

**“Functional Genomics”:
Analyse antiapoptotischer Signalwege in Krebszellen**

Dissertation

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München
zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Vorgelegt von

Andreas Roidl

aus München

Martinsried 2005

*“Science is built up of facts, as a house is built of stones;
but an accumulation of facts is no more a science than a heap of stones is a house”*

Henri Poincaré
La Science et l'hypothèse, 1902

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität München noch an einer anderen Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen.

Martinsried,

Andreas Roidl

Dissertation eingereicht:

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. T. Cremer

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. E. Weiss

Sonderberichterstatter: Prof. Dr. A. Ullrich

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2007

1. EINLEITUNG.....	7
1.1. Krieg gegen den Krebs.....	7
1.2. Brustkrebs - die häufigste maligne Erkrankung der Frau.....	10
1.2.1. Stadien des Brustkrebs	11
1.2.2. Therapie.....	12
1.3. Molekulare Mechanismen der Tumorgenese und Progression.....	16
1.3.1. Die klonale Evolution der Tumorzellen	16
1.3.2. Kennzeichen von Tumorzellen.....	19
1.3.2.1. Die unkontrollierte Proliferation	22
1.3.2.2. Antiapoptotische Mechanismen	28
1.4. Zielsetzung der Arbeit	33
2. MATERIAL UND METHODEN.....	34
2.1. Bezugsquellennachweis.....	34
2.1.1. Chemikalien	34
2.1.2. Enzyme.....	35
2.1.3. Radiochemikalien.....	35
2.1.4. Handelsübliche „Kits“ und sonstige Materialien	35
2.1.5. Wachstumsfaktoren und Liganden.....	36
2.2. Medien und Puffer	37
2.2.1. Medien für <i>E. coli</i> -Bakterien.....	37
2.2.2. Zellkulturmedien	37
2.2.3. Stammlösungen und Puffer	38
2.3. Bakterienstamm	40
2.4. Zelllinien.....	40
2.5. Antikörper.....	41
2.6. Plasmide und Oligonukleotide	42
2.7. Computerprogramme	43
2.8. Molekularbiologische Methoden.....	43
2.8.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke	43
2.8.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke	43
2.8.3. Enzymatische Behandlung von DNA	44
2.8.3.1. Dephosphorylierung von 5'-Enden	44
2.8.3.2. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase	44
2.8.4. Gelelektrophorese von DNA.....	44
2.8.5. Isolierung von DNA-Fragmenten.....	45
2.8.6. DNA-Transfer in <i>E. coli</i> -Bakterien.....	45
2.8.6.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien.....	45

2.8.6.2. Transformation kompetenter E. coli-Bakterien.....	45
2.8.7. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	46
2.8.7.1. PCR-Amplifikation von DNA.....	46
2.8.7.2. Aufreinigung von PCR-Produkten.....	47
2.8.8. Arbeiten mit RNA.....	47
2.8.8.1. Präparation von total-RNA.....	47
2.8.8.2. cDNA-Synthese.....	48
2.8.9. Makroarray-Analyse.....	48
2.8.9.1. Herstellung von cDNA-Arrays.....	48
2.8.9.2. Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten mit [α -33P]-dATP.....	49
2.8.9.3. Hybridisierung radioaktiv markierter Proben.....	49
2.8.9.4. Waschen der Arrays.....	50
2.8.9.5. Auswertung der cDNA-Arrays und Datenanalyse.....	50
2.8.9.6. Gruppierung der Gene.....	51
2.9. Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen.....	52
2.9.1. Allgemeine Zellkulturtechniken.....	52
2.9.2. Mykoplasmentest.....	53
2.9.3. Transfektion von Zellen.....	53
2.9.3.1. Kalziumphosphat-Transfektion.....	53
2.9.3.2. Transfektion mit anderen Methoden.....	54
2.9.4. Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen.....	54
2.9.5. Selektion chemoresistenter Klone.....	54
2.10. Proteinanalytische Methoden.....	55
2.10.1. Triton X-100 Lyse von Zellen.....	55
2.10.2. Proteinbestimmung.....	55
2.10.3. Immunopräzipitation von Proteinen.....	55
2.10.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	56
2.10.6. Immundetektion (Immunoblot-Analyse).....	56
2.10.7. PARP-Spaltung.....	57
2.11. Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen.....	57
2.11.1. Propidiumjodidfärbung zur Bestimmung von apoptotischen Zellen.....	57
2.11.2. Kolorimetrische Bestimmung lebender Zellen mittels WST-1 Reagenz.....	58
2.11.3. DAPI-Färbung.....	58
2.11.4. TUNEL-Test.....	58
2.11.5. Nachweis der Caspasenaktivität.....	58
3. ERGEBNISSE.....	59
3.1. Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen in Krebszellen.....	59
3.1.1. Strategie.....	59
3.1.2. Induktion der Apoptose in verschiedenen Brustkrebszelllinien durch Doxorubicin.....	61
3.1.3. Sensitivität verschiedener Brustkrebszelllinien für das Chemotherapeutikum Doxorubicin.....	62
3.1.4. Untersuchung der Apoptosesensitivität in DXR-behandelten Klonen.....	64
3.1.5. Abschätzung des Fehlers.....	67
3.1.6. Vergleich der Genexpression der DXR-behandelten Klone mit der Ausgangszelllinie.....	69

3.1.7. Analyse der differentiell exprimierten Gene der Zelllinien BT474 und MDA-MB231	79
3.1.8. Vergleich der differentiell exprimierten Gene aller Zelllinien.....	80
3.1.9. Clusteranalyse	82
3.2. Syk, eine zytoplasmatische Tyrosin Kinase	85
3.2.1. Genexpressionsanalyse der PTK Syk in Brustkrebszelllinien und Tumorbiopsien ...	87
3.2.2. Bestimmung der Syk-Proteinexpression in Brustkrebszelllinien.....	90
3.2.3. Reduktion der Syk-Expression in DXR behandelten Klonen	91
3.2.4. Syk interagiert mit Egfr, Her2 und Her3	93
3.2.5. Syk reduziert die basale Egfr- und Her2-Tyrosine Phosphorylierung nach DXR- Behandlung.....	94
3.2.6. Syk beeinflusst die Apoptosesensitivität von Krebszellen.....	96
3.3. Fgfr4, ein Gen mit erhöhter Expression in DXR-behandelten Klonen.....	98
3.3.1. Bestimmung der Expression des Fgfr4 in Zelllinien und Tumorbiopsien	102
3.3.2. Fgfr4 Expression in resistenten Klonen	106
3.3.3. Die Fgfr4-Überexpression erhöht die Apoptoseresistenz in MCF7 Brustkrebszellen	109
3.3.4. „Knock-down“ des Fgfr4 resultiert in verminderter Chemoresistenz.....	112
3.3.5. FGFR4 erhöht die durch verschiedene Chemotherapeutika induzierte Apoptoseresistenz.....	114
4. DISKUSSION	116
4.1. Identifikation antiapoptotischer Mechanismen.....	116
4.2. Syk, ein Gen mit verminderter Expression.....	122
4.3. Fgfr4, ein Gen mit erhöhter Expression.....	129
5. ZUSAMMENFASSUNG	134
6. ABKÜRZUNGEN	136
7. LITERATUR	139

1. Einleitung

1.1. Krieg gegen den Krebs

Krebserkrankungen gehören zu den vorherrschenden Krankheiten der Industrienationen. Auf Grund der großen Fortschritte in der Forschung konnten die basalen Zusammenhänge der Tumorentstehung und -progression weitgehend aufgeklärt werden. Das erweiterte Verständnis erbrachte Implikationen für Diagnose und Therapie der Krebserkrankungen. Trotz dieser Fortschritte erkranken jährlich weltweit ca. 10 Millionen Menschen an Krebs. Die Therapien basieren immer noch weitestgehend auf zytotoxischen Substanzen, die seit Jahrzehnten gebräuchlich sind.

Ziel der Krebsforschung ist es, durch Entwicklung neuer Therapieansätze und Medikamente die Nebenwirkungen zu reduzieren und Krebs zu einer beherrschbaren Krankheit zu machen.

Im Moment sind wir noch weit davon entfernt, den Krieg gegen den Krebs erfolgreich zu beenden. Mit 10 Millionen neuer Fälle pro Jahr weltweit stagniert die Zahl der neu dokumentierten Krebsfälle auf hohem Niveau. Die Ursachen und Formen der Krebserkrankungen unterscheiden sich zwar regional, dennoch gibt es kaum eine Familie in den Industrienationen ohne einen Krebsfall unter näheren Verwandten. Die häufigste Krebsform ist Lungenkrebs mit 1,2 Millionen neuen Fällen pro Jahr weltweit, gefolgt von Brustkrebs (knapp 1 Million Fälle pro Jahr), Darmkrebs (940000) und Magenkrebs (870000) (WHO Cancer Mortality Databank). Nach Ländern unterteilt haben Industrienationen wie die USA, Italien und Deutschland die höchste Gesamtrate an Krebserkrankungen (Kleihues, 2003). In Deutschland verteilt sich die Häufigkeit der Krebserkrankungen geschlechtsspezifisch wie folgt (Abb. 1):

Prozentualer Anteil der Krebsformen in Deutschland

Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2000
 Männer n=200.018, Frauen n=194.662

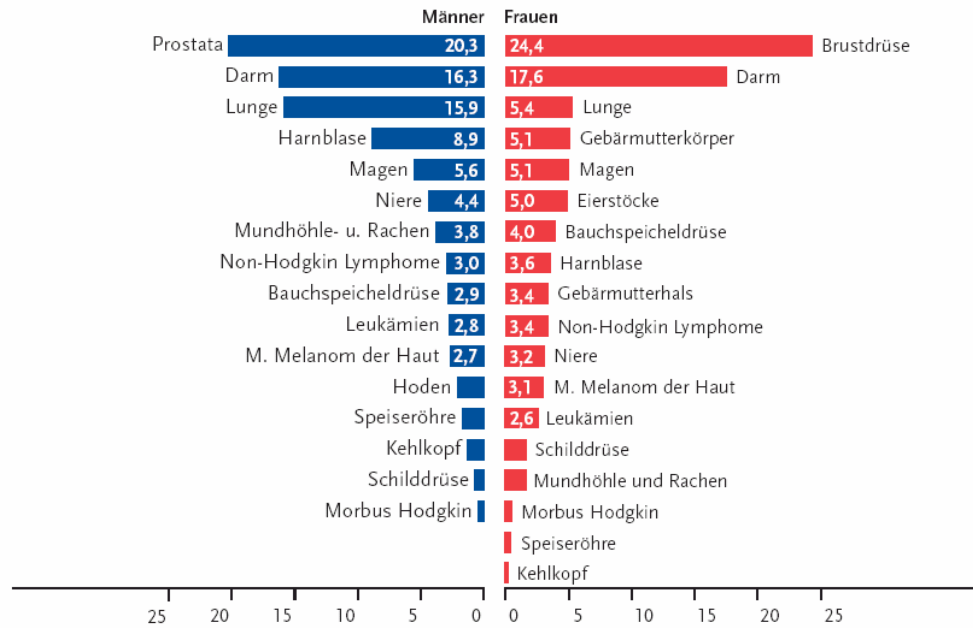


Abb. 1: Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2000 (aus Krebs in Deutschland, Herausgeber: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland)

Die beschleunigte Entwicklung der Krebsforschung begann mit den Fortschritten der Biochemie zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts. Otto Warburg, der die Glykolyse aufklärte und dafür 1931 den Nobelpreis erhielt, wandte sich in den 50er Jahren der Krebsforschung zu und behauptete, die Anomalien entarteter Zellen seien in einer Veränderung der Stoffwechselwege begründet (Warburg, 1956). In den folgenden Jahren wurde versucht, die Frage zu lösen, ob die Entstehung von Tumoren auf chemische Karzinogenese oder Tumoviren zurückzuführen ist (Weinberg, 1996). Im Jahre 1971 erklärte der amerikanische Präsident Richard Nixon den Krieg gegen den Krebs und stellte ein umfangreiches Projekt, ähnlich dem der Mondlandung, auf die Beine. Dies führte 1973 zur Entdeckung des ersten Onkogens v-src aus dem Rous-Sarkom-Virus (Stehelin et al., 1976). Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die mutierte Form eines normalen Gens aus dem Huhn Zellen transformieren kann. In den folgenden Jahren wurden weitere virale Onkogene wie ras, raf und myc entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass zu diesen viralen Genen homologe Gene im humanen Genom vorhanden sind. Diese sogenannten Protoonkogene unterscheiden sich manchmal nur durch Punktmutationen von den viralen Onkogenen. Die Mutationen führen zu hyperaktiven Proteinen, die die

Transformation von normalen Zellen hervorrufen. 1986 wurde das erste Tumorsuppressorgen pRb gefunden (Friend et al., 1986). Die Abwesenheit dieses Proteins führt zur Krebsentstehung und stellt den Gegenpol zu den Onkogenen dar. Es folgte die Entdeckung weiterer Gene, die sich in die Gruppe der Onkogene oder Tumorsuppressoren einteilen ließen.

In den letzten Jahren entwickelte sich unser Verständnis über die Grundlagen und Mechanismen der Krebserkrankung rapide. Darauf basierend konnten erstmals molekularbiologische Werkzeuge entwickelt werden, die Tumoren gezielt abtöten oder deren weiteres Wachstum unterdrücken. Erster Vorläufer einer Generation von monoklonalen Antikörpern ist Rituximab (Rituxan™), das gegen den CD20 Rezeptor von B-Lymphozyten gerichtet ist und zur Bekämpfung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird (Anderson et al., 1997). Zu diesen neuen zielgerichteten Medikamenten gehören sowohl Cetuximab (Erbix™), Trastuzumab (Herceptin™), ebenfalls inhibierende monoklonale Antikörper, als auch „small molecule inhibitors“ wie Imatinib (Glivec™) und Gefitinib (Iressa™).

Trotz dieser neuen Medikamente ist das Arsenal der molekularen Werkzeuge noch zu klein, um Krebserkrankungen effektiv behandeln zu können. Daher spielen Ansätze, die neue molekulare Mechanismen der Chemoresistenz aufzeigen, eine wichtige Rolle bei der Etablierung neuer Medikamente und Interventionsstrategien. Die Blockade der Apoptose, ein zellinternes Programm, das es dem Gesamtorganismus ermöglicht, fehlerhafte Zellen schonend zu entfernen, spielt bei der malignen Transformation sowie bei der Ausbildung der Chemoresistenz eine zentrale Rolle. Ein eleganter Schritt wäre es, diese Blockade mit Medikamenten zu beseitigen und die Tumorzellen dadurch in die Apoptose zu treiben. Für diese Untersuchung kann die Ausbildung der Chemoresistenz als Modell benutzt werden, um die verschiedenen Mechanismen der Apoptoseblockade zu identifizieren. Brustkrebs wurde hierfür als Tumormodell ausgewählt, da die Ausbildung der Chemoresistenz hier eine wichtige Rolle spielt und der Vergleich von *in vitro*- mit *in vivo*-Daten auf Grund der Verfügbarkeit von Biopsien besser möglich erscheint.

Im Nachfolgenden wird die Entstehung und Therapie von Brustkrebs beschrieben.

1.2. Brustkrebs - die häufigste maligne Erkrankung der Frau

In Deutschland erkranken jährlich über 47.500 Frauen an Brustkrebs, davon etwa 19.300 im Alter unter 60 Jahren. Brustkrebs stellt damit die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar. Diese Erkrankung ist für 24,4 % aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen und für mehr als ein Drittel (34 %) der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 Jahren verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas über 63 Jahren. Das Brustkrebsrisiko steigt ab dem vierten Lebensjahrzehnt mit zunehmendem Alter allmählich an (Abb. 2). Insgesamt hat die Häufigkeit dieser Krebsform in Europa in den letzten 20 Jahren zugenommen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2000
Erkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen

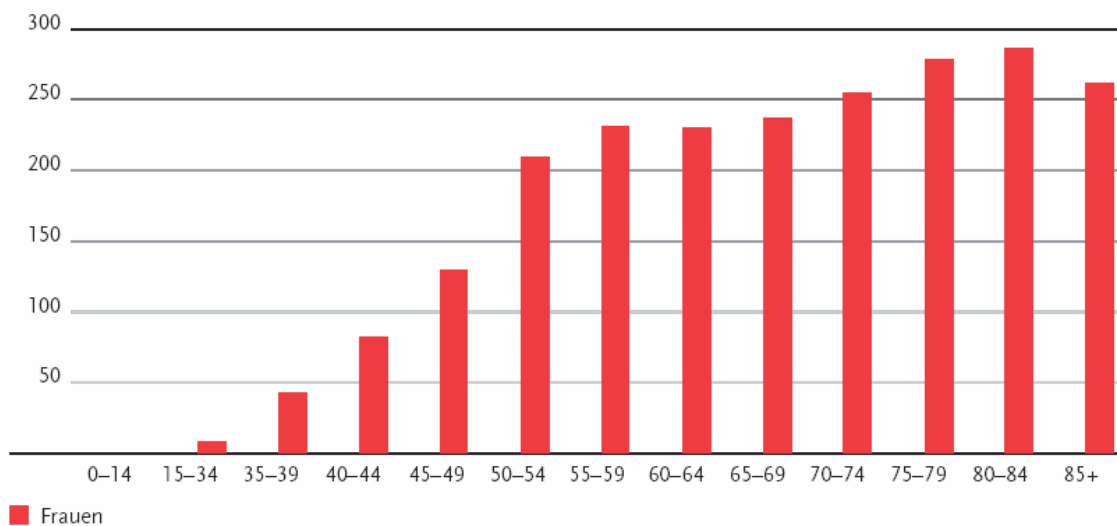


Abb. 2: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2000 (aus Krebs in Deutschland, Herausgeber: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland)

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen, die vor wenigen Jahren noch bei 73 % lag, konnte inzwischen auf 76 % gesteigert werden.

Zu den Risikofaktoren gehören neben genetischen Prädispositionen eine frühe erste Regelblutung, Kinderlosigkeit oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt, später Eintritt in die Wechseljahre, Hormonersatztherapie in Klimakterium und Postmenopause sowie ionisierende Strahlung. Dagegen verringert eine erste ausgetragene Schwangerschaft in jungen Jahren und viele Geburten umgekehrt das Brustkrebsrisiko. In verschiedenen Studien wurden auch Zusammenhänge zu Übergewicht, Bewegungsmangel, fett- und kalorienreicher Nahrung und regelmäßigem Alkoholkonsum beobachtet.

1.2.1. Stadien des Brustkrebs

Die überwiegende Mehrheit der malignen Brusterkrankungen sind Karzinome, welche aus Zellen epithelialen Ursprungs entstehen. Basierend auf histologischen Untersuchungen wurde postuliert, dass Brustkrebs wie andere maligne Erkrankungen auch in einer Reihe von definierten Ereignissen verläuft (*multi-step process*), die anhand spezifischer qualitativer Unterschiede in einzelne Stadien eingeteilt werden können (Abb. 3) (Russo et al., 1993; Russo et al., 1998). Die Tumorprogression verläuft normalerweise schrittweise, ausgehend von initialen duktalem bzw. atypisch duktalem Hyperplasien, über die Ausbildung eines duktalem Karzinoms *in situ* und anschließend eines invasiven duktalem Karzinoms, bis hin zur Ausbildung von Metastasen.

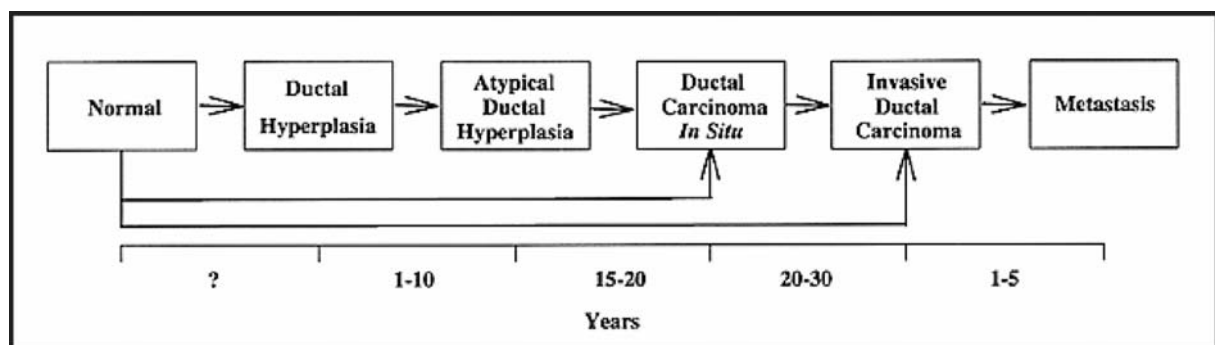


Abb. 3: In vivo Modell der neoplastischen Progression von humanen Brustkarzinomen (Russo et al., 1998).

1.2.2. Therapie

Um die Therapie optimal auf den jeweiligen Tumor abzustimmen, ist es wichtig neben den Standarddiagnosen (Mammographie, Röntgen, Ultraschall usw.) möglichst viele molekulare Tumormarker zu überprüfen. Tumormarker wie CEA und CA-15-3 können aus Blutproben analysiert werden.

Ein wichtiges Verfahren ist die Entnahme einer Biopsie. Durch sie kann die Expression von Tumormarkergenen überprüft werden. Hierbei werden der Hormonrezeptorstatus Östrogenrezeptor/Progesteronrezeptor, sowie die Expression von Wachstumsrezeptoren wie EGFR und Her2 festgestellt.

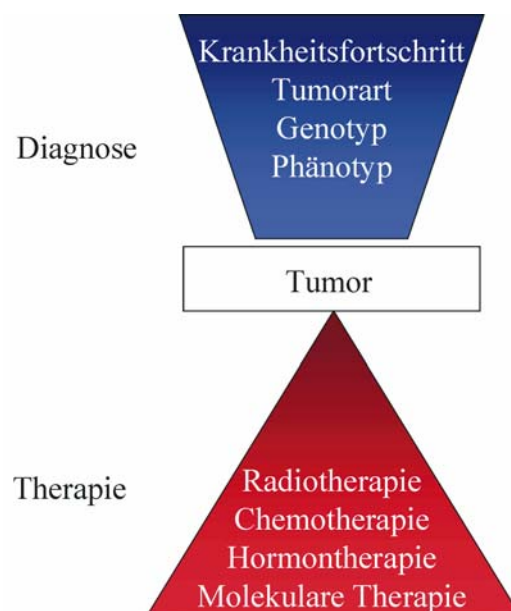


Abb. 4: Diagnose und Therapie bei Krebserkrankungen

Sollte keine neoadjuvante Therapie angezeigt sein, beginnt nach Resektion des Primärtumors und eventuell auch des Wächterlymphknotens die medikamentöse Therapie. Diese hängt maßgeblich vom histologischen Befund ab. Er enthält die TMN-Klassifikation, worauf die Einteilung des jeweiligen Tumors in verschiedene Stadien beruht (*Staging*). Hier können nun weitere wichtige molekulare Marker untersucht werden. Der Hormonrezeptorstatus kann als Prognosemarker untersucht werden, ebenso der EGFR- und Her2-Status. Weitere wichtige prognostische Marker die überprüft werden können sind u-PA und PAI-1, p53-Status und die Ki-67-Färbung.

Bei der Behandlung von Brustkrebs existieren vier Therapiemöglichkeiten (Abb. 4). Leider müssen mangels Alternativen immer noch unspezifische Therapien wie Radio- und Chemotherapie angewendet werden, die alle Zellen schädigen und somit sehr große Nebenwirkungen aufweisen. Um Zielmoleküle zu finden, die Apoptose spezifisch in Tumorzellen durch deren Aktivierung oder Inhibition auslösen können, wurden in dieser Arbeit Resistenzmechanismen der klassischen Chemotherapie untersucht. Antagonisten oder Agonisten dieser Zielmoleküle können eventuell später in Kombination mit klassischer Chemotherapie eingesetzt werden, um Chemoresistenzen zu verhindern und Krebszellen abzutöten.

Die Chemotherapie ist in der Regel eine Intervallbehandlung: Auf eine Behandlungsphase folgt jeweils eine Behandlungspause. Wie lange ein solcher Zyklus dauert, ist von Fall zu Fall unterschiedlich und hängt maßgeblich von den verabreichten Medikamenten ab. Die Behandlungspause zwischen den Zytotoxikagaben dient der Erholung und Regeneration des Normalgewebes. Eine Regeneration ist deshalb erforderlich, weil die Medikamente nicht ausschließlich auf Krebszellen wirken, sondern auch Zellen anderer Körpergewebe schädigen können. Dazu gehören in erster Linie die Zellen des Knochenmarks, die Haarwurzeln und die Schleimhaut im Mund und im Magen-Darm-Trakt. Die durch Zytotoxika geschädigten normalen Zellen sind im Gegensatz zu bösartigen Zellen in der Lage, Schädigungen ihrer DNA zu erkennen und in gewissem Maße zu reparieren oder, bei einer zu großen Schädigung der DNA, gezielt abzusterben. Bösartige Gewebe unterscheiden sich von gutartigen außerdem durch einen höheren Anteil sich teilender Zellen. Da die meisten Chemotherapieformen nur auf sich gerade teilende Zellen wirken, sind Krebsgewebe generell empfindlicher für Zytotoxika als gesunde.

Das in dieser Arbeit verwendete Chemotherapeutikum Doxorubicin (Adriamycin) gehört zur Gruppe der Anthrazykline. Die Anthrazykline sind Stoffwechselprodukte von *Streptomyces peucetius var. caesius* und wurden ursprünglich als Antibiotika gegen Tumore beschrieben. Die antitumorogene Wirkung von Daunomycin und Doxorubicin wurde erstmals um 1970 gezeigt (Arcamone et al., 1969; Zunino et al., 1976).

Doxorubicin besteht aus einem planaren, hydrophoben Tetracyclin-Ring, der über eine glycosidische Bindung an einen Daunosaminzucker geknüpft ist. Aufgrund seiner Struktur kann Doxorubicin wie andere Anthrazykline an die DNA binden, indem es sich zwischen zwei benachbarte Basenpaare einlagert. Bei

physiologischem pH-Wert ist das Molekül positiv geladen, was eine Interkalation in die DNA begünstigt. Außerdem tragen die Anthrazykline Quinon-Anteile, so dass sie bei Elektrontransfer-Reaktionen und der Bildung freier Sauerstoffradikale beteiligt sein können.

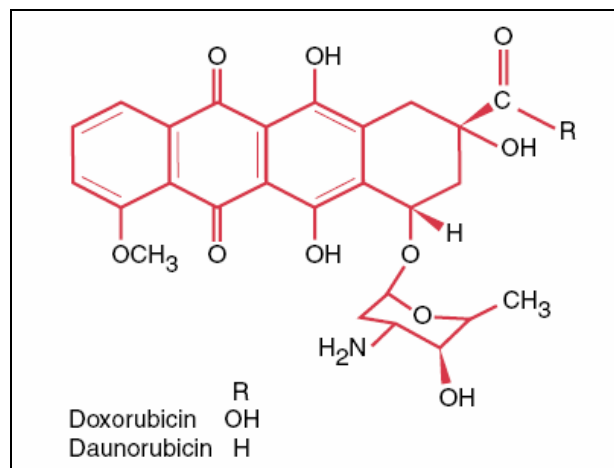


Abb. 5: Strukturformel von Doxorubicin (Holland, 2003)

Anthrazykline sind in Lösung sehr reaktiv und rufen in biologischen Systemen eine Vielzahl von Effekten hervor. Neben der Inhibition der Topoisomerasen (speziell Topoisomerase II) zeigen Anthrazykline noch weitere Effekte. Die Interkalation in doppelsträngige DNA verursacht strukturelle Veränderungen, die die DNA- und RNA-Synthese beeinflussen. Desweiteren generieren Anthrazykline reaktive Sauerstoffspezies, unter anderem freie Sauerstoffradikale, Hydroxylradikale und Hydrogenperoxid, die DNA, mRNA, Proteine und Lipide schädigen. Die Peroxidation von Lipiden ist wahrscheinlich hauptsächlich für die Nebenwirkungen am Herzen verantwortlich (Holland, 2003). Es wurde gezeigt, dass Doxorubicin zelltypabhängig Apoptose über die Aktivierung des Fas-Rezeptors (Fulda et al., 2000) oder über den Mitochondrien-Signalweg (Fulda et al., 2001) auslösen kann.

Ähnlich wie in der Chemotherapie werden in der Radiotherapie schnell proliferierende Zellen durch Schädigung der DNA mittels Strahlung abgetötet.

In der Antihormontherapie hingegen ist es das Ziel, das Wachstumssignal der Hormonrezeptoren zu inhibieren.

Unter molekularer Therapie versteht man das gezielte Eingreifen in Signaltransduktionsmechanismen der Krebszellen. Durch Inhibition dieser Signalwege können Tumoren abgetötet werden. Eine herausragende Rolle unter den molekularen Therapien spielt die Behandlung mit therapeutischen Antikörpern. Antikörper wurden schon vor Jahrzehnten als ideale Moleküle zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und Krebserkrankungen angesehen (Borrebaeck, 1989). Die meisten der Zielmoleküle sind extrazelluläre Proteine (Marasco and Dana Jones, 1998). Abhängig von der Anwendung werden unterschiedliche Zielmoleküle für eine Antikörpertherapie verwendet. Hier unterscheidet man einen direkten therapeutischen Effekt durch die Antikörper, beispielsweise durch Rekrutierung des Immunsystems oder durch Koppelung mit zytotoxischen Stoffen. Ein indirekter Effekt liegt vor, wenn über die Blockade essenzieller Signaltransduktionskaskaden der Tumorzellen Apoptose ausgelöst wird. Die Etablierung eines monoklonalen Antikörpers gegen HER2, 4D5, und des im folgenden humanisierten Counterparts Herceptin® (Trastuzumab), der von der FDA empfohlen wurde, verdeutlicht die Entwicklung zielgerichteter Medikamente gegen HER2-überexprimierenden, metastasierenden Brustkrebs (Fendly et al., 1987; Hudziak et al., 1989; Stebbing et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass therapeutisch effektive Antikörper wie Herceptin® oder Rituxan® über zwei verschiedene Mechanismen wirken: die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems sowie ein direkter zytotoxischer Effekt, der auf dem Auslösen der Apoptose beruht. (Baselga and Albanell, 2001; Sliwkowski et al., 1999; Soderlind et al., 2000; Vitetta and Uhr, 1994). Multinationale Studien benutzten Herceptin™ in Kombination mit Chemotherapie und konnten signifikant das Überleben von Patienten erhöhen (Cobleigh et al., 1999; Shak, 1999; Slamon et al., 2001).

Um weitere Medikamente zu finden, die spezifisch verschiedene Schwachstellen von Tumorzellen ausnützen und so die Nebenwirkungen für den Patienten möglichst gering halten, müssen die Mechanismen der Tumorentstehung und -progression aufgeklärt werden. Nachfolgende Kapitel beschreiben diese Mechanismen aus heutiger Sicht.

1.3. Molekulare Mechanismen der Tumorgenese und Progression

Maligne Transformation wird durch genetische und epigenetische Veränderungen ermöglicht, die eine Störung der allgemeinen Kontrollmechanismen von zellulärer Proliferation und programmiertem Zelltod hervorrufen (Holliday, 1996; Simons, 1995). Diese zellulären Störungen resultieren entweder aus einer genetischen Prädisposition oder aus exogenen Faktoren, die physikalischer (z.B. Strahlung), chemischer (Karzinogene), und biologischer (z.B. virale Infektion) Natur sind. Sie sind häufig mit Veränderungen assoziiert, welche die Aktivierung von Proto-onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bewirken (Couch, 1996). Dies führt zur Deregulation zellulärer Signaltransduktionsmechanismen in Krebszellen. Diese Fehler können, anders als in gesunden Zellen, nicht mehr erkannt oder behoben werden. Dadurch gerät das zelluläre Gleichgewicht von geregelt ablaufenden Prozessen aus den Fugen, was im Falle von Krebs zu einer verstärkten Zellproliferation ohne Kontrolle führt.

1.3.1. Die klonale Evolution der Tumorzellen

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, die zeigen, dass die Krebsentstehung ein schrittweiser Prozess ist (Foulds, 1954). Die einzelnen Schritte spiegeln genetische Veränderungen wider, die die Transformation von normalen somatischen Zellen zu malignen Tumorzellen verursachen. Zahlreiche Beobachtungen in Tiermodellen und bei humanen Tumoren legen die Vermutung nahe, dass die Tumorprogression ähnlichen Gesetzen folgt wie die Evolution (Bergers et al., 1998; DePinho and Jacks, 1999). Bereits Charles Darwin formulierte 1858 dieses Prinzip in seinem Buch „The Origin of species“.

Analog zur Entstehung der Arten ist auch bei der Tumorentstehung und –progression eine Abfolge von genetischen Veränderungen nötig. Genetische Prädisposition oder Mutationen resultieren in Defekten bei DNA-Reparaturmechanismen und in chromosomaler Instabilität, die zu einem veränderlichen Genotyp der Tumorzelle führen. Diese genetische Instabilität bringt *per se* keinen direkten Wachstumsvorteil, jedoch können dadurch verschiedene Genotypen entstehen, die wie in der Evolution der Tierarten an bestimmte Bedingungen des Körpers oder exogene Faktoren wie

Medikamente besser angepasst sind als normale Zellen. Diese Zellen haben dann einen Wachstumsvorteil gegenüber den übrigen und es erfolgt eine klonale Selektion dieser Zellen (Nowell, 1976). Einer anderen Theorie zu Folge entsteht Krebs durch Mutation kritischer Gene, die Sicherungsmechanismen ausschalten, wobei die genomische Instabilität der Tumorzellen nur ein Nebenprodukt der Tumorentstehung ist (Nowak et al., 2002; Schmitt et al., 2002). In beiden Fällen jedoch gilt bei Tumorzellen wie auch bei der Evolution das Prinzip von Mutation und Selektion, sowie das „survival of the fittest“. Dieser Mechanismus führt zu einer schrittweisen Evolution von mitotisch instabilen Körperzellen hin zu malignen Tumoren, die sich angepasst haben, den körpereigenen Sicherungsmechanismen zu entkommen bzw. sie auszuschalten (Foulds, 1954; Nowell, 1976). Zu den Selektionskriterien zu Beginn der malignen Transformation gehören intrinsische Faktoren, wie z.B. unkontrollierte Proliferation und die Blockade der Apoptose, sowie weitere exogene Faktoren wie das Entkommen der körpereigenen Immunabwehr. In der weiteren Progression herrschen an verschiedenen Stellen des Tumors unterschiedliche Selektionsdrücke, wie z.B. unterschiedlicher Sauerstoffpartialdruck, Interaktionen mit verschiedenen nichtmalignen Zelltypen, Attacken des Immunsystems und die schwankende Versorgung mit Wachstumsfaktoren (Cahill et al., 1999). Auch auf diese veränderten Bedingungen können genetisch instabile Tumorzellen reagieren. Daher ist ein Tumor nie klonal, sondern die große Heterogenität der Genotypen der Tumorzellen ist das Resultat verschiedenster Selektionen (Tsao et al., 1999). Die genetische Instabilität muss in Tumoren gut balanciert sein. Eine zu geringe Instabilität würde zu einer zu langsamen Reaktion auf die Veränderung des Selektionsdrucks führen und mit dem Zelltod der gesamten Population enden. Dagegen führt zu hohe Instabilität zur mitotischen Katastrophe (Cahill et al., 1999). Diese Balance wird wiederum durch Mutation und Selektion der molekularen Evolution aufrechterhalten (Abb. 6).

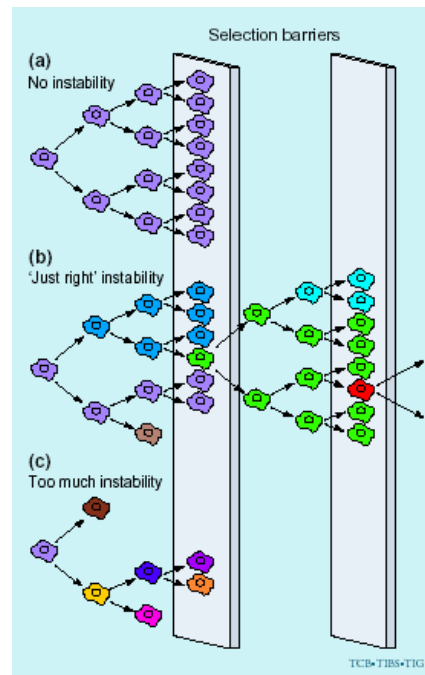


Abb. 6: Schematische Darstellung der genomischen Instabilität. (a) Durch keine bzw. zu wenig Instabilität kann die Selektionsbarriere nicht überwunden werden. Eine zu hohe Instabilität führt zum Tod der gesamten Zellpopulation (c). Die richtige Rate der Instabilität wird über die Evolution herausgebildet (b) (Cahill et al., 1999).

In der Chemotherapie von malignen Erkrankungen ist die molekulare Evolution der Tumorzellen ebenfalls von zentraler Bedeutung, da hier die Zellen dem exogenen Selektionsdruck des Chemotherapeutikums ausgesetzt sind. Durch das instabile Genom gelingt es manchmal den Tumorzellen, sich bis zu einem gewissen Grad an die Therapie anzupassen bzw. die Therapie zu überleben. Dies kann bisweilen in einen aggressiveren Tumorphänotyp nach der Therapie resultieren. Auch hier erschwert die Heterogenität eine Therapie der Tumoren, da neben der bereits vorhandenen genomischen Instabilität der einzelnen Zellen auch eine breite Diversität an Tumorzellen existiert. Dies führt zur zufälligen Existenz von Zellen, die in einer Selektionssituation dennoch effizient wachsen können, und es erleichtert den Tumoren eine beschleunigte Ausbildung von Chemoresistenz. Untersuchungen haben einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Grad der Aneuploidie und der Schwere der Tumorerkrankung gezeigt (Watanabe et al., 2001; Zhou et al., 2002). Auch kann der Grad der Aneuploidie als Marker zur Vorhersage über das Ansprechen einer Therapie verwendet werden (Rajagopalan and Lengauer, 2004).

Chemoresistenz ist ein ernsthaftes Problem bei der Behandlung von Krebs. Untersuchungen der komplexen Resistenzbildung sind *in vivo* aufgrund der Heterogenität der Zellen extrem schwer. Daher kann durch die Untersuchung potenzieller Resistenzmechanismen im Zellkulturmodell mit einem mehr oder weniger einheitlichen Genotyp etablierter Tumorzelllinien die Resistenzbildung modelliert werden. So konnte bereits 1990 von Hudziak und Kollegen gezeigt werden, dass die Resistenzentwicklung von NIH3T3 Fibroblasten durch Selektion mit TNF α apoptoseresistente Zellen mit einer met-Genamplifikation hervorbrachte (Hudziak et al., 1990). Die hier beschriebene Arbeit basiert auf dem Ansatz, die Instabilität der Tumorzellen auszunutzen und durch den Selektionsdruck von Chemotherapeutika einen chemoresistenten Phänotyp zu generieren. Die Erforschung der verschiedenen Chemoresistenzmechanismen *in vitro* wird in Zukunft Relevanz für Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen haben. An der Ausbildung dieser Resistenzen sind einige der Kennzeichen von Tumorzellen beteiligt.

1.3.2. Kennzeichen von Tumorzellen

Die maligne Entartung von Zellen ist im Vergleich zur Gesamtzellzahl eines Organismus äußerst selten. Daher existieren bestimmte körpereigene Mechanismen, die das maligne Wachstum verhindern sollen. Eine maligne Transformation scheint daher nur möglich, wenn diese Sicherungsmechanismen versagt haben. Zusätzlich müssen Krebszellen einige weitere Eigenschaften erlangt haben, um sich zu einem Tumor zu formieren. Man kann daher verschiedene Kennzeichen benennen, die von Tumorzellen während ihrer Progression erlangt oder umgangen werden müssen (Abb. 7).

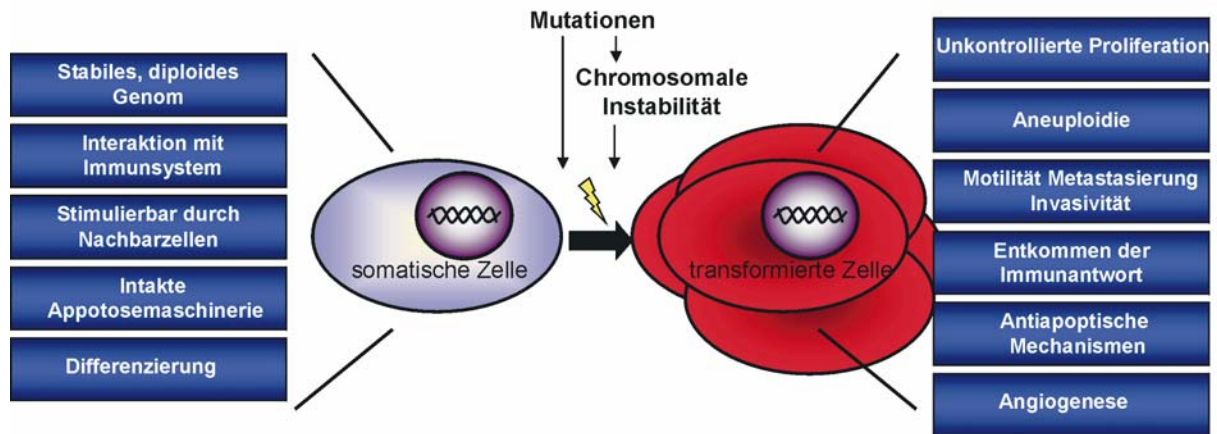


Abb. 7: Kennzeichen somatischer Zellen, die während der Transformation zu malignen Zellen durch Mutationen oder chromosomaler Instabilität verändert werden. Tumorzellen haben bestimmte Merkmale erreicht, die ihnen malignes Wachstum ermöglichen.

Die ersten Mutationen oder genetischen Prädispositionen betreffen meist diejenigen Gene, die die genomische Stabilität beeinflussen. Die Instabilität des Genoms von Krebszellen spielt eine herausragende Rolle bei der Tumorprogression. Hier unterscheidet man zwei Formen der Instabilität, nämlich CIN (chromosomal instability) und MIN (microsatellite instability) (Rajagopalan and Lengauer, 2004). CIN ist eine der Grundbedingungen für den leicht veränderbaren Genotyp der meisten Tumorzellen und resultiert in der Aneuploidie des Genoms. Normale Zellen besitzen den Chromosomensatz $44 + X, X/Y$, wohingegen die meisten Krebszellen 60 bis 90 Chromosomen aufweisen (Aaltonen et al., 1993). Diese numerischen und strukturellen Abnormalitäten wie Duplikationen, Deletionen, Inversionen und Translokationen sind Kennzeichen der Aneuploidie (CIN). Die wenigen nicht aneuploiden Tumoren, die Krankheitsbilder wie *Xeroderma pigmentosa* hervorrufen, sind charakterisiert durch Defekte in DNA-Reparaturmechanismen (MMR und NER). Dies führt zu einer erhöhten Mutationsrate. Die Mutationen akkumulieren in repetitiven Sequenzen und resultieren in einer genetischen Instabilität vor allem von Mikrosatelliten (MIN) (Peltomaki, 2001). In beiden Fällen akkumulieren genomische Veränderungen im Laufe der Zeit in der Zelle und führen mit zunehmendem Alter zur malignen Transformation. So kann die Korrelation der Häufigkeit von Krebserkrankungen mit fortgeschrittenem Alter erklärt werden. Aneuploidie ist daher in den meisten Tumoren die treibende Kraft für den Transformationsprozess, in dem sie die Amplifikation von Onkogenen und den Verlust von Tumorsuppressoren vorantreibt.

Ein weiteres Merkmal, das die eigentliche Mortalität von Krebs verursacht, ist die Fähigkeit von Krebszellen, anderes Gewebe zu infiltrieren und dort zu metastasieren. Dabei benutzen Tumorzellen die gleichen Mechanismen, wie z.B. Lymphozyten, Fibroblasten und Keratinozyten (Friedl and Brocker, 2000). Um beispielsweise die extrazelluläre Matrix zu durchdringen, polarisieren die Zellen und elongieren. Diese Veränderungen gehen anheim mit einer Veränderung der Genexpression bestimmter Proteinase und der Reorganisation des Zytoskeletts. Auslöser für diese Veränderungen in Krebszellen ist eine deregulierte Stimulation mit Chemokinen und/oder Wachstumsfaktoren (Friedl and Wolf, 2003).

