

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Genetik

Untersuchung von Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzmechanismen  
in humanen Brustkrebszelllinien

Jacqueline Nickisch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K. H. Schneitz

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

2. Hon.-Prof. Dr. A. Ullrich

(Eberhard-Karls-Universität Tübingen)

Die Dissertation wurde am 26.03.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.07.2009 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die EGFR-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Struktur der HER-Rezeptoren.....	2
1.1.2 Die HER-Signaltransduktion.....	4
1.1.3 Signalintegration.....	6
1.1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, HER1, ErbB1).....	6
1.1.5 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2, ErbB2/neu).....	7
1.1.6 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (HER3, ErbB3).....	9
1.1.7 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 4 (HER4, ErbB4).....	9
1.1.8 Das HER2/HER3 Heterodimer.....	10
<b>1.2 Möglichkeiten der Therapie von HER-Rezeptor-assoziierten Tumoren .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Der therapeutische Antikörper Herceptin® (Trastuzumab) .....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Methoden zur Bestimmung des HER2-Status .....	13
1.3.2 Die Entwicklungsgeschichte von Herceptin® .....	14
1.3.3 Zentrale Studien zur Wirksamkeit von Herceptin® .....	14
1.3.4 Wirkungsmechanismen von Herceptin® .....	20
1.3.5 Mögliche Ursachen für die Entstehung von Herceptin®-Resistenzen .....	22
<b>2. AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALIEN.....</b>	<b>24</b>
3.1 Chemikalien .....	24
3.2 Enzyme .....	24
3.3 Radiochemikalien .....	24
3.4 „Kits“ und andere Materialien .....	25
3.5 Wachstumsfaktoren und Liganden .....	25
3.6 Medien .....	25
3.7 Zellkulturmedien und Additive.....	26
3.8 Stammlösungen für Puffer .....	26
3.9 Bakterienstämme.....	28
3.10 Zelllinien .....	28
3.11 Primäre Antikörper .....	29
3.12 Sekundäre Antikörper .....	29

<b>3.13 Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	<b>29</b>
3.13.1 Primäre Vektoren.....	29
3.13.2 Konstrukte .....	29
<b>3.14 Oligonukleotide</b> .....	<b>30</b>
3.14.1 TaqMan <sup>®</sup> Sonden und Primer ( <i>Applied Biosystems</i> ) .....	30
3.14.2 siRNA <i>silencer</i> (Ambion, <i>Applied Biosystems</i> ).....	30
3.14.3 Kontroll-siRNA (GL2, <i>Dharmacon</i> ).....	30
3.14.4 siRNA <i>silencer select</i> (Ambion, <i>Applied Biosystems</i> ) .....	31
<b>3.15 Software</b> .....	<b>31</b>
<b>4. METHODEN</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
4.1.1 Arbeiten mit DNA.....	32
4.1.2 Makro-Array-Analyse.....	33
4.1.3 Quantitative Real-Time-PCR.....	37
<b>4.2 Methoden der Zellkultur (Säugetierzellen)</b> .....	<b>39</b>
4.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	39
4.2.2 Mykoplasmentest.....	39
4.2.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien .....	39
4.2.4 Calcium-Phosphat-Transfektion .....	40
4.2.5 Retroviraler Gentransfer in humane Brustkrebszellen (Pear et al., 1993) .....	40
4.2.6 siRNA-Transfektion .....	41
4.2.7 Analyse des Zellzyklus durch Propidiumiodid-Färbung .....	41
4.2.8 Indirekte Durchflusszytometrie zur Zelloberflächenfärbung .....	42
4.2.9 Proliferations-Assay (MTT-Färbung) .....	43
<b>4.3 Protein-analytische Methoden</b> .....	<b>44</b>
4.3.1 Stimulation und Zellyse mit Triton X-100.....	44
4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellysaten .....	44
4.3.3 Immunpräzipitation von Proteinen.....	45
4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
4.3.5 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen .....	46
4.3.6 Vertikaler Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran.....	46
4.3.7 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran .....	46
4.3.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse) .....	46
4.3.9 Aufreinigung des murinen monoklonalen Antikörpers 4D5 .....	47

<b>5. ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1 Untersuchungen zur natürlichen Herceptin®-Resistenz</b> .....	<b>49</b>
5.1.1 Bestimmung der Herceptin®-Sensitivität von 18 humanen Brustkrebszelllinien .....	49
5.1.2 Die Herceptin®-Sensitivität korreliert mit der <i>HER2</i> -Genexpression der untersuchten Brustkrebszelllinien.....	51
5.1.3 Identifizierung resistenzassoziierter Gene mit Hilfe einer vergleichenden Analyse der Genexpression .....	52
<b>5.2 Untersuchungen zur erworbenen Herceptin®-Resistenz</b> .....	<b>60</b>
5.2.1 Herstellung von 4D5-resistenten Zelllinien.....	60
5.2.2 Charakterisierung der Herceptin®-insensitiven Klone .....	64
5.2.3 Vergleichende Analyse der Genexpression .....	66
<b>5.3 Vergleich der natürlichen und erworbenen Resistenz-Untersuchung</b> .....	<b>73</b>
5.3.1 Validierung der im Makro-Array ermittelten Expressions-Steigerungsraten .....	75
5.3.2 Der Knockdown der drei Kinasen TGFBR2, PRKCA und CAMK1D bewirkt eine partielle Re-Sensitivierung der Herceptin®-insensitiven Klone .....	76
<b>5.4 Einfluss der IGF-1R und HER3-Rezeptor-Expression auf die 4D5/Herceptin®- Sensitivität von humanen Brustkrebszelllinien</b> .....	<b>79</b>
5.4.1 Abhängigkeit der Herceptin®-Sensitivität von der <i>HER3</i> -Genexpression .....	79
5.4.2 Auswirkungen einer Steigerung der IGF-1R-Expression auf die 4D5- Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien .....	83
5.4.3 Auswirkungen einer Verminderung der IGF-1R-Expression auf die 4D5-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien .....	86
<b>6. DISKUSSION</b> .....	<b>89</b>
<b>6.1 Untersuchungen zur natürlichen Herceptin®-Resistenz</b> .....	<b>89</b>
<b>6.2 Untersuchungen zur erworbenen Herceptin®-Resistenz</b> .....	<b>92</b>
<b>6.3 Der Einfluss des IGF-1-Rezeptors</b> .....	<b>93</b>
<b>6.4 Der Einfluss des HER3-Rezeptors</b> .....	<b>95</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>97</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>98</b>
<b>9. REFERENZEN</b> .....	<b>100</b>

## 1. Einleitung

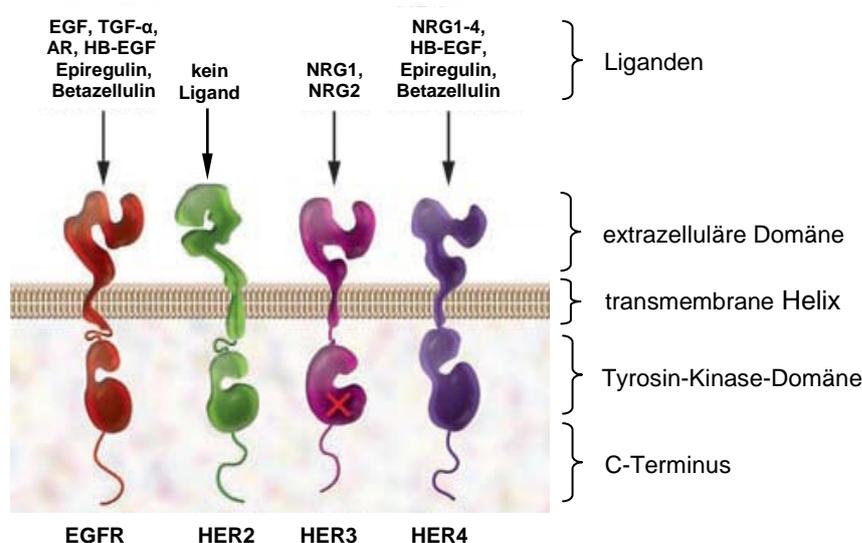
Für das Überleben eines vielzelligen Organismus ist es von entscheidender Bedeutung, dass seine Zellen auf die sie umgebenden Umweltbedingungen reagieren und untereinander kommunizieren können. Dabei werden extrazelluläre Signale aufgenommen, prozessiert und in physiologische Antworten umgewandelt. Zu diesen zählen elementare Prozesse wie die Zellproliferation, -differenzierung, -migration, -adhäsion oder -apoptose. Eine zentrale Bedeutung bei der Signalübertragung extrazellulärer Stimuli spielen die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs).

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind transmembrane Rezeptoren, die sich aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer hydrophoben, transmembranen Helix und einer zytoplasmatischen Proteinkinasedomäne zusammensetzen. Man unterscheidet etwa 58 verschiedene RTKs, die sich in 20 Subfamilien aufteilen (Manning et al., 2002).

Nach der Stimulierung durch einen spezifischen Liganden aktivieren die RTKs intrazelluläre Signalmoleküle. Infolge der weiteren Signaltransduktion werden Transkriptionsfaktoren induziert, die dann im Zellkern die Genexpression regulieren. Für eine normale physiologische Funktion ist es von großer Bedeutung, dass die Signalwege der RTKs durch positive und negative Regulatoren genau überwacht werden. Fehlregulierte oder konstitutiv aktive Signalwege können schwere Erkrankungen wie Diabetes oder Krebs auslösen.

### 1.1 Die EGFR-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen

Zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Abb.1) gehören vier eng verwandte Rezeptor-Tyrosinkinasen: EGFR (HER1, ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) (Ullrich and Schlessinger, 1990; Yarden and Sliwkowski, 2001). Sie werden in allen Epithelien und zahlreichen mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert. Die Expression und Aktivität dieser Rezeptorfamilie spielt aber auch eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren.

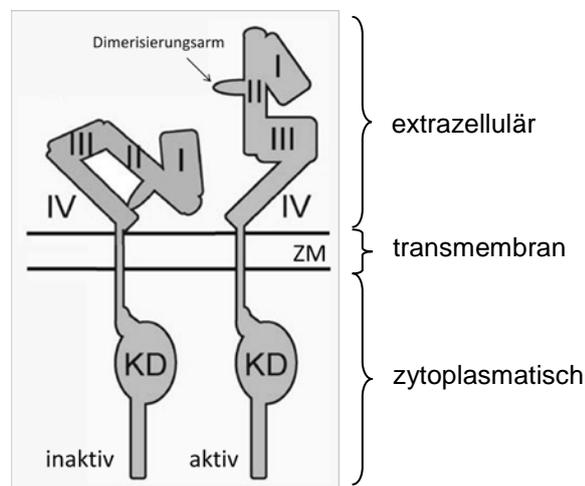


**Abbildung 1: Die Familie der EGFR-Tyrosin-Kinasen** setzt sich aus zwei autonomen (EGFR, HER4) und zwei nicht autonomen Rezeptoren (HER2, HER3) zusammen. Während HER2 keinen Liganden bindet, hat HER3 nur eine schwache Tyrosinkinaseaktivität. Beide Rezeptoren sind daher auf die Bildung von funktionellen Heterodimeren angewiesen. (Zhang et al., 2007)

### 1.1.1 Die Struktur der HER-Rezeptoren

Die vier HER-Rezeptoren setzen sich jeweils aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Helix, einer zytoplasmatischen Kinase-Domäne und einem C-Terminus, an dem sich die Tyrosin-Autophosphorylierungsstellen und somit auch die Bindungsstellen für die Effektor-Moleküle befinden, zusammen (Abb.1) (Citri and Yarden, 2006; Downward et al., 1984a; Riedel et al., 1987).

Die extrazelluläre Region besteht aus vier Subdomänen (Abb.2), wobei die leucinreichen Subdomänen I und III für die Bindung des Liganden und die cysteinreichen Subdomänen II und IV für die Dimerisierung verantwortlich sind (Ogiso et al., 2002).

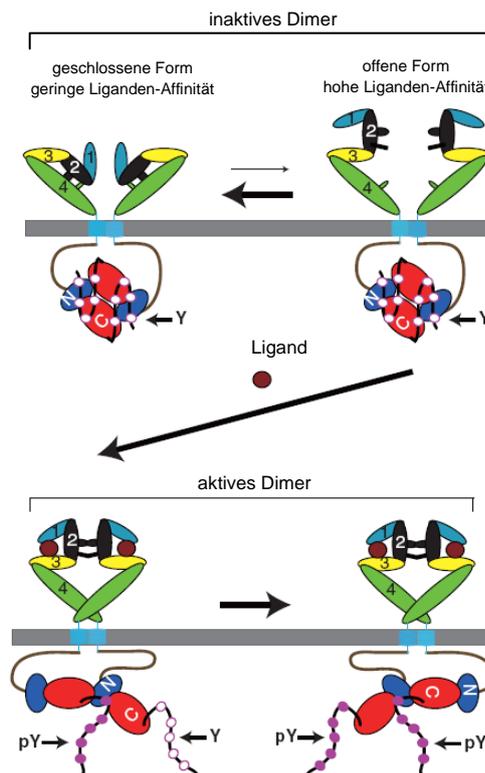


**Abbildung 2: Domänenstruktur der HER-Rezeptoren in der aktiven und inaktiven Konformation des Rezeptors**  
nach Badache und Goncalves, 2006 (ZM: Zellmembran; KD: Kinase-Domäne)

Man unterscheidet zwei verschiedene Konformationen, die entweder zur Aktivierung oder Inaktivierung des Rezeptors beitragen (Abb.2). Ist kein Ligand gebunden, befinden sich die extrazellulären Domänen des EGFR, HER3 und HER4-Rezeptors in einer sogenannten geschlossenen, inaktiven Konformation. Dabei ist der Dimerisierungsarm der Subdomäne II durch eine Interaktion mit der Subdomäne IV verdeckt. Außerdem sind in diesem Zustand die beiden Liganden-Bindungsdomänen I und III weit voneinander getrennt (Cho and Leahy, 2002; Ferguson, 2004).

Nach der Bindung eines Liganden gehen die Rezeptoren in eine offene Konformation über, in welcher der Dimerisierungsarm von der Domäne II für die Bildung von Rezeptor-Dimeren zur Verfügung steht (Dawson et al., 2005).

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die HER-Rezeptoren bereits vor der Bindung eines Liganden als inaktive Homo- oder Heterodimere auf der Zelloberfläche vorliegen (Clayton et al., 2005; Martin-Fernandez et al., 2002; Yu et al., 2002). Je nachdem, ob die Dimere in der geschlossenen oder offenen Form vorliegen, besitzen sie eine geringe oder hohe Affinität für ihre Liganden (Abb.3). Somit ist die offene Konformation weiterhin notwendig für eine Aktivierung der Rezeptoren. Die Bindung des Liganden induziert dann eine Rotation in der transmembranen Domäne, die für die Aktivierung der Kinasedomäne notwendig ist (Moriki et al., 2001).

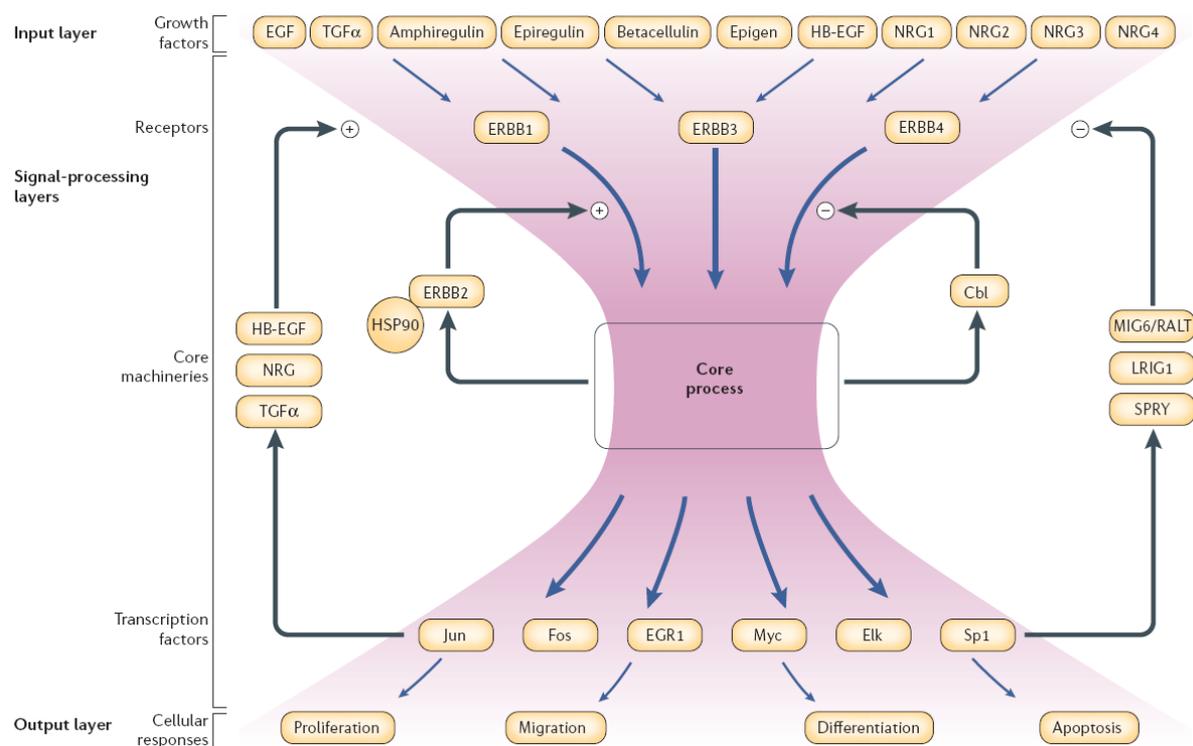


**Abbildung 3: Modell zur Aktivierung der vorgeformten HER-Rezeptor-Dimere durch einen Liganden** (Tao and Maruyama, 2008) - Oben: Die vorgeformten inaktiven Dimere liegen entweder in einer geschlossenen Form (mit geringer Ligandenaffinität) oder in einer offenen Form (mit hoher Ligandenaffinität) vor. Unten: Die Liganden-aktivierten Dimere sind zusätzlich über die Dimerisierungsarme verbunden. Eine Rotation in der transmembranen Domäne bildet die Grundlage für Konformationsänderungen in der intrazellulären Domäne und somit für die Phosphorylierung der Tyrosinreste (Y= nicht phosphoryliertes Tyrosin, PY= phosphoryliertes Tyrosin).

Im Gegensatz zu den anderen HER-Rezeptoren liegt HER2 ausschließlich in der offenen, aktiven Konformation vor. Dies erklärt auch seine besondere Rolle innerhalb der HER-Familie. Die starken Interaktionen zwischen den Subdomänen I und III bewirken, dass der Dimerisierungsarm ständig frei zugänglich ist, verhindern aber gleichzeitig die Bindung eines Liganden (Garrett et al., 2003). Somit steht HER2 ständig für die Bildung von Heterodimeren mit anderen HER-Rezeptoren zur Verfügung (Graus-Porta et al., 1997).

### 1.1.2 Die HER-Signaltransduktion

Auf den ersten Blick folgt die Signaltransduktion der HER-Rezeptoren einem einfachen Wachstumsfaktor-Signalweg. Die monomeren Rezeptoren lagern sich nach der Bindung eines Liganden zu Dimeren zusammen, was eine Aktivierung der zytoplasmatischen Kinasedomäne zur Folge hat und schließlich zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten führt. Diese dienen dann als Bindungsstellen für eine Vielzahl von Adaptorproteinen, die den Beginn einer intrazellulären Signalkaskade darstellen, an deren Ende eine physiologische Antwort steht. In den höheren Eukaryoten hat sich dieser einfache Signalweg jedoch zu einem vielschichtigen, interaktiven Netzwerk entwickelt (Abb.4).



**Abbildung 4: Das HER-Signalnetzwerk (Citri and Yarden, 2006)** - Das HER-Signalnetzwerk setzt sich aus drei Ebenen zusammen, in denen die Signale empfangen (Input) und prozessiert werden, um dann eine spezifische zelluläre Antwort (Output) zu induzieren. Die Kontrolle des Systems erfolgt über mehrere positive (+) und negative (-) Rückkopplungsschleifen.

In der ersten Ebene des Signalnetzwerkes, die sich aus elf verschiedenen Liganden und den vier HER-Rezeptoren zusammensetzt, werden die Signale empfangen. Alle HER-spezifischen Liganden besitzen eine EGF-ähnliche Domäne und drei intramolekulare Schleifen, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Die löslichen Liganden entstehen durch proteolytische Spaltung aus transmembranen Vorläufern (Massague and Pandiella, 1993). Ein Teil der Liganden bindet an mehrere HER-Rezeptoren, während die übrigen Liganden nur einen spezifischen Rezeptor aktivieren (Jones et al., 1999). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Aufteilung der HER-Liganden in drei Gruppen mit unterschiedlicher Rezeptor-Spezifität.

**Tabelle 1: Klassifizierung der HER-Liganden (nach Olayioye, 2000)**

<u>Gruppe 1</u>	<u>Gruppe 2</u>	<u>Gruppe 3 (Neureguline)</u>	
EGFR	EGFR und HER4	HER3 und HER4	HER4
EGF	Betazellulin	NRG-1	NRG-3
TGF $\alpha$	HB-EGF	NRG-2	NRG-4
Amphiregulin	Epiregulin		
Epigen			

Die Dimerisierung der HER-Rezeptoren leitet die zweite Phase der Signaltransduktion ein, in der die Prozessierung der Signale stattfindet. Sowohl der Ligand, als auch die Zusammensetzung der Rezeptordimere bestimmen darüber, welche Tyrosinreste in Folge der Aktivierung der Tyrosin-Kinase-Domäne im C-Terminus autophosphoryliert werden (Olayioye et al., 1998). Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen dann als Bindungsstellen für Signalmoleküle, die SH2 und PTB-Domänen enthalten (Jorissen et al., 2003). Dazu gehören Adaptoren (Shc, Grb2, p85), Enzyme (wie z.B. die Tyrosin-Phosphatase SHP-2/PTP-2c) oder Transkriptionsfaktoren (STAT5) (Hynes and Lane, 2005). Über die Signalmoleküle kann dann sowohl der MAP-Kinase-Signalweg, als auch der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert werden.

Am Ende der Signalkaskade regulieren die aktivierten Transkriptionsfaktoren (u.a. c-jun, c-fos, c-myc, NF-kB und STATs) die Genexpression. Auf diese Weise wird eine Reihe von physiologischen Prozessen reguliert, wie z.B. die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion und Migration. Welchen Effekt ein Signal bewirkt, kann auch durch die Kinetik der Signalwege bestimmt werden (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Positive Rückkopplungsschleifen können die eingehenden Signale weiter verstärken und eine längere Aktivierung der Signalwege bewirken. Ein wichtiger positiver Regulator ist der HER2-Rezeptor, da er den negativen Regulationsmechanismen entgehen kann (Baulida et al., 1996). Aber auch die autokrine und parakrine Produktion von EGF-Liganden (TGF $\alpha$  und HB-EGF), die durch die Aktivierung der Rezeptoren ausgelöst wird, trägt zur Signalverstärkung bei (Citri and Yarden, 2006).

Die negative Kontrolle des Netzwerkes erfolgt entweder auf der Ebene des Liganden-Rezeptor-Komplexes oder als Signalweg-spezifische Inaktivierung. Einige Negativregulatoren sind ständig präsent und kontrollieren vorwiegend die Dephosphorylierung und den Abbau der Rezeptoren. Andere werden erst nach der Stimulierung des Rezeptors hergestellt. Beispiele für diese Klasse von Negativregulatoren sind SPRY (Hanafusa et al., 2002), LRIG1 (Laederich et al., 2004) oder Mig-6 (Hackel et al., 2001).

### 1.1.3 Signalintegration

HER-Rezeptoren sind ein klassisches Beispiel für Signal-Integratoren, da sie auch Signale von Rezeptoren anderer Klassen empfangen können.

Die Mitglieder der Zytokin-Rezeptor-Familie, wie z.B. der Prolaktinrezeptor, bewirken eine direkte Phosphorylierung der HER-Rezeptoren. Da sie selbst keine Kinaseaktivität besitzen, schließen sie sich für die Signaltransduktion mit Janus-Tyrosin-Kinasen zusammen, um direkt die Kinasedomäne von HER1 oder HER2 zu phosphorylieren (Yamauchi et al., 2000). Ein weiteres Beispiel ist die Phosphorylierung des EGFR durch die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src (Biscardi et al., 1999).

Eine Transaktivierung der HER-Rezeptoren kann auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) erfolgen. Dieser Mechanismus wurde bereits intensiv am Beispiel des EGFR studiert (Daub et al., 1996; Gschwind et al., 2002; Schafer et al., 2004). Da das Signal hierbei dreimal die Zellmembran durchquert, wird dieser Prozess auch als TMP-S-Mechanismus (*triple membrane-passing signal*) bezeichnet. Dabei führt eine Stimulierung des GPCR durch Agonisten wie LPA oder Thrombin zu einer Aktivierung von Metalloproteinasen, die durch proteolytische Spaltung aus membrangebundenen Vorläufern reife EGF-Liganden freisetzen, die dann wiederum den EGFR aktivieren (Prenzel et al., 1999).

### 1.1.4 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, HER1, ErbB1)

Auf der Suche nach dem Rezeptor des mitogenen Wachstumsfaktors EGF, gelang es 1984 einer Gruppe von Forschern um Axel Ullrich erstmalig die cDNA-Sequenz des humanen EGFR zu klonieren (Ullrich et al., 1984). Bei einem Vergleich der EGFR-Sequenz mit bereits bekannten Proteinsequenzen stellte sich dann heraus, dass diese eine große Ähnlichkeit mit dem tumorinduzierenden vErbB-Onkogen hat (Downward et al., 1984b), welches ein Jahr zuvor aus einem Hühner-Erythroblastosevirus (AEV) isoliert werden konnte (Yamamoto et al., 1983). Damit konnte zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen einem krebsinduzierenden Onkogen und einem menschlichen Wachstumsfaktor-Rezeptor hergestellt werden.

Die Signale des EGFR aktivieren vor allem den MAPK-Signalweg. Dabei wird das Signal über die an den phosphorylierten Tyrosinresten gebundenen Adapterproteine Grb2 (*growth-factor-receptor bound-2*) oder Shc (*Src-homology-2-containing*) an den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*) weitergeleitet. Dieser aktiviert daraufhin die Raf-1-Kinase (Citri and Yarden, 2006). Von dort gelangt das Signal schließlich über MEK1/2 zur extrazellulär-regulierten Kinase (ERK). Da der EGFR keine PI3K-Bindungsstellen besitzt, kann die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nur indirekt über die kleine GTPase Ras erfolgen. Ein weiteres direktes Substrat des EGFR ist der Transkriptionsfaktor STAT5 (Schulze et al., 2005), welcher die Signale über den sogenannten JAK/STAT-Signalweg weiterleitet (Citri and Yarden, 2006).

Der C-Terminus des EGFR enthält außerdem eine Erkennungsstelle für die E3 Ubiquitin-Ligase c-Cbl, die zur Internalisierung und Degradierung des EGFR beiträgt (Levkowitz et al., 1999). Dabei bindet c-Cbl an den phosphorylierten Tyr1045-Rest des EGFR und bewirkt gemeinsam mit seinen Partnerproteinen (u.a. Grb2 und CIN85) eine Ubiquitinierung des Rezeptors.

Der EGFR spielt in mehreren Organen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Epithelzellen. In Abhängigkeit von ihrem genetischen Hintergrund sterben EGFR-Knockout-Mäuse daher bereits während der Embryogenese (SV129-Stamm), bei der Geburt (C57BL/6 Stamm) oder kurz nach der Geburt (CD1, C3H und MF1-Stamm) (Miettinen et al., 1995; Sibilias and Wagner, 1995; Threadgill et al., 1995).

Die konstitutive Aktivierung des EGFR durch Genamplifikation oder aktivierende Mutationen in der Kinasedomäne kann jedoch zur Entstehung von Tumoren beitragen. Derartige Mutationen wurden unter anderem in Lungentumoren (Garcia de Palazzo et al., 1993) und Glioblastomen (Ekstrand et al., 1992) identifiziert. EGFR-Amplifikationen konnten unter anderem in Kopf/Hals-, Eierstock-, Blasen-, Gebärmutterhals-, Brust-, Speiseröhren- oder Bauchspeicheldrüsentumoren nachgewiesen werden (Nicholson et al., 2001).

#### 1.1.5 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2, ErbB2/neu)

Ein Jahr nach der Entdeckung des EGFR, fand man eine weitere vermeintliche RTK, die sich durch eine große Homologie mit dem humanen EGFR auszeichnete und daher auch als HER2 (human EGFR related 2) bezeichnet wurde (Coussens et al., 1985). Interessanterweise stellte sich heraus, dass HER2 auf dem gleichen Chromosom lokalisiert ist, wie das Ratten-Onkogen „*neu*“, welches ein Jahr zuvor isoliert werden konnte (Schechter et al., 1984).

Zwei Jahre später konnte dann gezeigt werden, dass HER2 auch eine wichtige Rolle bei der humanen Tumorprogression spielt. In einer großangelegten Studie stellte sich heraus, dass das HER2-Gen in ca. 30% aller invasiven Brusttumore amplifiziert ist und dass diese HER2-Überexpression mit einer kürzeren Überlebens- und Rückfallzeit korreliert (Slamon et al., 1987).

HER2-Knockout-Mäuse sind aufgrund einer unvollständigen Trabekularisierung des Herzens nicht lebensfähig und sterben noch vor der Geburt (Lee et al., 1995). Um die Funktion von HER2 im Detail zu untersuchen, wurden daher gewebespezifische Knockout-Mausmodelle und transgene Mäuse mit dominant-negativem HER2-Rezeptor entwickelt. In diesen Modellen zeigte sich, dass HER2 an der Differenzierung von Oligodendrozyten, der Bildung der Myelinschicht im zentralen und peripheren Nervensystem (Garratt et al., 2003; Park et al., 2001), der Etablierung der radialen Glia im zerebralen Kortex (Schmid et al., 2003), der Versorgung von Muskelspindeln (Andrechek et al., 2002) und der Bildung von Milchgängen in der Brust (Jackson-Fisher et al., 2004) beteiligt ist.

Bisher wurde noch kein Ligand gefunden, der mit hoher Affinität an HER2-Homodimere bindet. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Struktur des Rezeptors, die einen freien Zugang der Liganden zur Liganden-Bindungsdomäne verhindert (Garrett et al., 2003). Diese strukturellen Besonderheiten sorgen jedoch auch dafür, dass HER2 von allen anderen HER-Rezeptoren als Heterodimer-Partner bevorzugt wird (Graus-Porta et al., 1997). HER2-Heterodimere haben eine höhere Affinität gegenüber ihren Liganden (Sliwkowski et al., 1994), sind stabiler und werden effizienter regeneriert (Lenferink et al., 1998). HER2 bindet außerdem deutlich mehr Signalmoleküle, als die anderen HER-Rezeptoren (Jones et al., 1999).

Präklinische Studien zeigten, dass HER2 eine direkte Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen spielt. So zeichnen sich HER2-überexprimierende NIH/3T3-Zellen nicht nur durch eine erhöhte DNA-Synthese- und Zellteilungsrate, sondern auch durch ein erhöhtes onkogenes Potential aus. Dieses äußert sich darin, dass Nacktmäuse in Folge einer Injektion von HER2-positiven-NIH/3T3-Zellen vermehrt Tumore und Metastasen ausbilden (Hudziak et al., 1987).

Auf der anderen Seite führt ein Knockdown des *HER2*-Gens in HER2-überexprimierenden Tumorzellen zum apoptotischen Zelltod (Roh et al., 2000). Auch in Mausmodellen bewirkt ein Entzug des Neu-Onkogens eine vollständige Rückbildung der zuvor gebildeten Brusttumore und assoziierten Metastasen (Moody et al., 2002).

Normale Epithelzellen haben zwei Kopien des *HER2*-Gens und exprimieren zwischen 20.000 und 50.000 HER2-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (Stern et al., 1986). Durch Genamplifikation kann die Rezeptordichte auf bis zu 2 Millionen Rezeptoren pro Zelle gesteigert werden (Venter et al., 1987). Diese HER2-Überexpression konnte bereits in vielen Krebsformen nachgewiesen werden, zu denen neben Brusttumoren auch Ovarial-, Magen- und Blasen Tumore gehören (Lemoine et al., 1991; Sauter et al., 1993; Slamon et al., 1989). Die HER2-Überexpression ist mit einer schlechten Prognose, einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer relativen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und endokrinen Therapien verbunden (Muss et al., 1994). Aktivierende HER2-Mutationen wurden bisher nur in Lungentumoren gefunden, sind jedoch wesentlich seltener, als EGFR-Mutationen (Shigematsu et al., 2005).

### 1.1.6 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (HER3, ErbB3)

Das dritte Mitglied der HER-Familie (Kraus et al., 1989) ist ebenfalls auf die Bildung von signalkompetenten Heterodimeren angewiesen. Aufgrund von Substitutionen in essentiellen Resten verfügt seine Kinasedomäne nur über eine sehr geringe Aktivität (Guy et al., 1994).

Im Gegensatz zu den anderen HER-Rezeptoren ist HER3 über seine sechs PI3K-Bindungsstellen sehr effizient an den PI3K/Akt-Signalweg gekoppelt, der eine zentrale Bedeutung für das Überleben einer Zelle hat (Schulze et al., 2005). HER3 besitzt zwar eine Bindungsstelle für Shc, jedoch keine für Grb2 (Citri and Yarden, 2006). Die Degradierung des HER3-Rezeptors erfolgt ligandenunabhängig in Proteasomen und wird von der E3 Ubiquitin-Ligase NRDP1 (*neuregulin receptor degradation protein 1*) vermittelt (Qiu and Goldberg, 2002).

HER3 spielt eine essentielle Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Herzens. So sterben auch HER3-Knockout-Mäuse aufgrund einer verzögerten Trabekularisierung des Herzens noch vor der Geburt (Erickson et al., 1997).

Der HER3-Rezeptor ist häufig in Tumoren überexprimiert, die ebenfalls eine hohe EGFR- oder HER2-Expression zeigen (Naidu et al., 1998). Über den Einfluss einer HER3-Überexpression auf die Prognose eines Tumors gibt es hingegen widersprüchliche Aussagen. So konnten einige Studien zeigen, dass HER3 in Brusttumoren mit schlechten prognostischen Faktoren, wie dem Tumorgrad (Naidu et al., 1998), der Metastasierung in Lymphknoten (Lemoine et al., 1992) und der Tumorgröße (Travis et al., 1996) assoziiert ist. In anderen Studien korrelierte eine HER3-Überexpression hingegen mit einem verbesserten 10-Jahres-Überleben (Quinn et al., 1994) oder einem guten Ansprechen auf eine endokrine Therapie (Knowlden et al., 1998).

### 1.1.7 Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 4 (HER4, ErbB4)

HER4 ist das vierte Mitglied der HER-Familie (Plowman et al., 1993). Man unterscheidet zwei Paare natürlicher HER4-Isoformen, die sich entweder in ihrer juxtamembranen Domäne (JMa und JMb), oder ihrem C-Terminus (cyt1 und cyt2) unterscheiden und durch alternatives Splicen entstehen (Junttila et al., 2000).

HER4 rekrutiert sowohl GRB2, als auch Shc, und STAT5 (Citri and Yarden, 2006). Die cyt1-Isoform kann außerdem die PI3K aktivieren (Elenius et al., 1999). Auch HER4 ist kein direktes Ziel von c-Cbl und wird daher nur sehr ineffizient endozytiert. Der Rezeptor kann jedoch infolge einer Ligandenstimulation oder einer Aktivierung durch die Proteinkinase C gespalten werden (Vecchi et al., 1996). Diese Spaltung erfolgt entweder durch die Metalloprotease ADAM17/TACE an der extrazellulären Domäne (Rio et al., 2000), oder durch eine  $\gamma$ -Sekretase an der transmembranen Domäne (Ni et al., 2001). Durch die Spaltung der  $\gamma$ -Sekretase wird ein lösliches, 80kDa großes Protein freigesetzt (s80), welches in den Zellkern wandert. Dort wirkt s80 als Chaperon, welches den Eintritt der Transkriptionsfaktoren STAT5 (Williams et al., 2004) und YAP1 (*YES-associated protein-1*) in den Zellkern erleichtert (Komuro et al., 2003).

Im Gegensatz zu den anderen HER-Rezeptoren wird HER4 ein antiproliferativer Effekt zugesprochen. Werden HER2-positive Tumorzellen mit HER4-transfiziert, so führt dies zu einer verminderten Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate (Barnes et al., 2005). Eine HER4-Überexpression kommt in humanen Brusttumoren zwar relativ selten vor, ist dafür aber mit einer erhöhten Überlebensrate und einem geringen Tumorgrad verbunden (Witton et al., 2003).

Auch HER4 scheint eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Herzens und des Nervensystems zu spielen. HER4-Knockout-Mäuse zeigen denselben Phänotyp, wie HER2-Knockout-Mäuse und sind daher nicht lebensfähig (Gassmann et al., 1995).

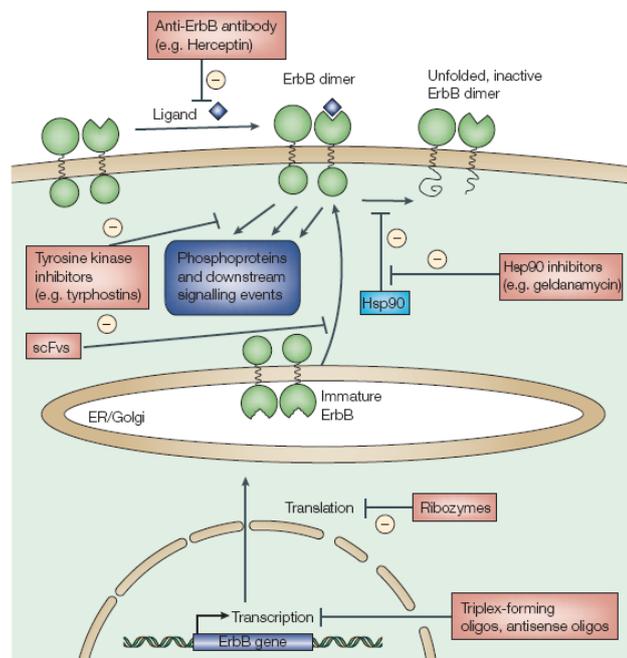
#### 1.1.8 Das HER2/HER3 Heterodimer

Der HER2- und der HER3-Rezeptor bilden zusammen das HER-Heterodimer mit dem größten onkogenen Potential (Beerli et al., 1995; Wallasch et al., 1995). In vielen Brusttumoren sind beide Rezeptoren gleichzeitig überexprimiert (Lemoine et al., 1992; Naidu et al., 1998) und viele HER2-überexprimierende Tumore zeichnen sich durch erhöhte HER3-Phosphotyrosin-Werte aus (Alimandi et al., 1995).

Dieses Potential lässt sich unter anderem damit erklären, dass sich die Signalwirkung beider Rezeptoren optimal ergänzt. Während HER2 über seine Bindungsstellen für Shc und Grb2 direkt an den MAPK-Signalweg gekoppelt ist (Olayioye et al., 2000), kann HER3 über seine sechs Bindungsstellen für die PI3K den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren (Fedi et al., 1994). Des Weiteren entgeht das HER2/HER3-Dimer weitgehend den Mechanismen der negativen Signalkontrolle und zeichnet sich daher durch eine langandauernde Signaltransduktion aus (Baulida et al., 1996; Waterman et al., 1999).

## 1.2 Möglichkeiten der Therapie von HER-Rezeptor-assoziierten Tumoren

Die HER-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der onkogenen zellulären Transformation und sind in vielen humanen Tumoren durch Genamplifikationen oder Mutationen konstitutiv aktiv. Daher eignen sie sich hervorragend als Ziele einer spezifischen Krebstherapie. Eine Hemmung der HER-Signaltransduktion ist auf mehreren Ebenen möglich. Zu den möglichen therapeutischen Strategien gehören unter anderem: Antikörper, die eine Bindung des Liganden oder eine Rezeptor-Dimerisierung unterbinden; Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKIs), die eine Bindung von ATP an die Kinasedomäne verhindern; Hsp90-Inhibitoren, die zu einer Destabilisierung des HER2-Rezeptors an der Zellmembran führen; Triplex-bildende Oligonukleotide, die die Transkription hemmen; antisense-Oligonukleotide oder Ribozyme, die die Translation hemmen oder einzelsträngige Fv-Fragmente von Antikörpern (scFv), die die Translokation der Rezeptoren an die Zelloberfläche unterbinden (Abb.5, Yarden and Sliwkowski, 2001).



