

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. H. Potschka

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Interaktion von Opioiden mit Herceptin® in humanen Mammakarzinomzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Edina Kathrin Speckmaier
aus Marklkofen

München 2010

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	6
II	Literaturübersicht	8
1.	Opioide	8
1.1	Definition und Einteilung	8
1.2	Rezeptoren	8
1.3	Opioiderge Wirkmechanismen	9
1.3.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	9
1.3.2	Adenylylcyclasen	11
1.3.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)	12
1.4	Therapie von Tumorschmerzen	13
1.5	Nebenwirkungen der Opioide	15
2.	EGF-Rezeptoren	15
2.1	Definition	15
2.2	Proteinstruktur	16
2.3	Einteilung und Funktion der einzelnen EGF-Rezeptoren	17
2.4	HER-2 Rezeptor	17
3.	Herceptin® (Trastuzumab)	18
3.1	Überblick	18
3.2	Wirkmechanismus	19
3.3	Therapie und Verabreichung	20
3.4	Zulassung	21
III	Fragestellung	22
IV	Material und Methoden	23
1.	Materialien	23
1.1	Geräte	23
1.2	Verbrauchsgegenstände	24
1.3	Chemikalien	25
1.4	Verwendete DNA und Antikörper	27
2.	Methoden	27
2.1	Zellmodelle	27

2.1.1	Zellkultur	27
2.1.1.1	Kultivierung der BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen	28
2.1.1.2	Kryokonservierung der Zellen	29
2.1.1.3	Auftauen der Zellen	29
2.1.1.4	Zellernte	29
2.1.2	Opioid-Behandlung	30
2.1.3	Herceptin [®] -Behandlung	30
2.2	Bestimmung von Opioidrezeptoren mittels RT-PCR und Radioliganden-Bindung	31
2.2.1	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	31
2.2.1.1	RNA-Isolation aus BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen	31
2.2.1.2	RT-PCR: Transkription der mRNA in cDNA	33
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.1.4	Agarose Gelelektrophorese	36
2.2.2	Radioliganden-Bindung	37
2.2.2.1	Membranpräparation	37
2.2.2.2	Proteinbestimmung nach Lowry	38
2.2.2.3	Bindung mit ³ H-U69,593	39
2.2.2.4	Bestimmung der Rezeptorendichte (B _{max})	40
2.3	Bestimmung der Effektorenregulation	41
2.3.1	Adenylylcyclaseaktivität	41
2.3.1.1	Intrazelluläre cAMP-Akkumulation	42
2.3.1.2	Bestimmung von cAMP mittels ELISA	42
2.3.2	Affinitätsreinigung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Herceptin [®]	45
2.3.3	Bestimmung von G-Proteinen und MAP-Kinasen mittels Western Blot	46
2.3.3.1	Herstellung von SDS-Proben	46
2.3.3.2	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen	47
2.3.3.3	SDS-Gelelektrophorese	48
2.3.3.4	Transfer von Proteinen im Semidry-Blot-Verfahren	48
2.3.3.5	Immunchemische Proteindetektion	50

2.3.3.6	Detektion der Proteinbande mittels Chemilumineszenz	51
2.3.4	Kristallviolett-Test	52
2.4	Auswertung der Ergebnisse	53
V	Ergebnisse	54
1.	Charakterisierung von Opioidrezeptoren in BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen	54
1.1	Nachweis von Opioidrezeptoren mittels RT-PCR	54
1.1.1	GAPDH (186 bp)	54
1.1.2	μ -Opioidrezeptor (342 bp)	55
1.1.3	δ -Opioidrezeptor (494 bp)	56
1.1.4	κ -Opioidrezeptor (322 bp)	57
1.2	Quantifizierung von κ -Opioidrezeptoren in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	58
1.3	Nachweis von G-Proteinen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	59
1.4	Regulation der Adenylylcyclase in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	60
2.	Interaktion von Opioiden mit Herceptin[®] in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	62
2.1	Interaktion auf Ebene der Signaltransduktion	62
2.1.1	Regulation der ERK1/2 in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	62
2.1.2	Regulation alternativer MAP-Kinasen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	65
2.1.3	Regulation von Apoptosewegen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen	65
2.2	Interaktion auf Ebene des Zellwachstums	67
VI	Diskussion	71
VII	Zusammenfassung	78
VIII	Summary	80
IX	Literaturverzeichnis	81
X	Anhang	89
XI	Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AG 825	(E)-3-[3-[2-Benzothiazolythio)methyl]-4-hydroxy-5-methoxyphenyl]-2-cyano-2-propenamide
AG 1478	N-(3-Chlorophenyl)-6,7-dimethoxy-4-quinazolinamine
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
AK	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin, Fraktion V
bp	Base pairs, Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cn	Kontrollgruppe
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
CTC	Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat-Lösung
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMEH	DEMEM mit Hepes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	δ-Opioid Rezeptor
DTT	Threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
EC50	halbmaximal wirksame Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)- N, N, N', N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunbindungsassay
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
For	Forskolin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Glut	L-Glutamin
G-Proteine	Guaninnukleotid-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

HB	Homogenisierungspuffer
HCl	Salzsäure
Hepes	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Her	Herceptin®
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
JNK	N-terminale Kinase (c-Jun)
kB	Kilobasenpaare
KD	Dissoziationskonstante
KOR	k-Opioid Rezeptor
mAb	monoklonaler Antikörper
MAP Kinase	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOR	μ-Opioid Rezeptor
mRNA	messenger-ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
NorBNI	Norbinaltorphimine
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pen	Penicillin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Rt	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
TGF _α	Transforming Growth Factor _α
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U	Umdrehungen / Minute
UV	ultraviolettes Licht
Wort	Wortmannin

I Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau in den westlichen Staaten. Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr 57.000 Frauen an der heimtückischen Krankheit, dies macht ungefähr 28 % aller Krebsneuerkrankungen im Jahr aus (Haberland et al., 2010). Doch auch weltweit stellt Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen dar, was die besondere Dringlichkeit nach bestmöglichen diagnostischen und therapeutischen Mitteln deutlich macht. Als Ursachen für die Entstehung von Brustkrebs kommen unterschiedliche Faktoren in Frage, wie zum Beispiel genetische und hormonelle Faktoren oder aber auch die Exposition mit ionisierender Strahlung, Übergewicht und Rauchen. Unabhängig von der Entstehungsursache wurde in der letzten Zeit immer mehr die Bedeutung der HER-2-Überexpression in Mammakarzinomzellen hinsichtlich der Behandlung und Prognose der Erkrankung diskutiert (Clark und McGuire, 1991). Etwa 25-30% der Mammakarzinome exprimieren HER-2 stark über, d.h. auf den Zellmembranen der Brustkrebszellen befinden sich übermäßig viele dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen, die das Zellwachstum (Proliferation) fördern und den programmierten Zelltod (Apoptose) hemmen (Emlet et al., 2006). In der Europäischen Union ist für diesen Fall seit dem Jahr 2000 der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) bei Frauen mit metastasiertem Brustkrebs und seit Mai 2006 auch bei Frauen mit Brustkrebs im Frühstadium (ohne Metastasen) zur Therapie verfügbar. Neben der Anwendung von Trastuzumab als adjuvante Therapie werden zur wirksamen Kontrolle der mit Krebserkrankungen verbundenen Schmerzen häufig auch Opioidanalgetika eingesetzt. In diesem Zusammenhang werden seit einigen Jahren die regulatorischen Effekte von Opioiden auf das Zellwachstum und die Proliferation von Tumorzellen intensiv erforscht und diskutiert. Trotz zahlreicher Hinweise konnten bisher noch keine eindeutigen Beweise dafür gewonnen werden, ob Tumorzellen in der Tat in Anwesenheit von Opioiden in ihrem Wachstum gefördert oder gehemmt werden (Janecka et al., 2004). Angesichts des häufigen Vorkommens von Brustkrebs und der damit verbundenen hohen Sterberate ist es umso wichtiger, möglichst schnell Informationen darüber zu gewinnen, inwiefern Opiode in das Wachstum von Tumorzellen eingreifen und ob diese möglicherweise mit der Wirkung von

Trastuzumab (Herceptin[®]) interferieren. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere humane Mammakarzinomzelllinien auf die Anwesenheit von Opioidrezeptoren hin untersucht, diese pharmakologisch charakterisiert und einer ersten Abschätzung möglicher Interaktionen mit Trastuzumab (Herceptin[®])-vermittelten intrazellulären Signalwegen unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass HER-2-überexprimierende humane SKBR-3 Mammakarzinomzellen funktionelle κ -Opioidrezeptoren tragen und diese die antiproliferative Wirkung von Trastuzumab (Herceptin[®]) verstärken können.

II Literaturübersicht

1. Opioide

1.1 Definition und Einteilung

Unter Opioiden versteht man eine chemisch heterogene Gruppe von Pharmaka, die aus natürlichen und synthetischen Substanzen besteht. Sie besitzen morphinartige Wirkungen und sind an Opioidrezeptoren wirksam. Opioide finden vor allem als stark wirksame Analgetika, Antitussiva und Antidiarrhoika ihren Einsatz in der Medizin. Als Schmerzmittel werden sie zur Behandlung mittelstarker bis stärkster Schmerzen traumatischer und maligner Genese eingesetzt (Ananthan, 2006). Einteilen lassen sie sich nach unterschiedlichen Kriterien, so zum Beispiel nach ihrer endogenen oder exogenen Herkunft. Exogene Opioide werden dem Körper in Form von Medikamenten zugeführt, endogene (Endorphin, Enkephalin, Dynorphin) dagegen werden natürlicherweise bei Stress ausgeschüttet, um Schmerzen zu unterdrücken (Corbett et al., 2006). Des Weiteren werden Opioide analog des WHO-Stufenschemas in schwache und starke Opioide eingeteilt. Schließlich können sie nach ihrer chemischen Struktur in natürliche (Morphin), halbsynthetische (Hydromorphon) und synthetische (Fentanyl) Opioide eingeteilt werden. Alle Opioide vermitteln ihre Wirkung über spezifische Opioidrezeptoren, worauf im nächsten Punkt näher eingegangen wird.

1.2 Rezeptoren

Sowohl im zentralen und peripheren Nervensystem als auch in vielen Geweben ektodermalen Ursprungs werden Opioidrezeptoren exprimiert, an die Opioid-Agonisten ebenso wie -Antagonisten binden und ihre Wirkung entfalten. Bei den Opioidrezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Choi et al., 2006), das heißt, sie leiten Signale über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) in das Zellinnere weiter. Es existieren folgende Rezeptortypen, die sich wiederum in Rezeptorsubtypen unterteilen lassen: μ (μ_1 , μ_2), δ (δ_1 , δ_2) und κ (κ_1 , κ_2 , κ_3) (Corbett et al., 2006). Alle Opioidrezeptoren können unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren und damit vielfältige Reaktionen in der Zelle hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit wird

der κ -Rezeptor eine bedeutende Rolle spielen, der unter anderem für die Analgesie aber auch für Atemdepression und Sedation verantwortlich ist.

1.3 Opioiderge Wirkmechanismen

1.3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Wie bereits oben erwähnt, zählen die Opioidrezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Unter den Membranrezeptoren stellen diese die größte und vielseitigste Gruppe dar. Neben Entzündungsprozessen oder gezielten Zellbewegungen spielen sie auch eine sehr wichtige Rolle für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Schematisch lässt sich der strukturelle Aufbau eines GPCR's folgendermaßen darstellen:

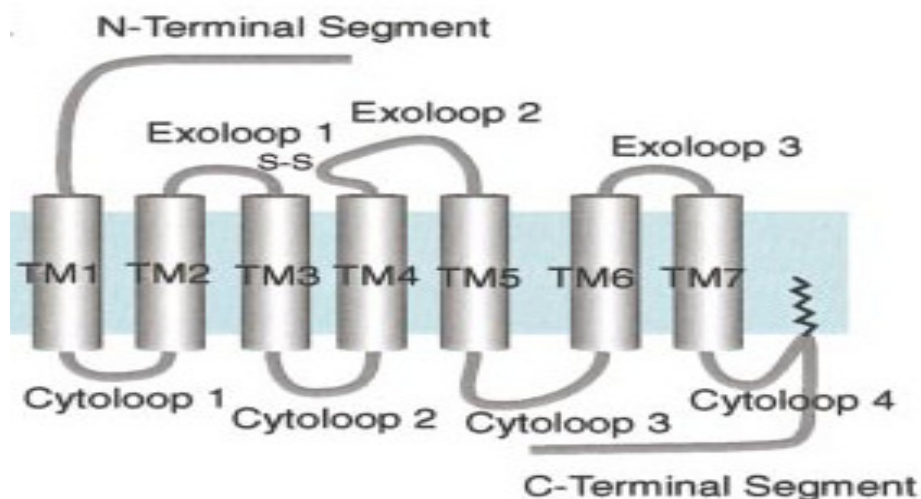


Abbildung 1: Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Ji et al., 1998).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus 7 transmembranen Domänen, weshalb sie auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet werden. Die transmembranen Domänen werden durch je drei extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (Gudermann et al., 1996). Die extrazellulären Schleifen dienen der Ligandenbindung, die intrazellulären stellen Bindungsstellen für G-Proteine dar. Die Funktion der Rezeptoren wird durch die Selektivität verschiedener G-Proteine bestimmt. Diese aktivieren nachfolgend ihre entsprechenden Effektoren. Aufgrund funktioneller

Eigenschaft der $G\alpha$ -Untereinheit werden G-Proteine in folgende Gruppen eingeteilt:

Familie	$G\alpha$ -Untereinheit
G_s	$G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$
G_i	$G\alpha_{1-3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$
G_q	$G_{q/11}\alpha$, $G_{16}\alpha$
G_{12}	$G_{12}\alpha$, $G_{13}\alpha$

Aus funktioneller Sicht fungieren G-Proteine als molekulare Schalter, die in ihrem inaktiven Zustand an Rezeptoren binden, von diesen aktiviert werden und anschließend das Signal an ihre entsprechenden intrazellulären Effektoren weiterleiten. Das folgende Schema bildet einen G-Protein-Zyklus ab:

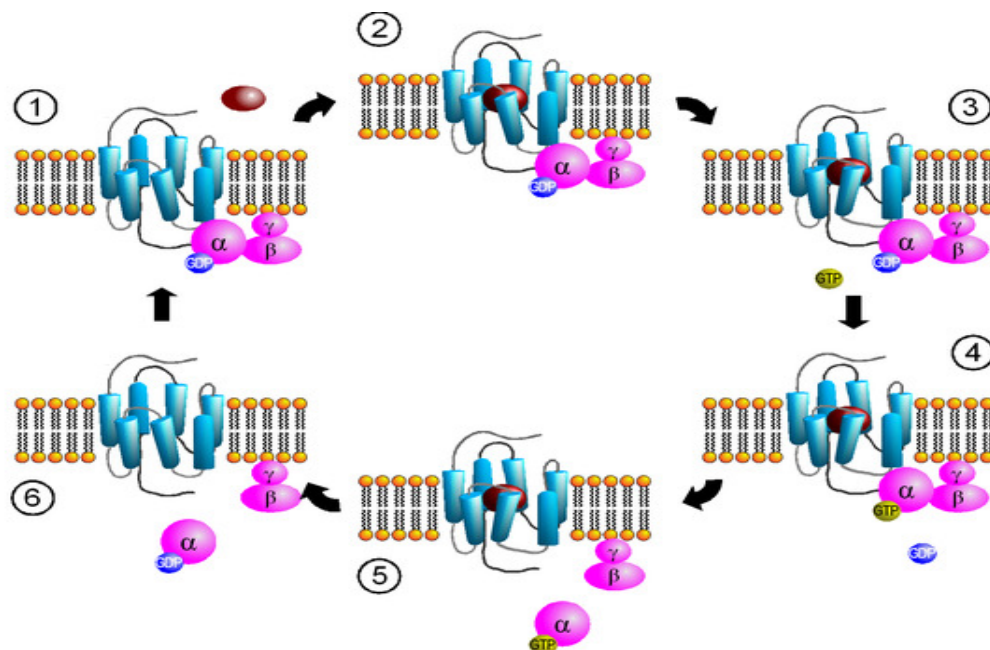


Abbildung 2: (1) Bindung des inaktiven, GDP-gebundenen G-Proteins an den Rezeptor. (2) Ligandenbindung. (3) Aktivierung des Rezeptors. (4) Aktivierung des G-Proteins mit Abdissoziation von GDP von der $G\alpha$ -Untereinheit und nachfolgender Bindung von GTP an diese. (5) Dissoziation des G-Proteins und Regulation intrazellulärer Signalwege durch aktivierte $G\alpha$ und freie $G\beta\gamma$.

Untereinheiten. (6) Inaktivierung des G-Proteins durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit mit nachfolgender Reassoziierung mit $G\beta\gamma$ (Kapoor et al., 2009).

Opioidrezeptoren koppeln G-Proteine der G_i , G_q und G_{12} Familie, wodurch sie unterschiedlichste Signalkaskaden induzieren können. Somit werden nicht nur „klassische“ Effektorsysteme wie Adenylylcyclasen, K^+ - und spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle beeinflusst, sondern auch komplexere Signalmechanismen wie der PI3K und verschiedene MAP-Kinasewege reguliert (Choi et al., 2006). Im Folgenden werden die Adenylylcyclasen sowie die MAP-Kinasen näher besprochen.

1.3.2 Adenylylcyclasen

Bei den Adenylylcyclasen handelt es sich um integrale membranständige Enzyme, die aus Adenosintriophosphat (ATP) die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) katalysieren. Beim Säuger existieren 9 Isoformen (I-IX), die durch verschiedene Regulatoren in ihrer Funktion beeinflusst werden. Opioidrezeptoren können z.B. über inhibitorische $G\alpha$ -Untereinheiten die Aktivität der Isoformen I, V und VI hemmen, über freie $G\beta\gamma$ -Untereinheiten die der Isoformen II und IV dagegen stimulieren (Pavan et al.,

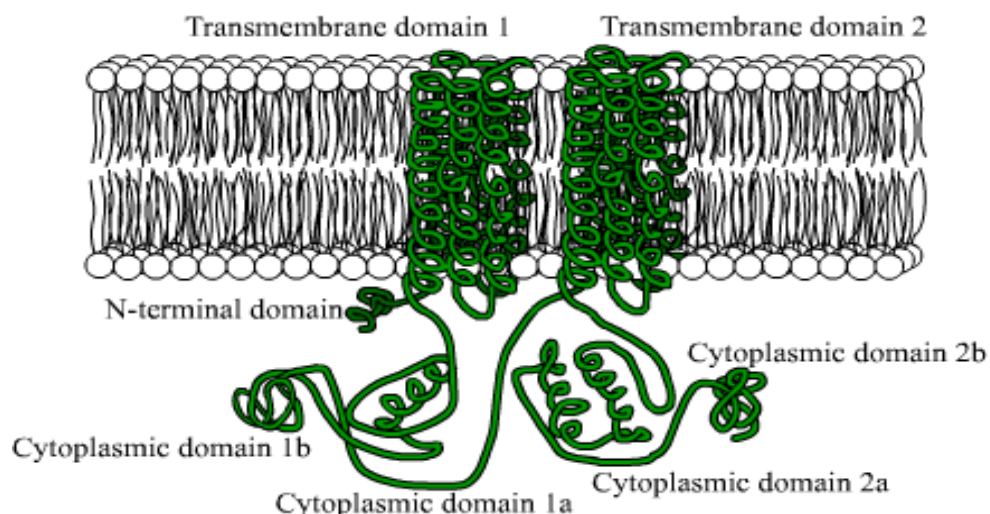


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Adenylylcyclase (Kandel, 2000).

2009). Im Gegensatz zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bestehen die Adenylylcyclasen aus 12 transmembranen, α -helikalen Domänen, für deren Funktion vor allem die cytosolischen N- und C-Termini entscheidend sind (Hanoune et al., 1997; Sadana et al., 2009). Aber auch die zwischen Helix 6 und 7 gelegene cytosolische C₁-Domäne spielt bei der Regulation der Aktivität eine wichtige Rolle. Der Aufbau einer Adenylylcyclase, die in die Zellmembran eingebettet ist, wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

Bei den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen handelt es sich um eine Familie verschiedener Serin/Threonin-Kinasen, die an einer Vielzahl mehrstufiger Signaltransduktionswege beteiligt sind. Sie sind unter anderem maßgeblich an der Regulation der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltods beteiligt (Jeffrey et al., 2007). Aktiviert werden MAP-Kinasen primär durch Wachstumsfaktoren, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. EGF Rezeptor) eine Abfolge von drei Proteinkinasen phosphorylieren, die schließlich das extrazelluläre Signal an die MAP-Kinasen weiterleiten (Muller und Unterwald, 2004). Dieser konservierte Signalweg sieht wie folgt aus:

MAP-KK Kinase (MAP3K) → MAP-K Kinase (MAP2K) → MAP Kinase (MAPK)
→ weitere Signalwege

Aktiviert MAP-Kinasen können eine Vielzahl von Effektorproteinen an spezifischen Serin-bzw. Threonin-Resten phosphorylieren und leiten auf diesem Wege die Information an regulatorische Proteine im Zytosol und im Zellkern weiter. Im Zellkern beispielsweise binden sie an Transkriptionsfaktoren und beeinflussen somit die Expression vieler Zielgene (Kholodenko und Birtwistle, 2009). Im inaktivierten, dephosphorylierten Zustand verteilen sich die MAP-Kinasen wieder ins Zytosol um und können erneut aktiviert werden.

