweit sind auf eine Hepatitis B (HBV) oder Hepatitis C Virus-Infektion (HCV) zurückzuführen. Zudem ist die

hepatokarzinogene Wirkung von Aflatoxin B1 bekannt, welche in Kombination mit einer HBV-Infektion das Risiko der Entwicklung eines HCC verdreifacht. Diese Ursachen spielen insbesondere in Entwicklungsländern eine große Rolle [EL-SERAG 2012, BURT et. al. 2012].

In westlichen Ländern ist die Entwicklung eines HCC häufig auf eine alkoholisch bedingte Leberzirrhose zurückzuführen [MORGAN et. al. 2004, EL-SERAG 2012]. Zudem kann Überernährung, Übergewicht allein oder in Kombination mit einem Diabetes mellitus die Entwicklung einer Zirrhose über eine nicht-alkoholische Steatohepatitis zur Folge haben. Diese führt zu einem erhöhten Risiko, ein HCC zu entwickeln. Des Weiteren kann ein hepatozelluläres Karzinom mit erblichen Stoffwechselerkrankungen wie der Hämochromatose (ca. 20%), Tyrosinämie (37%) oder α 1-Antitrypsinmangel (15%) assoziiert sein [BURT et. al. 2012]. Die karzinogene Wirkung natürlicher Sexualhormone, oraler Kontrazeptiva und anaboler Steroidhormone wird seit Längerem diskutiert und ist in Teilen belegt [El-Serag et al. 2007, Yu 2004].

Immerhin 20% der hepatozellulären Karzinome geht keine Leberzirrhose voraus. Hier können alle genannten Ursachen auch ohne diese Zwischenstufe ein HCC hervorrufen [EVERT et. al. 2008].

Die molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese sind sehr variabel und umfangreich. Diese verläuft in mehreren Schritten, die längst nicht vollständig erforscht oder verstanden sind [FEITELSON et. al. 2002]. Eine entscheidende Bedeutung kommt dem Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg zu, dessen Dysregulation tumorigen wirken kann und welcher im Zentrum dieser Forschungsarbeit steht (Kapitel 1.2.).

Therapie

Die Therapiemöglichkeiten sind vor allem im späten Stadium eines hepatozellulären Karzinoms derzeit völlig ungenügend. Neben operativen Methoden wie Leberteileresektion oder Lebertransplantation, stehen zur Behandlung inoperabler HCC momentan keine effektiven Medikamente zur Verfügung [CHEN et. al. 2015]. Viele Patienten sind jedoch lange asymptomatisch, sodass die Krankheit erst in späten, inoperablen Stadien diagnostiziert wird [FEITELSON et. al. 2002]. Sorafenib, ein Multikinase-Inhibitor, kann in diesem Stadium höchstens lebensverlängernd wirken – bisher wurden lediglich um im Median 3 Monate verlängerte Überlebenszeiten nachgewiesen [LLOVET et. al. 2008].

Heutzutage rücken mit einer zielgerichteten Tumorthherapie, auch Target-Therapien genannt, im Rahmen der individualisierten Medizin neue Therapiemöglichkeiten in Aussicht, wenn es gelingt, geeignete tumorogene Ziele in der Hepatokarzinogenese zu identifizieren und diese mittels pharmakologischer Substanzen gezielt zu beeinflussen.

1.2. Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg

Physiologische Funktionen des PI3K-Signalwegs

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (PI3K-Signalweg) reguliert verschiedene physiologische Funktionen wie Zellproliferation, Motilität, Proteinsynthese, Angiogenese, Apoptose, zelluläre Autophagie sowie Stoffwechselfunktionen der Zelle. Eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) erfolgt durch verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) oder den Insulinrezeptor. Die aktivierte PI3K katalysiert die Reaktion von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Abbildung 1.2.1).

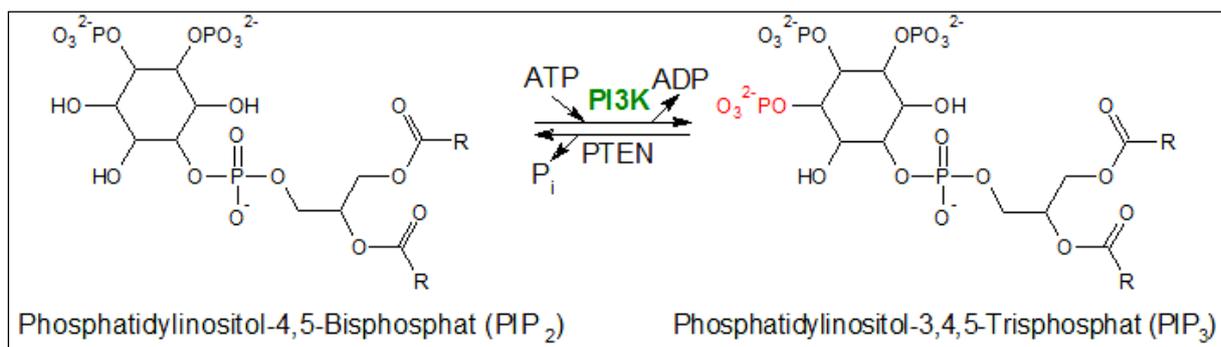


Abbildung 1.2.1: PI3K-Reaktion.

Phosphorylierung von PIP₂ mittels ATP zu PIP₃ via PI3K.

Gegenspieler der PI3K ist das Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), eine Phosphatase, die die Rückreaktion von PIP₃ zu PIP₂ katalysiert. PIP₃ erfüllt die Funktion eines second messengers, der zahlreiche nachgeschaltete Proteine aktiviert (Abbildung 1.2.2) [KARAKAS et. al. 2006, LAI et. al. 2015, SAMUELS et. al. 2005]. Diese werden entweder direkt durch PIP₃ oder

durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1), welche durch PIP₃ aktiviert wird, phosphoryliert.

Eines dieser nachgeschalteten Proteine ist die Proteinkinase B (PKB), auch AKT genannt. AKT steht im Zentrum des PI3K-Signalwegs, da es an der Vermittlung vieler der o.g. Funktionen beteiligt ist. Die Regulation der Proteinsynthese über die Aktivierung von mTOR, die Apoptosehemmung durch BAD-Hemmung oder die Regulation des Zellzyklus mittels Hemmung von p53 oder von Proteinen der FOXO-Familie sind nur einige dieser Funktionen [TOKUNAGA et. al. 2008].

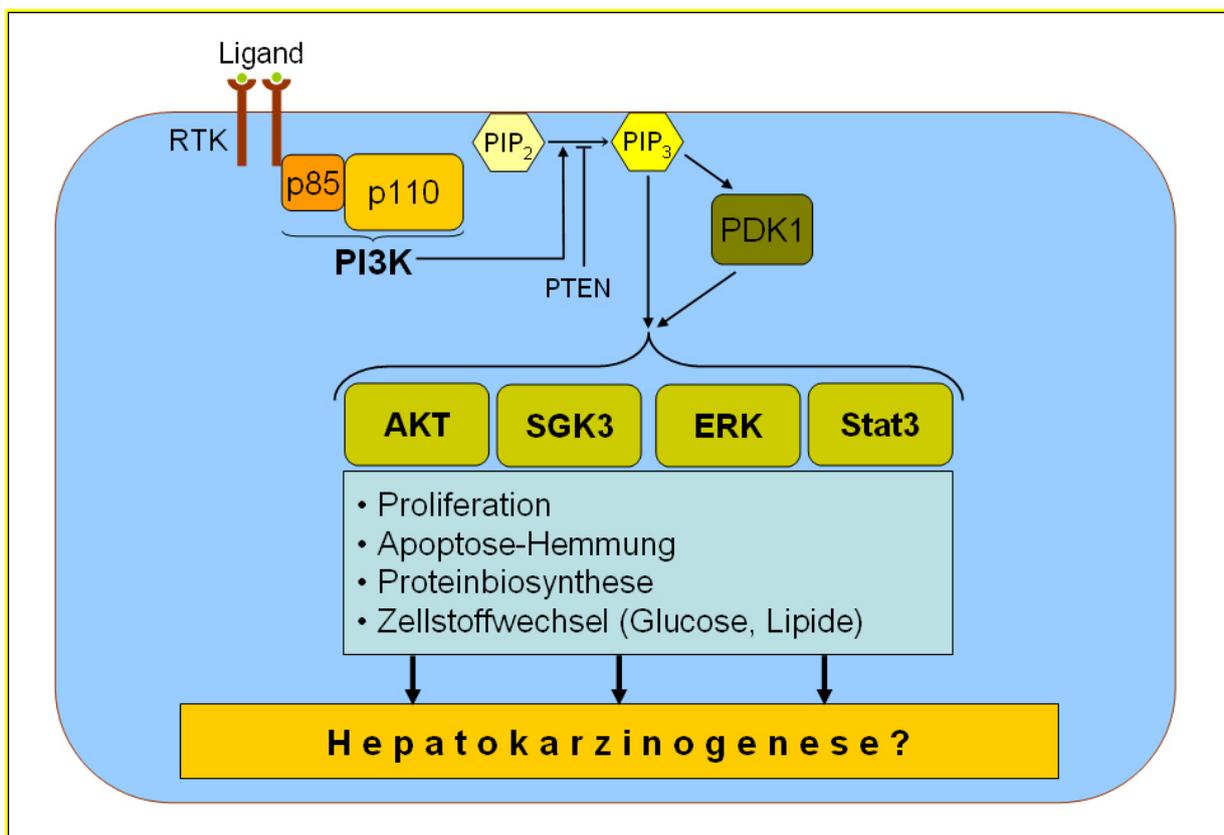


Abbildung 1.2.2: PI3K-Signalweg in der Zelle. Über eine RTK wird die PI3K aktiviert, welche ihrerseits via PIP₃ nachgeschaltete Signalmoleküle des Zellstoffwechsels bzw. der Zellproliferation (z.B. AKT, SGK3, ERK, Stat3) aktiviert und somit bei Überaktivität zur (Hepato-)Karzinogenese beiträgt.

Ein weiteres bekanntes Zielmolekül von PIP₃ ist die AKT-ähnliche Serum-Gluocorticoid-regulierte Kinase 3 (SGK3). Sie erfüllt ähnliche Funktionen wie AKT und viele ihrer Zielmoleküle sind ebenso als AKT-Ziele beschrieben [BRUHN et. al. 2013, PARK et. al. 1999].

Überschneidungen mit dem MAPK-Signalweg sind möglich, wodurch es zur Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) kommt, die ebenfalls proliferationsfördernd ist [WANG et al. 2013].

PI3K-Signalweg in Tumoren

Die Dysregulation des PI3K-Signalwegs steht im Zentrum der Onkogenese verschiedener Tumoren. Darunter fällt die aktivierende Mutation oder Amplifikation der PI3K selbst, der Verlust oder die Inaktivierung des Gegenspielers PTEN, sowie die Überschneidung mit anderen Signalwegen, z.B. dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg [Yang et al. 2019, Wang et al. 2013].

In humanen hepatozellulären Karzinomen sind verschiedene genetische Alterationen bekannt, die zu einer übermäßigen Aktivierung des PI3K-Signalwegs führen, wobei dessen ursprünglich physiologische Funktionen wie Apoptose-Hemmung oder Zellproliferation nun onkogen wirken können. Dazu gehören aktivierende Mutationen im Gen der katalytischen Untereinheit p110 α der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), PIK3CA, sowie die Promotormethylierung des Mitglieds 1A der RAS-assoziierten Domänen Familie (RASSF1A) [LEE et. al. 2005, AMADDEO et. al. 2012, VAN DER WEYDEN et. al. 2007, CALVISI et. al. 2012, UM et. al. 2011].

Nach aktuellem Kenntnisstand ist die PI3K ein Schlüsselziel von möglichen Target-Therapien. Inhibitoren der PI3K insgesamt, Inhibitoren ihrer einzelnen Isoformen, sowie gleichzeitige Inhibitoren von PI3K/mTOR sind Gegenstand klinischer Studien der verschiedensten Malignome. Zum hepatozellulären Karzinom befindet sich der duale PI3K/mTOR Inhibitor SF-1126 in der Testphase [Yang et al. 2019].

1.3. Phosphatidylinositol-3-Kinase und PIK3CA-Mutationen

Phosphatidylinositol-3-Kinase – Aufbau und Isoformen

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind heterodimere Lipidkinasen, die aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit zusammengesetzt sind. Diese Untereinheiten werden durch separate Gene codiert und es sind verschiedene, durch alternatives Spleißen entstandene, Isoformen bekannt. Die so entstandenen PI3K-Isoformen werden in drei

Klassen unterteilt, von denen die Klasse Ia PI3K bei Gensequenzierungen von Tumoren am häufigsten verändert ist [KARAKAS et. al. 2006, LAI et. al. 2015].

Die Klasse Ia PI3K kann aus verschiedenen regulatorischen und katalytischen Untereinheiten bestehen [LAI et. al. 2015]. Abbildung 1.3.1 zeigt schematisch den Aufbau der katalytischen Untereinheit p110 α , die im Fokus dieser Arbeit steht. Sie verfügt über eine Bindungsstelle für die regulatorische Untereinheit p85 α , eine Ras-bindende Domäne, eine lipidbindende C2-Domäne sowie eine Kinase-Domäne, die die katalytische Funktion der PI3K erfüllt. Die Funktion der helikalen Domäne ist bisher unklar [KARAKAS et. al. 2006, SAMUELS et. al. 2004].

PIK3CA-Mutationen und Krebs

Das 34kb-Gen der katalytischen Untereinheit p110 α , PIK3CA (Locus 3q26.3), besteht aus 20 Exons und weist in vielen



Abbildung 1.3.1: Aufbau von p110 α . Dargestellt sind die fünf Domänen der katalytischen PI3K-Untereinheit.

Tumoren Mutationen auf. Durch Gensequenzierungen wurden PIK3CA-Mutationen unter anderem im Mammakarzinom (ca. 26%), kolorektalem Karzinom (ca. 25%), Ovarialkarzinom (ca. 9%) oder im Magenkarzinom (ca. 7%) nachgewiesen. Die häufigsten Mutationen sind demnach die Punktmutationen G1624A:E542K, G1633A:E545K (Exon 9 bzw. helikale Domäne) und A3140G:H1047R (Exon 20 bzw. Kinase-Domäne) [BACHMAN et al. 2004, CAMPBELL et. al. 2004, LEE et. al. 2004, LEVINE et. al. 2005, LI et. al. 2005, SAAL et. al. 2005, SAMUELS et. al. 2004, VELHO et. al. 2005, WU et. al. 2005].

Auch im hepatozellulären Karzinom wurden diese und weitere Mutationen nachgewiesen. Das PIK3CA-Gen ist demnach in 1,6%-7% der hepatozellulären Karzinome mutiert [AMADDEO et. al. 2012, JANKU et. al. 2014, JHUNJHUNWALA et. al. 2014, LEE et. al. 2004].

Die beschriebenen Mutationen gehen *in vitro* mit einer übermäßigen katalytischen Aktivität der PI3K und mit zellulären onkogenen Effekten einher. In Zelllinien humaner kolorektaler Karzinomzellen war im Zusammenhang mit den Mutationen E545K bzw. H1047R eine wachstumsfaktorunabhängige, verstärkte Aktivierung des PI3K-Signalwegs nachweisbar. Zudem zeigten in diesem Experiment mutierte Zellklone im Vergleich zur Kontrolle eine

reduzierte Apoptose sowie verstärkte Migration und Invasion [SAMUELS et. al. 2005]. Ähnliche onkogene Effekte dieser Mutationen konnten in Zellkulturen embryonischer Fibroblasten (Huhn) nachgewiesen werden [KANG et. al. 2005]. Auch in Zellkulturen humaner embryonaler Nierenepithelzellen sowie in embryonalen Maus-Fibroblasten konnte im Zusammenhang mit den Mutationen E542K, E545K und H1047R eine verstärkte Aktivität der PI3K sowie zelluläre Transformation beobachtet werden [IKENOUE et. al. 2005].

In vivo konnte bereits das onkogene Potential von PIK3CA-Mutationen nachgewiesen werden. Die Schwanzveneninjektion H1047R-mutierter Kolonkarzinomzellen führte zur Ausbildung einer Kachexie in athymischen Nacktmäusen. Darüber hinaus wurden in diesen Mäusen multiple Tumoren und Mikrometastasen nachgewiesen [SAMUELS et. al. 2005]. In transgenen FVB/N-Mäusen mit der Mutation H1047R konnten Adenokarzinome der Lunge hervorgerufen werden [Engelman et. al. 2008].

Aufgrund der beobachteten onkogenen Effekte in Zellkulturen und Mausmodellen ist im Zusammenhang mit den physiologischen Funktionen des PI3K-Signalwegs ein onkogenes Potenzial der mutierten PI3K anzunehmen. Zur Untersuchung des PI3K-Signalweges im hepatozellulären Karzinom gibt es im Zusammenhang mit diesen Mutationen in der Literatur bisher keine geeigneten Modelle – weder *in vitro* noch *in vivo*.

1.4. Aufbau des Experiments und Ziele der Arbeit

Allgemeiner Versuchsaufbau

Das übergeordnete Ziel des Experiments war, die Rolle des Tumorsuppressors RASSF1A in Kombination mit der Überexpression verschiedener Onkogene in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden mittels hydrodynamischen Gentransfers in männlichen RASSF1A-Knockout-Mäusen (Stamm 129/Sv) sowie in männlichen Tieren des dazugehörigen Wildtyp-Stammes (129/Sv-C57BL/6) verschiedene putative Onkogene überexprimiert.

Ziele dieser Doktorarbeit

In dieser Doktorarbeit werden ausschließlich die Ergebnisse der PIK3CA-E545K- bzw. -H1047R-induzierten Hepatokarzinogenese in männlichen 129/Sv-C57BL/6-Mäusen (Wildtyp) ausgewertet. PIK3CA-E545K ist eine relativ häufig vorkommende Mutation in menschlichen Tumoren [Karakas et al. 2006]. Da es zudem bei der Erforschung der Hepatokarzinogenese an entsprechenden *in vivo*-Tumormodellen mangelt, war die Entwicklung eines Mausmodells zur Untersuchung gezielter Therapiemethoden in PI3K-induzierten Lebertumoren ein zentrales Ziel dieser Forschungsarbeit.

Darüber hinaus war die Frage zu klären, ob allein die PIK3CA-E545K- bzw. -H1047R-Mutation in der ansonsten intakten Mausleber onkogen wirkt – ob sie jeweils alleine bereits Präneoplasien oder sogar Tumoren hervorrufen können. Des Weiteren sollten mögliche Zielmoleküle von PIK3CA-E545K in der Mausleber molekularbiologisch identifiziert werden, um diese im Rahmen weiterer Experimente auf ihre karzinogene Wirkung zu untersuchen.

2. Material und Methoden

Nachfolgend wird die Tierversuchsmethode des hydrodynamischen Gentransfers sowie die Methoden zur Gewinnung und Auswertung der Gewebeproben erläutert. Der Tierversuch, die makro- und histopathologische Begutachtung und die meisten molekularbiologischen Methoden erfolgten am Institut für Pathologie der Universität Greifswald. Elektronenmikroskopie und Microarray wurden in Kooperation mit auswärtigen Instituten durchgeführt.

