Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. K. Diedrich

Interaktionen zwischen den Signaltransduktionswegen der Östrogenrezeptoren und der Tyrosinkinaserezeptoren am Beispiel der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 als Ziel neuer Behandlungsstrategien

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Angela Siebel
aus Eberswalde- Finow

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Tobias Restle

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2008
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.11.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

1. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom als häufigste Krebserkrankung der Frau weckt hinsichtlich der Behandlungsstrategien ein besonders großes Interesse im Bereich der medizinischen, biologischen und pharmazeutischen Forschung. Die Entscheidung über die durchzuführende Behandlung hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine wichtige Rolle dabei spielt der Hormonrezeptorstatus der Tumorzellen, da schon lange bekannt ist, dass die Expression bestimmter Rezeptorkonstellationen, wie z.B. das Fehlen von Östrogenrezeptoren oder die Überexpression von HER2/ Neu Rezeptoren, mit einer höheren Rückfallrate nach Behandlung und einem schlechteren Überleben einhergehen. Die antihormonelle Therapie hat dabei einen wichtigen Stellenwert in der Behandlung des Mammakarzinoms. Derzeit umfasst diese die Behandlung mit Antiöstrogenen, Aromataseinhibitoren, Gestagenen und Antikörpern gegen EGF Rezeptoren (insbesondere gegen den HER2/ Neu- Rezeptor). Da die Behandlung häufig jedoch nicht ausreicht, weil sich z.B. Resistenzen gegen Antiöstrogene ausbilden, müssen neue Behandlungsstrategien entwickelt werden, die die Entwicklung von Resistenzen verhindern und zu einer verbesserten Wirksamkeit führen. Als wichtiger Mechanismus für das Fehlschlagen einer Behandlung wird die Interaktion zwischen den Signalwegen der Tyrosinkinase- und der Östrogenrezeptoren angenommen. Durch eine gleichzeitige Inhibition verschiedener Signaltransduktionskaskaden könnte eine verbesserte Wirksamkeit der Therapien erreicht werden. Dazu ist es allerdings notwendig, weitere Einblicke in den Ablauf der Signalwege zu gewinnen. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 die Beeinflussung der Interaktionen zwischen Östrogen- und Tyrosinkinasesignalwegen durch Nachweis von Apoptose und Proliferation m. H. von drei verschiedenen Verfahren (MTS- Assay, Cell Death Detection ELISA und Western blot) untersucht. Durch Kombination von Östrogenrezeptorantagonisten und Tyrosinkinaseinhibitoren konnten unsere Studien eine Verbesserung in der antitumoralen Therapie nachweisen. Besonders günstig erwies sich dabei zur Steigerung der Apoptoserate die Kombination von Tamoxifen mit den EGF-Rezeptorantagonisten ZD 1839 und AG 1478. Allerdings konnten wir auch unerwartete Effekte z.B. bei der Behandlung mit Herceptin oder dem MEK- Inhibitor PD 98059 mit Senkung der Apoptoserate nachweisen. Die hinter diesen Effekten stehenden Mechanismen gilt es zu erforschen, um die Behandlungsstrategien den entsprechenden Mammakarzinomen anzupassen. Diese Arbeit sollte einen kleinen Beitrag zum Verständnis der zellulären Mechanismen leisten.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 3

2. Einleitung 8

2.1. Bedeutung der hormonellen Therapie und der Chemotherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms 8
2.2. Cross talk zwischen Signaltransduktionswegen 10
2.3. Östrogene und ihre Rezeptoren 11
2.4. Tyrosinkinasen 15
2.4.1. Nicht- Rezeptor- Tyrosinkinasen 15
2.4.2. Rezeptor- Tyrosin- Kinasen (RTK) 16
2.4.3. Signaltransduktionswege der Rezeptor- Tyrosin- Kinasen 18
2.4.4. Aktivierendes Protein- 1 (Activating Protein-1/ AP-1) 22
2.5. Apoptose 23
2.5.1. Signaltransduktion beim Vorgang der Apoptose, ausgelöst durch extrazelluläre Signale 23
2.5.2. Apoptose getriggert durch intrazelluläre Signale 26
2.6. Östrogenrezeptorantagonisten und Selektive Östrogenrezeptor-modulatoren 26
2.6.1. Tamoxifen 27
2.6.2. Faslodex (Fulvestrant/ ICI 182, 780) 27
2.7. RTK- Inhibitoren 28
2.7.1. Herceptin (Trastuzumab) 28
2.7.2. PD 98059 29
2.7.3. ZD 1839 (Iressa/ Gefitinib) 29
2.7.4. AG 1478 30
2.7.5. AG 1024 30
2.7.6. SB 203580 30
2.8. Fragestellung 31

3. Material und Methoden 32

3.1. Material 32
3.1.1. Verbrauchsmaterialien und Kits 32
3.1.2. Materialien für Western blot: 35
3.1.3. Puffer, Lösungen und Gele für Western blot: 35
3.2. Methoden 38
3.2.1. MCF-7 Zelllinie 38
3.2.2. MDA- MB- 231 Zelllinie 38
3.2.3. Zellkultur 39
3.2.4. MTS- Assay (CellTiter 96® Aqueous ONE Solution Cell Proliferation Assay) 41
3.2.5. Cell- Death- Detection- ELISA^{PLUS} (CDDE) 41
3.2.6. Western Blot (Anti- Poly- (ADP-Ribose)- Polymerase (PARP)) 44
3.3. Auswertung und Statistik 48

4. Ergebnisse 49

4.1. MDA- MB- 231 Zellen 49
4.1.1. Effekte der Östrogenrezeptorantagonisten auf die MDA- MB- 231 Zellen 49
4.2. MCF-7 Zellen 53
4.2.1. Effekte der Östrogenrezeptorantagonisten auf die ERα- positiven MCF-7 Zellen 53
4.2.2. Effekte der Wachstumsfaktoren auf die MCF-7 Zellen 58

4.2.3. Effekte der Wachstumsfaktoren auf die antiproliferative und apoptotische Wirkung des Tamoxifens im östrogenhaltigen Medium.....60
4.2.4. Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF- 7 Zellen.....63
4.2.5. Effekte einer Kombinationsbehandlung mit RTK- Inhibitoren und Tamoxifen auf die Apoptoserate der MCF-7 Zellen.....64
4.2.6. Aufhebung des antiapoptotischen Effektes der Wachstumsfaktoren durch die RTK- Inhibitoren 70
4.2.7. Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Proliferation 74
4.2.8. Effekte einer Kombinationsbehandlung der RTK- Inhibitoren und Tamoxifen auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Proliferation 75
4.2.9. Effekte auf die zelluläre Proliferation durch eine gleichzeitige Behandlung der MCF-7 Zellen mit RTK- Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Tamoxifen 77
4.3. Effekte der Lösungsmittel der einzelnen Substanzen auf die Zelllinien 80
4.3.1. Effekte der Lösungsmittel von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die MDA-MB- 231 Zellen.....80
4.3.2. Effekte der Lösungsmittel aller Substanzen auf die Proliferation der MCF-7 Zellen 81
4.3.3. Effekte der Lösungsmittel aller Substanzen auf die Apoptose der MCF-7 Zellen 85
4.4. Nachweis der Apoptose mit Hilfe des Western blotting Verfahrens am Beispiel der Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen, EGF und ZD 1839.89
5. Diskussion 91
5.1. Beeinflussung der Apoptose und Proliferation am Beispiel der ERα- und - β-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF- 7.....91
5.1.1. Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung durch SERM an MCF- 7 Zellen (dosis- und zeitabhängige Wirkung) 91
5.1.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Apoptose und Proliferation der MCF-7 Zellen 94
5.1.3. Einfluss der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation und Apoptose der MCF-7 Zellen mit und ohne gleichzeitige Tamoxifenbehandlung.....100
5.1.4. Einige der Lösungsmittel induzieren ebenfalls Apoptose 110
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse 111
5.3. Beeinflussung der Apoptose und Proliferation durch SERM an der ERα-negativen Zelllinie MDA- MB- 231 113
6. Ausblick 114
7. Literaturverzeichnis 115
8. Danksagung.....130
9. Tabellarischer Lebenslauf 131
10. Veröffentlichungen.....132

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF-1	aktivierende Funktion 1
AF-2	aktivierende Funktion 2
Akt	Proteinkinase B
AP-1	aktivierendes Protein- 1
AS	Aminosäure
ADP/ ATP	Adenosindiphosphat/ Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CBP	CREB binding proteins
CDDE	Cell death detection ELISA
CRE	cAMP- responsive element
CREB	CRE binding protein
DISC	death inducing signaling complex
DED	death effector domain
E2	Östrogen/ 17β- Östradiol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
ErbB	zelluläres Homolog zu einem Onkogen des Erythroblastose-Virus
ERE	Estrogen response elements
ERK	extrazelluläre Signal- regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
GDP/ GTP	Guanosindiphosphat/ Guanosintriphosphat
GF	Growth factor (Wachstumsfaktor)
GRB2	growth factor receptor- bound protein 2
HRG	Heregulin
ICE	Familie von Enzymen/ Caspasen
ICI 182, 780	Faslodex/ Fulvestrant
IGF	Insulin- like- growth factor
IGFBP	IGF bindendes Protein
JAK	Janus- Kinase
LBD	Ligandenbindungsdomäne

LM/ LMK	Lösungsmittel/ Lösungsmittelkontrolle
MAPK	microtubule associated protein kinase/ mitogen- activated protein kinase
MEK 1/2	MAP/ ERK- Kinase
MTS- Assay	Cell Proliferation Assay
NEU	alte Bezeichnung für ERBB2- Gen (NEU- Neuroblastom)
NTD	N- terminalen Domäne
PARP	Anti- Poly- (ADP-Ribose)- Polymerase
PCR	Polymerase- chain- reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PH	Pleckstrin- Homologieeinheit
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3- Kinase/ AKT (Proteinkinase B)
PKA	Proteinkinase- A
PKB	Proteinkinase- B/ Akt
PKC	Proteinkinase- C
PLC	Phospholipase C
PTB Domäne	Phosphotyrosin- Bindungs- Domäne
Ser	Serin
SERM	Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren
SH	SRC- Homologieeinheit
sog.	sogenannt
SOS	„son of sevenless", (der Tyrosinkinase- Rezeptor wurde bei Mutanten von Drosophila als „sevenless" bezeichnet, ein Protein im distalen Signalweg als „son of sevenless".)
SR- 2	Serum replacement/ Serumersatz
SRC	Onkogen des Rous- Sarkom- Virus
SRC-1	steroid- receptor- coactivator-1
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAM	Tamoxifen
TGF alpha	Transforming growth factor alpha
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	und andere
WF	Wachstumsfaktor
ZD 1839	Iressa/ Gefitinib

2. Einleitung

Das Mammakarzinom ist mit 25% die häufigste Krebserkrankungen der Frau, weshalb es einen hohen gesundheitspolitischen, gesellschaftspolitischen, sozialen und finanziellen Stellenwert in unserer Gesellschaft und in der Medizin einnimmt.

Die Schwere der Erkrankung, die daraus folgende Prognose und die Behandlungsstrategie hängen von verschiedenen Faktoren ab. Der Prognosefaktor der bei Frauen mit primärem Brustkrebs am wichtigsten ist, ist die Anzahl der vom Tumor befallenen Lymphknoten. Auch ein Fehlen von Östrogenrezeptoren oder eine Überexpression von Her2- Rezeptoren geht mit einem schlechteren Überleben und höherem Rückfallrisiko einher. Patientinnen mit aneuploiden Tumoren oder mit einem hohen S- Phase Anteil in der Tumorzellmasse haben ein erhöhtes Risiko, rückfällig zu werden (Clark et al., 1988).

Die hormonelle Therapie spielt eine wichtige Rolle in der Behandlung Östrogenrezeptor- positiver Mammakarzinome, wobei die verschiedenen Klassen der hormonellen Therapie dahin ausgerichtet sind, die ER- vermittelte Proliferation des Krebses zu verhindern. Dieses schließt die sog. Antiöstrogene ein, welche in die nonsteroidalen selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen und Raloxifen, die steroidalen Antiöstrogene wie Fulvestrant und die Aromataseinhibitoren wie Anastrozol und Exemestan eingeteilt werden können (Jones, 2003).

Aromataseinhibitoren blockieren die Aktivität des Enzyms Aromatase und so die Umwandlung von Androgenen in Östrogene. Allerdings können diese Medikamente nur bei postmenopausalen Patientinnen eingesetzt werden, da bei prämenopausalen Frauen der endogene Feedbackmechanismus die Ovarien zu einer gesteigerten Aromataseproduktion anregen würde. Als first- line Behandlung metastasierender Karzinome weisen Aromataseinhibitoren eine bessere Ansprechbarkeit als Tamoxifen auf, weshalb einige Onkologen den Einsatz der Aromataseinhibitoren bei diesem Patientenkollektiv bevorzugen (Jones, 2003).

2.1. Bedeutung der hormonellen Therapie und der Chemotherapie in der Behandlung des Mammakarzinoms

Obwohl anfangs viele E2- Rezeptor positive Mammakarzinome auf eine Therapie mit Antiöstrogenen reagieren, sind die Reaktionen häufig inkomplett und eine spätere Resistenz auf die Behandlung entsteht. Es ist wichtig, die

Signalmechanismen, die diesem Phänomen unterliegen zu verstehen und Therapien zu entwickeln, die die Ansprechbarkeit auf die antihormonelle Behandlung verbessern und Resistenzen gegen die verwendeten Substanzen verhindern (Gee et al., 2003).
Die Gründe des Versagens der antihormonellen Therapie werden bisher noch nicht vollständig verstanden. Möglicherweise ist ein Verlust der ER- Expression oder des Rezeptors involviert, oder es könnte eine Mutation des Östrogenrezeptors als Ursache in Frage kommen. Eine andere Theorie vermutet veränderte Level an Cofaktoren, die zu resistenten Zellen führen.
Die Überexpression des HER2- Rezeptors spielt wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung (Jones, 2003).

In den letzten Jahrzehnten stützte sich die Behandlung maligner Erkrankungen auf verschiedene Formen der Chemotherapie und die Bestrahlung. Dieses brachte viele Erfolge besonders in der Behandlung hämatologischer Erkrankungen, aber auch in der Behandlung solider Tumore. Dennoch sind viele maligne Leiden weitgehend resistent gegenüber diesen Behandlungsstrategien. Neben diesen Resistenzen sind Nebenwirkungen der Chemotherapie und der Bestrahlung limitierende Faktoren für die effektive Behandlung. Das Verständnis molekularer Mechanismen der Wachstumsregulierung, Stressbewältigung, des programmierten Zelltods und der Wirkung zytotoxischer Substanzen in den Körperzellen und Geweben ist wichtig für die Entwicklung einer gezielten und rationalen antitumoralen Therapie.
In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass viele (vielleicht sogar alle) Chemotherapeutika zur Behandlung von Tumoren über den Mechanismus der Apoptose wirken. Dazu zählen z.B. Vincristin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Paclitaxel, Adriamycin und 5´-Fluorouracil. Diese Feststellung legt die Hypothese nahe, dass Tumorzellen, die gegenüber Chemotherapien resistent sind, nicht in der Lage sind, den Apoptoseprozess in Gang zu setzten (Hannun, 1997).
Ein therapeutischer Ansatz wäre also, die Apoptoseresistenz zu durchbrechen, somit die Apoptoserate zu erhöhen und die erkrankten Zellen auszuschalten. Allerdings gilt es dabei, Therapieansätze zu finden, bei denen nur die erkrankten Zellen eliminiert werden und nicht etwa die gesunden Körperzellen, denn das Apoptoseprogramm ist ein in allen Körperzellen angelegtes Programm (Krammer, 1997).

Die Blockade der EGFR– aktivierten mitogenen Signalwege verspricht eine neue therapeutische Strategie in der Kontrolle menschlicher Tumore (Ciardiello, 2000).

2.2. Cross talk zwischen Signaltransduktionswegen

Viele molekulare Mechanismen wie z.B. Apoptose, Proliferation und Differenzierung werden nicht durch geradlinige Signaltransduktionswege induziert. Bei solchen vitalen Prozessen kommt es normalerweise zu einem „Durcheinander“ in Form von verschiedenen Kombinationen und Zwischenverbindungen verschiedener Signalwege, das man als cross talk bezeichnet. Mehrere Signaltransduktionswege benutzen dabei die gleichen „second messenger“ (z.B. Calcium, Diacylglycerin, Inositol- 1,4,5- trisphosphat), so dass viele verschiedene Einflüsse die Konzentration der „Signalüberträger“ beeinflussen. Cross talk ermöglicht so eine feinere Abstimmung der Zellaktivität, allerdings kann es durch Fehler zu einer falschen Interpretation der Informationen kommen (Stryer[1] et al., 2003). Manchmal funktioniert der cross talk mit seinen Verbindungen auf ganz neuen, unerwarteten Wegen, die viele Fragen hinterlassen, aber neue Einblicke in molekulare Mechanismen gewähren (Jehn und Osborne, 1997).

Cross talk ist auch eine interessante Eigenschaft von Steroidhormonrezeptoren mit anderen Proteinen, z.B. Interaktionen mit Komponenten des Transkription-initiierenden Komplexes (Jehn und Osborne, 1997). Steroidhormonrezeptoren sind in der Lage, die AP-1- abhängige Genexpression schnell und effektiv zu hemmen. Dieser inhibierende Effekt scheint ein gegenseitiger Effekt zu sein. So kann ein Überschuss an AP-1 zu einer Hemmung der hormon- response-elements- abhängigen Gentranskription führen (Jehn und Osborne, 1997). Ein weiteres Beispiel für den cross talk ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Proteinkinase C (PKC) durch Antiöstrogene und die dadurch verminderte AP-1 Antwort unabhängig vom ER (Astruc et al., 1995). Pratt et al. zeigten umgekehrt 1998, dass durch eine Behandlung der MCF- 7 Zellen mit Östradiol die RAF-1 Kinase aktiviert werden kann, die eigentlich downstream der RTK und der Proteinkinase C liegt.

Schon einige in vivo und in vitro Versuche haben gezeigt, dass EGF einige seiner biologischen Funktionen in einer ER- abhängigen Art und Weise ausübt (Smith, 1998). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Östrogenrezeptor in Abwesenheit von E2 stimuliert werden kann. So können z.B. natürlich vorhandene Substanzen wie der Neurotransmitter Dopamin den ER aktivieren. Wachstumsfaktoren wie

EGF sind in Abhängigkeit von ER und ERE in der Lage, die Transkriptionsaktivität des ER zu erhöhen und pure Antiöstrogene können diese Fähigkeit blockieren. In ähnlicher Weise kann auch der TGF alpha mit dem Östrogenrezeptor in einen cross talk treten. IGF-1 und Insulin stimulieren die Steroidhormonrezeptoren und auch Heregulin ist dazu in der Lage. Interessant ist ebenfalls, dass eine gemeinsame Behandlung von Zellen mit Östrogenen und anderen Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten Genexpression im Vergleich zu jeder Substanz alleine führt (Smith, 1998).

In- vitro Studien berichteten von der möglichen Interaktion zwischen dem HER2- und ER- Signalweg. Es besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen der ER- Expression und der HER2- Überexprimierung in Mammakarzinomzellen, die bereits in vielen klinischen Studien untersucht wurde. Außerdem beinhaltet der Promoter der HER2- Gene ein ERE, und es konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Transkription von HER2 unterdrückt, während Tamoxifen die Transkription von HER2 begünstigt. Bindet E2 an den Rezeptor, scheinen die ERE die HER2 Transkription negativ zu beeinflussen. Neuere Studien haben ergeben, dass MEKK 1, ein Vermittler im HER2- Signalweg, den ER aktiviert und agonistische Aktivitäten des Tamoxifens stimuliert. Theoretisch wäre es also denkbar, dass Patientinnen mit einem HER2- positiven Brustkrebs, der auch den Östrogenrezeptor exprimiert, mit einer Tamoxifentherapie eine noch schlechtere Prognose haben als ohne Therapie, da eventuell die agonistischen Effekte des Tamoxifens an der Brustkrebszelle durch HER2- stimulierte Signale überwiegen (Jones, 2003).

Bisher ist noch nicht vollständig geklärt, welche Funktion dem Cross talk zwischen den Zellen entgegenkommt. Sicher ist eine Modulierung verschiedener Signale über diese Interaktionen (Smith, 1998).

2.3. Östrogene und ihre Rezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören zur Gruppe der Steroidrezeptoren, die auch als Zellkernhormonrezeptoren bezeichnet werden. Liganden für diese Rezeptoren sind hydrophobe Moleküle, die aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften leicht durch die Zellmembran in die Zellen diffundieren. Sie heften sich dort an die hochspezifischen Rezeptorproteine, so dass ein Ligand- Rezeptor- Komplex entsteht, der an Kontrollelemente der DNA binden kann.

Zellkernhormonrezeptoren bestehen aus mehreren Domänen, von denen eine in

der Lage ist, die DNA zu binden; eine andere ist in der Lage, Liganden zu binden (siehe Abb.1.1.; Smith, 1998).

Amino-terminales Ende	Transaktivierende Domäne AF-1 (mit modulierendem Effekt auf die Rezeptor Aktivität)	Zentrale DNA-Bindungs-Domäne	Kernlokalisierungs-signal	Ligandenbindungs-domäne	Carboxy-terminales Ende (AF-2)

Abb. 1.1.: Schematischer Aufbau eines Östrogenrezeptors

Die DNA- bindende Domäne liegt in der Mitte des Moleküls und beinhaltet 9 konservierte Cysteinreste. Acht dieser Reste binden Zinkionen, weshalb solche Regionen als sogenannte Zinkfingerdomänen bezeichnet werden. Jeweils vier Cysteinreste sind mit einem Zinkion verknüpft, so dass die gesamte Struktur stabilisiert wird, und eine Entfaltung des Proteins nicht möglich ist.
Außerdem gehört zur DNA- bindenden Domäne eine α– Helix, die am Ende der ersten Zinkfingerdomäne beginnt. Diese α– Helix liegt innerhalb der Östrogenrezeptor- DNA- Komplexe und bindet an spezifische DNA- Sequenzen, die man als estrogen- response- elements (ERE) bezeichnet, über die dann die Transkription aktiviert wird.
Die ERE enthalten eine typische Nucleotidsequenz, die aufgrund ihrer Symmetrie die Bindung der Östrogenrezeptoren an die DNA als Dimer ermöglicht. Diese Sequenz hat den folgenden Aufbau:

5´- AGGTCA NNN TGACCT- 3´

Alternativ gibt es dazu auch die Möglichkeit, die Transkription über andere „response elements“, an die der Rezeptor nicht direkt bindet, zu aktivieren (Stryer[2] et al., 2003; Kushner et al., 2000; Webb et al.,1999).
Eine ER- Aktivierung kann ebenfalls, abhängig vom ER (α oder β), die Transkription an der AP-1- bindenden Seite der DNA, die Mitglieder der Jun/ Fos- Familie bindet, bedingen. Jun/ Fos Heterodimere stimulieren die Transkription über Rekrutierung des CBP/ p300- Komplexes und assoziierter Proteine (Kushner et al., 2000).

Der zweite, ligandenbindende Abschnitt der Zellkernrezeptorproteine besteht fast ausschließlich aus α- Helices, die in drei Schichten angeordnet sind, und in deren Mitte der Ligand, in diesem Falle das Östrogen, binden kann. Die Ligandenbindung führt zu einer starken Konformationsänderung, die allerdings nicht zu einer vermehrten DNA- Bindungsfähigkeit führt. Die letzte α- Helix dieser Domäne, die auch als Helix 12 bezeichnet wird, spielt bei der Bindung an die DNA eine große Rolle. Wenn keine Ligandenbindung vorliegt, ragt sie über den Rezeptor hinaus. Sobald aber das Östrogen an den Rezeptor bindet, kippt diese Helix auf eine Seite des Rezeptors und liegt dann dort in einer Vertiefung. Neben der Helix 12 findet sich eine Bindungsstelle für Coaktivatoren, die sich nur vollständig ausbildet, wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet und die Helix 12 so ihre Position verändert (siehe Abb. 1.2.). Coaktivatoren und eventuell durch sie hinzugezogene Proteine katalysieren Reaktionen, die bestimmte DNA- Abschnitte freilegen und diese für die Transkription zugänglich machen. Dieser Vorgang wird später genauer beschrieben.

Zu den Coaktivatoren, die wegen ihrer Größe auch als p160- Familie bezeichnet werden, gehört z.B. der SRC-1 (steroid- receptor- coactivator-1). Diese Proteine haben alle eine ähnliche Struktur. In ihrer Mitte befinden sich drei Leucin- X- X- Leucin- Leucin Aminosäuresequenzen, von denen wahrscheinlich zwei an der Bindung der Coaktivatoren an die Ligandenbindungsdomäne des Zellkernrezeptorproteins beteiligt sind.

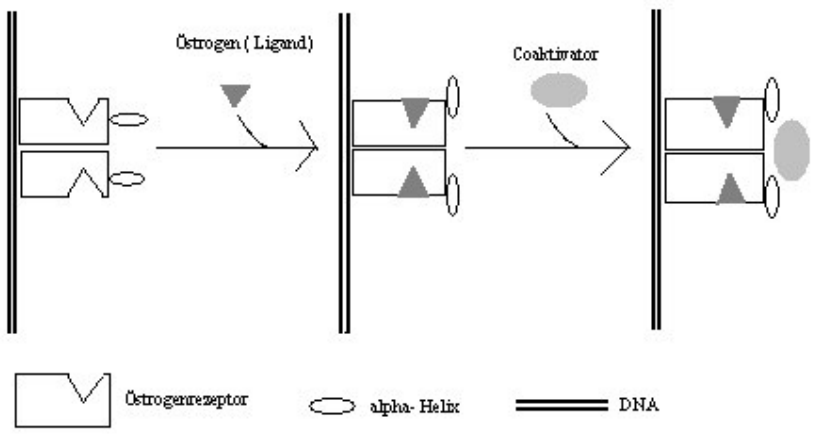

Abb. 1.2.: Bindung eines Coaktivators an den Östrogenrezeptor- Liganden- Komplex, nachdem die α- Helix ihre Position verändert hat

Durch die Coaktivatoren wird die Übertragung von Acetylresten des Acetyl- CoA auf spezifische Lysinreste im aminoterminalen Ende der Histone durch Histon-Acetyl- Transferasen katalysiert. Die gesamte Affinität der Histone für die DNA sinkt durch diesen Vorgang, so dass die Bindung zwischen DNA und Histonen gelockert wird, und Abschnitte des Genoms für die nun folgenden Transkriptionsvorgänge freiliegen (Stryer[2] et al., 2003).

Um Coaktivatorproteine zu binden hat der ER zwei transaktivierende Funktionen. Die aktivierende Funktion 2 (AF-2) liegt in der Ligandenbindungsdomäne (LBD), hat die stärkere Transaktivierungsfunktion und bindet Östrogen- abhängig an die Coaktivatoren der p160- Familie.
Die AF-1 befindet sich in der N- terminalen Domäne (NTD), besitzt generell eine kleine Östrogen- unabhängige Aktivität und dient ausschließlich dazu, mit der ligandenabhängigen AF-2 zu synergieren. Die AF-1- Aktivität wird durch die Phosphorylierung des Ser118- Restes durch eine MAPK potenziert, welche wiederum durch Wachstumsfaktoren wie EGF, Insulin und Insulin- like growth-Faktoren aktiviert wird (Endoh et al., 1999; Joel et al., 1998; Song et al., 2002).

Der ERα benötigt für eine Aktivierung des AP-1 die Aktivierenden Funktionen 1 und 2, ERβ hingegen hat keine wesentliche AF-1 (Kushner et al., 2000; Smith, 1998).
Die beiden Östrogenrezeptoren haben nicht nur einen unterschiedlichen Aufbau, sondern dadurch auch unterschiedliche transaktivierende Eigenschaften. 17beta-Östradiol aktiviert am ERα die Transkription, am ERβ hingegen inhibiert es in geringer Konzentration die Transkription und zusammen mit Tamoxifen kann es am ERβ die Transkription aktivieren oder in großen Konzentrationen die antagonistischen Tamoxifeneffekte steigern. Das lässt darauf schließen, dass ERα und ERβ eine unterschiedliche Rolle in der Genregulation spielen und dass ERβ als negativ oder positiv dominanter Regulator der ER- Aktivität fungieren kann (Peach et al., 1997; Pettersson et al., 2000).

Im Anschluss an die Stimulation durch einen Wachstumsfaktor (E2) und die konsekutive Phosphorylierung von Aminosäuren, Serin 104, 106, 118, und 167, folgt eine weitere Interaktion mit der p68 RNA Helicase. Die p 160- Coaktivatoren und die p68 RNA Helicase sind wiederum Teile eines großen

Coaktivatorkomplexes, dem CBP/p300 (Smith, 1998; Kushner et al., 2000; Endoh et al., 1999). Die Phosphorylierung einer weiteren Aminosäure, des Tyrosins 537, scheint ebenfalls wichtig zu sein für die transaktivierende Funktion des Rezeptors, weil sie neben der Helix 12 liegt, die durch Konformationsänderung eine Bindung der Coactivatoren ermöglicht. Allerdings wird diese Phosphorylierung nicht durch Östrogen induziert (Smith, 1998).

Ein weiterer vermuteter Östrogenrezeptortyp ist der Membran- assoziierten Östrogenrezeptor, dessen Wahrscheinlichkeit durch verschiedene Studien belegt wird (Lobenhofer et al., 2000), auf den in dieser Arbeit aber nicht weiter eingegangen werden soll.

2.4. Tyrosinkinasen

Beim Menschen werden viele Stoffwechselprozesse wie z.B. Proliferation, Differenzierung und maligne Transformation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen reguliert. Dabei sind bei 0,1% der zellulären Phosphoproteine Phosphatreste an Tyrosin gebunden. Enzyme, die die Phosphorylierung dieser Proteine katalysieren werden als Protein- Tyrosinkinasen bezeichnet.

Dabei unterscheidet man die Rezeptoren der Zellmembran, die eine extrazelluläre Liganden- Bindungsdomäne, eine transmembranöse und eine zytoplasmatische Domäne aufweisen von den Proteinen ohne Bindungsdomänen, die an der Innenseite der Zellmembran, im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert sind.

2.4.1. Nicht- Rezeptor- Tyrosinkinasen

Kinasen, denen die transmembranöse extrazelluläre Domäne fehlt und die im Zellinneren lokalisiert sind, werden als Nicht- Rezeptor- Tyrosinkinasen bezeichnet. Zu dieser Klasse von Tyrosinkinasen gehören z.B. die Janus- Kinase-Familie und die SRC- Familie (Sarcoma). Die zytoplasmatischen Kinasen der SRC- Familie sind an der Funktion verschiedener Rezeptoren, v.a. der RTK, der Zytokinrezeptoren und anderer Rezeptoren des Immunsystems beteiligt und in wichtige zelluläre Prozesse involviert. Substrate von SRC nach EGF- Stimulierung sind der EGFR selbst, Transkriptionsfaktoren der STAT- („transducer and activator of transcription“) Familie, Zytoskelettkomponenten und weitere Proteine (Prenzel et al., 2001).

Januskinasen regulieren ebenfalls die Signalübertragung durch Zytokinrezeptoren und kommen in verschiedenen Signalwegen der RTK (EGFR und PDGFR) vor.

2.4.2. Rezeptor- Tyrosin- Kinasen (RTK)

Zu den RTK gehören verschieden Familien (EGFR, Insulinrezeptoren, PDGF αR u.a.), von denen die meisten Rezeptoren Monomere sind und durch Ligandenbindung dimerisieren oder oligomerisieren. Durch diese Konformationsänderung der Tyrosinkinaserezeptoren und der konsekutiven Phosphorylierung von Tyrosinresten werden Signalwege, wie der Ras/ Raf/ ERK/ MAPK- , der PI-3 Kinase/ AKT- und der PLCγ- Weg, aktiviert (Sewell et al., 2002).

EGF- Rezeptor- Familie

Der EGF- Rezeptor (EGFR/ HER1) ist ein 170 kDa großes transmembranes Glycoprotein und der Prototyp einer Rezeptorsuperfamilie mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, der auf vielen Zelltypen weit verbreitet ist (Wells, 1999; Raymond et al., 2000).

Zu dieser Familie von Rezeptoren gehören außerdem die ERBB 2-4 genannten Rezeptoren, die auch als HER 2-4 Rezeptoren bezeichnet werden. Die Liganden für diese Rezeptorfamilie sind der „Epidermal Growth Factor“ (EGF)), ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren, das Epidermis- und Epithelzellen zum Wachstum anregt, und das NEUregulin bzw. auch Heregulin genannt, nach dem einer der Rezeptoren auch als HER 2/ NEU- Rezeptor bezeichnet wird. Des Weiteren können andere Liganden wie der „Transformig growth factor“ α (TGF- α), Amphiregulin oder Betacellulin an den EGFR binden (Weiß et al., 1997; Wells, 1999; Ciardiello et al., 2000; Baselga und Averbuch, 2000; Kurokawa et al., 2000).

Rezeptoren der EGFR- Familie besitzen 2 cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne und eine zusammenhängende Tyrosinkinasedomäne im zytoplasmatischen Anteil. Durch Ligandenbindung kommt es zur konstitutiven Dimerisierung (Homodimerisierung oder Heterodimerisierung) des Rezeptors, die eine ausgefeilte Signaltransduktionskaskade zur Folge hat. Diese wird später genauer beschrieben.

Bei der Heterodimerisierung dieses Rezeptors findet eine spezifische Paarung der Proteine statt. So interagiert erbB-1 mit erbB-2 oder 3, aber nicht mit erbB-4.

ErbB-4 wiederum paart sich nur mit erbB-2 (Ciardiello et al., 2000; Baselga und Averbuch, 2000; Wells, 1999; Prenzel et al., 2001; Weiß et al., 1997).

Die biologischen Funktionen des Rezeptorsignals sind sehr vielfältig. So werden über die Aktivierung des EGFR Zellproliferation und Zellwachstum, Differenzierung, Entdifferenzierung, Apoptose, Migration, Organreparatur und Epithelregenerierung gesteuert.

Zur Entwicklung und Progression von malignen Tumoren kann es durch autokrine und parakrine Signalweiterleitung kommen (Ciardiello et al., 2000; Wells, 1999; Camirand et al., 2005). So führt eine Amplifizierung von ERBB Genen, die zu einer Erhöhung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche führt, zur autokrinen Wachstumsstimulation.
Dieses Phänomen findet sich in ca. 15- 25% der Fälle der Mammakarzinome (HER2/ NEU überexprimierende Karzinome) und geht mit maligner Transformation, Onkogenese und einer schlechteren Prognose einher (Jones, 2003; Prenzel et al., 2001; Kurokawa et al., 2000).
Die Überexpression der EGFR korreliert außerdem mit einem Verlust der Östrogenrezeptoren. Selten zeigen maligne Zellen einen Rezeptorstatus, der nicht invers korreliert (z.B. EGFR+/ ER+ oder EGFR-/ ER-) (Chrysogelos und Dickson, 1994).

Insulin- Rezeptor- Familie
Zur Gruppe der Typ 1 Tyrosinkinaserezeptoren gehören die Insulin- Rezeptoren, die IGF-I- und IGF-II- Rezeptoren. Sie bilden Heterotetramere, bestehend aus 2 α- und 2 β- Einheiten.
Die α- Ketten bilden dabei die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (LBD) und sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Außerdem besteht ebenfalls eine Bindung über Disulfidbrücken zwischen jeweils einer α- Kette und einer β- Kette.
Die β- Ketten sind über eine hydrophobe Domäne in der Zellmembran verankert und enthalten die katalytische Domäne.
Nach Bindung eines Liganden an die α- Kette erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zur gleichzeitigen Autophosphorylierung beider β- Untereinheiten führt. Dadurch werden eine Reihe intrazellulärer enzymatischer

Aktivitäten in Gang gesetzt, z.B. die PI3- Kinase und der MAP Kinase Signalweg. Signale über den IGF- Rezeptor regeln die Proliferation, die Angiogenese und die Metastasierung und inhibieren die Apoptose (Smith, 1998; Wagener, 1999; Camirand et al., 2005; Khandwala et al., 2000).

Es wird beschrieben, dass die Östrogenrezeptor α- negativen Zelllinien, wie MDA-MB- 231 Zellen, ein höhere Sekretion an IGF-1 haben als ER positive Zelllinien, wie z.B. die MCF-7 Zelllinie. Gebauer et al. untersuchten im Jahr 1998 die MCF-7 Zellen und andere Brustkrebskulturen auf die Expression der IGF-1 mRNA. Dabei exprimierten die MCF-7 Zellen keine IGF-1 mRNA. Andere Studien wiederum demonstrierten das Vorhandensein des IGF-1 Rezeptors auch bei MCF- 7 Zellen (Khandwala et al., 2000).

2.4.3. Signaltransduktionswege der Rezeptor- Tyrosin- Kinasen

Durch Bindung von Liganden, wobei die ErbB Liganden nur über kurze Strecken als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren agieren, kommt es, wie oben beschrieben, zur Dimerisierung oder Oligomerisierung der RTK, was wiederum zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der zytoplasmatischen Domäne führt. Dadurch werden verschiedene Signalwege in der Zelle angestoßen, die zu einer Vielzahl an Veränderungen in der Zelle führen. So lässt sich bereits kurz nach der Bindung eines Liganden an Zellmembranrezeptoren eine erhöhte Konzentration an Inositoltrisphosphat im Zytoplasma, eine erhöhte Konzentration des intrazellulären Calciums sowie eine intrazelluläre Alkalisierung messen. (Wagener, 1999; Olayioye et al., 2000)
Bereits ca. 10 min nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor kann innerhalb der Zelle eine Erhöhung der mRNA- Konzentration des FOS- Onkogens, des c-MYC- Onkogens und weiterer sogenannter „early response“- Gene nachgewiesen werden. (Wagener, 1999)

Durch Ligandenbindung und Tyrosinphosphorylierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen, wird die Bindung an zytoplasmatische Proteine ermöglicht. Dieses geschieht über bestimmte Domänen dieser Proteine, zu denen die SH2-, SH3-, PH- und die PTB- Domänen, die in einer Vielzahl von Proteinen in unterschiedlicher Anordnung vorkommen, gehören. Durch diese Verbindung gelangen andere Enzyme in die Nähe ihrer Substrate in der Zellmembran (z.B.

PLCγ1, PI3- Kinase). Des Weiteren wird eine Anlagerung wichtiger Effektorproteine, z.B. des Guaninnukleotid- Austauschfaktors SOS, durch Adapterproteine (z.B. GRB2) ermöglicht (Wells, 1999; Stryer[1] et al., 2003; Whitmarsh und Davis, 1996; Prenzel et al., 2001; Raymond et al., 2000; Olayioye et al., 2000).

Im nächsten Schritt werden verschiedene Reaktionen über die an den Rezeptor gebundenen Proteine katalysiert, die zur Weiterleitung der Signale in die Zelle dienen. Die aktivierte Phospholipase Cγ (PLCγ 1 und 2) ist für die Spaltung von Phosphatidylinositol (4,5)- Bisphosphat in die second messenger Inositol- (1,4,5)- Trisphosphat und Diacylglycerin verantwortlich.
Die Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI-3-Kinase) phosphoryliert verschiedene Derivate des Phosphatidylinositols und bindet an die aktivierten RTK über SH2 Domänen. Allerdings besitzt der EGFR keine Bindungsstelle für die SH2 Domäne der PI3- Kinase, weshalb die EGF induzierte Aktivierung der PI-3- Kinase relativ schwach ist (Prenzel et al., 2001).
Interessant ist, dass diese Kinase oberhalb und unterhalb von Ras, einem wichtigen Protein, in der Signalkette erscheint. Die Phosphorylierung dieser Kinase führt zur Aktivierung weiterer Enzyme, der Akt/ Proteinkinase B und Mitgliedern der Proteinkinase C- Gruppe (Whitmarsh und Davis, 1996; Prenzel et al., 2001).
Adapterproteine, die nur aus Proteinbindungsdomänen bestehen und keine enzymatische Aktivität aufweisen, werden durch Tyrosinkinasen phosphoryliert und ermöglichen so die Lokalisierung eines Proteins an einen funktionell wichtigen Ort der Zelle. Adapterproteine wie das GRB2 (growth factor receptor- bound protein 2) sind wichtige Bindeglieder zu weiteren Signalwegen (z.B. zum RAS-Onkoprotein) (Wells, 1999; Stryer[1] et al., 2003; Chrysogelos und Dickson, 1994).

Kleine GTPasen

RAS bezeichnet eine Gruppe von ähnlichen Proteinen, die auf Grund ihrer Eigenschaft GTP zu binden, zusammen mit anderen verwandten Proteinen (RHO, RAB, ARF u.a.) zur Familie der „kleinen GTP- bindenden Proteine/ kleine GTPasen“ zusammengefasst wird. Guaninnukleotid- Austauschfaktoren bewirken die Überführung der inaktiven GDP- bindenden in die aktive GTP- bindende Form. Bei den Mutationen der RAS- Gene, die in menschlichen Tumoren sehr häufig

vorkommen, erfolgt eine konstitutive Umwandlung der inaktiven in die aktive Form des RAS- Onkoproteins.
Von RAS können nun wiederum verschiedene Signalwege ausgehen, von denen der RAS- MAP- Kinase- Signalweg im folgenden genauer betrachtet wird. Alternativen dazu sind z.B. Wege über PI3- Kinasen (Whitmarsh und Davis, 1996).