Die Familie der MAP-Kinasen wird in folgende drei Gruppen eingeteilt (Yin et al., 2009):

Extracellular Signal-related Kinases (Isoformen ERK-1 und ERK-2)
p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK)

Der ERK1/ERK2-Weg steht im Zusammenhang mit Zelldifferenzierung, Zellwachstum und –proliferation. Dieser Weg spielt in der vorliegenden Arbeit eine besondere Rolle, da er bei etwa 30% aller Krebsarten in einem hyperaktiven Zustand vorliegt. Der p38-Signalweg wird dagegen über Stress, Tumornekrosefaktoren oder Interleukin-1 aktiviert und wird mit Mechanismen der Entzündung, Differenzierung, Wachstum und dem programmierten Zelltod (Apoptose) in Verbindung gebracht. Die dritte Gruppe der MAP-Kinasen, die JNK, wird über Stress, UV-Licht oder auch durch osmotischen Druck aktiviert und spielt ebenso wie die p38 bei Entzündung, Zelldifferenzierung, -wachstum und Apoptose eine bedeutende Rolle (Waskiewicz und Cooper, 1995). Abbildung 4 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Aktivierung von MAP-Kinasen und mögliche Signalwege.

1.4 Therapie von Tumorschmerzen

Es wurde bereits erwähnt, dass Opioide bei verschiedenen Indikationen eingesetzt werden können. Von besonderer Bedeutung in der vorliegenden Arbeit ist ihre Anwendung als Analgetika, insbesondere zur Bekämpfung von Tumorschmerzen. Für Frauen, bei denen Brustkrebs diagnostiziert wird, besteht eine der Hauptängste darin, dass sie während des Krankheitsverlaufs und der Behandlung enormen Schmerzen ausgesetzt sind (Walsh und West, 1988). Umso wichtiger ist eine zielgerichtete, effektive und möglichst nebenwirkungsfreie Schmerzbehandlung. Als stärkste, bei der Tumorbehandlung angewandte Analgetika werden Opioide eingesetzt. Da jede Patientin Schmerzen anders empfindet und deshalb kein einheitliches Behandlungsschema möglich ist, müssen vor Beginn einer Schmerztherapie Art und Ausmaß der Schmerzen exakt ermittelt werden (Tay und Ho, 2009). Nur so ist

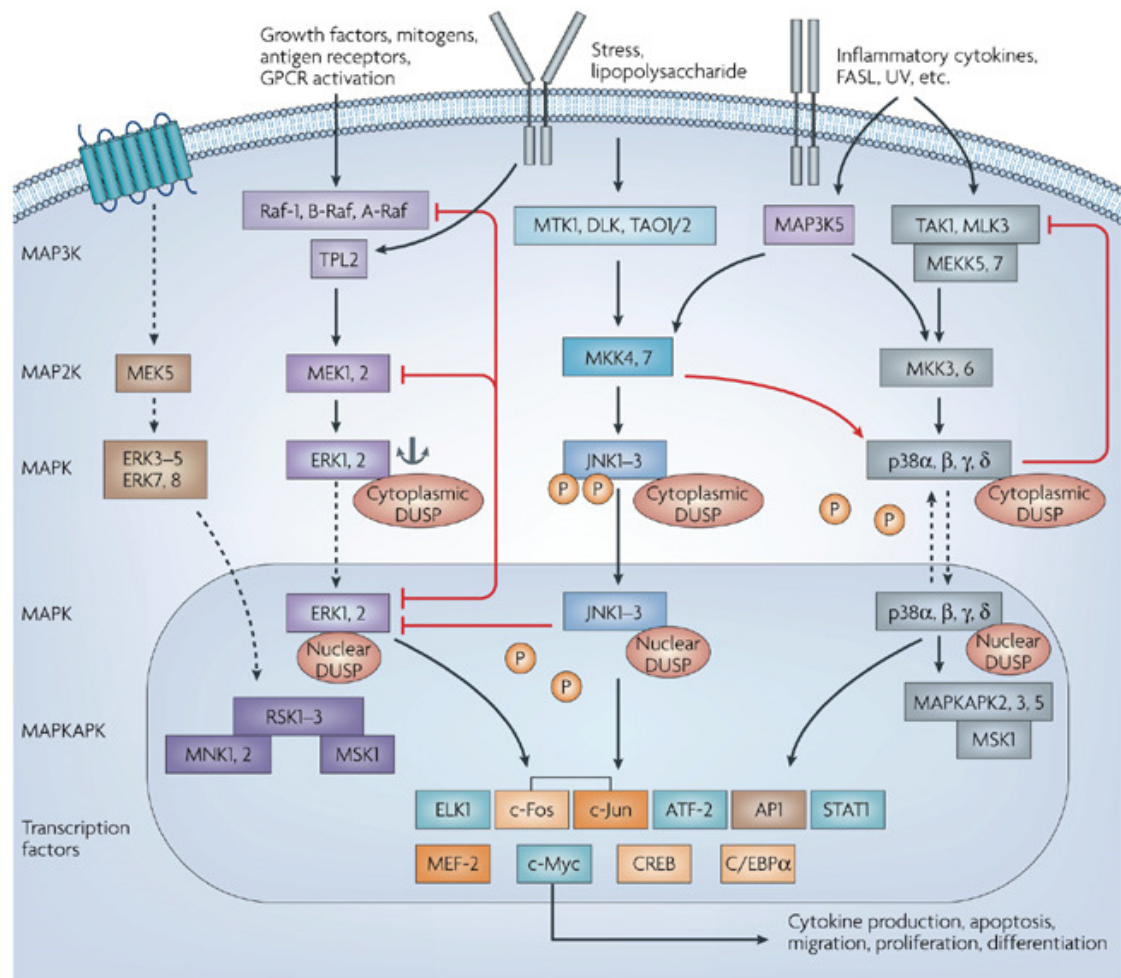


Abbildung 4: Schematische Darstellung der wichtigsten MAP-Kinase Signalwege (Jeffrey et al., 2007).

die Chance auf eine möglichst wirkungsvolle Analgesie gegeben. Die Patientinnen erhalten daher eine auf ihre individuellen Bedürfnisse angepasste Schmerzbehandlung, die während des ganzen Verlaufs regelmäßigen Kontrollen unterliegt. Die Auswahl eines geeigneten Wirkstoffes erfolgt entsprechend eines von der WHO vorgegebenen Stufenschemas (Tay und Ho, 2009):

Stufe	Wirkstoffgruppe
I	nicht-Opioid-Analgetikum
II	schwaches Opioid-Analgetikum
III	starkes Opioid-Analgetikum

Dabei ist zu beachten, dass immer zuerst die Maximaldosis eines Medikamentes ausgeschöpft werden muss, bevor zur nächsten Stufe gewechselt werden kann. Schmerzmittel kommen in verschiedenen Darreichungsformen (Applikationsformen) zum Einsatz. Die häufigste Form der Behandlung von starken Schmerzen ist die orale Anwendung von Morphin (Mercadante et al., 1997). Morphin und andere Opioid-Analgetika liegen jedoch auch in anderen Applikationsformen vor, falls eine orale Behandlung nicht möglich sein sollte (Hunt et al., 1999). In solchen Fällen kann die Verabreichung des Schmerzmittels auch subkutan, intravenös, spinal oder rektal erfolgen. Für die transdermale Anwendung findet vor allem das synthetische Opioid Fentanyl aber auch Buprenorphin Anwendung (Ahmedzai und Brooks, 1997).

Zu den eigentlichen Schmerzmitteln werden oft auch Begleitmedikationen verordnet, da viele Schmerzmittel zum Teil starke Nebenwirkungen bei den Patientinnen hervorrufen (Nauck, 2009). Auf diesen Aspekt soll im folgenden Punkt näher eingegangen werden.

1.5 Nebenwirkungen der Opiode

Wie bei vielen anderen Medikamenten, gehen auch bei Opioiden die therapeutisch erwünschten Wirkungen mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen einher. Hierzu zählen zum Beispiel Übelkeit, Erbrechen, Atemdepression, Obstipation, Bradykardie, Pruritus sowie Toleranz, Abhängigkeit und Sucht (Ananthan, 2006). Darüber hinaus mehrten sich die Hinweise darauf, dass Opiode auch in zahlreiche Aspekte des Tumorwachstums eingreifen (Tegeder und Geisslinger, 2004). Dennoch sind Opiode zum heutigen Zeitpunkt immer noch Mittel der Wahl bei der Behandlung starker Tumorschmerzen.

2. EGF-Rezeptoren

2.1 Definition

Wachstumsfaktoren sind für die Zelle essentielle Stoffe, da sie ihr Wachstum

regulieren und die Proliferation fördern. Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Brockhoff et al., 2001). Sie gehören zur Familie der ErbB-Membranrezeptoren. Da sich EGF-Rezeptoren auch an der Oberfläche von vielen Tumorzellen befinden, können sie das Tumorwachstum teils erheblich beschleunigen und so das onkogene Potential erhöhen.

2.2 Proteinstruktur

Die Kristallstruktur des EGF-Rezeptors ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie besteht aus einem extrazellulären Abschnitt mit zwei homologen Domänen I (L1) und III (L2) und den cysteinreichen Domänen II (CR1 bzw. S1) und IV (CR2 bzw. S2), einer single-pass transmembranen α -Helix und einer katalytischen Region im Zytoplasma, welche die Tyrosinkinase besitzt. Diese wird flankiert durch die Juxtamembran- und C-terminale regulatorische Region. Die cytoplasmatische Kinase-Domäne besitzt eine ATP-Bindungsstelle. Durch die extrazelluläre Bindung seiner Liganden (z.B. EGF, TGF α) dimerisieren die

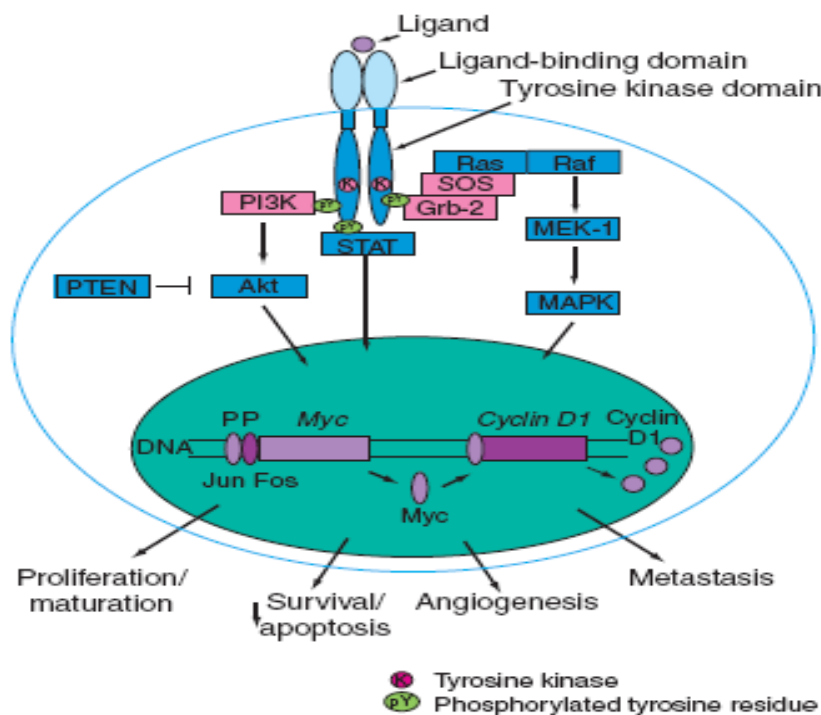


Abbildung 5: Schematische Darstellung EGF-Rezeptor-assoziiierter Signalwege (Baselga, 2002).

monomeren EGF-Rezeptoren, wodurch sie autophosphoryliert und aktiviert werden (Bowers et al., 2001). Die Autophosphorylierung erfolgt mithilfe von Signalmolekülen wie Akt/PKB, MEK und STAT (Baselga, 2002). Somit werden letztendlich Befehle an die Zelle gegeben, um das Zellwachstum zu stimulieren und die Apoptose zu verhindern.

2.3. Einteilung und Funktion der einzelnen EGF-Rezeptoren

Der EGF-Rezeptor ist ein Vertreter der Familie der ErbB-Rezeptoren. Diese lassen sich in vier Unterfamilien einteilen (Brockhoff et al., 2001):

<i>Rezeptor</i>	<i>Alternative Bezeichnungen</i>
ErbB-1	EGFR1, HER-1, HER1/neu
ErbB-2	HER-2, HER2/neu
ErbB-3	HER-3, HER3/neu
ErbB-4	HER-4, HER4/neu

Nicht nur in gesunden Zellen, sondern auch in Tumorzellen findet man EGF-Rezeptoren, die dort teilweise überexprimiert und mutiert vorliegen. Die Tumorzellen können in diesen Fällen unkontrolliert wachsen und sich schnell vermehren, was wiederum die Metastasierung begünstigen kann. Darüber hinaus sind derartige Tumorzellen oft weniger empfindlich gegenüber Chemo- oder Strahlentherapien.

2.4 HER-2 Rezeptor

In der modernen Medizin werden gezielt neue Therapiemöglichkeiten entwickelt, um EGF-Rezeptoren und damit einhergehend onkogene Wachstumssignale zu blockieren und das Tumorwachstum zu unterbinden (Brockhoff et al., 2007). Unter den EGF-Rezeptoren spielt dabei der HER-2-Rezeptor eine wichtige Rolle. Er stimuliert die Zellproliferation über den RAS/MAP-Kinaseweg und hemmt die Apoptose über den mTOR-Signalweg.

Bei etwa 20-30% aller Frauen mit Brustkrebs ist dieser Rezeptor in Karzinomzellen überexprimiert, das heißt, er ist in 10- bis 100-fach höherer Konzentration als in normalen Zellen vorhanden. Wachstumsfaktoren, die an den HER-2 andocken, führen zu einer Dimerisierung des HER-2 mit HER-1-Rezeptoren, die daraufhin Wachstumssignale in das Zellinnere aussenden und im Falle einer Überexpression des HER-2-Rezeptors die Zellteilung beschleunigen. Damit geht ein schlechterer Krankheitsverlauf und eine schlechtere Überlebensprognose einher (Casalini et al., 2001).

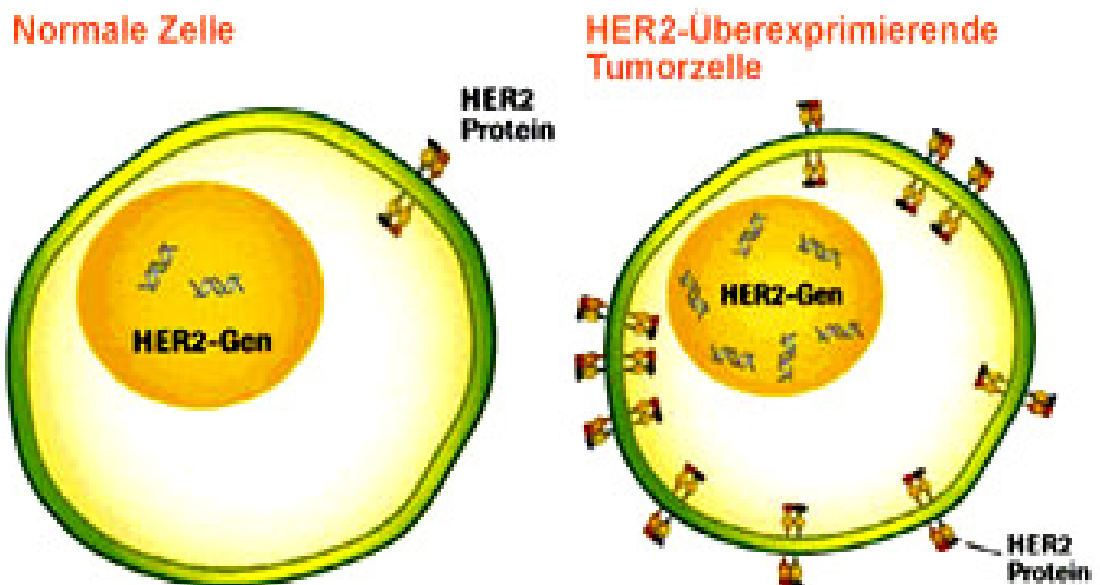


Abbildung 6: Schematische Darstellung HER-2 überexprimierender Brustkrebszellen (Quelle: www.brustkrebs-kompetenz.de).

3. Herceptin® (Trastuzumab)

3.1 Überblick

Da HER-2-Rezeptoren eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum spielen, stellen sie einen vielversprechenden Ansatz für die zielgerichtete Diagnostik und Behandlung von Mammakarzinomen dar. Mittels Immunhistochemischer Diagnostik kann festgestellt werden, ob HER-2-Rezeptoren in Mammatumoren einer Patientin überexprimiert sind (Diermeier et al., 2005). Ist dies der Fall, wird der Status dieser Tumoren als "HER-2-positiv" bezeichnet (Lin und Rugo, 2007). Für HER-2-positive Tumorzellen wurde der humanisierte, monoklonale

Antikörper Trastuzumab, der in Form des zugelassenen Arzneimittels Herceptin® verfügbar ist, entwickelt. Dieser Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptors gerichtet, wodurch er die Aussendung von Wachstumssignalen in das Zellinnere blockiert (Emlet et al., 2006). Der genaue Wirkmechanismus von Herceptin® wird im folgenden Punkt näher erläutert.

3.2 Wirkmechanismus

Spezifische Liganden wie EGF, TGF α oder Heregulin induzieren die Bildung von Homo- oder Heterodimeren einzelner HER-Rezeptoren. Dabei kann es zur Heterodimerisierung des HER-2-Rezeptors mit anderen HER-Rezeptoren oder bei überexprimierten HER-2-Rezeptoren zur Homodimerisierung kommen. Diese Dimere lösen eine Kaskade von Phosphorylierungsschritten aus, welche ihrerseits die Zellproliferation und das Überleben der Zelle fördert (Arpino et al., 2007). Herceptin[®] entfaltet als Monotherapie ebenso wie in Kombination mit Chemotherapeutika seine antineoplastische Wirkung. Die Wirkung von

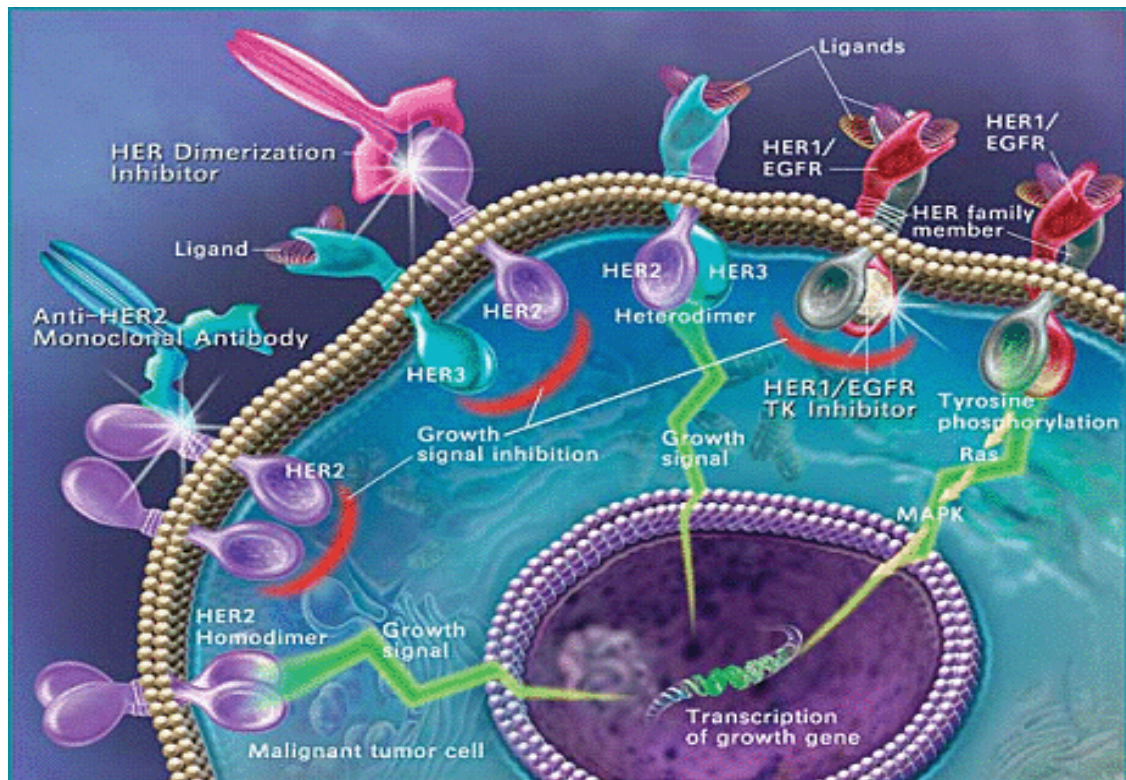


Abbildung 7: Schematische Darstellung der von Trastuzumab induzierten

Signalwege (Quelle: Genentech)

Herceptin® ist bis heute noch nicht vollständig geklärt (Baselga et al., 1998; Cuello, 2001). Es wird vermutet, dass Trastuzumab eine Down-Regulierung der HER-2-Rezeptoren bedingt, wodurch die Zellproliferation gehemmt bzw. die Apoptose eingeleitet wird (Cuello et al., 2001). Mechanistisch werden folgende Ursachen diskutiert: unter anderem sollen Immunzellen aktiviert, proliferative intrazelluläre Signalwege blockiert, die proteolytische Degradation des HER-2-Rezeptors gefördert und die Angiogenese gehemmt werden (Lin und Rugo, 2007). Abbildung 7 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die von Herceptin® aktivierten Signalmechanismen.

3.3 Therapie und Verabreichung

Bevor mit der Anwendung von Herceptin® begonnen werden kann, muss das Stadium des Brustkrebses festgelegt werden. Dies geschieht mithilfe der *TNM-Nomenklatur*, die folgendermaßen aussieht:

T	Tumor
N	Nodes (=Lymphknoten)
M	Metastasen

Dabei handelt es sich um eine Klassifikation, die der Stadieneinteilung von malignen Tumoren dient. Zum einen werden die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors beurteilt, zum anderen werden Aussagen darüber gemacht, ob die Lymphknoten befallen sind und ob bereits eine Metastasierung stattgefunden hat (Gospodarowicz et al., 2004).