2.1. Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte unter Standardbedingungen in offener Haltung. Der Zustand der Versuchstiere wurde täglich kontrolliert. Darüber hinaus wurden die Tiere standardmäßig monatlich gewogen. Tiere mit Gewichtsschwankungen von mehr als 10% des Körpergewichtes wurden wöchentlich gewogen, um zusätzliche Hinweise auf den Zustand der Tiere zu bekommen.

2.2. Zucht und Typisierung

Für diesen Versuch wurden männliche 129/Sv-C57BL/6-Mäuse verwendet. Zwei Brutpaare zum Zuchtaufbau der RASSF1a-Knockout-Mäuse stammten vom Wellcome Trust Sanger Institute (Research Support Facility, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK) und wurden anschließend in Eigenzucht vermehrt. Die Zucht des für diese Arbeit relevanten Wildtyp-Stamms 129/Sv-C57BL/6 erfolgte durch Kreuzung der Knockout-Mäuse mit C57BL/6-Mäusen der Charles River Laboratories (Sandhofer Weg, 97633 Sulzfeld).

Alle Versuchstiere wurden hinsichtlich des RASSF1a-Knockouts typisiert, um sicherzustellen, dass je Stamm ausschließlich homozygote Tiere für den Versuch eingesetzt wurden. Außerdem fand die Typisierung Anwendung in der Zucht. Die DNA wurde aus den Schwanzspitzen der Tiere gewonnen. Soweit nicht näher bezeichnet, wurden gängige Chemikalien der üblichen Hersteller im Reinheitsgrad "pro analysi" von der Universitätsapothek der Universitätsmedizin Greifswald bezogen.

DNA-Isolierung

Die Schwanzspitzen wurden mit 300 µl Lysepuffer () und 3 µl Proteinase K-Stammlösung (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C lysiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 95 °C zur Denaturierung inkubiert (TMix, Analytik Jena) und danach bei 13.000 rpm eine Minute lang zentrifugiert (DESAGA MC2, Sarstedt-Gruppe).

Tabelle 2.2.1: DNA-Isolierung - Herstellung des Lysepuffers

Stoff, ggf. Hersteller	Volumen	Konzentration
50 mM Kaliumchlorid	1,25 ml	2 M
10 mM Tris-HCl pH 9.0	0,5 ml	1 M
0,45% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)	2,25 ml	10%
0,45% Tween® 20 (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)	1,875 ml	12%

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde nach L. VAN DER WEYDEN et al. modifiziert [VAN DER WEYDEN et. al. 2005]. Dabei wurden zunächst zwei Master Mixe hergestellt, die sich nur in dem Vorwärts-Primer (RSF-5 oder RSF-C) unterschieden (Tabelle 2.2.2), um entweder den Wildtyp oder den RASSF1a-Knockout nachzuweisen.

Das Exon 1 α (E1 α) ist nur notwendig für die Expression von RASSF1a, alle anderen bekannten Mitglieder der RASSF1-Familie können bei Entfernung von E1 α immer noch exprimiert werden. Darum wurde nur dieses Exon bei den Knockout-Mäusen entfernt. RSF-5 (5'-CTC GCC CCT GTC AGA CCT CAA TTT CCC-3') erzeugt in diesem Modell zusammen mit dem Rückwärts-Primer RSF-3 (5'-CCA GGC TTC CTT CTC ACT CCT CTG CCG C3') bei den RASSF1a-Knockout-Mäusen ein ca. 400 bp langes Produkt. Bei den Wildtypen ist dieser Teil der DNA mit RSF-5 nicht nachweisbar, da das erzeugte Produkt E1 α enthält, somit für diese PCR-Bedingungen zu groß ist und instabil wird. RSF-C (5'-AAG GAG AAA GAA AGC TGC TCT GGG GTT CT-3') kann dagegen nur beim Wildtyp ein Produkt zusammen mit RSF-3 erzeugen, da RSF-C in E1 α bindet. Bei den Knockout-Mäusen ist E1 α entfernt worden, sodass kein entsprechendes Produkt entstehen kann.

Tabelle 2.2.2: PCR - Herstellung des Master Mix

Komponenten, ggf. Hersteller	Volumen	Endkonzentration
10x Kaliumchlorid-Puffer (Analytik Jena, Jena)	2,5 µl	1 x
je 10mM dNTPs (inNucleotide Set, Analytik Jena, Jena)	0,5 µl	je 200 µM
25mM Magnesiumchlorid (Analytik Jena, Jena)	2 µl	2 mM
20µM Primer fv (RSF-5 oder RSF-C; Eurofins Laborservices GmbH, Nürnberg)	0,5 µl	0,4 µM
20µM Primer rv (RSF-3; Eurofins Laborservices GmbH, Nürnberg)	0,5 µl	0,4 µM
5U/µl innuTaq Hot DNA-Polymerase (Analytik Jena, Jena)	0,1 µl	0,5 U
Aqua destillata	16,9 µl	

Für die PCR wurden 2 µl DNA zu 23 µl Master Mix gegeben und im Flex Cycler (Analytik Jena) nach dem Programm in Tabelle 2.2.3 amplifiziert:

Tabelle 2.2.3: PCR - Ablaufplan

Temperatur	Dauer	
94 °C	2 min	
94 °C	30 s	30 Zyklen
65 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf einem 6 %igen Polyacrylamidgel (Tabelle 2.2.4) aufgetrennt (180 V, 70 mA; Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech) und anschließend durch eine Silberfärbung (Tabelle 2.2.5) sichtbar gemacht. Als Marker wurde eine 100 bp DNA Ladder (invitrogen, CA, USA) verwendet.

Tabelle 2.2.4: Gelelektrophorese - Herstellung des Polyacrylamidgels

Stoff, ggf. Hersteller	Volumen
Aqua destillata	11,25 ml
10x Rotiphorese® Trisborat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)	3 ml
Rotiphorese® Gel 40 (Polyacrylamid-Bisacrylamid 40%, 29:1) (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe)	4,5 ml
10% Ammoniumpersulfat	300 µl
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamine) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)	30 µl

Tabelle 2.2.5: Gelelektrophorese - Ablauf der Silberfärbung

Stoff	Inkubationszeit
Salpetersäure (2 %)	3 min
Aqua destillata	6 min
Silbernitratlösung (0,1 %)	20 min
Aqua destillata	10 s
Natriumcarbonat-Lösung: - 280 mmol/l Natriumcarbonat - 6,54 µmol/l Natriumthiosulfatpentahydrat - 2,4 ml/l Formalin (37 %)	bis Marker und Kontrollen gut sichtbar
Essigsäure (7,5 %)	3 min
Aqua destillata	30 s
Glycerin (5 %)	3 min

2.3. Hydrodynamischer Gentransfer

Prinzip der Methode

Das Prinzip des hydrodynamischen Gentransfers ist eine für die Leber etablierte Methode der DNA-Transfektion. Ziel ist es, durch die forcierte Steigerung des Blutdruckes die endotheliale und parenchymale Zellpermeabilität zu erhöhen, um so die Plasmid-DNA in die Hepatozyten einzubringen. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass die maximale Expression durch Injektion von 2,5 ml DNA-haltiger Natriumchloridlösung innerhalb sieben Sekunden in die Schwanzvene der Maus erreicht wird. Dies verursacht eine Stauungsinsuffizienz des rechten Herzens und einen damit verbundenen Rückstau der Lösung in die Lebervenen. Mit dieser

schnellen Schwanzveneninjektion wird derselbe Effekt erzielt, wie durch direkte Injektion der Lösung in die Lebergefäße mit gleichzeitigem Verschluss der abfließenden Gefäße. Aufgrund des hohen Kapillardrucks in der Leber permeabilisiert das Endothel und gibt durch Lücken den Weg zum Parenchym frei. Die Zellmembranen der Hepatozyten wiederum bilden aufgrund der Druckbelastung vermutlich Poren aus und nehmen mit der Flüssigkeit die Fremd-DNA und andere Makromoleküle auf. Nach kurzer Zeit schließen sich diese Poren wieder, sodass das aufgenommene Plasmid die Zelle nicht mehr verlassen kann [SUDA et. al. 2007, ZHANG et. al. 1999].

Ablauf der Injektion

Zur Vorbereitung wurden die Versuchstiere in einem Abstand von 30 cm etwa 15 min dem Licht einer Infrarotlampe (250W, 240V/E27; Albert Kerbl GmbH, Buchbach, D) ausgesetzt, um die Durchblutung der lateralen Schwanzvene zu erhöhen. Diese war dadurch besser sichtbar und die Injektion wurde optimiert.

Während der Injektion wurde die Maus in einem sog. "Tailveiner Restrainer" (TV-150 SMALL, Braintree Scientific Inc., Braintree,

MA 02185, USA) fixiert, sodass der Schwanz frei lag (siehe Abbildung 2.3.1). Für die Injektion wurden 2 ml Spritzen (BD Discardit II; Becton Dickinson, Huesca, Spanien) und Injektionskanülen Nr. 16 (23G x 1"; 0,6mm x 25mm; BD Microlance 3; Becton Dickinson, Huesca, Spanien) verwendet. Den Tieren wurde zwischen 2 und 2,5 ml Lösung innerhalb von sieben Sekunden injiziert.

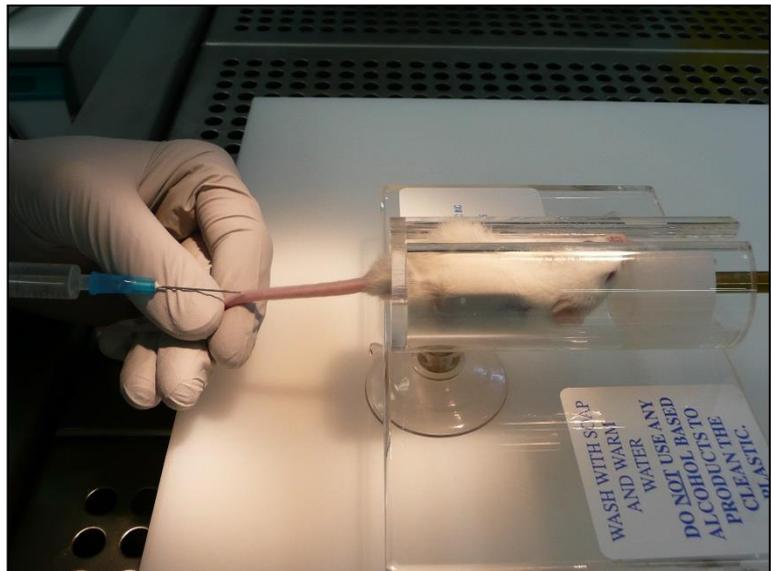


Abbildung 2.3.1: Hydrodynamischer Gentransfer. Schnelle Injektion des onkogenhaltigen Plasmids in die laterale Schwanzvene der Maus.

Dokumentation

Zu jedem Tier wurden Tiernummer, Injektionsdatum und das tatsächlich injizierte Volumen notiert. Darüber hinaus wurden die Mäuse nach der Injektion gewogen. Es erfolgte eine subjektive Bewertung der Qualität der Injektion durch die durchführende Person.

Ausschlusskriterien

Eine Maus wurde vom Versuch ausgeschlossen, wenn das injizierte Volumen unter 2 ml lag, die subjektive Bewertung der injizierenden Person schlechter als gut bzw. sehr gut bewertet wurde oder wenn die Injektion zu langsam durchgeführt wurde. Zudem wurde das Verhalten der Maus nach der Injektion beobachtet. Durch die Stauungsinsuffizienz, die durch die schnelle Injektion des großen Volumens erreicht wurde, war die Maus nach gelungener Injektion für ca. 30 min deutlich inaktiver als üblich. Sie zeigte kein normales Verhalten wie Klettern, Herumlaufen oder Fressen, sondern führte nur geringe, belastungsarme Bewegungen aus und lag flach auf dem Einstreu. Ein Tier, das jedoch normales Verhalten zeigte, wurde vom Versuch ausgeschlossen, da der Verdacht bestehen musste, dass die Injektion nicht korrekt durchgeführt wurde. Diese Kriterien waren essenziell, um bei den Versuchstieren einen einheitlich hohen Standard der Injektion zu erreichen.

2.4. Somatische Integration des Plasmids

Ist die hydrodynamische Injektion der Plasmidlösung erfolgt, so schließt sich intrazellulär die somatische Integration der Zielgene in die Hepatozyten-DNA an. Dafür wurde das Sleeping Beauty (SB) Transposon System verwendet. Die Injektion liefert das Plasmid (Abbildung 2.4.1), welches die gewünschte Gensequenz PIK3CA-E545K enthält.

Neben dem Plasmid beinhaltet die Injektionslösung die Sleeping Beauty Transposase. SB greift an den inverted repeats des Plasmids an, schneidet das Onkogen heraus und integriert es in die DNA der Hepatozyten. Somit wird eine Langzeitexpression des Onkogens erreicht [Carlson et. al. 2005].

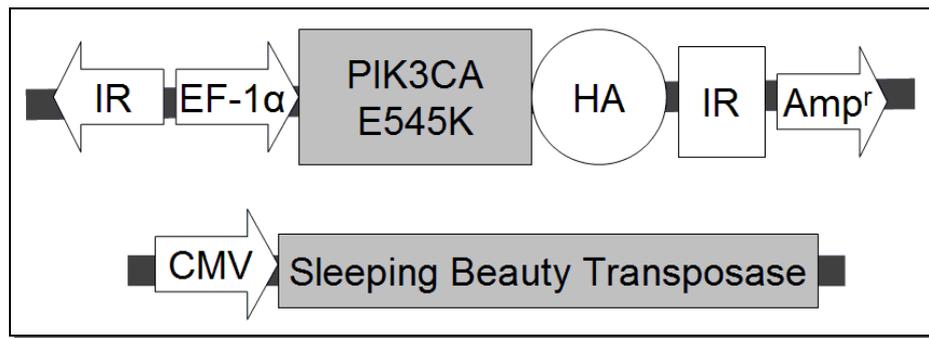


Abbildung 2.4.1: Plasmidaufbau. Das Plasmid enthält die gewünschte Gensequenz PIK3CA-E545K, beinhaltet außerdem den konstitutiven Promotor EF-1 α , ist markiert mit dem HA-Tag und wird flankiert von sich gegenläufig wiederholenden Endsequenzen, sog. "inverted repeats" (IR). Darüberhinaus ist das Plasmid mit einer Ampicillin-Resistenz (Amp^r) ausgestattet, welche für die Klonierung benötigt wird. Als Promoter wird ein Cytomegalievirus (CMV) genutzt.

Die pro Maus verwendeten 2,5 ml PBS-Injektionslösung beinhalteten 12,5 μ g Plasmid-DNA sowie 0,5 μ g Sleeping Beauty Transposase. Die Kontrollgruppen erhielten das Plasmid ohne die PIK3CA-E545K-Sequenz (empty Vector, EV), reines PBS oder blieben unbehandelt.

2.5. Klonierung

Die verwendeten Plasmide wurden erstmalig aus dem Labor von Xin Chen (Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences and Liver Center, University of California, San Francisco, California USA) zur Verfügung gestellt und anschließend im Institut für Pathologie der Universität Greifswald unter der Leitung von Herrn Dr. med. Calvisi durch Klonierung vermehrt. Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Soweit nicht näher bezeichnet, wurden gängige Chemikalien der üblichen Hersteller im Reinheitsgrad "pro analysi" von der Universitätsapothek der Universitätsmedizin Greifswald bezogen.

Tabelle 2.5.1: Klonierung - Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Thermoblock	Thermomixer Compact	Eppendorf AG
Inkubator	MAXQ™ 4000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Zentrifuge	centrifuge 5804 R	Eppendorf AG

Tabelle 2.5.2: Klonierung - Verbrauchsmaterialien

Material	Name	Hersteller	Katalognummer
DH5 α E.coli-Bakterien	Subcloning Efficiency TM DH5 α TM Competent Cells	Thermo Fisher Scientific Inc.	18265-017
Nährlösung	S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific Inc.	15544-034
Nährlösung	LB Broth (Miller) Liquid microbial growth medium	Sigma-Aldrich Co. LCC.	L2542
Ampicillin-Konzentrat (1000x)	Ampicillin Ready Made Solution	Sigma-Aldrich Co. LCC.	A5354
Minipräp Kit	QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	27104
Filtergefäß	QIAprep Spin Miniprep Columns	QIAGEN	27115
Maxipräp Kit	Zyppy TM Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research Corp	D4028
Agarosepulver	Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH	840004
Gelpuffer	LB 20x Faster Better TM	Faster Better TM Media LLC	LB20-4
DNA-Leiter	DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs Inc.	N3232L

Transformation und Selektion

50 μ l DH5 α E.coli-Bakterien wurden mit 50 ng Plasmid (in Lösung) 30 min auf Trockeneis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock 30 sec bei 42°C. Es folgten weitere 2 min auf Trockeneis. Nach Hinzufügen von 300 μ l S.O.C.-Nährlösung wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigem Agar ausplattiert und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am zweiten Tag wurde eine Nährlösung aus 4 ml LB Broth und 4 μ l Ampicillin-Konzentrat hergestellt, in der nun eine der angewachsenen Bakterienkulturen erneut über Nacht bei 37°C inkubiert wurde. Die Plasmide wurden mittels Minipräparation oder Maxipräparation nach Herstellerangaben mit den in Tabelle 2.5.2 genannten Kits isoliert.

Restriktionsverdau

Die zu überprüfende Plasmidlösung aus Mini- und Maxipräp wurde nach mit verschiedenen Restriktionsenzymen und ihren zugehörigen Puffern drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Herstellerangaben der Enzyme sind Tabelle 2.5.3 zu entnehmen.

Tabelle 2.5.3: Restriktionsverdau - Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Hersteller	Katalognummer
EcoR I	New England Biolabs Inc.	R0101S
Bgl II	New England Biolabs Inc.	R0144S
Hind III	New England Biolabs Inc.	R0104S

Gelelektrophorese

Die verdauten Plasmide wurden in 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 100 V durchgeführt.

Tabelle 2.5.4: Gelelektrophorese - Plasmidlösungen

Plasmidlösung	RNAse-freies Wasser	Puffer	Restriktionsenzym	DNA-Fragmente in Elektrophorese
2,5 µl	7,5 µl	kein	kein	1
2,5 µl	5,5 µl	1 µl EcoR I- Puffer	1 µl EcoR I	2
2,5 µl	5,5 µl	1 µl Puffer 3	1 µl Bgl II	3
2,5 µl	5,5 µl	1 µl Puffer 2	1 µl Hind III	3

2.6. Übersicht der Tiergruppen

Die Versuchstiere wurden in vierzehn Gruppen eingeteilt. So gab es von beiden Mausstämmen (Wildtyp oder RASSF1a-Knockout) je vier Gruppen, die mittels hydrodynamischen Gentransfers ein onkogenhaltiges Plasmid erhielten. Zwei Kontrollgruppen wurde je Stamm entweder nur die Kochsalzlösung (PBS) oder das leere Plasmid ohne Onkogen-Sequenz (Empty Vector, EV) injiziert. Die dritte Kontrollgruppe je Stamm blieb unbehandelt. Jede

Versuchsgruppe enthielt pro Beobachtungszeitraum zehn Tiere, die Kontrollgruppen je fünf Tiere. Insgesamt waren 660 Tiere im Gesamtversuch, die vorliegende Arbeit bezieht sich auf 210 Tiere. Nachfolgend werden nur die für diese Doktorarbeit relevanten Gruppen aufgeführt (Tabelle 2.6.1).