Der RAS- MAP- Kinase- Signalweg
Auf dem RAS- MAP- Kinase- Signalweg bindet zunächst eine weitere Phosphokinase an die Effektordomäne des RAS- Proteins, die Raf-1- Kinase. Diese besitzt die Spezifität, Serin- und Threoninreste zu phosphorylieren. In dieser Signaltransduktionskaskade phosphoryliert sie zwei Serinreste weiterer Kinasen, der MEK 1/2- Kinasen, die ihrerseits im aktivierten, phosphorylierten Zustand die ERK 1/2- Kinasen phosphorylieren (siehe Abb. 1.3.). Das aktivierte ERK- Enzym gelangt nun rasch in den Zellkern, wo es Transkriptionsfaktoren aktiviert, die dann an regulatorische DNA- Abschnitte („DNA- response elements"; „RAS- response elements" u.a.) binden (Stryer[1] et al., 2003; Chrysogelos und Dickson, 1994; Whitmarsh und Davis, 1996; Prenzel et al., 2001).

Die erwähnten Kinasen gehören zu den MAP Kinasen („Microtubule associated Protein Kinases" oder „mitogen activated protein kinase"). Diese Gruppe von Serin-/ Threonin- Kinasen, die durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert wird und an wichtigen Punkten der Signalübertragung liegt, kann in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Es wurden in Säugetierzellen die „extrazellulär- regulierte Kinase" (ERK), die c-Jun N- terminalen Kinase (JNK) und die p38 Kinase identifiziert. Die MAP Kinasen sind Mediatoren der Signaltransduktion von der Zelloberfläche bis in den Zellkern und haben als bekanntestes Ziel im Zellkern den Transkriptionsfaktor AP-1, den sie über verschiedene Mechanismen regulieren und der später noch genauer betrachtet wird (Whitmarsh und Davis, 1996).

Eine Vielzahl von Rezeptoren bei ganz verschiedenen Spezies arbeitet über diese oder dazu analoge Signaltransduktionskaskaden. Auf anderen Signalwegen werden die entsprechenden MAP- Kinasen teilweise anders bezeichnet. So werden die ERK 1/ 2- Kinasen auf den Signalwegen für Entzündungsreaktionen JUN- Kinasen genannt. Die allgemeine Bezeichnung für Enzyme dieser Gruppe

lautet jedoch MAP- Kinasen (siehe Abb. 1.3.).

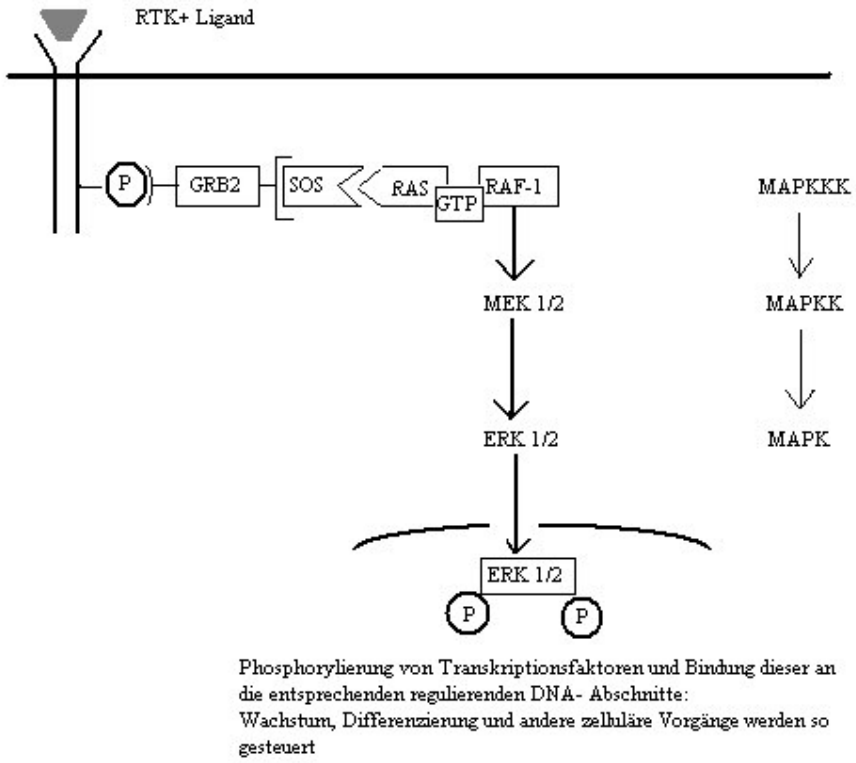

Abb. 1.3.: RAS- MAP- Kinase- Signalweg von der Bindung des Liganden an den Rezeptor bis zur Übertragung des extrazellulären Signals in den Zellkern

Zu beachten ist außerdem, dass solche Aktivierungswege nicht immer geradlinig verlaufen. Häufig können auch andere Signale über Proteine anderer Signalwege in die Kaskaden eingreifen. Ein Beispiel dafür ist die Phosphorylierung von Raf durch die Proteinkinase B (Akt). Akt liegt im Signalweg der PI-3- Kinase downstream von Ras. Dieser Signalweg kann entweder synergistisch oder oppositionell zu dem Raf- Signalweg agieren. Die jeweilige Umsetzung der Befehle könnte vom Differenzierungsgrad der Zelle oder vom Zelltyp abhängig sein. Durch die Kreuzung des Raf- MEK- ERK- und des PI-3- Kinase- Wegs über Interaktionen von Akt könnte die zelluläre Antwort in einem Umschlagen von einem Wachstumsstopp zur Proliferation bestehen (Zimmermann und Moelling, 1999). Außerdem wurde gezeigt, dass MAP Kinasen Serin 118 in Östrogenrezeptoren phosphorylieren können. Dieses führt zu einer ligandenunabhängigen Östrogenrezeptor- Aktivierung mit einem Verlust des

inhibitorischen Effektes von Tamoxifen auf die ER- vermittelte Transkription (Kurokawa et al., 2000).

Die beschriebene Signaltransduktionskaskade lässt sich mit verschiedenen Substanzen auf unterschiedlichen Ebenen unterbrechen. Unter der Vorstellung, dass die RTK und die Östrogenrezeptoren ihre Informationen auf bestimmten Signalstrecken über den gleichen Weg in den Zellkern transportieren (cross talk), wäre die gleichzeitige Hemmung der Signalweiterleitung an beiden Rezeptortypen eine wichtige Konsequenz in der Weiterentwicklung antitumoraler Therapien.

2.4.4. Aktivierendes Protein- 1 (Activating Protein-1/ AP-1)

AP-1 ist ein Überbegriff für dimerisierende Transkriptionsfaktoren, zusammengesetzt aus Jun, Fos oder anderen Untereinheiten „aktivierender Transkriptionsfaktoren“ („ activating transcription factors“/ AFT), die an die AP-1 bindende Seite der DNA andocken (Karin et al., 1997; Whitmarsh und Davis, 1996). Die Produktion und Aktivität des Aktivatorprotein-1 wird durch verschiedene Wachstumshormone und daraus folgende intrazelluläre Signale, oft vermittelt über cAMP, cAMP- abhängige Proteinkinase A, Proteinkinase C und viele Onkogenprodukte, initiiert (Jehn und Osborne, 1997).

Der Zellkernproteinkomplex, der aus Homodimeren der Jun- Familie oder Heterodimeren der Fos- und Jun- Familie besteht (Jehn und Osborne, 1997; Rauscher et al., 1988), erkennt eine Reihe von verwandten DNA- bindenden Elementen, die in vielen Zellgenen vorhanden sind (Jehn und Osborne, 1997; MacGregor et al., 1990). Man glaubt, dass Fos mit Jun interagiert und die DNA-Bindung über eine direkte Verbindung zwischen Jun und den DNA bindenden Elementen stattfindet. Durch diese Verbindung erfolgt dann eine Erhöhung der Transkription. Auch eine Erniedrigung dieser kann über die DNA-Bindungskapazität von Jun gesteuert werden (Jehn und Osborne, 1997; Chiu et al., 1988).

AP-1 ist ein weiteres Molekül, dass in den Prozess der Apoptose auf verschiedenen Wegen involviert ist (Jehn und Osborne, 1997), obwohl es selbst kein Teil des programmierten Zelltods ist und nur von einigen Zelltypen benötigt wird, um diesen Prozess zu initiieren (Karin et al., 1997).

2.5. Apoptose

Als Apoptose wird der in Zellen ablaufende sogenannte „programmierte Zelltod“ bezeichnet, der neben der Nekrose eine zweite Form des Zelluntergangs darstellt.
Der Begriff Apoptose ist aus dem Griechischen entlehnt und beschreibt das Herabfallen der Blätter von den Bäumen; Kerr, Wyllie und Mitarbeiter prägten diesen Begriff 1972 (Hannun, 1997).
Eine Vielzahl von morphologischen Veränderungen kennzeichnen die Apoptose. So ist diese Form des Zelltods durch das Schrumpfen der Zellen, die Kondensation des Chromatins sowie die Spaltung der DNA in Bruchstücke einer Länge von 200 Basenpaaren (bp) und Vielfachen davon (Jehn und Osborne, 1997; Wyllie et al. 1984), Verlust der Membranstabilität und Abspaltung von Apoptosekörperchen (Blebbing) charakterisiert (Clarke et al., 1995; Krammer, 1996, Jehn und Osborne, 1997).
Die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs liegt in der „Homöostase von Geweben“ und in der Beseitigung von alten, verletzten, mutierten oder „gefährlichen“ Zellen“, so dass die Apoptose einen wichtigen Mechanismus des Immunsystems bei der Infektabwehr darstellt. Eine weitere wesentliche Rolle spielt die Apoptose während der Embryologie, die durch Zellvermehrung und Zelluntergang gekennzeichnet ist. Durch eine verminderte Apoptoserate und dem daraus resultierendem ungesteuertem Zellwachstum lässt sich die Massenzunahme von Tumoren erklären.

Es gibt zwei unterschiedliche Mechanismen, durch welche die Zellen „Selbstmord begehen“ können. Einerseits wird die Initiierung der Apoptose durch äußere Faktoren, die Todesaktivatoren (TNF, Fas- Ligand) bewirkt, andererseits wird Apoptose durch innere Signale hervorgerufen.

2.5.1. Signaltransduktion beim Vorgang der Apoptose, ausgelöst durch extrazelluläre Signale

Um die Apoptose von Zellen über äußere Signale auszulösen, bedarf es der Regulation durch die sogenannten „Todesrezeptoren“, die in eine Subfamilie der TNF- Rezeptorsuperfamilie ´zusammengefasst werden und zu denen z.B. der am längsten bekannte CD95- (APO-1/ Fas-) Rezeptor gehört. Wichtig für die Auslösung der Apoptose ist die Todesdomäne (Death Domain) des Rezeptors, eine ca. 80 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne, die bei allen

Todesrezeptoren ähnlich ist. Diese Rezeptoren werden ebenfalls durch die spezifische Bindung von Liganden (Liganden der TNF- Familie) aktiviert (Krammer, 1997).
Eine konsekutive Trimerisierung der Rezeptoren führt über rezeptorassoziierte Moleküle zur Weiterleitung des Todessignals in das Zellinnere. Der Komplex aus dem aktivierten Todesrezeptor und den dazugehörigen Molekülen wird auch als „den Tod induzierender Signalkomplex“ (DISC- death inducing signaling complex) bezeichnet. In den DISC werden verschiedene Adapter (z.B. FADD/ MORT1) rekrutiert, die wiederum eine ganz bestimmte Domäne zur weiteren Interaktion besitzen, die Todeseffektordomäne (DED- Death Effector Domain). Über diese Domäne wird als nächstes Procaspase-8 in den DISC gebunden. Procaspase-8 ist ein Proenzym, dass nun autokatalytisch in die aktive Caspase-8 gespalten wird (siehe Abb. 1.4.: Apoptoseprozess).

Die Familie der Caspasen

Dieses Enzym gehört zu einer ganzen Familie von Caspasen (auch ICE- Familie genannt, da alle Mitglieder Ähnlichkeit zu dem interleukin- 1β- converting enzym besitzen), Enzyme, die an der Apoptose beteiligt sind. Sie besitzen im aktiven Zentrum ihres Moleküls einen Cysteinrest und haben die spezifische Fähigkeit nach einem Aspartat zu spalten. Aus diesen Eigenschaften leitet sich der Name dieser Proteasen ab: Cystein- Aspartasen.
Ein wichtiges und gut charakterisiertes Substrat für Mitglieder der ICE- Familie ist die Poly- (ADP-) Ribose- Polymerase (PARP) (White, 1996), die durch eine Protease namens CPP-32 (auch prICE, Yama oder Apopain genannt) gespalten wird (Hannun, 1997).
Caspase-8 spielt als Bindeglied zwischen den Todesrezeptoren und den Effektorcaspasen eine essentielle Rolle bei der Apoptose. Sie wird auch als Initiatorcaspase bezeichnet, weil sie eine ganze Caspasenkaskade in Gang setzt.
In einem weiteren Schritt werden dann zelluläre Substrate, unter anderem Proteine des Zellgerüsts, durch die Effektorcaspasen gespalten. Ebenso inaktivieren die Caspasen Proteine, die DNA- spaltende Enzyme (Endonukleasen) hemmen, so dass die Endonukleasen nun in den Zellkern wandern können und dort zu einer Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen führen. Aus diesem Grund haben die DNA- Bruchstücke die oben erwähnte definierte Länge von 200 bp (Krammer, 1997).

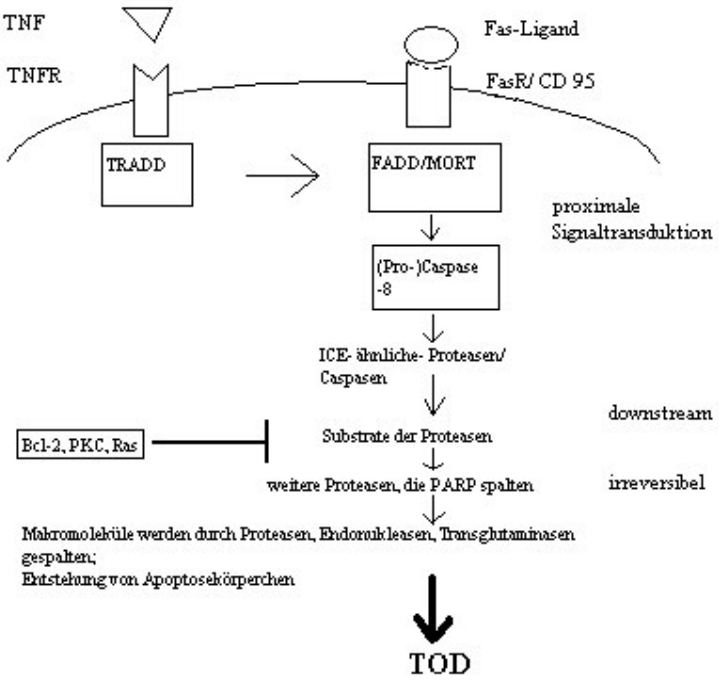

Abb. 1.4.: Der Apoptoseprozess

Regulierung der Apoptose

Da das Apoptoseprogramm in den meisten Körperzellen vorhanden ist, muss der menschliche Organismus einige Mechanismen zur Regulierung der Apoptose kennen. So gibt es z.B. Moleküle (FLIP- Moleküle), die eine Ähnlichkeit mit der Death Effector Domain aufweisen und die die Rekrutierung von Procaspase-8 in den DISC und damit die Apoptose verhindern. Solche FLIP- Moleküle werden unter anderem durch entartete Zellen hergestellt und verhindern in diesen Zellen die Auslösung des programmierten Zelltods, so dass es zur Entstehung von Tumoren kommen kann.

Auch einige Proteine der Bcl-2- Familie schützen die Zellen vor Apoptose und wirken dabei als zentraler Kontrollpunkt in der Signaltransduktionskette des apoptotischen Zelltods (White, 1996). Der genaue Mechanismus dafür ist allerdings noch nicht vollständig verstanden, obwohl Bcl-2 unter der Vorstellung eines ubiquitär vorkommenden Inhibitors der Apoptose vielfach untersucht wurde.

Es ist mit den Membranen der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums und den Kernmembranen assoziiert und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen. Kumar et al. zeigten 1996, dass eine Überexprimierung des HER2-

Rezeptors in ER- positiven Mammakarzinomzellen mit einer gesteigerten Bcl-2 Expression einhergeht. Es konnte die Hemmung der Apoptose bei chemotherapeutischer Behandlung nachgewiesen werden, wenn Bcl-2 überexprimiert wurde. Dagegen konnte bei einer zu geringen Exprimierung von Bax, einem pro- apoptotischen Mitglied der Bcl-2- Familie, eine zu geringe Ansprechbarkeit auf kombinierte Chemotherapien mit einem schlechten Überleben der Patientinnen bei metastasierendem Mammakarzinom nachgewiesen werden (Kumar et al., 1996; Hannun, 1997).

Weitere wichtige Faktoren, die ebenfalls die Apoptose regulieren sind der TNF-R1 (White, 1996), ein Zelloberflächenrezeptor, der Apoptose hervorrufen kann, das p53 Tumorsuppressorgen, dessen Produkt Apoptose und Wachstumshemmung hervorruft, Bax, ein Protein der Bcl-2- Familie, dass „downstream“ von p53 ebenfalls Apoptose induzieren kann (White, 1996; Han et al., 1996; Liu et al., 1999) und einige weitere Proteine, die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung sind.

2.5.2. Apoptose getriggert durch intrazelluläre Signale

Ein intrazellulärer Schaden führt zu Veränderungen der Zellmembranen, auf denen das Protein Bcl-2, an das Protein Apaf-1 gebunden, sitzt. Wird der Apoptosevorgang eingeleitet, wird Apaf-1 durch das Bcl-2 freigelassen und Cytochrom C leckt aus den Mitochondrien heraus. Apaf-1 und Cytochrom C binden dann an die Caspase 9, die durch Proteinspaltung beginnt, die Caspasenkaskade in Gang zu setzen. Der Komplex aus Cytochrom C, Apaf-1, Caspase 9 und ATP wird als Apoptosom bezeichnet. Die Apoptose zeigt auch auf diesem Wege ihre charakteristischen morphologischen Merkmale.

2.6. Östrogenrezeptorantagonisten und Selektive Östrogenrezeptor-modulatoren

Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) wie Tamoxifen sind kompetitive Inhibitoren der Östrogenbindung an den ER und produzieren Rezeptorkomplexe mit limitierter Aktivität (Jones, 2003).

Sie sind in der Lage, das Aktivierende Protein-1 zu aktivieren, wobei diese Aktivierung durch die Bindung von SERM manchmal stärker über den ER-β stattfindet. Allerdings ist diese Aktivierung unabhängig von der AF-2 Funktion des ERβ und funktioniert vermutlich über einen AF- unabhängigen Signalweg (

Kushner et al., 2000).

Während Antihormone den ER- und den IGF- Signalweg sowie den cross talk mit anderen Wachstumsfaktorwegen hemmen, führen sie zeitabhängig zur Expression des EGFR und des erbB2- Rezeptors (Nicholson et al., 2001).

2.6.1. Tamoxifen

Tamoxifen ist ein seit Jahrzehnten bekanntes und genutztes Antiöstrogen mit zellspezifischen Effekten, das als Selektiver Östrogenrezeptormodulator AP-1 Zielgene in Gebärmutterzellen aktiviert nicht aber in den Zellen der Brust. Es blockiert die AF-2 des ER durch Verschiebung der Helix 12 und Drehung dieser Helix um 110°, so dass keine Bindung des p160 erfolgen kann (Kushner et al., 2000). Zheng und Yao wiesen nach, dass Tamoxifen die Expression von bcl-2 unterdrücken, die Expression von bax aber verstärken kann und so Apoptose regulieren kann (Zheng und Yao, 2000). Dabei spielt der MAPK- Signalweg eine wichtige Rolle bei nicht- östrogenen- antagonistischen Mechanismen von Tamoxifen (Yang et al., 2002). Des Weiteren existieren nicht ER- vermittelte Mechanismen der Tamoxifenwirkung. Dieses schließt die Modulation bestimmter Signalproteine, wie z.B. die PKC, Calmodulin, TGF beta u.a., ein. Caspasen und MAPK spielen ebenfalls eine Rolle in Apoptose- Signalwegen (Mandlekar und Kong, 2001).

Tamoxifen hat eine nachgewiesene Wirkung bei Tumoren mit positivem Rezeptorstatus in prämenopausalen und postmenopausalen Patientinnen und bei Patientinnen, deren ER- Status unbekannt ist (Jones, 2003). Allerdings führt es bei ER- positiven Zellen in Abwesenheit von Östradiol zu leichten wachstumsstimulierenden Effekten, bekannt als partial agonistische Aktivität von Tamoxifen, die bei Behandlung von Brustkrebs zu einem erhöhten Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken, führen. Aufgrund dessen wurden die „reinen“ Antiöstrogene entwickelt (Langdon et al., 1994). Der Metabolit des Tamoxifens, 4- Hydroxytamoxifen, ist 100 mal potenter als Tamoxifen (Mandlekar et al.,2000[1]).

2.6.2. Faslodex (Fulvestrant/ ICI 182, 780)

Die gemischte agonistische und antagonistische Aktivität der SERM, welche eine Proliferation des Endometriums verursacht, hat in den 80iger Jahren zur Entwicklung purer Antiöstrogene geführt. Fulvestrant, das 7α- Alkylsulfinyl-

Östradiol- Analogon (Diel et al., 1999), ist die erste Verbindung dieser Klasse und bindet an den ER, nachdem er im Zytoplasma hergestellt wurde. Dieses verhindert den Transport in den Zellkern. Da es scheinbar keine Kreuzresistenzen gibt, kann Fulvestrant nach einer first- line Therapie mit Tamoxifen und fortschreitendem Tumorgeschehen eingesetzt werden (Jones, 2003). Es wurde berichtet, dass ICI 182, 780 neben der antagonistischen Wirkung am Östrogenrezeptor in der Lage ist, die E2 induzierte Aktivierung von ERK 1 und 2 zu verhindern. Außerdem kann es wahrscheinlich auch MAPK aktivieren und die intrazellulären Calciumspeicher leeren (Filardo et al., 2000).

2.7. RTK- Inhibitoren

RTK- Inhibitoren sind Substanzen, die auf verschiedenen Ebenen die Signaltransduktionskaskade dieser Rezeptoren hemmen können.

2.7.1. Herceptin (Trastuzumab)

Nachdem die Bedeutung der HER2 Überexpression beim Mammakarzinom bekannt wurde, führte dieses zur Entwicklung spezifischer Therapien gegen den HER2- Rezeptor (Jones, 2003).

Trastuzumab ist ein menschlicher monoklonaler Antikörper gegen erbB2, der bei Krebszellen angewendet wird, die erbB2 und EGFR exprimieren. Dort hemmt es das Wachstum, es führt zu einer geringeren Phosphorylierung von AKT (aber nicht von MAPK) (Normanno et al., 2002). Durch die Behandlung mit Herceptin kann die Expression des HER2- Rezeptors supprimiert und die Spaltung von HER2 in das membrangebundene Fragment p95 und die freigelassene Ektodomäne gehemmt werden. Außerdem werden wahrscheinlich auch die Angiogenese und Metastasierung durch dieses Medikament unterdrückt ebenso wie es im Tiermodel eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität gegen HER2 exprimierende Tumoren induziert (Molina et al., 2001).

Herceptin kann die antitumorale Aktivität von Cisplatin bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom steigern. Eine randomisierte Studie zeigte, dass die zusätzliche Behandlung mit Herceptin bei der Behandlung fortgeschrittener Mammakarzinome zu einer Verbesserung der Wirkung von Paclitaxel oder Doxorubicin führte (Ciardiello, 2000; Jones, 2003; Mendelsohn und Baselga, 2000).

In weiteren klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Frauen mit ER-

negativer/ HER2-postitiver und ER- positiver/ HER2- positiver Krebserkrankung ein ähnliches klinisches Outcome hatten, wenn sie entweder mit Trastuzumab alleine oder Trastuzumab und Chemotherapie behandelt wurden. Des Weiteren kann erwartet werden, dass Patientinnen mit einem ER- positiven/ HER2- positiven Mammakarzinom, die wahrscheinlich an einer aggressiveren Erkrankung leiden, von einer kombinierten Therapie mit Herceptin und einem Antiöstrogen profitieren (Jones, 2003).

Ein bedeutende Nebenwirkung des Herceptins ist allerdings die Kardiotoxizität, die vor allem in der Kombination mit Doxorubicin oder anderen Antracyclinderivaten, die als Chemotherapeutika in der Klinik eingesetzt werden, auftritt. Wie in Tierversuchen nachgewiesen, stieg die Anzahl apoptotischer Kardiomyocyten, wenn Herzzellen mit diesen Substanzen behandelt wurden (Xu et al., 2004).

2.7.2. PD 98059

Ein weiterer RTK- Inhibitor ist der MEK Inhibitor, der die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP Kinasen ERK 1 und 2 hemmt (Zimmermann und Moelling, 1999; Long et al., 2001). Diese Flavonverbindung hemmt bei der Zellteilung nicht die Expression der in der Zellteilung schnell aktivierten Proteine (Protoonkogene) myc oder fos, sondern verhindert die Akkumulation von Cyclin D1, einem wichtigen Protein für die Zellzyklusregulation (Lobenhofer et al., 2000), so dass die Mitogenese der Zellen negativ beeinflusst wird.

2.7.3. ZD 1839 (Iressa/ Gefitinib)

ZD 1839 ist ein per oral aktives Quinazoline- Derivat, (4-[3-chloro-4-fluoroanilino]-7-methoxy-6-[3-morpholinopropoxy] quinazoline), das selektiv die EGFR-Tyrosinkinase (und minimal die erbB-2- Kinase) und so die ERK-Phosphorylierung hemmt und bereits unter klinischen Bedingungen an Patienten mit fortgeschrittenem Nicht- kleinzelligen Lungenkrebs getestet wird. ZD 1839 hemmt zeit- und dosisabhängig die Transkription der c- fos mRNA. Es weist antiproliferative und in höheren Dosen apoptotische Aktivitäten auf. In einer kombinierten Behandlung mit herkömmlichen Zytostatika konnte eine Verstärkung der Wirkungen dieser Medikamente nachgewiesen werden. Außerdem ist ZD 1839 bei Dosen um 600 mg/d ein gut verträgliches Medikament. Zu den wesentlichen Nebenwirkungen zählen Gewichtsreduktion, Hautausschlag, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen, Erhöhung der Transaminasen, Husten,

Dyspnoe und Brustschmerz (Ciardiello et al., 2000; Sewell et al., 2002; Baselga und Averbuch, 2000; Ciardiello, 2000; Campiglio et al., 2004).

Fügt man bei einer in vitro Behandlung von E2- Rezeptor- positiven Brustkrebszelllinie den EGFR- Inhibitor ZD 1839 (Gefitinib) hinzu, kann eine viel effektivere Therapie und das Ausbleiben einer Resistenzentwicklung erreicht werden (Gee et al., 2003).

Laut Anderson et al., 2001 hemmt ZD1839 potent die Proliferation der Zellen, die EGFR oder den erbB2 exprimieren oder überexprimieren. Es konnte eine Steigerung der DNA- Fragmentierung (und damit Apoptose) durch ZD 1839 nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Stimulation von Zellen mit Iressa und Herceptin konnte sogar eine noch größere Steigerung der DNA- Fragmentierung festgestellt werden (Normanno et al., 2002).

Eine alleinige Behandlung der Zellen mit einem Tyrosinkinaseinhibitor hingegen hat nur wenig Einfluss auf das Tumorwachstum (Normanno et al., 2002).

2.7.4. AG 1478

Der EGFR spezifische Tyrosinkinaseinhibitor konnte nachweislich die Invasion von Glioblastomzellen in Gehirnmasse und die Proliferation von Prostatakrebszellen verhindern. AG 1478 inhibiert den EGFR- genauso wie den HER2- Signalweg und kann die Tumorgenese im Brustgewebe unterdrücken (Prenzel et al., 2001). AG 1478 ist ebenfalls ein Quinazoline- Derivat (Kurokawa et al., 2000).

2.7.5. AG 1024

AG 1024 ist ein synthetisches Tyrphostin mit der Formel 3-bromo-5-*t*-butyl-4-hydroxy-benzylidenemalonitril. Es inhibiert die ligandenstimulierte IGF1- Rezeptor Autophosphorylierung in intakten Zellen mit einer inhibierenden Konzentration von 50% bei 7 µM. Tyrphostin bindet an die aktive Seite des Rezeptors und verändert seine Konformation, so dass die Bindung des Substrates und des ATP verhindert wird. Über diese Aktivität hemmt AG 1024 die Zellproliferation und induziert Apoptose in verschiedenen Zellsystemen, Brustkrebs eingeschlossen (Camirand et al., 2005).

2.7.6. SB 203580

SB 203580, 4- (4-fluorophenyl)- 2- (4- methylsulfinylphenyl)- 5- (4- pyridyl) 1H-Imidazole, ist ein spezifischer Inhibitor der p38 MAP Kinase (Kalmes et al., 1999),

welcher über die kompetitive Inhibierung der ATP- Bindung wirkt und zum Verständnis über die MAPK- Signalwege in der Forschung eingesetzt wird. Der p38 Signalweg und seine Aktivität korreliert mit der Induktion der Apoptose (Zhang und Shapiro, 2000).

2.8. Fragestellung

Bei dem bisher vermuteten und an einigen Stellen der Signaltransduktionskette bereits nachgewiesenem cross talk zwischen den Signalwegen der Östrogenrezeptoren und der Tyrosinkinaserezeptoren wäre insbesondere in Hinblick auf die Resistenzentwicklung der Mammakarzinomzellen gegenüber den SERM und der Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren die gleichzeitige Hemmung mehrerer Signalwege eine wichtige Weiterentwicklung der antitumoralen Therapie.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer kombinierten Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Östrogenrezeptorantagonisten und RTK- Inhibitoren auf die Apoptose und Proliferation anhand der ER- positiven Zelllinie MCF-7 mit der Frage nach erweiterten wirksameren Therapien in der Behandlung des Mammakarzinoms untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verbrauchsmaterialien und Kits

Material	Bezugsquelle	Anmerkung
Zelllinien:		
MCF-7- Zellen	ATCC®	Mammakarzinom-zelllinie
MDA-MB 231- Zellen	ATCC®	Mammakarzinom-zelllinie
Zellkultur:		
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM/ F-12)	Gibco	
PBS- Dulbecco	Biochrom AG	
Foetal- calf- Serum (FCS)	PAA	
stripped FCS/ SNS	PAA	mit Aktivkohle von MTA hergestellt
Serum Replacement-2 (SR-2)	Sigma	
Sodium pyruvate	Sigma	
Accutase	PAA Laboratories GmbH	
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma	
Sterilität:		
Sterilium (Bacillol®AF)	Bode Chemie Hamburg	
Mycoplasma- off®	Minerva Biolabs GmbH	
Händedesinfektion	Bode Chemie Hamburg	
Wachstumsfaktoren:		
17-b- Estradiol (E_2)	Sigma	M = 272,4 ; LM: H_2O
Epidermal Growth Factor (EGF)	Sigma	Mix aus 50% Mäuse + 50% rekombin. Human- EGF; LM: H_2O
Heregulin (HRG)	Oncogene™	LM: PBS
Insulin- like Growth Factor (IGF-1)	Sigma	LM: CH_3-COOH
RTK- Inhibitoren:		
Herceptin	Roche	LM: H_2O HER- 2 Inhibitor

PD 98059	Alexis	LM: DMSO MEK ½ Inhibitor
Tyrphostin AG 1478	Alexis	LM: DMSO EGFR- Inhibitor
ZD 1839	AstraZeneca	LM: HCl 0,1 M EGFR- Inhibitor
SB 203580	CALBIOCHEM	LM: DMSO p 38 MAPK Inhibitor
Tyrphostin AG 1024	Alexis	IGFR- Inhibitor LM: DMSO
Lösungsmittel:		
DMSO	Sigma	Dimethylsulphoxide, steril, C_2H_6OS
H_2O	Delta select	Aqua Spüllösung
EtOH 95%	Apotheke/ Merck	als Lösungsmittel
HCl	Merck	als Lösungsmittel
Antiöstrogene:		
Tamoxifen	Sigma	LM: Ethanol Antiöstrogen
ICI 182, 780 / Faslodex/ Fulvestrand	Tocris	LM: Ethanol reines Antiöstrogen
fertige Kits:		
MTS- Kit/ CellTiter 96® Aqueous ONE Solution Cell Proliferation Assay	Promega	muss bei –20°C von Licht geschützt aufbewahrt werden
Cell Death Detection ELISA^{PLUS}	Roche	bei 2-8°C lagern
PARP- AK für Western blot	Pharmingen und Roche	
Streptawell- Platten	Roche	
Verbrauchsmaterialien:		
Combitips 10 ml, steril	Eppendorf, Hamburg	
Combitips 20 ml, steril	Eppendorf, Hamburg	
Pipetten 25ml steril, serologisch	Sarstedt	
Pipetten 10ml steril, serologisch	Sarstedt	
Pipetten 5ml steril, serologisch	Sarstedt	
Pipetten 2ml steril, serologisch	Sarstedt	
Pipetten 1ml steril, serologisch	Sarstedt	

Pipettenspitzen steril, mit Filter	Sarstedt	in den Größen: 10, 100, 200, 1000 µl
Pipettenspitzen steril, mit Filter	Biozym	in den Größen: 10, 100, 200, 1000 µl
Pipettenspitzen	Sarstedt	10, 100, 200, 1000µl
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner	100µl
Pipettenspitzen mit Filter	Maxymum Recovery	10, 1000µl
Zellkulturflaschen steril, mit Filter	Sarstedt	75 cm^2
Zellkulturflaschen steril, mit Filter	Sarstedt	175cm^2, 650 ml
Zellkulturflaschen steril, mit Filter	Sarstedt	25 cm^2
96- well Platten steril, mit Deckel	NUNC	für Zellkultur
6- well Platten steril, mit Deckel	Sarstedt	für Zellkultur
Reaktionsgefäße: Bluecap 50 ml, steril	Greiner	mit Deckel
Reaktionsgefäße: Bluecap 15 ml, steril	Greiner	mit Deckel
Eppendorf- Reaktionsgefäße steril	Eppendorf	2 ml
Microtubes Reagiergefäße	Sarstedt	1,5 ml
Mikroschraubröhre	Sarstedt	1,5 ml
Cryo Tube mit Schraubdeckel	vial	2 ml
Pasteurpipetten Glas	Apotheke	
Einwegpasteurpipetten steril, 3ml	Copan/ Italien	
Finnpipetten	Labsystems	
Multipipette plus	Eppendorf	diverse Größen
Pipetten	Eppendorf,	in den Größen: 10-100; 10- 200; 20-200; 100- 1000 µl
Biozym- Pipette/ Multipipette	PreCISION	in den Größen: 10-250; 50- 1000 µl
Handschuhe	Meditrade	Vinyl, puderfrei
Zähluhr		zur Zellzählung
Neubauer- Zählkammer	Assistent	0,1mm tief, 0,0025 mm^2
Geräte:		
Brutschrank	HERA cell	bei 37°C, 5% CO_2
Sterilbank	BioHAZARD und NUAIRE	

Mikroskop	Wetzlar	
Zentrifuge	Hettich	Universal 32R
Schüttler/ Combispin	Kisker	MS2 Minishaker
MTP- Rüttler	Eppendorf	Thermomixer Compact
Wasserbad	Memmert, Köttermann	
Waage	Kern	
Rührer	IKA Labortechnik	
Pipettus	Hirschmann	
ELISA Reader: MRX	Dynatech Labaratories	

3.1.2. Materialien für Western blot:

PARP- AK für Western blot	Pharmingen und Roche	1. AK
Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep) (HRP- 2. AK)	Amersham Biosciences	2. AK anti- mouse- Ig
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio- Rad	Marker für Gelelektrophorese
Elektrophoreseapparatur	Renner GmbH (Dannstadt)	
Milchpulver (Skim Milk)	Becton Dickinson	
ECL- Filme	Amersham Buchler (Braunschweig)	
ECL™	amersham pharmacia biotech	Western blot Detektionsreagenz

3.1.3. Puffer, Lösungen und Gele für Western blot:

Laemmli- Puffer	30% Glycerol 8% SDS 125 mM TRIS
Acrylamid	30 % (w/v) Acrylamid (4 x) 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid entionisiertes H_2O

Trenngelpuffer (4x)	Tris 1,5 M 4 N HCl entionisiertes H_2O
Sammelgelpuffer (4x)	Tris 0,5 M 4 N HCl entionisiertes H_2O
10% SDS- Lösung	Sodium dodecylsulfat 5g entionisiertes H_2O zu 50 ml
10% APS	Ammonium persulfat 0,44 mM 0,1g entionisiertes H_2O zu 1 ml
Proben- Behandlungspuffer (4x)	0,5 M TrisCL, pH 6,8 1ml 10% SDS 1,6 ml Glycerol 1,2 ml 2- Mercaptoethanol 0,4 ml Bromphenolblau 1% 0,6 ml entionisiertes H_2O zu 6 ml
Waschpuffer (10x)	100 mM Tris 12,11 g 1 M NaCl 58,44 g 1% Tween 20 10 ml entionisiertes H_2O zu 1l
Transferpuffer= Blotpuffer	Tris 25 mM 3g Glycin 192 mM 14,4g SDS 0,1% (3,5 mM) 1g 20% Methanol zu 1l (bei Nitrozellulosemembranen)
TBS (Tris- buffered saline) pH 7,6	20 mM Tris base 137 mM NaCL 3,8 ml 1M HCl entionisiertes H_2O zu 1l
TBS Tween	50 mM Tris- HCl , pH 7,3 150 mM NaCl 0,3% Tween 20
Blockierungspuffer= Milchpulverlösung	1x TBS Tween (0,1%), pH 7,3 28,5 ml 5% Milchpulver 1,5g

PBS (10x) (Phosphate buffered saline)	NaCl 80 g KCl 2 g Na_2HPO_4 14,4 g KH_2PO_4 2,4 g entionisiertes H_2O zu 1
Trenngel 10%	Acrylamid: 10 ml 1,5 M TrisCl, pH 8,8: 7,5 ml 10% SDS: 0,3 ml Entionisiertes H_2O: 12,1 ml 10% APS: 150 µl TEMED: 10 µl
Sammelgel 4%	Acrylamid: 0,67 ml 0,5 M TrisCl, pH 6,8: 1,25 ml 10% SDS: 0,05 ml Entionisiertes H_2O: 3,0 ml 10% APS: 25 µl TEMED: 2,5 µl
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS 35 mM entionisiertes H_2O
ECL- Lösung	Detectionsreagenz 1 (3 ml) Detectionsreagenz 2 (3 ml)

3.2. Methoden

3.2.1. MCF-7 Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Inhibitoren auf die Mammakarzinomzelllinien MCF- 7 und MDA- MB-231 untersucht.

Die MCF- 7 Zellen sind polygonale ERα- und ERβ- positive Zellen, die den HER2/ Neu- Rezeptor nur schwach exprimieren (Lupu und Lippman, 1993). Sie vermehren sich recht schnell mit einer Verdopplungsrate von ca. 15- 20h. Die Zellen wachsen zunächst als Monolayer, hält man sie längere Zeit in einer Kultur, wachsen die Zellen auch in mehreren Schichten.

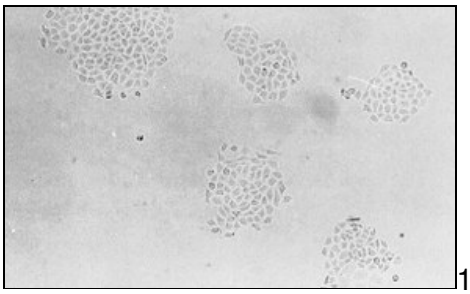

Abb.2.1.: MCF- 7 Zellen in Kultur ca. 36h nach Aussaat

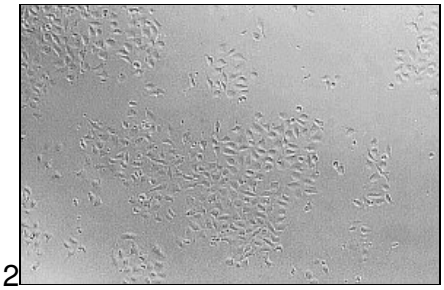

Abb.2.2.: MCF-7 Zellen in Kultur ca. 72h nach Aussaat

3.2.2. MDA- MB- 231 Zelllinie

Die MDA-MB- 231 Zellen sind sehr grazile, ovale bis längliche Zellen, die während ihrer Wachstumsphase einige Ausläufer aufweisen. Sie besitzen keinen ERα aber einen ERβ und überexprimieren den HER2/ Neu- Rezeptor (Lupu und Lippman, 1993). Diese Zellen wachsen langsamer als die MCF-7 Zellen mit einer Verdopplungsrate von ca. 35h und neigen nicht zum Wachstum in mehreren Schichten.

Abb. 2.3.: MDA- MB- 231 24h nach Aussaat

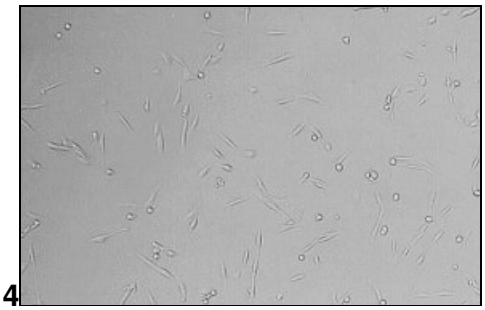

Abb. 2.4.: MDA- MB- 231 24h nach Aussaat

3.2.3. Zellkultur

Um eine ausreichende Zellmenge für die Versuche zu erhalten, wurden die Zellen in einem Brutschrank von HERA cell bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2-Gehalt in 175 cm^2 großen Zellkulturflaschen gelagert. Die MCF-7 Zellen wurden in der Regel in einer Zellzahl von 200000- 600000 Zellen (entspricht einer Zelldichte von ca. 1200- 3500 Zellen/ cm^2), die MDA-MB- 231 Zellen in einer Zellzahl von 600000 Zellen (entspricht einer Zelldichte von ca. 3500 Zellen/ cm^2) in 10 ml DMEM plus 10% FCS ausgesät. Dabei wurde die ausgesäte Zellmenge der Versuchsplanung und dem Zustand der Zellen zu diesem Zeitpunkt angepasst. Bei den MCF-7 Zellen wurde zusätzlich, um die Wachstumsbedingungen zu verbessern, 1% Sodium pyruvate dazugegeben.