Ein körpereigener Abwehrmechanismus gegen entartete Zellen besteht aus einer Immunreaktion gegen Tumorzellen (Finn, 1993). So konnte in Mäusen, die eine Tumortransplantation mit einer Regression des Tumors überlebt hatten, gezeigt werden, dass eine Injektion der gleichen Tumorzellen zu keinem erneuten Tumorwachstum führt (Slingluff et al., 1994). Das Immunsystem kann daher diese Tumorzellen abtöten. Demnach müssen Tumoren Mechanismen erworben haben, um unerkannt von zytotoxischen T-Zellen wachsen zu können. In einigen Fällen ist jedoch eine Entzündungsreaktion im Tumor für die Zellen nötig, um mit bestimmten Wachstumsfaktoren für die Tumorprogression stimuliert zu werden (Coussens et al., 1999; Sparmann and Bar-Sagi, 2004).

Um die Tumoren ausreichend mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen zu versorgen, müssen neue Blutgefäße gebildet werden. Ohne diese Angiogenese können Tumoren bestimmter Größe nicht weiterwachsen oder metastasieren. Dieser Prozess wird durch das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-Angiogenesefaktoren gesteuert. Liegt das Gleichgewicht auf Seiten der Angiogenesefaktoren findet eine Neubildung der Gefäße statt (Carmeliet and Jain, 2000).

Da sich diese Arbeit mit den übrigen Kennzeichen der Tumorzellen, nämlich unkontrollierter Proliferation und Antiapoptose, eingehend beschäftigt, sollen sie im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.3.2.1. Die unkontrollierte Proliferation

Ursächlich für die unkontrollierte Proliferation sind mehrere Mechanismen. Man kann hier die Blockade der terminalen Differenzierung bzw. Seneszenz, die Insensitivität für Antiwachstumssignale und die Amplifikation von Wachstumssignalen unterscheiden.

Vor Jahren haben Hayflick und Moorhead den Begriff der zellulären Seneszenz, der den endgültigen Wachstumsarrest von Zellen beschreibt, eingeführt (Hayflick, 1965). In den letzten Jahren wurde dann das Hayflicklimit, das die endliche Anzahl der Zellteilungen beschreibt, mit der fortschreitenden Verkürzung der Telomeren assoziiert (Harley et al., 1990). Wenn demnach Telomere eine kritische Länge erreichen, wechseln die Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus, was mit terminaler Differenzierung oder Seneszenz beschrieben wird (Sherr and DePinho, 2000). Diese Schritte sind im Allgemeinen irreversibel und die Zelle verliert ihr proliferatives Potenzial. In Krebszellen werden diese Mechanismen daher außer Kraft gesetzt.

Im normalen Gewebe existieren eine Vielzahl wachstumshemmender Mechanismen, die in Tumoren oft nicht mehr funktionieren. Störungen des zellulären Gleichgewichts werden meist über das Rb (Retinoblastoma)-Protein vermittelt und verursachen Zellzyklusarreste. Im hypophosphorylierten Zustand blockiert Rb die Progression des Zellzyklus durch die Bindung von E2F, einem Transkriptionsfaktor, der die Transkription der Gene des G₁ – S Übergangs kontrolliert (Weinberg, 1995). Die Disruption des Rb-Proteins führt zum ungehinderten Durchlaufen des Zellzyklus, wobei wachstumshemmende Signale nicht weiter umgesetzt werden können. Von großer Bedeutung hierbei ist die Regulation der Wachstumssignale, deren stärkstes Signal über die Egr-Familie weitergeleitet wird. Die Vielfalt normaler zellulärer Funktionen, die durch die Mitglieder der Egr-Familie reguliert werden, sowie die pathophysiologische Relevanz uneingeschränkter Kinaseaktivität unterstreichen die Notwendigkeit einer strengen aber fein abgestimmten Kontrolle der Signalweiterleitung durch Rezeptortyrosinkinasen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen eine angemessene Dauer und Stärke des Signals von Rezeptoren garantiert. Im Falle des Egfrs konnten mehrere Wege der Rezeptorregulation identifiziert werden (Fiorini et al., 2001). Diese schließen Liganden-induzierte Endozytose (Wiley and Burke, 2001), Degradation

durch die Ubiquitin-Proteasom-Maschinerie (de Melker et al., 2001; Levkowitz et al., 1998), die Induktion inhibitorischer Proteine (Azios et al., 2001; Doherty et al., 1999; Hackel et al., 2001; Ruschel and Ullrich, 2004) sowie die Negativregulation durch Proteintyrosinphosphatasen (Gensler et al., 2004; Tiganis, 2002) ein.

Desweiteren benötigen Körperzellen Wachstumsfaktoren um zu proliferieren. Diese Wachstumsfaktoren werden oft von Nachbarzellen sezerniert, binden und stimulieren bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zelle (parakrine Stimulation). Außerdem existieren endokrine Mechanismen, wobei Wachstumsfaktoren z.B. aus der Blutbahn Zellwachstum aktivieren können. Die Wachstumsrezeptoren lösen eine Signalkaskade bis in den Zellkern aus, wo die Transkription der für die Zellproliferation nötigen Proteine gestartet wird. Krebszellen zeigen eine reduzierte Abhängigkeit von exogener Wachstumsstimulation und -inhibition. Daher ist anzunehmen, dass Tumorzellen ihre eigenen Wachstumssignale produzieren können. Diese autokrine Stimulation wird oft durch die erhöhte Proteinexpression oder die Hyperaktivität von Wachstumsrezeptoren oder weiteren Signalmolekülen hervorgerufen. Es existieren beispielsweise aktivierende Mutationen in Proteinen der mitogenen Signaltransduktionswege. In ca. 25% aller humanen Tumoren konnten konstitutiv aktivierende Mutationen im *ras*-Onkogen nachgewiesen werden (Medema and Bos, 1993). Diese Mutationen verursachen eine dauerhafte Aktivierung dieser Onkogene und führen zu hyperaktiven Proliferationssignalwegen. Außerdem existieren „crosstalk“-Mechanismen, durch die hyperaktive Signalwege auch andere beeinflussen können. So kann eine hyperaktive *ras*-Mutation die PI3Kinase aktivieren, welche einen Überlebenssignalweg via Akt aktiviert.

Hauptmechanismus ist jedoch die Überexpression von Wachstumsrezeptoren. So findet man sehr häufig in Magen-, Hirn- und Brusttumoren eine Überexpression des *Egfr* (Salomon et al., 1995); (Rubin Grandis et al., 1996), während in fast einem Drittel aller Brusttumoren der *Her2*-Rezeptor überexprimiert ist (Slamon et al., 1989; Yarden and Ullrich, 1988). Dort konnte eine Amplifikation des *her2*-Gens und ein damit assoziiertes aggressives Tumorverhalten beobachtet werden (McCann et al., 1991); (Hynes and Stern, 1994). Der kausale Zusammenhang zwischen *Her2*-Überexpression und einer schlechten klinischen Prognose wird gestützt durch eine signifikant geringere Überlebensrate und einem früher auftretenden Rezidiv bei Patientinnen mit *Her2*-überexprimierendem Brust- oder Ovarialkrebs im Vergleich zu

Patienten mit Tumoren ohne Her2-Überexpression (Berchuck et al., 1990; Slamon et al., 1989). Die Überexpression von Wachstumsrezeptoren kann desweiteren zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung führen (Di Fiore et al., 1987). Da die Stimulation und Überexpression von Wachstumsfaktoren ebenfalls ein zentraler Mechanismus für Chemoresistenz ist, soll die Signalweiterleitung der Egfr-Familie näher beleuchtet werden.

Die Rezeptoren der EGFR-Familie

Eine der am besten erforschten Gruppen der Wachstumsrezeptoren ist die EGFR-Familie. Sie besteht aus vier Mitgliedern, dem Egfr (Her1, ErbB1) (Ullrich et al., 1984), Her2 (human Egfr, ErbB2/neu) (Coussens et al., 1985), Her3 (ErbB3) (Kraus et al., 1989) und Her4 (ErbB4) (Plowman et al., 1993). Her2 und Her3 nehmen in dieser Familie eine Sonderstellung ein. Während für Her2 bis heute kein direkter Ligand bekannt ist (Klapper et al., 1999), weist Her3 auf Grund von Punktmutationen innerhalb der katalytischen Domäne keine enzymatische Aktivität auf (Guy et al., 1994).

Die Aktivierung von RTKn der Egfr-Familie findet in der Regel durch die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren statt, die durch die Bindung eines spezifischen Liganden an den Rezeptor ausgelöst wird (Schlessinger, 2002).

Zu den Liganden der Egfr-Familie zählen EGF, TGF α , HB-EGF, Epi- und Amphiregulin, Betacellulin sowie verschiedene Liganden der Heregulin/NDF-Untergruppe (Abb. 8).

Die Bindung eines Liganden kann sowohl zur Bildung von Rezeptorhomodimeren als auch zur Dimerisierung zweier verschiedener Rezeptoren und somit zur Bildung von Heterodimeren führen (Daly, 1999; Wallasch et al., 1995). Die in beiden Fällen folgende Aktivierung der intrinsischen Proteintyrosinkinase leitet die Autophosphorylierung spezifischer zytoplasmatischer Tyrosinreste ein. Diese Phosphorylierungsstellen dienen dann als Andockstation für Adaptormoleküle wie Grb2, Shc oder Gab1 und bilden den Ausgangspunkt für eine Reihe von Signalkaskaden (Hackel et al., 1999; Prenzel et al., 2001).

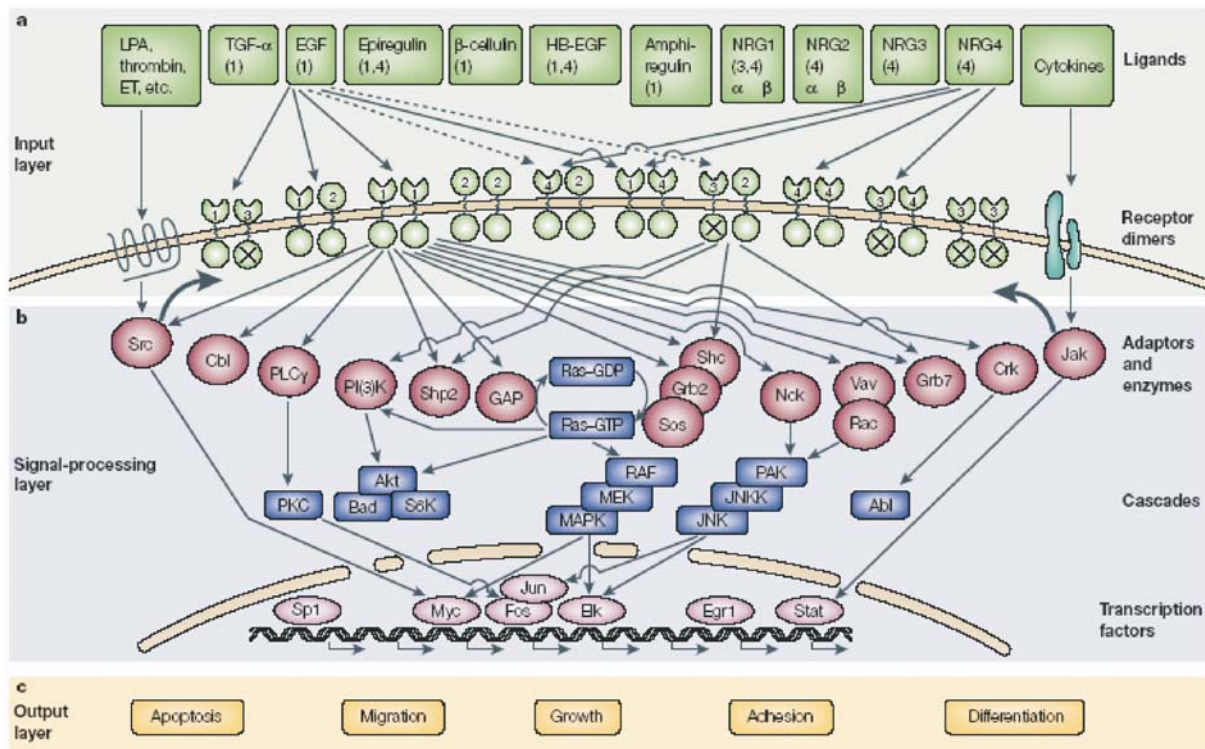


Abb. 8 : Das komplexe Signalnetzwerk der EGFR-Familie. Die kombinatorischen Möglichkeiten der verschiedenen Liganden, Rezeptoren und intrazellulären Signalkaskaden ermöglichen ein hohes Maß an Signaldiversifikation (Yarden and Sliwkowski, 2001).

Signaltransduktion durch die Rezeptoren der Egfr-Familie trägt zu einer Vielzahl von Entwicklungs- und Krankheitsprozessen bei (Burden and Yarden, 1997). Die Stimulation von kultivierten Zellen mit verschiedenen Liganden zeigt ganz unterschiedliche Einflüsse auf das Migrations-, Proliferations- oder Differenzierungsverhalten der Zellen. Zu diesem breiten Spektrum an zellulären Antworten kommt es, weil die Bindung verschiedener Liganden an den gleichen Rezeptor zu einem unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster innerhalb des zytoplasmatischen Bereichs des Rezeptormoleküls führen kann, obwohl die Gesamtphosphorylierung keine Unterschiede aufweist (Sweeney et al., 2000). Ein einzelner Rezeptor scheint somit in der Lage zu sein, in Abhängigkeit des gebundenen Liganden ganz unterschiedliche Signale in das Innere der Zelle weiterzuleiten und so zur Signaldiversität beizutragen. Des Weiteren kommt es, wie bereits erwähnt, nach der Bindung eines Liganden neben der Bildung von Homodimeren auch zur Wechselwirkung zweier unterschiedlicher Rezeptoren, wobei Her2 den bevorzugten Heterodimerisierungspartner darstellt. Da jeder Rezeptor mit einer spezifischen Auswahl intrazellulärer Adaptoren und Signalmolekülen interagiert,

besteht hier eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines breiten Spektrums zellulärer Antworten. Hinweise auf eine selektive Transphosphorylierung in Abhängigkeit vom Bindungspartner untermauern zusätzlich die Bedeutung der Heterodimerisierung bei der Signaldiversifikation (Muthuswamy et al., 1999; Olayioye et al., 1998). Dieses interaktive und vielschichtige Signalnetzwerk mit seinen kombinatorischen Möglichkeiten sowohl auf Aktivierungs- als auch auf Expressionsebene erlaubt eine Vielzahl von spezifischen biologischen Antworten.

Der MAPKinase- und AKT-Signalweg

Die beiden wichtigsten stromabwärts der Egfr-Familie gelegenen Signalwege sind der Mapkinase- und der Akt-Signalweg. Die Kaskade biochemischer Ereignisse, die vom Egfr über die Aktivierung des Protoonkogens Ras zur Kontrolle der Genexpression durch Mapkn führt, gehört zu den am besten untersuchten Signalwegen und wird als Ras/Mapk-Signalweg bezeichnet (Graves et al., 1995). Nach der Aktivierung und Autophosphorylierung des Egfrs bindet das Adaptormolekül Grb2 entweder direkt über seine SH2-Domäne oder indirekt durch die Interaktion mit Shc, einem weiteren Adaptormolekül, an den Rezeptor. Über seine SH3-Domäne rekrutiert Grb2 dann den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos zur Zellmembran. Diese Translokation des Grb2/Sos-Komplexes begünstigt die Wechselwirkung von Sos mit dem membranassoziierten kleinen G-Protein Ras und den Austausch von Ras-gebundenem GDP gegen GTP. Das somit aktivierte Ras-Protein bewirkt seinerseits die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Raf-1. Dies führt über die intermediären Threonin-/Tyrosinkinase Mek1 und Mek2 zur Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von Erk1 und Erk2, die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort durch Serin-/Threoninphosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Elk, die Genexpression regulieren (Abb. 8) (Cobb et al., 1991; Khokhlatchev et al., 1998; Treisman, 1996).

Parallel zur Erk/Mapk-Kaskade können in höheren eukaryotischen Systemen weitere Mapk-Kaskaden aktiviert werden, die ebenfalls die Signalübertragung in den Kern weiterleiten. Die daran beteiligten Proteinkinasen besitzen einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden Proteinen des Erk-Signalweges. So existieren die den Erk1 und 2 homologen Kinasen Jnk1 und 2, sowie die nach ihrer Molekülmasse

bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran and Premkumar Reddy, 1998). Während Erk1/2 in der Regel hauptsächlich nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren und nach Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden, wird die Aktivität von Jnk1/2 und p38 von diesen Stimuli nur eingeschränkt induziert. Die Hauptaktivatoren dieser Kinasen sind zellulärer Stress in Form von UV-Bestrahlung oder osmotischem Schock sowie proinflammatorische Zytokine (Derijard et al., 1994; Su and Karin, 1996).

Der Akt-Signalweg ist für das Überleben und somit für das Wachstum der Zelle von enormer Bedeutung und wird unter anderem von Rezeptoren der Egfr-Familie ausgelöst. Über die Phosphorylierung bestimmter Tyrosine an RTKs wird die PI3Kinase durch ihre SH2-Domäne rekrutiert. Dies führt zu deren Aktivierung entweder durch die bloße Nachbarschaft zu den Substraten Phosphatidylinositol(4,5)phosphate oder auf Grund der Bindung der regulatorischen Untereinheit p85, die eine die Aktivität steigernde Konformationsänderung auslöst (Yu et al., 1998). Die Aktivität der PI3Kinasen besteht darin, PtdIns(4,5)P₂ zu PtdIns(3,4,5)P₃ zu phosphorylieren. PtdIns(3,4,5)P₃ (oder auch PIP₃) dient als membranverankerte Plattform für die Bindung weiterer Proteine, vermittelt über die Wechselwirkung des 5'-Phosphats mit einer PH-Domäne. Die Kinasen der Akt-Familie (Akt1, 2 und 3) sind mit einer PH-Domäne ausgestattet und werden durch PIP₃ an der Zellmembran lokalisiert. Dort wird Akt über die Kinasen Pdk1 und 2 an Serin 473 und Threonin 308 phosphoryliert (Andjelkovic et al., 1997; Bellacosa et al., 1998). Akt kann die drei zellulären Parameter Überleben, Wachstum und Größenwachstum maßgeblich beeinflussen.

Akt kann beispielsweise Gsk3b direkt phosphorylieren, was deren Kinaseaktivität inhibiert und zur Akkumulation von Cyclin D1 führt (Diehl et al., 1998). Außerdem kann Akt die Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 inhibieren (Dijkers et al., 2000; Graff et al., 2000). Diese Signalwege führen zu einer verstärkten Proliferation. Das zelluläre Größenwachstum kann Akt über mTor beeinflussen. mTor reguliert die Biogenese durch die Aktivierung von p70 S6Kinase, welche die Translation von 5'polypyrimidin-RNA fördert. Die wichtigste Funktion von Akt ist der starke antiapoptotische Effekt, der über diesen Signalweg vermittelt werden kann. So kann Akt direkt in die Apoptose eingreifen, indem es die Caspase 9 und Bad phosphoryliert. Dadurch wird die katalytische Aktivität der Caspase 9 inhibiert

(Cardone et al., 1998), wobei Bad durch die Phosphorylierung an der Bindung mit BclXL gehindert wird. BclXL kann dadurch antiapoptotisch wirken (Datta et al., 1997). Des Weiteren kann Akt auch indirekt antiapoptotische Signale weitergeben. Durch die Phosphorylierung von Ikk und Mdm2 können der NFkB- und p-53 Signalweg antiapoptotisch beeinflusst werden (Romashkova and Makarov, 1999). Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Fkhr verhindert dessen Translokation in den Nukleus und damit die Transkription proapoptotischer Faktoren wie FasL und Bim (Brunet et al., 1999). Hier kann man keine klare Trennung zwischen antiapoptotischen Mechanismen und unkontrollierter Proliferation erkennen, da beide Mechanismen zusammenspielen und über gemeinsame Proteine aktiviert und weitergeleitet werden.

1.3.2.2. Antiapoptotische Mechanismen

Für multizelluläre Organismen ist es essentiell, störende Zellen beseitigen zu können. Unter anderem müssen kranke z.B. virus-infizierte und entartete Zellen vernichtet werden, um den Gesamtorganismus zu schützen. Diese Zellen werden durch einen speziellen Mechanismus, die Apoptose, entfernt. Der programmierte Zelltod besteht im Wesentlichen aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird von der Zelle ein apoptoseauslösendes Signal verarbeitet, das im zweiten Schritt zur Einleitung und Ausführung der Apoptose führt. Der dritte Schritt ist die Entsorgung der Zellüberreste durch Phagozyten. Durch das kontrollierte Absterben überflüssiger und kranker Zellen werden für den Gesamtorganismus schädliche Reaktionen wie Entzündungen und toxische Nebenprodukte verhindert. Zu den morphologischen Kennzeichen der Apoptose gehören Zellverkleinerung, Chromatinkondensation, Zellmembranbläschen und schließlich das Abschnüren von so genannten „apoptotic bodies“ (Wyllie et al., 1972). Diese Prozesse laufen in einem zeitlichen Rahmen von etwa einer Stunde ab.

Defekte in der Apoptosemaschinerie und deren Regulationsmechanismen führen zu einem großen Spektrum an Krankheiten. Vermehrte Apoptose findet sich sowohl bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson als auch bei AIDS.

Kann die Apoptose dagegen nicht mehr ausgeführt werden, entstehen hyperproliferative Erkrankungen wie Krebs. Trotz apoptotischer Stimuli, hervorgerufen beispielsweise durch die Hyperaktivität von Onkogenen oder dem Fehlen von Wachstumsfaktoren, gelingt es Tumorzellen die Apoptose zu blockieren und weiter zu wachsen. Defekte der Apoptose sind daher ein Kennzeichen onkogen transformierter Zellen und ermöglichen unkontrollierte Proliferation. Durch die Identifikation dieser Mechanismen und anschließendem Auflösen der Apoptoseblockade können Tumorzellen aktiv in den Zelltod getrieben werden.

Mechanismen der Apoptose

Prinzipiell unterscheidet man zwei verschiedene Signalwege der Apoptose. Während der extrinsische Weg eine spezifische Stimulation von zelleigenen Todesrezeptoren (Tnfr, FasR, TrailR uvm.) benötigt, kann der intrinsische oder mitochondriale Weg durch Stress wie DNA-Schäden oder Onkogenen ausgelöst werden (Riedl and Shi, 2004; Wang, 2001).

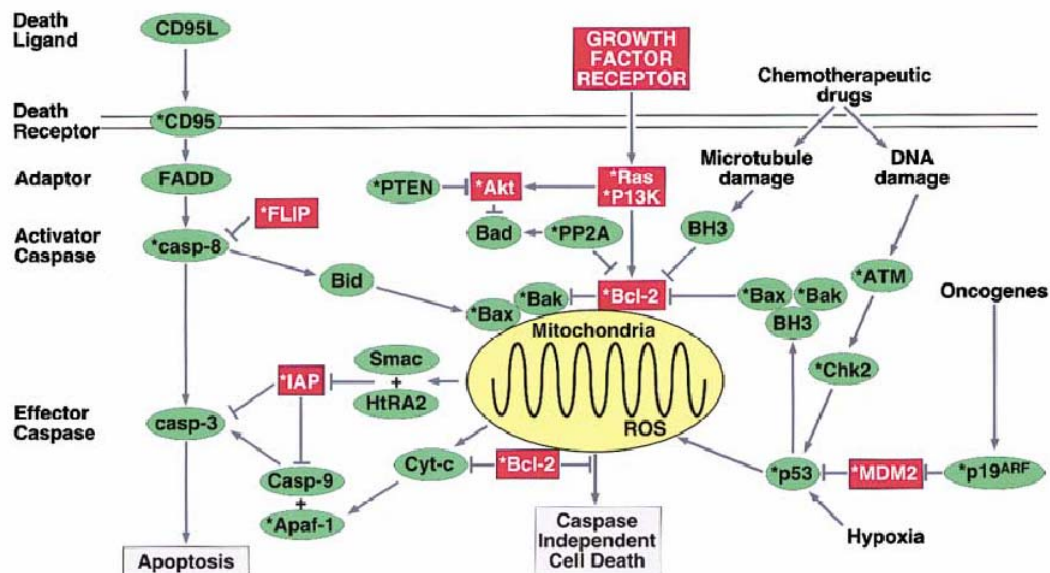


Abb. 9: Schematische Darstellung der verschiedenen apoptotischen Signalwege.

Im extrinsischen Weg führt die Bindung von Liganden (TNF α , FasL, TRAIL usw.) an Todesrezeptoren (Tnfr, FasR, usw.) zu einer Trimerisierung dieser Rezeptoren. Da die Rezeptoren keine katalytische Aktivität aufweisen, leiten sie das Signal über die Rekrutierung von Adaptormolekülen wie Tradd oder Fadd weiter. Deren Bindung an die Rezeptoren erfolgt über die DEATH-Domäne. Die Adaptoren können außerdem über eine weitere Domäne (CARD) Caspase 8 rekrutieren. Die Anhäufung von Caspase 8 in der Nähe der Rezeptoren führt zu einer autokatalytischen Spaltung und damit zur Aktivierung der Caspasen (Krammer, 2000). Dieser auch DISC genannte Komplex initiiert also die Caspase-Kaskade. Die aktive Caspase 8, eine so genannte Initiatorcaspase, spaltet und aktiviert weitere Effektorcaspasen, insbesondere Caspase 3. Mit der Aktivierung von Caspase 3 laufen der extrinsische und intrinsische Apoptoseweg zusammen.

Beim intrinsischen Weg wird die Aktivierung der Caspase 3 über die Mitochondrien vermittelt, die auch als Initiatoren und Integratoren der Apoptose bezeichnet werden. Als Auslöser dafür können sowohl eine Schädigung der Mitochondrien – durch Gifte, oxidativen Stress, Änderung des zellulären pH-Wertes, Strahlung oder Mutationen – als auch die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie dienen. In beiden Fällen bricht das Membranpotenzial als Folge einer fehlerhaften Membranregulation zusammen.

Zur Bcl2-Proteinfamilie gehören sowohl pro- als auch antiapoptotische Faktoren. Sie sind an der Regulation von Membrankanälen unter anderem in der Mitochondrienmembran beteiligt. BclXL und Bcl-2 selbst sind permanent aktive antiapoptotische Moleküle, während Bid, Bak und Bax zu den proapoptotischen Faktoren zählen und erst im Verlauf der Apoptose aktiviert werden (Harris and Thompson, 2000). Bcl-2 kann bei der Regulation von Kanälen in der Mitochondrienmembran und der des ER mitwirken. BclXL reguliert ebenfalls mitochondriale Membrankanäle und ist an der Regulation des Membranpotenzials sowie des Organellenvolumens von Mitochondrien und ER beteiligt. Die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie liegen in gesunden Zellen als inaktive Vorläufer im Zytoplasma vor, die durch apoptotische Signale aktiviert werden. Beispielsweise können Doppelstrangbrüche oder eine Aktivierung bestimmter Rezeptoren die Spaltung und Aktivierung von Bid durch Caspase 8 und Caspase 2 auslösen. Das aktivierte Bid (tBid für *truncated Bid*) kann Bak und Bax aktivieren

(Wei et al., 2001), die dann durch Heterodimerisierung mit BclXL und Bcl-2 deren antiapoptotische Funktion aufheben können. Des Weiteren können Bax-Oligomere in der Außenmembran der Mitochondrien supramolekulare Membranöffnungen bilden. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren also die Integrität der Mitochondrienmembran. Je nach Lage des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren wird die Apoptose begünstigt oder inhibiert. Durch die nicht mehr regulierten Kanäle können proapoptotische Moleküle wie Cytochrom c und Smac/Diablo sowie Endonuclease G und Aif ins Zytoplasma gelangen. Die proapoptotischen Proteine Apaf1 und Cytochrom C bilden im Zytoplasma zusammen mit Caspase 9 das Apoptosom (Rodriguez and Lazebnik, 1999). Dieser Proteinkomplex aktiviert über eine proteolytische Spaltung Effektorcaspasen wie Caspase 3.

Die Caspasen sind die zentralen Komponenten der Apoptose (Shi, 2002; Thornberry and Lazebnik, 1998). Caspasen, die ihren Namen von ihrer Funktion - Cystein-Proteasen, die ihre Substrate hinter einem Aspartat-Rest spalten (Alnemri et al., 1996) - erhalten haben, bilden eine konservierte Familie von Enzymen. Die apoptotischen Caspasen sind grundsätzlich in zwei Klassen eingeteilt: die Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10 in Säugern) und die Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7 in Säugern). Alle Caspasen liegen in der gesunden Zelle als inaktive Procaspasen vor, die erst durch Proteolyse und Dimerisierung zu funktionsfähigen Enzymen reifen. Dabei stehen die Initiatorcaspasen am Anfang einer Caspase-Kaskade, in der sich die Caspasen nacheinander gegenseitig aktivieren (Nunez et al., 1998). Die Autoaktivierung der Initiatorcaspasen ist streng reguliert und benötigt oft die Bildung eines aus vielen Komponenten aufgebauten Proteinkomplexes unter apoptotischen Bedingungen. Wenn schließlich die Effektorcaspasen aktiviert sind, sind sie für die proteolytische Spaltung einer Reihe zellulärer Ziele verantwortlich, was letztendlich zum Zelltod führt. Zu den durch Caspasen gespaltenen Molekülen gehört zum Beispiel neben Bestandteilen des Zytoskeletts auch das DNA-Reparatur-Enzym Parp (Germain et al., 1999) und der Inhibitor einer DNase (Enari et al., 1998). Diese Spaltungen bilden einige der morphologischen Kennzeichen der Apoptose.

Blockade der Apoptose in Krebszellen

Ob Apoptose ausgelöst wird, hängt letztendlich von der Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren ab. So kann beispielsweise auch eine Überexpression von Wachstums- und/oder Überlebensfaktoren wie IGF, Her2 und Akt die Balance zu Gunsten der Antiapoptose verändern. Auch können Wachstumsfaktoren die Insensitivität für apoptotische Stimuli beeinflussen.

Ein wichtiger Mechanismus, um Apoptose in Krebszellen zu verhindern, besteht darin, das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren deutlich auf die Seite der antiapoptotischen Faktoren zu bringen. Bekannt sind hier die Überexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Her2, Egfr, IGF usw.), sowie die konstitutive Aktivierung bzw. Inaktivierung von Signaltransduktionsproteinen, die ein Überlebenssignal weiterleiten oder inhibieren können (Akt, PI3K, Pten, p53). Wenn beispielsweise der Transkriptionsfaktor p53 mutiert ist, können Zellen resistent gegen bestimmte apoptotische Stimuli werden. So sind Mauszellen mit funktionellem p53 sensitiver gegen γ -Strahlung und das Chemotherapeutikum Doxorubicin (Lowe et al., 1994). Der zugrunde liegende Signaltransduktionsmechanismus basiert auf der Aktivierung von Atm oder Atr durch DNA-Schäden. Das Signal wird an p53 weitergegeben, das dann für die Transkription einer Reihe proapoptotische Gene wie Apaf1, Bax (Miyashita and Reed, 1995) und Procaspase 6 sorgt. Des Weiteren kann p53 Bcl2 und BclXL binden und fördert so die Apoptose (Mihara et al., 2003). Bcl2 und BclXL sind permanent aktive antiapoptotische Moleküle (Harris and Thompson, 2000). Erst durch die Bindung proapoptotischer Bcl2-Familienmitglieder wie Bid, Bad oder Bax werden diese inaktiviert und ein proapoptotisches Signal erzeugt. Daher ist es nicht verwunderlich, dass eine Überexpression von Bcl2 oder BclXL in den meisten Tumoren vorliegt (Kim et al., 2004). Außerdem spielt Bcl2 eine wichtige Rolle in der Chemoresistenz (Scorrano and Korsmeyer, 2003).

Durch die Blockade der Apoptose an verschiedenen Stellen entgehen Tumorzellen dem körpereigenen Sicherungssystem, das entartete Zellen in den Suizid treibt. Durch die Identifikation der damit assoziierten Mechanismen und Gene können zum einen die Grundlagen der Apoptoresistenz in Krebszellen aufgeklärt werden und zum anderen kann dieser Ansatz Angriffstellen der Tumorzellen für neue und effizientere Krebstherapien aufzeigen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Nach längerer Behandlung von Tumoren mit zytotoxischen Substanzen treten häufig Probleme in Form von Therapieresistenz auf. Durch Blockade der Apoptose kann bei Zellschädigung der programmierte Zelltod nicht mehr ausgelöst werden. Dies ermöglicht den Tumorzellen das Überleben einer Chemotherapie und somit eine weitere Tumorprogression. In der vorliegenden Arbeit sollen Gene und Mechanismen identifiziert werden, die für Apoptoseresistenz nach Chemotherapie verantwortlich sind. Es sollen dazu Genexpressionsprofile apoptoseresistenter und sensitiver Klone aus Brustkrebszelllinien erstellt werden.

Apoptose kann durch Chemotherapeutika (z.B. Doxorubicin) in Brustkrebszelllinien induziert werden. Durch Zugabe geeigneter Konzentrationen apoptoseauslösender Stoffe zu etablierten Brustkrebszelllinien (Ausgangszelllinie) werden apoptose-resistente Zellen überleben und als Zelllinie etabliert. Die überlebenden Klone können anschließend auf Apoptoseresistenz überprüft werden. Die so erhaltenen Klone sind für die sensitive Genexpressionsanalyse durch Macroarrays gut geeignet. Durch den genau definierten Genexpressionsphänotyp der Ausgangszelllinie können dann Veränderungen der Genexpression in apoptoseresistenten Klonen eindeutig identifiziert werden. Mit diesem Verfahren können Gene mit induzierter bzw. reprimierter Expression in apoptosesensitiven bzw. -resistenten Zellen identifiziert und damit mögliche antiapoptotischen Signalwege charakterisiert werden.

Anschließend soll durch die Analyse der differentiell regulierten Gene deren Beteiligung an Chemoresistenzmechanismen nachgewiesen werden.

In dem vorangegangenen Versuch konnten die PTK Syk und die RTK Fgfr4 als differentiell exprimiert identifiziert werden. Syk soll als Beispiel für ein Gen mit reduzierter Genexpression in resistenten Klonen charakterisiert werden. Der Fgfr4 dagegen wurde in den Klonen überexprimiert. Auch soll dessen Rolle bei der Chemoresistenz aufgeklärt werden.

Mit Hilfe dieses Ansatzes sollte es möglich sein, neue Angriffspunkte und Strategien zur therapeutischen Beseitigung der Apoptoseresistenz von Tumorzellen zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Bezugsquellennachweis

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
AG1478	Alexis Biochemicals, Lausen
Agar	Difco, Detroit
Agarose	BRL, Eggenstein
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Biotrend Chemikalien, Köln
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dG/A/T/CTP)	Roche, Mannheim
Doxorubicin	Sigma, Taufkirchen
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Polysciences, Eppenheim
IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid)	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Natriumazid	Serva, Heidelberg
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Aldrich, Steinheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Piceatannol	Sigma, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
Polybren (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen

Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Protein A/G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Puromycin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität (p.a.) von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2. Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt/Main
Reverse Transkriptase, AMV	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
Trypsin (Gibco)	Invitrogen, Eggenstein

2.1.3. Radiochemikalien

[α - ³³ P]-dATP	>6000 Ci/mmol
[³⁵ S]-Methionin	>6000 Ci/mmol

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Freiburg) bezogen.

2.1.4. Handelsübliche „Kits“ und sonstige Materialien

CaspACE FITC-VAD-FMK in situ Marker	Promega, USA
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
ECL Kit	PerkinElmer/NEN, Köln
Filterpapier 3MM	Whatman, USA
Fluorescein-FragEL DNA Fragmentation Kit	Merk, England
Human COT-1 DNA	Invitrogen, Karlsruhe

Hyperfilm MB	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Kulturgefäße, Plastik	Greiner, Solingen Nunc, Dänemark Falcon, U.K.
Megaprime DNA Labelling Kit	Amersham, Braunschweig
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Sankt Augustin
Parafilm	Dynatech, Denkendorf
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Sterilfilter 0,22 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
Sterilfilter 0,45 µm, Zelluloseacetat	Nalge Company, USA
tRNA (Bäckerhefe)	Roche, Mannheim
Zellulosenitrat 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.5. Wachstumsfaktoren und Liganden

EGF (Maus)	Toyoba, Japan
Heregulin-b1 EGF domain	R & D Systems,
Insulin	Lilly, Gießen
TNF α	Peptotec, USA

EGF (20 ng/ml)
 Hydrokortison ($1,4 \times 10^{-6} \text{M}$), Sigma, USA
 Cholera Enterotoxin (100 ng/ml), Sigma, USA

Die Medien wurden gemäß den Herstellerangaben mit 1mM Natriumpyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren versetzt. Je nach kultivierter Zelllinie wurde den Medien hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt (10-20%).

2.2.3. Stammlösungen und Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

BBS (2x)	50 mM	BES
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 6,96 (NaOH)
Denhardt (100x)	2,0 %	Polyvinylpyrrolidon
	2,0 %	Ficoll
	2,0 %	BSA
Doxorubicin	1 mM	in H ₂ O
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	30 %	Glyzerin
	100 mM	EDTA pH 8,0
HBS (2x)	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	100 mM	Hepes, pH 7,0
HNTG	200 mM	Hepes, pH7,5
	600 mM	NaCl
	40 %	Glycerin
	0,4 %	Triton X-100
Hybridisierungspuffer	5xSSC	
	0,1 %	SDS
Lämmli-Puffer (3x)	20 %	Glyzerin
	3 %	SDS

	10 mM	EDTA pH 8,0
	0,05 %	Bromphenolblau
	5 %	Mercaptoethanol
Lysepuffer	50 mM Hepes pH 7,5	
	150 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
	10% Glycerin	
	10 mM Tetra-Natrium-Pyrophosphat	
	1 % Triton X-100	
	100 mM NaF	
NET (10x)	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl pH 7,4
	0,05 %	Triton X-100
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 (HCl)
Prähybridisierungspuffer	10x Denhardt	
	10x SSC	
	100 mM NaPO ₄ , pH 6,8	
	2 mM Na ₄ P ₂ O ₇	
Propidiumiodidpuffer	0,1% Natriumcitrat	
	0,1 % Triton X-100	
	50 µg / ml Propidiumiodid	
SD-Transblot	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	40 mM	Glycin
	20 %	Methanol
	0,004 %	SDS
SSC (20x)	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Natriumcitrat
Strip-Lösung	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	2 %	SDS
	100 mM	b-Mercaptoethanol
TAE (10x)	400 mM	Tris/Acetat, pH 8,0
	10 mM	EDTA

TE 10/0,1	10 mM 0,1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0
Tris-Glycin-SDS (10x)	250 mM 2 M 1 %	Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS
Waschpuffer 1 (W1)	2x SSC 0,1 % SDS	
Waschpuffer 2 (W2)	0,2x SSC 0,1% SDS	

2.3. Bakterienstamm

Stamm	Beschreibung	Referenz
DH5 α F'	F' endA1 hsd17 ($r_k^- m_k^+$) supE44 recA1 gyrA (Nal) thi-1 α (lacZYA-argF196)	Genentech, USA

2.4. Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BT-549	Humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-122
HEK 293	Humane embryonale Nierenfibroblasten	ATCC CRL-1573
MCF-10A	Humane Mammaepithel-Zelllinie	ATCC CRL-10317
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-26
MDA-MB-435S	Humane Duktale Karzinomzelllinie	ATCC HTB-129
MDA-MB-468	Humane Mammaadenokarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-132
Φ NX-Ampho	Amphotrophe Retrovirus produzierende Zelllinie (w/c 293T Zellen) stabil transfiziert mit einem Moloney GagPol-IRES-Lyt2 Konstrukt mit RSV Promotor, pPGK Hygromycin selektierbaren Marker und amphotrophen <i>env</i> Gen	Nolan Lab, Stanford
BT474	Humane Mammaduktalkarzinom-Zelllinie	ATCC HTB-120

Alle nicht aufgeführten Zelllinien entsprechen in Charakterisierungen und Ursprung der ATCC.

2.5. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunoprecipitation oder als primäre Antikörper im Immunoblot verwendet.

Antikörper	Beschreibung	Referenz
Akt 1/2	Kaninchen, polyklonal, gegen AS 345-480 des humanen Akt	Santa Cruz, USA
EGFR	Schaf, polyklonal, gegen die intrazelluläre Domäne des humanen EGFRs	UBI, USA
Erk2 (C-14)	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des Ratten Erk2	Santa Cruz, USA
Erk2 (K-23)	Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus der Subdomäne XI des Ratten Erk2	Santa Cruz, USA
HER2 13D1B1	Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen HER2	H. J. Bühring, diese AG
HER2-CT	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen HER2	(Lee et al., 1989)
HER3	Maus, monoklonal, gegen AS 1295-1323 des humanen HER3	UBI, USA
HER3	Kaninchen, polyklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen HER3	R. Lammers, diese AG
Phospho-Akt	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Serin 437 des murinen AKT	Cell Signaling, USA
Phospho-Erk2	Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-Erk1/2 (Thr-202/Tyr-204) MAPK	NEB, Frankfurt/M
PY (4G10)	Maus, monoklonal, gegen Phosphotyrosin	UBI, USA
Syk (4D10)	Maus, monoklonal, gegen C-terminales Peptid des humanen Syk (AS 313-339)	Santa Cruz, USA
VSV (P5D4)	Maus, monoklonal, gegen 11AS des Glykoproteins des Virus für Vesikuläre Stomatitis (VSV-G)	Roche, Mannheim
b-Tubulin	Maus, monoklonal, Aszites	Sigma, Taufkirchen

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege gegen Maus	1:20000	BioRad, München
Ziege gegen Kaninchen	1:20000	BioRad, München
Kaninchen gegen Schaf	1:20000	Dianova, Hamburg

2.6. Plasmide und Oligonukleotide

Ausgangsvektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , CMV Promoter, BGH poly A, f1(+) ori	Invitrogen, USA
pBlueScript KS+	ColE1 ori, Amp ^r , LacZ, f1 (+) IG, SK (MKS)	Stratagene, USA
pRETRO-SUPER	siRNA generierender Vektor, H1 RNA Promotor, pBABE Backbone	OligoEngine
pLXSN	Retroviraler Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r , ori from pBR322, 5'-LTR and 3'-LTR from MoMuLV, SV40 Promoter	Clontech, USA
pcDNA3JVSV	Modifizierter pcDNA3 zur Proteinexpression, VSV-Epitop	J. Bange, diese AG

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pCDNA3/Syk	cDNA von hSyk, (AS 1-635)	C. Cant, diese AG
pCDNA3/Syk K/R	cDNA von hSyk (K402R), katalytisch-inaktive Mutante, VSV-Epitop	C. Cant, diese AG
pcDNA3JVSV/Syk wt	cDNA von hSyk, (AS 1-635), VSV-Epitop	A. Ruschel diese AG
pcDNA3JVSV/Syk K/R	cDNA von hSyk, (K402R), katalytisch-inaktive Mutante, VSV-Epitop	A. Ruschel diese AG
pRETRO-SUPER/Syk.1	Syk-spezifische "siRNA"-generierender Vektor. Syk Zielsequenz: GACTGGGCCCTTTGAGGAT	A. Ruschel diese AG
pRETRO-SUPER/Syk.6	Syk-spezifische "siRNA"-generierender Vektor. Syk Zielsequenz: GTACTTGGAGGAGAGCAAT	A. Ruschel diese AG

2.7. Computerprogramme

AIDA	Raytest, Kanada
ArrayVision 5.1.	Imaging Research, USA
BASreader	Raytest, Kanada
BD CellQuest Pro 4.0.2	Beckton Dickinson, USA
Cluster	Eisen Lab, USA (Eisen, 1998)
Tree View	Eisen Lab, USA (Eisen, 1998)
Oncomine	www.oncomine.com

2.8. Molekularbiologische Methoden

2.8.1. Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA wurden aus 2 ml *E. coli*-Kultur mit Hilfe des QIAGEN Mini Kits präpariert.

2.8.2. Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion verschiedener Zelllinien wurden größere DNA-Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.8.3. Enzymatische Behandlung von DNA

Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden bei Temperaturoptimum des Enzyms.

2.8.3.1. Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg verdaute Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,5) nach Zugabe von 5 Units alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1% Agarose) aufgereinigt und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit eluiert.

2.8.3.2. Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments sowie 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 Unit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.8.4. Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2%-igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Volumen 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-200 Volt innerhalb von 1-2 Stunden.

Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TBE/Ethidiumbromid (2µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TBE entfärbt.

2.8.5. Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.8.6. DNA-Transfer in *E. coli*-Bakterien

2.8.6.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (Chung and Miller, 1993) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.8.6.2. Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien

Zur Transformation von *E. coli*-Bakterien wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl, 150 mM CaCl₂, 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 1000 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden kurz bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Bakterienpellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB/Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.8.7. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

2.8.7.1. PCR-Amplifikation von DNA

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, einen DNA-Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide an den Matrizenstrang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligonukleotide wird der zwischen den Oligomeren liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis, 1986). Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Grundschema in einem Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt:

- 1 µl Matrizen-DNA, 1-10 ng
- 1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol/µl
- 1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol/µl
- 2,5 µl 10x PCR Puffer II mit 20 mM MgCl₂
- 2 µl dNTP-Mix, 2,5 mM je dNTP
- 0,5 µl Pfu DNA Polymerase (2,5 U/µl)
- 17 µl ddH₂O

Die Synthesereaktion wurde in einem Thermocycler „Progene“ der Firma Techne durchgeführt. Dabei wurde das folgende Syntheseprotokoll verwendet:

Erste Denaturierung:	3 min	94°C
Amplifikation 20-30 Zyklen:	1 min	94°C (Denaturierung)
	1 min	T _m -5°C (Hybridisierung)
	1,5 min/kb	72°C (Synthese)
Letzte Synthese:	7 min	72°C

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mittels Gelelektrophorese auf Amplifikation überprüft. Die gewünschten PCR-Fragmente wurden, wie unter 2.8.7.2. beschrieben, aufgereinigt und standen danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.8.7.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierte PCR-Produkte wurden mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.8.8. Arbeiten mit RNA

Die Präparation von RNA macht die Verwendung gesonderter, RNase-freier, Lösungen und Reaktionsgefäße notwendig. Die Lösungen wurden in MilliporeTM-Wasser angesetzt und autoklaviert. Reaktionsgefäße wurden 2 h bei 200°C gebacken. Während der RNA-Präparation wurden ständig Handschuhe zum Schutz vor RNAsen der Haut getragen und häufig gewechselt.

2.8.8.1. Präparation von total-RNA

Für die Präparation von total-RNA wurden 108 Zellen (ca 80 % konfluent) mit Guanidiniumthiocyanatpuffer (4 M GnSCN, 25 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,1 M β -Mercaptoethanol) lysiert. Die genomische DNA wird durch das 10x... durch eine Injektionsnadel geschert. Zu dem Ansatz wurden 500 μ l einer 10%-igen N-Lauroylsarcosinlösung und 1 ml 2M NaOAc pH 4,2 zugegeben und gemischt. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion mit 10 ml Phenol und 2 ml Chloroform. Nach der Zentrifugation (30' 4000rpm) wurde der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und 45 min. bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (HB4 10 min 10000 rpm) wurde das Pellet mit Chloroform / Wasser 1:1 gewaschen und die wässrige Phase mit 0,1 vol 3M NaOAc pH 6,0 und 3 Vol Ethanol präzipitiert. Das durch eine Zentrifugation erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 200 μ l H₂O resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde durch Gelelektrophorese und anschließendes Färben mit Ethidiumbromid überprüft.

2.8.8.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurden jeweils 10 µg totalRNA eingesetzt. Dazu wurde 1µl K1Primer und 0,5µl K2Primer (je 10µM) gegeben und 2 Minuten auf 68 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen (10 Sekunden auf Eis) wurden 2µl dNTPs (10mM), AMV-Reaktionspuffer und AMV Reverse Transkriptase (50 Units) zugegeben. Nach 10 Minuten bei 25°C wurde der Ansatz 1 h bei 42°C in einer PCR-Maschine inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit dem „PCR Purifikation“-Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.8.9. Makroarray-Analyse

2.8.9.1. Herstellung von cDNA-Arrays

Bei der Auswahl der Gene, die mit der Makroarray-Analyse untersucht werden sollten, wurde der Schwerpunkt auf Signalmoleküle gelegt, besonders Proteinkinasen und -phosphatasen. So kann, im Vergleich zu anderen Array-Systemen, die oft weit mehr Gene enthalten, die Analyse spezifisch auf die Gene des größten Interesses beschränkt werden. Ausgehend von den Daten des "Human Genome Project" wird die Anzahl der Proteinkinasen im menschlichen Genom auf ungefähr 550, die der Proteinphosphatasen, die die Aktivität der Proteinkinasen regulieren, auf 130 geschätzt (Lander et al., 2001). Auf den Arrays sind Sonden von 98 Tyrosinkinasen, 429 Serin/Threoninkinasen und 157 Proteinphosphatasen, so dass alle bisher identifizierten Kinasen und Phosphatasen untersucht werden. Die Makroarrays bestehen aus Nylonmembranen, auf die Sonden von etwa 1200 Genen aufgebracht sind. Die Sonden enthalten pBluescript Plasmide, in die Sequenzen der entsprechenden Gene mit einer Länge von 200 bp bis 4000 bp ligiert wurden. Das Plasmid ohne Gensequenzen dient als Negativkontrolle. Jede Gensonde ist als Triplikat aufgetragen und für viele Gene befinden sich zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlichen Sequenzen desselben Gens auf der Membran. Durch diese Mehrfachbestimmung der Expression jedes einzelnen Gens kann die Zuverlässigkeit der Daten gesteigert und der technische Fehler vermindert werden. Des weiteren enthalten die Arrays sog. „house-keeping“-Gene, die zur Normalisierung verwendet

werden können. Die Plasmid-DNA der Sonden wurde 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Anschließend mit 2mM NaOH versetzt und 10 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 mM NH₄OAc (pH 5,3) wurde der Ansatz neutralisiert und mit 6x SSC-Bromphenolblau versetzt. Das Aufbringen der Sonden auf die Nylonmembranen erfolgte mit einem GeneTAC™G3-Roboter (Genomic Solutions, USA). Durch Erhitzen der Membranen im Vakuum (80 °C für 2 h) wurden die Sonden fixiert.

2.8.9.2. Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten mit [α -³³P]-dATP

Die cDNA's wurden mit ³³P markiert. Dieses Radioisotop hat den Vorteil, dass es mit einer geringeren Energie strahlt und so die Hybridisierungssignale auf den Filtern deutlicher werden.

Zur radioaktiven Markierung von DNA- bzw. cDNA-Fragmenten wurde der „Random Primed Labeling Kit“ von Boehringer verwendet, der auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (Feinberg and Vogelstein, 1983) beruht. 50 ng DNA bzw. ca. 300 ng cDNA wurden zusammen mit 2,5 µl Hexanukleotiden in einem Volumen von 10 µl für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis gebracht. Zum Reaktionsansatz wurden je 8,5 µl Reaktionsmix (Puffer:dTTP:dCTP:dGTP = 5:4:4:4), 50 µCi [α -³³P]-dATP und 1,5 E Klenow-DNA-Polymerase zugegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ von Qiagen gereinigt und die radioaktiv markierte DNA in einem Volumen von 150 µl eluiert.

2.8.9.3. Hybridisierung radioaktiv markierter Proben

Jede Membran wurde zuerst in Puffer W1 inkubiert. Danach wurde sie mit 15 ml Prähybridisierungspuffer (50% Formamid, 5x SSC, 5x Denhardt, 0,1% SDS) und 100 µg/ml tRNA in einer Hybridisierungsröhre verschlossen. Die Prähybridisierung erfolgte unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (MWG-Biotech, Ebersberg) bei 68 °C üN. Der Ansatz der ³³P-markiertencDNA wurde vor der Hybridisierung mit 5 µl Cot-DNA (1 mg / ml), 4 µl 10 % SDS und 40 µl 20 x SSC für 10 min bei 95 °C und

anschließend für 30 min bei 68 °C inkubiert. Danach wurde der Mix ohne Temperaturverlust zu 10 ml Hybridisierungspuffer gegeben, der zuvor auf 70 °C vorgewärmt und mit 100 µg/ml tRNA (Roche) versetzt wurde. Für den Beginn der Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer auf den cDNA-Arrays ohne Temperaturverlust gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C und Rotation der Hybridisierungsröhren für mindestens 16 h.

2.8.9.4. Waschen der Arrays

Nach Entfernen des Hybridisierungspuffers wurden die Arrays in folgenden Schritten gewaschen:

Schritt	Puffer	Zeit	Temperatur
1	W1	20 min	42 °C
2	W1	20 min	42 °C
3	W2	20 min	42 °C
4	W2	60 min	65 °C

Danach wurden die Arrays mit H₂O_{bidest.} abgespült, getrocknet und auf Phosphoimagerplatten (Fuji, Japan) zwischen 48 h und 72 h exponiert.

2.8.9.5. Auswertung der cDNA-Arrays und Datenanalyse

Die exponierten Phosphoimagerplatten wurden mittels eines Phosphoimagers (Fuji BAS 2500, Fuji, Japan) und der zugehörigen Software „BASreader“ (Raytest, Kanada) eingelesen. Mit dem Programm Image Gauge 3.3. wurden die Bilddateien für die weitere Verarbeitung vorbereitet. Die Umsetzung der Bilddateien in verrechenbare Werte erfolgte mit dem Programm „ArrayVision“ (Imaging Research, USA). Jede Sonde wurde drei Mal auf die Arrays aufgetragen und für einige Gene befanden sich zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlichen Genabschnitten auf den Filtern. Dadurch wird eine Mehrfachbestimmung für die Expression eines Gens möglich und der p-Wert kann errechnet werden. Dies steigert die Zuverlässigkeit der

Daten. Die Daten wurden mit verschiedenen Programmen und Methoden ausgewertet.

Ein in Zusammenarbeit mit Dr. Abraham entwickeltes Programm analysiert die Daten mit einem Excel-Makro.

In einem ersten Schritt wurde von allen Werten der Durchschnitt der Hybridisierungssignale von pBluescript auf dem jeweiligen Filter abgezogen. Ergaben sich dabei Werte kleiner als Null, so wurde der Wert Null gesetzt. Die Normalisierung, mittels der „total intensity“ Methode oder anhand von housekeeping Genen, deren Expression konstant sein sollte. Zur besseren Handhabung der Werte wurden alle Werte anschließend mit 10000 multipliziert. Anschließend wurden für alle Sonden der Referenzzelllinie (Ausgangszelllinie) und der Klone, der Durchschnitt und die Standardabweichung berechnet. Der Schwellenwert für die differentielle Expression wurde erreicht, wenn die durchschnittliche Expression eines Gens größer oder kleiner plus 2 x der Standardabweichung als die Referenz war. Die Signifikanz dieses Ergebnisses wurde auf einem 5 % Niveau getestet (StudentT-Test). Die so prozessierten Daten wurden in eine Tabelle überführt, die nach verschiedenen Kriterien sortiert werden konnte.

2.8.9.6. Gruppierung der Gene

Durch Vergleich der Expressionsdaten können die einzelnen Gene entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile eingeteilt werden. Die Expressionsprofile zweier Gene ähneln sich, wenn die Gene in denselben Klonen stärker oder schwächer exprimiert werden. Diese gemeinsame Expression könnte bedeuten, dass die entsprechenden Gene auch funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen. Wenn mehrere Gene, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen, ähnliche Expressionsprofile haben, so könnten sie z.B. in einem gemeinsamen Signalweg wirken. Auf diese Weise können also nicht nur einzelne Gene identifiziert werden, die an Chemoresistenzmechanismen beteiligt sind, sondern ganze Signalwege.

Für das Gruppieren der Gene wurden die normalisierten Expressionsdaten mit dem Computerprogramm „Cluster“ analysiert. Es wurden nur Gene verwendet, die in wenigstens 80 % der cDNA-Arrays einen Wert von 1,0 oder größer aufwiesen. Dadurch wurden die Gene ausgeschlossen, deren Werte zu dicht am unspezifischen Hintergrund der Filter lagen. Dafür wurde die Filterfunktion des Programms verwendet. Anschließend wurden die Daten im Programm logarithmiert und nochmals normalisiert. Das Gruppieren der Gene erfolgte durch einen hierarchischen Gruppierungsalgorithmus. Es wurde der „Average Linkage“ Modus mit der zentrierten Korrelation benutzt. Bei dieser Art des Gruppierens werden zuerst kleinere Gengruppen gefunden und die Ähnlichkeit der Gengruppen untereinander bestimmt, indem ein durchschnittliches Expressionsprofil aus den Genen in einer Gengruppe gebildet wird und dieses dann mit dem durchschnittlichen Expressionsprofil der anderen Gengruppen verglichen wird. Die Ergebnisse des Gruppierens wurden in einer Ergebnisdatendatei abgelegt und mit dem Programm „TreeView“ angesehen. Wie gut die Expressionsprofile der Gene und Gengruppen miteinander korrelieren, wurde durch den Korrelationsfaktor ausgedrückt, der von 1.0 für identische Profile bis -1.0 für genau entgegengesetzte Profile reichte. Für weitere Untersuchungen wurden nur Gengruppen verwendet, die einen Korrelationsfaktor von 0.7 oder größer besaßen.

2.9. Methoden zur Arbeit mit eukaryotischen Zellen

2.9.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektionen mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in sog. Einfriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO in Cryo-Röhrchen (Nunc, Wiesbaden). Die

Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels eines Coulter Counter (Coulter Electronics, Krefeld).

2.9.2. Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontaminationen von Zellkulturen beeinflussen die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führen hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit 20% Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen untersucht.

2.9.3. Transfektion von Zellen

2.9.3.1. Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen and Okayama, 1987). Dazu wird die DNA mit CaCl_2 und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) präzipitiert und nach einem noch unbekanntem Mechanismus von der Zelle aufgenommen (Graham, 1973). Die DNA liegt als Trans-Genom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens bei Zellteilung verloren (Scangos, 1981). Daraus resultiert in der so genannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion auf eine 10 cm Zellkulturschale in 8 ml Medium ausgesät. Pro Transfektion wurden 6 µg DNA in 260 µl H_2O verdünnt und mit 40 µl einer 2,5 M CaCl_2 -Lösung gemischt. Unter Schütteln wurden 400 µl 2x BBS zugetropft. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese über Nacht bei 37°C und 3% CO_2 inkubiert. Am nächsten

Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und gegebenenfalls mit serumfreiem Medium bis zur weiteren Verwendung gehungert.

2.9.3.2. Transfektion mit anderen Methoden

Zellen, bei denen eine Kalziumphosphat-Transfektion ineffizient war, wurden mit kommerziellen Transfektionsreagenzien behandelt. Die Transfektion mittels Lipofectamin™ (Invitrogen), Lipofectamin 2000™ (Invitrogen) bzw. PolyFect® (Qiagen) erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.9.4. Retroviraler Gentransfer in Säugerzellen

Zur Infektion mit pRETRO-SUPER bzw. pLXSN Konstrukten wurde die Verpackungszelllinie Phoenix A (ΦNX-Ampho) mittels Kalziumphosphatmethode (s. 2.9.3.1) mit pRETRO-SUPER bzw. pLXSN Konstrukten transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit minimalem Volumen an Nährmedium versetzt. Nach weiteren 24 h wurde der virale Überstand gesammelt und durch einen 45 µm Filter sterilfiltriert. Der Überstand wurde dann mit 8 µg/µl Polybren versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gebracht. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde dieser Vorgang wiederholt. Nach erfolgter 4. Infektion wurde der letzte Überstand über Nacht auf den Zellen belassen. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und 8-12 h später 2 µg/ml Puromycin zur Selektion der infizierten Zellen zugegeben.

2.9.5. Selektion chemoresistenter Klone

Für die Selektion chemoresistenter Klone wurden Zellen der Ausgangszelllinien auf 15 cm Kulturschalen ausgesät und bei einer Zelldichte von ca 80 % wurde Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Nach 48 h wurde das DXR-enhaltende Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach und nach starben fast alle Zellen ab. Nach 3-5 Wochen konnten einzelne Klone gepickt und getrennt weiterkultiviert werden.

2.10. Proteinanalytische Methoden

2.10.1. Triton X-100 Lyse von Zellen

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% Glyzerin, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) versetzt, zu dem zusätzlich frisch 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, 100 mM Natriumfluorid und 2 mM NaOrthovanadat (pH 10) gegeben wurde. Nach 5-10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Zelllysate gesammelt und unlösliche Zellbestandteile mittels Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde dann zur Immunopräzipitation verwendet oder als Totallysate analysiert.

2.10.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce, Sankt Augustin, nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.10.3. Immunopräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines spezifischen Proteins aus dem Zelllysaten wurden Immunopräzipitationen durchgeführt, bei denen das Protein mittels spezifischer Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt wird und so von Zelllysate abgetrennt werden kann (Chenais et al., 1977). Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen zu binden vermag.

Zur Immunopräzipitation wurden 25 µl Protein A-Sepharose und eine angemessene Menge des spezifischen Antikörpers zu dem mit dem gleichem Volumen HNTG-Puffer versetzten Zelllysate gegeben und für 2-3 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden bei 6500 rpm (Tischzentrifuge) abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit HNTG-Puffer wurden die Proben in 15 µl 3xLämmli-Puffer aufgenommen. Vor dem

Auftragen auf ein SDS-PAGE Gel wurden die Proben für 3 min bei 100 °C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen und die Proteine zu denaturieren.

2.10.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Laufgeschwindigkeit im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15 %-ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen. Auf die Trenngele wurde im Anschluss ein 4%-iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde wie von Sambrook et al. (1990) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert.

2.10.5. Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer „Semidry“-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2% TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt und blockiert.

2.10.6. Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der spezifischen Erkennung des immobilisierten

Proteins durch den spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt wird dieser primäre Antikörper durch einen sekundären Antikörper erkannt, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Aufgrund dieser enzymatischen Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit der Firma NEN. Sollte die Membran ein zweites Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in Strip-Lösung bei 50 °C für 1 h entfernt werden.

2.10.7. PARP-Spaltung

Die Analyse der Parp-Spaltung wurde nach Angaben des Herstellers Roche des anti-PARP Antikörpers durchgeführt.

2.11. Zellbiochemische und zellbiologische Untersuchungen

2.11.1. Propidiumjodidfärbung zur Bestimmung von apoptotischen Zellen

Als schnelles Verfahren zur Bestimmung von Zelltod ist die Färbung mit Propidiumjodid anzusehen. Ein wichtiges Merkmal apoptotischer Zellen ist das Auftreten von DNA-Fragmentierung, wodurch der DNA-Gehalt im Vergleich zu nicht-apoptotischen Zellen abnimmt. Apoptotische Zellen besitzen deshalb einen DNA-Gehalt, der geringer ist als der von Zellen in der G0/G1-Phase. Nach Fixierung von Zellen und vollständiger Anfärbung der DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Propidiumjodid, einer sequenzunspezifisch DNA-interkalierenden Substanz, ist die Fluoreszenz dieser Zellen abhängig von deren DNA-Gehalt. Bei einer Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 529 nm emittiert Propidiumjodid rotes Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm. Apoptotische Zellen zeigen im Durchflusszytometer deshalb weniger Fluoreszenz als Zellen in G0/G1, es erscheint ein so genannter Sub-G0/G1-Wert. Zum Nachweis von apoptotischen Zellen wurden je $2,5 \times 10^4$ Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät und mit 200 μM H_2O_2 , 1 μM Doxorubicin bzw.

ohne Serum für 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte gelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit hypotonischem Färbereagenz (0,1% (w/v) NaCitrat; 0,1% (v/v) Triton-X-100; 50 µg/ml Propidiumjodid) versetzt und für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Analyse des DNA Gehalts erfolgte mittels Durchflusszytometer (FACScalibur) der Firma Becton Dickinson.

2.11.2. Kolorimetrische Bestimmung lebender Zellen mittels WST-1 Reagenz

Mittels WST-1 Reagenz der Firma Roche können sowohl Zellproliferation als auch Zellvitalität kolorimetrisch bestimmt werden. Der Assay basiert auf der Spaltung des Tetrazoliums Salzes WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen von lebenden Zellen. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.11.3. DAPI-Färbung

Zellen wurden mit 1 µg / ml DAPI versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mikroskopiert.

2.11.4. TUNEL-Test

Der TUNEL-Test wurde nach Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt.

2.11.5. Nachweis der Caspasenaktivität und FITC-VAD Färbung

Die Nachweise wurde nach Angaben des Herstellers (Promega) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen in Krebszellen

3.1.1. Strategie

Tumorzellen im menschlichen Körper unterliegen den Gesetzen der Evolution. Der Selektionsdruck generiert entartete Zellen, die gut an die Verhältnisse im Körper angepasst sind. Eine der Charakteristika dieser entarteten Zellen ist ihre im Vergleich zu den meisten normalen somatischen Zellen hohe Proliferationsrate. Dieser Effekt wird durch die Chemotherapie ausgenutzt, in dem man alle schnell proliferierenden Zellen schädigt und somit in die Apoptose treibt. Dadurch entsteht jedoch ein neuer Selektionsdruck, dem einige Tumorzellen durch verschiedene Resistenzmechanismen ausweichen können. Diese Rezidive zeichnen sich durch aggressiveres Wachstum und erhöhte Resistenz gegenüber der Chemotherapie aus. Durch die Simulation einer Chemotherapie in der Zellkultur wurden diese Resistenzmechanismen *in vitro* untersucht.

Der Ansatz zur Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen basiert auf der Untersuchung der Genexpression apoptoseresistenter und apoptosesensitiver Zellen, da durch die unterschiedliche Expression bestimmter Gene Apoptoseresistenz hervorgerufen werden kann. Ziel der Untersuchung war es, Gene zu identifizieren, die hierbei eine Rolle spielen.

Eine Methode zur Untersuchung der Expression von Genen ist das Erstellen eines Genexpressionprofils mittels Mikro- bzw. Makroarrays. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Veränderung der Genexpression von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu untersuchen. In den Brustkrebszelllinien MDA-MB453, MDA-MB468, MDA-MB231 und BT474 sollte die Tumorzellevolution nach Chemotherapie *in vitro* simuliert werden.

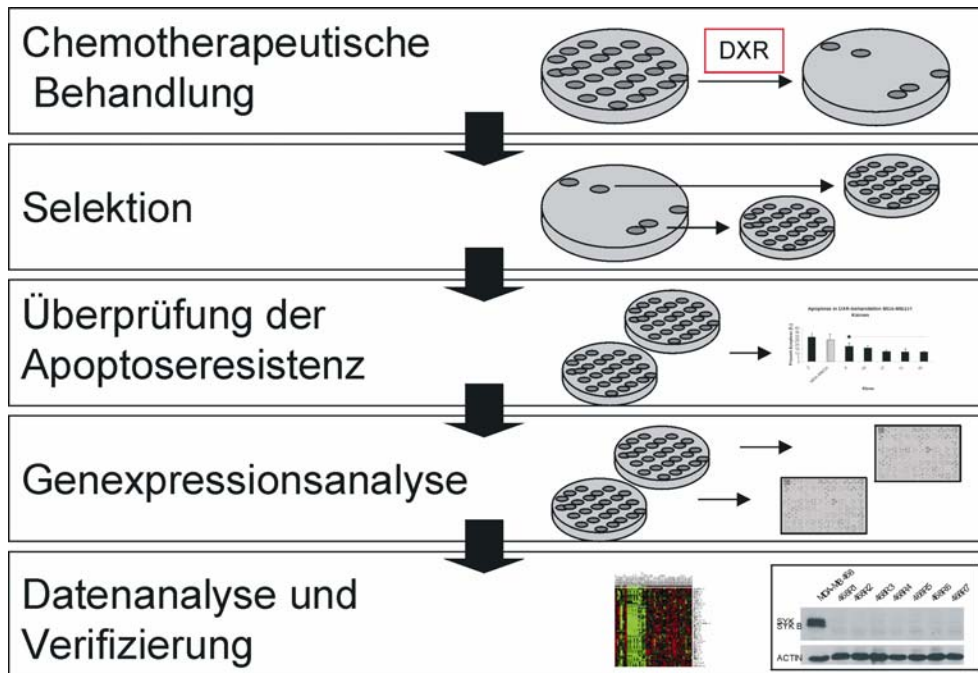


Abb. 10: Strategie zur Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen in Krebszellen.

In einem ersten Schritt sollten Mammakarzinom-Zelllinien identifiziert werden, die durch Behandlung mit Doxorubicin Apoptose auslösen können. Durch Zugabe geeigneter Konzentrationen an Doxorubicin zu diesen Zelllinien kann die Überlebensrate der meisten Zellen gering gehalten werden. Überlebende Klone können durch langsame Erhöhung der Konzentration dieser zytotoxischen Stoffe auf Apoptoseresistenz hin selektiert werden. Anschließend kann die Genexpression dieser apoptoseresistenten Klone durch eine Makroarray-Analyse untersucht werden. Durch den Vergleich ihres Expressionsprofils mit dem der Ausgangszelllinie (apoptosesensitiv) können Gene mit erhöhter bzw. reduzierter Expression identifiziert werden (Abb. 10).

3.1.2. Induktion der Apoptose in verschiedenen Brustkrebszelllinien durch Doxorubicin

Apoptose wurde durch das in der Klinik weit verbreitete Chemotherapeutikum Doxorubicin (Adriamycin™) ausgelöst. Doxorubicin (DXR) gehört zur Gruppe der Anthrazykline, die auf einer Quinonstruktur basieren (siehe Einleitung Abb. 5).

Da der zytotoxische Effekt bei DXR-Zugabe auf verschiedenen Wirkungsmechanismen beruht, war es wichtig, die Zytotoxizität in den folgenden Versuchen auf Apoptose, den programmierten Zelltod, und nicht etwa auf Nekrose zurückzuführen.

Hierfür wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB468 mit DXR behandelt und die Existenz verschiedener Apoptosemarker überprüft.

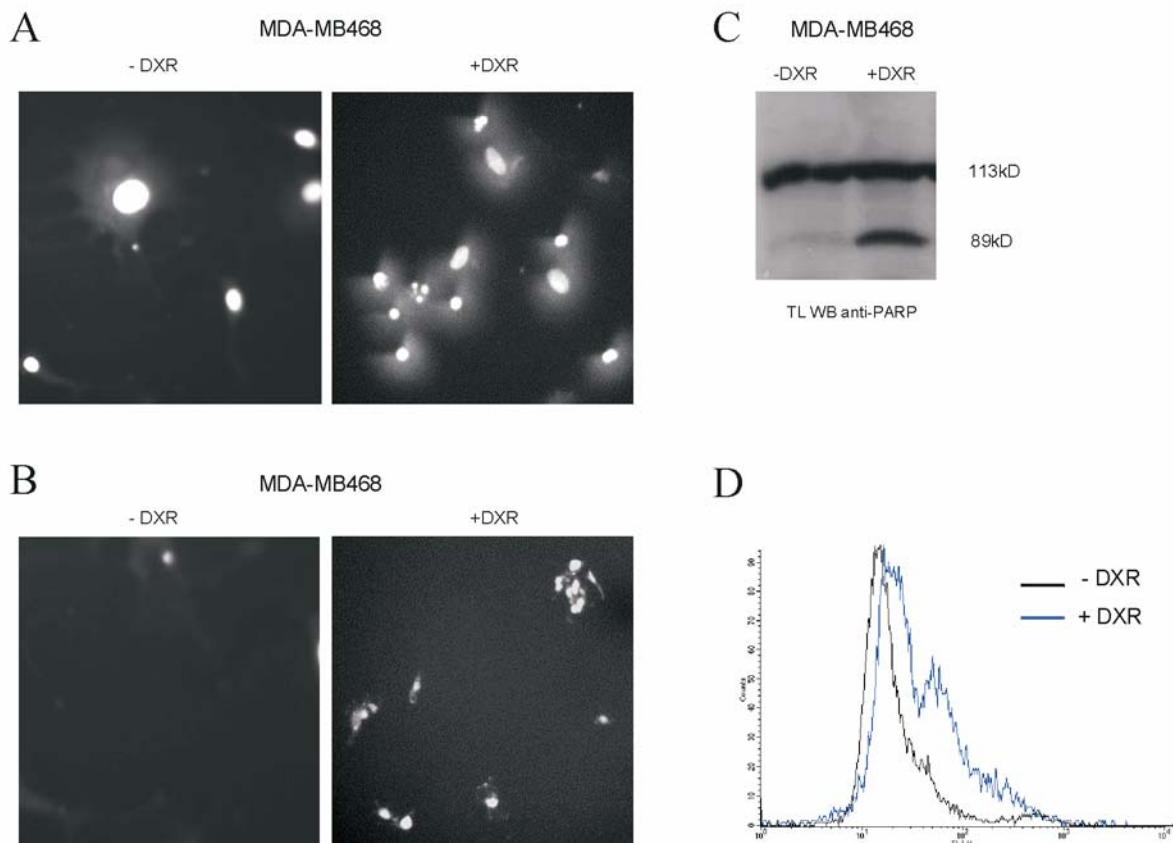


Abb. 11: Untersuchung verschiedener Apoptosemarker in der Brustkrebszelllinie MDA-MB468. (A) DAPI-Färbung, (B) TUNEL-Färbung und (C) Immunoblot mit anti-PARP-Antikörper (D) FACS-Analyse der mit FITC-VAD gefärbten Zellen nach Behandlung der Zellen mit 1 μ M DXR für 48 h.

Die mit Doxorubicin behandelte Mammakarzinomzelllinie MDA-MB468 zeigt fragmentierte Nuklei (Abb. 11A) und eine positive TUNEL-Färbung (Abb. 11B), was auf die Fragmentierung der DNA, einen Marker der Apoptose, hindeutet. Des Weiteren wird die Polyadenosinribose-Polymerase (PARP) proteolytisch gespalten (Abb. 11C). Diese Spaltung wird durch Caspasen hervorgerufen. Ein mit FITC versehenes Tripeptid aus Valin, Alanin und Aspartat (FITC-VAD) kann aktivierte Caspasen binden und verleiht den apoptotischen Zellen eine grünliche Fluoreszenz (Abb. 11D). Die Apoptose kann außerdem durch Inhibition der Caspase 3 mit dem Tripeptid VAD blockiert werden. Präinkubiert man die Zellen mit dem Inhibitor, ist es nicht mehr möglich, Apoptose durch Doxorubicin auszulösen (Abb. 12).

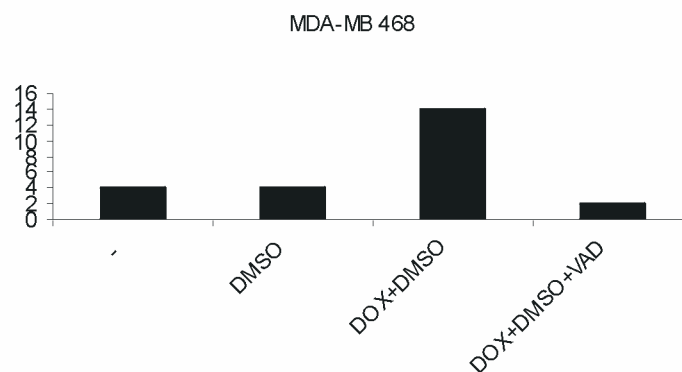


Abb. 12: Blockade der Apoptose durch Inhibition der Caspasen mit VAD-FMK.

Aufgrund der positiven Ergebnisse der qualitativen Apoptose Assays kann davon ausgegangen werden, dass Apoptose durch Doxorubicin in mikromolaren Konzentrationen in der Brustkrebszelllinie MDA-MB468 und anderen Brustkrebszelllinien (Daten nicht gezeigt) ausgelöst werden kann.

3.1.3. Sensitivität verschiedener Brustkrebszelllinien für das Chemotherapeutikum Doxorubicin

Um die Effizienz, mit der DXR Apoptose in verschiedenen Zelllinien auslöst, zu untersuchen, wurde ein quantitativer Apoptose Assay durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde die DNA-Fragmentierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

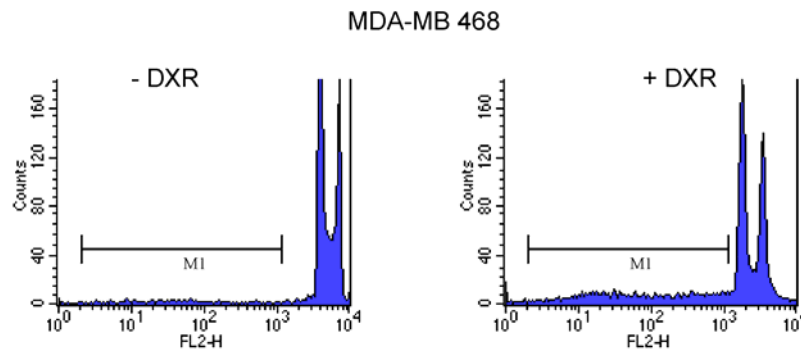


Abb. 13: Propidium-Jodid-Färbung der DNA, subG_{0/1} Peak wird durch M1 begrenzt.

Der prozentuale Anteil des SubG_{0/1}-Peaks (s. Abb. 13, hier M1) entspricht den apoptotischen Zellen an der Gesamtpopulation, da Kernfragmentation ein später Marker der Apoptose ist. Subtrahiert man den Wert der basalen Apoptose (SubG_{0/1}-Peak unbehandelt) vom Wert der DXR-behandelten Zellen, erhält man den prozentualen Anteil der durch Doxorubicin induzierten Apoptose. Dieser Versuch ergab eine basale Apoptoserate von 3% im Vergleich zu 15% in Zellen mit Doxorubicin-Behandlung.

Nachfolgend wurde die Apoptoserate in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien untersucht.

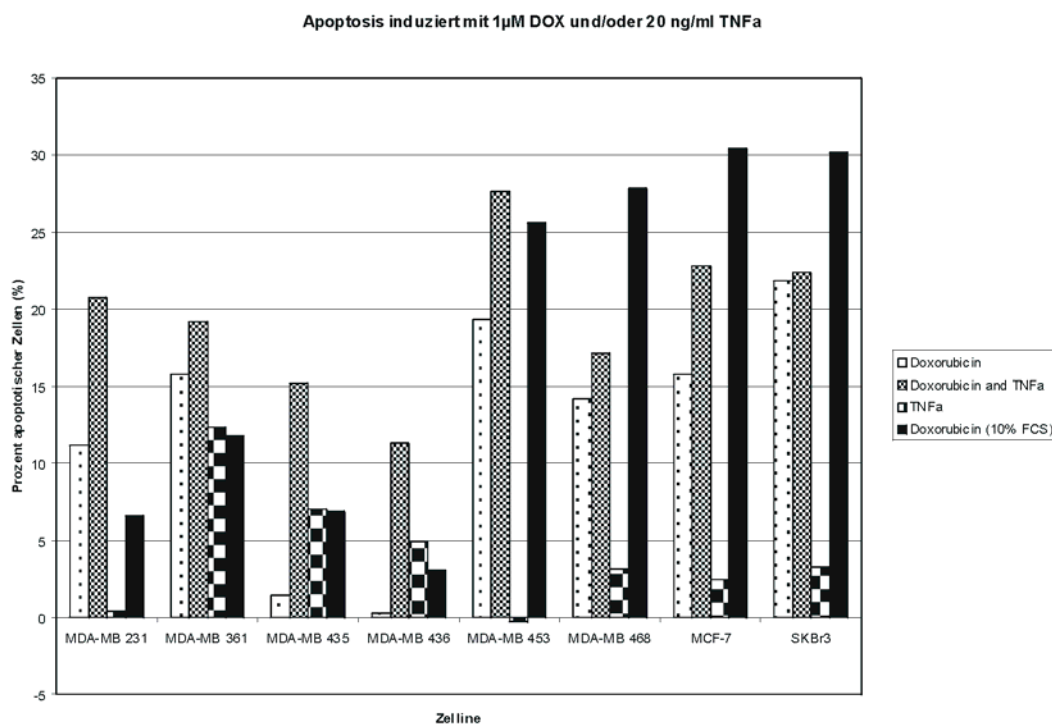


Abb. 14: Quantitative Auswertung der Apoptoserate, ermittelt über PJ-Färbung bei verschiedenen Brustkrebszelllinien, induziert mit DXR (1 µM für 48 h) und/oder TNFα (20 ng / ml, 48 h).

Auffällig ist, dass die Apoptoserate bei den verschiedenen Zelllinien stark variiert. Es konnte jedoch die Vermutung bestätigt werden, dass invasivere Zelllinien wie MDA-MB231, MDA-MB435s oder MDA-MB436 resistenter sind als weniger invasive Zellen. Der Ligand des TNF-Rezeptors, TNF α , wurde als Kontrolle für einen zelleigenen Apoptosefaktor verwendet. Man kann erkennen, dass TNF α deutlich weniger potent Apoptose induziert als Doxorubicin. Es konnte jedoch ein additiver Effekt der Kombination beider Substanzen beobachtet werden (Abb. 14). Als Beispiele für eine Zelllinie mit hoher und niedriger Doxorubicinsensitivität wurden MDA-MB468 und MDA-MB231 für die Gewinnung apoptoseresistenter Klone ausgewählt. Außerdem wurden die Zelllinien BT474 und MDA-MB453 für diesen Ansatz verwendet, da beide eine hohe Her2/Her3-Expression aufweisen.

3.1.4. Untersuchung der Apoptosesensitivität in DXR-behandelten Klonen

Die Brustkrebszelllinien wurden auf Apoptoseresistenz selektiert, indem sie mit DXR verschiedener Konzentrationen inkubiert wurden (vgl. Material und Methoden). Wenige Zellen überlebten diese Behandlung und wurden zu klonalen Zelllinien herangezogen. Klone, die die DXR-Behandlung überlebt haben, unterschieden sich morphologisch kaum von den Ausgangszelllinien MDA-MB453, MDA-MB468, MDA-MB231 und BT474 (Daten nicht gezeigt). Folglich wurde untersucht, ob die Selektion mit DXR apoptoseresistentere Klone hervorgebracht hat. Dazu wurde die Apoptoserate im Vergleich zur Ausgangszelllinie MDA-MB453, MDA-MB468 bzw. MDA-MB231 bestimmt. Zur Quantifizierung wurde die DNA-Fragmentierung mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht.

Diese Bestimmung wurde mit allen Klonen mindestens 4-mal durchgeführt.

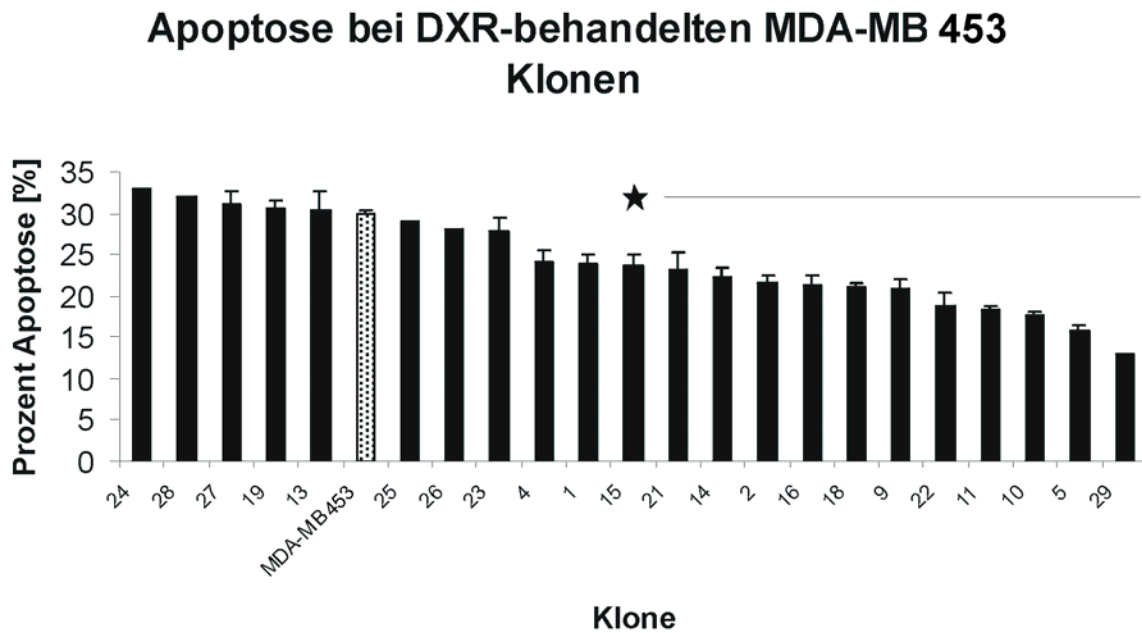


Abb. 15: Apoptoserate der mit DXR selektierten Klone sowie der Ausgangszelllinie MDA-MB468. Die Zellen wurden für 48 h mit 2 μ M DXR behandelt und anschließend mit PJ-Assay untersucht.

★ $p < 0,05$

Von den 22 getesteten Klonen der Zelllinie MDA-MB468 zeigten 17 reduzierte Sensitivitäten für das Chemotherapeutikum Doxorubicin, wogegen 5 Klone sensitiver wurden.

Benutzt man den Student-T-Test und testet die Signifikanz der Ergebnisse auf einem 5%-igem Signifikanzniveau, kommt man zu folgendem Schluss: 12 Klone sind resistenter, während 11 die Apoptosesensitivität der Ausgangszelllinie beibehalten haben.

Keiner der Klone wurde signifikant sensitiver für Doxorubicin als die Ausgangszelllinie.

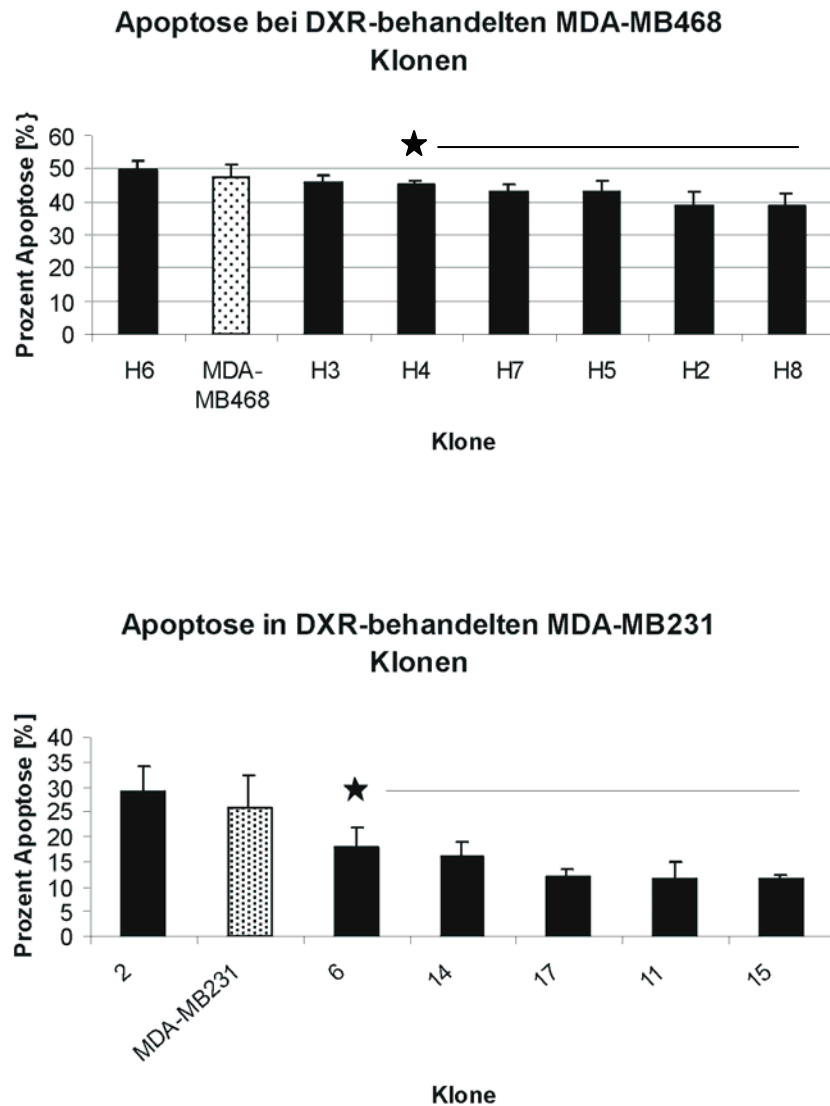


Abb. 16.: Apoptoserate der mit DXR selektierten Klone sowie der Ausgangszelllinie MDA-MB468 und MDA-MB231. Die Zellen wurden für 48 h mit 2 μ M DXR behandelt und anschließend mit PJ-Assay untersucht. ★ $p < 0,05$

Bei den Brustkrebszelllinien MDA-MB468 und MDA-MB231 zeigte sich ein ähnliches Bild: 5 von 7 (MDA-MB468) bzw. 5 von 6 (MDA-MB231) Klonen wurden signifikant resistenter als die Ausgangszelllinie. Von allen resistenten Klonen wurde anschließend eine Genexpressionsanalyse durchgeführt.