Tabelle 2.6.1: Tiergruppen

Stamm	Injektion	Geplante Beobachtungszeiträume und Tierzahl					
		1 Woche	1 Monat	3 Monate	6 Monate	9 Monate	12 Monate
Wildtyp	PIK3CA-E545K	10	10	10	10	10	10
Wildtyp	PIK3CA-H1047R	10	10	10	10	10	10
Wildtyp	PBS	5	5	5	5	5	5
Wildtyp	EV	5	5	5	5	5	5
Wildtyp	keine	5	5	5	5	5	5

2.7. Obduktion und histologische Aufarbeitung

Obduktion und Zuschnitt

Nach den jeweiligen Beobachtungszeiträumen wurden die Tiere noch einmal gewogen, anschließend getötet und umgehend obduziert. Dabei wurde die Leber als Erstes entnommen, sofort gewogen und die drei größeren Leberlappen 24 Stunden in 4 %iger Formalin-Lösung fixiert und vor der weiteren Präparation fotodokumentiert.

Die kleineren Leberlappen - Lobus hepatis dexter lateralis und Lobus caudatus - wurden für nachfolgende molekularbiologische Untersuchungen umgehend in flüssigem Stickstoff gekühlt und schließlich dauerhaft bei -80°C konserviert.

Je zwei Tieren pro Versuchsgruppe wurden Proben der kleinen Leberlappen für mögliche elektronenmikroskopische Untersuchungen entnommen und in Glutalaldehyd-Lösung (0,5 ml Glutalaldehyd, 5 ml NaP-Puffer; pH=7.4) fixiert. Außerdem wurden die inneren Organe sowie Teile der Wirbelsäule entnommen und für die Organpräparation ebenfalls 24 Stunden in Formalinlösung (4%) fixiert. Anschließend erfolgten Organpräparation und Paraffineinbettung gemäß Tabelle 2.7.1.

Tabelle 2.7.1: Makropathologischer Zuschnitt - Organeinbettung

Organ	Einbettung
Leber, Gallenblase	Lobus hepatis dexter/sinister medialis und Gallenblase lamelliert
	Lobus hepatis sinister lateralis lamelliert
Niere	Niere von Pol zu Pol halbiert, Nierenbecken angeschnitten, je 1/2 Niere eingebettet
Herz	Von Basis zu Apex halbiert, beide Kammern angeschnitten, 1/2 Herz eingebettet
Lunge	Einbettung komplett
Schilddrüse	Halsquerschnitt (Anschnitt von Schilddrüse, Trachea, Oesophagus)
Thymus	Einbettung komplett
Milz	Lamelliert, Einbettung komplett
Pankreas	Einbettung komplett
Dünndarm	Quer lamelliert, Einbettung von drei Lamellen
Dickdarm	Quer lamelliert, Einbettung von drei Lamellen
Hoden	Längs halbiert, 1/2 Hoden eingebettet
Wirbelsäule	Einbettung nur bei Verdacht auf Metastasen

Histologische Aufarbeitung

Die gewonnenen Schnitte wurden nach Standardprotokoll HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt. Für Fettfärbungen der Lebertumoren (Sudan IV) wurden einige Tumoren im Gefrierschnellschnittverfahren bearbeitet.

2.8. Elektronenmikroskopie

Die Fixation des Lebergewebes erfolgte in gepuffertem Glutaldehyd. Anschließend erfolgten Zuschnitt, Einbettung und Prozessierung in Ethanolreihe, Infiltration mit flüssigem EPON-Einbettmedium. Es folgte die Auspolymerisierung. Schließlich nach Auswertung von Orientierungsschnitten die Ultradünnschnitte (70 nm) erzeugt und auf einem Kupfer-Grid aufgezogen, getrocknet und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Untersuchung

erfolgte mit einem LEO 912AB Transmissionselektronenmikroskop bei 100 kV, die Bild-Dokumentation mit einer 2k*2k CCD-Kamera und mit der OSIS-Software iTEM.

2.9. Immunhistochemie

Zur weiteren Diagnostik wurden Präneoplasien und Tumoren immunhistologisch untersucht. Dabei wurde besonderer Wert auf die Proteine des PI3K-AKT-Signalwegs gelegt.

Geräte und Chemikalien

Die für die immunhistologischen Untersuchungen verwendeten Geräte und Chemikalien sind den folgenden Tabellen zu entnehmen. Soweit nicht näher bezeichnet, wurden gängige Chemikalien im Reinheitsgrad „pro analysi“ von der Apotheke der Universitätsmedizin Greifswald bezogen.

Tabelle 2.9.1: Immunhistochemie - verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA	1.0024.1000
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck KGaA	1.06448.1000
Wasserstoffperoxid-Lösung (30%)	Carl Roth GmbH & Co. KG	8070.1
TrisPuffer Base (Trizma® base)	Sigma-Aldrich Co. LCC.	93362
TrisPuffer Säure (Trizma® hydrochloride)	Sigma-Aldrich Co. LCC.	T3253
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	3957.1
Tween20	Dako Deutschland GmbH	S196630-2
Ziegen Serum (Goat Serum)	Dako Deutschland GmbH	X0907
Antikörper Verdünnungslösung (Antibody Diluent)	Ventana Medical Systems, Inc.	251-018
LSAB™ Kit	Dako Deutschland GmbH	K0675
Farbstoff (DAB+ Liquid)	Dako Deutschland GmbH	K3468

Tabelle 2.9.2: Immunhistochemie - Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
p110α (PI3K)	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	4249
HA-Tag	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	3724
Ki67	1:100	Bethyl Laboratories	IHC-00375
CK19	1:500	Abcam	ab133496
pERK 1/2	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	4370
FASN	1:100	BD Biosciences	610962
SCD1	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	2794
COX2 (1)	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	SC1747
COX2 (2)	1:100	Cell Signaling Technology, Inc.	12282S
ZIP4	1:100	LifeSpan Biosciences, Inc.	LSB5355
RACK1	1:100	Santa Cruz	SC-17754

Durchführung

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte angefertigt und in Xylol und absteigender Ethanolreihe entparaffiniert. Die entparaffinierten Schnitte wurden 25 min in Citratpuffer (pH = 6) gekocht und 30 min in dem Puffer abgekühlt. Zur Blockierung erfolgte eine Inkubation für 60 Minuten mit Blocking Puffer (Goat Serum) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte mit Antikörperlösungen in Verdünnungen von 1:100 bzw. CK19 in einer Verdünnung von 1:500 überschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert.

Der Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels LSAB Kit. Hierzu wurden die Schnitte mit Tris-Puffer (pH = 7,5) kurz gespült und 2x 5 min in Tris-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit den biotinylierten Sekundärantikörpern erfolgte für 30 min. Nach erneutem Spülen und Waschen (2x 5 min) mit Tris-Puffer wurde 30 min mit dem Streptavidin-Komplex inkubiert und dann erneut mit Tris-Puffer gespült und für 5 min gewaschen. Die Färbung erfolgte mit DAB+ Liquid für ca. 5 min unter mikroskopischer Kontrolle. Gestoppt wurde die Färbung in Aqua dest. Gegengefärbt wurde mit Hämalaun. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend eingedeckt.

2.10. Western Blot

Das bei -80 °C gelagerte Lebergewebe wurde auf eine veränderte Proteinexpression untersucht. Verglichen wurden Proben der PIK3CA-E545K-injizierten Mäuse aus dem Tumorgewebe der Leber (TM) und dem umgebenden Lebergewebe, das Präneoplasien enthielt (PN), mit tumorfreien Lebergewebsproben von Mäusen, die das leere Plasmid (EV) erhalten hatten. Eine Übersicht über die verwendeten Proben bietet Tabelle 2.10.1.

Die Durchführung des Western Blot erfolgte unter der Leitung von Dr. med. Diego Calvisi am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Greifswald und die Ergebnisse werden in dieser Arbeit ausgewertet.

Tabelle 2.10.1: Western Blot – Gewebeproben Leber

Tier	Injektion	Beobachtungszeitraum	verwendete Proben
E671	EV	3 Monate	tumorfreie Leber
E605	EV	6 Monate	tumorfreie Leber
E606	EV	6 Monate	tumorfreie Leber
E607	EV	6 Monate	tumorfreie Leber
E302	PIK3CA-E545K	6 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E303	PIK3CA-E545K	6 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E551	PIK3CA-E545K	6 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E630	PIK3CA-E545K	6 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E628	PIK3CA-E545K	6 Monate 10 Tage	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E298	PIK3CA-E545K	7 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien
E299	PIK3CA-E545K	7 Monate	Tumor und umgebendes Lebergewebe mit Präneoplasien

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die für den Western Blot sowie für die nötige Vorbereitung verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Antikörper sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen. Soweit nicht näher bezeichnet, wurden gängige Chemikalien der üblichen Hersteller im Reinheitsgrad "pro analysi" von der Universitätsapotheke der Universitätsmedizin Greifswald bezogen.

Tabelle 2.10.2: Western Blot - Geräte und Software

Gerät	Name	Hersteller
Pellet Mixer	Pellet Mixer (Katalognr: 47747-370)	VWR International LCC.
Zentrifuge	Centrifuge 5408 R	Eppendorf AG
UV-Vis Spektrophotometer	NanoDrop ND-2000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Thermoblock	Thermomixer Compact	Eppendorf AG
Elektrophoresekammer	XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tank Blot-Set	Criterion™ Blotter	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Analyse-Software	Quantity One	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Tabelle 2.10.3: Western Blot - Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Name	Hersteller	Katalognummer
Lysepuffer	T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.	78510
Proteaseinhibitor	HALT™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	78441
Probenpuffer	NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0007
Reduktionsmittel	NuPAGE® Sample Reducing Agent	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0009
Polyacrylamidgel (3-8%)	NuPAGE® Novex® 3-8% Tris-Acetate Protein Gels, 1.5mm	Thermo Fisher Scientific Inc.	EA03785BOX
Polyacrylamidgel (4-12%)	NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.5mm	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0336BOX
Antioxidant	NuPAGE® Antioxidant	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0005
Proteinstandard	SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc.	LC5925
Laufpuffer (für 3-8% Gel)	NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0002
Laufpuffer (für 4-12% Gel)	NuPAGE® Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	LA0041
Nitrocellulose Membran	Amersham Protran 0.2 NC	GE Healthcare Life Sciences	10600001
Filterpapier	Thick Blot Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1704085
Methanol	J.T.Baker® Methanol	Avantor Performance Materials	8040
Transferpuffer	NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	NP0006
Farbstoff	Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Co. LCC.	P7170
Waschpuffer 1	Tris Buffered Saline with Tween® 20 (TBST-10x)	Cell Signaling Technology, Inc.	9997
Blockierpuffer	Pierce™ Protein-Free T20 (TBS) Blocking Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	37571
Waschpuffer 2	Pierce™ 20x TBS Tween™ 20 Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.	28360
Chemilumineszenz-Substrat	SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc.	34095

Tabelle 2.10.4: Western Blot - Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Molekulargewicht Proteinnachweis
PIK3CA	Cell Signaling Technology, Inc.	4249	110 kDa
p-AKT	Cell Signaling Technology, Inc.	4060	60 kDa
p-SGK3	Cell Signaling Technology, Inc.	5642	62 kDa
p-ERK 1/2	Cell Signaling Technology, Inc.	4370	42/44 kDa
p-STAT3	BD-Biosciences	Y705	92 kDa
FASN	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-55580	270 kDa
SCD1	Cell Signaling Technology, Inc.	2794	37 kDa
COX2	Cell Signaling Technology, Inc.	12282	74 kDa
ZIP4	LifeSpan Biosciences, Inc.	LS-B5355	40 kDa
β-Actin	Sigma-Aldrich Co. LCC.	A1978	42 kDa

Tabelle 2.10.5: Western Blot - Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Anwendung bei Primärantikörper aus	Hersteller	Katalog- nummer
goat anti-mouse IgG- HRP	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005
goat anti-rabbit IgG-HRP	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2004

Proteinextraktion

Die Proteinextraktion wurde auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde ein Proteinextraktionsreagenz aus 10 ml Lysepuffer und 100 µl Proteaseinhibitor angesetzt. Ein ca. 1 mm³ Lebergewebsstück wurde dann in 300 µl Proteinextraktionsreagenz gegeben, grob zerschnitten und mit dem Pellet Mixer homogenisiert. Das Lysat wurde 60 min auf Eis inkubiert, währenddessen erfolgte alle 10 min eine kurze Durchmischung mit dem Vortex-Mixer. Anschließend wurde das Lysat 30 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand konnte bei -80 °C gelagert werden.

Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte anhand des Molekulargewichtes mittels SDS-Page. Der Proteingehalt wurde photometrisch bestimmt und der Proteingehalt auf 50 µg eingestellt. Versetzt mit ¼ Volumen Probenpuffer und 1/10 Volumen Reduktionsmittel wurden 88 µl Probe für 10 min bei 70 °C denaturiert und herunterzentrifugiert.

Von jeder Probe und dem Proteinstandard wurden 20 µl elektrophoretisch für 1 Stunde bei 150 V aufgetrennt. Dem Laufpuffer wurden 500 µl Antioxidant zugesetzt. Entsprechend des zu erwartenden Molekulargewichts von 40-500 kDA wurde ein 8 %iges Gel verwendet und bei kleineren Proteinen ein 12 %iges Gel.

Western Blot

Der Western Blot wurde mittels der Tank Blot (Wet Blot) Methode durchgeführt. Zunächst wurde eine Transferpuffer-Lösung hergestellt, die sich aus 750 ml doppelt destilliertem Wasser, 200 ml Methanol und 50 ml Transferpuffer zusammensetzte. In einer Schale wurden Nitrocellulosemembran, Filterpapier und die zum Tank Blot System gehörigen Schwämme in Transferpufferlösung getränkt. Anschließend wurde das Sandwich für den Tank Blot in der folgenden Reihenfolge hergestellt: schwarzer Teil der Kassette (später Kathode), Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, Schwamm, roter Teil der Kassette (später Anode). Das Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in den Tank gegeben, dieser wurde anschließend mit Transferpufferlösung aufgefüllt. Der Western Blot lief 3 Stunden bei 4 °C und 80 V.

Anschließend konnte der Proteintransfer anhand des Proteinmarkers überprüft werden. Die Membran wurde mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen, danach erfolgte eine Färbung mittels Ponceau S Färbelösung unter leichtem Schütteln. Eine dreimalige Waschung mit doppelt destilliertem Wasser entfernte überschüssige Färbelösung und die Membran konnte anhand der gefärbten Banden auf Höhe der gewünschten Molekülgröße zugeschnitten werden. Die zugeschnittenen Membranteile wurden mit dem Waschpuffer 1 entfärbt und 60 min in Blockierpuffer gegeben. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte dann bei 4 °C über Nacht. Es schloss sich die Inkubation mit dem zum Primärantikörper passenden Sekundärantikörper für 60 min an. Anschließend wurden die Membranteile dreimal für je 10 min in Waschpuffer 2 und zuletzt in doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Der

Sekundärantikörper wurde mit Chemilumineszenz-Substrat oxidiert, die Chemilumineszenz wurde detektiert und anschließend mit der entsprechenden Software ausgewertet.

2.11. Microarray

Die kryokonservierten Gewebeproben aus Tumor-, Nichttumor- und tumorumgebenden präneoplastischem Gewebe wurden am Department of Clinical Experimental Medicine der Universität Sassari, Italien, mittels Microarray analysiert. Auf die Ergebnisse wird in dieser Doktorarbeit auszugsweise Bezug genommen.

3. Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der forcierten Hepatokarzinogenese der Wildtypgruppen nach hydrodynamischem Gentransfer der verschiedenen PIK3CA-Mutationen E545K und H1047R vergleichend präsentiert. Schwerpunkte bilden die Statistik, Morphologie und Molekularpathologie. Des Weiteren wird auch auf die Nebenbefunde eingegangen.

3.1. Statistische Auswertung

Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-E545K

Für die Beobachtungszeiträume von einer Woche, einem, drei, sechs, neun und zwölf Monaten waren jeweils zehn Tiere pro Versuchsgruppe geplant. Je nach Schwere der Tumorentwicklung mussten die Tiere früher getötet werden. Eine Übersicht der Lebertumorentwicklung der Versuchstiere zeigt Diagramm 3.1.1.

Nach einer Woche sowie nach einem Monat waren weder makroskopisch noch histologisch Präneoplasien oder Tumoren zu erkennen. Drei Monate *post injectionem* waren bei 40 % der mit E545K injizierten Tiere (4 von 10) nur Präneoplasien histologisch sichtbar. Weitere 20 % (2 von 10) wiesen Präneoplasien und histologisch erkennbare Tumorherde auf. Bei 10 % (1 von 10) war der Lebertumor bereits makroskopisch sichtbar. Lediglich bei 30 % (3 von 10) der Tiere konnten nach drei Monaten weder Präneoplasien noch Tumoren der Leber gefunden werden.

Sechs Monate *post injectionem* waren in allen untersuchten sechs Tieren makroskopische und histologische Lebertumoren sowie Präneoplasien nachweisbar. Dasselbe Untersuchungsergebnis zeigten die zwei Tiere, die nach einem Beobachtungszeitraum von neun Monaten obduziert wurden.

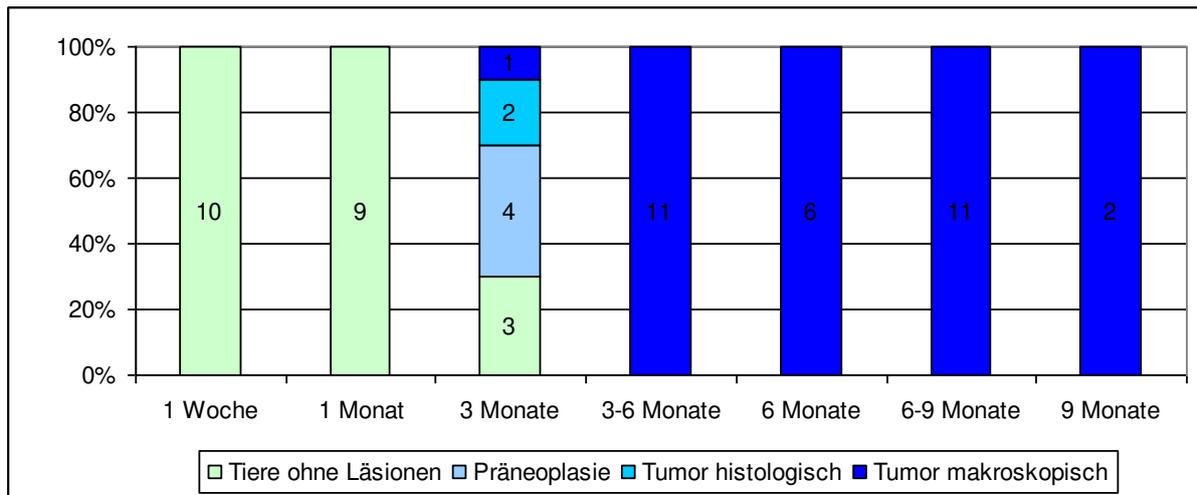


Diagramm 3.1.1: Zeitliche Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-E545K.

Alle anderen Tiere zeigten ein äußerst aggressives Tumorwachstum mit zahlreichen makroskopischen und histologischen Tumorherden. Diese Tumorlast war für die Tiere enorm, sodass elf Tiere zwischen den Zeiträumen von drei und sechs Monaten sowie weitere elf Tiere zwischen den Zeiträumen von sechs und neun Monaten vorzeitig getötet werden mussten (siehe Diagramm 3.1.3). Der geplante Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten konnte aufgrund der starken Tumorentwicklung nicht erreicht werden.

Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-H1047R

Die Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-H1047R zeigte sich insgesamt deutlich milder als in der zuvor beschriebenen Gruppe. So erreichten alle Tiere den geplanten Beobachtungszeitraum, keines musste vorzeitig getötet werden.

Insgesamt entwickelten viel weniger Tiere Tumoren, 6 und 9 Monate nach der Injektion waren jeweils nur bei einem von zehn Tieren (10%) Lebertumoren histologisch nachweisbar. 12 Monate nach der Injektion konnte bei 30% (3 von 10) der Tiere ein Lebertumor diagnostiziert werden. Präneoplasien waren hingegen ab dem Beobachtungszeitraum von 3 Monaten überwiegend nachweisbar (Diagramm 3.1.2). Bei den Kontrolltieren (Empty Vector, Kochsalzlösung, unbehandelt) waren zu keinem Beobachtungszeitpunkt Präneoplasien oder Tumoren nachweisbar.

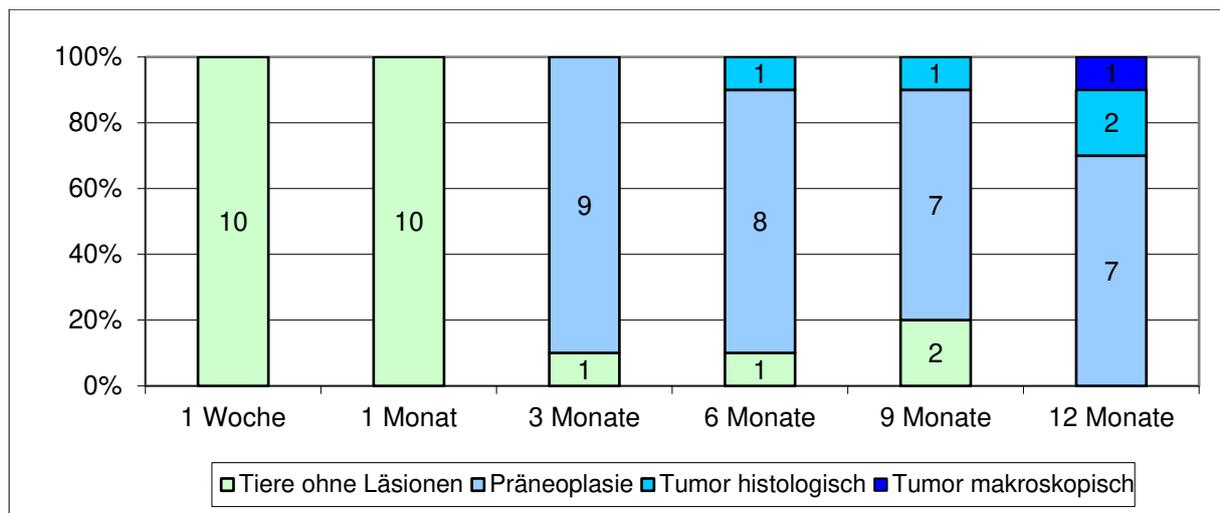


Diagramm 3.1.2: Lebertumorentwicklung nach Injektion von PIK3CA-H1047R

Überlebenszeiten

Das aggressive Tumorwachstum in der Leber war für die mit PIK3CA-E545K injizierten Mäuse bereits nach wenigen Monaten tödlich, sodass die geplanten Versuchszeiten von sechs und neun Monaten selten, die geplante Versuchszeit von zwölf Monaten nie erreicht wurde. Diese Tiere mussten vorzeitig getötet werden. Die mit PIK3CA-H1047R injizierten Tiere sowie die Kontrolltiere, die das leere Plasmid erhielten (Empty Vector, EV), zeigten hierdurch keine

Einschränkung und wurden somit alle planmäßig nach Ablauf der jeweiligen Beobachtungszeit getötet.

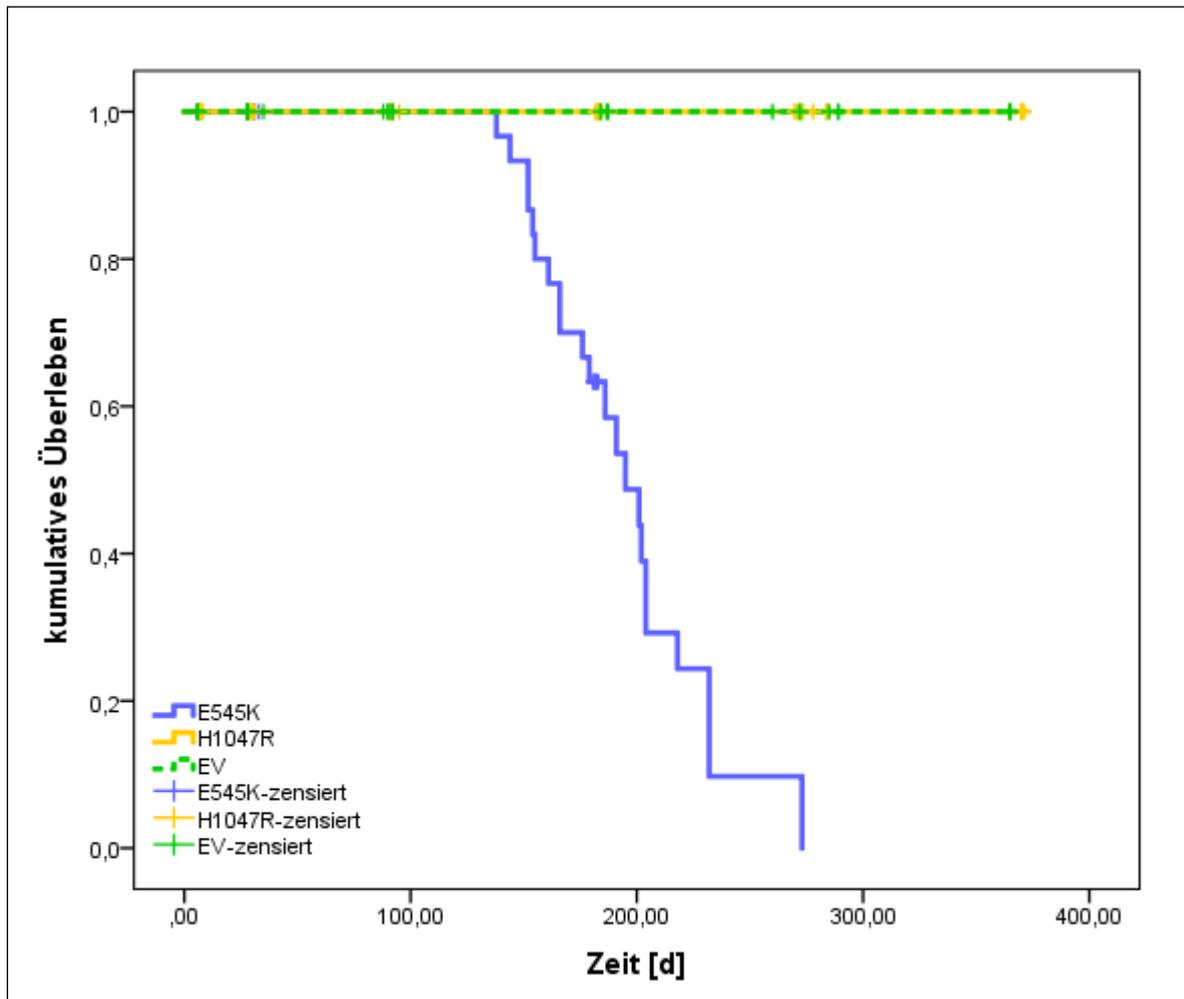


Diagramm 3.1.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurve

Diagramm 3.1.3 zeigt die Kaplan-Meier-Überlebenskurve der Versuchstiere. Hier zeichnet sich das kürzere Überleben der mit PIK3CA-E545K injizierten Mäuse gut sichtbar ab. Im Log-Rank-Test ist der Unterschied von E545K zu den anderen beiden Gruppen als signifikant ($p < 0,001$) zu werten. E545K-Tiere, die einen makroskopisch sichtbaren Lebertumor entwickelten, wurden im Median 182 Tage (6 Monate) alt.

Lebergewichtsentwicklung und Körpergewichtsentwicklung

Als objektiverer Maßstab für die Tumorlast der Tiere wurden die Lebergewichte herangezogen und verglichen. Dabei war erkennbar, dass die Tumorentwicklung der E545K-injizierten Tiere mit einem deutlichen Anstieg des Lebergewichtes einherging. Die Lebergewichtsentwicklung der Tiergruppen ist in Diagramm 3.1.4 dargestellt.

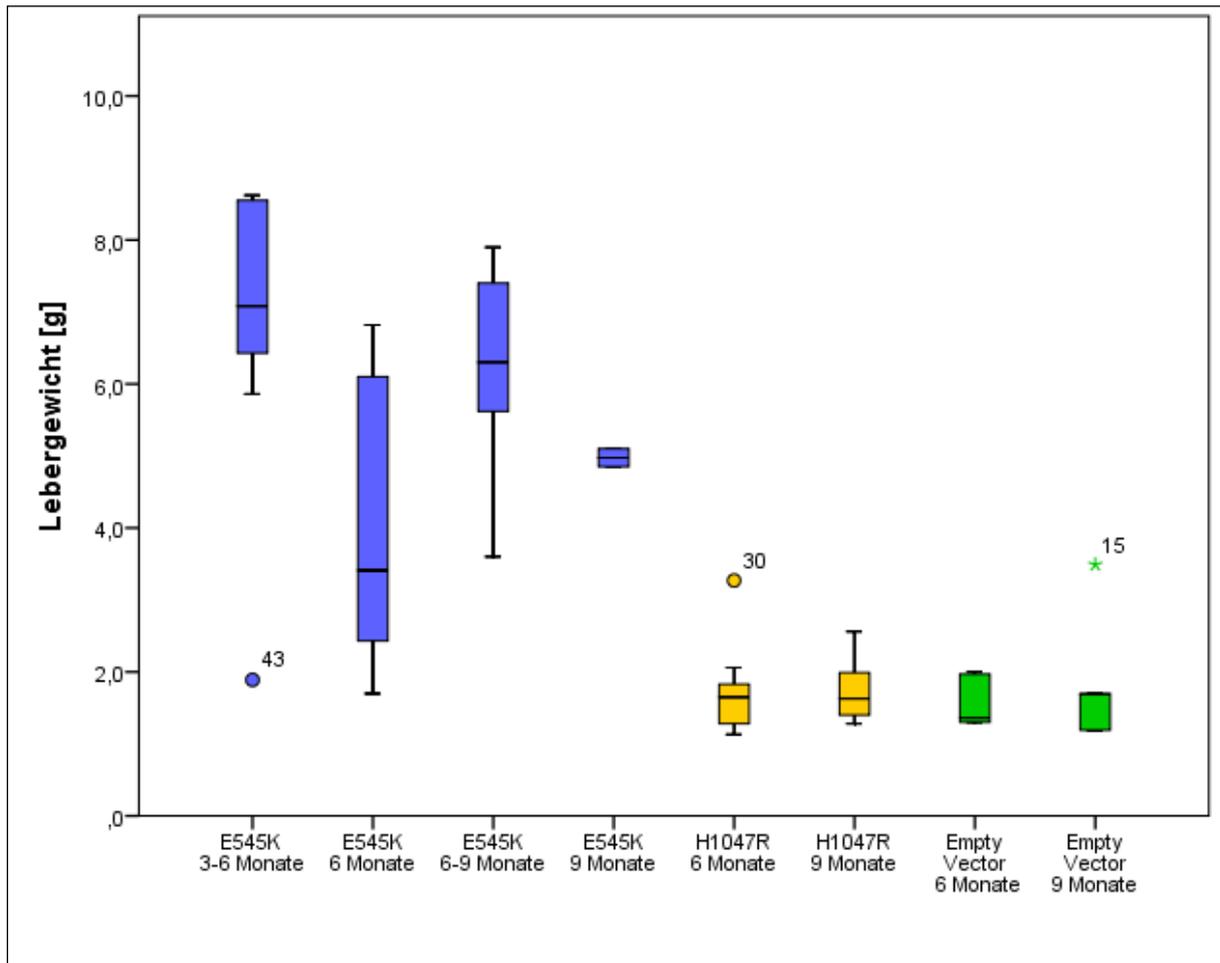


Diagramm 3.1.4: Lebergewichtsentwicklung

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass die E545K-injizierten Tiere ein deutlich erhöhtes Lebergewicht aufwiesen als gleichaltrige Tiere, die H1047R oder das leere Plasmid (EV) erhielten. Im t-Test ist dieser Unterschied für den Zeitpunkt sechs und neun Monate post injectionem signifikant, wobei der Unterschied von Tieren, die H1047R erhielten, zu Kontrolltieren nicht als signifikant gewertet werden kann ($p\text{-Wert} > 0,5$). Auch nach zwölf Monaten war dies nicht der Fall, weshalb im o.g. Diagramm auf eine Darstellung dieses

Zeitraums verzichtet wurde. Die errechneten p-Werte zum Vergleich der Lebergewichte sind Tabelle 3.1.1 zu entnehmen. Aufgrund der fehlenden Kontrolltiere zu den ungeplanten Tötungen der vorzeitig euthanisierten E545K-Versuchstiere in den Zeiträumen zwischen drei und sechs sowie zwischen sechs und neun Monaten konnte der t-Test hierfür nicht durchgeführt werden.

Tabelle 3.1.1: Statistik - t-Test Lebergewichtsentwicklung: p-Werte

Gruppe	Vergleich mit Gruppe	Beobachtungszeitraum	p-Wert
E545K	EV	6 Monate	< 0,017
E545K	H1047R	6 Monate	< 0,024
E545K	EV	9 Monate	< 0,003
E545K	H1047R	9 Monate	< 0,001
H1047R	EV	6 Monate	< 0,816
H1047R	EV	9 Monate	< 0,935

Methodisch ist darauf hinzuweisen, dass der t-Test in diesem speziellen Fall nicht mathematisch korrekt durchführbar war, da die hohen Lebergewichte der E545K-Tiere, die vorzeitig getötet werden mussten, im hier durchgeführten Test ignoriert werden. Daher ist davon auszugehen, dass der Mittelwert der Lebergewichte bei E545K zu den Zeitpunkten 6 Monate und 9 Monate theoretisch noch höher läge, die Streuung jedoch auch größer wäre. Ein zensierter t-Test für diesen speziellen Fall ist jedoch nicht existent.

Im Gegensatz zur Entwicklung des Lebergewichtes blieb das Körpergewicht der Versuchstiere ab dem Zeitpunkt der Tumorentwicklung leicht unterhalb des Körpergewichtes gleichaltriger Kontrolltiere – manche Tiere zeigten sich geradezu kachektisch.

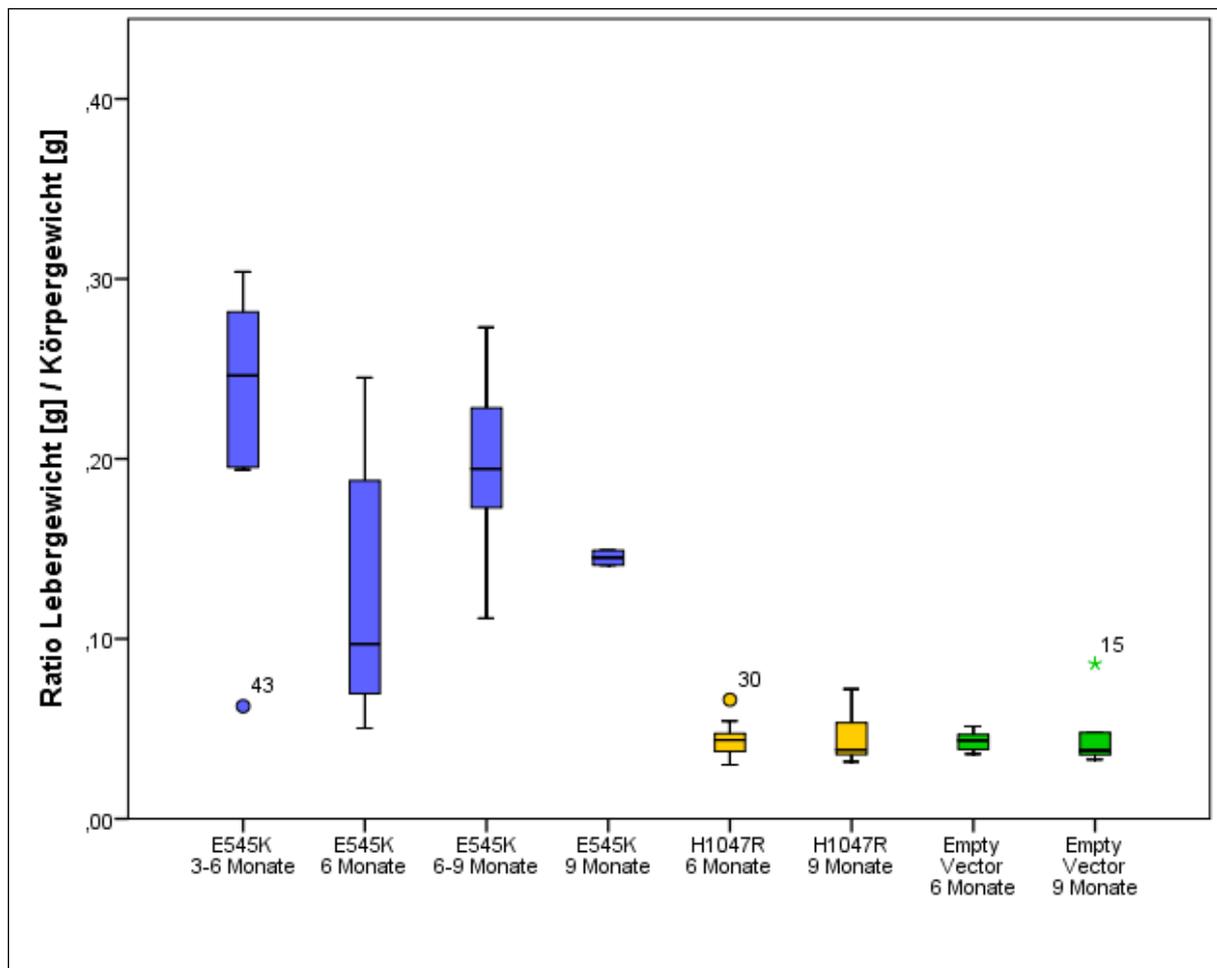


Diagramm 3.1.5: Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht

Werden die Leber- und Körpergewichte der Tiere ins Verhältnis gesetzt (siehe Diagramm 3.1.5), fällt auf, dass die Gewichtszunahme der E545K-Tiere vor allem auf die Leber beschränkt war. Es handelte sich also nicht um eine natürliche Gewichtszunahme im Rahmen des Wachstums der Mäuse. Auch für diesen Sachverhalt wurde der t-Test durchgeführt und ist für den Vergleich von E545K-injizierten Tieren mit den anderen beiden Gruppen für sechs und neun Monate signifikant, während der Unterschied von H1047R-injizierten Tieren mit dem leeren Plasmid nicht signifikant war (siehe Tabelle 3.1.2).