Die Zellen waren nach der Aussaat nicht konfluent. Nach 48- 72h wurde bei beiden Zelllinien jeweils das Medium mit seinen Inhaltsstoffen entfernt und erneuert. Zu diesem Zeitpunkt waren die MCF-7 Zellen bereits zu etwa 40- 60%, die MDA-MB- 231 Zellen erst zu ca. 30% konfluent. Nach weiteren 24- 48h war es dann möglich, eine ausreichende Zellzahl für die Kultivierung in 96- well Platten zu „ ernten“.

Die MCF-7 Zellen waren zu dem Zeitpunkt etwa zu 80- 90% konfluent, die MDA-MB- 231 Zellen zu ca. 60-70%.

Lagerung der Zellen

Nach jeweils 6-8 Wochen in Kultur wurden die Zellen stets verworfen, um eventuellen Rezeptormutationen und anderen Zellveränderungen vorzubeugen.

Zur Lagerung der Zellen über einen langen Zeitraum wurden diese in DMEM- F12 mit 5% DMSO und 20% FCS in Cryo Tubes aliquotiert und langsam, erst auf Eis und dann in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussell, über 24h abgekühlt und anschließend bei –80°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um die Zellen wieder zu kultivieren, erfolgte das Auftauen sehr schnell im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und direkt in die mit Nährmedium gefüllten Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank unter den o.g. Bedingungen gezüchtet.

Alle Arbeitsschritte wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt, außerdem wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit Hilfe einer PCR-

Methode (Polymerase- chain- reaction) auf Mycoplasmen getestet.

Präparation der Zellen für die Versuche

Für die Durchführung der folgenden Versuche ist es notwendig gewesen, die Zellen in einer annähernd gleichen Zellzahl und unter absolut identischen sowie sterilen Bedingungen zu kultivieren.

Zuerst wurde aus den oben genannten Zellkulturflaschen das Nährmedium entfernt, um dann sofort die Zellen mit ca. 20 ml PBS zu spülen und mittels 3ml Accutase (0,017 ml/ cm^2) vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Nach einer Einwirkzeit von ca. 5- 10 min bei 37°C schwammen fast alle, nun abgerundeten, Zellen über dem Flaschenboden. Um die Enzymwirkung zu beenden, wurden etwa 10 ml DMEM + 10% FCS hinzugegeben und die gesamte Menge in ein Bluecap überführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 1800 Umdrehungen/ min 5 min zentrifugiert. Der Überstand des Reaktionsgefäßes wurde entfernt und das Zellpellet erneut in einer definierten Menge DMEM ohne weitere Zusätze resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer konnte nun die vorhandene Zellzahl bestimmt werden, um die Zellen in 96- well Platten auszusäen. Die MCF-7 Zellen wurden in einer Anzahl von 2500 in 100 µl DMEM + 5% SNS + 1% Sodium pyruvate, die MDA- MB- 231 Zellen in einer Anzahl von 5000 in 100 µl DMEM + 5% SNS in jedes well gebracht.

Nach 24h wurde das Medium einer jeden Kammer m. H. einer Saugpumpe und Pasteurpipetten entfernt und durch 100 µl DMEM + 0,5% SNS (+ 1% Sodium pyruvate bei der MCF- 7 Zelllinie) ersetzt.

Stimulation der Zellen

Nach weiteren 24h waren die Zellen zu 80- 90% konfluent und einschichtig gewachsen, so dass die Stimulation mit den frisch angesetzten Medien, die SR-2 (1/50), Sodium pyruvate bei den MCF-7 Zellen und in verschiedenen Kombinationen E_2, EGF, IGF, HRG, die RTK- Inhibitoren und die Antiöstrogene enthielten, erfolgen konnte. Auch hier wurde wie zuvor das alte Medium zuerst abgesaugt.

Des Weiteren wurden immer die entsprechenden Lösungsmittelkontrollen des Tamoxifens und des ICI 182, 780 (Faslodex) durchgeführt, und es erfolgte die Kontrolle der Lösungsmittel der anderen Substanzen.

Die Inkubationszeit für die Stimulantien betrug bei dem MTS- Assay 72, bei dem

CDDE 12 und beim Western blot 12 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeiten wurde, wie im Folgenden beschrieben, fortgefahren.:

3.2.4. MTS- Assay (CellTiter 96® Aqueous ONE Solution Cell Proliferation Assay)

Um die Proliferation der Zellen nachzuweisen, wurde 72h nach der Stimulation ein MTS- Assay durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine kalorimetrische Methode bei der die Anzahl der lebenden Zellen einer Kultur bestimmt werden kann [Promega Corporation; Technical Bulletin No. 245].

Die verwendete Reagenz, bestehend aus dem Salz einer Tetrazolium- Verbindung (MTS; Owen´s reagent) und einer Elektronen- koppelnden Reagenz (phenazine ethosulfate; PES), die eine gesteigerte chemische Stabilität hat, so dass eine beständige Lösung entsteht, wurde in einer Menge von 20 µl zum jeweiligen Messzeitpunkt in die wells mit den stimulierten Zellen pipettiert.

Die Tetrazolium- Verbindung (MTS) wurde dann durch die Zellen in ein farbiges Formazanprodukt umgewandelt, das im Nährmedium löslich ist. Diese Umwandlung wird vermutlich durch NADPH und NADH, welches durch die metabolisch aktiven Zellen gebildet wird, vollendet, so dass sich ein gelb-bräunlicher Farbton bei dieser Reaktion zeigt.

Nach einer Inkubationszeit von 0,5- 1 Stunde bei 37°C wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA Reader gemessen. Die gemessene Formazanmenge ist bei diesem Versuch direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen, nachdem man die Eigenextinktion des MTS subtrahiert hat.

Dieser Assay wurde unter unsterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.5. Cell- Death- Detection- ELISA^{PLUS} (CDDE)

Für die vorliegende Arbeit war es besonders wichtig, die Apoptose der behandelten Zellen nachzuweisen. Dazu wurde ein Kit verwendet, bei dem photometrisch die zytoplasmatischen Histon- assoziierten- DNA- Fragmente nach der Auslösung des Zelltods bestimmt werden konnten [Roche; Instruction Manual]. Das Prinzip dieses Testes beruht darauf, dass Antikörper der Maus, die direkt gegen DNA und Histone gerichtet sind, im „Sandwich- Verfahren“ aneinander binden. Dabei kommt es zu einer Bindung von Anti- Histon- Biotin- AK an die Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten und an die Nukleosomen der Zellen. Diese wiederum werden durch die Anti- DNA- POD (Peroxidase)- AK

gebunden, an die dann außerdem das ABTS- Substrat (farblos) binden kann. Der enzymatisch gebildete Farbstoff kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

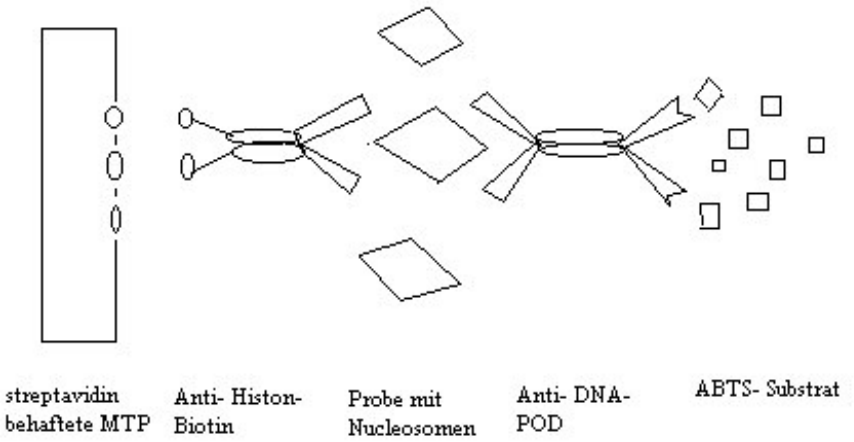

Abb. 2.5.: Prinzip des Cell Death Detection ELISA

Für diesen Versuch wurde eine Stimulationszeit von 12h gewählt, da Tamoxifen 10µM sehr schnell zum Tod der Zellen führte. Bei der Apoptose spaltet eine Ca^{2+}- und Mg^{2+}- abhängige Endonuclease die doppelsträngige DNA an der internucleosomalen Linkerregion, so dass Mono- und Oligonucleosomen entstehen. An diesen Stellen ist die DNA fest mit den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 verbunden und ergibt ein Vielfaches einer 180 bp großen Untereinheit. Diese DNA- Fragmente entstehen einige Stunden bevor die Plasmamembran sich auflöst, weswegen der Messzeitpunkt so gewählt wurde, dass die Zellmembran zu Beginn der Versuchsdurchführung noch intakt war, und es zu keinem größeren Verlust der DNA- Bruchstücke und so zu Messungenauigkeiten kommen konnte.

Die Zellen sahen im Mikroskop zu diesem Zeitpunkt stark abgerundet aus und zeigten viele vesikuläre Einschlüsse. Die Zellmembran war noch deutlich sichtbar und es lösten sich nur wenige Zellen vom Boden der 96 well Platte.

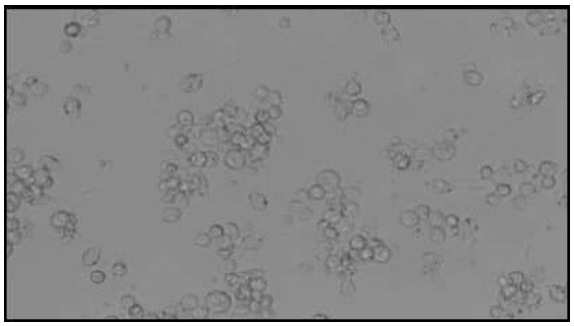

Abb. 2.6.: Apoptose der MCF-7 Zellen nach 12h mit Tamoxifenbehandlung

Zu Beginn des CDDE wurden die Stimulantien aus den wells durch vorsichtiges Abschütteln entfernt und die Zellen in jedem well in 100µl Lysierungspuffer resuspendiert und 30 min bei Raumluft inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Immunreagenz aus 1/20 Anti- DNA- POD, 1/20 Anti- Histon- Biotin und 18/20 Inkubationspuffer und die ABTS- Lösung aus den ABTS- Tabletten und dem Substrat- Puffer laut Anleitung hergestellt.

Nachdem die Zellen lysiert worden sind, wurde das Lysat bei 200g für 10 min zentrifugiert und anschließend 20µl des Überstandes in eine Streptavidin behaftete Mikrotiterplatte überführt.

Es war sehr wichtig, genau und ohne Schütteln zu arbeiten, da ansonsten die Fehlerrate sehr hoch gewesen wäre. Außerdem war es notwendig für jede Überführung saubere Pipettenspitzen zu verwenden, da auch Verunreinigungen dieser zu großen Messfehlern hätten führen können.

Es wurde bei jedem Versuch eine Negativ-, eine Positiv- und eine „Background"-(ABTS- Lösung) Kontrolle durchgeführt, wodurch es möglich war, die Echtheit des Versuches zu überprüfen und die Eigenfarbe des ABTS- Substrates von den Ergebnissen zu subtrahieren.

Zu den 20µl Überstand wurden jetzt jeweils 80µl Immunreagenz dazugegeben, die Platten wurden abgedeckt und für 2h bei Raumtemperatur auf dem MTP- Rüttler unter ständiger Bewegung (300 rpm) inkubiert.

Nach dieser Zeit konnte die Lösung einfach aus den wells durch Abschütteln entfernt werden, da der Anti- Histon- Biotin- AK das Anhaften der DNA auf der beschichteten MTP ermöglichte. Der Sekundärantikörper sollte, wie oben beschrieben, an den DNA- Anteil binden und jetzt mit Hilfe der Peroxidase die Farbreaktion katalysieren (Zinkernagel, 1997). Zuvor allerdings erfolgte ein dreimaliges Waschen mit jeweils 250µl Inkubationspuffer, damit alle Überstände sorgfältig entfernt wurden.

Zuletzt wurde in jedes well 100µl ABTS- Lösung pipettiert, die wiederum 10 min auf dem MTP- Rüttler bei 250 rpm inkubierte. Es entwickelte sich in dieser Zeit ein kräftiger grüner Farbton, der anschließend im ELISA- Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen ABTS als „Background“ photometrisch gemessen werden konnte.
Die Durchführung des ELISA erfolgte unter unsterilen Bedingungen.

3.2.6. Western Blot (Anti- Poly- (ADP-Ribose)- Polymerase (PARP))

Um die Apoptose der Zellen auch m. H. einer zweiten Methode nachzuweisen wurde ein Western Blot gewählt, da diese Methode sehr sensitiv und spezifisch ist in Hinsicht auf die Darstellung von Proteinen. Es sollte speziell nochmals die Wirkung eines Wachstumsfaktors und dessen Inhibitors an MCF-7- Zellen aufgezeigt werden. Dafür wurden EGF und ZD 1839 gewählt, da diese beiden Substanzen in den vorangegangenen Versuchen deutliche Reaktionen zeigten. Als Nachweisprodukt im Western blot diente die Anti- Poly- (ADP- Ribose)- Polymerase (PARP).
„PARP ist ein Zinkabhängiges, eukaryotisches, DNA- bindendes Protein, welches spezifisch DNA- Strangbrüche erkennt, die durch genotoxische Agenzien induziert wurden“ [Roche; Produktinformation, J. de Murcia et al, 1994].
PARP dient dabei als Substrat für Apoptose- spezifische Proteasen der ICE-Familie und wird von 113 kD Größe in Fragmente von 89 kD und 24 kD gespalten, die dann als frühe spezifische Apoptose- Marker im Western Blot nachgewiesen werden können.

Proteinpräparation nach Laemmli

Die Stimulation der Zellen erfolgte ähnlich wie bei den anderen Versuchen, allerdings wurden die Zellen zuvor in 6- well Platten (10000 Zellen/ well) in jeweils 500 µl 5% (0,5%) SNS und Sodiumpyruvat ausgesät.
Nach 12h Stimulationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es erfolgte die Proteinpräparation nach Laemmli, wobei in jedes well 110µl des Laemmli-Puffers gegeben wurden. Nach dem Abschaben der Zellen wurden die Zellsuspensionen bei 99°C 5 min im Thermoschüttler erhitzt und weitere 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

BCA- Proteinkonzentrationsbestimmung nach Pierce

Dann wurde aus dem Überstand eine BCA- Proteinbestimmung nach Pierce durchgeführt, die auf eine Biuret Methode (Cu^{2+} wird zu Cu^{1+} im alkalischen Milieu durch Proteine reduziert) basiert. Durch die Bildung eines 2:1 Komplexes aus dem Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) und den Cu^{1+}- Ionen entsteht ein stabiles rotes Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, das im ELISA Reader messbar ist.

Insgesamt wurden 10 µl Proteinextrakt sowie 200 µl der Arbeitslösung (Reagenz A/ Reagenz B: 50/1) in Mikrotiterplatten überführt, bei 37 °C 30 min inkubiert und bei 562 nm im MRX ELISA- Reader gemessen.

Als Standardreihe diente die BCA- Konzentrationsreihe, anhand derer später die vorhandene Proteinmenge berechnet werden konnte.

Gelelektrophorese der Proteine (SDS- PAGE, Sodiumdodecylsulfat-Poly-acrylamidgelelektrophorese)

Das Prinzip dieser Gelelektrophorese beruht darauf, dass die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Zuvor werden die Proteine durch Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS, Sodiumdodecylsulfat) und β-Mercaptoethanol denaturiert. Das SDS umgibt dabei die Proteine durch Sulfatgruppen mit einer gleichmäßig negativ geladenen Hülle, wobei anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen: ca. 1,4 g SDS pro g Protein (Melkonian Laboratory, Internetinformation).

Die ursprüngliche Struktur der Proteine sowie die ursprüngliche Ladung der Peptide haben also keinen Einfluss mehr auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Eiweiße im elektrischen Feld. Das jeweilige Molekulargewicht ist der bestimmende Parameter, und mit Hilfe von Markerproteinen lässt sich eine Eichkurve der Wanderungsstrecke erstellen, anhand derer sich die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine bestimmen lassen.

Die SDS- PAGE findet in einem diskontinuierlichen System aus Trenn- und Sammelgel im Elektrophoresepuffer statt, welches je nach der Molekülgröße in der Acrylamidkonzentration, der Pufferzusammensetzung und –konzentration sowie dem pH- Wert angepasst werden kann, um die maximale Auflösung und Trennschärfe zu erreichen.

Von jeder Probe wurden je 250 µg Protein zu 100 µl Laemmli- Puffer und einem Gemisch von β- Mercaptoethanol und 1% Bromphenolblau gegeben und kurz zentrifugiert. Die intensiv blau gefärbten Probengemische wurden dann 5 min aufgekocht, dadurch denaturiert, und nach dem Abkühlen neben dem Kaleidoscope Marker auf das Trenngel, 20 µl in die entsprechende Geltasche, aufgetragen.
Das verwendete Gel, indem die Proteine 10 min bei 100 V und ca. 1h bei 200 V in der Gelkammer mit 1x Elektrophoresepuffer getrennt wurden, bestand dabei aus 30 ml eines 10% Polyacrylamid- Gels (Trenngel) und 5 ml eines 4% Sammelgels.

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Durchführung verschiedener Nachweismethoden, z.B. immunologischer Tests oder Aminosäureanalysen, ist es notwendig, die aufgetrennten Proteine auf eine geeignete Matrix zu übertragen. Es wurde dazu eine Nitrozellulosemembran in einer „semi- dry"- Apparatur (Miniblot- Apparatur) verwendet, die zu Beginn kurz in Transferpuffer getränkt wurde.
Der Aufbau dieser Apparatur erfolgte im „Sandwich- Verfahren" von der Kathode zur Anode in der folgenden Reihenfolge: Kathode, 3mm Kathodenpuffer, 3mm Kathodenpuffer, Trenngel, Nitrozellulosemembran, 3 mm Anodenpuffer 2, 3 mm Anodenpuffer 1, Anode.

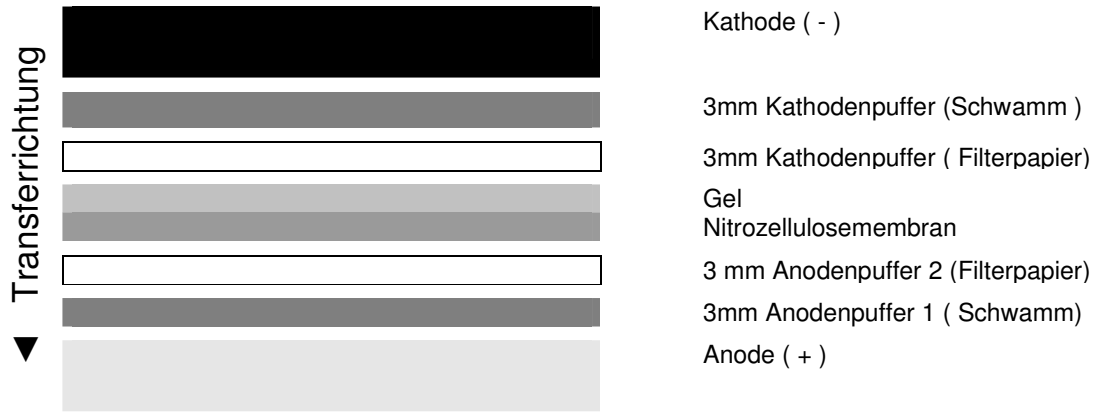

Abb. 2.7.: Anordnung der Schichten im Blotting- Verfahren

Es wurde dann ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 400 mA für 1h angelegt, das senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung stand. Dadurch wurde das Protein von dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen und dort

gebunden.
Das Filterpapier dient bei der Elektrophorese als Ionenreservoir, der Transferpuffer (v.a. das Methanol) dazu, SDS aus dem gemeinsamen Komplex mit den Proteinen zu entfernen und so die Bindung der Proteine an die Membran zu erhöhen.

Danach wurde die Membran aus der Apparatur genommen und in ca. 30 ml TBS Tween gewaschen und anschließend in einer Milchpulverlösung, um weitere unspezifische Bindungen an Proteine zu blockieren, für ca. 1h inkubiert.

Die Milchpulverlösung wurde durch erneutes Waschen mit TBS Tween entfernt, bevor der PARP- AK in einer 1:1000 Verdünnung auf die Membran gegeben wurde und bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubierte.
Am nächsten Tag wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS Tween (mind. 5x 5 min) die Membran von PARP- AK- Überständen gesäubert. Im Anschluss daran inkubierte der 2. AK in einer Verdünnung von 1: 2000 in TBS Tween für 1h auf der Nitrozellulosemembran, und es erfolgte ein weiterer Waschvorgang in TBS für 1h unter mehrmaligem Wechseln der Waschlösung, an den sich das Trocknen der Membran auf Filterpapier anschloss.

ECL- Detektion (enhanced chemilumineszence)
Die ECL- Detektion lässt im Anschluss der Proteinmarkierung durch die Antikörper eine quantitative sowie qualitative Darstellung der Proteinmenge mittels Chemilumineszenz zu.
Die Anti- Poly- (ADP- Ribose)- Polymerase wurde mit Hilfe des primären Antikörpers markiert, während dieser durch den sekundären AK, den horseradish peroxidase (HRP) linked whole antibody, gebunden wurde. Die durch diesen AK gebundene Peroxidase katalysiert bei Zugabe der beiden Detektionsreagenzien in (gleicher Menge: je 3ml; Inkubationszeit 1 min) zusammen mit Wasserstoffperoxid die Oxidation eines zyklischen Diacylhydrazides, wie z.B. Luminol, unter alkalischen Bedingungen [ECL™, Handbuch, amersham pharmacia biotech]. Dadurch geht sofort nach der Oxidation das Luminol in einen angeregten Zustand über, bei dessen Verfall Licht emittiert wird. Diese Reaktion wird durch die Anwesenheit von chemischen Verstärkern, wie z.B. Phenol, gesteigert. Die Lichtemission kann in der Stärke um das Tausendfache erhöht und in der Zeit

verlängert werden.

Das Licht, mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 428 nm, wurde nach der Zugabe der ECL- Lösung mit der Autoradiographie auf einem ECL- Hyperfilm detektiert, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.3. Auswertung und Statistik

Die Auswertung und Statistik der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms Graph Pad PRISM™ und Excel von Microsoft Office.

4. Ergebnisse

Während der Versuche wurde davon ausgegangen, dass sich das gesunde wie auch das kranke Körpergewebe stets unter dem Einfluss verschiedener Hormone befindet. Unsere besondere Aufmerksamkeit galt dabei v.a. dem Östradiol, da angenommen werden muss, dass dieses eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielt. Aus diesem Grund wurden alle behandelten Zellen stets dem Einfluss von Östradiol ausgesetzt. Nur in einigen Kontrollversuchen wurde bewusst auf die Zugabe dieses Hormons verzichtet.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erscheint in den Graphen jeweils ein Balken mit der Beschriftung „SR-2". SR-2 (Serum Replacement- 2) ist ein Serum- Ersatz aus ergänztem Kälberserum, das als Trägersubstanz für Wachstumsfaktoren dient (Johnston und Siegel, 1990). Das Ergebnis, das dieser Balken repräsentiert, stellt die Anzahl der lebenden Zellen bzw. die gemessene Apoptoserate bei Zellen, die mit keinerlei Hormonen oder RTK- Inhibitoren behandelt wurden, dar. Als Referenzwert für alle Versuche wurde ein Wert von 100% angenommen, der sich aus der Apoptoserate bzw. der Proliferationsrate, der mit Serum Replacement- 2 und Östradiol stimulierten Zellen, ergab. Dieser Balken wird in den Graphiken als „Kontrolle" bezeichnet.

4.1. MDA- MB- 231 Zellen

4.1.1. Effekte der Östrogenrezeptorantagonisten auf die MDA- MB- 231 Zellen

Zunächst wurde der Effekt der Östrogenrezeptorantagonisten auf die ERα- negative Zelllinie untersucht, um zu überprüfen, ob möglicherweise auch eine Behandlung von ERα- negativen Mammakarzinomen mit Tamoxifen oder ICI 182,780 möglich wäre. Die Ergebnisse der Messungen bei der MDA- MB- 231 Zelllinie waren nicht sehr eindrucksvoll. Allerdings war der selektive Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen in der Lage, auch bei diesen, ERα- negativen Zellen, die Anzahl der lebenden Zellen statistisch signifikant zu senken. Es wurde bereits nach 48h eine mit $p < 0,05$ (+) signifikante Minimierung der verstoffwechselnden Zellen nachgewiesen. Nach 72h zeigte sich ein mit $p < 0,01$ (++) statistisch signifikantes Ergebnis, und nach 96h konnte die Zellzahl etwa halbiert werden; mit $p < 0,001$ (+++).

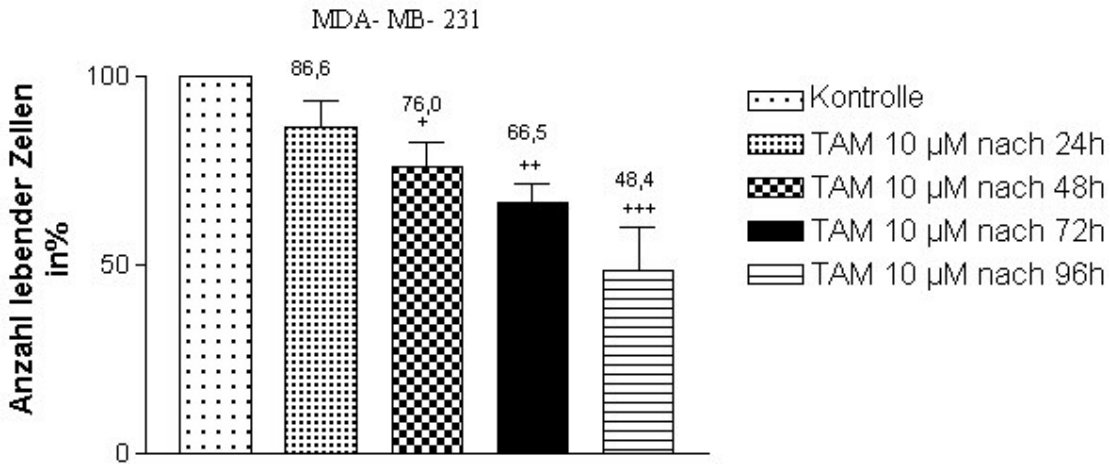

Abb.3.1.: Wirkung des Tamoxifens auf die Proliferationsrate der MDA-MB 231 Zellen in Abhängigkeit von der Zeit; nach 96h lebten gegenüber der Kontrollgruppe nur noch 48,4% der Zellen

Im Cell- Death- Detection- ELISA wurde nach 24h eine durch Tamoxifen induzierte, stark signifikante Apoptoserate mit 168,3% messbar ($p < 0,001$ (+++)), die bereits nach weiteren 12h nicht mehr so stark nachzuweisen war ($p < 0,01$ (++); 148,1%).

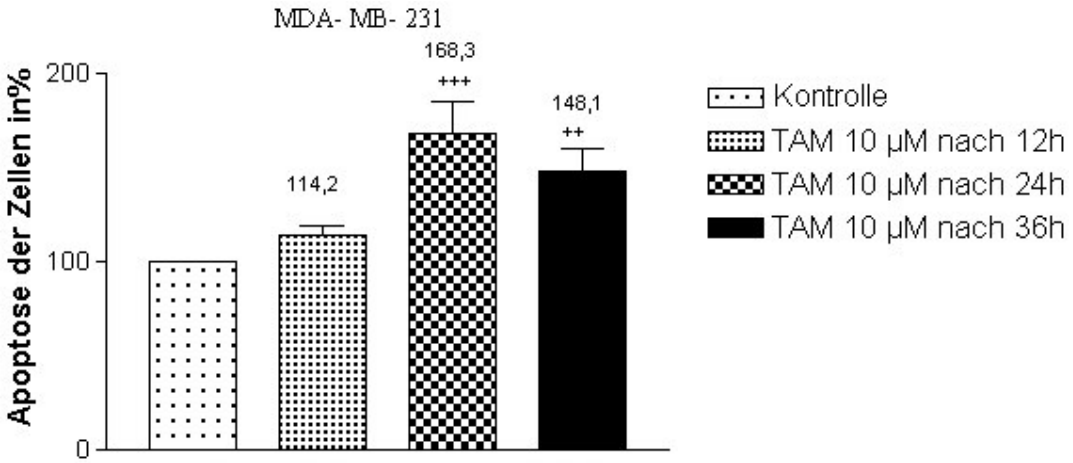

Abb.3.2: Apoptotische Wirkung des Tamoxifens in Abhängigkeit von der Stimulationszeit; nach 24h konnte eine statistisch signifikante Apoptoserate von 168,3% nachgewiesen werden.

Außerdem konnte bei dieser Zelllinie eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung des Antiöstrogens deutlich dargestellt werden. In einer Konzentration von 10 µM senkte Tamoxifen mit $p < 0,001$ (+++) signifikant die Anzahl der lebenden Zellen, kleinere Konzentrationen zeigten keine statistisch signifikanten Effekte. Des Weiteren fällt in der folgenden Graphik auf, dass im Medium ohne Östrogen eine höhere Anzahl an Formazan- bildenden lebenden Zellen nachweisbar war,

mit p < 0,05 (+) statistisch signifikant. Dieses spricht für eine erniedrigte Ansprechbarkeit der ERα- negativen Zellen auf Östradiol.

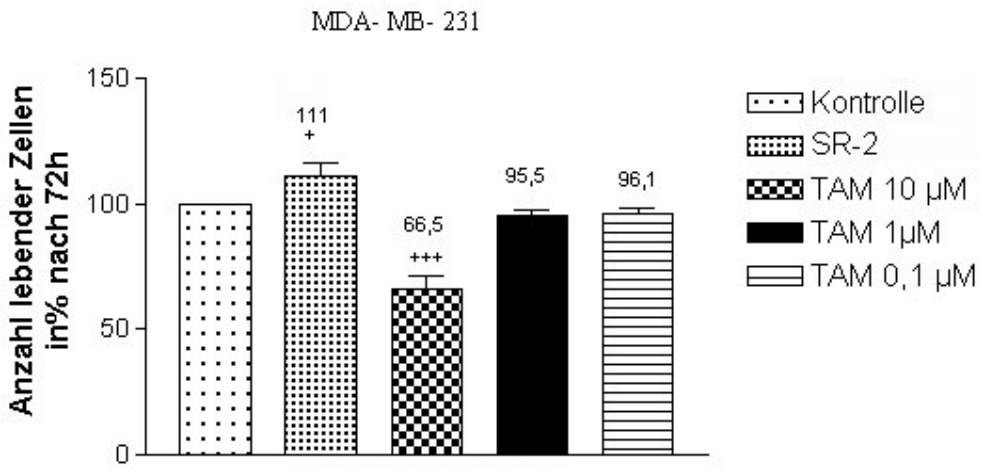

Abb.3.3: Konzentrationsabhängige Wirkung des Tamoxifens auf die MDA- MB- 231 Zellen auf die Proliferationsrate; Tamoxifen in der höchsten Konzentration konnte die Anzahl der lebenden Zellen auf 66,5% senken. Außerdem auffällig war eine statistisch signifikant gesteigerte Proliferationsrate der Zellen, wenn diese unbehandelt im SR-2 kultiviert wurden.

Bei der Behandlung der MDA- MB- 231 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Tamoxifens ließ sich neben der erniedrigten Zellzahl im MTS- Assay auch eine gesteigerte Apoptoserate von 168,3% mit p < 0,001 (+++) im Cell- Death- Detection- ELISA nachweisen. Allerdings gelang dieser Nachweis nur in der höchsten Tamoxifenkonzentration (10µM).

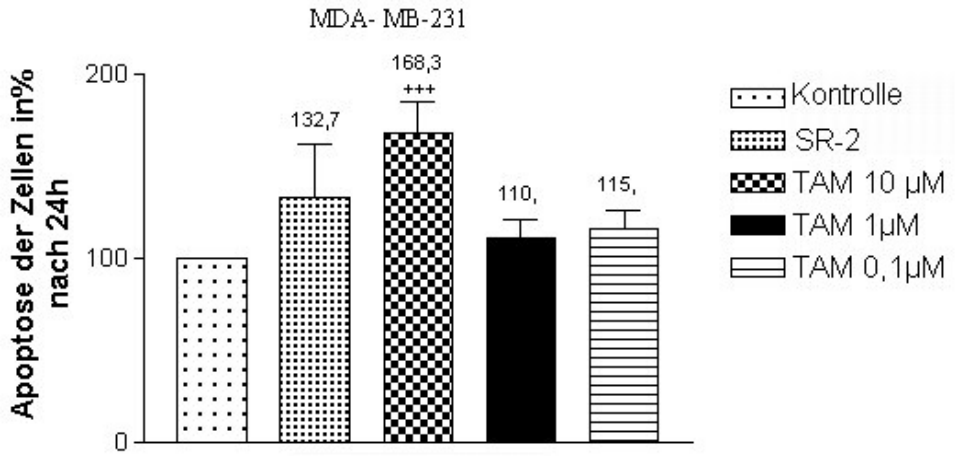

Abb.3.4.: Konzentrationsabhängige Wirkung des Tamoxifens auf die Apoptoserate bei MDA-MB-231 Zellen; in der höchsten Tamoxifenkonzentration konnte eine statistisch signifikante Apoptoserate mit 168,3% nach 24h nachgewiesen werden, die in SR-2 kultivierten Zellen wiesen auch eine erhöhte Apoptoserate auf.

Die gleichen Versuche mit dem reinen Östrogenrezeptorantagonisten ICI 182,780 zeigten keine statistisch signifikanten Ergebnisse bei den MDA- MB- 231 Zellen. So konnte bei keiner Behandlung mit einer der drei Konzentrationen des ICI 182, 780 eine geminderte Anzahl an lebenden Zellen oder eine verstärkte Apoptose nachgewiesen werden, wie es die beiden folgenden Diagramme zeigen. Dieser Unterschied zwischen Tamoxifen und ICI 182,780 resultiert aus der spezifischen Wirkung des Tamoxifens, das ERα- unabhängige Effekte aufweist.

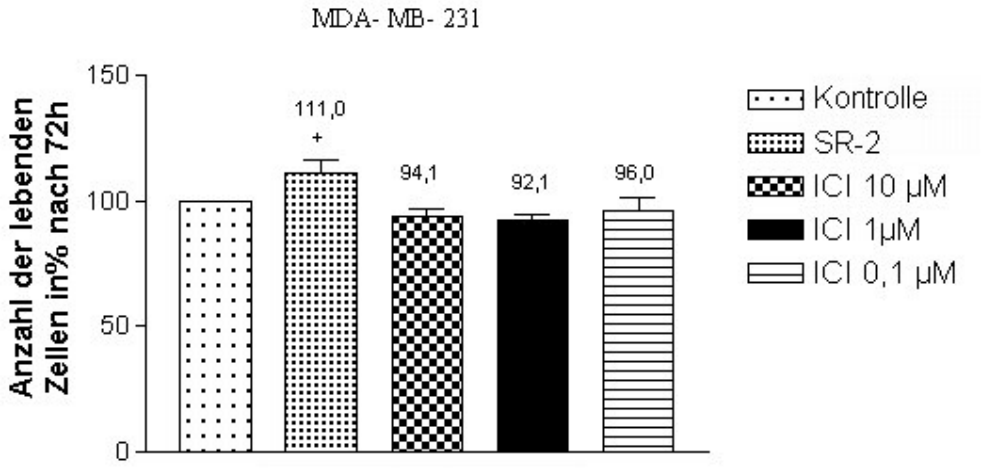

Abb.3.5.: Wirkung des ICI 182,780 auf die Proliferationsrate der MDA-MB- 231 Zellen; es konnten keine statistisch signifikanten Effekte auf die Zellen gesehen werden.

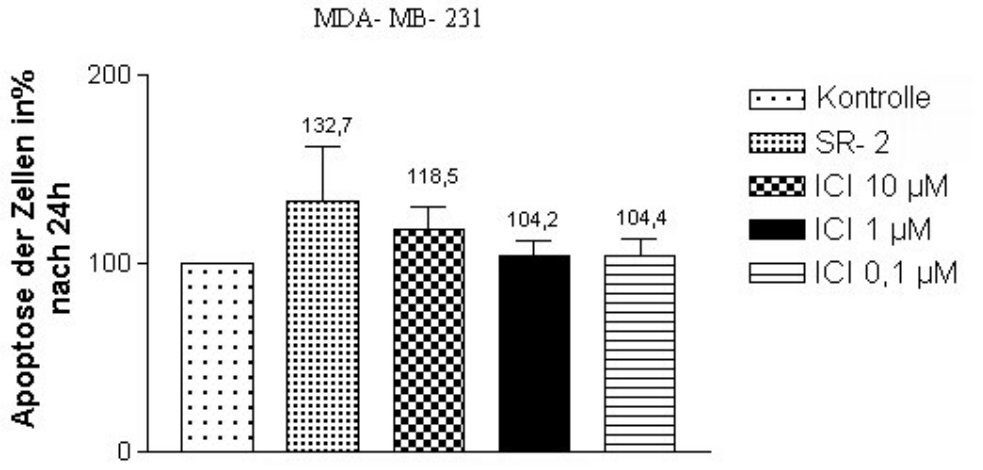

Abb.3.6 : Konzentrationsabhängige apoptotische Wirkung des ICI 182,780 auf die MDA- MB- 231 Zellen; es konnte kein statistisch signifikanter Effekt gemessen werden

4.2. MCF-7 Zellen

4.2.1. Effekte der Östrogenrezeptorantagonisten auf die ERα- positiven MCF-7 Zellen

Um herauszufiltern, welche Dosis und welche Behandlungszeit für die Behandlung der Zellen am geeignetsten für die weiteren Untersuchungen ist, wurden auch bei der MCF- 7 Zelllinie Versuche mit Tamoxifen und ICI 182,780 in verschiedenen Konzentrationen und mit unterschiedlichen Stimulationszeiten durchgeführt. Die zeit- und dosisabhängige Wirkung konnte in unseren Versuchen wie im folgenden beschrieben nachgewiesen werden.

Die MCF- 7 Zellen reagierten stets sehr stark auf die Antiöstrogene, so dass wir für das Tamoxifen eine geminderte Anzahl lebender Zellen und eine starke Apoptose nachweisen konnten, was auch die folgenden Graphen darstellen sollen.

Effekte des Tamoxifens auf die Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit

Durch das Tamoxifen wurde die Anzahl der lebenden Zellen bereits nach 24h statistisch signifikant auf 78,3% mit $p < 0,05$ (+) gesenkt. Über diesen Stimulationszeitraum hinaus sank die Anzahl der Zellen, die in der Lage war, das MTS zu verstoffwechseln, sehr stark mit $p < 0,001$ (+++), nach 96h lebten nur noch 9,6% der Zellen.

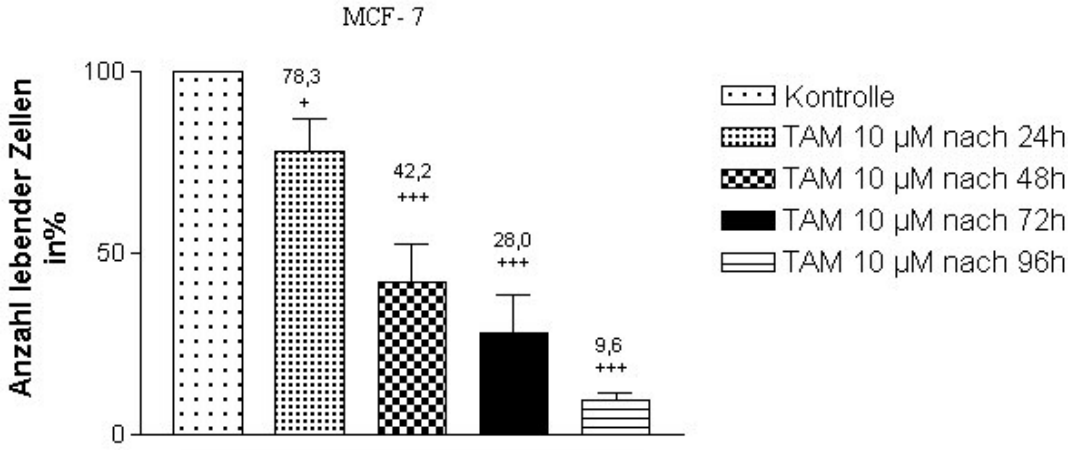

Abb.3.7: Wirkung des Tamoxifens auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Proliferation in Abhängigkeit von der Zeit; nach 24h ist die Proliferationsrate bereits statistisch signifikant erniedrigt, nach 96h leben nur noch ca. 10% der behandelten Zellen

Effekte des Tamoxifens auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Zeit

Die Apoptose, durch das Tamoxifen ausgelöst, wurde hingegen schon nach 12h

Stimulationszeit statistisch signifikant nachweisbar mit $p < 0{,}001$ (+++). Vermutlich konnte nach einer längeren Zeit die Apoptose aus technischen Gründen nicht mehr in diesem Maße nachgewiesen werden, denn die freigesetzten Zellorganellen im Medium wurden zu Beginn des Versuches durch Abschütteln von den noch haftenden Zellen getrennt.