3.1.5. Abschätzung des Fehlers

Um die Genexpression resistenter und sensitiver Klone zu bestimmen, wurde aus den Zellen total RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch Inkorporation von $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP wurde die cDNA markiert und mit den Arrays hybridisiert. Die Arrays beinhalten ca. 1100 Gene, die jeweils in den Vector pBluescript ligiert wurden.

Um die Qualität und den Hintergrund der Genexpressionsexperimente zu ermitteln wurden einige Vorexperimente durchgeführt.

Hybridisiert man die gleiche cDNA auf zwei verschiedene Filter und vergleicht die durchschnittlichen Genexpressionen der einzelnen Gene, so erhält man den systematischen Fehler der Filter.

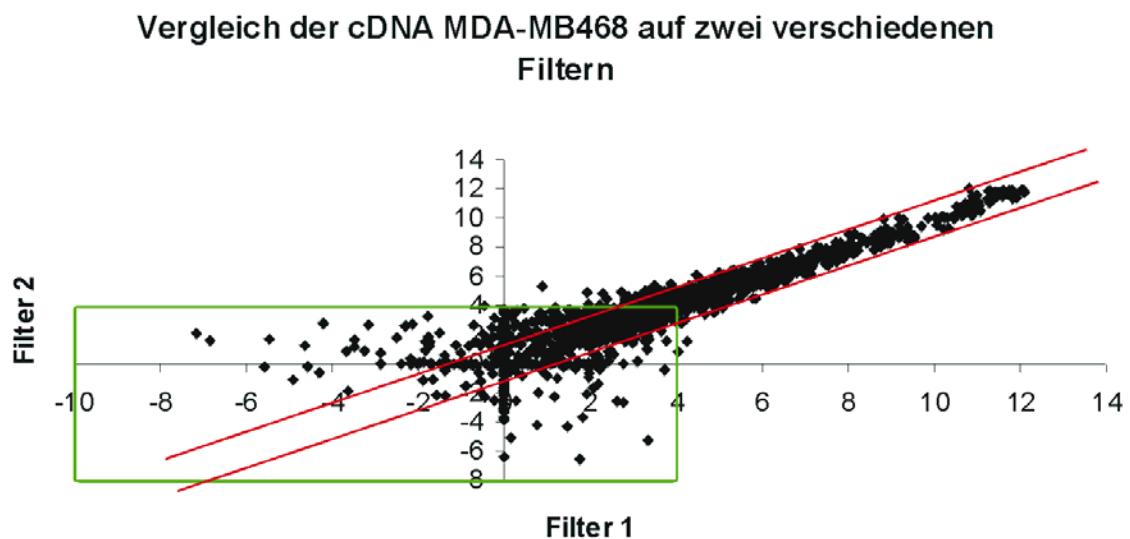


Abb. 17: Scatterplot der Genexpressionen der gleichen cDNA auf zwei verschiedenen Filtern (Filter1, Filter2). Differentielle Expression um $\ln_2(1)$ entspricht den roten Linien. Rauschen bzw. Hintergrund grüner Kasten.

Einen Scatterplot erhält man, wenn man die Expression eines Gens auf dem ersten und dem zweiten Filter als Koordinaten aufträgt. Je mehr ein Punkt von der Winkelhalbierenden abweicht, desto höher ist der Expressionsunterschied. Im Idealfall sollten sich hierbei keinerlei Abweichungen ergeben und alle Gene auf der Winkelhalbierenden verteilt sein.

Der Filterfehler beträgt in unserem System ca. $\ln_2(1)$ also 2-fach, d.h. ist ein Gen weniger als 2-fach reguliert, ist die Wahrscheinlichkeit eines falsch-positiven Ergebnisses groß (rote Linien). Des Weiteren sind alle Gene mit einer geringeren Expression als 18 (arbitrary units) nahe am Hintergrundrauschen und sollten unberücksichtigt bleiben (grüne Box).

Um die biologische Varianz zu bestimmen wurde cDNA der Zelllinie MDA-MB468 aus einer Präparation von Passagennummer 67 mit einer von 99 verglichen. Diese Zellen hatten verschiedene Wachstumsbedingungen und die cDNA wurde im Abstand von 3 Jahren synthetisiert.

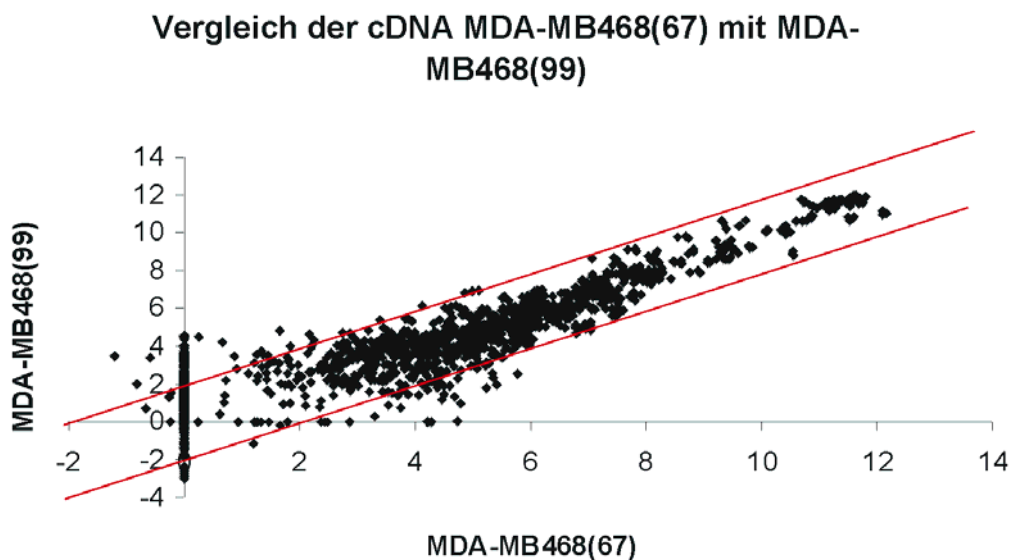


Abb. 18: Scatterplot der Genexpressionen zweier unterschiedlicher cDNA-Präparationen (99, 67). Differentielle Expression um $\ln_2(2)$ entspricht den roten Linien.

Betrachtet man die biologische Varianz, so kommt man zu dem Schluss, dass sie bei bis zu $\ln_2(2)$ liegen kann. Die Abschätzung der Fehler ist hier bewusst sehr konservativ, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Durch Berücksichtigung von Werten, die näher am Rauschen liegen, könnten deutlich mehr regulierte Gene identifiziert werden. Jedoch soll in diesem Fall der Qualität der Zielgene Priorität eingeräumt werden.

3.1.6. Vergleich der Genexpression der DXR-behandelten Klone mit der Ausgangszelllinie

Es wurden die Genexpressionsprofile von vier verschiedenen Brustkrebszelllinien und deren resistenter Klone bestimmt:

- MDA-MB453 (10 Kontrollen/Ausgangszelllinie und 48 Experimente/Klone)
- MDA-MB468 (9 Kontrollen/Ausgangszelllinie und 14 Experimente/Klone)
- BT474 (4 Kontrollen/Ausgangszelllinie und 8 Experimente/Klone)
- MDA-MB231 (4 Kontrollen/Ausgangszelllinie und 6 Experimente/Klone)

Für die Erstellung der Genexpressionsprofile der resistenten Klone und der Ausgangszelllinie wurde die cDNA auf den Filtern hybridisiert. Dabei wurden mindestens zwei unabhängige cDNA-Präparationen pro Klon untersucht. Um eine stabile Basisexpression der Ausgangszelllinie aller Gene zu erhalten, wurden davon mindestens vier unabhängige cDNAs analysiert. Zusätzlich wurden vier monoklonale Zelllinien der Ausgangszellen MDA-MB468, die nicht mit DXR behandelt wurden, etabliert und analysiert, um klonale Effekte, die unabhängig von der Apoptoseresistenz sind, auszuschließen. Zusammen ergibt dies bei der Zelllinie MDA-MB468 zehn Kontrollexperimente mit Triplikaten eines jeden Gens, also 30 Datenpunkte pro Gen der Ausgangszelllinie. Dies sollte eine stabile Unterscheidung von Rauschen und tatsächlich differentiell regulierten Genen erlauben. Die Auswertung der Daten wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, mit verschiedenen Datenanalyseverfahren durchgeführt.

In der Analyse der Daten mit dem Excelmakro wurden folgende Kriterien benutzt: Die Schwelle, ab der ein Wert als differentiell reguliert angesehen wird, ist erreicht, wenn die durchschnittliche Expression plus 2 Mal der Standardabweichung den durchschnittlichen Wert der Ausgangszelllinie über- bzw. unterschreitet. Die Anzahl der Klone, in denen der Schwellenwert über- bzw. unterschritten wird, wurde in den Tabellen in Spalte 2 dargestellt.

Folgende Abbildungen zeigen die Auswertung für die Zelllinie MDA-MB453. Die weiteren Zelllinien MDA-MB468, MDA-MB231 und BT474 wurden analog ausgewertet, werden aber nicht im Detail gezeigt.

Nachfolgende Tabelle zeigt die 30 Gene mit erhöhter Genexpression in den signifikant resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453, geordnet nach der Anzahl der Klone, in denen die Expression erhöht war. Die Wahrscheinlichkeit, dass technische und biologische Fehler das Ergebnis beeinflussen, ist umso geringer, je mehr Klone ein bestimmtes Gen differentiell stärker oder schwächer exprimieren.

Genname	Anzahl der Klone mit Expression über dem Schwellenwert	Faktor der Expressionserhöhung	p-Wert	Durchschnittliches Hybridisierungssignal
Betacellulin (a)	43	24,55	1,9153E-05	4,91
AATYK (a)	43	10,29	6,6235E-06	2,06
Bmx (a)	43	7,67	3,0873E-07	1,53
HER-3 (a)	43	5,93	4,694E-07	8,91
beta-Catenin (a)	43	5,53	2,7091E-11	50,94
PTPmu (a)	43	5,40	9,9729E-07	1,08
HRGa (d)	43	5,02	4,5057E-07	1,16
Prohibitin (a)	43	4,17	1,0015E-13	3,56
Pyk2 (a)	43	3,37	4,2012E-11	1,08
MHC I (a)	43	3,36	0,01232043	19,26
Csk (cyl) (a)	43	2,64	5,859E-10	3,72
ADAM15 (d)	43	2,44	3,0224E-06	11,83
Neurolektin (a)	43	2,41	2,2523E-09	100,34
PP1-C alpha (a)	43	1,65	6,0041E-11	20,01
Caspase 8 (a)	42	5,32	8,4089E-06	1,06
Edg3 (a)	42	5,16	0,00088968	1,03
MMP1c (a)	42	3,16	8,8258E-05	2,20
Contactin 2 (a)	42	2,74	4,7242E-08	1,06
MMP2 (5a) (a)	42	2,28	0,00020833	0,67
EPHB3 (a)	42	1,77	2,5277E-08	3,62
CDK9 (a)	42	1,71	7,659E-08	2,66
GNAS2 b (a)	42	1,43	3,8041E-11	126,92
MMP9 (d)	41	4,76	0,00134946	0,95
MMP13 (d)	41	4,48	0,00211516	0,90
MMP9 (a)	41	3,77	0,01106018	0,75
ADAM19 (a)	41	3,17	8,461E-07	0,72
Desmocullin 2 (a)	41	2,42	2,128E-06	1,16
PLC gamma2 (a)	41	2,35	0,02782832	0,81
PSSALRE (d)	41	2,26	8,0059E-06	2,33
p130-Cas (a)	41	2,16	3,9707E-09	0,95
EPHB2 (a)	40	4,42	2,6099E-05	0,88

Tabelle 1: Liste der Gene mit erhöhter Expression in DXR-resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453 geordnet nach der Anzahl der Klone/Experimente in denen das Gen differentiell exprimiert wurde.

Ordnet man die Gene nach dem größten durchschnittlichen Expressionsunterschied in der Ausgangszelllinie und in den signifikant resistenten Klonen, erhält man folgende Tabelle:

Genname	Faktor der Expressionserhöhung	Anzahl der Klone mit Expression über dem Schwellenwert	p-Wert	Durchschnittliches Hybridisierungssignal
Betacellulin (a)	24,55	43	1,91528E-05	4,91
GPI/90K Ligand (a)	13,26	38	0,088684456	3,55
AATYK (a)	10,29	43	6,62346E-06	2,06
PB-3031 (a)	9,64	1	0,887934485	2,93
Lck (a)	9,45	32	0,009638218	1,89
Bmx (a)	7,67	43	3,08734E-07	1,53
HER-3 (a)	5,93	43	4,69397E-07	8,91
beta-Catenin (a)	5,53	43	2,70906E-11	50,94
PTPmu (a)	5,40	43	9,97294E-07	1,08
Caspase 8 (a)	5,32	42	8,40888E-06	1,06
Edg3 (a)	5,16	42	0,000889685	1,03
HRGa (d)	5,02	43	4,50571E-07	1,16
IE72 (a)	4,77	36	0,001017845	0,95
MMP9 (d)	4,76	41	0,001349465	0,95
FES (a)	4,64	4	0,707406329	1,50
MMP13 (d)	4,48	41	0,00211516	0,90
EPHB2 (a)	4,42	40	2,60991E-05	0,88
PAK6 (a)	4,19	39	0,044606067	16,22
Prohibitin (a)	4,17	43	1,00148E-13	3,56
Cadherin 12 (a)	4,17	40	0,002552449	0,83
PP4 (a)	3,94	5	0,393638865	0,79
CDK5 (a)	3,88	1	0,509130011	0,78
MMP9 (a)	3,77	41	0,011060179	0,75
No_Name_001 (a)	3,67	38	3,43783E-05	0,73
FASL (a)	3,39	9	0,27865108	4,29
Pyk2 (a)	3,37	43	4,20122E-11	1,08
MHC I (a)	3,36	43	0,012320426	19,26
RCK (a)	3,35	35	4,70797E-05	0,67
HGF (a)	3,27	30	0,073660476	0,65
ADAM19 (a)	3,17	41	8,46104E-07	0,72
MMP1c (a)	3,16	42	8,82578E-05	2,20
PB-3033 (a)	3,15	25	0,085070114	0,65

Tabelle 2: Liste der Gene mit erhöhter Expression in DXR-resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453, geordnet nach dem Faktor der Expressionserhöhung.

Der Schwellenwert, um in diese Liste aufgenommen zu werden, lag willkürlich gewählt bei mehr als 3-facher Erhöhung der Expression. Betrachtet man die Genexpression einiger stark differentiell exprimierter Gene in den einzelnen Klonen, so erkennt man, dass die Expression dort deutlich variiert. So ist der maximale Expressionsunterschied bei Betacellulin 75-fach in Klon 453R33, der minimale 3-fach in Klon 28 (siehe Abb. 19). Dieses Muster korreliert jedoch nicht mit der prozentualen Apoptoseresistenz. Ein ähnliches Muster erkennt man auch bei vielen anderen Genen mit erhöhter Expression in den resistenten Klonen.

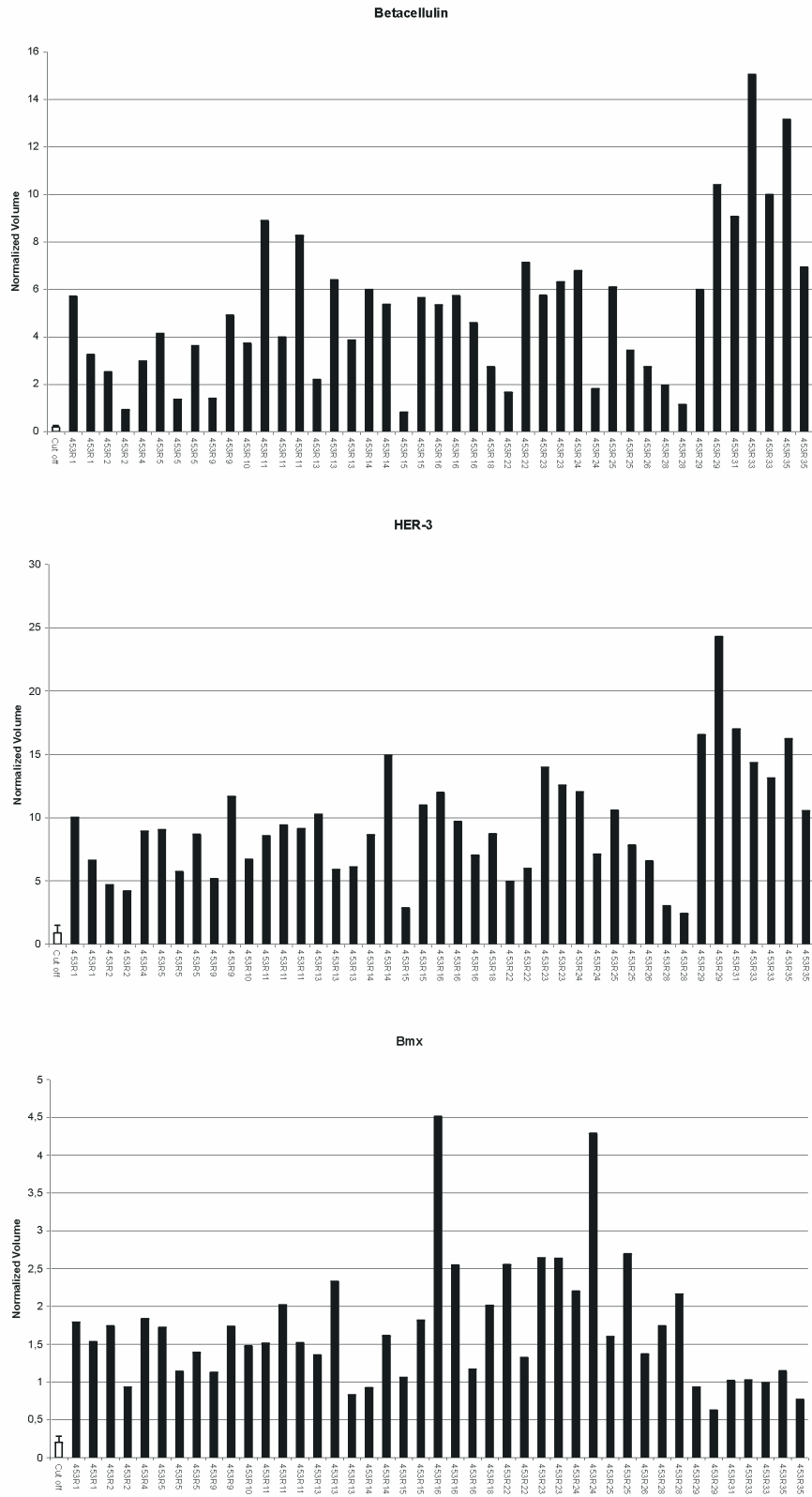


Abb. 19: Expression überexprimierter Gene in den einzelnen Klonen. Die durchschnittliche Genexpression in der Ausgangszelllinie zeigt die weiße Säule. Weiß: Ausgangszelllinie; schwarz: resistente Klone.

Die gleichen Tabellen für Gene mit verminderter Genexpression stellen sich wie folgt dar:

Genname	Anzahl der Klone mit Expression unter dem Schwellenwert	Faktor der Expressionsreduktion	p-Wert	Durchschnittliches Hybridisierungssignal
N397 (a)	43	40,95	1,9691E-31	15,65
Pac-1 (a)	43	13,68	3,2679E-25	9,58
PRK-2 (a)	43	12,05	7,2224E-22	10,40
PRP4 (a)	43	10,46	5,3623E-26	3,56
April (a)	43	9,13	5,3086E-23	21,31
p85su of PI3 Kinase	43	6,88	6,0869E-23	8,87
Gas6 (a)	43	6,80	7,2676E-30	2,56
II tRNA Synthetase	43	6,77	2,2468E-21	12,95
p85 (PI3K) (a)	43	5,88	3,7958E-23	10,82
N392 (a)	43	5,62	5,7121E-28	1,65
PB-3017 (a)	43	5,21	2,8377E-21	1,88
S6K- α 1 (a)	43	4,64	3,5232E-22	3,47
MCE1 (a)	43	4,44	2,3911E-19	1,21
MTR6 (a)	43	4,42	4,5231E-19	2,95
MYOTUBULARIN (a)	43	4,14	2,7148E-19	1,13
MTR2 (a)	43	3,99	5,8402E-17	2,95
PB-3038 (a)	43	3,99	7,2315E-20	1,26
YVH1 (a)	43	3,84	5,2408E-21	3,68
alpha Interferon (a)	43	3,75	2,8157E-39	0,99
KIAA0965 (a)	43	3,70	2,5378E-31	1,29
CLK1 (a)	43	3,38	6,0964E-22	8,78
PP1-C gamma (a)	43	3,28	1,0058E-19	11,89
PP2A-C alpha (a)	43	3,17	3,8295E-18	12,65
PIR1 (a)	43	3,03	1,5305E-22	1,47
MASK (a)	43	3,02	1,0987E-18	3,64
PPM1D (a)	43	2,99	1,6646E-16	1,08
Pri-1 (a)	43	2,95	6,5766E-21	11,98
PTP mu (a)	43	1,94	3,3383E-29	0,75
PGF (a)	43	1,71	4,9713E-21	1,35
NAK (a)	42	4,84	2,2654E-19	4,89
Q9BU58 (a)	42	4,19	6,5793E-20	8,84

Tabelle 3: Liste der Gene mit verminderter Expression in DXR-resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453, geordnet nach der Anzahl der Klone.

Genname	Faktor der Expressionsreduktion	Anzahl der Klone mit Expression unter dem Schwellenwert	p-Wert	Durchschnittliches Hybridisierungssignal
N397 (a)	40,95	43	1,969E-31	15,65
Pac-1 (a)	13,68	43	3,268E-25	9,58
PRK-2 (a)	12,05	43	7,222E-22	10,40
PRP4 (a)	10,46	43	5,362E-26	3,56
April (a)	9,13	43	5,309E-23	21,31
p85su of PI3 Kinase	6,88	43	6,087E-23	8,87
Gas6 (a)	6,80	43	7,268E-30	2,56
IIRNA_Synthetase	6,77	43	2,247E-21	12,95
p85 (PI3K) (a)	5,88	43	3,796E-23	10,82
N392 (a)	5,62	43	5,712E-28	1,65
N401 (a)	5,43	39	4,402E-11	10,57
PB-3017 (a)	5,21	43	2,838E-21	1,88
ERK3	5,10	33	6,825E-14	5,97
NAK (a)	4,84	42	2,265E-19	4,89
PB-5 (a)	4,82	40	6,794E-18	2,13
S6K- α 1 (a)	4,64	43	3,523E-22	3,47
hSLK (a)	4,59	41	3,236E-12	7,59
MCE1 (a)	4,44	43	2,391E-19	1,21
MTR6 (a)	4,42	43	4,523E-19	2,95
ADAM9 (d)	4,30	39	3,76E-14	3,44
Q9BU58 (a)	4,19	42	6,579E-20	8,84
MYOTUBULARIN	4,14	43	2,715E-19	1,13
PI3-Kinase_ α	4,11	40	1,071E-17	1,82
Topoisomerase 2	4,08	42	2,339E-17	17,58
MTR2 (a)	3,99	43	5,84E-17	2,95
PB-3038 (a)	3,99	43	7,232E-20	1,26
YVH1 (a)	3,84	43	5,241E-21	3,68
alpha Interferon (a)	3,75	43	2,816E-39	0,99
Transferrinreceptor 1	3,74	40	3,47E-19	6,95
KIAA0965 (a)	3,70	43	2,538E-31	1,29
HUMTEFSII (a)	3,55	40	5,628E-16	7,04
MAP3K7 (a)	3,49	42	1,559E-15	1,59

Tabelle 4: Liste der Gene mit verminderter Expression in DXR-resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453, geordnet nach dem Faktor der Expressionserhöhung

Der Schwellenwert lag hier ebenfalls willkürlich gewählt bei durchschnittlich 3-facher Reduktion der Expression.

Betrachtet man das Muster der Genexpression in den einzelnen Klonen, so erkennt man eine fast vollständige Inhibition der Transkription bei den am besten platzierten Genen in allen Klonen. Das Expressionsmuster in den verschiedenen Klonen ist also gleichmäßiger als bei den Genen mit stärkerer Expression.

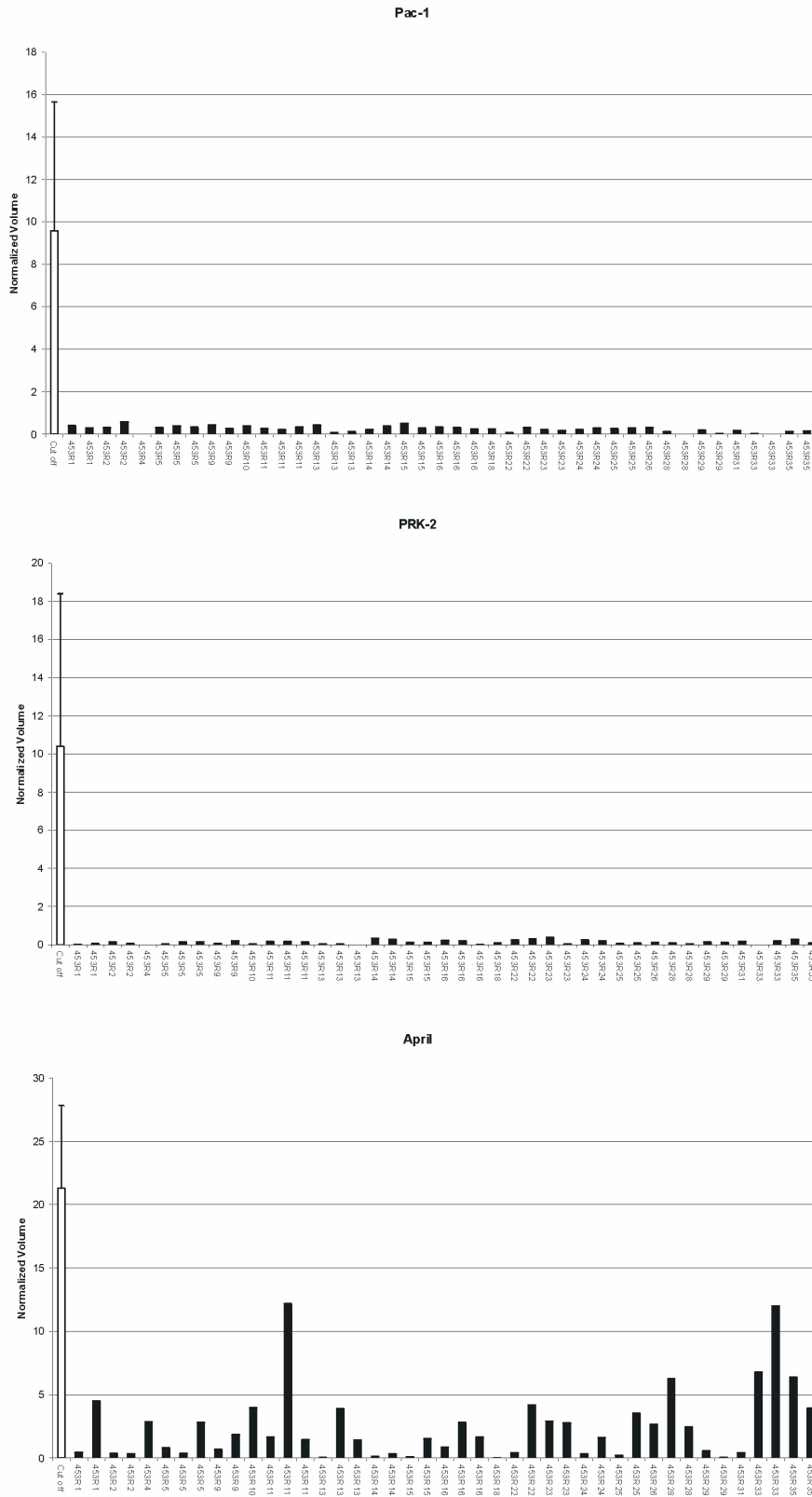


Abb. 20: Expression der Gene mit reduzierter Expression in den einzelnen Klonen. Die durchschnittliche Genexpression der Ausgangszelllinie zeigt die weiße Säule. Weiß: Ausgangszelllinie und monoklonale Zellen; schwarz: resistente Klone.

Aus diesen verschiedenen Analyseverfahren wurde eine Rangliste der besten Gene generiert. Dazu wurden alle Verfahren als gleichwertig eingestuft und der Rang eines Gens in den verschiedenen Listen addiert (Score). Trat ein Gen in einer Analyse nicht unter den ersten 50 auf, so wurde ihm der Rang 50 zugewiesen. Ausgewertet wurden die Listen der Analysen nach Anzahl der Klone (siehe Tabelle 1 und 3), der mittlere Erhöhungsfaktor (normalisiert mit „total intensity“ (siehe Tabelle 2 und 4) und über Haushaltsgene (Daten nicht gezeigt). Der beste Score wäre demnach 4 (erster Platz bei allen vier Analyseverfahren), der schlechteste 200 (nur letzte Plätze).

MDA-MB453

Gene mit erhöhter Expression

Gennamen	Score
Betacellulin (a)	4
AATYK (a)	10
Bmx (a)	18
HER-3 (a)	26
PTPmu (a)	32
beta-Catenin (a)	33
HRGα (d)	41
TIMP1 (1c) (a)	44
Caspase 8 (a)	58
Prohibitin (a)	60
Edg3 (a)	63
Pyk2 (a)	80
MHC I (a)	84
MMP13 (d)	87
MMP9 (d)	87
GPI/90K Ligand (a)	94
MMP9 (a)	107
PB-3031 (a)	108
EPHB2 (a)	110
Lck (a)	110
Tnk1 (a)	112
MMP1c (a)	114
Cadherin 12 (a)	116
WNK3 (a)	116
PAK6 (a)	121
Csk (cyl) (a)	122
ADAM19 (a)	124
ADAM15 (d)	125
Neurolektin (a)	125
PP1-C alpha (a)	128
IE72 (a)	130
Contactin 2 (a)	131
FES (a)	134
ULK1 (a)	138
MMP2 (5a) (a)	142
EPHB3 (a)	144
No_Name_001 (a)	144
GNAS2 b (a)	147
PP4 (a)	148
TRK-T3 (a)	150
CDK5 (a)	152
CDK9 (a)	155
Desmocullin 2 (a)	157
TNF a (a)	158
PLC gamma2 (a)	159
FASL (a)	160
PSSALRE (d)	161
p130-Cas (a)	163
RCK (a)	166
Ste-20likePK3 (a)	166
TRPM-2 (a)	168

Gene mit verminderter Expression

Gennamen	Score
N397 (a)	4
Pac-1 (a)	8
PRK-2 (a)	12
PRP4 (a)	16
April (a)	20
Ile_tRNA_Synthetase (a)	24
p85 su of PI3 Kinase	24
Gas6 (a)	28
p85 (PI3K) (a)	36
N392 (a)	40
PB-3017 (a)	46
S6K-α1 (a)	56
MTR6 (a)	64
MCE1 (a)	69
MYOTUBULARIN (a)	77
MTR2 (a)	79
NAK (a)	87
alpha Interferon (a)	89
PB-3038 (a)	90
YVH1 (a)	94
KIAA0965 (a)	95
Q9BU58 (a)	104
CLK1 (a)	105
Topoisomerase 2 (a)	106
hSLK (a)	115
N401 (a)	122
PB-5 (a)	123
PP1-C gamma (a)	126
MAP3K7 (a)	128
PIR1 (a)	132
CKIGX5 (a)	136
MASK (a)	136
PPM1D (a)	140
PP2A-C alpha (a)	143
Pr1-1 (a)	145
PI3-Kinase_alpha (a)	151
PTP mu (a)	156
Transferrin receptor 1 (a)	156
PGF (a)	158
UK-18 (a)	162
N395 (a)	165
ADAM10 (d)	166
HUMTEFSII (a)	166
Bub1b (a)	168
S6-Kinase R (a)	171
PTP-Meg (a)	172
CHK1 (a)	174
Yes (a)	176
CDK3 (a)	178
CDK7 (a)	181
KHS (a)	186

Tabelle 5: Listen der bestplatzierten Gene nach dem Score der Zelllinie MDA-MB453. Links erhöhte Genexpression, rechts verminderte Genexpression.

MDA-MB468

Gene mit erhöhter Expression

Gencode	Score
PHKalphaM (a)	76
CHUK1 (a)	79
rS9 (a)	89
Bim (a)	91
PRL3 (a)	95
PSSALRE (a)	98
PTPepsilon (a)	102
Amphiregulin (a)	104
Beta ARK1 (a)	107
Dyrk4 (a)	107
PYST1/MKP-3 (a)	107
HSCOVIC (a)	109
CAK/STK1 (a)	111
KIAA1725 (a)	111
DSG_G (a)	112
PCNA (a)	113
51PK (a)	114
Hyl (a)	118
KAP-1 (a)	118
CDK1 (a)	119
TPTE (a)	119
VH2 (a)	119
GSK3 / MAP4K1	120
IL-4Stat (a)	120
TTKxxx (a)	121
CDK7 (a)	122
PB-2 (a)	124
PP1-R (a)	126
FGF2 (a) (a)	127
H3.3 (a)	128
JNK1/SAPK1 c (a)	128
N412 (a)	132
Desmoglein 3 (a)	136
TFIIB (a)	136
MKP2 (a)	137
PP2C-beta (a)	137
PTP LAR (a)	138
Mok (a)	139
PKC-μ /PKD (a)	140
Cadherin 16 (a)	142
AMP-activatedPKa1 su	143
Caveolin1 (a)	143
TrkC (a)	144
JAK2 (a)	148
COQ3 (a)	149
p85 (PI3K) (a)	151
Calla (a)	152
SNRPB (a)	152
IE72 (a)	155
MASK (a)	155
PP2A-C alpha (a)	155

Gene mit verminderter Expression

Gencode	Score
LIMK-1 (a)	25
RSK/HU1 (a)	28
TUBA3 (a)	33
A6-related_protein (a)	40
CK-18 (a)	44
ILK (a)	54
NOXA (a)	55
HUMP4K (a)	61
PGAM-b (a)	66
HRS (a)	67
NEK3/NIMA-related kinase 3 (a)	67
retfinger (a)	72
YSK1 (a)	78
RNA Polymerase 2 (a)	79
MHC I (a)	84
CKII alpha 2 M (a)	91
HUM4AI (a)	95
KIF-1C (a)	100
PPX (a)	103
GNAS1 a (a)	104
c-Myc (a)	106
GNAS2 b (a)	106
CB1 (a)	110
EPHB2 (a)	111
RNP-K (a)	111
CAF-1 (a)	114
CCK4 (a)	119
PKN H4/ PRK1 (a)	120
PhKyT (a)	121
PP2A-Ra65 (a)	126
SIRP alpha1 (a)	128
HER-3 (a)	130
IL1 beta (a)	132
SGK223 (a)	133
PLC gamma2 (a)	134
CSNK2A1 (a)	135
MDPK/DM-Kinase (a)	140
CDK4 (a)	141
N415 (a)	143
IMPD (a)	144
p58GTA (a)	145
GRK5 (a)	148
Q9BQ20 (a)	148
beta Actin (a)	151
Tensin (a)	151
TIMP2b (a)	152
EMK (a)	156
VRK3 (a)	156
p38delta/SAPK.... (a)	158
SHP1-FL (a)	165
PP5 (a)	168

Tabelle 6: Listen der bestplatzierten Gene nach dem Score der Zelllinie MDA-MB468. Links erhöhte Genexpression, rechts verminderte Genexpression.

3.1.7. Analyse der differentiell exprimierten Gene der Zelllinien BT474 und MDA-MB231

Die Auswertungen der Zelllinien BT474 (4 Kontrollen und 8 Experimente) und MDA-MB231 (4 Kontrollen und 6 Experimente) wurden auf gleiche Weise wie bei Zelllinie MDA-MB468 durchgeführt. Listet man die Gene nach dem Score (siehe 3.1.6.) unter Berücksichtigung der verschiedenen Analysemethoden so erhält man folgende Liste für die Brustkrebszelllinie BT474:

BT474

Gene mit erhöhter Expression

Genname	Score
CAF-1 (a)	53
PhKyT (a)	54
TIMP1 (a)	62
CDC42-bdgkinase beta (a)	64
Chk2 (a)	68
Cadherin 12 (a)	73
Dyrk4 (a)	74
FHIT (a)	75
TIMP1 (1c) (a)	80
PLK-1/PLK (a)	83
PIM-1 (a)	87
MMP9 (a)	91
MHC I (a)	94
Bmx (a)	98
KAP-1 (a)	99
HPAK1 (a)	102
PTP Sigma (a)	104
Her4	105
PB-34 (a)	106
G beta 1 subunit (a)	107
PKG beta	107
MMP2 (5a) (a)	113
ADAM15 (d)	115
PSSALRE (d)	116
UK-15 (a)	116

Gene mit verminderter Expression

Genname	Score
rAR (a)	4
S6K-a1 (a)	15
CD24 (a)	28
N401 (a)	33
Jak-1 (a)	35
ERK3/MAP kinase 4 (a)	38
S6K alpha1/S6K (a)	39
CK I alpha (a)	48
G3BP2 (a)	54
FYVE-DSP2 (a)	61
E-Cadherin (d)	70
KIAA1700 (a)	76
Fak (a)	82
ALK3 (a)	83
PRP4 (a)	92
CK I delta (a)	94
GPI/90K Ligand (a)	96
Tep-1 (a)	100
Amphiregulin	101
JNK3/ ErkZ	103
VH5	104
PB3033	105
MAPK4 (a)	107
Yes	108
RARA	110

Tabelle 7: Listen der bestplatzierten Gene nach dem Score der Zelllinie BT474. Links erhöhte Genexpression, rechts verminderte Genexpression.

Für die Auswertung der Gene der Zelllinie MDA-MB231 wurden ebenso die Analyseverfahren nach der Anzahl der Klone und der mittlere Erhöhungsfaktor berücksichtigt.

MDA-MB231

Gene mit erhöhter Expression

Gencode	Score
ITGB4 (a)	15
Caspase 7 (a)	22
Jak-1 (a)	26
No_Name_001 (a)	27
LIF (a)	28
SGK223 (a)	28
Amphiregulin (a)	29
PLC gamma2 (a)	29
S6K/RSK3 gene (a)	30
FGFR4 (a)	30
Her2 (a)	31
PP7	31
Bad (a)	32
VEGF	32
KIAA0537 (a)	33
HB-EGF	33
PAP (a)	34
Contactin 2	34
PKN beta (a)	35
Fes	35
BDP1 (a)	36
KIAA0641	36
GS3955 (a)	37
Bmx	37

Gene mit verminderter Expression

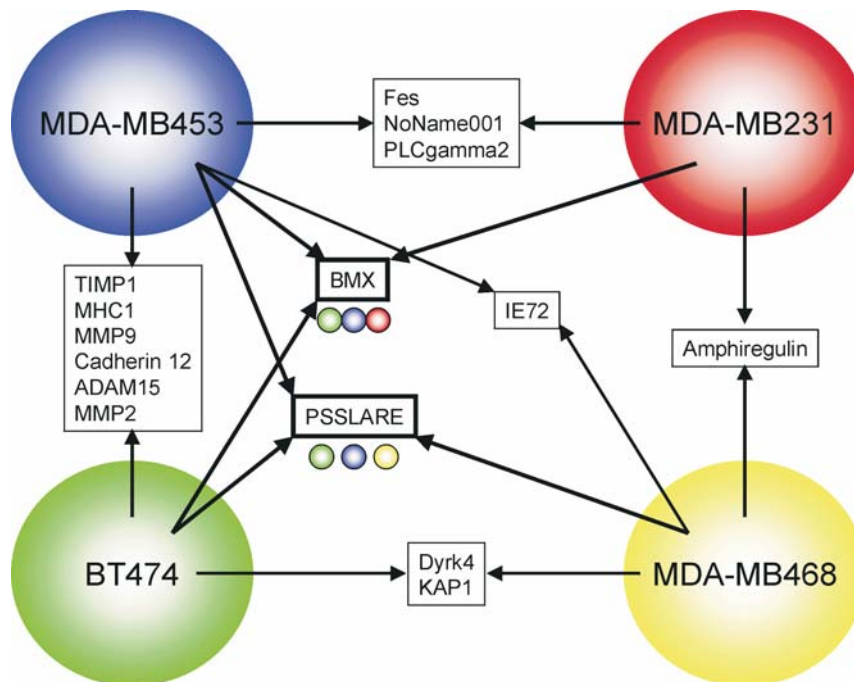
Gencode	Score
PSSALRE (d)	3
SGK (a)	7
KIAA0303 (a)	9
PK-38 (a)	11
SPHK1 (a) (a)	13
DRAK1 (a)	18
mTEC (a)	18
PLSTIRE (a)	20
PhKyT (a)	28
Nbak1	28
PLK-1/PLK (a)	29
ARK2 (a)	29
PCTAIRE	31
Syndecan4 (a)	32
Citron Kinase	32
GSK-3 beta R (a)	34
IL1 beta (a)	36
PB34	36
MINK	37
NRK2/STK2 (a)	38
ADAM19 (a)	41
PHK-g (b) (a)	42
Dynamin (a)	43
MST1 (a)/KRS2 (a)	44

Tabelle 8: Listen der bestplatzierten Gene nach dem Score der Zelllinie MDA-MB231. Links erhöhte Genexpression, rechts verminderte Genexpression.

3.1.8. Vergleich der differentiell exprimierten Gene aller Zelllinien

Die Scorelisten der drei verschiedenen Zelllinien wurden anschließend verglichen, und gemeinsam regulierte Gene wurden in einem Diagramm dargestellt. Diese Auswertung umfasst nur Gene, die in den Top 50 der Scorelisten aufgeführt sind. Würde man die Top 100 berücksichtigen, wäre die Überschneidung deutlich größer. Hier wurde jedoch Wert auf eine sehr konservative Auswertung gelegt.

Gene mit erhöhter Expression



Gene mit verminderter Expression

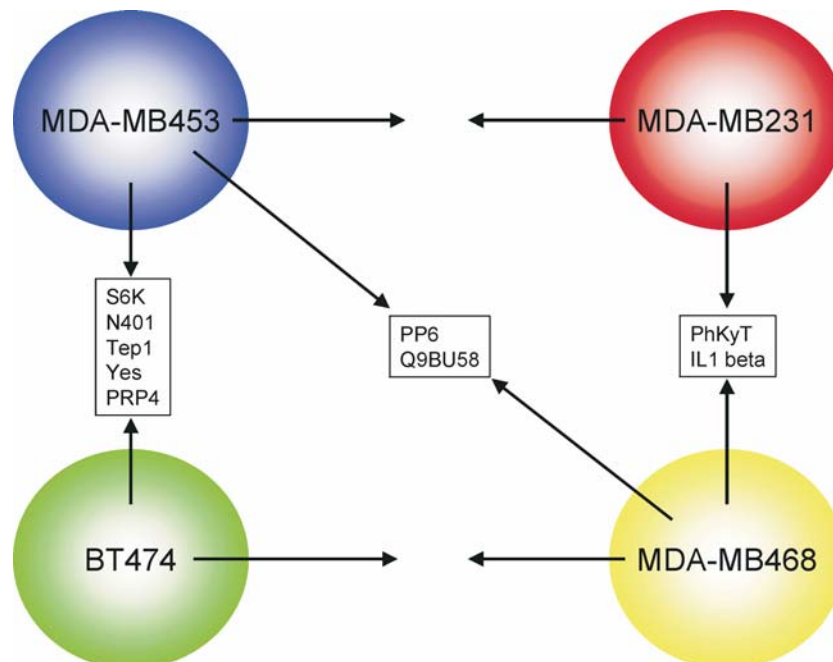


Abb. 21: In allen resistenten Klonen der vier Zelllinien gemeinsam differentiell regulierte Gene.

Die Beteiligung der einzelnen Gene der verschiedenen Listen an bekannten sowie hypothetischen Überlebenssignalwegen wird in der Diskussion erörtert.