Tabelle 3.1.2: Statistik - t-Test Ratio Leber- zu Körpergewicht: p-Werte

Gruppe	Vergleich mit Gruppe	Beobachtungszeitraum	p-Wert
E545K	EV	6 Monate	< 0,020
E545K	H1047R	6 Monate	< 0,021
E545K	EV	9 Monate	< 0,001
E545K	H1047R	9 Monate	< 0,001
H1047R	EV	6 Monate	< 0,977
H1047R	EV	9 Monate	< 0,903

3.2. Morphologische Auswertung

Makroskopie

Makroskopisch zeigten sich in der Gruppe PIK3CA-E545K Lebertumoren von der Größe <1mm bis hin zu bereits makroskopisch vollständig mit multiplen, teilweise verschmolzenen, Tumoren befallenes Lebergewebe [Abbildung 3.2.2 A - C]. Das Ausmaß des Befalls korrelierte einerseits mit dem Beobachtungszeitraum, andererseits zeigten Tiere, die ungeplant vorzeitig getötet werden mussten (Zwischenzeiträume 3-6 Monate sowie 6-9 Monate), die stärkste Ausprägung (vgl. auch Diagramm 3.1.4).

Die Tumoren zeigten ein solides Wachstum, waren von runder, recht scharf begrenzter Gestalt sowie teilweise mit feinen Gefäßinjektionen [Abbildung 3.2.2 C] an der Oberfläche versehen. Bei starkem Tumorbefall kam es zu Verschmelzungen der einzelnen Läsionen [Abbildung 3.2.2 C]. Die Tumorschnittfläche war grau-weiß, optional mit zystischen, gallertig gefüllten Anteilen [Abbildung 3.2.2 C].

Der einzige makroskopisch sichtbare Lebertumor eines mit PIK3CA-H1047R injizierten Tieres war auffällig peripher lokalisiert, scharf begrenzt und zeigte eine weiße Schnittfläche [Abbildung 3.2.2 E und F].

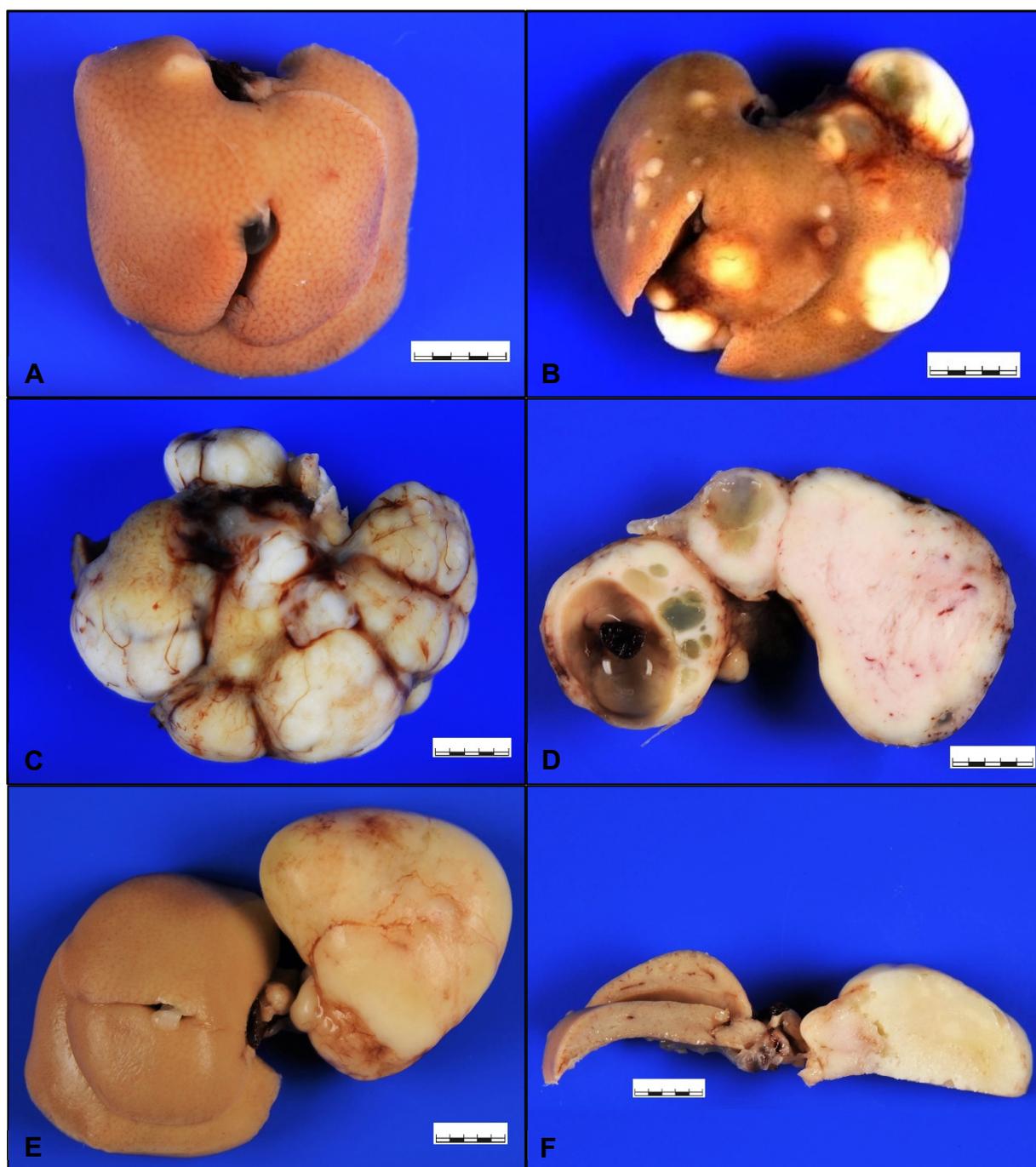


Abbildung 3.2.1: Makroskopie der Lebertumoren. Maßstab: jeweils 5 mm. **A** E545K 3 Monate **B** E545K 6 Monate **C** E545K 5 Monate und 2 Wochen **D** E545K 6 Monate und 1 Woche **E** H1047R 12 Monate **F** H1047R 12 Monate

Histologie

Histologisch zeigten sich frühestens 3 Monate nach dem hydrodynamischen Gentransfer erste präneoplastische Läsionen sowie bei der Gruppe PIK3CA-E545K bei 3 von 10 Tieren auch

erste Lebertumoren. Als präneoplastische Zellen konnten bereits in früheren Experimenten klarzellige Hepatozyten ausgemacht werden [Calvisi et al. 2011]. Diese waren auch im vorliegenden Versuch nachweisbar (Abbildung 3.2.3, A). Diese klarzelligen Herde reicherten vor allem Lipide an (Abbildung 3.2.5). Die präneoplastisch veränderten Hepatozyten zeigten sich bei PIK3CA-E545K-Tieren vereinzelt oder in Gruppen von wenigen Zellen, wohingegen die Präneoplasien der PIK3CA-H1047R-Tiere flächig in den Azinuszonen 2-3 vertreten waren

(Abbildung 3.2.3, A und D).

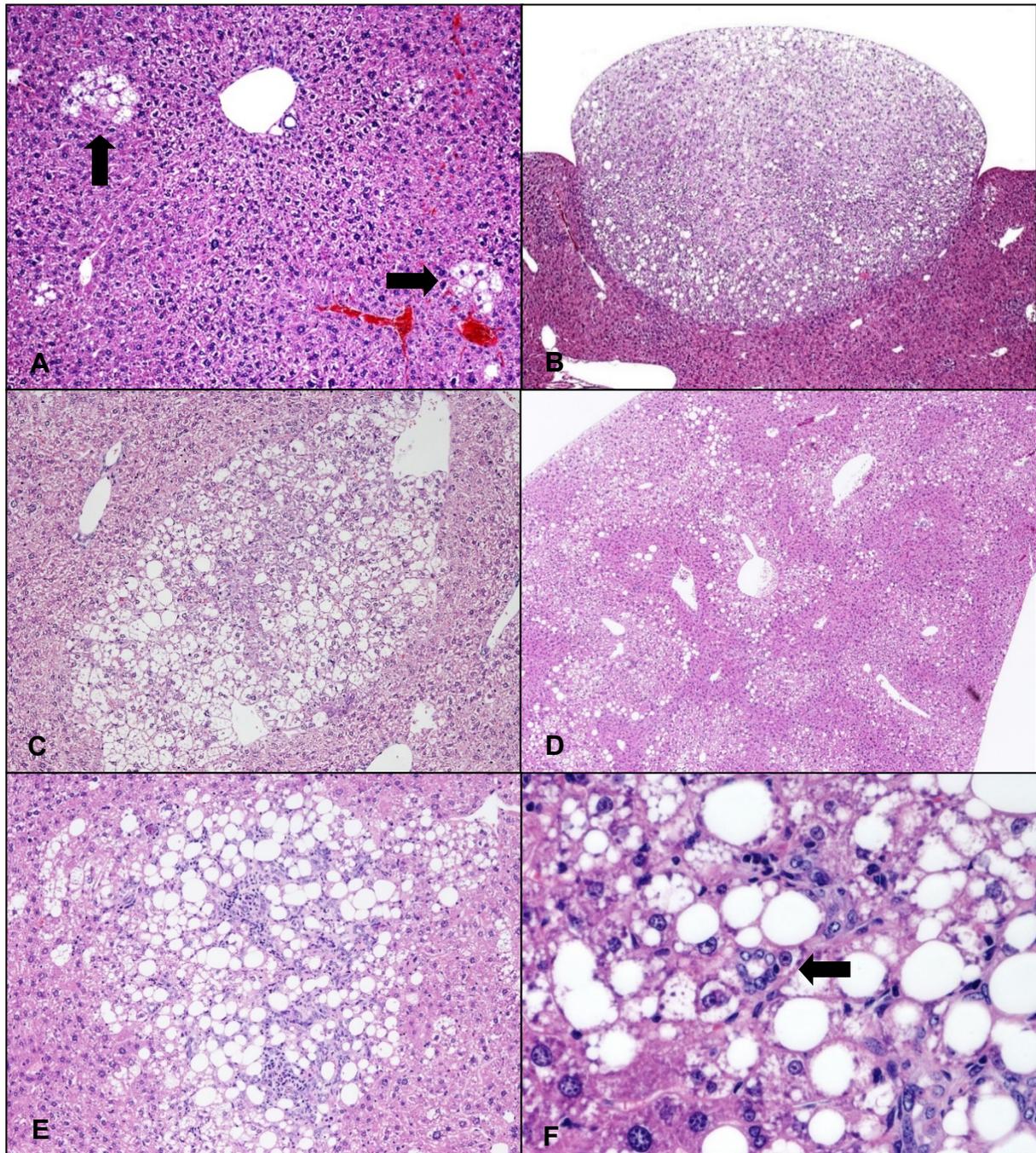


Abbildung 3.2.3: Histologie der Präneoplasien und Tumoren. **A** präneoplastisch veränderte Hepatozyten (3 Monate, E545K, 10x). **B** Lebertumor (6 Monate, E545K, 4x). **C** Lebertumor (3 Monate, E545K, 10x). **D** präneoplastisch veränderte Hepatozyten, Übersicht (12 Monate, H1047R, 4x). **E** Lebertumor (12 Monate, H1047R, 10x). **F** Ausschnitt aus E, Darstellung gangartiger Struktur (Pfeil), 20x.

Wie schon in der Makroskopie zeigten die Lebertumoren eine gute Abgrenzung zum benachbarten Lebergewebe auf, wenn auch keine Kapsel. Die Tumorzellen besaßen eine phänotypisch hepatozelluläre Differenzierung und waren im Vergleich zu den Präneoplasien ebenfalls klarzellig, jedoch deutlich unregelmäßig vergrößert, teils gröber septiert, teils mehrkernig (Abbildung 3.2.3 B, C, E und F). Die Tumorzellen der zwei Versuchstiergruppen

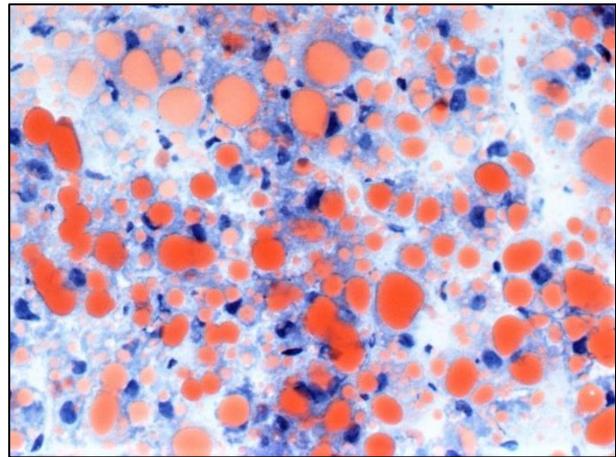


Abbildung 3.2.5: Lipidnachweis in einem Lebertumor. Sudan-Färbung (5 Monate, PIK3CA-E545K, 20x vergrößert)

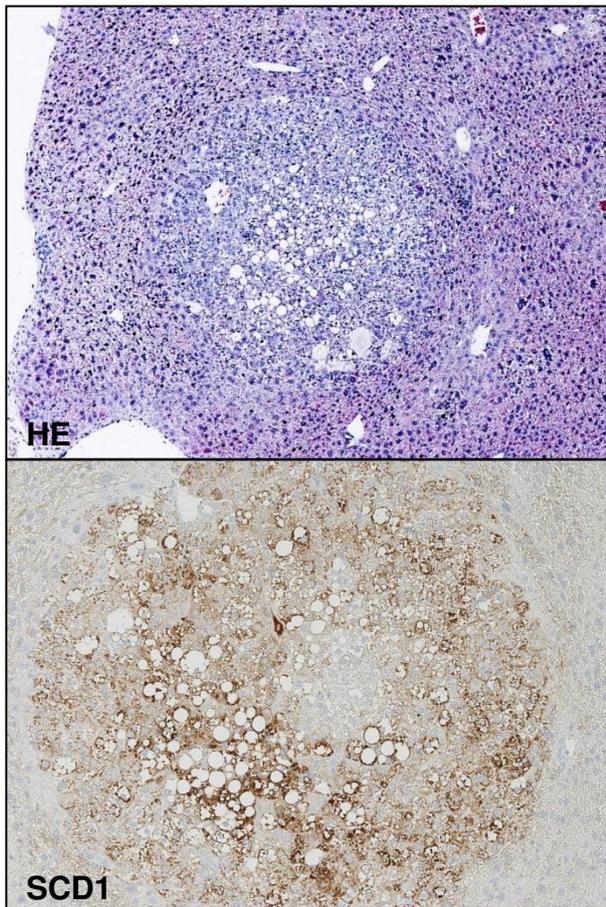


Abbildung 3.2.4: Immunhistologie eines Tumors (PIK3CA-E545K). Nachweis der Überexpression von SCD1, 6 Monate nach Injektion. HE 10x, SCD1 20x vergrößert.

dieser Arbeit stellten sich histologisch ähnlich dar, jedoch waren im Tumor der PIK3CA-H1047R-injizierten Maus zusätzlich duktile Gangstrukturen im Sinne einer cholangiozellulären Differenzierung zu finden (Abbildung 3.2.3, E und F).

Immunhistologie

Die Immunhistologie wurde bisher nur bei Tumoren durchgeführt, die nach Injektion von PIK3CA-E545K entstanden. Der Nachweis des HA-Tags in Präneoplasien und Tumoren bestätigte den kausalen Zusammenhang der Tumorentwicklung mit der Gen-Transfektion. Dies korrelierte mit der Überexpression der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α sowie einer Überexpression der Ziele ERK1/2, FASN und SCD1 (Abbildung 3.2.4 und Abbildung 3.2.6).

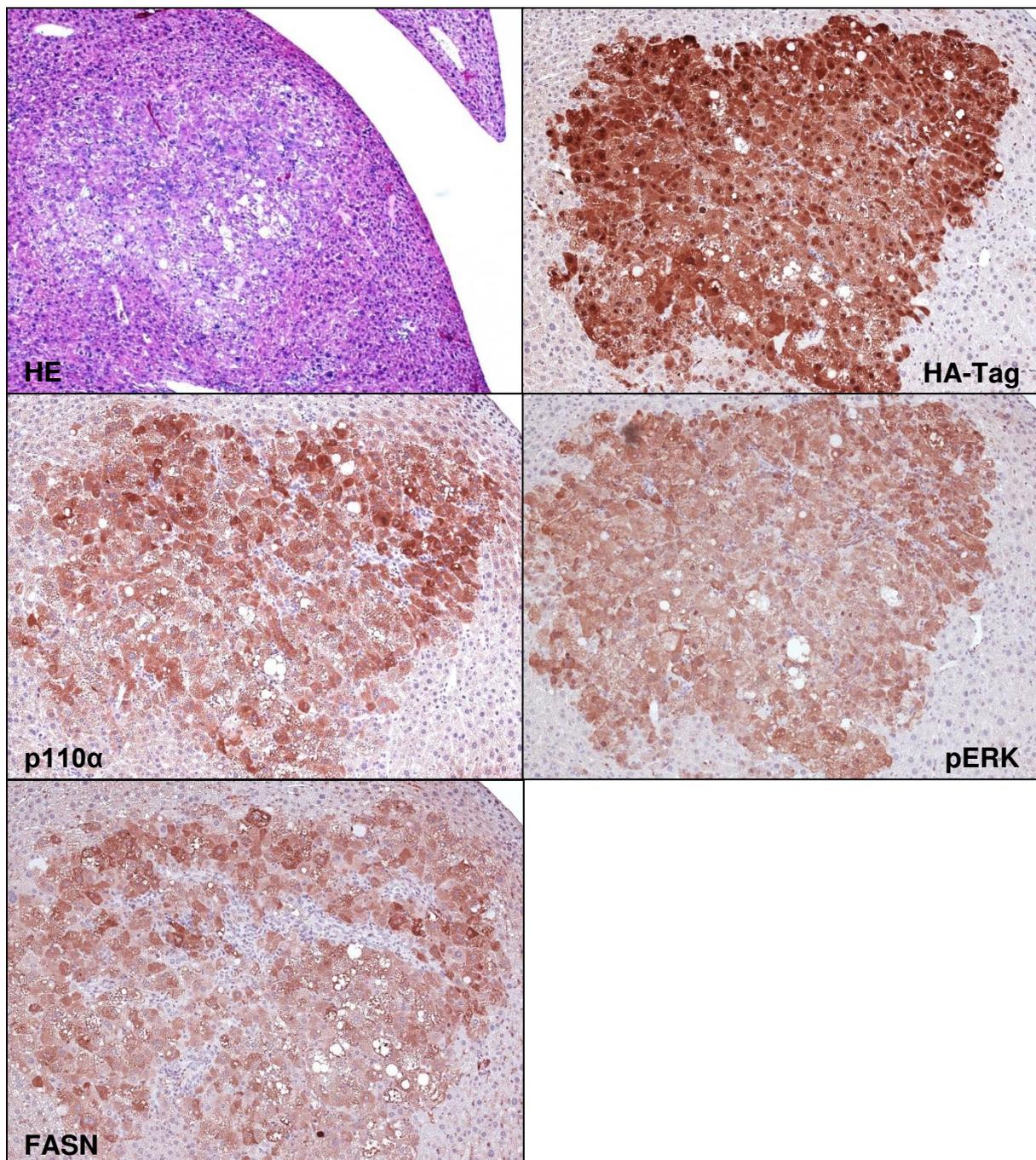


Abbildung 3.2.6: Immunhistologie der Tumoren (PIK3CA-E545K). Nachweis der Überexpression von p110 α , FASN und pERK in den Tumoren. Der Nachweis korreliert mit dem Vorhandensein des onkogenhaltigen Plasmids, markiert mit dem HA-Tag. 6 Monate nach Injektion. HE 10x, Immunhistologie 20x vergrößert.