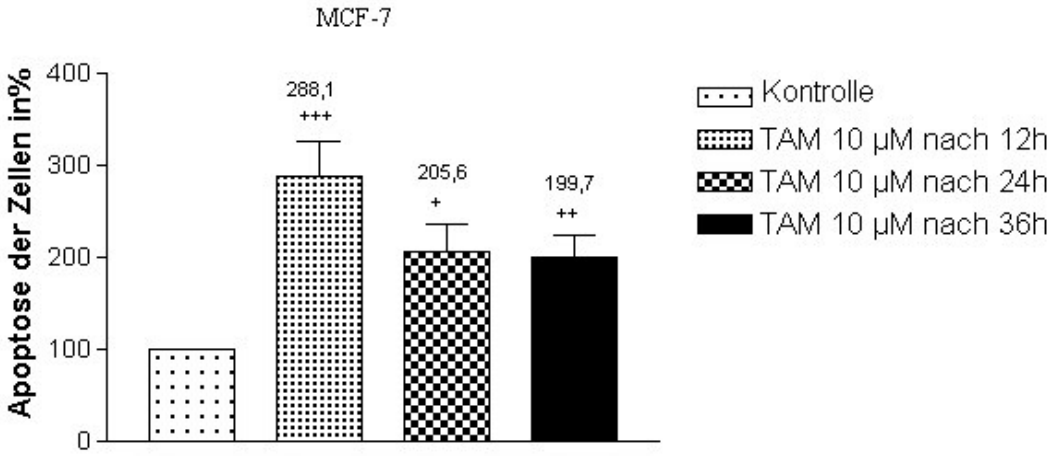

Abb.3.8 : Wirkung des Tamoxifens in Abhängigkeit von der Zeit auf die Apoptose der MCF-7 Zellen ; bereits nach 12h ist eine statistisch signifikante Apoptoserate mit 288% messbar.

Effekte des Tamoxifens auf die Proliferation in Abhängigkeit von der Konzentration

Deutlich wurde auch, dass die MCF- 7 Zellen besonders sensibel auf eine Tamoxifenkonzentration von 10 µM reagierten. Dieses spiegelte sich in den Versuchen zur Messung der Anzahl der lebenden Zellen und im Cell- Death- Detection- ELISA zum Nachweis des programmierten Zelltods in Abhängigkeit der Tamoxifenkonzentration wieder.

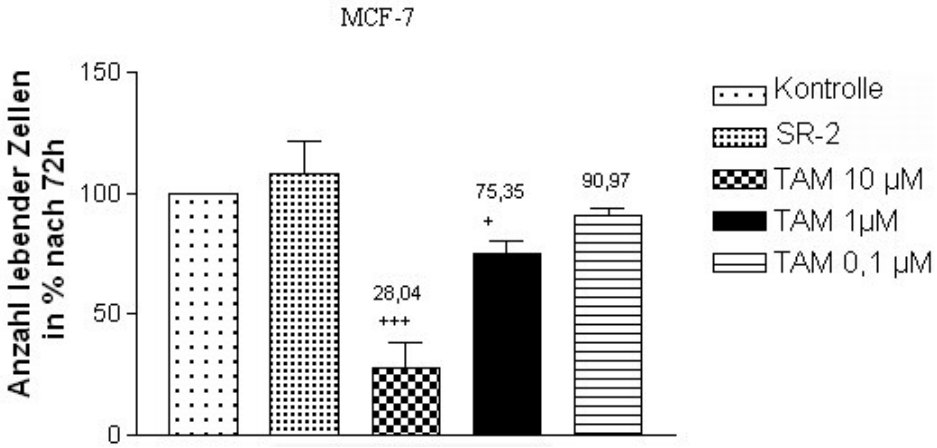

Abb.3.9: Konzentrationsabhängige Wirkung des Tamoxifens auf die Proliferationsrate der MCF-7 Zellen, in einer Konzentration von 10 µM überleben nur 28% aller Zellen (statistisch signifikant).

Effekte des Tamoxifens auf die Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration

Eine hohe Konzentration (10µM) an Tamoxifen im Nährmedium konnte die Zellzahl signifikant senken und die Apoptoserate mit $p < 0,001$ statistisch signifikant steigern, wohingegen eine Tamoxifenkonzentration von 1 µM viel schwächere Wirkungen aufwies. In den graphischen Darstellungen kann man auch Effekte auf die kleinste Tamoxifenkonzentration (0,1 µM) erahnen, die allerdings nicht statistisch signifikant waren.

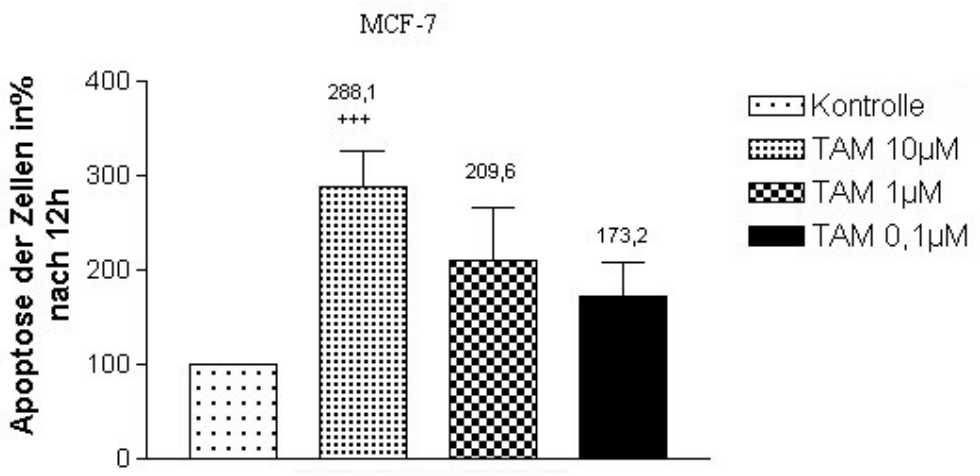

Abb.3.10: Konzentrationsabhängige Wirkung des Tamoxifens nach 12h auf die MCF-7 Zellen auf die Apoptoserate; bei 10µM Tamoxifen konnte die Apoptose mit 288% statistisch signifikant nachgewiesen werden. Die abweichenden Werte in der Apoptoserate zu später gezeigten Darstellungen beruht auf eine hier verwendete Zellzahl von 5000 Zellen/ well statt 2500 Zellen/ well, die in den Hauptversuchen eingesetzt wurde.

Effekte des ICI 182, 780 auf die Proliferation und Apoptose in Abhängigkeit von der Konzentration

In unseren Versuchen konnten wir für ICI 182, 780 (Faslodex) keine starken Effekte erfassen. Es konnte eine geringe Erniedrigung der Zellzahl im MTS- Assay gemessen werden, die allerdings nicht signifikant war, sowie eine erhöhte Apoptoserate, die für alle Konzentrationen des ICI 182, 780 mit $p < 0,05$ statistisch signifikant war.

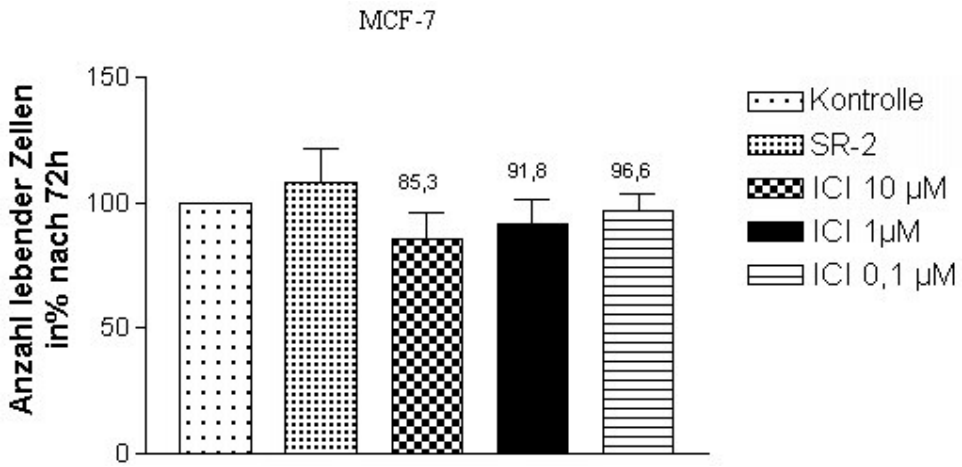

Abb.3.11 : Konzentrationsabhängige Wirkung des ICI 182, 780 auf die MCF-7 Zellen nach 72h auf die Proliferationsrate; trotz einer Erniedrigung der Zellzahl sind die Ergebnisse nicht statistisch signifikant.

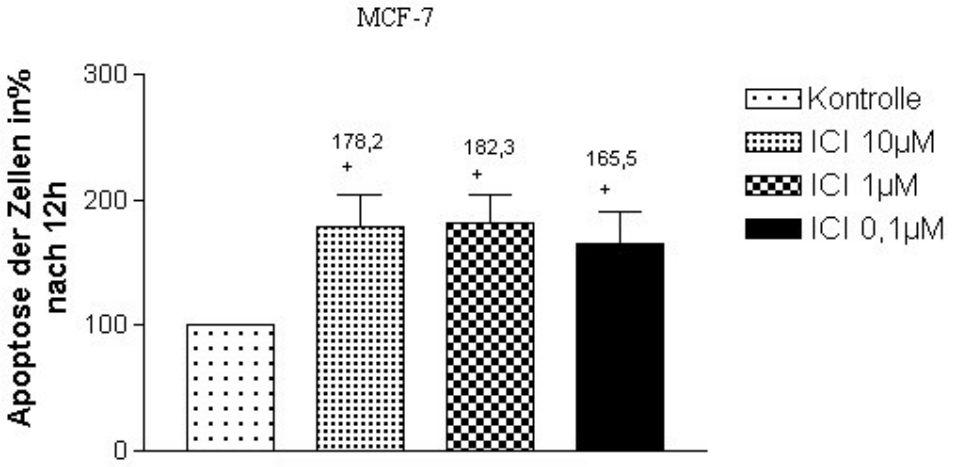

Abb.3.12 : Konzentrationsabhängige Wirkung des ICI 182, 780 auf die MCF-7 Zellen nach 12h auf die Apoptoserate ; in allen Konzentrationen konnte ICI 182, 780 eine gesteigerte Apoptoserate hervorrufen, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen aufzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des Apoptose- ELISA und die des MTS- Assays bisher miteinander korrelierten.

Da das ICI 182, 780 keine starken Effekte aufwies, wurde im Verlauf der Versuche auf weitere Messungen verzichtet. Die erhobenen Daten sollen nicht weiter dargestellt werden, denn sie sind mit einer zu geringen Versuchsanzahl nicht statistisch zu verwerten.

Effekte des Tamoxifens auf die Proliferation und Apoptose in Abhängigkeit von der verwendeten Zellzahl

Ein weiteres Kriterium, das Auswirkungen auf die Effekte an den MCF-7 Zellen zeigte, war die in den wells vorgelegte Zellanzahl. So wurden die Effekte bei einer Anzahl von 2500 statt 5000 Zellen noch deutlicher, wie es die folgenden Diagramme darstellen.

Das Antiöstrogen war in hoher Konzentration in der Lage, die Apoptose auf ein fünffaches zu steigern; mit $p < 0,001$ (+++) statistisch signifikant. In Korrelation dazu zeigte der MTS- Assay eine stark supprimierte Zellzahl- ebenfalls statistisch signifikant mit $p < 0,001$ (+++).

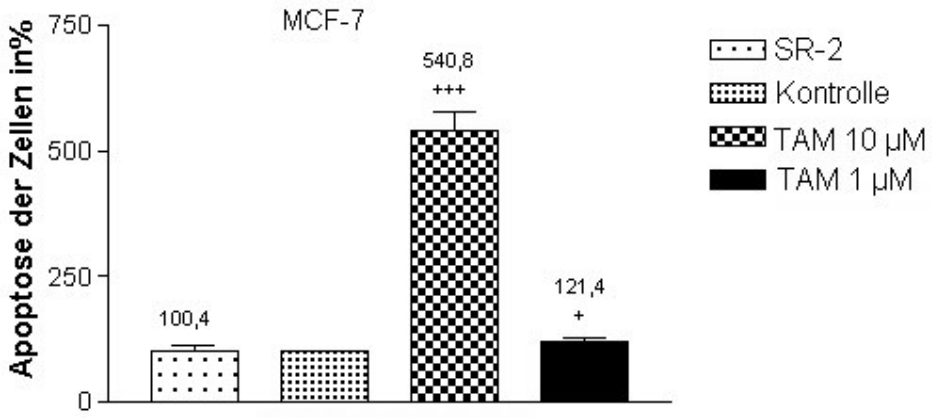

Abb.3.13: Wirkung des Tamoxifen auf die MCF-7 Zellen in einer Zellzahl von 2500 Zellen/ well nach 12h; beide Tamoxifenkonzentrationen rufen eine statistisch signifikante Apoptose hervor.

Tamoxifen in einer 1 µM Konzentration konnte auch eine signifikant erhöhte Apoptose ($p < 0,05$ (+)) und parallel dazu eine Minimierung der lebenden Zellen auf ca. 80% mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,001$ (+++) bewirken. In der höchsten Konzentration konnte die Zellzahl sogar signifikant bis auf ca. 28% gesenkt werden.

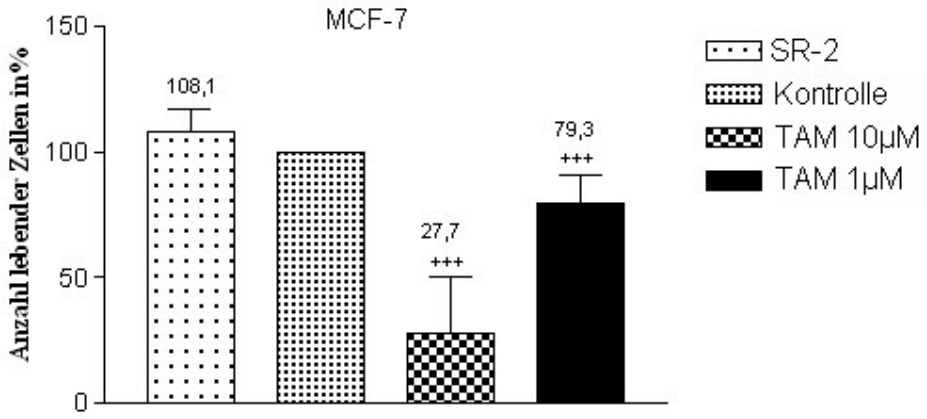

Abb.3.14: Wirkung des Tamoxifens auf die Proliferationsrate der MCF-7 Zellen nach 12h; deutlich zu sehen, ist die statistisch signifikant gesenkte Zellzahl bei 10µM Tamoxifen, auch in der kleineren Konzentration senkt Tamoxifen die Zellzahl signifikant.

Die Messungen der Versuchsreihen erfolgten an der MCF-7 Zelllinie in einer Zellzahl von 2500 Zellen/ well, weil sie die prägnantesten Ergebnisse erbrachten. Die folgenden Diagramme spiegeln die Ergebnisse dieser Messungen wieder.

4.2.2. Effekte der Wachstumsfaktoren auf die MCF-7 Zellen

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die Apoptose im E2- freien Medium

Zuerst wurden die Wirkungen der Wachstumsfaktoren Östradiol, EGF, HRG und IGF auf die MCF-7 Zellen ohne weitere Zusätze, wie E2, im Grundmedium untersucht, um eventuelle Proliferationseffekte sowie eine stattfindende Apoptose der Zellen zu quantifizieren. Es zeigte sich unter der Verwendung von 10nM EGF eine deutliche Senkung der Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf 68,6% (mit $p < 0,001$ (+++)). Die anderen Wachstumsfaktoren bewirkten keine statistisch signifikante Senkung des programmierten Zelltods. Auch eine leichte Erhöhung der Apoptose, obwohl unter dem Einfluss von IGF anhand der Darstellung zu vermuten, konnte nicht signifikant nachgewiesen werden.

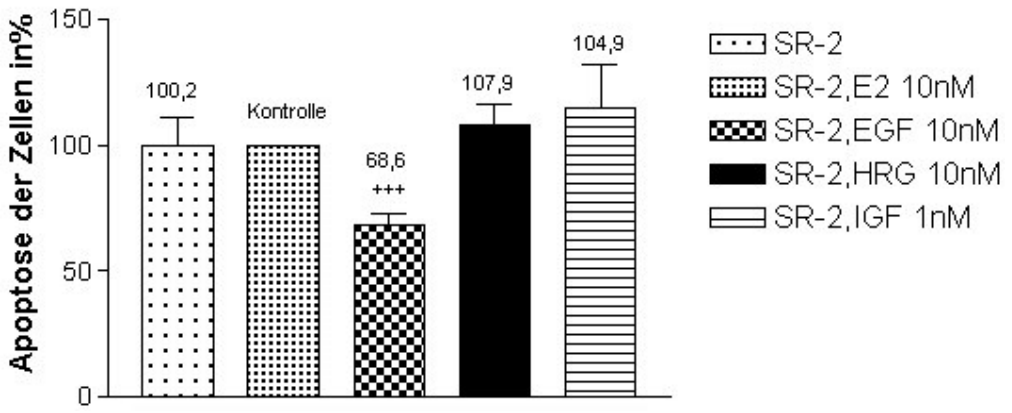

Abb.3.15: Einfluss der Wachstumsfaktoren bei den MCF-7 Zellen auf die Apoptose ohne Östradiol im Grundmedium; EGF konnte die Apoptose statistisch signifikant senken

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation im E2- freien Medium

Weiterhin zeigte sich keine wesentliche Veränderung hinsichtlich der Anzahl der lebenden Zellen, eine geringfügig messbare Erhöhung der Zellzahl ließ sich jedoch unter dem Einfluss von EGF, HRG und IGF darstellen (nicht signifikant).

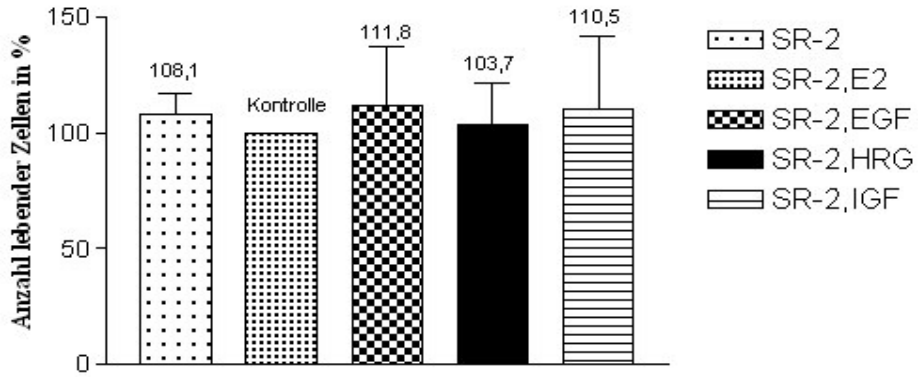

Abb.3.16: Einfluss der Wachstumsfaktoren bei den MCF-7 Zellen auf die Proliferation ohne Östradiol im Grundmedium; es konnte keine statistisch signifikante Wirkung der WF nachgewiesen werden.

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die Apoptose im E2- haltigen Medium

Weitere Messreihen untersuchten die Effekte der Wachstumsfaktoren auf die Zellen in östradiolhaltigen Medien, da davon ausgegangen werden muss, dass alle zellulären Vorgänge unter dem Einfluss von Hormonen stattfinden. Auch bei diesen Versuchen ließ sich lediglich unter dem Einfluss von EGF die Apoptose der Zellen statistisch signifikant auf 81,2% senken, mit $p < 0,05$ (+). HRG und IGF zeigten ähnlich wie zuvor keine starken Effekte auf die MCF-7 Zellen.

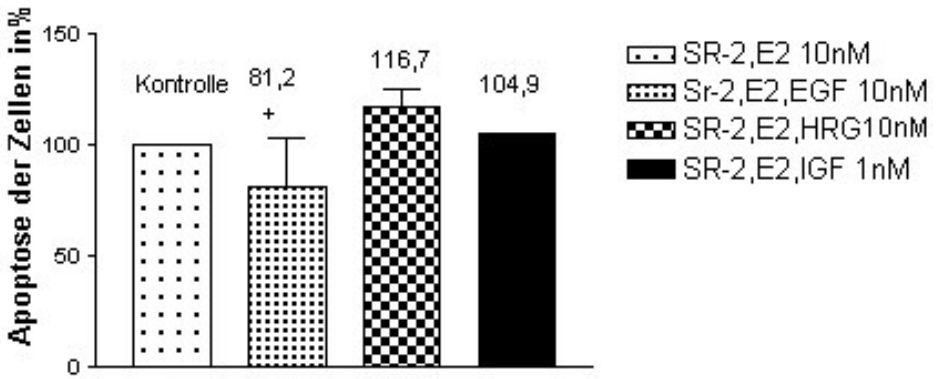

Abb.3.17: Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Apoptose der MCF-7 Zellen unter dem Einfluss von Östradiol im Grundmedium; unter EGF konnte eine signifikant gesenkte Apoptoserate gemessen werden.

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation im E2- haltigen Medium

In Korrelation dazu konnte auch durch eine Kombination der Wachstumsfaktoren mit dem Östrogen keine Erhöhung der Proliferationsrate gemessen werden, wie es in dem folgenden Graphen dargestellt wird.

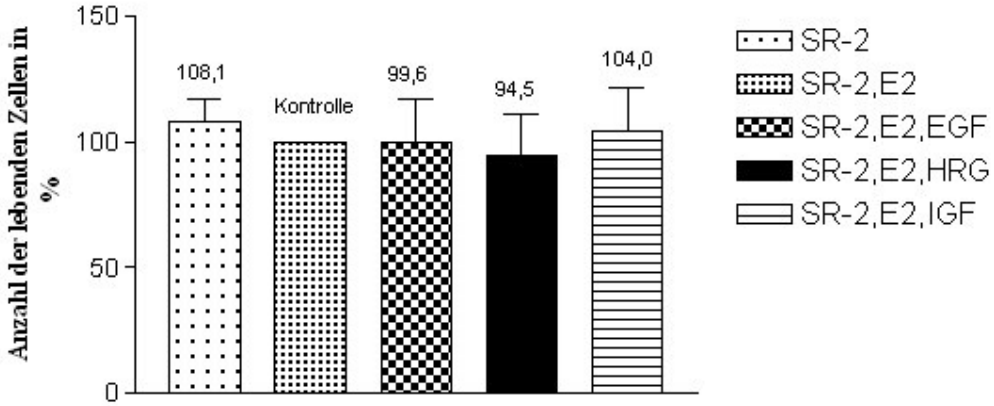

Abb.3.18: Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Proliferation der MCF-7 Zellen unter dem Einfluss von Östradiol im Grundmedium; es wurden keine statistisch signifikanten Ergebnisse gemessen.

4.2.3. Effekte der Wachstumsfaktoren auf die antiproliferative und apoptotische Wirkung des Tamoxifens im östrogenhaltigen Medium

Als nächstes wurden die proliferativen und antiapoptotischen Effekte der Wachstumsfaktoren, wenn die Zellen gleichzeitig mit Tamoxifen behandelt wurden, untersucht. Diese Versuche führten wir durch, um die gegenseitige Beeinflussung der Signalwege von Östrogen- und Tyrosinkinase- Rezeptoren

nachzuweisen. Vermutet wurde eine abgeschwächte Wirksamkeit von Tamoxifen auf ERα- positive Zellen, wenn diese durch andere Wachstumsfaktoren beeinflusst werden.

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die apoptotische Wirkung des Tamoxifens
Wurden die mit Tamoxifen (10 µM) behandelten Zellen zusätzlich mit einem Wachstumsfaktor stimuliert, ließ sich feststellen, dass EGF und HRG in der Lage waren, die durch Tamoxifen verursachte Apoptose um ca. 100% statistisch signifikant mit $p < 0,05$ zu senken. Auch bei der Stimulation mit IGF konnte eine leichte Minimierung des programmierten Zelltods nachgewiesen werden, die jedoch nicht signifikant war.

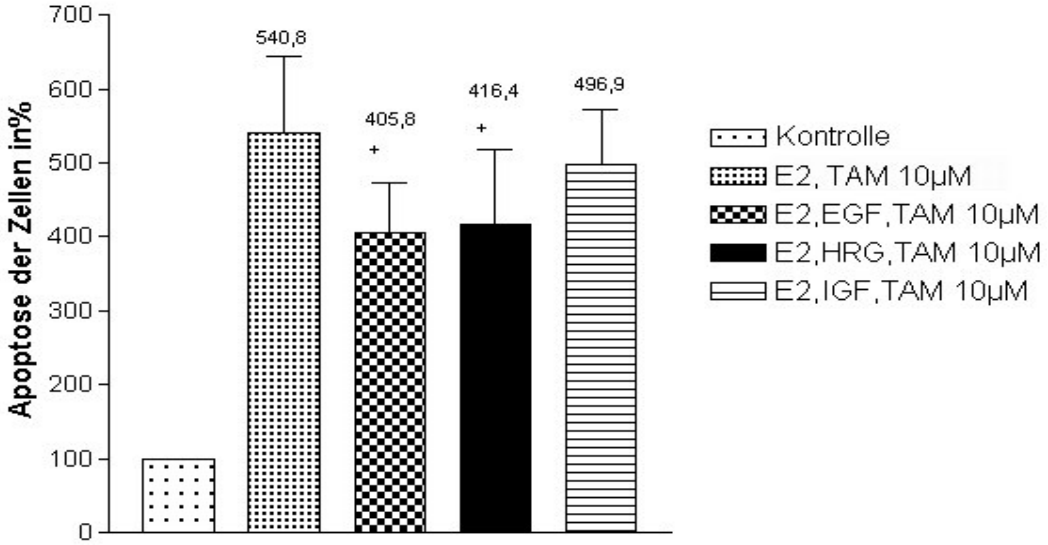

Abb.3.19: Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die apoptotischen Tamoxifeneffekte; es ist zu erkennen, dass EGF und HRG die durch Tamoxifen ausgelöste Apoptose statistisch signifikant senken können.

Bei der Behandlung der Zellen mit Tamoxifen in einer Konzentration von 1µM führte EGF zu einer statistisch signifikanten (mit $p < 0,01$) Senkung der Apoptoserate der MCF-7 Zellen. Es konnte bei der kombinierten Behandlung der Zellen mit EGF und Tamoxifen (1 µM) sogar ein Absinken der Apoptoserate auf ca. 85% nachgewiesen werden. HRG und IGF zeigten keine Erniedrigung der Apoptoserate. Im Gegenteil: die mit IGF, Tamoxifen und Östradiol stimulierten Zellen zeigten sogar eine sehr hohe Zelltodrate, mit $p < 0,05$ statistisch signifikant gegenüber den nicht stimulierten Zellen.

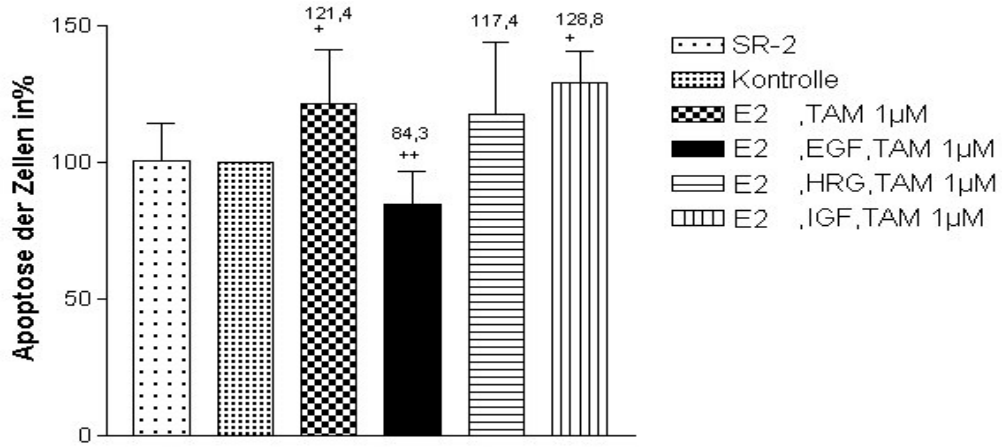

Abb.3.20: Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die apoptotischen Tamoxifeneffekte bei einer Tamoxifenkonzentration von 1 µM; in der gleichzeitigen Stimulation mit EGF kann durch Tamoxifen keine gesteigerte Apoptoserate bewirkt werden, die Apoptose ist mit 84,3% sogar ++ statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt, HRG und IGF hingegen haben keine Effekte auf die Tamoxifenwirkung.

Effekte der Wachstumsfaktoren auf die antiproliferative Wirkung des Tamoxifens

Im Proliferations- Assay ließ sich allerdings kein eindeutiger Unterschied zwischen den mit Tamoxifen und den mit Tamoxifen und einem Wachstumsfaktor behandelten Zellen herausarbeiten. Exemplarisch sei als nächstes das Diagramm für die höchste Antiöstrogenkonzentration dargestellt.

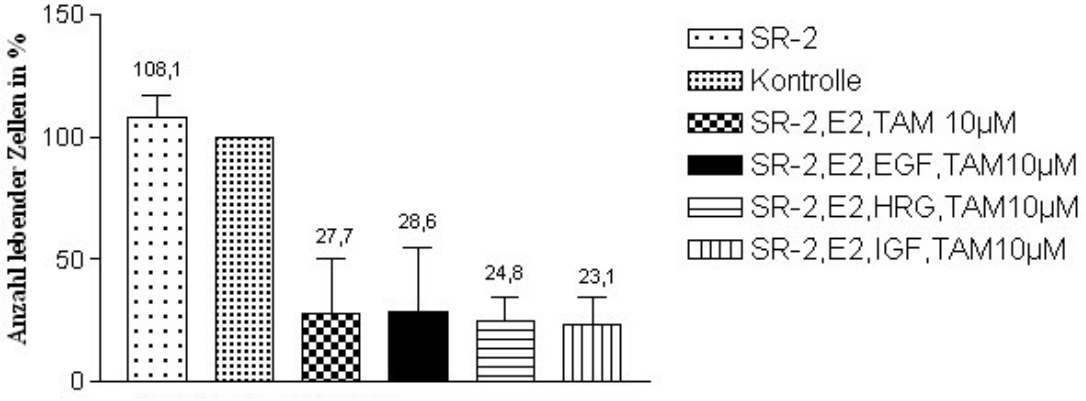

Abb.3.21: Effekte der Wachstumsfaktoren auf die antiproliferativen Effekte des Tamoxifens (10µM); es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem Antiöstrogen behandelten Zellen gesehen werden.

Der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen war bei allen Ansätzen in der Lage, die Anzahl der lebenden Zellen statistisch signifikant (siehe oben) zu

senken. Jedoch konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Zellzahl bei den mit EGF, HRG oder IGF und Tamoxifen stimulierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Tamoxifen 10 µM behandelt wurden, gemessen werden. Leichte proliferative Effekte der Wachstumsfaktoren lassen sich bei den mit Tamoxifen in einer Konzentration von 1 µM behandelten Zellen erkennen. Jedoch sind auch diese nicht statistisch signifikant. Die Balken der Zellen, die zusätzlich mit den Wachstumsfaktoren behandelt wurden, lassen eine etwas höhere Anzahl an lebenden Zellen erkennen.

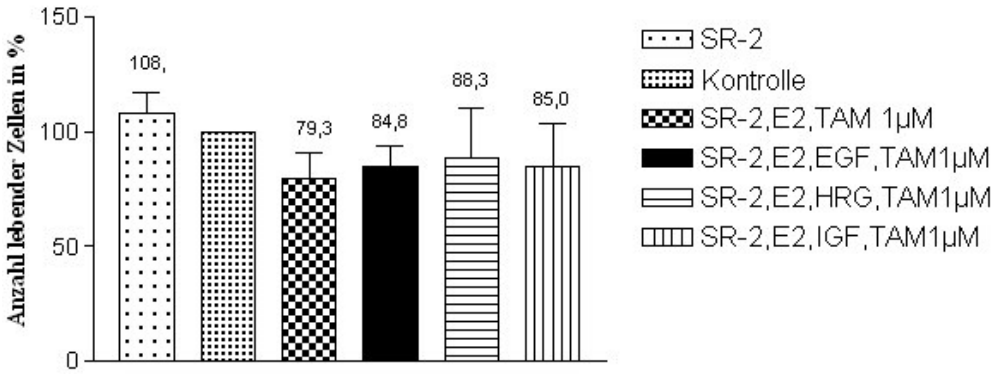

Abb.3.22: Effekte der Wachstumsfaktoren auf die antiproliferativen Effekte des Tamoxifens (1µM); es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem Antiöstrogen behandelten Zellen gesehen werden.

4.2.4. Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF- 7 Zellen

Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Apoptose

Mit den folgenden Versuchen sollten proapoptotische Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF-7 Zellen und mögliche additive oder synergistische Effekte in der kombinierten Behandlung mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen untersucht werden, um zu verifizieren, ob durch eine Kombinationsbehandlung eine Steigerung der Apoptoserate bzw. eine Senkung der Proliferationsrate möglich ist. Außerdem sollte untersucht werden, wie weit sich die Signaltransduktionswege der Östrogenrezeptoren und Tyrosinkinaserezeptoren gegenseitig beeinflussen.

Schon durch die Stimulation der Zellen mit den verschiedenen Tyrosinkinaseinhibitoren konnte in einigen Zellansätzen, wie die folgende Graphik darstellt, eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden.

Die Messdaten zeigten, dass durch den Zusatz von AG 1478 und ZD 1839 jeweils eine Erhöhung der Apoptoserate, mit $p < 0{,}001$ signifikant, erzielt werden konnte.

Dabei bewirkte AG 1478 eine Apoptoserate, die im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ca. 156% betrug. Bei Iressa hingegen konnte im quantitativen Nachweis eine ca. dreifach erhöhte Apoptoserate mit 275% nachgewiesen werden- allerdings mit einer hohen Standardabweichung bei relativ hohen Schwankungen zwischen den einzelnen Messwerten. Auch PD 98059 war in der Lage die Apoptose der Zellen mit $p < 0,05$ statistisch signifikant auf 118% zu steigern. Die weiteren RTK- Inhibitoren führten ohne die Zugabe von Östrogenrezeptorantagonisten nicht zu einer statistisch signifikanten Zunahme des programmierten Zelltods.

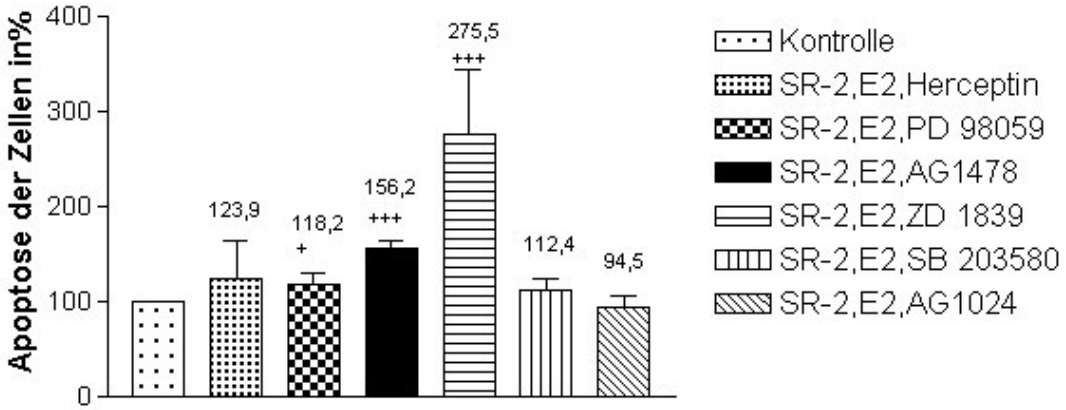

Abb.3.23: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die Apoptoserate der MCF- 7 Zellen; für PD 98059, ZD 1839 und AG 1478 konnte eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptoserate nachgewiesen werden.

4.2.5. Effekte einer Kombinationsbehandlung mit RTK- Inhibitoren und Tamoxifen auf die Apoptoserate der MCF-7 Zellen

In den nächsten Versuchen sollte untersucht werden, ob durch eine Kombinationsbehandlung mit RTK- Inhibitoren eine weitere Steigerung der Apoptoserate des Tamoxifens erreicht werden kann. Dabei zeigten sich interessante Effekte auf die MCF-7 Zellen.

Analog zu den vorhergehenden Ergebnissen konnte die apoptotische Wirkung des Tamoxifens durch AG 1478 und ZD 1839 weiter gesteigert werden. Es zeigten sich additive Effekte in der gleichzeitigen- kombinierten Behandlung der Zellen mit einem Antiöstrogen und einem der beiden RTK- Inhibitoren.

AG 1478 zeigte eine mit $p < 0,01$ statistisch signifikante Apoptoserate bei 715%, ZD 1839 eine mit $p < 0,001$ statistisch signifikante Apoptoserate mit 777%.

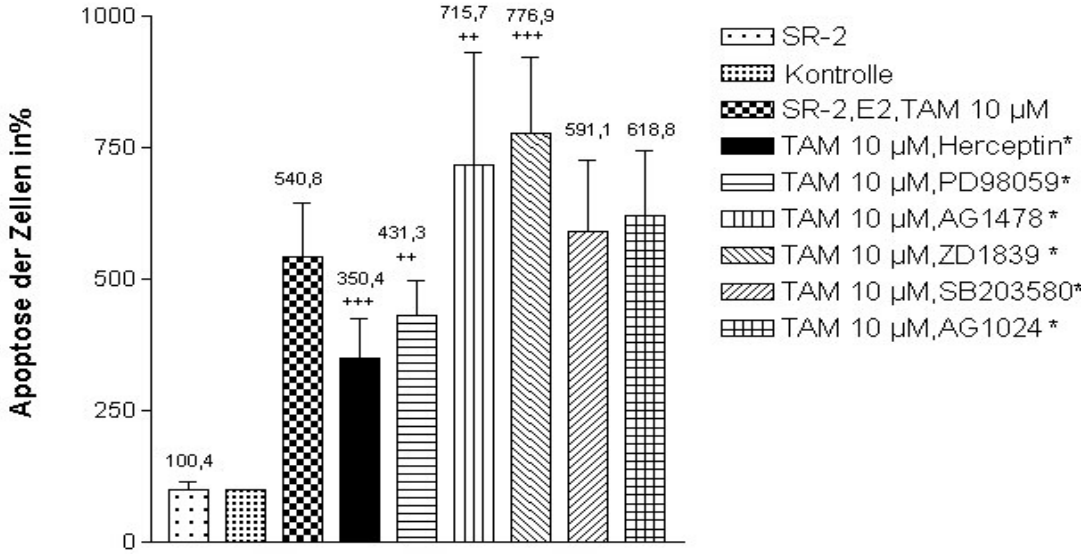

Abb.3.24: Effekte einer Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen und den einzelnen RTK- Inhibitoren auf die Apoptose; durch AG 1478 und ZD 1839 konnte die Apoptoserate statistisch signifikant gesteigert werden, durch Herceptin und PD 98059 wurde die Apoptoserate signifikant gesenkt. (* jeweils zusätzlich SR-2 und E2)

Interessant sind in dieser Graphik außerdem die Ergebnisse, die die Apoptose durch Herceptin und PD 98059 wiederspiegeln. Hier sieht man deutlich eine Erniedrigung der Zelltodrate, die mit $p < 0,001$ und $p < 0,01$ statistisch signifikant war. Interessante Ergebnisse werden im Folgenden genauer untersucht.

Die Stimulation der Zellen mit Tamoxifen oder ZD 1839 führte bereits ohne Kombination dieser Substanzen zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen (jeweils mit $p < 0,001$).

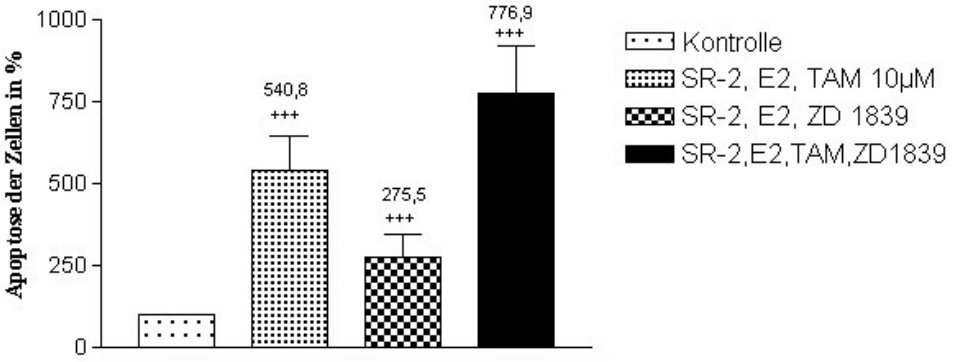

Abb.3.25: Effekte von Tamoxifen und ZD 1839 auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptose, in der Kombinationsbehandlung zeigte sich ein additiver Effekt beider Substanzen.

Tamoxifen wies dabei eine stärkere proapoptotische Wirkung als Iressa (ZD 1839) auf. Die Apoptose war im Vergleich fast doppelt so hoch, so dass dieses Ergebnis ebenfalls statistisch signifikant (+++) war.
Einen ähnlichen Effekt zeigte die Behandlung mit AG 1478.
Wie bereits zuvor erwähnt, konnten Tamoxifen und AG 1478 wiederum alleine die Anzahl der apoptotischen Zellen mit $p < 0,001$ statistisch signifikant erhöhen.
Analog zu dem vorherigen Diagramm zeigte sich auch bei der Behandlung der Zellen mit der Kombination von Tamoxifen und AG 1478 ein additiver Effekt auf die MCF-7 Zellen bezüglich der Apoptoserate, der hier allerdings wegen einer höheren Standardabweichung nur mit $p < 0,01$ statistisch signifikant war.