**Abbildung 5: Möglichkeiten der Hemmung des HER-Netzwerkes (Yarden and Sliwkowski, 2001)** - Eine Unterbrechung der HER-Signaltransduktion ist auf allen Ebenen möglich: von der Transkription und Translation, über den Transport und die Stabilität des Rezeptors, bis hin zur direkten Hemmung des membranständigen Rezeptors durch Antikörper oder TKIs.

Einige dieser Strategien werden bereits erfolgreich in der Klinik angewendet. Zu den bereits zugelassenen Medikamenten gehören unter anderem die beiden EGFR-spezifischen TKIs Erlotinib und Gefitinib, die bei der Therapie von Lungentumoren (NSCLC) zum Einsatz kommen; der bei HER2-positivem Brustkrebs eingesetzte duale TKI Lapatinib; sowie die bei Dickdarmkrebs wirksamen EGFR-spezifischen, monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab. Ein weiterer HER2-spezifischer monoklonaler Antikörper, der in der Brustkrebstherapie zum Einsatz kommt, ist Herceptin®. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die Entwicklungsgeschichte, die Ergebnisse zentraler klinischer Studien und die molekularen Wirkungsmechanismen dieses sehr erfolgreichen Krebsmedikamentes.

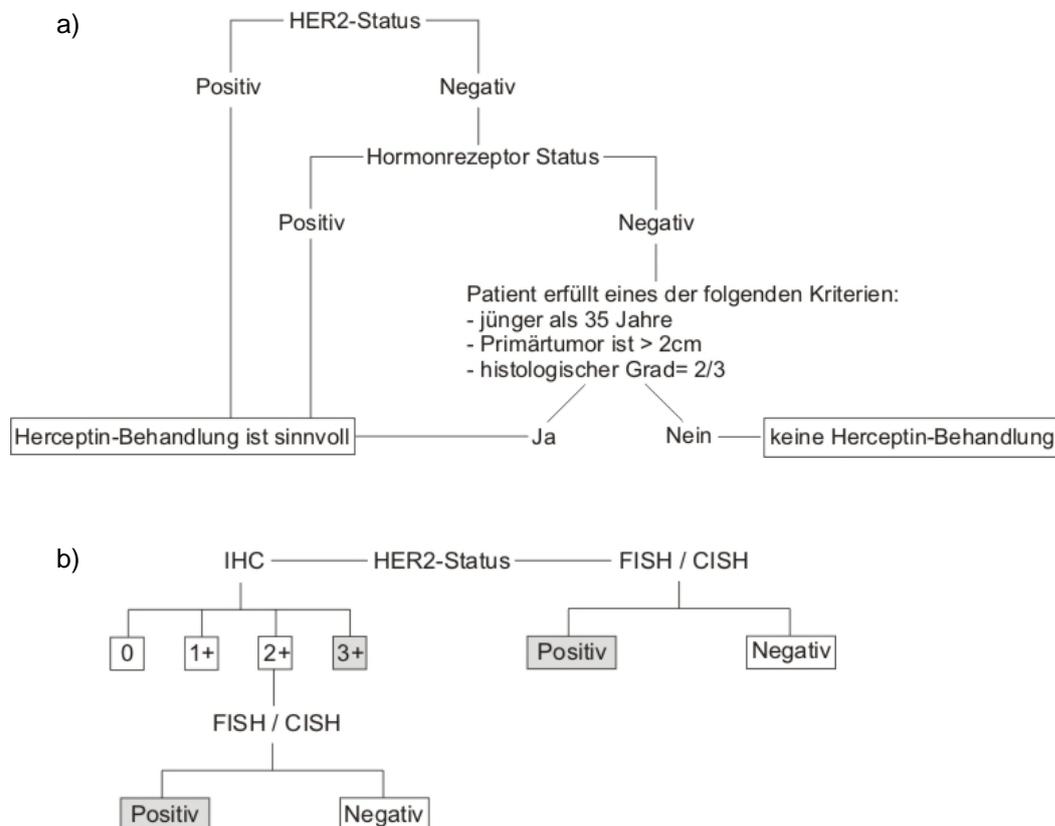
### 1.3 Der therapeutische Antikörper Herceptin® (Trastuzumab)

Herceptin® ist für die adjuvante Behandlung von HER2-überexprimierendem Brustkrebs zugelassen. Dabei kann der Antikörper, in Abhängigkeit von den vorangegangenen Therapien, entweder in Kombination mit Doxorubicin, Cyclophosphamid, Paclitaxel oder Docetaxel, in Kombination mit Docetaxel und Carboplatin, oder als Einzeltherapie eingesetzt werden.

Ob ein Patient für eine Herceptin®-Therapie geeignet ist, wird vor allem anhand des HER2- und Hormonrezeptor-Status entschieden (Abb.6a). Die Bestimmung des Hormonrezeptor(HR)-Status erfolgt anhand einer Gewebebiopsie. Dabei wird mit einer immunhistologischen Färbung die Anzahl von Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-positiven Zellen ermittelt. Anhand dieser Werte wird der Tumor einer der folgenden Kategorien zugeordnet:

0	keine HR-Expression (HR-negativ)	2+	mittlere HR-Expression
1+	geringe HR-Expression	3+	starke HR-Expression (HR-positiv)

Das wichtigste Entscheidungskriterium für oder gegen eine Herceptin®-Therapie bleibt jedoch der HER2-Status des Tumors (Abb.6b). Für die Validierung der HER2-Expression kommen derzeit zwei Techniken zur Anwendung: die immunhistochemische Färbung (IHC) und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).

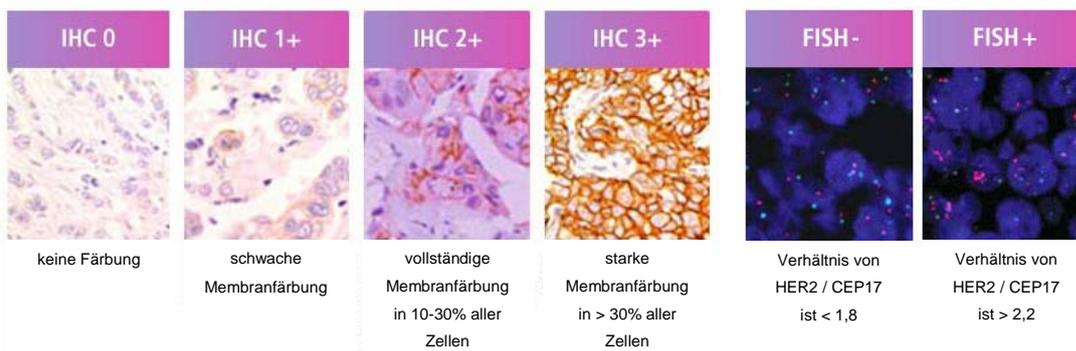


**Abbildung 6: Entscheidungskriterien für oder gegen eine Herceptin®-Therapie** a) allgemeine Kriterien, b) Bewertungskriterien für den HER2-Status (grau unterlegte Ergebnisse eignen sich für eine Therapie) (Quelle: www.herceptin.com)

### 1.3.1 Methoden zur Bestimmung des HER2-Status

Die IHC ist eine semiquantitative Methode und wird anhand von fixierten oder gefrorenen Gewebeproben durchgeführt. Dabei dient die Zelloberflächen-Expression des HER2-Rezeptors als Maßstab für den Grad der HER2-Genamplifikation. Die Einteilung der Tumore (0, 1+, 2+, 3+) erfolgt anhand des Ausmaßes und der Lokalisierung der zellulären Färbung (Abb.7). Die Durchführung der IHC ist schnell und kostengünstig. Problematisch ist hingegen, dass die Ergebnisse je nach Labor variieren können, da die Einteilung relativ subjektiv ist. Die gebräuchlichsten kommerziellen IHC-Tests sind HercepTest<sup>®</sup> und Pathway<sup>™</sup>.

Die FISH-Technik ist hingegen eine quantitative Methode, die eine genaue Bestimmung der Anzahl der HER2-Genkopien pro Tumorzelle ermöglicht. Auch hierfür werden fixierte Gewebeproben verwendet. Die spezifische Färbung erfolgt mit fluoreszierenden DNA-Sonden. Tumorzellen, bei denen das Verhältnis aus den HER2-Genkopien und den Genkopien des innerchromosomalen Referenzgens CEP17 größer als 2,2 ist, werden als HER2-positiv betrachtet (Abb.7). Die FISH-Technik ist teurer und zeitaufwendiger als eine IHC. Die gebräuchlichsten kommerziellen FISH-Assays sind PathVysion<sup>®</sup> und NFORM<sup>®</sup> (Perez and Baweja, 2008).



**Abbildung 7: Bewertungskriterien zur Klassifizierung von Tumoren hinsichtlich ihrer HER2-Expression** (Quelle: www.herceptin.com) IHC-Kategorien zur Validierung der HER2-Proteinexpression (0, bis 3+); sowie Validierung der HER2-Genamplifikation mittels FISH: FISH-neg. (mit HER2-Ratio < 1,8) versus FISH-pos. Tumorzellen (mit HER2-Ratio > 2,2)

Eine noch relativ neue Technik ist die chromogene-in-situ-Hybridisierung (CISH). Sie ermöglicht ebenfalls eine Validierung der HER2-Genamplifikation und vereint somit die in-situ-Hybridisierung der FISH-Technik mit der chromogenen Signaldetektion der IHC. Durch die geringeren Kosten, bei gleichbleibender Präzision, ist CISH eine gute Alternative zur FISH (Denoux et al., 2003).

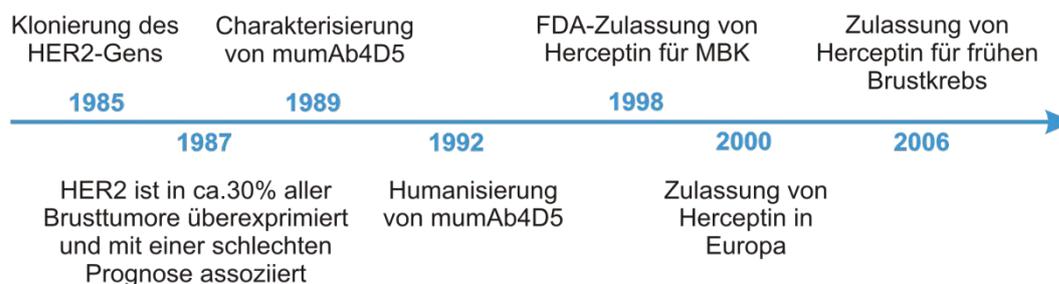
Es gibt Studien, nach denen die FISH-Technik eine bessere Vorhersage über den Erfolg einer Herceptin<sup>®</sup>-Therapie ermöglicht, als die IHC (Mass, 2001; Pauletti et al., 2000; Press et al., 2002). Hierbei wurden jedoch sowohl IHC2+, als auch IHC3+-Tumore als HER2-positiv gewertet. Vergleicht man nur IHC3+ und FISH-pos. Tumore miteinander, so ermöglichen beide Methoden eine genaue Prognose über das Ansprechen auf eine Herceptin<sup>®</sup>-Therapie (Larsimont et al., 2002; Lebeau et al., 2001; Tubbs et al., 2001). Trotzdem empfehlen die derzeitigen Richtlinien, dass IHC2+-Tumore zusätzlich mit FISH oder CISH validiert werden (Abb.6b).

### 1.3.2 Die Entwicklungsgeschichte von Herceptin®

Herceptin® wurde von der Firma *Genentech* entwickelt. Nachdem man hier im Labor von Dr. Axel Ullrich den HER2-Rezeptor als zweites Mitglied der EGFR-Familie identifizierte (Coussens et al., 1985), gelang es den Forschern in Kooperation mit dem Mediziner Dennis Slamon zwei Jahre später die Relevanz diesen neuen Onkogenes in humanen Tumoren zu zeigen. Dabei stellte sich heraus, dass das HER2-Gen in ca. 30% aller invasiven Brusttumore amplifiziert ist und dass diese HER2-Überexpression mit einer kürzeren Überlebens- und Rückfallzeit korreliert (Slamon et al., 1987). Daraus folgte Dr. Ullrich, dass eine wirkungsvolle Hemmung des HER2-Rezeptors zu einer signifikanten Reduzierung des Tumorwachstums beitragen könnte. Die daraufhin hergestellten HER2-spezifischen murinen Antikörper hemmten tatsächlich wirkungsvoll die Proliferation humaner HER2-überexprimierenden Brust- und Ovarialkarzinom-Zelllinien. Der murine Antikörper 4D5 (mumAb4D5) zeigte dabei die höchste Effizienz und wurde somit für die weitere klinische Entwicklung ausgewählt (Hudziak et al., 1989). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass mumAb4D5 sowohl die Proliferation von HER2-transformierten, murinen Zellen, als auch spezifisch die Proliferation von humanen HER2-überexprimierenden Zelllinien und Xenografts hemmen kann (Chazin et al., 1992; Lewis et al., 1993; Sarup et al., 1991).

Da murine Antikörper in der klinischen Praxis nur eine begrenzte Wirksamkeit besitzen (Miller 1983), wurde mumAb4D5 humanisiert. Der daraus resultierende Antikörper (Herceptin®, Trastuzumab) setzt sich aus einem humanen IgG-Gerüst und der hypervariablen Antigen-Bindungs-Region von mumAb4D5 zusammen. Herceptin® besitzt eine noch höhere HER2-Affinität ( $K_d = 0,1nM$ ), als mumAb4D5 ( $K_d = 0,3nM$ ) und bewirkt eine gleichwertige Wachstumshemmung in HER2-überexprimierenden Zelllinien und Xenografts (Carter et al., 1992).

Im September 1998 wurde Herceptin® schließlich von der amerikanischen FDA (*Federal Food and Drug Administration*) für die Behandlung von HER2-positivem, metastasierendem Brustkrebs zugelassen. Zwei Jahre später folgte die Zulassung in Europa. Seit 2006 ist Herceptin® außerdem für die adjuvante Therapie des frühen Mammakarzinoms zugelassen. Zurzeit wird Herceptin® in umfangreichen Studien für die Behandlung von HER2-positivem Magenkrebs evaluiert (Cortés-Funes, 2007).



**Abbildung 8: Die Entwicklungsgeschichte von Herceptin – vom Gen zum Medikament in nur 13 Jahren**

### 1.3.3 Zentrale Studien zur Wirksamkeit von Herceptin®

Die Einführung von Herceptin® wurde zu einem Meilenstein in der Geschichte der Brustkrebstherapie. In mehreren zentralen Studien konnte gezeigt werden, dass Herceptin® sowohl als Monotherapie, als auch in Kombination mit diversen Chemotherapeutika seine Wirkung zeigt.

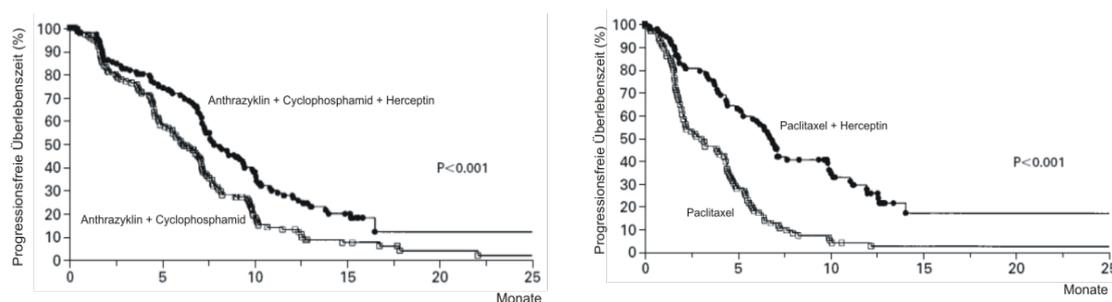
#### **Herceptin®-Monotherapie**

Die Wirkung von Herceptin® als Monotherapie wurde im Rahmen von klinischen Studien der Phase I bereits seit 1992 untersucht. In den darauf aufbauenden Phase II Studien wurden Ansprechraten zwischen 12 und 26%, bei einer mittleren progressionsfreien Zeit von 3-5 Monaten (Baselga et al., 2005; Baselga et al., 1996; Cobleigh et al., 1999; Vogel et al., 2002) ermittelt. Die dabei verabreichte Dosis lag meist bei einer initialen Gabe von 4mg/kg, mit einer sich anschließenden wöchentlichen Verabreichung von 2mg/kg (Baselga et al., 1996). Ansprechraten von über 20% wurden nur bei Patienten mit IHC-3+ Tumoren erreicht, die noch keine andere Therapie erhalten haben (Vogel et al., 2002). Bei Patienten, die bereits mit anderen Medikamenten vorbehandelt wurden, lagen die Ansprechraten deutlich darunter (Cobleigh et al., 1999).

#### **Herceptin® und adjuvante Chemotherapie (fortgeschrittene Brusttumore)**

In präklinischen Studien wurde durch eine Kombination aus Herceptin® und Chemotherapie eine bessere Wachstumshemmung erreicht, als wenn man die Tumorzellen mit nur einer Komponente behandelte. Dabei konnten sowohl synergistische (z.B. mit Carboplatin, Docetaxel oder Vinorelbin), als auch additive Effekte (mit Doxorubicin, Paclitaxel oder Epirubicin) beobachtet werden (Pegram et al., 2004).

In zwei zentralen klinischen Studien H0648g (Slamon et al., 2001) und M77001 (Marty et al., 2005) konnte erstmals gezeigt werden, dass diese additiven Effekte auch im Patienten wirksam werden. Das Ziel der H0648g-Studie (Abb.9), in die 469 Patienten einbezogen wurden, war es, den Vorteil einer Herceptin®-Kombinationstherapie (CT+H) gegenüber einer reinen chemotherapeutischen Behandlung (CT) zu ermitteln und zwei verschiedene Chemotherapien miteinander zu vergleichen (Anthrazyklin/Cyclophosphamid versus Paclitaxel).



**Abbildung 9: Vergleich der progressionsfreien Überlebenszeit von Patienten, die mit Chemotherapie allein (links= Anthrazyklin/Cyclophosphamid, rechts =Paclitaxel) oder mit einer Kombination aus Chemotherapie und Herceptin® behandelt wurden.**

Die Kombination aus Chemotherapeutikum und Herceptin<sup>®</sup> war jeweils effizienter, als eine alleinige CT-Behandlung. Herceptin<sup>®</sup> bewirkte eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine Erhöhung der Ansprechrates (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Ergebnisse der H0648g-Studie (Slamon, 2001)**

	AC + Herceptin <sup>®</sup> (n=143)	AC (n=138)	P + Herceptin <sup>®</sup> (n=92)	Paclitaxel (n=96)
Progressionsfreie Überlebenszeit (Mon)	7,8	6,1	6,9	3,0
Gesamtüberlebenszeit (Mon)	26,8	21,4	22,1	18,4
vollständiges Ansprechen (%)	8	4	8	2
Partielles Ansprechen (%)	48	38	34	15
Dauer des Ansprechens (Mon)	9,1	6,7	10,5	4,5

Abkürzungen: AC (Anthrazyklin und Cytophosphamid), Mon (Monate), P (Paclitaxel), n (Anzahl der Patienten)

Die M77001-Studie untersuchte den Vorteil einer Kombination aus Herceptin<sup>®</sup> und Docetaxel gegenüber einer einfachen Docetaxel-Behandlung. Auch hier wurden nur Patienten einbezogen, die nicht vorher behandelt waren. Die Kombination aus Docetaxel und Herceptin<sup>®</sup> bewirkte wiederum eine Verlängerung der Lebenszeit und ein vermehrtes Ansprechen auf die Therapie (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Ergebnisse aus der M77001-Studie (Marty, 2005)**

	Docetaxel + Herceptin <sup>®</sup> (n=92)	Docetaxel (n=94)
Progressionsfreie Überlebenszeit (Mon)	11,7	6,1
Gesamtüberlebenszeit (Mon)	31,2	22,7
vollständiges Ansprechen (%)	7	2
Partielles Ansprechen (%)	54	32
Dauer des Ansprechens (Mon)	11,7	5,7
Herzinsuffizienz (%)	1	0

Neben Anthrazyklinen und Taxanen wurden noch andere Kombinationen aus Chemotherapeutikum und Herceptin<sup>®</sup> auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit hin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch Kombinationen aus Vinorelbin, Gemcitabin bzw. Capecitabin mit Herceptin<sup>®</sup> wirksam sind und zu keinen ernsthaften Nebenwirkungen führen (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Weitere wirksame Kombinationsbehandlungen aus Chemotherapeutikum und Herceptin<sup>®</sup>**

Chemotherapeutikum	Vorbehandlung	Ansprechrates	progressionsfreie Zeit	Referenz
Vinorelbin (n=54)	Keine	68%	5,6 Monate	(Burstein et al., 2003)
Gemcitabin (n=61)	Taxan / AC	38%	5,8 Monate	(O'Shaughnessy et al., 2004)
Capecitabin (n=27)	Vorbehandelt	60%	6,3 Monate	(Schaller, 2005)

Neben den einfachen Kombinationen aus Chemotherapeutikum und Herceptin® wurden auch Dreifach-Kombinationen, die zwei Chemotherapeutika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen und Herceptin® enthielten, auf ihre Wirksamkeit hin untersucht (Tabelle 5). Alle Studien zeigten, dass die Dreifach-Kombinationen wirksam sind und hohe Ansprechraten induzieren. Bei der Wahl der zu kombinierenden Chemotherapeutika musste jedoch beachtet werden, dass keine überlappenden Toxizitätsprofile auftreten, nur dann konnte eine Verträglichkeit der Therapie gewährleistet werden.

**Tabelle 5: Ergebnisse von Studien über Dreifachbehandlungen mit Herceptin®**

Studie	Kombination (+Herceptin®)	Anzahl Patienten	Ansprechrates
Wardely, 2007	Capecitabin, Docetaxel	222	70%
Yardley, 2002	Carboplatin, Paclitaxel	61	66%
Perez, 2005	Carboplatin, Paclitaxel	48	81%
Robert, 2004	Carboplatin, Paclitaxel	93	52%
Pegram, 2004	Cisplatin, Docetaxel	62	79%
Pegram, 2004	Carboplatin, Paclitaxel	59	58%
Venturini, 2006	Epirubicin, Docetaxel	45	67%
Miller, 2002	Gemcitabin, Paclitaxel	45	62%
Yardley, 2004	Vinorelbin, Docetaxel	34	70%

### **Herceptin® und adjuvante Chemotherapie (Brusttumore im Frühstadium)**

Neben den bereits erwähnten Studien, an denen vor allem Patienten mit fortgeschrittenem MBK teilnahmen, wurden in den letzten Jahren auch großangelegte Studien durchgeführt, welche die Wirkung von Herceptin® als adjuvante Therapie von Brusttumoren im Frühstadium untersuchen sollten (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammenfassung der fünf zentralen Studien zur adjuvanten Herceptin®-Therapie (Baumann, 2007)**

Studie	Patientinnen Zahl	Krankheitsfreies Überleben		Gesamtüberleben			Herzinsuffizienz NYHA III und IV $\diamond$	
		ohne Trastuzumab	mit Trastuzumab	ohne Trastuzumab	mit Trastuzumab	ohne Trastuzumab	mit Trastuzumab	
HERA	5090	nach 3 Jahren 74.3%	<b>nach 3 Jahren 80.6% p&lt;0.0001</b>	nach 3 Jahren 92.4%	nach 3 Jahren 89.7% p<0.0051	nach 1 Jahr 0%	nach 1 Jahr 0.6%	
BCIRG 006	3222	nach 4 Jahren 77%	<b>nach 4 Jahren 83% bzw. 82% # p = 0.0003 #</b>	nach 4 Jahren 86%	<b>nach 4 Jahren 92% bzw. 91% # p = 0.004 bzw. p=0.017 #</b>	nach 4 Jahren 0.4%	nach 4 Jahren 2% bzw. 0.4% ! #	
Intergroup N9831	2766	nach 4 Jahren*	<b>nach 4 Jahren*</b>	nach 4 Jahren*	<b>nach 4 Jahren*</b>	nach 3 Jahren 0%	nach 3 Jahren 2.9%	
NSABP B-31	2043	67.1%	<b>85.3% p&lt;0.0001</b>	86.6%	<b>91.4% p=0.015</b>	nach 3 Jahren 0.8%	nach 3 Jahren 4.1%	
FinHer	232	nach 3 Jahren	<b>nach 3 Jahren</b>	nach 3 Jahren	nach 3 Jahren			
	HER2/neu positive: 131	77.6% $\nabla$	<b>89.3%<math>\nabla</math> p=0.01</b>	89.7% $\nabla$	96.3% $\nabla$ p=0.15			

\* gepoolte Analyse von Intergroup N9831 und NSABP B-31.  
 # 2 verschiedene Therapiearme mit Trastuzumab. Der zuerst erwähnte Arm: Doxorubicin und Cyclophosphamid x4 gefolgt von Docetaxel x4 gefolgt von Trastuzumab. Der zweite erwähnte Arm: Docetaxel und Carboplatin x6 und Trastuzumab.  
 $\nabla$  Resultate gelten nur für die 131 Patientinnen mit HER2/neu-positiven Tumoren.  
 $\diamond$  Herzinsuffizienz NYHA III: Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung, NYHA IV: Beschwerden in Ruhe.  
**Fett gedruckt** sind die signifikanten Resultatverbesserungen durch Trastuzumab.

Herceptin® bewirkte gegenüber Patienten, die ausschließlich chemotherapeutisch behandelt wurden, nahezu eine Halbierung der Rückfallrate. Weiterhin konnte eine signifikante Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit und in einigen Studien bereits eine Erhöhung der Gesamtüberlebenszeit beobachtet werden.

### **Herceptin® und neoadjuvante Chemotherapie**

Herceptin® kommt auch als neoadjuvante Therapie zum Einsatz. Bei dieser Anwendungsform beobachtete man ebenfalls eine deutliche Zunahme der kompletten Remissionen durch die Kombination von Herceptin® und Chemotherapie (65% versus 26%) (Buzdar et al., 2005).

### **Herceptin® und endokrine Therapie**

Viele HER2-positive Brusttumore sind auch Östrogen-Rezeptor-positiv. Während Herceptin® sowohl in ER-positiven, als auch in ER-negativen Tumoren wirksam ist, weisen vor allem ER/HER2-positive Tumore eine natürliche Resistenz gegenüber einer endokrinen Therapie auf (Ellis, 2004). Es wird daher vermutet, dass durch eine Kombination aus Herceptin® und endokriner Therapie diese Resistenz teilweise behoben werden kann. Einige Studien befassten sich bereits mit dem Erfolg einer solchen Kombinationstherapie. So wurde bei einer Studie mit 31 Patienten eine Ansprechrate von 26% und eine progressionsfreie Überlebenszeit von 5,8 Monaten ermittelt (Marcom et al., 2007).

***Nebenwirkungen einer Herceptin®-Therapie***

Herceptin® verursachte bisher keine irreversiblen Nebenwirkungen. Am häufigsten sind infusionbedingte Reaktionen, die zwar bei bis zu 40% der Patienten beobachtet werden, jedoch medikamentös behandelbar sind und auch meist nur bei der ersten Infusionsbehandlung auftreten (Cook-Bruns, 2001).

Weiterhin besteht bei der Verabreichung von Herceptin®, insbesondere in Kombination mit einem Anthrazyklin, die Gefahr einer Kardiotoxizität, wobei das Risiko mit 2-7% relativ gering ist (Keefe, 2002; Seidman et al., 2002). Dennoch wird die Herzfunktion von Patienten während einer Herceptin®-Therapie in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die auftretenden Probleme sind aber auch hier medikamentös zu behandeln und verschwinden nach dem Absetzen der Herceptin®-Therapie.

### 1.3.4 Wirkungsmechanismen von Herceptin®

Über die genauen molekularen Wirkungsmechanismen von Herceptin® ist bisher wenig bekannt. Die Ergebnisse der vielen präklinischen und klinischen Studien ermöglichen dennoch einige Rückschlüsse über die molekulare Wirkungsweise des Antikörpers.

#### ***Internalisierung und Degradierung des HER2-Rezeptors***

Frühe präklinische Studien deuteten darauf hin, dass Herceptin® und sein muriner Vorläufer 4D5 eine Internalisierung und Degradierung des HER2-Rezeptors bewirken (Baselga et al., 2001; Hudziak et al., 1989). In klinischen Studien konnte dieser Rückgang der HER2-Oberflächenexpression jedoch nicht beobachtet werden (Gennari et al., 2004; Mohsin et al., 2005). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass der HER2-Pool sehr dynamisch ist. Das bedeutet, der Rezeptor befindet sich in einem kontinuierlichen Kreislauf aus Endozytose und effizientem Recycling. Herceptin® bewirkt demnach wahrscheinlich keine Degradierung des Rezeptors, sondern bleibt während des gesamten Kreislaufes an dem Rezeptor gebunden (Austin et al., 2004).

#### ***Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus***

4D5 und Herceptin® hemmen spezifisch das Wachstum von HER2-positiven Tumorzellen (Lane et al., 2000; Yakes et al., 2002). Dabei werden die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Der zentrale Vermittler des G1-Arrestes ist der CDK-Inhibitor p27<sup>kip1</sup>. Durch eine Erhöhung der p27<sup>kip1</sup>-Expression und eine Verminderung der Expression von Proteinen, die an der Sequestrierung von p27<sup>kip1</sup> beteiligt sind, steigt die Menge an freiem Inhibitor stark an. Dieser transloziert dann in den Zellkern, um dort an den Zyklin-E/CDK2-Komplex zu binden und diesen somit zu inaktivieren (Lane et al., 2000). Neben dem p27<sup>kip1</sup>-induzierten G1-Arrest bewirkt Herceptin® auch eine Hemmung der PI3K. Diese wird vermutlich durch die Dephosphorylierung des HER3-Rezeptors verursacht, die aus der Dissoziation des HER2/HER3-Heterodimers resultiert (Yakes et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit wäre eine Herceptin®-induzierte Reduktion der Phosphorylierung von PTEN. Dadurch würde sowohl die Membranlokalisierung, als auch die Phosphataseaktivität von PTEN zunehmen, was wiederum eine schnelle Dephosphorylierung von Akt und somit eine Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges zur Folge hätte (Nagata et al., 2004).

#### ***Aktivierung des Immunsystems***

Da Herceptin® ein Antikörper ist, wird auch das Immunsystem in die Tumorbekämpfung einbezogen. Natürliche Killerzellen (NK) exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Fcγ-Rezeptoren. Durch die Bindung an die Fc-Domäne von Herceptin® werden die NK-Zellen aktiviert und lysieren in der Folge alle HER2-positiven Zellen, die Herceptin® gebunden haben (Clynes et al., 2000). Dieser Prozess wird auch als antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet.

Der Beitrag des Immunsystems zur Wirksamkeit von Herceptin® konnte in einem Mausmodell deutlich gemacht werden. Während immunsuppressive Mäuse (eingeschränkte Funktion der NK-Zellen) nur eine Wachstumshemmung von 29% als Reaktion auf eine Herceptin®-Behandlung zeigten, reagierten die Kontrollmäuse (intakte NK-Zellen) mit einer 96%igen Hemmung des Tumorwachstums (Clynes et al., 2000).

In einer klinischen Studie beobachtete man infolge einer Herceptin®-Monotherapie eine starke Infiltration von lymphoiden Zellen (Gennari et al., 2004). In welchem Maße das Immunsystem von Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung zur Unterstützung der Herceptin®-Therapie beitragen kann, ist jedoch fraglich, da dieses durch vorangegangene Chemotherapien meist sehr geschwächt ist.

### ***Hemmung der Angiogenese***

Herceptin® kann sich auch auf die Tumor-Angiogenese auswirken (Baselga et al., 2001). So können z.B. in Folge einer Herceptin®-Behandlung Mikrogefäße im Tumor zurückgebildet und Endothelzellen in ihrer Migration gehemmt werden (Klos et al., 2003). Weiterhin vermindert Herceptin® die Produktion des proangiogenen VEGF und aktiviert den antiangiogenen Faktor Thrombospondin-1 (Petit et al., 1997).

### ***Blockierung der Abspaltung der extrazellulären HER2-Domäne***

Durch eine proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne (EZD) kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung des HER2-Rezeptors. Das dabei in der Membran verbleibende Fragment (95kDa) besitzt eine höhere Kinaseaktivität, als der vollständige 185kDa-Rezeptor (Christianson et al., 1998). Die Bindungsstelle von Herceptin® ist so gelegen, dass die Abspaltung der EZD bei gebundenem Antikörper nicht mehr erfolgen kann. Die im Blut zirkulierende extrazelluläre Domäne kann daher auch als Marker für das Ansprechen auf eine Herceptin®-Therapie herangezogen werden. Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine Reduktion der HER2-EZD-Level im Serum im Zusammenhang mit einem positiven Ansprechen und einer längeren krankheitsfreien Überlebenszeit steht (Kostler et al., 2004).

### ***Hemmung des DNA-Reparatursystems***

Herceptin® erhöht die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber der Wirkung des Tumor-Nekrose-Faktors (Hudziak et al., 1989) und der zytotoxischen Wirkung von Chemotherapeutika (Pegram et al., 1999). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Herceptin® *in vitro* sowohl die Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Addukten (Pietras et al., 1994), als auch eine durch eine Bestrahlung ausgelöste DNA-Synthese blockiert (Pietras et al., 1999).

### 1.3.5 Mögliche Ursachen für die Entstehung von Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzen

Zahlreiche klinische Studien der Phase II demonstrierten, dass Herceptin<sup>®</sup> sowohl als Einzeltherapie, als auch in Kombination mit einem Chemotherapeutikum wirksam ist. Etwa 15% aller Patienten sind jedoch de novo resistent gegenüber einer Herceptin<sup>®</sup>-Therapie und auch die Mehrzahl der Tumore, mit einem anfänglich guten Ansprechen, entwickelt innerhalb eines Jahres eine Resistenz gegen die Behandlung (Esteva et al., 2002; Slamon et al., 2001).

#### ***Mechanismen, die die Herceptin<sup>®</sup>-HER2-Interaktion beeinflussen***

MUC4 und CD44 verhindern die Bindung von Herceptin<sup>®</sup> auf verschiedene Weise. Während CD44 eine vermehrte Internalisierung des HER2-Rezeptors hervorruft (Palyi-Krekk et al., 2007), maskiert das membranassoziierte Glykoprotein MUC4 die Herceptin<sup>®</sup>-Bindungsstelle am Rezeptor (Nagy et al., 2005). Darüber hinaus induziert MUC4 auch eine Phosphorylierung des HER2-Rezeptors (Nagy et al., 2005; Price-Schiavi et al., 2002). HER2-Mutationen scheinen keine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzen zu spielen. Einen Hinweis auf den Einfluss einer solchen Mutation liefert bisher nur eine Mutation in Exon 21, die bei drei Brustkrebs-Patienten mit erworbener Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz gefunden wurde (Wongpaksa, 2006).

#### ***Kompensatorische Signaltransduktion***

Ein weiterer genereller Resistenzmechanismus besteht in der Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege. Dabei wird die blockierte HER2-Signaltransduktion durch Rezeptoren wie den EGFR (Diermeier et al., 2005), den IGF-1R (Lu et al., 2001), c-Met (Shattuck et al., 2008), den CXCR4 (Tripathy and Shelton J, 2007) oder über eine verstärkte Signaltransduktion von  $\beta$ 1-Integrinen (Thoms, 2007) kompensiert. Aber auch eine verminderte Aktivität von endogenen HER-Inhibitoren, wie z.B. Mig-6, kann eine Resistenzbildung zur Folge haben (Anastasi et al., 2005).

#### ***Konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges***

Die konstitutive Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade kann wesentlich zu einer Resistenzbildung gegenüber Herceptin<sup>®</sup> beitragen (Yakes et al., 2002). Die erhöhte Aktivität wird entweder durch eine verminderte Expression des endogenen Akt-Inhibitors PTEN (Nagata et al., 2004) oder durch aktivierende Mutationen in der katalytischen Untereinheit der PI3K (Berns et al., 2007) verursacht. Auch eine verminderte Expression des CDK-Inhibitors p27<sup>kip1</sup> (Nahta et al., 2004) bzw. eine JAB1-abhängige, erhöhte Degradation von p27<sup>kip1</sup> (Shackleford, 2007) kann an der Entstehung von Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzen beteiligt sein.

## 2. Aufgabenstellung

Durch die Einführung des therapeutischen Antikörpers Herceptin<sup>®</sup> hat sich die Prognose von Patientinnen mit HER2-positivem Brustkrebs deutlich verbessert. Aber nicht alle HER2-positiven Brusttumore sprechen auf eine Herceptin<sup>®</sup>-Behandlung an und auch bei denen, die eine anfängliche Reaktion zeigen, können innerhalb von einem Jahr Resistenzen gegenüber der Therapie auftreten. Die Mechanismen, die dieser natürlichen bzw. erworbenen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz zugrunde liegen, sind noch immer nicht vollständig aufgeklärt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Kinasen zu identifizieren, die von selektionierten Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klonen höher exprimiert werden, als von ihren parentalen Brustkrebszelllinien und deren Beitrag zur verminderten Sensitivität mit Hilfe von spezifischen Knockdown-Experimenten zu validieren.

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern sich die Genexpressionsprofile natürlich sensitiver bzw. resistenter Brustkrebszelllinien unterscheiden und ob sich daraus neue Resistenzmarker ableiten lassen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der beiden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen HER3 und IGF-1R auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität ausgewählter Brustkrebszelllinien zu untersuchen.

### 3. Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	BRL, Eggenstein
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Bio-Rad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Deoxynucleotid (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Serva, Heidelberg
Lipofectamine®	Gibco, Eggenstein
Methanol	Fluka, Neu-Ulm
MTT	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybrene (Hexadimethrinebromid)	Sigma, Taufkirchen
PEG (Polyethylenglycol) 4000, 6000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizma base	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	Sigma, Taufkirchen

Alle anderen Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

#### 3.2 Enzyme

Klenow-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin-EDTA	Gibco, Eggenstein
AMV-Reverse Transkriptase	Roche, Mannheim

#### 3.3 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] ATP >5000 Ci/mmol	PerkinElmer Life Science, Köln
---	--------------------------------

### 3.4 „Kits“ und andere Materialien

Zellkultur - Plastikwaren	Greiner, Solingen Corning Incorporated, USA Nunclon, Dänemark Falcon, U.K.
CapFinder PCR Synthese Kit (Primer K1 und K2)	Clontech, USA
Cellulose Nitrat 0.45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
DNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
ECL Kit	PerkinElmer, Köln
Hyperfilm MP	Amersham, USA
Lipofectamin RNAi MAX	Invitrogen, Karlsruhe
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
REDTaq ReadyMix	Sigma, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, USA
Whatman 3mm	Whatman, USA

### 3.5 Wachstumsfaktoren und Liganden

IGF-1	Sigma
-------	-------

### 3.6 Medien

Medium für E.coli	LB-Medium	1.0% Trypton 0.5% Hefe Extrakt 1.0% NaCl pH7.2
-------------------	-----------	---

Nach dem Autoklavieren wurde noch Ampicillin hinzugefügt.

### 3.7 Zellkulturmedien und Additive

Amphotericin	Sigma, Taufkirchen
FCS	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	PAA, Cölbe
Natrium-Pyruvat	Sigma, Taufkirchen
Nicht essentielle Aminosäuren	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
RPMI-1640	Sigma, Taufkirchen
DMEM, MEM, OptiMEM	Sigma, Taufkirchen
McCoy5a, L-15, F12-Ham	Sigma, Taufkirchen
Einfriermedium: 90% Hitze-inaktiviertes FCS, 10% DMSO.	

