

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Philipps-Universität Marburg
Geschäftsf. Direktor: Professor Dr. med. Th. Gudermann

**Resistenz von Brust- und Ovarialkarzinom-Zellen
gegenüber Chemotherapeutika in
Abhängigkeit von der Expression des
HER-2 neu-Rezeptors**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin (Dr. med.)
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Jürgen Johannes Apel
aus Georgsmarienhütte

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 23.06.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. F. Czubayko

Coreferent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Jackisch

Meinen Eltern

1	EINLEITUNG	3
1.1	Onkogen-Targeting als spezifischer Ansatz in der Krebstherapie	3
1.2	HER-2	4
1.2.1	Extrazelluläre HER-2 Rezeptordomäne (HER-2-ECD)	6
1.2.2	Herceptin (Anti-HER-2-Antikörper)	7
1.3	HER-2-Ribozymtargeting in SKOV-3-Ovarialkarzinomzellen	8
1.4	Überexpression der dominant negativen Rezeptormutante in MCF-7-Brustkarzinomzellen	10
1.5	Einfluss von HER-2- und HER-2-ECD-Überexpression auf die Sensitivität gegenüber Zytostatika	11
1.5.1	Zytostatika in der Therapie von Mamma- und Ovarialkarzinomen und ihre Wirkmechanismen	14
1.5.2	rViscumin, ein neues Zytostatikum	15
1.6	Aufgabenstellung und Arbeitshypothesen	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Materialien	17
2.1.1	Materialien für die Kultivierung von Zellen	17
2.1.2	Chemikalien, Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Antikörper	17
2.1.3	Fertige Versuchskits	18
2.1.4	Kunststoff-Einwegmaterialien	18
2.1.5	Laborgeräte	18
2.2	Molekularbiologische und proteinchemische Verfahren	19
2.2.1	DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie	19
2.2.2	Proteinbestimmung im Biorad Proteinassay	19
2.2.3	Transformation von E. coli	20
2.2.4	Präparative Plasmidisolierung mit Qiagen-tip 500 Säulen	21
2.2.5	Restriktionsanalyse von Plasmid DNA	21
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.3	Verfahren in der Zellkultur	23
2.3.1	Kultivierung von Zellen	23
2.3.2	Passagieren von Zellen	23
2.3.3	Zellzahlbestimmung	24
2.3.4	Kryokonservierung	25
2.3.5	Auftauen von Zellen	25
2.4	Zellbiologische und immunchemische Verfahren	26
2.4.1	Transfektion von Tumorzellen mit Plasmid DNA	26
2.4.2	Selektionierung von transfizierten Zellen	26
2.4.3	Zellwachstumskinetik	27
2.4.4	Zellwachstum unter Zytostatika	27

2.4.5	Zellwachstum im Softagar	28
2.4.6	HER-2 ELISA	29
2.4.7	Apoptose ELISA	30
2.4.8	Annexin V-FITC Apoptose Analyse	31
2.4.9	FACS - Zellzyklusanalyse	32
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Bedeutung der HER-2-Rezeptorexpression in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen	34
3.1.1	Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf das Zellwachstum	34
3.1.2	Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf die Resistenz von SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika	35
3.1.3	Einfluss der HER-2-Level auf die basale und die Zytostatika-vermittelte Apoptose-Induktion in SKOV-3-Zellen	41
3.1.4	Beeinflussung des Zellzyklus durch Paclitaxel, Topotekan bzw. rViscumin in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen in Abhängigkeit vom HER-2-Level	45
3.2	Bedeutung der extrazellulären HER-2-Rezeptordomäne (ECD) in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen	48
3.2.1	Einfluss der HER-2-ECD Expression auf das Wachstum von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen	48
3.2.2	Einfluss der Expression der HER-2-ECD auf die Resistenz von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika	49
3.2.3	Einfluss der HER-2-Level auf die basale und die Zytostatika-vermittelte Apoptose-Induktion in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen	51
3.2.4	Beeinflussung des Zellzyklus durch Paclitaxel und Topotekan in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen in Abhängigkeit von der HER-2-ECD-Expression	53
4	DISKUSSION	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS	67
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
8	ANHANG	78
8.1	Publikationen	78
8.2	Ehrenwörtliche Erklärung	80
8.3	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer	81
8.4	Lebenslauf	82
8.5	Danksagung	84

1 Einleitung

1.1 Onkogen-Targeting als spezifischer Ansatz in der Krebstherapie

Tumorerkrankungen nehmen in den letzten Jahren einen immer größer werdenden Prozentsatz der Krankheiten in unserer Bevölkerung ein. Allein in Deutschland betrug 1998 die Zahl der neuauftretenden Leiden 347.217 (Männer und Frauen). Die Sterbezahl lag im selben Jahr bei 212.353 (Deutsches Krebsregister). Seit 1950 werden intensive Bemühungen unternommen, die Entwicklung von Chemotherapeutika für die Therapie von Krebserkrankungen weiter voranzutreiben. Spätestens in den frühen 70er Jahren aber wurde klar, dass dieser Ansatz die Mehrzahl der Krebserkrankungen nicht heilen oder zumindest kontrollieren konnte. Die Chemotherapie ist immer noch zu unspezifisch und geht mit hohen Toxizitäten sowie bedeutenden Nebenwirkungen einher.

Über die letzten 30 Jahre hat viel innovative Forschungsarbeit dazu beigetragen, dass unser Wissen über die Biologie und die Genetik der Zelle enorm zugenommen hat. So beginnen wir, die Veränderungen in Genetik und Zellbiologie, die für eine maligne Transformation von Zellen verantwortlich ist, besser zu verstehen, und das ermöglicht es Therapien zu entwickeln, die selektiv maligne Zellen angreifen können.

Protoonkogene sind Gensequenzen, die jede natürliche Zelle in sich trägt aber nicht exprimiert. In Tumorzellen werden diese Gene aufgrund von z.B. Mutationen oder viralen Transformationen überexprimiert und befinden sich nicht mehr unter der Kontrolle wichtiger zellregulatorischer Mechanismen. Man nennt diese dann Onkogene. Sie können für viele Arten von Onkoproteinen kodieren, die das Wachstum der Tumorzellen durch autokrine und parakrine Stimulation durch Anregung der Angiogenese beschleunigen. Durch die Überexpression von VEGF (Vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) und TGF- α (transforming growth factor α) wird so z.B. die Tumorangiogenese gefördert und sorgt damit durch eine Sicherstellung der Versorgung des Tumors für ein schnelleres Wachstum. Therapeutisch werden diese Erkenntnisse genutzt, indem man Angiogenese-Inhibitoren entwickelt, die die Expression von Angiogenese-fördernden Proteinen (u.a. VEGF, bFGF und TGF- α) in den Tumorzellen hemmen (z.B. Avastin = VEGF-R-Antikörper; zugelassen bei metastasiertem Kolon-Karzinom (Hurwitz et al., 2004)).

In Tumoren wurde nicht nur eine vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren, sondern auch eine Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren gefunden. Bei natürlichen Rezeptorformen wird durch extrazelluläre Ligandenbindung die Tyrosin-Kinase-Aktivität gesteigert. Es kommt zur Rezeptor-Dimerbildung und Phosphorylierung von Substraten der Signaltransduktionskaskade. Onkogene Rezeptorvarianten bewirken dagegen oftmals, auch ohne Bindung von Wachstumsfaktoren, eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität. Der kausale Zusammenhang zwischen der Überexpression der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) und der Steigerung des Tumorstwachstums macht sie zu idealen Ansatzpunkten für eine Tumorthherapie. Es sind eine Vielzahl von RTK's bekannt. Die in den 80er Jahren zuerst entdeckten Rezeptoren waren HER-1 und HER-2 aus der Familie der HER-Rezeptoren (s. Kap. 1.2). Momentan sind spezifische Therapieansätze gegen HER-Rezeptoren ein Schwerpunkt der Antikrebsforschung. Es werden verschiedene Ansätze verfolgt, zu denen die intrazelluläre Expression von Anti-HER-2-Einzelstrangantikörpern (Graus-Porta et al., 1995; Barnes et al., 1996; Haynes et al., 1993; Huston et al., 1993), das HER-2 anti-sense targeting (Vaughn et al., 1995), die HER-2 spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren (Zhang et al., 1995), die Applikation von Anti-HER-2-Antikörpern (z.B. Herceptin) (Dickman et al., 1998; Shak et al., 1999; Baselga et al., 1996, 1998; Pegram et al., 1998; Pietras et al., 1998) und das Ribozym-Targeting der für den Rezeptor kodierenden mRNA (s. Kap. 1.3) gehören.

1.2 HER-2

Der HER-2-Wachstumsfaktorrezeptor ist ein 185-kDa-Transmembran-Glykoprotein (p185^{ErbB2}), das zur "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR)-Familie gehört (Bnagmann et al., 1986; Stern et al., 1986). Es existieren vier bekannte HER-Rezeptoren, HER-1 bis HER-4 (Peles et al., 1993; Alroy et al., 1997), die ein komplexes, interagierendes, bis dato noch nicht ganz verstandenes Netzwerk bilden, das diverse biologische Prozesse wie z.B. Embryogenese und Onkogenese kontrolliert (Alroy et al., 1997; Pinkas-Kramarski et al., 1997). In 20-30% der menschlichen Adenokarzinome von Brust, Ovar, Endometrium, Lunge und Magen findet sich eine Überexpression von HER-2 (Stankovski et al., 1994). Von großer Bedeutung hierbei ist, dass diese mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit Brust- (Slamon et al., 1987) und Ovarialkarzinomen (Slamon et al., 1989) einhergeht. Es zeigt sich ein

aggressiveres und schnelleres Tumorwachstum und ein größeres Metastasierungspotential bei HER-2-überexprimierenden Tumoren (Tan et al., 1997; Yu et al., 1994). Des Weiteren korreliert die Anzahl der Lymphknotenmetastasen mit der HER-2-Überexpression (Slamon et al. 1987, 1989). Genauere Untersuchungen der Ursachen des erhöhten Metastasierungspotentials ergaben, dass durch die Überexpression von HER-2 die Aktivität von MMP-9 und MMP-2, zweier Proteasen, erhöht ist, und damit die Invasivität eines Karzinoms gesteigert werden kann (Tan et al., 1997). Zum anderen wird auch ein Anstieg der VEGF- (Vascular Endothelial Growth Factor) Expression beobachtet. Die Steigerung der Proteaseaktivität und die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren, die das Gefäßwachstum steigern, kann zu einer verstärkten Angiogenese führen (Petit et al., 1997). Die Aufgabe des HER-2-Rezeptors, für den im Gegensatz zu den anderen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der HER-Familie kein natürlicher Ligand gefunden werden konnte (Hynes und Stern, 1994; Tzahar und Yarden, 1998), wird in einer Heterodimerbildung mit den Rezeptoren HER-1, HER-3 und HER-4 (Yarden and Schlessing, 1987 a,b) und in einer damit verbundenen Steigerung der Affinität der HER-Rezeptoren gegenüber ihren natürlichen Liganden (Jones et al., 1999) gesehen. Die Heterodimerform zwischen HER-2 und HER-1 (EGFR) bildet sich bevorzugt im Vergleich zu Homodimerformen der einzelnen Rezeptoren (Quian et al., 1994b), was auch für die HER-3- und HER-4-Rezeptoren beobachtet wurde (Tzakar et al., 1996). Der HER-4-Rezeptor ist im Rahmen der neuronalen und kardialen Embryonalentwicklung von großer Bedeutung (Gassmann et al., 1995). HER-3 und HER-4 binden als natürlichen Liganden das Heregulin. Im Zustand der monomeren Rezeptorform hat HER-3 bei der Bindung mit Heregulin eine Tyrosinkinaseaktivität, die im Vergleich zur Coexpression mit HER-2 vermindert ist (Guy et al., 1994, Kim et al., 1994). Wird HER-3 mit HER-2 überexprimiert, werden Tyrosinreste von HER-3 in der Zytoplasmadomäne phosphoryliert, die dann über den PI3-Kinase-Pathway ein Signal generieren (Carraway et al., 1994, Beerli et al., 1995). Ein funktioneller Heregulin-Rezeptor kann daher als ein Heterodimer von HER-3 und HER-2 gesehen werden, indem HER-2 die Affinität von HER-3 zu Heregulin moduliert. Die enge Rezeptorabhängigkeit unter den HER-Rezeptoren wurde durch Untersuchungen von Spivak-Kroizman et al., (1992) weiter erforscht. Sie fanden bei der Überexpression von HER-2 und HER-1, denen beiden durch gezielte Mutation ein Grossteil des intrazellulären Rezeptors fehlte, eine deutlich eingeschränkte

Kinaseaktivität. Wurde hingegen HER-1 mit fehlender Kinaseaktivität mit funktionstüchtigem HER-2 überexprimiert, kam es dennoch zur Transphosphorylierung der mutierten-HER-1-Rezeptoren.

Die Heterodimerbildung von HER-2 mit HER-1-, HER-3- oder HER-4-Rezeptoren führt also zu einer Kompensation von eventuell defekten Rezeptoren und vor allem zu einer vielfachen Verstärkung der Signaltransduktion intakter Rezeptoren. Diese erhöhte Signaltransduktionsrate, und insbesondere die sich daraus ergebende Stimulation des Zellwachstums (Karunagaran et al., 1996, Graus-Porta et al., 1997) führen dazu, dass Zellen durch Überexpression von HER-2 einen Wachstumsvorteil entwickeln (Salomon et al., 1995; Alroy et al., 1997). Ob auch die Bildung von Oligomeren (Strukturaggregaten höherer Ordnung) in der HER-Familie eine funktionelle Rolle spielt, konnte bis jetzt noch nicht bewiesen werden. Mutationsanalysen (le Veau et al., 1993), Untersuchungen der Bindungskinetiken (Wada et al., 1990) und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Gadella und Jovin., 1995) sind Gegenstand aktueller Forschung.

HER-2 spielt also eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Wachstumsstimuli über die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren der HER-Familie in das Innere der Zelle und bildet daher auch den Hauptansatzpunkt in der Entwicklung antiproliferativer Agenzien.

1.2.1 Extrazelluläre HER-2 Rezeptordomäne (HER-2-ECD)

Von vielen Transmembran-Wachstumsfaktoren wurden lösliche, ligandenbindende Rezeptorformen beschrieben, die im konditionierten Medium von Tumorzellen oder in biologischen Flüssigkeiten wie Serum oder Urin (Mosley et al., 1989; Petch et al., 1990; Zabrecky et al., 1991) nachweisbar sind. Dieses weitgestreute Vorkommen von trunkeerten Rezeptor-ECD-Formen, gerade bei Wachstumsfaktor-überexprimierenden Tumoren, weist auf die womöglich große Bedeutung dieser Rezeptoren hin. Ein Großteil der trunkeerten Rezeptorformen entsteht durch proteolytische Spaltung des full-length-Rezeptors an der Zelloberfläche, wie es auch für den koloniestimulierenden Faktor I und den Interleukin-II-Rezeptor beschrieben wurde (Downing et al., 1989; Loughnan et al., 1988; Rubin et al., 1985). Im Falle des HER-2 ist ein wichtiger weiterer Mechanismus der Entstehung solcher trunkeerter Rezeptorformen das „splicing“ der Rezeptortranskripte in eine Form, die die Transmembran- und die intrazelluläre Domäne eliminiert (Scott et al., 1993). Dieses wurde auch für Interleukin-

4, Fc- und EGF-Rezeptoren gezeigt (Mc Kenzie et al., 1992; Mosley et al., 1989; Petch et al., 1990), aber auch für mindestens zwei trunkierte HER-2-ECD-Rezeptorformen konnte eine solcher Entstehungsmechanismus durch abweichende HER-2-mRNA-Varianten gefunden werden. Scott et al. beschrieben als erste eine 2.3 kb HER-2-mRNA-Variante, die für die ersten 633 Aminosäuren (AS) kodiert und somit fast die ganze HER-2-ECD enthält (Scott et al., 1993).

Später wurde noch eine andere lösliche, trunkierte 68 kDa HER-2-Rezeptorform beschrieben, welche die ersten 340 AS des HER-2-Rezeptors, verbunden mit einem einzelnen "Stretch" von 79 AS (kodiert durch Einfügen einer neuen Intronsequenz in das Transkript) enthält (Doherty et al., 1999). Die möglichen physiologischen Effekte der trunkierten Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind noch weitgehend unerforscht. Das sezernierte 68 kDa Protein (Doherty-Variante) fungiert, wahrscheinlich durch eine Wechselwirkung mit der HER-Rezeptor Dimerbildung, als ein autokriner Wachstumsinhibitor in vitro (Doherty et al., 1999). Für die durch Scott et al. erstbeschriebene trunkierte 100 kDa Rezeptorform wurde eine Hemmung der proliferations-inhibierenden Wirkung monoklonaler HER-2-Antikörper durch einen vermutlich intrazellulären Wirkmechanismus gefunden (Scott et al., 1993). Aigner et al. konnten zeigen, dass die 100 kDa extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors dominant negativ die wachstumsfaktorvermittelte Tumorzellvermehrung inhibiert. Dazu wurde in MCF-7-Brustkarzinomzellen eine 2.3 kb HER-ECD-cDNA Doxycyclin-reguliert überexprimiert. Diese bewirkte sowohl eine HER-2-ECD-vermittelte Hemmung der Spontanproliferation, als auch einen Abbruch Heregulin-induzierter Proliferation (Aigner et al., 2001).

In dieser Arbeit soll anhand des gleichen Zellmodells (Doxycyclin-regulierte Überexpression von HER-2-ECD in MCF-7 Brustkarzinomzellen) der Ursache für das unterschiedliche Proliferationsverhalten unter Berücksichtigung von Veränderungen in Apoptose und Zellzyklus nachgegangen werden. Im Weiteren soll die Frage gestellt werden, ob unterschiedliche Expressionslevel der 100 kDa HER-2-ECD-Variante die Sensitivität von MCF-7-Zellen gegenüber Chemotherapeutika beeinflusst.

1.2.2 Herceptin (Anti-HER-2-Antikörper)

Herceptin ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne (ECD) des HER-2-Rezeptors gerichtet ist. Er hatte in präklinischen Studien und in Phase II und

III der klinischen Studien hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum und sensibilisierende Effekte gegenüber der Chemotherapie mit Taxol gezeigt (Dickman et al., 1998; Shak et al., 1999; Baselga et al., 1996, 1998; Pegram et al., 1998; Pietras et al., 1998) und wird zur Zeit mit vielversprechenden Erfolgen bei der Behandlung von Patientinnen mit HER-2 überexprimierendem, metastasiertem Brustkarzinom eingesetzt (Cobleigh et al., 1999; Shak., 1999).

Dem Auftreten trunkierter HER-2-Rezeptor-ECD-Formen kommt im Zusammenhang mit dem Einsatz von Herceptin eine womöglich entscheidende Bedeutung zu. Scott et al. konnten schon 1993 in Transfektionsstudien zeigen, dass eine starke Produktion der von ihnen entdeckten 100 kDa HER-2-ECD-Variante in Tumorzellen, die den 185 kDa HER-2-Rezeptor überexprimieren, den wachstumsinhibierenden Effekt von Herceptin aufheben. Dieser kann, unabhängig vom Entstehungsmechanismus der HER-2-ECD-Form (s. Kap. 1.2.1), als der Gleiche angesehen werden. So fanden auch Brodowicz et al. (1997) eine Beeinflussung der Herceptin-Wirkung durch proteolytisch entstandene HER-2-ECD-Fragmente. Dieses kann durch Patientenserum-Untersuchungen bestätigt werden (Baselga et al., 1996), in denen sich bei Anwesenheit von p185 HER-2-Antigenfragmenten im Serum eine schlechte Ausgangslage für eine Anti-HER-2 monoklonale Antikörpertherapie zeigte.

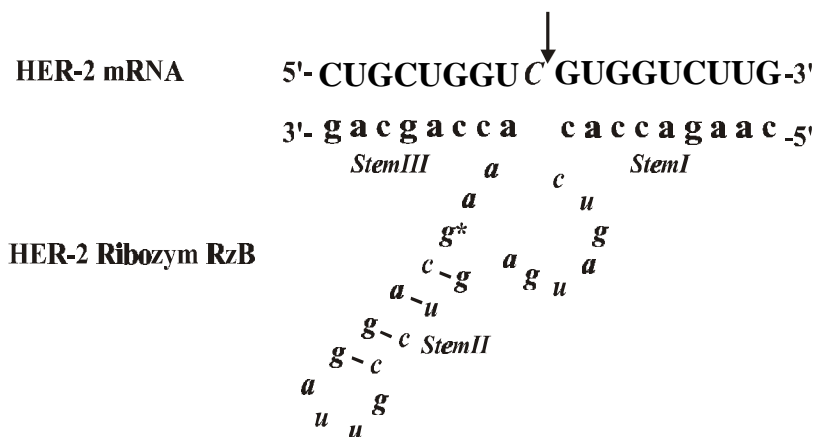
Monoklonale Antikörper mögen also nicht unbedingt der ideale Mechanismus für die therapeutische Manipulation des HER-2-Signaltransduktionswegs sein. Sie reagieren nur mit der extrazellulären Domäne des 185 kDa HER-2-Rezeptors. Isoliert, z.B. im Rahmen einer onkogenen Rezeptorveränderung, auftretende intrazelluläre Rezeptordomänen, die keinen transmembranen- und extrazellulären Anteil haben und dennoch über mitogene Aktivität verfügen, werden über eine Antikörpertherapie nicht erreicht (Graus-Porta et al., 1995).

1.3 HER-2-Ribozymtargeting in SKOV-3-Ovarialkarzinomzellen

Unter Ribozymen versteht man enzymatisch aktive RNA-Moleküle (Ribozym = ribonucleic acid-derived enzyme). RNA wurde ursprünglich nur als ein Satz von Molekülen gesehen, der Struktur vermittelt oder für Information kodiert. Die Entdeckung der enzymatischen Aktivität der RNA durch Altmann und Cech (Cech T.R., 1990) änderte diese traditionelle Ansicht der Funktion der RNA. Es ist nun

offensichtlich, dass RNA als ein Enzym agieren kann und fähig ist Reaktionen zu katalysieren, die vorher nur mit Proteinenzymen assoziiert waren.

Als das Wirkprinzip von natürlich vorkommenden Ribozymen, die in cis (auf sich selbst) agieren, entdeckt war, wurde schnell offensichtlich, dass man sie auch in trans (auf andere Moleküle wirkend) umformen konnte, und sie damit so zu erstellen sind, dass theoretisch jede RNA angegriffen werden kann. Dieses wurde ursprünglich für das Gruppe-I-Intron und für das Hammerhead-Ribozym gezeigt (Uhlenbeck et al., 1997; Haseloff et al., 1988). Die meistbenutzten Hammerhead-Ribozyme sind vom „Haselhoff-Gerlach Ribozym“ abgeleitet (Haselhoff et al., 1988). Basierend auf Mutationsanalysen, die essentielle Elemente der katalytischen RNA-Aktivität zeigten (McCall et al., 1992), wurde das Hammerhead-Ribozym modifiziert und verkleinert zu einem 22 Nukleotid großen Zentrum (s. stem II, Abb.1) (Czubayko et al., 1994). Abb. 1 zeigt die Struktur dieses Ribozymtyps und die Interaktion mit dem Zielsubstrat. Das minimierte enzymatisch aktive Zentrum (s. stem II in Abb. 1) und zwei ansetzende Arme von 9 bzw. 8 Nukleotiden (stems I und III) ergeben zusammen ein Ribozym von 39 Nukleotiden. Die seitlich ansetzenden Sequenzen von Stem I und Stem III hybridisieren als Antisense-Sequenzen mit der Ziel-RNA durch Basenpaarung und führen zu der hohen Spezifität von Hammerhead-Ribozymen.



Pfeil markiert die Ribozym Spaltungsstelle.

Abb. 1-1: Struktur eines Hammerhead-HER-2-Ribozyms, hybridisiert mit der Ziel HER-2 mRNA. Stem I und III sind Antisense-Sequenzen, die mit der Ziel mRNA hybridisieren. Stem II ist das katalytisch aktive Zentrum des Ribozyms.

Das HER-2-Ribozym RzB greift die HER-2-mRNA 1991 Nukleotide downstream vom Translationsstartpunkt an. Diese Region entspricht bei Übertragung auf die Proteinebene der Transmembranregion (TM) des HER-2 Rezeptors.

Die DNA-Sequenz für das HER-2-Hammerhead-Ribozym RzB wurde in ein Expressionsplasmid unter Kontrolle des CMV-Promotors inseriert (Czubayko et al., 1994; Juhl et al., 1997; Czubayko et al., 1997) und in den hier verwendeten SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen stabil exprimiert (Aigner et al., 2000; Hsieh et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Hammerhead-Ribozyme sehr effizient den HER-2-Rezeptor in überexprimierenden Ovarialkarzinom-Zellen herunterregulieren können (Czubayko et al., 1997; Juhl et al., 1997). Dieser Ansatz des Angreifens von mRNA, die für definierte Moleküle kodiert, erlaubt es, selektiv bestimmte Genprodukte in Tumorzellen zu untersuchen, und wird in dieser Arbeit für die Untersuchung des HER-2-Rezeptors in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen gewählt. SKOV-3-Zellen eignen sich aufgrund ihrer begrenzten Expression von HER-Rezeptor-Subtypen sehr gut, um den HER-2-Rezeptor zu untersuchen. Sie exprimieren sehr viel HER-1 und HER-2, während die HER-3- und HER-4-Level nur sehr gering sind (Hsieh et al., 2000). Dieses schränkt die vielen Interaktionsmöglichkeiten des HER-Rezeptor-Netzwerks und seinen Liganden ein. In massentransfizierten SKOV-3-Ribozym-Zellen wurde eine 50 % Reduktion des HER-2-Gehalts erreicht. Um Zellen mit stärker reduzierter HER-2-Expression zu isolieren, wurde eine klonale Selektionierung durchgeführt. Die verschiedenen HER-2-Level einiger selektionierter Klone wurden in der FACS-Analyse ermittelt. Sie lassen sich einteilen in: sehr geringe (< 10 % - Klon Rz. 3.8), geringe (ca. 20 % - Rz. 3.3), mittlere (ca 50 % - Rz. 3.7) und hohe (100 % - Wildtyp) HER-2-Expression.