3.1.9. Clusteranalyse

Zur weiteren Analyse der Genexpressionsdaten wurden die Ausgangszelllinien und die apoptoseresistenten Klone, sowie die Gene geclustert. Prinzip dieses Verfahrens ist die Gruppierung ähnlich exprimierter Gene oder Klone aufgrund ihres Genexpressionsprofils. Eine ähnliche Expression zweier Gene über verschiedene Experimente/Klone könnte auf eine gemeinsame Regulation oder Funktion hindeuten. Eine Clusteranalyse aller Zelllinien und Klone erscheint nicht sinnvoll, da die Genexpressionsunterschiede zwischen den Zelllinien zu groß sind, um gemeinsame Muster erkennen zu lassen. Da nur große Datenmengen interpretierbare Resultate zeigen, wurde diese Analyse nur mit der Zelllinie MDA-MB453 (58 Genexpressionsprofile) durchgeführt.

Zur Gruppierung der Gene oder Zelllinien nach Ähnlichkeit wurde das Programm Cluster (Eisen et al., 1998) verwendet. Die Rohdaten mit Triplikaten für ein Gen, wurden zuerst gefiltert, dann $\log(2)$ -transformiert. Danach wurden die Gene und Experimente normalisiert und nach dem Median gemittelt. Anschließend wurden die Daten mit einem hierarchischem Algorithmus gruppiert.

Die Gruppierung der Experimente/Klone ergab vier vorherrschende Cluster (siehe Abb. 22). Durch die Gruppierung der Ausgangszelllinie und der Klone kann überprüft werden, ob es Gemeinsamkeiten z.B. hinsichtlich Apoptoseresistenz der resistenten Klone gibt. Berechnet man den Resistenzindex (RI) erkennt man, dass die Zelllinien in Cluster 2 den höchsten Wert aufweisen. In dieser Gruppe sind auch alle Ausgangszelllinien enthalten. Cluster 1 weist den niedrigsten Index auf. Hier sind die Klone mit der geringsten Apoptoserate bei Induktion mit DXR zu finden. Alle hier enthaltenen Klone sind im Vergleich zur Ausgangszelllinie signifikant resistenter.

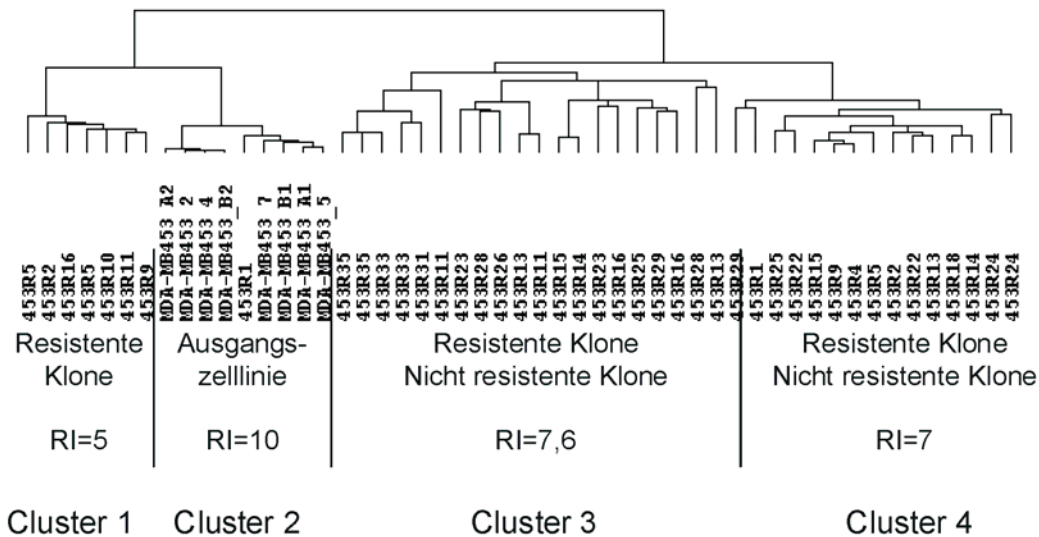


Abb. 22: Hierarchisches Clustering der Ausgangszelllinie MDA-MB453 und der Klone.

Betrachtet man die Cluster der Gene (s. Abb. 23) erkennt man einen deutlichen Unterschied zwischen der Ausgangszelllinie und den resistenten Klonen. Man erhält drei große Cluster mit Genen, die in der Ausgangszelllinie eine erhöhte bzw. verminderte und in den Klonen eine verminderte bzw. erhöhte Expression aufweisen (s. Abb. 23 B, C, und D). Der Pearson-Koeffizient, ein Maß für die Ähnlichkeit der Expressionsprofile, liegt bei allen Clustern bei mindestens 0,81. Ein Pearsonkoeffizient von 1 entspricht identischen Expressionsprofilen. Die meisten der in den Clustern enthaltenen Gene wurden ebenfalls durch die vorangegangenen Analysen als signifikant differentiell exprimiert identifiziert (vgl. Tabellen 1 bis 6). Dies bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen Analysen

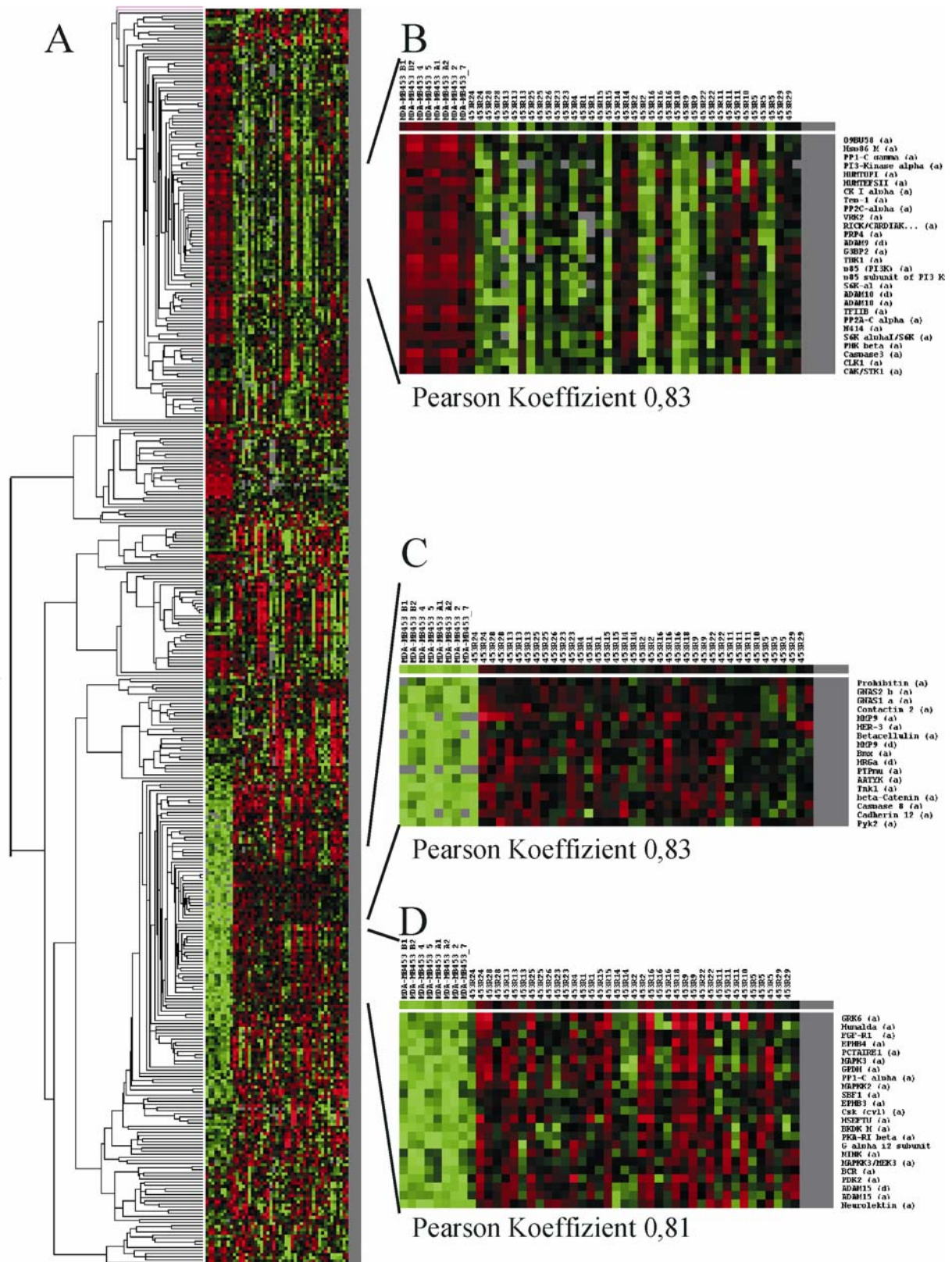


Abb. 23: Clusteranalyse der Brustkrebszelllinie MDA-MB453. Rot erhöhte Genexpression, grün verminderte Genexpression. (A) Dendrogramm aller Gene (B) Cluster von Genen mit verminderter Expression. Pearson-Koeffizient 0,83. (C) Cluster von Genen mit erhöhter Expression. Pearson-Koeffizient 0,83. (D) Weiteres Cluster von Genen mit erhöhter Expression. Pearson-Koeffizient 0,81. Die ersten acht Spalten enthalten jeweils die Ausgangszelllinie MDA-MB453.

3.2. Syk, eine zytoplasmatische Tyrosin Kinase

Wie aus der Genexpressionsanalyse der DXR-resistenten Klone der Zelllinien MDA-MB468 und BT474 hervorgeht, konnte die Spleen Tyrosin Kinase SYK als ein Gen mit reduzierter Genexpression identifiziert werden. Syk ist dort zwar nicht unter den Top 50 platziert, dennoch wurde die Expression dieser PTK in den apoptoseresistenten Klonen signifikant verringert und aufgrund von Vorarbeiten in dieser Arbeitsgruppe weiter untersucht. Die große Bedeutung dieser Kinase im hämatopoetischen System und die wenigen bekannten Fakten über die Funktion als potentieller Tumorsuppressor in epithelialen Zellen machten dieses Protein interessant für eine weitergehende Analyse. Des Weiteren waren einige Konstrukte und Zelllinien bereits vorhanden, die für die folgenden Arbeiten genutzt werden konnten. Die Proteintyrosinkinase Syk (*Spleen Tyrosine Kinase*) ist ubiquitär in Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Syk wurde 1991 aus einer cDNA-Bank der Schweinemilz kloniert (Taniguchi et al., 1991) und umfangreich als Effektorprotein der B-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalgebung charakterisiert (Turner et al., 2000). Der nächste Verwandte von Syk ist Zap-70, eine PTK, die ebenfalls als Effektorkinase des hämatopoetischen Systems identifiziert wurde. Syk besitzt N-terminal zwei SH2- Domänen, mit denen Tyrosin phosphorylierte Proteine gebunden werden können. C-terminal befindet sich die Kinasedomäne mit Tyrosinphosphorylierungsaktivität. Die alternative Spleißform Syk-B weist im Vergleich zu Syk eine Deletion von 23 AS innerhalb der Interdomäne B auf.

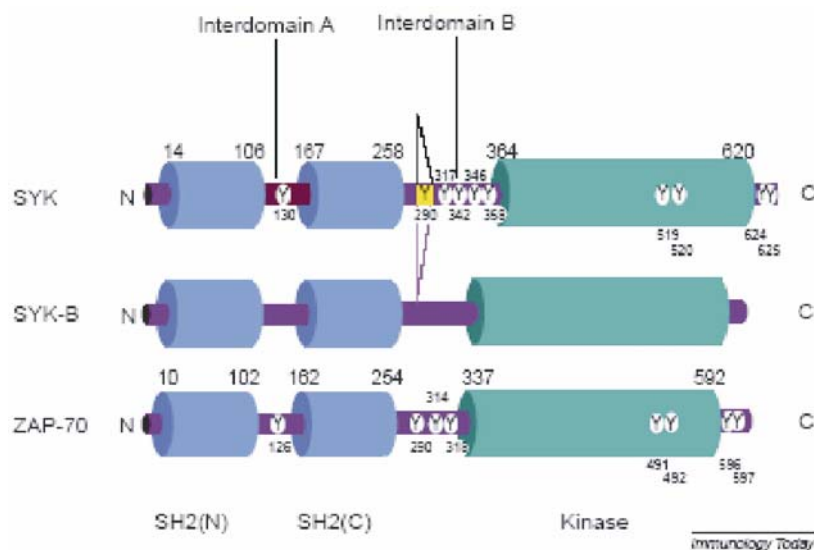


Abb. 24: Schematische Darstellung der Struktur der Syk/ZAP-70 Proteintyrosinkinase-Familie (Turner et al., 2000).

Syk-abhängige Signalwege regulieren die klonale Expansion, Differenzierung und Apoptose von B-Zellen, wobei sowohl die Phospholipase C (Plc), als auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) nach B-Zell-Rezeptor-Aktivierung von Syk tyrosinphosphoryliert werden. Dies resultiert in einer Aktivierung der MAP-Kinasen Erk und Jnk (Jiang et al., 1998) bzw. von Akt, das das Überleben der Zelle entscheidend reguliert (Craxton et al., 1999; Datta et al., 1997). Außerhalb hämatopoetischer Zellen konnte die Syk Expression auch in humanen Hepatozyten (Tsuchida et al., 2000), in humanen Kolonkarzinomzellen (Okamura et al., 1999), in humanen nasalen Fibroblasten (Yamada et al., 2001) und in humanen Endothelzellen (Yanagi et al., 2001) nachgewiesen werden, wobei die Funktion von Syk in diesen Zellen noch weitestgehend ungeklärt ist.

Coopman und Kollegen konnten zeigen, dass Syk ein potenter Wachstumsmodulator von Brustepithelzellen ist. Diese Untersuchungen ergaben, dass sich sowohl Syk-mRNA als auch das Protein in einer Reihe von humanen Brustkrebszelllinien, in normalem humanen Brustdrüsengewebe und normalen Brustepithelzellen nachweisen lassen, jedoch in invasiven Brustkrebszelllinien keine Syk-Expression gezeigt werden konnte (Coopman et al., 2000). In einer Arbeit von Yuan et al. wurde gezeigt, dass die Syk-Expression in invasiven Brustkrebszellen und Brusttumoren infolge von Promotorhypermethylierung unterdrückt ist (Yuan et al., 2001).

Weitere Untersuchungen im Maus Xenograftmodell zeigten, dass Syk-negative invasive Brustkrebszellen nach Überexpression von Syk das Tumorstadium verlangsamen. Zusätzlich konnte im Matrigelassay gezeigt werden, dass für diesen suppressiven Effekt sowohl die Kinase- als auch die SH2-Domänen von Syk von Bedeutung sind. Der Verlust der Syk-Expression ist daher mit einer erhöhten Motilität, Invasivität und Proliferation von Brustkrebszellen assoziiert. Somit könnte die Syk-Expression einen prognostischen Marker in humanen Brusttumoren darstellen, welcher mit einer schlechten klinischen Prognose korreliert (Toyama et al., 2003). Interessanterweise scheint die Kernlokalisierung von Syk für die Unterdrückung der Invasion essenziell zu sein. Denn Wang und Kollegen veröffentlichten, dass Syk innerhalb der Interdomäne B über ein basisches Kernlokalisierungssignal verfügt, das in SykB infolge von alternativem Spleißen zerstört wird (Wang et al., 2003).

Des Weiteren gab es einige Ansätze in der Literatur die PTK Syk bestimmten Signalwegen zuzuordnen, jedoch zeigen diese Studien Widersprüche und fehlende Kontrollen. Einige Untersuchungen zur PTK Syk wurden in dieser Arbeitsgruppe am MPI für Biochemie von Anja Ruschel durchgeführt. Sie konnte zeigen, dass Syk die Tyrosinphosphorylierung des EGF-Rezeptors und stromabwärts gelegene Signalwege negativ beeinflusst (Ruschel and Ullrich, 2004).

3.2.1. Genexpressionsanalyse der PTK Syk in Brustkrebszelllinien und Tumorbiopsien

Zur Untersuchung der Expression und einer eventuellen Bedeutung der Tyrosinkinase Syk außerhalb hämatopoetischer Zellen wurde eine cDNA Makroarrayanalysen von Brustkrebszelllinien durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Syk-Transkripte hauptsächlich in den normalen und schwach tumorigenen Brustzelllinien vorhanden waren. Im Gegensatz dazu war in den invasiven Brustzelllinien keine bzw. nur eine geringe Syk Expression nachweisbar (Abb. 25).

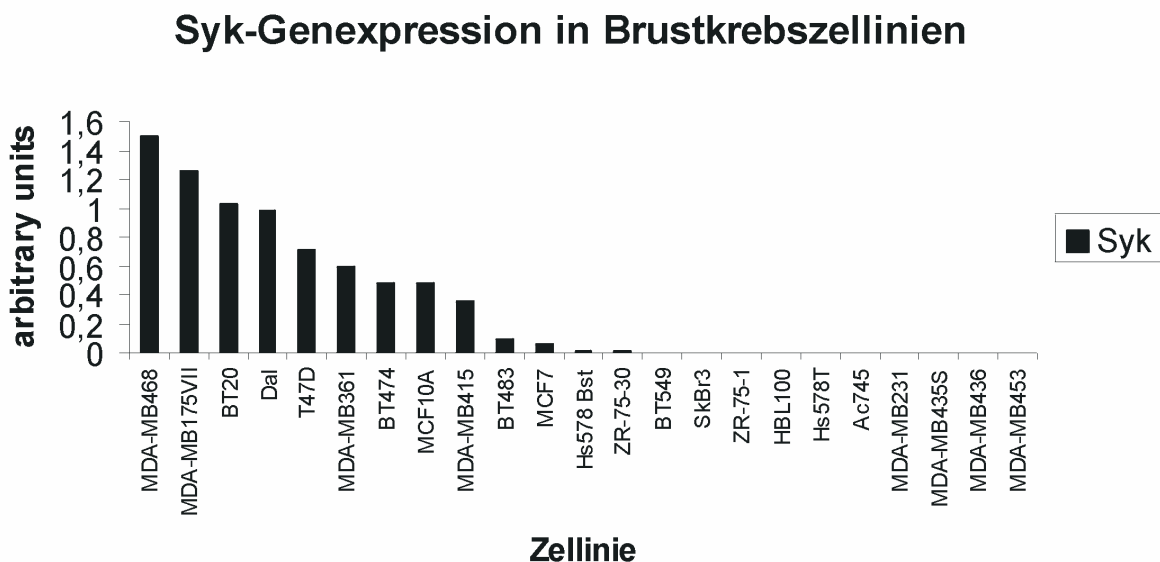


Abb. 25: Makroarray Analyse der Syk-RNA-Expression in verschiedenen Brustkrebszelllinien

Vergleicht man die Syk Expression von Zelllinien und Tumoren mittels Genexpressionsarray so kann man feststellen, dass die relative Expression in Tumoren deutlich höher als in etablierten Brustkrebszelllinien ist.

Das liegt teilweise an hämatopoetischen Zellen mit hoher Syk-Expression die jeden Tumor durchwandern. Andererseits können normale, nicht transformierte Brustepithelzellen mit erhöhter Syk-Expression in den Biopsien vorhanden sein (Abb. 26).

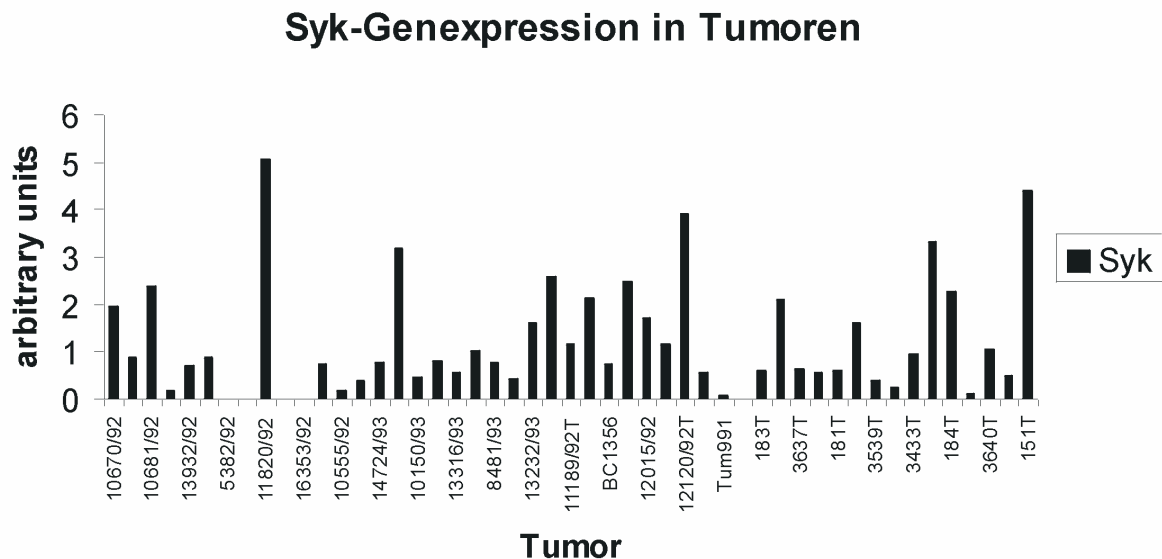


Abb. 26: Syk-Expression in verschiedenen Tumoren, untersucht mittels Makroarray-Analyse

Um einen Trend der Syk-Expression im normalen und tumorigenen Gewebe zu erkennen wurden die über hundert bereits publizierten Genexpressionsstudien der Oncomine-Datenbank (www.oncomine.org) nach der Syk-Genexpression durchsucht. Man erkennt in den meisten Studien eine Repression der Syk-Expression in den transformierten Geweben (Abb. 27 und 28).

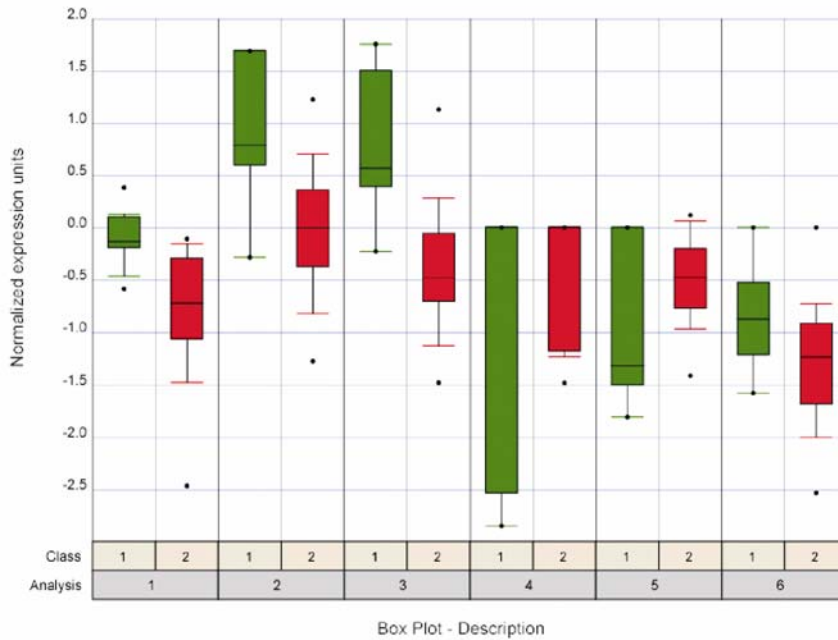


Abb. 27: Syk-Expression ist reduziert in einer Reihe von Tumoren im Vergleich zum nicht tumorigenen Gewebe (Daten aus Oncomine).

In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Syk-Repression kein gewebsspezifisches Phänomen ist, sondern in Lungenkrebs, Prostatakrebs, Blasen- und Eierstockkrebs auftritt. Es wurden nur Studien berücksichtigt die mehr als 20 Patienten/Biopsien pro Kohorte untersuchten und deren Experimente mit soliden Tumoren durchgeführt wurden. In Leukämien zeigt sich ein anderes Bild, was auf die unterschiedliche Funktion der PTK Syk im hämatopoetischen System hindeutet.

Analysis	Study	Class1	Class2	Mean1	Mean2	T-stat	P-value	Adj P-value
1	Bhattacharjee_Lung	Tissue Type: Normal Lung (17)	Tissue Type: Carcinoid (20)	-0.104	-0.788	4.674	7.4E-5	0.008
2	Garber_Lung	Tissue Type: Normal Lung (6)	Tissue Type: Lung Adenocarcinoma (40)	0.764	-0.068	2.989	0.023	>1
3	Luo_Prostate	Tissue Type: Benign Prostatic Hyperplasia (9)	Tissue Type: Prostate Cancer (16)	0.75	-0.401	4.454	3.8E-4	0.039
4	Ramaswamy_Multi_Cancer	Normal Tissue Type: Bladder (18)	Cancer Type: Bladder Transitional Cell Carcinoma (11)	-2.694	-0.974	-6.458	0.002	0.216
5	Welsh_Ovarian	Tissue Type: Normal Ovary (4)	Tissue Type: Ovarian Adenocarcinoma - Serous Papillary (28)	-1.481	-0.569	-4.368	0.029	>1
6	Welsh_Prostate	Tissue Type: Normal Prostate (9)	Tissue Type: Prostate Cancer (25)	-1.015	-1.408	2.503	0.022	>1

Abb. 28: Studien der Oncomine Datenbank mit signifikanter differentieller Syk Expression

3.2.2. Bestimmung der Syk-Proteinexpression in Brustkrebszelllinien

Die Präsenz eines Proteins in der Zelle wird zum einen durch die Stabilität seiner mRNA und der damit verbundenen Translationseffizienz und zum anderen durch die Stabilität des Proteins selbst reguliert. Somit muss das Expressionsniveau von Syk auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Zellen nicht die tatsächlich vorhandene Proteinmenge widerspiegeln. Da außerdem die Proteinsynthese durch Mutationen beeinträchtigt werden kann und die Genexpressionsanalysen mittels cDNA-Filtern und Northernblotanalyse nichts darüber aussagen, ob das Protein in verschiedenen Isoformen vorliegt, wurde die Expression von Syk in einer Reihe von Brustkrebszelllinien normalen und transformierten Ursprungs auf Proteinebene analysiert. Hierzu wurde Syk mittels Immunoblot in den verschiedenen Zelllysaten nachgewiesen. Dabei wurde deutlich, dass die Expression auf Proteinebene nicht zwangsläufig der nachgewiesenen Transkriptmenge entsprach (Abb. 25). Dabei konnten die beiden Isoformen Syk und SykB mit einer Größe von 72 bzw. 70 kDa detektiert werden. In den untersuchten Zelllinien traten beide Isoformen sowohl in gleichen als auch in unterschiedlichen Anteilen auf. Die vorangegangenen Daten wurden hinsichtlich der Syk-Expression bestätigt, denn auch auf Proteinebene konnte Syk nur in schwach tumorigenen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte Syk in den invasiven Brustkrebszelllinien (BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, MDA-MB-436) nicht detektiert werden.

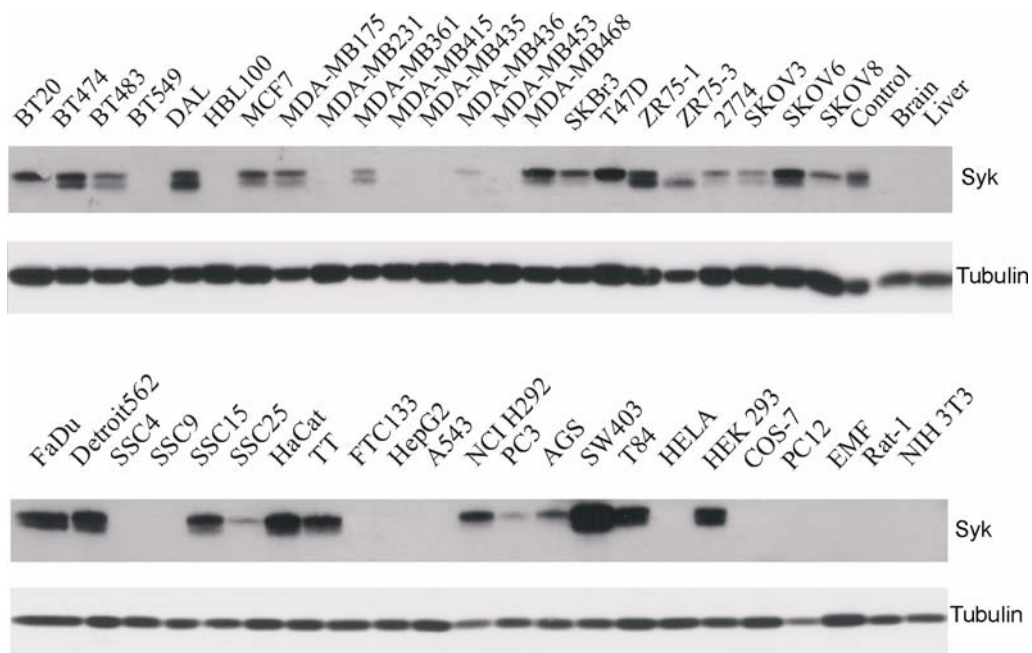


Abb. 29: Proteinexpression der PTK Syk in verschiedenen Krebszelllinien. Totallysat, WB antiSyk

3.2.3. Reduktion der Syk-Expression in DXR behandelten Klonen

Die Spleen Tyrosin Kinase Syk konnte als ein Gen mit reduzierter Genexpression bei der Genexpressionsanalyse der DXR-resistenten Klone identifiziert werden. Diese verminderte Genexpression konnte in allen DXR-behandelten Klonen der Syk-exprimierenden Brustkrebszelllinien MDA-MB468 (Abb. 30) und BT474 (Abb. 31) durch Genexpressionsarrays nachgewiesen werden.

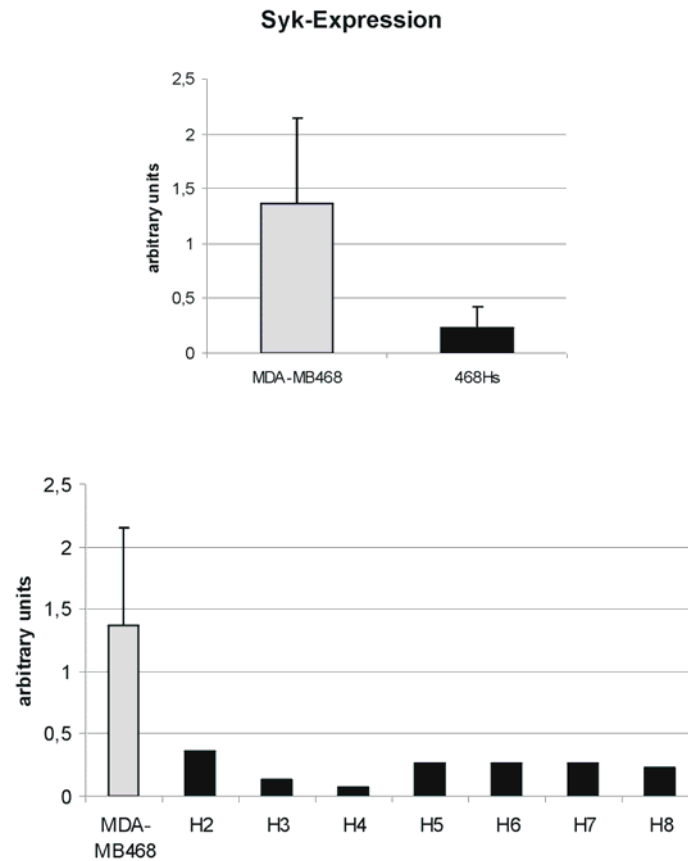


Abb. 30: Genexpressionsanalyse der PTK Syk in der Brustkrebszelllinie MDA-MB468 und ihrer resistenten Klone mittels Makroarrays. Das obere Diagramm zeigt die durchschnittliche Syk-Expression in den neun verschiedenen cDNA-Präparationen der Ausgangszelllinie MDA-MB468 und die durchschnittliche Expression der sieben DXR-behandelten Klone (468Hs). Das untere Diagramm zeigt die Syk-Expression der einzelnen Klone aus drei unabhängigen cDNA-Präparationen.

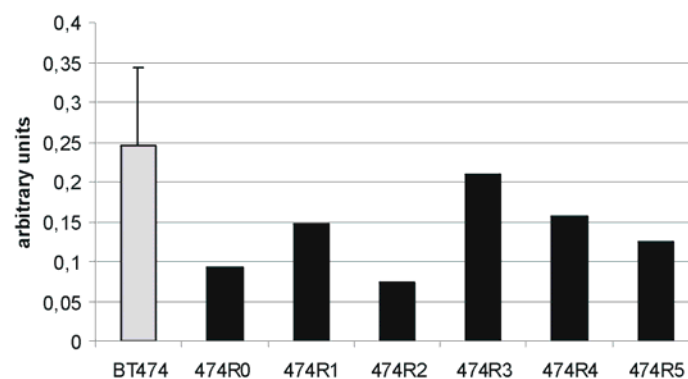


Abb. 31: Genexpressionsanalyse der PTK Syk in der Brustkrebszelllinie BT474 und ihrer resistenten Klone mittels Makroarrays. BT474 entspricht der durchschnittlichen Expression aus vier unabhängigen cDNA-Präparationen der Ausgangszelllinie BT474.

Im Vergleich zu den Ausgangszelllinien MDA-MB468 und BT474 zeigen alle DXR-selektionierten Klone eine reduzierte Syk-Expression, wobei die generelle Expressionsintensität sehr nah am Hintergrund liegt. Die Expressionslevel der einzelnen Klone variieren kaum.

3.2.4. Syk interagiert mit Egfr, Her2 und Her3

Nach einer Publikation von Ruschel und Ullrich (Ruschel and Ullrich, 2004) beeinflusst die PTK Syk den Phosphorylierungszustand des Egf-Rezeptors. Da die Egfr-Familie eine bedeutende Rolle bei der Krebsentstehung und der Apoptoseresistenz spielt, wurde die Möglichkeit die Beeinflussung dieses Wachstumssignalwegs durch die PTK Syk bei chemotherapeutischer Behandlung näher untersucht.

Da die physische Assoziation zwischen Syk und Egfr mittels Überexpression nachgewiesen wurde (Ruschel and Ullrich, 2004), wurde nun diese Interaktion mit den Mitgliedern der Egf-Rezeptor-Familie in endogenen Zellsystemen untersucht.

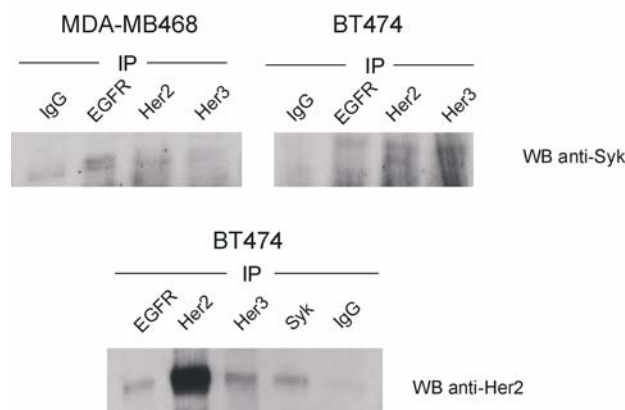


Abb. 32: Immunpräzipitation der Egfr, Her2 und Her3 und Immunoblot anti Syk aus total Lysaten der Syk endogen exprimierenden Brustkrebszelllinien MDA-MB468 und BT474.

Abb. 32 zeigt eine Immunpräzipitation von Syk mit dem Egf-Rezeptor in MDA-MB468 Zellen, sowie mit Her2 und Her3 in der Zelllinie BT474. Die unterschiedlich starke Assoziation der Proteine hängt von den Expressionslevel der Rezeptoren in den verschiedenen Zelllinien ab. MDA-MB468 Zellen haben eine starke Egfr Expression, wogegen Her2 und Her3 in BT474 hoch exprimiert sind.

3.2.5. Syk reduziert die basale Egfr- und Her2-Tyrosin Phosphorylierung nach DXR-Behandlung

Die Brustkrebszelllinie MCF10A zeigt endogen eine starke Syk-Expression und wurde daher mit Syk, einer Kinase-defizienten Mutante von Syk (KR) und nur Vektor stabil infiziert. Diese Zellen wurden von Anja Ruschel generiert. Ebenso wurde ein stabiler knock down der endogenen Syk-Expression versucht. Da die Reduktion des Syk-Proteinlevels nur um 30% gelang, wurden diese Zellen nicht weiterverwendet.

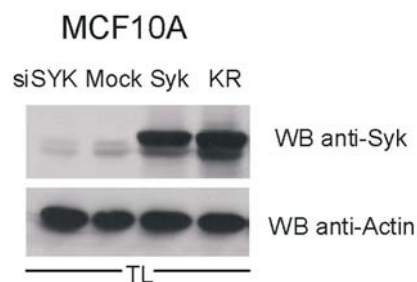


Abb. 33: Expression der PTK Syk in MCF7 Brustkrebszellen stabil infiziert mit verschiedenen Konstrukten (SI SYK, si RNA knock down der PTK Syk; Mock Vector infizierte Zellen, Syk, Überexpression des VSV-markierten Syk; KR, Überexpression der Kinase-defizienten Mutante von Syk)

Das exogene Syk besitzt eine VSV-Markierung und läuft daher über den zwei endogenen Syk-Isoformen. Um die Auswirkungen der Syk-Überexpression auf den Egfr nach DXR-Behandlung zu untersuchen, wurden die Zellen verschieden lang mit DXR behandelt und die Egfr-Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung analysiert.

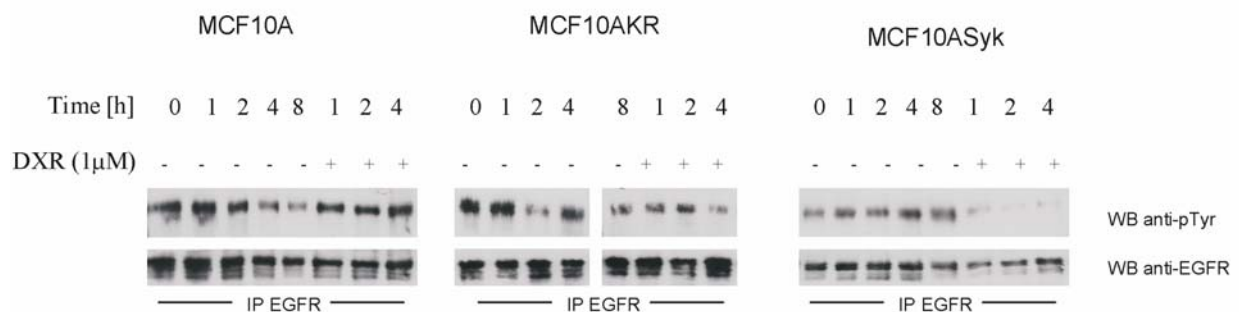


Abb. 34: Reduktion der Egfr Tyrosinphosphorylierung in DXR behandelten, Syk-überexprimierenden MCF7-Zellen. Immunpräzipitation des Egfr geblottet mit einem Antikörper gegen PhosphoTyrosin.

Durch die Überexpression von Syk ist es möglich, die basale EGF-Rezeptor Tyrosinphosphorylierung nach DXR-Behandlung zu reduzieren. Die Zellen mit Vektor oder der Kinase-defizienten Mutante von Syk zeigen keine Veränderungen im EGF-Rezeptor-Tyrosinphosphorylierungsmuster. Daher ist dieser Effekt von der Kinaseaktivität abhängig. Die gleichen Beobachtungen konnten außerdem in der Zelllinie MDA-MB231 gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Da die verschiedenen Brustkrebszelllinien die Egfr-Familienmitglieder unterschiedlich stark exprimieren, konnte in den MCF10A-Zellen nur die Egfr Tyrosinphosphorylierung untersucht werden. Da auch eine Assoziation mit Her2 gefunden wurde, wurde die Brustkrebszelllinie MDA-MB453 mit den verschiedenen Konstrukten stabil infiziert. Diese Zelllinie zeigt eine hohe endogene Her2-Expression.



Abb. 35: Expression der PTK Syk in MDA-MB453 Brustkrebszellen, stabil infiziert mit verschiedenen Konstrukten (Mock Vector infizierte Zellen; Syk, Überexpression des VSV-markierten Syk; KR, Überexpression der Kinase-defizienten Mutante von Syk).

Diese Zellen wurden mit verschiedenen Dosen Doxorubicin für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Tyrosinphosphorylierung des Her2-Rezeptors untersucht.

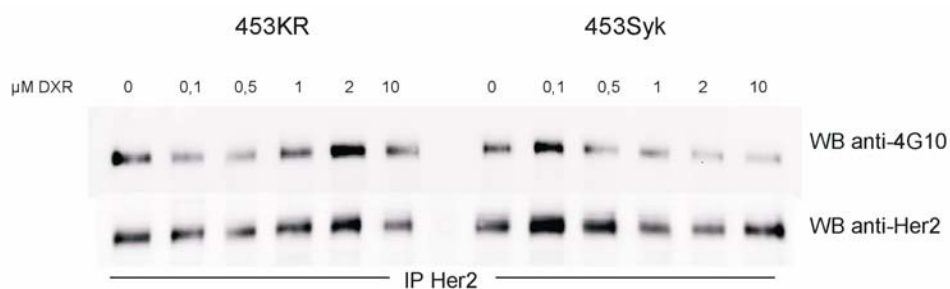


Abb. 36: Reduktion der Her2 Tyrosinphosphorylierung in DXR behandelten, Syk-überexprimierenden MDA-MB453-Zellen. Immunpräzipitation von Her2, geblottet mit einem Antikörper gegen PhosphoTyrosin.

Ab 1 μM DXR kann man bei der Syk-Überexpression eine Reduktion der Her2-Phosphorylierung erkennen.

3.2.6. Syk beeinflusst die Apoptosesensitivität von Krebszellen

Da die Syk-Expression die Tyrosinphosphorylierung der Egfr-Familie beeinflusst, wurden mögliche physiologische Effekte untersucht. In verschiedenen Publikationen konnte ein Einfluss der Syk-Überexpression auf die Proliferationsrate festgestellt werden (Moroni et al., 2004; Ruschel and Ullrich, 2004). Da Syk als ein Gen mit reprimierter Expression in chemoresistenten Klonen identifiziert wurde, wäre zu erwarten, dass Syk die Sensitivität für Doxorubicin erhöht. Daher wurden die Proliferations- und Apoptoseraten in den verschiedenen stabilen Zelllinien untersucht.

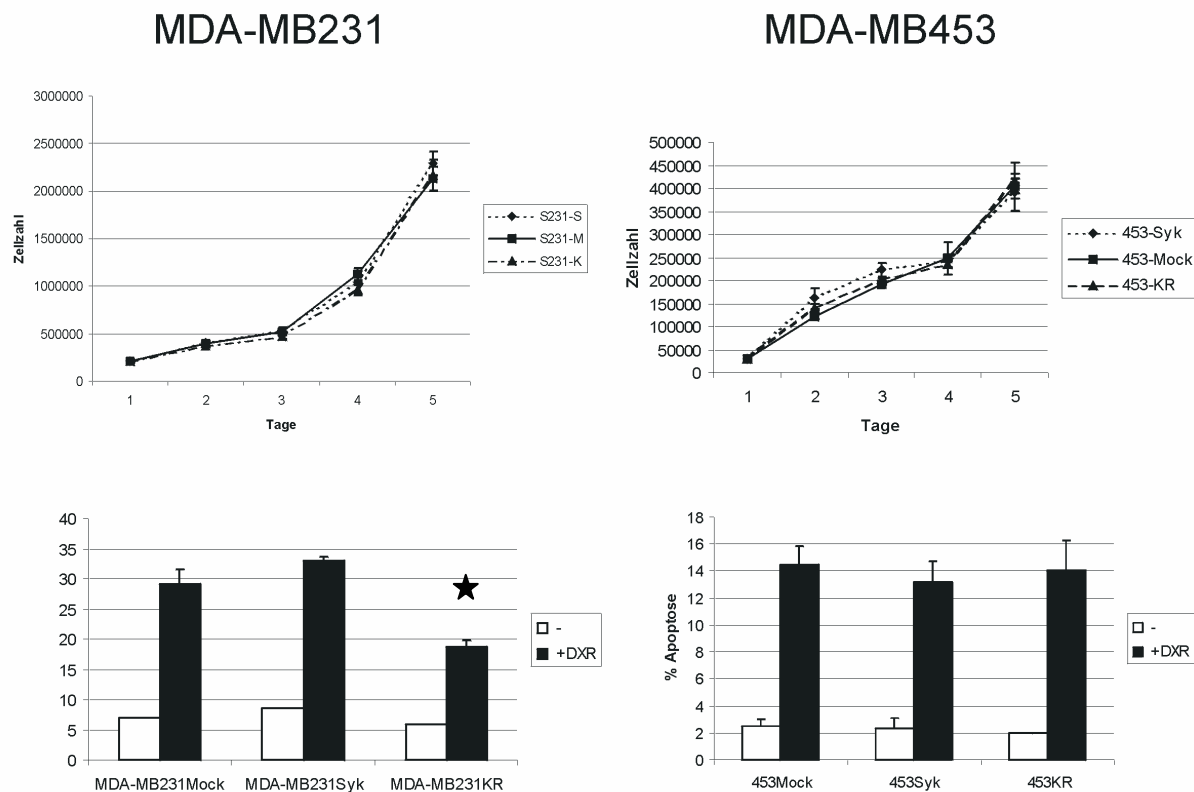


Abb. 37: Obere Diagramme: Bestimmung der Proliferation durch Auszählen der Zellzahlen mittel eines Coulter Counter. Untere Diagramme: Durchschnittliche Apoptoserate der verschiedenen Zelllinien aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Apoptose wurde mit 2 μM DXR für 48 h induziert und mittels PJ-Assay bestimmt.