### 3.8 Stammlösungen für Puffer

DNA Ladepuffer (6x)	0.25% Bromphenol-Blau 0.25% Xylencyanol 30.0% Glycerol 100.0mM EDTA pH 8.0
LaemmLi Puffer (2x)	187.5mM Tris/HCl pH 6.8 6.0% SDS 30.0% Glycerol 0.01% Bromphenol-Blau 5.0% $\beta$ -Mercaptoethanol
NET (1x)	150.0mM NaCl 5mM EDTA 50mM Tris 0.05% Triton X-100 pH 7.4 (HCl)
PBS	13.7mM NaCl 2.7mM KCl 80.9mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1.5mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4 (HCl)
“Strip” Puffer	62.5mM Tris/HCl pH 6.8 2.0% SDS 100mM $\beta$ -Mercaptoethanol

---

SD-Transblot	50.0mM Tris/HCl pH 7.5 40.0mM Glycin 20.0% Methanol 0.004% SDS
SSC (20x)	3.0 M NaCl 0.3 M Natriumcitrat TAE (10x) 400mM Tris/Acetat 10mM EDTA pH 8.0 (Essigsäure)
TE10/0.1	10.0mM Tris/HCl pH 8.0 0.1mM EDTA pH 8.0
Tris-Glycin-SDS (10x)	248.0mM Tris/HCl pH 7.5 1918.0mM Glycin 1.0% SDS
2xPre-Hybridisierungs- Puffer 10x	10x Denhardt 10x SSC 10mM NaPO <sub>4</sub> (pH 6,8) 2mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Hybridisierungspuffer	5x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer 1	2x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer 2	0,2x SSC 0,1% SDS
dNTP-Mix	je 100µldCTP/ dGTP/ dTTP 125µl Reaktionspuffer B
Stopp-Puffer (MTT-Assay)	5% 2-Butanol 0,012 M HCl in einer 10%igen SDS-Lösung

### 3.9 Bakterienstämme

*Escherichia coli*: DH5 $\alpha$  Genentech, USA

### 3.10 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
BT20	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-19
BT474	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	ATCC HTB-20
BT483	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	Sugen HTB-121
BT549	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	ATCC HTB-122
DAL	humane Brustkarzinomzellen	G.Natali
Hs578T	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	ECACC HTB-126
MCF10A	humane Brustzellen	B.Gillies CRL-10317
MCF7	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-22
MDA-MB-157 (MB157)	human, Brust, medulläres Karzinom	ECACC HTB-24
MDA-MB-175VII (MB175)	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	ATCC HTB-25
MDA-MB-231 (MB231)	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-26
MDA-MB-361 (MB361)	humane Brustadenokarzinomzellen	Sugen HTB-27
MDA-MB-415 (MB415)	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ HTB-128
MDA-MB-436 (MB436)	humane Brustadenokarzinomzellen	DKFZ HTB-130
MDA-MB-453 (MB453)	humane Brustkarzinomzellen	ATCC HTB-131
MDA-MB-468 (MB468)	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-132
SKBR3	humane Brustadenokarzinomzellen	ATCC HTB-30
T47D	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	ATCC HTB-133
ZR-75-30	humane Brustkarzinomzellen der ableitenden Milchgänge	Sugen CRL-1504
Phoenix A	modifizierte HEK293-Zellen zur Produktion helfervirusfreier, amphotropher Retroviren	ATCC Nolan Lab, Stanford
4D5 Subklon	Hybridom, das $\alpha$ HER2 Antikörper produziert	d. AG

### 3.11 Primäre Antikörper

Antigen	Hersteller	Spezies
HER2	UBI	Kaninchen
HER3 (2F12)	UBI	Maus
P-HER2 (1248)	Upstate Signaling	Kaninchen
P-HER3	Cell Signaling	Kaninchen
EGFR	Biomol	Schaf
Tubulin	Sigma	Maus
4G10	Upstate Signaling	Maus
4D5	d. AG (selbst aufgereinigt)	Maus
Met (C-28)	Santa Cruz	Kaninchen
MIG-6	Upstate Signaling	Kaninchen
IGF-1R (C20)	Santa Cruz	Kaninchen
Akt	Santa Cruz	Kaninchen
Erk	Santa Cruz	Kaninchen
P-Akt (Ser473)	Cell Signaling	Kaninchen
P-Erk (Thr202/Tyr204)	NEB	Kaninchen
PTEN	Upstate Signaling	Kaninchen
p27 <sup>kip1</sup>	Abcam	Kaninchen

### 3.12 Sekundäre Antikörper

HRP-konjugiert, Ziege anti-Maus (WB)	1:10.000	Sigma, Taufkirchen
HRP-konjugiert, Ziege anti-Schaf (WB)	1:25.000	Dianova, Hamburg
HRP-konjugiert, Ziege anti-Kaninchen (WB)	1:50.000	BioRad, München
PE-konjugiert, Esel anti-Maus (FACS)	1:1000	Jackson Immuno Research

### 3.13 Plasmide und Oligonukleotide

#### 3.13.1 Primäre Vektoren

pLXSN: Expressionsvektor für retroviralen Gentransfer, SV40 Promotor, Ampicillin- und Neomycinresistenz, Origin von pBR322, 5'-LTR and 3'-LTR von MoMuLV, (Clontech, Palo Alto, USA)

#### 3.13.2 Konstrukte

pLXSN\_EGFR (hergestellt von B.Aicher)

pLXSN-HER3 (hergestellt von C.Wallasch, E.v.d.Horst)

pLXSN-IGF-1R (hergestellt von R.Abraham)

pLXSN-ESK mit *multiple cloning site* (hergestellt von J. Ruhe)

### 3.14 Oligonukleotide

#### 3.14.1 TaqMan® Sonden und Primer (Applied Biosystems)

Assay ID	Gen-Name	Produktgröße
Hs00938675_m1	ROR1	88bp
Hs00324043_m1	TTBK2	86bp
Hs00608037_m1	CDK6	73bp
Hs00220668_m1	CAMK1D	92bp
Hs00242357_m1	AXL	70bp
Hs00245497_m1	FER	100bp
Hs00176973_m1	PRKCA	79bp
Hs00178612_m1	SGK1	81bp
Hs00176719_m1	LYN	70bp
Hs00178178_m1	ROR1	96bp
Hs00178533_m1	AKT3	100bp
Hs00198403_m1	WNK2	67bp
Hs99999905_m1	GAPDH	122bp
Hs01552926_m1	FGFR2	77bp
Hs00559660_m1	TGFBR2	73bp

#### 3.14.2 siRNA silencer (Ambion, Applied Biosystems)

*pre-designed siRNA* Nr. 185: HER3 (human)

Sequenz= GGCUAUGUCCUCGUGGCCAtt (sense)  
 (5'-3') UGGCCACGAGGACAUAGCCTG (antisense)

*pre-designed siRNA* Nr. 103555: EGFR (human)

Sequenz= GGUGGUCCUUGGGAAUUUUGtt (sense)  
 (5'-3') CAAAUUCCCAAGGACCACtc (antisense)

*pre-designed siRNA* Nr. 144650: IGF-1R (human)

Sequenz= GCACCCUUUAAGAAUGUCAtt (sense)  
 (5'-3') UGACAUUCUAAAAGGGUGCtt (antisense)

#### 3.14.3 Kontroll-siRNA (GL2, Dharmacon)

Sequenz= CGUACGCGGAAUACUUCGAtt (sense)  
 (5'-3') UCGAAGUAUCCGCGUACGtt (antisense)

#### 3.14.4 siRNA *silencer select* (Ambion, Applied Biosystems)

validierte siRNA Nr. s32717: CAMK1D

Sequenz= CCAUCGGAGUGAUUGCCUAtt (sense)  
(5'-3') UAGGCAAUCACUCCGAUGGac (antisense)

validierte siRNA Nr. s11094: PRKCA

Sequenz= GGCUGUACUUCGUCAUGGAtt (sense)  
(5'-3') UCCAUGACGAAGUACAGCCga (antisense)

validierte siRNA Nr. s14077: TGFBR2

Sequenz= CCAGCAAUCCUGACUUGUUt (sense)  
(5'-3') AACAAAGUCAGGAUUGCUGGtg (antisense)

#### 3.15 Software

AIDA	Raytest (Kanada)
ArrayVision	Imaging Research (USA)
BASreader	Raytest (Kanada)
BD CellQuest™ Pro Version 4.0.2	Beckton Dickinson (USA)
DNAStar Paket	DNASTAR, Inc. (USA)
WorklistManager Version 3.3	Beckton Dickinson (USA)

## 4. Methoden

### 4.1 Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 Arbeiten mit DNA

##### ***Herstellung kompetenter Zellen***

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Chung und Miller (Chung und Miller, 1993). Die kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Transformationsfrequenz lag zwischen 10<sup>5</sup> und 10<sup>7</sup> Kolonien/µg DNA.

##### ***Transformation von kompetenten Bakterien***

Zur Transformation von *E. coli* wurde 1 µl Plasmid-DNA verwendet, zu dem 20 µl 5x KCM-Lösung (500mM KCl, 150mM CaCl<sub>2</sub>, 250mM MgCl<sub>2</sub>), 79 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetaute *E.coli*-Bakterien pipettiert wurden. Der Ansatz wurde daraufhin 20min auf Eis und anschließend 10min bei RT inkubiert, dann mit 1ml LB-Medium (enthält Ampicillin) versetzt und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 250µl des Reaktionsansatzes auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Um ausreichend Plasmid-DNA zu generieren, wurden am nächsten Tag Kolonien gepickt und damit jeweils 5ml LB-Ampicillin angeimpft. Die Kultur wurde dann 3-4h bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis eine ausreichende Trübung erreicht war. Schließlich wurden mit dieser Vorkultur weitere 500ml LB-Ampicillin Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dann die Aufreinigung der Plasmid-DNA durchgeführt.

##### ***Plasmid-Aufreinigung***

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

##### ***Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren***

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (DNA und RNA) erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (*Thermo Scientific*, Nanodrop) bei einer Wellenlänge von 260nm.

### **Agarose-Gel-Elektrophorese**

Abhängig von der Größe des DNA-Fragmentes erfolgte die elektrophoretische Auftrennung mit 1-2%igen horizontalen Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid versetzt waren. Für die Elektrophorese wurde TAE Puffer verwendet. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen eines 6-fach konzentrierten DNA-Auftragspuffers versetzt. Als Größenstandard wurde die 1kb DNA- Leiter von *Gibco* (Smart Ladder) aufgetragen, mit dessen Hilfe die Größe der linearisierten DNA- Fragmente ermittelt werden konnte. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 4-10V pro cm Gel. Die DNA Banden wurden auf einem Transilluminator (UVP) mittels der Ethidiumbromid-Fluoreszenz unter UV-Licht ( $\lambda = 302\text{nm}$ ) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Orangefilters fotografiert (*Polaroid 667*).

#### **4.1.2 Makro-Array-Analyse**

Die Makroarrays bestehen aus Nylonmembranen, auf denen Sonden von etwa 1200 Genen aufgebracht sind. Die Sonden bestehen aus pBluescript Plasmiden, die Sequenzen der entsprechenden Gene mit einer Länge von 200bp bis 4000bp enthalten. Jede Gensonde ist dreimal aufgetragen und für viele Gene befinden sich zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen desselben Gens auf der Membran. Das ebenfalls aufgetragene leere pBluescript-Plasmid diente als Negativkontrolle. Durch die Mehrfachbestimmung der Expression jedes einzelnen Gens kann die Zuverlässigkeit der Daten gesteigert werden. Das Aufbringen der Sonden auf die Nylonmembranen erfolgte mit einem GeneTAC™G3- Roboter (Genomic Solutions, USA). Durch Erhitzen der Membranen im Vakuum (2h bei 80°C) wurden die Sonden fixiert. Bei der Auswahl der Gene, die mit der Makroarray-Analyse untersucht werden sollten, wurde der Schwerpunkt auf Signalmoleküle gelegt. So sind auf den Arrays Sonden von 98 Tyrosinkinasen, 429 Serin/Threoninkinasen und 157 Proteinphosphatasen aufgetragen.

### **RNA-Isolierung**

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Pro Zelllinie wurden mindestens zwei 15cm Schalen mit 600µl RLT (+ 6µl  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert. Vor der Lyse wurden die Platten mit PBS gewaschen. Das Lysat wurde mit Hilfe einer QiaShredder-Säule homogenisiert. Die Elution der RNA erfolgte mit 35µl RNase-freiem Wasser. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **cDNA-Synthese**

Zur Synthese der cDNA wurden ein Oligo-dT-Primer, der an das 3'-Ende der mRNA bindet (K1, Clontech Inc.) und ein „SMART“-Primer, der an die 5'-terminale CAP-Struktur der mRNA bindet (K2, Clontech Inc.), verwendet. Dabei erfolgte nur eine Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges.

Die cDNA-Synthesereaktion wurde wie folgt angesetzt:

- 5µg Gesamt-RNA wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 7,5µl eingestellt
- Zugabe von 1µl Primer K1 und 0,5µl Primer K2
  
- Inkubation: 3min bei 70°C – danach auf Eis abkühlen lassen
  
- Zugabe von:
  - 4µl AMV-RT-Puffer (5x)
  - 2µl dNTPs (10mM)
  - 2µl AMV Reverse Transkriptase
  
- Inkubation: 3h bei 42°C – auftragen von 10µl cDNA auf ein 1,5 %iges Agarosegel
  
- Abstoppen der Synthesereaktion durch Zugabe von:
  - 10µl 1N NaOH (20min bei 68°C)
  
- zum Neutralisieren Zugabe von:
  - 5µl 2N HCl
  - 5µl 2M Tris-HCl (pH 7.5)

#### ***cDNA-Reinigung***

Die Reinigung der cDNA erfolgte mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen). Die Elution erfolgte mit 30µl Elutionspuffer. Anschließend wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### ***Denaturierung der Plasmid DNA und Drucken der Filter***

Nach einer einstündigen Inkubation der Plasmid-DNA bei 37°C wurden jeweils 100µl aliquotiert. Dann wurde die DNA für 10min bei 100°C denaturiert. Nach 10min Inkubation bei 4°C wurden 11µl 5M NaOH hinzugegeben und das Gemisch für 10min bei RT inkubiert. Nach der abschließenden Zugabe von 6µl 7,4M NH<sub>4</sub>OAc (pH 5.3) und 60µl 20x SSC mit Bromphenolblau wurde die Plasmid-DNA in DNA-Racks überführt. Schließlich wurden die Plasmide in 96-well-Platten aliquotiert und mit Hilfe eines Roboters auf die Filter gedruckt. Nach dem Druck wurden die Filter unter Vakuum für 90min bei 80°C gebacken.

#### ***Prehybridisierung***

Die Filter wurden mit Waschpuffer 1 (20x SSC, 5x End, 10%SDS) für 30min bei 68°C in den Hybridisierungsgefäßen gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Waschpuffer abgegossen und 10ml vorgewärmter Pre-Hybridisierungs-Puffer mit tRNA (100µg/ml, Böhlinger) auf den Filter gegeben. Die Inkubation erfolgte rotierend für 16h bei 68°C.

**Markierung der cDNA**

Die cDNA (7,5µl) wurde zusammen mit den Primern (2,5µl) und Wasser (2,5µl) für etwa 5-10min aufgeköcht und dann für 5min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 8,5µl dNTP-Mix (ohne dATP) hinzugegeben. Schließlich wurden 1,5µl Klenow-Polymerase und 50µCi radioaktiv-markiertes ATP ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP) hinzugefügt und das Gesamtgemisch für 2-4h bei 37°C inkubiert.

**Reinigung der markierten cDNA**

Die Reinigung der markierten cDNA erfolgte mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen. Dazu wurden zur cDNA 250µl PN-Puffer gegeben und vermischt. Alle weiteren Schritte erfolgten laut dem Protokoll des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 152µl Elutionspuffer direkt in den COT-DNA-Mix, der sich aus 40µl 20xSSC, 2µl 10% SDS und 5µl COT-DNA zusammensetzte.

**Denaturierung und Hybridisierung mit der Sonde (=markierte cDNA)**

Zunächst wurden 5-10ml Hybridisierungspuffer und tRNA bei 70°C im Wasserbad erwärmt. Parallel dazu wurde die Sonde für 5-10min bei 100°C und anschließend für 30min bei 68°C im Radioaktiv-Labor inkubiert. Nach dem Entfernen des Pre-Hybridisierungspuffers wurden 5ml vorgewärmter Hybridisierungspuffer mit der tRNA (*Böhringer*) und der denaturierten Sonde auf den Filter im Hybridisierungsgefäß gegeben und bei 68°C über Nacht inkubiert.

**Waschen und Belichtung**

Nach dem Entfernen des Hybridisierungspuffers mit der Sonde wurde der Filter dreimal mit 5ml Waschpuffer 1 (vorgewärmt auf 42°C) gespült. Anschließend folgten drei weitere Waschschrirte:

- 20min mit Waschpuffer1 (42°C)
- 20min mit Waschpuffer2 (42°C)
- 60min mit Waschpuffer2 (65°C).

Danach wurden die Filter mit Wasser abgspült, getrocknet und auf Phosphoimagerplatten (*Fuji, Japan*) zwischen 48h und 72h exponiert.

### Auswertung

Die exponierten Phosphoimagerplatten wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fuji BAS 2500, Fuji, Japan) und der zugehörigen Software „BASreader- ( Raytest, Kanada) eingelesen. Mit dem Programm „AIDA“ (Raytest, Kanada) wurden die Bilddateien für die weitere Verarbeitung vorbereitet. Die Umsetzung der Bilddateien in zu verrechnende Werte erfolgte mit dem Programm „ArrayVision“ (Imaging Research, USA). Das Programm errechnet für jeden Punkt des Arrays einen Wert, der die Stärke der Schwärzung ausdrückt. Außerdem wurde von jedem Wert der unspezifische Hintergrund in der Umgebung der Punkte abgezogen und jedem Punkt das entsprechende Gen zugeordnet. Die Daten wurden anschließend in Microsoft Excel exportiert und dort weiter prozessiert (Abb.10).

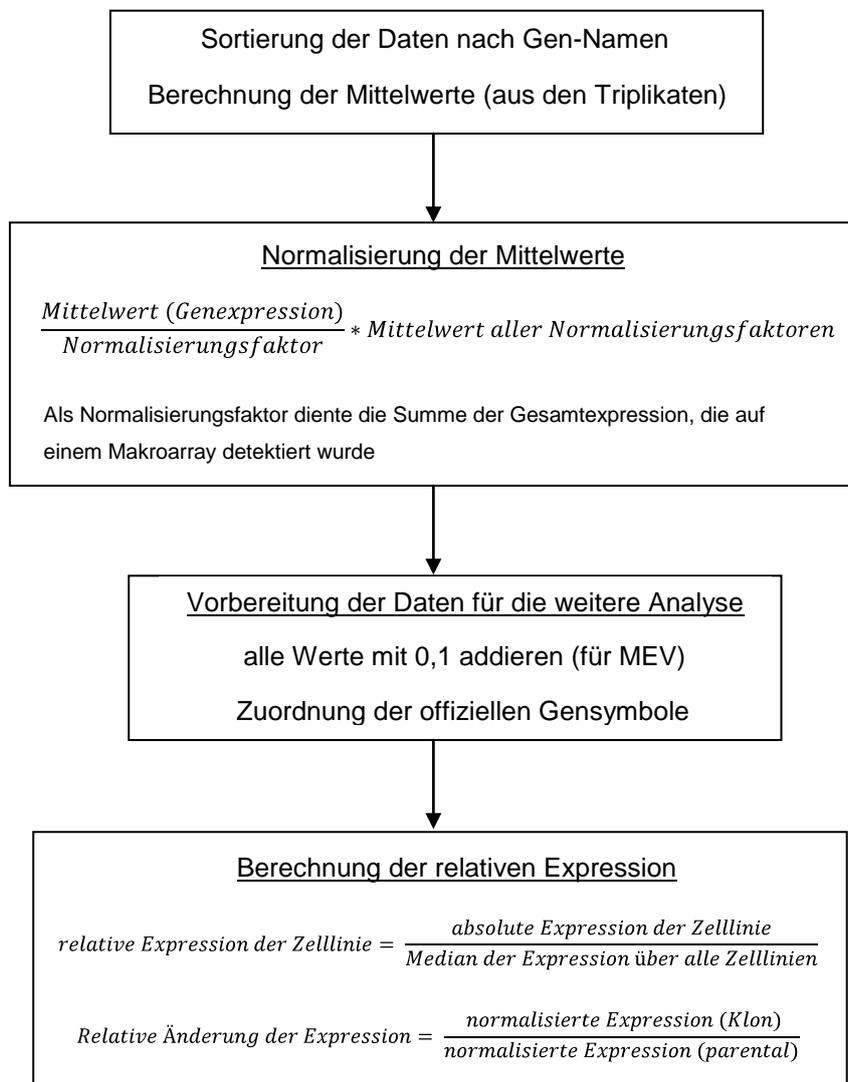


Abbildung 10: Vorgehensweise bei der finalen Datenprozessierung in Excel

### 4.1.3 Quantitative Real-Time-PCR

Um die relative Genexpression zu bestimmen, wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt (*StepONE Real-Time PCR Systems, Applied Biosystems*). Dafür wurden hydrolysierende TaqMan<sup>®</sup>-Sonden verwendet. Der proportionale Zusammenhang zwischen der entstehenden Fluoreszenz und der Menge des gebildeten PCR-Produktes ermöglicht dabei eine direkte Quantifizierung der Zielsequenz.

#### **Hydrolysierende TaqMan<sup>®</sup>-Sonden**

TaqMan<sup>®</sup>-Sonden sind Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende einen Quencher tragen, der die Emission des Reporters unterdrückt. Während der PCR wird die Sonde durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase von der Zielsequenz verdrängt. Durch die Trennung vom Quencher beginnt der Reporter-Farbstoff zu fluoreszieren. Der daraus resultierende Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte (Abb.11).

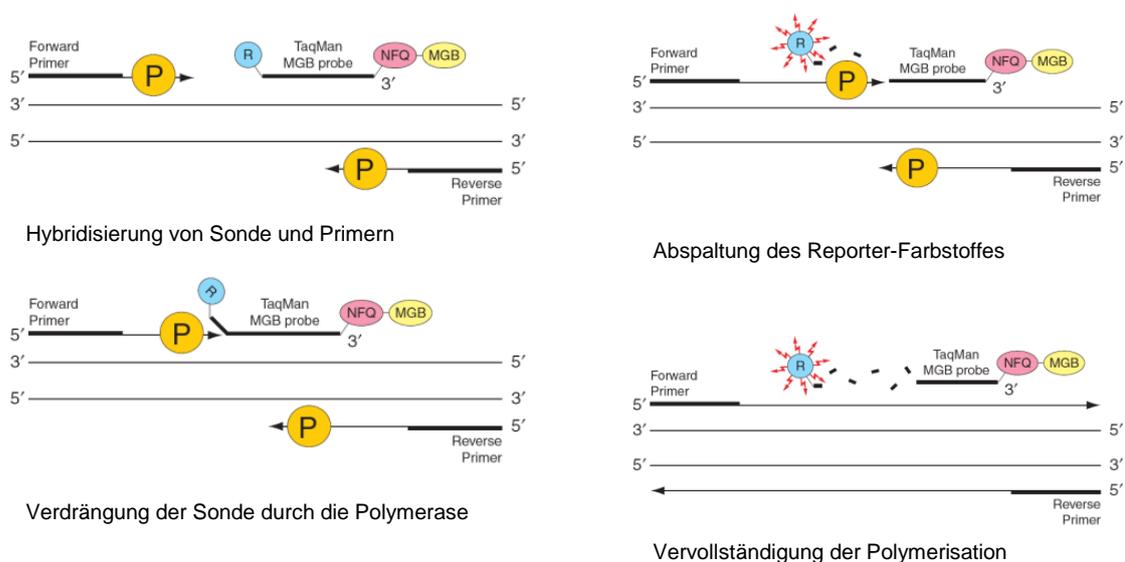


Abbildung 11: Prinzip der Real-Time PCR mit TaqMan<sup>®</sup>-Sonden

#### **Durchführung der qRT-PCR**

Die PCR wurde in einer 96-Well-Platte (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, *Applied Biosystems*) durchgeführt. Pro 20µl Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

- 10µl TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix (*Applied Biosystems*)
- 1µl Assay Mix (*Applied Biosystems*)
- 2µl cDNA (1:10)
- 7µl Wasser

Der Assay-Mix enthält sowohl eine sequenzspezifische Sonde, als auch ein sequenzspezifisches Primerpaar.

Vor Beginn der PCR wurde die 96-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und für eine Minute bei 1500rpm zentrifugiert.

Die PCR erfolgte für alle Proben und Zielgene nach folgendem Schema:

- Vorbereitung: 2min bei 50°C
- Denaturierung: 10min bei 95°C
- Amplifikation: 15sek bei 95°C und 1min bei 60°C; 40 Zyklen

### **Quantifizierung**

Zur Quantifizierung wird der Beginn der exponentiellen Phase der PCR herangezogen, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Dabei wird der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als C<sub>T</sub>-Wert (Cycle Threshold = „Schwellenwert-Zyklus“) bezeichnet (Saiki et al, 1985). Die Expression des Zielgenes wird mit einem Referenzgen (GAPDH) normalisiert.

Die Berechnung der relativen Expression erfolgte nach folgender Formel:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (Kontrolle-Probe)}}$$

R= relative Expression      E= Effizienz der PCR (in Vorversuchen wurde ein Wert von 1,9 ermittelt)  
 $\Delta C_T$ = Differenz der C<sub>T</sub>-Werte von Kontrolle und Probe (Kontrolle: WT-cDNA, Probe: cDNA der insensitiven Klone)

Die Berechnung der Knockdown-Effizienz (E<sub>KD</sub>) erfolgte nach folgender Formel:

$$E_{\text{KD}} = 100 - \left( \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{ Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{ Referenzgen (Kontrolle-Probe)}}} * 100 \right)$$

## 4.2 Methoden der Zellkultur (Säugetierzellen)

### 4.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (*Heraeus, HERAcell 150*) bei 7% CO<sub>2</sub>, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (*Heraeus, Laminair*) durchgeführt.

Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des Coulter-Counters ZM der Firma Coulter.

### 4.2.2 Mykoplasmentest

Eine Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt daher zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6cm-Schalen wurden deshalb routinemäßig mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

### 4.2.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien

Die vorbehandelten, polyklonalen, 4D5-insensitiven Brustkrebszelllinien wurden durch serielle Verdünnungen auf 15cm Platten ausgesät. Die dadurch vereinzelt Zellen wurden solange in Gegenwart von 4D5 kultiviert, bis sie zu Kolonien von ca. einem halben Zentimeter Durchmesser herangewachsen waren. Danach wurden die Klone gepickt und einzeln in 48-well-Platten überführt.

#### 4.2.4 Calcium-Phosphat-Transfektion

Die Zellen wurden in 6cm Schalen ausgesät und nach 24h bei einer Konfluenz von ca. 70% transfiziert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll von Chen und Okayama (Chen and Okayama, 1987). Bei diesem Protokoll bilden sich die Calcium-Phosphat-DNA-Komplexe graduell im Medium während der Inkubation mit den Zellen.

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Transfektionsmixes (6cm Schale)**

Ansatz	1x	2x	3x
CaCl <sub>2</sub>	20µl	44µl	66µl
DNA	10µl	22µl	33µl
TE	170µl	374µl	561µl
HEPES-S	200µl	440µl	660µl

Das HEPES-S wurde tropfenweise zu der Mischung aus CaCl<sub>2</sub>, DNA und TE gegeben. Danach wurde der Mix auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann über Nacht bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 3% inkubiert.

#### ***Bestimmung der Transfektionseffizienz***

Bei diesem Test wurden Säugerzellen mit einem Expressionsplasmid für das Grün-Fluoreszierende-Protein (GFP), wie bereits beschrieben, transfiziert. Die Zellen wurden dann 48h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, um den prozentualen Anteil der GFP-exprimierenden Zellen zu bestimmen.

#### 4.2.5 Retroviraler Gentransfer in humane Brustkrebszellen (Pear et al., 1993)

Für die Produktion des retroviralen Überstandes wurden Phoenix-A-Zellen mit den pLXSN-Konstrukten mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Um die Effizienz der Transfektion zu erhöhen, wurde zudem Chloroquin (50µM) zu den Zellen hinzugegeben. Am Tag der Transfektion wurden außerdem die Zielzellen in einer 6-Well-Platte ausgesät.

Einen Tag nach der Transfektion wurde der retrovirale Überstand dreimal im Abstand von 3h geerntet. Die Überstände wurden filtriert (0,45µm filter), mit Polybrene (8µg/ml) versetzt und direkt auf die Zielzellen (BT474, SKBR3 und MDA-MB-453) gegeben.

Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zielzellen für zwei Wochen mit G418 (1mg/ml) selektioniert.

#### 4.2.6 siRNA-Transfektion

Die reverse Transfektion von doppelsträngigen siRNA-Konstrukten erfolgte mit Hilfe der Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMax von Invitrogen. Dazu wurden die Zellen zusammen mit einem vorinkubierten Gemisch aus siRNA (20µM) und RNAiMax in OptiMEM-Medium ausgesät. Um den Zellen die Adhärenz zu erleichtern, enthielt das Medium 1% FCS. Nach 4h wurde die FCS-Konzentration auf 10% erhöht, um über Nacht ein normales Wachstum zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder für einen Proliferationsassay ausgesät (von der 6cm-Schale) oder für die spätere Aufnahme des DNA-Profiles mit Antikörpern behandelt (12-well-Platte). Ein Teil der Zellen aus der 6cm-Schale wurde jeweils weiterkultiviert und diente am Ende des Versuches zur Kontrolle der Knockdown-Effizienz. Alle anderen Knockdown-Effizienzen wurden in separaten Vorversuchen ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit GL2-siRNA transfiziert und im weiteren Versuch mitgeführt.

**Tabelle 8: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für eine 6cm Schale bzw. ein 12-well**

	Volumen (Zellen)	Volumen (RNAi-Mix)	Lipofectamine RNAiMax	siRNA (20µM)
6cm Kulturschale	2ml	1ml	5µl	3µl
12-well-Platte (pro well)	350µl	250µl	2µl	1µl

#### 4.2.7 Analyse des Zellzyklus durch Propidiumiodid-Färbung

Bei der Propidiumiodid-Färbung nach Nicoletti et al (Riccardi and Nicoletti, 2006) wird die Zellmembran mit Hilfe eines hypotonen Puffers (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton-X-100, 20µM Propidiumiodid) permeabilisiert, so dass das Propidiumiodid in die Zelle eindringen und dort im Zellkern die DNA anfärben kann. Danach wird per Durchflusszytometrie im FL2-Kanal ein Profil des DNA-Gehalts erstellt.

Mit Hilfe der Propidiumiodid-Färbung kann so ermittelt werden, in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zellen zum Zeitpunkt der Messung befinden. Zudem lässt sich eine qualitative Aussage darüber treffen, ob die Zellen in Apoptose gegangen sind.

Zunächst wurden die Zellen in einer 12-Well-Platte ausgesät und mit einer IGF-1R- (Nr.144650, *Ambion*) bzw. Kontroll-siRNA (GL2, *Dharmacon*) transfiziert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10µg/ml 4D5 behandelt. Nach weiteren 72h wurden die Zellen mit Trypsin von der Platte gelöst und anschließend in ihrem Überstand resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (2000rpm, 5min) wurden diese in 500µl PI-Puffer (0,1% Na-Citrat, 0,1% Triton-X-100, 20µM Propidiumiodid) resuspendiert.

Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei 4°C im Dunkeln erfolgte die Aufnahme des DNA-Profiles der Zellen am Durchflusszytometer (*BD FACSCalibur* - *BD Biosciences*). Die Quantifizierung der Zellzyklus-Phasen erfolgte mit Hilfe der CellQuestPro-Software (*BD Biosciences*).

#### 4.2.8 Indirekte Durchflusszytometrie zur Zelloberflächenfärbung

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Oberflächenexpression von Rezeptoren der HER-Familie ermittelt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 10mM EDTA abgelöst und mit PBS+3%FCS auf eine Konzentration von 1,25 Mio. Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 200µl der Zellsuspension (= 250.000 Zellen) für 30min bei 4°C mit dem primären Antikörper (10µg/ml in PBS/FCS) inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit eiskaltem PBS/FCS erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem PE-gekoppelten sekundären Antikörper (1:1000 in PBS/FCS) bei 4°C. Nachdem die Zellen von ungebundenem, sekundärem Antikörper durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS/FCS befreit wurden, erfolgte die Aufnahme des Fluoreszenzprofils am Durchflusszytometer im FL2-Kanal bei 585nm. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software CellQuestPro (BD Biosciences). Um die relative Expression zu bestimmen, wurde der Quotient aus den geometrischen Mittelwerten der spezifischen (primärer und sekundärer Antikörper) und unspezifischen (nur sekundärer Antikörper) Färbung berechnet.

$$\text{Steigerung der Expression} = \frac{[\text{Mittelwert (spez. Färbung)} - \text{Mittelwert (2. AK)}] \text{ der WT - Zellen}}{[\text{Mittelwert (spez. Färbung)} - \text{Mittelwert (2. AK)}] \text{ der inf. Zellen}}$$

#### 4.2.9 Proliferations-Assay (MTT-Färbung)

Um die Hemmung der Proliferation durch 4D5 bzw. Herceptin® quantitativ zu bestimmen, wurde eine Färbung mit MTT durchgeführt. MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, welches von Zellen mit Hilfe ihrer mitochondrialen Dehydrogenase in wasserunlösliches MTT-Formazan umgewandelt wird. Diese blauen Kristalle werden innerhalb der Zellen angereichert, da sie nicht durch die Membran diffundieren können. Erst durch die Zugabe einer Detergenz (SDS) werden die Kristalle freigesetzt. Durch den ebenfalls im Stopp-Puffer enthaltenen Alkohol (2-Butanol) gelangen die freien Kristalle in Lösung. Da die Zunahme des Farbstoffes mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen korreliert, kann man aus der Färbung Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten einer Zellpopulation ziehen. Die Intensität der Färbung wurde bei 570nm (ref. 630nm) mit einem Spektrometer (*ELISA Reader, Dynatech*) gemessen.

Zunächst wurden die Zellen in einer 48-well-Platte in einer der Zelllinie angepassten Dichte und einem Volumen von 250µl ausgesät (siehe Tabelle 9). Nach 24h erfolgte die Behandlung der Zellen mit Herceptin® oder 4D5. Nach weiteren 72h wurde die MTT-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 50µl einer MTT-Lösung (5mg/ml in PBS) direkt ins Medium gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit der Zugabe von 150µl Stopp-Puffer abgestoppt. Nach 8h Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570nm gemessen. Als Hintergrund wurde Medium ohne Zellen gemessen. Jeder Versuch wurde mindestens zweimal unabhängig und in Triplikaten durchgeführt.

**Tabelle 9: Zelldichten bei der Aussaat des MTT-Assays**

Zelllinie	Dichte bei der Aussaat (Anzahl der Zellen/well)
MCF10A	400
BT549, Hs578T, MDA-MB-231	3.000
BT20	4.000
MCF7, MDA-MB-435S, MDA-MB-436, MDA-MB-468, SKBR3, T47D	5.000
MDA-MB-361	7.000
BT474, BT483, MDA-MB-175VII, MDA-MB-453, ZR-75-30	10.000
MDA-MB-157	12.000
DAL	15.000
MDA-MB-415	15.000

Zur Validierung wurde entweder die Hemmung der Proliferation ( $H_P$ ) oder die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ( $P_K$ ) nach folgenden Formeln berechnet:

$$H_P = \frac{MW1 - MW2}{MW2} * 100 \quad P_K = 100 - H_P$$

mit MW1= Mittelwert aus den Absorption (570nm) der behandelten Zellen  
mit MW2= Mittelwert aus den Absorption (570nm) der unbehandelten Zellen

### 4.3 Protein-analytische Methoden

#### 4.3.1 Stimulation und Zellyse mit Triton X-100

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen 24h in serumfreiem Medium gehungert und anschließend für 10min im 37°C-Inkubator mit Liganden inkubiert.

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 10% Glycerin, 1mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert.

Zusätzlich wurden dem Lysepuffer vor der Verwendung frisch zugegeben:

- 10µg/ml Aprotinin
- 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
- 10mM Natriumfluorid (NaF)
- 2mM Natriumorthovanadat, pH 10 ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )

Natriumfluorid und Natriumorthovanadat sind zwei Phosphataseinhibitoren, die eine Dephosphorylierung der Proben verhindern. PMSF und Aprotinin dagegen sind Proteaseinhibitoren, die einer möglichen Proteindegradation entgegen wirken.

Nach 10min Lyse auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (10min, 13.000rpm, 4°C) konnten unlösliche Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett abgetrennt werden. Der Überstand, der alle zytosolischen und die meisten membranständigen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und entweder zur Immunpräzipitation weiterverwendet oder als Gesamtlysate benutzt.

#### 4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellysaten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysate erfolgte mit dem „Micro BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, Sankt Augustin) nach den Angaben des Herstellers.

### 4.3.3 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus dem Gesamt-Zelllysate dienen spezifische, an Protein-A- oder G-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sogenannte Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes - Antikörper und Protein - erleichtert (Chenais *et al.*, 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30µl Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und 1-5µl monoklonaler Antikörper oder 3-10µl polyklonaler Antikörper zu den Zelllysaten gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 5000rpm (1min, 4°C) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Kanüle abgesaugt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit eiskaltem Lysepuffer gewaschen und in 50µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 5min bei 95°C aufgeköcht, um den Immunkomplex von der Protein-Sepharose zu lösen, und anschließend für 1min abzentrifugiert.

### 4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamid-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergens SDS (**S**odium**d**odecyl**s**ulfat) werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Die Proteine erhalten zugleich eine negative Ladung, die nicht von ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung abhängt. Somit wird ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt. Weiterhin ist das im Laemmli-Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol dafür verantwortlich, dass die intra- und intermolekulare Disulfidbrücken der Proteine reduziert werden. So kommt eine Denaturierung der Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur zustande. Es wurden stets vertikale Gelapparaturen (Atto Cooperation, Japan) verwendet. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele gegossen. Über die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde, wie von Sambrook *et al.* beschrieben, durchgeführt (Sambrook, 1990). Sie erfolgte über Nacht bei einer Stromstärke von 5mA (pro Gel).

Als Molekulargewichtsstandard wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

<u>Protein</u>	<u>kDa</u>	<u>Protein</u>	<u>kDa</u>
Myosin	205,0	Ovalbumin	42,7
$\beta$ -Galaktosidase	116,3	Carboanhydrase	29,0
Phosphorylase b	97,4	Trypsin-Inhibitor	21,5
BSA	66,2	Lysozym	14,4

#### 4.3.5 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1% Coomassie R250, 10% Essigsäure, 40% Methanol) 15min gefärbt und dann mit 40% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit Wasser getränkte Zellophanfolien gelegt, aufgespannt und für 3h mittels eines warmen Luftstromes getrocknet.

#### 4.3.6 Vertikaler Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni and Palade, 1982). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 3h bei  $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$  Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, BA 85) auf einer "Semidry"-Blotapparatur.

#### 4.3.7 Ponceau S-Färbung der Nitrozellulosemembran

Nach dem erfolgten Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden diese für 1min mit einer Lösung des roten Farbstoffs Ponceau S (2g/l in 2% (w/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Unspezifisch angefärbte Bereiche der Nitrozellulose wurden mit destilliertem Wasser entfärbt, damit die Banden des Proteinmarkers, der zur Immunpräzipitation eingesetzten Antikörper oder der Proteine des Zelllysats sichtbar wurden. Dies diente neben dem Fixieren der Proteine auf der Membran zum einen dazu die „Markerbanden“ mit wasserfestem Kugelschreiber einzuzeichnen, zum anderen, um anhand der Antikörperbanden abzuschätzen, ob gleiche Mengen Protein aufgetragen worden waren. Die Nitrozellulose wurde dann durch mehrmaliges Waschen in 1x NET-Gelatine (0,25% Gelatine in 1 x NET) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulose abgesättigt.

#### 4.3.8 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Verfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen primären Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch einen sekundären Antikörper erkannt werden, welche an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ (*PerkinElmer*).