Darüber hinaus muss der HER-2-Status der Patientin anhand einer Gewebeprobe ermittelt werden, da Herceptin® nur für HER-2-positive Frauen zugelassen ist. Die Anwendung wird in der Regel als Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika durchgeführt, um einen möglichst optimalen Behandlungserfolg zu erzielen.

Seit 2006 ist Herceptin® zur dreiwöchentlichen Therapie zugelassen, jedoch wird meist einmal wöchentlich eine Infusion (6 mg/kg) über 30-90 min. verabreicht (Gianni et al., 2010). Bei ergänzender (adjuvanter) Gabe dauert die Behandlung 12 Monate. Patientinnen, die bereits Metastasen ausgebildet haben, werden mindestens bis zum Wiederauftreten des Tumors weiterbehandelt.

3.4 Zulassung

Trastuzumab wurde 2000 in der Europäischen Union für Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs zugelassen, in den USA schon 1998 (Nahta und Esteva, 2004). Seit Mai 2006 ist der Wirkstoff auch für HER-2-positive Frauen im Frühstadium, das heißt für Frauen ohne Metastasen zugelassen (Rüschhoff et al., 2009), da beobachtet wurde, dass die Rückfallgefahr bei adjuvanter Gabe deutlich vermindert ist.

III Fragestellung

In den letzten Jahren wurden Anstrengungen unternommen, die Therapie von Brustkrebspatientinnen zu verbessern, um sie noch effizienter und mit weniger Nebenwirkungen behaftet zu gestalten. Dabei stellen Opioide zur Schmerzbekämpfung einen wichtigen Bestandteil dar. In letzter Zeit wurden jedoch in der Literatur vermehrt sowohl proliferative als auch apoptotische Effekte von Opioiden beschrieben, die mit der Wirkung von Zytostatika interferieren könnten. Bei HER-2-positiven Mammakarzinomen wird seit dem Jahr 2000 der monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) im Rahmen einer personalisierten antineoplastischen Therapie erfolgreich eingesetzt. Seit dem Jahr 2006 ist er auch für Brustkrebspatientinnen im Frühstadium zugelassen.

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, einen ersten Hinweis auf mögliche Interaktionen zwischen Opioiden und Herceptin® in Mammakarzinomzellen zu beschreiben. Hierfür wurden folgende Fragen beantwortet:

1. Tragen Mammakarzinomzellen Opioidrezeptoren?

Hierzu wurden drei verschiedene HER-2-überexprimierende und nicht-überexprimierende humane Mammakarzinomzelllinien mittels RT-PCR und Radioliganden-Bindung auf die Anwesenheit von Opioidrezeptoren hin untersucht.

2. Sind die Opioidrezeptoren in diesen Zellen funktionell aktiv, so dass sie mit den von Herceptin® regulierten intrazellulären Signalkaskaden interferieren können?

Hierzu wurde das in diesen Zelllinien vorhandene G-Proteinspektrum mittels Western Blot untersucht. Anschließend wurde die Regulation der intrazellulären cAMP-Produktion sowie mitogener und Apoptose-induzierender Signalwege durch Opioide bestimmt.

3. Wie wirkt sich eine kombinierte Behandlung der Zellen mit Opioiden und Herceptin® auf das Zellwachstum aus?

Diese Frage wurde mittels Bestimmung des Effekts von Opioiden und Herceptin® auf das Zellwachstum untersucht.

IV Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Brutschrank, Modell 6000	Heraeus, Hanau
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr
-70 °C Gefrierschrank	GFL
Laminar Flow, Modell 6.12 S	BDK, Sonnenbühl
Minifuge	Heraeus, Hanau
Polytron	Bachofer, Reutlingen
Sorvall® Rotor RC-5B	DuPont Instruments, Mechelen, Belgien
Spektralphotometer, Modell U-3200	Hitachi Scientific Instruments, Schwäbisch Gmünd
Szintillationsmessgerät, Modell LS 6500	Beckmann-Coulter, Krefeld
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vakuum Filtrationseinheit	Millipore, Schwalbach
Video-Imager, Modell E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch
PCR-Cycler	Primus, MWG-Biotech
Semi-dry Blotter	Pharmacia LKB, Multiphor II
Eismaschine	Scotsman AF-10
Stromanschluss für Semi-Dry Blotter und Elektrophoresekommer	Power Supply, BioRad, Modell 1000/500
Wasserbad	julabo 20B (Helmut Saur, Reutlingen)
Stickstoff	Air Liquide
ELISA-Reader	Tecan. Spectra

<u>Geräte</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Autoklav	Systec 2540EL (Biomedis, Gießen)
Sterilisator	Memmert UL50 (Schwabach)
Mikrowelle	Severin 900
Schüttler	TPM-2, Sarstedt
PCR-Elektrophoresegerät	Easy Cast TM Modell B1 (Owl, Separation Systems)
Gelkammer für Elektrophorese (Western Blot)	Mini-Protean II, Fa. Bio-Rad
Mikroskop	Labovert, Leitz

1.2 Verbrauchsgegenstände

<u>Materialien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²)	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Rundschalen	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten mit 12 oder 24 Vertiefungen	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Mikrotitrierplatten, Maxisorp [®]	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Deckplättchen	Roth, Karlsruhe
Polvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen, Immobilon-P [®]	Millipore Corporation, Bedford, MA, USA
Röntgenfilm, Hyperfilm TM	Amersham-Biosciences, Freiburg
Schraubgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Silikatglasfaserfilter (Whatman [®] GF/B)	Schleicher & Schuell, Maidstone, England
Zählfläschchen, Minis [®]	Zinsser Analytic, Frankfurt
Zellkulturgefäß, Multi Dish mit 8 Vertiefungen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz

1.3 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid (30%); Bisacrylamid (0,8%) (Rotiphorese® - Gel 30)		Roth, Karlsruhe
Agarose-Pulver: peqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	
Ammoniumperoxidsulfat	APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Fraktion V, proteasefrei (bovin)	BSA	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	DMSO	Roth, Karlsruhe
Dithiotreitol	DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	DMEM	Pan Biotech GmbH
Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure	EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, wasserfrei	EAH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	FKS	PAA, Cölbe
Forskolin	For	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Folin-Ciocalteu`s Phenol Reagenz	Folin- Reagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Herceptin®, 440 mg/Ampulle	Her	Genentech, Inc., San Francisco, U.S.A.
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	IBMX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kupfer-II-sulfat × 5 H ₂ O	CuSO ₄	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe

<u>Chemikalien</u>	<u>Abkürzung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
L-Glutamin	Glut	PAN Biotech GmbH
6 × DNA Probenpuffer		Fermentas, St. Leon-Rot
Luminol		Fluka, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Roth, Karlsruhe
Methanol	MeOH	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Calbiochem, Schwalbach
Natrium-Laurylsulfat	SDS	Roth, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin -N`-(2-Ethansulfonsäure)	HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	PAN Biotech GmbH
Polyethylenglykol 6000	PEG	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Tween	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
³ H-U69,593	Amersham-Biosciences, Freiburg	
Rotiszint® EcoPlus		Roth, Karlsruhe
Triethylamin	TEA	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan-HCl	Tris	Roth, Karlsruhe
Tetramethylbenzamidin	TMB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N,N,N`,N`,-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Merck-Bioscience GmbH, Schwalbach

1.4 Verwendete DNA und Antikörper

cDNA aus BT-474, SKBR-3 und MCF-7, selbst hergestellt
Die verwendeten Antikörper werden im Kapitel 2.3.2.5 Immunchemische Proteindetektion näher beschrieben

2. Methoden

2.1 Zellmodelle

Die Untersuchung der pharmakodynamischen Interaktion zwischen Opioiden und Herceptin® wurde an den humanen Mammakarzinomzellen BT-474, SKBR-3 und MCF-7 durchgeführt. BT-474 und SKBR-3 Zellen wurden von ATCC (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) bezogen. MCF-7 Zellen wurden uns freundlicherweise von der Chirurgischen Poliklinik der LMU München zur Verfügung gestellt. Bei allen drei Zelllinien handelt es sich um adhärente Zellen epithelialer Herkunft, wobei SKBR-3 und MCF-7 Zellen aus Lungenmetastasen isoliert wurden. Ein besonderes und für vorliegende Arbeit relevantes Merkmal der SKBR-3 Zellen ist, dass sie den HER-2-Rezeptor überexprimieren (Nahta et al., 2004), während MCF-7 Zellen hauptsächlich durch ein IGF-1 abhängiges Wachstum charakterisiert sind (Boylan et al., 1998).

2.1.1 Zellkultur

Für die Anzucht der Zellen wurden Kulturflaschen mit Ventilationsdeckel und einer Bodenfläche von 25 cm², 75 cm² und 150 cm² verwendet (Firma Josef Peske GmbH & Co. KG, Aindling-Arnhofen). Zellkultur Testplatten mit je 12 oder 24 Vertiefungen dienten der Kultivierung von Zellen für die cAMP-Akkumulation, den Nachweis von Proteinen mittels Western Blot und der Bestimmung des Zellwachstums.

2.1.1.1 Kultivierung der BT-474, SKBR-3 und MCF-7- Zellen

Wachstumsmedium:

500 ml	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; Fa. PAN Biotech GmbH)
10%	Fetales Kälberserum (FKS; Fa. PAA), hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min)
4 mM	L-Glutamin (Fa. PAA)
100 IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. PAA)
0,2%	Enrofloxacin

Einfriermedium:

20 %	Fetales Kälberserum
10 %	Dimethylsulfoxid (DMSO)
in Wachstumsmedium gelöst	

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

8 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
2,145 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O
in H ₂ O doppelt destilliert (bidest.), pH 7,43	

PBS mit EDTA:

0,04%	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS, pH 7,43
-------	---

Trypsin-Lösung in PBS mit EDTA:

0,05 %	Trypsin
0,02 %	EDTA
in PBS gelöst, pH 7,43	

Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow (Modell 6.12 S, Fa. BDK) durchgeführt. Die Kultivierung der BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen erfolgte im Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden dreimal pro Woche im Verhältnis 1:3, 1:5 und 1:10 verdünnt und je nach Versuch auf kleine, mittlere oder große Zellkulturflaschen oder auf Platten mit 12 und 24 Vertiefungen verteilt. Dabei wurde das Medium mit einer Absaugvorrichtung entfernt, die Zellen mit 2 ml warmer PBS/EDTA-Lösung gewaschen und anschließend durch eine etwa einminütige Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von warmem Wachstumsmedium gestoppt, die Zellen resuspendiert und die Einzelzellsuspension in neue Behältnisse verteilt.

2.1.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Vor Beginn der Experimente wurde jede Zelllinie expandiert und ein Vorrat in flüssigem Stickstoff angelegt, um später auf identische Zellpassagen zurückgreifen zu können. Hierfür wurden geerntete Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert, in ein Einfrierröhrchen überführt und über Nacht bei -70°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.1.1.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem Wachstumsmedium resuspendiert und das DMSO durch zehnminütige Zentrifugation (Minifuge, Fa. Heraeus) bei 1.200 U/min⁻¹ und 4°C entfernt. Danach wurde das Zellpellet im 37°C warmem Medium aufgenommen, resuspendiert und die Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

2.1.1.4 Zellernte

Für Radioligandenbindungsversuche wurden die Zellen großer Zellkulturflaschen geerntet. Die Flaschen wurden auf ein Eisbad gelegt, die Zellen durch Zugabe von 30 ml eiskaltem PBS mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (1.200

U/min⁻¹, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet bei -70 °C eingefroren.

2.1.2 Opioid-Behandlung

Für die Ausbildung chronischer Opioidwirkungen wurden die Zellen für 1-3 Tage mit dem κ -Opioidrezeptor-Agonisten U69,593 behandelt. Für alle anderen Versuche wurden die Liganden in verschiedenen Konzentrationen und für unterschiedlich lange Zeiträume zum Wachstumsmedium gegeben, so wie es in den einzelnen Abschnitten beschrieben ist.

Verwendete Substanzen:

<u>Substanz</u>	<u>Eigenschaft</u>
Morphin (Mor)	μ -OR-Agonist
Sufentanyl (Suf)	μ -OR-Agonist
[D-Ala ² ,MePhe ⁴ ,Gly-(ol) ⁵] Enkephalin (DAMGO)	μ -OR-Agonist
U50,488	κ -OR-Agonist
U69,593	κ -OR-Agonist
[D-Pen ² ,D-Pen ⁵]-Enkephalin (DPDPE)	δ -OR-Agonist
Norbinaltorphimine (NorBNI)	κ -OR-Antagonist
Naloxon (Nal)	Antagonist an allen Opioid-rezeptoren

Die Substanzen wurden als 100- bis 1000-fach konzentrierte Stammlösungen in Aqua bidest. angesetzt und dem vorgewärmten Medium zugesetzt.

2.1.3 Herceptin®-Behandlung

Die Antikörperbehandlung mit Herceptin® erfolgte im Zusammenhang mit den Western Blot- (2.3.3.1) und Proliferationsversuchen (2.3.4). Auf

Konzentrationsangaben sowie Dauer der Behandlung wird in den entsprechenden Abschnitten näher eingegangen.

2.2 Bestimmung von Opioidrezeptoren mittels RT-PCR und Radioliganden-Bindung

Grundlage der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von Opioidrezeptoren in den BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen. Die Expression der Rezeptoren wurde mittels RT-PCR bestimmt, die entsprechenden Rezeptoren anschließend mittels Radioliganden-Bindung quantifiziert.

2.2.1 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine sensitive Methode zum Nachweis der mRNA Expression. Sie beinhaltet zum einen die Reverse Transkriptase-Reaktion und zum anderen die eigentliche PCR, die Vervielfältigung von DNA. Im ersten Schritt wird die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die so gewonnene cDNA wird im Anschluss als Matritze für die PCR verwendet, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Nachdem der DNA-Doppelstrang durch Hitze denaturiert wurde, binden spezifische Primer an die einzelsträngige DNA und die DNA-Polymerase amplifiziert den von den Primerpaaren begrenzten Sequenzabschnitt. Im Idealfall ist ein exponentieller Anstieg der Produktmenge zu erwarten, da jedes neu erstellte Fragment als Matritze für den nächsten Vervielfältigungszyklus dient.

2.2.1.1 RNA-Isolation aus BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen

Zur Herstellung der für die PCR benötigten cDNA wurde RNA gewonnen. Hierzu wurde TRIzol[®] Reagenz verwendet, mit dem nach einem von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Protokoll RNA aus Zelllysaten isoliert werden kann.

Verwendete Materialien für die RNA-Isolation (Angaben pro 75 cm² Zellkulturflasche):

7,5 ml	TRIzol [®] LS (Phenol, Guanidin-isothiocyanat, roter Farbstoff und andere nicht näher genannte Bestandteile)
1,5 ml	Chloroform
1,5 ml	2-Propanol
7,5 ml	75% (v/v) EtOH
0,5 ml	Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) – behandeltes H ₂ O bidest.

Durchführung:

Als erstes wurde das Medium abgesaugt und je 7,5 ml TRIzol[®] auf die Zellen gegeben. Nachdem sie sich von der Bodenfläche abgelöst hatten, wurden sie resuspendiert und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (Rt) wurde 1,5 ml Chloroform zugegeben und 15 sec lang kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation für 10 min bei Rt wurden die Ansätze 10 min zentrifugiert (4.000 U/min⁻¹, 4 °C), wobei es zur Phasentrennung kam. Die obere Phase wurde nun vorsichtig abgenommen, sodass sie nicht mit Material aus der Interphase kontaminiert wurde. Die phenolische Phase wurde in ein weiteres 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 1,5 ml 2-Propanol zugegeben und 4-5 mal vorsichtig geschwenkt. Dabei wurde die RNA gefällt. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen für 15 min in den Kühlschrank gestellt und anschließend 10 min zentrifugiert (4.000 U/min⁻¹, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt, 7,5 ml 75% EtOH zu gegeben und so lange geschüttelt, bis sich das Pellet abgehoben hat. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, bevor je 50 µl DEPC-behandeltes Wasser auf das Pellet gegeben wurde. Hiervon wurden je 5 µl in bereits vorbereitete Reaktionsgefäße (2 ml Fassungsvermögen) mit 495 µl DEPC-behandeltem Wasser überführt (1:100 Verdünnung). Die RNA-Konzentration wurde anschließend im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 gleich 40 µg/ml einer einzelsträngigen RNA.

2.2.1.2 RT-PCR: Transkription der mRNA in cDNA

Im nächsten Schritt wurde die gewonnene RNA in der RT-PCR eingesetzt, um sie in die für die PCR benötigte cDNA umzuschreiben. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Für die RT-PCR wurden folgende Materialien verwendet (Fermentas, First Strand cDNA Synthesis Kit, 20 µl Probenvolumen):

2 µg RNA Präparation
1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer (0,5 µg/µl)
auf insgesamt 11 µl aufgefüllt mit DEPC-behandeltem H₂O bidest.

4 µl 5 × Puffer
1 µl Ribo LockTM (RNase Inhibitor; 20 u/µl)
2 µl dNTP Mix (10 mM)
2 µl M-MuLV RT (Reverse Transkriptase; 20 u/µl)

Durchführung:

Zu 2 µg RNA wurde 1 µl Oligo (dT)₁₈ Primer hinzugefügt und mit DEPC-behandeltem Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler 5 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von Puffer, Ribo Lock, dNTP und MuLV RT wurden die Proben gemischt, abzentrifugiert und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der reversen Polymerase erfolgte durch 5-minütiges Erhitzen auf 70°C. Die so gewonnene cDNA konnte entweder sofort als Matritze in der PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In der vorliegenden Arbeit wurde der Primus 25/96 Thermocycler (Fa. MWG-Biotech) verwendet. Die PCR wurde durchgeführt, um bei den BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen das Vorhandensein von µ-, δ- und κ-Opioidrezeptoren zu überprüfen. Als Qualitätskontrolle wurde zunächst die Integrität der verwendeten cDNA überprüft. Hierfür wurde ein 186 bp langes Fragment der

GAPDH mittels PCR vervielfältigt. Das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert ("housekeeping gene") und muss bei erfolgreicher cDNA-Synthese nachweisbar sein.

Durchführung:

Vorwärtsprimer (GAPDH1): 5'- GCATCTGAGGGCCCACTGAAG -3'

Exon 8

Rückwärtsprimer (GAPDH2): 5'- GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG -3'

Exon 9

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: 94 °C; 5 min

55 °C; 1 min

72 °C; 1 min

40 Zyklen bestehend aus:

Denaturierung: 94 °C; 30 sec

Primeranlagerung: 55 °C; 30 sec

Kettenverlängerung: 72 °C; 1 min

Endverlängerung: 72 °C; 2 min

Vom μ -Opioidrezeptor wurde ein 342 bp langes, allen bekannten Spleissvarianten gemeinsames Fragment amplifiziert. Um mögliche Artefakte aufgrund von Verunreinigungen mit DNA auszuschließen, wurde das Primerpaar so gewählt, dass es auf benachbarten Exons zu liegen kommt.

Durchführung:

Vorwärtsprimer (P1): 5'-GATCATGGCCCTCTACTCCA-3' Exon 1

Rückwärtsprimer (P2): 5'-GCATTTCGGGGAGTACGGAA-3' Exon 2

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: wie unter GAPDH beschrieben

34 Zyklen bestehend aus:

Denaturierung:	95 °C; 1 min
Primeranlagerung:	60 °C; 1 min
Kettenverlängerung:	72 °C; 1 min
Endverlängerung:	72 °C; 10 min

Vom δ -Opioidrezeptor wurde ein 494 bp langes Fragment amplifiziert. Das verwendete Primerpaar kam ebenfalls auf benachbarten Exons zu liegen.

Durchführung:

Vorwärtsprimer (P3): 5'-GCCAAGCTGATCAACATCTG-3' Exon 2

Rückwärtsprimer (P4): 5'-AAGCAGCGCTTGAAGTTCTC-3' Exon 3

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: wie unter GAPDH beschrieben

40 Zyklen bestehend aus:

Denaturierung:	95 °C; 20 sec
Primeranlagerung:	58 °C; 30 sec
Kettenverlängerung:	72 °C; 30 sec
Endverlängerung:	72 °C; 10 min

Vom κ -Opioidrezeptor wurde schließlich unter den gleichen Bedingungen ein 322 bp langes Fragment amplifiziert.

Durchführung:

Vorwärtsprimer (P5): 5'-GGCTTTGGCAGATGCTTTAG-3' Exon 3

Rückwärtsprimer (P6): 5'-AATGACATCGACGTCTTCCC-3' Exon 4

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung: wie unter GAPDH beschrieben

40 Zyklen bestehend aus:

Denaturierung: 95 °C; 20 sec

Primeranlagerung: 58 °C; 30 sec

Kettenverlängerung: 72 °C; 30 sec

Endverlängerung: 72 °C; 10 min

Die individuellen Anlagerungstemperaturen wurden von der Schmelztemperatur der verwendeten Primerpaare abgeleitet. In Optimierungsexperimenten wurden Zykluszahl, Primerkonzentration und MgCl_2 variiert. Die PCR-Ansätze wurden in dafür vorgesehene sterile Gefäße mit 0,2 ml Fassungsvermögen (Fa. Quiagen) pipettiert und umfassten ein Gesamtvolumen von 50 μl . Jeder Ansatz enthielt 28,5 μl H_2O (steriles PCR-Wasser), 5 μl 10 \times Puffer Y bzw. S, 10 μl Enhancer Solution P, 2 μl 25 mM MgCl_2 , 1 μl 10 mM dNTP, jeweils 0,5 μl der beiden Primer, 0,5 μl Taq-Polymerase (5 u / μl) (alle genannten Reagenzien wurden von Peqlab Biotechnologie GmbH bezogen) und 2 μl (2 μg) cDNA als Template. Bei jeder PCR wurde je eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde die cDNA durch steriles PCR-Wasser ersetzt. Als Positivkontrollen wurden humane SH-SY5Y Zellen (μ , δ) oder der klonierte κ -Opioidrezeptor eingesetzt. Diese cDNAs lieferten die entsprechenden Banden in der jeweiligen Produktlänge.