Betrachtet man die Brustkrebszelllinien ohne endogene Syk-Expression (MDA-MB231 und MDA-MB453), so ist in der Proliferationsrate kein Unterschied festzustellen. Bei der Apoptosesensitivität scheint die Kinase-defiziente Mutante in MDA-MB231 eine verringerte Apoptosesensitivität hervorzurufen. Dieser Effekt konnte auch in der Zelllinie BT549 beobachtet werden.

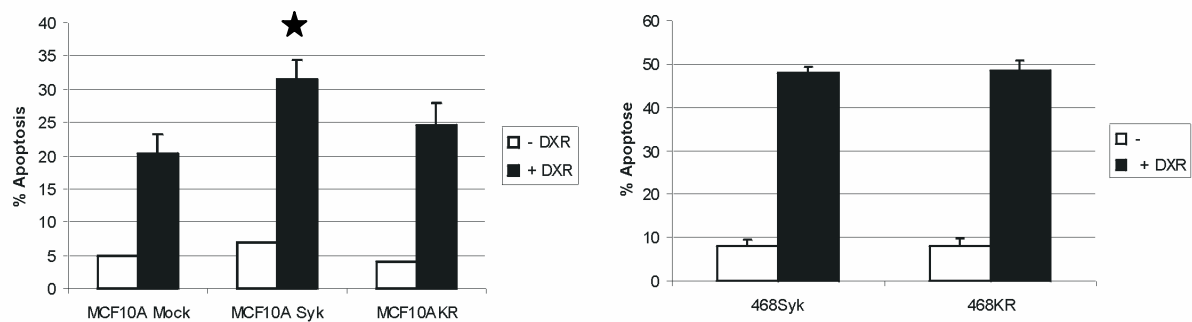


Abb. 38: Durchschnittliche Apoptoserate der verschiedenen Zelllinien (MCF10A und MDA-MB468) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Apoptose wurde mit 2 μ M DXR für 48 h induziert und mittels PJ-Assay bestimmt.

Die Überexpression von Syk im endogenen System (MCF10A und MDA-MB468) bewirkte nur in MCF10A-Zellen eine Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin. Die Proliferationsrate dieser Zelllinien blieb dagegen unverändert (Daten nicht gezeigt).

3.3. Fgfr4, ein Gen mit erhöhter Expression in DXR-behandelten Klonen

Im Stammbaum der Tyrosinkinase bildet die Familie der Fgf-Rezeptoren (fibroblast growth factor) einen eigenständigen Zweig. Die vier Mitglieder der humanen Fgf-Rezeptoren (Fgfr1-4) (Dionne et al., 1990; Keegan et al., 1991; Partanen et al., 1991) weisen eine Homologie der primären Aminosäuresequenz von 55 bis 72% auf. Der extrazelluläre Teil umfasst drei Immunglobulin-domänen, eine Acid-Box, sowie ein HAV-Motif im Falle von Fgfr1,2, und 4 (L'Hote and Knowles, 2005). Durch alternatives Spleißen der mRNA sind sowohl lösliche als auch membrangebundene Fgf-Rezeptoren mit einer, zwei oder drei Immunglobulin-domänen möglich (Johnson and Williams, 1993). Im Gegensatz dazu existieren vom Fgfr4 nur intrazelluläre Varianten ohne Transmembrandomäne oder mit einem verkürzten Carboxy-Terminus (van Heumen et al., 1999). Die Bindung verschiedener FGF-Liganden löst eine Signalkaskade ähnlich der des Egf-Rezeptors aus. Die Regulation erfolgt allerdings über andere Mechanismen (Schlessinger, 2004). Die Gruppe der FGF-Liganden gehört zu einer Klasse von monovalenten Molekülen, die nur jeweils ein Rezeptor-Molekül binden können (Schlessinger et al., 1995). Bis heute konnten 23 verschiedene Liganden dieser Familie in menschlichen Geweben identifiziert werden (L'Hote and Knowles, 2005). Die beiden wichtigsten Vertreter der FGF-Familie sind FGF-1 (aFGF) und FGF-2 (bFGF). Sie zeigen die größte Expressionsbreite in den verschiedenen menschlichen Gewebetypen.

Im unstimulierten Zustand liegen die Fgf-Rezeptoren in monomerer Form vor. Erst durch Ligandenbindung wird die Dimerisierung eingeleitet und die Kreuzphosphorylierung der intrazellulären Domänen beginnt (Klint and Claesson-Welsh, 1999; Schlessinger and Lemmon, 2003). Diese Dimerisierung wird durch Heparin und Heparansulfatproteoglykane (HSPG) unterstützt, welche gleichermaßen an den Fgf-Rezeptor sowie an den Liganden binden (Eswarakumar et al., 2005; Plotnikov et al., 2000).

Anschließend werden ähnliche Moleküle wie beim Egf-Rezeptorsignalweg aktiviert (Schlessinger, 2000).

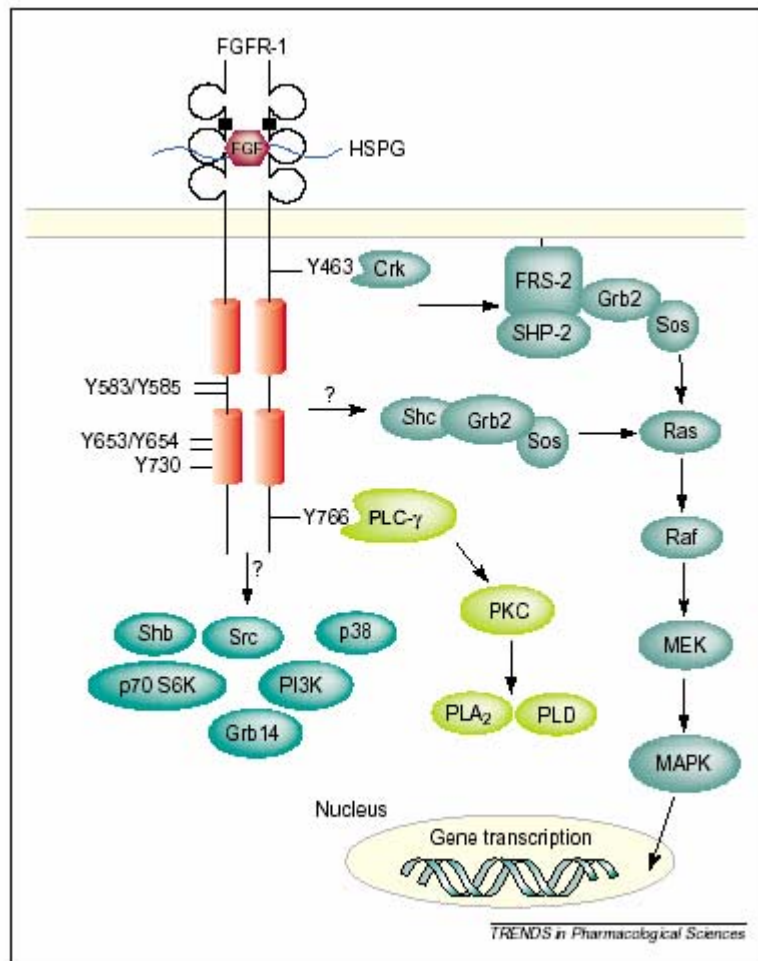


Abb. 39: Schematische Darstellung der Fgfr1 Signalkaskade (Cross and Claesson-Welsh, 2001).

So binden nach Phosphorylierung bestimmter Tyrosine des Fgfr1, z.B. Y463, Y653 und Y654, Adaptorproteine wie Frs-2, Crk und Shc (Cross und Claesson-Welsh, 2001). Verschiedene Signalwege werden durch Fgf-Rezeptor-Stimulation aktiviert. Ein wichtiger Signalweg verläuft über Ras und aktiviert die MAPKinase-Kaskade. Weitere Signale können über PI3Kinase, Phospholipasen und Src-Kinasen weitergegeben werden (Abb. 39).

Die Mitglieder der Fgfr-Familie spielen durchaus eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung, da sie sowohl als Onkogene zur Tumorentstehung beitragen, als auch als Angiogenesefaktoren die weitere Versorgung des Tumors mit Nährstoffen positiv beeinflussen können. Dies belegen auch häufige genetische Veränderungen von Genen der Fgf-Rezeptoren in verschiedenen Tumortypen, wie zum Beispiel in Nieren-, Brust- und Harnblasenkrebs (Tab. 9).

Genetic alterations of FGFRs in human cancers

Cancer	Gene alteration
8P11 myeloproliferative syndrome (EMS)	Translocation and fusion of <i>FGFR1</i> with <i>ZNF-198</i> (also called <i>FIM</i> or <i>RAMP</i>) t(8;13); fusion of <i>FOP</i> with <i>FGFR1</i> t(6;8); fusion of <i>FGFR1</i> with <i>CEP 110</i> t(8;9); fusion of <i>FGFR1</i> with endogenous human retroviral sequence t(8;19); and fusion of <i>FGFR1</i> with <i>BCR</i> t(8;22)
Breast cancer	Over expression of FGFR1
Pancreatic adenocarcinoma	Abnormal expression of FGFR1 and FGFR4
Prostate cancer	Class switch of FGFR2 from IIIb isoform to IIIc isoform Abnormal expression of FGFR1c in prostate epithelial cells
Astrocytoma	Elevated expression of FGFR1 in white matter and down regulation of FGFR2 in malignant astrocytomas
Gastric cancer	<i>FGFR2</i> splice site mutation (940-2A → G) and Ser267Pro mutation
Transitional cell carcinoma of bladder	Frequent <i>FGFR3</i> mutations: Arg248Cys; Ser249Cys; Gly372Cys; Lys652Glu
Thyroid carcinoma	Over expression of FGFR3
Cervical carcinoma	Low frequency of <i>FGFR3</i> mutation: Ser249Cys
Colorectal cancer	Aberrant splicing and activation of cryptic splice sequences in <i>FGFR3</i>
Peripheral T cell lymphoma	Translocation and fusion of <i>FGFR3</i> with <i>ETV6</i> t(4;12)
Multiple myeloma	Activating mutations of <i>FGFR3</i> (Lys650Glu; Lys650Met) associated with chromosomal translocation t(4;14) (p16.3;q32.3)
Head and neck squamous cell carcinoma	FGFR4 polymorphism: Gly388Arg

Tab.9: Übersicht der genetischen Veränderungen der Fgf-Rezeptoren in humanen Tumoren (Eswarakumar et al., 2005).

In dem weiter vorne beschriebenen Ansatz zur Identifizierung apoptoseresistenz-auslösender Gene wurde eine erhöhte Genexpression des Fgfr festgestellt. Der Fgfr4 wurde vor zehn Jahren aus der cDNA der Zelllinie K562 (multiple myelomische Leukämie) kloniert (Partanen et al., 1991). Seine Aminosäuresequenz ist zu 55% homolog zu den vorher bereits identifizierten Fgfr1 und Fgfr2 (Dionne et al., 1990) und besitzt die charakteristischen strukturellen Komponenten der Fgfr-Proteinfamilie. Die Signaltransduktion nach Ligandenbindung erfolgt über die bereits von anderen Fgf-Rezeptoren bekannten Signalwege. So konnte gezeigt werden, dass die konstitutiv-aktivierende Mutation K650E im Aktivierungs-Loop des Fgfr3, die auch bei Patienten mit Blasen- und Gebärmutterhalskrebs zu finden ist, durch Transfektion in NIH3T3-Zellen transformierend wirken kann (Hart et al., 2001). Des Weiteren wurden die Proteine SHP2, PLCgamma und die MapKinasekaskade aktiviert. Die Aktivierung des MapK-Signalwegs durch Stimulation des Fgfr4 konnte in einer Reihe weiterer Zellsysteme gezeigt werden. Ein weiterer stromabwärts des Fgfr4 gelegener Signalweg ist der Akt-Weg, der über die Phosphorylierung der PI3Kinase aktiviert wird und ein Überlebenssignal für die Zelle darstellt. Die Beteiligung dieser Signalwege an der Fgfr4-Signaltransduktion konnte auch durch die Blockierung der Tyrosinkinaseaktivität mittels Inhibitoren gezeigt werden. Dabei konnte ein

Zellzyklusarrest der Zellen, verbunden mit der Repression von Cyclin D1 und verringerter Phosphorylierung von pRb, beobachtet werden (Koziczak et al., 2004). Dieser Effekt ließ sich durch die gleichzeitige Inhibition mit Her2-Inhibitoren verstärken (Koziczak and Hynes, 2004).

Über die biologische Funktion des Fgfr4 ist noch wenig bekannt. Die Knock-out Maus ist lebensfähig und zeigt keinen offensichtlichen Phänotyp. Es konnte lediglich ein verstärkter Cholesterin-Stoffwechsel und erhöhte Gallensäureexkretion beobachtet werden (Yu et al., 2000).

In verschiedenen Tumorarten spielen Mutationen oder Überexpression des Fgfr4 offensichtlich eine große Rolle. Bange *et al.* konnten einen wichtigen SNP (single nucleotide polymorphism) identifizieren, der prognostischen Wert für die Überlebenszeit von Patienten mit Brustkrebs besitzt. Relevanz für diesen SNP konnte auch in einigen weiteren Tumoren nachgewiesen werden (Bange et al., 2002).

Die starke Expression von FGFR4 in Brust-, Pankreas- und Nieren-Karzinomen (Jaakkola et al., 1993; Penault-Llorca et al., 1995) lässt auf eine wichtige Funktion des Fgfr4 in der Tumorgenese schließen.

Da bislang wenig über die molekularen Zusammenhänge des FGFR4-Signalwegs mit einer offensichtlichen Bedeutung in der Tumorgenese oder -progression bekannt war, wurde die Rolle des Fgfr4 in der Apoptoseresistenz weiter untersucht.

3.3.1. Bestimmung der Expression des Fgfr4 in Zelllinien und Tumorbiopsien

Die generelle Expression dieser RTK sollte durch einen Vergleich aller verfügbaren Brustkebszelllinien festgestellt werden. Dazu wurde die Genexpression mittels Array-Analyse bestimmt.

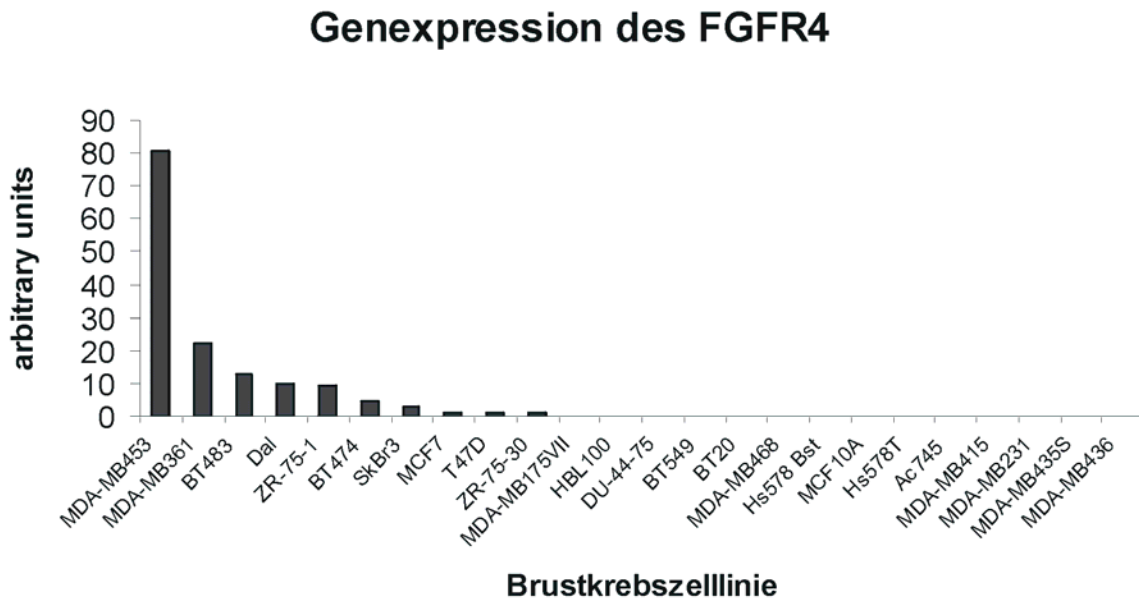


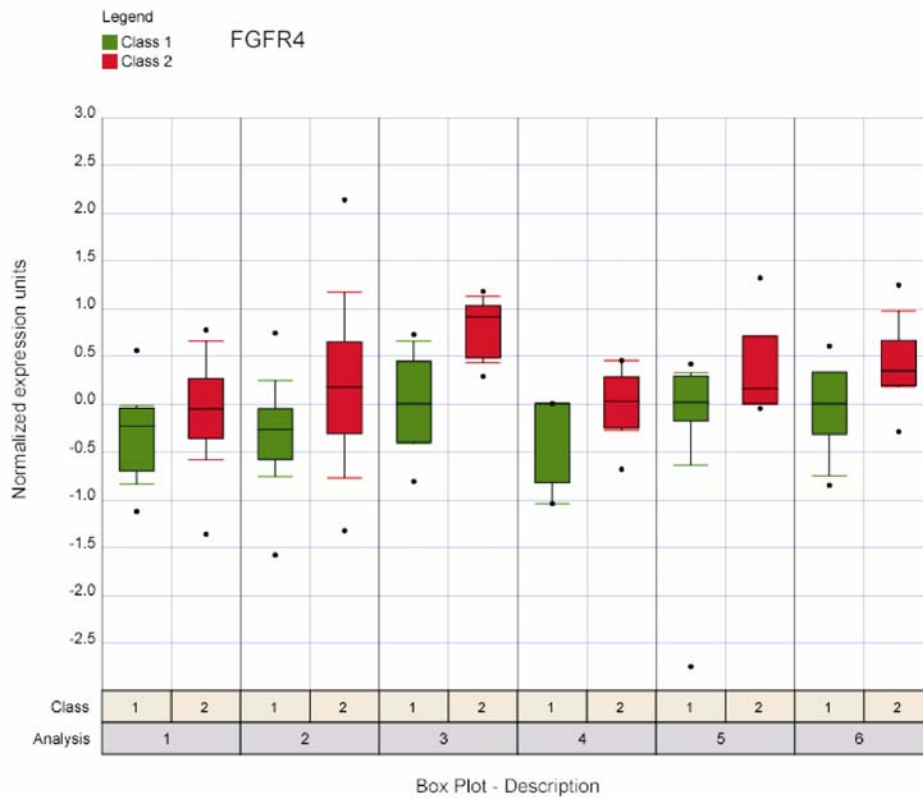
Abb. 40: Genexpression des Fgfr4 in verschiedenen Brustkrebszelllinien, bestimmt durch eine Array-Analyse.

Im Vergleich zu anderen Genen ist der Fgfr4 in Brustkrebszelllinien relativ schwach exprimiert. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie MDA-MB453, die zusätzlich zur hohen FGFR4-Expression eine konstitutive Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors zeigt. Eine Einteilung nach bestimmten Charakteristika Fgfr4-exprimierender Zelllinien, wie beispielsweise Chemoresistenz, ist nicht offensichtlich. Vergleicht man das Expressionsniveau in Tumorbiopsien, erkennt man nur wenige Tumoren mit nennenswerter Expression. Zwei Studien konnten Fgfr4-Überexpression in 10% bzw. 32% der Brusttumoren nachweisen (Jaakkola et al., 1993; Penault-Llorca et al., 1995).



No	Study	Class1	Class2	Mean1	Mean2	T-stat	P-value	Adj P-value
1	Beer_Lung	Tissue Type: Non-neoplastic Lung (10)	Tissue Type: Lung Adenocarcinoma (86)	0.451	0.119	5.762	5.2E-6	3.2E-4
2	Bhattacharjee_Lung	Tissue Type: Normal Lung (17)	Tissue Type: Lung Adenocarcinoma (139)	0.473	-0.101	6.945	5.4E-9	3.4E-7
3	Bhattacharjee_Lung	Tissue Type: Normal Lung (17)	Tissue Type: Small Cell Lung Cancer (6)	0.473	-0.26	5.105	0.001	0.079
4	Bhattacharjee_Lung	Tissue Type: Normal Lung (17)	Tissue Type: Squamous Cell Lung Carcinoma (21)	0.473	-0.665	7.903	4.2E-8	2.6E-6
5	Garber_Lung	Tissue Type: Normal Lung (6)	Tissue Type: Lung Adenocarcinoma (40)	0.026	-0.71	3.604	0.008	0.471
6	Powell_Lung	Tissue Type: Non-Malignant Lung (11)	Tissue Type: Lung Adenocarcinoma (11)	0.787	0.126	3.575	0.002	0.118

Abb. 42: Tabelle der publizierten Studien in denen normales und malignes Lungengewebe untersucht wurde und Fgfr4 signifikant differentiell exprimiert wurde. Die Expressionsdaten wurden der Oncomine Datenbank entnommen. Bedingungen für die Berücksichtigung der Studien waren eine Biopsienanzahl von mehr als 20, sowie die Veränderung der Genexpression auf einem 95%-igem Signifikanzniveau.



No	Study	Class1	Class2	Mean1	Mean2	T-stat	P-value	Adj P-value
1	Alon_Colon	Tissue Type: Normal Colon (22)	Tissue Type: Colon Adenocarcinoma (40)	-0.316	-0.075	-2.098	0.041	>1
2	Chen_Liver	Tissue Type: Non-tumor Liver (76)	Tissue Type: Hepatocellular Carcinoma (104)	-0.286	0.183	-5.514	1.3E-7	8,00E-06
3	Notterman_Colon	Tissue Type: Normal Colon (18)	Tissue Type: Colon Adenocarcinoma (18)	-0.014	0.797	-5.332	4.9E-5	0.003
4	Ramaswamy_Multi_Cancer	Normal Tissue Type: Uterus (16)	Cancer Type: Uterine Adenocarcinoma (10)	-0.931	-0.043	-5.536	0.005	0.34
5	Ramaswamy_Multi_Cancer	Normal Tissue Type: Renal (23)	Cancer Type: Renal Cell Carcinoma (11)	-0.268	0.484	-2.193	0.046	>1
6	Ramaswamy_Multi_Cancer	Normal Tissue Type: Colon (23)	Cancer Type: Colorectal Adenocarcinoma (12)	-0.082	0.445	-2.622	0.019	>1

Abb. 43: Tabelle der publizierten Studien in denen normales und malignes Gewebe untersucht wurde und Fgfr4 signifikant differentiell exprimiert wurde. Die Expressionsdaten wurden der Oncomine Datenbank entnommen. Bedingungen für die Berücksichtigung der Studien waren eine Biopsienanzahl von mehr als 20, sowie die Veränderung der Genexpression auf einem 95-%igem Signifikanzniveau.

3.3.2. Fgfr4 Expression in resistenten Klonen

Wie bereits in Kapitel 3.1. festgestellt wurde, konnte durch den Selektionsprozess mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin eine erhöhte durchschnittliche Expression des Fgfr4 in den behandelten Klonen festgestellt werden.

Dies trifft sowohl auf die Zelllinie MDA-MB453 (Tabelle 1) als auch auf MDA-MB231 (Daten nicht gezeigt) zu.

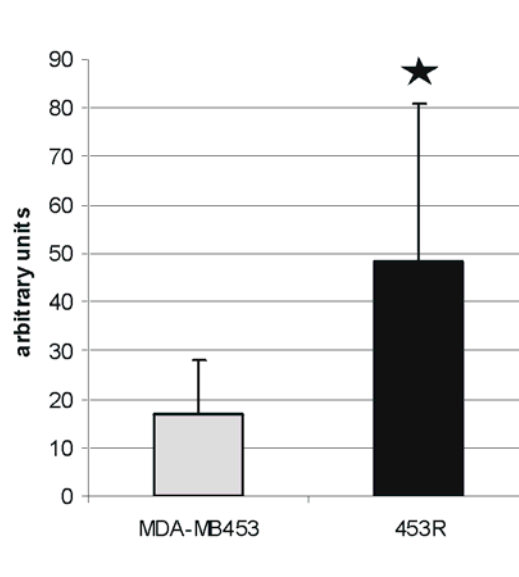


Abb. 44A: Genexpression des Fgfr4 in der Ausgangszelllinie MDA-MB453 (durchschnittliche Expression aus 10 Arrayexperimenten) und apoptoseresistenten Klonen (durchschnittliche Expression aus 52 Arrayexperimenten).

Das Fgfr4-Niveau variiert stark zwischen den Klonen, jedoch ist die durchschnittliche Expression 2-fach über den Schwellenwert (durchschnittliche Expression + 3 x Standardabweichung) gestiegen.

Betrachtet man die Fgfr4-Expression der einzelnen Klone, so kann man feststellen, dass bei etwa der Hälfte (9 Klone) eine mehr als dreifache Induktion (maximale Induktion 7-fach in Klon R1) vorliegt, wogegen bei der anderen Hälfte die Expression, wenn überhaupt, nur leicht erhöht ist (Abb. 44B).

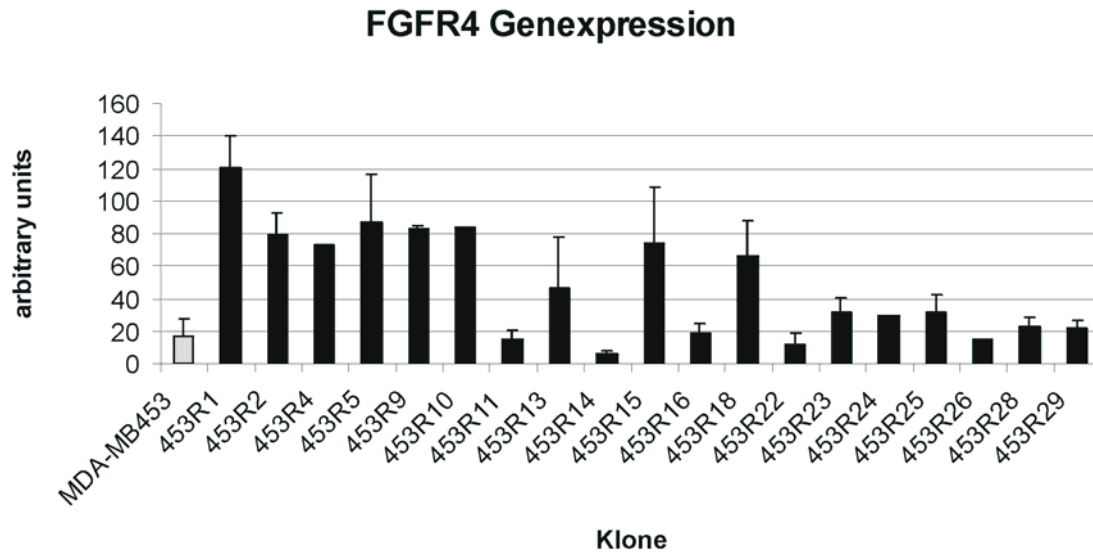


Abb. 44B: Durchschnittliche Genexpression des *Fgfr4* in 10 unabhängigen Präparationen der Ausgangszelllinie MDA-MB453 sowie deren resistenter Klone.

Die Expression der Zelllinie MDA-MB231 und ihrer Klone zeigt ein ähnliches Bild. Die durchschnittliche Genexpressionserhöhung liegt hier ebenfalls bei Faktor 2 (maximal 12-fach in Klon 231R14; Daten nicht gezeigt). In den ebenfalls untersuchten Brustkrebszelllinien BT474 und MDA-MB468 konnte keine signifikante Erhöhung der *Fgfr4*-Expression in den DXR-behandelten Klonen festgestellt werden. Die verstärkte Genexpression des *Fgfr4* kann zum einen durch eine Amplifikation des genomischen Locus zu Stande kommen, oder aber durch Erhöhung der Transkription des Gens.

Betrachtet man den genomischen Locus des *Fgfr4* in diesen chemoresistenten Zellen so kann man dort keine Amplifikation erkennen (Abb. 45). Als Ladekontrolle diente hierbei ein unspezifisches Signal.

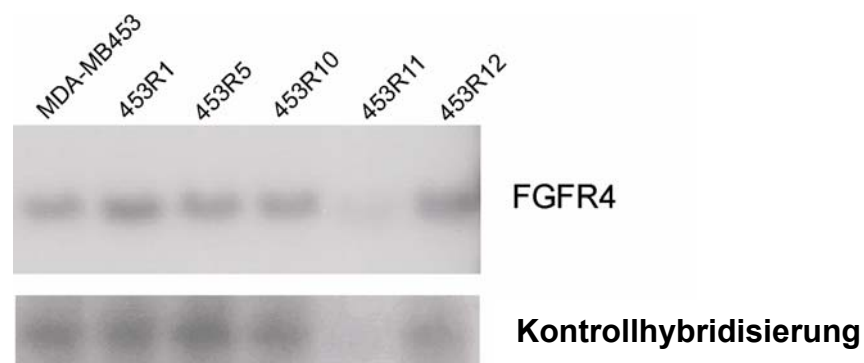


Abb. 45: Southernblot des *fgfr4*-Locus

Da die Klone eine Behandlung mit DXR überstanden haben, stellt sich die Frage inwiefern die Fgfr4-Expression die Chemoresistenz von Krebszellen beeinflussen kann. Dazu wurde die Korrelation der Fgfr4 Expression in den verschiedenen Klonen mit der Apoptosesensitivität untersucht.

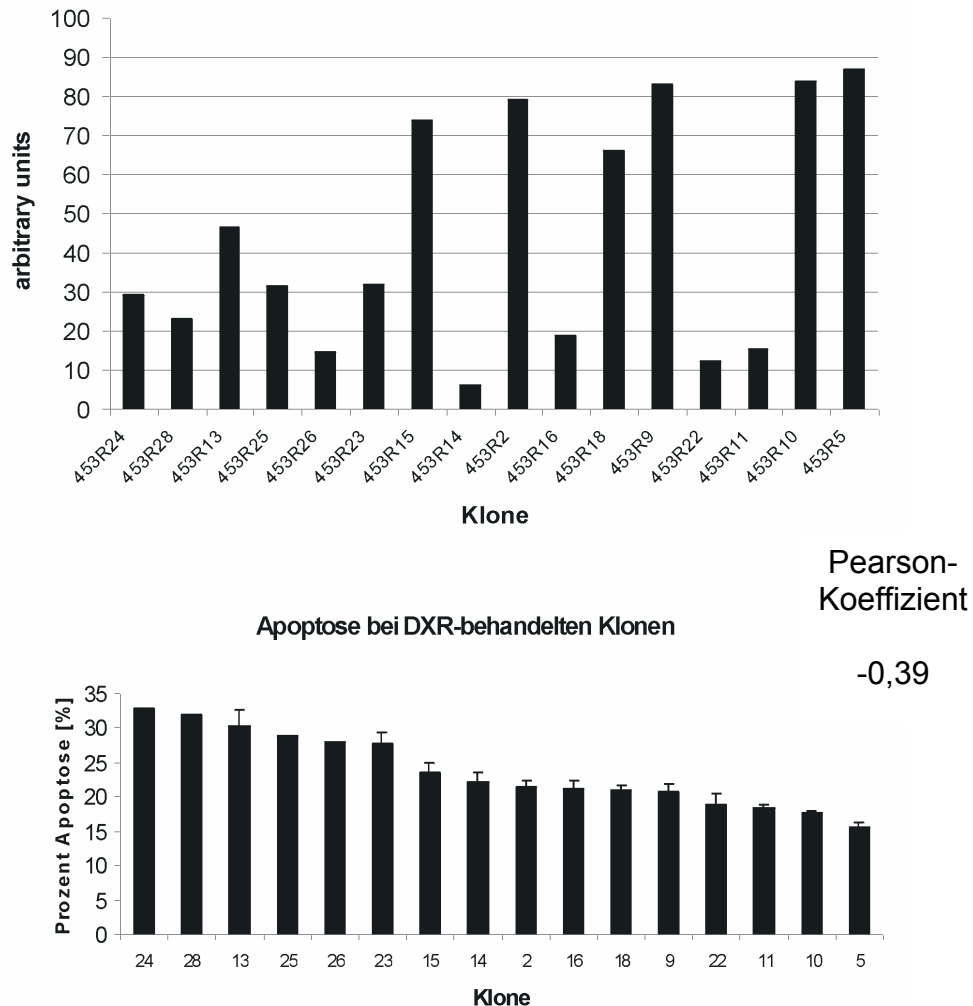


Abb. 46: Korrelation der Fgfr4-Expression mit der Apoptosesensitivität. Oberes Diagramm zeigt die FGFR4-Expression der Klone geordnet nach ihrer Apoptosesensitivität (absteigend). Unteres Diagramm zeigt die Apoptosesensitivität der Klone (absteigend).

Es wurde beobachtet, dass mit steigenden Fgfr4-Expression die Apoptosesensitivität sinkt. Die Pearson-Korrelation hierfür beträgt $-0,39$, was ein Hinweis auf die Beteiligung des Fgfr4 an der Ausbildung der Apoptoseresistenz von Krebszellen sein kann.

3.3.3. Die Fgfr4-Überexpression erhöht die Apoptoseresistenz in MCF7 Brustkrebszellen

Um die Beteiligung des Fgfr4 an der Ausbildung der Apoptoseresistenz näher studieren zu können, wurden MCF7-Zellen mit einer stabilen Überexpression des Fgfr4 verwendet. Wie in der Einleitung auf Seite 101 beschrieben spielt der Polymorphismus von Glycin 388 zu Arginin eine wichtige Rolle bei der Fgfr4-abhängigen Zellmigration. Durch die stabile Überexpression beider Fgfr4-Allele in MCF7-Zellen kann eine unterschiedliche Beteiligung dieses SNPs bei der Apoptoseresistenz untersucht werden. Diese Zellen wurden von J. Bange hergestellt (Bange et al., 2002). Die MCF7 Brustkrebszelllinie besitzt eine nur sehr geringe endogene Expression des Fgfr4, die nur in Array-Experimenten nachweisbar ist (s. Abb. 40). Die stabile Überexpression des Fgfr4 mit Glycin- oder Arginin-Allels konnte im Westernblot nachgewiesen werden.

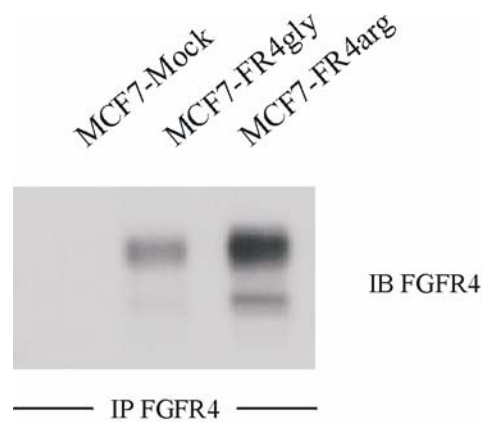


Abb. 47: Westernblot der Fgfr4-Expression in MCF7 Zellen (polyklonal)

In verschiedenen Publikationen konnte eine erhöhte Wachstumsrate der Fgfr4-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Kosiczak, 2002). Daher wurde die Proliferation der verschiedenen polyklonalen MCF7-Zellen untersucht. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied beim Wachstum der verschiedenen Zelllinien festgestellt werden (Abb. 48).

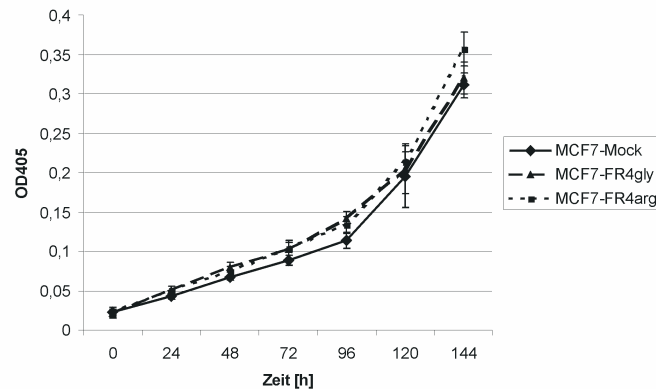


Abb. 48: Wachstum der polyklonalen, Fgfr4-überexprimierenden (FR4gly, FR4arg) Brustkrebszelllinie MCF7 und der mit leerem Vektor infizierten Zellen (Mock). Die Proliferation wurde mittels eines WST-Assays über 7 Tage bestimmt.

In dieser Zeitreihe wurde auch das Zellwachstum der MCF7-Brustkrebszellen mit oder ohne Fgfr4-Überexpression in Abhängigkeit des Chemotherapeutikums DXR untersucht (Abb. 49). Hier konnte gezeigt werden, dass Fgfr4 exprimierende Zellen weniger sensitiv auf das Chemotherapeutikum Doxorubicin reagieren.

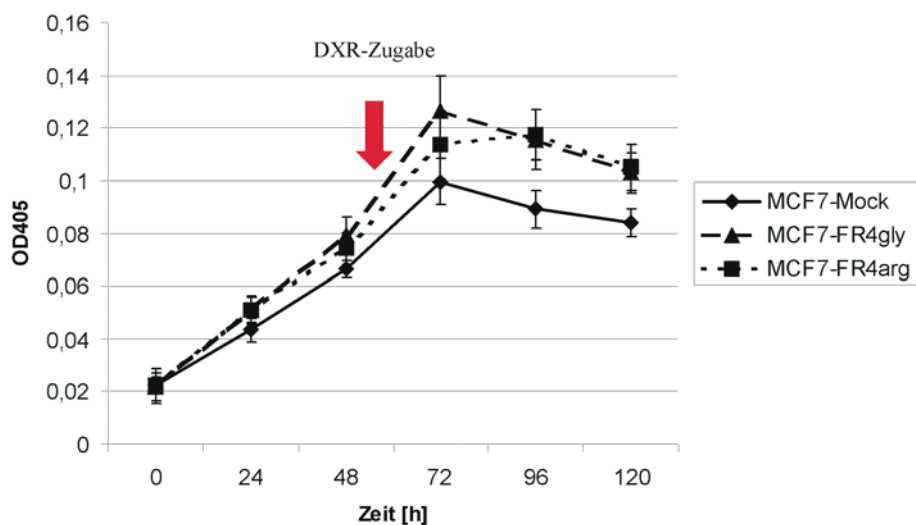


Abb. 49.: Wachstum der polyklonalen, Fgfr4-überexprimierenden (FR4gly, FR4arg) Brustkrebszelllinie MCF7 und der mit leerem Vektor infizierten Zellen (Mock) nach DXR-Behandlung (Zugabe von $2\mu\text{M}$ DXR nach 72h). Die Proliferation wurde mittels eines WST-Assays bestimmt.

Durch Induktion der Apoptose mit DXR in den mit leerem Vektor transfizierten Zellen (Mock) und den Fgfr4 überexprimierenden Zellen (FR4gly, FR4arg) sollte die Beteiligung des Fgfr4 an der Apoptoseresistenz untersucht werden.

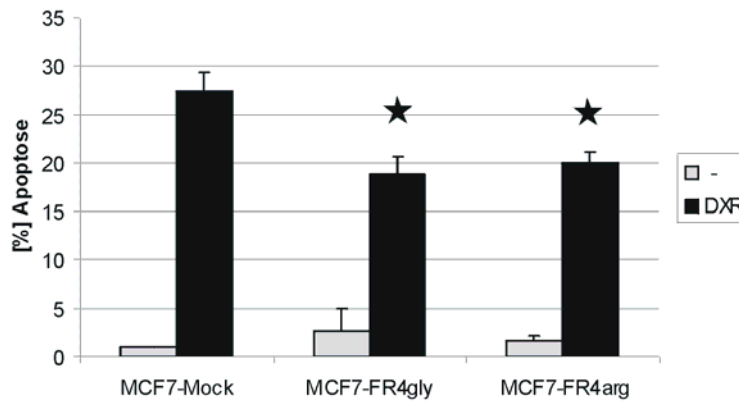


Abb. 50: Apoptoserate der Fgfr4 überexprimierenden MCF7-Zellen. Apoptose wurde für 48h mit 2 μ M DXR induziert und die Zellen in einem PJ-Assay analysiert

Hier konnte ein signifikanter Unterschied in der Resistenz beobachtet werden. Die Fgfr4-Überexpression zeigt in beiden Allelen eine Reduktion der Apoptoserate um ca. 10 Prozent (Abb. 50).

In einer Dosis-Wirkungskurve konnte ebenfalls die geringere Apoptoserate der Fgfr4-überexprimierenden Zellen (hier wurde nur der Glycin-Polymorphismus untersucht) im Vergleich zum Wildtyp (Mock) gezeigt werden (Abb. 51).

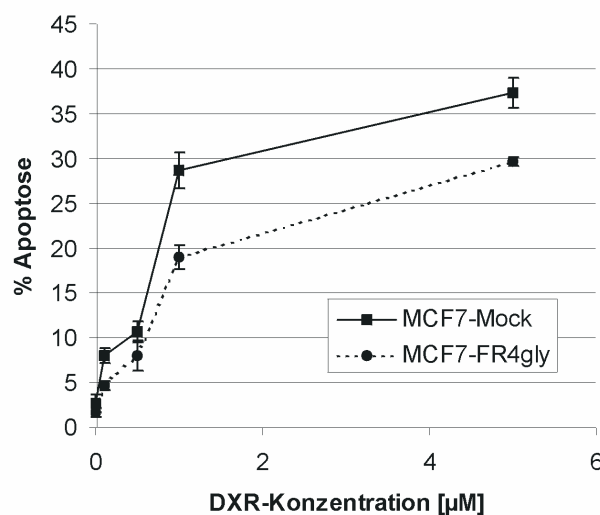


Abb. 51: Dosis/Wirkungskurve der polyklonalen MCF7-Zellen. Die Apoptoserate wurde mittels PJ-Assay nach Behandlung der Zellen für 48 h mit steigenden DXR-Konzentrationen gemessen.

3.3.4. „Knock-down“ des Fgfr4 resultiert in verminderter Chemoresistenz

Um die Auswirkung einer erhöhten Fgfr4-Expression auf die Apoptosesensitivität weiter zu untersuchen wurde in den chemoresistenten Klonen 453R1 und 453R9 (s. Ergebnisse 3.1.) mittels siRNAs die Proteinexpression des Rezeptors unterdrückt. Dazu wurden verschiedene siRNAs entworfen und stabil in das Genom der Zelllinien 453R1 und 453R9 integriert. Diese Zellen wurden von Hans-Jürgen Berger (diese Abteilung) generiert.

Abb.52 zeigt eine Immunpräzipitation des Fgfr4 in der Zelllinie 453R1 mit verschiedenen stabil exprimierenden siRNAs.

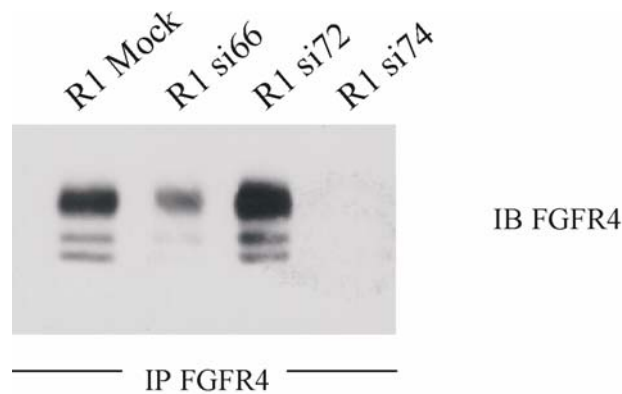


Abb.52: Expression des Fgfr4 nach stabiler siRNA-Infektion.