Die Inkubation mit dem Primäantikörper erfolgte über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach dreimaligem Waschen mit NET-Gelatine (0,25% Gelatine in 1x NET) für jeweils 20min wurde die Membran für 60min bei RT mit dem sekundären Antikörper (in NET-Gelatine) inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte speziesspezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (*PerkinElmer*) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal für 20min mit NET-Gelatine gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran 1min in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

ECL ist ein nicht radioaktives System zur Detektion von spezifischen Antigenen auf einer stationären Phase. Die wesentlichen Komponenten des Systems sind Luminol und Wasserstoffperoxid, die in Anwesenheit von speziellen "Enhancern" (z.B. Phenol) eine Lumineszenz-Reaktion eingehen. Durch die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase werden cyclische Diacylhydrazide wie Luminol im Alkalischen oxidiert. Das durch die Chemilumineszens ausgesendete Licht (Maximum bei  $\lambda = 428\text{nm}$ ) kann anschließend durch Exposition der mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckten Membranen auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Das Maximum der Licht-Emission ist bei 5-20min erreicht und klingt mit einer Halbwertszeit von etwa 60min ab. Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch eine Inkubation in "Strip"-Puffer (62,5mM Tris/HCl pH 6.8, 100mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% SDS) bei 50°C für 30min in einem Warmwasserschüttler entfernt werden. Danach muss das  $\beta$ -Mercaptoethanol durch intensives Waschen mit NET-Gelatine für mindestens 4h vollständig entfernt werden, bevor die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden kann.

#### 4.3.9 Aufreinigung des murinen monoklonalen Antikörpers 4D5

##### ***Gewinnung der Hybridomüberstände***

Nach dem Auftauen der Hybridomzellen wurden diese auf 30 konfluente 15cm Petrischalen expandiert. Dann wurde ein vollständiger Medienwechsel vorgenommen und die Zellen in 20ml Medium inkubiert. Nach 5 Tagen wurden weitere 10ml hinzugefügt. Nach insgesamt 10 Tagen Antikörperproduktion wurde die Zellsuspension geerntet und abzentrifugiert (10min, 5000rpm). Der Überstand wurde gefiltert (0,2 $\mu\text{m}$  Filter) und mit  $\text{NaPO}_4$  auf einen pH-Wert von 7.0 eingestellt.

##### ***Aufreinigung monoklonaler Antikörper per FPLC***

Die Reinigung der Antikörper erfolgte per FPLC (= fast performing liquid chromatography) an der Äkta (*Amersham Biosciences*). Mit Hilfe dieser Methode lassen sich Proteine über Affinitätschromatographie von ungewünschten Nebenprodukten befreien. Das bedeutet, das zu reinigende Protein bindet an eine Chromatographiesäule (hier bestehend aus Protein-G-Sepharose), während die flüssige Phase und andere Moleküle die Säule passieren, ohne dabei an die Matrix zu binden. Nachdem die Säule durch Waschen von nicht-gebundenen Molekülen gesäubert wurde, können die Proteine mit einem geeigneten Elutionspuffer von der Säule gelöst und gesammelt werden.

Zu Beginn wurde die gesamte Anlage mit Bindepuffer und Eluierungspuffer equilibriert. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose Säule (*Amersham Biosciences*) solange mit Bindepuffer gewaschen (4ml/min), bis eine Basislinie erreicht war. Dann wurde die Säule mit ca. 900ml Hybridomüberstand beladen, wobei die Flussrate (0,6-1ml/min) so gering wie möglich gehalten wurde.

Nach dem Probenauftrag wurde die Säule mit Bindepuffer gewaschen (1ml/min), bis die Absorption wieder auf eine Basislinie sank. Anschließend erfolgte die Elution mit 1ml/min in 1,5ml Eppendorf-Gefäße, die zur sofortigen Neutralisierung bereits 50 µl 1M Tris (pH 8.0) enthielten. Die einzelnen Fraktionen hatten ein Volumen von 0,5ml. Nach dem Auftreten des Peaks wurde noch bis zum Erreichen der Basislinie eluiert. Danach wurde die Säule wieder neutralisiert, zusammen mit dem gesamten System gewaschen und stand somit für die nächste Aufreinigung zur Verfügung.

Bindepuffer (Äkta): 20mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Merck*), pH 7.0

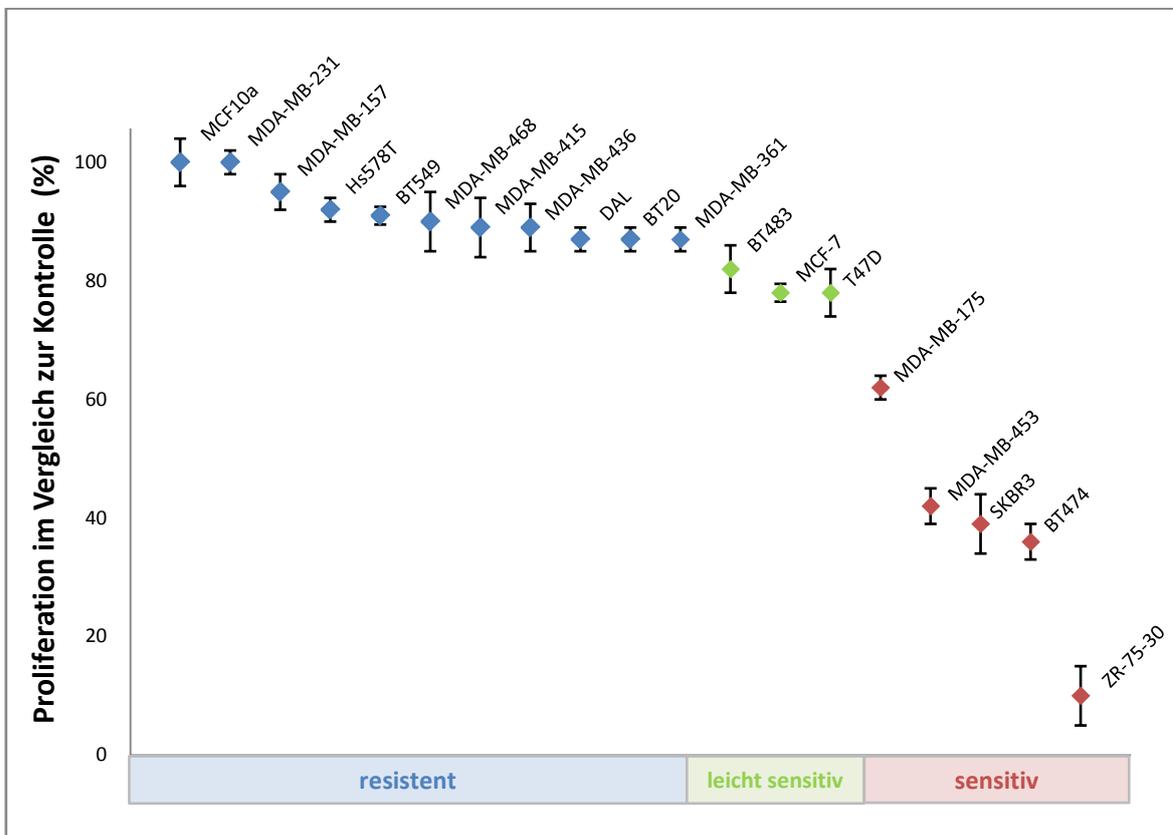
Elutionspuffer (Äkta): 100mM Glycin (*Merck*) / HCl, pH 2.7

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Untersuchungen zur natürlichen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz

#### 5.1.1 Bestimmung der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität von 18 humanen Brustkrebszelllinien

Zur Vorbereitung der Cluster-Analyse, die der Identifizierung von resistenzassoziierten Genen dienen sollte, wurden zunächst 18 humane Brustkrebszelllinien auf ihre Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität hin untersucht (Abb.12). Als Negativkontrolle diente die humane, immortalisierte, aber nicht-transformierte Brustepithelzelllinie MCF10a. Die Einteilung in sensitive und resistente Zelllinien erfolgte mit Hilfe eines Proliferations-Assays (siehe 4.2.9), der eine Quantifizierung der Herceptin<sup>®</sup>-induzierten Proliferationshemmung ermöglichte.



**Abbildung 12: Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien** - Die Zellen wurden 72h lang mit Herceptin<sup>®</sup>-Konzentrationen zwischen 0,01-100µg/ml behandelt und anschließend mit MTT gefärbt. Die Zelllinien sind in der Reihenfolge der maximal erreichten Hemmung aufgetragen. Diese ist als relative Proliferation der behandelten Zellen im Vergleich zu deren unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Je geringer die relative Proliferation der behandelten Zellen, desto sensitiver ist eine Zelllinie. Basierend auf den Werten der relativen Proliferation wurde eine Einteilung in resistente (blau), leicht sensitive (grün) und sensitive (rot) Zelllinien vorgenommen.

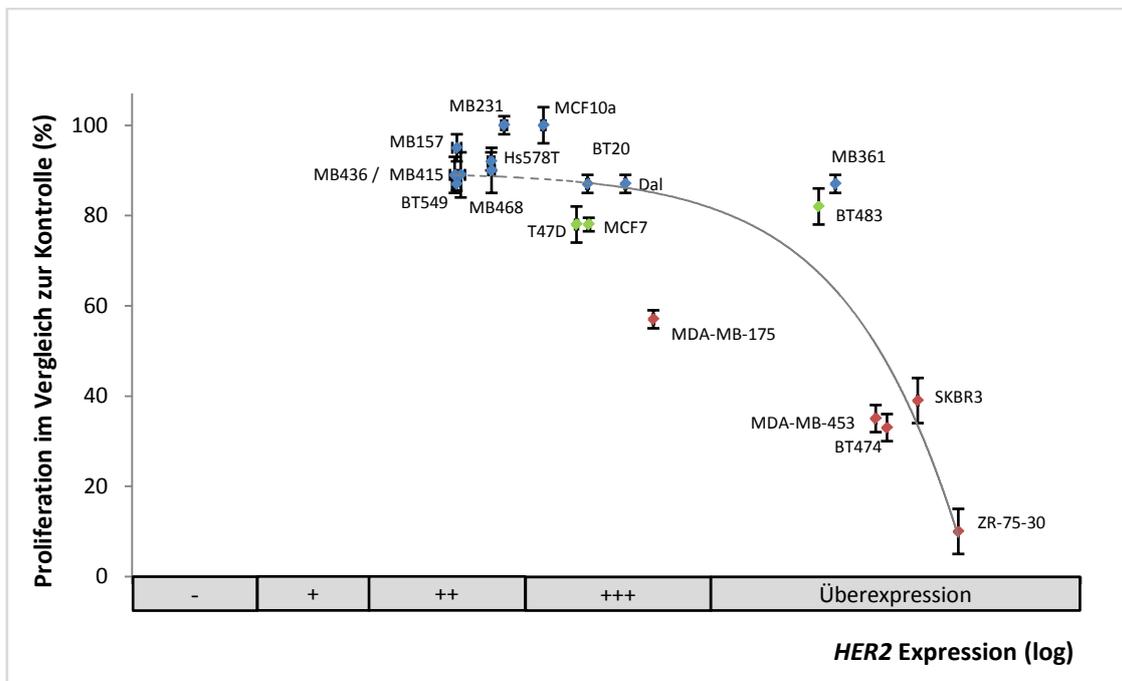
Alle Zelllinien wurden mit Herceptin<sup>®</sup>-Konzentrationen zwischen 0,01 und 100µg/ml (0,01 - 0,1 - 1 - 5 -10 - 50 - 100µg/ml) behandelt. Für die Bewertung der Sensitivität wurde der Wert der maximal erreichten Hemmung herangezogen, unabhängig davon, bei welcher Konzentration diese erreicht wurde. Bei den meisten Zelllinien konnte die maximale Hemmung bereits bei einer Konzentration von 1µg/ml erreicht werden. Oberhalb einer Konzentration von 10µg/ml konnte weder bei den resistenten, noch bei den sensitiven Zelllinien eine weitere Zunahme der Wachstumshemmung bewirkt werden.

Aufgrund der ermittelten Hemmraten erfolgte eine Zuordnung der Zelllinien zu einer der folgenden drei Gruppen: resistent (0-15% Hemmung), leicht sensitiv (15-25% Hemmung) und sensitiv (mehr als 25% Hemmung) (siehe Abb.12).

Der überwiegende Teil der untersuchten Zelllinien einschließlich der Kontrollzelllinie MCF10a war resistent gegenüber Herceptin<sup>®</sup>. Die maximalen Hemmraten lagen innerhalb dieser Gruppe zwischen 0% (MCF10a und MDA-MB-231) und 13% (BT20, BT549 und MDA-MB-361). Drei Zelllinien zeichneten sich durch eine leichte Sensitivität aus, wobei Hemmraten zwischen 18% (BT483) und 22% (MCF7 und T47D) erreicht wurden. Die verbleibenden fünf Zelllinien können als sensitiv betrachtet werden. Die durch Herceptin<sup>®</sup> induzierte Wachstumshemmung lag zwischen 40% (MDA-MB-175VII) und 90% (ZR-75-30).

### 5.1.2 Die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität korreliert mit der *HER2*-Genexpression der untersuchten Brustkrebszelllinien

Da Herceptin<sup>®</sup> ein HER2-spezifischer Antikörper ist, wurde zunächst der Zusammenhang zwischen der *HER2*-Expression und der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit steigender *HER2*-Expression meist auch die in den Zelllinien ermittelte Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität zunimmt (Abb.13). Unter den sechs Zelllinien, die den HER2-Rezeptor überexprimieren, sind vier sensitive (BT474, MDA-MB-453, SKBR3 und ZR-75-30), eine leicht sensitive (BT483) und eine resistente Zelllinie (MDA-MB-361). Bei den Zelllinien mit hoher *HER2*-Expression (+++) ist der Zusammenhang nicht so deutlich, hier sind sowohl eine Herceptin<sup>®</sup>-sensitive (MDA-MB-175VII), zwei leicht sensitive (T47D und MCF7), als auch zwei Herceptin<sup>®</sup>-resistente Zelllinien zu finden (BT20 und DAL). Auf der anderen Seite findet man unter den Zelllinien mit mittlerer *HER2*-Expression (++) ausschließlich solche, die resistent gegenüber Herceptin<sup>®</sup> sind.



**Abbildung 13: Die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien steigt mit zunehmender *HER2*-Expression**  
 Dargestellt ist die relative Proliferation der Herceptin<sup>®</sup>-behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und deren Abhängigkeit von der *HER2*-Expression (logarithmische Skalierung). Die farbliche Markierung repräsentiert den Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivitäts-Status der Zelllinien (blau: resistent, grün: leicht sensitiv, rot: sensitiv). Die gestrichelte Linie stellt eine Regressionsgerade dar.

### 5.1.3 Identifizierung resistenzassoziierter Gene mit Hilfe einer vergleichenden Analyse der Genexpression

Das Ziel der vergleichenden Makro-Array-Analyse sollte es sein, neue Gene zu identifizieren, die im Zusammenhang mit der Herceptin<sup>®</sup>-Ansprechrate einer Zelllinie stehen. Dazu wurde die Expression von etwa 1200 relevanten Genen in den 18 untersuchten humanen Brustkrebszelllinien analysiert und miteinander verglichen. Die Durchführung der Makro-Arrays und die anschließende Datenprozessierung erfolgten wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben.

Für jedes Gen wurde die zellspezifische, relative Expression ermittelt, die sich aus dem Quotienten der Genexpression einer Zelllinie und der mittleren Genexpression aller Zelllinien ergibt. Von den resultierenden Werten der relativen Expression wurde anschließend der duale Logarithmus berechnet. Dieser diente dann als Ausgangswert für die weitere Datenverarbeitung, die mit der Software „Multi Experiment Viewer“ durchgeführt wurde. Der Vergleich der Genexpressionsprofile erfolgte dann mit drei verschiedenen Ansätzen:

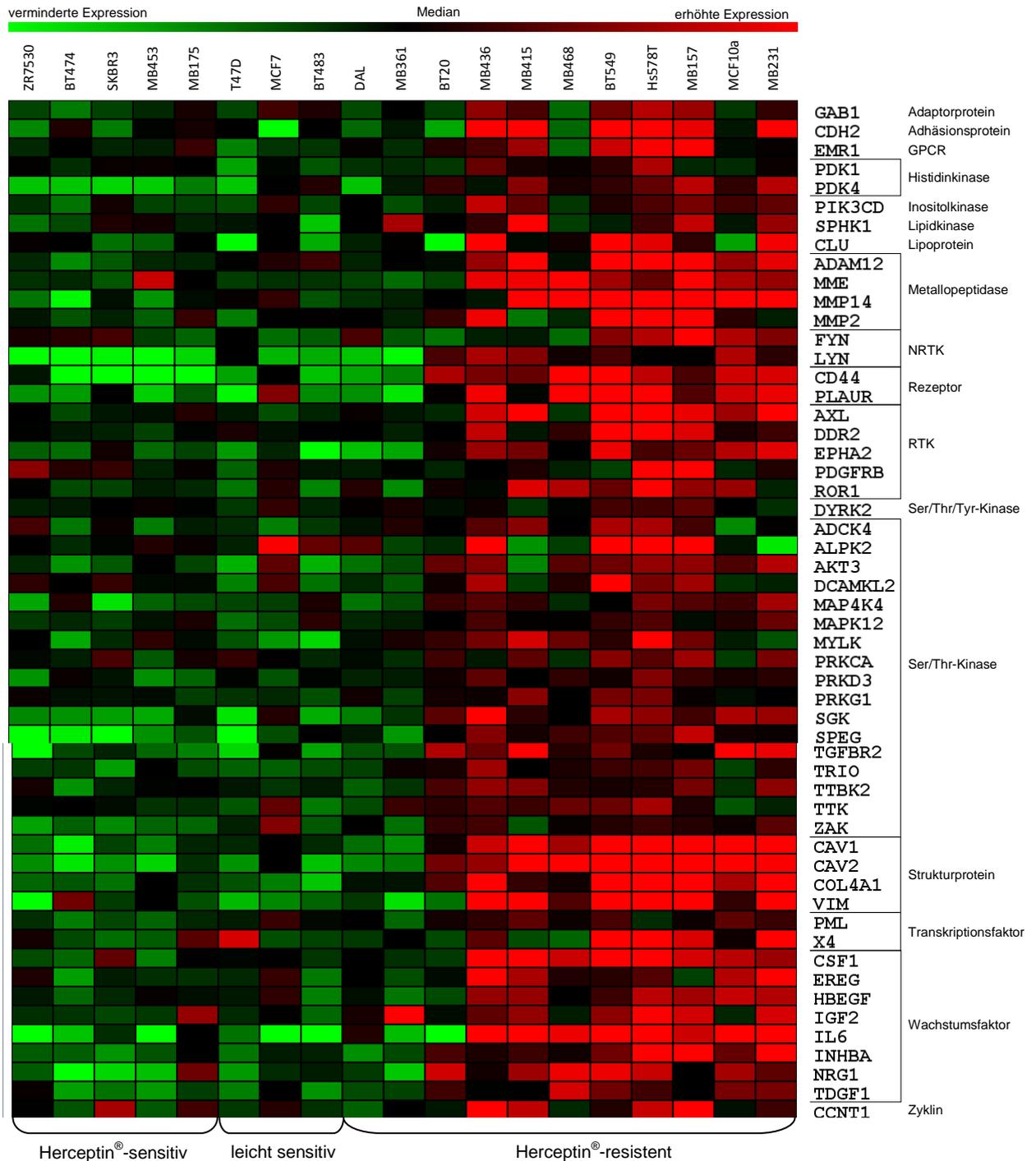
- 1) Gruppierung der Gene mit einer festen Anordnung der Brustkrebszelllinien hinsichtlich ihrer Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität (KMC-Analyse – Herceptin<sup>®</sup>)
- 2) Gruppierung der Gene mit einer festen Anordnung der Brustkrebszelllinien hinsichtlich ihrer HER2-Expression (KMC-Analyse – HER2)
- 3) Hierarchische Gruppierung der Brustkrebszelllinien hinsichtlich ihres Gesamt-Genexpressionsprofils (HCL-Analyse – Zelllinien)

Das K-Means-Clustering (KMC) ist eine gängige Methode zum Zuweisen einer Clustermitgliedschaft. Dabei werden die Unterschiede zwischen Elementen eines Clusters minimiert und die Entfernung zwischen den Clustern gleichzeitig maximiert. Der Algorithmus weist jeden Datenpunkt genau einem Cluster zu. Die Mitgliedschaft in einem Cluster wird als Entfernung vom Schwerpunkt (=“Means“) ausgedrückt. Hierbei handelt es sich um einen willkürlich ausgewählten Datenpunkt, der so lange iterativ optimiert wird, bis er das genaue arithmetische Mittel aller Datenpunkte des Clusters repräsentiert. Die Anzahl der zu bildenden Cluster wurde auf 50 festgelegt. Als Algorithmus wurde die Pearson Korrelation verwendet.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Cluster-Analysen zusammengefasst. Bei allen KMC-Analysen sind die einzelnen Zelllinien horizontal in der Reihenfolge ihrer Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität bzw. ihrer HER2-Expression dargestellt (jeweils von links nach rechts abnehmend). Auf der vertikalen Achse sind die Gene aufgelistet. Die Farbgebung der einzelnen Gen-/Zelllinien-Kombinationen gibt die relative Erhöhung bzw. Abnahme der Expression gegenüber dem Median der Expression über alle Zelllinien. Dabei stellen die verschiedenen Rot-Töne eine Zunahme und die Grün-Töne eine Abnahme der Expression dar (siehe auch Farbskala im oberen Teil der Abbildung).

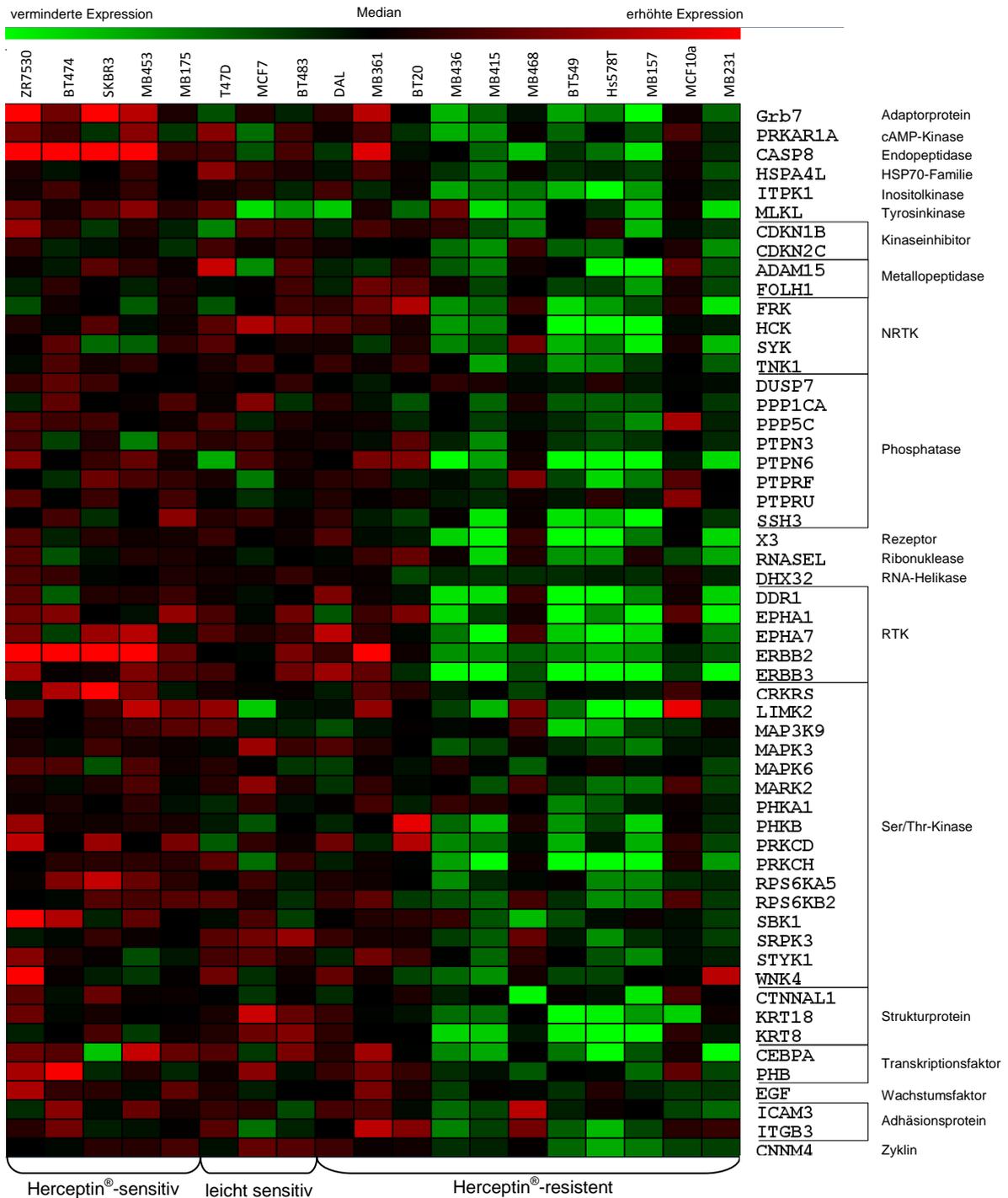
### KMC-Analyse – Herceptin®

Zu den 54 Herceptin®-resistenzassoziierten Genen gehören u.a. fünf RTKs, 17 Ser/Thr-Kinasen, acht Wachstumsfaktoren, vier Metallopeptidasen und vier Strukturproteine (siehe Abb.14).



**Abbildung 14: Zusammenfassung von Herceptin®-resistenzassoziierten Genen.** - Die Zelllinien sind horizontal nach ihrer Herceptin®-Sensitivität angeordnet (von links nach rechts abnehmend). Vertikal sind die Gene aufgelistet, die ein resistenzassoziiertes Expressionsmuster zeigen (hohe Expression in resistenten Zelllinien).

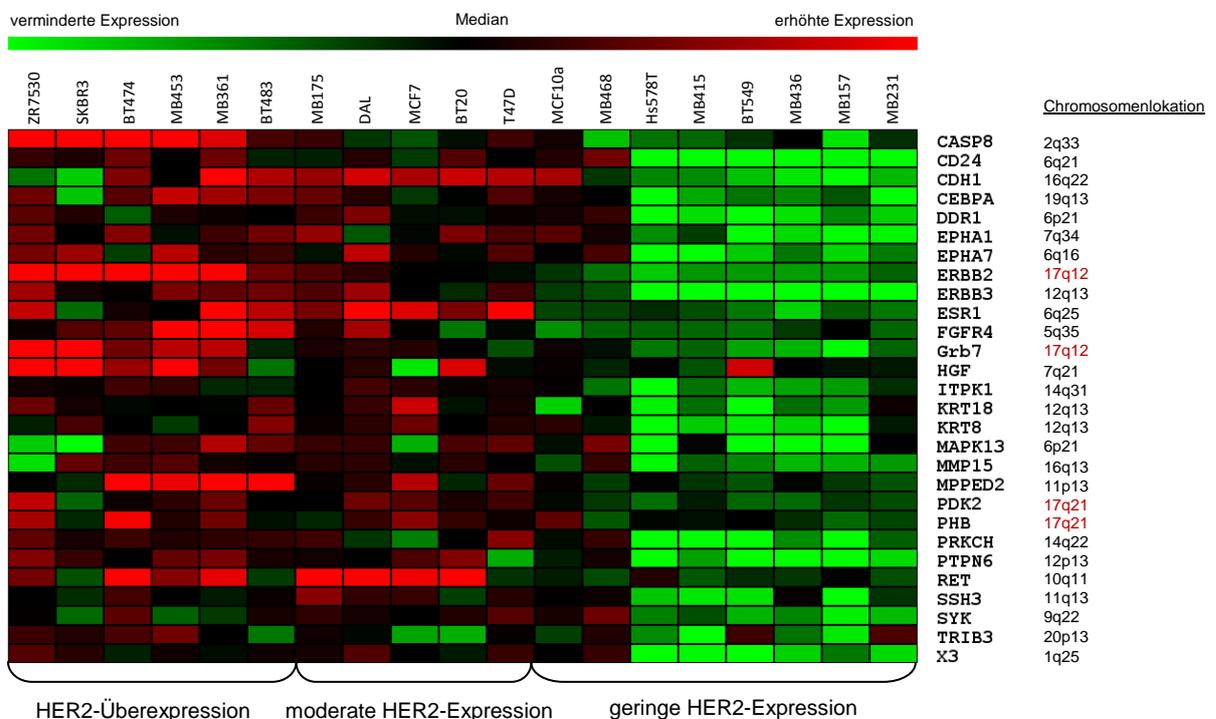
Zu den 55 Herceptin<sup>®</sup>-sensitivitätsassoziierten Genen gehören u.a. fünf RTKs, 16 Ser/Thr-Kinasen, acht Phosphatasen, sechs Endopeptidasen und zwei Kinaseinhibitoren (siehe Abb.15).



**Abbildung 15: Zusammenfassung von Herceptin<sup>®</sup>-sensitivitätsassoziierten Genen.** - Die Zelllinien sind horizontal nach ihrer Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität angeordnet (von links nach rechts abnehmend). Vertikal sind die Gene aufgelistet, die ein sensitivitätsassoziiertes Expressionsmuster zeigen (hohe Expression in sensitiven Zelllinien).

### KMC-Analyse – HER2

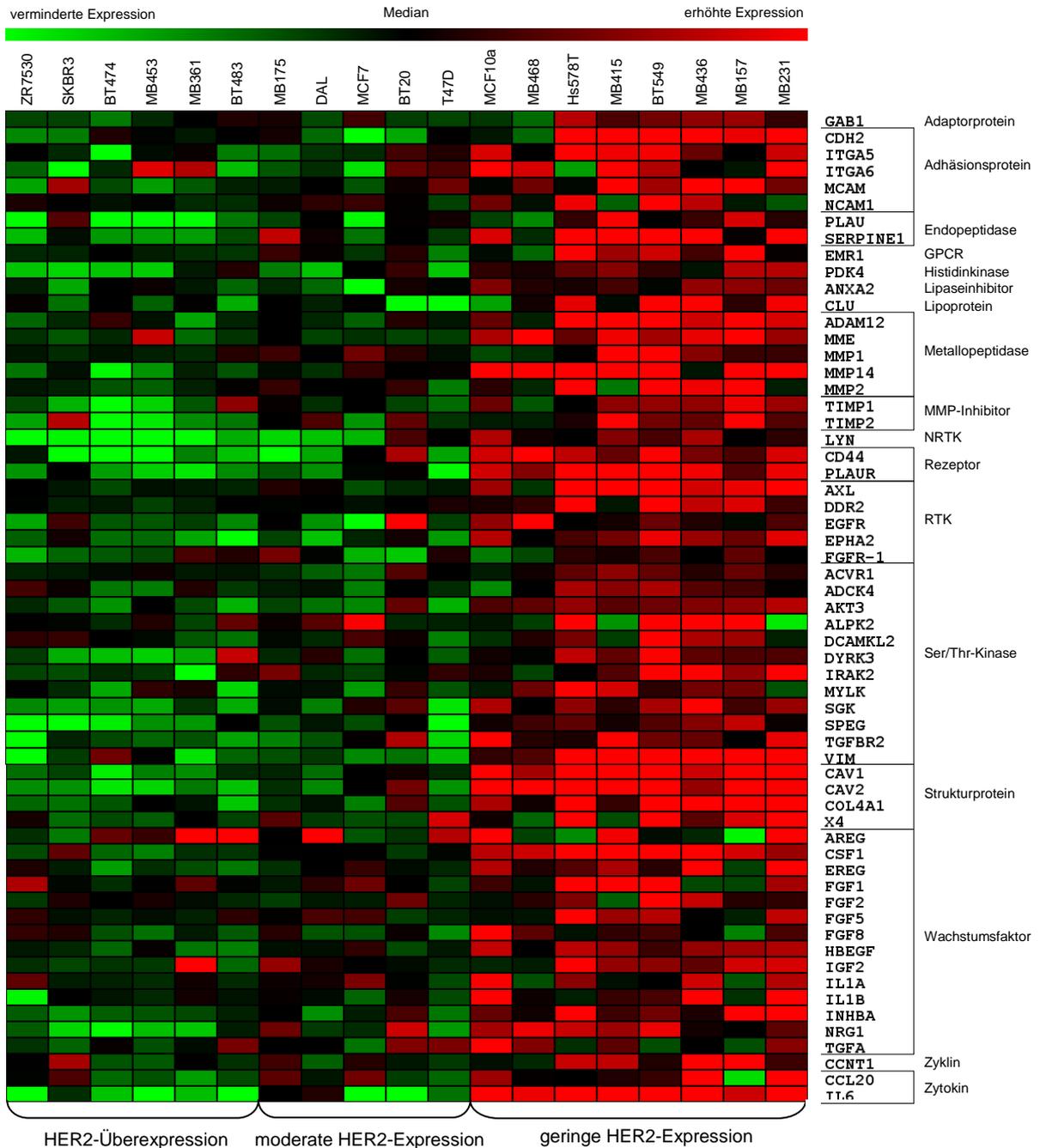
Die HER2-abhängige Clusteranalyse wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob es sich bei den Herceptin<sup>®</sup>-assoziierten Genen ausschließlich um HER2-assoziierte Gene handelt. Aus der Clusteranalyse ergaben sich 28 Gene, die vor allem in HER2-positiven (Abb.16) und 60 Gene, die vor allem in HER2-negativen Zelllinien (Abb.17) zu finden waren. Bei sechs HER2-negativen Zelllinien ist das entgegengesetzte Expressionsmuster am deutlichsten (Hs578T bis MDA-MB-231). Die beiden HER2-negativen Zelllinien MCF10a und MDA-MB-468 zeigen in beiden Clustern (HER2+ und HER2-), sowohl Gene mit erhöhter, als auch verminderter Expression. Auch bei den Zelllinien mit moderater HER2-Expression lässt sich nur eine allgemeine Tendenz zur entgegengesetzten, HER2-abhängigen Genexpression feststellen. Die Zelllinien mit HER2-Überexpression weisen hingegen bei fast allen in den Clustern enthaltenen Genen ein den HER2-negativen Zelllinien entgegengesetztes Expressionsmuster auf.



**Abbildung 16: Zusammenfassung von Genen die mit einer hohen HER2-Expression assoziiert sind** - Die Zelllinien sind horizontal nach ihrer HER2-Expression angeordnet (von links nach rechts abnehmend). Vertikal sind die Gene aufgelistet, die entweder mit HER2 koexprimiert werden, bzw. Gene, die von HER2-negativen Zelllinien nicht exprimiert werden. Die Abbildung fasst zwei Gencluster zusammen. Im rechten Teil der Abbildung ist die Chromosomenlokation der einzelnen Gene angegeben.

Zu den Genen, die am deutlichsten mit HER2 koexprimiert werden, gehören CASP8, GRB7, HGF aber auch HER3. Einige Gene, wie z.B. ESR1 (Östrogenrezeptor) oder das Zelladhäsionsprotein CDH1 fehlen in HER2-negativen Zelllinien und werden vor allem von Zelllinien mit moderater HER2-Expression und einigen Zelllinien mit HER2-Überexpression exprimiert. Drei der HER2-assoziierten Gene (*GRB7*, *PDK2*, *PHB*) sind wie *HER2* auf dem Chromosom 17 lokalisiert, wobei nur GRB7 in unmittelbarer Nachbarschaft des *HER2*-Genes liegt.

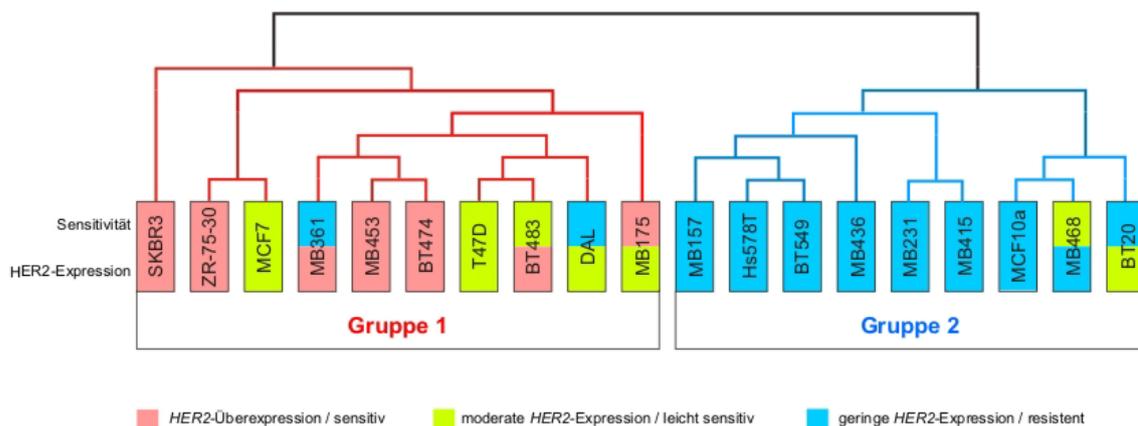
Zu den Genen, die vor allem von HER2-negativen Zelllinien exprimiert werden, gehören zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Metallopeptidasen aber auch viele Ser/Thr-Kinasen oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (siehe Abb.17).



**Abbildung 17: Zusammenfassung von Genen die mit einer geringen HER2-Expression assoziiert sind** - Die Zelllinien sind horizontal nach ihrer HER2-Expression angeordnet (von links nach rechts abnehmend). Vertikal sind die Gene aufgelistet, die vor allem von HER2- negativen Zelllinien exprimiert werden.

### HCL-Analyse der Zelllinien

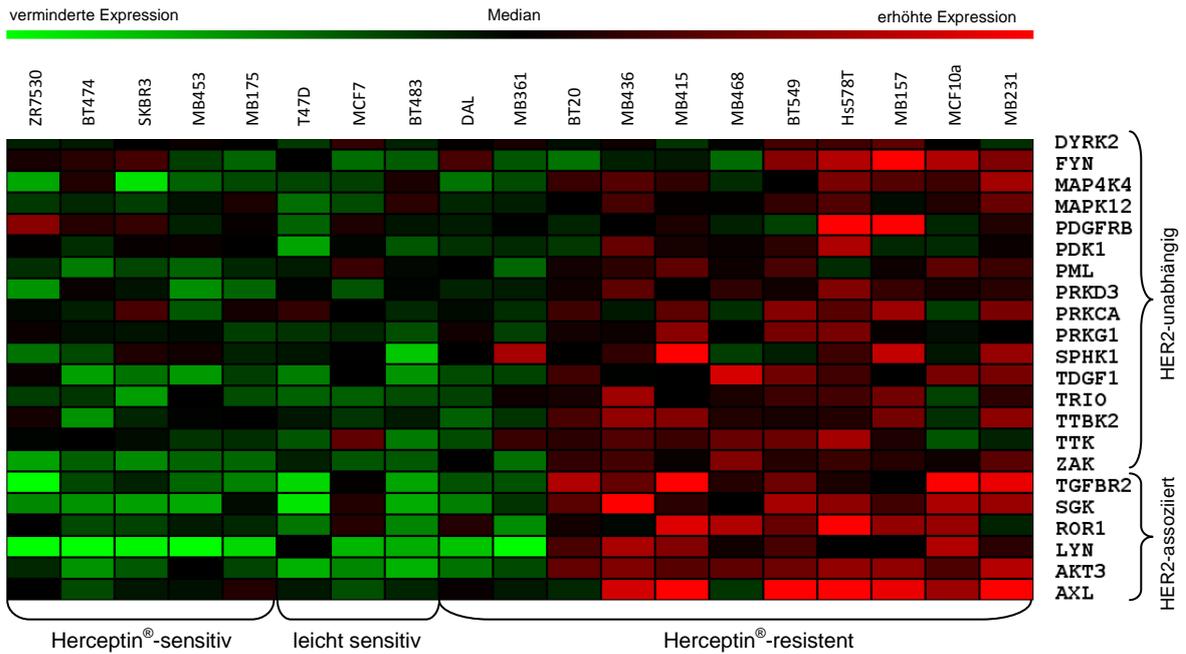
Bei der hierarchischen Clusteranalyse zeigte sich, dass sich die Zelllinien aufgrund ihres Expressionsprofils in zwei Gruppen einteilen lassen (Abb.18). Gruppe 1 setzt sich vorwiegend aus Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven und HER2-positiven Zelllinien, Gruppe 2 hingegen fast ausschließlich aus Herceptin<sup>®</sup>-resistenten und HER2-negativen Zelllinien zusammen.