Elektronenmikroskopie

Die nach Injektion von PIK3CA-E545K entstandenen Tumoren und Präneoplasien wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei konnte ebenfalls eine vesikuläre Lipidakkumulation sowie eine zelluläre Anreicherung von Glykogengranula dargestellt werden (6).

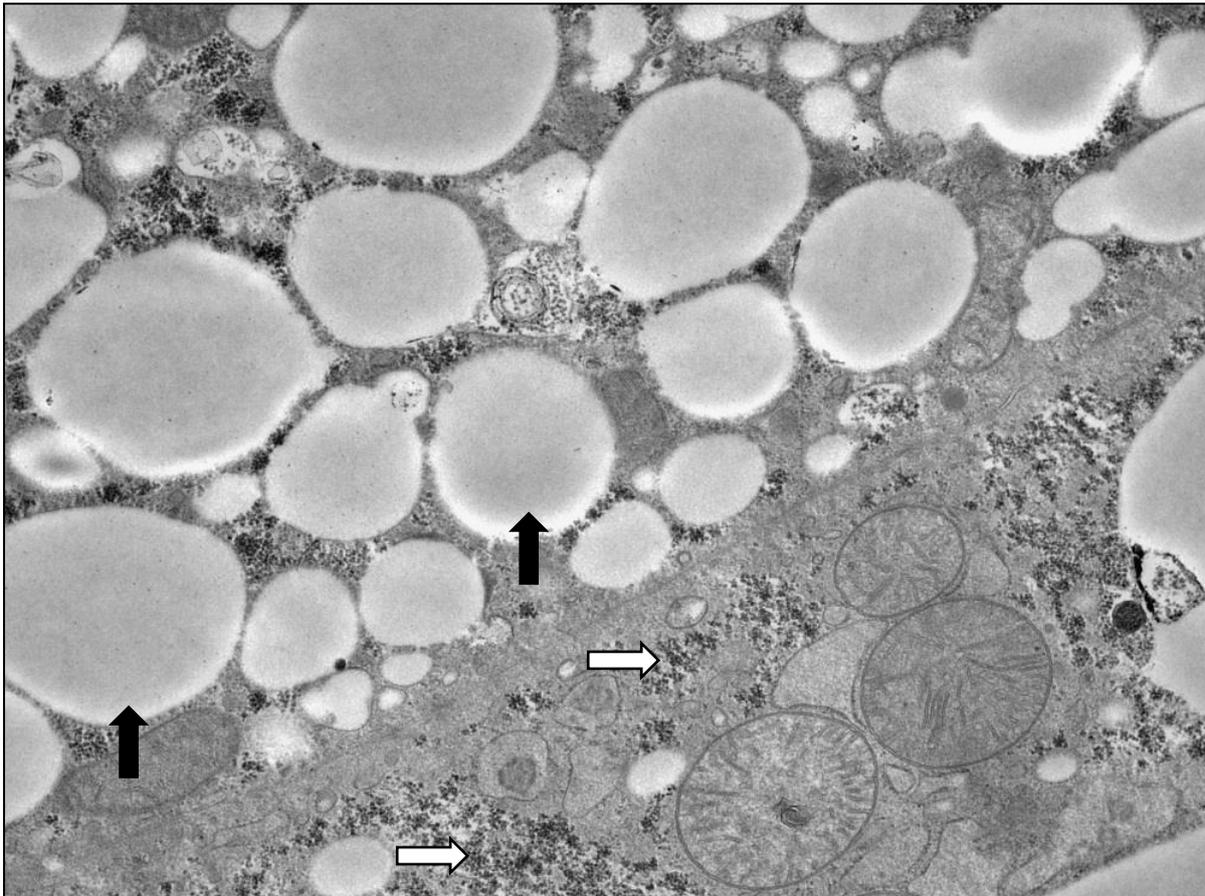


Abbildung 3.2.7: Elektronenmikroskopie. Vesikuläre Lipidakkumulation (schwarze Pfeile exemplarisch) sowie zelluläre Anreicherung von Glykogengranula (weiße Pfeile exemplarisch). PIK3CA-E545K, 9 Monate.

Western Blot

Die fünf untersuchten Tumorproben (5 von 6) aus Lebern der sechs Monate alten Tiere, die das Onkogen PIK3CA-E545K mittels hydrodynamischem Gentransfer erhielten, unterscheiden sich in ihrer Proteinexpression stark von den Proben der nichtneoplastischen Lebern der Kontrolltiere, welche das leere Plasmid erhalten haben. Wie Abbildung 3.2.8 zeigt, ist die Proteinexpression der katalytischen PI3K-Untereinheit PIK3CA in den Tumoren gegenüber

den anderen Proben stark erhöht. Die verstärkte PIK3CA-Expression korreliert mit der Überexpression der phosphorylierten (aktivierten) Ziele von PIK3CA-E545K: phosphorylierte und aktivierte Proteinkinase B (p-AKT), Serum-Glucokortikoid-regulierte Kinase 3 (p-SGK3), extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2 (p-ERK1/2) sowie der Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3 (p-STAT3). Zudem weisen die Enzyme der De-novo Lipidsynthese, die Fettsäuresynthase (FASN) und Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) sowie die proinflammatorische Cyclooxygenase 2 (COX-2) und das Zinktransportprotein 4 (ZIP-4) in den Tumoren eine gesteigerte Expression gegenüber der Proteinexpression in den Lebern der Kontrolltiere auf.

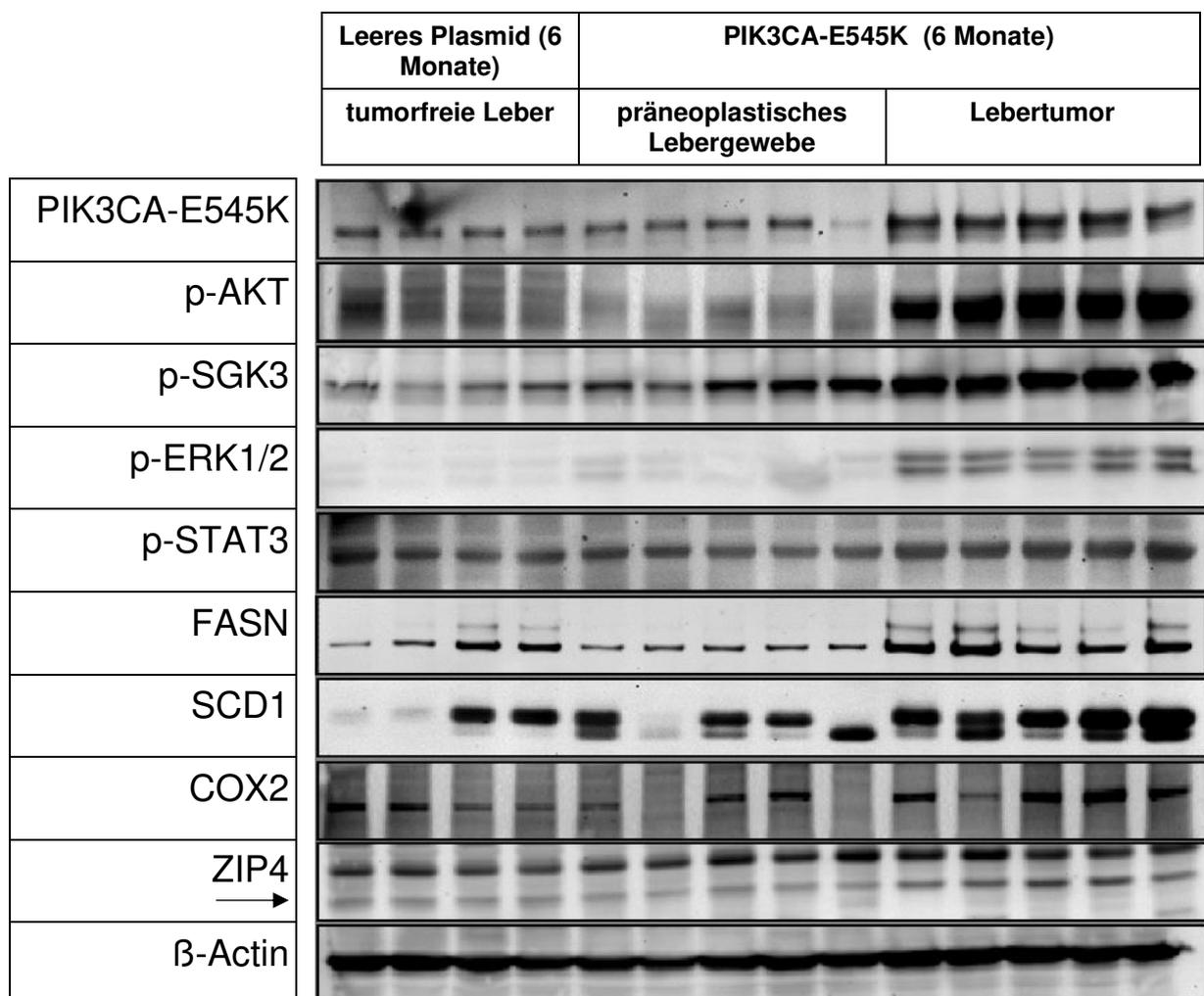


Abbildung 3.2.8: Ergebnis des Western Blot

Die Proteinexpression im präneoplastischen, umgebenden Tumorgewebe der PIK3CA-E545K-injizierten Tiere variiert. Hier ist kein einheitliches Ergebnis ablesbar. Einige der untersuchten Proteine zeigen eine vermehrte Expression, jedoch nicht in allen präneoplastischen Lebern der PIK3CA-E545K-injizierten Tiere. β -Actin ist das Housekeeping-Protein und zeigt an, dass die für die Analysen verwendete Proteinmenge in allen Proben gleich ist.

Microarray

Die Microarray-Analysen wurden nur für PIK3CA-E545K im Vergleich zu den Kontrolltieren durchgeführt. Die Gene der bereits in Immunhistologie und Western Blot nachgewiesenen Proteine Fettsäuresynthase (FASN), Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1), Cyclooxygenase 2 (COX2) sowie des Zinktransporters 4 (Protein: ZIP4, Gen: Slc39a4) zeigen auch im Microarray in den Tumoren eine verstärkte Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Fettsäuresynthase sowie der Zinktransporter 4 sind außerdem in den Tumoren noch stärker exprimiert als im umgebenden, präneoplastischen Lebergewebe.

Zudem zeigt sich in den Tumoren eine gesteigerte Expression des Gens Gnb2l1, welches für den Rezeptor 1 für aktivierte Proteinkinase C (RACK1) kodiert. Auch das Gen für das Insulin-Wachstumsfaktor-bindende Protein 1 (IGFBP1) wird in den Tumoren vermehrt exprimiert. Andere Gene mit veränderter Expression haben eine Bedeutung im Zellstoffwechsel, bei der Hämatopoese, als Transporter oder bei der Akute-Phase-Reaktion. Einige der gefundenen Gene oder deren Funktionen sind noch unbekannt. Eine komplette Auflistung findet sich im Anhang.



Abbildung 3.2.9: sichtbar vergrößertes Abdomen E545K, 6 Monate nach Injektion

3.3. Nebenbefunde

Aufgrund der starken Entwicklung der Lebertumoren konnte in den meisten Fällen ein vergrößertes Abdomen bereits am lebenden Tier beobachtet werden (Abbildung 3.2.9). Bei geringerer Ausprägung waren viele Tumoren jedoch noch immer palpabel. Versuchs- und Kontrolltiere entwickelten im gleichen Ausmaß Lymphome der Leber.

Metastasierung

Trotz des aggressiven Tumorwachstums der Leber konnten bei der umfangreichen histologischen Untersuchung der inneren Organe keine Metastasen gefunden werden. Eine intrahepatische Metastasierung ist jedoch aufgrund multipler Tumorherde bei vielen E545K-Tieren denkbar.

4. Diskussion

Das onkogene Potenzial der Mutationen PIK3CA-E545K sowie H1047R konnten in der Mauseleber nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung. Nachgeschaltete bekannte Ziele der PI3K konnten in Lebertumoren und Präneoplasien bestätigt und neue entdeckt werden. Des Weiteren konnte eine gesteigerte Lipidsynthese in (prä)neoplastischen Hepatozyten aufgezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit sind relevant für den Erkenntnisgewinn auf dem Gebiet der Hepatokarzinogenese sowie für das Wissen über die allgemeine Tumorphathologie. Die junge und innovative Methode des hydrodynamischen Gentransfers bietet neue Chancen als Zukunftsmodell in der Krebsforschung.

4.1. PIK3CA-Mutationen wirken onkogen in der Mauseleber

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist ein zentraler Regulator von multiplen zellulären Prozessen, einschließlich Zellmetabolismus, Proliferation und Überleben. Im hepatozellulären Karzinom ist die Deregulation des PI3K-Signalweges das Ergebnis multipler molekularer Mechanismen, u.a. aktivierender Mutationen der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 [Wang et al. 2013].

In morphologischer und statistischer Auswertung konnte gezeigt werden, dass allein die Mutation PIK3CA-E545K ausreicht, um bereits nach wenigen Monaten zuverlässig aggressive hepatozelluläre Karzinome in der Maus hervorzurufen. Aufgrund der Aggressivität konnten einige Versuchszeitpunkte nicht erreicht werden, da die Tiere vorzeitig getötet werden mussten. Auch die Mutation von PIK3CA-H1047R ruft in der Mauseleber präneoplastische Veränderungen bis hin zu einer Tumorentwicklung hervor, jedoch in weitaus geringerer Anzahl und mit geringeren systemischen Auswirkungen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Arbeit von Li (2015) beschrieben. Durch die hydrodynamische Injektion von PIK3CA-H1047R zeigten sich Cluster von lipidreichen Hepatozyten im Sinne von Präneoplasien. Anders als in dem in dieser Doktorarbeit präsentierten Versuch wurden hier 40 Wochen nach Injektion noch keine Tumoren beobachtet. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die E545K Mutation wesentlich potenter in der Hepatokarzinogenese ist als die H1047R Mutation.

In einem weiteren vorangegangenen Experiment konnten durch die vorgenannten PIK3CA-Mutationen ebenfalls keine Lebertumoren mittels der hier verwendeten Methode des hydrodynamischen Gentransfers hervorgerufen werden [Wang et al. 2016]. Allerdings betrug der Beobachtungszeitraum in dem zitierten Versuch nur vier Wochen. Mit dem in dieser Arbeit präsentierten Experiment konnte gezeigt werden, dass allein die Überexpression der PIK3CA-Mutationen E545K oder H1047R ausreicht, um Lebertumoren in der Maus zu erzeugen, allerdings ist hierfür ein Mindestbeobachtungszeitraum von drei (E545K) bzw. sechs Monaten (H1047R) erforderlich.

4.2. Gesteigerte Lipidsynthese in der Hepatokarzinogenese

Die gesteigerte De-novo Lipidsynthese, d.h. die endogene Herstellung von Fettsäuren aus Acetyl-CoA, wurde in verschiedenen Tumoren, u.a. des Kolons, der Mamma, Lunge und Prostata, beschrieben. Im Wachstum von Tumoren bietet die fehlregulierte Lipidsynthese einen stetigen Nachschub von Lipiden z.B. zur Herstellung von Membranbestandteilen oder zur lipidbasierten posttranslationalen Proteinmodifikation von wichtigen Signalproteinen, die ihrerseits in der gesteigerten Proliferation ihre Wirkung zeigen [Currie et al. 2013, Rohrig et al. 2016, Menendez et al. 2007, Che et al. 2017].

Die übermäßige Aktivität und Expression von FASN und SCD1 konnten bisher als wichtige Schlüsselenzyme der Lipidsynthese in verschiedenen Tumorzellen ausgemacht werden [Khwairakpam et al. 2015]. - Der PI3K-AKT-Signalweg konnte bereits zuvor als ein Hauptsignalweg der gesteigerten Lipidsynthese in verschiedenen Tumoren identifiziert werden [Lamming et al. 2013].

In der Hepatokarzinogenese des Menschen konnte eine Überexpression von Genen der Lipidsynthese, u.a. FASN, zuvor gezeigt werden. Darüber hinaus korrelierte das Maß der FASN-Überexpression mit der klinischen Aggressivität und einer schlechten Prognose der Erkrankung. Eine Steigerung von FASN geht in menschlichen HCC mit einer übermäßigen Aktivität von AKT und einem Verlust von PTEN einher [Hao Q et al. 2014, Zhu X et al. 2012, Calvisi DF et al. 2011].

In der Maus war zuvor eine Überexpression von AKT bzw. eine leberspezifische Deletion von PTEN mit einer FASN-Überexpression und gesteigerten Lipidsynthese, welche

zur Steatosis hepatis und zur Hepatokarzinogenese führte, nachweisbar verknüpft [Calvisi et al. 2011, Ono H et al. 2003, Stiles B et al. 2004]. Umgekehrt konnte zuvor experimentell gezeigt werden, dass FASN für die AKT-gesteuerte Hepatokarzinogenese in der Maus vorhanden sein muss [Che et al. 2017].

Bereits im Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die hydrodynamische Injektion von PIK3CA-E545K bzw. -H1047R mittels AKT/mTOR zu einer Steatosis führt [Wang et al. 2016]. In dieser Doktorarbeit konnte darüber hinaus erstmals die Verbindung bis zur Tumorentwicklung nachgewiesen werden.

Die Überexpression der PI3K führte im hier vorgestellten Versuch durch verschiedene Mutationen in den erzeugten Lebertumoren zur gesteigerten Expression von AKT und konsekutiv zur Überexpression von FASN, SCD1 und SGK3. Als morphologisches Korrelat war eine intrazelluläre Lipidanreicherung erkennbar. Diese Untersuchungsergebnisse unterstreichen die zuvor in humanen HCCs sowie die im Mausversuch gezeigten Befunde. Der PI3K/AKT-Signalweg nimmt in der Zusammenschau der Ergebnisse eine Hauptrolle in der für die Hepatokarzinogenese so wichtigen Lipidsynthese ein.

4.3. Bedeutung für das Verständnis der Hepatokarzinogenese

Morphologisch konnten bereits zuvor beobachtete Präneoplasien, sog. „clear cell foci“ auch bei diesem Experiment in den Lebern der jüngeren Tiere beobachtet werden [vgl. Calvisi et al. 2011]. Noch ausgeprägter als nach Injektion von PIK3CA-E545K zeigten sich diese Präneoplasien nach Injektion von PIK3CA-H1047R. Die bisherigen morphologischen Erkenntnisse über Präneoplasien von Lebertumoren der Maus konnten somit bestätigt werden. Dieses Wissen ist hilfreich, wenn auch nach längerer Beobachtungszeit nach hydrodynamischer Injektion eines Onkogens keine Tumoren in der Leber auftreten. Dann kann die Untersuchung auf Präneoplasien und ggf. die weitere immunhistologische oder molekularpathologische Auswertung erfolgen.

Wie in den molekularbiologischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, resultiert die Expression von PIK3CA-E545K in den Lebertumoren und Präneoplasien der Mausleber in der vermehrten Aktivierung von AKT, SGK3, ERK, STAT3, FASN, SCD1, COX2 und ZIP4. Diese Proteine sind bereits als Ziele der PI3K in Tumoren bekannt [Hers et al. 2011, Liu et al.