Klon Rz. 3.8 weist eine Reduktion der HER-2-Expression um mehr als 90 % auf (Aigner et al., 2000; Hsieh et al., 2000). Die direkte Abhängigkeit des Wachstums von der HER-2-Expression lässt sich auch im Soft Agar bei allen Klonen zeigen. So wurde eine Abnahme der Koloniezahlen beim mäßig HER-2-exprimierenden Klon Rz. 3.7 um 45 %, beim im Vergleich weniger exprimierenden Klon Rz. 3.3 um 70 % und beim sehr wenig HER-2-exprimierenden Klon Rz. 3.8 von über 95 % nachgewiesen (Hsieh et al., 2000).

1.4 Überexpression der dominant negativen Rezeptormutante in MCF-7-Brustkarzinomzellen

Die Überexpression der trunkeierten 100 kDa ECD-Variante des HER-2-Rezeptors (s. Kap. 1.2.1) wurde hier als alternativer Ansatz zur ribozymvermittelten

Herunterregulation des HER-2-Rezeptors (s. Kap. 1.3) gewählt. Diese trunkierte ECD-Rezeptorform ist bereits für ihre HER-2-Rezeptor antagonistischen Eigenschaften bekannt und stellt eine dominant negative Rezeptormutante dar. Um die Bedeutung dieser trunkierten ECD-Rezeptorform genauer zu untersuchen, wurden MCF-7-Brustkarzinomzelllinien als Modell gewählt. Diese exprimieren die HER-2-Rezeptormutante im ursprünglichen Zustand nicht und den vollständigen HER-2-Rezeptor nur in geringem Maße.

Ein Doxycyclin-reguliertes Expressionssystem (beschrieben in: Juhl et al., 1997) dient der Überexpression der 2,3 kb HER-2-ECD-mRNA in MCF-7-Zellen. Stabil transfizierte MCF-7-HER-2-ECD-Zellen werden über mehrere Wochen unter Zugabe oder in Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert. In Northern Blot Analysen wurde gezeigt, dass die Expression der 2,3 kb HER-2-ECD-mRNA durch Zugabe von Doxycyclin um über 90 % gesenkt werden kann (Aigner et al., 2001). Dieses entspricht den Ergebnissen aus dem HER-2-ELISA, in dem eine 10-fach geringere Menge an HER-2-ECD-Rezeptorprotein, bei Zellen die ohne Doxycyclin inkubiert wurden, im Zellysat nachgewiesen werden konnte (Aigner et al., 2001).

1.5 Einfluss von HER-2- und HER-2-ECD-Überexpression auf die Sensitivität gegenüber Zytostatika

Aus den Beobachtungen, dass manche Patientinnen mit Brust- oder Ovarialkarzinomen besser auf eine Chemotherapie ansprechen als andere, wurde eine Rezeptorstatusabhängigkeit postuliert. Im Bezug auf das Mammakarzinom wurde schon 1992 in ersten klinischen Studien belegt, dass der Expression des HER-2-Rezeptors bei der zytostatischen Behandlung eine ganz entscheidende Bedeutung zukommt. So sind HER-2-überexprimierende Tumoren weniger empfindlich gegenüber einer Behandlung mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil) oder Epirubicin (Gusterson et al., 1992). In einer weiteren Studie konnte ein Ansprechen auf die Epirubicin-Therapie bei normaler HER-2-Expression in 65 % der Fälle, im Vergleich zu nur noch 32 % bei HER-2-Überexpression gezeigt werden (Jarvinen et al., 1998). Durch die Überexpression von HER-2 in Brustkarzinomen kann auch eine zunehmende Resistenz bei der Behandlung mit Taxol und Docetaxol (Taxotere) beobachtet werden. Die Apoptoseinduktion fällt durch erhöhte HER-2-Spiegel vermindert aus (Yu et al., 1998). Auch der Zusammenhang zwischen dem HER-2-Protein-Spiegel im

Patientenserum und dem Ansprechen auf die Chemotherapie zeigt gleiche Ergebnisse und kann die Zahlen von ca. 60 % bei normaler Expression des HER-2-Rezeptors versus ca. 30 % bei Überexpression (s.o.) bestätigen (Fehm et al., 1998; Mehta et al., 1998). Steigert man die Dosen der Chemotherapie, so kann gezeigt werden, dass Patientinnen mit HER-2-überexprimierenden Mammakarzinomen in frühen Stadien davon profitieren, während andere, die HER-2 nicht überexprimieren, keinen Vorteil erzielen (Muss et al., 1994). Diese Daten werden auch von Versuchen mit dem monoklonalen Antikörper Herceptin unterstützt, in denen der Anti-HER-2-Antikörper die Antitumoraktivität von Taxol und Doxorubicin gegen HER-2 überexprimierende Brustkarzinom-Xenotransplantate steigert (Baselga et al., 1998). Des Weiteren zeigen die Ergebnisse aus der Phase III der Herceptin-Testung, dass die Taxol-Ansprechraten von Patientinnen mit HER-2-überexprimierendem Brustkarzinom höher ist bei Behandlung mit Taxol plus Herceptin. Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse beim Ansprechen auf Taxol alleine signifikant schlechter (Pegram et al., 1998). Der Expressionsstatus des HER-2-Rezeptors in Mammakarzinomen nimmt also, bezogen auf die Chemotherapieplanung, eine ganz zentrale Stellung ein und gilt als prognostischer Faktor.

Die Bedeutung von HER-2 im Bezug auf Chemotherapie wird trotz dieser Ergebnisse (s.o.) kontrovers diskutiert. So ist in einer Untersuchung von 329 Patientinnen mit Brustkrebs (Stadium T2/T3-N0/N1b-M0) die HER-2-Expression nicht signifikant assoziiert mit dem Tumoransprechen auf neoadjuvante Chemo-Radiotherapie, die mit der FAC (Fluorouracil, Adriamycin und Cyclophosphamid) – Kombination oder mit Radiotherapie gefolgt von chirurgischer Behandlung durchgeführt wurde (Roza et al., 1998). In einer anderen Studie von 127 Brustkrebs-Patientinnen, die eine Behandlung nach dem FEC (Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid) – Schema entweder einmal pro Woche oder einmal alle 4 Wochen erhielten, hat die HER-2-Genamplifikation ebenfalls keinen prädiktiven Wert im Bezug auf das Ansprechen auf Chemotherapie (Niskanen et al., 1997). Einige mögliche Faktoren wie der Zeitpunkt der Behandlung (neoadjuvant oder adjuvant), das Alter und der menopausale Status der Patientinnen, der Östrogenrezeptorstatus und die Höhe des HER-2-Rezeptorstatus der Tumoren könnten mögliche Faktoren dieser unterschiedlichen Ergebnisse um die Bedeutung des HER-2-Rezeptors in Bezug auf modulierende Chemosensitivität sein. Wichtig ist auch, ob der Art der Chemotherapiebehandlung eine wesentliche Bedeutung zukommt, man also eine

vom HER-2-Status abhängige Chemosensitivität für jedes Zytostatikum getrennt beurteilen muss.

Beim Ovarialkarzinom scheint sich der Einfluss der HER-2-Expression von dem beim Mammakarzinom zu unterscheiden. Aigner et al. (2000) konnten zeigen, dass durch Überexpression des HER-2-Rezeptors die Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit Taxol signifikant gesteigert werden kann. Sie wählten den Ansatz des HER-2-Ribozymtargetings (s. Kap. 1.3), um die Rezeptorexpression zu minimieren, und untersuchten SKOV-3 Klon 3.8 (90 % Reduktion der HER-2-Expression (s. Kap. 1.3)) und Wildtyp HER-2-überexprimierende Kontrollzellen auf das Ansprechen auf Cisplatin, Doxorubicin und Taxol. Während die EC_{50} in „Proliferations-Assays“ bei der Behandlung mit Cisplatin und Doxorubicin durch die Veränderung im HER-2-Rezeptorstatus unbeeinflusst blieb, nahm die Sensitivität der Zellen gegenüber Taxol durch HER-2-Reduktion ca. 70-fach ab. Die Gründe für die durch HER-2-Expressionsunterschiede hervorgerufenen Resistenzänderungen gegenüber Chemotherapeutika sind bis dato weitgehend unerforscht. So wird oftmals das *mdr-1*-Gen (multi drug resistance gene) überexprimiert, wenn Zellen von einer Chemotherapie zur nächstfolgenden Behandlung resistenter werden. Das *mdr-1*-Gen kodiert für ein p-170-Glykoprotein, das ATP-abhängig als Transmembranpumpe die Akkumulation von Chemotherapeutika im Zellinnern vermindert und daher durch seine Überexpression die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika fördert (Moscow et al., 1988; Nooter et al., 1991). Eine Studie mit HER-2-cDNA transfizierten MDA-MB-435 Brustkarzinomzellen konnte zeigen, dass die HER-2-Überexpression zu einer zunehmenden Resistenz gegenüber Taxol und Taxotere führt, ohne eine Veränderung in der p170-Glykoprotein-Expression herbeizuführen (Yu et al., 1996). Dieses lässt schlussfolgern, dass eine Überexpression von HER-2 zu intrinsischer Taxolresistenz führen kann, unabhängig von *mdr-1*-basierten multi-drug-resistance Mechanismen (Yu et al., 1996).

In dieser Arbeit soll mittels Ribozymtargeting in den SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen der Einfluss der HER-2-Expression auf die Chemosensitivität weiter untersucht werden. Die von Aigner et al. durchgeführten Voruntersuchungen zur Chemosensitivierung von SKOV-3 Klon 3.8 Zellen (90 % HER-2-Reduktion, s.o.) auf eine Paclitaxelbehandlung sollen durch Analysen mit Klon 3.3- und Klon 3.7-Zellen (HER-2-Reduktion 80 bzw 50 %, s. Kap. 1.3) Zellen ergänzt werden. Hier soll herausgefunden werden, ob sich die

Sensitivität gegenüber Paclitaxel proportional zur HER-2-Expression ändert, sich also eventuell eine „HER-2-Gen-Dosis“-Abhängigkeit der Paclitaxel-Zytotoxizität zeigen ließe. Des Weiteren soll die Anzahl zu untersuchender Zytostatika erhöht werden (s. Kap. 1.5.1), um die beschriebene Zytostatikaspezifität auf eine mögliche Relevanz des Wirkmechanismus zu prüfen.

In MCF-7-Mammakarzinom-Zellen wird ein alternatives Modell zur Relevanz der HER-2-Expression gegenüber Chemotherapie geprüft. Der HER-2-Rezeptor wird nicht direkt herunterreguliert (z.B. durch Ribozyme, s. Kap. 1.3), sondern die extrazelluläre Rezeptordomäne, die dominant negativ den eigentlichen HER-2-„Full-length-Rezeptor“ beeinflusst, wird überexprimiert (s. Kap. 1.4). Es soll der Einfluss dieses trunkierten 100 kDa Rezeptorproteins auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika geprüft werden. Vordaten über den Einfluss der durch proteolytische Spaltung an der Zelloberfläche entstehenden HER-2-ECD (s. Kap. 1.2.1) auf Chemotherapie existieren einzig aus klinischen Studien. Hier korreliert das Ansprechen bereits metastasierter Brustkarzinome auf die erste Chemotherapie mit der Höhe des HER-ECD-Levels. Je höher der HER-ECD-Level, umso geringer ist das Ansprechen auf Chemotherapie (Fehm et al., 1998). Dieses kann ebenfalls bei der Anwendung adjuvanter Chemotherapie beim Brustkarzinom und bei der Kombination von Paclitaxel und Doxorubicin beobachtet werden (Colomer et al., 2000; Fehm et al., 1997; Mehta et al., 1988).

1.5.1 Zytostatika in der Therapie von Mamma- und Ovarialkarzinomen und ihre Wirkmechanismen

Um die Einflüsse sowohl des HER-2-Ribozymtargetings in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen als auch die der Überexpression der 100 kDa HER-2-ECD in MCF-7-Brustkarzinom-Zellen auf eine zytostatische Therapie zu untersuchen, wurden hier die im folgenden aufgelisteten Chemotherapeutika getestet. Die Zytostatika finden in der Therapie von Ovarial- und Mammakarzinomen entweder als Einzelsubstanzen oder in Kombinationschemotherapien Verwendung.

Zytostatikum	Wirkmechanismus	Zellzyklusspezifität
Paclitaxel	Bindung an Tubulin und Hemmung der Tubulindepolymerisation → pathologische Bildung und Stabilisierung der Mitosespindel, Mitosearrest	M-Phase
Vinblastin	-Bindung an Tubulin, Hemmung der Bildung der Mitosespindel, Mitosearrest -Hemmung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen → Hemmung der RNA-Synthese	G2- / M-Phase
Topotekan	Hemmung der Topoisomerase I, DNA-Religation↓↓ → DNA-Strangbrüche und Interkalation	G2- / M-Phase
Doxorubicin	DNA-Interkalation, Induktion von DNA-Strangbrüchen, Bildung freier Sauerstoffradikale, Hemmung der Topoisomerase II	S / G2-Phase
Cisplatin	kovalente Bindung von Platinkomplexen an DNA und Proteine → Platin-DNA-Addukte, „cross-linking“	G1- /S-Phase
rViscumin	katalytische Inaktivierung der ribosomalen 60 S Untereinheiten	

1.5.2 rViscumin, ein neues Zytostatikum

Mistlektin I (ML-I) wird in der adjuvanten Chemotherapie eingesetzt. Das rekombinante ML-I, rViscumin, zeigt eine starke Cytotoxizität gegenüber Tumorzellen in vitro und in vivo. Das Galactosid-spezifische ML-I ist die hauptsächlich wirksame Substanz aus Extrakten des *Viscum Album* (Mistel), welches weitverbreitet in Kontinental-Europa für mehr als 75 Jahre als Anti-Krebs-Mittel eingesetzt wurde (Kleinen et al., 1994). Das heterodimere 65 kDa Glykoprotein (Typ II) der Ribosomen-inaktivierenden Proteine katalysiert die selektive Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Ribose und Adenin am Nukleosid 4324 in der eukaryonten 28S ribosomalen RNA. Dieses inhibiert zum einen die Bindung des Elongationsfaktors 2 an die 60 S Untereinheit und führt außerdem zu einer Hemmung des Elongationsschrittes der Proteinbiosynthese (Endo et al., 1988). Während für diese ribosomale Inaktivierung die A-Kette des rViscumins verantwortlich ist, besitzt die B-Kette Lectin-Affinität und ermöglicht durch eine Bindung an die Zellmembran die Transduktion der A-Kette. Außerdem finden sich auf Tumorzellen oft veränderte, krebsspezifische Glykosylierungsmuster (Williams et al., 1997), die bevorzugte Bindestellen für ML-1

darzustellen scheinen (Brooks et al., 1998). Diese mögen der Grund für die besonders potente Wirkung von Mistel Lektin auf Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen sein. ML-1 ist in Gewebekulturen im femtomolaren bis unteren picomolaren Bereich wirksam (Mockel et al., 1997). Eine Apoptoseinduktion wurde in verschiedenen in vitro-Systemen gefunden (Williams et al., 1997; Brooks et al., 1998; Mockel et al., 1997). Zusätzlich haben mehrere Studien eine Aktivierung und/oder Proliferation von zellulären Komponenten des Immunsystems wie den T-Helfer-Zellen, Granulozyten, natürlichen Killerzellen und hämatopoetischen Stammzellen gezeigt, genauso wie eine erhöhte Freisetzung von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen. Dieses Therapeutikum soll hier auf seinen Einfluss gegenüber Brust- und Ovarialkarzinom-Zellen mit verschiedenen HER-2-Expressionslevel getestet werden.

1.6 Aufgabenstellung und Arbeitshypothesen

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der HER-2-Expression auf die Sensitivität von Mamma- und Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika untersucht werden. Drei Klone der Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV-3 (Rz.3.3, Rz.3.7 und Rz.3.8), die durch Ribozymtargeting unterschiedliche Expressionslevel des HER-2-Rezeptors aufweisen (s. Kap. 1.3), sollten in Wachstumsversuchen auf ihr Ansprechen gegenüber verschiedenen Zytostatika getestet und mit den Wildtyp-Zellen verglichen werden. Bei eventuellen Sensitivitätsunterschieden sollten diese auf ihre Proportionalität zur HER-2-Rezeptor-Expression (eventueller „Gen-Dosis-Effekt“) überprüft werden. In Mammakarzinom-Zellen (MCF-7-Zellen) wird die trunkierte 100 kDa-Rezeptor-ECD-Variante (s. Kap. 1.4), die dominant negativ den „HER-2-full length Rezeptor“ beeinflusst, überexprimiert, und auch hier soll der Einfluss auf das Zellwachstum ermittelt werden. Zellwachstumsversuche finden auf der Kunststoffoberfläche und im Soft-Agar statt.

Eventuell eintretende Änderungen der Sensitivität der Tumorzellen sollen zytostatikaspezifisch auf ihre Ursachen untersucht werden. Hierzu werden Veränderungen im Apoptose- und Zellzyklusverhalten spezifiziert. Die Apoptose-Induktion wird zum einen über einen ELISA quantifiziert und zum anderen mit Hilfe einer FACS-Analyse in Früh-, Mittel- und Spätapoptose differenziert. Der Zellzyklus wird anhand einer FACS-Analyse mit zusätzlicher Bestimmung der Cyclin-Expression untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien für die Kultivierung von Zellen

Kulturmedium IMDM (1x)	PAA Laboratories, Linz, Austria
IMDM (10X)	PAA Laboratories, Linz, Austria
Fetal Calf Serum Gold	PAA Laboratories, Linz, Austria
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (1x)	PAA Laboratories, Linz, Austria
Viralex Trypsin/EDTA (1x)	PAA Laboratories, Linz, Austria
LB-Medium	ISC Bio Express, Kaysville, UT
Gewebekulturflaschen 50ml, 250ml, 500ml	Greiner, Frickenhausen
6-,12-,96-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Sterilfilter	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Cell-Scraper	Nalge Nunc Int., Neerijse, Belgien

2.1.2 Chemikalien, Enzyme, Proteine, Farbstoffe und Antikörper

Ethanol 100% p.a.	Riedel-de Haen, Seelze
β -Estradiol	Sigma, Hanau
G418 Sulphate	PAA Laboratories, Linz, Austria
BM Cyclin	Boehringer, Mannheim
Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Heregulin- β 1	Neo Markers, Fremont, USA
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Boehringer, Mannheim
p-Iodonitrotetrazolium Violet	Sigma, Hanau
Doxycyclin Hydrochloride	ICN Biomedicals Inc., Ohio
Cisplatin	Universitäts-Klinikum, Marburg
Doxorubicin	Universitäts-Klinikum, Marburg
Etoposide (VP16)	Universitäts-Klinikum, Marburg
Paclitaxel	Universitäts-Klinikum, Marburg
Topotekan	Universitäts-Klinikum, Marburg

Vinblastin	Universitäts-Klinikum, Marburg
rViscumin	Viscum, Zwingenberg
Maus Anti-Human-Cyclin B1	Pharmingen, San Diego, USA
Anti-Maus-IgG, FITC-gekoppelt	Pharmingen, San Diego, USA
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Propidium Iodid	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin	Serva, Heidelberg

2.1.3 Fertige Versuchskits

Cell-Death Detection ELISA	Boehringer, Mannheim
c-erbB-2 ELISA	Calbiochem, San Diego, USA
Proteinassay	Bio Rad, München

2.1.4 Kunststoff-Einwegmaterialien

FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
PP-Test Röhrchen, steril (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Polyethylene 15ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrol 15ml Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen 1,25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
sterile Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5 Laborgeräte

Elisa-Reader	MWG, Ebersberg
Kryobox	Forma Scientific, Marietta, USA
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Biorad, München
Mikroskope	Esselte Leitz GmbH, Stuttgart
Mikrowelle	AEG GmbH, Nürnberg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten: 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bed, France
Reinraumwerkbank	Heraeus, Hanau

Vortex Genie 2	Scientific Industries,
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Heraeus Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Hämocytometer (Thoma-Zählkammer)	Marienfeld, Laude Königshofen

2.2 Molekularbiologische und proteinchemische Verfahren

2.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometrie

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Extinktionsmessung bei 260 nm mit Hilfe einer Quarzküvette in einem Spektralphotometer. Bei völlig unbekannter Konzentration empfiehlt es sich mehrere Verdünnungen einzusetzen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c_{(\text{DNA})} \text{ ng/}\mu\text{l} = A_{260} / 0,020 \times \text{Verd.}$$

Die Reinheit der DNA wird durch den Quotienten aus A_{260} und A_{280} bestimmt. Im Bereich von 1,7 und 2,0 liegt die DNA in einer guten Qualität vor.

2.2.2 Proteinbestimmung im Biorad Proteinassay

Für den Proteinassay wird eine Proteinverdünnungsreihe erstellt, mit Hilfe derer sich eine Eichgerade aufnehmen lässt. Hierfür eignet sich Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V in Aqua bidest.

Der Biorad Proteinassay kann in 96-Well Platten durchgeführt werden. Das Versuchskit von Biorad besteht aus den drei Lösungen A, B und S.

Zunächst wird durch Mischen der Lösungen A und S im Verhältnis 50:1 die Lösung A* hergestellt.

In eine Vertiefung der 96-Well Platte wird dann folgendes pipettiert:

22 μl	Lösung A*
5 μl	Protein (zu bestimmende Proteinlösung oder Standard)
177,6 μl	Lösung B

15 min Inkubation bei Raumtemperatur.

Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei 750 nm.

Anhand der Eichgeraden lässt sich nun die Proteinmenge in der zu untersuchenden Lösung bestimmen. Es empfiehlt sich, für den Versuch noch Verdünnungen der Proteinprobe mitzumessen, um bei der Messung im ELISA-Reader Absorptionswerte im sicher linearen Messbereich des Gerätes zu erhalten.

2.2.3 Transformation von E. coli

Bei der Transformation wird die Plasmid-DNA von kompetenten E. coli Bakterien aufgenommen.

Es werden zu Beginn so viele Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) auf Eis gestellt, wie Transformationsansätze gewählt werden. Es empfiehlt sich, mehrere Ansätze mit verschiedenen DNA-Konzentrationen und einen Kontrollansatz ohne Plasmid-DNA vorzubereiten.

Die kompetenten Zellen werden aus dem -70 °C Gefrierschrank genommen und ebenfalls auf Eis gelagert. Nach leichtem Durchmischen werden $50\text{ }\mu\text{l}$ der Zellen in jeden Ansatz gegeben. $1\text{-}3\text{ }\mu\text{l}$ Plasmid-DNA ($1\text{-}10\text{ ng}$) werden direkt zu den $50\text{ }\mu\text{l}$ pipettiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird der Ansatz für 2 min in ein 42 °C warmes Wasserbad gehalten und anschließend sofort wieder für 10 min auf Eis heruntergekühlt.

Nach Zugabe von $950\text{ }\mu\text{l}$ LB-Medium (RT) werden die Ansätze für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Selektion der E. coli Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, werden von den verschiedenen Ansätzen und von der Negativkontrolle $950\text{ }\mu\text{l}$ und $50\text{ }\mu\text{l}$ auf je eine LB-Medium-Platte ausgestrichen. Die LB-Platte enthält ein Antibiotikum, das den Resistenzen des Plasmids entspricht (hier: Ampicillin).

Zum Ausstreichen wird ein Drigalski-Spatel benutzt, der zwischen den einzelnen Ausstreichschritten durch Eintauchen in Alkohol und anschließendes Abflammen immer wieder optimal gesäubert werden kann.

Die Platten inkubieren über Nacht bei 37 °C .

Die Selektion positiver Klone erfolgt durch Ampicillin. Bakterien, die kein Plasmid, auf dem eine Ampicillin-Resistenz kodiert, aufgenommen haben, wachsen auf den LB-Ampicillin-Platten nicht.

2.2.4 Präparative Plasmidisolierung mit Qiagen-tip 500 Säulen

Mit einer Kolonie eines positiven Klones (siehe 2.2.3.) wird eine 300 ml LB-Ampicillin-Kultur angesetzt und für 12 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Die Kultur wird nach der Inkubation auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt (jeweils 150 ml) und bei 6000 x g 15 min zentrifugiert (Sorvall GSA). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml P1 Lysepuffer (RNase versetzt) gelöst. Nach weiterer Zugabe von 10 ml P2 Puffer (ebenfalls ein Lysepuffer) und vorsichtigem Mischen, wird die Lösung 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml P3 Puffer gestoppt und 20 min auf Eis gesetzt. Es entsteht ein Niederschlag, der gut gemischt werden sollte, bevor die Lösung dann bei 4°C und 20000 x g für 30 min zentrifugiert wird. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 20000 x g 15 min lang zentrifugiert.

Der Überstand wird auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-tip 500 Säule aufgetragen. Nach dem Durchlaufen wird die Säule mit 2 x 30 ml QC-Puffer gewaschen, und anschließend die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert.

Das Eluat wird in einem neuen Röhrchen aufgefangen und mit 10,5 ml Isopropanol unter kurzem Durchmischen 30 min auf Eis präzipitiert.