**Abbildung 18: Dendrogramm der hierarchische Clusteranalyse** - Objekte, die sich im multidimensionalen Datenraum am nächsten sind, sind durch eine horizontale Linie verbunden und bilden ein Cluster, das als "neues" Objekt angesehen werden kann. Das neue Cluster und die übrig gebliebenen Originaldaten werden wieder nach dem nächsten Paar durchsucht. Der Abstand eines bestimmten Paares von Objekten (oder Clustern) wird durch die Höhe der horizontalen Linie angezeigt. Je früher sich Cluster vereinigen, umso ähnlicher sind sie sich. Bei der Analyse wurden folgende Parameter verwendet: average linkage; Pearson-Korrelation; optimierte Anordnung. Als zusätzliche Information wurde die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität bzw. HER2-Expression, in Form einer farblichen Markierung der Zelllinien, in die Abbildung integriert (Bedeutung der Farben: siehe Legende).

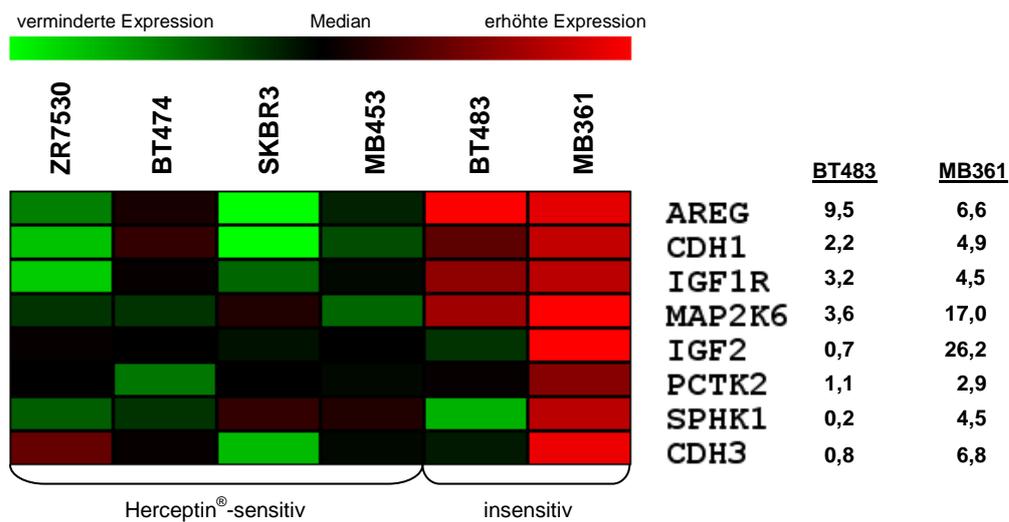
### Vergleich der beiden KMC-Analysen

Bei der Herceptin<sup>®</sup>-abhängigen Clusteranalyse wurden viele Gene identifiziert, die ebenfalls HER2-assoziiert sind. Um Gene zu finden, die HER2-unabhängig und resistenzrelevant sind, wurden die Ergebnisse beider Analysen miteinander verglichen. Danach wurde ein neues Cluster zusammengestellt, welches nur noch 16 HER2-unabhängige Gene enthielt, die von Herceptin<sup>®</sup>-resistenten Zelllinien exprimiert werden (Abb.19). Diese Gene kodieren Ser/Thr-Kinasen (*DYRK2*, *MAP4K4*, *MAPK12*, *PRKD3*, *PRKG1*, *TRIO*, *TTBK2*, *TTK* und *ZAK*), Tyrosinkinasen (*FYN* und *PDGFRB*), aber auch für eine Histidinkinase *PDK1* und eine Lipidkinase *SPHK1*, sowie den Wachstumsfaktor *TDGF1* und den Transkriptionsfaktor *PML*. Es kann jedoch keine wirkliche Aussage darüber getroffen werden, inwiefern diese Gene tatsächlich zur Resistenz der Zelllinien beitragen. Die primäre Resistenzursache ist vermutlich die geringe HER2-Expression. Die tatsächliche Relevanz der Gene ließe sich nur mit einer induzierten HER2-Überexpression ermitteln. Bleiben die Zellen resistent, so steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass die identifizierten Gene tatsächlich zur Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz beitragen.



**Abbildung 19: Zusammenfassung der resistenzassoziierten Gene, die HER2-unabhängig sind.** - Die Zelllinien sind horizontal nach ihrer Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität angeordnet. Vertikal sind die Gene aufgelistet, die ein resistenzassoziiertes Expressionsmuster zeigen. Im unteren Teil der Abbildung sind sechs HER2-assoziierte Gene aufgelistet, die als Kontrolle weiter mitgeführt wurden.

Um weitere HER2-unabhängige Gene zu finden, die resistenzassoziiert sind, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt, die sich auf die HER2-überexprimierenden Zelllinien beschränkte (Abb.20). Dafür wurden auch die Werte der relativen Expression neu berechnet.



**Abbildung 20: Gene, die spezifisch von den beiden insensitiven HER2-positiven Zelllinien exprimiert werden.** Dargestellt ist die relative Expression der Gene in den einzelnen Zelllinien (rot= gegenüber dem Median erhöhte Expression; grün= gegenüber dem Median verminderte Expression). Im rechten Teil der Abbildung ist angegeben, um welchen Faktor die Expression in den BT483 bzw. MDA-MB-361-Zellen gegenüber der mittleren Expression aller Zelllinien erhöht ist.

Dabei wurden vier Gene identifiziert, die ausschließlich von den resistenten MDA-MB-361-Zellen exprimiert werden (*IGF2*, *PCTK2*, *SPHK1* und *CDH3*), sowie vier Gene, die zudem in den leicht sensitiven BT483-Zellen zu finden sind (*AREG*, *CDH1*, *IGF-1R* und *MAP2K6*). Die *Sphingosin-Kinase-1* (*SPHK1*) war bereits unter den resistenzassoziierten HER2-unabhängigen Genen, die bei der Analyse aller Zelllinien gefunden wurden (Vgl. Abb.19).

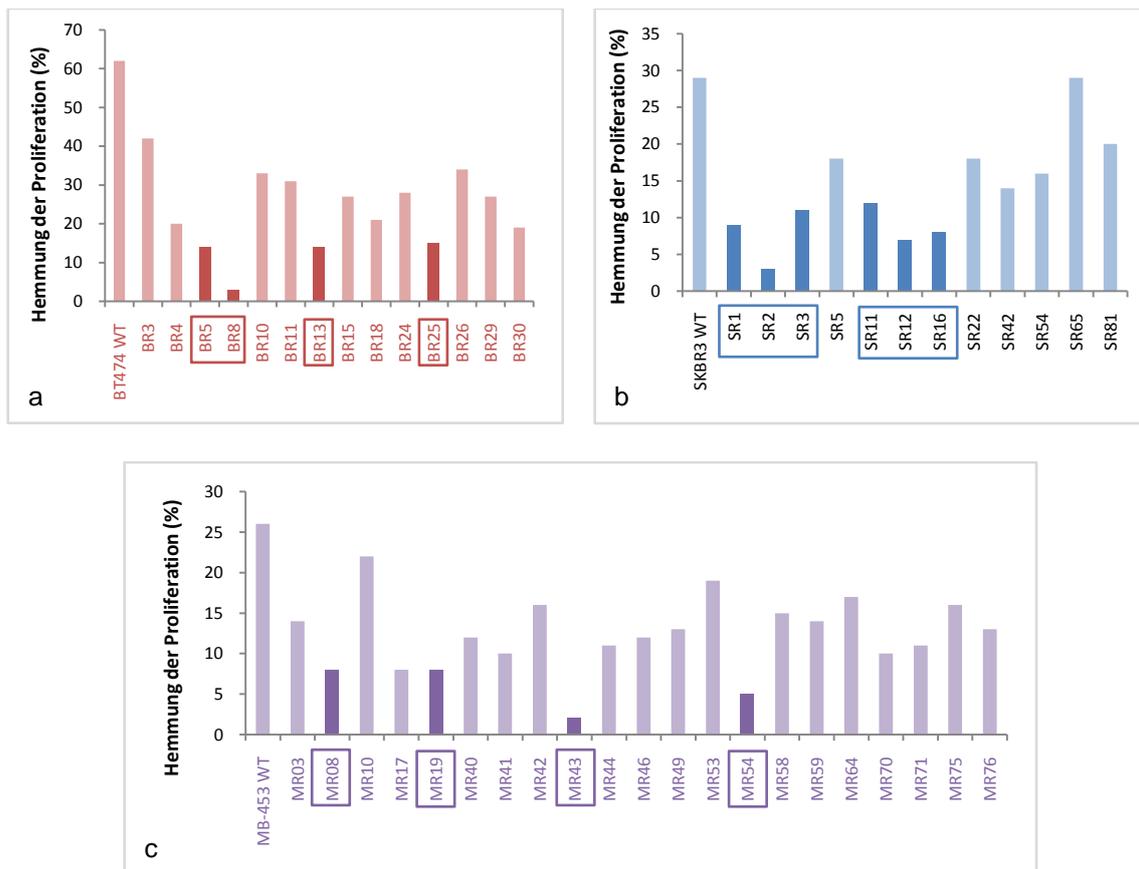
Welche Relevanz die identifizierten Gene tatsächlich bei der Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzbildung haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig untersucht werden. Um eine generelle Bedeutung dieser Gene festzustellen, müssten die Ergebnisse in weiteren Herceptin<sup>®</sup>-resistenten Zelllinien validiert werden. Ob die Gene zur geringen Sensitivität dieser Zelllinien beitragen, könnte man durch funktionelle Knockdown-Studien klären. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies bereits für den IGF-1R in den MDA-MB-361-Zellen durchgeführt (siehe 5.4.1).

## 5.2 Untersuchungen zur erworbenen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz

### 5.2.1 Herstellung von 4D5-resistenten Zelllinien

Um Gene zu identifizieren, die an der Entstehung von erworbenen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzen beteiligt sind, sollte in den drei Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Zelllinien BT474, MDA-MB-453 und SKBR3 durch gezielte Selektion eine Resistenzbildung induziert werden.

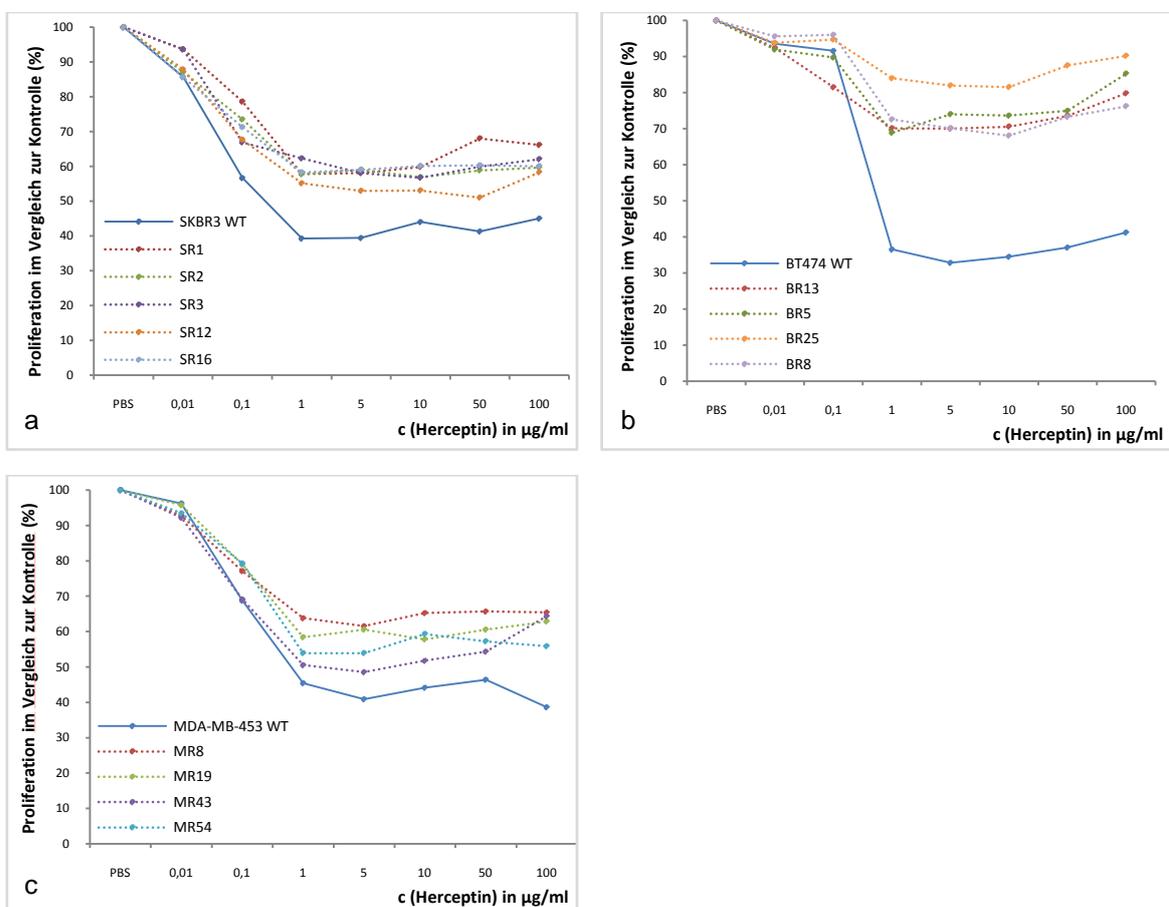
Die Desensitivierung erfolgte durch eine kontinuierliche Kultivierung der Zelllinien in Medium, dem 10µg/ml des 4D5-Antikörpers zugesetzt waren. Dabei handelt es sich um den murinen Vorläufer von Herceptin<sup>®</sup>. Nach einer dreimonatigen Selektion wurden die Zelllinien dünn ausgesät, klonal vereinzelt und in Anwesenheit von 4D5 expandiert. Anschließend wurden die überlebenden Klone auf ihre 4D5-Sensitivität getestet. Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität der Klone stark variiert. Die Mehrzahl der Klone zeigt eine Halbierung der parentalen 4D5-Sensitivität, einige Klone sind nahezu resistent und andere sind fast genauso sensitiv, wie die parentalen Zellen (Abb.21).



**Abbildung 21: Validierung der 4D5-Sensitivität der insensitiven BT474-(a), SKBR3-(b) und MDA-MB-453-(c) Klone**  
Die Validierung erfolgte anhand eines Proliferationsassays mit anschließender MTT-Färbung. Die parentalen Zellen und insensitiven Klone wurden für 72h mit 10µg/ml 4D5 behandelt. Der Resistenzgrad wurde anhand der dabei erzielten Wachstumshemmung bestimmt. Die farblich hervorgehobenen Klone mit der geringsten 4D5-induzierten Hemmung wurden für eine weitergehende Analyse ausgewählt.

Die in Abbildung 21 farblich hervorgehobenen Klone zeigen die geringste Wachstumshemmung und wurden daher für eine genauere Analyse ausgewählt. Hierbei wurde außerdem überprüft, ob die Klone ebenfalls insensitive gegenüber Herceptin® sind.

Dazu wurden die Zellen 24h nach dem Aussäen mit Herceptin®-Konzentrationen zwischen 0,01µg/ml und 100µg/ml behandelt. Nach weiteren 72h erfolgte die Quantifizierung der Proliferation mittels einer MTT-Färbung. Die dabei ermittelten Herceptin®-Sensitivitäten sind in der folgenden Abbildung als relative Proliferation, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, dargestellt.



**Abbildung 22: Herceptin®-Sensitivität von ausgewählten insensitive Klone und ihren parentalen Zelllinien** - Die Zellen wurden für 72h mit steigenden Herceptin®-Konzentrationen (0,01-100µg/ml) behandelt. Anschließend wurde die Proliferation der behandelten Zellen im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen berechnet und gegen die Herceptin®-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogene, blaue Linie stellt jeweils die relative Proliferation der parentalen Zelllinie dar, während die gepunkteten Linien die relative Proliferation der einzelnen Klone darstellen. a) SKBR3 b) BT474 und c) MDA-MB-453

Während man für die drei parentalen Zelllinien noch einen IC50-Wert berechnen konnte (Herceptin<sup>®</sup>-Konzentration, die eine Hemmung von 50% bewirkt), ist dies für die insensitiven Klone nicht mehr möglich, da eine 50%ige Hemmung auch bei der maximal eingesetzten Konzentration von 100µg/ml nicht erreicht wurde. Eine verminderte Sensitivität gegenüber Herceptin<sup>®</sup> zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 1µg/ml. Bei höheren Konzentrationen blieb die Differenz zwischen den parentalen und den insensitiven Zellen relativ konstant. Um die verminderte Sensitivität der Klone zu bewerten, wurde die maximal in einer Zelllinie erreichbare und die bei einer Konzentration von 1µg/ml Herceptin<sup>®</sup> induzierte Wachstumshemmung herangezogen.

Die geringste Sensitivität zeigten die BT474-Klone. Hier lag die verbliebene, Herceptin<sup>®</sup>-induzierte, Wachstumshemmung nur noch zwischen 30% und 32% (BR5, BR8 und BR13). Dies entspricht in etwa der Hälfte der parentalen Sensitivität (67% Wachstumshemmung). Der Klon BR25 kann mit einer verbleibenden maximalen Hemmung von nur noch 19%, was in etwa einem Viertel der in den parentalen Zellen beobachteten Hemmung entspricht, als resistent betrachtet werden.

Die SKBR3-Klone sind in etwa 30% resistenter, als die parentalen SKBR3-Zellen. Während diese eine maximale Wachstumshemmung von 61% zeigten, wurde bei vier Klonen nur eine maximale Hemmung von ca. 40% erreicht (SR1-3 und SR16). Beim fünften Klon (SR12) betrug die maximale Hemmung sogar 50%, weshalb dieser nur als leicht insensitiv eingestuft werden kann.

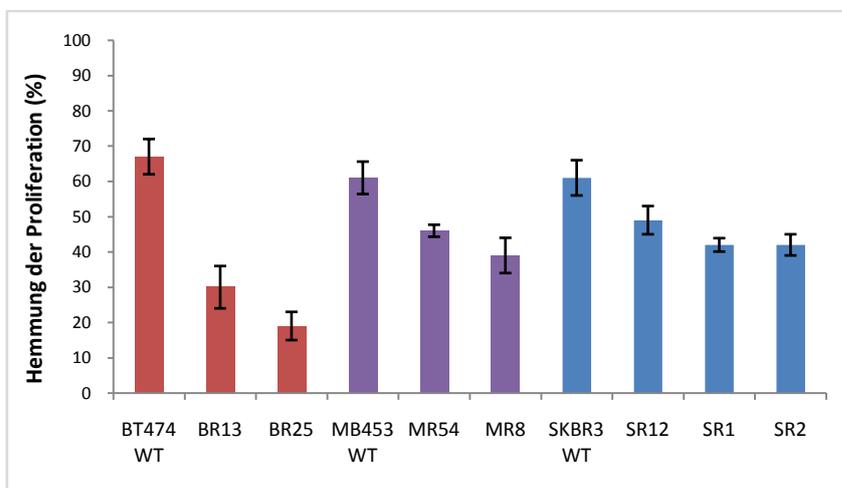
Ein ähnliches Resultat wurde in der dritten Zelllinie MDA-MB-453 erzielt. Auch hier zeigten die parentalen Zellen eine durch Herceptin<sup>®</sup>-induzierte Wachstumshemmung von 60%. In zwei Klonen (MR8, MR19) konnte diese auf maximal 40% Wachstumshemmung gesenkt werden. Bei Klon MR54 lag die Hemmrate bei 46%, was bedeutet, dass diese nur 25% geringer war, als in den parentalen Zellen. Auch beim Klon MR43 verringerte sich die Hemmrate sogar nur um 15%, weshalb dieser Klon ebenfalls als leicht insensitiv eingestuft wurde.

Die folgende Tabelle fasst noch einmal die Hemmraten und die daraus resultierende Bewertung der Klone hinsichtlich ihres Resistenzgrades zusammen.

**Tabelle 10: Herceptin®-Sensitivität der parentalen und insensitiven Zelllinien** - die Bewertung der Sensitivität erfolgte anhand der prozentualen Differenz zu den parentalen Zellen: 10-20%=leicht insensitiv, 20-70% insensitiv, >70%= resistent

	Hemmung bei 1µg/ml	maximale Hemmung	Δrel. (parental)	Bewertung
<b><u>BT474</u></b>	64%	67%		sensitiv
BR5	31%	31%	-54%	insensitiv
BR8	27%	32%	-52%	insensitiv
BR13	30%	30%	-55%	insensitiv
BR25	16%	19%	-71%	resistent
<b><u>SKBR3</u></b>	61%	61%		sensitiv
SR1	42%	42%	-31%	insensitiv
SR2	42%	42%	-31%	insensitiv
SR3	38%	43%	-30%	insensitiv
SR12	45%	49%	-20%	leicht insensitiv
SR16	42%	42%	-31%	insensitiv
<b><u>MDA-MB-453</u></b>	55%	61%		sensitiv
MR8	36%	39%	-36%	insensitiv
MR19	42%	42%	-31%	insensitiv
MR43	50%	52%	-15%	leicht insensitiv
MR54	46%	46%	-25%	insensitiv

Für die weiteren Experimente wurden von jeder Zelllinie jeweils der Klon mit der geringsten Hemmrate (BR25, SR1, SR2 und MR8), sowie ein Klon mit einer mittleren Hemmrate (BR13, SR12, MR54) ausgewählt (Abb. 23).

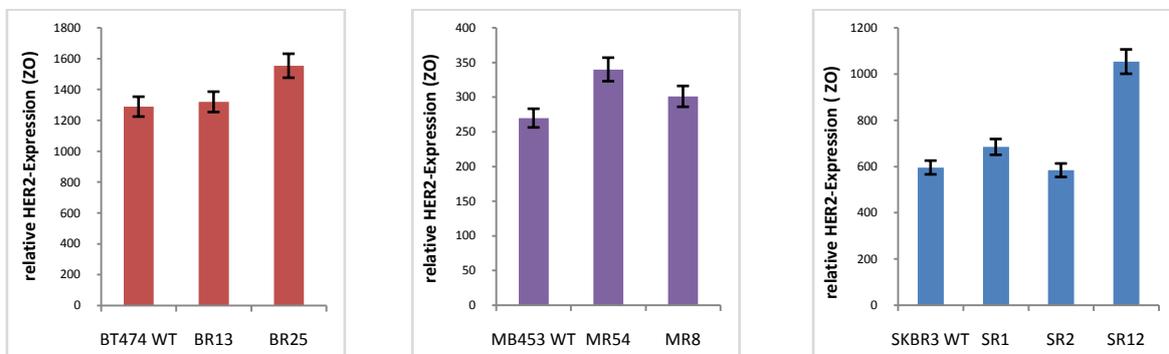


**Abbildung 23: Maximale Hemmraten der ausgewählten Klone und der jeweiligen parentalen Zelllinie**

### 5.2.2 Charakterisierung der Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klone

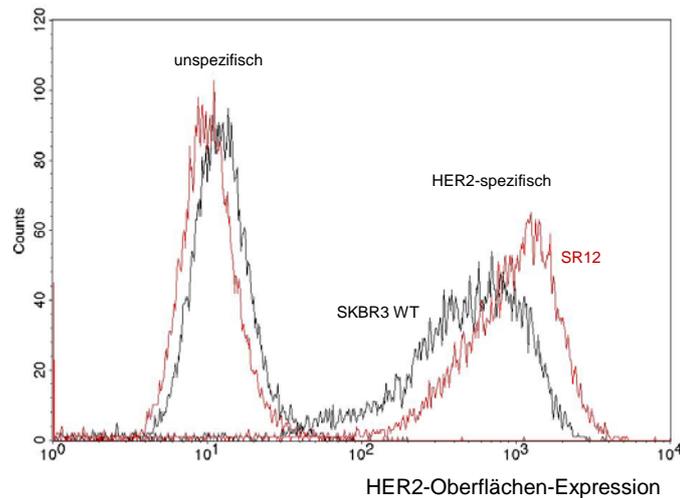
#### ***Einige Herceptin<sup>®</sup>-insensitive Klone haben eine erhöhte HER2 Expression***

Als nächstes wurde überprüft, ob 4D5 noch an den HER2-Rezeptor binden kann, und ob sich die Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche durch die Selektion verändert hat. Dafür wurden die Zellen etwa zwei Wochen ohne 4D5 kultiviert. Anschließend wurde eine HER2-Oberflächenfärbung mit 4D5 als primärem Antikörper durchgeführt. Die Quantifizierung der Färbung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers. Da die alleinige Zugabe eines PE-gekoppelten, sekundären  $\alpha$ -Maus-Antikörpers kein Fluoreszenzsignal auslöste, kann man davon ausgehen, dass kein 4D5 mehr aus der vorangegangenen Selektionsprozedur am HER2-Rezeptor gebunden war. Daher konnte 4D5 für eine spezifische Detektion des HER2-Rezeptors auf der Zelloberfläche genutzt werden (Abb. 24 und 25).



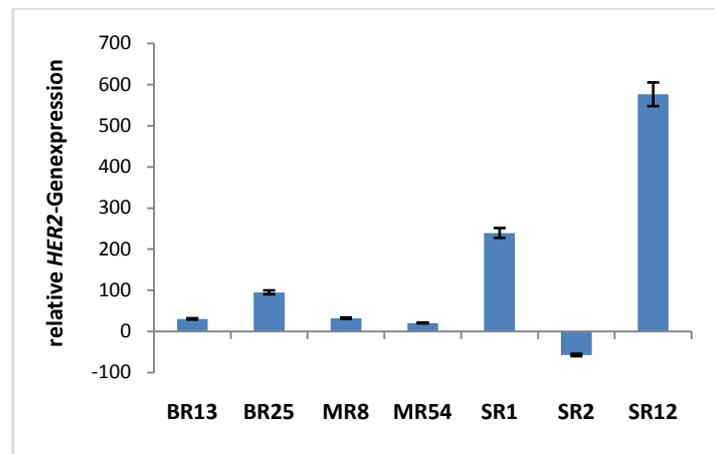
**Abbildung 24: Expression des HER2-Rezeptors auf der Zelloberfläche** - Die Rezeptor-Oberflächenfärbung wurde wie unter 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Die dargestellte relative HER2-Expression ergibt sich aus der Differenz der geometrischen Mittelwerte der spezifischen und unspezifischen Färbung.

Die HER2-Oberflächen-Expression entspricht in den meisten Klonen der parentalen HER2-Expression. Eine Verminderung der HER2-Expression konnte in keinem Fall beobachtet werden. In einigen Klonen wurde jedoch eine Steigerung der HER2-Oberflächen-Expression gemessen. Besonders auffällig ist dies im Klon SR12. Die Intensität der Fluoreszenz war in diesem Klon etwa 77% stärker als in den parentalen SKBR3 Zellen (Abb.25). Eine leichte Zunahme der Fluoreszenz konnte zudem in den Klonen BR25, MR54 und SR1 festgestellt werden.



**Abbildung 25: HER2-Oberflächen-Expression der parentalen SKBR3-Zellen (schwarz) und der SR12-Zellen (rot).** Um die Expression zu vergleichen, wurden die Histogramme der unspezifischen (links) und der HER2-spezifischen (rechts) Färbung beider Zelllinien übereinander gelegt. Die Färbung erfolgte wie unter 4.2.2. beschrieben.

Um auszuschließen, dass die Zunahme des Fluoreszenzsignals auf einer erhöhten Affinität des HER2-Rezeptors gegenüber dem 4D5-Antikörper beruht, wurde zusätzlich die *HER2*-Genexpression vergleichend untersucht (Abb. 26).



**Abbildung 26: Relative *HER2*-Genexpression der Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klone.** - Die Werte resultieren aus der im folgenden Abschnitt erläuterten Makro-Array-Analyse. Die relative Expression wurde aus der Differenz der parentalen und der klonalen *HER2*-Genexpression berechnet.

Dabei stellte sich ebenfalls heraus, dass der SR12-Klon eine höhere *HER2*-Expression besitzt, als seine parentale SKBR3-Zelllinie. Auch die leicht erhöhte *HER2*-Genexpression von Klon SR1 und BR25 konnte bestätigt werden. Bei den übrigen Klone wurde, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Oberflächenfärbung, eine den parentalen Zelllinien entsprechende *HER2*-Expression gemessen. Die leichte Erhöhung der HER2-Oberflächen-Expression im Klon MR54 konnte auf der DNA-Ebene nicht reproduziert werden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität in diesem Klon auf eine erhöhte Affinität des Rezeptors zurückzuführen ist.

### 5.2.3 Vergleichende Analyse der Genexpression

Um Gene zu identifizieren, die über ihre veränderte Expression zur Insensitivierung der Klone beigetragen, wurde eine Makro-Array-Analyse durchgeführt, bei der die Expression von ca. 1200 Genen verglichen wurde.

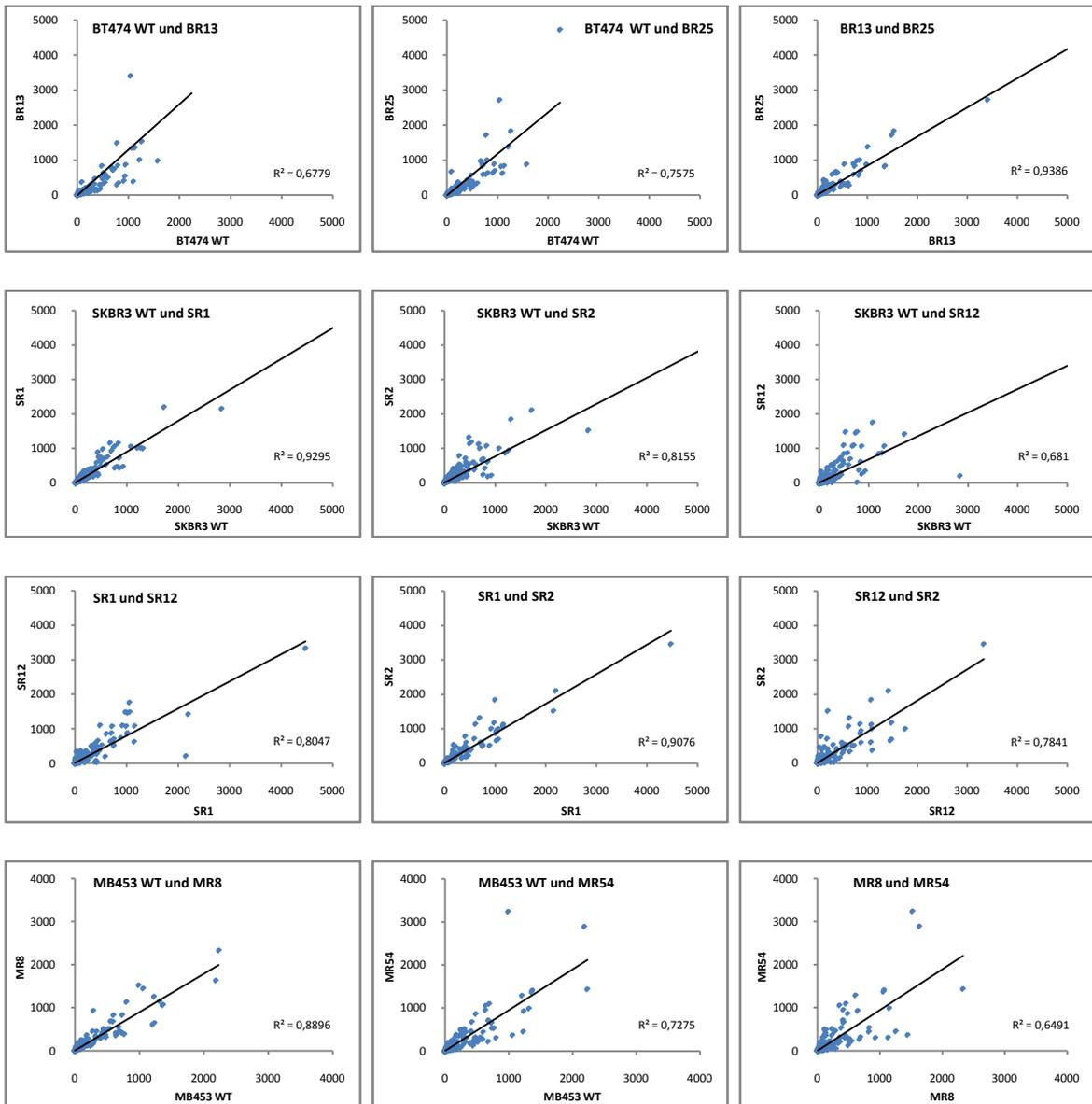
Die Durchführung der Makro-Arrays und die anschließende Datenprozessierung erfolgte wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben.

Um sowohl die Genexpression der parentalen Zelllinien und ihrer Klone miteinander, als auch die Genexpression der Klone einer Zelllinie untereinander zu vergleichen, wurden Scatterplots angefertigt (Abb.27). Darin wurde die Expression von jeweils zwei Zelllinien gegeneinander aufgetragen, wobei jeder Punkt im Diagramm eine Hybridisierungsprobe auf dem Array darstellt. Mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ), lässt sich das Ausmaß der Gemeinsamkeiten zwischen zwei Expressionsprofilen ermitteln.

So hat sich gezeigt, dass die beiden BT474-Klone in ihrer Genexpression mehr übereinstimmen ( $R^2= 0,9386$ ), als der einzelne Klon und seine parentalen BT474-Zellen. Dabei war die Übereinstimmung zwischen Klon BR25 und BT474 WT noch größer ( $R^2=0,7575$ ), als zwischen Klon BR13 und den BT474 WT-Zellen ( $R^2=0,6779$ ).

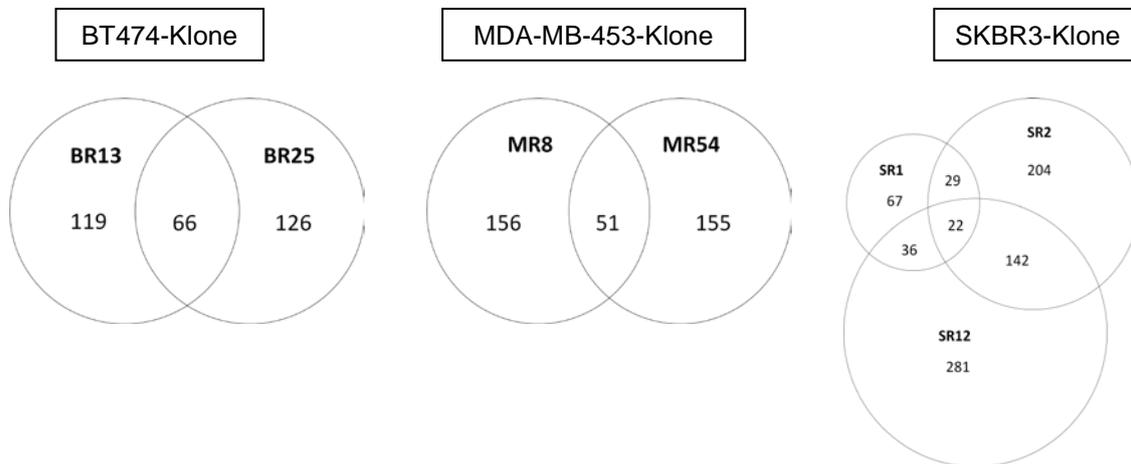
Bei den SKBR3-Zellen gab es eine hohe Übereinstimmung zwischen den Expressionsprofilen der parentalen Zellen und der Klone SR1 bzw. SR2 ( $R^2=0,9295$ , bzw.  $R^2=0,8155$ ). Der SR12-Klon unterscheidet sich hingegen deutlich von den SKBR3-WT-Zellen ( $R^2=0,681$ ). Vergleicht man die Expressionsprofile der Klone untereinander, so findet man eine nahezu vollständige Übereinstimmung zwischen Klon SR1 und SR2 ( $R^2=0,91$ ), aber auch zwischen den Klonen SR1 und SR12 bzw. SR2 und SR12 gibt es größtenteils Gemeinsamkeiten im Expressionsprofil ( $R^2=0,8047$  bzw.  $0,7841$ ).

Bei den MDA-MB-453 Zellen unterscheiden sich die beiden Klone am deutlichsten voneinander ( $R^2=0,6491$ ). Demnach sind die Übereinstimmungen mit den parentalen Zellen größer ( $R^2=0,8896$  bei MR8 und  $R^2=0,7275$  bei MR54), als zwischen den Klonen, die die gleiche Selektion durchlaufen haben.



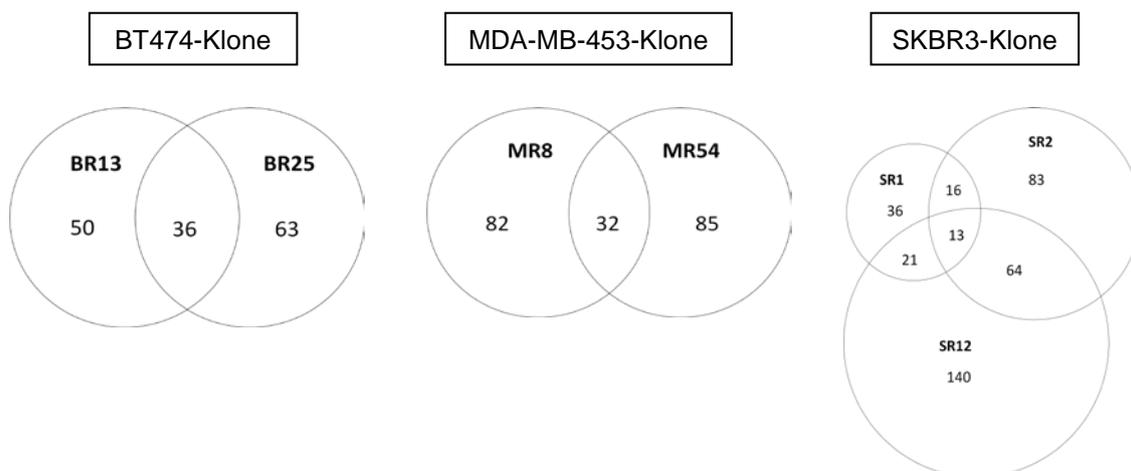
**Abbildung 27: Vergleich der Genexpressionsprofile der parentalen Zelllinie und der insensitive Klone** - In jedem Scatterplot sind die Werte der Hybridisierungssignale von zwei Expressionsprofilen gegeneinander aufgetragen. Dabei wurden entweder die parentale Zelllinie und ein Klon oder zwei Klone einer Zelllinie einander gegenübergestellt.

Die folgenden Diagramme geben einen Überblick über die Anzahl der Gene, die in den insensitiven Klonen eine mindestens zweifach erhöhte Expression gegenüber den parental Zelllinien aufweisen. Die Mehrzahl der Gene wird nur von einem der insensitiven Klone stärker exprimiert. Allerdings gibt es auch eine viele Gene, die in mehreren selektionierten Klonen einer Zelllinie hochreguliert sind.



**Abbildung 28: Anzahl an Genen mit erhöhter Expression in insensitiven Klonen** - Dargestellt ist die Anzahl der Gene, die von den jeweiligen Klonen mindestens zweifach stärker exprimiert werden. Die Zahl im äußeren Bereich des Kreises gibt die Gesamtzahl der Gene an, die in diesem Klon hochreguliert sind, während die Zahl im Überlappungsbereich beider Kreise den Anteil der übereinstimmend hochregulierten Gene angibt (d.h. diese sind in beiden Klonen stärker exprimiert).

Um die Zahl der regulierten Gene weiter einzuschränken, wurden im Folgenden nur noch Gene untersucht, die Proteinkinasen codieren, da sich deren Funktion gut mit spezifischen Inhibitoren blockieren lässt und sie sich daher hervorragend für eine alternative, zielgerichtete Krebstherapie eignen.



**Abbildung 29: Anzahl an Kinasen mit erhöhter Expression in insensitiven Klonen** - Dargestellt ist die Anzahl der Kinasen, die in den jeweiligen Klonen mindestens zweifach stärker exprimiert sind. Die Zahl im äußeren Bereich der Kreise gibt die Gesamtzahl der Kinasen an, die in diesem Klon hochreguliert sind, während die Zahl im Überlappungsbereich beider Kreise den Anteil der übereinstimmend hochregulierten Kinasen angibt (d.h. diese sind in beiden Klonen stärker exprimiert).