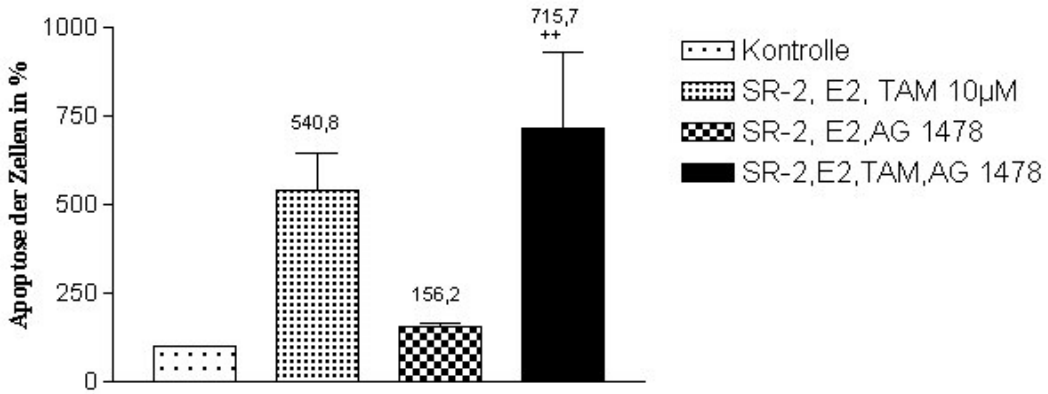

Abb.3.26: : Effekte von Tamoxifen und AG 1478 auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptose, in der Kombinationsbehandlung zeigte sich ein additiver Effekt beider Substanzen.

Überraschende Ergebnisse zeigte die Behandlung mit Herceptin und PD 98059. Durch die gemeinsame Stimulation der Zellen mit Tamoxifen und diesen Tyrosinkinaseinhibitoren wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen gesenkt.
Durch die Behandlung der Zellen mit PD 98059 konnte eine gesteigerte Apoptose gegenüber der Kontrollgruppe, mit $p < 0,05$ statistisch signifikant, gemessen werden (in dieser Abbildung nicht durch x gekennzeichnet). In Kombination mit Tamoxifen hingegen lag die Apoptoserate deutlich unter der, die die Behandlung mit dem Antiöstrogen allein bewirkte (mit $p < 0,01$ statistisch signifikant).

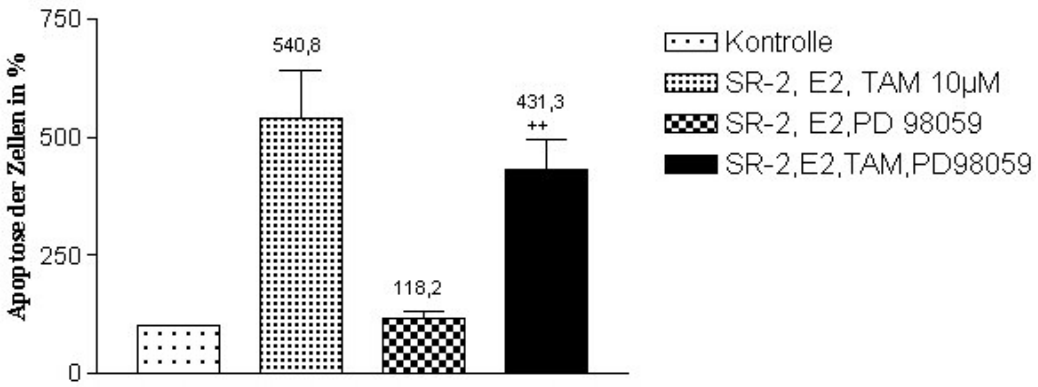

Abb.3.27: : Effekte von Tamoxifen und PD 98059 auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptose, allerdings zeigt sich in der Kombinationsbehandlung eine gegenüber der Behandlung der Zellen mit Tamoxifen alleine statistisch signifikant gesenkte Apoptoserate.

Die Behandlung mit Herceptin führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Obwohl die Stimulation mit Herceptin die Apoptose der Zellen leicht, aber ohne statistische Signifikanz, erhöhte, wurde zusammen mit dem Tamoxifen eine Verminderung der Apoptoserate erreicht, die, wie im folgenden Graphen dargestellt, trotz einer relativ hohen Standardabweichung mit $p < 0,001$ dreifach statistisch signifikant war.

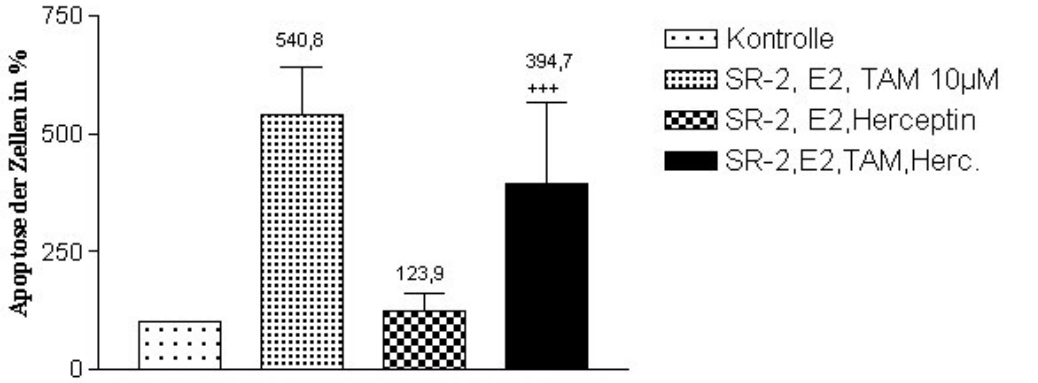

Abb.3.28: Effekte von Tamoxifen und Herceptin auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptose, allerdings zeigt sich in der Kombinationsbehandlung eine gegenüber der Behandlung der Zellen mit Tamoxifen alleine statistisch signifikant gesenkte Apoptoserate.

Auch bei der Verwendung der kleineren Tamoxifenkonzentration wird deutlich, dass AG 1478 und ZD 1839 in der Lage waren, die Apoptose zu steigern. Für AG 1478 zusammen mit Tamoxifen 1µM ergab sich mit $p < 0,05$ eine einfache, für ZD 1839 mit $p < 0,001$ eine dreifache statistische Signifikanz.

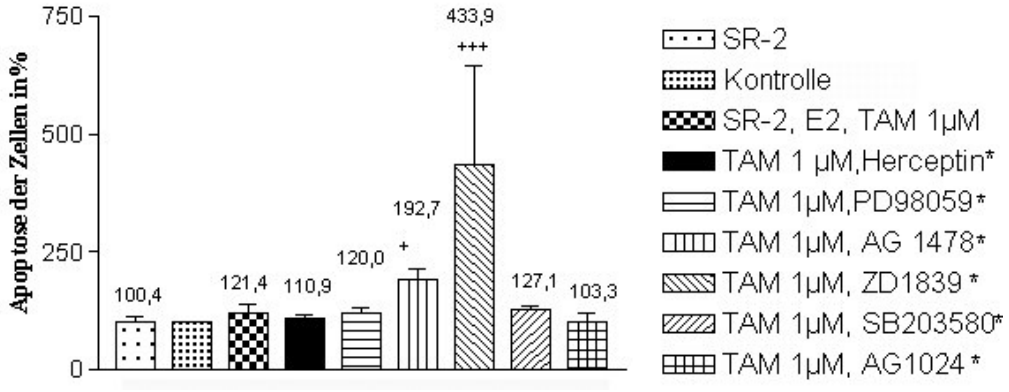

Abb.3.29: Effekte einer Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen 1µM und den einzelnen RTK- Inhibitoren auf die Apoptose; durch AG 1478 und ZD 1839 konnte die Apoptoserate statistisch signifikant gesteigert werden, bei dieser Tamoxifenkonzentration konnte eine durch Herceptin und PD 98059 gesenkte Apoptoserate nicht nachgewiesen werden. (* jeweils zusätzlich SR-2 und E2)

Um auszuschließen, dass es sich nur um die Wirkung einer Substanz auf die Zellen handelte und um die additive Wirkung zu verdeutlichen, werden die besonders interessanten Ergebnisse genauer betrachtet.

Es soll nochmals erwähnt werden, dass Tamoxifen in einer Konzentration von 1 µM die Zellen einfach statistisch signifikant zum programmierten Zelltod brachte (in dieser Abbildung nicht mit einem + gekennzeichnet). Iressa war ebenfalls in der Lage, diesen Zelltod mit $p < 0{,}001$ (+++) signifikant auszulösen. Die Kombination dieser beiden Substanzen wies wiederum, wie deutlich anhand der Balken in der Graphik nachzuvollziehen, einen additiven Effekt auf.

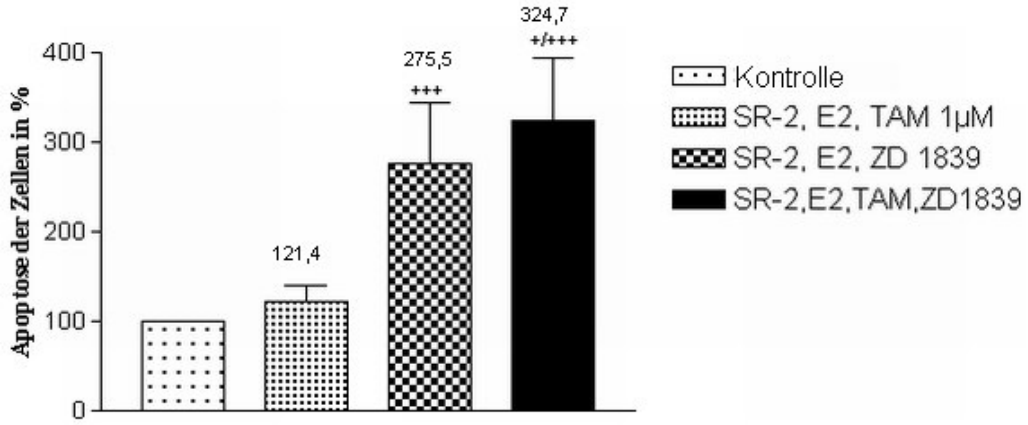

Abb.3.30: : Effekte von Tamoxifen 1µM und ZD 1839 auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptose, in der Kombinationsbehandlung zeigte sich ein additiver Effekt beider Substanzen. Die Kombinationsbehandlung ist auch gegenüber der einfachen Behandlung mit ZD 1839 statistisch signifikant (+).

Die nächste Abbildung zeigt äquivalent dazu die Ergebnisse von Tamoxifen in kleiner Konzentration und dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 1478. Dieser Inhibitor konnte bei den Zellen mit $p < 0{,}001$ statistisch signifikant den programmierten Zelltod induzieren. Mit AG 1478 zusammen konnte die Wirkung von Tamoxifen additiv auf 192% erhöht werden. Die Ergebnisse dafür waren ebenfalls mit $p < 0{,}001$ statistisch signifikant.

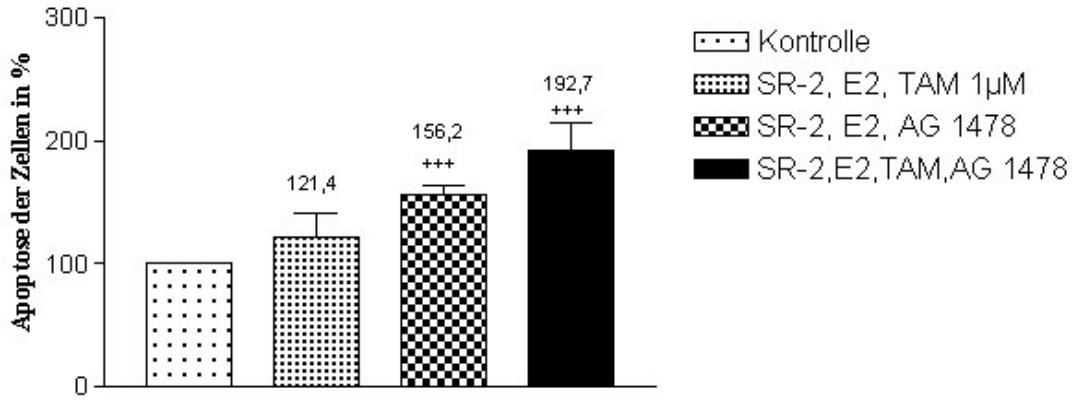

Abb.3.31: : Effekte von Tamoxifen 1µM und AG 1478 auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; einzelne Substanzen und die Kombinationsbehandlung bewirken jeweils eine statistisch signifikant gesteigerte Apoptoserate, in der Kombinationsbehandlung zeigte sich ein additiver Effekt beider Substanzen. Die Kombinationsbehandlung ist auch gegenüber der einfachen Behandlung mit AG 1478 statistisch signifikant (+).

4.2.6. Aufhebung des antiapoptotischen Effektes der Wachstumsfaktoren durch die RTK- Inhibitoren

In den nächsten Experimenten sollte untersucht werden, wie die Tyrosinkinaseinhibitoren die Effekte der Wachstumsfaktoren beeinflussen können. Dazu wurden die Zellen zusätzlich zu dem Östradiol und dem Tamoxifen mit einem Wachstumsfaktor und einem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt. Diese Versuche sollten außerdem überprüfen, ob eine Hemmung des RTK- und des Östrogenrezeptor- Signalweges gleichzeitig eine gesteigerte Apoptose der Zellen hervorrufen kann.

EGF

Bevor die Ergebnisse dargestellt werden, sollte nochmals erwähnt werden, dass EGF in den Versuchen zuvor in der Lage war, die apoptotische Wirkung des Tamoxifens negativ zu beeinflussen (in dieser Abbildung nicht mit + gekennzeichnet). Der Tyrosinkinaseinhibitor AG 1478 konnte diesem Effekt am ehesten entgegenwirken. Die anderen Inhibitoren waren nicht in der Lage, die antiapoptotische Wirkung des EGF statistisch signifikant aufzuheben.

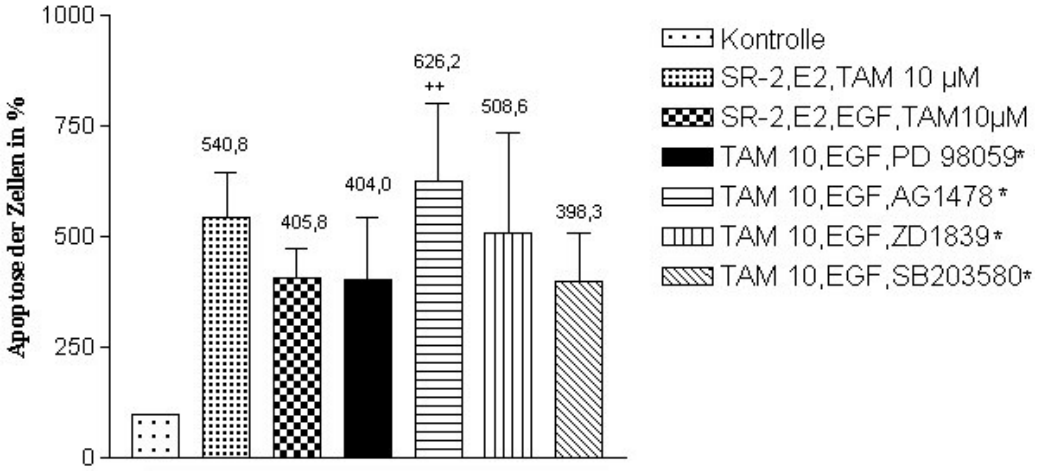

Abb.3.32: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die antiapoptotische Wirkung des EGF bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Tamoxifen; nur AG 1478 konnte die Wirkung von EGF vollständig 2-fach statistisch signifikant aufheben. Überraschend senkte SB 203580 die Apoptoserate, allerdings war dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant. (* + SR-2, E2)

In dem folgenden Graphen soll speziell die Wirkung des AG 1478 dargestellt werden. Es sind wiederum die Wirkung des Antiöstrogens, das eine starke Apoptose hervorgerufen hat und die Beeinflussung des Tamoxifens durch das

EGF, wodurch es zur einer Reduktion der Apoptose mit $p < 0,05$ kam (in dieser Abbildung nicht mit + gekennzeichnet), dargestellt. Der letzte Balken zeigt eine deutliche Steigerung der Apoptoserate auf 626% durch die Behandlung der MCF-7 Zellen zusätzlich mit dem Tyrosinkinaseinhibitor AG 1478. Es konnte durch eine gleichzeitige Stimulation die Wirkung des Wachstumsfaktors aufgehoben werden. Dieses Ergebnis ist mit $p < 0,01$ statistisch signifikant.

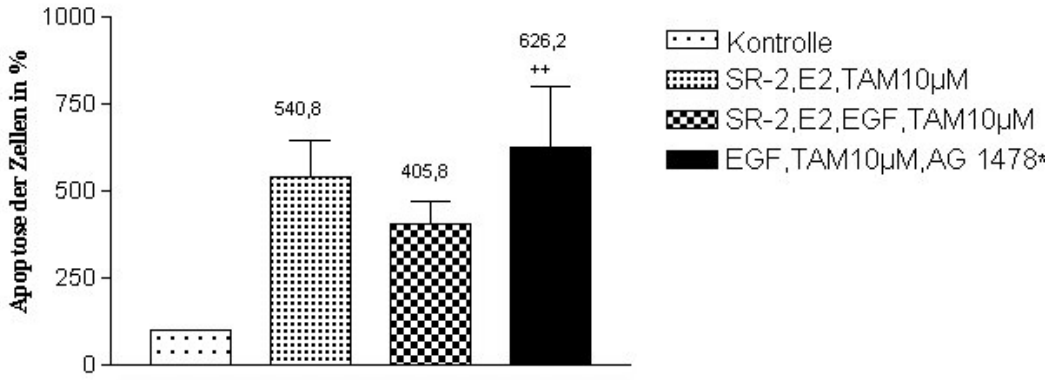

Abb.3.33: Aufhebung der antiapoptotischen Wirkung des EGF durch AG 1478; die Apoptoserate übersteigt dabei nicht signifikant die durch Tamoxifen allein ausgelöste Apoptose der MCF-7 Zellen. (* + SR-2, E2)

Die Abbildung, die die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen, EGF und ZD 1839 darstellt, zeigt ein ähnliches Ergebnis. Allerdings waren die Daten aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant. Eine Aufhebung der Wirkung des Wachstumsfaktors EGF durch den Tyrosinkinaseinhibitor Iressa kann deshalb nur vermutet werden.

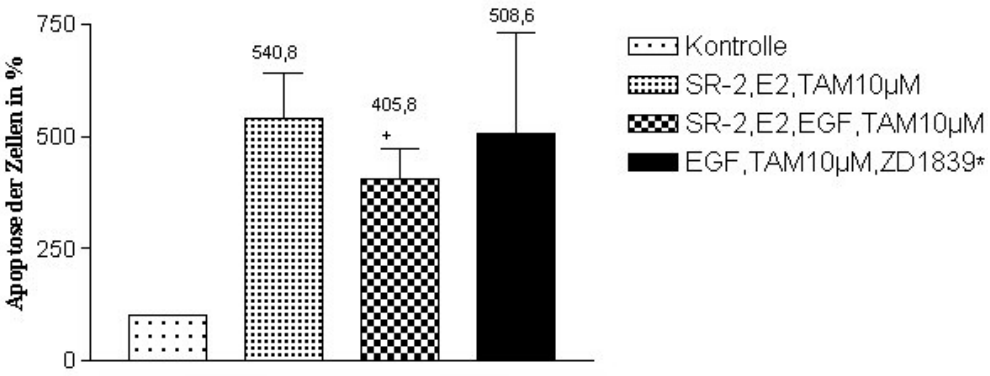

Abb.3.34: Aufhebung der antiapoptotischen Wirkung des EGF durch ZD 1839, die Ergebnisse sind aufgrund der hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant. (* + SR-2, E2)

Heregulin

Auch der Wachstumsfaktor Heregulin war in den vorherigen Versuchen in der Lage, die Wirkung des Tamoxifens zu beeinflussen. HRG konnte ebenfalls die Apoptoserate mit $p < 0,05$ statistisch signifikant senken. Aus Gründen der Übersichtlichkeit soll auch hier auf die Darstellung diesen Faktes durch + verzichtet werden. Bei einer zusätzlichen Behandlung der MCF-7 Zellen mit den Tyrosinkinaseinhibitoren zeigte sich nur bei SB 203580 ein statistisch signifikantes Ergebnis, wie aus der Graphik ersichtlich. SB 203580 war in der Lage, den antiapoptotischen Effekt des Heregulin statistisch signifikant aufzuheben.

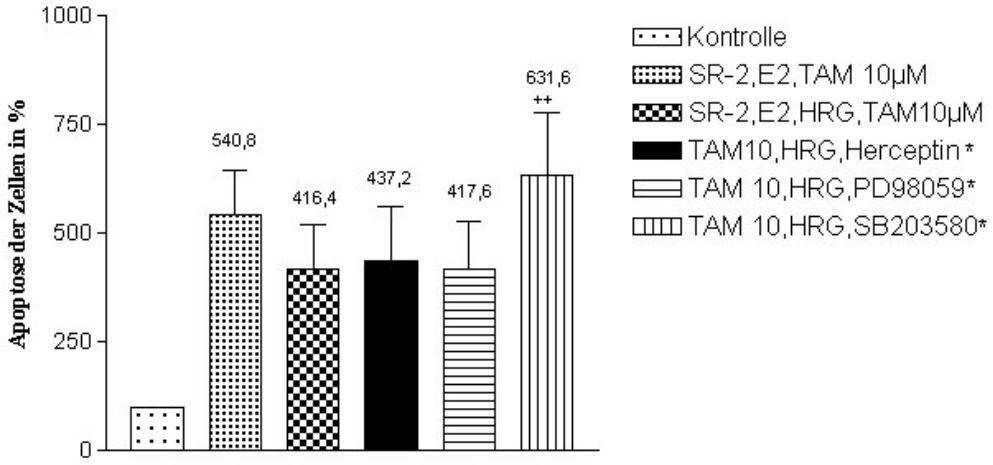

Abb.3.35: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die antiapoptotische Wirkung des HRG bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit TAM; nur SB203580 konnte die Wirkung des HRG aufheben. (* + SR-2, E2)

Die Ergebnisse waren für die Behandlung der MCF-7 Zellen mit Heregulin, Tamoxifen und dem RTK- Inhibitor SB 203580 mit $p < 0,01$ statistisch signifikant. In der folgenden Darstellung kann man sogar einen leichten Effekt darüber hinaus erkennen. Die Apoptoserate war mit 632% noch etwas höher, als die, die durch Tamoxifen allein (540,8%) verursacht wurde. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht statistisch signifikant.

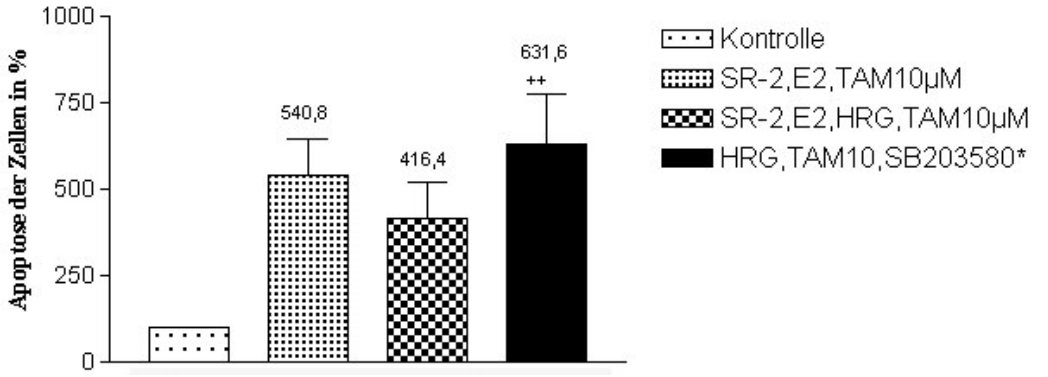

Abb.3.36: Aufhebung der antiapoptotischen Wirkung des HRG durch SB 203580; die Apoptoserate übersteigt dabei nicht signifikant die durch Tamoxifen allein ausgelöste Apoptose der MCF-7 Zellen. (* + SR-2, E2)

IGF

Weitere interessante Ergebnisse zeigten sich bei der Behandlung der MCF-7 Zellen mit dem Wachstumsfaktor IGF und den RTK- Inhibitoren, obwohl die Stimulation mit IGF alleine keine signifikanten Ergebnisse bei der Senkung der Apoptoserate hervorbrachte.

Wurden die Zellen zusätzlich zu Tamoxifen und IGF mit dem Tyrosinkinaseinhibitor PD 98059 behandelt, konnte die Zelltodrate statistisch signifikant auf 686% über die der Behandlung mit dem Antiöstrogen allein gesteigert werden. Bei den anderen Tyrosinkinaseinhibitoren konnten keine auffälligen Ergebnisse nachgewiesen werden.

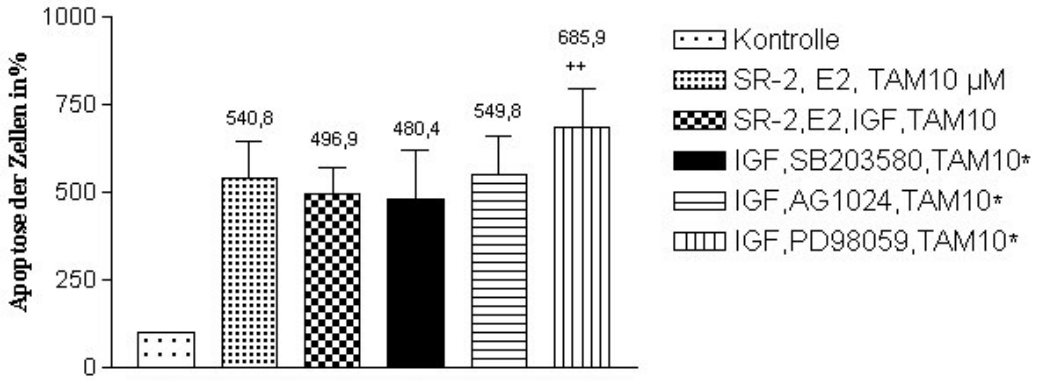

Abb.3.37: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die (nicht signifikante) antiapoptotische Wirkung des IGF bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit TAM; nur PD 98059 konnte die Wirkung des IGF aufheben und den apoptotischen Effekt des Tamoxifens darüber hinaus steigern. (* + SR-2, E2)

In der folgenden Graphik wird nochmals speziell auf die Wirkung des PD 98059 eingegangen. Dieser RTK- Inhibitor war in der Lage, die Apoptoserate von

Tamoxifen in kombinierter Behandlung mit IGF mit $p < 0,01$ (++) statistisch signifikant auf 686% zu erhöhen. Außerdem konnte PD 98059 die Zelltodrate über die der Behandlung mit Tamoxifen allein steigern. Dieses Ergebnis war mit $p < 0,05$ (+) statistisch signifikant und insofern sehr interessant, da Tamoxifen und PD 98059 ohne IGF eine im Vergleich zu Tamoxifen signifikant gesenkte Apoptoserate mit 431% aufwiesen. PD 98059 alleine konnte bei den MCF-7 Zellen eine mit 118% gesteigerte Apoptoserate verursachen (siehe auch Abb.3.23).

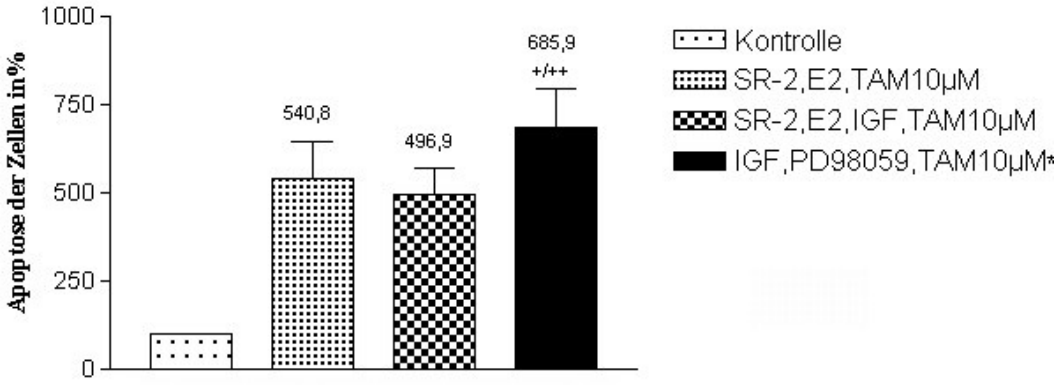

Abb.3.38: Aufhebung der antiapoptotischen Wirkung des IGF durch PD 98059; die Apoptoserate übersteigt dabei (+) signifikant die durch Tamoxifen allein ausgelöste Apoptose der MCF-7 Zellen. (* + SR-2, E2)

4.2.7. Effekte der RTK- Inhibitoren auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Proliferation

In unseren ersten Experimenten konnten wir nachweisen, dass die selektiven Östrogenrezeptormodulatoren nicht nur eine apoptotische sondern auch eine antiproliferative Wirkung aufweisen. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob diese antiproliferativen Effekte durch eine Hemmung der Tyrosinkinase- Signalwege gesteigert werden können.

In den Versuchen des Proliferationsassays (MTS) konnten sogar einige noch stärkere Effekte als im Cell Death Detection ELISA gesehen werden. In dem folgenden Diagramm ist dargestellt, dass die RTK- Inhibitoren PD 98059, AG 1478 und Iressa in der Lage waren, die Anzahl der lebenden Zellen mit $p < 0,001$ statistisch signifikant zu senken, wobei Iressa die stärkste Wirkung auf die MCF- 7 Zellen zeigte. Es konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit SR-2 und E2 (100%) eine erniedrigte Anzahl an lebenden Zellen mit ca. 60% gemessen werden. Auch SB 203580 zeigte mit $p < 0,05$ eine statistisch signifikant gesenkte Anzahl (85%) lebender Zellen.

Die Wirkung der beiden RTK- Inhibitoren Herceptin und AG 1024 war nur schwach und konnte deswegen mit keiner Signifikanz gemessen werden.

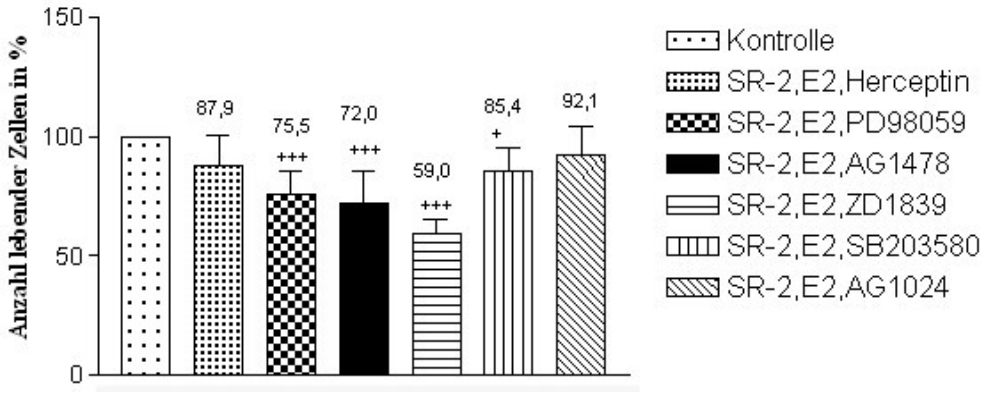

Abb.3.39: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation der MCF- 7 Zellen; für PD 98059, AG 1478, ZD 1839 und SB 203580 konnte eine statistisch signifikant gesenkte Proliferationsrate nachgewiesen werden.

4.2.8. Effekte einer Kombinationsbehandlung der RTK- Inhibitoren und Tamoxifen auf die MCF-7 Zellen in Hinblick auf die Proliferation

Bei der Behandlung der MCF- 7 Zellen mit Tamoxifen und den Tyrosinkinaseinhibitoren konnte mit Hilfe des MTS- Assays als indirekter Nachweis der Proliferation gezeigt werden, dass die Substanzen AG 1478 und ZD 1839 genauso wie sie die Apoptoseraten erhöhten, die Proliferationsraten senken konnten. In der folgenden Graphik ist dargestellt, dass beide Substanzen zusammen mit Tamoxifen die Zellzahl noch weiter erniedrigten. AG 1478 konnte zusammen mit dem Antiöstrogen die Anzahl der lebenden Zellen auf ca. 11,7% reduzieren. Im Vergleich dazu senkte Tamoxifen 10µM die Proliferation der Zellen auf 27,7%. ZD 1839 konnte in der Kombination mit Tamoxifen die Zellzahl sogar auf ca. 6% absenken. Beide Ergebnisse waren mit $p < 0,05$ (+) statistisch signifikant und zeigten zu den nachgewiesenen Apoptoseraten passende Ergebnisse.

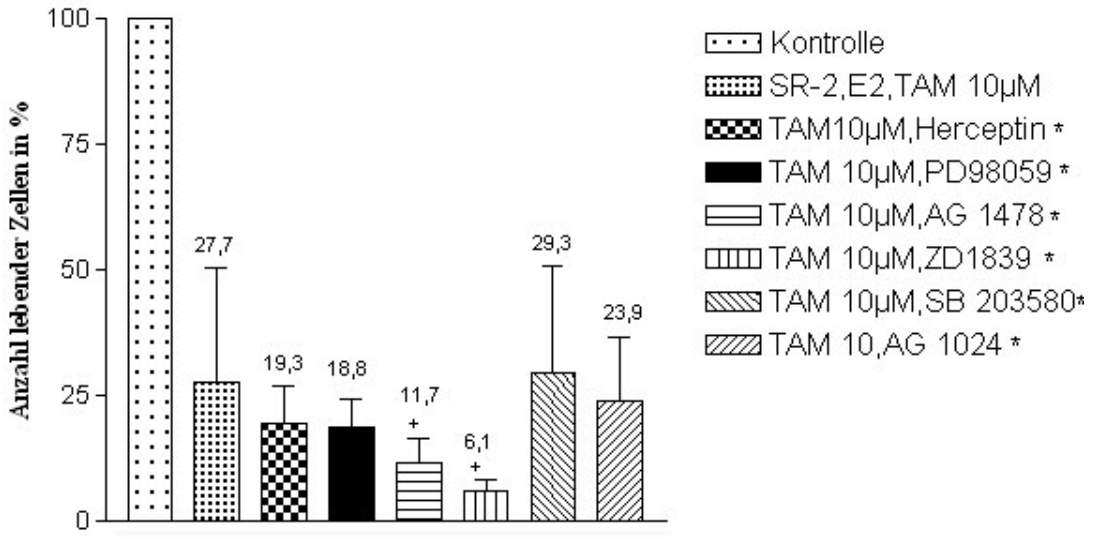

Abb.3.40: Effekte einer Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen 10µM und den RTK- Inhibitoren auf die Proliferation; durch AG 1478 und ZD 1839 konnte die bereits durch TAM signifikant gesenkte Proliferationsrate noch weiter statistisch signifikant gesenkt werden. (*+SR-2, E2)

Unter der Verwendung kleinerer Tamoxifenkonzentrationen wurden diese Ergebnisse sogar noch deutlicher. Für die beiden Tyrosinkinaseinhibitoren, AG 1478 und ZD 1839, wurde deutlich, wie stark sie in der Lage waren, die Wirkung des Tamoxifens zu verstärken. Bei der Behandlung der Zellen mit 1µM Tamoxifen ergab sich bezüglich der Erniedrigung der Proliferationsrate sogar ein stark statistisch signifikantes Ergebnis mit $p < 0,001$ (+++).

Die anderen RTK- Inhibitoren zeigten mit TAM 1µM keine signifikanten Ergebnisse.

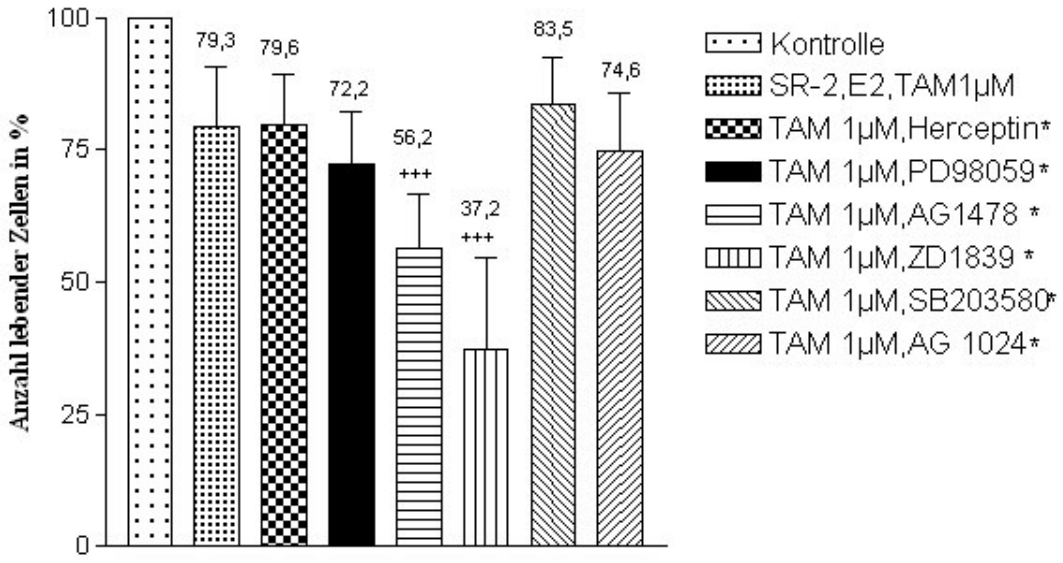

Abb.3.41: Effekte einer Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen 1µM und den RTK- Inhibitoren auf die Proliferation; durch AG 1478 und ZD 1839 konnte die bereits durch TAM signifikant gesenkte Proliferationsrate noch weiter statistisch signifikant gesenkt werden. (*+ SR-2, E2)

4.2.9. Effekte auf die zelluläre Proliferation durch eine gleichzeitige Behandlung der MCF-7 Zellen mit RTK- Inhibitoren, Wachstumsfaktoren und Tamoxifen

Eine Steigerung der Proliferationsrate der MCF-7 Zellen durch die Wachstumsfaktoren konnte nicht signifikant nachgewiesen werden (siehe Abb.3.16). Dennoch sollte mit den nächsten Versuchen untersucht werden, wie weit eine gleichzeitige Hemmung des RTK- Signalweges und die Hemmung des Östrogenrezeptorsignalweges unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu einer verminderten Proliferationsrate, analog zur gesteigerten Apoptoserate, führen kann.

EGF

Die folgende Graphik stellt die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen in einer Konzentration von 1µM, EGF und den Tyrosinkinaseinhibitoren dar. Auch wenn die Wirkung des Wachstumsfaktors im MTS- Assay nicht statistisch signifikant nachweisbar war (die Anzahl der lebenden Zellen konnte nur minimal erhöht werden), konnte gezeigt werden, dass nur ZD 1839, wenn die Zellen zusätzlich mit EGF behandelt wurden, zu einer Erniedrigung der Tumorzellzahl führte, mit $p < 0,001$ (+++) statistisch signifikant. Eine Reduktion der Zellzahl konnte für die

anderen RTK- Inhibitoren mit Hilfe diesen Assays nicht signifikant nachgewiesen werden, obwohl das Diagramm, eine Erniedrigung der Tumorzellzahl erahnen lässt.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war die Reaktion der Zellen auf die Behandlung mit Tamoxifen, EGF und SB 203580. Obwohl die Zellen mit diesem RTK- Inhibitor behandelt wurden, konnte die Anzahl der lebenden Zellen sogar auf über 100% gesteigert werden. Das bedeutet, dass die Wirkung des Tamoxifens komplett aufgehoben wurde, statistisch signifikant mit $p < 0{,}001$ (+++). Ebenso wurden die Effekte von EGF und Tamoxifen zusammen aufgehoben. Dieses Ergebnis war ebenfalls mit $p < 0{,}01$ (++) statistisch signifikant.

Dabei muss an dieser Stelle nochmals auf die Ergebnisse des Cell- Death- Detection- ELISA eingegangen werden. Die dazu korrelierenden Ergebnisse zeigen, wenn diese auch nicht signifikant waren, eine erniedrigte Apoptoserate bei der Behandlung der Zellen mit EGF, SB 203580 und Tamoxifen gegenüber einer Behandlung der Zellen mit EGF und Tamoxifen (siehe Abb.3.32).

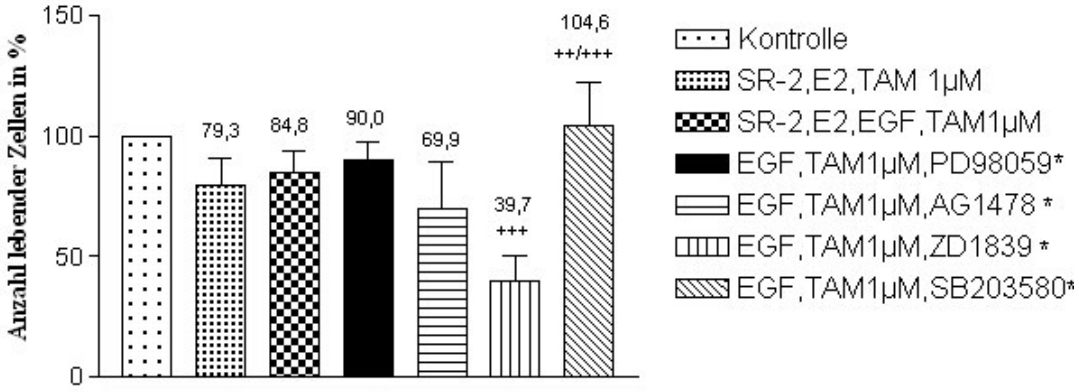

Abb.3.42: Effekte der RTK- Inhibitoren bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit EGF und Tamoxifen 1µM; nur ZD 1839 konnte die nicht signifikante proliferative Wirkung von EGF statistisch signifikant aufheben. Überraschend steigerte SB 203580 die Proliferationsrate statistisch signifikant gegenüber einer Behandlung mit Tamoxifen alleine (+++) und einer Behandlung mit Tamoxifen und EGF (++). (* + SR-2, E2)

Die Behandlung der Zellen mit Tamoxifen in einer Konzentration von 10 µM, EGF und den RTK- Inhibitoren ergab ähnliche Ergebnisse. Allerdings waren diese nicht statistisch signifikant, da die Daten eine zu hohe Standardabweichung aufwiesen.