Danach wird die Lösung 30 min zentrifugiert (4 °C, 15000 x g in einer Beckman Ultrazentrifuge, Rotor SW28), und das Sediment durch Überschichten mit 30 ml Ethanol (70 %) und erneuter Zentrifugation (15 min, 4 °C, 15000 x g) gereinigt. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, die DNA bei Raumtemperatur (ca. 10 min) getrocknet und anschließend in 500 µl Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.5 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Die Restriktion mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.6) ist ein Verfahren, bei dem mit Hilfe von Restriktionsenzymen Plasmid-DNA in Fragmente geschnitten und diese dann sichtbar gemacht werden. Restriktionsenzyme erkennen sequenzspezifische Spaltstellen auf der Ziel-DNA. Durch charakteristische Fragmentmuster können so Plasmide überprüft werden.

Die Restriktion erfolgt in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml). Für eine effiziente Restriktion ist ein Milieu zu erstellen, in dem das Restriktionsenzym optimal arbeitet.

Daher wird ein vom Hersteller passend zum Enzym mitgelieferter 10x Puffer verwendet. Dieser Puffer (bei zwei verschiedenen Restriktionsenzymen muss ein Puffer gefunden werden, in dem beide Enzyme arbeiten) wird mit der Plasmidlösung des zu untersuchenden Plasmids, eventuell BSA-Lösung und dem entsprechenden Restriktionsenzym (das in seiner Stammlösung immer auf Eis gelagert werden sollte) zusammengegeben. Der Ansatz wird zur Verdünnung des Glycerin-haltigen Puffers mit Aqua bidest aufgefüllt.

Ansatz	
Puffer (10x)	3µl
Plasmid Lsg. ca. 1,5-2µg	1µl
BSA Lsg. (10x)	3µl
Stammlsg. Restriktionsenzym	1µl
Aqua bidest	22µl

Die Reaktion wird bei 37 °C 2 h inkubiert. Anschließend werden 15 µl davon mit 3 µl Probenauftragspuffer versetzt und auf das Agarosegel (siehe 2.2.6) geladen.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

In der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente, die durch negative Phosphatgruppen die Fähigkeit haben, im elektrischen Feld zu wandern, nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Netzstruktur der Agarose dient als Molekularsieb und bedingt die unterschiedliche Laufweite verschieden großer DNA-Fragmente. Die Konzentration der Agarose im Gel ist daher entscheidend für die Porengröße und damit die Auftrennung der DNA.

Entsprechend der Größe der DNA-Fragmente wird ein 0,7–1 prozentiges Agarose-Gel (0,7-1 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer) hergestellt. 0.7 g Agarose werden in 100 ml 1x TAE-Puffer, unter kurzem Aufkochen in der Mikrowelle, vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C und Zusatz von 1 µl Ethidiumbromid (c = 10 mg/ml), wird die Agarose in einen 7 x 10 cm großen Schlitten gegossen, und ein Kamm zur Ausbildung der Probenaschen eingesetzt. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der durch UV-Anregung sichtbar gemacht werden kann.

Nach Abkühlung der Agarose kann der Kamm entfernt werden, und der Gelschlitten in die Elektrophoreseapparatur eingebaut werden. Diese wird mit 1x TAE-Puffer gefüllt, bis der Gelschlitten gut überschichtet ist.

Bei der Probenauftragung wird nun für eine Tasche 1 µl eines 1 kb Längenstandards, 3 µl 10x Probenauftragspuffer (TAE, Glycerin, Bromphenolblau, Xylen-Cyanol) und 15 µl Aqua bidest gemischt und in die Tasche gefüllt.

Für die anderen Taschen werden jeweils 3 µl 10x Probenauftragspuffer mit 15 µl der DNA aus der Restriktionsanalyse (siehe 2.2.5) gemischt und dann eingefüllt.

Nach einer Laufzeit von ca. 60 min bei einer Spannung von 90 V wird das Gel auf einen UV-Leuchttisch gelegt, und die DNA-Fragmente werden als leuchtende Banden sichtbar gemacht. Anhand des 1 kb Markers lässt sich die Größe der DNA-Fragmente bestimmen.

2.3 Verfahren in der Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Zellen

In der Zellkultur ist es von besonderer Wichtigkeit, möglichst keimfrei zu arbeiten. Daher sollten zu Beginn aller hier stattfindenden Arbeiten die Hände mit 70 % Ethanol eingesprüht und die Reinraumwerkbank ebenfalls mit Ethanol (70%) desinfiziert werden.

Die verwendeten MCF-7-Mammakarzinom-Zellen und SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen zeigen ein optimales Wachstum in IMDM-Medium, das mit fötalem Kälberserum (10 %) versetzt ist, und werden in Gewebekulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Das Medium sollte regelmäßig gewechselt werden. Der Rhythmus des Medienwechsels hängt von der Dichte des Zellrasens, vom Zelltyp und von der Wachstumsgeschwindigkeit ab. Betrachtet man die Zellen unter dem Mikroskop, sollte bei ca. 60-80 % Konfluenz ein Medienwechsel im Abstand von ca. 3 Tagen vorgenommen werden.

2.3.2 Passagieren von Zellen

Vermehren sich die Zellen, die in der Regel strikt adhärent an dem Boden der Gewebekulturflasche wachsen, soweit, dass sie den Boden der Gewebekulturflasche

ganz einnehmen (100 % Konfluenz), so haben die Zellen aus Platzmangel keine Möglichkeit, weiter zu proliferieren, und können unter Umständen absterben. Es ist daher notwendig, die Zellen vor Erreichen der Maximaldichte zu verdünnen.

Dieser als Passagieren von Zellen bezeichnete Vorgang, geschieht folgendermaßen:

Das Medium wird abgesogen. Zur Entfernung von Medienresten werden die Zellen mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS) gespült. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Kultivierung in 250 ml Flaschen. Danach wird die PBS-Lösung wieder abgesogen.

Durch die nun folgende "Trypsinisierung" werden die Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. 2 ml eines Trypsin/EDTA-Gemisches werden zu den Zellen gegeben, und die Gewebekulturflasche für ca. 2 min in den Inkubator gestellt. Nach kurzer Kontrolle unter dem Mikroskop, ob sich alle Zellen abgelöst haben, und gegebenenfalls kurzer Nachinkubation, wird der Trypsinisierungsvorgang durch Zugabe von 5ml FCS-versetztem Medium abgebrochen.

Die Zellsuspension kann nun verdünnt werden, wobei sich das Verdünnungsverhältnis nach der Zelllinie richtet, und evtl. in einer neuen Flasche wieder ausgesät werden.

Alle 4-5 Passagen sollte eine neue Kulturflasche benutzt werden, da die Zellen durch zurückbleibende Proteinreste auf dem Boden der Gewebekulturflasche, auch nach der Trypsinisierung, schlechter anhaften.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung geschieht mit Hilfe eines Hämocytometers. Zunächst wird die Zählkammer mit 70 % Ethanol gereinigt, und dann ein leicht angefeuchtetes Deckgläschen aufgesetzt. An den Kontaktstellen zwischen Deckgläschen und Zählkammer erscheinen sogenannte „Newtonringe“. Sie zeigen an, dass das Deckgläschen anhaftet, und somit die Tiefe der Zählkammer auf 0,1 mm eingestellt ist.

Eine Pasteurpipette wird in die Zellsuspension, deren Zellzahl zu bestimmen ist, gehalten und dann an die Unter- oder Oberkante der Zählkammer herangeführt. Die Zellsuspension saugt sich durch die Kapillarkräfte selbstständig in den Zwischenraum zwischen Deckgläschen und Kammer.

Unter dem Mikroskop (100 fache Vergrößerung) werden nun Kästchen mit einer Kantenlänge von 1mm in der Zählkammer ausgezählt. Es können beliebig viele Kästchen ausgezählt werden, umso exakter wird die Zellzahl bestimmt. Es ergibt sich

ein Volumen von 0,1 µl pro Kästchen. Die Multiplikation der durchschnittlichen Zellzahl pro Kästchen mit dem Faktor 10^4 ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

2.3.4 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) ermöglicht es, Zellen dauerhaft, sogar über mehrere Jahre und ohne Verlust der Lebensfähigkeit, lagern zu können. Es empfiehlt sich, wenn man lange Zeit mit den gleichen Zellen arbeitet, zu Beginn der Arbeiten viele Zellen einzufrieren, um auf diese später immer wieder zurückgreifen zu können. So wird der genetischen Veränderung durch langes Kultivieren und immer fortwährendes Passagieren entgegengewirkt.

Beim Einfrieren der Zellen werden diese durch Dimethylsulfoxid (DMSO) geschützt. Dimethylsulfoxid verhindert die Kristallbildung und damit die Zerstörung der Zellen. DMSO ist im Einfriermedium enthalten.

Einfriermedium: Kulturmedium IMDM (1x)
+ fötales Kälberserum (20 %)
+ DMSO (5 %).

Abtrypsinisierte Zellen werden bei 500 x g für 5 bis 10 min zentrifugiert, und das Sediment in ca. 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wird in ein Kryoröhrchen pipettiert, dieses fest verschlossen und in eine Kryobox überführt. Durch die mit Isopropanol gefüllte äußere Kammer, findet die Temperaturabsenkung im Innern der Box nur langsam statt.

Die Kryobox wird zunächst für ca. 24 h in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt. Danach kann das einzelne Kryoröhrchen entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.3.5 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen werden die Kryokonservierungs-Röhrchen (s.o.), in denen sich die Zellen befinden, aus dem flüssigen Stickstoff genommen und sofort in ein 37 °C-Wasserbad befördert. Nach kurzer Zeit ist der Inhalt aufgetaut, wird mit 70 % Ethanol außen kurz desinfiziert und unter die Reinraumwerkbank genommen. Die Zellen werden unter Zusatz von normalem Kulturmedium (s.o.) in eine Gewebekulturflasche überführt und im Brutschrank so lange sitzen gelassen, bis sie sich am Boden angeheftet haben (ca. 4 - 6 h). Dann wird, um das DMSO zu entfernen, ein Medienwechsel (mit normalem Kulturmedium) vorgenommen. Auch ein Zeitraum von

24 h bis zum Medienwechsel ist bei MCF-7- und SKOV-3-Zellen durchaus möglich, sollte aber nicht überschritten werden. Die Zellen werden durch das DMSO sonst geschädigt.

2.4 Zellbiologische und immunchemische Verfahren

2.4.1 Transfektion von Tumorzellen mit Plasmid DNA

Ein Transfektionsansatz wird in einem Well einer 6-Well Platte durchgeführt. 50000 bis 100000 Zellen werden pro Well einer 6-Well Platte ausplattiert und einen Tag wachsen gelassen. 1 µg der Plasmid-DNA sowie 8 µl Polyethylenimine (PEI) werden in separaten Eppendorf Reaktionsgefäßen (1,5 ml) in jeweils 25 µl NaCl (pH 7,4) für 10 min bei vorsichtigem Mischen gelöst. Die PEI-Lösung wird mit der DNA-Lösung zusammengegeben und noch einmal 10 min unter leichtem Mischen inkubiert.

Das Kultivierungsmedium der Zellen wird durch 1 ml frischen Mediums ersetzt, und die fertige Lösung aus PEI-DNA-Komplexen auf die Zellen gegeben. Die Transfektion wird nach 5 h durch einen Medienwechsel beendet.

2.4.2 Selektionierung von transfizierten Zellen

Auf einem Transfektions-Plasmid kodierende Resistenzen gegenüber zytotoxischen Agentien, machen es möglich, transfizierte Zellen zu selektionieren. Kodiert auf dem Plasmid keine Resistenz, so kann bei der Transfektion ein zweites Plasmid mit einer Resistenz in einem 1:10-Unterschuß zugesetzt werden. Der Einbau des Plasmids, das im Unterschuss vorlag, garantiert mit hoher Sicherheit auch den Einbau des zweiten Plasmids. Im obigen Protokoll (2.4.1) werden in diesem Fall insgesamt 1,1 µg Plasmid-DNA eingesetzt, ansonsten wird identisch verfahren.

Die Selektionierung beginnt etwa 36 h nach abgeschlossener Transfektion. Hier wurden folgende Agentien dem Medium mehrere Wochen zugesetzt, bis kein Absterben der Zellen mehr sichtbar war (siehe auch 3.1):

Puromycin	0,75 µg/ml
G418	750 µg/ml

Zur Aktivierung des in Kap. 1.4 beschriebenen Doxycyclin-regulierten Expressionssystems, zur Überexpression der 2,3 kb HER-2-ECD-mRNA in MCF-7-Zellen, werden die Zellen auf zwei Gewebekulturflaschen aufgeteilt. In einer Flasche wird dem Medium Doxycyclin (1 µg/ml) zugesetzt (+ Dox), die Zelle der zweiten Flasche werden mit gewöhnlichem Medium ohne Zusätze kultiviert (- Dox). Mindestens 4 Wochen sollten die Zellen so wachsen, bis weitere Versuche, die ECD-überexprimierende und normal exprimierende Zellen vergleichen, stattfinden.

2.4.3 Zellwachstumskinetik

Zum Erstellen einer Kinetik des Zellwachstums über die Zeit werden Zellen in Vierfach-Ansätzen in 96-Well-Platten (250 oder 500 Zellen/Well) in ihrem Kulturmedium ausgesät. Die Zellzahl wird vorher in einem 15 ml Röhrchen eingestellt. Mit einer Multipette werden die Zellen in die Vertiefungen gegeben und unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37 °C) kultiviert.

Im Abstand von ein bis zwei Tagen wird die Zellzahl mit Hilfe des Farbreagens WST-1 Cell Proliferation Reagent ermittelt. WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch eine mitochondriale Dehydrogenase lebender Zellen gespalten wird. Das Kulturmedium wird abgesogen, WST-1 (1:10 in Kulturmedium verdünnt) auf die Zellen gegeben, im Brutschrank 30 min inkubiert und die Absorption der Gelbfärbung im ELISA-Reader bei 450 nm quantifiziert.

Bei der graphischen Auftragung wird, um verschiedene Zelllinien vergleichen zu können, die höchste Absorption gleich 100 % gesetzt und alle anderen Werte entsprechend prozentual angegeben.

2.4.4 Zellwachstum unter Zytostatika

Die Zellen werden in 4-fach Ansätzen in 96-Well Platten (1000 Zellen/Well) in ihrem Kulturmedium eingesät.

Die Anzahl der Ansätze richtet sich nach der Zahl der verschiedenen Zytostatika-Konzentrationen, die untersucht werden sollen.

Nachdem die Zellen 24 h kultiviert wurden, wird das Medium abgesogen und die Zytostatika (gelöst in Kulturmedium in einem Endvolumen von mindestens 100µl) mit einer Multipette auf die Zellen pipettiert und weitere 48 bis 72 h inkubiert. Mit Hilfe des

WST-1 Cell Proliferation Reagent (siehe 2.4.3) wird die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Auch die graphische Auswertung erfolgt wie bei der normalen Zellwachstumskinetik (siehe 2.4.3).

2.4.5 Zellwachstum im Softagar

Der Softagar ist ein geeignetes Medium, um das in vivo-Wachstum von Tumorzellen besser simulieren zu können. Die Zellen können ohne Anheftung an eine Plastikoberfläche dreidimensional wachsen, und es läßt sich eine Aussage über das genaue Wachstum (Koloniebildung) der einzelnen Zelle ohne interzelluläre Stimulation treffen.

Zusammensetzung Agarosegemisch (100ml)	
Agarose (2,4 % in Wasser)	25 ml
IMDM (10 x)	2,5 ml
Kulturmedium (IMDM/10 % FCS)	75 ml

Die Agarose wird in der Mikrowelle in Wasser gelöst, auf ca. 55 °C gekühlt, IMDM und Kulturmedium (vorher auf 42 °C vorgewärmt) hinzugegeben und das fertige Gemisch weiter bei 42 °C temperiert.

In 6-Well-Platten wird mit dem Agarosegemisch eine Bodenschicht gegossen (1ml Agarose / Well).

Jeder Top-Agarose-Ansatz wird in Triplikaten durchgeführt und in einer Vertiefung einer 24-Well-Platte angemischt.

Zusammensetzung Top-Agarose:	
Kulturmedium (IMDM/10 % FCS) incl. der Testmedien (Cytostatika, Wachstumsfaktoren, etc.)	800 µl
Zellen (in IMDM/10 % FCS)	200 µl
Agarosegemisch (42 °C), s.o.	1,5 ml

Die Zellzahl muss vorher eingestellt werden und richtet sich nach der Zelllinie. Bei SKOV-3 Ovarialkarzinom-Zellen empfiehlt sich eine Zelldichte von 60000 Zellen pro Dreifachansatz, bei MCF-7 Mammakarzinom-Zellen werden, da sie schneller wachsen, nur 30000 Zellen eingesetzt.

Mit einer 2 ml-Pipette wird der Ansatz in der 24-Well Platte gut durchmischt und jeweils 800 µl auf 3 Wells der 6-Well Platten pipettiert.

Der Softagar wird 10 bis 14 Tage unter Standardbedingungen (5 % CO₂ / 37 °C) inkubiert, und die Kolonien mit p-Iodonitrotetrazolium Violet (4 mg/ml in Aqua bidest) angefärbt.

Mit Hilfe von Mikroskop und Zählkular werden Kolonien, die einen Durchmesser größer als 50 µm messen, von zwei unabhängigen Beobachtern gezählt.

2.4.6 HER-2 ELISA

Der HER-2-Status der Zellen wird in einem HER-2-ELISA gemessen. Pro Zelllinie werden in 3 Wells einer 6-Well-Platte jeweils 100000 Zellen ausgesät, welche dann 48 h wachsen. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, in 500 µl Receptor-Buffer pro Well von der Plastikoberfläche abgeschabt und in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigt. Sämtliche hier genannte Puffer-Lösungen werden mit dem ELISA-Kit mitgeliefert.

Zur Lyse der Zellen werden diese 5 min Ultraschall-behandelt und 3 mal hintereinander in flüssigem Stickstoff eingefroren und schnell wieder bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut.

100 µl dieses Lysats werden mit 20 µl Antigen-Extraction-Buffer unter zwischenzeitlichem Mixen bei Raumtemperatur 60 min inkubiert und anschließend bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Das Pellet kann verworfen werden, und der Überstand, in äquivalenten Mengen (Proteinbestimmung im Biorad Proteinassay [siehe 2.2.2]) mit einer Verdünnung von mindestens 1:50 in Sample Diluent in den ELISA eingesetzt werden.

In Triplikaten werden jeweils 100 µl der Proben in die schon mit Erst-Antikörper vorbeschichteten ELISA-Wells pipettiert und 12–18 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Fünf verschiedene HER-Standards (120, 30, 15, 5 und 0 HER-Units/ml) werden ebenfalls in jeweils einem Well mitgeführt.

Die Probe wird durch Ausklopfen der ELISA-Platte entfernt, und die Vertiefungen 6 x mit 300 µl Plate Wash (1 x) gewaschen. Die 60 minütige Zweitantikörper Inkubation erfolgt mit 100 µl Detector-Antibody auf dem Schüttler bei RT.

Es folgt ein Waschschrift (siehe oben) und anschließend eine 30 minütige Inkubation (RT, Schüttler) mit 100 µl Working Conjugate, hergestellt aus Conjugate Concentrate (Goat anti-Rabbit IgG-horseradish peroxidase), verdünnt in Conjugate Diluent (1:50).

Die Farbreaktion erfolgt nach erneutem Waschen (s.o.) unter Zugabe von 100 µl Working Substrate und 10 bis 15 minütiger Inkubation in der Dunkelheit. Die Absorption, die ein direktes Maß für den HER-2-Proteingehalt ist, wird bei 490 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.4.7 Apoptose ELISA

Die Apoptose wird im Cell Death detection ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim) anhand von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten quantifiziert, die während der Apoptose durch Karyolyse in das Cytoplasma der Zelle gelangen.

Für einen Ansatz werden jeweils 30000 Zellen einer Zelllinie in 3 Wells einer 12-Well-Platte pipettiert, zwei Tage wachsen gelassen, das Medium einmal gewechselt und im Falle einer zu untersuchenden Apoptoseinduktion durch Zytostatika, diese dann zugesetzt. Eine weitere Inkubation erfolgt über 48 h. Bei der Untersuchung der Abhängigkeit des Apoptoseanstiegs von Zytostatikumskonzentration und Zeit werden diese Parameter im Versuch variiert.

Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert (100 µl Trypsin/EDTA) und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit 900 µl Medium überführt. Ein kleiner Teil (70 µl) wird zur Quantifizierung der Probenzellzahl in eine 96-Well-Platte erneut eingesät und ca. 4 h später mit dem WST-1 Cell Proliferation Reagent gemessen (siehe 2.4.3).

Die Zellen im Eppendorf Reaktionsgefäß werden bei 2000 rpm 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 250 µl Inkubationspuffer aufgenommen und nach leichtem Anschnippen 30 min auf Eis lysiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 rpm (10 min) werden von dem Überstand äquivalente Mengen (anhand der WST-1 Zellzahlmessung (s.o.) zu ermitteln) in den ELISA eingesetzt. Die Proben können mit Inkubationspuffer verdünnt werden.

Vor dem Pipettieren der Proben in die ELISA-Platte findet die Erstantikörper-Beschichtung der einzelnen Vertiefungen statt. Hierzu werden 100 µl Beschichtungslösung (Anti-Histon in Beschichtungspuffer 1:10) pro Vertiefung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die Blockierung mit 200 µl Inkubationspuffer (30

min RT). Nach gründlichem Ausklopfen und dreimaligem Waschen der Vertiefungen mit 300 µl Waschlösung werden jeweils 100 µl Probenlösung 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschschrift erfolgt die Inkubation des 2. Antikörpers mit 100 µl Konjugatlösung (Anti-DNA-POD in Inkubationspuffer 1:10) für 90 min bei RT.

Die Substrat-Reaktion erfolgt nach wiederholtem Waschschrift durch Zugabe von jeweils 100 µl Substratlösung so lange auf dem Schüttler, bis eine Farbreaktion in Form einer Grünfärbung zu sehen ist. Die Absorptionsmessung bei 405 nm gegen einen Leerwert erfolgt dann im ELISA-Reader.

2.4.8 Annexin V-FITC Apoptose Analyse

Mit dem Annexin V-FITC Apoptose Test kann die Apoptose von in Suspension befindlichen lebenden Zellen im FACS Durchflusszytometer (FACS-Calibur) gemessen werden.

Der Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie und das Erscheinen von Teilen von Phosphatidylserinen (PS) an der äußeren Plasmamembran in der frühen Apoptose nutzt man in dieser Apoptose-Analyse. Annexin V hat eine starke und spezifische Bindungsfähigkeit an PS. Wird Annexin V mit einem Farbstoff (z.B. FITC) markiert, so läßt sich die Annexin-Bindung im Durchflußzytometer quantifizieren.

Zellen von etwa 40-50 % Konfluenz, die über mindestens 48 h in einer Petrischale (6 cm) gewachsen sind, erhalten einen Medienwechsel und werden über 20 h mit dem Zytostatikum behandelt, dessen Apoptoseinduktion untersucht werden soll. Zum Vergleich mit der Apoptoserate von unbehandelten Zellen, wird von diesen Zellen eine bis maximal 60 % konfluente Petrischale als Kontrolle benötigt.

Alle folgenden Schritte müssen mit Kunststoffpipetten durchgeführt werden, da Glaspipetten einen zu großen physikalischen Stress auf die Zellen ausüben und die Zellmembranen schädigen können.

Der benötigte Bindungspuffer wird durch Zehnfach-Verdünnung des Pufferkonzentrates in Aqua bidest hergestellt. Die mitgelieferte Annexin V-FITC Lösung wird zehnfach in Bindungspuffer gelöst. Die beiden Substanzen müssen, aufgrund ihrer nicht langen Haltbarkeit, unmittelbar vor dem Versuch hergestellt, beide auf Eis gelagert und Annexin V-FITC zusätzlich bei Dunkelheit aufbewahrt werden.

Die Zellen in der Petrischale werden trypsinisiert und in einem 15 ml Polystyrol-Röhrchen in 2 ml eiskaltem PBS wieder aufgenommen. Dann werden sie bei 1200 rpm 10 min zentrifugiert und in 1400 µl Bindungspuffer (unbehandelte Kontrollzellen) bzw. 1000 µl Bindungspuffer (behandelte Zellen) resuspendiert.

Messung der unbehandelten Kontrollzellen:

Die 1400 µl Zellsuspension im Bindungspuffer werden aufgeteilt auf drei FACS-Röhrchen zu je 465 µl pro Röhrchen und auf Eis gelagert. Vier Messungen von jeweils 10000 Zellen werden durchgeführt. Die Zellen im ersten Röhrchen werden zur Kalibrierung des Gerätes ohne Zufügen weiterer Substanzen gemessen. Zum zweiten Röhrchen werden 25 µl Propidiumiodid (50 µg/ml in Aqua bidest) zugesetzt, und diese Zellen dann gemessen. Für die unbehandelten Kontrollzellen wird gefordert, daß sie eine Propidiumiodid-Aufnahme unter 10 % haben. Andernfalls wäre von einer Schädigung der Zellen schon vor der Behandlung mit Zytostatika auszugehen. Das dritte Röhrchen wird mit 10 µl Annexin V-FITC versetzt, 10 min bei Dunkelheit auf Eis inkubiert und dann gemessen. Danach werden zu diesem Röhrchen 25 µl Propidiumiodid zugesetzt und noch einmal 10000 Zellen gemessen.

Messung der Zytostatika-behandelten Zellen:

Jeweils 465 µl Bindungspuffer-Zellsuspension werden auf zwei FACS-Röhrchen verteilt. Die Zellen des ersten Röhrchens werden nach Zugabe von 25 µl Propidiumiodid gemessen, die des zweiten werden 10 min bei Dunkelheit mit Annexin V-FITC inkubiert, sofort 25 µl Propidiumiodid zugegeben und dann gemessen.

Die vollständige Auswertung mit prozentueller Bestimmung der Propidiumiodid- und Annexin V-FITC- Aufnahme wurde in Cell Quest durchgeführt.