2012, Wang et al. 2013, Han et al. 2019, Li et al. 2016, Mauvoisin et al. 2007, Kuang et al. 2017]. Die Ergebnisse der Molekularbiologie stützen die bereits zuvor vielfach aufgestellte These der kanzerogenen Lipidakkumulation in der Leber (Vgl. 4.2).

Interessant war auch der Nachweis duktilärer Strukturen in einem durch H1047R Mutation hervorgerufenen Lebertumor, welches als eine hepatozelluläre-cholangiozelluläre Mischdifferenzierung bewertet werden kann. Dies könnte als Indiz dafür herangezogen werden, dass der PI3K-Signalweg eine Rolle bei der Umdifferenzierung eines Hepatozyten in eine maligne Zelle mit hepatozellulären und cholangiozellulären Eigenschaften spielt. Diese Form der Dedifferenzierung des Hepatozyten konnte bereits in anderen Versuchen z.B. durch Mutation der Isocytatdehydrogenase 1 oder durch Verlust von p53 gezeigt werden. Für eine Mutation der PIK3CA als alleiniges Onkogen wurde dies bisher noch nicht gezeigt [Saba et al. 2014, Tschaharganeh et al. 2014].

4.4. Neue und unbekannte Gene im PI3K-Signalweg

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Microarray-Untersuchungen nicht nur bekannte Gene als PI3K-Ziele bestätigt werden, sondern auch zahlreiche unbekannte Ziele entdeckt werden, die es weiter zu untersuchen gilt. Dies betrifft einerseits Gene, die bisher nicht bekanntermaßen im Zusammenhang mit dem PI3K-Signalweg gesehen wurden, als auch andererseits bisher noch unbekannte Gene, die durch die o.g. Untersuchungen überhaupt erst entdeckt wurden.

Beispielhaft ist hier RACK1 zu erwähnen, welches zuvor bereits *in vitro* via PI3K-Signalweg in HCC-Zelllinien der Maus Proliferation, Migration und invasives Wachstum förderte [Wu et al. 2013]. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Mausmodell kann die weitere Erforschung von RACK1 in der Hepatokarzinogenese *in vivo* fortgesetzt werden.

4.5. Chancen des Tumormodells und Target Therapies

E545K und H1047R sind bekannte PI3K-Mutationen in humanen HCCs [Karakas et al. 2006]. Mit dieser Forschungsarbeit wurde ein Modell geschaffen, in dem die Auswirkungen der vorgenannten Mutationen *in vivo* näher untersucht werden können. Dies betrifft die Darstellung

von bekannten sowie neuen Zielen von PIK3CA-E545K zur weiteren Erforschung des Tumorsignalweges, aber auch in nächster Instanz das Testen von sog. *target therapies in vivo*.

FASN steht hierbei sicher als ein wichtiges Schlüsselenzym der Lipidsynthese in Tumoren im Fokus einer solchen Therapie. Es sind bereits zahlreiche pharmakologische Inhibitoren von FASN zur Anwendung in verschiedenen Tumoren entwickelt worden [Rohrig et al. 2016]. Jedoch ist keiner dieser Inhibitoren bisher zur Therapie beim Menschen einsatzbereit, die klinischen Studien befinden sich noch im Anfangsstadium. Auch ist ein FASN-Inhibitor für den Einsatz speziell im HCC noch nicht in Sicht. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell liefert zuverlässige Bedingungen für das Testen von verschiedenen FASN-Inhibitoren zur Hemmung der Hepatokarzinogenese *in vivo*.

4.6. Ausblick

Der PI3K-Signalweg in der Mausleber wurde dargestellt und bekannte sowie neue Ziele definiert. Die molekularbiologische Auswertung des Experimentes wurde in dieser Doktorarbeit nur auszugsweise angeschnitten. Allein den PI3K-Signalweg betreffend können sich noch umfangreichere molekularbiologische Tests mit dem gewonnenen Untersuchungsmaterial anschließen, z.B. die molekulare Untersuchung der Präneoplasien der PIK3CA-H1047R Gruppe.

Es steht aus diesem Versuch noch Gewebe für weitere molekularbiologische Untersuchungen bereit. Des Weiteren können, wie zuvor erwähnt, andere putative Onkogene und Signalwege sowie deren Zusammenspiel Gegenstand nachfolgender Experimente sein. Die in mühevoller Kleinarbeit zusammengetragenen Ergebnisse sollen schließlich zum Verständnis der Hepatokarzinogenese sowie zur allgemeinen Tumorentwicklung beitragen und den Weg zur Erforschung von *target therapies* bahnen. Im letzten Schritt ist es das Ziel, eben jene *target therapies* in klinischen Studien auf den Menschen zu übertragen und schließlich im Sinne einer individualisierten Medizin nach Typisierung einer geeigneten Gewebeprobe den Patienten individuell behandeln zu können. Dies spart unerwünschte Nebenwirkungen ein und ermöglicht die gezielte, fokussierte Tumorthherapie.

In dieser Arbeit wurde die noch recht neue Methode des hydrodynamischen Gentransfers genutzt. Das Besondere der Methode ist, dass sie - einmal erlernt - zuverlässig, kostengünstig

und ohne aufwendige Zucht von Versuchstierstämmen das gewünschte Onkogen mittels Sleeping Beauty Transposase in der Mausleber exprimieren kann. Die Methode hat somit das Potenzial, bei reger Nutzung die Forschung auf dem Gebiet der Lebertumoren enorm zu voranzutreiben. Aufgrund der simplen Anwendung der Methode wird sie sicher auch für die allgemeine Untersuchung von Tumorsignalwegen Verwendung finden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit liefert ein Modell zur Erzeugung PI3K-mutierter Tumoren in der Mausleber, je nach Mutationsart mit unterschiedlichem onkogenen Potenzial. Bekannte und bisher unbekannte nachgeschaltete Ziele der PI3K konnten identifiziert werden. Diese können im Rahmen von künftigen Target Therapien von Bedeutung sein.

Die in diesem Versuch verwendete Methode des hydrodynamischen Gentransfers bietet eine zuverlässige Möglichkeit, ohne aufwendige Zucht von transgenen Mausstämmen, verschiedene (Onko)Gene in der Mausleber langfristig zu exprimieren und ihre Auswirkungen *in vivo* zu untersuchen.

In der allgemeinen Tumorforschung konnte bisher gezeigt werden, dass das Gen der katalytischen PI3K-Untereinheit p110 α (PIK3CA) in vielen Tumoren, einschließlich des hepatozellulären Karzinoms, mutiert oder überexprimiert ist. PIK3CA vermittelt über nachgeschaltete Ziele zelluläre Funktionen wie Proliferation, Überleben, Migration sowie Stoffwechselfunktionen. In dieser Forschungsarbeit wurde die onkogenen PIK3CA-Mutationen E545K und H1047R sowie ihre nachgeschalteten Ziele in der Hepatokarzinogenese untersucht. Zu diesem Zweck wurde PIK3CA-E545K/H1047R mittels hydrodynamischem Gentransfer in der Leber von 129/Sv-C57BL/6-Mäusen überexprimiert. Die Mäuse wurden nach verschiedenen Beobachtungszeiträumen ausführlich obduziert und das gewonnene Organmaterial makroskopisch, histologisch und elektronenmikroskopisch ausgewertet. Darüberhinaus kamen zur Identifizierung möglicher Ziele von PIK3CA-E545K in der Mausleber immunhistologische Methoden zum Einsatz, deren Ergebnisse durch Western Blots bestätigt werden konnten. Microarray-Analysen wurden zur Identifizierung weiterer Ziele für nachfolgende Experimente angeschlossen.

Die Mutation PIK3CA-E545K allein reichte aus, um bereits nach drei Monaten Präneoplasien und nach spätestens sechs Monaten zuverlässig hepatozelluläre Karzinome *in vivo* zu erzeugen. Auch für die Mutation PIK3CA-H1047R konnte ein onkogenes Potenzial für die Leber nachgewiesen werden, jedoch mit deutlich geringerer Aggressivität.

Verschiedene nachgeschaltete Ziele von PIK3CA-E545K konnten immunhistologisch und molekularpathologisch identifiziert werden, um diese in weiteren Experimenten auf ihre tumorogene Wirkung zu untersuchen. Diese Ergebnisse wurden durch die Microarray-Analysen bestätigt. Die Rolle der Lipidsynthese in Lebertumoren wurde in Zusammenhang mit den

molekularbiologischen Ergebnissen besonders herausgearbeitet. Zudem lieferten diese Analysen neue Ansätze für die Untersuchung möglicher weiterer Ziele von PIK3CA-E545K in der Mausleber.

Diese Arbeit liefert zudem ein Tumormodell, welches zur Untersuchung gezielter Therapiemethoden in PI3K/AKT-aktivierten Tumoren geeignet ist. Dies bietet einen guten Ansatz für die weitere Forschung zum Verständnis des hepatozellulären Karzinoms und der Entwicklung gezielter Therapiemethoden gegen diese tödliche Krankheit.

6. Anhang

Originalauswertung der Microarray-Analysen:

TargetID	Gene Symbol	Biological Process	Sets	<Fi> vs. <vv> (31:21)		
			/	Log ...	Q-V...	
NM_024437	Nudt7	acetyl-CoA catabolism, coenzyme A catabolism		↓	-1.5149	0.0184
NM_011314	Saa2	acute-phase response		↓	-2.1904	0.0000
AK011413	Mup1			↓	-1.7890	0.0000
NM_028341	2810439F02Rik			↓	-0.8266	0.0379
NM_175250	2810007J24Rik			↓	-0.8644	0.0461
NM_008648	Mup4	transport		↓	-2.2022	0.0001
NM_008768	Orm1	acute-phase response, transport		↓	-0.8007	0.0262
NM_011315	Saa3	acute-phase response		↓	-1.2131	0.0000
NM_009117	Saa1	acute-phase response		↓	-2.4405	0.0000
NM_013541	Gstp1	glutathione metabolism, metabolism		↓	-0.8842	0.0223
NM_144511	EG13909			↓	-0.9309	0.0223
TC1755975				↓	-1.1202	0.0025
NM_031188	Mup1			↓	-3.1259	0.0000
AF288221				↓	-0.9785	0.0116
NM_017399	Fabp1	transport		↓	-1.2255	0.0024
NAP112201-1				↓	-1.6050	0.0000
NAP102507-1				↓	-1.2968	0.0003
NM_009117	Saa1	acute-phase response		↓	-1.9029	0.0000
NM_011458	Serpina3k			↓	-0.9331	0.0461
BC037152	Mup1			↓	-1.7790	0.0000
AK031235	9430028L06Rik			↓	-1.2036	0.0147
NM_001081285	RP23-68L5.1			↓	-1.1277	0.0027
NM_008649	Mup5	transport		↓	-3.0745	0.0000
AK039091				↑	1.4833	0.0147
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport		↑	1.0572	0.0009
NM_008341	Igfbp1	regulation of cell growth		↑	0.9732	0.0253
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport		↑	0.7799	0.0355
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, transport		↑	0.7651	0.0147
NM_001039678	EG231903			↑	1.8028	0.0001
NM_032541	Hamp1	defense response to bacteria, defense resp...		↑	0.8932	0.0092
NM_007504	Atp2a1	calcium ion transport, ion transport, regulati...		↑	1.0346	0.0105

TargetID	Gene Symbol	Biological Process	Sets	<tumor> vs. <vv> (57:48)	
				/	Log R... Q-Value
NM_011314	Saa2	acute-phase response			-2.4964 0.0000
NM_008648	Mup4	transport			-2.0301 0.0000
AK013640	2900042K05Rik				-0.9894 0.0374
XM_979235	EG665756				-1.2301 0.0472
NM_011315	Saa3	acute-phase response			-1.1773 0.0002
NM_009117	Saa1	acute-phase response			-2.6656 0.0000
NM_031188	Mup1				-3.0793 0.0000
AF288221					-1.0029 0.0181
NM_130887	Papln				-1.0170 0.0472
NAP112201-1					-1.5207 0.0000
NM_009117	Saa1	acute-phase response			-2.7221 0.0000
BC037152	Mup1				-1.6699 0.0000
AK031235	9430028L06Rik				-1.3813 0.0020
NM_001081285	RP23-68L5.1				-1.1645 0.0058
NM_008649	Mup5	transport			-2.9371 0.0000
NM_001001980	3732412D22Rik				-0.9691 0.0426
BC067070	4932415G12Rik				-0.9042 0.0314
NM_028064	Slc39a4	transport, zinc ion homeostasis, zinc io...			0.7703 0.0406
NM_007475	Arbp				0.8513 0.0475
NM_007990	Fau	protein biosynthesis, protein modification			0.9637 0.0284
NM_007474	Aqp8	transport, water transport			0.9204 0.0223
NM_009690	Cd5l	apoptosis			0.9713 0.0058
NM_007438	Aldoa	glycolysis			0.7319 0.0472
NM_031170	Krt8	cytoskeleton organization and biogene...			0.7698 0.0420
NM_007980	Fabp2	transport			0.8226 0.0406
NM_007988	Fasn				0.9248 0.0123
ENSMUST0000008...	COX2				0.8998 0.0418
NM_009695	Apoc2	lipid catabolism, lipid metabolism, lipid t...			1.4048 0.0002
NM_011295	Rps12				1.0205 0.0072
NM_009076	Rpl12				0.9634 0.0367
NM_009080	Rpl26				0.7923 0.0406
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...			1.5790 0.0000
NM_009997	Cyp2a4	electron transport, transport			1.2571 0.0104
NM_007899	Ecm1	transport			0.9028 0.0343
NM_013465	Ahsg	ossification			0.9283 0.0284
NM_009673	Anxa5	blood coagulation			0.8266 0.0472
NM_008155	Gpi1	gluconeogenesis, glycolysis			0.8429 0.0326
NM_008341	Igfbp1	regulation of cell growth			1.5861 0.0001
NM_010359	Gstm3	metabolism			1.3661 0.0001
NM_010358	Gstm1	metabolism			1.2839 0.0011
NM_013913	Angptl3				0.7545 0.0406
NM_008143	Gnb2l1	intracellular signaling cascade, protein ...			0.8614 0.0475
NM_009450	Tubb2a	microtubule-based process			1.0431 0.0236
NM_027015	Rps27				0.9768 0.0239
M20632					0.8609 0.0447
M10466	Hba-a2				1.1188 0.0121
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...			1.1351 0.0017
NM_009373	Tgm2	G-protein signaling, coupled to IP3 sec...			0.8206 0.0241
NM_008220	Hbb-b1	hemopoiesis, oxygen transport, trans...			1.2468 0.0001
NM_008218	Hba-a1	oxygen transport, transport			1.0446 0.0465
NM_007954	Es1				0.8378 0.0382
NM_010358	Gstm1	metabolism			1.0452 0.0027
NM_145146	Afm	transport			0.8596 0.0407
NM_016844	Rps28				0.8246 0.0472
NM_032541	Hamp1	defense response to bacteria, defens...			1.2600 0.0001
NM_009127	Scd1	fatty acid biosynthesis, lipid biosynthesis			1.0332 0.0201
NM_009997	Cyp2a4	electron transport, transport			0.8405 0.0472

TargetID	Gene Sym...	Biological Process	Sets	treatment - <tumor> vs. <Fi> (5:5)	
				/	Log Ratio Q-Value
NM_001039678	EG231903				-2.2436 0.0016
NM_028064	Slc39a4	transport, zinc ion homeostasis, zinc ion transport			1.1142 0.0175
NM_007988	Fasn				1.2552 0.0075
NM_009695	Apoc2	lipid catabolism, lipid metabolism, lipid transport, transport			1.3075 0.0042
NM_017399	Fabp1	transport			1.3094 0.0028

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
BAD	Bcl-2 antagonist of cell death
bp	Basenpaare
CMV	Cytomegalievirus
CK19	Zytokeratin 19
Co-A	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
DH5 α	Escherichia coli-Stamm für Klonierung
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EF-1 α	Promotor des injizierten Plasmids
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
EV	Empty vector – „leeres Plasmid“, enthält kein Onkogen
FASN	Fettsäuresynthase
FOXO	Forkhead-Box-Protein O3
HA-Tag	Markierung des Plasmids
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGFBP1	Insulin-Wachstumsfaktor-bindende Protein 1
IR	inverted repeats
Ki67	Proliferationsmarker
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mTOR	mechanistic (früher: mammalian) Target of Rapamycin
p53	Protein 53, bekannter Tumorsuppressor
p110 α	katalytische Untereinheit der PI3K
PBS	Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PDK1	Phosphoinositid-abhängige Kinase 1
pERK	phosphorylierte extrazellulär regulierte Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	Gen der katalytischen PI3K-Untereinheit p110
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B / AKT
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RACK1	Rezeptor 1 für aktivierte Proteinkinase C
Raf	rapidly growing fibrosarcoma Protein, eine Proteinkinase
Ras	rat sarcoma Protein, ein G-Protein
RASSF1A	Mitglied 1A der RAS-assoziierte Domänenfamilie
rpm	round per minute – Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SB	Sleeping Beauty Transposon
SCD1	Stearyl-CoA-Desaturase 1
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGK3	Serum-Glucokortikoid-regulierte Kinase 3
SF1126	dualer PI3K/mTOR Inhibitor
Stat3	Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3
ZIP4	Zinktransportprotein 4

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2.1: DNA-Isolierung - Herstellung des Lysepuffers	9
Tabelle 2.2.2: PCR - Herstellung des Master Mix	11
Tabelle 2.2.3: PCR - Ablaufplan	11
Tabelle 2.2.4: Gelelektrophorese - Herstellung des Polyacrylamidgels	12
Tabelle 2.2.5: Gelelektrophorese - Ablauf der Silberfärbung	12
Tabelle 2.5.1: Klonierung - Geräte	15
Tabelle 2.5.2: Klonierung - Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 2.5.3: Restriktionsverdau - Restriktionsenzyme	17
Tabelle 2.5.4: Gelelektrophorese - Plasmidlösungen	17
Tabelle 2.6.1: Tiergruppen	18
Tabelle 2.7.1: Makropathologischer Zuschnitt - Organeinbettung	19
Tabelle 2.9.1: Immunhistochemie - verwendete Chemikalien	20
Tabelle 2.9.2: Immunhistochemie - Antikörper	21
Tabelle 2.10.1: Western Blot – Gewebeproben Leber	22
Tabelle 2.10.2: Western Blot - Geräte und Software	23
Tabelle 2.10.3: Western Blot - Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 2.10.4: Western Blot - Primärantikörper	25
Tabelle 2.10.5: Western Blot - Sekundärantikörper	25
Tabelle 3.1.1: Statistik - t-Test Lebergewichtsentwicklung: p-Werte	33
Tabelle 3.1.2: Statistik - t-Test Ratio Leber- zu Körpergewicht: p-Werte	35

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2.1: PI3K-Reaktion.	3
Abbildung 1.2.2: PI3K-Signalweg in der Zelle.....	4
Abbildung 1.3.1: Aufbau von p110 α	6
Abbildung 2.3.1: Hydrodynamischer Gentransfer.	13
Abbildung 2.4.1: Plasmidaufbau.....	15
Abbildung 3.2.1: Makroskopie der Lebertumoren.....	36
Abbildung 3.2.2: Makroskopie der Lebertumoren.....	36
Abbildung 3.2.3: Histologie der Präneoplasien und Tumoren.....	38
Abbildung 3.2.4: Immunhistologie eines Tumors (PIK3CA-E545K).	39
Abbildung 3.2.5: Lipidnachweis in einem Lebertumor.	39
Abbildung 3.2.6: Immunhistologie der Tumoren (PIK3CA-E545K).	40
Abbildung 3.2.7: Elektronenmikroskopie.	41
Abbildung 3.3.1: Ergebnis des Western Blot.....	42
Abbildung 3.3.2: sichtbar vergrößertes Abdomen E545K.....	43

10. Literaturverzeichnis

AMADDEO G, GUICHARD C, IMBEAUD S, ZUCMAN-ROSSI J: Next-generation sequencing identified new oncogenes and tumor suppressor genes in human hepatic tumors. *Oncology* 1:9, 1612-1613, 2012.