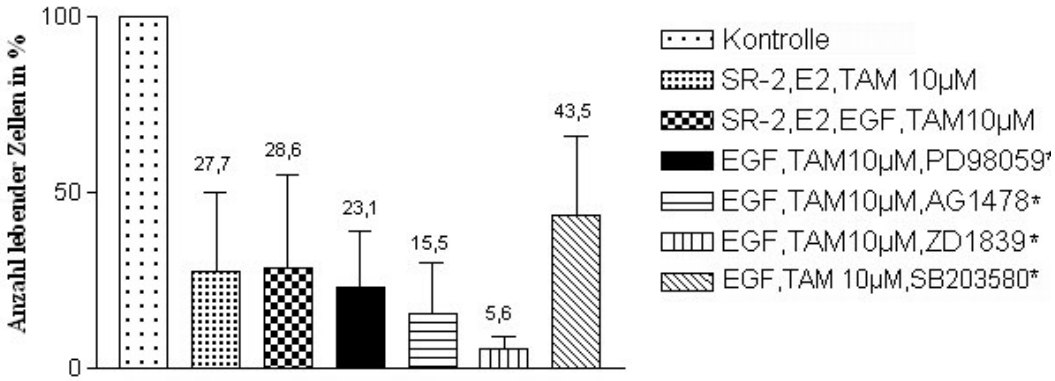

Abb.3.43: Effekte der RTK- Inhibitoren bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit EGF und Tamoxifen 10 µM; es konnten gegenüber einer Behandlung der Zellen mit Tamoxifen 10 µM keine statistisch signifikanten Ergebnisse erhoben werden, obwohl starke antiproliferative Effekte, insbesondere durch AG 1478 und ZD 1839, zu erkennen sind. (* + SR-2, E2)

Heregulin

Für die Behandlung der MCF-7 Zellen mit dem SERM Tamoxifen und den Wachstumsfaktoren Heregulin und IGF seien hier nur exemplarisch die Daten für die höchste Tamoxifenkonzentration, 10 µM, dargestellt. Es konnte eine deutliche Verminderung der Zellzahl bei der Behandlung mit einem Antiöstrogen, jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis zur Verstärkung diesen Effektes durch die RTK- Inhibitoren nachgewiesen werden. Heregulin konnte die antiproliferativen Effekte des Tamoxifens nicht aufheben.

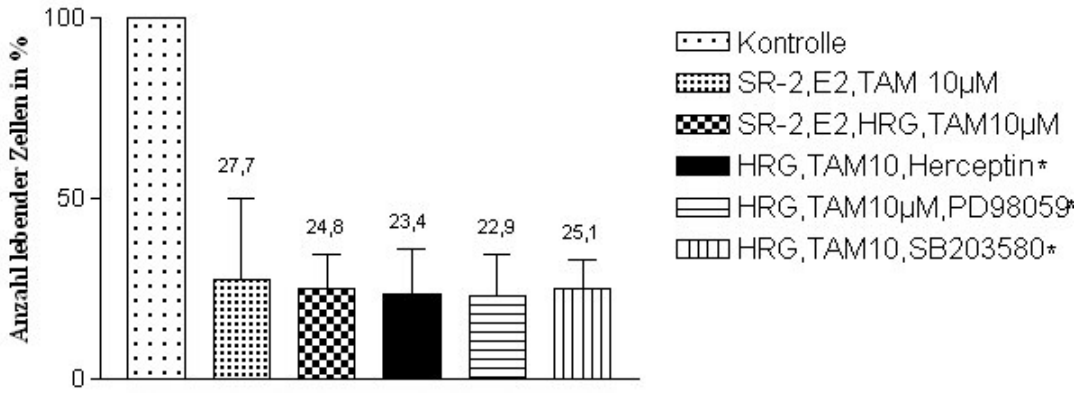

Abb.3.44: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation der mit Tamoxifen 10µM und HRG behandelten Zellen; die Ergebnisse waren bis auf die Apoptoserate an sich nicht statistisch signifikant. (* + SR-2, E2)

IGF

Auch die Behandlung der mit Tamoxifen und IGF behandelten MCF-7 Zellen mit einem Tyrosinkinaseinhibitor bewirkte keine weitere statistisch signifikante Erniedrigung der Proliferationsrate. IGF konnte bei gleichzeitiger Behandlung mit Tamoxifen die Proliferationsrate ebenfalls nicht erhöhen.

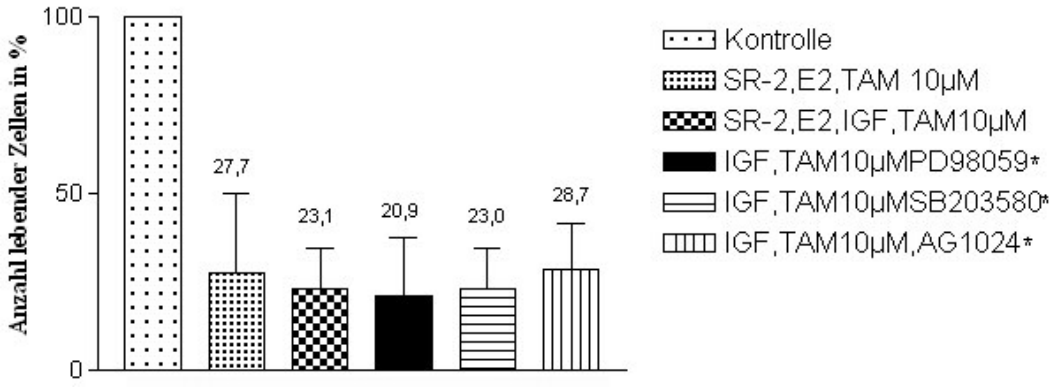

Abb.3.45: Effekte der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation der mit Tamoxifen 10µM und IGF behandelten Zellen; die Ergebnisse waren bis auf die Apoptoserate an sich nicht statistisch signifikant. (* + SR-2, E2)

4.3. Effekte der Lösungsmittel der einzelnen Substanzen auf die Zelllinien

Gemeinsam mit den eigentlichen Experimenten führten wir Versuche mit den Lösungsmitteln aller Substanzen durch, um herauszufinden, welche Auswirkungen auf die Apoptoserate und die Proliferationsrate durch die Lösungsmittel verursacht wurden. Die folgende Zusammenfassung zeigt, dass die hauptsächlichen apoptotischen und antiproliferativen Effekte durch die RTK- Inhibitoren und die Antiöstrogene hervorgerufen wurden.

4.3.1. Effekte der Lösungsmittel von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die MDA-MB- 231 Zellen

Zuerst sollen die Lösungsmittelkontrollen für Tamoxifen und ICI 182, 780 dargestellt werden. Beide Substanzen wurden in Ethanol gelöst.

Für die MDA- MB- 231 Zellen konnte beim MTS- Assay, wie die Abbildung zeigt, keine statistisch signifikante Wirkung des Lösungsmittels Ethanol in den beiden höchsten Konzentrationen 1% und 0,1% nachgewiesen werden.

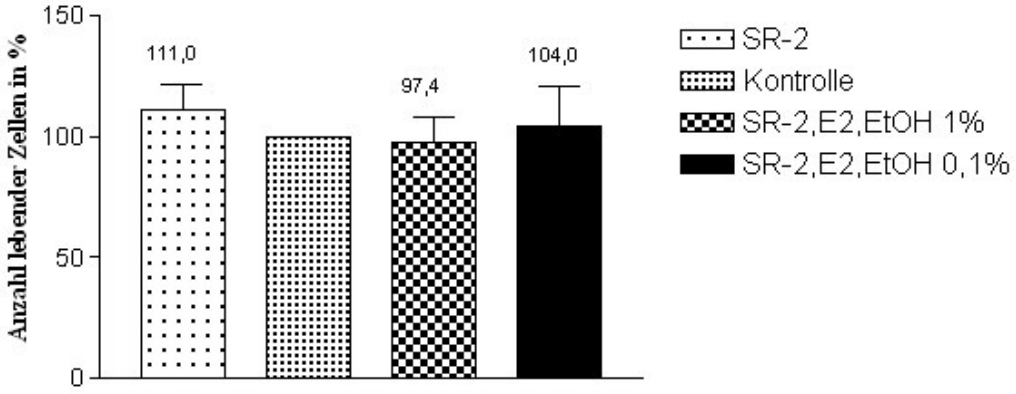

Abb.3.46: Effekte des Lösungsmittels von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Proliferation der MDA- MB- 231 Zellen; Ethanol in der höchsten Konzentration lässt einen leichten aber nicht statistisch signifikanten antiproliferativen Effekt erahnen, in der kleineren Konzentration kann man eher einen proliferativen Effekt vermuten. Beide Effekte waren nicht statistisch signifikant.

Es kam ebenfalls zu keinerlei Erhöhung der Apoptoserate der MDA- MB- 231 Zellen unter dem Einfluss der beiden höchsten Konzentrationen des Lösungsmittels von Tamoxifen und ICI 182, 780 im Cell Death Detection ELISA.

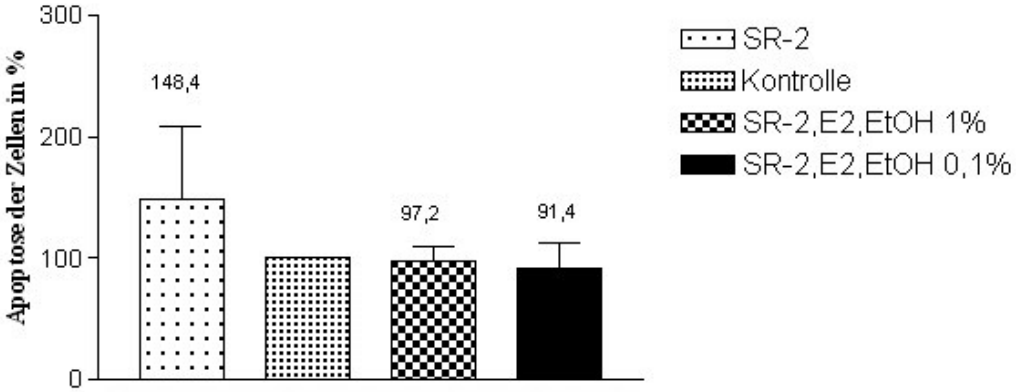

Abb.3.47: Effekte des Lösungsmittels von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Apoptose der MDA-MB- 231 Zellen ; es zeigten sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse, allerdings kann man eine gesteigerte Apoptoserate der Zellen, die nur mit SR-2 behandelt wurden, erahnen.

4.3.2. Effekte der Lösungsmittel aller Substanzen auf die Proliferation der MCF-7 Zellen

Bei den MCF- 7 Zellen konnte die Anzahl der lebenden Zellen ebenfalls nicht durch die alleinige Behandlung mit den Lösungsmitteln reduziert werden.

Lösungsmittel von Tamoxifen und Faslodex

Die Zellen reagierten, wie aus der Graphik ersichtlich, weder auf die 1%ige noch auf die 0,1%ige Lösung mit Ethanol.

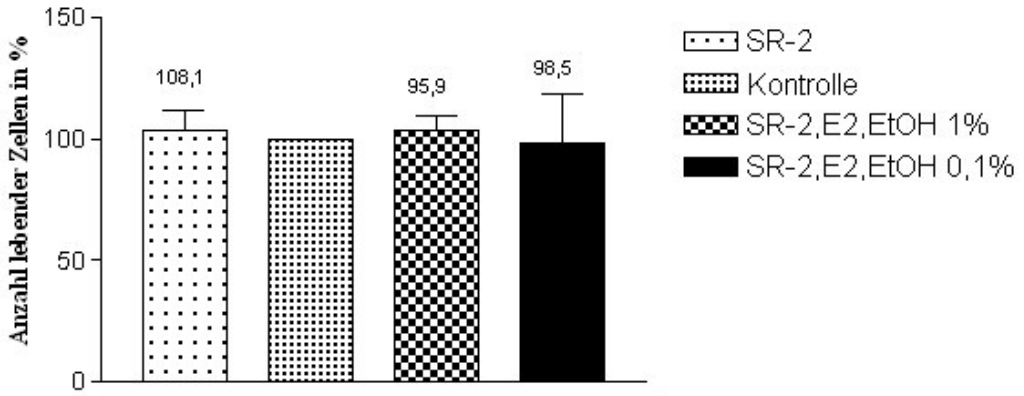

Abb.3.48: Effekte des Lösungsmittels von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Proliferation der MCF-7 Zellen; es konnten keine statistisch signifikanten antiproliferativen Effekte nachgewiesen werden.

Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren

Weiterhin zeigten sich für die Kontrollen der Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren keine statistisch signifikanten Effekte auf die MCF-7 Zellen, obgleich Wasser (H_2O), das Lösungsmittel von EGF und Östradiol, zu einer leichten Senkung der Zellzahl und das Lösungsmittel von Heregulin (PBS) eher zu einer leichten Erhöhung der Zellzahl führte.

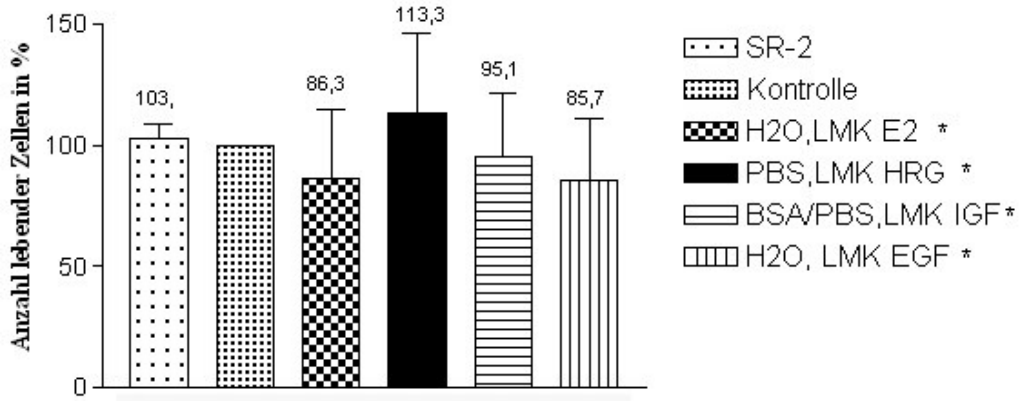

Abb.3.49: Effekte der Lösungsmittel von E2, HRG, IGF und EGF auf die Proliferation der MCF-7 Zellen ohne Zusatz von E2; es konnten keine statistisch signifikanten (anti-) proliferativen Effekte nachgewiesen werden, obwohl die Behandlung der Zellen mit H_2O zu einer erniedrigten Proliferationsrate führte. (* + SR-2)

Wurde dem Grundmedium, wie in den Hauptversuchen, Östradiol hinzugefügt, waren die Unterschiede bei der Behandlung der MCF-7 Zellen mit den Lösungsmitteln nicht mehr nachvollziehbar, wie die folgende Abbildung darstellen soll. Die Lösungsmittel hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Proliferationsrate der MCF-7 Zellen.

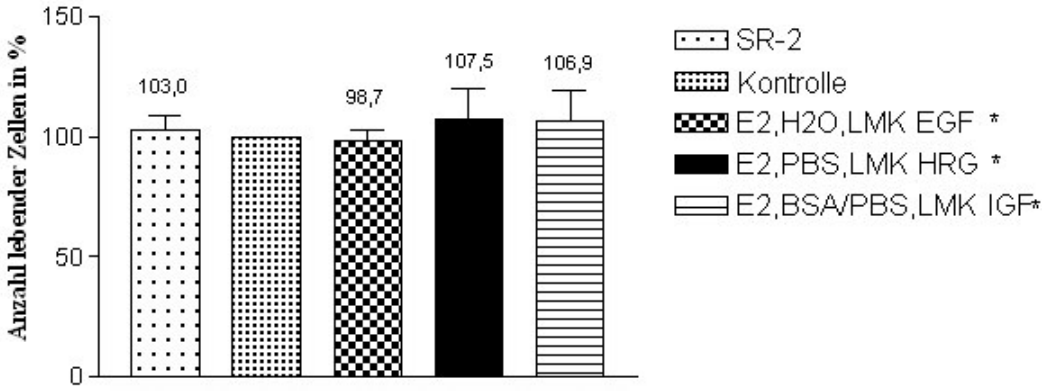

Abb.3.50: Effekte der Lösungsmittel von HRG, IGF und EGF auf die Proliferation der MCF-7 Zellen mit Zusatz von E2; es konnten keine statistisch signifikanten (anti-) proliferativen Effekte nachgewiesen werden. Bei den Lösungsmittelkontrollen von HRG und IGF kann man einen proliferativen Effekt erahnen. (* + SR-2)

Kombination der Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren und des Tamoxifens

Wurde zusätzlich zu den Lösungsmitteln der Wachstumsfaktoren (analog zu den Hauptversuchen) das Lösungsmittel des Tamoxifens, Ethanol, in der entsprechenden Konzentration zugesetzt, konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Veränderung des Zellwachstums nachgewiesen werden.

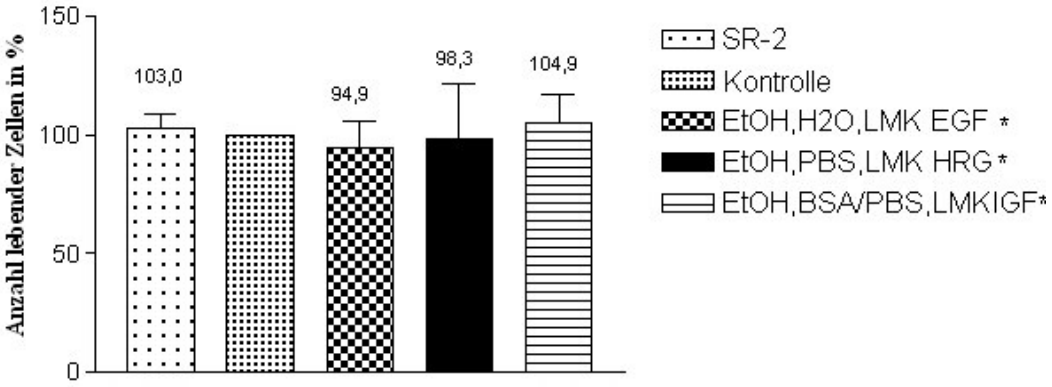

Abb.3.51:Effekte der Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren und des Tamoxifens auf die Proliferationsrate der MCF-7 Zellen; es zeigte sich keine statistisch signifikant veränderte Proliferationsrate. (* + SR-2, E2)

Lösungsmittel der Tyrosinkinaseinhibitoren

Anschließend wurde die Wirkung der Lösungsmittel der Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht. Fast alle der Inhibitoren lagen in DMSO gelöst vor, so dass die Zellen wiederum nur mit den entsprechenden Konzentrationen behandelt wurden. Als Lösungsmittel von ZD 1839 wurde allerdings HCl verwendet, das, wie aus der Abbildung erkennbar, den größten Effekt auf die Zellen aufwies. Allerdings führte keines der Lösungsmittel zu einer signifikanten Veränderung der Zellzahl.

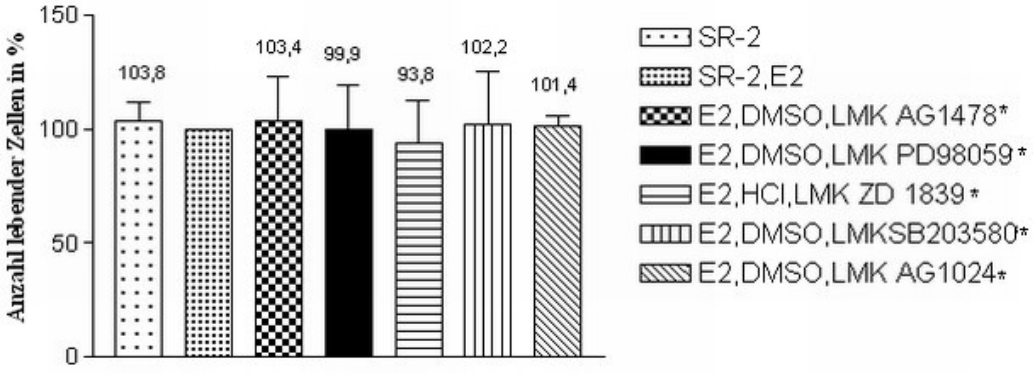

Abb.3.52: Effekte der Lösungsmittel der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation der MCF-7 Zellen; es ließ sich keine statistisch signifikante Veränderung der Proliferationsrate messen. (* + SR-2)

Lösungsmittel der Tyrosinkinaseinhibitoren und des Tamoxifens in Kombination

Analog zu den Hauptversuchen wurden die Zellen nun zusätzlich noch mit Ethanol, dem Lösungsmittel von Tamoxifen behandelt, um eine eventuelle Potenzierung der Lösungsmittelwirkung auszuschließen. Auch bei diesen Versuchen konnten keine statistisch signifikanten Effekte gemessen werden.

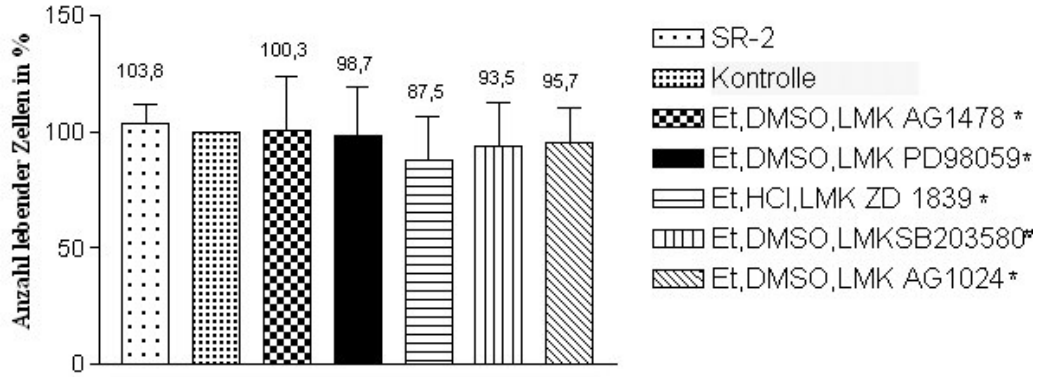

Abb.3.53: Effekte der Lösungsmittel der RTK- Inhibitoren und des Tamoxifens auf die Proliferation der MCF-7 Zellen; nur bei der Lösungsmittelkombination aus HCl und Ethanol lässt sich ein geringer antiproliferativer Effekt erahnen, der nicht statistisch signifikant ist. (Et= Ethanol; * + SR-2, E2)

4.3.3. Effekte der Lösungsmittel aller Substanzen auf die Apoptose der MCF-7 Zellen

Die bisher dargestellten Ergebnisse wurden mit dem MTS- Assay als indirekten Nachweis für die Proliferation ermittelt. Um die Wirkungen der Lösungsmittel auf die Apoptoserate darzustellen, wurden der CDDE durchgeführt.

Lösungsmittel von Tamoxifen und Faslodex

Bei der Behandlung der Zellen mit Ethanol konnte keine signifikante Steigerung des programmierten Zelltodes gemessen werden. Die folgende Abbildung stellt dieses Ergebnis dar.

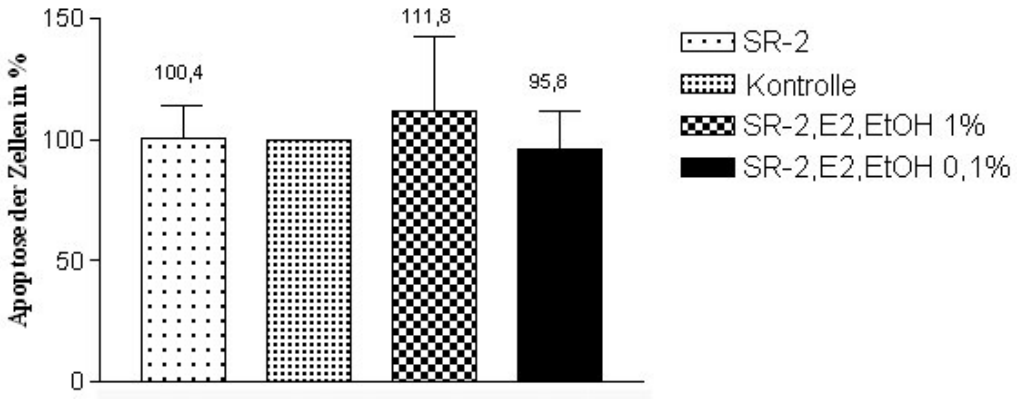

Abb.3.54: Effekte des Lösungsmittels von Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Apoptoserate der MCF-7 Zellen; es konnten keine statistisch signifikanten apoptotischen Effekte nachgewiesen werden, obgleich bei der höchsten Ethanolkonzentration die Apoptose auf 111,8% angestiegen ist.

Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren

Die Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren im östrogenfreien Medium führten ebenfalls zu keiner statistisch signifikanten Erhöhung der Apoptoserate.

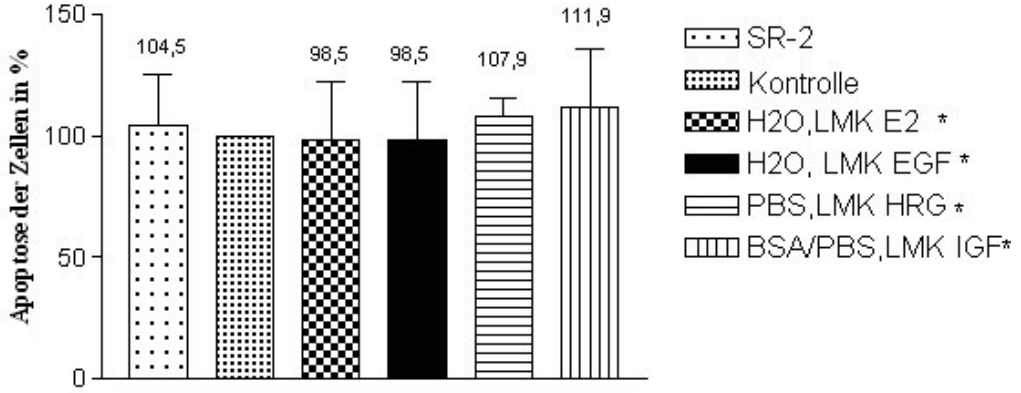

Abb.3.55: Effekte der Lösungsmittel von E2, HRG, IGF und EGF auf die Apoptose der MCF-7 Zellen ohne Zusatz von E2; es konnten keine statistisch signifikanten apoptotischen Effekte nachgewiesen werden, obwohl die Behandlung der Zellen mit den Lösungsmitteln von HRG und IGF zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate führte. (* + SR-2)

Auch bei der Behandlung der Zellen mit den Lösungsmitteln der Wachstumsfaktoren im östrogenhaltigen Medium kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, wie die nächste Abbildung darstellt.

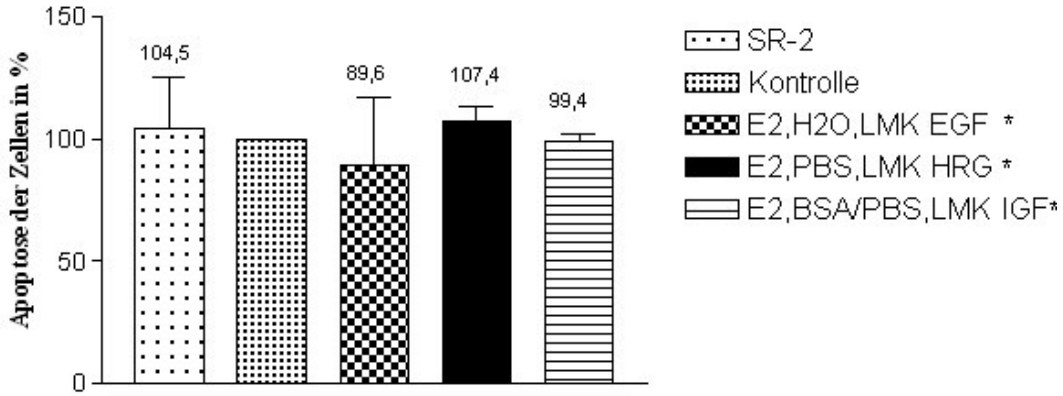

Abb.3.56: Effekte der Lösungsmittel von HRG, IGF und EGF auf die Apoptose der MCF-7 Zellen mit Zusatz von E2; es konnten keine statistisch signifikanten apoptotischen Effekte nachgewiesen werden. Bei der Lösungsmittelkontrolle von HRG kann man einen leichten apoptotischen Effekt erahnen. (* + SR-2)

Kombination der Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren und des Tamoxifens

Bei der Erweiterung der Zellansätze um Ethanol in der höchsten Konzentration zeigte sich eine Erhöhung der Zelltodraten. Für die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel von EGF (H_2O) und Ethanol ergab sich eine Apoptoserate von ca. 140%, die zwar mit $p < 0,05$ (+) statistisch signifikant war, jedoch weit unter den Apoptosewerten der Behandlung mit Tamoxifen (ca. 500 %) lag.

Auch die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel für IGF (BSA/ PBS) und Ethanol führte zu einer Erhöhung der Zelltodrate, die bei einem Wert von 166 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) mit $p < 0,01$ statistisch signifikant war, aber nicht so hoch lag wie die Apoptoserate der Zellen, die mit Tamoxifen und IGF behandelt wurden.

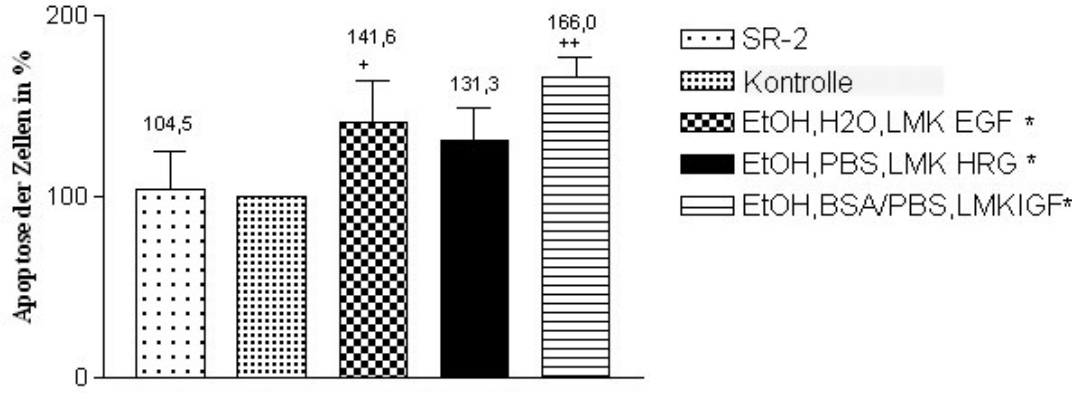

Abb.3.57: Effekte der Lösungsmittel der Wachstumsfaktoren und des Tamoxifens auf die Apoptoserate der MCF-7 Zellen; es zeigte sich eine mit 141,6% erhöhte Apoptoserate bei der Behandlung der Zellen mit Ethanol und dem Lösungsmittel des EGF sowie eine mit 166% erhöhte Apoptoserate bei der Behandlung der Zellen mit Ethanol und dem Lösungsmittel von IGF, beide Werte statistisch signifikant. (* + SR-2, E2)

Die Wirkung mehrerer Lösungsmittel zusammen konnte also zu einem gesteigerten Zelltod führen. Allerdings waren diese Effekte signifikant niedriger als die Effekte der Wachstumsfaktoren und dem Antiöstrogen, so dass eine starke Wirkung der Lösungsmittel ausgeschlossen werden konnte.

Lösungsmittel der Tyrosinkinaseinhibitoren

Analog zu den Ergebnissen des MTS- Assay zeigten sich bei der Stimulation der Zellen mit dem DMSO, dem Lösungsmittel der meisten Tyrosinkinaseinhibitoren, keine signifikant erhöhten Apoptoseraten. Eine Ausnahme stellte die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel für ZD 1839 (HCl) dar. Salzsäure konnte mit $p < 0,05$ statistisch signifikant die Apoptose der Zellen auf 173% steigern. Dieses ist in der folgenden Abbildung dargestellt und wird später noch einmal genauer untersucht.

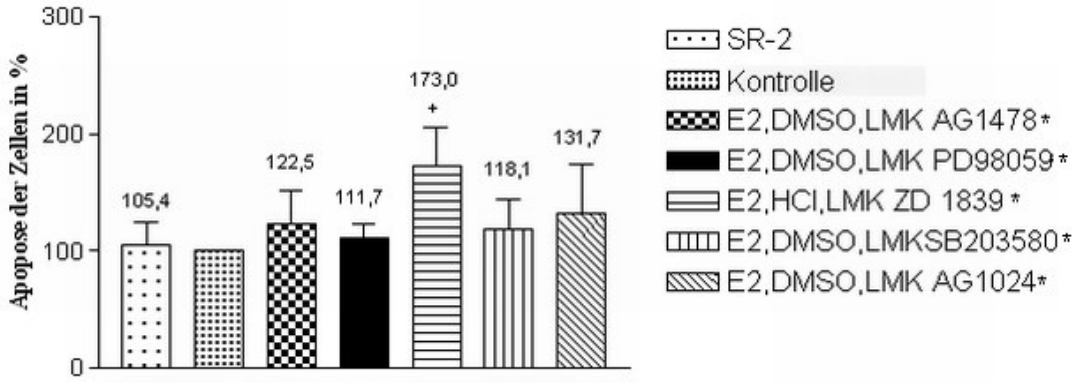

Abb.3.58: Effekte der Lösungsmittel der RTK- Inhibitoren auf die Apoptose der MCF-7; die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel von ZD 1839 führte zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate mit 173%. Dieses Ergebnis wird in Abb.3.60 genauer betrachtet. (* + SR-2)

Lösungsmittel der Tyrosinkinaseinhibitoren und des Tamoxifens in Kombination

Um die Lösungsmittelkontrollen zu vervollständigen, wurden die MCF-7 Zellen zusätzlich mit Ethanol (Lösungsmittel von Tamoxifen) behandelt. Hier zeigten sich leicht erhöhte Zelltodraten, die mit $p < 0,05$ bei den Lösungsmitteln von PD 98059, ZD 1839, SB 203580 und AG 1024 signifikant waren. Auch bei diesen Ergebnissen konnte die Apoptoserate nicht über 145 % gesteigert werden, so dass auch hier wieder davon ausgegangen werden muss, dass die Wirkung der Lösungsmittel zusammen keinen Einfluss auf die gesamten Ergebnisse hatte.

Weiterhin ist zu bedenken, dass stets die höchste Ethanolkonzentration von 1% verwendet wurde, obwohl die Ethanolkonzentration während der Hauptversuche tatsächlich meistens unter der genannten Konzentration gelegen hat.

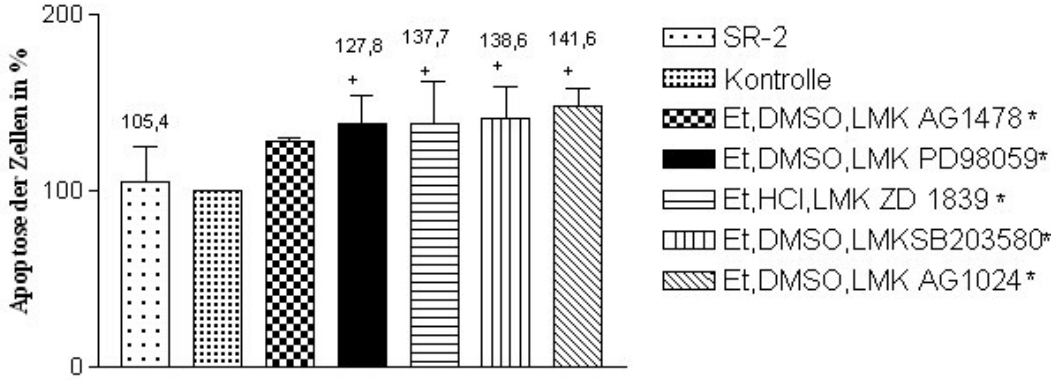

Abb.3.59: Effekte der Lösungsmittel der RTK- Inhibitoren und des Tamoxifens, auf die Apoptose der MCF-7 Zellen; die Lösungsmittel von PD 98059, ZD 1839, SB 203580 und AG 1024 zusammen mit Ethanol waren in der Lage eine geringe aber statistisch signifikante Steigerung der Apoptoserate zu bewirken. (Et= Ethanol; * + SR-2, E2)

Exemplarisch soll in der folgenden Grafik nochmals das Verhalten von ZD 1839, Tamoxifen und den dazugehörigen Lösungsmittelkontrollen dargestellt werden. Wie in dem folgenden Diagramm erkennbar, war die Apoptoserate von 605,1% durch Tamoxifen und ZD 1839 mit $p < 0,001$ statistisch signifikant gegenüber den anderen Ergebnissen.

Die Lösungsmittelkontrollen wiesen zwar, wie oben gezeigt, signifikante Effekte auf die Apoptoserate gegenüber der Kontrollegruppe auf (dieses wird aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit + dargestellt), jedoch führte die Behandlung der Zellen mit ZD 1839 zu stark erhöhten Apoptoseraten, die gegenüber den Lösungsmittelkontrollen mit $p < 0,01$ statistisch signifikant waren, so dass, wie oben angenommen, davon ausgegangen werden kann, dass die Wirkungen der Lösungsmittel keinen großen Einfluss auf die vorliegenden Ergebnisse hatten.

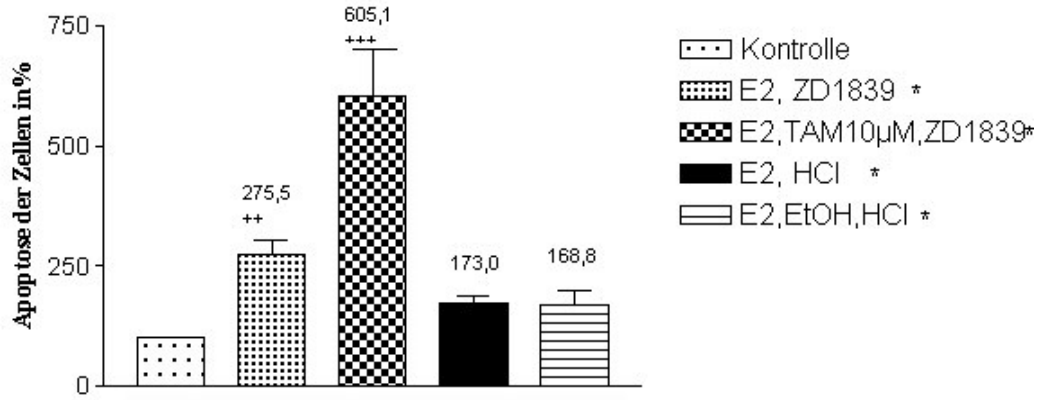

Abb.3.60: Vergleich der Apoptoseraten der mit Tamoxifen und ZD 1839 sowie deren Lösungsmittel behandelten MCF-7 Zellen. Die Lösungsmittel führten zwar zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate, die allerdings nicht so hoch war, wie die Apoptose, die durch ZD 1839 oder Tamoxifen verursacht wurde. (* + SR-2)

4.4. Nachweis der Apoptose mit Hilfe des Western blotting Verfahrens am Beispiel der Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen, EGF und ZD 1839

Um die bisher gezeigten Ergebnisse auch mit einer weiteren Methode nachzuweisen, wurden bei den MCF-7 Zellen für einige Versuchsreihen Western blots durchgeführt. Diese bestätigten im Wesentlichen unsere zuvor erhobenen Daten. Stellvertretend seien hier die Ergebnisse für die Behandlung der Zellen mit EGF, Tamoxifen und dem Tyrosinkinaseinhibitor ZD 1839 dargestellt.

Die Banden, die mit 89 kD gekennzeichnet sind, stellen den Nachweis der

Apoptose m. H. des Anti- PARP- AK dar. Diese Banden traten nur nach Behandlung der Zellen mit Tamoxifen, dem partiellem Östrogenrezeptorantagonisten auf. Man erkennt diese Banden an Position 3, 7, 13, 14,18.

Für die Lösungsmittel konnte m. H. des Western blotting Verfahren keine Apoptose nachgewiesen werden. Dieses betrifft sowohl das Lösungsmittel von Tamoxifen (Ethanol) sowie die Lösungsmittel von EGF (H_2O) und ZD 1839 (HCl).

Weiterhin kann man aus der Abbildung entnehmen, dass die Banden, die die Behandlung der Zellen mit ZD 1839 (bzw. seinem Lösungsmittel) und Tamoxifen (Bande 13 und 14) darstellen, an der 89 kD Position viel deutlicher zu erkennen sind, was vermuten lässt, dass die Apoptoseraten bei diesen behandelten Zellen höher waren.