Auch die Mehrzahl der Kinasen wird hauptsächlich von nur einem Klon stärker exprimiert. Wie schon in der Scatterplot-Analyse sichtbar wurde, ist die Übereinstimmung zwischen den beiden Klonen BR13 und BR25 relativ groß. Von insgesamt 113 hochregulierten Kinasen wurden 36 in beiden Klonen identifiziert, was einem Prozentsatz von 32% entspricht.

Die beiden MDA-MB-453-Klone haben eine ähnliche Anzahl von hochregulierten Kinase-Genen, von denen etwa 19% bei der Expressionsanalyse beider Klone nachzuweisen waren.

Bei den SKBR3-Klonen gibt es deutlich mehr übereinstimmend hochregulierte Kinasen zwischen den Klonen SR12 und SR2 (64 Kinasen) als zwischen SR1 und SR2 (16 Kinasen) oder SR1 und SR12 (21 Kinasen). Insgesamt konnten sogar 13 Kinasen in allen drei Klonen identifiziert werden. Allerdings unterscheidet sich die Gesamtzahl der innerhalb eines Klons hochregulierten Kinasen sehr deutlich. Die geringste Gesamtzahl wurde im SR1-Klon detektiert. Zudem konnten alle Kinasen, die vom SR1-Klon hochreguliert wurden, auch in einem der anderen SKBR3-Klone nachgewiesen werden: von den insgesamt 36 Kinasen waren dies 16 im SR2-Klon und 21 im SR12-Klon. Das andere Extrem zeigt sich im SR12-Klon: hier beläuft sich die Gesamtzahl der hochregulierten Kinasen auf insgesamt 140.

Die beiden folgenden Tabellen fassen Kinasen zusammen, die in allen untersuchten Klonen einer Zelllinie hochreguliert sind, sowie Kinasen, die in jeweils zwei SKBR3-Klonen eine verstärkte Expression zeigen.

Besonders interessante Kinasen, welche vom jeweils resistenteren Klon stärker exprimiert werden, wurden hierbei farblich hervorgehoben. Am häufigsten konnte dies in den BT474-Klonen beobachtet werden: 55% der aufgelisteten Kinasen zeigten eine mit dem Resistenzgrad assoziierte Expressionssteigerung, wobei bei sieben Kinasen sogar Expressionssteigerungen von einem Faktor größer als 1,5 ermittelt werden konnten. Bei den MDA-MB-453- und SKBR3-Klonen wurden hingegen nur etwa 20% der dargestellten Kinasen von dem resistenteren Klon stärker exprimiert und die Expressionsunterschiede zwischen den beiden Klonen waren auch nicht so deutlich (Faktor kleiner als 1,5). Unter den SKBR3-Klonen ließen sich signifikante Expressionsunterschiede, die im Zusammenhang mit einem höheren Resistenzgrad standen, vor allem zwischen den beiden Klonen SR2 und SR12 beobachten.

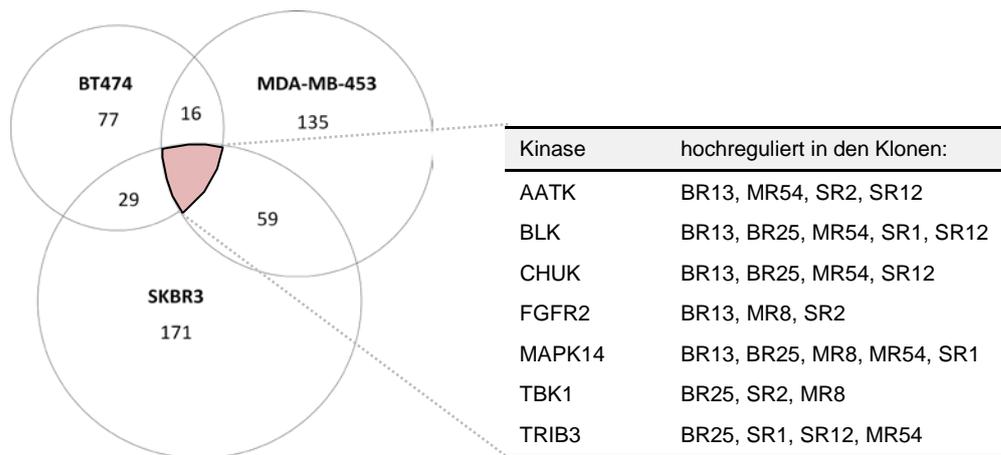
**Tabelle 11: Kinasen, die in allen Klonen einer Zelllinie stärker exprimiert werden (Faktor >2)** - Aufgelistet sind die Namen der jeweiligen Kinase mit den in den Klonen ermittelten Steigerungsfaktoren der Genexpression. Farblich hervorgehoben sind Kinasen, bei denen eine serielle Erhöhung der Expression festgestellt werden konnte, d.h. der Klon mit dem höheren Resistenzfaktor (jeweils in der rechten Spalte) weist eine stärkere Expressionssteigerung auf.

BT474	BR13	BR25	MDA-MB-453	MR54	MR8	SKBR3	SR12	SR1	SR2
AKT3	2,6	3,6	AURKC	2,6	2,2	ADCK4	2,0	2,5	2,5
ALS2CR2	3,0	5,7	BRSK1	4,3	2,0	CDKN1C	7,5	2,9	3,3
BLK	3,3	2,8	CAMK2A	3,1	2,5	CLK3	4,1	2,0	3,6
BRD4	3,2	2,5	CAMK2G	3,5	2,3	MAPK11	6,4	3,7	2,1
CAMK1D	4,0	6,7	CDK6	2,8	3,0	PLK2	3,2	2,2	2,3
CDKL2	6,0	7,1	CDKN2C	3,8	3,2	PRKCA	2,1	2,3	3,4
CDKL4	2,7	5,9	CSNK1G3	2,5	2,6	PRKDC	2,5	2,3	3,3
CHUK	2,4	4,4	EIF2AK1	2,5	2,0	PTK7	3,6	2,1	2,3
CKS1B	3,8	2,9	GRK4y	2,0	2,7	RAGE	3,1	2,1	2,5
DAPK2	2,0	2,9	HIPK2	2,0	2,0	TRIB1	3,0	3,1	4,3
DAPK3	2,2	2,1	HIPK3	3,9	2,2	UHMK1	5,8	2,4	5,8
DDR2	3,6	2,8	KALRN	2,3	2,2	WNK2	3,6	2,5	2,7
DYRK1B	4,2	7,7	MAK	2,2	2,4	WNK4	2,2	3,7	2,6
EPHA1	2,3	2,8	MAP3K9	3,1	3,5				
EPHA6	2,8	2,3	Mapk1	2,4	2,0				
ERN2	2,3	2,0	MAPK6	5,4	2,1				
FYN	2,8	2,6	MAPK14	5,6	5,4				
GRK5	3,0	4,0	MAST4	3,0	3,0				
ITK	3,0	2,1	MOS	2,5	2,5				
MAP2K5	5,3	6,6	PRKACA	3,0	2,0				
MAP2K6	3,6	2,2	PRKAR2A	2,3	2,7				
MAP3K2	2,5	3,0	PRKCH	2,9	2,2				
MAPK14	3,2	2,1	PTK2	2,6	2,0				
MAST3	5,3	4,0	RIOK3	2,5	2,4				
MAST4	2,1	2,3	RNASEL	3,2	2,6				
MATK	2,2	2,1	SGK3	2,4	2,0				
NTRK3	11,2	2,8	SNRK	2,0	2,0				
NUAK1	3,1	4,2	STK35	2,0	2,1				
PDK3	2,8	3,0	TESK2	2,8	2,4				
PIK3CG	2,5	3,6	TRIO	4,1	3,0				
STK11	2,9	4,9	TYRO3P	3,8	2,0				
STK32A	7,6	3,9	VRK3	2,0	2,8				

**Tabelle 12: Kinasen, die in zwei von drei SKBR3-Klonen stärker exprimiert werden (Faktor >2)** - Aufgelistet sind die Namen der jeweiligen Kinase mit den in den Klonen ermittelten Steigerungsfaktoren der Genexpression. Farblich hervorgehoben sind Kinasen, bei denen eine serielle Erhöhung der Expression festgestellt werden konnte, d.h. der Klon mit dem höheren Resistenzfaktor (jeweils in der rechten Spalte) weist eine stärkere Expressionssteigerung auf.

Kinase	SR1	SR2	Kinase	SR12	SR1	Kinase	SR12	SR2	Kinase	SR12	SR2
ADCK4	2,5	2,5	ADCK4	2,0	2,5	AAK1	5,5	2,3	MAP4K3	4,5	2,3
CDKN1C	2,9	3,3	BLK	6,3	2,0	BRD4	2,7	2,8	MAPK1	5,6	4
CAMK4	2,1	2,0	CDKN1C	7,5	2,9	ACVR2B	2,4	2,8	MAPK11	6,4	2,1
CLK3	2,0	3,6	CKS2	2,8	2,1	ACVRL1	2,6	3,0	MLKL	2,4	2
MAP3K9	2,3	2,2	CLK3	4,1	2,0	CDKL5	3,1	2,5	PDIK1L	5,3	4,7
MAPK11	3,7	2,1	EPHB3	6,4	3,7	CDKN1C	7,5	3,3	PDK1	2	2,9
PLK2	2,2	2,3	MAPK11	6,4	3,7	CHEK2	2,3	2,0	PLAU	2,5	2,4
PRKCA	2,1	2,3	PRKCA	3,4	1,8	BCKDK	2,2	2,2	PLAUR	2,3	4,4
PRKDC	2,3	3,3	PLK1	2,1	2,1	BMPR2	4,6	5,9	PLK2	3,2	2,3
TRIB1	3,1	4,3	PLK2	3,2	2,2	AATK	4,1	2,8	PRKCA	3,4	2,3
WNK2	2,5	2,7	PRKCE	5,4	2,4	ADCK4	2	2,5	PRKDC	2,5	3,3
PTK7	2,1	2,3	PRKDC	2,5	2,3	BMX	7,6	3,3	PRPF4B	3,6	2,1
RAGE	2,1	2,5	PTK7	3,6	2,1	CDC42BPB	2,4	2,4	PTK6	7,9	5,7
UHMK1	2,4	5,8	RAGE	3,1	2,1	CIT	2,5	2,4	PTK7	3,6	2,3
WNK4	3,7	2,6	SGK269	2,6	2,0	Clk3	4,1	3,6	RAGE	3,1	2,5
CDC7	3,0	2,6	STK24	2,5	2,6	CLK4	5,8	2,2	RYK	2,7	4,6
			TRIB1	3,0	3,1	Dlgh4	2,6	2,4	SPHK1	4,9	6,3
			TRIB3	3,2	2,5	DYRK2	2,3	2,9	SPHK2	4,8	4,7
			UHMK1	5,8	2,4	EIF2AK1	3,9	2,3	SRPK2	3,2	2,1
			WNK2	3,6	2,5	EIF2AK2	2,7	2,1	STK19	3,7	3,8
			WNK4	2,2	3,7	FES	2,4	3,1	STK36	4,5	2,1
						FGFR2	2,1	3,8	STYK1	2,4	3,3
						FRK	5,3	6,1	TAOK3	3	3,3
						HIPK3	2,7	3,6	TEC	3	3,4
						IKBKE	3,8	2,6	TNK1	2,2	2,1
						IRAK1	2,1	2,1	TRIB1	3	4,3
						LMTK3	2,5	6	TRIM27	2	3
						MAP2K1	3,6	2,3	TYRO3	2,4	2,4
						MAP2K5	2,4	2,1	UHMK1	5,8	5,8
						MAP3K3	2,2	2,1	WNK2	2,7	3,6
						MAP3K4	4,3	2,0	WNK4	2,2	2,6

Einige Kinasen wurden auch in insensitiven Klonen verschiedener Zelllinien hochreguliert (Abb. 30). Die größten Übereinstimmungen herrschen mit 59 gemeinsamen Kinasen zwischen den SKBR3- und den MDA-MB-453-Klonen, während die MDA-MB-453- und BT474-Klone nur 16 bzw. die SKBR3- und BT474-Klone nur 29 gemeinsame Kinasen haben. Sieben Kinasen sind zudem in mindestens einem insensitiven Klon aus allen drei Zelllinien hochreguliert, wobei keine darunter ist, die tatsächlich von allen sieben Klonen stärker exprimiert wird.



**Abbildung 30: Anzahl an Zelllinien-spezifisch hochregulierten Kinasen.** - Dargestellt ist die Anzahl der Kinasen, die von mindestens einem Klon der Zelllinie mindestens zweifach stärker exprimiert werden. Die Zahl im äußeren Bereich der Kreise gibt die Gesamtzahl der Kinasen an, die in den insensitiven Klonen dieser Zelllinie hochreguliert sind, während die Zahl im Überlappungsbereich beider Kreise den Anteil der übereinstimmend hochregulierten Kinasen angibt (d.h. diese sind in mindestens einem Klon beider Zelllinien stärker exprimiert). Die Tabelle gibt einen Überblick über die Kinasen, die in mindestens einem Klon aller drei Zelllinien hochreguliert ist.

### 5.3 Vergleich der natürlichen und erworbenen Resistenz-Untersuchung

Nachdem Gene identifiziert werden konnten, die sowohl bei der natürlichen, als auch bei der erworbenen Resistenzbildung eine Rolle zu spielen scheinen, sollte geprüft werden, welche Gene an der Entstehung beider Resistenzformen beteiligt sind.

Dazu wurde untersucht, in welchen Klonen die Gene aus dem Resistenzcluster eine um mindestens zweifach erhöhte Genexpression zeigen (Tab.13).

**Tabelle 13: Gene, die im Resistenzcluster (Abb.14) enthalten sind und in einem der Herceptin®-insensitiven Klone eine mindestens zweifach erhöhte Expression gegenüber ihrer parentalen Zelllinie zeigen** (die rot markierten Gene sind zudem Bestandteil des HER2-unabhängigen Resistenzcluster – Abb.19).

BR13	BR25	SR1	SR2	SR12	MR8	MR54
<i>AKT3</i>	<i>AKT3</i>	<i>ADCK4</i>	<i>ADCK4</i>	<i>AXL</i>	<i>CAV1</i>	<i>ADAM12</i>
<i>CAV1</i>	<i>DDR2</i>		<i>AXL</i>	<i>DYRK2</i>	<i>CCNT1</i>	<i>LYN</i>
<i>CAV2</i>	<i>FYN</i>		<i>CAV1</i>	<i>EPHA2</i>	<i>CLU</i>	<i>ROR1</i>
<i>CCNT1</i>	<i>MYLK</i>		<i>DYRK2</i>	<i>FYN</i>	<i>HBEGF</i>	<i>TRIO</i>
<i>DDR2</i>	<i>PIK3CD</i>		<i>EMR1</i>	<i>HBEGF</i>	<i>INHBA</i>	
<i>FYN</i>			<i>HBEGF</i>	<i>MME</i>	<i>MMP2</i>	
			<i>INHBA</i>	<i>PDK1</i>	<i>PDK4</i>	
			<i>NRG1</i>	<i>PLAUR</i>	<i>TRIO</i>	
			<i>PDK1</i>	<i>PML</i>	<i>TTBK2</i>	
			<i>PLAUR</i>	<i>PRKCA</i>	<i>TTK</i>	
			<i>PML</i>	<i>PRKG1</i>		
			<i>PRKCA</i>	<i>SGK</i>		
			<i>TGFBR2</i>	<i>SPHK1</i>		
			<i>VIM</i>	<i>TRIO</i>		
				<i>ZAK</i>		

Von den 54 Genen aus dem Resistenzcluster sind 36 verschiedene Gene auch in mindestens einem insensitiven Klon um einen Faktor größer als zwei hochreguliert worden. Die Mehrzahl der Gene zeigte nur in einem Klon eine erhöhte Expression, neun Gene sind aber auch in zwei Klonen einer Zelllinie (wie z.B. *AKT3* oder *DYRK2*) und sechs Gene sogar in insensitiven Klonen verschiedener Zelllinien (u.a. *CAV1*, *FYN* oder *TRIO*) stärker exprimiert (Tab.13).

Von den 16 HER2-unabhängigen, resistenzassoziierten Genen, die in der Clusteranalyse der Brustkrebszelllinien identifiziert wurden (Abb.19), sind zehn Gene ebenfalls in einem der insensitiven Klone höher exprimiert (in Tab.13 rot markiert). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Gene tatsächlich eine Rolle bei der Entstehung von Herceptin®-Resistenzen spielen.

Anschließend wurde die Anzahl der Gene wieder auf die Kinasen beschränkt. Diese sind in der folgenden Tabelle zusammen mit dem Namen des Klons und dem im Gen-Array ermittelten Steigerungsfaktor der Expression aufgelistet.

**Tabelle 14: Kinasen aus dem Resistenzcluster (Abb.14), die in mindestens einem der 4D5-insensitiven Klone eine gegenüber den parental Zellen erhöhte Expression zeigen (Faktor >2)**

Kinase	vollständiger Name	Faktor der Expressionsteigerung		
<i>AKT3</i>	V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3 (PKB $\gamma$ )	BR13 (2,6)	BR25 (3,6)	
<i>DDR2</i>	DISCOIDIN DOMAIN RECEPTOR FAMILY, MEMBER 2	BR13 (3,6)	BR25 (2,8)	
<i>ADCK4</i>	AARF DOMAIN CONTAINING KINASE 4	SR1 (2,5)	SR2 (2,5)	
<i>EPHA2</i>	EPH RECEPTOR A2	SR12 (2,7)		
<i>AXL</i>	AXL RECEPTOR TYROSINE KINASE	SR2 (10,7)	SR12 (13,0)	
<i>FYN</i>	FYN ONCOGENE RELATED TO SRC, FGR, YES	BR13 (2,8)	BR25 (2,6)	SR12 (2,2)
<i>LYN</i>	V-YES-1 YAMAGUCHI SARCOMA VIRAL RELATED ONCOGENE HOMOLOG	MR54 (3,1)		
<i>PDK4</i>	PYRUVATE DEHYDROGENASE KINASE, ISOZYME 4	MR8 (2,8)		
<i>DYRK2</i>	DUAL-SPECIFICITY TYROSINE-PHOSPHORYLATION REGULATED KINASE 2	SR2 (2,9)	SR12 (2,3)	
<i>MYLK</i>	MYOSIN, LIGHT POLYPEPTID KINASE	BR25 (6,9)		
<i>PRKCA</i>	PROTEIN KINASE C, ALPHA	SR2 (2,3)	SR12 (3,4)	
<i>PDK1</i>	PYRUVAT DEHYDROGENASE KINASE, ISOENZYM 1	SR2 (2,9)	SR12 (2,0)	
<i>ROR1</i>	RECEPTOR TYROSINE KINASE-LIKE ORPHAN RECEPTOR 1	MR54 (3,3)		
<i>SGK</i>	SERUM/GLUCOCORTICOID REGULATED KINASE FAMILY	SR12 (3,0)		
<i>PIK3CD</i>	PHOSPHOINOSITIDE-3-KINASE; CATALYTIC; DELTA POLYPEPTID	BR25 (5,2)*		
<i>PRKG1</i>	PROTEIN KINASE; CGMP-DEPENDENT; TYPE 1	SR12 (2,3)		
<i>TGFBR2</i>	TRANSFORMING GROWTH FACTOR, BETA RECEPTOR II	SR2 (3,9)		
<i>TRIO</i>	TRIPLE FUNCTIONAL DOMAIN	SR12 (2,4)	MR8 (3,0)	MR54 (4,1)
<i>TTBK2</i>	TAU TUBULIN KINASE 2	MR8 (2,3)		
<i>ZAK</i>	STERILE ALPHA MOTIF AND LEUCINE ZIPPER CONTAINING KINASE AZK	SR12 (2,2)		
<i>SPHK1</i>	SPHINGOSINE KINASE 1	SR12 (4,9)		
<i>TTK</i>	TTK PROTEIN KINASE	MR8 (2,8)		

\* Expressionssteigerung gegenüber Klon BR13, da kein Signal bei parental Zellen

Von den insgesamt 22 verschiedenen Kinasen wurden dreizehn (59%) von nur einem Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klon und sieben (32%) von zwei Klonen stärker exprimiert. Für *FYN* und *TRIO* konnten sogar in drei Klonen Expressionssteigerungen ermittelt werden. Meist waren davon beide Klone einer Zelllinie betroffen, wobei auch hier wieder der resistenterere Klon eine deutlichere Expressionssteigerung zeigte (Tab.14).

### 5.3.1 Validierung der im Makro-Array ermittelten Expressions-Steigerungsraten

Aus den 22 in Tabelle 14 aufgelisteten Kinasen wurden fünf für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zunächst wurde überprüft, ob die in den insensitiven Klonen detektierten Expressionssteigerungen mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-PCR reproduziert werden können. Die Validierung erfolgte mit Hilfe spezifischer TaqMan<sup>®</sup>-Sonden. Zusätzlich wurden noch die Expressionssteigerungen von drei Kinasen (CAMK1D, FGFR2 und WNK2) validiert, die in mehreren Klonen hochreguliert wurden und somit auch für die folgenden Knockdown-Experimente in Frage kommen. In Tabelle 15 sind die bei der RT-PCR gemessenen Expressionssteigerungen im Vergleich zu den Werten, die in der Array-Analyse ermittelt wurden, zusammengefasst.

**Tabelle 15: Ergebnisse der quantitativen Real-Time-PCR**

	Klon	Array	RT-PCR	Klon	Array	RT-PCR
<i>AKT3</i>	BR13	2,6	-	BR25	3,6	-
<i>PRKCA</i>	SR2	2,3	-	SR12	3,4	<b>3,9</b>
<i>SGK</i>	SR12	3,0	<b>3,2</b>			
<i>TGFBR2</i>	SR2	3,9	<b>4,0</b>			
<i>TTBK2</i>	MR8	2,3	-			
<i>CAMK1D</i>	BR13	4,0	-	BR25	6,7	<b>5,8</b>
<i>FGFR2</i>	MR8	2,7	<b>1,4</b>	BR13	3,6	-
<i>FGFR2</i>	SR2	3,8	-	SR12	2,1	<b>1,2</b>
<i>WNK2</i>	SR2	2,6	<b>1,7</b>	SR12	3,6	<b>3,8</b>
<i>WNK2</i>	BR13	2,8	-	BR25	2,0	<b>1,5</b>

Array validiert: Wert  $\pm$  15%

gleiche Tendenz: Wert  $>$ 1,0

andere Tendenz: Wert  $<$ 1,0

Insgesamt wurden die Array-Daten von 17 Gen/Klon-Kombinationen untersucht. Bei sechs Kombinationen konnten die Werte mit einer Genauigkeit von  $\pm$  15% reproduziert werden. Dazu gehören unter anderem die *PRKCA* im Klon SR12 und der *TGFBR2* im Klon SR2. Bei weiteren vier Paaren wurde zumindest die gleiche Tendenz ermittelt, das heißt, es konnte ebenfalls eine Steigerung der Expression im entsprechenden Klon gemessen werden (z.B. *WNK2* im Klon SR2 und BR25). Für *AKT3* und *TTBK2* konnten die Expressionssteigerungen nicht bestätigt werden. Wurde bei der Array-Analyse in mehreren Klonen eine höhere Expression detektiert, konnte meist nur die höhere Steigerungsrate bestätigt werden. So wurde z.B. die erhöhte *CAMK1D*-Expression im Klon BR25 reproduziert (5,8 versus 6,7), auf der anderen Seite konnte im Klon BR13 per RT-PCR kein Expressionsanstieg ermittelt werden (0,8 versus 4,0).

Für die folgenden Knockdown-Experimente wurden nur die Kinasen ausgewählt, für die mit beiden Methoden eine mindestens zweifache Expressionssteigerung nachgewiesen werden konnte.

### 5.3.2 Der Knockdown der drei Kinasen TGFBR2, PRKCA und CAMK1D bewirkt eine partielle Re-Sensitivierung der Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klone

Im Anschluss wurde überprüft, ob die verminderte Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der untersuchten Klone tatsächlich auf die Expressionssteigerung der ausgewählten Kinasen zurückgeführt werden kann und ob sich die ursprüngliche Sensitivität der parentalen Zelllinien durch ein gezieltes Ausschalten der betreffenden Kinase wiederherstellen lässt.

Für den Knockdown wurden jeweils eine HER2-abhängige (TGFBR2) und eine HER2-unabhängige, resistenzassoziierte Kinase (PRKCA) ausgewählt, die bei den Untersuchungen zur natürlichen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz identifiziert werden konnten. Beide Kinasen zeigten auch in mindestens einem Klon eine erhöhte Expression. Zum anderen wurde die CAMK1D-Kinase ausgesucht, da sie vom 4D5-resistenten BR25-Klon sechsfach stärker exprimiert wird.

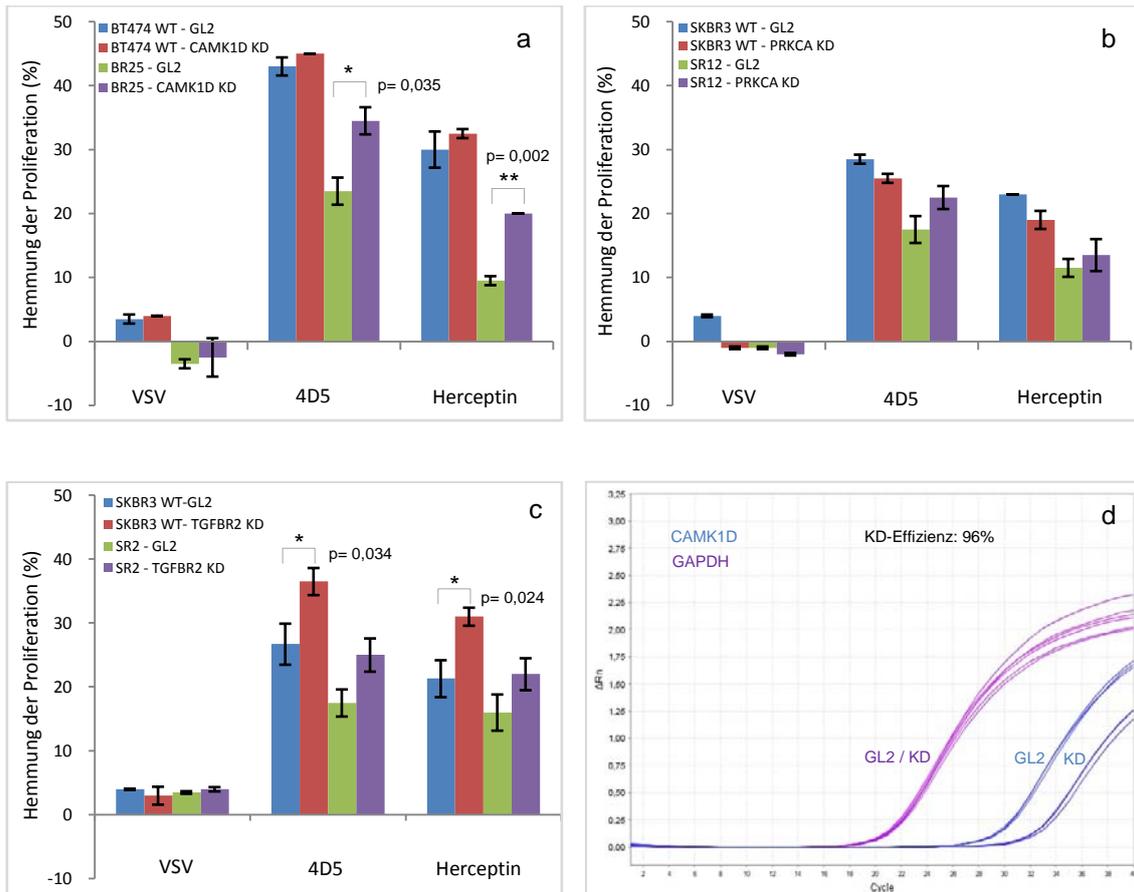
Um die Auswirkung der einzelnen Kinase-Knockdowns auf die 4D5- bzw. Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität zu untersuchen, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Dafür wurde jeweils der Klon mit der deutlichsten Expressionssteigerung und die entsprechende parentale Zelllinien ausgewählt.

TGFBR2: SR2 und SKBR3 WT

PRKCA: SR12 und SKBR3 WT

CAMK1D: BR25 und BT474 WT

Die Ergebnisse der Knockdown-Experimente sind in Abbildung 31 zusammengefasst. In den abgebildeten Diagrammen ist jeweils die Antikörper-induzierte relative Wachstumshemmung der mit Kontroll-siRNA (GL2) bzw. Kinase-spezifischen-siRNA transfizierten parentalen bzw. insensitiven Zelllinien dargestellt. Die Werte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten berechnet, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.



**Abbildung 31: Auswirkungen des Knockdowns** (a) der CAMK1D, (b) der PRKCA und (c) des TGFBR2 auf die 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der parentalen Zelllinien und der insensitive Klone. (d) Beispiel einer RT-PCR zur Ermittlung der Knockdown-Effizienz (Kontrolle/GL2- und CAMK1D-KD in BR25-Zellen). 24h nach der reversen Transfektion wurden die Zellen in einer 48well-Platte ausgesät und mit 10µg/ml VSV, 4D5 bzw. Herceptin<sup>®</sup> behandelt. Nach 72h wurde eine MTT-Färbung durchgeführt, um die durch die Behandlung induzierte Wachstumshemmung zu ermitteln.

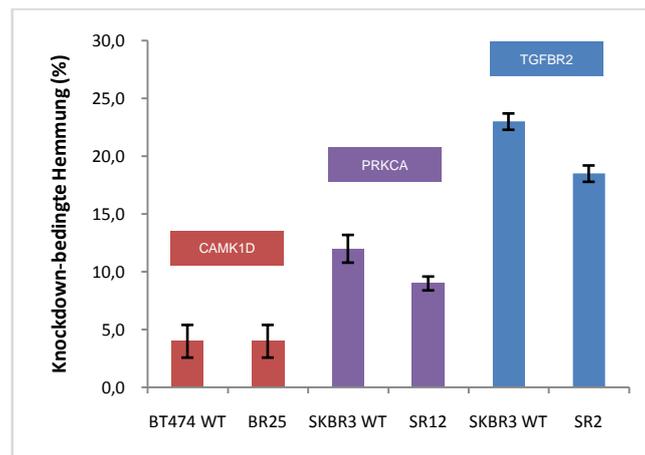
Die durch eine Real-Time-PCR bestimmte Knockdown-Effizienz lag in den einzelnen Experimenten zwischen 80 und 100%. In Abbildung 31d ist exemplarisch ein Diagramm mit den Amplifikationskurven eines *CAMK1D*-Knockdown-Paares (BR25-GL2 und BR25-CAMK1D-KD) dargestellt. Die violetten Kurven zeigen die *GAPDH*-Amplifikation und die blauen Kurven die Amplifikation der *CAMK1D*. Da die *GAPDH*-Kurven genau übereinander liegen, kann man davon ausgehen, dass die eingesetzten cDNAs gleich konzentriert waren. Aus der Rechtsverschiebung der *CAMK1D*-Kurven lässt sich daher ablesen, dass die Genexpression durch den Knockdown deutlich verringert wurde. Aus den ermittelten  $C_T$ -Werten konnte in diesem Beispiel eine Knockdown-Effizienz von 96% berechnet werden.

Der Knockdown aller drei Kinasen bewirkte in den insensitive Klone eine leichte Erhöhung der 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität, wobei diese nicht immer signifikant war. Den deutlichsten Effekt bewirkte der Knockdown der *CAMK1D*-Kinase. Während sich die 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der parentalen GL2- und *CAMK1D*-siRNA-transfizierten Zellen nicht unterscheidet, führte der *CAMK1D*-Knockdown im BR25-Klon zu einer Halbierung der ursprünglichen Resistenz. Die Sensitivität der parentalen Zellen wurde jedoch noch nicht erreicht.

Im Gegensatz zur *CAMK1D* hat der Knockdown des *TGFBR2* auch die 4D5- und Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der parentalen Zelllinie signifikant erhöht. Im SR2-Klon konnte durch den Knockdown in etwa die 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der *GL2*-transfizierten parentalen SKBR3-Zellen wiederhergestellt werden. Der Sensitivitätsanstieg des SR2-Klons war jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

Das Ausschalten der *PRKCA* hat nur einen geringen Einfluss auf die 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität, der ermittelte Anstieg der 4D5-Sensitivität betrug im SR12-Klon nur 5% und ist nicht signifikant. In den parentalen Zellen konnte sogar eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme der Sensitivität beobachtet werden.

Der Kinase-Knockdown hatte teilweise auch einen Einfluss auf die Proliferation der Antikörper-unbehandelten Zellen (Abb. 32). Am deutlichsten war dies bei den *TGFBR2*-Knockdown-Zellen. Sie zeigten gegenüber den mit *GL2*-siRNA transfizierten Zellen ein um 20% vermindertes Wachstum. Während der Knockdown der *PRKCA* die Proliferation noch leicht hemmte (-10%), hatte der *CAMK1D*-Knockdown keinen Einfluss auf die Proliferation der Kontrollzellen.



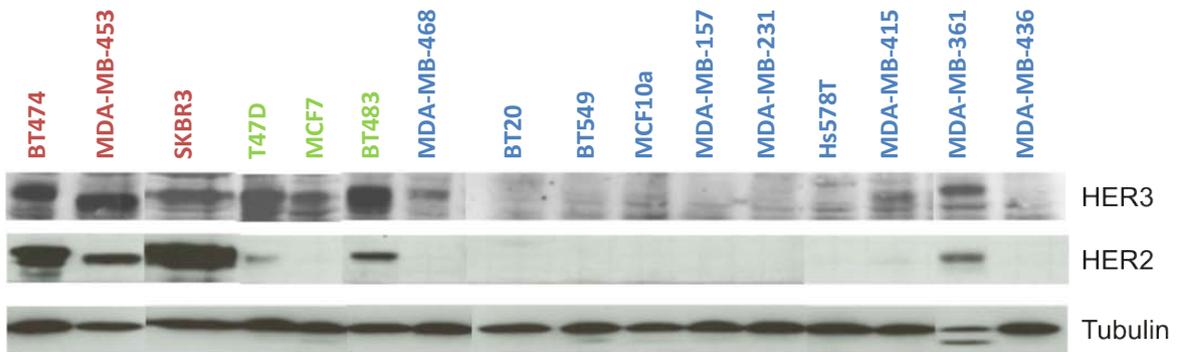
**Abbildung 32: Knockdown-bedingte Proliferationshemmung der Kontrollzellen.** - Dargestellt ist die Proliferationshemmung, die durch den Knockdown induziert wurde. Diese wurde aus der prozentualen Differenz der Absorptionswerte berechnet, die bei den *GL2*-transfizierten und KD-transfizierten Kontrollzellen (ohne AK-Behandlung) gemessen wurden.

## 5.4 Einfluss der IGF-1R und HER3-Rezeptor-Expression auf die 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität von humanen Brustkrebszelllinien

### 5.4.1 Abhängigkeit der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität von der HER3-Genexpression

Zunächst sollte überprüft werden, ob es in den untersuchten humanen Brustkrebszelllinien einen Zusammenhang zwischen der HER3-Expression und der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität gibt.

HER2 und HER3 werden häufig koexprimiert (Abb. 33), das bedeutet, Zelllinien, die HER2 überexprimieren, zeichnen sich gleichzeitig durch eine hohe HER3-Expression aus. Auf der anderen Seite findet man in Zelllinien mit einer geringen HER2-Expression meist auch eine geringe HER3-Expression.



**Abbildung 33: HER3 und HER2-Proteinexpression in humanen Brustkrebszelllinien** (Westernblot) - Die horizontale Anordnung erfolgte entsprechend der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität (rot: sensitiv, grün: leicht sensitiv, blau: resistent)

Die *HER3*-Expression steht aber auch im Zusammenhang mit der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der Zelllinien (Abb.35). Ebenso, wie bei der *HER2*-Expression, besteht in den untersuchten humanen Brustkrebszelllinien ein proportionaler Zusammenhang zwischen der *HER3*-Expression und der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität. Das heißt, mit steigender *HER3*-Expression nimmt auch die Wahrscheinlichkeit zu, dass eine Zelllinie sensitiv gegenüber Herceptin<sup>®</sup> ist. So zeichnen sich alle Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Zelllinien durch eine hohe *HER3*-Expression aus. Unter den Zelllinien mit einer geringen *HER3*-Expression befinden sich hingegen ausschließlich Herceptin<sup>®</sup>-resistente Zelllinien. Bei einigen Zelllinien konnte diese Abhängigkeit nicht beobachtet werden. Dazu zählen unter anderem die MDA-MB-361-Zellen, die trotz ihrer hohen *HER2* und *HER3*-Expression resistent gegenüber Herceptin<sup>®</sup> sind.

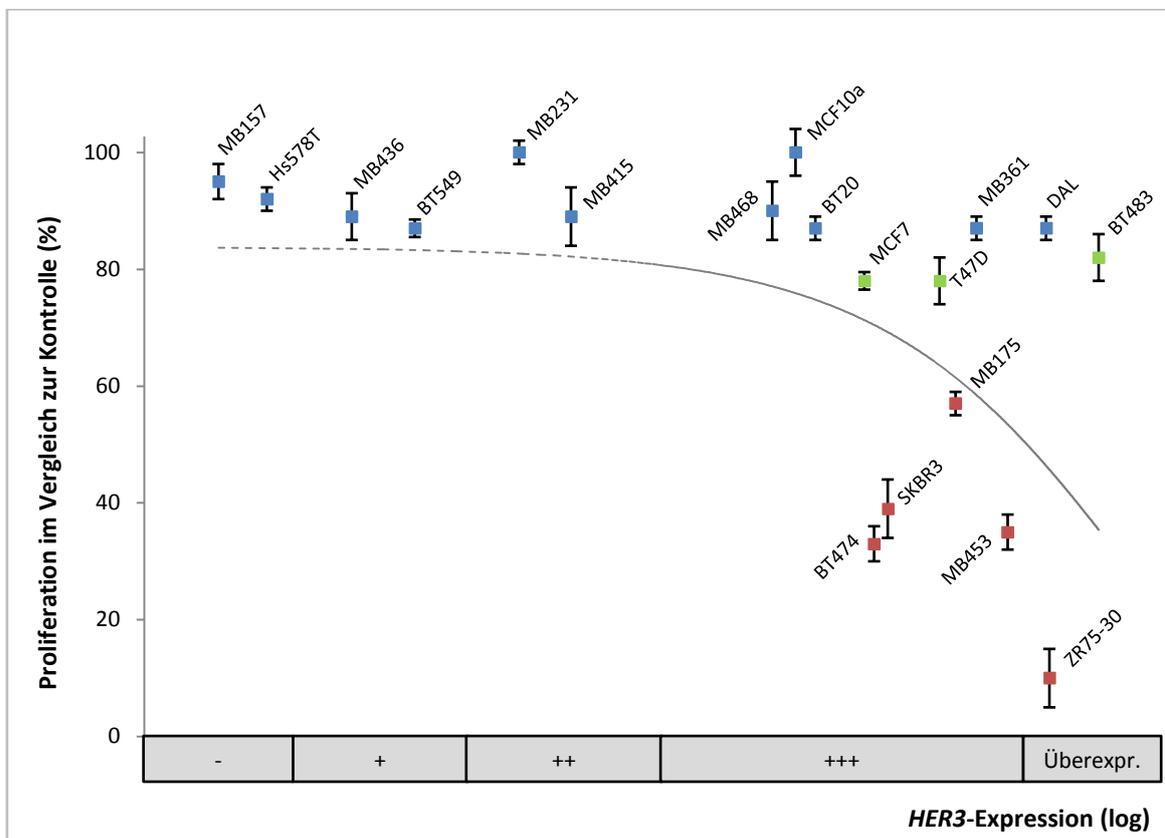
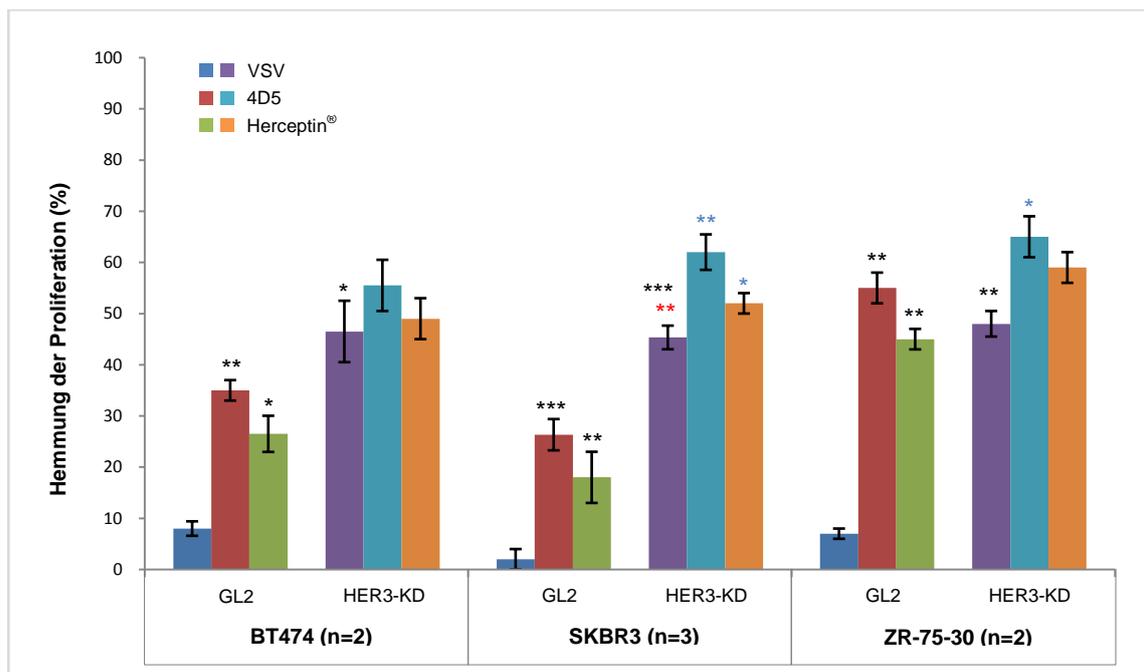


Abbildung 34: Zusammenhang zwischen der *HER3*-Genexpression und der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien. Die *HER3*-Genexpression wurde logarithmisch gegen die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität aufgetragen. Die gestrichelte Linie ist eine Regressionsgerade.