BACHMAN KE, ARGANI P, SAMUELS Y, SILLIMAN N, PTAK J, SZABO S, KONISHI H, KARAKAS B, BLAIR BG, LIN C, PETERS BA, VELCULESCU VE, PARK BH: The PIK3CA Gene is Mutated with High Frequency in Human Breast Cancers. *Cancer Biology & Therapy* 3:772-775, 2004.

BRUHN MA, PEARSON RB, HANNAN RD, SHEPPARD KE: AKT-independent PI3-K signaling in cancer – emerging role for SGK3. *Cancer Management and Research* 5:281-292, 2013.

BURT AD, PORTMANN BC, FERRELL LD: MacSween's Pathology of the Liver. 6. Auflage, Elsevier 2012.

CALVISI DF, WANG C, HO C, LADU S, LEE SA, MATTU S, DESTEFANIS G, DELOGU S, ZIMMERMANN A, ERICSSON J, BROZZETTI S, STANISCI A T, CHEN X, DOMBROWSKI F, EVERT M: Increased Lipogenesis, Induced by AKT-mTORC1-RPS6 Signaling Promotes Development of Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 140(3):1071-1083, 2011.

CALVISI DF, EVERT M, DOMBROWSKI F: Pathogenetic and Prognostic Significance of Inactivation of RASSF Proteins in Human Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Biology International* Volume 2012:849874, 2012.

CAMPBELL IG, RUSSELL SE, CHOONG DYH, MONTGOMERY KG, CIAVARELLA ML, HOI CSF, CRISTIANO BE, PEARSON RB, PHILLIPS WA: Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Research* 64:7678-7681, 2004.

CHE L, PILO MG, CIGLIANO A, LATTE G, SIMILEB MM, RIBBACK S, DOMBROWSKI F, EVERT M, CHEN X, CALVISI DF: Oncogene dependent requirement of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle* 19;16(6):499-507, 2017.

CHEN KW, OU TM, HSU CW, HORNG CT, LEE CC, TSAI YY, TSAI CC, LIOU YS, YANG CC, HSUEH CW, KUO WH: Current systemic treatment of hepatocellular carcinoma: A review of the literature. *World Journal of Hepatology* 7(10):1412-1420, 2015.

CURRIE E, SCHULZE A, ZECHNER R, WALTHER TC, FARESE RV: Fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metabolism* 18:153-61, 2013.

DAI R, CHEN R, LI H: Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 34:1749-1757, 2009.

EL-SERAG HB, RUDOLPH KL: Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 132:2557-2576, 2007.

EL-SERAG HB: Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 142:1264-1273, 2012.

ENGELMAN JA, CHEN L, TAN X, CROSBY K, GUIMARAES AR, UPADHYAY R, MAIRA M, MCNAMARA K, PERERA SA, SONG Y, CHIRIEAC LR, KAUR R, LIGHTBOWN A, SIMENDINGER J, LI T, PADERA RF, GARCÍA-ECHEVERRÍA C, WEISSELEDER R, MAHMOOD U, CANTLEY LC, WONG KK: Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nature Medicine* 14(12):1351-1356, 2008.

EVERT M, DOMBROWSKI F: Hepatozelluläre Karzinome in der nicht-zirrhotischen Leber. *Der Pathologe* 29(1):47-52, 2008.

FATTOVICH G, STROFFOLINI T, ZAGNI I, DONATO F: Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 127:S35-50, 2004.

FEITELSON MA, SUN B, TUFAN NLS, LIU J, PAN J, ZHAORUI L: Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 21:2593-2604, 2002.

HAN Y, CHEN M, WANG A, FAN X: STAT3-induced upregulation of lncRNA CASC11 promotes the cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by epigenetically silencing PTEN and activating PI3K/AKT signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508(2):472-479, 2019.

HAO Q, LI T, ZHANG X, GAO P, QIAO P, LI S, GENG Z: Expression and roles of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports* 32:2471-6, 2014.

HERS I, VINCENT EE, TAVARÉ JM: Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* 23:1515-1527, 2011.

HO C, WANG C, MATTU S, DESTEFANIS G, LADU S, DELOGU S, ARMBRUSTER J, FAN L, LEE SA, JIANG L, DOMBROWSKI F, EVERT M, CHEN X, CALVISI DF: AKT (v-AKT Murine Thynoma Viral Oncogene Homolog 1) and N-Ras (Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog) Coactivation in the Mouse Liver Promotes Rapid

Carcinogenesis by Way of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1), FOXM1 (Forkhead Box M1)/SKP2, and c-Myc Pathways. *Hepatology* 55(3):833-845, 2012.

IKENOUE T, KANAI F, HIKIBA Y, OBATA T, TANAKA Y, IMAMURA J, OHTA M, JAZAG A, GULENG B, TATEISHI K, ASAOKA Y, MATSUMARA M, KAWABE T, OMATA M: Functional Analysis of PIK3CA Gene Mutations in Human Colorectal Cancer. *Cancer Research* 65(11):4562-4567, 2005.

JANKU F, KASEB AO, TSIMBERIDOU AM, WOLFF RA, KURZROCK R: Identification of novel therapeutic targets in the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma using targeted next generation sequencing. *Oncotarget* 5(10):3012-3022, 2014.

JHUNJHUNWALA S, JIANG Z, STAWISKI EW, GNAD F, LIU J, MAYBA O, DU P, DIAO J, JOHNSON S, WONG KF, GAO Z, LI Y, WU TD, KAPADIA SB, MODRUSAN Z, FRENCH DM, LUK JM, SESHAGIRI S, ZHANG Z: Diverse models of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. *Genome Biology* 15:436, 2014.

KANG S, BADER AG, VOGT PK: Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(3):802-807, 2005.

KARAKAS B, BACHMANN KE, PARK BH: Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *British Journal of Cancer* 94:455-459, 2006.

KHWAIRAKPAM AD, SHYAMANANDA MS, SAILO BL, RATHNAKARAM SR, PADMAVATHI G, KOTOKY J, KUNNUMAKKARA AB. ATP citrate lyase (ACLY): a promising target for cancer prevention and treatment. *Current Drug Targets* 16:156-63, 2015.

Krebsdaten.de [Internet]. Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. Abgerufen am 10.06.2015, Verfügbar unter http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leberkrebs/leberkrebs_inhalt.html.

KUANG W, DENG Q, DENG C, LI W, SHU S, ZHOU M: Hepatocyte growth factor induces breast cancer cell invasion via the PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways to up-regulate the expression of COX2. *American Journal of Translational Research* 9(8):3816-3826, 2017.

LAI K, KILLINGSWORTH MC, LEE CS: Gene of the month: PIK3CA. *Journal of Clinical Pathology* 68:253-257, 2015.

LAMMING DW, SABATINI DM: A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metabolism* 18:465-9, 2013.

LEE JW, SOUNG YH, KIM SY, LEE HW, PARK WS, NAM SW, KIM SH, LEE JY, YOO NJ, LEE SH: PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 24:1477-1480, 2005.

LEVINE DA, BOGOMOLNIY F, YEE CJ, LASH A, BARAKAT RR, BORGES PI, BOYD J: Frequent Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancers. *Clinical Cancer Research* 11:2875-2878.

LI L, CHE L, WANG C, BLECHA JE, LI X, VANBROCKLIN HF, CALVISI DF, PUCHOWICZ M, CHEN X, SEO Y: [(11)C]acetate PET Imaging is not Always Associated with Increased Lipogenesis in Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Molecular Imaging and Biology* 18(3):360-367, 2016.

XIAOLEI LI, JUNYAN TAO, ANTONIO CIGLIANO, MARCELLA SINI, JULIEN CALDERARO, DANIEL AZOULAY, CHUNMEI WANG, YAN LIU, LIJIE JIANG, KATJA EVERT, MARIA I. DEMARTIS, SILVIA RIBBACK, KIRSTEN UTPATEL, FRANK DOMBROWSKI, MATTHIAS EVERT, DIEGO F. CALVISI, XIN CHEN: Co-activation of PIK3CA and Yap promotes development of hepatocellular and cholangiocellular tumors in mouse and human liver. *Oncotarget* 6(12): 10102–10115, 2015.

LI VSW, WONG CW, CHAN TL, CHAN ASW, ZHAO W, CHU KM, SO S, CHEN X, YUEN ST, LEUNG SY: Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer* 5:29, 2005.

LIU M, CHEN L, CHAN TH, WANG J, LI Y, LI Y, ZENG TT, YUAN YF, GUAN XY: Serum and glucocorticoid kinase 3 at 8q13.1 promotes cell proliferation and survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 55(6):1754-1765, 2012.

LLOVET JM, RICCI S, MAZZAFERRO V, HILGARD P, GANE E, BLANC JF, DE OLIVEIRA AC, SANTORO A, RAOUL JL, FORNER A, SCHWARTZ M, PORTA C, ZEUZEM S, BOLONDI L, GRETEN TF, GALLE PR, SEITZ JF, BORBATH I, HÄUSSINGER D, GIANNARIS T, SHAN M, MOSCOVICI M, VOLIOTIS D, BRUIX J, SHARP INVESTIGATORS STUDY GROUP: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine* 24:359(4):378-390, 2008.

MAUVOISIN D, ROCQUE G, ARFA O, RADENNE A, BOISSIER P, MOUNIER C: Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *Cell Communication and Signaling* 1(2):113-125, 2007.

MENENDEZ JA, LUPU R.: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* 7:763-77, 2007.

MORGAN TR, MANDAYAM S, JAMAL MM: Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127:S87-96, 2004.

NORDENSTEDT H, WHITE DL, EL-SERAG HB: The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 42S: S206-S214, 2010.

ONO H, SHIMANO H, KATAGIRI H, YAHAGI N, SAKODA H, ONISHI Y, ANAI M, OGIHARA T, FUJISHIRO M, VIANA AY, ET AL.: Hepatic Akt activation induces marked hypoglycemia, hepatomegaly, and hypertriglyceridemia with sterol regulatory element binding protein involvement. *Diabetes* 52:2905-13, 2003.

PARK J, LEONG MLL, BUSE P, MAIYAR AC, FIRESTONE GL, HEMMINGS BA: Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *The EMBO Journal* 18(11):3024-3033, 1999.

Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010, Gesundheitsberichterstattung des Bundes 9. Ausgabe, 2013.

ROHRIG F, SCHULZE A.: The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature Reviews Cancer* 16:732-49, 2016.

SAAL LH, HOLM K, MAURER M, MEMEO L, SU T, WANG X, YU JS, MALMSTRÖM PO, MANSUKHANI M, ENOKSSON J, HIBSHOOSH H, BORK Å, PARSONS R: PIK3CA Mutations Correlate with Hormone Receptors, Node Metastasis, and ERBB2, and Are Mutually Exclusive with PTEN Loss in Human Breast Carcinoma. *Cancer Research* 65:2554-2559, 2005.

SAHA SK, PARACHONIAK CA, GHANTA KS, FITAMANT J, ROSS KN, NAJEM MS, GURUMURTHY S, AKBAY EA, SIA D, CORNELLA H, MILTIADOUS O, WALESKY C, DESHPANDE V, ZHU AX, HEZEL AF, YEN KE, STRALEY KS, TRAVINS J, POPOVICI-MULLER J, GLISER C, FERRONE CR, APTE U, LLOVET JM, WONG KK, RAMASWAMY S, BARDEESY N: Mutant IDH inhibits HNF-4 α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature* 513(7516):110-4, 2014.

SAMUELS Y, WANG Z, BARDELLI A, SILLIMAN N, PTAK J, SZABO S, YAN H, GAZDAR A, POWELL SM, RIGGINS GJ, WILLSON JKV, MARKOWITZ S, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, VELCULESCU VE: High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers. *Science* 304:554, 2004.

SAMUELS Y, LUIS AD JR, SCHMIDT-KITTLER O, CUMMINS JM, DELONG L, CHEONG I, RAGO C, HUSO DL, LENGAUER C, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, VELCULESCU VE: Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7:561-573, 2005.

STILES B, WANG Y, STAHL A, BASSILIAN S, LEE WP, KIM YJ, SHERWIN R, DEVASKAR S, LESCHE R, MAGNUSON MA, et al.: Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101:2082-7, 2004.

SUDA T, LIU D: Hydrodynamic gene delivery: its principles and applications. *Molecular Therapy* 15(12):2063-2069, 2007.

TOKUNAGA E, OKI E, EGASHIRA A, SADANAGA N, MORITA M, KAKEJI Y, MAEHARA Y: Deregulation of the AKT Pathway in Human Cancer. *Current Cancer Drug Targets* 8:27-36, 2008.

TSCHAHARGANEH DF, XUE W, CALVISI DF, EVERT M, MICHURINA TV, DOW LE, BANITO A, KATZ SF, KASTENHUBER ER, WEISSMUELLER S, HUANG CH, LECHER A, ANDERSEN JB, CAPPER D, ZENDER L, LONGERICH T, ENIKOLOPOV G, LOWE SW: p53-dependent Nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. *Cell* 158(3):579-92, 2014.

UM TH, KIM H, OH BK, KIM MS, KIM KS, JUNG G, PARK YN: Aberrant CpG island hypermethylation in dysplastic nodules and early HCC of hepatitis B virus-related human multistep hepatocarcinogenesis. *Journal of Hepatology* 54:939-947, 2011.

VAN DER WEYDEN L, ADAMS DJ: The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1776:58-85, Elsevier 2007.

VAN DER WEYDEN L, TACHIBANA KK, GONZALEZ MA, ADAMS DJ, NG BL, PETTY R, VENKITARAMAN AR, ARENDS MJ, BRADLEY A: The RASSF1A isoform of RASSF1 promotes microtubule stability and suppresses tumorigenesis. *Molecular Cell Biology* 25(18):8356-8367, 2005.

VELHO S, OLIVEIRA C, FERREIRA A, FERREIRA AC, SURIANO G, SCHWARTZ S JR, DUVAL A, CARNEIRO F, MACHADO JC, HAMELIN R, SERUCA R: The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *European Journal of Cancer* 41:1649-1654, 2005.

WAGENER C, MÜLLER O: Molekulare Onkologie. 3. Auflage, Thieme 2010.

WANG C, CHE L, HU J, ZHANG S, JJANG L, LATTE G, DEMARTIS MI, TAO J, GUI B, PILO MG, RIBBACK S, DOMBROWSKI F, EVERT M, CALVISI DF, CHEN X: Activated mutant forms of PIK3CA cooperate with RasV12 or c-Met to induce liver tumour formation in mice via AKT2/mTORC1 cascade. *Liver international* 36(8):1176-86, 2016.

WANG C, CIGLIANO A, DELOGU S, ARMBRUSTER J, DOMBROWSKI F, EVERT M, CHEN X, CALVISI DF: Functional crosstalk between AKT/mTOR and Ras/MAPK pathways in hepatocarcinogenesis: implications for the treatment of human liver cancer. *Cell Cycle* 12(13):1999-2010, 2013.

WU G, XING M, MAMBO E, HUANG X, LIU J, GUO Z, CHATTERJEE A, GOLDENBERG D, GOLLIN SM, SUKUMAR S, TRINK B, SIDRANSKY D: Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Research* 7:R609-R616, 2005.

WU J, MENG J, DU Y, HUANG Y, JIN Y, ZHANG J, WANG B, ZHANG Y, SUN M, TANG J: RACK1 promotes the proliferation, migration and invasion capacity of mouse hepatocellular carcinoma cell line in vitro probably by PI3K/Rac1 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 67(4):313-319, 2013.

YANG J, NIE J, MA X, WEI Y, PENG Y, WEI X: Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular Cancer* 18(1):26, 2019.

YU MC, YUAN JM: Environmental factors and risk for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 237:S72-S78, 2004.

ZHANG G, BUDKER V, WOLFF JA: High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injection of naked plasmid DNA. *Human Gene Therapy* 10(10):1735-1737, 1999.

ZHU X, QIN X, FEI M, HOU W, GRESHOCK J, BACHMAN KE, WOOSTER R, KANG J, QIN CY: Combined phosphatase and tensin homolog (PTEN) loss and fatty acid synthase (FAS) overexpression worsens the prognosis of Chinese patients with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Science* 13:9980-91, 2012.

11. Publikationen

ANNWEILER K, EVERT K, UTPATEL K, CIGLIANO A, SINI M, LATTE G, FRAU M, PASCALE RM, DOMBROWSKI F, CALVISI DF, EVERT M: The E545K mutant form of the p110alpha catalytic subunit of phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA) is oncogenic in the mouse liver.

99. *Annual Conference of the German Association of Pathology*, 28.-31.05.2015 in Frankfurt (speech); Abstract: *Der Pathologe* May 2015, Volume 36, Supplement 1

ANNWEILER K, EVERT K, CIGLIANO A, SINI M, LATTE G, FRAU M, PASCALE RM, DOMBROWSKI F, CALVISI DF, EVERT M, UTPATEL K: Different oncogenic potential in the mouse liver of mutant forms of the p110alpha catalytic subunit of phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA).

32. *Annual Conference of the German Association of the Study of the Liver (GASL)*, 22.-23.01.2016 in Düsseldorf (poster); Abstract: *German Journal of Gastroenterology* 12/2015

RIBBACK S, EVERT K, UTPATEL K, ANNWEILER K, CALVISI DF, EVERT M, DOMBROWSKI F: Early ultrastructural hepatocellular alterations after hydrodynamic tail vein injection.

32. *Annual Conference of the German Association of the Study of the Liver (GASL)*, 22.-23.01.2016 in Düsseldorf (poster); Abstract: *German Journal of Gastroenterology* 12/2015

S. RIBBACK, K. EVERT, K. UTPATEL, K. ANNWEILER, D. CALVISI, M. EVERT, F. DOMBROWSKI: Early ultrastructural findings in hepatocytes after hydrodynamic tail vein injections in mice.

100. *Annual Conference of the German Association of Pathology*, 19.-21.05.2016 in Berlin (poster); Abstract: *Der Pathologe* May 2016, Volume 37, Supplement 1

12. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

19.12.2019

Katharina Viktoria Annweiler

13. Lebenslauf

14. Danksagung

Folgenden Personen und Institutionen gilt mein Dank:

Prof. Dr. med. Frank Dombrowski für die unkomplizierte Betreuung als Doktorvater

Dr. med. Kirsten Utpatel für die engagierte inhaltliche Betreuung

Dr. rer. nat. Michele Peters für die hilfreiche wissenschaftliche Unterstützung

Dr. rer. nat. Marcus Vollmer für die Beratung im Bereich der Statistik

Dr. rer. nat. Benedikt Annweiler für die mathematische Unterstützung

Tilo Prüter, M.A. für die unermüdliche Motivation und strukturellen Hinweise

Institut für Pathologie der Universität Greifswald für die Unterstützung bei der Durchführung des Experimentes