2.4.9 FACS - Zellzyklusanalyse

Eine Untersuchung des Zellzyklus lässt sich gut durch Doppelmessung von DNA-Gehalt (DNA-Anfärbung mit Propidiumiodid) und Expression bestimmter Cycline (Detektion über FITC-markierten Antikörper) durchführen. Cycline sind Schlüsselkomponenten des Zellzyklus. Sie aktivieren Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), die durch Phosphorylierung bestimmter, noch nicht völlig bekannter Proteine die Zelle durch spezielle Phasen und Checkpoints des Zellzyklus steuern. Die Expression der verschiedenen Cycline findet sehr definiert zu bestimmten Zeiten des

Zellzyklus statt und lässt daher durch gleichzeitige DNA-Quantifizierung eine sehr exakte Untersuchung des Zellzyklus zu.

Zellen von etwa 50-60 % Konfluenz, die in einer 75 cm² Kulturflasche gewachsen sind (ca. 3-4 Millionen Zellen) und für Untersuchungen von Zytostatikumseinflüssen auf den Zellzyklus mit Zytostatika für 24 h behandelt wurden, werden trypsinisiert, einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, abzentrifugiert und wieder in 2 ml eiskaltem PBS aufgenommen.

Zur Fixierung werden die Zellen mit einer 1000 µl Pipette in ein 15 ml Polystyrol-Röhrchen pipettiert, das mit 6 ml 95 % Ethanol gefüllt ist. Nach 30 min Fixierung auf Eis (fixierte Zellen können bis zu mehreren Wochen bei 4 °C gelagert werden) werden die Zellen 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in 2 ml Waschlösung (1 % BSA in PBS) gewaschen, wieder zentrifugiert und in 100 µl RNase A 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschlösungsschritt erfolgt die Permeabilisierung mit 1,5 ml kaltem 0.25 % Triton® X-100 in Waschlösung (5 min auf Eis). Durch Verdünnung mit 12 ml Waschlösung und Zentrifugation (s.o.) wird die Permeabilisierung beendet. Die Zellen werden in 100 µl Waschlösung aufgenommen und mit Anti-Cyclin B1 Antikörper (Purified Mouse Anti-Human Cyclin B1) in einer Konzentration von 1 µg/1 Million Zellen bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 30 min wird mit 2 ml Waschlösung gewaschen und bei 1200 rpm zentrifugiert.

Zur Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (FITC polyclonal anti-mouse Ig) werden erneut 100 µl Waschlösung zu dem Zellsediment gegeben, und die Zellen unter identischen Bedingungen wie beim Erst-Antikörper inkubiert.

Die Zellen werden nun noch einmal mit 2 ml Waschlösung versetzt und bei 1200 rpm zentrifugiert, bevor sie in 500 µl Aqua bidest aufgenommen werden.

Zur Messung im FACS-Calibur werden die Zellen in ein spezielles FACS-Röhrchen überführt und mit 100 µl Propidiumiodid (50 µg/ml) angefärbt. Das Flow-Cytometer wird auf eine Anregungswellenlänge von 488 nm eingestellt. Zur Detection des Fluorescein (FITC) wird ein 515 nm Bandpassfilter sowie für die PI-Detection ein >600 nm Filter verwendet.

Die Daten des FACS Calibur werden mit Cell Quest, einer speziell für FACS-Analysen entwickelten Software, visualisiert und quantifiziert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bedeutung der HER-2-Rezeptorexpression in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen

3.1.1 Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf das Zellwachstum

Die HER-2-Rezeptorexpression wird hier auf ihre Bedeutung beim Wachstum von Ovarialkarzinom-Zellen untersucht. Wir benutzen SKOV-3-Zellen, in denen der HER-2-Rezeptor durch Ribozymtargeting herunterreguliert wird.

Diese Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen hat einen deutlichen Einfluss auf ihr Wachstum (Abb. 3.1-1). Die Verdopplungszeit der SKOV-3-Wildtyp-Zellen beträgt beim Wachstum auf der Kunststoffoberfläche ca. 1 Tag, während bei den SKOV-3 Rz. 3.8 Zellen, die eine um 90 % verminderte HER-2-Expression aufweisen, eine Verdopplung der Zellzahl erst nach ca. 2 Tage stattfindet.

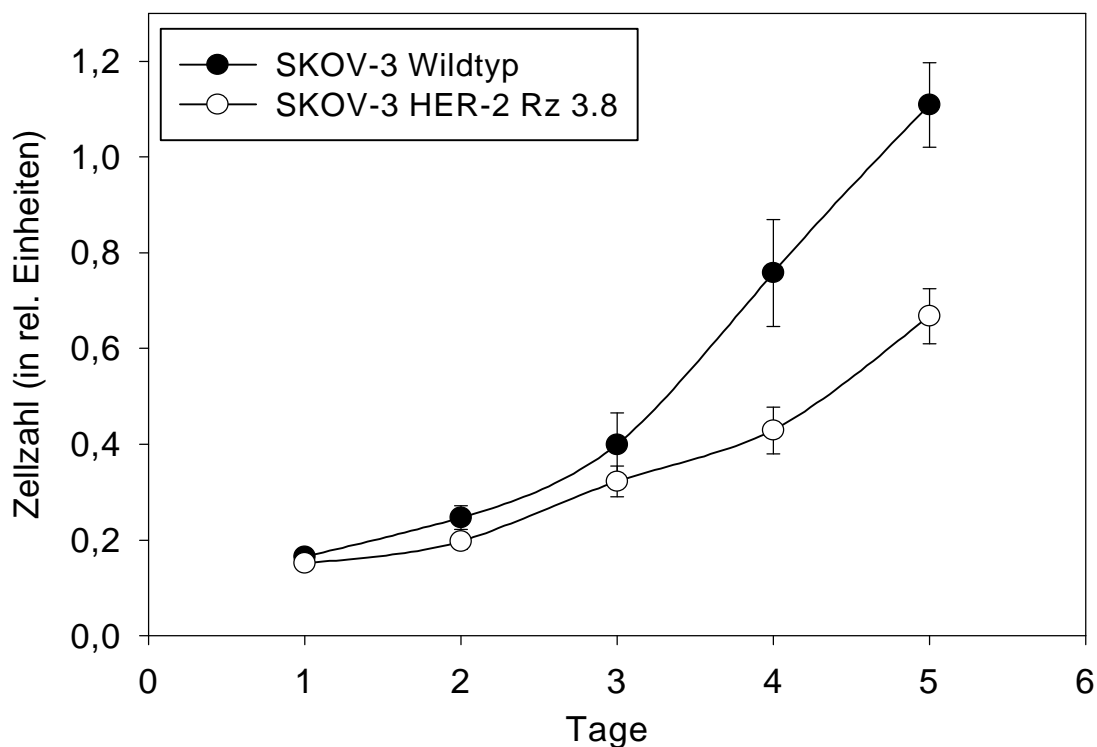


Abb. 3.1-1: Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf das Zellwachstum von SKOV-3-Ovarialkarzinomzellen. Durch Ribozymtargeting wird die HER-2-Expression in SKOV-3-Zellen herabgesetzt. Im spontanen Wachstum der SKOV-3-Zellen über 6 Tage, zeigt sich ein um 50 % vermindertes Wachstum bei vermindertem HER-2-Level (Rz.3.8).

3.1.2 Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf die Resistenz von SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika

Mit Hilfe von Zellwachstumsversuchen unter Zytostatika-Einwirkung (siehe 2.4.4) wurde die Frage adressiert, ob die Herunterregulation der HER-2-Expression in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen einen Einfluß auf die zytostatischen Effekte der Chemotherapeutika aufweist. An Chemotherapeutika wurden Doxorubicin, Cisplatin, Topotekan, Paclitaxel und rViscumin verwendet (s. 1.5.1).

Die Zellen zeigen bei der Behandlung mit Cisplatin (Abb 3.1-2 a, $EC_{50} = 5\mu\text{M}$) und Doxorubicin (Abb 3.1-2 b, $EC_{50} = 10\text{ nM}$) eine deutliche Resistenz im Bereich geringer Zytostatika-Konzentrationen, während sie auf die Behandlung mit Paclitaxel, Topotekan und rViscumin frühzeitig ansprechen. HER-2-herrunterregulierte SKOV-3 Rz 3.8 Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollzellen keinen Unterschied im Ansprechen auf Doxorubicin und Cisplatin.

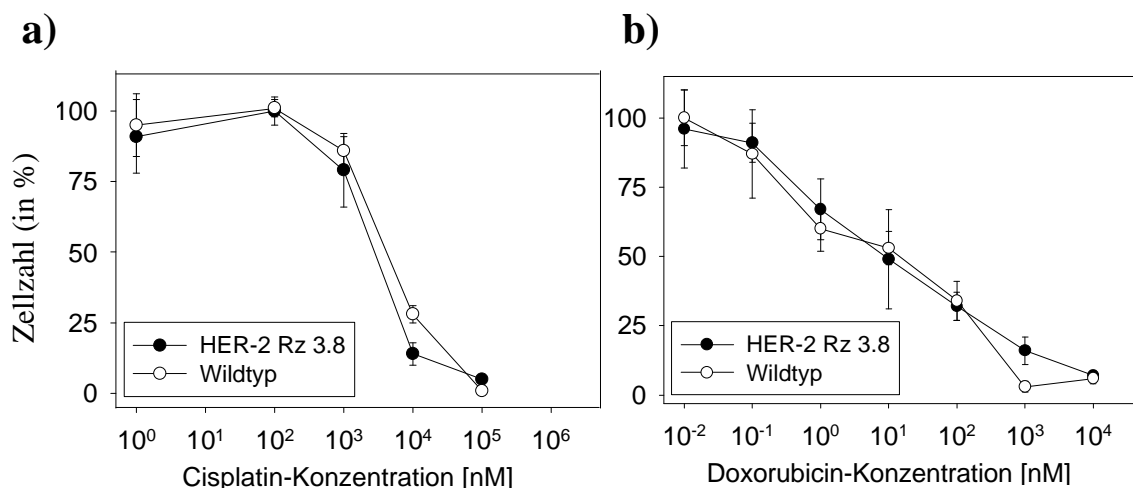


Abb. 3.1-2: Identischer Effekt der Zytostatika-Behandlung mit Cisplatin (a) und Doxorubicin (b) auf SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen, unabhängig von der HER-2-Expression. Verglichen wurden HER-2 Klon 3.8-Zellen (90 % Reduktion der HER-2-Expression) mit SKOV-3-Wildtyzellen. Die Werte repräsentieren das Mittel \pm S.D. dreier unabhängiger Experimente.

Bei der Behandlung mit Paclitaxel (Abb. 3.1-3), rViscumin (Abb. 3.1-4) und Topotekan (Abb. 3.1-5) ist ein deutlicher Resistenzunterschied zwischen HER-2-herunterregulierten Zellen und den Kontrollzellen zu sehen.

Die Dosiswirkungskurve der HER-2 Rz 3.8 Zellen (90 % Reduktion der HER-2-Expression) zeigt bei der Paclitaxel-Behandlung eine deutliche Verschiebung nach rechts mit einer halbmaximalen Zytostatikawirkung bei 6 nM Paclitaxel. Es folgen die Kurven der Rz 3.3- und Rz 3.7-Zellen (EC_{50} : 2 nM), welche sowohl im HER-2-Status (siehe 3.1.1), als auch in der Resistenz gegenüber Paclitaxel eine Zwischenstellung zwischen Rz 3.8 Zellen und Kontrollzellen einnehmen (50 % HER-2-Reduktion in Rz 3.7-Zellen, 80 % bei Rz 3.3-Zellen). Die HER-2-herunterregulierten Rz 3.8 Zellen (90 % Reduktion) mit einer EC_{50} von 6 nM sind um den Faktor 7 resistenter gegenüber Paclitaxel als die Kontrollzellen (Wildtyp).

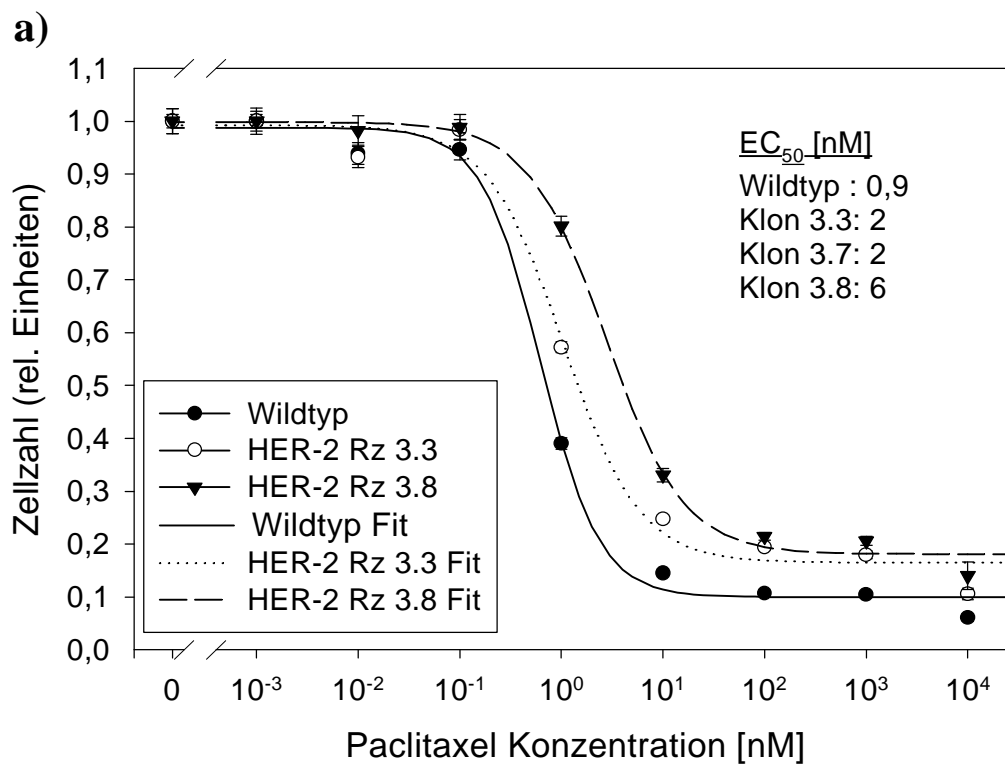


Abb. 3.1-3a: Deutliche Resistenzzunahme gegen Paclitaxel durch die Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in SKOV-3-Zellen. Mit geringer werdender Expression des HER-2-Rezeptors (Rz 3.7, 3.3, 3.8) steigt die Resistenz der Ovarialkarzinom-Zelllinien bis auf das 7-fache ((a) Rz. 3.8, gefülltes Dreieck) an. Die Werte repräsentieren das Mittel \pm S.D. dreier unabhängiger Experimente.

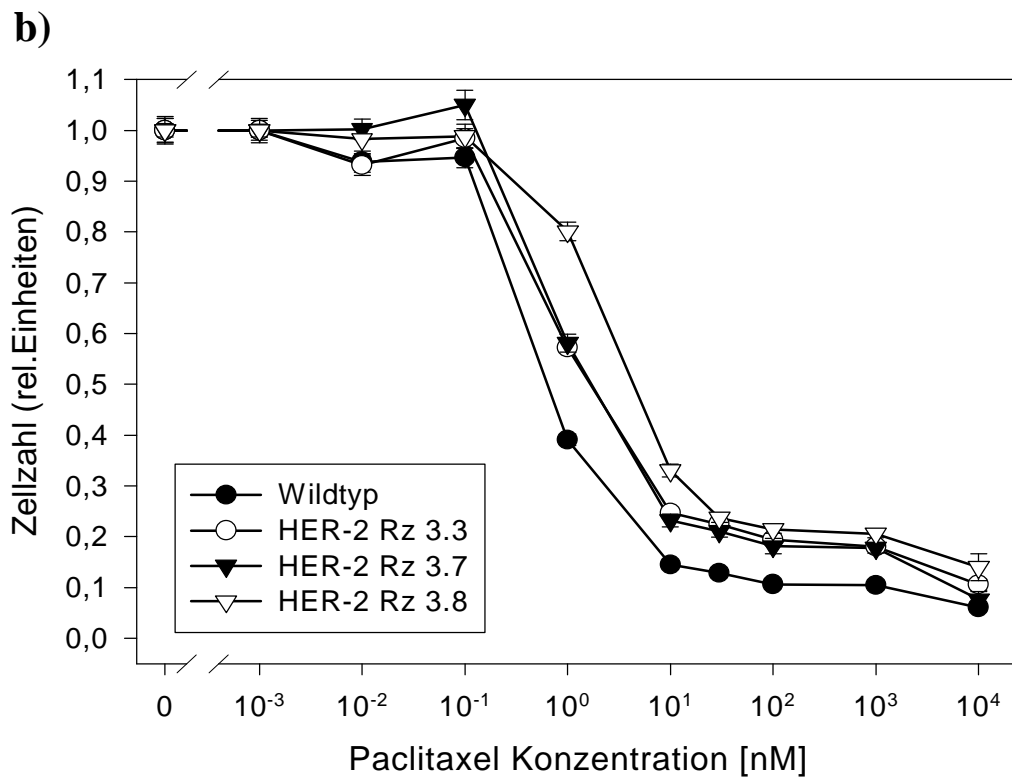


Abb. 3.1-3b: Zeigt zusätzlich zu Abb. 3.1-3a die Proliferationskurve der HER-2 Rz Klon 3.7 Zellen (gefülltes Dreieck), die aus Gründen der Übersichtlichkeit in (a) nicht dargestellt ist.

Diese deutliche Zunahme der Paclitaxel-Resistenz bei verminderter HER-2-Expression kann auch im Softagar bestätigt werden (Abb.3.1-3c).

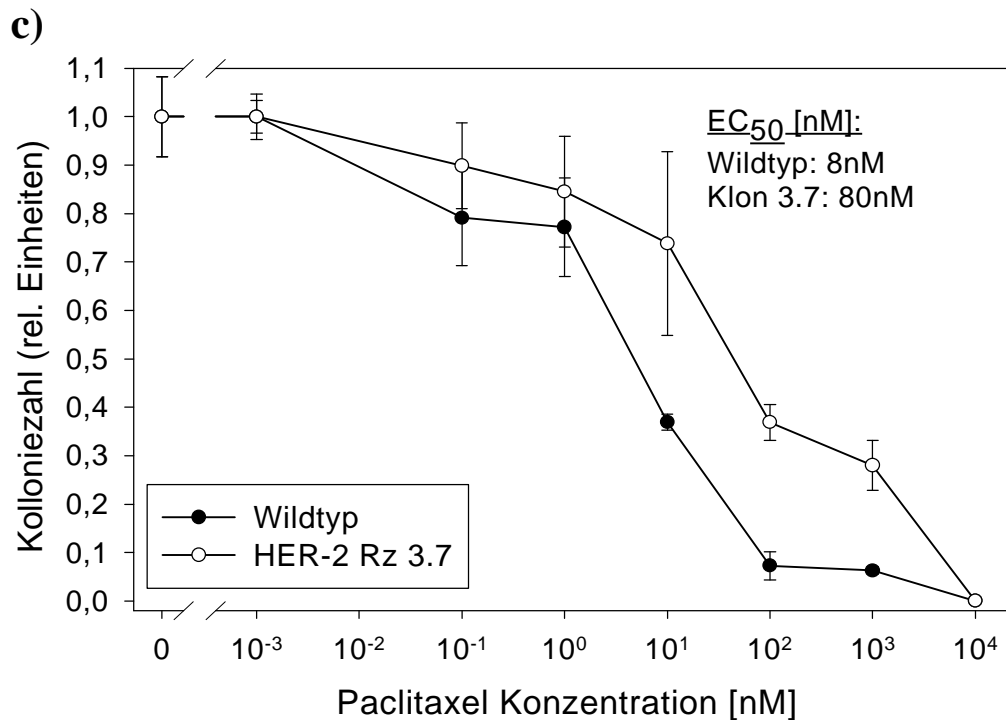


Abb. 3.1-3c: Im Softagar ist die Koloniebildung durch Herunterregulation des HER-2-Rezeptors deutlich verstärkt. SKOV-3-Rz 3.7-Zellen (50 % Reduktion der HER-2-Expression) zeigen eine 10-fach verstärkte Koloniebildung, unter 10-tägiger Behandlung mit Paclitaxel, verglichen mit SKOV-3-Wildtypzellen. Die Inkubation erfolgt nach Abschn. 2.4.5. Bei der anschließenden optischen Auswertung werden Kolonien >50 µm Größe gezählt.

Im Softagar (Abb.3.1-3c) werden, um die Paclitaxel-Resistenz zu untersuchen, Rz 3.7 Zellen (mittlere HER-2-Expression - siehe auch Kap.1.3) verwendet, da die Rz 3.8 und Rz 3.3 Zellen durch den starken Verlust des wichtigen HER-2-Wachstumsfaktors nicht ausreichend im Softagar wachsen. Die HER-2 Rz 3.7 Zellen (EC₅₀: 80 nM) zeigen im Softagar eine 10-fach höhere Resistenz gegenüber Paclitaxel als die Wildtyp Kontrollzellen (EC₅₀: 8 nM).

Bei der Behandlung mit rViscumin (Abb.3.1-4) sind die HER-2 reduzierten Rz 3.8 Zellen mit einer EC_{50} von $6,1 \times 10^{-4}$ um das 19-fache resistenter als die Kontrollzellen (EC_{50} : $3,3 \times 10^{-5}$) mit normalem HER-2-Status. Die Rz 3.3-Zellen bestätigen auch hier wieder die Abhängigkeit der Resistenz vom HER-2-Level. Ihre Dosiswirkungskurve befindet sich mit einer EC_{50} von $1,1 \times 10^{-4}$ zwischen der von Rz 3.8- und derjenigen der Kontrollzellen.

Dieses Ergebnis wird auch im Softagar bestätigt (Abb. 3.1-4b). Die HER-2-Ribozymzellen (EC_{50} : $6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$) sind um den Faktor 10 resistenter gegenüber rViscumin als die Wildtyp Kontrollzellen (EC_{50} : $6 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$).

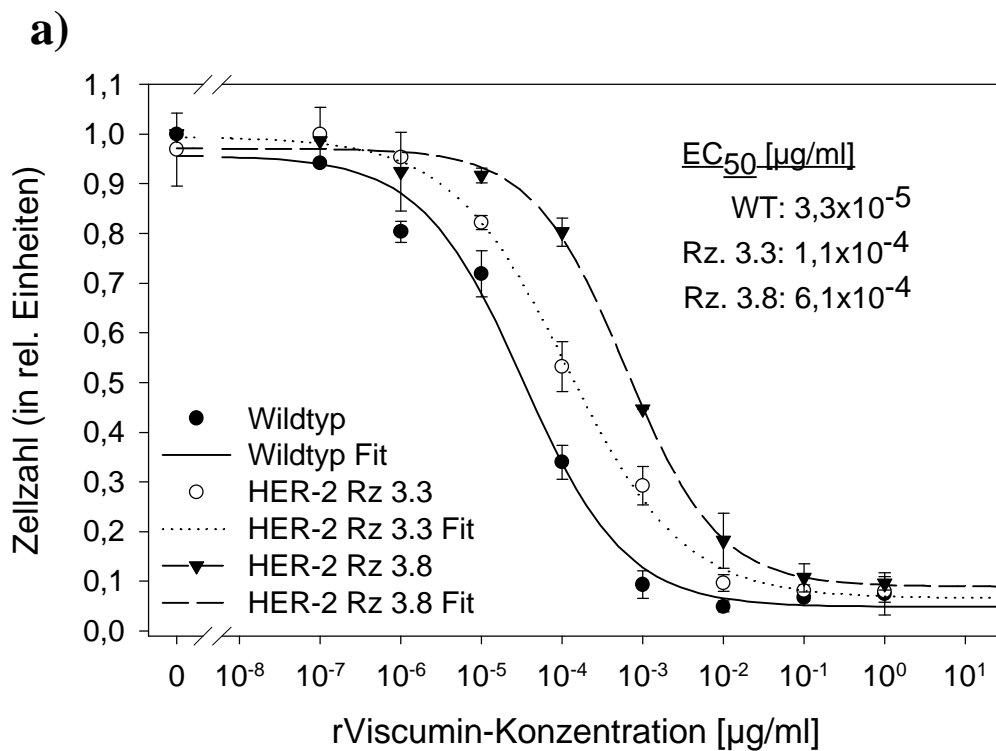


Abb. 3.1-4a : Durch Reduktion der HER-2-Expression zeigt sich eine deutliche Resistenzzunahme der SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber einer Behandlung mit rViscumin. Die HER-2 Rz 3.8 Zellen (90 % Reduktion der HER-2-Expression) sind im Wachstum unter rViscumin um das 19-fache resistenter, die Rz 3.3 Zellen (80% Reduktion der HER-2-Expression) um das 3,3-fache im Vergleich zu den Wildtyp-Ovarialkarzinom-Zellen mit normaler HER-2-Expression.