2.2.1.4 Agarose Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurde ein 1,8%-iges Agarosegel hergestellt.

Materialien:

0,9 g Agarose

50 ml 50 fach konzentrierter TAE Puffer:

242 g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA; pH 7,4

	auf 1 l H ₂ O bidest. auffüllen
2 µl	Ethidiumbromid (10 mg/ml)
4 µl	6 x Probenpuffer

Durchführung:

Die Agarose wurde abgewogen und zusammen mit 50 ml TAE Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromidlösung in eine Mini-Gelelektrophorese-Kammer (Fa. Peqlab; Modell B1A) gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel fest war, wurden je 20 µl des PCR Ansatzes, vermischt mit 4 µl Probenpuffer in die Geltaschen pipettiert und die Proben bei einer Stromstärke von 70 mA für ca. 45 min aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1:50 verdünnter TAE Puffer. Die DNA wurde im Anschluss daran im Videodensitometer unter UV-Licht (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab) sichtbar gemacht und ausgewertet. Der aufgetragene Längenstandard ("DNA-Leiter") diente zur Abschätzung der Fragmentlängen.

2.2.2 Radioliganden-Bindung

Die Rezeptorendichte auf der Zelloberfläche wurde mittels Radioliganden-Bindung in Membranpräparationen bestimmt. Hierfür wurde der tritierte κ -Opioidrezeptor-Agonist ³H-U69,593 verwendet.

2.2.2.1 Membranpräparation

Homogenisierungspuffer (HB):

5 mM	Tris-HCl
1 mM	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)- N, N, N', N'-Tetraessigsäure (EGTA)
1 mM	threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol (DTT)
gelöst in H ₂ O bidest., eingestellt auf pH 7,4	

Tris-MgCl₂-Puffer (TM):

50 mM Tris-HCl

5 mM MgCl₂gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4*Durchführung:*

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Für die Membranpräparation wurden die eingefrorenen Zellen aufgetaut, in 10 ml eiskaltem HB resuspendiert und mithilfe eines Ultraturrax (Kinematica[®], Bachofer) für 10 sec homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden intakte Zellen und Zellkerne durch Zentrifugation bei 1.200 U/min⁻¹ und 4°C für 10 min. sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und für weitere 30 min bei 17.000 U/min⁻¹ zentrifugiert (Sorvall[®], Du Pont Instruments), wodurch Plasmamembranen sedimentierten. Die zytosolische Fraktion wurde abgenommen und die pelletierten Membranen in 100 µl TM-Puffer aufgenommen.

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry*Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC-Lösung):*0,1 % CuSO₄ x 5 H₂O0,2 % Na⁺/K⁺-Tartrat10 % Na₂CO₃gelöst in H₂O bidest.*Lowryreagenz A:*

10 ml CTC-Lösung

10 ml 0,8 M NaOH

20 ml 5 % SDS-Lösung

Lowryreagenz B:

1 ml Folin-Ciocalteu Phenol Reagenz (Folin-Reagenz)

gelöst in 5 ml H₂O bidest.

Standardreihe:

Std A: H₂O bidest.

Std B: 2,5 µg/100 µl bovines Serumalbumin (BSA)

Std C: 5 µg/100 µl BSA

Std D: 7,5 µg/100 µl BSA

Std E: 10 µg/100 µl BSA

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et. al (1951). Die durch Tyrosin und Tryptophan vermittelte Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ lässt zusammen mit dem Folin-Reagenz einen tiefblauen Farbkomplex entstehen. Die Proteinbestimmung erfolgte jeweils im Doppelansatz. Die Proben wurden zunächst 1:10 verdünnt und daraus wiederum je 3 µl zur Messung verwendet. Auf die Proben wurde, ebenso wie auf die Standardansätze, 200 µl Lowry A pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde 100 µl Lowry B dazugegeben und die Ansätze für weitere 30 min inkubiert. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer (U-3200; Fa. Hitachi) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$. Der Proteingehalt der Proben wurde durch lineare Regression anhand der Eichgeraden ermittelt.

2.2.2.3 Bindung mit ³H-U69,593*Bindungspuffer (TM-Puffer):*

50 mM Tris-HCl

5 mM MgCl₂

gelöst in H₂O bidest., eingestellt auf pH 7,4

³H-U69,593 (GE Healthcare, TRK 896; spez. Akt. 56 Ci/mmol)

Blocklösung für Glasfaserfilter (GF/B, Fa. Whatman®):

0,1% Polyethylenglycol (PEG) gelöst in H₂O bidest.

Die Bestimmung der spezifischen Bindung (B_0) von $^3\text{H-U69,593}$ an κ -Opioidrezeptoren erfolgte in Anwesenheit eines molaren Überschusses an U69,593 .

Die spezifische Bindung wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$B_0 = B_{\text{total}} - B_{\text{unspez.}}$$

B_0 = spezifische Bindung von $^3\text{H-U69,593}$

B_{total} = Bindung von $^3\text{H-U69,593}$ in Abwesenheit von U69,593

$B_{\text{unspez.}}$ = Bindung von $^3\text{H-U69,593}$ in Anwesenheit von U69,593

Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Bindungsexperimente wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Reaktionsansätze umfassten ein Gesamtvolumen von 200 μl , wobei der Anteil der in Bindungspuffer resuspendierten Plasmamembranen 160 μl betrug. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 1 μM U69,593 bestimmt. Die Ansätze wurden gemischt und bis zum Erreichen des Equilibriums im Wasserbad inkubiert (20°C, 2 h). Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer (TM) wurde die Reaktion gestoppt und das an die Plasmamembranen gebundene $^3\text{H-U69,593}$ durch Filtration über Silikatglasfaser-Filter (GF/B, Fa. Whatman®) mit Hilfe einer Vakuum Filtrationseinheit (Fa. Millipore) vom ungebundenen Radioliganden getrennt. Zur Absättigung der unspezifischen Bindung wurden die Glasfaserfilter eine halbe Stunde mit PEG-Blocklösung benetzt. Die Filter wurden anschließend dreimal mit 3 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, in Zählfläschchen überführt (Minis® 2001, Fa. Zinsser Analytic) und mit je 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® EcoPlus, Fa. Roth) extrahiert. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät (Fa. Beckmann, Modell LS6500) bestimmt. Neben den Proben wurden des Weiteren zwei Tracerproben zur anschließenden Berechnung der Bindungskapazität und zwei Wischproben mitgemessen.

2.2.2.4 Bestimmung der Rezeptorendichte (B_{max})

Mithilfe der Dissoziationskonstante (K_d) des Radioliganden lässt sich von der spezifischen Bindung auf die maximale Bindungskapazität in der

Membranpräparation schließen. Hierbei wird zunächst die eingesetzte Konzentration des Radioliganden (L) unter Einbeziehung seiner spezifischen Aktivität und der Messgenauigkeit des Szintillationszählers (Quench) bestimmt.

Mit folgender Formel lässt sich die maximale Rezeptorendichte berechnen (DeBlasi et al., 1989):

$$B_{\max} = B_0 \times \frac{K_d + L}{L}$$

B_{\max} = maximale Bindungskapazität

B_0 = spezifische Bindung

L = Konzentration des Radioliganden

K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Als Dissoziationskonstante K_d wird diejenige Konzentration eines Liganden bezeichnet, bei der 50% aller Rezeptoren besetzt sind. Für den verwendeten Radioliganden wurde am humanen κ -Opioidrezeptor eine K_d von 3,8 nM bestimmt (Kim et al., 1996). Die Ligandenkonzentration L ist je nach Versuch unterschiedlich. Sie wird aus der eingesetzten Radioaktivität für jeden Versuch gesondert bestimmt.

2.3 Bestimmung der Effektorenregulation

2.3.1 Adenylylcyclaseaktivität

Adenylylcyclasen sind integrale Membranproteine, die aus Adenosintriphosphat (ATP) cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bilden. Ihre Funktion wird durch G-Proteine reguliert. Da cAMP die Rolle eines Second Messenger übernimmt, bildet es einen wichtigen Bestandteil in der Signalkaskade zur Weiterleitung von Signalen in der Zelle. Um eine Aussage darüber zu erhalten, ob Opioidrezeptoren die Adenylylcyclase in den Tumorzellen regulieren, wurde der Einfluss von Opioiden auf den intrazellulären cAMP-Gehalt mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ermittelt.

2.3.1.1 Intrazelluläre cAMP-Akkumulation

Versuchsmedium:

25 mM	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure] (Hepes)
500 µM	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)
gelöst in DMEM (Fa. PAN Biotech GmbH)	

Für die Bestimmung des intrazellulären cAMP Gehaltes wurden die Zellen einer 75 cm² Kulturflasche mit frischem, warmem Wachstumsmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 20 °C und 1.200 U/min pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und je 0,5 ml der Einzelzellsuspension in die Vertiefungen einer 24-Well Platte ausgesät. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank (37 °C; 5% CO₂) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für eine Stunde mit je 250 µl DMEH/IBMX im Brutschrank vorinkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium erneut abgesaugt, die Platten auf das Eisbad gestellt und jeweils 250 µl der folgenden Lösungen zugegeben: DMEH, DMEH + Forskolin, DMEH + Forskolin + Opiode. Im Anschluss daran wurde die cAMP Produktion für 15 min bei 37 °C bestimmt. Um den Abbau des gebildeten cAMP durch Phosphodiesterasen zu hemmen, wurde den Inkubationslösungen 10 µM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), ein Hemmstoff der Phosphodiesterasen, zugegeben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von je 750 µl 50 mM HCl gestoppt und die Proben bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gestellt oder bei -20 °C eingefroren.

2.3.1.2 Bestimmung von cAMP mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Im ELISA wird cAMP durch Konkurrenz mit einem Enzym-gekoppelten cAMP-Konjugat um die Bindung an einen selektiven Antikörper (AK) bestimmt, der über einen anti-Kaninchen AK am Boden einer Platte mit 96 Vertiefungen gebunden ist. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats entsteht eine Farbreaktion, wodurch der Anteil der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme ermittelt werden kann. Die Farbentstehung lässt sich

folgendermaßen erklären: die als Markerenzym dienende Meerrettich-Peroxidase übernimmt die Rolle eines Katalysators und spaltet Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser und Sauerstoff. Dabei reagiert der Sauerstoff mit dem farblosen TMBH_2 zu dem tiefblau gefärbten Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasser. Die Farbreaktion ist dabei indirekt proportional zur Menge des gebildeten cAMP.

Materialien:

Beschichtungspuffer (Coatingbuffer):

0,2 M Carbonatpuffer, pH 9,4

Blockpuffer:

0,05 M NaAcetat mit 1% BSA, pH 6,0

Probenpuffer:

0,05 M NaAcetat mit 0,1% BSA, pH 6.0

Waschpuffer (Phosphatpuffer):

10 mM Phosphatpuffer, pH 7,4

0,01% Tween-20

Substratlösung:

Lösung A:	1 g/l	Wasserstoffperoxid-Harnstoff
	18 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
	10,3 g/l	Zitronensäure $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$

Lösung B:	500 mg	Tetramethylbenzidin (TMB)
	40 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	960 ml	H_2O
	10,3 g/l	Zitronensäure $\times 1 \text{ H}_2\text{O}$

cAMP-Standardkurve:

Standard I: 10 μ M cAMP-Standardlösung in Probenpuffer

A: Probenpuffer

B: 1:10 (Std.I in Probenpuffer verdünnen) 100 + 900 μ l

C: 1:10 aus B 100 + 900 μ l

D: 1:10 aus C 100 + 900 μ l

E: 1:10 aus D 100 + 900 μ l

F: 1:10 aus E 100 + 900 μ l

G: 1:10 aus F 100 + 900 μ l

H: 1:10 aus G 100 + 900 μ l

Acetylierung der Proben:

3 Teile Triethylamin (TEA)

1 Teil Essigsäureanhydrid (EAH)

Durchführung:

Nach dem Abstoppen der cAMP Akkumulation wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und das gebildete cAMP im Überstand je nach Bedarf im Verhältnis 1:10 oder 1:100 verdünnt und anschließend acetyliert. Dazu wurde 50 μ l des TEA/EAH-Gemisches auf jede Vertiefung einer 24-Well Platte gegeben und die Proben unter Schütteln im Abzug für einige Minuten inkubiert. 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit je 10 μ g eines affinitätsgereinigten anti-Kaninchen IgG für 1 h bei Raumtemperatur beschichtet. Der Beschichtungspuffer wurde abgekippt und die Platten ausgeklopft. Unspezifische Bindungsstellen an den Platten wurden durch Zugabe von je 200 μ l Blockpuffer für 30 min abgesättigt. Nachdem der Puffer wieder abgekippt und die Platten ausgeklopft wurden, folgte ein dreimaliger Waschschrift. Im Anschluss daran wurde der erste, gegen cAMP gerichtete Antikörper (AS22; 2,5 μ g/ml) in einem Volumen von je 100 μ l/Vertiefung aufgetragen und für 2 h bei Rt inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Restpuffer abgekippt, die Platten ausgeklopft und dreimal gewaschen. Nun

wurden die Proben und die Standardreihe aufgetragen. Im Dreifachansatz wurden je 100 µl der Standardreihe und je 25 µl der verdünnten und acetylierten Proben auf die beschichteten Platten pipettiert, wobei in die Vertiefungen für die Proben zuvor 75 µl Probenpuffer gegeben wurden. Den Proben wurde daraufhin je 100 µl cAMP-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:20.000 zugegeben und mit Parafilm bedeckt über Nacht bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal gewaschen und anschließend durch Zugabe einer Substratlösung entwickelt. Je 150 µl der Substratlösungen A und B wurden auf die Platten pipettiert und 15-30 min bei Rt. auf einem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 50 µl 1M HCl gestoppt, bevor die Platten im ELISA-Reader (Tecan.Spectra) bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ gemessen werden konnten.

2.3.2 Affinitätsreinigung des humanisierten monoklonalen Antikörpers Herceptin®

Vor Versuchsbeginn wurde der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab aus Herceptin® mittels Affinitätschromatographie über eine Protein A-Säule aufgereinigt. Dazu wurden 440 mg (22 mg/ml) des lyophilisierten Antikörpers mit 20 ml sterilem Wasser aufgenommen. Die Protein A-Säule wurde zuerst mit 10 ml Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 4,0, und anschließend mit 10 ml Aceton gespült, um die Säule von möglichen Verunreinigungen mit Antikörpern und Fetten zu befreien. Danach wurde die Säule für eine Stunde mit PBS, pH 7,4, gespült. Als nächstes wurde der Antikörper aufgetragen und mit einem zweifachen Säulenvolumen an PBS, pH 7,4, gespült. Die anschließende Elution erfolgte mit 0,5 M NaH_2PO_4 bei pH 3,0. Das Eluat wurde durch Zugabe von 1 M Na_2HPO_4 neutralisiert. Die IgG-Konzentration im Eluat wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=280 \text{ nm}$ gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einem IgG-Gehalt von 1,35 mg/ml. Das Eluat wurde mit PBS auf 5 mg/ml IgG eingestellt und der Antikörper in Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Bestimmung von G-Proteinen und MAP-Kinasen mittels Western Blot

Im Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf Membranen übertragen und mithilfe von spezifischen Antikörpern angefärbt. Je nach verwendetem Antikörper können dabei Proteine identifiziert oder ihr Aktivitätszustand bestimmt werden.

2.3.3.1 Herstellung von SDS-Proben

Probenpuffer nach Laemmli:

62 mM	Tris-HCl
10%	Glycerol
1%	SDS
6%	10%ige Bromphenolblaulösung in Ethanol
0,25 %	β-Mercaptol
ad 1000 µl H ₂ O bidest., pH 7,25	

Verwendete Liganden (100 x Stammlösungen):

EGF (1 µg/ml)	AG 1478 (0,3 mM)	AKT-Inhibitor 3 (2 µM)
U50,488 (0,1 mM)	AG 825 (3 mM)	Herceptin® (20 µg/ml)
NorBNI (0,1 mM)	Wortmannin (0,1 mM)	

Die Zellen wurden auf Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die Platten mit DMEH (DMEM mit 25 mM Hepes, pH 7,4) gewaschen und anschließend für 1 h mit 1 ml serumfreiem Medium im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden 10 µl der o.g. Liganden (100-fach konzentriert), jeweils gelöst in Medium, in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung in die Vertiefungen pipettiert. Dieser Schritt erfolgte auf Eis, um Reaktionen während des Pipettierens zu verhindern. Im Anschluss daran wurden die Platten leicht geschwenkt und 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktionen wurden durch

Überführen der Platten auf ein Eisbad gestoppt und das Medium mit den Liganden abgesaugt. Schließlich wurden die Zellen durch Zugabe von je 500 µl Probenpuffer für 15 min lysiert, bevor sie in Schraubgefäße mit 1,5 ml Fassungsvermögen überführt und für 5 min bei 95 °C (Thermomixer compact, Eppendorf) erhitzt wurden. Die Proben wurden anschließend direkt elektrophoretisch aufgetrennt oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.3.3.2 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Trenngel (A):

5 ml	Rotiphorese [®] -Gel 30 (Fa. Roth; 30 % Acrylamid, 0,8 Bisacrylamid)
3,75 ml	1,5 M Tris-HCl
150 µl	10 % SDS
15 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
75 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
gelöst in 6,1 ml H ₂ O bidest., eingestellt auf pH 8,8	

Sammelgel (B):

1,7 ml	Rotiphorese [®] -Gel 30
1 ml	125 mM Tris-HCl
100 µl	10% SDS
20 µl	N, N, N', N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
100 µl	Ammoniumperoxodisulfat (APS)
gelöst in 7 ml H ₂ O bidest., eingestellt auf pH 6,8	

Die oben genannten Anleitungen beziehen sich auf die Herstellung von zwei Minigelen. In eine Gelkammer (Mini-Protean II, Fa. Bio-Rad) wurde ein Trenngel von 5 x 8 cm gegossen, an dessen oberes Ende sich ein 3 x 8 cm hohes Sammelgel anschloss. Die Gele wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlraum gelagert, um eine vollständige Auspolymerisation zu gewährleisten.

2.3.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Laufpuffer:

15 g 25 mM Tris-HCl

72 g 190 mM Glycin

5 g 0,1% SDS

gelöst in 5 l H₂O bidest, keine pH-Einstellung nötig

Durchführung:

Die Taschen des Sammelgels wurden mit je 10 µl der in Laemmli-Probenpuffer aufgenommenen Zelllysate befüllt. Pro Gel wurde ein biotinylierter Proteinstandard mit bekanntem Molekulargewicht aufgetragen. In leer gebliebene Taschen wurde Probenpuffer pipettiert, um das Gleichgewicht der Wanderung der Teilchen im elektrischen Feld zu gewährleisten. Die Gelkassette wurde in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und diese an den Stromversorger angeschlossen. Die Proteine durchwanderten zunächst bei 100 V für ca. 20 min das Sammelgel, um anschließend bei 200 V für 40 min im Trenngel nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt zu werden.

2.3.3.4 Transfer von Proteinen im Semidry-Blot-Verfahren

Anodenpuffer I:

15 g Tris-HCl

20 % Methanol

gelöst in 500 ml H₂O bidest., keine pH-Einstellung nötig

Anodenpuffer II:

1,5 g Tris-HCl

20 % Methanol

gelöst in 500 ml H₂O bidest., keine pH-Einstellung

Kathodenpuffer:

2,6 g ϵ -Aminocaprylsäure
20 % Methanol
gelöst in 500 ml H₂O bidest., keine pH-Einstellung nötig

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBS/T):

3 g Tris-HCl
11,1 g NaCl
1 ml Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween-20)
gelöst in 1 l H₂O bidest., eingestellt auf pH 8,0

Blocklösung:

5 % BSA, gelöst in TBS/T, pH 8,0

Durchführung:

Der Western Blot wurde mittels Semidry-Verfahren im diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Dabei werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine möglichst quantitativ auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Immobilon-P[®], Fa. Millipore) transferiert. Für jedes Gel wurde eine 5 × 8 cm große Membran erst 10 min in Methanol und dann 10 min in H₂O bidest. eingelegt, um die Membranen zu hydratisieren. Bis zur weiteren Anwendung wurden die Membranen in Anodenpuffer II geschwenkt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele markiert und ebenfalls in Anodenpuffer II gelegt. Die für das Blotten benötigten Graphitplatten wurden in der Zwischenzeit angefeuchtet und die untere Platte mit 10 × 8 cm großen Filterpapieren, die wie folgt getränkt waren, belegt:

6 × Anode I
3 × Anode II
2 × Transfermembranen
2 × Gele
9 × Kathode.

Die Filter und Membranen wurden nach jeder Schicht vorsichtig mit einem Roller angepresst, um Luftblasen zu entfernen. Der Proteintransfer wurde für 2 h bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} / \text{cm}^2$ durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurden die freien Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in Blocklösung abgesättigt.

2.3.3.5 Immunchemische Proteindetektion

Die für die Proteindetektion verwendeten Antikörper wurden in TBS/T und 0,1 % BSA verdünnt. Die Membranen wurden mit den primären, gegen die jeweiligen Proteine gerichteten Antikörper über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 ml TBS/T für je 10 min wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Rt. inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Membranen erneut 3 x gewaschen und anschließend entwickelt.