Der Immunoblot zeigt eine erfolgreiche Unterdrückung der Fgfr4-Expression in der Zelllinie R1si66 und eine nahezu hundertprozentige bei R1si74. Die Zelllinie R1si72 wurde in weiteren Versuchen als Kontrolle verwendet für die Expression einer unspezifischen siRNA. Für die Zelllinie 453R9 wurden ähnliche Fgfr4-Expressionslevel ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die mit siRNA stabil infizierten Zellen zeigen auch deutliche morphologische Unterschiede. Während die Zellen ohne reduzierte Fgfr4-Expression die runde Grundstruktur der MDA-MB453 Brustkrebszelllinie beibehielten, zeigen die meisten der mit siRNA-74 infizierten Zellen eine deutliche Veränderung. Die Zellen besitzen eine spindelartige Form mit dendritischen Ausläufern und erinnern eher an Nervenzellen (Abb. 53).

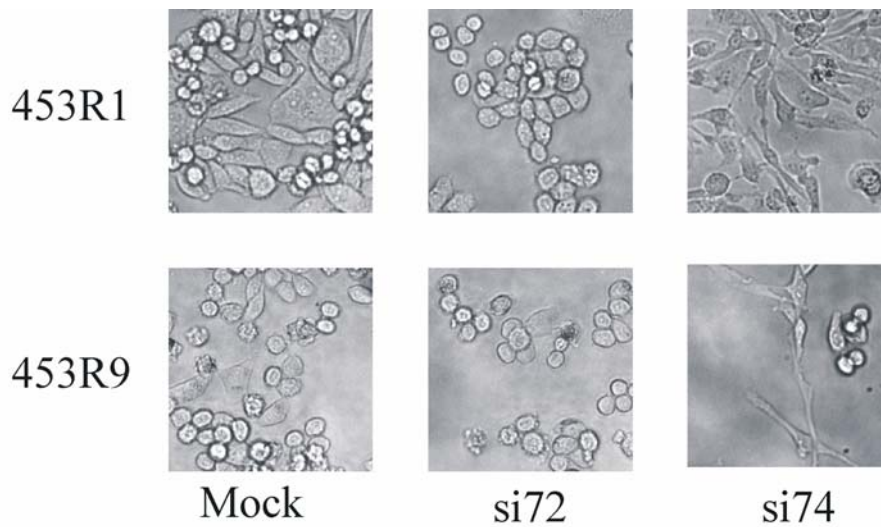


Abb. 53: Phasenkontrastaufnahmen der mit siRNA infizierten 453R1 und -R9 Zellen

Die Induktion der Apoptose durch das Chemotherapeutikum Doxorubicin löste in den mit Leervektor infizierten Zellen (R1Mock und R9Mock) ca. 30 % Apoptose aus, während die Zelllinien ohne Fgfr4-Expression eine deutlich höhere Apoptoserate zeigen.

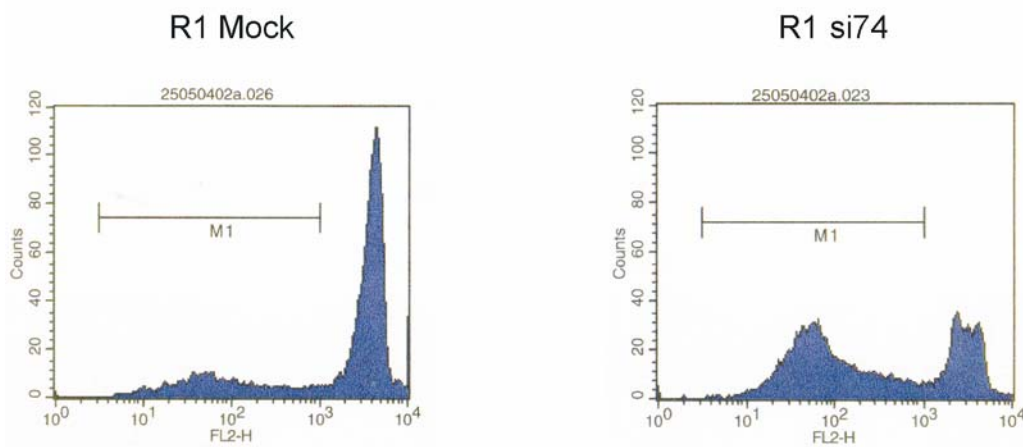


Abb. 54: Diagram der PJ-FACS-Analyse zeigt die Zellzyklusverteilung nach DXR-Behandlung (2 μ M für 48h). M1 gibt den Bereich der subG1/0-Phase, der die apoptotischen Zellen umfasst.

Betrachtet man nun die Apoptoseraten in den vier Zelllinien mit unterdrückter Fgfr4-Expression (R1si66, R1si74, R9si66 und si74), so kann man die Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen (R1Mock, R1si72, R9Mock und R9si72) erkennen. In mit

siRNA-74 behandelten Zellen kann eine deutlichere Erhöhung der Apoptoserate als in den siRNA-66-Zellen beobachtet werden. Ebenso sind die Effekte in R1 größer als in R9. Dies spricht für einen von der Fgfr4-Dosis abhängigen Effekt, da in R1 der Fgfr4 höher exprimiert ist und die siRNA-74 eine nahezu hundertprozentige Unterdrückung der Expression auslöst.

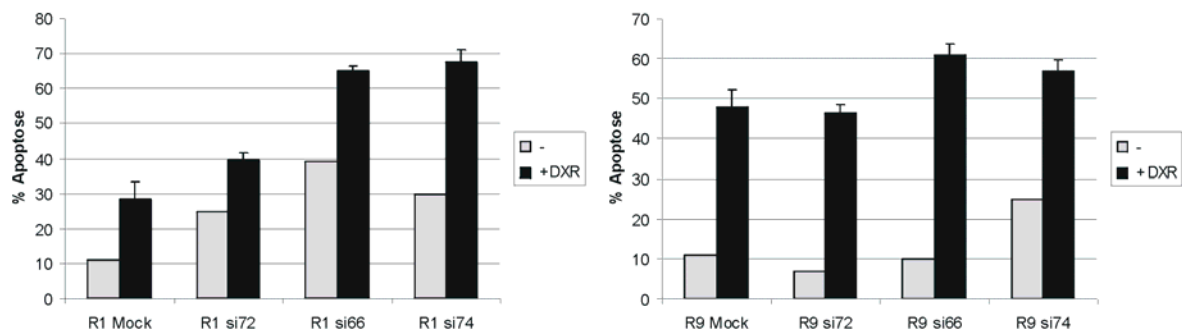


Abb. 55: Apoptoserate der Fgfr4 si RNA-Zellen (R1/9 si74 und si66 knock down; R1/9 si72 und Mock Kontrolle). Apoptose wurde für 48h mit 2 μ M DXR induziert und die Zellen in einem PJ-Assay analysiert

Daraus kann geschlossen werden, dass die Überexpression des Fgfr4 zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führt. Diese Ergebnisse konnten mittels Knock-down der endogenen Fgfr4-Expression in der Nierenkarzinomzelllinie 769-P bestätigt werden (persönliche Kommunikation H.J. Berger).

3.3.5. FGFR4 erhöht die durch verschiedene Chemotherapeutika induzierte Apoptoseresistenz

Die große Bandbreite der Wirkungsmechanismen von verschiedenen Chemotherapeutika wirft die Frage auf, ob der oben gezeigte Anstieg der Apoptoseresistenz Doxorubicin-spezifisch ist, oder die Fgfr4-Expression eine allgemeine Chemoresistenz ausbilden kann. Hierfür wurden die Fgfr4-Überexpressionzelllinie MCF7-FR4gly sowie die „Fgfr4-knock-down“-Zellen 453R1si66 und -si74 und deren Kontrollen mit den Chemotherapeutika Taxotere (TXT), Cyclophosphamid (CPA) und Cisplatin (CP) behandelt (Abb. 56).

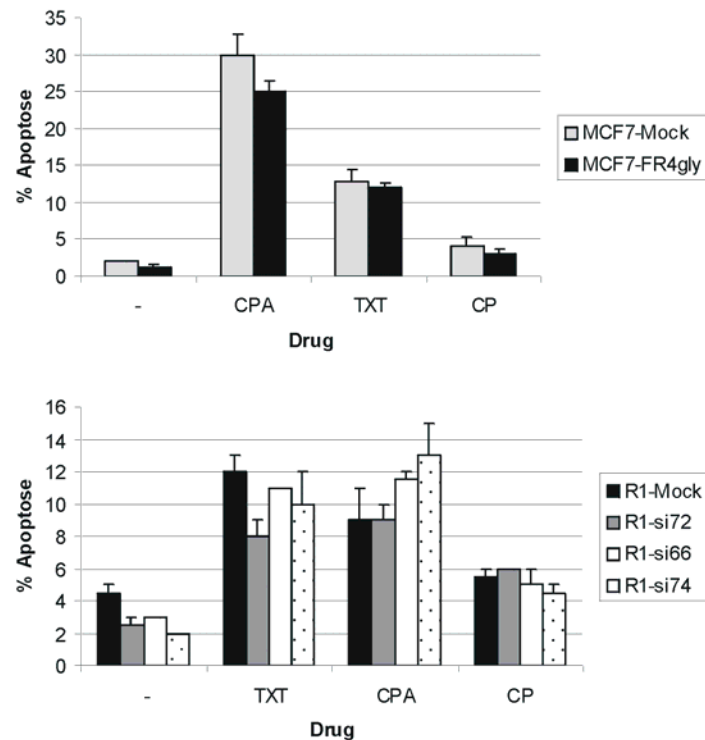


Abb. 56: Apoptoserate der MCF7- und R1-Zellen nach Induktion mit TXT (Taxotere), CPA (Cyclophosphamid) und CP (Cisplatin) für 48 h. Die Apoptoserate wurde mittels PJ-Assay gemessen.

Betrachtet man Abbildung 56, so kann man nur bei CPA einen deutlichen Unterschied in der Apoptoserate feststellen. Die Fgfr4-Überexpression in MCF7-Zellen führt hier zu einer verminderten Apoptoserate, wobei der Knock-down der Fgfr4-Expression in 453R1si66 und -si74 zu einer Erhöhung führt (jeweils im Vergleich zur Kontrollzelllinie). Dies deutet darauf hin, dass Doxorubicin und Cyclophosphamid ähnliche Wirk- oder Resistenzmechanismen besitzen.

4. Diskussion

4.1. Identifikation antiapoptotischer Mechanismen

Die Entwicklung einer Zelle vom normalen zum neoplastischen Zustand ist ein mehrstufiger Prozess, an dem Veränderungen in einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt sind. Die Therapie dieser malignen Veränderungen basiert derzeit auf den klassischen chemotherapeutischen Agenzien. Dies führt zur Schädigung aller schnellproliferierenden Zellen eines Organismus und hat daher schwere Nebenwirkungen. Trotz dieser unspezifischen Wirkungsweise der Chemotherapie entstehen resistente Tumoren, deren Behandlung sich weiter verkompliziert. Erhöhte Genexpression auf Grund von Genamplifikationen oder erhöhter transkriptioneller Aktivität spielen in der Resistenzausbildung wie in der Tumorigenese eine bedeutende Rolle. In der Literatur existieren einige Studien, die durch Genexpressionsvergleich von sensitiven und resistenten Tumoren und Zellen Gene und Gencluster identifizieren konnten, die wichtig für die Ausbildung der Resistenzen sind (Jazaeri et al., 2005; Oshita et al., 2004; Suganuma et al., 2003; Weldon et al., 2002). Nachteil all dieser Studien ist eine geringe Zahl an Experimenten bzw. Patienten im Vergleich zu der Menge an untersuchten Genen. Beispielsweise können mit „whole genome chips“ über 60.000 Genexpressionsprofile untersucht werden. Bei nur 20 Experimenten/Patienten entsteht ein statistisches Problem. Um statistisch brauchbare Daten zu erhalten, ist die Reproduktion der Arrayexperimente nötig. Dies scheitert meistens an der Verfügbarkeit des biologischen Materials sowie am finanziellen Aufwand. In dem hier beschriebenen Ansatz konnten diese Probleme umgangen werden, da resistent gemachte Zelllinien, von denen unlimitierte Mengen an Material zur Verfügung stehen, verwendet wurden. Auch durch die Produktion eines eigenen Arrayanalyse-Systems konnte der finanzielle Aufwand relativ gering gehalten werden. Dies ermöglichte die wiederholte Analyse von über 30 resistenten Klonen und deren Ausgangszelllinien. Durch die Fokussierung der Filterproben auf Signaltransduktionsmoleküle und wichtige Marker der Apoptose und Tumorigenese konnte das statistische Ungleichgewicht zwischen Genen und Experimenten etwas abgeschwächt werden. Mit den hier verwendeten Arrays konnten alle bisher

publizierten Kinasen (Manning et al., 2002) und Phosphatasen (Alonso et al., 2004) untersucht werden.

Ein weiterer Punkt, den viele Studien nicht berücksichtigen, ist der individuelle genetische Hintergrund der Tumorbiopsien. Wie in der Einleitung beschrieben, entwickeln sich Tumoren durch einen evolutionären Prozess. Daher ist die Expression der einzelnen Gene von einer Vielzahl von Parametern während der Tumorprogression abhängig, also individuell unterschiedlich. Weiter verkompliziert sich die Betrachtung der Genexpressionen verschiedener Tumoren noch durch die Heterogenität des Tumors. So unterscheidet sich die Expression von Genen an der Peripherie und im Inneren dramatisch. Eingewanderte hämatopoetische Zellen sein hier nur am Rande erwähnt. Diese Faktoren machen den Vergleich von Tumoren mit normalen Geweben extrem schwer und lassen auch nur sehr dominante Genexpressionsmuster erkennen. Dies ist wahrscheinlich einer der Gründe für die unterschiedlichen prognostischen Gencluster die bisher publiziert wurden (vergleiche beispielsweise (Perou et al., 1999; Sorlie et al., 2001; van 't Veer et al., 2002)).

In dieser Arbeit wurde versucht, diese Komplexität etwas zu verringern, indem von einer gut charakterisierten Ausgangszelllinie mit definiertem genetischem Hintergrund resistente Klone generiert wurden. Es gibt bereits einige Studien, die apoptoseresistente mit apoptosesensitiven Zellen verglichen haben. Allerdings wurden hier nur wenige Klone untersucht und meist nur von einer Zelllinie. Auch spielt die Art und Weise wie die Klone generiert wurden eine entscheidende Rolle. So sollten hier die Bedingungen während einer Chemotherapie so gut wie möglich simuliert werden. Dabei können die Patienten nicht über einen längeren Zeitraum mit Chemotherapeutika behandelt werden, da sonst die Nebenwirkungen zu groß würden. Daher wurde DXR nur für 48 Stunden auf die Zellen gegeben. Damit sollte auch die schon gut charakterisierte Chemoresistenzbildung durch Effluxpumpen wie Mdr1, Bcrp etc. verhindert werden. Die Entwicklung von Chemoresistenz kann, je nach Zelllinie, auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Ziel dieser Arbeit war es, möglichst viele verschiedene Resistenzmechanismen, die von Signaltransduktionsmolekülen stammen, zu identifizieren.

Betrachtet man die Verteilung der Expression eines Gens in den Klonen, erkennt man unterschiedliche Mechanismen. Bei einigen Genen zeigt sich eine gleichmäßig hohe Expression in allen resistenten Klonen, was für einen generellen Mechanismus der Zelllinie spricht (vgl. Her3-Expression). Bei anderen Genen hingegen zeigt sich

eine sehr starke Expressionserhöhung nur in sehr wenigen Klonen (vgl. Bmx-Expression). Dies deutet auf einen speziellen Mechanismus hin, der eher selten auftritt. Leider werden diese Mechanismen mit den hier gewählten Datenanalyseverfahren nicht ausreichend detektiert, da die mittlere Erhöhung der Genexpression über alle Klone Vorrang hat. Die speziellen Resistenzmechanismen könnten mit anderen Datenanalyseverfahren besser identifiziert und weiter untersucht werden.

Bei den 30 resistenten Klonen aus vier verschiedenen Brustkrebszelllinien konnten folgende Gene identifiziert werden, die gemeinsam eine erhöhte Expression aufweisen (vgl. Tab. 10).

Als resistent wird im nachfolgenden ein Klon bezeichnet, der eine signifikant verringerte Apoptoserate im Vergleich zur Ausgangszelllinie aufweist.

	Genzahl	Genname	Klassifizierung	Anti-/Proapoptotisch
Erhöhte Genexpression in drei Zelllinien	2			
		BMX	PTK	antiapoptotisch
		PSSLARE (CDK5)	STK	antiapoptotisch
Erhöhte Genexpression in zwei Zelllinien	13			
		NoName001 (Cark, TNNI3K)	PTK	unbekannt
		Fes	PTK	antiapoptotisch
		PLCgamma2	Lipase	antiapoptotisch
		Amphiregulin	Ligand	antiapoptotisch
		Dyrk4	DSPK	unbekannt
		KAP1	PTP	unbekannt
		Timp1	MMP-Inhibitor	antiapoptotisch
		MMP9	MMP	antiapoptotisch
		MMP2	MMP	antiapoptotisch
		Adam15	MMP	antiapoptotisch
		MHC1	Immunrezeptor	unbekannt
		Cadherin12	Adhäsion	unbekannt

Tabelle 10: Aufstellung der in den resistenten Klone gemeinsam hochregulierten Gene

Die Funktion und Rolle jedes einzelnen Gens zu diskutieren würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Daher wird sich die Diskussion exemplarisch auf die Analyse interessanter Gene mit erhöhter Expression und gemeinsam regulierter Signalwege beschränken. Auch bleiben Gene mit verringerter Expression hier meist unberücksichtigt, da die Überexpression ein vermeintlich wichtigerer Resistenzmechanismus zu sein scheint.

Die beiden am häufigsten überexprimierten Gene sind Bmx und Psslare (Cdk5). Bmx ist eine Proteintyrosinkinase (PTK), die zur Familie der Tec-Kinasen gehört. Tec-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei Antiapoptose, Wachstum und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen, da sie durch Wachstums- und Differenzierungsstimuli aktiviert werden können. Wichtiges Strukturmerkmal dieses Proteins ist eine PH-Domäne mit der Phospholipide, wie etwa PIPs gebunden werden kann. Diese Bindung rekrutiert diese PTKs zur Zellmembran (Mano, 1999; Smith et al., 2001). In Lymphozyten sind diese Kinasen an der Signaltransduktion nach Antigenstimulation beteiligt. Dabei stellen sie das Überleben der aktivierten Zelle sicher (Schmidt et al., 2004). In Brustepithelzellen konnte gezeigt werden, dass Bmx ein Effektor der PI3Kinase ist und Pak1 aktiviert. Transfiziert man nicht-invasive MCF/-Zellen mit Bmx, kann verstärkte Zellproliferation beobachtet werden. Ebenso kann die Transfektion von dominant-negativem Bmx die Proliferation von MDA-MB435-Zellen inhibieren (Bagheri-Yarmand et al., 2001). Die Aktivierung von Bmx führt zu einer Induktion der Vegf-Expression über Erk- und PI3K-abhängige Signalwege in Epithel- und Endothelzellen (Chau et al., 2002). Dies verstärkt antiapoptotische Signalwege und kann zu einer Insensitivität für Chemotherapeutika führen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die antiapoptotische Kinase Pim1 an Bmx über dessen SH3-Domäne bindet. Dies führt zur Aktivierung von Bmx (Xie et al., 2005). Für Pim1-Überexpression konnte bereits in Prostatakrebs eine Resistenz für Chemotherapeutika gezeigt werden (Dhanasekaran et al., 2001). Im Übrigen konnte Pim1 auch in dieser Arbeit in BT474 als Gen mit erhöhter Expression in resistenten Klonen identifiziert werden. In einer weiteren Publikation konnte eine Bindung von Bmx an p53 nach chemotherapeutischer Behandlung nachgewiesen werden, was zur Inhibition der BMX-Aktivität und somit zur p53-vermittelten Apoptose führt (Xie et al., 2005). Diese Publikationen und die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine wichtige Funktion von Bmx in der Chemoresistenz.

Betrachtet man die Gene mit erhöhter Expression, so ist auffällig, dass viele verschiedene Liganden der Egfr-Familie in resistenten Klonen verstärkt exprimiert werden. Beispielsweise wurde in MDA-MB453-Klonen Betacellulin und Heregulin alpha, in MDA-MB231-Klonen HB-EGF und Amphiregulin sowie in MDA-MB468-Klonen Amphiregulin verstärkt exprimiert. Dagegen konnte eine Erhöhung der Egfr-Familienmitglieder nur in MDA-MB453 (Her3) in MDA-MB231 (Her2) und in BT474 (Her4) festgestellt werden. Die Mitglieder der EGFR-Familie sind Beispiele für

Signalmoleküle, die eine dominierende Funktion bei der Entstehung von Brustkrebs besitzen. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Beweisen erbracht worden, dass Her2 in 30% der Patienten mit Brustkrebs amplifiziert/überexprimiert ist und dieses eine schlechte klinische Prognose zur Folge hat. Daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Signalweg sehr oft in resistenten Klonen verstärkt wird. Keine der untersuchten Zelllinien kommt ohne eine Expressionserhöhung dieser RTKs oder ihrer Liganden aus. An dem Muster der Überexpression der verschiedenen Liganden und Rezeptoren kann der Hauptsignalweg der Zelllinien erkannt werden. So zeigen MDA-MB453-Zellen eine verstärkte Expression von Her3 und der Liganden Betacellulin und Heregulin alpha, die eine hohe Affinität zu Her2/Her3-Heterodimeren und Her2/Her4-Heterodimere aufweisen (Jones et al., 1999). Hier wird also der dominierende Her2 Signalweg weiter verstärkt. MDA-MB468-Zellen weisen bereits eine starke Egfr-Expression auf. Bei diesen resistenten Klonen wird durch die erhöhte Expression von Amphiregulin, was den Egfr stimuliert (Yarden and Sliwkowski, 2001), dieser Signalweg verstärkt. Diese Beobachtungen decken sich mit einer Publikation von Sorensen und Kollegen die zeigen konnten, dass nach Behandlung von Blasenkrebszellen mit VP16 die Liganden der Egfr-Familie erhöht exprimiert werden. Auch hier wurde eine mehr als 100-fache Induktion von Amphiregulin beobachtet. Für HB-EGF und Epiregulin wurde ebenfalls eine erhöhte Expression gefunden. Die Expressionslevel der Rezeptoren wurden dagegen leicht reduziert (Sorensen et al., 2005).

Betrachtet man die Anzahl der gemeinsam regulierten Gene der Brustkrebszelllinien, so kann sowohl für die induzierte als auch reprimierte Expression beobachtet werden, dass bei den Linien MDA-MB453 und BT474 die meiste Übereinstimmungen zu finden sind. Beide Brustkrebszelllinien zeigen eine sehr hohe Her2-Expression.

In einer anderen Arbeit von Ute Richter (diese Arbeitsgruppe) wurden BT20 Brustkrebszellen mit den verschiedenen Chemotherapeutika Doxorubicin, Cyclophosphamid und Taxotere behandelt, resistente Klone generiert und die Expressionsprofile von Ausgangszelllinie und Klonen verglichen (Richter, 2005). Hier konnte beobachtet werden, dass die Übereinstimmung der gemeinsam regulierten Gene bei der gleichen Zelllinie, behandelt mit verschiedenen Chemotherapeutika, größer war, als zwischen den verschiedenen Zelllinien behandelt mit dem selben Chemotherapeutikum (diese Arbeit).

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass bei der chemotherapeutischen Behandlung von Tumorzellen der genetische Hintergrund, zumindest *in vitro*, das Muster der differentiell exprimierten Gene bzw. Resistenzmechanismen vorgibt. Dies unterstreicht die große Bedeutung des genetischen Hintergrunds für die Chemotherapie. Daher sollte der individuelle genetische Hintergrund eines Tumors vor einer Chemotherapie sorgfältig bestimmt werden.

4.2. Syk, ein Gen mit verminderter Expression

Die PTK Syk wurde in dem vorne beschriebenen Ansatz zur Identifizierung antiapoptotischer Mechanismen als ein Gen mit reduzierter Expression in den resistenten Klonen identifiziert. Da Syk in der Literatur zu diesem Zeitpunkt bereits als Tumorsuppressor diskutiert wurde und in dieser Abteilung Zelllinien und Konstrukte existierten, wurde die Rolle von Syk in der Chemoresistenz weiter untersucht. Auch die Diskrepanz zwischen der genau untersuchten Rolle dieser PTK im hämatopoetischen System und der unbekanntenen Funktion in Epithelzellen lieferte Argumente für weitergehende Analysen.

In den invasiven Brustkrebszelllinien konnte keine oder nur eine sehr geringe Expression von Syk detektiert werden, während in nichttransformierten und transformierten aber nicht-invasiven Brustzelllinien Syk-Transkripte nachweisbar waren. Diese Unterschiede wurden in den durchgeführten Westernblotanalysen noch deutlicher, denn in keiner der untersuchten invasiven Brustkrebszelllinien konnte Syk nachgewiesen werden. Die Daten bestätigten Ergebnisse von Coopman und Kollegen, die zeigten, dass der Verlust von Syk mit erhöhtem Tumorwachstum und Metastasierung von Brustkrebszellen korreliert (Coopman et al., 2000). Durch die Oncomine-Datenbanksuche konnten diese Resultate weiter bestätigt werden. So wird Syk in einer Reihe nicht-hämatopoetischer Gewebe exprimiert und in den korrespondierenden Tumoren unterdrückt. Dies deutet auf eine wichtige tumorsuppressive Rolle der PTK Syk in verschiedenen Geweben hin.

Syk tritt in Brustepithelzellen, ebenso wie in den Zellen des hämatopoetischen Systems (Latour et al., 1996; Latour et al., 1998), in zwei verschiedenen Isoformen, Syk und SykB, auf. In den verschiedenen Zelllinien konnte aber keine Korrelation zwischen dem Auftreten der einen bzw. der anderen Isoform und krebisrelevanten Eigenschaften der Zellen beobachtet werden. Dies steht im Widerspruch zu den von Wang et al. veröffentlichten Daten, die eine erhöhte Expression der kürzeren Isoform von Syk, SykB, in Brustkrebszellen und Primärtumoren der Brust beobachteten (Wang et al., 2003). Wang und Kollegen zeigten zusätzlich, dass Syk mittels einer Kernlokalisationssequenz innerhalb der Interdomäne B, die in SykB infolge alternativen Spleißens zerstört wird, im Kern nachgewiesen werden kann. Die bloße

Kernlokalisierung von Syk scheint dabei zur Unterdrückung der Invasivität von Brustkrebszellen auszureichen. Die in dieser Arbeit untersuchten MCF-10A-Zellen exprimieren jedoch entgegen der publizierten Daten von Wang et al. beide Isoformen in vergleichbaren Mengen.

Für Syk wurde bereits eine Funktion in der Brustkrebsprogression und Invasion impliziert (Coopman et al., 2000; Wang et al., 2003), über die Funktion in normalen Mammaepithelialzellen ist jedoch bis heute wenig bekannt. In dieser Arbeit konnte Syk als Gen mit reduzierter Expression in chemoresistenten Klonen identifiziert werden. So wurde in beiden Syk-endogen exprimierenden Brustkrebszelllinien MDA-MB468 und BT474 die Syk-Expression signifikant vermindert.

Um weiteren Aufschluss über die biologische Funktion von Syk zu erhalten, sollte die Funktion dieser PTK bei der Apoptoseresistenz bestimmt werden. Arbeiten von Anja Ruschel (diese Arbeitsgruppe) zeigten, dass die Unterdrückung der endogenen Expression von Syk in nichttransformierten Brustepithelzellen eine erhöhte EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Egfrs vermittelte, während die exogene Expression von katalytisch-aktivem Syk diese reduzieren konnte. Ferner konnte gezeigt werden, dass reduzierte Syk-Level die EGF-stimulierte Tyrosinphosphorylierung von Signalproteinen steigerte und somit die Proliferationsrate nichttransformierter Brustepithelzellen sowie deren Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhte. Aufbauend auf diesen Daten kann eine Funktion von Syk in der Regulation von Egfr-vermittelten Signalen in Brustepithelzellen postuliert werden. Die gesteigerte autokatalytische Aktivität von Syk *in vitro*, die durch die chemische Inhibition der Egfr-Kinase erzielt werden konnte, sowie die nachgewiesene Assoziation beider Proteine, wenn überexprimiert, suggerieren ebenfalls einen wechselseitigen Einfluss von Syk und Egfr (Ruschel and Ullrich, 2004).

Daher wurde die endogene Assoziation zwischen Syk und Mitgliedern der Egf-Rezeptor-Familie untersucht. Zusätzlich konnte zur bereits postulierten Syk/Egfr-Interaktion eine Bindung von Syk an Her2 gefunden werden. Dies ist bei der Zelllinie BT474 der Fall, die eine sehr hohe endogene Her2-Expression aufweist. Das inverse Experiment (Immunpräzipitation mit Syk und Immunoblot gegen Her2) bestätigte diesen Befund.

Es konnte jedoch nicht eindeutig belegt werden, ob es sich um eine direkte oder indirekte Interaktion von Syk und Egfr/Her2 handelt. Aufgrund der schwachen

Assoziation konnte nur eine indirekte Wechselwirkung, die weitere Signalproteine einschließt, vermutet werden. Diese Interaktionen könnten über die zehn Autophosphorylierungsstellen innerhalb der Interdomänen bzw. die SH2-Domänen von Syk vermittelt werden. In hämatopoetischen Zellen konnten bereits eine Reihe von Syk-spezifischen Substraten und Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Sada et al., 2001), wobei davon ausgegangen werden muss, dass sich die Funktion von Syk in Brustepithelzellen grundlegend von jener in Blutzellen unterscheidet.

Da gezeigt werden konnte, dass eine Repression von Syk mittels siRNAs die Tyrosinphosphorylierung des Egfr erhöht (Ruschel and Ullrich, 2004) und chemoresistente Klone mit reduzierter Syk-Expression selektiert wurden (diese Arbeit), wurde nun untersucht ob die Expression von Syk negative Folgen auf den Egfr-Signalweg und das Überleben von Krebszellen hat. Dazu wurde Syk stabil in der nichttransformierten Brustzelllinie MCF-10A, die ein etabliertes Modellsystem für normale humane Brustzellen darstellt, exprimiert. Diese Zelllinie konnte durch spontane Immortalisierung isoliert werden und ähnelt Primärkulturen von normalen humanen Mammaepithelialzellen, zum einen hinsichtlich ihrer strikten Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, wie EGF und Insulin (Soule et al., 1990) und zum anderen in ihrem Unvermögen, Tumore im Nacktmausmodell zu bilden. Überexprimiert man Syk und induziert Apoptose mit Doxorubicin in diesen Zellen, so kommt es zur vollständigen Reduktion der Tyrosinphosphorylierung des Egfr. Bei der stabilen Überexpression von Syk in MDA-MB453 Zellen konnte der gleiche Effekt, wenn auch nicht so dramatisch, bei Her2 beobachtet werden.

Auch in der Arbeit von Anja Ruschel konnte eine geringe Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung von Her2 in den EGF-stimulierten Zellen mit reduzierter Syk-Expression beobachtet werden. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass HER2 infolge der Hyperaktivierung des Egfrs durch den Knock-down innerhalb der Egfr-Her2 Heterodimere in stärkerem Ausmaß transphosphoryliert werden kann. Da jedoch MDA-MB453 Zellen eine sehr geringe Egfr-Expression aufweisen, ist der Einfluss der gesteigerten Aktivierung des Egfrs in diesen Zellen fast auszuschließen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinphosphorylierung des Egfrs und von Her2 anscheinend nur von katalytisch-aktivem Syk reguliert wird. Die exogene Expression von Syk, jedoch nicht die einer katalytisch-inaktiven Mutante, bewirkte eine Reduktion an tyrosinphosphoryliertem Egfr/Her2. Die exogene Expression der katalytisch-inaktiven Mutante wirkte sich demnach nicht dominant-negativ auf

endogenes Syk aus und verursachte daher keinen erhöhten Level an tyrosinphosphoryliertem Egfr.

Unter den Bedingungen der stabilen Reduktion von Syk konnte gezeigt werden, dass die Hyperphosphorylierung des Egfrs ebenfalls in eine erhöhte Aktivierung der Map-Kinase Erk (Ruschel and Ullrich, 2004) bzw. der anti-apoptotisch wirkenden Proteinkinase Akt (Datta et al., 1997) resultierte. Eine deregulierte Aktivierung des Egfrs oder von Her2, z.B. infolge von Überexpression bzw. autokriner Stimulation, ist in Krebszellen häufig mit erhöhter Proliferation, Migration, Invasion, Tumorneovaskularisation bzw. Resistenz gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen assoziiert (Schlessinger, 2000). So zeigten MCF-10A Zellen mit reduzierten Syk-Leveln, wahrscheinlich aufgrund der verstärkten EGFR-abhängigen Signalvermittlung, im Vergleich zur Kontrollzelllinie eine Erhöhung in Wachstum und Proliferation (Ruschel and Ullrich, 2004). Auch in BT549-Zellen einer weiteren Brustkrebszelllinie konnte ein inhibitorischer Effekt der Syk-Expression auf das Wachstum beobachtet werden (Moroni et al., 2004). In dieser Arbeit konnte jedoch in vier verschiedenen Brustkrebszelllinien mit stabiler Syk- bzw. Syk-KR-Überexpression kein signifikanter Unterschied in der Proliferation festgestellt werden. Dies kann auf einen systematischen Fehler der stabilen Überexpression hindeuten. Die Zellen wurden über einen langen Zeitraum selektiert und waren, um klonale Effekte auszuschließen, polyklonal. So könnten kompensatorische Mechanismen in den Zellen etabliert worden sein, um die Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit durch die Syk-Expression wett zu machen. Bei Ruschel und Moroni wurden diese Probleme durch EGF-Stimulation oder transienter Expression mit einem GFP-markiertem Syk umgangen.

Im Gegensatz dazu konnten Unterschiede in der Apoptoserate beobachtet werden. So wurden MCF10A-Zellen durch eine weitere Syk-Expression für Apoptose durch DXR sensibilisiert. Die Kinase-inaktive Mutante zeigte hier keinen Effekt, was darauf hindeutet, dass die Egfr-Tyrosinphosphorylierung durch die Kinaseaktivität von Syk reduziert wurde. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass katalytisch-aktives Syk zur Apoptoseregulation in Brustepithelzellen befähigt ist. Gestützt wird diese Vermutung durch die Veröffentlichung von Mahabeleshwar und Kollegen, die zeigten, dass die Aktivität der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K), die die Aktivierung von Akt vermittelt (Brazil et al., 2002), in Brustkrebszellen durch Syk negativ reguliert wird (Mahabeleshwar and Kundu, 2003). Im Gegensatz dazu scheint

die Syk-abhängige Aktivierung von Akt hinreichend für das Überleben von B-Zellen in Folge von oxidativem Stress zu sein (Ding et al., 2000). Ungeachtet dessen ist es wahrscheinlich, dass sich die biologische Funktion von Syk in hämatopoetischen Zellen von jener in Brustepithelzellen grundlegend unterscheidet. Es kann weiter vermutet werden, dass Syk Phosphatasen aktivieren kann, die wiederum für die Dephosphorylierung des Egfr verantwortlich sind.

Andere Zelllinien wie MDA-MB231 oder MDA-MB453 zeigten keine Erhöhung der Apoptoserate bei DXR-Stimulation. Dies kann daran liegen, dass diese Zelllinien kein endogenes Syk exprimieren und dieser Signalweg inaktiv ist oder Interaktionspartner fehlen. Dagegen konnte hier eine reduzierte Apoptoserate bei Expression der kinase-inaktiven Mutation von Syk ermittelt werden, d.h. die Überexpression von inaktivem Syk hat *per se* einen antiapoptotischen Effekt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Induktion der Syk-vermittelten Apoptose der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle spielt.

Apoptose wurde in allen beschriebenen Experimenten mit Doxorubicin (DXR) ausgelöst. Das quinonhaltige Anthrazyklin DXR wird zur Behandlung verschiedenster Tumore eingesetzt. Seine Umsetzung durch mitochondriale Enzyme, wie z.B. NADH-Dehydrogenasen, verursacht erhöhte ROS (reactive oxygen species)-Level, die für die Zytotoxizität und der damit verbundenen Apoptose von Krebszellen wichtig sind (Kalyanaraman et al., 2002). So kann spekuliert werden, dass Syk-negative Tumorzellen eine DXR-Behandlung besser tolerieren würden, da sie eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress aufweisen. Dies könnte ihnen einen Wachstumsvorteil verschaffen. Überdies ist bekannt, dass durch die EGF-Stimulation der H₂O₂-Anteil in der Zelle transient erhöht wird, was zu einer reversiblen Inhibition von PTPn führt und so eine verstärkte Wachstumssignal-vermittelte Signaltransduktion in der Zelle induziert werden kann (Meng et al., 2002). Wie bereits erwähnt wurde, weisen Brusttumore häufig eine erhöhte Expression und Aktivierung von RTKn der Egfr-Familie auf, was ebenfalls zu einer Erhöhung der zellulären ROS-Anteile beiträgt. Brustkrebszellen ohne die Expression von Syk sollten demzufolge eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen, die durch die verstärkte Aktivierung von RTKn und der damit verbundenen erhöhten ROS-Entwicklung normalerweise induziert werden würde.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, kann man folgendes Model für die durch Syk-Expression erhöhte Apoptoserate erstellen:

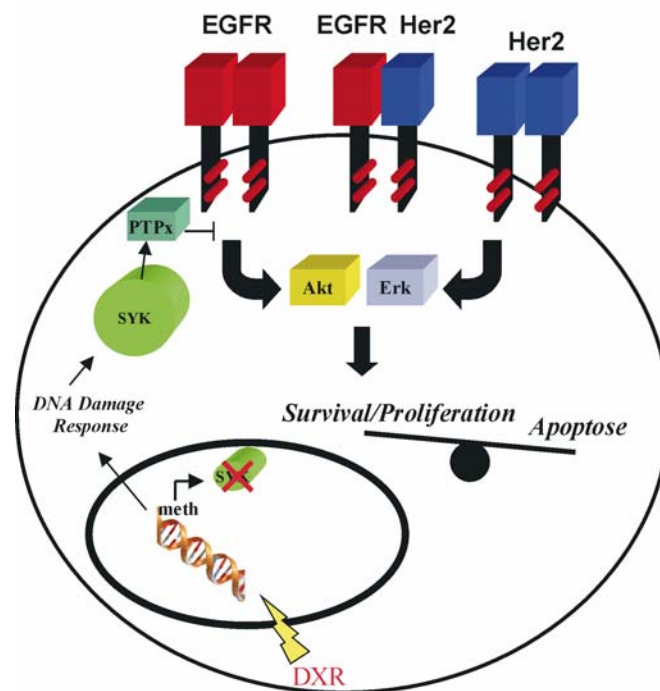


Abb. 57: Model der Syk-vermittelten Apoptosesensibilisierung

In nichttransformierten Brustepithelzellen nimmt Syk Stress wahr, woraufhin eine bisher unbekannte Phosphatase aktiviert wird, die Egfr/Her2 dephosphoryliert. Wachstums- und Überlebenssignale werden so abgeschaltet und die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren neigt sich zu Gunsten der Apoptose. Fehlt die Syk-Expression, etwa durch Promotormethylierung wie in verschiedenen Publikationen gezeigt werden konnte (Dhillon et al., 2004; Goodman et al., 2003; Wang et al., 2005; Yuan et al., 2001), können Wachstumssignale nicht mehr abgeschaltet werden und die Zellen entwickeln eine Toleranz gegenüber Stress. Diese Stressfaktoren beinhalten sowohl intrinsische Faktoren, etwa erhöhte ROS-Level usw., als auch extrinsische Faktoren in Form von Chemotherapeutika.

Außerdem ist denkbar, dass Syk zum einen die Aktivität, zum anderen die Lokalisierung dieser PTP direkt bzw. indirekt beeinflussen könnte. Obwohl keine Unterschiede in der Gesamtproteinmenge des Egfrs in Brustepithelzellen mit reduzierter Expression von Syk nachgewiesen werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass Syk in die Endozytose und der damit verbundenen Degradation der EGFR-Signalkomplexe involviert ist. Für c-Cbl, das die Ubiquitylierung und

Degradation des aktivierten Egfrs vermittelt (Levkowitz et al., 1998), wurde in hämatopoetischen Zellen bereits eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung gezeigt (Ota et al., 1996). Ebenso wäre es vorstellbar, dass Syk den Phosphotyrosinstatus des Egfrs über die Aktivität von Csk (c-src tyrosine kinase) und damit über die Aktivität der Src-Kinasen reguliert. Faruki et al. zeigten eine Syk-abhängige Tyrosinphosphorylierung von beta-Tubulin und postulierten, dass Syk die Bildung von Signalkomplexen über seine Interaktion mit Proteinen des Zytoskeletts beeinflusst (Faruki et al., 2000). Demzufolge könnte Syk generell die Bildung der Egfr-abhängigen Signalkomplexe in Epithelzellen regulieren.

Die funktionelle Relevanz der hier beschriebenen Interaktion von Syk auf die Egfr-vermittelte Signaltransduktion hinsichtlich der von Coopman und Kollegen postulierten tumorsuppressiven Aktivität von Syk in Brusttumoren (Coopman et al., 2000) bleibt noch zu klären und bietet Raum für weitere Untersuchungen. Die Resultate dieser Arbeit liefern jedoch Hinweise für eine biologische Funktion von Syk innerhalb von Wachstumsfaktor-abhängigen Signaltransduktionswegen in Brustepithelzellen und bei der Sensibilisierung von Zellen für Chemotherapeutika. Syk könnte daher in der klinischen Anwendung als Markerprotein für chemotherapeutisch responsive Tumoren etabliert werden.

4.3. Fgfr4, ein Gen mit erhöhter Expression

Überexpression des Fgfr4 wurde bisher häufig in einer Reihe verschiedener Tumortypen beschrieben. In dem in dieser Arbeit unter 3.1. beschriebenen Ansatz zur Identifizierung von antiapoptotischen Mechanismen in Krebszellen konnte der Fgfr4 als ein Gen mit erhöhter Expression in chemoresistenten Klonen identifiziert werden. Da der Fgfr4 eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression spielt und in dieser Arbeitsgruppe bereits wichtige Erkenntnisse über das Auftreten eines SNPs und dessen Relevanz in Hinblick auf Tumorprogression bei diesem Rezeptor beschrieben wurde, wurde die Rolle des Fgfr4 in der Vermittlung der Chemoresistenz untersucht.

In verschiedenen Publikationen dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Fgfr4 eine polymorphe Aminosäure in der Transmembrandomäne besitzt. An Position 1217 der Nukleotidsequenz wird ein Guanidin gegen ein Adenosin ausgetauscht, was zu einem Arginin an Position 388 des Proteins führt. Bei Fgfr4 Arg388 handelt es sich um eine häufige Sequenzvariante, die in 50% der Bevölkerung entweder in homozygoter oder heterozygoter Form auftritt (Bange et al., 2002; Streit et al., 2004). Sie zeigt eine deutliche Überrepräsentanz in Brustkrebspatienten mit Her2-Überexpression und ist mit einer signifikant verringerten Rezidiv-freien Überlebenszeit in Patienten mit axiliären Lymphknoten Metastasen verknüpft (Bange et al., 2002). Eine übereinstimmende Beziehung zwischen dem Fgfr4 Arg-Allel und klinisch prognostischen Faktoren wurde auch in Darmkrebs nachgewiesen.

Hingegen ist der Zusammenhang zwischen Fgfr4-Expression und der Ausprägung der Chemoresistenz, der im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde gänzlich neu.

In normalen menschlichen Geweben wird der Fgfr4 in Milz, Niere, Leber und Lunge exprimiert (<http://www.dkfz-heidelberg.de/GeneCards/>). Die Überexpression von Genen ist ein verbreiteter Mechanismus, um Resistenzen auszubilden. Vergleicht man die Höhe der Fgfr4-Expression in verschiedenen normalen Geweben sowie den korrespondierenden Tumoren, kann festgestellt werden, dass in malignen Gewebe der Leber, Gebärmutter, Niere und des Darms der Fgfr4 höher als in normalem Gewebe exprimiert ist (www.Oncomine.org und Abb. 43). Daneben existieren eine

Reihe von Publikationen, die eine erhöhte Expression der FGF-Rezeptoren in weiteren Tumortypen identifiziert haben. Zum Beispiel in Melanomen (Ahmed et al., 1997), in Gehirn- (Morrison et al., 1994), in Brust- (Yoshimura et al., 1998), in Prostata- (Giri et al., 1999) und in Schilddrüsen-Tumoren (Shingu et al., 1998).