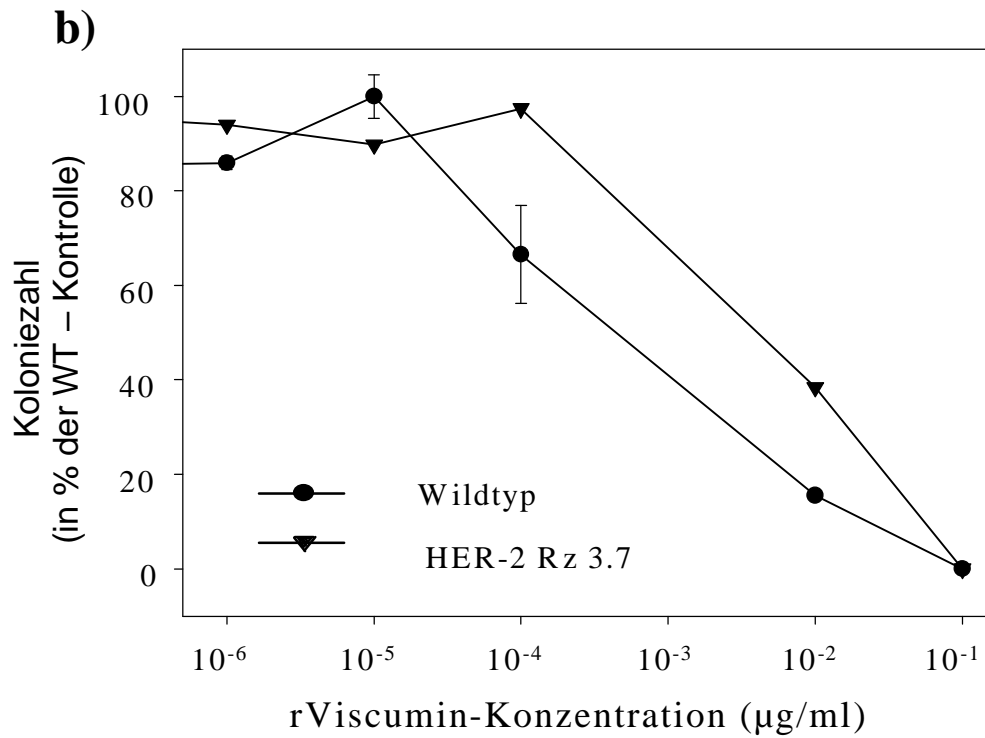


Abb. 3.1-4b) Bestätigung der im Wachstumsversuch auf der Kunststoffoberfläche (Abb. 3-4a) gefundenen Resistenzzunahme gegenüber rViscumin durch Herunterregulation des HER-2- Rezeptors. Das Wachstum im Softagar zeigt eine Resistenzzunahme um den Faktor 10 bei HER-2 Rz 3.7 Zellen (Dreiecke) im Vergleich zu Wildtypzellen (Kreise).

Die Herunterregulation des HER-2-Rezeptors bewirkt gegenüber der zytostatischen Therapie mit Topotekan ebenfalls eine deutliche Resistenzzunahme in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen (Abb. 3.1-5).

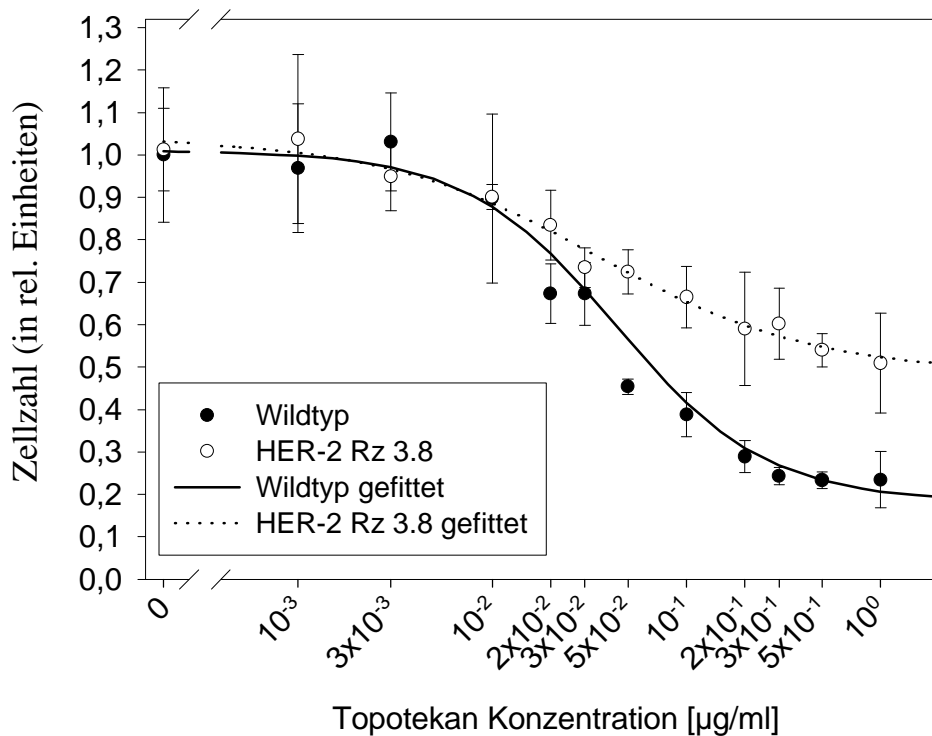


Abb. 3.1-5: Effekt der Topotekan-Behandlung auf SKOV-3 HER-2 Rz 3.8 - Zellen (90 % Reduktion der HER-2-Expression) verglichen mit Wildtyp SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen.

3.1.3 Einfluss der HER-2-Level auf die basale und die Zytostatika-vermittelte Apoptose-Induktion in SKOV-3-Zellen

Die Apoptose-Untersuchungen an SKOV-3-Zellen wurden unter der Fragestellung durchgeführt, ob die beobachteten Wachstums- bzw. Sensitivitätsunterschiede gegenüber Zytostatika auf einem veränderten Apoptose-Verhalten beruhen.

Sowohl Abb. 3.1-6 a wie auch Abb. 3.1-7 a (s.u.) zeigen bei Betrachtung der unbehandelten Zelllinien (1. und 3. Säule), dass die SKOV-3-Zellen mit herunterreguliertem HER-2-Rezeptor (Rz 3.8) eine höhere Apoptoserate haben als die Kontrollzellen. Beide Zelllinien wuchsen 2 Tage, und der Anteil an basaler Apoptose wurde im ELISA (s. 2.4.7) bestimmt. Durch stark verminderte HER-2-Expression in Rz 3.8-Zellen, steigt die basale Apoptose in beiden unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten um das 1,6-fache an.

Die Zytostatika, die ein unterschiedliches Ansprechen der HER-2-Ribozymzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen auslösen, wurden auf ihre möglicherweise unterschiedliche Apoptose-Induktion hin untersucht. Es werden Zytostatika-Konzentrationen im Bereich der halbmaximalen Wirkung gewählt, die aus den Dosiswirkungskurven (s. 3.1.2) ermittelt wurden.

Werden die Zellen 48 h mit 0,1 µg/ml Topotekan behandelt, so kommt es sowohl bei den Rz 3.8 Zellen, als auch bei den Kontrollzellen zu einem Anstieg der Apoptose. Es fällt auf, dass der Anstieg der Apoptose bei den Kontrollzellen größer ausfällt als bei den Rz 3.8 Zellen. Dieses wird in Abb. 3-7 b, nach Normierung der unbehandelten Zellen auf eins, noch deutlicher. Die HER-2-herunterregulierten Zellen reagieren nur mit einem 2-fachen Anstieg der Apoptose, während die Wildtyp-Kontrollzellen einen 3-fachen Apoptoseanstieg auf die Topotekan-Therapie zeigen.

Bei der 48 h Behandlung mit 3 nM Paclitaxel (Abb. 3.1-6a und b) steigt die Apoptoserate bei den Wildtyp-Kontrollzellen um den Faktor 3. Durch das Ribozymtargeting des HER-2-Rezeptors in SKOV-3 Rz 3.8 Ovarialkarzinom-Zellen reagieren diese Zellen mit einem Anstieg der Apoptose um den Faktor 1,2. Die Apoptose-Induktion durch Paclitaxel ist bei HER-2 Rz 3.8 Zellen also nur noch minimal.

Bei der Behandlung mit rViscumin (1 ng/ml) zeigen die Wildtypzellen im ELISA (Abb. 3.1-8 b) einen mehr als 10-fachen Anstieg der Apoptose. Im Gegensatz dazu steigt die Apoptose nach ribozymvermittelter HER-2-Herunterregulation bei Rz 3.3 Zellen durch die rViscumin-Behandlung nur gering (3-fach) und bei nur noch minimal HER-2-exprimierenden Zellen (Rz 3.8) gar nicht mehr. Diese Daten konnten in der Annexin V FACS-Analyse (Abb. 3.1-8 a) bestätigt werden. Hier zeigt sich ein >16-facher Apoptose-Anstieg der Wildtypzellen durch die rViscumin-Behandlung, während bei der Behandlung der Rz 3.3 Zellen die Apoptose-Induktion deutlich vermindert ist (~ 6-fach). Detailliertere Untersuchungen ergeben zusätzlich markante Unterschiede der Zelllinien im Verhältnis der frühen zur späten Apoptose (Abb. 3.1-8 a rechts). Es fällt, verglichen mit den HER-2-reduzierten Rz 3.3 Zellen, ein höherer Anteil an Wildtyp-Kontrollzellen in der frühen Apoptose auf.

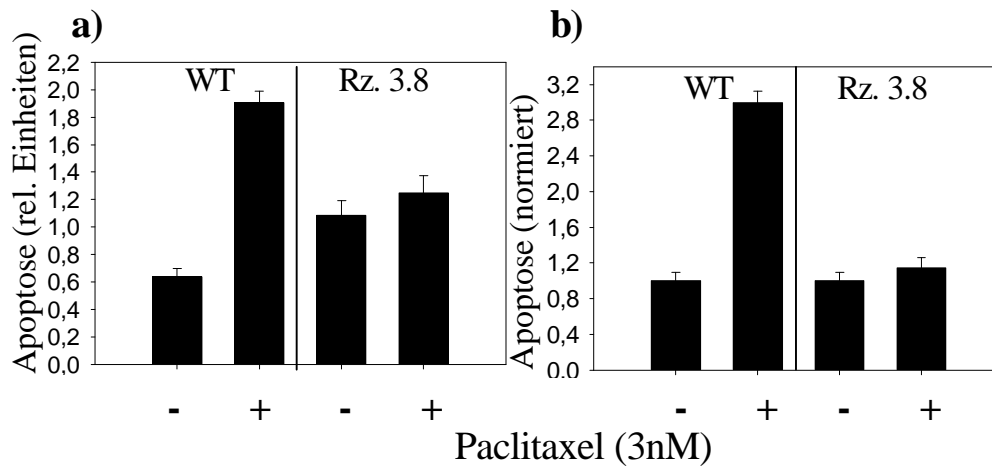


Abb. 3.1-6 a: 1,6-facher Anstieg der basalen Apoptose durch Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen (Vergleich erste und dritte Säule, WT vers. Rz 3.8). Beide Zelllinien wurden nach 2 tägigem Wachstum im ELISA auf ihre Apoptoserate untersucht.

Die Apoptose-Induktion durch Paclitaxel-Behandlung bei HER-2-Ribozymzellen ist nur noch minimal im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollzellen. Nach 48 h Behandlung mit [3 nM] Paclitaxel, ist der Apoptoseanstieg der HER-2-Rezeptor herunterregulierten Rz 3.8- Zellen (Apoptose-Anstieg um Faktor 0,2 (4. Säule)) gering, im Vergleich zu den Kontrollzellen (Anstieg um Faktor 3 (2. Säule)), (in **Abb. 3.1-6 b**, nach Normierung der unbehandelten Zellen auf eins, noch deutlicher zu sehen).

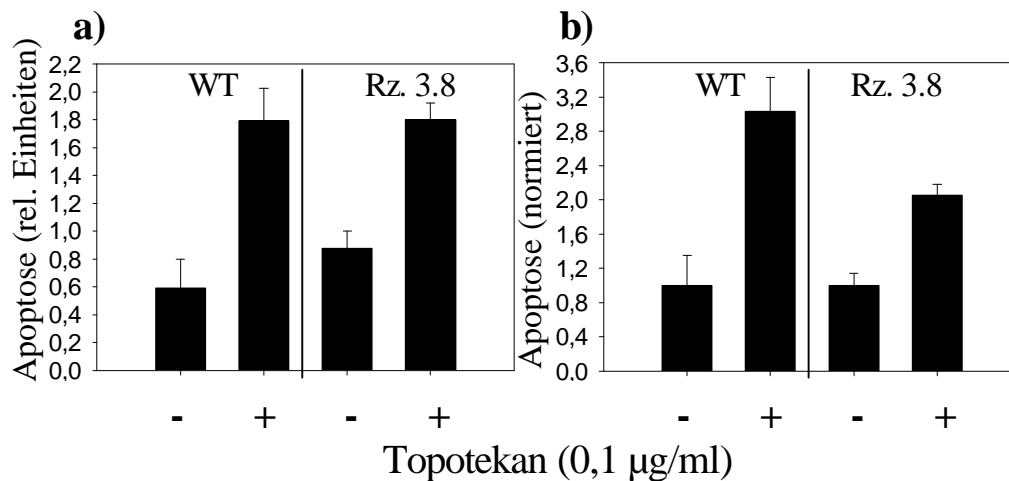


Abb. 3.1-7 a+b: Geringere Apoptose-Induktion durch Topotekan-Behandlung bei HER-2-Ribozymzellen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollzellen. Nach 48 h Behandlung mit Topotekan (0,1 µg/ml) und Untersuchung im ELISA ist der Apoptose-Anstieg der HER-2-Rezeptor herunterregulierten Rz 3.8 Zellen um den Faktor 2 (Säule 4) deutlich geringer als der der Kontrollzellen (Faktor 3 (Säule 2)), (in **Abb. 3.1-7 b** nach Normierung der unbehandelten Zellen auf eins noch deutlicher zu sehen).

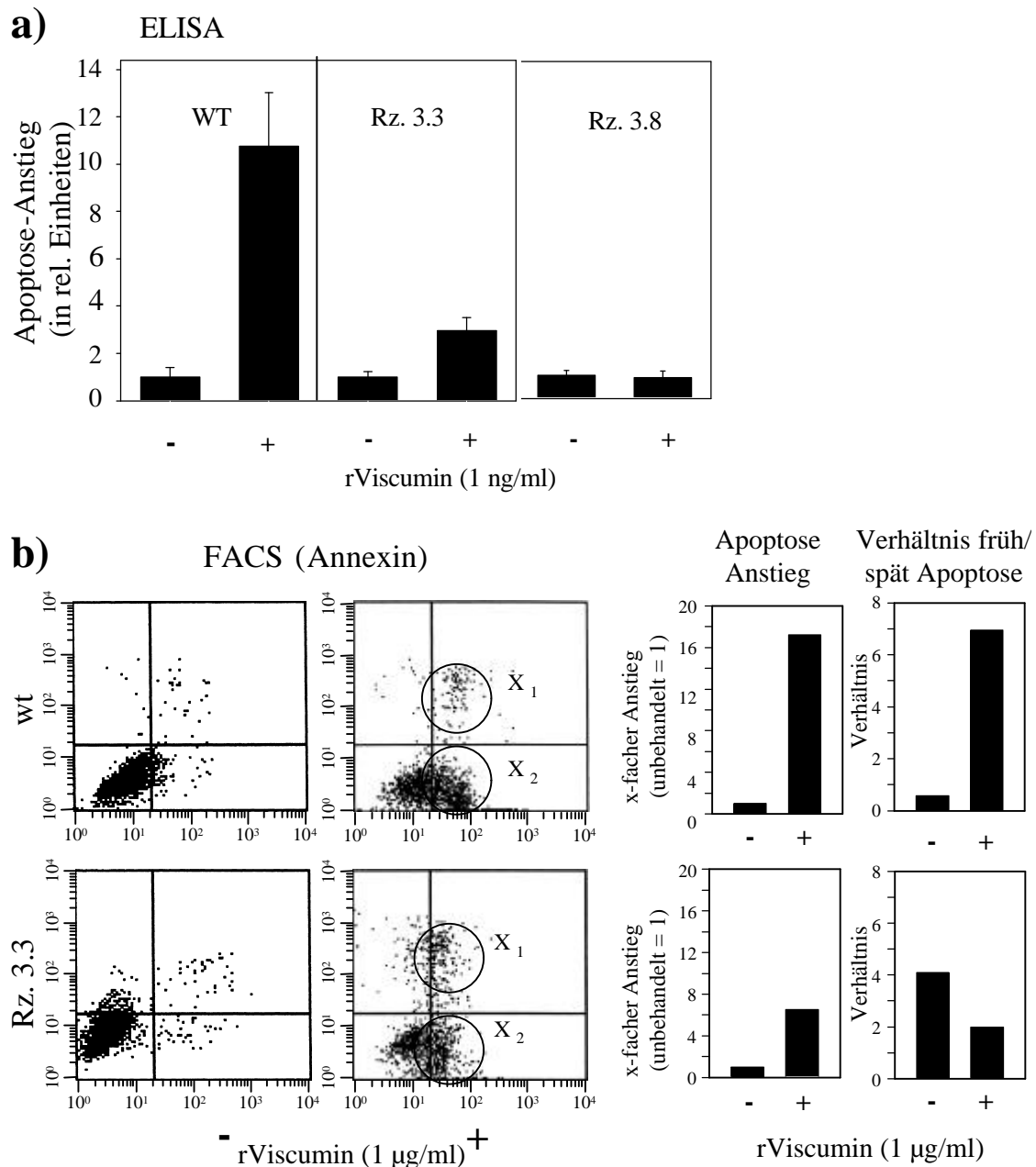


Abb. 3.1-8: *rViscummin*-induzierte Apoptose ist abhängig vom *HER-2*-Expressionslevel. Quantifizierung mittels Apoptose-ELISA (a) zeigt eine *HER-2*-Rezeptorstatus-abhängige Induktion der Apoptose. Während unter der Behandlung mit 1 ng/ml *rViscummin* die Apoptose bei den Wildtyp-Kontrollzellen auf über das 10-fache ansteigt, steigt die Apoptose bei Rz 3.3 Zellen nur noch 3-fach, und bei Rz 3.8 Zellen, mit geringster *HER-2*-Expression, ist kein Anstieg der Apoptose mehr zu verzeichnen. (b) Apoptose-Untersuchungen mit der Annexin V FACS Analyse bestätigen die Abnahme der *rViscummin* induzierten Apoptose bei *HER-2*-herunterregulierten SKOV-3 Ovarialkarzinom-Zellen und zeigt deutliche Unterschiede der Zelllinien WT und Rz 3.3 im Verhältnis von früher zu später Apoptose. Während Wildtyp-Zellen in den Untersuchungen nach der *Viscummin*-Behandlung einen größeren Anteil an Zellen in der Frühapoptose (X_2) aufweisen, verschiebt sich das Verhältnis bei Rz 3.3-Zellen (80 % *HER-2* Reduktion) in Richtung Spätapoptose (X_1).

3.1.4 Beeinflussung des Zellzyklus durch Paclitaxel, Topotekan bzw. rViscumin in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen in Abhängigkeit vom HER-2-Level

Die Zellzyklus-Analysen werden unter der Fragestellung durchgeführt, ob die Resistenzunterschiede, die (s. 3.1.2) bei der Behandlung von HER-2-herunterregulierten SKOV-3 Ovarialkarzinom-Zellen mit Paclitaxel, Topotekan bzw. rViscumin auftreten, möglicherweise durch ein unterschiedliches Verhalten dieser Zellen im Zellzyklus erklärbar sind.

Zur Untersuchung des Zellzyklus wird eine DNA-Quantifizierung mittels Propidiumiodid durchgeführt. Ferner wird das Cyclin-B1 untersucht und parallel zur DNA-Quantifizierung mitgemessen. Cyclin-B1 wird im Zellzyklus in der späten S-Phase exprimiert, hat sein Expressionsmaximum in der Mitte der G₂-Phase und nimmt dann langsam bis zum Ende der Mitosephase wieder ab.

In den Zellzyklusmessdaten lässt sich erkennen, dass der Prozentsatz an Zellen in der G₂/M-Phase bei den SKOV-3-Wildtypzellen unter normalen Wachstumsbedingungen (Abb. 3.1-9) immer größer ist, als nach Rz-vermittelter HER-2-Reduktion. Das heißt, es befinden sich mehr Zellen in der Teilungsphase.

Durch die 24 h Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (3 nM) steigt der Prozentsatz des G₂/M-Anteils in den SKOV-3-Wildtyp-Kontrollzellen von 13,8 % auf 21 % (s. Abb. 3.1-9), während bei den HER-2 herunterregulierten Rz 3.8 Zellen kein Anstieg zu verzeichnen ist.

Durch die Herunterregulation des HER-2-Rezeptors kommt es zum vollständigen Verlust des Paclitaxel-vermittelten Zellzyklus-Arrests, was auch die B1-Cyclin-Daten bestätigen. Hier steigt das B1-Cyclin durch die Paclitaxel-Behandlung in den HER-2-Ribozymzellen nicht an, während in den Wildtypzellen ein Anstieg von 13,8 % auf 20,2 % zu verzeichnen ist.

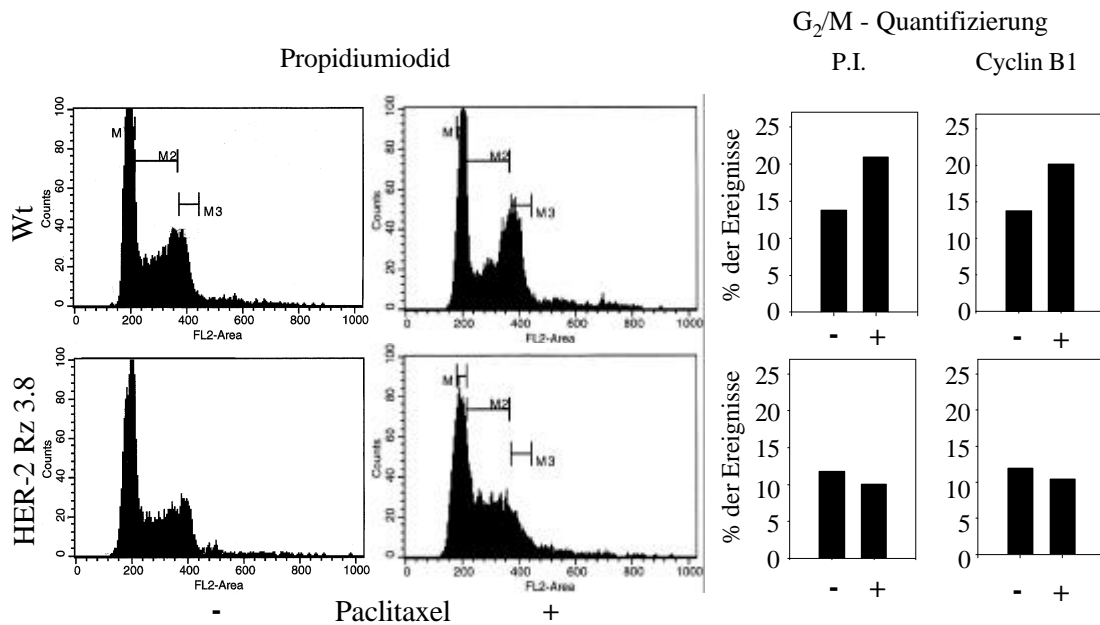


Abb. 3.1-9: Die HER-2-Herunterregulation in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen verhindert einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase bei Paclitaxel-Behandlung. Während die Chemotherapie mit Paclitaxel (+) bei den Wildtyp SKOV-3-Zellen einen klassischen G₂/M-Arrest auslöst, kommt es, wie sich sowohl im P.I.-FACS, als auch durch die Bestimmung der B1-Cycline zeigt, durch ribozymvermittelte Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in Rz 3.8 Zellen zu keinem Arrest in der G₂/M-Phase mehr.

Topotekan blockiert als Topoisomerasehemmer die Zellen vor allem in der S-Phase. Dieser S-Phase-Arrest findet durch die 24 h Topotekanbehandlung (0,1 µg/ml), (Abb. 3.1-10) sowohl in den SKOV-3-Wildtypzellen, als auch den HER-2-herunterregulierten Zellen statt. Allerdings sind leichte Unterschiede im Zellzyklus zu beobachten.

Die Wildtypzellen reagieren auf die Topotekan-Behandlung mit einer Verbreiterung des G₀/G₁-Phase-Peaks und der Zunahme des S-Phase-Peaks um den Faktor 2,7 (14,6 % auf 39,2 %). Diese Zunahme fällt im Vergleich zu den HER-2-Ribozymzellen, die einen S-Phase-Anstieg um das 1,8-fache haben, deutlich größer aus (s. unten Mitte: S-Phase-Quantifizierung). Außerdem vergrößert sich die G₂/M-Phase der HER-2-Ribozymzellen (Cyclin B1-Anstieg von 9 % auf 17 %), was auf einen kleinen zusätzlichen Arrest hindeutet (s. unten links: G₂/M Quantifizierung).