Verwendete primäre Antikörper:

<u>Antigen (Verdünnung)</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Bezugsquelle</u>
G ₀ α (1:4.000)	Kaninchen	selbst hergestellt
G _i α1 (1:2.000)	Kaninchen	dito
G _i α1/2 (1:5.000)	Kaninchen	dito
G _i α3 (1:2.000)	Kaninchen	dito
G ₁₃ α (1:1.000)	Kaninchen	Gramsch Laboratories, Schwabhausen
G ₁₄ α (1:1.000)	Kaninchen	dito
G ₁₆ α (1:1.000)	Kaninchen	dito
G _{q/11} α (1:2.000)	Kaninchen	dito
G _s α (1:4.000)	Kaninchen	selbst hergestellt
G _z α (1 µg/ml)	Kaninchen	dito
Gβ1/2 (1:5.000)	Kaninchen	dito
ERK1/2 (1:2.000)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, U.S.A.
phospho-ERK1/2 (1:2.000)	Kaninchen	dito
phospho-ERK5	Kaninchen	dito

(1:1.000)		
phospho-AKT (1:1.000)	Kaninchen	dito
phospho-p38 (1:1.000)	Kaninchen	dito
Caspase 3 (1:2.000)	Kaninchen	dito
phospho-JNK (1:2.000)	Kaninchen	dito

Verwendete sekundäre Antikörper:

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Rabbit-HRP	1:10.000	Dianova, Hamburg
anti-Biotin-HRP	1:5.000	Cell Signaling Technology, Danvers MA, U.S.A.

2.3.3.6 Detektion der Proteinbande mittels Chemilumineszenz

Substratlösung (20 ml Gesamtvolumen):

2,5 mM Luminol (3-Aminophtalhydrazid) in DMSO

400 µM p-Cumarsäure in DMSO

100 mM Tris-HCl

2,7 mM 30% H₂O₂

gelöst in 20 ml H₂O bidest., eingestellt auf pH 8,5

Durchführung:

Bei der Chemilumineszenz spaltet die an den zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase das in der Substratlösung vorhandene H₂O₂ katalytisch, wodurch nachfolgend Luminol oxidiert wird. Nach seiner chemischen Aktivierung fällt das Luminol wieder in den Grundzustand zurück, wobei Energie in Form von Licht ausgesendet wird. Dieses kann über einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

Die Blotmembranen wurden für je 1 min in einem dunklen Gefäß mit der oben beschriebenen ECL-Lösung inkubiert. Danach wurden die Membranen zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm™; Fa. Amersham Biosciences) in eine Röntgenkassette gelegt. Nach einer Belichtungszeit von 1-5 min wurden die Filme entwickelt und mithilfe eines Video-Imagers (Modell E.A.S.Y. RH-3; Fa. Herolab) dokumentiert und ausgewertet.

2.3.4 Kristallviolett-Test

Wachstumsmedium (serumfrei):

500 ml	DMEM
1 %	Glutamin
1,2 %	Pen/Strep-Konzentrat
0,2 %	Enrofloxacin
0,5 %	FKS

Der Einfluss von Opioiden und Herceptin® auf das Zellwachstum wurde mit dem Kristallviolett-Test untersucht. Hierfür wurden die Zellen von einer 75 cm² Zellkulturflasche abgelöst, in Wachstumsmedium resuspendiert, gezählt und jeweils 2×10^5 Zellen/ml pro Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Platten wurden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) einen Tag lang kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und mit den Liganden, gelöst in serumfreiem (0,5% FKS-haltigem) Wachstumsmedium in Dreifachbestimmung behandelt. Folgende Werte wurden ermittelt:

- basal
- Colchizin, 10 ng/ml
- EGF, 10 ng/ml
- Herceptin®, 20 µg/ml
- Herceptin®, 20 µg/ml + U50,488, 1 µM
- Herceptin®, 20 µg/ml + U50,488, 1 µM + NorBNI 1 µM
- U50,488, 1 µM
- U50,488 + NorBNI, je 1 µM

Die Platten wurden anschließend 3 Tage im Brutschrank inkubiert, bevor die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit Kristallviolett angefärbt wurden. Hierzu wurden in jede Vertiefung 250 μ l einer 5 %-igen Kristallviolettlösung (1 Teil und 1 Teil Methanol) pipettiert und für 15 min bei Rt. inkubiert. Die Färbelösung wurde abgehoben und die Zellen 5 x mit je 1 ml PBS gewaschen. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden schließlich mit je 500 μ l 0,1 M Natriumcitratlösung, pH 5,5, extrahiert, je 100 μ l der Überstände in Dreifachbestimmung auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen pipettiert und im Anschluss daran die Absorption im ELISA Reader bei einer Wellenlänge von $\lambda=492$ nm gemessen (Koltermann et al., 2009). Als Bezugspunkt dienten Basalwerte, die zu Beginn der Behandlungsdauer bestimmt wurden. Die Farbreaktion im Kristallviolett-Test ist direkt proportional mit der Anzahl an Zellkernen und damit lebender Zellen.

2.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Bei den Bindungen wurden signifikante Unterschiede mittels Student`s test für nicht gepaarte Proben untersucht. Bei den cAMP Daten wurden signifikante Unterschiede mittels ANOVA und dem Bonferroni post-hoc Test festgestellt. Die gezeigten Western Blots sind repräsentativ für mindestens 3 Experimente.

V Ergebnisse

1. Charakterisierung von Opioidrezeptoren in BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen

1.1 Nachweis von Opioidrezeptoren mittels RT-PCR

In einem ersten Schritt wurden Opioidrezeptoren mittels RT-PCR in BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen nachgewiesen. Hierzu wurde aus den Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die einzelnen Rezeptoren charakteristische Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert.

1.1.1 GAPDH (186 bp):

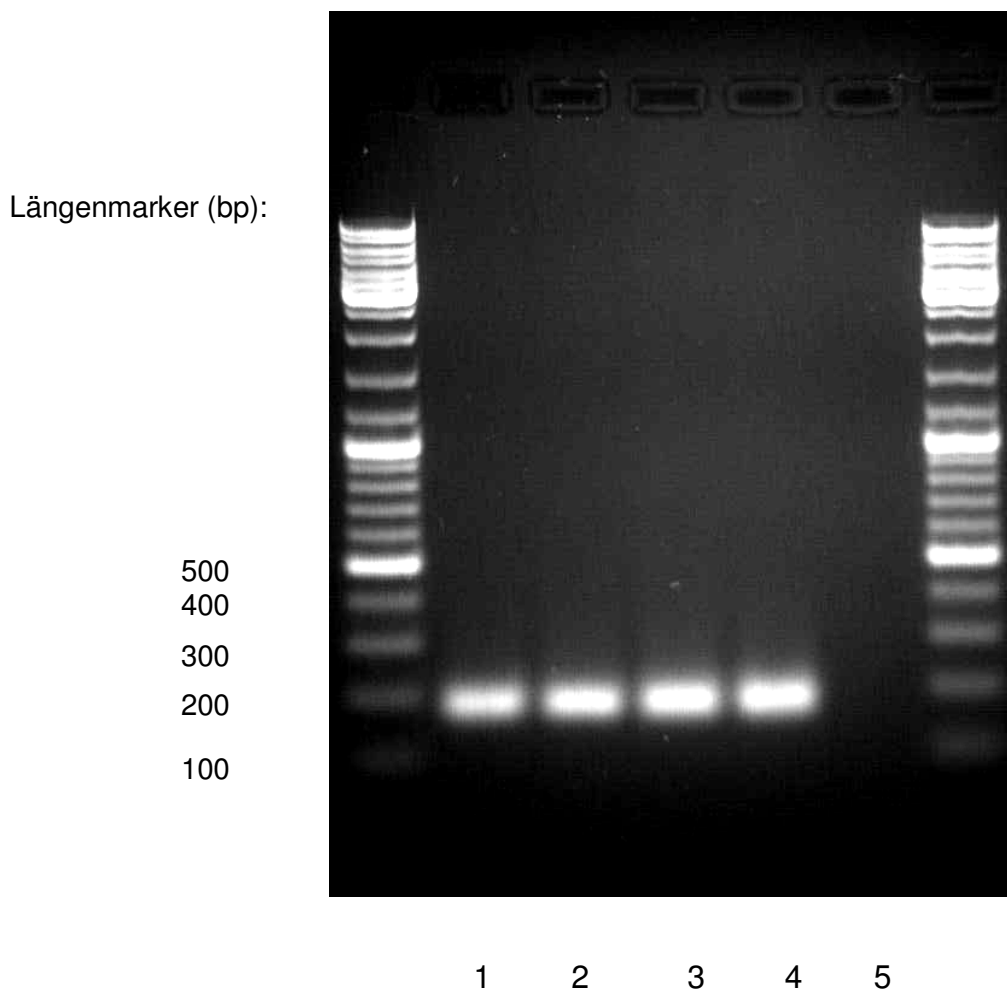


Abbildung 8: PCR zur Darstellung des GAPDH-Fragmentes mit der Länge 186 bp in den folgenden Zell-Linien: Spur 1 = SH-SY5Y-Zellen (Positivkontrolle); Spur 2 = BT-474 Zellen; Spur 3 = SKBR-3 Zellen; Spur 4 = MCF-7 Zellen und Spur 5 = Wasser (Negativkontrolle).

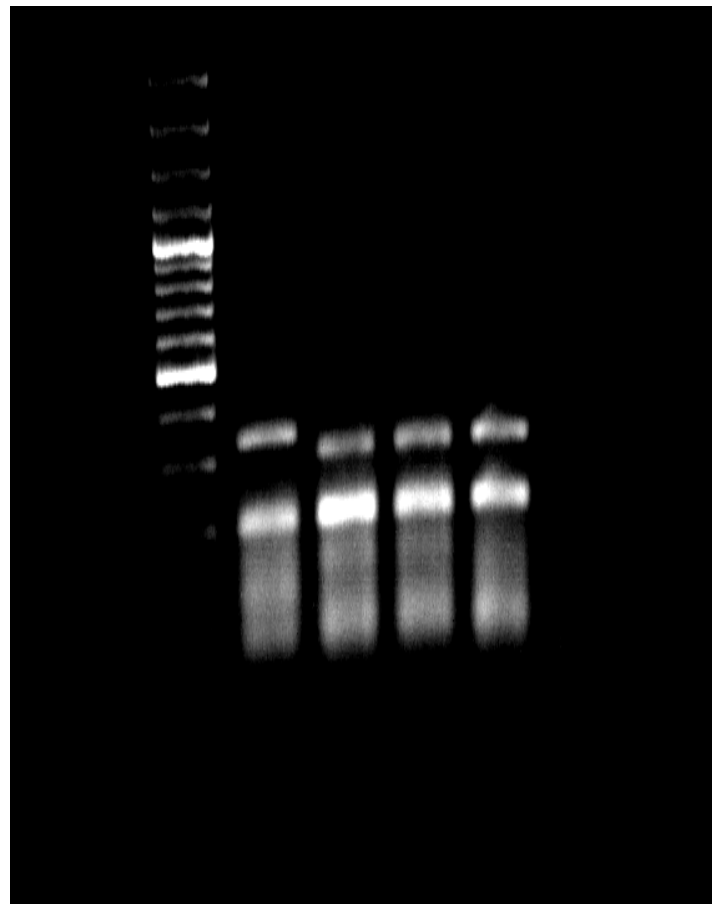
Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym, das in allen Zellen als so genanntes Haushaltsgen (housekeeping gene) konstitutiv exprimiert wird. Es dient daher als Kontrolle für die Integrität der verwendeten cDNA.

1.1.2 μ -Opioidrezeptor (342 bp):

Längenmarker

(bp):

500
400
300
200
100



1 2 3 4 5

Abbildung 9: Nachweis des μ -Opioidrezeptors mit der Länge 342 bp in Mammakarzinomzellen. Spur 1 = SH-SY5Y-Zellen (Positivkontrolle); Spur 2 = BT-474 Zellen; Spur 3 = SKBR-3 Zellen; Spur 4 = MCF-7 Zellen; Spur 5 = Wasser (Negativkontrolle).

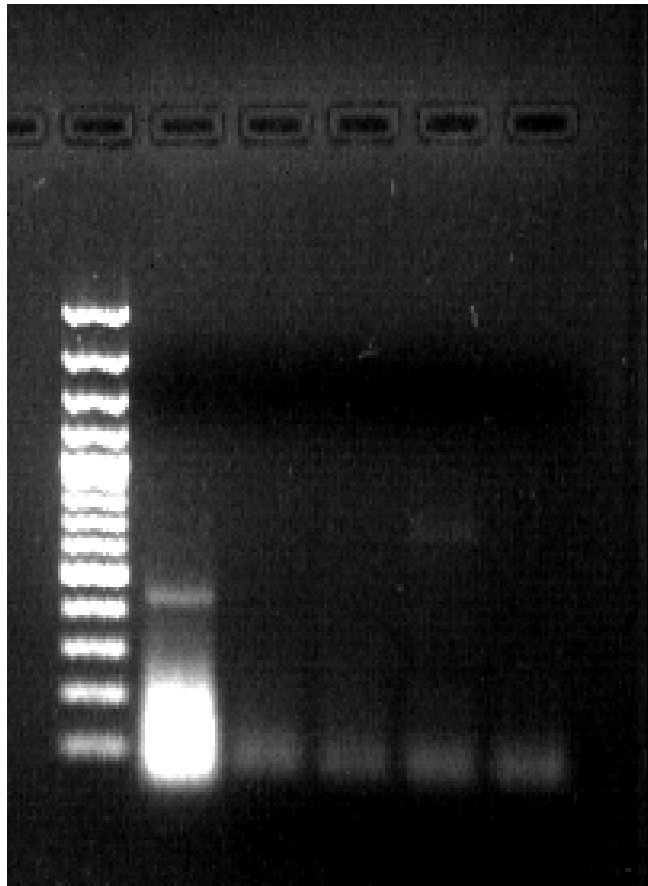
Die μ -Opioidrezeptor-PCR lieferte nur bei der Positivkontrolle, humane SH-SY5Y Zellen (Spur 1), das erwartete Produkt mit einer Länge von 342 bp. Bei den drei Mammakarzinomzelllinien lässt sich ebenfalls eine Bande erkennen, die jedoch im Agarosegel etwas schneller läuft. Diese wurden daraufhin isoliert und sequenziert, wobei keine Übereinstimmung mit dem μ -Opioidrezeptor

gefunden werden konnte. Bei diesen Banden handelt es sich daher um Artefakte und nicht um den μ -Opioidrezeptor. In Spalte 5 wurde Wasser als Negativkontrolle verwendet, um eventuelle Kontaminationen und dadurch falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

1.1.3 δ -Opioidrezeptor (494 bp):

Längenmarker
(bp):

500
400
300
200
100



1 2 3 4 5

Abbildung 10: Nachweis des δ -Opioidrezeptors mit der Länge 494 bp in Mammakarzinomzellen. Spur 1 = SH-SY5Y-Zellen (Positivkontrolle); Spur 2 = BT-474 Zellen; Spur 3 = SKBR-3 Zellen; Spur 4 = MCF-7 Zellen; Spur 5 = Wasser (Negativkontrolle).

Auch für den δ -Opioidrezeptor dienten humane SH-SY5Y-Zellen als Positivkontrolle, die neben dem μ - auch den δ -Opioid-Rezeptor exprimieren. Mit dem verwendeten Primerpaar konnte nur in diesen Zellen, nicht aber in allen 3 Mammakarzinomzelllinien ein PCR-Fragment mit der entsprechenden Länge von 494 bp amplifiziert werden.

1.1.4 κ -Opioidrezeptor (322 bp):

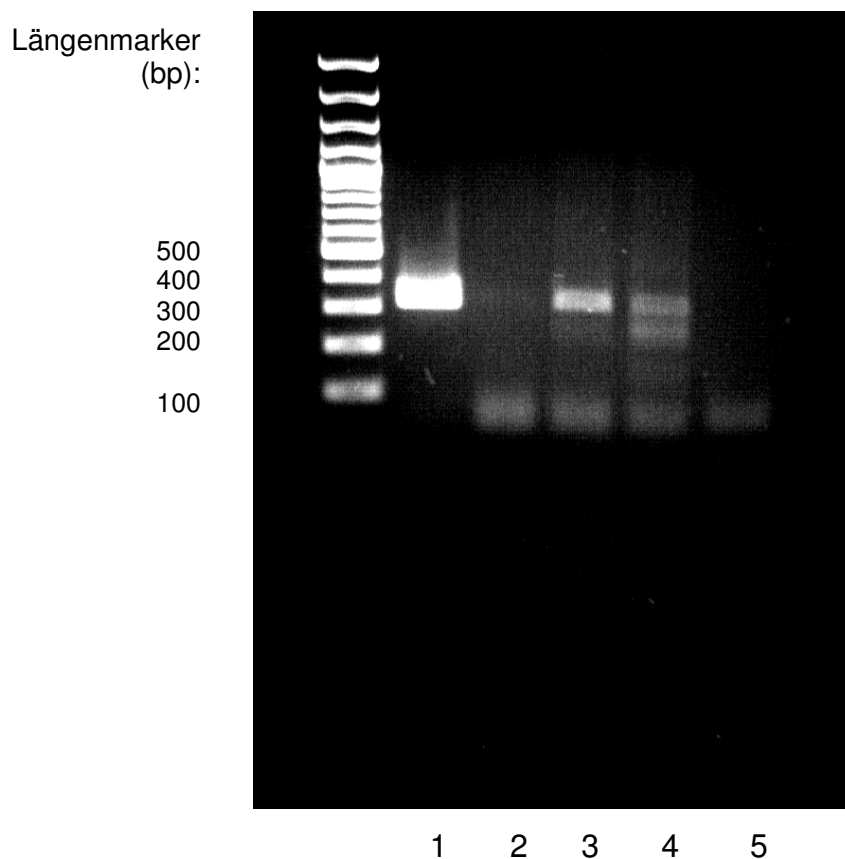


Abbildung 11: Nachweis des κ -Opioidrezeptors mit der Länge 322 bp in Mammakarzinomzellen. Spur 1 = humane κ -Opioidrezeptor-cDNA (Positivkontrolle); Spur 2 = BT-474 Zellen; Spur 3 = SKBR-3 Zellen; Spur 4 = MCF-7 Zellen; Spur 5 = Wasser (Negativkontrolle).

Beim Nachweis des κ -Opioidrezeptors wurde die klonierte cDNA des humanen Rezeptors als Positivkontrolle verwendet. Mit dem verwendeten Primerpaar lässt sich ein Fragment mit der berechneten Länge von 322 bp amplifizieren. Eine Bande mit identischer Länge konnte ebenso in SKBR-3 und etwas schwächer in MCF-7, nicht aber in BT-474 Zellen gefunden werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass lediglich SKBR-3 und MCF-7 Zellen Transkripte des κ -Opioidrezeptors enthalten, μ - und δ -Opioidrezeptoren werden dagegen von keiner der drei untersuchten Zelllinien exprimiert. Die folgenden Untersuchungen beschränken sich daher auf die Funktion des κ -Opioidrezeptors in den genannten Zelllinien.

1.2 Quantifizierung von κ -Opioidrezeptoren in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

Das Vorhandensein von κ -Opioidrezeptoren in Membranen von SKBR-3 und MCF-7 Zellen wurde mithilfe von Radioliganden-Bindungsexperimenten verifiziert. Hierfür wurden naive oder für 3 Tage mit dem selektiven κ -Opioidrezeptor-Agonisten U50,488 (1 μ M) vorbehandelte Zellen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass SKBR-3 Zellen $14,9 \pm 5$ fmol/mg und MCF-7 Zellen $24,4 \pm 6$ fmol/mg κ -Opioidrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Nach Vorbehandlung mit U50,488 für 3 Tage nimmt die Anzahl der Rezeptoren bei MCF-7 Zellen signifikant um 75% ab. Dies weist darauf hin, dass die Rezeptoren funktionell reguliert, nicht aber vollständig internalisiert werden. Damit sind die Voraussetzungen dafür geschaffen, dass Opioide auch nach einer längerfristigen Behandlung in das Zellwachstum eingreifen können.

Radio-Liganden-Bindung mit ^3H U69, 593

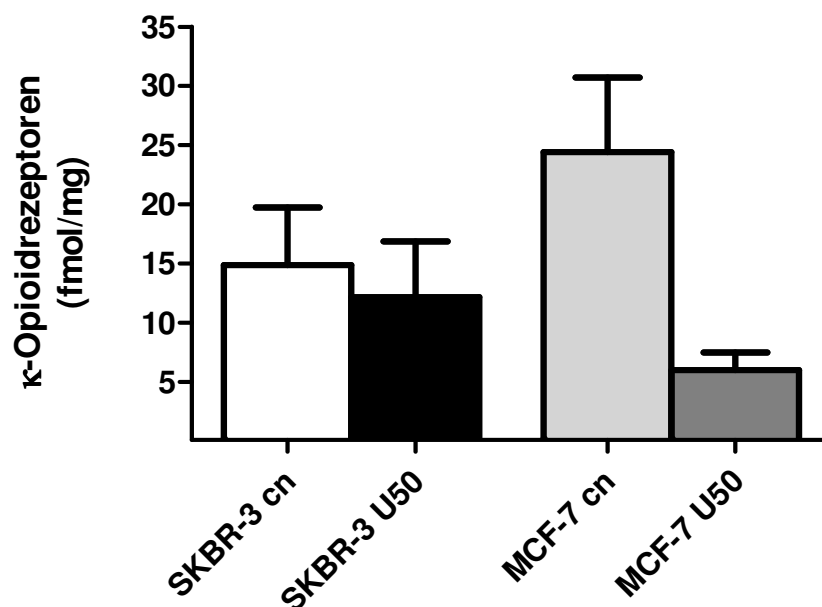


Abbildung 12: Nachweis von κ -Opioidrezeptoren in humanen Mammakarzinomzellen. Naive (cn) oder für 3 Tage mit 1 μ M U50,488 vorbehandelte (U50) SKBR-3 und MCF-7 Zellen wurden geerntet und die Anzahl von κ -Opioidrezeptoren mittels Radioliganden-Bindung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. von 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

1.3 Nachweis von G-Proteinen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

G-Proteine übernehmen bei der Weiterleitung von Signalen in das Zellinnere eine wichtige Schlüsselfunktion. Es stellte sich daher die Frage, ob die verwendeten Tumorzellen die für die Regulation des Zellwachstums durch Opiode benötigten G-Proteine besitzen. Diese wurden daher in Membranpräparationen mithilfe von selektiven Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, besitzen SKBR-3 und MCF-7 Zellen sämtliche G-Proteine, die sowohl für die Regulation "klassischer" Effektoren wie Adenylylcyclase, K^+ und Ca^{2+} -Kanäle, als auch für "atypische" Signalwege benötigt werden. Beide Zelllinien besitzen dagegen kein insbesondere in neuronalen Geweben vorhandenes α_o und auch kein α_{16} , das für lymphoide Gewebe charakteristisch ist.