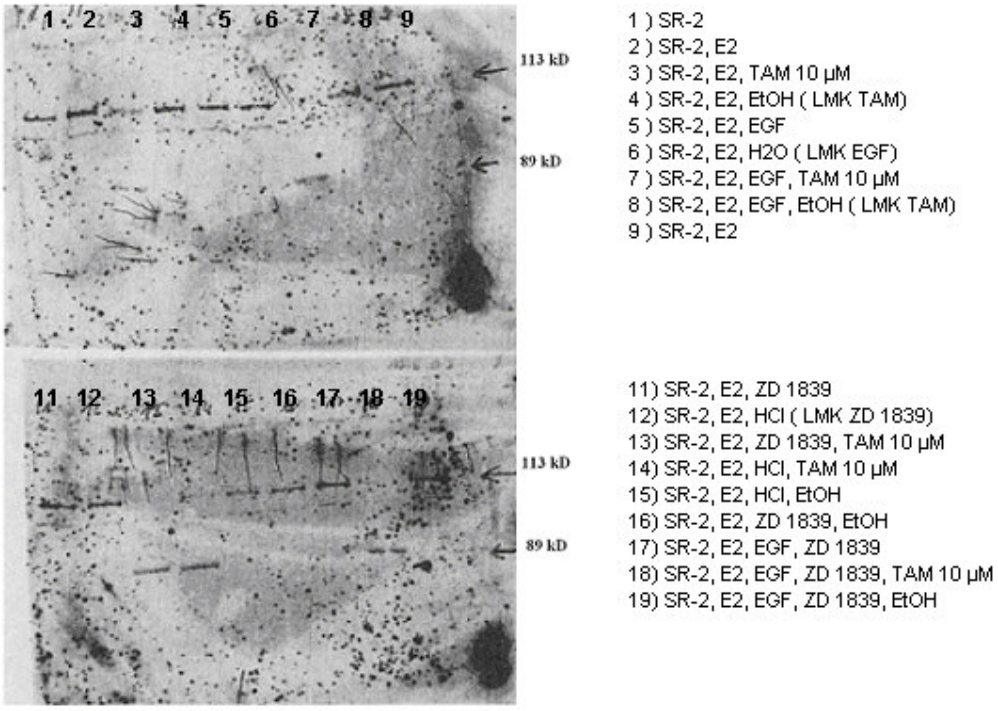

Abb.3.61: Nachweis der Apoptose im Western blot Verfahren. Die 89 kD Bande weist die Apoptose der behandelten Zellen nach, zu erkennen an Position 3, 7, 13, 14, 18- zusammengefasst bei Zellen, die mit Tamoxifen behandelt wurden.

5. Diskussion

Noch immer sind die Ergebnisse der antihormonellen Therapie in der Behandlung des Mammakarzinoms nicht vollkommend zufriedenstellend, obwohl es durch die Einführung der Behandlung mit Aromatasehemmern und durch die Einführung des reinen Antiöstrogens Fulvestrant zu neuen Behandlungsoptionen gekommen ist. Tamoxifen ist seit Jahrzehnten ein zentrales (first line) Medikament und für viele Frauen ein Hoffnungsschimmer und die einzige Alternative zur Bekämpfung ihres Leidens.

Umso bedauerlicher ist es, wenn die Therapie nur ungenügend zum Erfolg führt und sich Resistenzen während der Behandlung gegen diese einstellen.

Es muss also einen Mechanismus geben, der vorhanden ist oder sich während der Therapie entwickelt, der es einigen entarteten Zellen erlaubt, dem antihormonellen Einfluss zu entkommen und weiter zu wachsen. Die Charakterisierung dieser kompensatorischen Mechanismen ist noch unvollständig, sodass die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten noch nicht abgeschlossen ist (Gee et al., 2003).

Diese Arbeit soll einen kleinen Schritt in die Richtung der Entwicklung dieser Möglichkeiten gehen und untersucht hauptsächlich die Beeinflussung des cross talks zwischen Östrogenrezeptor- und Tyrosinkinaserezeptor- Signalwegen an der ERα- positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

5.1. Beeinflussung der Apoptose und Proliferation am Beispiel der ERα- und - β- positiven Mammakarzinomzelllinie MCF- 7

5.1.1. Apoptoseinduktion und Proliferationshemmung durch SERM an MCF-7 Zellen (dosis- und zeitabhängige Wirkung)

Interessant ist, dass MCF- 7 Zellen keine messbare Caspase-3 Aktivität wie andere Zelllinien aufweisen, weshalb vermutet wird, dass die Apoptose in dieser Zelllinie über andere Signalwege ausgelöst wird (Mandlekar et al., 2000[2]). Eine wichtige regulatorische Rolle spielt dabei der cross talk zwischen dem Östrogenrezeptor- und dem Tyrosinkinaserezeptor- Signalweg.

Effekte des reinen Östrogenrezeptorantagonisten, ICI 182, 780, auf die MCF- 7 Zellen

Entgegen unseren Ergebnissen wiesen viele Studien eine größere Wirksamkeit von ICI 182, 780 gegenüber Tamoxifen bezogen auf die Apoptose und Proliferationshemmung nach (Somai et al., 2003, Diel et al., 1999; Wakeling et al., 1991, Lichtner et al., 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte, wie in Abb. 3.12. gezeigt, nach 12h Inkubationszeit eine signifikante apoptotische Wirkung des Faslodex nachweisen. Aus der Literatur geht hervor, dass ICI 182, 780 wie auch Tamoxifen zu einer zeitabhängigen Senkung der Bcl-2 mRNA führt. Im Gegensatz zur Tamoxifenbehandlung steigt die Bcl-2- Expression bei Behandlung mit ICI 182, 780 nicht nach 8h nach Behandlungsbeginn wieder an und erreicht auch nicht nach 96h nahezu den Ausgangswert wieder. Möglicherweise erklärt diese Reduktion der Bcl-2- Expression die überlegenere Wirkung des ICI 182, 780 gegenüber dem Tamoxifen (Diel et al., 1999).

Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Wirkung der Antiöstrogene in unseren Versuchen können durch Unterschiede in der Versuchsplanung und Durchführung erklärt werden. So hat die Arbeitsgruppe von Diel et al. nur 1500 MCF-7 Zellen (statt bei uns 2500 Zellen) in jedes well der 96- well Platte „gepflanzt“ und konnte dadurch evt. bestimmte Effekte anders herausarbeiten. Ein weiterer Unterschied liegt in den Inkubationszeiten. So wurden die Zellen bei dem o.g. Versuch über 5 Tage mit den Östrogenrezeptorantagonisten behandelt. Während unserer Versuche waren die Stimulationszeiten mit 12- 72 h kürzer.

Wie in der Studie von Diel et al. nachgewiesen, kommt es nach einer achtstündigen Tamoxifenbehandlung wieder zu einem Anstieg der Bcl- 2 Protein Expression, und damit auch der antiapoptotischen Wirkung. Nach 96h ist die Expression dieses Proteins wieder so hoch wie am Ausgangspunkt der Behandlung und verhindert womöglich schon zu einem früheren Zeitpunkt eine weitere Apoptose und fördert sogar die Proliferation der Zellen. Dieser Effekt konnte bei dem reinen Antiöstrogen nicht nachgewiesen werden, so dass nach einer 5- tägigen Behandlung der Zellen mit ICI 182, 780 konsequenter Weise eine höhere Effektivität nachgewiesen werden muss. Diese zeitabhängige Wirkung der Substanzen konnte durch unsere Arbeitsgruppe ebenso nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden allerdings nicht im Ergebnisteil dargestellt.

Diel et al. halten außerdem das Vorhandensein verschiedener Phänotypen der MCF- 7 Zellen für möglich, das zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Zellbehandlung führen könnte.
Wilson et al. konnten 1995 sogar keine apoptotische Wirkung von ICI 182,780 an MCF- 7 Zellen nachweisen, was wiederum weder mit unserem Ergebnis noch mit den Ergebnissen von Diel et al. übereinstimmt.

Proapoptotische und antiproliferative Effekte von Tamoxifen
Wie bereits beschrieben, konnten wir proapoptotische und antiproliferative Effekte in der Behandlung der MCF- 7 Zellen mit Tamoxifen nachweisen (siehe Abb. 3.7.-3.10.). Dabei hemmt Tamoxifen die Aktivierende Funktion- 2. Die AF-1 wird nicht gehemmt und unter bestimmten Umständen sogar aktiviert. Der reine Östrogenrezeptorantagonist ICI 182, 780 inhibiert dagegen beide Aktivierende Funktionen (Gehm et al., 2000). Analog zu unseren Ergebnissen wies Budtz 1999 Apoptose an MCF-7 Zellen durch Tamoxifen nach. Dabei beeinflusste Östrogen die Tamoxifenwirkung und reduzierte die Zelltodrate.

Zhang et al. wiesen 1999 ebenfalls eine Tamoxifen- induzierte Apoptose an MCF-7 Zellen nach, die zeit- und dosisabhängig war. Auch diese Arbeitsgruppe konnte dabei eine Herabregulierung der Bcl-2- Proteinexpression und eine gesteigerte Expression von Bax (proapoptotisch) messen. Im Gegensatz zu der Studie von Diel et al. zeigte sich nach 72h eine ca. 70%ige Herabregulierung der Bcl-2-Expression und stimmt damit vermutlich mit unseren Ergebnissen einer starken apoptotischen Wirkung des Tamoxifens überein. Östradiol wirkt diesem Effekt des Tamoxifens entgegen und verhindert in gewissem Maße die Apoptose und führt zur Proliferation der Zellen (Diel et al., 1999; Swiatecka et al., 2000).

Überraschend konnte die Arbeitsgruppe von Salami et al. 2003 auch eine gesteigerte Proliferationsrate durch Tamoxifen in Dosen über 2,5 µM an MCF- 7 Zellen nachweisen. Auch Lichtner et al. stellten 1999 ähnliche Ergebnisse allerdings bei sehr kleinen Konzentration von 4- OH- Tamoxifen in ihrer Studie dar. Diese widersprechen unseren Ergebnissen und könnten durch einen anderen Versuchsaufbau und das Fehlen von E2 bei Salami et al. bzw. sehr kleinen Dosen von E2 bei Lichtner et al. erklärt werden.

Klinische Studien bestätigen diese Ergebnisse. So untersuchten Cameron et al. im Jahr 2000 die apoptotische und die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen an 50 über 70jährigen Patientinnen mit ER- positivem Brustkrebs. Die Expressionssenkung von Bcl-2 und KiSI sind assoziiert mit einer Tumorantwort auf die neoadjuvante Tamoxifengabe. Dabei zeigte sich ein umgekehrtes Verhältnis von Bcl-2- Expression und Apoptoseindex und ein positives Verhältnis zwischen der KiSI Expression und dem Mitoseindex. Es gibt also 2 Mechanismen der Tamoxifenwirkung: die Apoptosesteigerung und die Senkung der Proliferationsrate, die über die Expression von KiSI, einem Marker für die Zellzyklus- Aktivität und somit für Proliferation, nachgewiesen wurde. Die Frauen bekamen bei primärem, nicht metastasierendem Brustkrebs 20 mg Tamoxifen pro Tag für 3 Monate. Bei 62% der Patientinnen konnte eine Tumorreduktion von 25% erreicht werden. Nach dreimonatiger Behandlung mit Tamoxifen zeigten sich die Ergebnisse in der Expression des Bcl-2- Proteins und des KiSI allerdings nicht mehr. Weitere Arbeitsgruppen wie Zheng und Yao erhielten 2000 während ihrer Untersuchungen ähnliche Ergebnisse.

5.1.2. Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die Apoptose und Proliferation der MCF-7 Zellen

Die Wirkung von Östradiol

Die meisten unserer Experimente wurden unter dem Einfluss von Östradiol durchgeführt, dessen Zusatz nach dem „Aushungern“ der Zellen zum Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus führen sollte (Lobenhofer et al., 2000). Die Stimulationsansätze der Zellen mit dem Hormon wurden unter der Annahme, dass Östrogene in vivo ein natürliches Vorkommen haben, als Referenzgruppe bei allen Versuchen ausgewählt. Östradiol ist neben seinen proliferativen Eigenschaften an den MCF- 7 Zellen in der Lage, die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 zu steigern (Diel et al., 1999). Außerdem ist Östradiol nicht nur über die ER in der Lage, seine Wirkungen an verschiedenen Zellen auszuüben. Wie Filardo et al. in einer Arbeit von 2000 veröffentlichten ist E2 über G- Protein- gekoppelte Rezeptor Homologe (GPR 30) in der Lage, die MAP- Kinasen ERK 1 und 2 zu aktivieren. Damit ist Östradiol ein weiterer Bestandteil des cross talks zwischen den Signaltransduktionsketten.

Eine Behandlung der MCF-7 Zellen mit Östradiol führte bei der Arbeitsgruppe von Lichtner et al. 1999 zu einem gesteigerten ER- Proteinlevel. Außerdem konnte eine Behandlung mit E2 und 4- OH- Tamoxifen zu einem gesteigerten ER-Proteingehalt führen, der durch eine Kombination mit dem reinen Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant wieder gesenkt wurde. Allerdings verwendete diese Arbeitsgruppe ein anderes Serum, wodurch die unterschiedlichen Ergebnisse in der Behandlung mit dem 4- OH- Tamoxifen erklärt werden könnten. Diese Arbeitsgruppe konnte in ihren Versuchen zusätzlich dosisabhängige mitogene Effekte von Heregulin und IGF-1 nachweisen, die durch E2 verstärkt wurden. Unsere Arbeit konnte diese Ergebnisse nicht eindeutig wiederspiegeln. Ein Grund dafür könnten die durch uns verwendeten größeren Konzentrationen der Wachstumsfaktoren darstellen. Denkbar wäre bereits ein maximales Zellwachstum, hervorgerufen durch eine größere Konzentration an Östradiol (Gehm et al., 2000).

Die Wirkung von EGF: proliferative und antiapoptotische Effekte

Von allen Wachstumsfaktoren hatte EGF bei unseren Versuchen die größte Effektivität in Hinblick auf die Hemmung der Apoptose. In einer Konzentration von 10 nM konnte es die Apoptoserate, die durch Tamoxifen signifikant gesteigert wurde, statistisch signifikant wieder senken (Abb. 3.19.- 3.22.). Eine gesteigerte Proliferation hingegen konnte nicht signifikant nachgewiesen werden. Dieser fehlende Effekt könnte einerseits durch das fehlende oder nur schwache Vorhandensein des EGF Rezeptors erklärt werden (Lupu und Lippmann, 1993), andererseits auch durch eine bereits maximal gesteigerte Proliferation der MCF-7 Zellen.

Gehm et al. wiesen im Jahr 2000 additive Effekte hinsichtlich des Zellwachstums bei der kombinierten Stimulation von MCF- 7 Zellen mit E2 und EGF nach, die allerdings nur bis zu einer Sättigungsdosis des Östradiols nachzuweisen waren. Vermutlich erklären diese Ergebnisse auch die fehlende Proliferationssteigerung in unseren Experimenten durch eine Behandlung der Zellen mit E2 und EGF, da die von uns verwendete Konzentration des Östradiols höher war als bei anderen Studien.

Wie bereits in der Einleitung erklärt, sind die verschiedenen Signalwege miteinander verknüpft. So ist Östradiol in der Lage, die MAP Kinasen Erk 1 und 2

zu aktivieren (Migliaccio et al., 1996; Keshamouni et al., 2002; Filardo et al., 2000) und so möglicherweise zu einer gesteigerten Proliferation zu führen.
EGF oder der Insulin- like growth Faktor modulieren die ER- Aktivität in der Abwesenheit von Östrogenen durch einen MAP Kinase- Signalweg über die Phosphorylierung des Ser118- Restes und führen so zur Steigerung der AF-1 des ER (Yoo et al., 1998; Kato et al.,1995; Kato et al., 2000).

Nicholson et al. fassten 2001 zusammen, dass EGF ohne Östradiol einen viel größeren proliferativen Effekt induziert und dass antiöstrogen- resistente Zellen ein viel größeres Potential besitzen, EGFR für das Wachstum zu nutzen. In dieser Studie wurde signifikant nachgewiesen, dass angestiegene EGFR- Level wie ein Überlebensfaktor agieren. Durch andere Substanzen kann über Inhibition dieses Rezeptors Apoptose hervorgerufen werden. Außerdem konnte bei antiöstrogen-resistenten Zellen der MEK- Inhibitor PD 98059 eingesetzt werden, der bei diesen Zellen effektiv das Wachstum hemmte, indem durch ihn ein Zellzyklus- Arrest erreicht wurde.

In der Literatur herrscht keine Einigkeit über die Aktivierung der ER-Transkriptionsaktivität durch Tyrosinkinaserezeptoren. Smith vermutete 1998 die Aktivierung der ER- Transkription über eine Östradiol unabhängige Art, wobei die AF-1 des ER erforderlich zu sein scheint. In der Abwesenheit von Östradiol können z.B. natürlich vorhandene Substanzen wie der Neurotransmitter Dopamin den ER aktivieren. Wachstumsfaktoren wie EGF sind in Abhängigkeit von Östrogenrezeptoren und ERE in der Lage, die Transkriptionsaktivität des ER zu erhöhen und pure Antiöstrogene können diese Fähigkeit blockieren. In ähnlicher Weise kann auch der Ligand TGF alpha mit dem Östrogenrezeptor „in einen cross talk treten“.
IGF-1 und Insulin stimulieren die Steroidhormonrezeptoren und auch Heregulin ist dazu in der Lage. Interessant ist ebenfalls, dass eine gemeinsame Behandlung der Zellen mit Östrogenen und anderen Wachstumsfaktoren im Vergleich zu jeder einzelnen Substanz zu einer erhöhten Genexpression zu führen scheint (Smith, 1998).

Bei Behandlung der MCF-7 Zellen mit EGF konnte in vielen Studien eine gesenkte Apoptoserate und ein gesteigertes Wachstum der Zellen nachgewiesen werden.

Die Apoptoseraten betreffend konnten unsere Versuche ähnliche Ergebnisse erheben. Die Studie von Garcia et al. von 2006 zeigte allerdings, dass die alleinige Behandlung der Zellen mit EGF nur zu einer insuffizienten Progression des Zellzyklus führt. Ähnliche Beobachtungen konnte auch unsere Arbeitsgruppe machen, deren Ergebnisse sind jedoch nicht in dieser Arbeit veröffentlicht.

Antiapoptotische Effekte von Heregulin

Heregulin und IGF wiesen ebenfalls keine statistisch signifikanten Effekte auf die Proliferation auf, obwohl beide Wachstumsfaktoren bekannte mitogene Effekte auf die MCF-7 Zellen haben (Lichtner et al., 1999).

Allerdings konnte Heregulin, genauso wie EGF, die durch Tamoxifen 10 µM ausgelöste Apoptose mit $p < 0,05$ statistisch signifikant senken (Abb. 3.19.).

Der Her2 Rezeptor ist das Proteinprodukt des HER2- Protoonkogen und Mitglied der EGFR Familie. Eine Überexpression des HER2 Rezeptors geht oft mit einer Tamoxifenresistenz einher, deren Mechanismus bisher noch unklar ist. Es kommt infolge der Überexpression zu einer Aktivierung des RAS/ MAPK Signalwegs. MAPK sind in der Lage, in Östrogenrezeptoren Ser118 zu phosphorylieren, was zu einer ligandenunabhängigen ER- Aktivierung führt und damit zu einem Verlust der Tamoxifenwirkung (Kurokawa et al., 2000). Heregulin wurde ursprünglich nur als Ligand für erbB2 beschrieben, bis man herausfand, dass es für einige Mitglieder der erbB- Familie als Ligand in Form von Heterodimeren dient (Lichtner et al., 1999).

Eine Überexpression von Her2/ Neu ist mit einer Resistenz der Brustkrebszellen gegenüber der Behandlung mit Antiöstrogenen verbunden (Benz et al., 1993). Die Arbeitsgruppe von Chung et al. fand 2002 heraus, dass der Her2/ Neu Rezeptor direkt an der Zellmembran mit einem Östrogenrezeptor, dem zellmembrangebundenen ER, interagiert. Eine Tamoxifen induzierte Apoptose findet sofort nach Dissoziation des Her2/ Neu vom zellmembrangebundenen ER statt. Dieses eröffnete neue Einblicke in die Einbeziehung des Her2/ Neu-Rezeptors in die Tamoxifenresistenz.

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sind in Hinblick auf eine gesteigerte Proliferation durch HRG nicht signifikant. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die Arbeit von Lupu und Lippmann, 1993. Dort wird die uneinheitliche Exprimierung

des ErbB2 und das unterschiedliche Vorhandensein des EGFR auf MCF-7 Zellen dargestellt. Da das Verhalten der MCF-7 Zellen hinsichtlich der Rezeptorausprägung nicht gleich zu sein scheint, ist auch eine gleichartige Reaktion der Zellen nicht unbedingt zu erwarten. Eine weitere mögliche Erklärung für die geringe Steigerung der Proliferation unserer Zellen liefert der Artikel von Weinstein et al. von 1998. Es wird das Vorhandensein verschiedener Heregulinisoforme beschrieben, die möglicherweise auch eine Apoptose in Brustepithelzellen hervorrufen können. Es wäre eine gesteigerte Zelltodrate bei der Stimulation mit Heregulin vorstellbar, die so proliferative Effekte maskieren könnte. In Versuchen mit stabiler HRG- Transfektion in MCF-7 Zellen gingen 20-30% der Zellen in die Apoptose über. Anhand anderer Zelllinien wurde dargestellt, dass diese Wirkungen des HRG nicht über EGF Rezeptor Signalwege zustande kommt.

Reduktion der apoptotischen Effekte des Tamoxifens durch EGF und HRG

Bei unseren Versuchen konnten wir eine verminderte Wirksamkeit des Tamoxifens unter dem Einfluss von HRG oder EGF messen, was als weiterer Hinweis auf einen cross talk zwischen den Signalwegen zu deuten ist. Zu dieser verminderten Wirksamkeit kam es bereits nach einer kurzen Stimulationszeit, so dass nicht von einer Tamoxifenresistenz, die in vielen Artikeln nach einer Langzeitbehandlung beschrieben wird, ausgegangen werden kann. Vermutlich kommt es hier zu einer direkten Beeinflussung der Signalwege. Denkbar wäre eine sofortige Aktivierung des Ras/ MAPK Signalweges durch EGF oder Heregulin und eine Phosphorylierung des Ser118- Restes am ER sowie eine dadurch abgeschwächte Wirkung des Tamoxifens, wie es als Langzeiteffekt beschrieben wird (Kurokawa et al., 2000).

Kaum nachweisbare antiapoptotische und proliferative Effekte von IGF an MCF-7 Zellen

Khandwala et al. fassten im Jahr 2000 in einem Übersichtsartikel verschiedene Studien zusammen. Daraus ging hervor, dass scheinbar keine einheitliche Expression der IGF- und IGF-1- Rezeptoren selbst an der gleichen Zelllinie vorliegt, was wiederum unsere Ergebnisse bezüglich der kaum messbaren Wirkungen des IGF an den MCF-7 Zellen erklären könnte. Durch unsere Versuche konnten wir weder einen signifikanten proliferativen noch einen antiapoptotischen

Effekt von IGF nachweisen.

In einer Studie von 1999 belegten Ahmad et al. an MCF-7 Zellen eine Verbindung des IGF-1 Rezeptor- und Östrogenrezeptor- Signalweges auf Höhe der AKT1 (PKBα). Durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Östradiol und IGF-1 konnte eine synergistische Steigerung der AKT1- Aktivität nachgewiesen werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Dupont et al.. Auch sie wiesen eine gesteigerte Aktivierung der PI- 3-K und der PKB (AKT1) nach.

Außerdem kann auch IGF in das Östrogen- vermittelte Wachstum eingreifen (Lee et al., 1997; Smith, 1998). Tamoxifen ist in der Lage, das Wachstum der Zellen, das durch IGF-1 hervorgerufen wird, zu hemmen. Während unserer Versuche waren diese Ergebnisse nicht eindeutig. Allerdings verwendeten wir eine geringere Konzentration des IGF-1 (1 nM statt 5 nM) und eine höhere Konzentration des Tamoxifens (10 µM statt 1 µM), so dass eine Apoptoseinduktion und Wachstumshemmung durch Tamoxifen viel stärker nachweisbar waren, die proliferativen und antiapoptotischen Effekte des IGF-1 allerdings nicht so stark ausgeprägt waren wie in der Studie von Lee et al.. Da die Effekte von IGF-1 auf den ER durch Tamoxifen gehemmt werden können, kann man annehmen, dass diese Effekte über die AF-2 des Rezeptors zustande kommen (Lee et al., 1997).

IGF und Tamoxifen 1 µM führen zu einer gesteigerten Apoptoserate in östrogenfreiem Medium

Ungewöhnlich war der Nachweis einer gesteigerten Apoptoserate in der Kombinationsbehandlung mit Tamoxifen 1 µM und IGF 1 nM, wobei das Medium kein Östradiol enthielt. Erklären lässt sich dieser Effekt dadurch, dass keine antiapoptotische Wirkung des E2 vorhanden war und bei einer instabilen Expression der Tyrosinkinaserezeptoren das IGF keinerlei Wirkung entfalten konnte. Die Apoptose der nur mit Tamoxifen behandelten Zellen lag bei 121%, die der Zellen, die mit IGF und Tamoxifen behandelt wurden bei 128%, damit also ähnlich hoch. In der gleichen Abbildung (Abb. 3.20.) ist ebenfalls dargestellt, dass auch die kombinierte Behandlung der Zellen mit HRG und Tamoxifen zu einer gesteigerten Apoptoserate mit 117% führte, was allerdings nicht statistisch signifikant war. Auch hier fehlte wahrscheinlich die Östradiolwirkung. Es konnte also nochmals nachgewiesen werden, dass Östradiol die Wirkung des Tamoxifens

beeinflusst.

5.1.3. Einfluss der RTK- Inhibitoren auf die Proliferation und Apoptose der MCF-7 Zellen mit und ohne gleichzeitige Tamoxifenbehandlung

Herceptin vermindert die durch Tamoxifen verursachte Apoptose möglicherweise durch Beeinflussung des Östrogenrezeptorsignalweges

Überraschend konnte eine Kombinationsbehandlung von Tamoxifen und Herceptin nicht zu einer höheren Apoptoserate im Vergleich zu Tamoxifen alleine führen. Die Apoptoserate war sogar mit 350% deutlich niedriger (siehe Abb. 3.24.).

Es gibt viele Patienten, die nicht auf eine Behandlung mit Herceptin ansprechen, obwohl sie Her2- positive Tumoren haben. 2005 wurde von Yuste et al. erstmals eine Studie durchgeführt, die sich mit der Fragestellung befasste, ob die Aktivierung des ErbB Rezeptors bei ErbB2 überexprimierenden Zellen oder bei Zellen, die transmembranes Neuregulin/ Heregulin exprimieren, über verschiedene Signalwege stattfindet. Dabei wurden die Experimente an MCF-7 Wildtyp- Zellen (WT), MCF-7 Zellen, die HER2 überexprimieren, und MCF-7 Zellen, die transmembranes Neuregulin exprimieren, durchgeführt. Diese Zellen wurden hinsichtlich der Proliferation miteinander verglichen. MCF-7 Zellen, die Neuregulin exprimieren, proliferierten dabei stärker als MCF-7/ HER2 überexprimierende Zellen, diese wiederum stärker als die Wildtypzellen. Betrachtete man dabei die Phosphorylierung der Tyrosinkinasen, zeigte sich, dass die ErbB 2-4- Phosphorylierung in WT- MCF-7 Zellen kaum messbar war. In den MCF-7- Neuregulin Zellen waren ErbB 2-4 unter ruhenden Bedingungen phosphoryliert und in den HER2 überexprimierenden Zellen war nur ErbB2 stark tyrosin- phosphoryliert. Unter dem Einfluss von extern zugeführtem Neuregulin phosphorylierten auch die übrigen Tyrosinkinasen, wobei bei den MCF-7/ Neuregulin- Zellen keine weitere Phosphorylierung erreicht werden konnte. Außerdem konnte durch das externe Neuregulin in MCF-7 WT und MCF-7/ Her2 überexprimierenden Zellen eine konsekutive Phosphorylierung von ERK 1 und 2 erreicht werden. Dieser Effekt war bei den Neuregulin- exprimierenden Zellen nicht nachweisbar. Eine weitere MAP Kinase, die für die Proliferation der Zellen zuständig ist, ERK 5, war nur in den Neuregulin exprimierenden Zellen aktiv. Des

Weiteren war auch nur in diesen Zellen Akt phosphoryliert. Diese Zelllinien wurden unter diesem Wissen mit dem ErbB2 Antikörper Herceptin behandelt. Herceptin steigerte die ErbB2 Tyrosin- Phosphorylierung in den MCF-7 WT und den HER2 überexprimierenden Zellen, ohne zu einer gesteigerten Proliferation zu führen. Er senkte allerdings die Phosphorylierung in den Neuregulin exprimierenden Zellen. Daraus konnte geschlossen werden, dass für eine suffiziente Steigerung der Proliferation die Heterodimerisation des ErbB2 Rezeptors mit den anderen ErbB Rezeptoren notwendig ist. Herceptin war in der Lage die Proliferation der Neuregulin exprimierenden MCF-7 Zellen zu senken. Die hohe Effektivität des Herceptins liegt also in der Verhinderung einer Proliferation der Mammakarzinomzellen bei normaler Ausprägung des ErbB Rezeptors unter der Voraussetzung, dass Neuregulin vorhanden ist (Yuste et al., 2005).
In unseren Versuchen konnte durch die zusätzliche Behandlung der MCF-7 Zellen mit Herceptin die apoptotische Wirkung des Tamoxifens statistisch signifikant mit p= 0,001 gesenkt werden. Die Behandlung der Zellen mit Heregulin schwächte die Wirkung des Tamoxifens ab. In einer kombinierten Behandlung der Zellen mit Tamoxifen, Heregulin und Herceptin konnte im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit Tamoxifen/ Herceptin und Tamoxifen/ Heregulin kein zusätzlicher Effekt gesehen werden. Aufgrund der von Yuste et al. beschriebenen Effekte an den WT- MCF-7 Zellen wäre denkbar, dass durch eine Bindung des Herceptins an den ErbB2- Rezeptor mit Phosphorylierung diesen Rezeptors umgekehrt in den Signaltransduktionsweg des Östrogenrezeptors, der durch Tamoxifen kompetitiv gehemmt wird, eingegriffen wird, möglicherweise sogar über die Phosphorylierung des Ser118- Restes des ER. Dadurch wäre zumindest eine teilweise stattfindende Aufhebung der Tamoxifenwirkung denkbar. Da das Herceptin aber insgesamt an den MCF-7 Zellen zu einer Reduktion der ErbB2 Level führt, ist dadurch die Wirksamkeit an HER2 überexprimierenden Zellen zu erklären. Über einen längeren Zeitraum führt die Behandlung HER2- positiver Mammakarzinome mit Herceptin zu einer verminderten Tumorprogression.

Eine weitere mögliche Erklärung für die erniedrigte Apoptoserate der Kombinationsbehandlung mit Herceptin und Tamoxifen lieferte die Studie von Kim und Serrero; 2006. Darin konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression eines Glycoprotein- Wachstumsfaktors, PCDGF/GP88, zu einer Herceptinresistenz führen kann. Dabei wurde allerdings dieser Wachstumsfaktor

extern hinzugefügt. Ein natürliches Vorkommen ist bei vielen MCF-7 Zelltypen jedoch nicht ausgeschlossen. Außerdem ist PCDGF/GP88 in der Lage, MAP Kinasen zu phosphorylieren. Diese Wirkung konnte durch Herceptin nicht abgeschwächt werden.
Außerdem weisen die kaum messbaren Effekte von Heregulin in unseren Versuchen auf das Fehlen bzw. die nur geringe Exprimierung des HER2 Rezeptors hin, dieser ist jedoch der Angriffspunkt des Herceptins.

Hinsichtlich einer alleinigen Behandlung der Zellen mit Herceptin konnten wir weder auf die Proliferationsrate noch auf die Apoptoserate ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielen, was sich mit dem Ergebnis der Arbeitsgruppe von Larsen et al., 1999 deckt. Larsen et al. vermuteten, dass der HER2/ NEU Rezeptor an den MCF-7 Zellen nicht in die Wachstumsregulierung involviert ist, was wiederum auch unsere Ergebnisse in Hinblick auf die Wirksamkeit des Heregulins erklären würde.

Der RTK- Inhibitor ZD 1839 zeigt starke apoptotische und antiproliferative Effekte durch Hemmung der ERK- Phosphorylierung
Die Ergebnisse unserer Studien hinsichtlich der kombinierten Behandlung der Zellen mit ZD 1839, einem EGFR- Tyrosinkinase- Inhibitor, und Tamoxifen bestätigten die Ergebnisse vieler anderer Arbeitsgruppen. Wir konnten eine statistisch signifikante Steigerung der Apoptoserate und eine Senkung der Proliferationsrate bei kombinierter Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen und ZD 1839 nachweisen. Außerdem gelang uns trotz einer hohen Standardabweichung der statistisch signifikante Nachweis einer erhöhten Apoptoserate bei der Behandlung der MCF-7 Zellen mit diesem Tyrosinkinaseinhibitor alleine. Analog dazu war eine erniedrigte Proliferationsrate bei alleiniger Behandlung der Zellen mit ZD 1839 messbar (siehe Abb. 3.23., 3.24., 3.29., 3.32., 3.39., 3.40., 3.41., 3.42., 3.43.). Diese Ergebnisse stimmen damit z.B. mit denen von Ciardiello aus dem Jahr 2000 überein und legen die Vermutung nahe, dass bei einer Hemmung der ERK- Phosphorylierung durch ZD 1839 eine Interaktionsstelle zwischen dem Östrogenrezeptor- und dem Tyrosinkinaserezeptor- Signalweg vor ERK oder in Höhe von ERK liegen muss. Umgekehrt ist E2 in der Lage, wie bereits oben beschrieben, die MAP- Kinasen ERK 1 und 2 zu aktivieren.

Wie in der Literatur beschrieben, führt eine Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen zu einer Blockierung der MAP Kinase Aktivität und zur Verhinderung einer Tamoxifenresistenz (Wakeling et al., 2001; Kurokawa und Arteaga, 2001). Wakeling et al. schlugen 2001 sogar eine frühzeitige Kombinationsbehandlung mit Tamoxifen und ZD 1839 zur Verhinderung einer Tamoxifenresistenz vor.
Camirand et al. beschrieben 2005, dass Iressa die Tyrosinkinaseaktivität von EGF Rezeptoren blockieren kann und somit die Proliferation verschiedener menschlicher Tumore hemmt. Allerdings beschrieben Camirand et al. auch, dass Iressa in der II. klinischen Phase bei Nicht- kleinzelligen Lungenkarzinomen eine Ansprechrate von 9-19% hat, und die Ansprechrate bei Mammakarzinomen bei weniger als 10% liegt. Die Ergebnisse konnten in Kombination mit einer Chemotherapie gegenüber der Chemotherapie alleine nicht verbessert werden.
Zusätzlich wurde deshalb gleichzeitig der IGFR mit AG 1024 gehemmt. An MCF-7 Zellen konnten Iressa und AG 1024 die Proliferation der Zellen hemmen, eine Kombination beider Substanzen wies einen additiven bis synergistischen Effekt hinsichtlich der Proliferationshemmung auf- wahrscheinlich durch einen höheren Effekt auf die Apoptose. Iressa hemmte oder reduzierte die Phosphorylierung der p42/p44 Erk- Kinase in Abhängigkeit von der Zelllinie. Bei Kombination beider Substanzen wurde die Akt- Kinase gehemmt. Anhand dieser Studie kann man darauf schließen, dass die Wirkung von Iressa durch den IGFR- Signalweg gehemmt wird. Umgekehrt können wir durch unsere Versuche darauf schließen, dass bei starken Effekten von ZD 1839 und kaum messbaren Effekten von IGF auf die MCF-7 Zellen der IGFR- Signalweg bei dieser Zelllinie möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Eine weitere Studie von Gee et al. zeigte 2003, dass die Tamoxifenresistenz, die sich nach einer Langzeitbehandlung einstellt, durch eine zusätzliche Behandlung mit ZD 1839 durchbrochen werden kann. Es konnten eine erhöhte Apoptoserate und ein verringertes Zellwachstum sowie eine geringere Expression von EGFR und eine geringere Phosphorylierung von PI- 3 und ERK 1 und 2 nachgewiesen werden.
In unseren Experimenten zeigte sich bei kurzzeitiger Behandlung mit Tamoxifen und ZD 1839 eine deutliche Steigerung der Wirksamkeit beider Substanzen zusammen gegenüber den einzelnen Substanzen im Sinne additiver Effekte.

Dieses kann als deutlicher Hinweis auf einen cross talk beider Signalwege gedeutet werden.
Normanno et al. testeten in einer Arbeit von 2002 sogar die gleichzeitige Behandlung von Krebszelllinien mit ZD 1839 und Herceptin und stellten fest, dass es einen synergistischen inhibitorischen Effekt auf die Tumorzellen gibt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei Patientinnen, deren Tumoren Zellen haben, die beide Rezeptoren, den EGFR und erbB2, exprimieren, eine effizientere Hemmung des Tumorwachstums durch kombinierte Hemmung beider Rezeptoren erreicht werden kann.

Weitere Arbeiten an anderen Zelllinien beschäftigten sich auch mit der Frage der Wirksamkeit einer kombinierten Hormon- und Chemotherapie mit Iressa. Iressa verursacht einen zytostatischen Effekt mit Zellzyklusarrest in der G1- Phase und ist in der Lage dosisabhängig Apoptose auszulösen (Ciardiello et al., 2000). Bei einer Behandlung von Tumorzellen mit zytotoxischen Substanzen (z.B. Cisplatin, Paclitaxel, Doxorubicin u.a.) zusammen mit ZD 1839 konnte ein supraadditiver wachstumsinhibierender Effekt nachgewiesen werden, dosisabhängig kam es auch zu einer Steigerung der Apoptoserate.
Iressa ist ebenfalls in der Lage, potent die Proliferationsrate bei erbB2 überexprimierenden Zellen, z.B. MDA- MB- 231 Zellen, durch Hemmung der Autophosphorylierung von EGFR und Verhinderung der Aktivierung von PLC-γ1, ERK und Akt durch EGF zu senken (Anderson et al., 2001).

Die durch uns gemessene hohe Standardabweichung der Werte erklären wir uns durch eine massiv gesteigerte Apoptoserate der Zellen, wodurch bereits vermutlich beim Mediumwechsel vom Boden gelöste, apoptotische Zellen vorzeitig aus dem well entfernt wurden. Obwohl wir deshalb die Inkubationszeiten schon so kurz wie möglich gehalten haben, gelang es wahrscheinlich nicht, diese Fehlerquelle weitestgehend auszuschalten.

Die Behandlung mit AG 1478 führt ebenfalls zu einer gesteigerten Apoptoserate und einer erniedrigten Proliferationsrate und verstärkt Tamoxifeneffekte
Ähnlich wie bei dem RTK- Inhibitor Iressa konnte durch die Behandlung der Zellen mit AG 1478, einem spezifischen EGFR- Antagonisten, eine erniedrigte Proliferationsrate und eine erhöhte Apoptoserate gemessen werden. Eine

kombinierte Behandlung der MCF-7 Zellen mit AG 1478 und Tamoxifen steigerte diese Effekte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.
Kurokawa et al. machten 2000 ähnliche Beobachtungen. Diese Arbeitsgruppe wies nach, dass eine kombinierte Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen und einem HER2- Inhibitor die MAPK- Aktivität hemmt und ein Wachstum von HER2- überexprimierenden MCF-7 Zellen verhindert. AG 1478 wirkt, obwohl es ein spezifischer EGFR- Antagonist ist, einer HER2- Phosphorylierung und Aktivität der MAPK entgegen. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit 4- OH-Tamoxifen und AG 1478 konnte eine Hemmung der Proliferation nachgewiesen werden. Die alleinige Behandlung der Zellen mit AG 1478 konnte entgegen unseren Ergebnissen bei Kurokowa et al. das Tumorwachstum nicht hemmen, sondern nur die MAPK Aktivität, was diese Arbeitsgruppe zu der Überlegung führte, dass E2- abhängiges Tumorwachstum nicht MAPK abhängig ist.
Da AG 1478 einer HER2- Phosphorylierung und MAPK- Aktivität entgegen wirkt und die gesteigerte Expression von EGF Rezeptoren ein wichtiger Bestandteil der Resistenzentwicklung von Mammakarzinomzellen gegenüber Tamoxifen ist, können wir annehmen, dass auch eine Kombinationsbehandlung von Tamoxifen und AG 1478 zur Verhinderung einer Tamoxifenresistenz beitragen könnte.

Unterschiede in den Ergebnissen unserer Studie im Vergleich zu anderen Studien sind durch unterschiedliche Konzentrationen und Stimulationszeiten des RTK-Inhibitors erklärbar. So bewirken niedrige Konzentrationen des AG 1478 (1- 10 µM) bei einer einstündigen Inkubationszeit eine Formierung von HER2- Dimeren. Bei höheren Konzentrationen des AG 1478 kann eine Phosphorylierung der HER2- Dimere, dem Mechanismus, der vermutlich an der Proliferationshemmung beteiligt ist (s.o.), jedoch nicht nachgewiesen werden.

PD 98059 senkt die durch Tamoxifen gesteigerte Apoptoserate vermutlich über kompetitive Verdrängung am ERα

Ein weiteres überraschendes Ergebnis war eine Erniedrigung der Apoptoserate bei einer Kombinationsbehandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen und dem MEK- Inhibitor PD 98059 gegenüber der Behandlung der Zellen mit dem SERM alleine.

Lobenhofer et al. behandelten im Jahr 2000 ausgehungerte MCF-7 Zellen mit E2 und wiesen eine erhöhte Expression von Cyclin D1, welches, wie in der Einleitung beschrieben, wichtig für die Mitose der Zellen ist, nach. Bereits 5 Minuten nach der Behandlung mit E2 konnte eine Aktivierung der Erk 1/ 2 nachgewiesen werden auch durch Östradiol, das die Zellmembran nicht passieren konnte. Diese Effekte konnten durch die Zugabe von PD 98059 gehemmt werden. Eigentlich wäre nach diesen Erkenntnissen eine Steigerung der Apoptoserate durch gleichzeitige Hemmung des RTK- und ER- Signalweges durch Tamoxifen und PD 98059 zu erwarten, die wir nicht beobachten konnten. Lobenhofer et al. vermuteten selbst hinter differenten Ergebnissen anderer Studien Unterschiede im Bereich der Zellkulturbedingungen, Stimulationszeiten und der experimentellen Bedingungen.