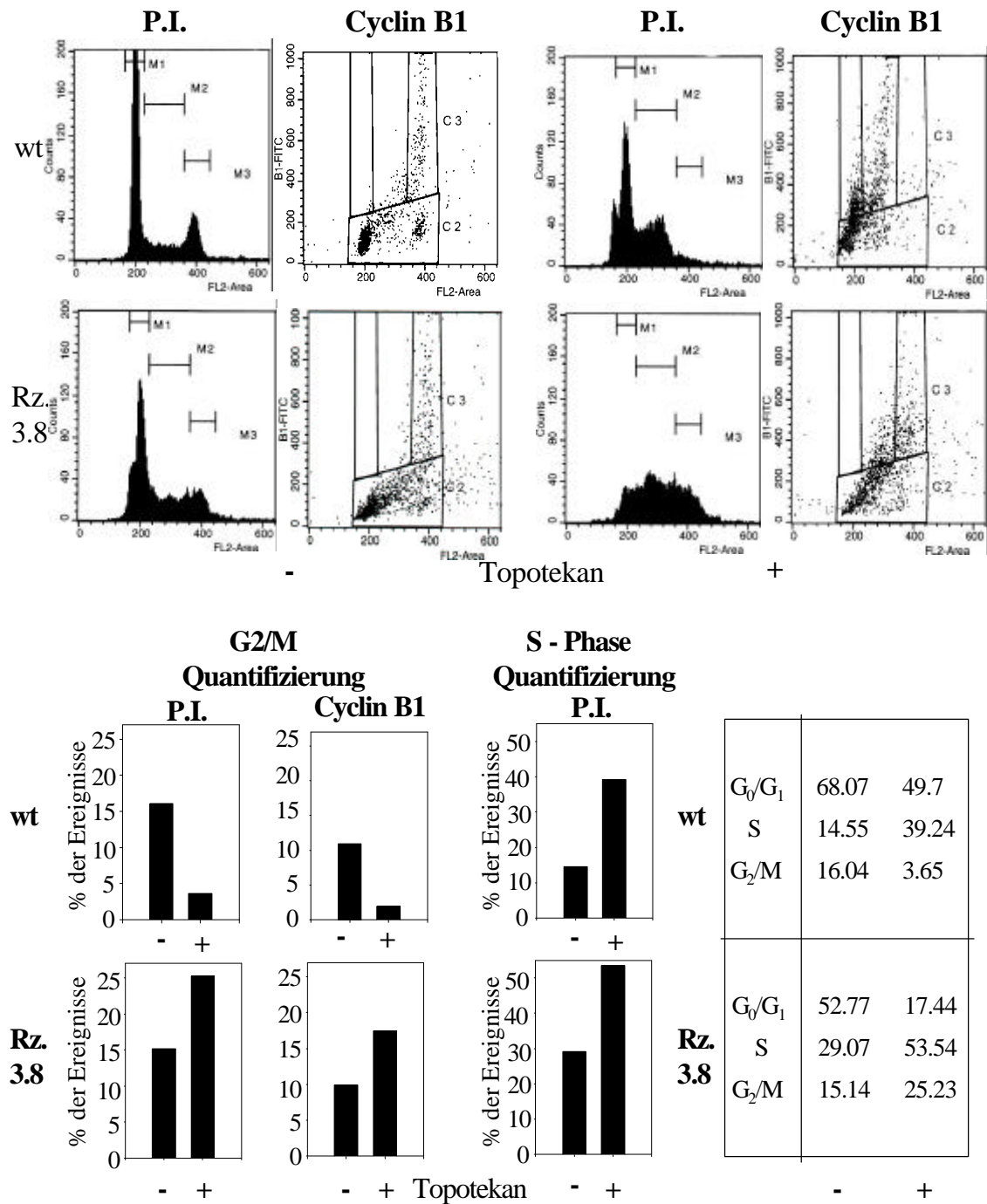


Abb. 3.1-10: Abhängig vom HER-2-Rezeptorstatus wird bei der Behandlung von SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen mit Topotekan (0,1 µg/ml) eine unterschiedliche Verteilung im Zellzyklus beobachtet. Während sich bei den SKOV-3-Wildtypzellen ein Teil der Zellen noch in der G₀/G₁-Phase befindet, und ein großer Anteil der Zellen dann typisch in der S-Phase arretieren, ist durch Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in Rz 3.8 Zellen keine verbreiteter G₀/G₁-Phase-Peak mehr zu erkennen. Die Zellen zeigen neben dem ausgeprägten S-Phase-Arrest einen zusätzlichen Arrest in der G₂/M-Phase. Dieses ist sowohl in der FACS-Analyse mit P.I. , als auch durch die Cyclin B1-Bestimmung nachweisbar.

Bei der Behandlung mit rViscumin (1 ng/ml) fällt auf, dass rViscumin keinen Einfluss auf den Zellzyklus hat. Abb. 3.1-11 zeigt, dass das Verhältnis von G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase vor und nach der Behandlung annähernd gleich geblieben ist.

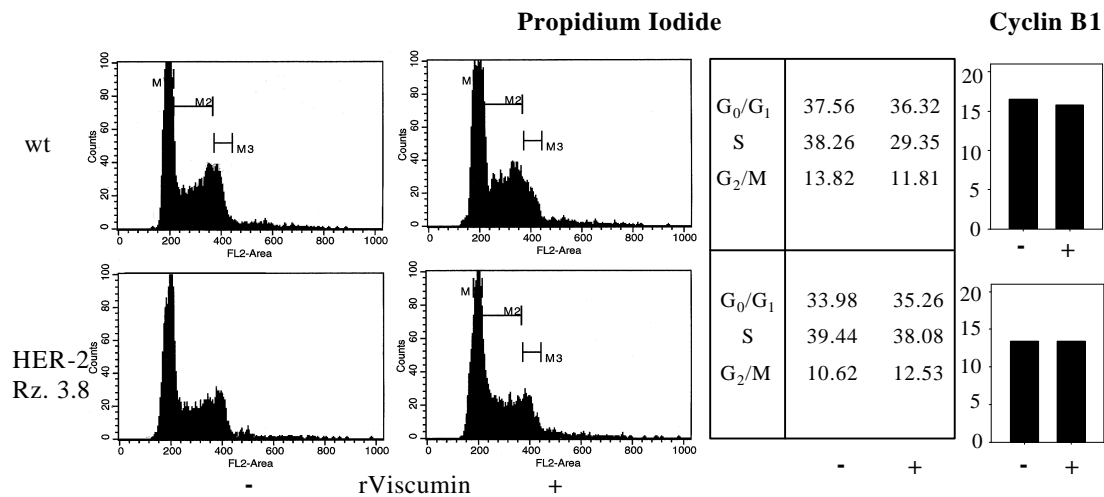


Abb. 3.1-11: Unabhängig vom HER-2-Expressionsstatus ist die Zellzyklusverteilung der SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen bei der Behandlung mit rViscumin gleichbleibend. Sowohl die Wildtypkontrollzellen, als auch die Rz 3.8-Zellen mit verminderter HER-2-Expression haben mit (+) oder ohne (-) Behandlung mit rViscumin die gleiche Zellzyklusverteilung, was in der Propidiumiodid- und Cyclin B1 FACS-Analyse gezeigt werden konnte.

3.2 Bedeutung der extrazellulären HER-2-Rezeptordomäne (ECD) in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen

3.2.1 Einfluss der HER-2-ECD Expression auf das Wachstum von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen

Die Überexpression der 100 kDa HER-2-ECD-Rezeptorvariante hat deutliche Auswirkungen auf das Zellwachstum. Wie in der Zellwachstumskinetik (Abb. 3.2-1) zu sehen ist, haben die MCF-7-Zellen, welche die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors minimal exprimieren, eine etwa 2-tägige Verdopplungszeit, während sich diese durch Überexpression der HER-2-ECD auf ca. 4 Tage verlängert. Nach 7-tägigem

Wachstum der MCF-7-Brustkarzinom-Zellen, ist die Zellzahl, durch Überexpression der HER-2-ECD, auf nur noch ca. 50 % gesenkt (Abb. 3.2-1).

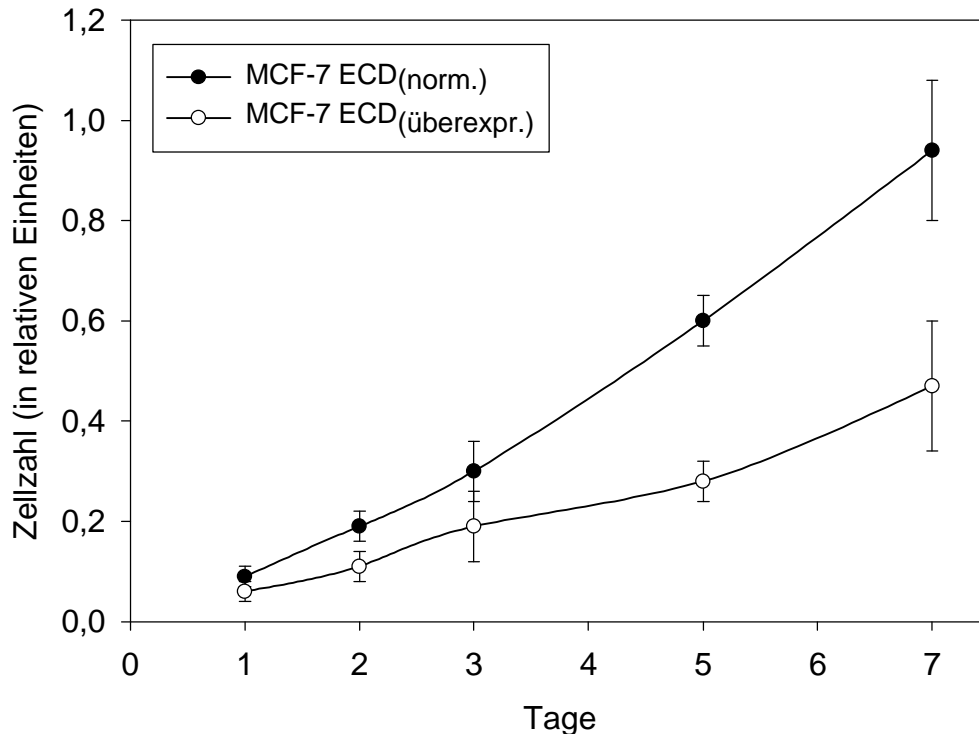


Abb. 3.2-1: Das spontane Wachstum der MCF-7-Brustkarzinom-Zellen wird durch Überexpression der extrazellulären HER-2 Rezeptordomäne (leere Kreise), bei einem Wachstum über 7 Tage, um ca. 50 % gesenkt.

3.2.2 Einfluss der Expression der HER-2-ECD auf die Resistenz von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika

Zur Untersuchung der Resistenzänderung von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen gegenüber Chemotherapeutika durch Überexpression einer dominant negativen HER-2-Rezeptormutante wurden Zellwachstumsversuche unter dem Einfluß von Cisplatin, Vinblastin, Doxorubicin, Topotekan und Paclitaxel durchgeführt.

Bei der Behandlung mit Cisplatin (Abb. 3.2-2) zeigte sich eine Cisplatin-Resistenz beider Zelllinien über ein großes Konzentrationsspektrum, während bei der Doxorubicinbehandlung (nicht gezeigt) und der Vinblastin-Behandlung (Abb. 3.2-3) die

Dosiswirkungskurven schon bei geringeren Konzentrationen wieder abfallen und somit eine Sensitivität der Zellen für das Zytostatikum anzeigen. Bei der Behandlung mit Cisplatin, Vinblastin und Doxorubicin besteht kein Unterschied zwischen HER-2-ECD überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen. Sowohl bei dem Zytostatikum Paclitaxel (Abb. 3.2-5) als auch bei Topotekan (Abb. 3.2-6) zeigt sich hingegen, dass die Überexpression der HER-2-Rezeptormutante einen deutlichen Einfluß auf die Zytostatika-Resistenz hat. Trotz des etwas unruhigen Kurvenverlaufes im Bereich der Konzentration 10^3 nM Paclitaxel (Abb. 3.2-5) kann man sagen, daß HER-2-ECD überexprimierende MCF-7 Brustkarzinom-Zellen eine ca. über 100-fach höhere Sensitivität auf Paclitaxel (EC_{50} : 8 nM) zeigen, als Kontrollzellen mit nur geringer Expression von HER-2-ECD (EC_{50} : 9×10^2 nM). Bei der Behandlung mit Topotekan wirkt sich die Überexpression der dominant negativen HER-2-Rezeptormutante ebenfalls in einem Anstieg der Sensitivität aus.

Auch hier, wie bei den Wachstumsversuchen der SKOV-3-Zellen unter Zytostatika (s. 3.1.2) konnte somit bewiesen werden, dass die Resistenzlage der Zellen zum einen durch Manipulation am HER-2-Rezeptorstatus verändert wird, zum andern aber auch von der Wahl des Zytostatikums abhängig ist.

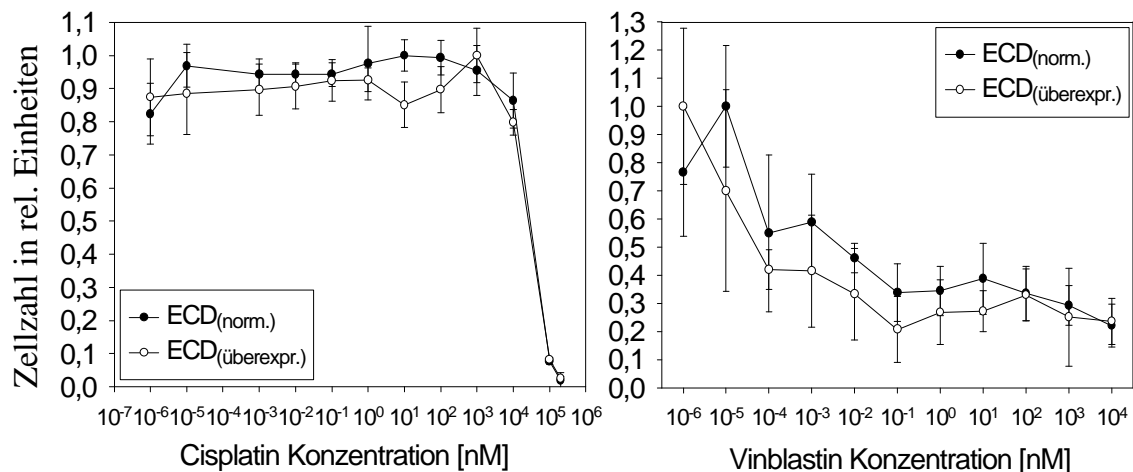


Abb. 3.2-2 + 3.2-3: Die Überexpression der extrazellulären HER-2-Domäne (HER-2 ECD) hat keinen Einfluss auf die Sensitivität von MCF-7 Brustkarzinom-Zellen gegenüber der Behandlung mit Cisplatin und Vinblastin.

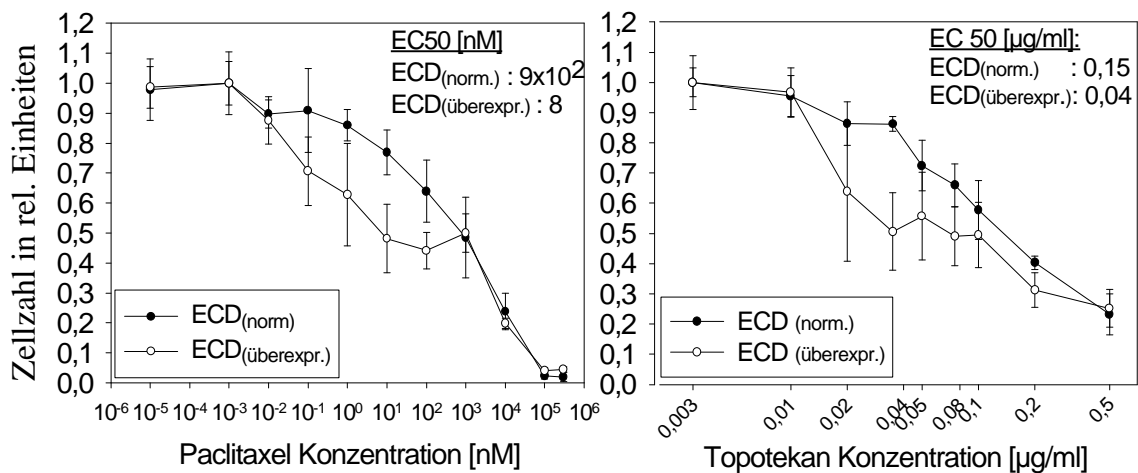


Abb. 3.2-5 + 3.2-6: HER-2-ECD-Überexpression in MCF-7 Brustkarzinom-Zellen erhöht die Sensitivität gegenüber Paclitaxel und Topotecan. Im Wachstumsversuch unter der Behandlung mit Paclitaxel zeigen die Zellen durch Überexpression der extrazellulären Domäne des HER-2-Rezeptors (leerer Kreis) eine über 100-fach gesteigerte Sensitivität (Abb. 3.2-5).

Auch auf die Behandlung mit Topotecan (Abb. 3.2-6) reagieren die HER-2-ECD überexprimierenden Brustkarzinom-Zellen (leerer Kreis) deutlich sensitiver als die normal exprimierenden Zellen.

3.2.3 Einfluss der HER-2-Level auf die basale und die Zytostatika-vermittelte Apoptose-Induktion in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen

Die Apoptoseuntersuchungen der MCF-7-Zellen wurden unter der Fragestellung durchgeführt, ob die beobachteten Wachstumsunterschiede bzw. die Sensitivitätsunterschiede gegenüber Zytostatika durch die HER-2-ECD-Überexpression auf einem veränderten Apoptoseverhalten beruhen.

Bei der Bestimmung der basalen Apoptose der MCF-7-Zelllinien nach 2 Tagen Wachstum fällt auf, dass die HER-2-ECD-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den normal exprimierenden im ELISA eine deutlich höhere Apoptoserate verzeichnen (Abb. 3.2-7 + 3.2-8). Durch die Überexpression der extrazellulären Domäne steigt die basale Apoptoserate um mehr als das 9-fache an (vergleiche 1. zu 3. Säule).

Die HER-2-ECD-überexprimierenden MCF-7 Brustkarzinom-Zellen zeigen gegenüber normal exprimierenden eine unterschiedliche Sensitivität bei der Behandlung mit Taxol

und Topotekan im Zellwachstumsversuch. Die initial schon erhöhte Apoptoserate der ECD-überexprimierenden Zellen wird durch die 48 h Behandlung der Zellen mit 10 nM Paclitaxel (Abb. 3.2-7) bzw. 0,05 µg/ml Topotekan (Abb. 3.2-8) noch weiter gesteigert. Die Zunahme der Apoptose durch die Behandlung bleibt allerdings geringer als bei den Kontrollzellen. Durch die Überexpression der ECD erhöht sich, absolut gesehen, die Apoptose-Rate dennoch, sowohl bei der Behandlung mit Paclitaxel, als auch mit Topotekan, in etwa um den Faktor 3 (Abb. 3.2-7 + 3.2-8; Vergleich jeweils der 2. und 4. Säule).

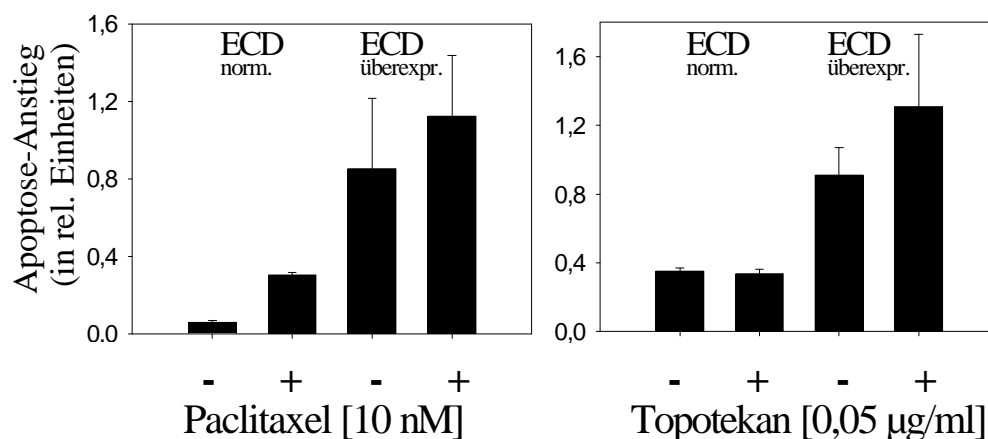


Abb. 3.2-7 + 3.2-8: Anstieg der Apoptose durch Überexpression der extrazellulären HER-2-Domäne. Die MCF-7-Zellen, bei denen die ECD überexprimiert wurde, haben im Vergleich zu den Kontrollzellen eine bereits deutlich erhöhte basale Apoptose (1. + 3. Säule). Unter der Behandlung mit Paclitaxel und Topotekan ist die Apoptoserate dieser Zellen dann, in absoluten Werten ausgedrückt, auch um etwa den Faktor 3 höher im Vergleich zu den Kontrollzellen (Säule 2 vers. Säule 4). Die Zunahme der Apoptose durch die Behandlung mit Paclitaxel und Topotekan, ist bei den HER-2-ECD-überexprimierenden Zellen allerdings geringer im Vergleich zu den Kontrollzellen.

3.2.4 Beeinflussung des Zellzyklus durch Paclitaxel und Topotekan in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen in Abhängigkeit von der HER-2-ECD-Expression

Die Paclitaxel-Behandlung wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die MCF-7-Zellen, die die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors überexprimieren, reagieren frühzeitig mit einer zunehmenden Blockierung in der G2/M-Phase. Bei Einsatz von 10 nM Paclitaxel über 24 h steigt der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase von 16,3 % auf 20,9 % und wird bei 24 h Behandlung mit 20 nM Paclitaxel auf 48,7 % gesteigert (Abb. 3.2-9 b / s. G2/M Quantifizierung) Auch die Cyclin B1-Daten zeigen diesen G2/M-Arrest mit einem Anstieg der Zellen mit hoher Cyclin B1-Expression von 4,2 % auf 16,7 % (10 nM Paclitaxel über 24 h) und einem Anstieg auf 51,4 % bei 20 nM Paclitaxel über 24 h.

Bei den MCF-7-ECD-Kontrollzellen ist ein deutlicher Unterschied im Ansprechen auf Paclitaxel zu sehen. Der G0/G1-Peak ist bei Behandlung mit 10 nM Paclitaxel (24 h) stark verbreitert und auch höher als bei 10 nM Behandlung der HER-2-ECD-überexprimierenden Zellen. Hier befinden sich daher noch mehr Zellen in der G0/G1-Phase (s. Abb: 3.2-9 b: Quantifizierung der G0/G1-Phase). Auch bei 20 nM Behandlung unterscheidet sich das Verteilungsmuster der Zellen. Nach wie vor ist der verbleibende Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase größer. Es findet sich aber auch ein Teil an Debridement (s. links v. M1 im Flowzytogramm), der größer ist als bei den ECD überexprimierenden Zellen.

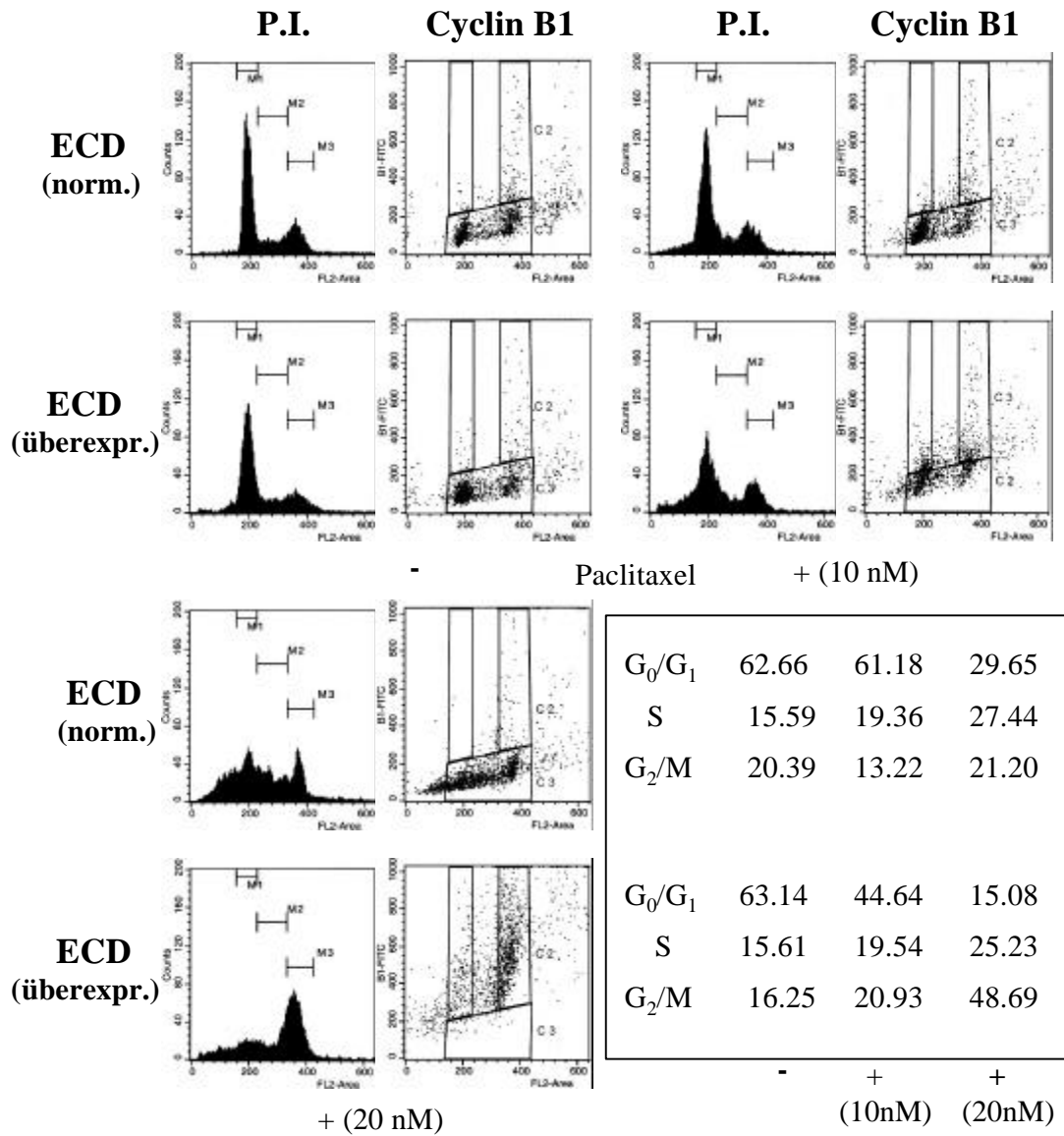


Abb. 3.2-9 a: FACS-Diagramme der P.I. Analysen mit den Gates M1, M2, M3 für G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase und die Punktwolkendiagramme die Cyclin B1 Facs-Analysen, wobei das obere rechte Kästchen (C2) die G₂/M-Phase quantifiziert.