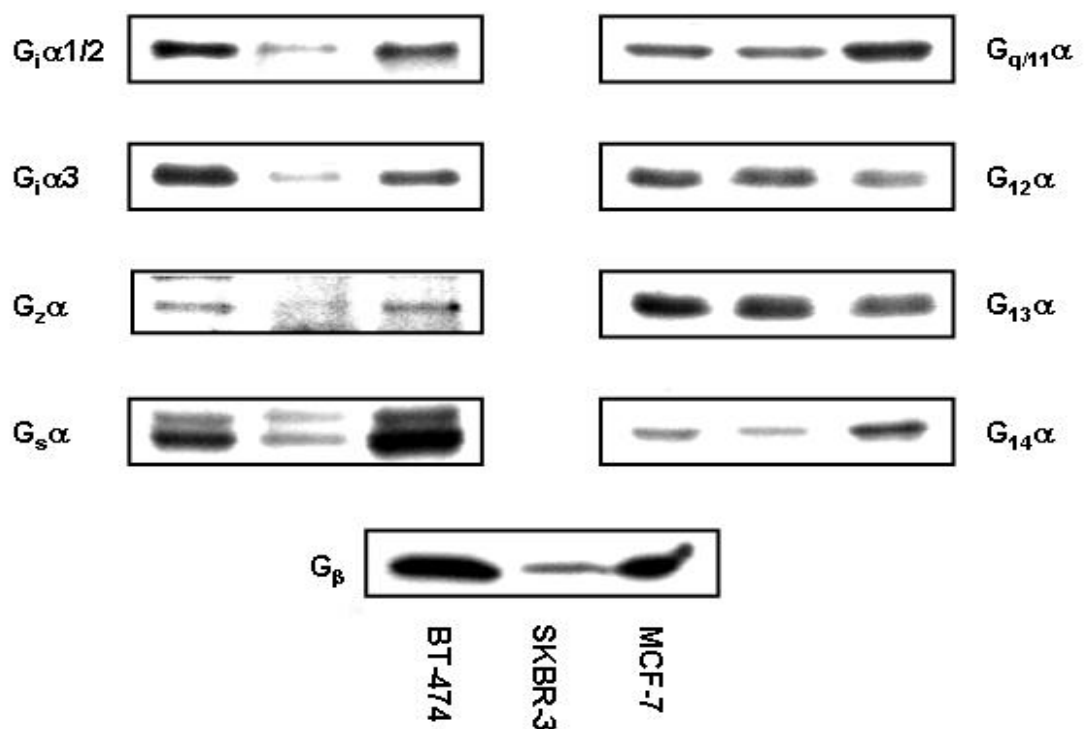


Abbildung 13: Nachweis von G-Proteinen in humanen Mammakarzinomzellen. Jeweils 20 μ g Membranprotein von BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membranen transferiert und mit für die einzelnen G-Proteine spezifischen Antikörpern markiert.

Während die G-Proteine $G_{i\alpha1/2}$, $G_{i\alpha3}$ sowie $G_{z\alpha}$ die Adenylylcyclase hemmen können, wird deren Aktivität über $G_{s\alpha}$, das in 2 unterschiedlichen Spleissvarianten von 42 und 45 kDa vorkommt, gefördert. Die genannten G-Proteine kommen in SKBR-3 Zellen nur zu geringen, in MCF-7 Zellen dagegen in deutlichen Mengen vor. Die G-Proteine der $G_{q/11}$ Familie dagegen regulieren die Aktivität der Phospholipase C_{β} , wodurch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit intrazellulären Signalwegen des Zellwachstums in Verbindung treten können. $G_{13\alpha}$ steuert darüber hinaus die Aktivität von Rho, einem kleinen G-Protein das bei der Regulation des Zytoskeletts von besonderer Bedeutung ist. Diese G-Proteine werden von den Antikörpern in allen Tumorzelllinien gut erkannt. Schließlich besitzen alle untersuchten Zelllinien deutliche Mengen an G_{β} , das nach der Freisetzung von $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten an der Aktivierung der Phospholipasen A_2 und C beteiligt ist. Somit erfüllen SKBR-3 und MCF-7 Zellen sämtliche Voraussetzungen, dass die vorhandenen κ -Opioidrezeptoren in die Zellfunktion eingreifen können.

1.4 Regulation der Adenylylcyclase in SKBR-3 und MCF-7

Zellen

Die Gesamtaktivität aller in einer Zelle vorhandenen Adenylylcyclasen kann über die intrazelluläre Anreicherung des gebildeten cAMP indirekt bestimmt werden. Um die Regulation der Adenylylcyclasen durch die κ -Opioidrezeptoren bestimmen zu können, wurden SKBR-3 und MCF-7 Zellen mit dem Diterpen Forskolin in einer Konzentration von 1 μ M stimuliert. Forskolin bindet direkt an die katalytische Einheit aller Adenylylcyclasen, wodurch die intrazelluläre cAMP-Produktion stark gesteigert wird. Diese stimulierte Aktivität kann durch Opioide moduliert werden. Hierfür wurden die Zellen zusammen mit dem selektiven κ -Opioidrezeptor-Agonisten U50,488 oder mit dem nicht-selektiven Opiat Morphin behandelt. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, steigern beide Opioide die durch Forskolin stimulierte cAMP-Produktion in MCF-7-Zellen um das 1,5- in SKBR-3 Zellen sogar um das 3-fache. Beide Effekte sind durch den κ -Opioidrezeptor-Antagonisten NorBNI blockierbar. NorBNI alleine hatte keinen Effekt. Die Ergebnisse zeigen, dass die in SKBR-3 und MCF-7 Zellen exprimierten κ -Opioidrezeptoren funktionell voll aktiv sind. Darüber hinaus

stimulieren Opiode in diesen Zellen die cAMP-Produktion, was im Gegensatz

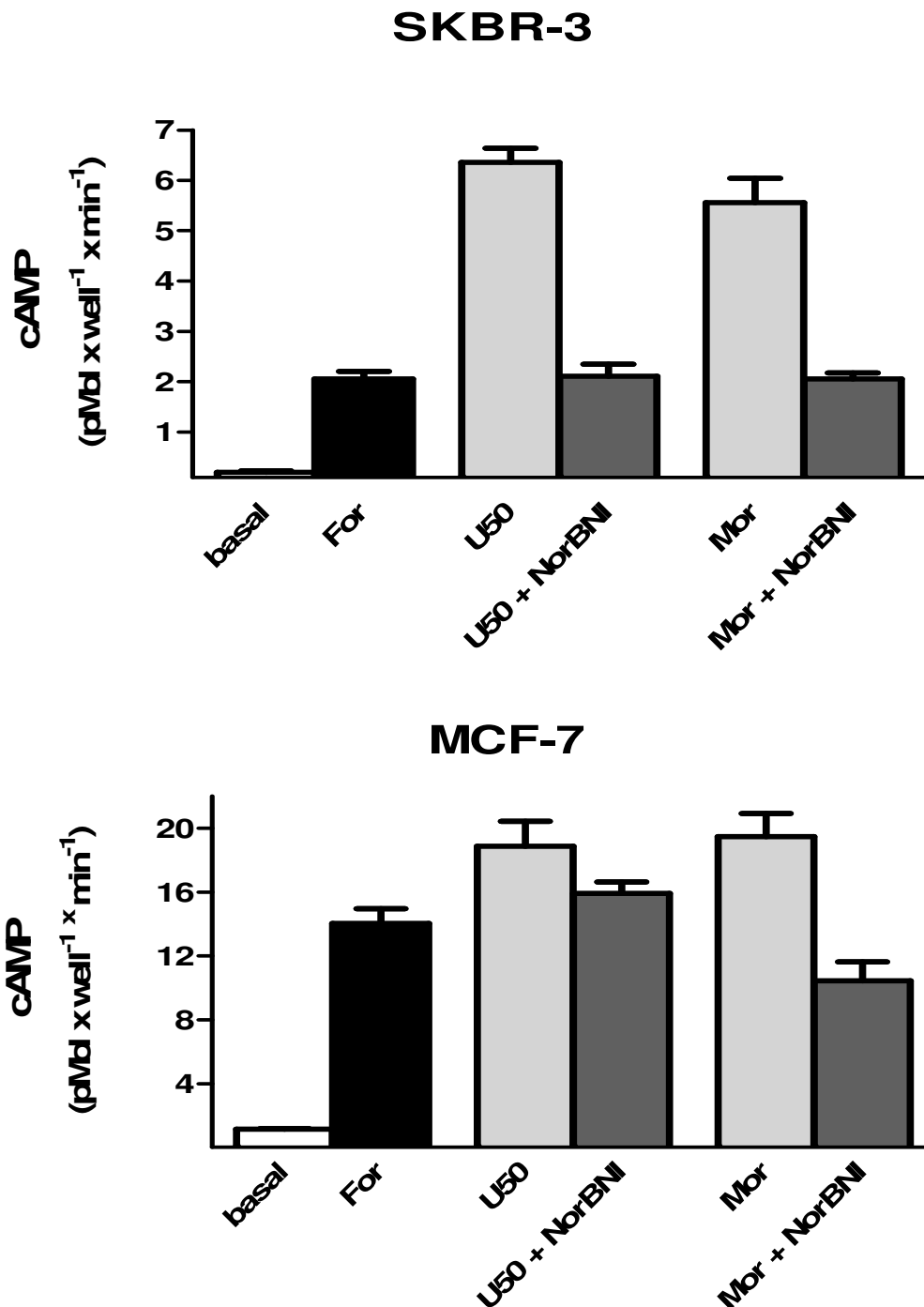


Abbildung 14: Regulation der cAMP-Produktion durch Opiode in SKBR-3 (oben) und MCF-7 (unten) Zellen. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C in Anwesenheit von Forskolin (For), U50,488 (U50), Morphin (Mor) und NorBNI (je 1 µM) stimuliert und das gebildete cAMP anschließend im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte ± S.D. eines repräsentativen Experimentes dar, das 3 x mit qualitativ vergleichbaren Ergebnissen reproduziert wurde.

zu neuronalen Zellen für Tumorzellen charakteristisch ist. Schließlich zeigen

die Ergebnisse, dass nicht nur synthetische Opioide sondern auch Analgetika vom Morphintyp die cAMP-Bildung beeinflussen können.

2. Interaktion von Opioiden mit Herceptin® in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

2.1 Interaktion auf Ebene der Signaltransduktion

2.1.1 Regulation der ERK1/2 in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

Opioide können über eine Transaktivierung von HER-1-Rezeptoren in die Zellproliferation eingreifen (Schulz et al., 2004). Da Herceptin® die Heterodimerisierung des HER-2 mit HER-1-Rezeptoren unterbindet, wurde zunächst der Effekt von Herceptin® auf die von Opioiden stimulierte Aktivierung von ERK1/2 untersucht. Hierfür wurden die Zellen für verschiedene Zeitspannen mit Herceptin® vorbehandelt und anschließend die ERK1/2 mit EGF und U50,488 stimuliert. Wie in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt, führt die kurzfristige Exposition von SKBR-3 und MCF-7 Zellen gegenüber EGF zu einer starken Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2. Im Gegensatz zu vielen anderen Zellen und Geweben kommt es nach Aktivierung des κ -Opioidrezeptors mit U50,488 in keiner der beiden Tumorzelllinien zu einer messbaren Stimulation der ERK1/2. Werden die Zellen für 30 min mit AG1478, einem selektiven Inhibitor des HER-1-Rezeptors, vorbehandelt, so kann weder eine basale noch von EGF stimulierte ERK1/2-Aktivierung beobachtet werden. Die Vorbehandlung mit Herceptin® hat in SKBR-3 Zellen keinen Einfluss auf die basale und EGF-vermittelte ERK1/2-Aktivierung, während sie in MCF-7 Zellen selektiv die durch EGF induzierte ERK1/2-Phosphorylierung zeitabhängig hemmt. Die Vorinkubation der Zellen mit dem HER-2-Inhibitor AG825 besitzt wiederum keinen Einfluss auf die basale oder EGF-stimulierte ERK1/2-Aktivierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die in beiden Zelllinien vorhandenen κ -Opioidrezeptoren nicht an die Regulation der ERK1/2 gekoppelt sind. Sie zeigen ebenso, dass Herceptin® die über EGF vermittelte Aktivierung der ERK1/2 in MCF-7, nicht aber in HER-2-Rezeptor überexprimierenden SKBR-3 Zellen blockieren kann.

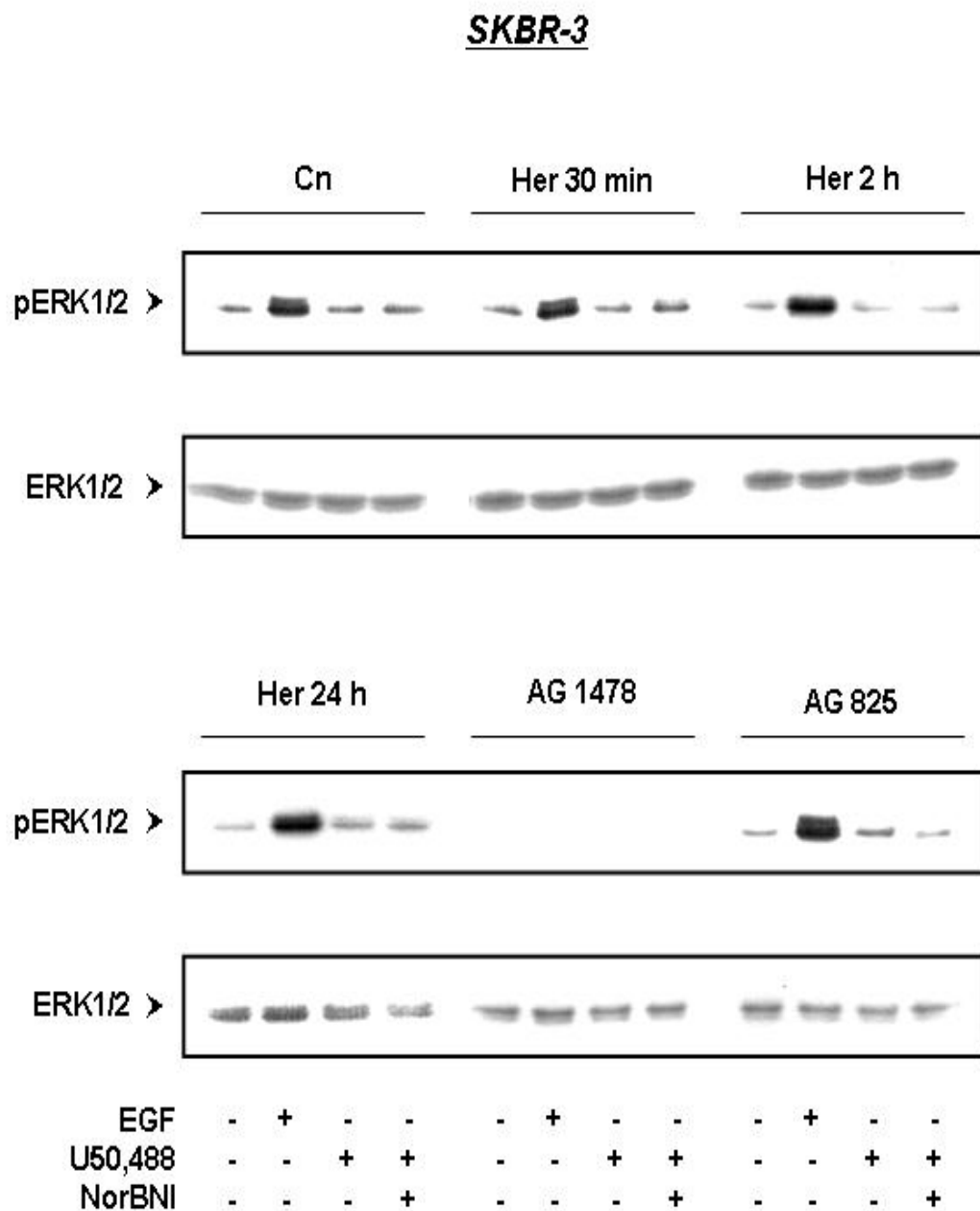


Abbildung 15: Regulation der ERK1/2-Aktivität in SKBR-3 Zellen durch Opioide und Herceptin®. Die Zellen wurden für 5 min mit EGF (1 ng/ml) oder U50,488 alleine bzw. zusammen mit NorBNI (je 1 µM) stimuliert und die Aktivierung der ERK1/2 mittels eines phosphospezifischen anti-ERK1/2 Antikörpers (pERK1/2) im Western Blot bestimmt. Vor der Bestimmung der ERK1/2-Aktivierung wurden die Zellen entweder nicht (cn) oder für verschiedene Zeiten mit Herceptin® (30 min, 2h, 24 h), AG1478 (30 min) und AG825 (30 min) vorbehandelt. Der Auftrag vergleichbarer Proteinmengen wurde durch Inkubation der Blots mit einem pan-reaktiven Antikörper gegen ERK1/2 untersucht (ERK1/2).

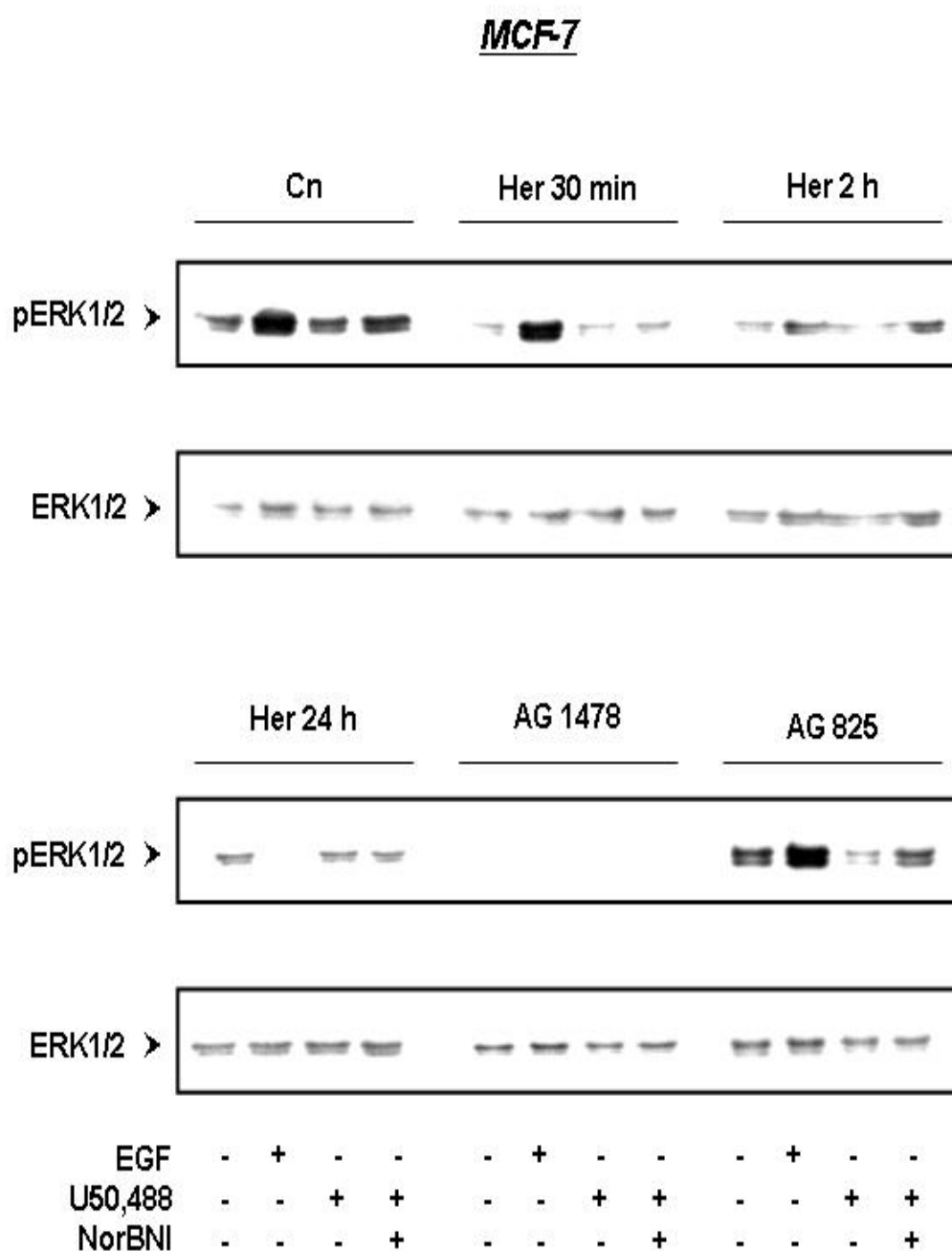


Abbildung 16: Regulation der ERK1/2-Aktivität in MCF-7 Zellen durch Opioid- und Herceptin®. Die Zellen wurden wie in Abbildung 15 beschrieben vorbehandelt und mit EGF und U50,488 stimuliert. Die Aktivierung der ERK1/2 wurde mithilfe eines phosphospezifischen Antikörpers (pERK1/2) bestimmt. Zur Kontrolle wurden dieselben Proben mit einem pan-reaktiven Antikörper gegen ERK1/2 untersucht.