Dagegen zeigt sich in der Lunge das umgekehrte Bild. Hier ist die Fgfr4-Expression im malignen Zustand reprimiert. Powell et al. konnten in der Entwicklung der Ratte die Fgfr4-Expression in der Lunge erst ab der Geburt detektieren. Im weiteren Verlauf der Lungenentwicklung der Ratte nimmt die Expression des Fgfr4 zu (Powell et al., 1998). Es gibt auch Hinweise, dass Fgfr4 die Differenzierung zwischen Leber- und Lungenzellen reguliert (Serls et al., 2005). Dies deutet auf eine gewebsspezifische Funktion des Fgfr4 in der Lunge und allen anderen Geweben hin. Gerade auch im Hinblick auf die Karzinogenese scheint die erhöhte Fgfr4-Expression in den verschiedenen Gewebetypen außer in der Lunge für die Tumorigenese wichtig zu sein.

In Brustkrebs, dessen Resistenzbildung im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, konnte eine Überexpression im malignen Zustand in verschiedenen Untersuchungen festgestellt werden (Bange et al., 2002; Jaakkola et al., 1993). In den in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebs-Zelllinien wird der Fgfr4 in 30% der Zelllinien exprimiert. Im Gegensatz dazu, konnten in den nicht transformierten Brustepithelzelllinien keine Fgfr4-Transkripte nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Publikationen überein, in denen ebenfalls eine häufig starke Expression von Fgfr4 oder eine Amplifikation des *fgfr4* Genes in Brustkrebs gefunden wurde (Jaakkola et al., 1993). Die erhöhte Expression von Fgfr4 in Brustkrebs legt die Vermutung nahe, dass dieses Gen ähnlich wie Her2 zur Tumorentwicklung oder Resistenzbildung beitragen kann. Diese Hypothese wird zusätzlich noch durch die Untersuchungen von Hughes et al. (Hughes, 1997) gestützt. In einer immunhistochemischen Analyse der Fgf-Rezeptor Familie an Paraffinschnitten von allen humanen Organ-Systemen konnten die Fgfr 1, 2 und 3, aber nicht der Fgfr4 in den Drüsen, stromalen Fibroblasten und den Blutgefäßen des normalen Brustgewebes nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass der Fgfr4 nur in Tumoren des Brustgewebes, nicht aber in normalem Brustgewebe vorkommt. Interessant wäre bei diesen Arbeiten, zu untersuchen, ob die Tumoren vor Entfernung therapiert wurden. So könnte eine Chemotherapie, wie etwa mit dem häufig verwendeten Doxorubicin, die Fgfr4 Expression, wie in dieser Arbeit beschrieben, ansteigen lassen.

In den DXR-behandelten Klonen konnte eine Erhöhung der Fgfr4-Expression festgestellt werden. Dies deutet auf einen Selektionsvorteil von Zellen mit erhöhter Fgfr4-Expression während der DXR-Behandlung hin.

Jedoch nur in der Zelllinie MDA-MB453 konnte nach Doxorubicinbehandlung ein Anstieg der Fgfr4-Expression beobachtet werden. Dies mag daran liegen, dass für ein durch Fgfr4 weitergeleitetes Signal auch die stromabwärtsgelegenen Interaktionspartner vorhanden sein müssen. Die endogene Expression des Rezeptors wie in MDA-MB453 stellt einen funktionsfähigen Signalweg sicher, der durch Erhöhung einzelner Partner noch verstärkt werden kann. Die Erhöhung der Anzahl der Rezeptoren allein, wie beispielsweise in einer Überexpression des Fgfr4 in MDA-MB231-Zellen scheint dafür nicht ausreichend zu sein und daher eher unspezifische Effekte zu produzieren. Folglich konnte auch in der Überexpression nur mit MCF7-Zellen, die endogen Fgfr4 exprimieren, Effekte auf das Apoptoseverhalten beobachtet werden. Betrachtet man die Expression des Fgfr4 in allen resistenten Klonen der Zelllinie MDA-MB453, so kann festgestellt werden, dass es sich bei der Überexpression um einen Mechanismus handelt, der von über 50% dieser Zellen zur Resistenzausbildung benutzt wird.

Die Erhöhung der Fgfr4-Expression resultiert nicht aus einer Amplifikation des genomischen Abschnitts des fgfr4-Gens, wie im Southernblot gezeigt. Bisher konnten noch keine Beweise für eine genomische Amplifikation des fgfr4-Locus erbracht werden, was eine transkriptionelle Deregulation wahrscheinlich macht. Das fgfr4-Gen besitzt einen GC-reichen, TATA-Box-losen Promotor (Shah et al., 2002). Für die Regulation der Transkription konnten bisher zwei Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. In Tumoren der Hypophyse spielt der Transkriptionsfaktor Ikaros eine Rolle (Ezzat et al., 2004), während HNF1alpha in Pankreaskrebs die Fgfr4-Expression steuert (Shah et al., 2002). Bei dieser Untersuchung konnte in Fgfr4 negativen Zellen durch Überexpression von HNF1alpha Fgfr4-mRNA nachgewiesen werden. Auch zeigen die Autoren eine positive Korrelation von Fgfr4 und HNF1alpha in Pankreastumoren.

Eine negative Korrelation von $-0,4$ des Pearson-Koeffizienten konnte zwischen der Apoptoserate, induziert mit DXR, und der Fgfr4-Expression in den resistenten Klonen berechnet werden. Das heißt, je höher die Fgfr4-Expression war, desto niedriger war die gemessene Apoptoserate. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung des Fgfr4 an antiapoptotischen Mechanismen.

In der gegenwärtigen Literatur wird der Fgfr4 nicht mit Chemoresistenz in Zusammenhang gebracht. Vielmehr soll diese RTK eine Rolle bei der Proliferation und/oder Migration von Tumorzellen spielen (Cavallaro et al., 2002; Koziczak et al., 2004). Für andere Familienmitglieder der Fgf-Rezeptoren konnte dagegen eine Beteiligung an Überlebenssignalwegen und Apoptoseresistenz nachgewiesen werden. So wurden für den Fgfr3 beschrieben, dass eine konstitutiv-aktivierende Mutation zur Erhöhung der Proliferation und Verminderung der Apoptoserate führt (Plowright et al., 2000). Dieser Signalweg führt zur Aktivierung von Stat3 und anschließend zur verstärkten Expression des antiapoptotischen Faktors BclXL (Plowright et al., 2000). Durch den Knockdown des Fgfr3 konnte das Gegenteil gezeigt werden. Hierbei wird die Apoptoserate der Zellen erhöht, antiapoptotische Faktoren wie Bcl2 und Mcl1 reduziert und proapoptotische Faktoren wie Caspasen und Bid erhöht (Zhu et al., 2005). Auch für den Fgfr1 ist beispielsweise in Prostatakrebs ein antiapoptotischer Effekt beschrieben. Hier führt die Expression einer dominant-negativen Mutation des Fgfr1 zur Erhöhung der Apoptoserate und des Zellzyklusarrests in der G2-Phase (Ozen et al., 2001). Eine konstitutiv-aktivierende Mutation des Fgfr1 führt auch hier zur Erhöhung der BclXL-Expression und der Aktivierung von Stat1, 3 und 5 (Heath and Cross, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Erhöhung des Fgfr4, eines anderen Mitglieds der FGF Rezeptorfamilie, die Apoptoserate gesenkt und durch Knockdown erhöht werden. Zu untersuchen bleibt, ob ähnliche Effekte wie Stat-Aktivierung oder Erhöhung der BclXL-Expression auch hier für die Ausbildung der Chemoresistenz eine Rolle spielen.

Da der SNP (*single nucleotide polymorphism*) Gly388Arg des Fgfr4 eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung spielt, wurde mit diesen unterschiedlichen Fgfr4-Konstrukten in MCF7-Zellen das Apoptoseverhalten untersucht. Hier konnte jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Allelen festgestellt werden. Die Überexpression beider Fgfr4-Allele (egal ob Glycin oder Arginin an Position 388) wie in MCF7-Zellen der Fall, zeigt wohl wegen der Höhe der Expression hinsichtlich der Apoptoserate keinen Unterschied. Wahrscheinlich ist die Dosis der Expression für den antiapoptotischen Effekt wichtiger als Unterschiede in der Aminosäuresequenz an Position 388.

Wie in dieser Arbeit in MCF7 Brustkrebszellen gezeigt werden konnte, reduziert eine Überexpression des Fgfr4 die Sensitivität der Zellen für die Chemotherapeutika DXR

und CPA. Da die Fgfr4-Expression auf die Apoptoserate mit andere Agenzien keinen Effekt hatte, ist zu vermuten, dass dieser Effekt spezifisch in die Wirkmechanismen von Doxorubicin (DXR) und Cyclophosphamid (CPA) eingreift, da beide Agenzien DNA binden und die Replikation inhibieren können.

Interessant wäre hier, den Zusammenhang zwischen FGFR4-Expression und Chemotherapie mit Patientenbiopsien vor und nach der Therapie zu untersuchen. Leider gibt es hierzu noch keine publizierten Daten. Auch müsste an Patienten untersucht werden, ob eine negative Korrelation zwischen Fgfr4-Expression und dem Ansprechen auf die Chemotherapie (evtl. speziell mit DXR oder CPA) besteht. Ergeben diese Untersuchungen einen positiven Befund, könnten diese Ergebnisse einige Implikationen für die Therapie von Brustkrebs haben.

Erstens könnte die Fgfr4-Expression als Marker für die Apoptosesensibilität der Tumoren dienen. Speziell die Therapie mit DXR und CPA könnte geändert werden, um so die Tumorzellen effizienter zu bekämpfen. Zweitens könnte der Nachweis der Fgfr4-Expression im Verlauf einer Therapie auf die Entwicklung von Chemoresistenz hindeuten, worauf die therapeutische Strategie geändert werden kann. Und drittens können Inhibitoren gegen den Fgfr4 oder dessen Signalweg entwickelt werden, um chemoresistente Tumoren zu bekämpfen. Möglich wäre auch eine Kombinationstherapie mit klassischen Chemotherapeutika, wie DXR und CPA, und der zeitgleichen Gabe von Fgfr4-spezifischen Inhibitoren, um chemoresistente Tumorzellen zu bekämpfen oder deren Entstehung zu verhindern.

5. Zusammenfassung

Tumorzellen unterliegen im menschlichen Körper den Gesetzen der Evolution. Der Selektionsdruck generiert entartete Zellen, die gut an die Verhältnisse im Körper angepasst sind. Eines der Charakteristika dieser entarteten Zellen ist ihre im Vergleich zu den meisten normalen somatischen Zellen hohe Proliferationsrate. Dieser Effekt wird durch die Chemotherapie ausgenutzt, in dem man alle schnell proliferierenden Zellen schädigt und somit in die Apoptose treibt. Dadurch entsteht jedoch ein neuer Selektionsdruck, dem einige Tumorzellen durch verschiedene Resistenzmechanismen ausweichen können. Diese Rezidive zeichnen sich durch aggressiveres Wachstum und erhöhte Resistenz gegenüber der Chemotherapie aus. In der vorliegenden Arbeit wurden antiapoptotische Mechanismen in Krebszellen untersucht. Dazu wurden etablierte Brustkrebszelllinien mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin *in vitro* behandelt. Das Genexpressionsprofil von chemoresistenten Klonen wurde mit der Ausgangszelllinie verglichen. Dadurch konnten verschiedene bekannte und unbekannte Gene mit differentieller Expression identifiziert werden.

Zu den Genen, die in verschiedenen Zelllinien eine erhöhte Genexpression zeigten und gut charakterisierte antiapoptotische Funktionen besitzen, gehören beispielsweise Bmx, Psslare (Cdk5), und FesS. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dagegen wenig über die antiapoptotische Signaltransduktion von NoName001 (TNNI3K), Dyrk4 und Kap1 bekannt. Auffällig ist die häufige Überexpression von Komponenten der Egfr-Familie. Hier wurden häufig Liganden (Amphiregulin, Betacellulin, Heregulin und HB-EGF) und die RTKs (Her2 und Her3) in resistenten Klonen verstärkt exprimiert.

Eine direkte Beteiligung dieser Gene an antiapoptotischen Mechanismen kann nun mit weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit konnte das Mitwirken an antiapoptotischer Signaltransduktion für zwei Gene, nämlich der RTK *fibroblast growth factor receptor 4* (Fgfr4) und der PTK Syk, gezeigt werden.

Die PTK Syk wurde bereits vorher als potentieller Tumorsuppressor beschrieben, jedoch konnte erstmals eine Beteiligung an proapoptotischer Signaltransduktion gezeigt werden. Konsequenterweise wurde in dem oben beschriebenen Ansatz zur Analyse antiapoptotischer Mechanismen Syk in resistenten Klonen als Gen mit

verringertes Expression identifiziert. In weiteren Gen- und Proteinexpressionsanalysen konnte das Fehlen von Syk in aggressiven Kebszelllinien beobachtet werden. Durch Coimmunopräzipitation konnte eine Interaktion von Syk mit Egr und Her2 gezeigt werden. Nach Doxorubicinbehandlung von Brustkrebszellen, die Syk stabil exprimieren, wurde die basale Tyrosinphosphorylierung des Egr- und Her2-Rezeptors deutlich reduziert. Dies führt zu geringeren antiapoptotischen Signalen, was sich bei manchen Zelllinien als höhere Sensitivität der Zellen bei Chemotherapie auswirkt. So konnte gezeigt werden, dass die Existenz von Syk die Zellen für Chemotherapie sensibilisiert und umgekehrt fehlende Syk-Expression zu erhöhter Chemoresistenz führt.

Obwohl die Überexpression des Fgr4 in Brusttumoren und Brustkrebszelllinien durchschnittlich nur 10% beträgt, konnte eine erhöhte Expression in chemoresistenten Klonen beobachtet werden. Diese Überexpression korreliert positiv mit der Resistenz der einzelnen Klone. Ektopische Expression in MCF7 Brustkrebszellen führt zu einer erhöhten Apoptoseresistenz, wobei die Proliferationsrate nicht beeinträchtigt wurde. Folglich erhöhte sich die Apoptoserate der chemoresistenten Klone sowie zweier weiterer Krebszelllinien nach Suppression der Fgr4-Expression mittels siRNA-Experimenten. Eine direkte Beteiligung des Fgr4 an der Verstärkung der Chemoresistenz konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden.

Insgesamt zeigen diese Untersuchungen neue Zielmoleküle zur Inhibition antiapoptotischer Proteinfunktionen auf. Des Weiteren bieten sich Ansatzpunkte für neue Kombinationen der Chemotherapie, die durch spezifische Inhibitoren dieser Zielmoleküle unterstützt werden könnten, und so die Entstehung von Chemoresistenz verhindern.

6. Abkürzungen

''	Sekunde
'	Minute
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp ^r	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Blot Ak wurde	Antikörper, der im Westernblot eingesetzt
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalo Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB	avian erythroblastosis virus oncogene B
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
Gab1	Grb2-associated binder 1
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G protein-coupled receptor
Grb2	growth factor receptor binding protein 2
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
ddH ₂ O	zweifach destilliertes, entionisiertes Wasser
HB-EGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HEK	human embryonic kidney
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-
HER	Human EGFR-related gene
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranosid
Jnk	c-Jun N-terminal kinase
K-	katalytisch-inaktive Kinase
K/R	Lysin zu Arginin mutiert
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter

m	Milli
M	Molar
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	MAP Kinase
MAPKK	MAP Kinase Kinase
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase
MEK	MAPK/Erk Kinase
MEKK	MAPK/Erk Kinase Kinase
MKS	Multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MMTV	mouse mammary tumor virus
Mock	kontrolltransfiziert
n	Nano
NDF	neu differentiation factor
Neo ^r	Neomycin Resistenz
OD	optische Dichte
p.a.	Per analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMT	Polyoma middle T antigen
pRS	pRetroSuper Vektor
PTB	Phosphotyrosin-bindend
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PY	Phosphotyrosin
RNAi	RNA interference
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S.A.	Standardabweichung
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src homology
siRNA	small interfering RNA
Sos	Son of sevenless
c-Src	Homologue to v-src (sarcoma viral
oncogene)	
SV40- TAg	simian virus 40 large T antigen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF- α	transforming growth factor alpha
TL	Totallysat
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Einheit für enzymatische Aktivität
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett

V
WB
wt

Volt
Westernblot
Wildtyp

7. Literatur

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. and et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**, 812-816.
- Ahmed, N.U., Ueda, M., Ito, A., Ohashi, A., Funasaka, Y. and Ichihashi, M. (1997) Expression of fibroblast growth factor receptors in naevus-cell naevus and malignant melanoma. *Melanoma Res*, **7**, 299-305.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, **87**, 171.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, **117**, 699-711.
- Anderson, D.R., Grillo-Lopez, A., Varns, C., Chambers, K.S. and Hanna, N. (1997) Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*, **25**, 705-708.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M. and Hemmings, B.A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, **272**, 31515-31524.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C. (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, **11**, 1101-1110.
- Azios, N.G., Romero, F.J., Denton, M.C., Doherty, J.K. and Clinton, G.M. (2001) Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene*, **20**, 5199-5209.
- Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Taludker, A.H., Wang, R.A., Vadlamudi, R.K., Kung, H.J. and Kumar, R. (2001) Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 29403-29409.
- Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Muller, S., Gartner, S., Sures, I., Wang, H., Imyanitov, E., Haring, H.U., Knayzev, P., Iacobelli, S., Hofler, H. and Ullrich, A. (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res*, **62**, 840-847.
- Baselga, J. and Albanell, J. (2001) Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol*, **12 Suppl 1**, S35-41.
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J. and Tsichlis, P. (1998) Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene*, **17**, 313-325.
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J.T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D.L., Marks, P. and et al. (1990) Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, **50**, 4087-4091.
- Bergers, G., Hanahan, D. and Coussens, L.M. (1998) Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, **42**, 995-1002.
- Borrebaeck, C.A. (1989) [Human monoclonal antibodies. New therapeutic possibilities]. *Lakartidningen*, **86**, 1692-1693, 1695.
- Brazil, D.P., Park, J. and Hemmings, B.A. (2002) PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*, **111**, 293-303.

- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-868.
- Burden, S. and Yarden, Y. (1997) Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron*, **18**, 847-855.
- Cahill, D.P., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol*, **9**, M57-60.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318-1321.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-257.
- Cavallaro, U., Schaffhauser, B. and Christofori, G. (2002) Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett*, **176**, 123-128.
- Chau, C.H., Chen, K.Y., Deng, H.T., Kim, K.J., Hosoya, K., Terasaki, T., Shih, H.M. and Ann, D.K. (2002) Coordinating Etk/Bmx activation and VEGF upregulation to promote cell survival and proliferation. *Oncogene*, **21**, 8817-8829.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, **7**, 2745-2752.
- Chenais, F., Virella, G., Patrick, C.C. and Fudenberg, H.H. (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A--Sephrose as substrate. *J Immunol Methods*, **18**, 183-192.
- Chung, C.T. and Miller, R.H. (1993) Preparation and storage of competent Escherichia coli cells. *Methods Enzymol*, **218**, 621-627.
- Cobb, M.H., Boulton, T.G. and Robbins, D.J. (1991) Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul*, **2**, 965-978.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. and Slamon, D.J. (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*, **17**, 2639-2648.
- Coopman, P.J., Do, M.T., Barth, M., Bowden, E.T., Hayes, A.J., Basyuk, E., Blancato, J.K., Vezza, P.R., McLeskey, S.W., Mangeat, P.H. and Mueller, S.C. (2000) The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature*, **406**, 742-747.
- Couch, D.B. (1996) Carcinogenesis: basic principles. *Drug Chem Toxicol*, **19**, 133-148.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. and et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, **230**, 1132-1139.
- Coussens, L.M., Raymond, W.W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Coughley, G.H. and Hanahan, D. (1999) Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, **13**, 1382-1397.
- Craxton, A., Jiang, A., Kurosaki, T. and Clark, E.A. (1999) Syk and Bruton's tyrosine kinase are required for B cell antigen receptor-mediated activation of the kinase Akt. *J Biol Chem*, **274**, 30644-30650.
- Cross, M.J. and Claesson-Welsh, L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 201-207.
- Daly, R.J. (1999) Take your partners, please--signal diversification by the erbB family of receptor tyrosine kinases. *Growth Factors*, **16**, 255-263.

- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- de Melker, A.A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H. and Borst, J. (2001) c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci*, **114**, 2167-2178.
- DePinho, R.A. and Jacks, T. (1999) A bumper crop of cancer genes. *Nat Genet*, **23**, 253-254.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, **76**, 1025-1037.
- Dhanasekaran, N. and Premkumar Reddy, E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene*, **17**, 1447-1455.
- Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, **412**, 822-826.
- Dhillon, V.S., Young, A.R., Husain, S.A. and Aslam, M. (2004) Promoter hypermethylation of MGMT, CDH1, RAR-beta and SYK tumour suppressor genes in granulosa cell tumours (GCTs) of ovarian origin. *Br J Cancer*, **90**, 874-881.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R. and Aaronson, S.A. (1987) erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, **237**, 178-182.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**, 3499-3511.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffey, P.J. (2000) Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol*, **20**, 9138-9148.
- Ding, J., Takano, T., Gao, S., Han, W., Noda, C., Yanagi, S. and Yamamura, H. (2000) Syk is required for the activation of Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem*, **275**, 30873-30877.
- Dionne, C.A., Crumley, G., Bellot, F., Kaplow, J.M., Searfoss, G., Ruta, M., Burgess, W.H., Jaye, M. and Schlessinger, J. (1990) Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors. *Embo J*, **9**, 2685-2692.
- Doherty, J.K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J.P. and Clinton, G.M. (1999) The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10869-10874.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-14868.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.
- Eswarakumar, V.P., Lax, I. and Schlessinger, J. (2005) Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 139-149.
- Ezzat, S., Zheng, L. and Asa, S.L. (2004) Pituitary tumor-derived fibroblast growth factor receptor 4 isoform disrupts neural cell-adhesion molecule/N-cadherin signaling to diminish cell adhesiveness: a mechanism underlying pituitary neoplasia. *Mol Endocrinol*, **18**, 2543-2552.

- Faruki, S., Geahlen, R.L. and Asai, D.J. (2000) Syk-dependent phosphorylation of microtubules in activated B-lymphocytes. *J Cell Sci*, **113** (Pt 14), 2557-2565.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Fendly, B.M., Toy, K.J., Creasey, A.A., Vitt, C.R., Larrick, J.W., Yamamoto, R. and Lin, L.S. (1987) Murine monoclonal antibodies defining neutralizing epitopes on tumor necrosis factor. *Hybridoma*, **6**, 359-370.
- Finn, O.J. (1993) Tumor-rejection antigens recognized by T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, **5**, 701-708.
- Fiorini, M., Alimandi, M., Fiorentino, L., Sala, G. and Segatto, O. (2001) Negative regulation of receptor tyrosine kinase signals. *FEBS Lett*, **490**, 132-141.
- Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*, **14**, 327-339.
- Friedl, P. and Brocker, E.B. (2000) The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 41-64.
- Friedl, P. and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, **3**, 362-374.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. and Dryja, T.P. (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, **323**, 643-646.
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S.A., Kroemer, G. and Debatin, K.M. (2001) Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*, **20**, 1063-1075.
- Fulda, S., Strauss, G., Meyer, E. and Debatin, K.M. (2000) Functional CD95 ligand and CD95 death-inducing signaling complex in activation-induced cell death and doxorubicin-induced apoptosis in leukemic T cells. *Blood*, **95**, 301-308.
- Gensler, M., Buschbeck, M. and Ullrich, A. (2004) Negative regulation of HER2 signaling by the PEST-type protein-tyrosine phosphatase BDP1. *J Biol Chem*, **279**, 12110-12116.
- Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. and Poirier, G.G. (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem*, **274**, 28379-28384.
- Giri, D., Ropiquet, F. and Ittmann, M. (1999) Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **5**, 1063-1071.
- Goodman, P.A., Burkhardt, N., Juran, B., Tibbles, H.E. and Uckun, F.M. (2003) Hypermethylation of the spleen tyrosine kinase promoter in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*, **22**, 2504-2514.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J.D., Hbailu, A., Goode, R.G., Sandusky, G.E., Vessella, R.L. and Neubauer, B.L. (2000) Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem*, **275**, 24500-24505.
- Graham, F.L. a.v.d.E., A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**, 536-539.
- Graves, J.D., Campbell, J.S. and Krebs, E.G. (1995) Protein serine/threonine kinases of the MAPK cascade. *Ann N Y Acad Sci*, **766**, 320-343.
- Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A. and Carraway, K.L., 3rd. (1994) Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8132-8136.
- Hackel, P.O., Gishizky, M. and Ullrich, A. (2001) Mig-6 is a negative regulator of the epidermal growth factor receptor signal. *Biol Chem*, **382**, 1649-1662.

- Hackel, P.O., Zwick, E., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 184-189.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Harris, M.H. and Thompson, C.B. (2000) The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ*, **7**, 1182-1191.
- Hart, K.C., Robertson, S.C. and Donoghue, D.J. (2001) Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Mol Biol Cell*, **12**, 931-942.
- Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **37**, 614-636.
- Heath, C. and Cross, N.C. (2004) Critical role of STAT5 activation in transformation mediated by ZNF198-FGFR1. *J Biol Chem*, **279**, 6666-6673.
- Holland, F.J., Frei, E. (2003) *Cancer Medicine 6*. BC Decker Inc., London.
- Holliday, R. (1996) Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. *Cancer Surv*, **28**, 103-115.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Holmes, W.E., Ullrich, A. and Shepard, H.M. (1990) Selection for transformation and met protooncogene amplification in NIH 3T3 fibroblasts using tumor necrosis factor alpha. *Cell Growth Differ*, **1**, 129-134.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M. and Ullrich, A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, **9**, 1165-1172.
- Hughes, S.E. (1997) Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J Histochem Cytochem*, **45**, 1005-1019.
- Hynes, N.E. and Stern, D.F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 165-184.
- Jaakkola, S., Salmikangas, P., Nylund, S., Partanen, J., Armstrong, E., Pyrhonen, S., Lehtovirta, P. and Nevanlinna, H. (1993) Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer*, **54**, 378-382.
- Jazaeri, A.A., Awtrey, C.S., Chandramouli, G.V., Chuang, Y.E., Khan, J., Sotiriou, C., Aprelikova, O., Yee, C.J., Zorn, K.K., Birrer, M.J., Barrett, J.C. and Boyd, J. (2005) Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin Cancer Res*, **11**, 6300-6310.
- Jiang, A., Craxton, A., Kurosaki, T. and Clark, E.A. (1998) Different protein tyrosine kinases are required for B cell antigen receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase, c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Exp Med*, **188**, 1297-1306.
- Johnson, D.E. and Williams, L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*, **60**, 1-41.
- Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, E. and Kotamraju, S. (2002) Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem*, **234-235**, 119-124.
- Keegan, K., Johnson, D.E., Williams, L.T. and Hayman, M.J. (1991) Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1095-1099.

- Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. and Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. and Toge, T. (2004) Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. *Cancer*, **101**, 2491-2502.
- Klapper, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M. and Yarden, Y. (1999) The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4995-5000.
- Kleihues, P.S., B.W. (2003) *World Health Organization WORLD CANCER REPORT International Agency for Research on Cancer*.
- Klint, P. and Claesson-Welsh, L. (1999) Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci*, **4**, D165-177.
- Koziczak, M., Holbro, T. and Hynes, N.E. (2004) Blocking of FGFR signaling inhibits breast cancer cell proliferation through downregulation of D-type cyclins. *Oncogene*, **23**, 3501-3508.
- Koziczak, M. and Hynes, N.E. (2004) Cooperation between fibroblast growth factor receptor-4 and ErbB2 in regulation of cyclin D1 translation. *J Biol Chem*, **279**, 50004-50011.
- Krammer, P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789-795.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. and Aaronson, S.A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 9193-9197.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J.,

- Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koonin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrino, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S. and Chen, Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Latour, S., Chow, L.M. and Veillette, A. (1996) Differential intrinsic enzymatic activity of Syk and Zap-70 protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **271**, 22782-22790.
- Latour, S., Zhang, J., Siraganian, R.P. and Veillette, A. (1998) A unique insert in the linker domain of Syk is necessary for its function in immunoreceptor signalling. *Embo J*, **17**, 2584-2595.
- Lee, J., Dull, T.J., Lax, I., Schlessinger, J. and Ullrich, A. (1989) HER2 cytoplasmic domain generates normal mitogenic and transforming signals in a chimeric receptor. *Embo J*, **8**, 167-173.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B. and Yarden, Y. (1998) c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev*, **12**, 3663-3674.
- L'Hote, C.G. and Knowles, M.A. (2005) Cell responses to FGFR3 signalling: growth, differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res*, **304**, 417-431.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E. and Jacks, T. (1994) p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, **266**, 807-810.
- Mahabeleshwar, G.H. and Kundu, G.C. (2003) Syk, a protein-tyrosine kinase, suppresses the cell motility and nuclear factor kappa B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator by inhibiting the phosphatidylinositol 3'-kinase activity in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **278**, 6209-6221.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **298**, 1912-1934.
- Mano, H. (1999) The Tec family protein-tyrosine kinases: a subset of kinases for a subset of signalings. *Int J Hematol*, **69**, 6-12.
- Marasco, W.A. and Dana Jones, S. (1998) Antibodies for targeted gene therapy: extracellular gene targeting and intracellular expression. *Adv Drug Deliv Rev*, **31**, 153-170.
- McCann, A.H., Dervan, P.A., O'Regan, M., Codd, M.B., Gullick, W.J., Tobin, B.M. and Carney, D.N. (1991) Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res*, **51**, 3296-3303.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.
- Meng, T.C., Fukada, T. and Tonks, N.K. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell*, **9**, 387-399.

- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- Moroni, M., Soldatenkov, V., Zhang, L., Zhang, Y., Stoica, G., Gehan, E., Rashidi, B., Singh, B., Ozdemirli, M. and Mueller, S.C. (2004) Progressive loss of Syk and abnormal proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 7346-7354.
- Morrison, R.S., Yamaguchi, F., Bruner, J.M., Tang, M., McKeehan, W. and Berger, M.S. (1994) Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res*, **54**, 2794-2799.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant*, **51**, 263-273.
- Muthuswamy, S.K., Gilman, M. and Brugge, J.S. (1999) Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers. *Mol Cell Biol*, **19**, 6845-6857.
- Nowak, M.A., Komarova, N.L., Sengupta, A., Jallepalli, P.V., Shih Ie, M., Vogelstein, B. and Lengauer, C. (2002) The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16226-16231.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- Nunez, G., Benedict, M.A., Hu, Y. and Inohara, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, **17**, 3237-3245.
- Okamura, S., Ng, C.C., Koyama, K., Takei, Y., Arakawa, H., Monden, M. and Nakamura, Y. (1999) Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res*, **11**, 281-285.
- Olayioye, M.A., Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Rohrer, J., Gay, B. and Hynes, N.E. (1998) ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol*, **18**, 5042-5051.
- Oshita, F., Ikehara, M., Sekiyama, A., Hamanaka, N., Saito, H., Yamada, K., Noda, K., Kameda, Y. and Miyagi, Y. (2004) Genomic-wide cDNA microarray screening to correlate gene expression profile with chemoresistance in patients with advanced lung cancer. *J Exp Ther Oncol*, **4**, 155-160.
- Ota, Y., Beitz, L.O., Scharenberg, A.M., Donovan, J.A., Kinet, J.P. and Samelson, L.E. (1996) Characterization of Cbl tyrosine phosphorylation and a Cbl-Syk complex in RBL-2H3 cells. *J Exp Med*, **184**, 1713-1723.
- Ozen, M., Giri, D., Ropiquet, F., Mansukhani, A. and Ittmann, M. (2001) Role of fibroblast growth factor receptor signaling in prostate cancer cell survival. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1783-1790.
- Partanen, J., Makela, T.P., Eerola, E., Korhonen, J., Hirvonen, H., Claesson-Welsh, L. and Alitalo, K. (1991) FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. *Embo J*, **10**, 1347-1354.
- Peltomaki, P. (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet*, **10**, 735-740.
- Penault-Llorca, F., Bertucci, F., Adelaide, J., Parc, P., Coulier, F., Jacquemier, J., Birnbaum, D. and deLapeyriere, O. (1995) Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. *Int J Cancer*, **61**, 170-176.
- Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O. and Botstein, D. (1999) Distinctive gene expression patterns in human

- mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9212-9217.
- Plotnikov, A.N., Hubbard, S.R., Schlessinger, J. and Mohammadi, M. (2000) Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*, **101**, 413-424.
- Plowman, G.D., Green, J.M., Culouscou, J.M., Carlton, G.W., Rothwell, V.M. and Buckley, S. (1993) Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature*, **366**, 473-475.
- Plowright, E.E., Li, Z., Bergsagel, P.L., Chesi, M., Barber, D.L., Branch, D.R., Hawley, R.G. and Stewart, A.K. (2000) Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. *Blood*, **95**, 992-998.
- Powell, P.P., Wang, C.C., Horinouchi, H., Shepherd, K., Jacobson, M., Lipson, M. and Jones, R. (1998) Differential expression of fibroblast growth factor receptors 1 to 4 and ligand genes in late fetal and early postnatal rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **19**, 563-572.
- Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S. and Ullrich, A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer*, **8**, 11-31.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature*, **432**, 338-341.
- Riedl, S.J. and Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 897-907.
- Rodriguez, J. and Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*, **13**, 3179-3184.
- Romashkova, J.A. and Makarov, S.S. (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Rubin Grandis, J., Melhem, M.F., Barnes, E.L. and Tweardy, D.J. (1996) Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, **78**, 1284-1292.
- Ruschel, A. and Ullrich, A. (2004) Protein tyrosine kinase Syk modulates EGFR signalling in human mammary epithelial cells. *Cell Signal*, **16**, 1249-1261.
- Russo, J., Calaf, G. and Russo, I.H. (1993) A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens. *Crit Rev Oncog*, **4**, 403-417.
- Russo, J., Yang, X., Hu, Y.F., Bove, B.A., Huang, Y., Silva, I.D., Tahin, Q., Wu, Y., Higgy, N., Zekri, A. and Russo, I.H. (1998) Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci*, **3**, D944-960.
- Sada, K., Takano, T., Yanagi, S. and Yamamura, H. (2001) Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J Biochem (Tokyo)*, **130**, 177-186.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **19**, 183-232.
- Scangos, G.a.R., F. H. (1981) Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Genes Dev*, **14**, 1-10.
- Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 211-225.
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*, **110**, 669-672.
- Schlessinger, J. (2004) Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science*, **306**, 1506-1507.
- Schlessinger, J., Lax, I. and Lemmon, M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*, **83**, 357-360.

- Schlessinger, J. and Lemmon, M.A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, **2003**, RE12.
- Schmidt, U., Boucheron, N., Unger, B. and Ellmeier, W. (2004) The role of Tec family kinases in myeloid cells. *Int Arch Allergy Immunol*, **134**, 65-78.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R.M. and Lowe, S.W. (2002) Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell*, **1**, 289-298.
- Scorrano, L. and Korsmeyer, S.J. (2003) Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 437-444.
- Serls, A.E., Doherty, S., Parvatiyar, P., Wells, J.M. and Deutsch, G.H. (2005) Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development*, **132**, 35-47.
- Shah, R.N., Ibbitt, J.C., Alitalo, K. and Hurst, H.C. (2002) FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene*, **21**, 8251-8261.
- Shak, S. (1999) Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol*, **26**, 71-77.
- Sherr, C.J. and DePinho, R.A. (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, **102**, 407-410.
- Shi, Y. (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, **9**, 459-470.
- Shingu, K., Fujimori, M., Ito, K., Hama, Y., Kasuga, Y., Kobayashi, S., Itoh, N. and Amano, J. (1998) Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 in thyroid diseases: difference between neoplasms and hyperplastic lesions. *Endocr J*, **45**, 35-43.
- Simons, J.W. (1995) Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis. *Crit Rev Oncog*, **6**, 261-273.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. and Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, **344**, 783-792.
- Slingluff, C.L., Jr., Hunt, D.F. and Engelhard, V.H. (1994) Direct analysis of tumor-associated peptide antigens. *Curr Opin Immunol*, **6**, 733-740.
- Sliwkowski, M.X., Lofgren, J.A., Lewis, G.D., Hotaling, T.E., Fendly, B.M. and Fox, J.A. (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol*, **26**, 60-70.
- Smith, C.I., Islam, T.C., Mattsson, P.T., Mohamed, A.J., Nore, B.F. and Vihinen, M. (2001) The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. *Bioessays*, **23**, 436-446.
- Soderlind, E., Strandberg, L., Jirholt, P., Kobayashi, N., Alexeiva, V., Aberg, A.M., Nilsson, A., Jansson, B., Ohlin, M., Wingren, C., Danielsson, L., Carlsson, R. and Borrebaeck, C.A. (2000) Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol*, **18**, 852-856.
- Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Eystein Lonning, P. and Borresen-Dale, A.L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10869-10874.

- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Jr., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F. and Brooks, S.C. (1990) Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res*, **50**, 6075-6086.
- Sparmann, A. and Bar-Sagi, D. (2004) Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, **6**, 447-458.
- Stebbing, J., Copson, E. and O'Reilly, S. (2000) Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rev*, **26**, 287-290.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. and Vogt, P.K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, **260**, 170-173.
- Streit, S., Bange, J., Fichtner, A., Ihrler, S., Issing, W. and Ullrich, A. (2004) Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, **111**, 213-217.
- Su, B. and Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol*, **8**, 402-411.
- Suganuma, K., Kubota, T., Saikawa, Y., Abe, S., Otani, Y., Furukawa, T., Kumai, K., Hasegawa, H., Watanabe, M., Kitajima, M., Nakayama, H. and Okabe, H. (2003) Possible chemoresistance-related genes for gastric cancer detected by cDNA microarray. *Cancer Sci*, **94**, 355-359.
- Sweeney, C., Lai, C., Riese, D.J., 2nd, Diamonti, A.J., Cantley, L.C. and Carraway, K.L., 3rd. (2000) Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer. *J Biol Chem*, **275**, 19803-19807.
- Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S. and Yamamura, H. (1991) Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J Biol Chem*, **266**, 15790-15796.
- Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.
- Tiganis, T. (2002) Protein tyrosine phosphatases: dephosphorylating the epidermal growth factor receptor. *IUBMB Life*, **53**, 3-14.
- Toyama, T., Iwase, H., Yamashita, H., Hara, Y., Omoto, Y., Sugiura, H., Zhang, Z. and Fujii, Y. (2003) Reduced expression of the Syk gene is correlated with poor prognosis in human breast cancer. *Cancer Lett*, **189**, 97-102.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 205-215.
- Tsao, J.L., Tavare, S., Salovaara, R., Jass, J.R., Aaltonen, L.A. and Shibata, D. (1999) Colorectal adenoma and cancer divergence. Evidence of multilineage progression. *Am J Pathol*, **154**, 1815-1824.
- Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N. and Yamamura, H. (2000) Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)*, **127**, 321-327.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P. and Tybulewicz, V.L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today*, **21**, 148-154.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J. and et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.

- van Heumen, W.R., Claxton, C. and Pickles, J.O. (1999) Fibroblast growth factor receptor-4 splice variants cause deletion of a critical tyrosine. *IUBMB Life*, **48**, 73-78.
- van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R. and Friend, S.H. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, **415**, 530-536.
- Vitetta, E.S. and Uhr, J.W. (1994) Monoclonal antibodies as agonists: an expanded role for their use in cancer therapy. *Cancer Res*, **54**, 5301-5309.
- Wallasch, C., Weiss, F.U., Niederfellner, G., Jallal, B., Issing, W. and Ullrich, A. (1995) Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *Embo J*, **14**, 4267-4275.
- Wang, L., Devarajan, E., He, J., Reddy, S.P. and Dai, J.L. (2005) Transcription repressor activity of spleen tyrosine kinase mediates breast tumor suppression. *Cancer Res*, **65**, 10289-10297.
- Wang, L., Duke, L., Zhang, P.S., Arlinghaus, R.B., Symmans, W.F., Sahin, A., Mendez, R. and Dai, J.L. (2003) Alternative splicing disrupts a nuclear localization signal in spleen tyrosine kinase that is required for invasion suppression in breast cancer. *Cancer Res*, **63**, 4724-4730.
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **15**, 2922-2933.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309-314.
- Watanabe, T., Wu, T.T., Catalano, P.J., Ueki, T., Satriano, R., Haller, D.G., Benson, A.B., 3rd and Hamilton, S.R. (2001) Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*, **344**, 1196-1206.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727-730.
- Weinberg, R. (1996) *Racing to the Beginning of the Road The Search for the Origin of Cancer*. Harmony Books, New York.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Weldon, C.B., Scandurro, A.B., Rolfe, K.W., Clayton, J.L., Elliott, S., Butler, N.N., Melnik, L.I., Alam, J., McLachlan, J.A., Jaffe, B.M., Beckman, B.S. and Burow, M.E. (2002) Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery*, **132**, 293-301.
- Wiley, H.S. and Burke, P.M. (2001) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic*, **2**, 12-18.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R. (1972) Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J Pathol*, **106**, Pix.
- Xie, D., Sham, J.S., Zeng, W.F., Lin, H.L., Bi, J., Che, L.H., Hu, L., Zeng, Y.X. and Guan, X.Y. (2005) Correlation of AIB1 overexpression with advanced clinical stage of human colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, **36**, 777-783.
- Yamada, T., Fujieda, S., Yanagi, S., Yamamura, H., Inatome, R., Sunaga, H. and Saito, H. (2001) Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol*, **166**, 538-543.
- Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Kitaguchi, H., Tybulewicz, V.L. and Yamamura, H. (2001) Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. *Blood*, **98**, 2869-2871.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M.X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 127-137.

- Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988) Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry*, **27**, 3113-3119.
- Yoshimura, N., Sano, H., Hashiramoto, A., Yamada, R., Nakajima, H., Kondo, M. and Oka, T. (1998) The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clin Immunol Immunopathol*, **89**, 28-34.
- Yu, C., Wang, F., Kan, M., Jin, C., Jones, R.B., Weinstein, M., Deng, C.X. and McKeehan, W.L. (2000) Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4. *J Biol Chem*, **275**, 15482-15489.
- Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A. and Backer, J.M. (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110 α catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol*, **18**, 1379-1387.
- Yuan, Y., Mendez, R., Sahin, A. and Dai, J.L. (2001) Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res*, **61**, 5558-5561.
- Zhou, W., Goodman, S.N., Galizia, G., Lieto, E., Ferraraccio, F., Pignatelli, C., Purdie, C.A., Piris, J., Morris, R., Harrison, D.J., Paty, P.B., Culliford, A., Romans, K.E., Montgomery, E.A., Choti, M.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2002) Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers. *Lancet*, **359**, 219-225.
- Zhu, L., Somlo, G., Zhou, B., Shao, J., Bedell, V., Slovak, M.L., Liu, X., Luo, J. and Yen, Y. (2005) Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther*, **4**, 787-798.
- Zunino, F., Gambetta, R., DiMarco, A., Luoni, G. and Zaccara, A. (1976) Effects of the stereochemical configuration on the interaction of some daunomycin derivatives with DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **69**, 744-750.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für die Vergabe des interessanten Themas bedanken. Besonders danke ich ihm für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen, seine Unterstützung sowie die Freiheit, meine eigenen Gedanken und Ideen zu verfolgen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Ludwig-Maximilians-Universität München zu betreuen.

Ein großes Dankeschön geht an Reimar Abraham, Pjotr und Tatjana Knyazev(a) und Irmi Sures für die Einführung in die wunderbare Welt der Makroarrayanalyse.

Heike Stubbe gilt mein Dank für die technische Assistenz der letzten Zeit.

Danken möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt dabei allen Mitgliedern des Donnerstagsseminars Ute Richter, Phillip Mertins, Sushil Kumar, Yxiang Zhang, HaJü Berger, Lars Anders, Miriam Gensler, Marcus Buschbeck, Marta Murgia, Andreas Weiss und Anja Ruschel für ihre stete Diskussionsbereitschaft, ihre wertvollen Anregungen und ihre konstruktive Kritik.

Ich danke allen jetzigen und früheren Kollegen, die zu einem entspannten und stets heiteren Arbeitsklima beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt schließlich meiner Familie, die mir meine Ausbildung durch ihre immerwährende Unterstützung ermöglichte.