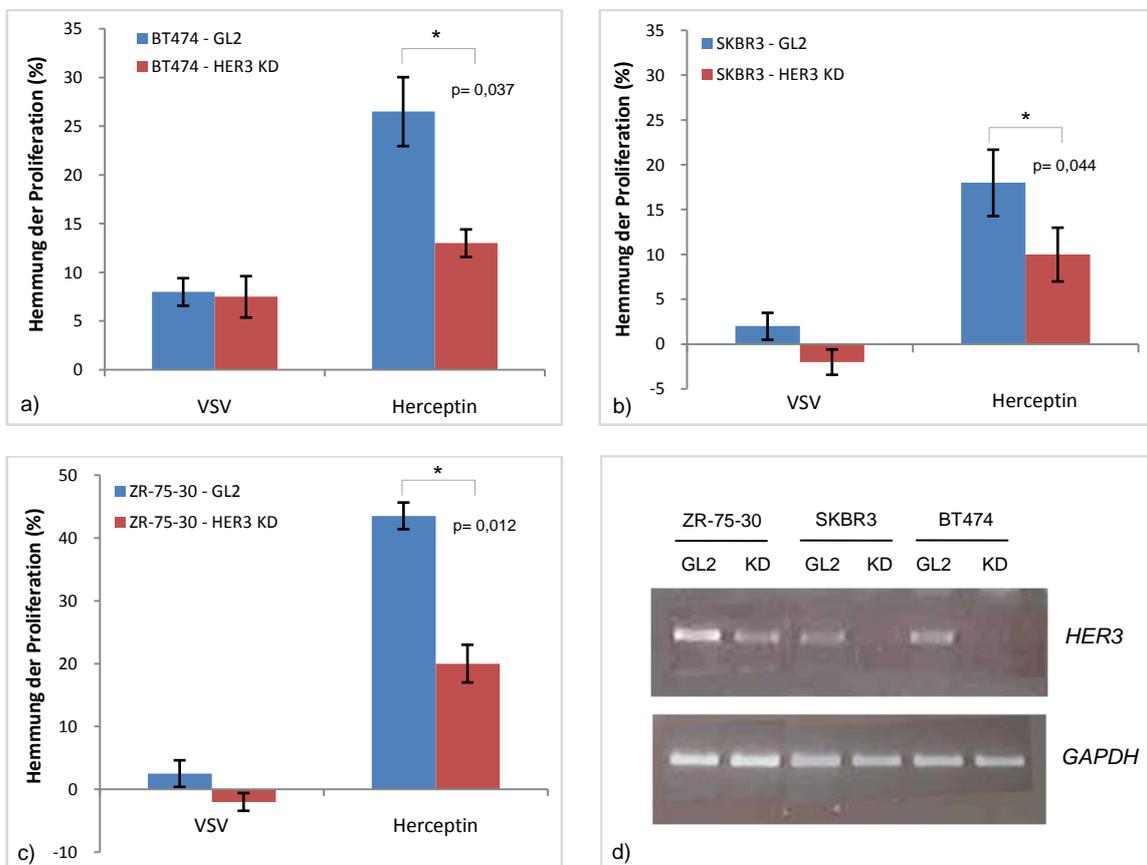
Um den tatsächlichen Einfluss des HER3-Rezeptors auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität zu untersuchen, wurden Knockdown-Experimente in Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Brustkrebszelllinien durchgeführt.

Berechnet man sowohl von den GL2- (Kontroll-siRNA) KD-, als auch von den HER3-KD-Zellen die relative Proliferation in Bezug auf die unbehandelten GL2-KD-Zellen, so zeigt sich, dass der HER3-Knockdown in den BT474 und den SKBR3-Zellen eine stärkere Wachstumshemmung bewirkt, als 4D5 oder Herceptin<sup>®</sup> (Abb.35). Dieser Effekt war in den SKBR3-Zellen sogar sehr signifikant ( $p < 0,01$ ). In den ZR-75-30-Zellen hatte eine Hemmung von HER2 und HER3 hingegen dieselbe Effizienz. Die durch den HER3-Knockdown induzierte Proliferationshemmung konnte in den SKBR3-Zellen durch die Zugabe von 4D5 und Herceptin<sup>®</sup> noch einmal signifikant gesteigert werden. In den ZR-75-30-Zellen war dies nur durch 4D5, aber nicht durch Herceptin<sup>®</sup> möglich. In den BT474-Zellen war die leichte Erhöhung der Hemmrate für keinen der beiden Antikörper signifikant.



**Abbildung 35: Auswirkungen einer HER2- und/oder HER3-Hemmung auf die Proliferation von Tumorzellen**  
 Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der Proliferation im Vergleich zu GL2-transfizierten, unbehandelten Zellen. Vergleich der relativen Proliferation zwischen VSV, 4D5 bzw. Herceptin<sup>®</sup>-behandelten GL2- und HER3-KD-Zellen. Anzahl der Sterne: \* signifikant ( $p < 0,05$ ), \*\* sehr signifikant ( $p < 0,01$ ), \*\*\* hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Farbe der Sterne: \* gegenüber unbehandelten GL2-Zellen; \*\* gegenüber 4D5/Herceptin<sup>®</sup>-behandelten GL2-Zellen; \*\*\* gegenüber unbehandelten HER3-KD-Zellen

Berechnet man die relative Proliferation hingegen jeweils in Bezug auf die unbehandelten Knockdown-Zellen (GL2- und HER3-KD getrennt), so zeigt sich, dass sich der HER3-Knockdown auch auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der Tumorzellen auswirkt (Abb. 36). So konnte in allen drei untersuchten Zelllinien eine Halbierung der ursprünglichen Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität beobachtet werden. Während Herceptin<sup>®</sup> in den GL2-transfizierten BT474-Zellen eine Proliferationshemmung von etwa 26% auslöste, lag die Hemmrage in den HER-Knockdown-Zellen bei nur noch 13%. Auch in den anderen beiden Zelllinien konnte dieser Effekt beobachtet werden (SKBR3: von 20% auf 10%, ZR-75-30: von 43% auf 20%). Der Kontrollantikörper ( $\alpha$ -VSV) bewirkte keine signifikante Proliferationshemmung.



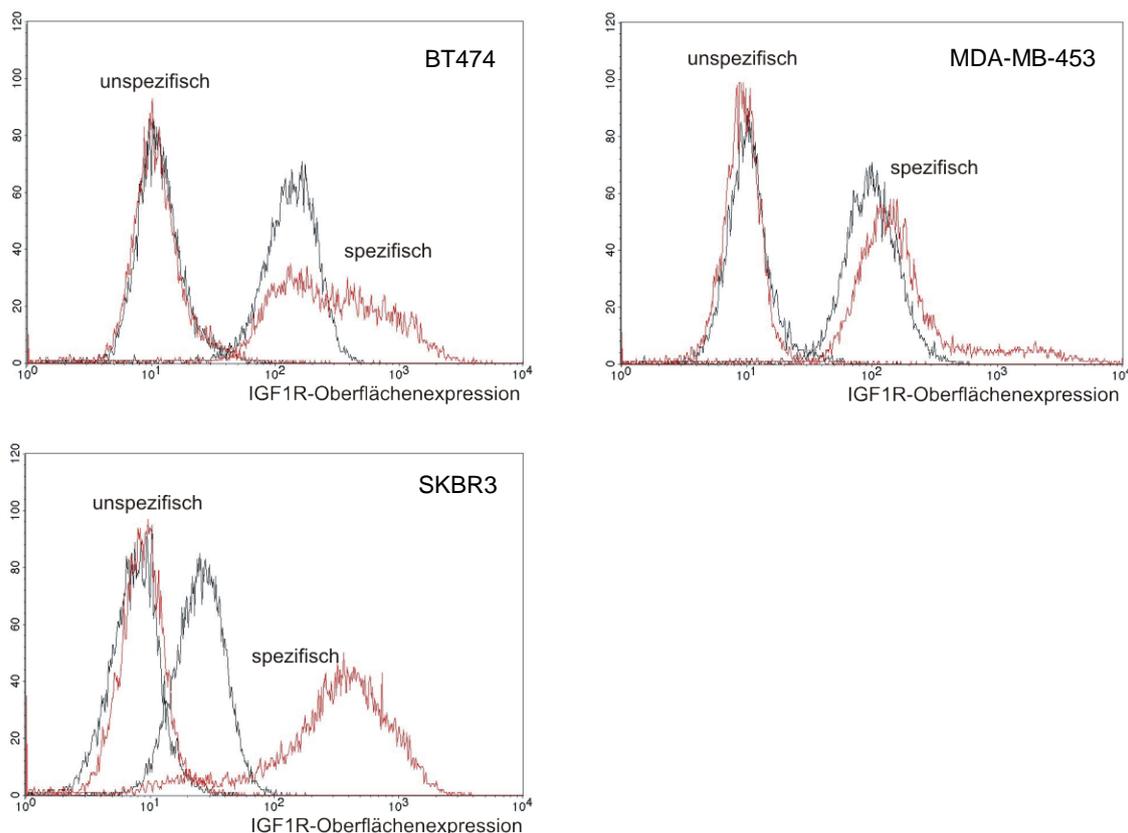
**Abbildung 36: Auswirkungen eines HER3-Knockdowns auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität** a) BT474, b) SKBR3 und c) ZR-75-30. 24h nach der reversen Transfektion mit GL2 bzw. HER3-siRNA wurden die Zellen neu ausgesät und mit 10 $\mu$ g/ml VSV bzw. Herceptin<sup>®</sup> behandelt. Nach weiteren 72h folgte die MTT-Färbung. Aus den Absorptionen der verschiedenen Behandlungen wurde die prozentuale Hemmung berechnet. d) Die Knockdown-Effizienz wurde mit Hilfe einer semiquantitativen PCR bestimmt (GAPDH diente zur Normalisierung).

Mit Hilfe einer semiquantitativen PCR wurde bei jedem Experiment die Effizienz des Knockdowns überprüft (Abb. 36d). Dazu wurde ein Teil der transfizierten Zellen bis zum Ende des Versuches getrennt weiterkultiviert. Bei den SKBR3- und den BT474-Zellen wurde in den Knockdown-Zellen kein HER3 mehr amplifiziert. In den ZR-75-30-Zellen wurde eine Knockdown-Effizienz von ca. 70% erreicht.

#### 5.4.2 Auswirkungen einer Steigerung der IGF-1R-Expression auf die 4D5- Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien

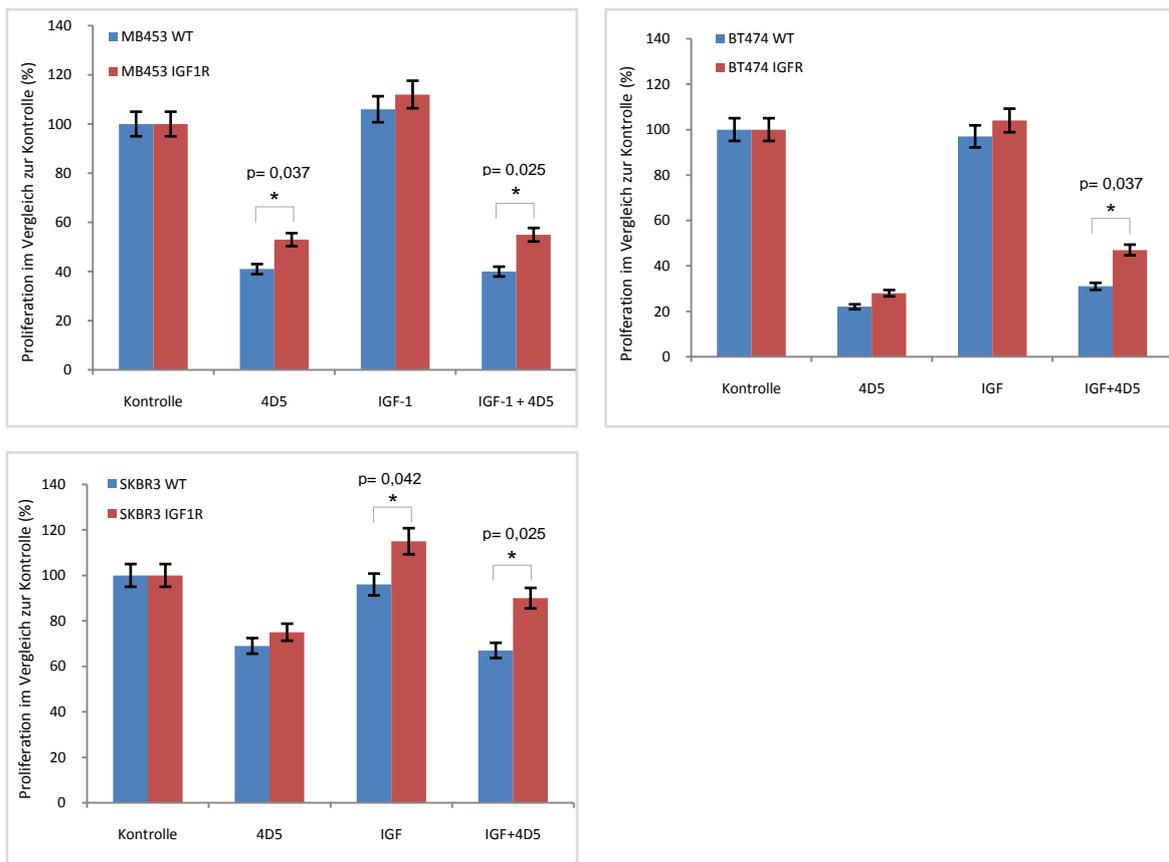
Ziel der folgenden Versuche war es, den Einfluss einer gesteigerten IGF-1R-Expression auf die 4D5-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien zu untersuchen. Als Zellsystem dienten die drei 4D5-sensitiven humanen Brustkrebszelllinien BT474, SKBR3 und MDA-MB-453. Für den retroviralen Transfer wurden folgende pLXSN-Vektoren verwendet: pLXSN-EKS und pLXSN-IGF-1R. Die Selektion der stabil infizierten Zelllinien erfolgte über die im Vektor integrierte G418-Resistenz. Die Validierung der veränderten IGF-1R-Expression erfolgte mit Hilfe der spezifischen Färbung des Rezeptors an der Zelloberfläche und einer sich anschließenden Quantifizierung am Durchflusszytometer. Die Steigerungsraten wurden aus dem Quotienten der relativen Oberflächenexpression von WT- und infizierten Zellen berechnet.

Die Expression des IGF-1-Rezeptors konnte in allen drei Zelllinien gesteigert werden (Abb.37). So zeigten die SKBR3-Zellen, die eine sehr geringe endogene IGF-1R-Expression besitzen, nach der retroviralen Infektion eine 22-fach erhöhte Oberflächenexpression. Auch in den anderen beiden Zelllinien stieg die Expression trotz einer bereits hohen endogenen Expression um einen Faktor von 3 bzw. 4 an.



**Abbildung 37: Quantifizierung der IGF-1R Oberflächenexpression per Durchflusszytometrie** (im FL2-Kanal). Die Färbung erfolgte mit einem IGF-1R-spezifischem primären murinen Antikörper (24-31) und einem PE-gekoppeltem, sekundären  $\alpha$ -Maus-Antikörper. Die schwarzen Kurven zeigen jeweils die Expression der WT-Zellen und die roten Kurven die Expression der infizierten Zellen. Der unspezifische Peak der Hintergrundfärbung wurde bei einer Intensität von  $10^1$  eingestellt.

Um die Auswirkung der gesteigerten IGF-1R-Expression auf die 4D5-Sensitivität zu untersuchen, wurden im Anschluss Proliferationsassays durchgeführt. Dabei sollte zum einen überprüft werden, ob sich die Proliferation der infizierten Zellen mit dem IGF-1R-spezifischen Liganden IGF-1 (25ng/ml) gegenüber den WT-Zellen steigern lässt. Weiterhin wurde getestet, inwiefern sich die 4D5-Sensitivitäten der WT- und IGF-1R-infizierten Zellen unter Hunger- bzw. IGF-1-stimulierten Bedingungen unterscheiden.



**Abbildung 38: 4D5-Sensitivität der IGF-1R-infizierten Zelllinien (rot) im Vergleich zu den WT-Zellen (blau).**- 24h nach dem Aussäen erfolgten Medienwechsel (Reduktion auf 1% FCS) und Behandlung der Zellen mit 4D5, IGF-1 bzw. 4D5+IGF-1. Nach 72h wurde die MTT-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist die relative Proliferation der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (=100%). Je geringer die relative Proliferation, umso größer ist die resultierende Hemmung.

In allen drei Zelllinien konnten dieselben Effekte beobachtet werden (Abb.38). Zum einen waren die IGF-1R-infizierten Zellen leicht insensitiver gegenüber der 4D5-Behandlung, wobei die Differenz nur bei den MDA-MB-453-Zellen signifikant war (-12%).

IGF-1 bewirkte ausschließlich in den IGF-1R-infizierten Zelllinien eine Stimulierung der Proliferation. Eine signifikante Steigerung (+19%) konnte jedoch nur in den SKBR3-Zellen beobachtet werden.

Die leichte Abnahme der 4D5-Sensitivität konnte durch eine gleichzeitige Gabe des spezifischen Liganden (IGF-1) weiter gesteigert werden. So wurde die Proliferation durch eine kombinierte IGF-1/4D5-Behandlung in den IGF-1R-infizierten Zellen deutlich weniger gehemmt, als in den entsprechenden WT-Zellen. Die Differenzen zwischen den Hemmraten der WT- und infizierten Zellen waren in allen drei Zelllinien signifikant.

Am deutlichsten waren die beschriebenen Effekte in den SKBR3-Zellen. So zeigten die SKBR3<sub>IGF-1R</sub>-Zellen bei gleichzeitiger Stimulation des überexprimierten IGF-1-Rezeptors nur noch ein Drittel der 4D5-induzierten Proliferationshemmung, die in den WT-Zellen gemessen wurde (10% versus 33%). Bei einer verbleibenden Hemmung von 10% können die SKBR3<sub>IGF-1R</sub>-Zellen als 4D5-resistent betrachtet werden.

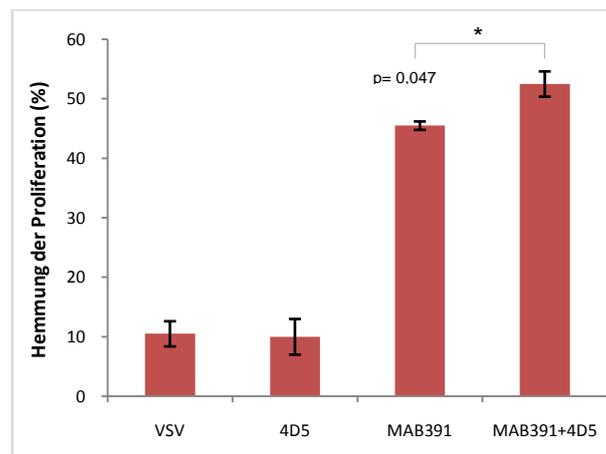
Bei den anderen beiden Zelllinien bewirkte 4D5 in Anwesenheit von IGF-1 eine gegenüber den WT-Zellen um 15% signifikant verminderte Proliferationshemmung. Die verbleibenden Hemmraten lagen aber immer noch bei 55% (MDA-MB-453<sub>IGF-1R</sub>) bzw. 47% (BT474<sub>IGF-1R</sub>).

### 5.4.3 Auswirkungen einer Verminderung der IGF-1R-Expression auf die 4D5-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien

Schließlich sollte auch überprüft werden, ob eine Verminderung der IGF-1R-Expression konsequenterweise auch zu einer Erhöhung der 4D5-Sensitivität führen kann.

Für diese Untersuchungen wurde die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-361 ausgewählt. Diese ist trotz ihrer hohen HER2-Expression und einem Gen-Expressionsprofil, das eher einer Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Zelllinie ähnelt, resistent gegenüber einer 4D5-Behandlung. Da die Zelllinie eine sehr hohe IGF-1R-Expression aufweist, sollte getestet werden, ob die Zellen durch eine Hemmung des IGF-1R sensitiver gegenüber einer 4D5-Behandlung werden.

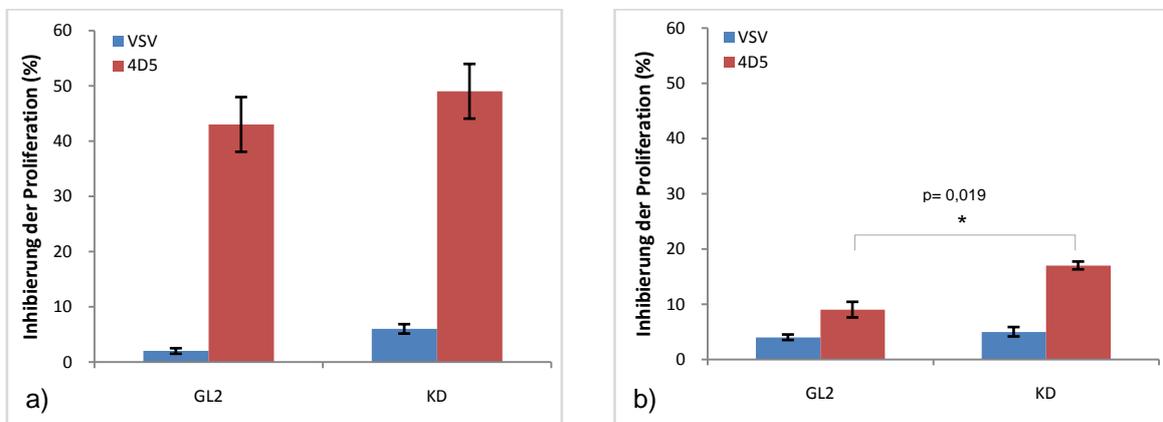
Die Hemmung des IGF-1R wurde zunächst mit Hilfe eines inhibitorischen Antikörpers (MAB391, *R&D Systems*) vorgenommen. Dieser bewirkt bei alleiniger Gabe eine Proliferationshemmung von 45% (Abb. 39). Eine Behandlung mit einem Kontrollantikörper ( $\alpha$ -VSV) bzw. mit 4D5 konnte hingegen keine signifikante Hemmung der Proliferation bewirken. Die Kombination von 4D5 und MAB391 führte zu einer leichten Zunahme der Hemmung, die aber noch signifikant ist.



**Abbildung 39: Wirkung von MAB391 und 4D5 auf die Proliferation von MDA-MB-361-Zellen.** – Die Zellen wurden 24h nach dem Aussäen mit je 10 $\mu$ g/ml VSV, MAB391 ( $\alpha$ IGF-1R), 4D5 ( $\alpha$ HER2) oder einer Kombination aus 4D5 und MAB391 behandelt. Nach 72h wurden die Zellen mit MTT gefärbt und die behandlungsinduzierte Hemmung der Proliferation berechnet.

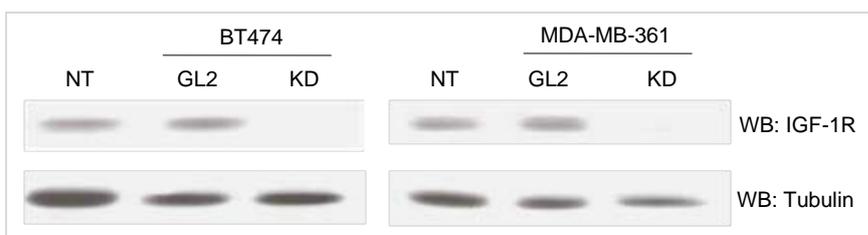
Neben einer Hemmung des IGF-1R durch einen inhibitorischen Antikörper sollten auch die Auswirkungen eines transienten IGF-1R-Knockdowns untersucht werden.

Für diese Versuche wurden sowohl die 4D5-sensitiven BT474, als auch die 4D5-resistenten MDA-MB-361-Zellen untersucht. Der Knockdown des IGF-1R allein bewirkte in den MDA-MB-361-Zellen eine Proliferationshemmung von ca. 20%. Die BT474-Zellen wurden durch den Knockdown selbst nicht gehemmt (Daten nicht gezeigt). Auch auf die 4D5-Sensitivität hatte der IGF-1R-KD in den BT474-Zellen keinen Einfluss. Der leichte Anstieg der Hemmrates ist nicht signifikant. In den MDA-MB-361-Zellen führte der Knockdown jedoch zu einer Verdopplung der 4D5-Sensitivität. Zwar werden mit 17% noch nicht die Hemmraten erreicht, die in einer hoch sensitiven Zelllinie wie BT474 erzielt werden, dennoch hat sich die 4D5 Sensitivität der MDA-MB-361-Zellen signifikant erhöht (Abb.40).



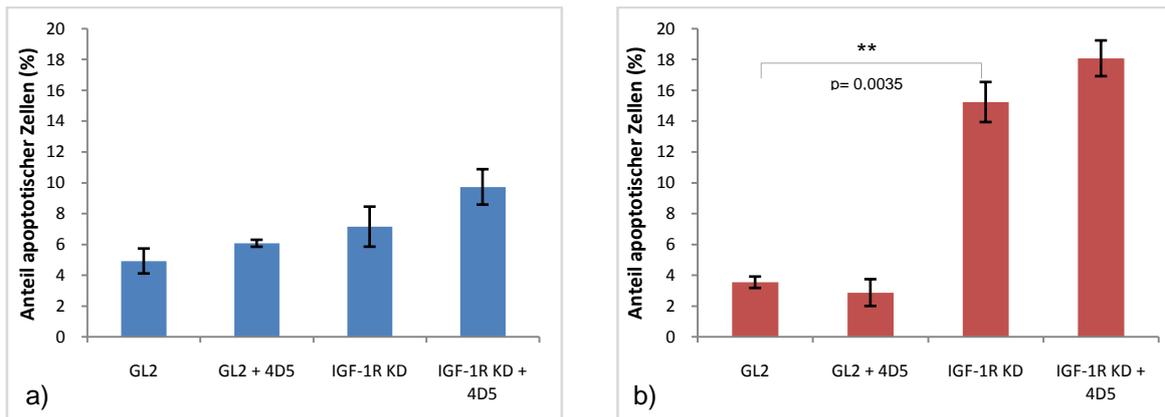
**Abbildung 40: Auswirkungen eines IGF-1R-Knockdowns auf die 4D5-Sensitivität von a) BT474 und b) MDA-MB-361-Zellen.** 24h nach der reversen Transfektion (GL2 bzw. IGF-1R-siRNA) wurden die Zellen neu ausgesät und mit 10µg/ml VSV bzw. 4D5 behandelt. Nach weiteren 72h folgte die MTT-Färbung. Aus den Absorptionwerten der verschiedenen Behandlungen wurde jeweils die prozentuale Hemmung der Proliferation berechnet.

Die Effizienz des Knockdowns wurde mit einer Westernblot-Analyse überprüft. In beiden Zelllinien konnte nach dem Knockdown kein IGF-1R-Protein mehr detektiert werden (Abb.41).



**Abbildung 41: IGF-1R-Expression der nicht-transfizierten (NT), GL2- bzw. IGF-1R-KD-Zellen im Westernblot.** Tubulin diente als Ladekontrolle.

Neben der Hemmung der Proliferation wirkte sich der IGF-1R Knockdown auch auf das Überleben der Zellen aus (Abb.42). Dies konnte vor allem in den MDA-MB-361-Zellen beobachtet werden. Die IGF-1R-Knockdown-Zellen zeichneten sich durch eine gegenüber den GL2-Zellen vierfach erhöhte Apoptoserate aus (3,54% versus 15,24%). Eine zusätzliche 4D5-Behandlung konnte nur eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Apoptoserate bewirken (15,24% versus 18,1%). In den BT474 löste der KD selbst keine Apoptose aus (4,9% versus 7,2%). Auch hier führte die Gabe von 4D5 zu keinem signifikanten Anstieg in der Apoptoserate, weder in den GL2-, noch in den IGF-1R-KD-Zellen.



**Abbildung 42: Auswirkungen des IGF-1R-Knockdowns auf die Apoptoserate (a) BT474 und (b) MDA-MB-361-Zellen.** 24h nach der reversen Transfektion mit GL2/IGF-1R-siRNA wurde ein Teil der Zellen mit 4D5 behandelt. Nach 72h wurde das DNA-Profil der Zellen nach einer PJ-Färbung am Durchflusszytometer (FL2-Kanal) aufgenommen. Dargestellt ist der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamt-Zell-Population.

## 6. Diskussion

### 6.1 Untersuchungen zur natürlichen Herceptin®-Resistenz

Herceptin® ist das erste Medikament einer neuen Generation von zielgerichteten Krebstherapien und spielt eine bedeutende Rolle bei der Behandlung von HER2-positiven Brusttumoren. Aber nicht alle HER2-positiven Brusttumore sprechen auf eine Herceptin®-Behandlung an und auch bei vielen Tumoren, die zu Beginn der Therapie eine gute Reaktion zeigen, treten innerhalb von einem Jahr Resistenzen auf.

Ein Ziel dieser Studie sollte es daher sein, Gene zu identifizieren, die an Prozessen der Resistenzbildung beteiligt sind. Dafür wurde von 18 humanen Brustkrebszelllinien mittels einer Makro-Array-Analyse ein Genexpressionsprofil erstellt. Anschließend wurden alle 18 Expressionsprofile auf Gene untersucht, die in Herceptin®-resistenten und Herceptin®-sensitiven Zelllinien eine entgegengesetzte Expression zeigen.

Die 18 Tumorzelllinien unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Herceptin®-Sensitivität, sondern auch in der Expression des HER2-Rezeptors. So waren unter den zehn Herceptin®-resistenten Zelllinien vorwiegend solche zu finden, die nur geringe Mengen des Rezeptors exprimieren und daher als HER2-negativ bezeichnet werden können. Hier ist es sehr wahrscheinlich, dass die Herceptin®-Resistenz allein durch die mangelnde HER2-Expression verursacht wird. Dafür spricht unter anderem, dass MDA-MB-231/HER2-Zellen, deren HER2-Expression etwa 10-fach erhöht ist, signifikant sensitiver gegenüber Herceptin® sind, als ihre natürlichen MDA-MB-231-Zellen (Cornelissen et al., 2008). Drei der resistenten Zelllinien zeichneten sich jedoch durch eine hohe bzw. sehr hohe HER2-Expression aus. Hier müssen demnach andere Mechanismen zur Resistenzbildung beitragen.

Bei der anschließenden Genexpressionsanalyse konnten vor allem HER2-assoziierte Gene identifiziert werden. Das bedeutet, diese Gene zeigen in HER2-positiven und HER2-negativen Zelllinien ein gegenläufiges Expressionsmuster. Die Unterschiede im Genexpressionsprofil lassen sich vermutlich damit erklären, dass HER2-negative und HER2-positive Tumorzellen verschiedene Signalwege nutzen, um ihr Überleben zu sichern. So exprimieren drei HER2-negative Zelllinien unter anderem den EGFR und EGF-Liganden. Die hohen IGF2- und AXL-Expressionsraten deuten auf zwei weitere Signalwege hin, die in den HER2-negativen Zelllinien eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Zu den Genen, die vorwiegend von HER2-positiven Zelllinien exprimiert werden, gehörten unter anderem *CASP8*, *HER3*, *GRB7* und *HGF*.

Auch Bertucci et al. konnten das Adaptorprotein GRB7 (*growth factor receptor-bound protein 7*) als HER2-assoziiertes Gen identifizieren. Die Ursache für die Koamplifikation von HER2 und GRB7 sehen die Autoren primär in der direkten Nachbarschaft beider Gene auf dem Chromosom 17 (Bertucci et al., 2004). Dass *GRB7* in Brusttumoren gemeinsam mit *HER2* amplifiziert und überexprimiert ist, konnte bereits 1994 durch Stein et al. gezeigt werden. (Stein et al., 1994). GRB7 kann den Tumorzellen aber auch einen funktionellen Vorteil liefern. So zeigten Shen et al., dass eine hohe *GRB7*-Expression zur Integrin-vermittelten Migration beitragen kann (Shen et al., 2002).

Die Genexpressionsanalyse war nur bedingt zur Identifizierung von Herceptin®-resistenzassoziierten Genen geeignet, da die Mehrzahl der dabei ermittelten Gene eine starke HER2-Abhängigkeit zeigte. Nach einer Beschränkung der Gene auf solche, die nur im Resistenz-, aber nicht im HER2-Cluster, enthalten sind, blieben noch 16 resistenzassoziierte Gene übrig. Ob alle diese Gene tatsächlich zur Resistenzbildung beitragen, ist jedoch fraglich, da sie vorwiegend von HER2-negativen Zelllinien exprimiert werden. Um die Relevanz zu prüfen, könnte man untersuchen, ob die HER2-negativen Zelllinien auch nach einer Erhöhung der HER2-Expression resistent gegenüber Herceptin® bleiben. Erst wenn ein anschließender spezifischer Knockdown zu einer Sensitivierung der Zelllinien führen würde, könnte man tatsächlich von einem resistenzassoziierten Gen sprechen.

Bisher befassten sich nur wenige klinische Studien mit der Identifizierung von Herceptin®-resistenzassoziierten Genen. In einer dieser Studien konnten jedoch Gene identifiziert werden, die spezifisch von Herceptin®-resistenten Tumoren exprimiert wurden (Harris et al., 2007). Zu diesen resistenzassoziierten Genen gehören Wachstumsfaktoren (HGF, IGF-1, PDGF, PTN), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (c-met, LEPR), die p85-Untereinheit der PI3K, das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2), sowie einige Gene, die spezifisch für Brusttumore des basalen Subtyps sind (p63, BOC). Dass auch die von Harris et al. untersuchten resistenten Tumore eine erhöhte Expression von diversen Wachstumsfaktoren aufwiesen, deutet darauf hin, dass die Aktivierung alternativer Signalwege einen generellen Resistenzmechanismus darstellt.

Um die Relevanz der 16 HER2-unabhängigen, resistenzassoziierten Gene weiter zu untersuchen, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt, die nur die HER2-überexprimierenden Zelllinien einbezog. Zu den differentiell exprimierten Genen gehörte unter anderem die Sphingosin-Kinase-1 (*SPHK1*), deren Expression sich auf die einzige Herceptin®-resistente Zelllinie beschränkte.

Die Sphingosin-Kinase-1 ist ein Bestandteil des Sphingolipid-Signalweges und katalysiert die Phosphorylierung von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Pitson et al., 2000). Der Sphingolipid-Signalweg ist an der Regulation zentraler Prozesse, wie dem Zellwachstum, der Seneszenz, der Angiogenese, sowie der Differenzierung und dem Überleben von Zellen beteiligt (Hannun and Obeid, 2008). Ihre Funktion scheint essentiell zu sein, da ein Knockdown der Kinase in MCF7-Brustkrebszelllinien den intrinsischen Signalweg des programmierten Zelltodes aktiviert (Taha et al., 2006a).

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der SPHK1/S1P-Signalweg auch eine onkogene Wirkung haben kann. So ruft eine Überexpression der humanen Kinase in NIH3T3-Zellen einen transformierten Phänotyp hervor (Xia et al., 2000). Zudem scheint die SPHK1 auch eine Rolle in diversen humanen Tumorerkrankungen zu spielen. Eine vermehrte Expression der Kinase, wurde bereits in Brust- (Ruckhaberle et al., 2008), Magen- (Li et al., 2009) und Darmtumoren (Kawamori et al., 2009), sowie Astrozytomen (Li et al., 2008) und Glioblastomen (Van Brocklyn et al., 2005) beobachtet und korrelierte meist auch mit einer reduzierten Überlebensrate des Patienten. Die onkogene Funktion der SPHK1 besteht vermutlich darin, dass sie aus einem proapoptotischen Sphingosin das proliferative und antiapoptotisch wirkende S1P herstellt (Cuvillier, 2007; Hannun and Obeid, 2008; Taha et al., 2006b).

## 6.2 Untersuchungen zur erworbenen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz

Um weitere resistenzassoziierte Gene zu identifizieren, wurden Herceptin<sup>®</sup>-resistente Klone hergestellt, die sich durch eine kontinuierliche 4D5-Behandlung aus ihren parental sensitiven Brustkrebszelllinien entwickelt haben.

Obwohl dabei 4D5-Konzentrationen eingesetzt wurden, die schon andere Gruppen zur Selektion von Herceptin<sup>®</sup>-resistenten Zelllinien verwendeten (Kute et al., 2004; Nahta et al., 2004), resultierten aus dem Selektionsprozess hauptsächlich Herceptin<sup>®</sup>-insensitive Klone und nur ein resistenter Klon.

Trotz der vergleichsweise geringen Veränderung der Sensitivität, unterschied sich das Genexpressionsprofil der insensitiven Klone zum Teil deutlich von dem der parental Zelllinien. Einige der selektionsbedingten Expressionsänderungen deckten sich mit den Beobachtungen anderer Gruppen. So konnte sowohl in den insensitiven Klonen dieser Studie, als auch in den Herceptin<sup>®</sup>-resistenten Zelllinien anderer Arbeitsgruppen eine erhöhte Expression des EGFR und seiner Liganden (Ritter et al., 2007), eine Erhöhung der IGF-1R- und IGF1-Expression (Nahta et al., 2005), eine verminderte Expression des CDK-Inhibitors p27<sup>kip1</sup> (Nahta et al., 2004), sowie eine Zunahme der c-Met-Expression (Shattuck et al., 2008) beobachtet werden.

Dass die von den Klonen stärker exprimierte Gene tatsächlich zur Resistenzbildung beitragen, konnte anhand der im Klon BR25 hochregulierten Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase 1D (CAMK1D) gezeigt werden. Ein transients Knockdown dieser 6-fach stärker exprimierte Kinase führte zu einer Halbierung des Resistenzgrades von Klon BR25.

Die CAMK1D (CKLiK) ist eine zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinase. CAMK1-Kinasen spielen unter anderem eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. So zeigten Rodriguez-Mora et al., dass eine Hemmung der CAMK1-Kinasen mittels RNAi oder eines spezifischen Inhibitors (KN-93) die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert (Rodriguez-Mora et al., 2005).