2.1.2 Regulation alternativer MAP-Kinasen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

Nachdem die Aktivierung von κ -Opioidrezeptoren in beiden Zelllinien nicht zu einer Aktivierung des ERK1/2 Signalweges führt, wurde eine mögliche Regulation weiterer Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Wege untersucht. Hierzu wurden die Zellen ebenfalls wieder akut mit EGF und U50,488 stimuliert und die Aktivierung der beiden Stress-induzierten MAP-Kinasen p38 und JNK mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 17 dargestellt, führt die Aktivierung des HER-1-Rezeptors mit EGF in beiden Zelllinien zu einer Aktivierung der p38 Proteinkinase. Die JNK wird von EGF dagegen nur in SKBR-3 Zellen stimuliert. Die Aktivierung beider MAP-Kinasen kann durch Vorinkubation mit dem HER-1-Inhibitor AG1478 blockiert werden. Wie bereits für die ERK1/2 beschrieben, können Opioide auch diese beiden MAP-Kinasen in den untersuchten Zelllinien nicht stimulieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung der κ -Opioidrezeptoren weder in SKBR-3 noch in MCF-7 Zellen eine stressinduzierte Stimulation der p38 Proteinkinase und der JNK auslösen kann.

2.1.3 Regulation von Apoptosewegen in SKBR-3 und MCF-7 Zellen

Nachdem Opioide offensichtlich in beiden Zelllinien keine proliferativen Signalwege aktivieren, um so mit der Herceptin[®]-Wirkung interferieren zu können, wurden mögliche Einflüsse auf die Apoptose untersucht. Hierzu wurden dieselben Proben wie in Abbildung 18 einer Western Blot-Analyse mit einem phosphospezifischen Antikörper gegen die Proteinkinase B/AKT und der Procaspase-3 unterzogen. AKT stellt einen wichtigen intrazellulären Mediator von Überlebenssignalen dar, der neben Rezeptor-Tyrosinkinasen auch von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) reguliert wird. Aktiviertes AKT ist dann in der Lage, über eine Beeinflussung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3)-vermittelten Spaltung von Procaspase-3 in die Apoptose einzugreifen.

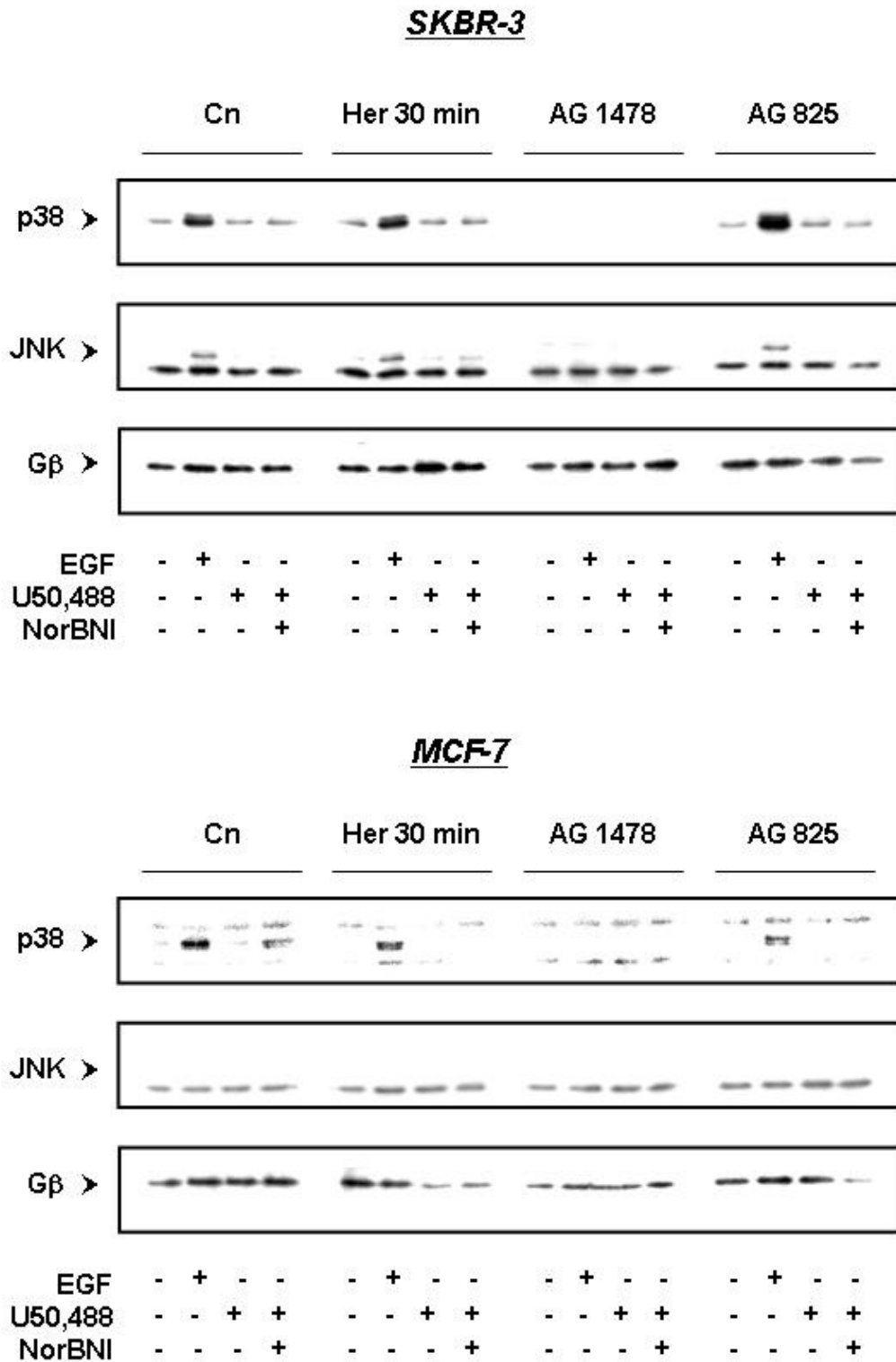


Abbildung 17: Regulation der p38 und JNK in SKBR-3 und MCF-7 Zellen durch Opiode und Herceptin®. Die Zellen wurden entweder nicht (cn) oder für 30 min mit Herceptin® (Her), AG1478 und AG824 vorbehandelt und anschließend mit EGF und U50,488 stimuliert. Die Aktivierung der p38 und JNK wurde jeweils mithilfe von phosphospezifischen Antikörpern bestimmt. Der Auftrag vergleichbarer Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen G β dokumentiert.

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, weisen SKBR-3 Zellen eine niedrige basale AKT-Phosphorylierung auf, die mit einer fast vollständigen Spaltung der Procaspase-3 einhergeht. Die kurzzeitige Exposition der Zellen für 5 min gegenüber EGF induziert ein Wachstumssignal, das mit einer starken AKT-Phosphorylierung und verminderten Spaltung der Procaspase-3, und damit einer Hemmung der Apoptose, korreliert. Opiate selbst besitzen keinen erkennbaren Einfluss auf die AKT-Aktivierung, wird U50,488 aber zusammen mit dem Antagonisten NorBNI verabreicht, so kommt es zu einer starken AKT-Phosphorylierung und Hemmung der Procaspase-3-Spaltung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass U50,488 in diesen Zellen die AKT-Aktivierung hemmen und dadurch die Apoptose induzieren kann.

Werden die Zellen für einen Tag mit Herceptin[®] vorbehandelt, so kann der Antagonist NorBNI die von U50,488 induzierte Hemmung der AKT-Phosphorylierung und Procaspase-3-Spaltung nicht mehr aufheben. Werden die Zellen für 30 min mit Wortmannin, einem spezifischen PI3K-Inhibitor vorbehandelt, so wird die AKT-Phosphorylierung unterbunden, was in diesen Zellen mit einer Spaltung der Procaspase-3 einhergeht. Völlig unterschiedliche Ergebnisse werden in MCF-7 Zellen beobachtet. Hier vermag EGF, nicht aber Opioide, die AKT nur in einem geringen Ausmaß zu aktivieren. Eine Vorbehandlung mit Herceptin[®] hat darüber hinaus keinen Einfluss auf diesen Effekt, was mit der niedrigen Expressionsrate des HER-2-Rezeptors erklärt werden kann. Interessanterweise enthalten MCF-7 Zellen keine Procaspase-3, so dass dieser Signalweg in diesen Zellen offensichtlich weder von EGF noch von Opioiden reguliert wird. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Opioide in HER-2-Rezeptor überexprimierenden SKBR-3 Zellen die apoptotische Wirkung von Herceptin[®] verstärken könnten.

2.2 Interaktion auf Ebene des Zellwachstums

Aufgrund der Hinweise auf eine mögliche Interaktion von U50,488 mit Herceptin[®] auf Ebene der Apoptose wurden die Effekte beider Wirkstoffe auf das Zellwachstum hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 3 Tage

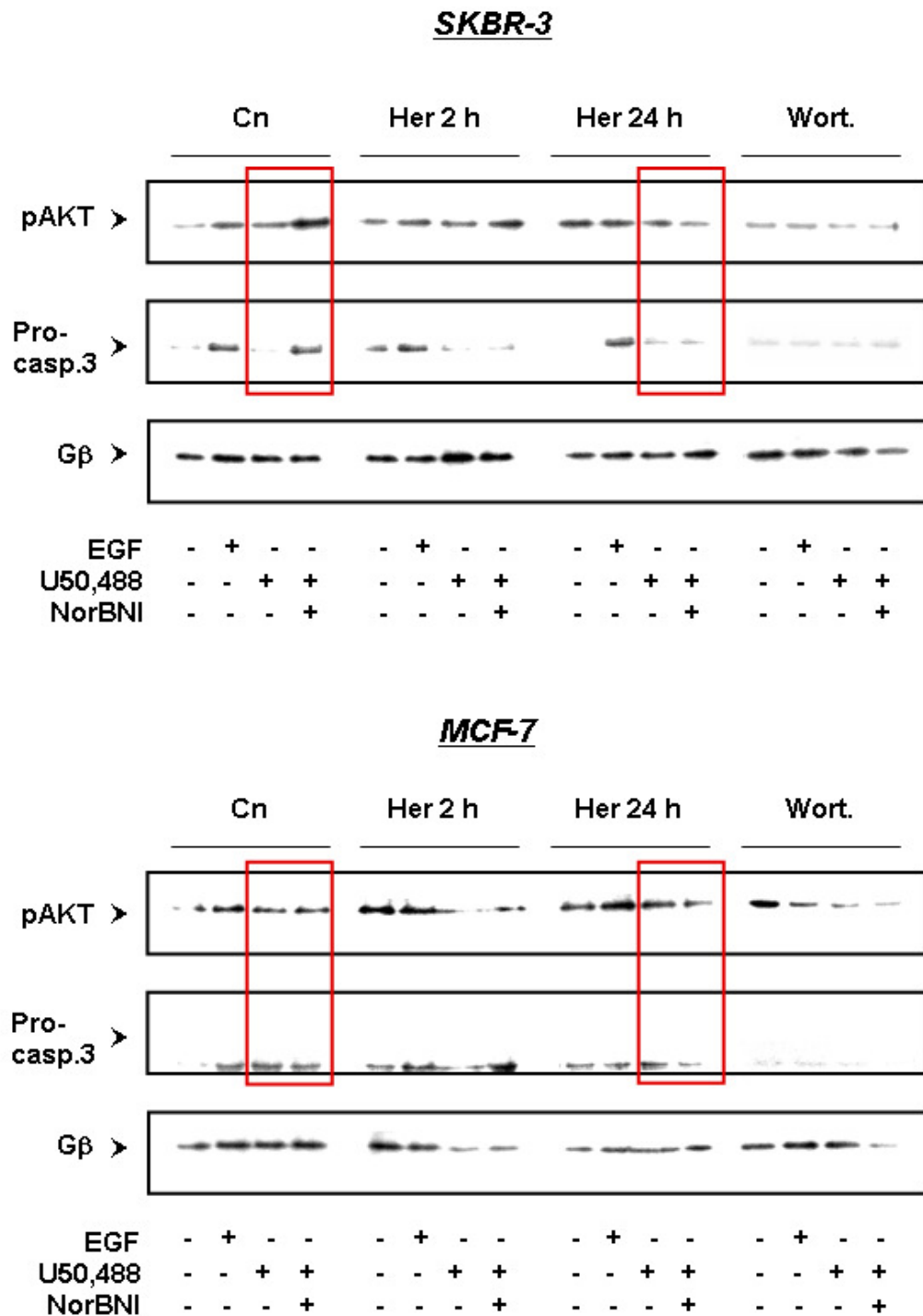


Abbildung 18: Regulation der AKT-Phosphorylierung und Procaspase-3-Spaltung in SKBR-3 und MCF-7 Zellen durch Opiode und Herceptin®. Die Zellen wurden entweder nicht (cn), mit Herceptin® für 2 und 24 h (Her 2h; Her 24h) oder für 30 min mit Wortmannin vorbehandelt und anschließend mit EGF, U50,488 alleine oder zusammen mit NorBNI stimuliert. Die Aktivierung der AKT wurde mithilfe eines phosphospezifischen, die Spaltung der Procaspase-3 mit einem Caspase-3-spezifischen Antikörper bestimmt. Wird die Procaspase-3 gespalten und damit die Apoptose induziert, so ist auf der entsprechenden Höhe keine Bande mehr zu sehen. Der Auftrag vergleichbarer Proteinmengen wurde mit einem Antikörper gegen G β dokumentiert.

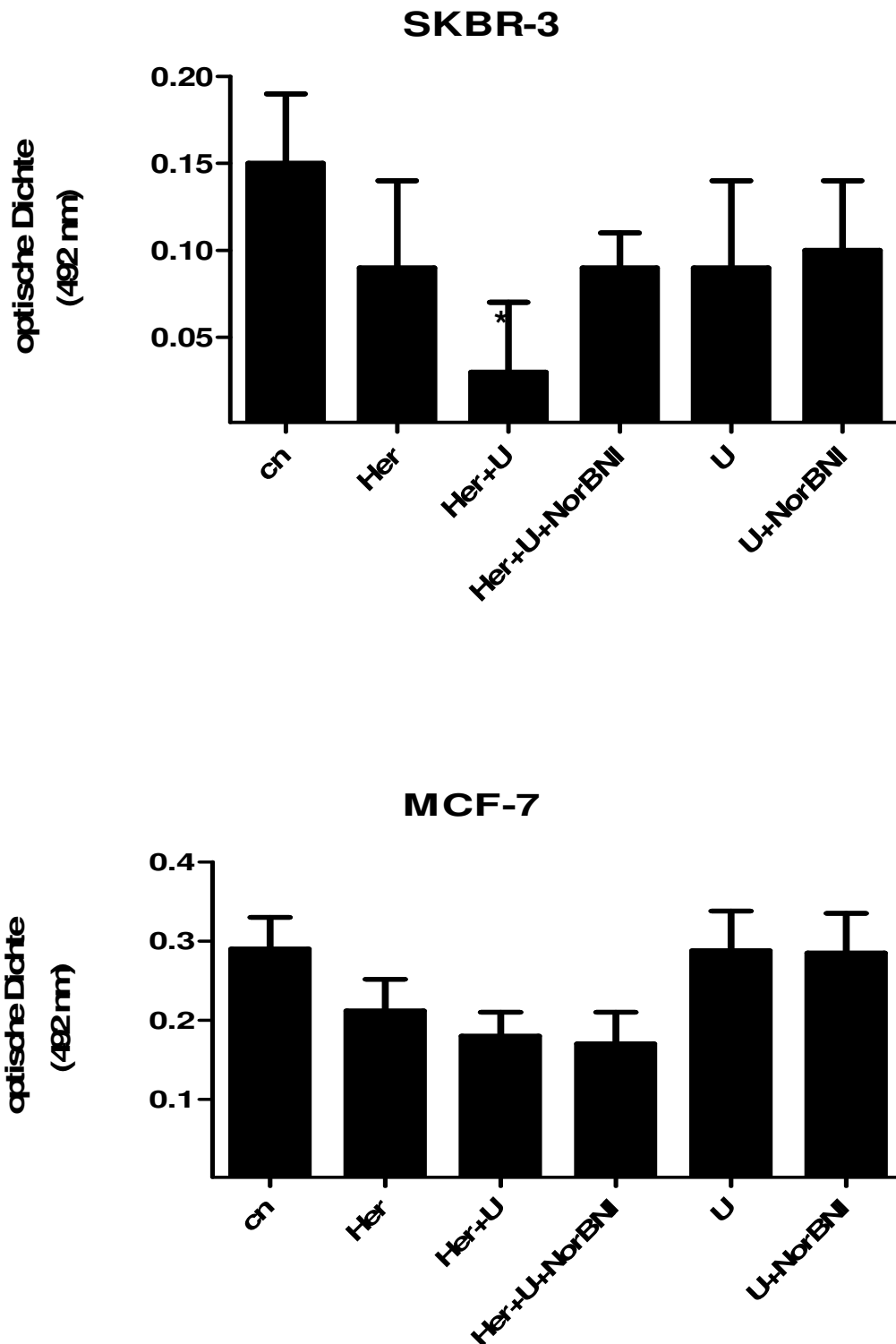


Abbildung 19: Regulation des Zellwachstums durch Opioide und Herceptin®. Die Zellen wurden für 3 Tage entweder nicht (cn) oder mit 20 µg/ml Herceptin® (Her), U50,488 (U50) und NorBNI (Nor-BNI) (beide je 1 µM) in den angegebenen Kombinationen inkubiert und die Zellzahl mittels Kristallviolett-Test bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Colchizin verwendet (nicht gezeigt). Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte ± S.E.M. von 3 unabhängigen Experimenten dar. *; $p < 0,05$, Signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (ANOVA).

entweder in Ab- oder Anwesenheit von Herceptin® alleine oder zusammen mit U50,488 inkubiert und die Zellzahl bestimmt. Gegenüber den nicht behandelten Kontrollen bedingt die Behandlung mit Herceptin® eine Abnahme der Zellzahl, die vor allem bei SKBR-3 Zellen deutlich ausgeprägt ist. Dieses Ergebnis korreliert mit der Vorstellung, dass SKBR-3 Zellen besonders empfindlich gegenüber Herceptin® sind, da sie den HER-2-Rezeptor überexprimieren. Werden die Zellen zusätzlich zu Herceptin® noch mit U50,488 behandelt, so führt dies bei SKBR-3, nicht aber bei MCF-7 Zellen zu einem signifikant stärkeren Rückgang der Zellzahl. Dieser Opioideffekt ist durch den κ -Opioidrezeptor-Antagonisten NorBNI aufhebbar. Dies deutet darauf hin, dass in SKBR-3 Zellen die Aktivierung des κ -Opioidrezeptors die Wirkung von Herceptin® verstärkt. Die alleinige Behandlung mit U50,488 induziert nur bei SKBR-3 Zellen einen moderaten Rückgang der Zellzahl, ein Effekt, der durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit NorBNI wieder aufhebbar ist.

Mithilfe des Kristallviolett-Tests konnten somit erste Hinweise auf einen kooperativen Effekt von Opioiden mit Herceptin® auf das Tumorzellwachstum gewonnen werden. Da Herceptin® die Proliferation von SKBR-3 Zellen unter den verwendeten Bedingungen nicht messbar beeinflusst, muss die Abnahme der Zellzahl im Kristallviolett-Test durch Induktion der Apoptose zustande kommen. Dieser Effekt wird durch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit U50,488 verstärkt. Da MCF-7 Zellen nur physiologische Mengen an HER-2-Rezeptoren exprimieren und diese Zellen keinen Caspase-3-Weg besitzen, können Opiode in diesen Zellen trotz der Expression funktionell aktiver κ -Opioidrezeptoren das Überleben der Zellen nicht beeinflussen.

VI Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erste Hinweise für eine mögliche Wechselwirkung zwischen Opioiden und Herceptin® in Mammakarzinomzellen zu erhalten. Als Modellsystem hierfür dienten humane SKBR-3 Zellen, die den HER-2-Rezeptor überexprimieren (Brockhoff, 2001; Emlet, 2006). Als Kontrolle wurden MCF-7 Zellen mit untersucht, die östrogen- und IGF-1-abhängig wachsen und lediglich physiologische Konzentrationen von HER-2-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (Knuefermann, 2003; Emlet, 2006). Diese Unterscheidung war erforderlich, da Herceptin® im Rahmen einer maßgeschneiderten Therapie nur bei HER-2 „positiven“ Tumoren eingesetzt wird (Lin, 2007). Obwohl SKBR-3 und MCF-7 Zellen beide funktionell aktive κ -Opioidrezeptoren tragen, sind Opioide lediglich in HER-2-Rezeptor überexprimierenden SKBR-3 Zellen in der Lage, die von Herceptin® vermittelte Hemmung des Zellwachstums zu verstärken.