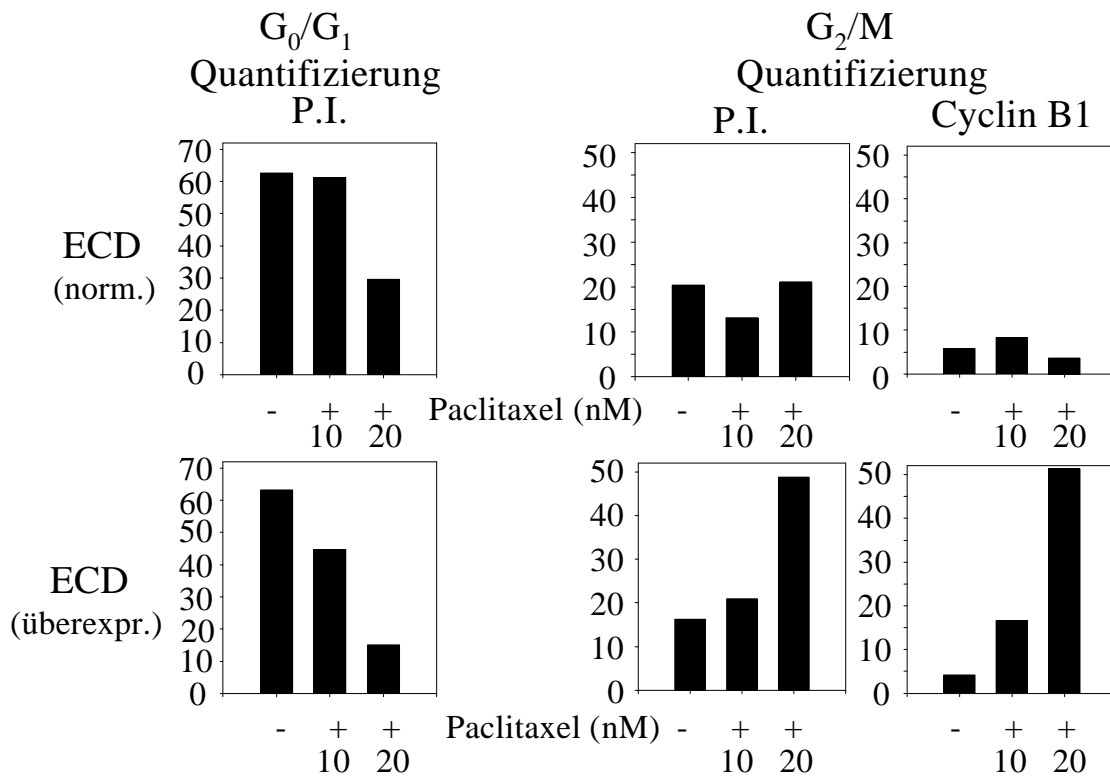


Abb. 3.2-9 b: Der Paclitaxel-Effekt auf den Zellzyklus von MCF-7-Brustkarzinom-Zellen ist abhängig von der Überexpression der HER-2-ECD. Während bei ECD-überexprimierenden MCF-7-Zellen mit zunehmender Zytostatikumskonzentration der Anteil an Zellen in der G₂/M-Phase immer weiter steigt, und sie schließlich einen G₂/M-Block (Zahlentabelle: 16,25 % auf 48,69 %) zeigen, ist die Verteilung bei MCF-7-Zellen, die einen normalen ECD-Status haben, sowohl bei 10, als auch bei 20 nM Behandlung, durch eine stark verbreiterte G₀/G₁-Phase gekennzeichnet.

Die Überexpression der HER-2-ECD hat in MCF-7-Zellen keine Auswirkung auf die Topotekan-vermittelte Beeinflussung des Zellzyklus. Beide Zelllinien, sowohl die ECD-überexprimierenden, als auch die Kontrollzellen reagieren auf die Topotekan-Behandlung mit einer eindeutigen Blockierung in der S-Phase des Zellzyklus. Bei beiden steigt die Anzahl der Zellen in der S-Phase um etwa den Faktor 2 (Kontrollzellen: 29,3 % auf 57,4 % ; ECD-überexprimierende Zellen: 30,6 % auf 63,35 %).

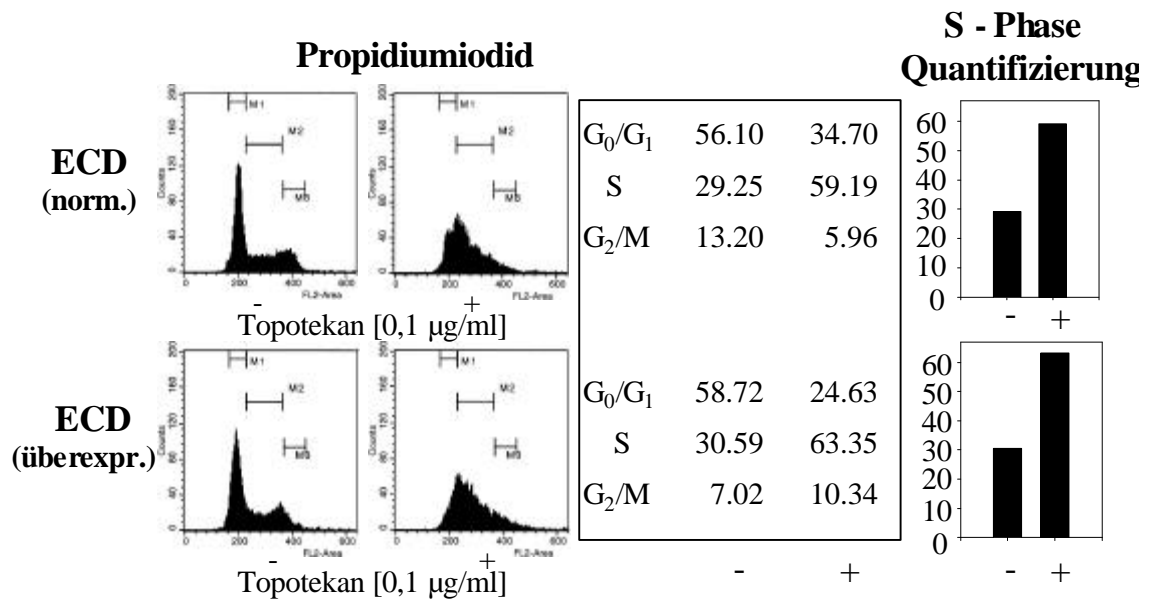


Abb. 3.2-10: Durch die Überexpression der HER-2-ECD ändert sich die Zellzyklusverteilung bei der Behandlung von MCF-7 Brustkarzinom-Zellen mit Topotecan nicht. Durch die Therapie mit Topotecan (+) kommt es sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei den ECD-überexprimierenden Zellen zu einem klassischen S-Phase-Arrest (~30 % auf ~60 %).

4 Diskussion

Das Ansprechen auf eine Chemotherapie, sowohl beim Mamma- als auch beim Ovarialkarzinom, differiert bei verschiedenen Patientinnen sehr stark. Als möglicher Erklärungsansatz hierfür wurde eine Abhängigkeit von einer eventuellen Onkogen-Expression vermutet. Ein molekularer Marker, der identifiziert werden konnte und das Ansprechen auf bestimmte Zytostatika entscheidend beeinflussen kann, ist der HER-2-Rezeptor (s. Kap. 1.5). So soll in dieser Arbeit vergleichend in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen und MCF-7-Mammakarzinom-Zellen der Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf die Wirkung verschiedener Zytostatika untersucht werden. In Ovarialkarzinom-Zellen kommt ein Ribozym-Targeting-Modell zur HER-2-Rezeptor-Herunterregulation zum Einsatz. Dieses hat in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen keine ausreichend differierenden HER-2-Expressionslevel zwischen Ribozym-transfizierten Zellen und Kontrollzellen gebracht (Daten nicht gezeigt). Daher findet hier ein Alternativmodell Anwendung. In MCF-7-Brustkarzinom-Zellen wird die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors überexprimiert. Diese ECD-Überexpression ist für ihre antagonistischen Effekte auf den „full-length“-HER-2-Rezeptor und die damit einhergehenden wachstumsinhibierenden Eigenschaften bekannt (Aigner et al., 2001). Zudem ist der Einfluss der Überexpression dieser HER-2-ECD auf das Ansprechen gegenüber Chemotherapie weitgehend unerforscht und daher von großem Interesse.

Die chemotherapeutische Behandlung des Ovarialkarzinoms, deren wichtigste Substanz schon seit Jahren Cisplatin darstellt, ist durch eine äußerst schlechte Ansprechrates und das häufige Auftreten von Resistenzen gekennzeichnet. Häufig als Kombinationstherapeutikum im Rahmen einer First-Line-Chemotherapie kommt das äußerst aktive Paclitaxel zum Einsatz (NCCN – Practice Guidelines in Oncology 2002). Die bisherige Datenlage über die Zytostatika-Resistenz von Ovarialkarzinom-Zellen ist widersprüchlich. Auf der einen Seite konnte eine E1A-vermittelte Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in SKOV-3.ip1 Ovarialkarzinom-Zellen eine Sensibilisierung gegenüber Paclitaxel zeigen (Ueno et al., 2000). Auf der anderen Seite zeigen Untersuchungen von Aigner et al., (2000), dass eine Ribozym-vermittelte HER-2-Inhibition in SKOV-3-Zellen mit einer vermehrten Resistenz gegenüber einer Paclitaxeltherapie einhergeht. Dies geht mit Arbeiten zu cDNA-Arrays Paclitaxel-

resistenter Zellen konform, in denen verminderte HER-2-Level mit einem Paclitaxel-resistenten Phänotyp einhergehen (Duan et al., 1999). In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Aigner et al. reproduziert werden, ferner wurde durch die zusätzliche Selektion verschiedener Klone unterschiedlicher Expressionslevel (HER-2 Rz 3.3, HER-2 Rz 3.7) hier die direkte Abhängigkeit der Sensitivität der Ovarialkarzinom-Zellen von der HER-2-Expression weiter untermauert. Die Resistenzzunahme der Ovarialkarzinom-Zellen verhält sich proportional zur Abnahme der HER-2-Expression. Somit kann eine „Gen-Dosis-Abhängigkeit“ der Sensitivitätsänderung gegenüber Paclitaxel gezeigt werden.

Dass diese Ergebnisse nicht nur bei Ribozym-vermittelter HER-2-Inhibition Gültigkeit haben, sondern von allgemeiner Bedeutung sind, konnte in Versuchen, die sich dieser Arbeit anschlossen, gezeigt werden. Zum einen wurde durch die Applikation eines spezifischen HER-2-Antikörpers (Herceptin) der HER-2-Rezeptor antagonisiert, zum andern wurden zwei HER-2-Tyrosinkinase-Inhibitoren verwandt, die eine stark inhibitorische Wirkung auf die Phosphorylierung des HER-2-Rezeptors, und damit auf dessen Signaltransduktion haben (Abuharbid, Apel et al., 2004). Trotz der sich vollständig unterscheidenden Wirkmechanismen dieser beiden Ansätze im Vergleich zu dem in dieser Arbeit gewählten Ribozym-targeting des HER-2-Rezeptors konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Durch die HER-2-Inhibition wurde erneut die Resistenz der Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber Paclitaxel deutlich erhöht. Etwaige Fehler durch den in dieser Arbeit verwandten Ansatz der HER-2-Inhibition, sowie durch die klonale Selektion der unterschiedlich HER-2-exprimierenden Zellen, können dadurch ausgeschlossen werden.

Paclitaxel bindet an Mikrotubuli und hemmt damit die Ausbildung der Mitosespindel in der Zellteilungsphase. Die Zellen arretieren im Zellzyklus in der G₂/M-Phase. Die Zellzyklusanalysen dieser Arbeit zeigen interessanterweise, dass durch die ribozymvermittelte Herunterregulation des HER-2-Rezeptors dieser Paclitaxel-Effekt aufgehoben ist. Auch die Apoptoseinduktion durch Paclitaxel (beschrieben in Moos et al., 1998), die in den Kontrollzellen deutlich im ELISA nachweisbar ist, geht in den HER-2-supprimierten Rz 3.8-Zellen verloren. Aufgehobener Zellzyklusarrest und nicht mehr nachzuweisende Apoptoseinduktion können damit die deutliche Resistenzzunahme der Ovarialkarzinom-Zellen begründen. Dieses stimmt mit Arbeiten

überein, die dem HER-2-Rezeptor im allgemeinen eine Zellzyklus- und Apoptose-beeinflussende Rolle zusprechen (Pietras et al., 1998; Alaoui-Jamali et al., 1997).

Die MCF-7-Brustkarzinom-Zellen zeigen in den Wachstumsversuchen ohne Zytostatika vergleichbare Ergebnisse zu den Ovarialkarzinom-Zellen. Die Überexpression der „dominant negativen Rezeptormutante“ HER-2-ECD wirkt in den Brustkarzinom-Zellen als endogener Wachstumsinhibitor (Aigner et al., 2001). Durch diese Antagonisierung des HER-2-Rezeptors nimmt die Proliferation signifikant ab. In SKOV-3-Zellen wirkt die direkte Herunterregulation des „HER-2-Full-length-Rezeptors“ durch Ribozymtargeting ebenfalls proliferationsinhibierend. So eindeutig die Antagonisierung des HER-2-Rezeptors in Wachstumsversuchen von Mamma- und Ovarialkarzinom-Zellen die gleiche Wirkung zeigt, so sehr bewirkt diese einen unterschiedlichen Effekt auf beide Zelllinien in ihrem Ansprechen auf Paclitaxel. Durch Überexpression der HER-2-ECD in den Mammakarzinom-Zellen wird die Sensitivität der Zellen gegenüber Paclitaxel deutlich gesteigert. Dieses stimmt mit Ergebnissen überein, die eine Chemoresistenzzunahme von Mammakarzinom-Zellen durch Überexpression von HER-2 gefunden haben (Yu et al., 2000), und mit schon etablierten Chemotherapieverfahren des Mammakarzinoms, in denen mit Hilfe des Antikörpers Herceptin der HER-2-Rezeptor antagonisiert und die Chemotherapie kombiniert wird (Pegram et al., 1998). Das zeigt, dass der hier gewählte Ansatz der Überexpression der HER-2-ECD die Chemoresistenz der Zellen auf gleiche Art und Weise beeinflusst und zu einer Sensitivierung der Mammakarzinom-Zellen führt. Die Antagonisierung des HER-2-Rezeptors zeigt in diesen Zellen also einen vollständig gegenläufigen Effekt im Vergleich zu den Ovarialkarzinom-Zellen. Dies macht deutlich, dass die gezeigten Resistenzunterschiede in beiden Zelllinien nicht einfach auf einer verlangsamten Proliferation beruhen, sondern andere Mechanismen von entscheidender Bedeutung sind, die in beiden Zelllinien differieren und diesen HER-2-vermittelten Effekt auslösen.

Die in dieser Arbeit gezeigten Apoptoseanalysen geben Aufschluß über die Proliferationshemmung der Brustkarzinom-Zellen durch Überexpression der HER-2-ECD. Wurde eine Hemmung der „downstream“-Signaltransduktionswege (Induktion der p44/p42 Aktivierung) durch HER-2-ECD-Überexpression schon beschrieben

(Aigner et al., 2001), so konnte hier gezeigt werden, dass zusätzlich auch die Apoptoserate in diesen Zellen um mehr als den Faktor 9 ansteigt.

Die erhöhte Sensitivität von ECD-überexprimierenden Zellen auf die Behandlung mit Paclitaxel kann durch die Apoptoseanalysen nicht vollständig geklärt werden. Die absolute Apoptoserate in den ECD-überexprimierenden Zellen nach Behandlung mit Taxol ist etwa 3 mal höher im Vergleich zu den Kontrollzellen. Der Apoptose-Anstieg durch die Zytostatikums-Behandlung, unter Berücksichtigung der basal differierenden Apoptoserate vor der Behandlung, zeigt aber im Vergleich der beiden Zelllinien keinen signifikanten Unterschied. Die Untersuchungen des Zellzyklus zeigen eine deutliche Sensitivierung für einen G₂/M-Phase-Arrest durch die Überexpression der HER-2-ECD. Diese Zellen zeigen schon bei deutlich geringeren Paclitaxel-Konzentrationen einen kompletten G₂/M-Block.

Die Auswirkungen der HER-2-Rezeptor-Expression ist also offensichtlich verschieden in MCF-7-Mamma- und SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen. Werden die Mammakarzinom-Zellen durch die Überexpression eines endogenen Inhibitors (HER-2-ECD) auf eine Paclitaxel-Therapie sensibler, so spricht in den Ovarialkarzinom-Zellen eine Herunterregulation des „HER-2-full-length-Rezeptors“ für eine deutliche Zunahme der Zytostatikumsresistenz. Ein Korrelat auf Ebene des Zellzyklus konnte in dieser Arbeit gefunden werden: Kommt es in den Ovarialkarzinom-Zellen durch Herunterregulation des HER-2-Rezeptors zur Aufhebung des Zellzyklusarrestes, so zeigen Mammakarzinom-Zellen durch Antagonisierung des HER-2-Rezeptors (Überexpression der HER-2-ECD) einen vorzeitigen Übergang in den G₂/M-Phase-Arrest.

Um im weiteren die molekularen Veränderungen durch die Herunterregulation des HER-2-Rezeptors auf zellulärer Ebene besser verstehen zu können, sind Untersuchungen verschiedener Signaltransduktionswege und ihrer Veränderungen von großem Interesse. Sie wurden an diese Arbeit angeschlossen (Abuharbid, Apel et al., 2004). Untersucht wurden verschiedene MAP Kinasen, für die bekannt ist, dass sie u.a. einen proapoptotischen Einfluss haben (Makin et al., 2001 als Review), sowie insbesondere die Caspase-abhängigen Apoptose-Wege. Caspase 3 und 7 gelten hier als die wichtigsten Effektoren bei der Caspasen-Aktivierung (Nunes et al., 1998 als Review). Außerdem wurde Bcl-2 näher untersucht, für das ein Mitochondrien-

Membran-stabilisierender Effekt beschrieben ist, und das die Caspasen-Aktivität reguliert (Makhija et al., 1999; Blagosklonny et al., 1996).

Um zu zeigen, ob die hier gezeigten Chemoresistenzänderungen gegenüber Paclitaxel auf alle Chemotherapeutika übertragbar sind, wurden mehrere Zytostatika untersucht. Bei der zytostatischen Behandlung mit Cisplatin und Doxorubicin zeigt der HER-2-Expressionslevel keinen Einfluss auf die Sensibilität der Tumorzellen, weder bei MCF-7-Mammakarzinom- noch bei SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen. Für letztgenannte entspricht dieses den Voruntersuchungen von Aigner et al. (2000). In SKOV-3-Zellen wurde aber auch schon eine HER-2-abhängige Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin diskutiert (Langton-Webster et al., 1994). Die HER-2-abhängige Resistenzänderung der Tumorzellen scheint also ebenfalls eine Abhängigkeit vom Zytostatikum zu zeigen.

Damit stellt sich die Frage, ob eventuell der Wirkmechanismus des Zytostatikums von entscheidender Bedeutung ist. Zu diesem Zweck wurde Topotekan als weiteres Zytostatikum ausgesucht. Es agiert als Topoisomerasehemmer über einen Wirkmechanismus, der ähnlich dem von Paclitaxel in den Zellzyklus eingreift (s. auch Kap.1.5.1) und findet außerdem im Rahmen einer Second-Line-Chemotherapie Anwendung in der Therapie des Ovarialkarzinoms (NCCN – Practice Guidelines in Oncology 2002). Bei der Behandlung mit Topotekan zeigen Ovarial- und Mammakarzinom-Zellen, wie bei der Behandlung mit Paclitaxel, eine deutliche Abhängigkeit ihrer Sensitivität von der Expression des HER-2-Rezeptors. So erhöht sich die Resistenz der SKOV-3-Zellen mit verminderter HER-2-Rezeptor-Expression und die MCF-7-Zellen werden sensitiver durch HER-2-ECD-Überexpression.

Auch die Daten der Apoptoseuntersuchung beider Zytostatika sind durchaus vergleichbar. Zwar ist die Apoptoseinduktion der Ovarialkarzinom-Zellen durch Topotekan-Behandlung nicht wie bei Paclitaxel nach Herunterregulation von HER-2 völlig aufgehoben, dennoch ist auch sie bei der Behandlung mit Topotekan deutlich vermindert. Die Untersuchung des Zellzyklus ergibt in den Mammakarzinom-Zellen keine Beeinflussung des klassischen S-Phase-Arrestes durch die HER-2-Rezeptor-Expression. Bei den Ovarialkarzinom-Zellen sind hier leichte Unterschiede zu verzeichnen: So zeigen die HER-2-Ribozymzellen keinen partiellen G₀/G₁-Block im

Vergleich zu den Kontrollzellen, präsentieren aber neben dem klassischen S-Phase-Arrest noch einen zusätzlichen Arrest in der G₂/M-Phase. Aufhebungen oder Sensibilisierungen für den Zytostatikum-spezifischen Zellzyklusarrest werden im Vergleich zur Paclitaxel-Behandlung nicht beobachtet. Die Sensibilisierung der MCF-7 Mammakarzinom-Zellen auf Topotekan durch Überexpression der HER-2-ECD ist also weder eindeutig durch Veränderungen der Apoptoseinduktion, noch des Zellzyklusverhaltens zu begründen. SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen mit herunterreguliertem HER-2-Rezeptor werden durch eine deutlich verminderte Apoptoseinduktion resistenter gegenüber Topotekan. Die Ergebnisse aus der Zellzyklusanalyse sind allerdings nicht eindeutig genug, um hieraus Schlussfolgerungen ziehen zu können. Hier wäre es interessant, noch zusätzliche Untersuchungen zu eventuellen Veränderungen von Apoptose-Pathways mit Berücksichtigung von bcl-2 sowie Caspase-3 und -7 (Nunez G. et al., 1998 als Review) anzuschließen.

Der HER-2-Expressionslevel bleibt dennoch ein entscheidender Faktor in dem Ansprechen der Tumorzellen auf eine Topotekanbehandlung und damit auf ein Chemotherapeutikum, das wie Paclitaxel in den Zellzyklus eingreift.

Ob dem Wirkmechanismus der Zytostatika, auf die die Tumorzellen durch Veränderungen in der HER-2 Expression sensitiver werden, eine entscheidende Bedeutung zukommt, sollte durch ein Zytostatikum geklärt werden, das sich in seinem Wirkmechanismus völlig von allen anderen in dieser Arbeit untersuchten unterscheidet. rViscumin agiert in den Zellen in Form einer ribosomalen Inaktivierung und besitzt zudem eine immunmodulatorische Wirkkomponente. Trotz des sich grundlegend unterscheidenden Wirkmechanismus zeigt das Ansprechen der SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen auf eine Behandlung mit rViscumin eine deutliche Abhängigkeit vom HER-2-Expressionslevel. Die Herunterregulation des HER-2-Rezeptors führt zu einer sich proportional zum HER-2-Level verhaltenden Resistenzzunahme und zeigt damit einen HER-2-Gen-Dosis-Effekt, der dem bei der Behandlung mit Paclitaxel oder Topotekan entspricht. Während rViscumin, wie auch durch dessen Wirkmechanismus zu begründen ist, keinen Effekt auf den Zellzyklus hat (s. Kap. 3.1.4), zeigt sich eine deutliche Apoptoseinduktion in den Zellen. Diese ist, wie hier gezeigt werden konnte, HER-2-Gen-Dosis abhängig und geht durch Ribozym-vermitteltes HER-2-Targeting vollständig verloren. Dies kann die Resistenzzunahme

der Zellen erklären. Der Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf die Sensitivität von SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen gegenüber Chemotherapeutika ist also deutlich auch bei diesem Zytostatikum, das über einen anderen Wirkmechanismus als Paclitaxel und Topotekan agiert, nachzuweisen. Nicht bei jedem Zytostatikum jedoch zeigt sich diese HER-2-abhängige Resistenz der Zellen. Cisplatin und Doxorubicin weisen eindeutig keinen Unterschied in der zytostatischen Potenz auf Ovarialkarzinom-Zellen auf, wenn diese in ihrem HER-2-Expressionslevel differieren (s. Kap. 3.1.2).

Für MCF-7-Mammakarzinom-Zellen steht das Experiment der Behandlung mit Viscumin noch aus. Es konnte gezeigt werden, dass Vinblastin, welches als Spindelinhistor einen ganz ähnlichen Wirkmechanismus wie Paclitaxel besitzt und das wie auch Topotekan in den Zellzyklus eingreift, keinen Unterschied in der zytostatischen Potenz auf MCF-7-Mammakarzinom-Zellen, bei differierenden HER-2-Expressionslevel, präsentiert. Vor dem Hintergrund dieser Daten wird deutlich, dass der Einfluss der HER-2-Expression auf die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika offensichtlich nicht auf alle Zytostatika verallgemeinert werden kann. Die Frage, ob durch Modulation am HER-2-Rezeptor die Chemotherapie mit einem bestimmten Zytostatikum positiv beeinflusst werden kann, stellt sich für jedes Zytostatikum individuell. Der Wirkmechanismus des Zytostatikums scheint dabei, nach den hier gezeigten Ergebnissen, eher nicht von entscheidender, oder zumindest alleiniger Bedeutung zu sein.

Wichtig ist, dass die Ergebnisse auch als spezifisch für eine Zelllinie betrachtet werden. So zeigen Mammakarzinom-Zellen bei bestimmten Zytostatika eine Sensibilisierung durch Antagonisierung des HER-2-Rezeptors, während sich dieses bei Ovarialkarzinom-Zellen genau gegenteilig verhält.