Eine weitere Erklärung für unsere Ergebnisse lieferten Long et al., 2001. Danach kann PD 98059 Östradiol vom ERα kompetitiv verdrängen und den Östrogenrezeptor aktivieren. Dadurch kann eine gesteigerte Transkription hervorgerufen werden. Allerdings ist PD 98059 dafür in viel höheren Konzentrationen erforderlich als E2. Die Dosis, die jedoch für die MAPK-Inhibierung notwendig ist, ist in der Lage maximale E2- Effekte zu produzieren. Dieses kann zur Verwechslung der Interpretation der Ergebnisse bei ER- positiven Zellen führen. An MCF-7 Zellen wurde MEK vollkommen gehemmt, wenn die Dosis über 50 μM betrug.
Bei unseren Versuchen verwendeten wir eine viel niedrigere Konzentration von PD 98059 (1μM), so dass vermutet werden kann, dass es nicht zu einer vollständigen Inhibierung der MAPK gekommen ist. Zusätzlich können bereits geringe proliferative Effekte durch PD 98059 bei dieser Konzentration vorhanden gewesen sein. Außerdem kann die Hypothese aufgestellt werden, dass auch Tamoxifen durch PD 98059 kompetitiv am ERα verdrängt werden kann und dadurch konsekutiv eine erniedrigte Apoptoserate im Vergleich zu der durch Tamoxifen verursachten Apoptose messbar ist. Das würde auch erklären, warum der MEK- Inhibitor alleine die Apoptose der Zellen begünstigt, da bei niedrigen Konzentrationen vermutlich die MAPK- inhibierende Wirkung überwiegt.
Außerdem könnten durch die Verdrängung des E2 am ER durch PD 98059 die leichten wachstumsstimulierenden Effekte des Tamoxifens, die in Abwesenheit von E2 nachgewiesen werden können, einen Teil der apoptotischen Wirkung des Tamoxifens aufheben.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen gelang es der Arbeitsgruppe von Yang et al. im Jahr 2002 eine gesteigerte Apoptoserate durch die Kombinationsbehandlung mit dem partiellen Östrogenrezeptorantagonisten und dem RTK- Inhibitor nachzuweisen.

Interessant ist ebenfalls das Ergebnis unserer Studie, wobei eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit E2, IGF, Tamoxifen und PD 98059 die durch Tamoxifen induzierte Apoptose im Sinne eines synergistischen Effektes steigern konnte (siehe Abb. 3.37.), obwohl wir vermuteten, dass der IGF-Signalweg bei den MCF-7 Zellen keine größere Rolle spielt (s.o.). Laut Ahmad et al. (1999) interagieren der ER- und der IGFR- Signalweg in Höhe von Akt downstream der PI-3- Kinase und vor RAF-1. Durch einen gleichzeitigen E2- und IGF-1- Einfluss kommt es zu einer synergistischen Steigerung der Akt- Aktivität und somit zur Phosphorylierung von RAF-1 im RAS- RAF- MAPK- Signalweg. Denkbar wäre, dass durch eine gesteigerte Akt- Aktivität mehr RAF-1 phosphoryliert wird und dadurch MEK- 1 für eine Hemmung durch PD 98059 zur Verfügung steht. Möglicherweise wird so die Affinität für eine MEK- Inhibition durch PD 98059 gesteigert, so dass der RTK- Inhibitor in der kleinen Konzentration nicht mehr an die Östrogenrezeptoren bindet (s.o.) und so zu einer Reduktion der Apoptoserate führt. Die Tatsache, dass IGF, genauso wie Östradiol, ein in vivo vorkommender Botenstoff ist, legt die Vermutung nahe, dass der MEK-Inhibitor, PD 98059, in einer gemeinsamen Behandlung von Krebszellen die Tamoxifenwirkung verstärken würde.

Der IGF- 1 Rezeptor- Inhibitor, AG 1024, zeigt keine signifikanten Effekte

Dieser IGF-1R- Inhibitor hatte bei der Behandlung der MCF-7 Zellen in unseren Versuchen keinen Einfluss auf die Apoptose und Proliferation, wobei bei einer Kombinationsbehandlung der Zellen mit Tamoxifen eine leichte, aber nicht statistisch signifikante Steigerung der Apoptoserate gesehen werden konnte (Abb. 3.23., 3.24., 3.29., 3.37.). Auch eine Kombinationsbehandlung mit IGF erbrachte kein statistisch signifikantes Ergebnis.

Im Gegensatz dazu konnten Camirand et al. im Jahr 2005 eine Reduktion der Proliferationsrate durch eine Behandlung der Zellen mit AG 1024 nachweisen. Im Unterschied zu unserer Studie verwendete diese Arbeitsgruppe allerdings mit 10

mM eine viel höhere Konzentration des RTK- Inhibitors (unsere Versuche wurden mit einer Konzentration von 1 µM durchgeführt). Camirand et al. wiesen außerdem eine gesteigerte Apoptoserate durch Iressa nach, wenn sie dieses mit AG 1024 kombinierten. Dadurch wird eine gleichzeitige Hemmung des EGF- und des IGF-Rezeptorsignalweges als weitere Möglichkeit, in die Zellprozesse einzugreifen, gesehen. Insgesamt ist die Datenlage hinsichtlich der Behandlung der MCF-7 Zellen mit AG 1024 eher dünn, da sich bisher bekannte Studien mehr mit Tamoxifen- resistenten Zellen befassten (Jones et al., 2004; Knowlden et al., 2005). Die kaum nachweisbaren Effekte des AG 1024 bei unseren Versuchen bestätigen den Verdacht, dass der IGFR- Signalweg bei unseren MCF-7 Zellen eine untergeordnete Rolle spielt.

Neueste Hinweise auf einen cross talk zwischen den IGFR- und ER- Signalwegen bietet die Arbeit von Martin und Baxter, 2007. Das Insulin- like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) ist ein Mitglied der IGF- bindenden Protein- Familie und wichtig für mitogene und antiapoptotische Effekte von IGF-1 und IGF-2. IGFBP-2 fungiert als ein Inhibitor des normalen Zellwachstums. Es gibt einige Studien, die belegen, dass IGFBP-2 für das Wachstum maligner Tumore wichtig ist, z.B. auch für das Wachstum von Mammakarzinomen. Martin und Baxter beschäftigten sich mit der Beeinflussung der IGFBP-2 Expression durch den PI-3-Kinase- Signalweg. Eine Hemmung des PI-3- Kinase- Weges konnte zu einer Reduktion der Expression des IGFBP-2 führen. Außerdem belegt diese Studie eine Beeinflussbarkeit der IGFBP-2 Expression durch Östradiol. Die IGFBP-2 Level können in MCF- 7 Zellen durch E2 signifikant gesteigert werden und dadurch eine Kontrollfunktion auf das Zellwachstum ausüben.

SB 203580 kann die antiapoptotischen Effekte des Heregulins auf die Tamoxifenwirkung aufheben und durch Hemmung des p38- Signalweges die Proliferationsrate bei gleichzeitiger Behandlung mit EGF und Tamoxifen steigern

SB 203580 ist als p38- Kinase- Inhibitor ein weiterer „Hemmer“ der Rezeptor-Tyrosinkinasen, der in unseren Versuchen kaum statistisch signifikante Ergebnisse erbrachte. Eine alleinige Behandlung der MCF-7 Zellen mit SB 203580 steigerte die Apoptoserate nicht signifikant, in einer Kombination mit Tamoxifen zeigte sich ein leicht additiver Effekt, jedoch ohne Signifikanz. Die antiapoptotischen Effekte des EGF wurden nicht aufgehoben. Allerdings konnten

die antiapoptotischen Effekte des Heregulins im Sinne eines synergistischen apoptotischen Effektes aufgehoben werden. Die Apoptoserate konnte sogar über die Apoptoserate der Tamoxifenbehandlung gesteigert werden (siehe Abb. 3.35.).
Ein weiteres überraschendes Ergebnis war die Steigerung des Zellwachstums bei einer Behandlung der Zellen mit EGF, Tamoxifen und SB 203580 gegenüber einer Behandlung der Zellen mit Tamoxifen oder EGF und Tamoxifen (Abb. 3.42., 3.43.). Dieses Ergebnis war bei einer hohen Tamoxifenkonzentration signifikant, bei der niedrigeren Konzentration aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht. Eine Erklärung ist die Hemmung der Apoptose über eine Hemmung des p38- Signalwegs durch SB 203580 an MCF-7 Zellen. Damit wirkt SB 203580 einer Tamoxifenwirkung in Abhängigkeit des Rezeptorstatus entgegen. Dieses wird im Folgenden noch genauer beschrieben.

Bereits Zhang und Shapiro untersuchten im Jahr 2000 die Effekte von SB 203580 auf MCF-7 Zellen. E2 stimulierte das Wachstum dieser Zellen, konnte aber nicht p38 aktivieren oder Apoptose induzieren, während 4- OH- Tamoxifen beides konnte. In einer anderen Zelllinien, den HeLa- ER5 Zellen, mit hohem ER Gehalt hingegen konnten entgegengesetzte Effekte gesehen werden, was diese Arbeitsgruppe zu der Annahme führte, dass E2 und Tamoxifen beide den p38 Signalweg aktivieren können. Die Aktivierung des p38 Signalwegs ist streng mit der Apoptose korreliert. In Abhängigkeit vom Östrogenrezeptor- Status können also Östradiol und Tamoxifen den p38 Signalweg aktivieren und damit Apoptose induzieren.
In der MCF-7 Zelllinie führte die Behandlung mit Tamoxifen zu einer gesteigerten p38 Kinase Aktivität und zu einer gesteigerten Apoptoserate. Umso erstaunlicher ist, dass die zusätzliche Behandlung mit einem p38 Inhibitor- also in diesem Fall auch Inhibitor der Apoptose- bei uns nicht zu einer erniedrigten Zelltodrate führte.
Erklären lässt sich dieser Effekt vielleicht durch die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit E2. Östradiol verursachte bei Zhang und Shapiro bei den MCF-7 Zellen eine Hemmung des p38 Signalweges und der Apoptose. Denkbar wäre, dass sich die Effekte von Tamoxifen und E2 teilweise bei unseren Versuchen aufgehoben haben.

Bei einer Kombinationsbehandlung mit Heregulin, E2, Tamoxifen und SB 203580 konnten wir durch einen bisher unbekannten Mechanismus trotz Inhibition des

p38- Weges und damit laut Zhang und Shapiro auch der Apoptose eine gegenüber den Vergleichsgruppen deutlich gesteigerte Apoptoserate messen (Abb. 3.35). Der antiapoptotische Effekt des Heregulins wird aufgehoben, sogar über die apoptotische Wirkung des Tamoxifens alleine hinaus. Möglich wäre eine Veränderung des Östrogenrezeptorstatus durch die Behandlung mit HRG und dadurch eine umgekehrte Wirkung von SB 203580 oder die Aktivierung des p38-Signalweges durch Heregulin in Kombination mit bestimmten anderen Substanzen. Dazu liefert die Literatur bisher noch keine ausreichenden Daten.

In der Arbeit von Mabuchi et al. konnte 2004 auch anhand von Ovarialzellen eine Inhibierung der Tamoxifenwirkung durch die Verwendung des p38- Inhibitors nachgewiesen werden. Ein weiterer Punkt, der eventuell eine Rolle auf die Wirksamkeit des Inhibitors spielt, könnte sein, dass SB 203580 in der Lage ist, über einen RAS unabhängigen Weg RAF-1 zu aktivieren (Kalmes et al., 1999), wobei dieses vom MEK/ ERK Signalweg abgekoppelt ist.

5.1.4. Einige der Lösungsmittel induzieren ebenfalls Apoptose

Bemerkenswert ist, dass einige der Lösungsmittel unserer Substanzen alleine auch in der Lage waren, Apoptose hervorzurufen. Unter diesen Substanzen befanden sich H2O, Ethanol und HCl. Allerdings waren die Apoptoseraten sehr viel niedriger als die der wirksamen RTK- Inhibitoren. Da aber Wasser als Lösungsmittel von EGF und Ethanol als Lösungsmittel von IGF eine leicht erhöhte Apoptoserate aufwiesen, wäre es möglich, so den fehlenden Effekt der Wachstumsfaktoren zu erklären. Salzsäure als Lösungsmittel des ZD 1839 blieb mit seinem apoptotischen Effekt weit unter der Apoptoserate des RTK- Inhibitors, so dass dieses Ergebnis vernachlässigt werden kann.

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend konnte an der ERα- und - β- positiven MCF-7 Zelllinie, die den HER2- Rezeptor nur schwach bis gar nicht exprimiert, eine starke Wirksamkeit der EGFR- Inhibitoren, ZD 1839 und AG 1478, nachgewiesen werden. Beide Substanzen konnten die apoptotische Wirkung des Tamoxifens verstärken. Der spezifische HER2/ Neu Rezeptor Antikörper Herceptin zeigte allein kaum einen Effekt, in der Behandlung mit Tamoxifen aber das überraschende Ergebnis, dass die Apoptoserate statistisch signifikant gesenkt werden konnte, womöglich über eine Beeinflussung des Östrogenrezeptor- Signalweges. Der MEK-1 Inhibitor, PD 98059, führte ebenfalls zu einer gesenkten Apoptoserate, die eventuell auf eine kompetitive Bindung an den ER und dadurch hervorgerufene proliferative und antiapoptotische Effekte zurückzuführen ist. SB 203580 scheint als Inhibitor des p38- Signalweges und damit der Apoptose bei noch unklarem Wirkmechanismus für die Behandlung des Mammakarzinoms derzeit nicht geeignet.

Durch die Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren konnten wir keine eindeutigen proliferativen Effekte nachweisen, allerdings waren EGF und Heregulin in der Lage, die durch Tamoxifen induzierte Apoptose zu senken. Der IGFR könnte bei unserer MCF-7 Zelllinie nur eine untergeordnete Rolle für die Proliferation und Apoptose spielen.

Bei der Behandlung der MCF-7 Zellen mit Tamoxifen und ICI 182, 780 konnten wir zum Teil starke apoptotische und antiproliferative Effekte nachweisen, wobei wir aber bei Behandlung der Zellen mit Tamoxifen stärkere Effekte gesehen haben.

Es gibt bereits viele Studien, die eine Verbindung zwischen den Signalwegen der Östrogen- und Tyrosinkinaserezeptoren belegen. Durch unsere Arbeit ist es gelungen, weitere Interaktionspunkte zwischen den Signalwegen nachzuweisen und so Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für das Mammakarzinom zu schaffen. Allerdings bleiben weiterhin noch viele Fragen ungeklärt.

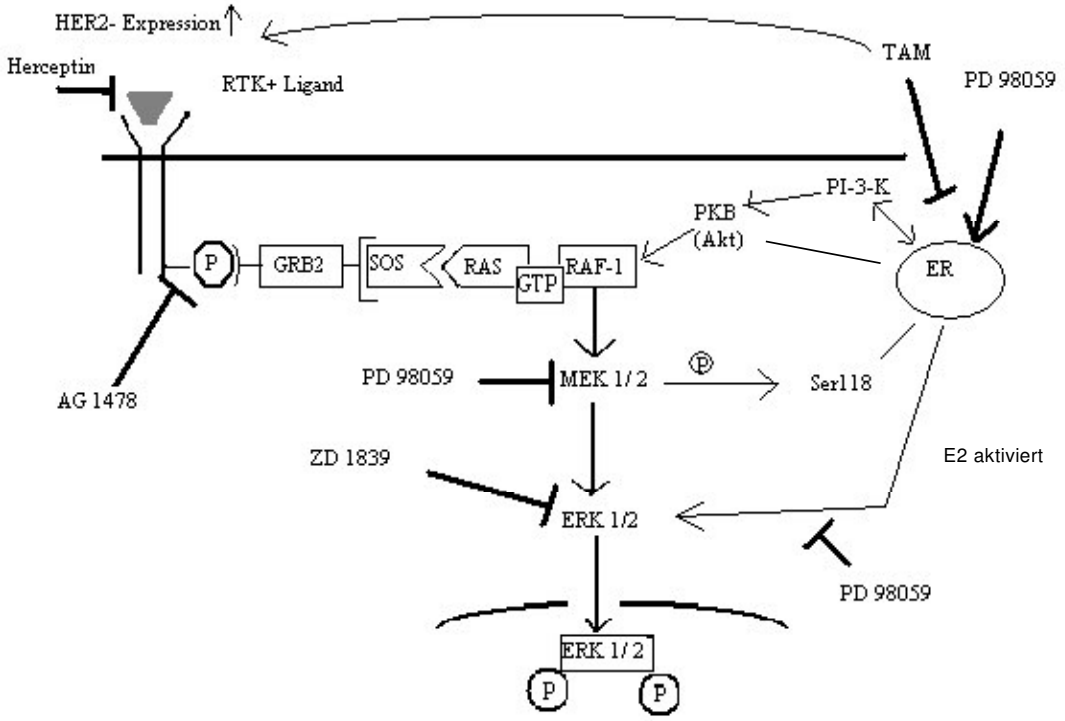

Abb. 4.1. Interaktionen zwischen Tyrosinkinase- und Östrogenrezeptor- Signalwegen mit Darstellung der Angriffspunkte der verschiedenen RTK- Inhibitoren und des Tamoxifens.

5.3. Beeinflussung der Apoptose und Proliferation durch SERM an der ERα-negativen Zelllinie MDA- MB- 231

Tamoxifen als partieller Agonist ist an den ERα– negativen MDA- MB- 231 Zellen in der Lage, bestimmte Wirkungen zu entfalten. So konnten wir dosis- und zeitabhängige apoptotische Effekte nachweisen, die durch ICI 182, 780 nicht hervorgerufen wurden. Mandlekar et al. berichteten im Jahr 2000, dass Tamoxifen in der Lage ist, die Aktivität der Caspase- 3- like Protease in MDA- MB- 231 Zellen und dadurch Apoptose zu induzieren. Außerdem kann es die Apoptose über JNK1 Signalwege einleiten. Dadurch kommt es zu einer dosisabhängigen Reduktion des Zellüberlebens. Analog zu unseren Ergebnissen wurde der Tamoxifen- induzierte Zelltod als relativ spätes Ereignis (später als 24h nach Behandlung) nachgewiesen. Damit können unsere Ergebnisse die bisher bekannten Ergebnisse anderer Studien unterstützen.

Wie erwartet konnte Faslodex an den ERα- negativen Zellen nicht zu einer verminderten Proliferation oder zur Apoptose führen. Dieses wird durch die Bindungseigenschaften der Antiöstrogene erklärt (Webb et al., 1999). ICI 182, 780 bindet an den ERα und verhindert seinen Transport in den Zellkern (Jones, 2003).

Korrespondierend dazu konnte in klinischen Studien ebenfalls keine signifikante apoptotische Wirkung von Faslodex an ER- negativen Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden (Ellis et al., 1997).

Interessanter Weise führte der Zusatz von Östrogen zum Nährmedium zu einer Senkung der Proliferationsrate der MDA- MB- 231 Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nur mit SR-2 behandelt wurden. Die Arbeitsgruppe von Yoo et al. konnte einen zu unseren Ergebnissen passenden Effekt im Jahr 1998 an einer anderen ER- negativen Zelllinie, AU- 565, nachweisen. Das Wachstum der AU-565 Zellen konnte durch die Behandlung mit Östradiol gesenkt werden, das der MDA- MB- 231 allerdings nicht- im Gegensatz zu unseren Versuchen. Vermutlich gehen diese Effekte an den MDA- MB- 231 Zellen auf die negativ dominante Wirkung des ERβ und auf die Aktivierung der MAP Kinasen durch Östradiol zurück (Pettersson et al., 2000). Vermutlich lassen sich Unterschiede der Ergebnisse durch einen veränderten Versuchsaufbau und unterschiedliche Konzentrationen einzelner Substanzen erklären.

6. Ausblick

Die aktuellen Behandlungsprinzipien des Brustkrebses umfassen derzeit multimodale Strategien. Abhängig vom Rezeptorstatus, dem Alter der Patientin, der Tumorausdehnung, dem Nodalstatus, dem Grading sowie der vaskulären Invasion des Tumors in Blut- und Lymphgefäße wird entschieden, nach welchem Therapieverfahren vorgegangen wird.

Um eine weitere Verbesserung der Ansprechraten auf bestimmte Therapieregime zu erreichen, werden weitere Kombinationsbehandlungen mit Hormonen und Chemotherapeutika erforderlich sein. So konnten Menendez et al. im Jahr 2006 verbesserte Ansprechraten von MCF-7 Zellen auf eine kombinierte Therapie mit Cisplatin und Herceptin bei Zellen ohne HER-2 Überexprimierung nachweisen.

Wichtigstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere mögliche hormonale Kombinationen zur Optimierung in der Behandlung des Brustkrebses zu ermitteln. Besonders effektiv waren bezüglich gesteigerter Apoptoseraten Kombinationsbehandlungen der MCF-7 Zellen von Tamoxifen mit AG 1478 und ZD 1839. Sinnvoll ist weiterhin eine kombinierte Behandlung mittels Chemotherapie und Hormontherapie (Pegram et al., 2000).

Für die Behandlung mit Herceptin scheint nicht nur die Überprüfung des ER- und Her2/ Neu- Status wichtig zu sein sondern auch die Überprüfung der Exprimierung von Neuregulin (s.o.). Wahrscheinlich kann bei der Therapie bestimmter Mammakarzinome sogar eine Verschlechterung der Wirksamkeit einer Hormontherapie in Kombination mit Herceptin erfolgen.

Derzeit wird zur Auswahl der geeigneten antitumoralen Therapie nach Beachtung der oben genannten Kriterien nach der Standardchemotherapie der St. Gallen-Konferenz verfahren. Danach gibt es zur Behandlung des Mammakarzinoms verschiedene Chemotherapieschemata und die Hormontherapie in Abhängigkeit des Rezeptorstatus und dem Alter der Patientinnen mit Tamoxifen, GnRH-Analoga, Aromataseinhibitoren und Gestagenen. Zusätzlich spielen natürlich die symptomatische Therapie bei Schmerzen, die operative Therapie und die Bestrahlung bei der Behandlung des Tumorleidens eine wichtige Rolle.

Um letztendlich die richtige Therapie für die Behandlung des Mammakarzinoms zu finden, sind das Verständnis der molekularen Mechanismen in der einzelnen Zelle und damit die weitere Forschung in diesem Bereich der Medizin unerlässlich.

7. Literaturverzeichnis

Ahmad S, Singh N, Glazer RI.

Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. Biochem Pharmacol. 1999 Aug 1;58(3):425-30.

Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ.

ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. Int J Cancer. 2001 Dec 15;94(6):774-82.

Astruc ME, Chabret C, Bali P, Gagne D, Pons M.

Prolonged treatment of breast cancer cells with antiestrogens increases the activating protein-1-mediated response: involvement of the estrogen receptor. Endocrinology. 1995 Mar;136(3):824-32.

Baselga J, Averbuch SD.

ZD1839 ('Iressa') as an anticancer agent. Drugs. 2000; 60 Suppl 1:33-40; discussion 41-2. Review.

Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK.

Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. Breast Cancer Res Treat. 1993;24(2):85-95.

Budtz PE.

Role of proliferation and apoptosis in net growth rates of human breast cancer cells (MCF-7) treated with oestradiol and/or tamoxifen. Cell Prolif. 1999 Oct;32(5):289-302.

Cameron DA, Keen JC, Dixon JM, Bellamy C, Hanby A, Anderson TJ, Miller WR.

Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and pro-apoptotic changes. Eur J Cancer. 2000 May;36(7):845-51.

Camirand A, Zakikhani M, Young F, Pollak M.
Inhibition of insulin-like growth factor-1 receptor signaling enhances growth-inhibitory and proapoptotic effects of gefitinib (Iressa) in human breast cancer cells. Breast Cancer Res. 2005;7(4):R570-9. Epub 2005 Apr 12.

Campiglio M, Locatelli A, Olgiati C, Normanno N, Somenzi G, Vigano L, Fumagalli M, Menard S, Gianni L.
Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in breast cancer cells by the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa') is independent of EGFR expression level. J Cell Physiol. 2004 Feb;198(2):259-68.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M.
The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell. 1988 Aug 12;54(4):541-52.

Chrysogelos SA, Dickson RB.
EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1994 Jan;29(1):29-40. Review.

Chung YL, Sheu ML, Yang SC, Lin CH, Yen SH.
Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. Int J Cancer. 2002 Jan 20;97(3):306-12.

Ciardiello F.
Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. Drugs. 2000;60 Suppl 1:25-32; discussion 41-2. Review.

Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G.
Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):2053-63.

Clark GM, McGuire WL.
Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. Semin Oncol. 1988 Apr;15(2 Suppl 1):20-5. Review.

Clarke PG, Clarke S.
Historic apoptosis. Nature. 1995 Nov 16;378(6554):230.

Diel P, Smolnikar K, Michna H
The pure antiestrogen ICI 182780 is more effective in the induction of apoptosis and down regulation of BCL-2 than tamoxifen in MCF-7 cells. Breast Cancer Res Treat. 1999 Nov;58(2):87-97.

Dupont J, Karas M, Le Roith D.
The potentiation of estrogen on insulin-like growth factor I action in MCF-7 human breast cancer cells includes cell cycle components. J Biol Chem. 2000 Nov 17;275(46):35893-901.

Dupont J, Le Roith D.
Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. Mol Pathol. 2001 Jun;54(3):149-54. Review.

Ellis PA, Saccani-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE, Dowsett M.
Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. Int J Cancer. 1997 Aug 7;72(4):608-13.

Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto S, Kato S.
Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. Mol Cell Biol. 1999 Aug;19(8):5363-72.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr.
Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol Endocrinol. 2000 Oct;14(10):1649-60.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI.
Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol Endocrinol. 2002 Jan;16(1):70-84.

Garcia R, Franklin RA, McCubrey JA.
Cell death of MCF-7 human breast cancer cells induced by EGFR activation in the absence of other growth factors. Cell Cycle. 2006 Aug;5(16):1840-6. Epub 2006 Aug 15.

Gee JM, Harper ME, Hutcheson IR, Madden TA, Barrow D, Knowlden JM, McClelland RA, Jordan N, Wakeling AE, Nicholson RI.
The antiepidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves antihormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. Endocrinology. 2003 Nov;144(11):5105-17. Epub 2003 Aug 7.

Gehm BD, McAndrews JM, Jordan VC, Jameson JL
EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway. Mol Cell Endocrinol. 2000 Jan 25;159(1-2):53-62.

Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E.
The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Genes Dev. 1996 Feb 15;10(4):461-77.

Hannun YA.
Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. Blood. 1997 Mar 15;89(6):1845-53. Review.

Jehn BM, Osborne BA.
Gene regulation associated with apoptosis. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 1997;7(1-2):179-93. Review.

Joel PB, Traish AM, Lannigan DA
Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1998 May 22;273(21):13317-23.

Johnston S. and Siegel C.
Comparison of a serum replacement (Omni Serum) and fetal bovine serum in cell cultures used to isolate herpes simplex virus from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990 April; 28(4): 643–645.

Jones A.
Combining trastuzumab (Herceptin) with hormonal therapy in breast cancer: what can be expected and why? Ann Oncol. 2003 Dec;14(12):1697-704. Review.

Jones HE, Goddard L, Gee JM, Hiscox S, Rubini M, Barrow D, Knowlden JM, Williams S, Wakeling AE, Nicholson RI.
Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer. 2004 Dec;11(4):793-814.

Kalmes A, Deou J, Clowes AW, Daum G.
Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. FEBS Lett. 1999 Feb 5;444(1):71-4.

Karin M, Liu Z, Zandi E.
AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):240-6. Review.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P.
Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science. 1995 Dec 1;270(5241):1491-4.

Kato S, Masuhiro Y, Watanabe M, Kobayashi Y, Takeyama KI, Endoh H, Yanagisawa J.
Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. Genes Cells. 2000 Aug;5(8):593-601. Review.

Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB.
Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. J Biol Chem. 2002 Jun 21;277(25):22558-65. Epub 2002 Apr 17.

Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. Endocr Rev. 2000 Jun;21(3):215-44. Review.

Kim WE, Serrero G.
PC cell-derived growth factor stimulates proliferation and confers Trastuzumab resistance to Her-2-overexpressing breast cancer cells. Clin Cancer Res. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4192-9.

Knowlden JM, Hutcheson IR, Barrow D, Gee JM, Nicholson RI.
Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. Endocrinology. 2005 Nov;146(11):4609-18. Epub 2005 Jul 21.

Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, Madden T, Gee JM, Harper ME, Barrow D, Wakeling AE, Nicholson RI.
Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. Endocrinology. 2003 Mar;144(3):1032-44.

Krammer P.H.
Apoptose Deutsches Ärzteblatt 97, Heft 25, 23.06.2000

Kumar R, Mandal M, Lipton A, Harvey H, Thompson CB.
Overexpression of HER2 modulates bcl-2, bcl-XL, and tamoxifen-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. Clin Cancer Res. 1996 Jul;2(7):1215-9.

Kurokawa H, Arteaga CL.
Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4436s-4442s; discussion 4411s-4412s. Review.

Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL.
Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. Cancer Res. 2000 Oct 15;60(20):5887-94.

Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P.
Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol. 2000 Nov 30;74(5):311-7. Review.

Laemmli UK.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Langdon SP, Crew AJ, Ritchie AA, Muir M, Wakeling A, Smyth JF, Miller WR.
Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens in vitro and in a xenograft model. Eur J Cancer. 1994;30A(5):682-6.

Larsen SS, Egeblad M, Jaattela M, Lykkesfeldt AE.
Acquired antiestrogen resistance in MCF-7 human breast cancer sublines is not accomplished by altered expression of receptors in the ErbB-family. Breast Cancer Res Treat. 1999 Nov;58(1):41-56.

Lee AV, Weng CN, Jackson JG, Yee D.
Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells. J Endocrinol. 1997 Jan;152(1):39-47.

Lichtner RB, Parczyk K, Birchmeier W, Schneider MR.
Differential cross-talk of estrogen and growth factor receptors in two human mammary tumor cell lines. J Steroid Biochem Mol Biol. 1999 Dec 31;71(5-6):181-9.

Liu G, Schwartz JA, Brooks SC.
p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Oct 22;264(2):359-64.

Lobenhofer EK, Huper G, Iglehart JD, Marks JR.
Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. Cell Growth Differ. 2000 Feb;11(2):99-110

Long X, Gize EA, Nephew K, Bigsby RM.
Evidence for estrogenic contamination of the MAPK inhibitor PD98059. Endocrinology. 2001 Dec;142(12):5390-3.

Lupu R, Lippman ME.
William L. McGuire Memorial Symposium. The role of erbB2 signal transduction pathways in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 1993;27(1-2):83-93. Review.

Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Ikebuchi Y, Hisamoto K, Arimoto-Ishida E, Nishio Y, Takahashi K, Tasaka K, Murata Y.
Tamoxifen inhibits cell proliferation via mitogen-activated protein kinase cascades in human ovarian cancer cell lines in a manner not dependent on the expression of estrogen receptor or the sensitivity to cisplatin. Endocrinology. 2004 Mar;145(3):1302-13. Epub 2003 Nov 26.

MacGregor PF, Abate C, Curran T.

Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. Oncogene. 1990 Apr;5(4):451-8.

Mandlekar S, Kong AN.

Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. Apoptosis. 2001 Dec;6(6):469-77. Review.

Mandlekar S, Hebbar V, Christov K, Kong AN. [1]

Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. Cancer Res. 2000 Dec 1;60(23):6601-6.

Mandlekar S, Yu R, Tan TH, Kong AN. [2]

Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. Cancer Res. 2000 Nov 1;60(21):5995-6000.

Martin JL, Baxter RC.

Expression of Insulin- like growth factor binding protein- 2 (IGFBP-2) by MCF-7 breast cancer cells is regulated through the PI3-kinase /AKT/ mTOR pathway. Endocrinology. 2007 Feb 8

Melkonian Laboratory; Praktische Übungen in Botanik für Fortgeschrittene, Teil B Zellbiologie; Universität von Köln, Botanisches Institut. Internetseite zuletzt besucht 07/07

http://www.melkonian.uni-koeln.de/cytoskelett/pages/students/kursscript.htm

Mendelsohn J, Baselga J.

The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene. 2000 Dec 27;19(56):6550-65. Review.

Menendez JA, Mehmi I, Lupu R.
Trastuzumab in combination with heregulin-activated Her-2 (erbB-2) triggers a receptor-enhanced chemosensitivity effect in the absence of Her-2 overexpression. J Clin Oncol. 2006 Aug 10;24(23):3735-46. Epub 2006 Jul 17.

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F.
Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. EMBO J. 1996 Mar 15;15(6):1292-300.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J.
Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. Cancer Res. 2001 Jun 15;61(12):4744-9.

Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, Jones HE, Wakeling AE, Gee JM.
Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer. Endocr Relat Cancer. 2001 Sep;8(3):175-82. Review.

Normanno N, Campiglio M, De LA, Somenzi G, Maiello M, Ciardiello F, Gianni L, Salomon DS, Menard S.
Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth. Ann Oncol. 2002 Jan;13(1):65-72.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE.
The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3159-67. Review. No abstract available.

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. Science. 1997 Sep 5;277(5331):1508-10.

Pegram MD, Lopez A, Konecny G, Slamon DJ.
Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. Semin Oncol. 2000 Dec;27(6 Suppl 11):21-5; discussion 92-100.

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA
Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. Oncogene. 2000 Oct 12;19(43):4970-8.

Pratt MA, Satkunaratnam A, Novosad DM.
Estrogen activates raf-1 kinase and induces expression of Egr-1 in MCF-7 breast cancer cells. Mol Cell Biochem. 1998 Dec;189(1-2):119-25.

Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A.
The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. Endocr Relat Cancer. 2001 Mar;8(1):11-31. Review.

Rauscher FJ 3rd, Voulalas PJ, Franza BR Jr, Curran T.
Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. Genes Dev. 1988 Dec;2(12B):1687-99.

Raymond E, Faivre S, Armand JP.
Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. Drugs. 2000;60 Suppl 1:15-23; discussion 41-2. Review.

Salami S, Karami- Tehrani F.
Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. Clin Biochem. 2003 Jun;36(4):247-53.

Sewell JM, Macleod KG, Ritchie A, Smyth JF, Langdon SP.
Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 ("Iressa"). Br J Cancer. 2002 Feb 1;86(3):456-62.

Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R.
Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2004 Jun 16;96(12):926-35.

Smith CL.
Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. Biol Reprod. 1998 Mar;58(3):627-32. Review.

Somai S, Chaouat M, Jacob D, Perrot JY, Rostene W, Forgez P, Gompel A
Antiestrogens are pro-apoptotic in normal human breast epithelial cells. Int J Cancer. 2003 Jul 10;105(5):607-12.

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ
Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. Mol Endocrinol. 2002 Jan;16(1):116-27.

Stryer L[1]; Signaltransduktionswege: eine Einführung in den Informationsstoffwechsel. In Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemie; 5. Auflage; (431- 463), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2003

Stryer L[2]; Kontrolle der Genexpression. In Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemie; 5. Auflage; (953- 982), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; 2003

Swiatecka J, Dzieciol J, Anchim T, Dabrowska M, Pietruczuk M, Wolczynski S.
Influence of estrogen, antiestrogen and UV-light on the balance between proliferation and apoptosis in MCF-7 breast adenocarcinoma cells culture. Neoplasma. 2000;47(1):15-24.

Treeck O., Diedrich K., Ortmann O.
Interaktionen zwischen Östrogenrezeptor- und Rezeptor- Tyrosinkinase Signaltransduktion: Implikation für die Therapie des Mammakarzinoms

Wagener Ch; Rezeptoren und Signalwege der Wachstumskontrolle. In Wagener Ch: Molekulare Onkologie; 2. Auflage, (77- 110), Thieme, Stuttgart; 1999

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J.
A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. Cancer Res. 1991 Aug 1;51(15):3867-73.

Wakeling AE, Nicholson RI, Gee JM.
Prospects for combining hormonal and nonhormonal growth factor inhibition. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12 Suppl):4350s-4355s; discussion 4411s-4412s. Review.

Webb P, Nguyen P, Kushner PJ.
Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. J Biol Chem. 2003 Feb 28;278(9):6912-20. Epub 2002 Dec 13.

Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ.
The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. Mol Endocrinol. 1999 Oct;13(10):1672-85.

Weinstein EJ, Grimm S, Leder P.
The oncogene heregulin induces apoptosis in breast epithelial cells and tumors. Oncogene. 1998 Oct 22;17(16):2107-13.

Weiss FU, Wallasch C, Campiglio M, Issing W, Ullrich A.
Distinct characteristics of heregulin signals mediated by HER3 or HER4. J Cell Physiol. 1997 Nov;173(2):187-95.

Wells A.
EGF receptor. ; Int J Biochem Cell Biol. 1999 Jun;31(6):637-43. Review.

White E.
Life, death, and the pursuit of apoptosis; Genes & Development 1996; 10: 1-15

Whitmarsh AJ, Davis RJ.
Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. J Mol Med. 1996 Oct;74(10):589-607. Review.

Wilson JW, Wakeling AE, Morris ID, Hickman JA, Dive C.
MCF-7 human mammary adenocarcinoma cell death in vitro in response to hormone-withdrawal and DNA damage. Int J Cancer. 1995 May 16;61(4):502-8.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D.
Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol. 1984 Jan;142(1):67-77.

Xu Y, He B, Wang YJ, Fu Q.
Effect of herceptin combined with Doxorubicin on rat cardiotoxicity; Ai Zheng. 2004 Apr;23(4):367-71.

Yang D, Wang S, Wang S, Ye Y, Cui Z.
[Effect of mitogen-activated protein kinase signal transduction in non-estrogen antagonistic mechanism of tamoxifen] Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2002 Sep 25;82(18):1232-4.

Yoo JY, Lessor T, Hamburger AW.
Inhibition of cell proliferation by 17beta-estradiol and heregulin beta1 in estrogen receptor negative human breast carcinoma cell lines. Breast Cancer Res Treat. 1998 Sep;51(1):71-81.

Yuste L, Montero JC, Esparis-Ogando A, Pandiella A.
Activation of ErbB2 by overexpression or by transmembrane neuregulin results in differential signaling and sensitivity to herceptin. Cancer Res. 2005 Aug 1;65(15):6801-10.

Zhang CC, Shapiro DJ.
Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. J Biol Chem. 2000 Jan 7;275(1):479-86.

Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T, Tsuchiya A, Abe R, Takenoshita S.
Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. Clin Cancer Res. 1999 Oct;5(10):2971-7.

Zheng J, Yao Z.
[Effect of tamoxifen on apoptosis and drug resistance of breast cancer cells in vitro] Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 2000 Jan;22(1):55-7. Chinese.

Zimmermann S, Moelling K.
Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science. 1999 Nov 26;286(5445):1741-4.

Zinkernagel RM; Grundlagen der Immunologie. In Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: Medizinische Mikrobiologie; 9. Auflage, (43- 130), Thieme, Stuttgart; 1998

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. K. Diedrich, dem Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsklinik Lübeck, danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien, Geräte und des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. O. Ortmann, für die Auswahl des Themas und seine Ratschläge bezüglich der Durchführung der Arbeit. Dadurch konnte ich tiefe Einblicke in die Molekularbiologie und die gynäkologische Onkologie gewinnen.

Gleichzeitig bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. O. Treeck, dem Leiter des wissenschaftlichen Labors, für seine ständige Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit, besonders für die Beantwortung aller Fragen hinsichtlich der Versuchsplanung, der statistischen Auswertung und dem Abfassen der Dissertationsschrift und die ständige Ermutigung auch in schwierigen Phasen.

Nicole Bohnert und Constanze Siggel möchte ich für das Beibringen aller notwendigen Handgriffe bei der Laborarbeit, für die Hilfe bei der Pflege meiner Zellkulturen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen danken. Außerdem möchte ich mich bei Dr. med. Nicola Frey bedanken, die mir mit ihrem Rat zur Seite stand.

Meinen Eltern, Marianne und Manfred Weber, danke ich dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, das Medizinstudium zu absolvieren und diese Arbeit durchzuführen. Außerdem bedanke ich mich für die ständige moralische Unterstützung, insbesondere bei dem schriftlichen Teil der Arbeit und für eure Liebe und euer Vertrauen.

Und zuletzt bedanke ich mich bei meinem Ehemann, Dr. med. Ch. Siebel, der mich nachts vom Labor abgeholt hat und mich durch seine ständige Unterstützung zum Abschluss dieser Arbeit gebracht hat.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliches:

Name:	Siebel (geb. Weber)
Vorname:	Angela
Geburtsdatum:	04.08.1978
Geburtsort:	Eberswalde- Finow
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Adresse:	Dr.- Hans- Wolf- Straße 24, 19055 Schwerin
Ehepartner:	Dr. med. Christian Siebel, Arzt
Eltern:	Manfred Weber, Steuerfachangestellter
	Marianne Weber, geb. Gloeck, Steuerfachangestellte
Geschwister:	Steffen Weber, Einzelhandelskaufmann

Schulausbildung:

1985- 1987	Polytechnische Oberschule (POS) Sigmund Jähn in Schwerin
1987- 1990	POS Juri Gagarin mit erweitertem Russischunterricht in Schwerin
1990- 1992	POS Katja Niederkirchner in Wittenburg
1992- 1997	Gymnasium Wittenburg; Abschluss mit dem Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr:

1997- 1998	FSJ im Psychiatrischen Pflege- und Förderheim Neubukow

Studium und Beruf:

1998- 2005	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
	Physikum 9/ 2000
	Erstes Staatsexamen 8/ 2001
	Zweites Staatsexamen 4/ 2004
	Drittes Staatsexamen 5/ 2005
9/ 2005- 8/ 2006	Anstellung als Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin in der Asklepios Klinik Parchim
seit 09/ 2006	Anstellung als Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin in den Schweriner Helios Kliniken

10. Veröffentlichungen

Treeck O, Weber A, Boester M, Porz S, Frey N, Diedrich K, Ortmann O.

H-ras dependent estrogenic effects of epidermal growth factor in the estrogen-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. Breast Cancer Res Treat. 2003 Jul;80(2):155-62.

Treeck O, Weber A, Getschmann N, Siggel C, Diedrich K, Ortmann O

Interaction of estrogen receptor and receptor tyrosine kinases: Effects on the efficacy of antitumoral substances. American Association for Cancer Research. 93rd Annual Meeting, San Francisco, California, Volume 43, March 2002, Artikel Nr. 4683, Seite 946