Während Herceptin<sup>®</sup> einen G1-Arrest bewirkt, sind die CAMK1-Kinasen dafür verantwortlich, dass die Zellen die G1-Phase ungehindert durchlaufen. Eine erhöhte CAMK1D-Expression könnte daher die Wirkung von Herceptin<sup>®</sup> zumindest teilweise aufheben. Der Knockdown der Kinase führt demnach dazu, dass der proliferative Effekt der CAMK1D entfällt und somit eine bessere G1-Arretierung durch Herceptin<sup>®</sup> erfolgen kann.

Um die Bedeutung und klinische Relevanz dieser Beobachtung zu validieren, müssten jedoch noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So könnte man zum Beispiel durch eine Überexpression der Kinase in Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Tumorzellen überprüfen, ob die CAMK1D auch in anderen Zellsystemen zur Resistenzbildung beiträgt. Ferner müsste man untersuchen, ob die Expression der CAMK1D in Primärtumoren mit einer schlechten Prognose bzw. einer verminderten Herceptin<sup>®</sup>-Ansprechrate assoziiert ist.

### 6.3 Der Einfluss des IGF-1-Rezeptors

Der IGF-1-Rezeptor ist als positiver Regulator des Zellzyklus am Übergang von der G1- in die S-Phase beteiligt (Baserga et al., 1997). IGF-1 ist aber auch ein anti-apoptotischer Faktor, der zum Überleben der Zelle beiträgt (Resnicoff et al., 1995). Aufgrund dieser zentralen Funktionen führt eine erhöhte Expression der IGF-Liganden bzw. des Rezeptors oder eine anderweitig induzierte, konstitutive Aktivierung des Signalweges unter Umständen zur Entstehung und Progression von Tumoren. So wurden bereits in diversen Krebsarten erhöhte IGF-1/IGF-1R - Expressionen ermittelt, darunter in Karzinomen der Lunge, Brust, Schilddrüse, des Magen-Darm-Traktes oder auch bei Leukämien (Macaulay, 1992).

Dem IGF-1R wird weiterhin ein Beitrag zur Entstehung von Herceptin<sup>®</sup>-Resistenzen zugesprochen. So konnten Lu et al bereits im Jahre 2001 zeigen, dass IGF-1R-überexprimierende SKBR3-Zellen (SKBR3/IGF-1R), im Gegensatz zu SKBR3/Neo-Zellen, die nur eine geringe IGF-1R-Expression besitzen, resistent gegenüber einer Herceptin<sup>®</sup>-Behandlung sind (Lu et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser Effekt auch in Zelllinien zu beobachten ist, die eine moderate endogene IGF-1R-Expression besitzen. So führte bereits eine 3-4-fache Steigerung der endogenen Expression zu einer signifikanten Desensitivierung gegenüber 4D5, dem murinen Vorläufer von Herceptin<sup>®</sup>. Demnach gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Höhe der IGF-1R-Expression und der Sensitivität gegenüber 4D5 bzw. Herceptin<sup>®</sup>. Dies zeigt, dass Tumorzellen in Anwesenheit eines alternativen, kompetenten Signalweges zu einem geringeren Grad auf die transformierenden Eigenschaften des HER2-Rezeptors angewiesen und somit auch weniger anfällig gegenüber einer Hemmung der HER2-Signaltransduktion sind.

Harris et al gingen der Frage nach, ob dieser Zusammenhang auch für humane Brusttumore gilt. Dafür untersuchten sie 46 HER2-positive (IHC3+) Tumore auf ihre IGF-1R-Expression und ihre Ansprechrate auf eine Herceptin<sup>®</sup>/Vinorelbin-Therapie. Dabei stellten sie fest, dass beide Faktoren signifikant korrelieren und eine hohe IGF-1R-Expression somit tatsächlich mit einer verminderten Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität assoziiert ist. So sprachen nur 50% aller IGF-1R-positiven Tumore, aber 97% aller IGF-1R-negativen Tumore auf die Herceptin<sup>®</sup>-Therapie an (Harris et al., 2007).

Bei der vergleichenden Genexpressionsanalyse, die in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, stellte sich heraus, dass von den sechs HER2-überexprimierenden Zelllinien vor allem die beiden Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Zelllinien eine hohe IGF-1R-Expression aufweisen. Daher sollte überprüft werden, ob eine gleichzeitige Hemmung des IGF-1- und HER2-Rezeptors in MDA-MB-361-Zellen wirksamer ist, als eine der beiden Einzelbehandlungen, und ob ein transienter Knockdown des IGF-1R mittels RNAi die Sensitivität der Zelllinie gegenüber 4D5 erhöhen kann.

Die MDA-MB-361-Zellen zeigten sich sehr sensitiv gegenüber einer Hemmung des IGF-1-Rezeptors durch den monoklonalen Antikörper MAB391. 4D5 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation. Die Kombination beider Behandlungen bewirkte zwar eine leichte, aber nicht-signifikante, Zunahme der Hemmung gegenüber der alleinigen MAB391-Behandlung.

Esparis-Ogando et al. zeigten, dass eine kombinierte IGF-1R/HER2-Hemmung dennoch von Vorteil sein kann. So bewirkten Herceptin<sup>®</sup> und der IGF-1R-Inhibitor NVP-AEW541 in zwei Herceptin<sup>®</sup>-sensitiven Zelllinien (BT474 und SKBR3) eine synergistische Hemmung der Proliferation. In der Herceptin<sup>®</sup>-resistenten Zelllinie MCF7, die HER2 in normalen Mengen exprimiert, konnte Herceptin<sup>®</sup> jedoch keine signifikante Verbesserung der NVP-AEW541-induzierten Proliferationshemmung bewirken (Esparis-Ogando et al., 2008). Dies liegt vermutlich an der mangelnden HER2-Expression der MCF7-Zellen und ist ein weiterer Beweis dafür, dass die HER2-Überexpression eine unbedingte Voraussetzung für die Wirksamkeit von Herceptin<sup>®</sup> ist, sowohl allein, als auch in Kombination mit anderen Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Studie wurde auch überprüft, ob eine vollständige Hemmung der IGF-1R-Signaltransduktion mittels RNAi zu einer Sensitivierung gegenüber 4D5 beitragen kann. Dabei wurden sowohl die resistenten MDA-MB-361-Zellen, als auch die sensitiven BT474-Zellen untersucht. Ein Knockdown des IGF-1R induzierte in den resistenten MDA-MB-361-Zellen Apoptose und verdoppelte die 4D5-induzierte Wachstumshemmung. Die sensitiven BT474-Zellen, deren IGF-1R-Expression nur etwa ein Viertel, der in den MDA-MB-361-Zellen ermittelten Expression beträgt, zeigten sich hingegen weniger empfindlich gegenüber einer vollständigen Hemmung des IGF-1R. Somit kann die geringe 4D5-Sensitivität der MDA-MB-361-Zellen zumindest teilweise mit der hohen endogenen IGF-1R-Expression erklärt werden.

#### 6.4 Der Einfluss des HER3-Rezeptors

Das HER2/HER3-Heterodimer hat von allen HER-Rezeptor-Dimeren das größte onkogene Potential (Beerli et al., 1995; Wallasch et al., 1995) und ist zudem mit 12% das vorherrschende Heterodimer in Brusttumoren (Witton et al., 2003).

Andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass der HER3-Rezeptor in HER2-überexprimierenden Tumorzelllinien an einer Resistenzbildung gegenüber EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren beteiligt ist. Die EGFR-Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib blockieren nicht nur sehr effizient die Autophosphorylierung des EGFR- und HER2-Rezeptors, sondern auch die EGFR- bzw. HER2-vermittelte Transphosphorylierung des HER3-Rezeptors. Die Inhibierung des HER3-Rezeptors ist jedoch nur transient, da Rückkopplungsschleifen des PI3K/Akt-Signalweges oder eine erhöhte Aktivität des Met-Rezeptors bereits nach kurzer Zeit dafür sorgen, dass die Signaltransduktion über den HER3-Rezeptor auch in Anwesenheit der EGFR-Inhibitoren stattfinden kann (Engelman et al., 2007; Sergina et al., 2007). Daher sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden, welchen Einfluss HER3 auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität von Brustkrebszelllinien hat.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien (Lee-Hoeflich et al., 2008; Reschke et al., 2008), bewirkte der transiente Knockdown des HER3-Rezeptors in den drei HER2-überexprimierenden Tumorzellen eine deutliche Wachstumshemmung. In den SKBR3-Zellen war diese sogar signifikant höher, als die 4D5- bzw. Herceptin<sup>®</sup>-induzierte Wachstumshemmung. Die durch den HER3-Knockdown-induzierte Proliferationshemmung ließ sich in den SKBR3-Zellen von 4D5 und Herceptin<sup>®</sup> und in den ZR-75-30-Zellen nur von 4D5 signifikant steigern. In den BT474-Zellen konnte hingegen durch eine zusätzliche Herceptin<sup>®</sup>-Behandlung keine signifikante Erhöhung der Proliferationshemmung bewirkt werden. Die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der HER3-KD-Zellen war in allen drei Zelllinien nur halb so groß, wie die der Kontroll-transfizierten Zellen.

Dass die gleichzeitige Hemmung des HER2- und HER3-Rezeptors in den hier untersuchten Zelllinien keine additiven bzw. synergistischen Effekte hervorgerufen hat, lässt sich eventuell damit erklären, dass aufgrund des Zusammenwirkens beider Rezeptoren als onkogene Einheit, die Hemmung des einzelnen Rezeptors genauso effizient ist, wie eine kombinierte Hemmung beider Rezeptoren.

Dafür sprechen auch die Untersuchungen von Lui et al., die zeigten, dass MCF7/HER2-Zellen (HER2-positiv) durch einen Knockdown des HER3-Rezeptors die ursprüngliche Tamoxifen-Sensitivität ihrer MCF7-Ursprungszellen (HER2-negativ) zurückerlangen. Das bedeutet, eine Resistenz gegenüber Tamoxifen kann nur bestehen, wenn beide Partner der onkogenen Einheit, d.h. HER2 und HER3, vorhanden sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz selten nur eine einzelne Ursache hat. Vielmehr handelt es sich bei der Resistenzbildung um einen Prozess, in dem mehrere Faktoren zusammenwirken. Vor diesem Hintergrund ist es umso erstaunlicher, dass bereits die Hemmung eines Faktors zu einer so deutlichen Re-Sensitivierung führt, wie es beim BR25-Klon mit der CAMK1D beobachtet werden konnte. Die Identifizierung derartig zentraler Resistenzfaktoren könnte in Zukunft dazu beitragen, dass bereits vor Beginn einer Herceptin<sup>®</sup>-Behandlung eine Vorhersage über das Therapieansprechen eines Tumors getroffen werden kann. Damit könnten gefährdete Tumore bereits vorbeugend mit spezifischen Kombinationsbehandlungen an einer Resistenzbildung gehindert werden.

## 7. Zusammenfassung

Das in den letzten Jahren stetig wachsende Verständnis über die molekularen Grundlagen von Krebserkrankungen führte zur Entwicklung von zielgerichteten und effizienten Therapieformen. Herceptin<sup>®</sup> war das erste Medikament dieser neuen Generation von Krebstherapien und spielt heute eine bedeutende Rolle bei der Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs. Aber nicht alle HER2-positiven Brusttumore sprechen auf eine Herceptin<sup>®</sup>-Behandlung an und auch bei Tumoren, die eine anfängliche Reaktion zeigen, können innerhalb von einem Jahr Resistenzen auftreten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels einer Array-Analyse zwei neue Kinasen identifiziert werden, deren Expressionsmuster mit der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität humaner Brustkrebszelllinien korreliert. Dabei handelt es sich zum Einen um die Sphingosin-Kinase 1 (SPHK1), die sowohl von Zelllinien mit natürlicher Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz, als auch von selektionierten Herceptin<sup>®</sup>-insensitiven Klonen exprimiert wird. Durch spezifische Knockdown-Versuche konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die erhöhte Expression der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase 1D (CAMK1D) signifikant zur erworbenen Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz eines BT474-Klons beiträgt.

Ein wichtiger Mechanismus bei der Resistenzbildung gegenüber Herceptin<sup>®</sup> ist die Aktivierung alternativer Rezeptor-Tyrosinkinasen. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, welchen Einfluss der IGF-1R auf die Herceptin<sup>®</sup>-Resistenz nehmen kann. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die geringe Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität der HER2-überexprimierenden Brustkrebszelllinie MDA-MB-361 zumindest teilweise auf deren hohe IGF-1R-Expression zurückführen lässt. So konnte ein spezifischer Knockdown des IGF-1-Rezeptors zu einer signifikanten Erhöhung der Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität beitragen. Da die Hemmrate aber auch nach dem Knockdown vergleichsweise gering war, müssen noch weitere Mechanismen an der Resistenzbildung der MDA-MB-361-Zellen beteiligt sein.

In einem weiteren Projekt wurde untersucht, welchen Einfluss der HER3-Rezeptor als wichtigster HER2-Dimerisierungspartner auf die Herceptin<sup>®</sup>-Sensitivität nimmt. Obwohl die drei untersuchten Zelllinien sehr sensitiv auf eine alleinige Hemmung des HER2- und HER3-Rezeptors reagierten, führte eine kombinierte Behandlung nur in einer Zelllinie zu einer synergistischen Proliferationshemmung. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass beide Rezeptoren eine onkogene Einheit bilden und es daher für eine effiziente Wachstumshemmung ausreichend ist, wenn ein Partner des funktionellen HER2/HER3-Heterodimers blockiert wird.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

### Allgemeine Abkürzungen

α-	anti- (Antigen von Antikörpern)
AIDA	Advanced Image Data Analyzer
AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Brustkrebs
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Chemotherapie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DXR	Doxorubicin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EZD	extrazelluläre Domäne
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FPLC	<i>fast performing liquid chromatography</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IHC	Immunhistochemie
KD	Knockdown
MBK	Metastasierender Brustkrebs
MEV	Multi Experiment Viewer (Software)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RE	relative Einheiten
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>standard saline citrate</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i> (Transkriptionsfaktoren)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF-α	<i>transforming growth factor α</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TL	Totallysat

ÜN	Über Nacht
WB	<i>Westernblot</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZL	Zelllinie

### **Kinasen und Liganden**

AKT	Ser/Thr-Proteinkinase (auch PKB)
CAMK1D	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase 1
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF</i>
HER	Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren
HER2/3/4	<i>human epidermal growth factor 2/3/4</i>
HER2+	HER2-positiv (HER2-Überexpression)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HR	Hormonrezeptor
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGFBP3	<i>Insulin-like-growth-factor-binding-protein-3</i>
IGF-1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MET	Rezeptor des HGF
MIG-6	<i>Mitogen-inducible gene 6</i>
MUC4	Mucin 4
NRG	Neuregulin
PKB	Proteinkinase B
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SPHK1	Sphingosin-Kinase-1

### **Einheiten und Statistik**

bp	Basenpaar
°C	Temperatur in Grad Celsius
c	Konzentration
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{M}$	Mikromolar
h	Stunde(n)
$K_d$	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
M	mol pro Liter
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Molar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
rpm	rounds per minute; Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
Stabw	Standardabweichung
V	Volt

## 9. Referenzen

Alimandi, M., Romano, A., Curia, M. C., Muraro, R., Fedi, P., Aaronson, S. A., Di Fiore, P. P., and Kraus, M. H. (1995). Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10, 1813-1821.

Anastasi, S., Sala, G., Huiping, C., Caprini, E., Russo, G., Iacovelli, S., Lucini, F., Ingvarsson, S., and Segatto, O. (2005). Loss of RALT/MIG-6 expression in ERBB2-amplified breast carcinomas enhances ErbB-2 oncogenic potency and favors resistance to Herceptin. *Oncogene* 24, 4540-4548.

Andrechek, E. R., Hardy, W. R., Girgis-Gabardo, A. A., Perry, R. L., Butler, R., Graham, F. L., Kahn, R. C., Rudnicki, M. A., and Muller, W. J. (2002). ErbB2 is required for muscle spindle and myoblast cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 4714-4722.

Austin, C. D., De Maziere, A. M., Pisacane, P. I., van Dijk, S. M., Eigenbrot, C., Sliwkowski, M. X., Klumperman, J., and Scheller, R. H. (2004). Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Mol Biol Cell* 15, 5268-5282.

Barnes, N. L., Khavari, S., Boland, G. P., Cramer, A., Knox, W. F., and Bundred, N. J. (2005). Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 11, 2163-2168.

Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A., and Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 28, 4-11.

Baselga, J., Carbonell, X., Castaneda-Soto, N. J., Clemens, M., Green, M., Harvey, V., Morales, S., Barton, C., and Ghahramani, P. (2005). Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 23, 2162-2171.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., *et al.* (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744.

Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., and Valentini, B. (1997). The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1332, F105-126.

Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P. P., and Carpenter, G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271, 5251-5257.

Baumann, C. K., Castiglione-Gertsch, Monica (2007). Trastuzumab. *Schweiz Med Forum* 7, 879-883.

- Beerli, R. R., Graus-Porta, D., Woods-Cook, K., Chen, X., Yarden, Y., and Hynes, N. E. (1995). Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 15, 6496-6505.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., Linn, S. C., Gonzalez-Angulo, A. M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., *et al.* (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 12, 395-402.
- Bertucci, F., Borie, N., Ginestier, C., Groulet, A., Charafe-Jauffret, E., Adelaide, J., Geneix, J., Bachelart, L., Finetti, P., Koki, A., *et al.* (2004). Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* 23, 2564-2575.
- Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H., and Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 274, 8335-8343.
- Burstein, H. J., Harris, L. N., Marcom, P. K., Lambert-Falls, R., Havlin, K., Overmoyer, B., Friedlander, R. J., Jr., Gargiulo, J., Strenger, R., Vogel, C. L., *et al.* (2003). Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol* 21, 2889-2895.
- Buzdar, A. U., Ibrahim, N. K., Francis, D., Booser, D. J., Thomas, E. S., Theriault, R. L., Puztai, L., Green, M. C., Arun, B. K., Giordano, S. H., *et al.* (2005). Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 23, 3676-3685.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E., and Shepard, H. M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4285-4289.
- Chazin, V. R., Kaleko, M., Miller, A. D., and Slamon, D. J. (1992). Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7, 1859-1866.
- Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752.
- Cho, H. S., and Leahy, D. J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297, 1330-1333.

- Christianson, T. A., Doherty, J. K., Lin, Y. J., Ramsey, E. E., Holmes, R., Keenan, E. J., and Clinton, G. M. (1998). NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 58, 5123-5129.
- Citri, A., and Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505-516.
- Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005). Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280, 30392-30399.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Cobleigh, M. A., Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert, N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., and Slamon, D. J. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-2648.
- Cook-Bruns, N. (2001). Retrospective analysis of the safety of Herceptin immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncology* 61 Suppl 2, 58-66.
- Cornelissen, B., McLarty, K., Kersemans, V., and Reilly, R. M. (2008). The level of insulin growth factor-1 receptor expression is directly correlated with the tumor uptake of (111)In-IGF-1(E3R) in vivo and the clonogenic survival of breast cancer cells exposed in vitro to trastuzumab (Herceptin). *Nucl Med Biol* 35, 645-653.
- Cortés-Funes, R., Alés (2007). Phase II of trastuzumab and cisplatin in patients with advanced gastric cancer with HER2/neu overexpression / amplification. *J Clin Oncol* 15, 18S.
- Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U., and et al. (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.
- Cuvillier, O. (2007). Sphingosine kinase-1--a potential therapeutic target in cancer. *Anticancer Drugs* 18, 105-110.
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560.

Dawson, J. P., Berger, M. B., Lin, C. C., Schlessinger, J., Lemmon, M. A., and Ferguson, K. M. (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25, 7734-7742.

Denoux, Y., Arnould, L., Fiche, M., Lannes, B., Couturier, J., Vincent-Salomon, A., Penault-Llorca, F., Antoine, M., Balaton, A., Baranzelli, M. C., *et al.* (2003). HER2 gene amplification assay: is CISH an alternative to FISH? *Ann Pathol* 23, 617-622.

Diermeier, S., Horvath, G., Knuechel-Clarke, R., Hofstaedter, F., Szollosi, J., and Brockhoff, G. (2005). Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* 304, 604-619.

Downward, J., Parker, P., and Waterfield, M. D. (1984a). Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* 311, 483-485.

Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M. D. (1984b). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307, 521-527.

Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4309-4313.

Elenius, K., Choi, C. J., Paul, S., Santiestevan, E., Nishi, E., and Klagsbrun, M. (1999). Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 18, 2607-2615.

Ellis, M. (2004). Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. *Oncologist* 9 Suppl 3, 20-26.

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.

Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., and Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999-5011.

Esparis-Ogando, A., Ocana, A., Rodriguez-Barrueco, R., Ferreira, L., Borges, J., and Pandiella, A. (2008). Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells. *Ann Oncol* 19, 1860-1869.

Esteva, F. J., Valero, V., Booser, D., Guerra, L. T., Murray, J. L., Pusztai, L., Cristofanilli, M., Arun, B., Esmaeli, B., Fritsche, H. A., *et al.* (2002). Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 1800-1808.

Fedi, P., Pierce, J. H., di Fiore, P. P., and Kraus, M. H. (1994). Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 14, 492-500.

Ferguson, K. M. (2004). Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *BiochemSocTrans* 32, 742-745.

Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. (1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 53, 3217-3220.

Garratt, A. N., Ozcelik, C., and Birchmeier, C. (2003). ErbB2 pathways in heart and neural diseases. *Trends Cardiovasc Med* 13, 80-86.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11, 495-505.

Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390-394.

Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., *et al.* (2004). Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10, 5650-5655.

Gershoni, J. M., and Palade, G. E. (1982). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal Biochem* 124, 396-405.

Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16, 1647-1655.

Gschwind, A., Prenzel, N., and Ullrich, A. (2002). Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation. *Cancer Res* 62, 6329-6336.

- Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A., and Carraway, K. L., 3rd (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8132-8136.
- Hackel, P. O., Gishizky, M., and Ullrich, A. (2001). Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem* 382, 1649-1662.
- Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 850-858.
- Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 139-150.
- Harris, L. N., You, F., Schnitt, S. J., Witkiewicz, A., Lu, X., Sgroi, D., Ryan, P. D., Come, S. E., Burstein, H. J., Lesnikoski, B. A., *et al.* (2007). Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res* 13, 1198-1207.
- Hudziak, R. M., Lewis, G. D., Winget, M., Fendly, B. M., Shepard, H. M., and Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9, 1165-1172.
- Hudziak, R. M., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1987). Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7159-7163.
- Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-354.
- Jackson-Fisher, A. J., Bellinger, G., Ramabhadran, R., Morris, J. K., Lee, K. F., and Stern, D. F. (2004). ErbB2 is required for ductal morphogenesis of the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17138-17143.
- Jones, J. T., Akita, R. W., and Sliwkowski, M. X. (1999). Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett* 447, 227-231.
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
- Junttila, T. T., Sundvall, M., Maatta, J. A., and Elenius, K. (2000). Erbb4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends Cardiovasc Med* 10, 304-310.

Kawamori, T., Kaneshiro, T., Okumura, M., Maalouf, S., Uflacker, A., Bielawski, J., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2009). Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *Faseb J* 23, 405-414.

Keefe, D. L. (2002). Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 95, 1592-1600.

Klos, K. S., Zhou, X., Lee, S., Zhang, L., Yang, W., Nagata, Y., and Yu, D. (2003). Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone. *Cancer* 98, 1377-1385.

Knowlden, J. M., Gee, J. M., Seery, L. T., Farrow, L., Gullick, W. J., Ellis, I. O., Blamey, R. W., Robertson, J. F., and Nicholson, R. I. (1998). c-erbB3 and c-erbB4 expression is a feature of the endocrine responsive phenotype in clinical breast cancer. *Oncogene* 17, 1949-1957.

Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E., and Sudol, M. (2003). WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J Biol Chem* 278, 33334-33341.

Kostler, W. J., Schwab, B., Singer, C. F., Neumann, R., Rucklinger, E., Brodowicz, T., Tomek, S., Niedermayr, M., Hejna, M., Steger, G. G., *et al.* (2004). Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 1618-1624.

Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., and Aaronson, S. A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9193-9197.

Kute, T., Lack, C. M., Willingham, M., Bishwokama, B., Williams, H., Barrett, K., Mitchell, T., and Vaughn, J. P. (2004). Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 57, 86-93.

Laederich, M. B., Funes-Duran, M., Yen, L., Ingalla, E., Wu, X., Carraway, K. L., 3rd, and Sweeney, C. (2004). The leucine-rich repeat protein LRIG1 is a negative regulator of ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 279, 47050-47056.

Lane, H. A., Beuvink, I., Motoyama, A. B., Daly, J. M., Neve, R. M., and Hynes, N. E. (2000). ErbB2 potentiates breast tumor proliferation through modulation of p27(Kip1)-Cdk2 complex formation: receptor overexpression does not determine growth dependency. *Mol Cell Biol* 20, 3210-3223.

Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378, 394-398.

- Lee-Hoeflich, S. T., Crocker, L., Yao, E., Pham, T., Munroe, X., Hoeflich, K. P., Sliwkowski, M. X., and Stern, H. M. (2008). A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy. *Cancer Res* 68, 5878-5887.
- Lemoine, N. R., Barnes, D. M., Hollywood, D. P., Hughes, C. M., Smith, P., Dublin, E., Prigent, S. A., Gullick, W. J., and Hurst, H. C. (1992). Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer. *Br J Cancer* 66, 1116-1121.
- Lemoine, N. R., Jain, S., Silvestre, F., Lopes, C., Hughes, C. M., McLelland, E., Gullick, W. J., and Filipe, M. I. (1991). Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* 64, 79-83.
- Lenferink, A. E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M. L., van Vugt, M. J., Klapper, L. N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E. J., and Yarden, Y. (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J* 17, 3385-3397.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., *et al.* (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4, 1029-1040.
- Lewis, G. D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W. L., Carter, P., Gorman, C., and Shepard, H. M. (1993). Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37, 255-263.
- Li, J., Guan, H. Y., Gong, L. Y., Song, L. B., Zhang, N., Wu, J., Yuan, J., Zheng, Y. J., Huang, Z. S., and Li, M. (2008). Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival. *Clin Cancer Res* 14, 6996-7003.
- Li, W., Yu, C. P., Xia, J. T., Zhang, L., Weng, G. X., Zheng, H. Q., Kong, Q. L., Hu, L. J., Zeng, M. S., Zeng, Y. X., *et al.* (2009). Sphingosine kinase 1 is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients. *Clin Cancer Res* 15, 1393-1399.
- Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., and Pollak, M. (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93, 1852-1857.
- Macaulay, V. M. (1992). Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65, 311-320.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marcom, P. K., Isaacs, C., Harris, L., Wong, Z. W., Kommarreddy, A., Novielli, N., Mann, G., Tao, Y., and Ellis, M. J. (2007). The combination of letrozole and trastuzumab as first or second-line biological therapy produces durable responses in a subset of HER2 positive and ER positive advanced breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 102, 43-49.

Martin-Fernandez, M., Clarke, D. T., Tobin, M. J., Jones, S. V., and Jones, G. R. (2002). Preformed oligomeric epidermal growth factor receptors undergo an ectodomain structure change during signaling. *Biophys J* 82, 2415-2427.

Marty, M., Cognetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Anton, A., Lluch, A., *et al.* (2005). Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23, 4265-4274.

Mass, P., Anderson, Murphy, Slamon (2001). Improved survival benefit from Herceptin (trastuzumab) in patients selected by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20.

Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62, 515-541.

Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376, 337-341.

Mohsin, S. K., Weiss, H. L., Gutierrez, M. C., Chamness, G. C., Schiff, R., Digiovanna, M. P., Wang, C. X., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., Allred, D. C., *et al.* (2005). Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 23, 2460-2468.

Moody, S. E., Sarkisian, C. J., Hahn, K. T., Gunther, E. J., Pickup, S., Dugan, K. D., Innocent, N., Cardiff, R. D., Schnall, M. D., and Chodosh, L. A. (2002). Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis. *Cancer Cell* 2, 451-461.

Moriki, T., Maruyama, H., and Maruyama, I. N. (2001). Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 311, 1011-1026.

Muss, H. B., Thor, A. D., Berry, D. A., Kute, T., Liu, E. T., Koerner, F., Cirrincione, C. T., Budman, D. R., Wood, W. C., Barcos, M., and *et al.* (1994). c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 330, 1260-1266.

Nagata, Y., Lan, K. H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Klos, K. S., Li, P., Monia, B. P., Nguyen, N. T., *et al.* (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6, 117-127.

Nagy, P., Friedlander, E., Tanner, M., Kapanen, A. I., Carraway, K. L., Isola, J., and Jovin, T. M. (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 65, 473-482.

- Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N. T., Hung, M. C., and Esteva, F. J. (2004). P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 64, 3981-3986.
- Nahta, R., Yuan, L. X., Zhang, B., Kobayashi, R., and Esteva, F. J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res* 65, 11118-11128.
- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S., and Kutty, M. K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 78, 1385-1390.
- Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G. (2001). gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294, 2179-2181.
- Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S9-15.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.
- Olayioye, M. A., Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Rohrer, J., Gay, B., and Hynes, N. E. (1998). ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 18, 5042-5051.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19, 3159-3167.
- O'Shaughnessy, J. A., Vukelja, S., Marsland, T., Kimmell, G., Ratnam, S., and Pippen, J. E. (2004). Phase II study of trastuzumab plus gemcitabine in chemotherapy-pretreated patients with metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5, 142-147.
- Palyi-Krek, Z., Barok, M., Isola, J., Tammi, M., Szollosi, J., and Nagy, P. (2007). Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer* 43, 2423-2433.
- Park, S. K., Miller, R., Krane, I., and Vartanian, T. (2001). The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes. *J Cell Biol* 154, 1245-1258.
- Pauletti, G., Dandekar, S., Rong, H., Ramos, L., Peng, H., Seshadri, R., and Slamon, D. J. (2000). Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 18, 3651-3664.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396.

Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinavar, F., and Slamon, D. (1999). Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18, 2241-2251.

Pegram, M. D., Konecny, G. E., O'Callaghan, C., Beryt, M., Pietras, R., and Slamon, D. J. (2004). Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 739-749.

Perez, E. A., and Baweja, M. (2008). HER2-positive breast cancer: current treatment strategies. *Cancer Invest* 26, 545-552.

Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., and Kerbel, R. S. (1997). Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151, 1523-1530.

Pietras, R. J., Fendly, B. M., Chazin, V. R., Pegram, M. D., Howell, S. B., and Slamon, D. J. (1994). Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 9, 1829-1838.

Pietras, R. J., Poen, J. C., Gallardo, D., Wongvipat, P. N., Lee, H. J., and Slamon, D. J. (1999). Monoclonal antibody to HER-2/neureceptor modulates repair of radiation-induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpressing this oncogene. *Cancer Res* 59, 1347-1355.

Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Xia, P., Gamble, J. R., Vadas, M. A., D'Andrea, R. J., and Wattenberg, B. W. (2000). Expression of a catalytically inactive sphingosine kinase mutant blocks agonist-induced sphingosine kinase activation. A dominant-negative sphingosine kinase. *J Biol Chem* 275, 33945-33950.

Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G., and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1746-1750.

Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999). EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888.

- Press, M. F., Slamon, D. J., Flom, K. J., Park, J., Zhou, J. Y., and Bernstein, L. (2002). Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens. *J Clin Oncol* 20, 3095-3105.
- Price-Schiavi, S. A., Jepson, S., Li, P., Arango, M., Rudland, P. S., Yee, L., and Carraway, K. L. (2002). Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *IntJCancer* 99, 783-791.
- Qiu, X. B., and Goldberg, A. L. (2002). Nrdp1/FLRF is a ubiquitin ligase promoting ubiquitination and degradation of the epidermal growth factor receptor family member, ErbB3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14843-14848.
- Quinn, C. M., Ostrowski, J. L., Lane, S. A., Loney, D. P., Teasdale, J., and Benson, F. A. (1994). c-erbB-3 protein expression in human breast cancer: comparison with other tumour variables and survival. *Histopathology* 25, 247-252.
- Reschke, M., Mihic-Probst, D., van der Horst, E. H., Knyazev, P., Wild, P. J., Hutterer, M., Meyer, S., Dummer, R., Moch, H., and Ullrich, A. (2008). HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clin Cancer Res* 14, 5188-5197.
- Resnicoff, M., Abraham, D., Yutanawiboonchai, W., Rotman, H. L., Kajstura, J., Rubin, R., Zoltick, P., and Baserga, R. (1995). The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. *Cancer Res* 55, 2463-2469.
- Riccardi, C., and Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *NatProtoc* 1, 1458-1461.
- Riedel, H., Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1987). A chimeric, ligand-binding v-erbB/EGF receptor retains transforming potential. *Science* 236, 197-200.
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., and Corfas, G. (2000). Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* 275, 10379-10387.
- Ritter, C. A., Perez-Torres, M., Rinehart, C., Guix, M., Dugger, T., Engelman, J. A., and Arteaga, C. L. (2007). Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* 13, 4909-4919.
- Rodriguez-Mora, O. G., LaHair, M. M., McCubrey, J. A., and Franklin, R. A. (2005). Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 65, 5408-5416.

Roh, H., Pippin, J., and Drebin, J. A. (2000). Down-regulation of HER2/neu expression induces apoptosis in human cancer cells that overexpress HER2/neu. *Cancer Res* 60, 560-565.

Ruckhaberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., von Minckwitz, G., Schiffmann, S., Grosch, S., Geisslinger, G., Holtrich, U., Karn, T., and Kaufmann, M. (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 112, 41-52.

Sarup, J. C., Johnson, R. M., King, K. L., Fendly, B. M., Lipari, M. T., Napier, M. A., Ullrich, A., and Shepard, H. M. (1991). Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul* 1, 72-82.

Sauter, G., Moch, H., Moore, D., Carroll, P., Kerschmann, R., Chew, K., Mihatsch, M. J., Gudat, F., and Waldman, F. (1993). Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 53, 2199-2203.

Schafer, B., Gschwind, A., and Ullrich, A. (2004). Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 23, 991-999.

Schaller, B., Weber (2005). Efficacy and safety of trastuzumab plus capecitabine in a German multicentre phase II study of pre-treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 23, 57s.

Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I., and Weinberg, R. A. (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* 312, 513-516.

Schmid, R. S., McGrath, B., Berechid, B. E., Boyles, B., Marchionni, M., Sestan, N., and Anton, E. S. (2003). Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4251-4256.

Schulze, W. X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0008.

Seidman, A., Hudis, C., Pierri, M. K., Shak, S., Paton, V., Ashby, M., Murphy, M., Stewart, S. J., and Keefe, D. (2002). Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 20, 1215-1221.

Sergina, N. V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K. M., and Moasser, M. M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445, 437-441.

- Shackleford, K. A., Le XF, Kute T, Rassidakis G. (2007). JAB1 confers resistance to trastuzumab by inhibition of p27. Paper presented at: AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics.
- Shattuck, D. L., Miller, J. K., Carraway, K. L., 3rd, and Sweeney, C. (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 68, 1471-1477.
- Shen, T. L., Han, D. C., and Guan, J. L. (2002). Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem* 277, 29069-29077.
- Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, II, Fong, K. M., Toyooka, S., Shimizu, N., *et al.* (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 65, 1642-1646.
- Sibilia, M., and Wagner, E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 269, 234-238.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and *et al.* (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L., and Carraway, K. L., 3rd (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 269, 14661-14665.
- Stein, D., Wu, J., Fuqua, S. A., Roonprapunt, C., Yajnik, V., D'Eustachio, P., Moskow, J. J., Buchberg, A. M., Osborne, C. K., and Margolis, B. (1994). The SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *Embo J* 13, 1331-1340.
- Stern, D. F., Heffernan, P. A., and Weinberg, R. A. (1986). p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol* 6, 1729-1740.

Taha, T. A., Kitatani, K., El-Alwani, M., Bielawski, J., Hannun, Y. A., and Obeid, L. M. (2006a). Loss of sphingosine kinase-1 activates the intrinsic pathway of programmed cell death: modulation of sphingolipid levels and the induction of apoptosis. *Faseb J* 20, 482-484.

Taha, T. A., Mullen, T. D., and Obeid, L. M. (2006b). A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2027-2036.

Tao, R. H., and Maruyama, I. N. (2008). All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J Cell Sci* 121, 3207-3217.

Thoms, S. S., Lesniak D, Lai R, Deschenes J, Mackey J, Murray, Abdulkarim B (2007). Increased b1 integrin expression is a predictor of trastuzumab resistance in HER-2 overexpressing metastatic breast cancer patients. Paper presented at: San Antonio Breast Cancer Symposium.

Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., and et al. (1995). Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 269, 230-234.

Travis, A., Pinder, S. E., Robertson, J. F., Bell, J. A., Wencyk, P., Gullick, W. J., Nicholson, R. I., Poller, D. N., Blamey, R. W., Elston, C. W., and Ellis, I. O. (1996). C-erbB-3 in human breast carcinoma: expression and relation to prognosis and established prognostic indicators. *Br J Cancer* 74, 229-233.

Tripathy, M. P., Verma U, Mukhopadhyay C., and Shelton J, S. M., Ding L. (2007). Targeting of the chemokine receptor CXCR4 in acquired trastuzumab resistance. Paper presented at: San Antonio Breast Cancer Symposium.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and et al. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418-425.

Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.

Van Brocklyn, J. R., Jackson, C. A., Pearl, D. K., Kotur, M. S., Snyder, P. J., and Prior, T. W. (2005). Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 695-705.

Vecchi, M., Baulida, J., and Carpenter, G. (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* 271, 18989-18995.

Venter, D. J., Tuzi, N. L., Kumar, S., and Gullick, W. J. (1987). Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 2, 69-72.

Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., *et al.* (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726.

Wallasch, C., Weiss, F. U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W., and Ullrich, A. (1995). Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J* 14, 4267-4275.

Waterman, H., Alroy, I., Strano, S., Seger, R., and Yarden, Y. (1999). The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *Embo J* 18, 3348-3358.

Williams, C. C., Allison, J. G., Vidal, G. A., Burow, M. E., Beckman, B. S., Marrero, L., and Jones, F. E. (2004). The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* 167, 469-478.

Witton, C. J., Reeves, J. R., Going, J. J., Cooke, T. G., and Bartlett, J. M. (2003). Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 200, 290-297.

Wongpaksa, T. P. a. C. (2006). Mutations of HER2 gene in HER2-positive metastatic breast cancer. Paper presented at: Journal of Clinical Oncology.

Xia, P., Gamble, J. R., Wang, L., Pitson, S. M., Moretti, P. A., Wattenberg, B. W., D'Andrea, R. J., and Vadas, M. A. (2000). An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr Biol* 10, 1527-1530.

Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C. L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62, 4132-4141.

Yamamoto, T., Hihara, H., Nishida, T., Kawai, S., and Toyoshima, K. (1983). A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell* 34, 225-232.

Yamauchi, T., Yamauchi, N., Ueki, K., Sugiyama, T., Waki, H., Miki, H., Tobe, K., Matsuda, S., Tsushima, T., Yamamoto, T., *et al.* (2000). Constitutive tyrosine phosphorylation of ErbB-2 via Jak2 by autocrine secretion of prolactin in human breast cancer. *J Biol Chem* 275, 33937-33944.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137.

Yu, X., Sharma, K. D., Takahashi, T., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2002). Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell* 13, 2547-2557.

Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., and Greene, M. I. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 117, 2051-2058.

## Danksagung

Zu allererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die interessanten Projekte, die hilfreichen Anregungen und seine großartige Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Alfons Gierl dafür danken, dass er die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Technischen Universität München übernommen hat.

Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich auch an all meine lieben Kollegen, von denen jeder seinen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Pjotr Knyazev bedanken, der mir nicht nur die Arraydaten der Brustkrebszelllinien zur Verfügung gestellt hat, sondern auch immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Weiterhin danke ich Claus, für seine Unterstützung, vor allem bei der Durchführung und Auswertung der Arrays für die insensitiven Klone.

Ganz besonders möchte ich auch Markus, Martin und Nina für ihre guten Vor- und Ratschläge danken, die mir dabei halfen, meinen Weg durch den Forschungsdschungel zu finden.

Selbstverständlich danke ich auch meinen vielen Korrekturlesern, die (hoffentlich) alle von mir eingearbeiteten Ungereimtheiten herausgefiltert haben. Vielen Dank: Kathrin, Markus, Martin, Philipp und Susanne.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinem lieben Mann und bei meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Unterstützung bedanken. Vielen Dank, dass ihr mich immer wieder aufgebaut und motiviert habt und dass auch ihr euch durch die vielen Seiten meiner Doktorarbeit gekämpft habt.