Dieses ist auch von entscheidender Bedeutung für eine eventuell kombinierte Herceptin-Therapie. Inzwischen für das Mammakarzinom zugelassen, sollte eine eventuelle Kontraindikation bei der Therapie des Ovarialkarzinoms diskutiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Herunterregulation des HER-2-Rezeptors in Ovarialkarzinom-Zellen, was der Anwendung des HER-2-Antikörpers Herceptin entsprechen würde, die Zellen gegenüber diversen Chemotherapeutika resistenter werden. Versuche, die sich dieser Arbeit anschlossen, konnten dieses bestätigen. Dort wurden die SKOV-3-Ovarialkarzinomzellen durch eine Herceptin-Behandlung

resistenter gegenüber einer Therapie mit Paclitaxel und rViscumin (Abuharbeid, Apel et al., 2004).

Des Weiteren lässt sich auch die Frage stellen, ob vor Beginn einer Herceptin-Therapie eines HER-2-überexprimierenden Mammakarzinoms nicht der Anteil an, vom Full-length-Rezeptor unabhängig exprimierter, HER-2-ECD auf der Zelloberfläche bestimmt werden muss. Nach den hier gezeigten Ergebnissen hat die Überexpression der endogen exprimierten HER-2-ECD einen sensibilisierenden Effekt auf eine Behandlung mit Paclitaxel und Topotekan, der aber durch eine Antikörpergabe in Form von Herceptin mit großer Wahrscheinlichkeit wieder verloren gehen würde. Der Anschluss von Untersuchungen über die Bedeutung der ECD-Überexpression bei der Kombination von Herceptin und Zytostatika ist hier von großem Interesse.

Diese Arbeit zeigt Ergebnisse, die zunächst nur auf der Untersuchung jeweils einer Zelllinie des Mamma- und des Ovarialkarzinoms beruhen und daher erste Tendenzen aufzeigen. Um diese Daten weiter zu sichern, müssen zusätzliche Zelllinien der beiden Tumoren untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der HER-2-Rezeptor, ein Tyrosinkinase-Rezeptor aus der "Epidermal Growth Factor Receptor" (EGFR)-Familie, gilt in Brustkarzinomen als wichtiger Marker für ein aggressiveres Tumorwachstum, ein erhöhtes Metastasierungs-Potential und eine gesteigerte Chemoresistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika. Ovarialkarzinome, in denen sich ebenfalls häufig eine Überexpression des HER-2-Rezeptors findet, sind sehr schlecht chemotherapeutisch zu behandeln, da sie schnell Resistenzen gegenüber Zytostatika entwickeln. Über den Einfluss des HER-2-Rezeptors auf die Chemoresistenz von Ovarialkarzinom-Zellen gibt es widersprüchliche Daten.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der HER-2-Expression auf die Resistenz gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika in Brust- und Ovarialkarzinomzellen untersucht. Hierzu wurde in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen die Expression des HER-2-Rezeptors mittels Ribozym-Targeting und klonaler Selektion inhibiert, und in MCF-7-Brustkarzinom-Zellen, zur Antagonisierung des HER-2-Rezeptors, eine dominant-negative HER-2-Rezeptormutante (HER-2-ECD) überexprimiert.

Es konnte für MCF-7-Mammakarzinom-Zellen eine Abhängigkeit der Sensitivität gegenüber Paclitaxel und Topotekan von dem Expressionslevel der HER-2-ECD gezeigt werden. Diese war bei der Behandlung mit Paclitaxel auf Veränderungen im Zellzyklus zurückzuführen. Bei SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen wurde anhand der unterschiedlich stark HER-2-exprimierenden Zellklone eine HER-2-Genosis-Abhängigkeit der Chemoresistenz gegenüber Taxol und Topotekan demonstriert, die sich aber interessanterweise zu der von Mammakarzinom-Zellen gegenläufig verhält. Als ursächlich für diese Abhängigkeit der Chemoresistenz in SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen vom HER-2-Expressionslevel und für den gegensätzlichen Verlauf, im Vergleich zu den Mammakarzinom-Zellen, konnten entscheidende Veränderungen in Apoptose-Induktion und Zellzyklus bestimmt werden.

Bei der Behandlung der Ovarialkarzinom-Zellen mit Doxorubicin und Cisplatin und der Mammakarzinom-Zellen mit Vinblastin und Cisplatin konnte nachgewiesen werden, dass keinerlei Einfluss der HER-2-Rezeptor-Expression auf die Chemoresistenz gegenüber diesen Zytostatika besteht. Daher wurde weitergehend der Frage nachgegangen, ob eventuell dem Wirkmechanismus des Zytostatikums eine entscheidende Bedeutung bei der HER-2-Abhängigkeit der Resistenz zukommt. Hierbei

zeigte sich, dass rViscumin, welches sich im Wirkmechanismus völlig von den anderen untersuchten Zytostatika unterscheidet, durch die Veränderung der HER-2-Expressionslevel deutlich in seiner zytostatischen Potenz auf SKOV3-Ovarialkarzinom-Zellen beeinflusst wurde. Es konnte auch hier die Abhängigkeit der Chemoresistenz der Zellen von der HER-2-Expression auf Veränderungen in der Apoptose-Induktion zurückgeführt werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit ergaben somit, dass die Chemoresistenz von MCF-7-Mammakarzinom-Zellen und SKOV-3-Ovarialkarzinom-Zellen bei einigen Zytostatika von der HER-2-Expression abhängig ist. Sie führten aber zu der Schlussfolgerung, dass dies offensichtlich nicht auf alle Zytostatika verallgemeinert werden kann, sondern für jedes Zytostatikum individuell und außerdem tumorzellspezifisch gesehen werden muss. Dem Wirkmechanismus der Zytostatika kommt, wie diese Ergebnisse hier zeigen, keine entscheidende Bedeutung zu.

6 Literaturverzeichnis

1. **Apel J, Abuharbeid S, Sander M, et al.** Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(2):403-12.
2. **Apel J, Abuharbeid S, Zugmaier G, et al.** Inhibition of HER-2 by three independent targeting strategies increases paclitaxel resistance of SKOV-3 ovarian carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2005; in press.
3. **Aigner A, Hsieh SS, Malerczyk C, Czubyko F.** Reversal of HER-2 over-expression renders human ovarian cancer cells highly resistant to taxol. *Toxicology.* 2000;144(1-3):221-8.
4. **Aigner A, Juhl H, Malerczyk C, Thybusch A, Benz CC, Czubyko F.** Expression of a truncated 100 kDa HER2 splice variant acts as an endogenous inhibitor of tumour cell proliferation. *Oncogene.* 2001;20(17):2101-11.
5. **Alaoui-Jamali MA, Paterson J, Al Moustafa AE, Yen L.** The role of ErbB-2 tyrosine kinase receptor in cellular intrinsic chemoresistance: mechanisms and implications. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(4):315-25.
6. **Alroy I, Yarden Y.** The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997;410(1):83-6.
7. **Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA.** The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature.* 1986;319(6050):226-30.
8. **Barnes MN, Deshane JS, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT.** Novel gene therapy strategy to accomplish growth factor modulation induces enhanced tumor cell chemosensitivity. *Clin Cancer Res.* 1996;2(7):1089-95.
9. **Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al.** Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1996;14(3):737-44.
10. **Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J.** Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* 1998;58(13):2825-31.

11. **Beerli RR, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE.** Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol.* 1995;15(12):6496-505.
12. **Blagosklonny MV, Schulte T, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM.** Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res.* 1996;56(8):1851-4.
13. **Brodowicz T, Wiltschke C, Budinsky AC, Krainer M, Steger GG, Zielinski CC.** Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro. *Int J Cancer.* 1997;73(6):875-9.
14. **Brooks SA, Leathem AJ.** Expression of N-acetyl galactosaminylated and sialylated glycans by metastases arising from primary breast cancer. *Invasion Metastasis.* 1998;18(3):115-21.
15. **Carraway KL, 3rd, Cantley LC.** A neu acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling. *Cell.* 1994;78(1):5-8.
16. **Cech TR.** Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. *Biosci Rep.* 1990;10(3):239-61.
17. **Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al.** Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2639-48.
18. **Colomer R, Montero S, Lluch A, et al.** Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2356-62.
19. **Czubayko F, Riegel AT, Wellstein A.** Ribozyme-targeting elucidates a direct role of pleiotrophin in tumor growth. *J Biol Chem.* 1994;269(33):21358-63.
20. **Czubayko F, Downing SG, Hsieh SS, et al.** Adenovirus-mediated transduction of ribozymes abrogates HER-2/neu and pleiotrophin expression and inhibits tumor cell proliferation. *Gene Ther.* 1997;4(9):943-9.
21. **Dickman S.** Antibodies stage a comeback in cancer treatment. *Science.* 1998;280(5367):1196-7.
22. **Doherty JK, Bond C, Jardim A, Adelman JP, Clinton GM.** The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(19):10869-74.

23. **Downing JR, Roussel MF, Sherr CJ.** Ligand and protein kinase C downmodulate the colony-stimulating factor 1 receptor by independent mechanisms. *Mol Cell Biol.* 1989;9(7):2890-6.
24. **Duan Z, Feller AJ, Penson RT, Chabner BA, Seiden MV.** Discovery of differentially expressed genes associated with paclitaxel resistance using cDNA array technology: analysis of interleukin (IL) 6, IL-8, and monocyte chemotactic protein 1 in the paclitaxel-resistant phenotype. *Clin Cancer Res.* 1999;5(11):3445-53.
25. **Endo Y, Tsurugi K, Franz H.** The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett.* 1988;231(2):378-80.
26. **Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W.** Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;43(1):87-95.
27. **Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH.** The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology.* 1998;55(1):33-8.
28. **Fehm T, Maimonis P, Katalinic A, Jager WH.** The prognostic significance of c-erbB-2 serum protein in metastatic breast cancer. *Oncology.* 1998;55(1):33-8.
29. **Gadella TW, Jr., Jovin TM.** Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 1995;129(6):1543-58.
30. **Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, et al.** Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 1995;378(6555):390-4.
31. **Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE.** Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol.* 1995;15(3):1182-91.
32. **Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE.** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J.* 1997;16(7):1647-55.
33. **Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, et al.** Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 1992;10(7):1049-56.

34. **Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, 3rd.** Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(17):8132-6.
35. **Haseloff J, Gerlach WL.** Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature.* 1988;334(6183):585-91.
36. **Haynes NM, Smyth MJ, Kershaw MH, Trapani JA, Darcy PK.** Fas-ligand-mediated lysis of erbB-2-expressing tumour cells by redirected cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother.* 1999;47(5):278-86.
37. **Hsieh SS, Malerczyk C, Aigner A, Czubayko F.** ERbB-2 expression is rate-limiting for epidermal growth factor-mediated stimulation of ovarian cancer cell proliferation. *Int J Cancer.* 2000;86(5):644-51.
38. **Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al.** Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(23):2335-42.
39. **Huston JS, McCartney J, Tai MS, et al.** Medical applications of single-chain antibodies. *Int Rev Immunol.* 1993;10(2-3):195-217.
40. **Hynes NE, Stern DF.** The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1198(2-3):165-84.
41. **Jarvinen TA, Holli K, Kuukasjarvi T, Isola JJ.** Predictive value of topoisomerase IIalpha and other prognostic factors for epirubicin chemotherapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998;77(12):2267-73.
42. **Jones JT, Akita RW, Sliwkowski MX.** Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 1999;447(2-3):227-31.
43. **Juhl H, Downing SG, Wellstein A, Czubayko F.** HER-2/neu is rate-limiting for ovarian cancer growth. Conditional depletion of HER-2/neu by ribozyme targeting. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29482-6.
44. **Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al.** ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J.* 1996;15(2):254-64.
45. **Kim HH, Sierke SL, Koland JG.** Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J Biol Chem.* 1994;269(40):24747-55.

46. **Langton-Webster BC, Xuan JA, Brink JR, Salomon DS.** Development of resistance to cisplatin is associated with decreased expression of the gp185c-erbB-2 protein and alterations in growth properties and responses to therapy in an ovarian tumor cell line. *Cell Growth Differ.* 1994;5(12):1367-72.
47. **LeVea CM, Myers JN, Dougall WC, Qian X, Greene MI.** A structural and kinetic comparison of proto-oncogenic and oncogenic neu holo-receptors expressed in insect cells. *Receptor.* 1993;3(4):293-309.
48. **Loughnan MS, Sanderson CJ, Nossal GJ.** Soluble interleukin 2 receptors are released from the cell surface of normal murine B lymphocytes stimulated with interleukin 5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(9):3115-9.
49. **Makhija S, Taylor DD, Gibb RK, Gercel-Taylor C.** Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *Int J Oncol.* 1999;14(3):515-21.
50. **Makin G, Dive C.** Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S22-6.
51. **McCall MJ, Hendry P, Jennings PA.** Minimal sequence requirements for ribozyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(13):5710-4.
52. **McKenzie SE, Keller MA, Cassel DL, et al.** Characterization of the 5'-flanking transcriptional regulatory region of the human Fc gamma receptor gene, Fc gamma RIIA. *Mol Immunol.* 1992;29(10):1165-74.
53. **Mehta RR, McDermott JH, Hieken TJ, et al.** Plasma c-erbB-2 levels in breast cancer patients: prognostic significance in predicting response to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1998;16(7):2409-16.
54. **Mockel B, Schwarz T, Zinke H, Eck J, Langer M, Lentzen H.** Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. *Arzneimittelforschung.* 1997;47(10):1145-51.
55. **Moos PJ, Fitzpatrick FA.** Taxanes propagate apoptosis via two cell populations with distinctive cytological and molecular traits. *Cell Growth Differ.* 1998;9(8):687-97.
56. **Moscow JA, Cowan KH.** Multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80(1):14-20.
57. **Mosley B, Beckmann MP, March CJ, et al.** The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell.* 1989;59(2):335-48.

58. **Mosley B, Beckmann MP, March CJ, et al.** The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell*. 1989;59(2):335-48.
59. **Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al.** c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med*. 1994;330(18):1260-6.
60. **Niskanen E, Blomqvist C, Franssila K, Hietanen P, Wasenius VM.** Predictive value of c-erbB-2, p53, cathepsin-D and histology of the primary tumour in metastatic breast cancer. *Br J Cancer*. 1997;76(7):917-22.
61. **Nooter K, Herweijer H.** Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer*. 1991;63(5):663-9.
62. **Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17(25):3237-45.
63. **Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al.** Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2659-71.
64. **Peles E, Yarden Y.** Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors. *Bioessays*. 1993;15(12):815-24.
65. **Petch LA, Harris J, Raymond VW, Blasband A, Lee DC, Earp HS.** A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. *Mol Cell Biol*. 1990;10(6):2973-82.
66. **Petit AM, Rak J, Hung MC, et al.** Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol*. 1997;151(6):1523-30.
67. **Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ.** Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*. 1998;17(17):2235-49.
68. **Pietras RJ, Pegram MD, Finn RS, Maneval DA, Slamon DJ.** Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*. 1998;17(17):2235-49.

69. **Pinkas-Kramarski R, Alroy I, Yarden Y.** ErbB receptors and EGF-like ligands: cell lineage determination and oncogenesis through combinatorial signaling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1997;2(2):97-107.
70. **Qian X, LeVea CM, Freeman JK, Dougall WC, Greene MI.** Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: a mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1500-4.
71. **Rozañ S, Vincent-Salomon A, Zafrani B, et al.** No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(1):27-33.
72. **Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, et al.** Soluble interleukin 2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. *J Immunol*. 1985;135(5):3172-7.
73. **Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N.** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19(3):183-232.
74. **Scott GK, Robles R, Park JW, et al.** A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 1993;13(4):2247-57.
75. **Shak S.** Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol*. 1999;26(4 Suppl 12):71-7.
76. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
77. **Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al.** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989;244(4905):707-12.
78. **Spivak-Kroizman T, Rotin D, Pinchasi D, Ullrich A, Schlessinger J, Lax I.** Heterodimerization of c-erbB2 with different epidermal growth factor receptor mutants elicits stimulatory or inhibitory responses. *J Biol Chem*. 1992;267(12):8056-63.
79. **Stancovski I, Sela M, Yarden Y.** Molecular and clinical aspects of the Neu/ErbB-2 receptor tyrosine kinase. *Cancer Treat Res*. 1994;71:161-91.

80. **Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA.** p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol.* 1986;6(5):1729-40.
81. **Tan M, Yao J, Yu D.** Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities. *Cancer Res.* 1997;57(6):1199-205.
82. **Tzahar E, Waterman H, Chen X, et al.** A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(10):5276-87.
83. **Tzahar E, Yarden Y.** The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1377(1):M25-37.
84. **Ueno NT, Bartholomeusz C, Herrmann JL, et al.** E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clin Cancer Res.* 2000;6(1):250-9.
85. **Uhlenbeck OC, Pardi A, Feigon J.** RNA structure comes of age. *Cell.* 1997;90(5):833-40.
86. **Vaughn JP, Iglehart JD, Demirdji S, et al.** Antisense DNA downregulation of the ERBB2 oncogene measured by a flow cytometric assay. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(18):8338-42.
87. **Wada T, Qian XL, Greene MI.** Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function. *Cell.* 1990;61(7):1339-47.
88. **Williams JM, Lea N, Lord JM, Roberts LM, Milford DV, Taylor CM.** Comparison of ribosome-inactivating proteins in the induction of apoptosis. *Toxicol Lett.* 1997;91(2):121-7.
89. **Yarden Y, Schlessinger J.** Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry.* 1987;26(5):1443-51.
90. **Yarden Y, Schlessinger J.** Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry.* 1987;26(5):1434-42.

91. **Yu D, Wang SS, Dulski KM, Tsai CM, Nicolson GL, Hung MC.** c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties. *Cancer Res.* 1994;54(12):3260-6.
92. **Yu D, Liu B, Tan M, Li J, Wang SS, Hung MC.** Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms. *Oncogene.* 1996;13(6):1359-65.
93. **Yu D, Jing T, Liu B, et al.** Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase. *Mol Cell.* 1998;2(5):581-91.
94. **Yu D, Liu B, Jing T, et al.** Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol. *Oncogene.* 1998;16(16):2087-94.
95. **Yu D, Hung MC.** Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene.* 2000;19(53):6115-21.
96. **Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W.** The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J Biol Chem.* 1991;266(3):1716-20.
97. **Zhang L, Chang CJ, Bacus SS, Hung MC.** Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells by emodin. *Cancer Res.* 1995;55(17):3890-6.

7 Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Abb	Abbildung
AFP	α -Feto-Protein
AS	Aminosäure
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumine (Rinderalbumin-Serum)
BP	binding protein (Bindeprotein)
bp	base pairs (Basenpaare)
c	Konzentration
Ca	Karzinom
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Extinktion
ECD	extracellular domaine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
g	Gramm
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
IMD-Medium	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
M	molar
mdr	multi drug resistance
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
ML I	Mistel-Lektin I

mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Kochsalz
Ng	nanogramm
nm	Nanometer
PEI	Polyethylenimine
PI	Propidium Iodid
PS	Phosphatidylserine
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
rpm	revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
Rz	Rezeptor
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF-á	transforming growth factor á
TM	Transmembranregion
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Verd	Verdünnung
WT	Wildtyp

8 Anhang

8.1 Publikationen

Apel, J.*, Abuharbeid, S.*, Zugmaier, G., Sander, M., Gilbert, S., Czubayko, F. und Aigner, A.

*gemeinsame Erstautoren

Inhibition of HER-2 by three independent targeting strategies increases paclitaxel resistance of SKOV-3 ovarian carcinoma cells.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2005; in press.

Apel, J.*, Abuharbeid, S.*, Sander, M., Fiedler, B., Zuzarte, M., Czubayko, F. und Aigner, A.

*gemeinsame Erstautoren

Cytotoxicity of the novel anti-cancer drug rViscumin depends on HER-2 levels in SKOV-3 cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2004;321(2):403-12

Aigner, A., Renneberg, H., Bojunga, J., Apel, J., Nelson, P. und Czubayko, F.

Ribozyme-targeting of a secreted FGF-binding protein (FGF-BP) inhibits proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo.

Oncogene 21(37), 5733-42 (2002).

Aigner, A., Hsieh, S. S., Malerczyk, C., Wüstenhagen, A.; Butscheid, M., Apel, J. und Czubayko, F. (2000): Effects of HER-2 expression levels on drug resistance of breast and ovarian cancer cells.

Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 41

Butscheid, M., Aigner, A., Apel, J., Malerczyk, C. und Czubayko, F. (2000)

Ribozym-vermittelte Verringerung der HER-2-Expression in Ovarial- und Brustkrebs-Zellen beeinflusst die Cytostatikaresistenz

Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol. Suppl. Vol.361, #53

Tagungsbeiträge / Poster:

Apel, J., Möckel, B., Malerczyk, C., Czubyko, F. und Aigner, A.

„Die zytotoxischen Effekte der Anti-Krebs-Wirkstoffe rViscumin und Paclitaxel sind abhängig von der zellulären HER-2 (c-erbB2/neu)-Expression“

Vortrag auf der 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2001, Mainz

Aigner, A., Hsieh, S.S., Malerczyk, C., Wüstenhagen, A., Butscheid, M. Apel, J. und Czubyko, F.

„Effects of HER-2 expression levels on drug resistance of breast and ovarian cancer cells“

vorgelegt auf dem 91. Annual Meeting der American Association for Cancer Research, April 2000, San Francisco

Butscheid, M., Aigner, A., Apel, J., Malerczyk, C., und Czubyko, F.

„Ribozym-vermittelte Verringerung der HER-2-Expression in Ovarial- und Brustkrebs-Zellen beeinflusst die Cytostatika-Resistenz

vorgelegt auf der 41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, März 2000, Mainz

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Resistenz von Brust- und Ovarialkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika in Abhängigkeit von der Expression des HER-2 neu-Rezeptors“

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Professor Dr. Frank Czubayko ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde oder wird in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht: siehe vorangehende Seiten.

Köln, den 8.02.2005

Jürgen Johannes Apel

8.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Berchem, Cavin, Çetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dicato, Donner-Banzhoff, Doss, Duhem, Engel, Feuser, Fritz, Fruhsdorfer, Gemsa, Geus, Göke, Gotzen, Gressner, Grimm, Griss, Gressner, Grzeschik, Gudermann, Habermehl, Happle, Hasilik, Hebebrand, Hoffmann, Jungclas, Kalbfleisch, Kann, Kern, Klenk, Klose, Koch, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lennarz, Leonhardt, Leppek, Lill, Lippert, Maisch, Mallmann, Mennel, Milliez, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Peter, Remschmidt, Richter, Ries, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneider, Schneyer, Schüffel, Schulz, Seifart, Seitz, Seybert, Slenczka, Sommer, Steiniger, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wulf.

8.4 Lebenslauf

persönliche Daten:

JÜRGEN JOHANNNES APEL
 Lukasstr. 12a
 50823 Köln
 geb. 20.12.1975
 ledig



schulische Ausbildung:

08/82 - 07/86	Grundschule am Harderberg, Georgsmarienhütte
08/86 - 07/88	Orientierungsstufe Innenstadt, Osnabrück
08/88 – 06/95	Gymnasium Carolinum, Osnabrück Abitur

Berufsausbildung:

-Zivildienst:	06/95 - 07/96	Deutsches Rotes Kreuz; Ausbildung zum Rettungssanitäter
-Medizinstudium:	10/96 - 06/03	Philipps-Universität, Marburg
-Dissertation:	seit 10/99	Pharmakologie und Toxikologie Marburg, Prof. Dr. Czubayko Thema: Resistenz von Brust- und Ovarialkarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika in Abhängigkeit von der Expression des HER-2 Rezeptors
-Famulaturen:	02/99 - 03/99	Chirurgie, Krankenhaus der barmherzigen Brüder, Prof. Dr. Wagner, Wien
	09/99 - 10/99	Innere Medizin, Klinikum Konstanz, Prof. Dr. Müller-Esch, Konstanz
	07/01 – 08/01	Pädiatrie, Gem.- Praxis, Drs. Jenß und Jacke-Pfeffer, Osnabrück
	08/01 – 09/01	Gynäkologie, Hôpital Saint-Antoine, Prof. Dr. Milliez, Paris
-Praktisches Jahr:	04/02 - 08/02	Chirurgie, Hôpital Riviera, Dr. Cavin, Montreux, Schweiz
	08/02 – 12/02	Gynäkologie, Uni-Klinik Köln, Prof. Dr. Mallmann, Köln
	12/02 – 03/03	Innere Medizin, Centre Hospitalier Luxembourg, Prof. Dr. Dicato, Luxemburg

- Arzt im Praktikum:** 11/03 – 9/04 Innere Medizin, Städtische Kliniken
Köln, Prof. Dr. Saborowski
- Assistenzarzt:** seit 10/04 Innere Medizin, Städtische Kliniken
Köln,
PD Dr. Hummerich
- Sprachkenntnisse:** Englisch, Französisch
- spezielle Interessen** Sport (Radsport), Musik Köln, 08.02.2005

8.5 Danksagung

Sehr herzlich möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Czubayko, für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, sowie für seine große Unterstützung danken.

Herrn PD Dr. Achim Aigner möchte ich für die einzigartige Betreuung dieser Arbeit danken. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat, hochgradiger Kompetenz und einem unvergleichlichen Engagement zur Seite.

Beiden möchte ich für die überaus herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, sowie für das freundschaftliche Verhältnis danken, das uns inzwischen verbindet.

Andrea Wüstenhagen, Mary-Lou Zuzarte und Helga Radler möchte ich danken, die mich in der Laborarbeit mit so großem Einsatz unterstützt haben.

Die Zeit im Labor der Medizinischen Forschungseinheiten Marburg werde ich in äußerst positiver Erinnerung behalten.

Ich danke meinen Eltern Elisabeth und Herbert Apel in ganz besonderem Maße. Sie waren nicht nur während der Dissertation, sondern auch während meiner gesamten ärztlichen Ausbildung immer für mich da und haben mich unermesslich unterstützt.

Hier soll auch meine Schwester Birgit Alexandra Apel nicht ungenannt bleiben, der ich vielmals für die vielen Stunden danke, die sie für das Korrekturlesen dieser Arbeit aufgebracht hat.