Um ein geeignetes Zellmodell für die Untersuchung von Interaktionen zwischen Opioiden und Herceptin® auszuwählen, wurden drei verschiedene humane epitheliale Mammakarzinomzelllinien auf die Anwesenheit von Opioidrezeptoren hin untersucht. Hierfür wurde in einem ersten Schritt die Expression von Opioidrezeptoren mittels einer RT-PCR unter Verwendung beschriebener Primerpaare durchgeführt (Kraus et al., 2001; Kraus, 2009). Da Tumorzellen im Allgemeinen nur geringe Mengen an Opioidrezeptor-Transkripten enthalten, mussten die PCR-Bedingungen für jeden einzelnen Rezeptor gesondert optimiert und die erhaltenen Amplifikate sequenziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass SKBR-3 und MCF-7 Zellen lediglich den κ -, nicht aber μ - und δ -Opioidrezeptoren exprimieren. In BT-474 Zellen konnte keiner der drei Opioidrezeptoren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Mitteilung von Maneckjee et al. (1990), die in MCF-7 Zellen mittels Radioliganden-Bindungsstudien Hinweise für die Existenz aller drei Rezeptortypen erhalten haben. Für die weiteren Untersuchungen wurden deshalb die BT-474 Zellen ausgeschlossen.

Nachdem die RT-PCR Hinweise für die Expression von κ -Opioidrezeptoren in SKBR-3 und MCF-7 Zellen lieferte, wurde in einem nächsten Schritt die Translation des Proteins bestätigt. Hierfür wurden die κ -Opioidrezeptoren

mittels Radioliganden-Bindungsstudien in Membranpräparationen quantifiziert (Maneckjee, 1990). Dabei wurde die Rezeptorendichte sowohl in unbehandelten Zellen als auch nach einer chronischen Behandlung mit dem spezifischen κ -Opioidrezeptor-Agonisten U50,488 (Lahti et al., 1982) bestimmt. Im Vergleich zu neuronalem Gewebe ist der Gehalt an κ -Opioidrezeptoren in den untersuchten Mammakarzinomzellen mit $14,9 \pm 5$ (SKBR-3) und $24,4 \pm 6$ (MCF-7) fmol/mg Membranprotein gering. Er liegt aber dennoch in einem Bereich, der für Tumorzellen, z.B. R1.1 Lymphomzellen, charakteristisch ist (Joseph und Bidlack, 1994). Wurden die Zellen für drei Tage mit U50,488 behandelt, so konnte eine deutliche Abnahme der κ -Opioidrezeptoren, insbesondere in MCF-7 Zellen beobachtet werden. Diese weist darauf hin, dass die κ -Opioidrezeptoren in beiden Zelllinien einer Agonist-vermittelten Regulation unterliegen und internalisiert werden (McLaughlin et al., 2003). Die geringe Abnahme der Rezeptorendichte in SKBR-3 Zellen weist auf eine nur unbedeutende Entwicklung von Toleranz in diesen Zellen hin und stellt eine wichtige Voraussetzung dafür dar, dass Opioide auch nach längerfristiger Verabreichung noch mit der Herceptin®-Wirkung interferieren können.

Neben der reinen Anwesenheit von κ -Opioidrezeptoren stellt ihre funktionelle Kopplung an nachgeschaltete Signalmechanismen eine wesentliche Voraussetzung für eine mögliche Regulation der Zellfunktion durch Opioide dar. Aus diesem Grunde wurde die Ausstattung der BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen mit den verschiedenen G-Proteinen im Western Blot untersucht. G-Proteine fungieren als molekulare Schalter zwischen Zelloberflächenrezeptoren und intrazellulären Signalmechanismen und sind so für die Regulation von Zellmotilität, Zellwachstum und Differenzierung durch extrazelluläre Stimuli verantwortlich (Spiegelberg, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten in allen drei Zelllinien folgende G-Protein-Untereinheiten gefunden werden: $G_{i1/2}$, G_{i3} , $G_{z\alpha}$, $G_{s\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$, $G_{13\alpha}$, $G_{14\alpha}$ und G_{β} . Die G-Proteine der $G_{12/13}$ Familie gelten dabei als äußerst effiziente Onkogene, da sie unter allen G-Proteinen allein durch Überexpression ihrer entsprechenden Rezeptoren onkogene Eigenschaften entwickeln (Dhanasekaran, 1996; Radhika, 2001). Neuere Studien weisen $G_{12\alpha}$ und $G_{13\alpha}$ zudem eine große Bedeutung bei der Zellmigration zu, einem wesentlichen Aspekt des Tumorstwachstums und der Metastasierung (Spiegelberg, 2007). Neben diesen

direkten onkogenen Effekten greifen $G_{12\alpha}$ - und $G_{13\alpha}$ -abhängige Mechanismen auch indirekt in die Regulation von MAP-Kinasewegen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z.B. über Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren ein (Pierce, 2001; Yang, 2003). BT-474, SKBR-3 und MCF-7 Zellen enthalten ebenfalls verschiedene inhibitorische G-Proteine, die für die Regulation „klassischer“ Effektoren der Opioidrezeptoren benötigt werden. Aus diesem Grunde sind in den untersuchten Mammakarzinomzellen sämtliche Voraussetzungen dafür geschaffen, dass die vorhandenen κ -Opioidrezeptoren funktionell aktiv sind und in die Regulation der Zellfunktion eingreifen können.

Bei der Regulation des Zellwachstums spielt die Adenylylcyclase eine wichtige Rolle (Cho-Chung et al., 1991; Hartwell, 1994). Sie regt die Bildung von intrazellulärem cAMP an, das wiederum als second messenger eine Reihe von Signalmechanismen steuert (Miller et al., 1985). Die Inkubation von SKBR-3 und MCF-7 Zellen mit 1 μ M Forskolin führt zu einer starken Stimulation der cAMP-Produktion, die als Positivkontrolle diente (Boe, 1995; Davio, 1995). Wurden die Zellen zusätzlich mit dem selektiven κ -Opioidrezeptor-Agonisten U50,488 behandelt, so kam es zu einem weiteren Anstieg der Forskolin-vermittelten cAMP-Bildung. Dieser Effekt konnte durch den selektiven κ -Opioidrezeptor-Antagonisten NorBNI aufgehoben werden. Diese Ergebnisse demonstrieren erstmals, dass Opioide in SKBR-3 Zellen die Adenylylcyclase regulieren können. Sie zeigen ebenso, dass die Aktivierung des κ -Opioidrezeptors in beiden Zelllinien zu einer Stimulation und nicht zu einer Hemmung der cAMP-Produktion führt, wie sie für neuronale Zellen charakteristisch ist (Attali et al., 1989). Eine Stimulation der Adenylylcyclase durch per se inhibitorische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurde bereits in anderen Tumorzellen beschrieben und wird mit den onkogenen Eigenschaften dieser Rezeptoren in Verbindung gebracht (Melnikova und Bar-Eli, 2007).

Diese proliferative Wirkung von Morphin auf Tumorzellen wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Gupta, 2002; Ishikawa, 1993; Simon, 1986; Moon, 1988). Es wird vermutet, dass der mitogene Effekt von Morphin durch eine $G_{\beta\gamma}$ -induzierte Aktivierung der PI3K/AKT (Polakiewicz, 1998) und ERK1/2 Signalwege (Gupta, 2002) vermittelt wird. Die Tatsache, dass der stimulierende Effekt des partiellen Opioidrezeptor-Agonisten Morphin auf die

cAMP-Produktion gleich groß (SKBR-3) bzw. sogar etwas größer (MCF-7) war als derjenige von U50,488, könnte darauf hinweisen, dass in beiden Tumorzellen noch weitere Opioidrezeptoren exprimiert werden. In diesem Zusammenhang wurde für MCF-7 Zellen ein so genannter σ -Opioidrezeptor beschrieben, über den Met-Enkephalin seine Tumor-promovierenden Eigenschaften ausüben soll (Mach et al., 1997; Lee und Wurster, 1994; Spruce et al., 2004). Die Tatsache, dass NorBNI die von Morphin vermittelte cAMP-Produktion aber vollständig wieder aufheben kann, spricht gegen die Existenz weiterer Opioidrezeptoren in beiden Zelllinien.

Opioide besitzen vielfältige Wirkungen auf das Tumorstadium (Tegeder et al., 2004). Je nach Zelltyp können sie die Proliferation, Metastasierung, Angiogenese und das Überleben der Zelle beeinflussen (Chen et al., 2008). Die Zellproliferation wird dabei vornehmlich durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen reguliert (Yue, 2002). Die proliferativen Effekte von Opioiden stehen dabei in enger Verbindung mit einer Überexpression von Wachstumsfaktoren (Clarke, 1989), Rezeptor-Tyrosinkinasen oder beidem zusammen (Arteaga, 1988; Pietras, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Regulation des in vielen Zellen bedeutendsten MAP-Kinase-Weges, der extrazellulären Signal-regulierten Proteinkinase (ERK1/2), mithilfe eines aktivierungsspezifischen Antikörpers im Western Blot untersucht. Obwohl die Behandlung von SKBR-3 und MCF-7 Zellen mit EGF eine starke Aktivierung der ERK1/2 bedingte (Watt, 2008), konnte nach Exposition der Zellen mit U50,488 keine Aktivierung dieses Signalweges beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass beide Zelllinien über einen intakten HER-1-Rezeptor/Ras/Raf/ERK1/2 Signalweg verfügen, die κ -Opioidrezeptoren diesen aber nicht transaktivieren können. Dies ist umso erstaunlicher, da κ -Opioidrezeptoren in vielen Zellsystemen und Geweben die ERK1/2 stimulieren (Bruchas et al., 2008; Asensio et al., 2006). Als mögliche Ursache hierfür kann die in diesen Zellen beobachtete hohe basale ERK1/2-Aktivität herangezogen werden (Nakagawa et al., 2003; Treff et al., 2004), wodurch das im Vergleich geringere Signal des κ -Opioidrezeptors im Hintergrundrauschen verschwindet. In der Tat konnte die basale ERK1/2-Phosphorylierung nur durch extensives Waschen der Zellen und Inkubation unter serumfreien Bedingungen reduziert werden.

Zu unserer Überraschung hatte die Vorbehandlung der Zellen mit Herceptin® in SKBR-3 Zellen keinen Effekt auf die von EGF vermittelte ERK1/2-Aktivität, während sie nach 24 h Vorinkubation die Stimulation des Signalweges in MCF-7 Zellen vollständig blockierte. Der für Herceptin® postulierte Wirkmechanismus schlägt eine Blockade der Heterodimerisierung von HER-1 mit HER-2-Rezeptoren vor (Brockhoff, 2001). Da SKBR-3 Zellen den HER-2-Rezeptor überexprimieren, hätten wir nach der Vorinkubation mit dem Antikörper eine Abnahme monomerer HER-1-Rezeptoren und damit eine Abschwächung des EGF Signals in diesen Zellen erwartet. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Herceptin® hemmte die HER-1 vermittelte ERK1/2-Aktivierung in MCF-7 Zellen. Offensichtlich geht die Überexpression von HER-2 auch mit einer Aktivitätssteigerung oder Zunahme von HER-1-Rezeptoren einher (Wiseman et al., 2005). Des Weiteren scheint es auch in MCF-7 Zellen zu einer Heterodimerisierung von HER-1 mit den vorhandenen HER-2-Rezeptoren zu kommen, was im Gegensatz zu einem Bericht von Knowlden et al. (2003) steht. Unabhängig davon zeigen unsere Versuche mit den spezifischen HER-1 (AG1478) und HER-2 (AG825) Rezeptorenblockern, dass in beiden Zelllinien die von EGF induzierte Aktivierung der ERK-1/2 über den HER-1-Rezeptor vermittelt wird.

Da Opioide die ERK1/2 nicht aktivieren können, war es nicht verwunderlich, dass auch nach Vorbehandlung der Zellen mit Herceptin® kein derartiger Effekt zu beobachten war. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob Opioide eventuell alternative MAP-Kinase Wege induzieren können. Signale, die über die beiden stressinduzierten MAP-Kinasen p38 und JNK vermittelt werden, spielen eine große Rolle bei der Proliferation und Apoptose von Zellen (Li, 2010). Unsere Ergebnisse zeigten, dass EGF sowohl in SKBR-3 als auch MCF-7 Zellen die p38, in SKBR-3 Zellen auch die JNK aktivieren kann und dass diese Effekte durch den HER-1-Inhibitor AG1478 blockierbar sind. Die Exposition der Zellen gegenüber U50,488 führte dagegen zu keiner Stimulation der beiden MAP-Kinasen. Wie auch für die ERK1/2 beobachtet, hatte die Vorbehandlung der Zellen mit Herceptin® keinen Einfluss auf die Aktivierung der beiden MAP-Kinasen durch EGF. Somit scheint auch die Stimulation der p38 und der JNK über eine Aktivierung des HER-1-Rezeptors vermittelt zu sein. Dies ist ein weiterer

Hinweis darauf, dass die in SKBR-3 und MCF-7 Zellen vorhandenen κ -Opioidrezeptoren den HER-1-Rezeptor nicht transaktivieren können.

Da weder Herceptin[®] noch Opioide proliferative Signalwege in SKBR-3 Zellen hemmen, wurden schließlich mögliche Auswirkungen auf Apoptosewege untersucht. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können dabei über eine PI3K-abhängige Regulation der AKT in den extrinsischen Apoptoseweg eingreifen. Interessanterweise führte die kurzzeitige Aktivierung von κ -Opioidrezeptoren mit U50,488 in den beiden Zelllinien zu keiner Phosphorylierung von AKT, die z.B. in δ -Opioidrezeptor exprimierenden Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) Zellen mit einer Hemmung der Apoptose in Verbindung gebracht wurde (Heiss et al., 2009). Im Gegenteil, eine Phosphorylierung der AKT konnte erst bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit U50,488 zusammen mit NorBNI beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von κ -Opioidrezeptoren in SKBR-3 Zellen die AKT-Phosphorylierung hemmt. Die Hemmung der AKT-Phosphorylierung korrelierte dabei mit einer vollständigen Spaltung der Procaspase-3 und damit Auslösung der Apoptose in SKBR-3 Zellen durch U50,488. Wurden die Zellen für 24 h mit Herceptin[®] vorbehandelt, so stieg einerseits die basale AKT-Phosphorylierung an, der Gehalt an Procaspase-3 sank aber. Unter diesen Bedingungen konnte U50,488 die basale Aktivierung der AKT sogar leicht hemmen. Da auch die Vorbehandlung von SKBR-3 Zellen mit Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, die basale Phosphorylierung der AKT vermindert, deuten diese Ergebnisse auf eine zusätzliche Hemmung der Apoptose durch Opioide in Gegenwart von Herceptin[®] hin (Way, 2003). MCF-7 Zellen enthalten dagegen keine Procaspase3 (Jänicke, 1998), weshalb in diesen Zellen weder Herceptin[®] noch Opioide diesen Apoptoseweg benutzen. Alternativ könnte in MCF-7 Zellen durch Aktivierung der Caspase-9, gefolgt von den Caspasen 7 und 6 ein ähnlicher Apoptoseweg beschritten werden (Liang, 2001).

Die Regulation der PI3K-abhängigen AKT-Phosphorylierung stellt eine Möglichkeit dar, wie Opioide mit Herceptin[®] das Überleben von HER-2-positiven Mammakarzinomzellen verkürzen können. In der Tat konnten Opioide in SKBR-3 Zellen die Abnahme der Zellzahl durch Herceptin[®] im Kristallviolett-Test signifikant beschleunigen. In MCF-7 Zellen konnte dagegen kein Effekt von Opioiden auf das Überleben der Zellen beobachtet werden.

Diese Ergebnisse liefern einen ersten Hinweis dafür, dass Opiode die zytotoxische Wirkung von Herceptin® in HER-2 positiven SKBR-3 Zellen durch Aktivierung der Apoptose steigern können. Eine vergleichbare synergistische Wirkung von Opioiden mit Zytostatika wurde vor kurzem in MCF-7 Zellen für Doxorubicin beschrieben (Crawford und Bowen, 2002). Die gleichzeitige Behandlung von Brustkrebspatientinnen mit Herceptin® und Opioiden könnte daher in Zukunft helfen, die Wirksamkeit der antineoplastischen Therapie zu steigern und die Ausbildung von Resistenzen gegen Herceptin® zu umgehen oder zu verzögern. Die vorliegende Studie liefert die Basis dafür, die Mechanismen der Interaktion von Opioiden mit Herceptin® auf zellulärer und molekularer Ebene näher zu charakterisieren.

VII Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erste Hinweise für eine mögliche Interaktion von Opioiden mit Herceptin[®] zu erlangen. Herceptin[®] ist ein monoklonaler Antikörper gegen den HER-2-Rezeptor, der beim Menschen zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird. In einem ersten Schritt wurden die humanen Mammakarzinomzelllinien BT-474, SKBR-3 und MCF-7 auf die Anwesenheit von Opioidrezeptoren hin untersucht. Mithilfe der RT-PCR und von Radioliganden-Bindungsstudien konnten sowohl in SKBR-3 (HER-2 positiv) als auch MCF-7 Zellen (HER-2 negativ) funktionell aktive κ -Opioidrezeptoren identifiziert werden. Alle Zelllinien sind zudem mit den G-Protein-Untereinheiten $G_{i1/2}$, G_{i3} , $G_{z\alpha}$, $G_{s\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$, $G_{13\alpha}$, $G_{14\alpha}$ und G_{β} ausgestattet, die als molekulare Schalter fungieren und die κ -Opioidrezeptoren an ihre entsprechenden intrazellulären Signalmechanismen koppeln. In der Tat führt die Stimulation von SKBR-3 und MCF-7 Zellen mit U50,488, einem selektiven Agonisten am κ -Opioidrezeptor, und Morphin zu einem starken Anstieg der intrazellulären cAMP-Produktion. Die Aktivierung der Adenylylcyclase kann in beiden Fällen durch den selektiven κ -Opioidrezeptor-Antagonist NorBNI wieder aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu konnte weder in SKBR-3 noch in MCF-7 Zellen eine Transaktivierung des mitogenen HER-1-Rezeptor/Ras/Raf/ERK1/2 Signalweges oder der beiden stressinduzierten Proteinkinasen p38 und JNK durch Opiode beobachtet werden. Die genannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen werden jedoch durch EGF stimuliert, ein Effekt, der nur in MCF-7, nicht aber in SKBR-3 Zellen durch eine 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Herceptin[®] aufhebbar ist. Schließlich wurde der Einfluss von Opioiden auf die Regulation von Überlebensmechanismen der Zellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von κ -Opioidrezeptoren in SKBR-3 Zellen die PI3K-abhängige Phosphorylierung der Proteinkinase B/AKT hemmt und damit die Spaltung der Procaspase-3 stimuliert. Die Aktivierung des Caspase-3-Weges ist durch NorBNI aufhebbar und wird nach einer Vorbehandlung der Zellen mit Herceptin[®] überdeckt. Zudem verstärkt die Apoptose-induzierende Wirkung der Opiode den wachstumshemmenden Effekt von Herceptin[®] in SKBR-3 Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass SKBR-3 und MCF-7 Zellen funktionell aktive κ -

Opioidrezeptoren exprimieren und diese die zytotoxische Wirkung von Herceptin® in HER-2 positiven SKBR-3 Zellen verstärken können.

VIII Summary

Interaction between Opioids and Herceptin[®] in human breast carcinoma cells

The aim of the present study was to investigate possible interactions between opioids and Herceptin[®], a monoclonal antibody frequently used for treatment of human breast cancers. For this, the human mammary carcinoma cell lines BT-474, SKBR-3 and MCF-7 were screened for the presence of opioid receptors by RT-PCR and radioligand binding studies. We found that “HER-2 positive” SKBR-3 and “HER-2 negative” MCF-7 cells both express ample amounts of κ -opioid receptors. Each cell line also contains the following G Proteins: $G_{i1/2}$, G_{i3} , $G_{z\alpha}$, $G_{s\alpha}$, $G_{q/11\alpha}$, $G_{13\alpha}$, $G_{14\alpha}$, und G_{β} . These G proteins serve as molecular switches and connect κ -opioid receptors to intracellular effector systems. Among these, the κ -opioid receptor agonist U50,488 and morphine were shown to stimulate cAMP accumulation in both cell lines, an effect blocked by co-incubation of the cells with the selective κ -opioid receptor antagonist NorBNI. In contrast, treatment of SKBR-3 and MCF-7 cells with U50,488 failed to transactivate the mitogenic HER-1-Rezeptor/Ras/Raf/ERK1/2 signalling pathway as well as the stress-induced protein kinases p38 and JNK. These signal transduction pathways were stimulated by EGF, an effect specifically blocked in MCF-7 cells by pre-treatment with Herceptin[®]. Finally, regulation of cell survival pathways by opioids was examined. In this respect we found that opioids are able to inhibit PI3K-dependent phosphorylation of protein kinase B/AKT and activate procaspase-3 cleavage in SKBR-3 cells. Activation of caspase-3 signalling in these cells is sensitive to NorBNI and masked by Herceptin[®] pre-treatment. Activation of this apoptosis pathway by opioids further enhances the induction of cell death by Herceptin[®] as assessed in the crystal-violet test. These results demonstrate that both SKBR-3 and MCF-7 cell express functionally competent κ -opioid receptors and that opioids are able to enhance the cytotoxic activity of Herceptin[®] in “HER-2 positive” SKBR-3 cells.

IX Literaturverzeichnis

Ahmedzai, S. and D. Brooks (1997). "Transdermal fentanyl versus sustained-release oral morphine in cancer pain: preference, efficacy, and quality of life. The TTS-Fentanyl Comparative Trial Group." *J Pain Symptom Manage* 13(5): 254-61.

Ananthan, S. (2006). "Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics." *AAPS J* 8(1): E118-25.

Arpino, G., C. Gutierrez, et al. (2007). "Treatment of human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer xenografts with multiagent HER-targeted therapy." *J Natl Cancer Inst* 99(9): 694-705.

Arteaga, C. L. and C. K. Osborne (1991). "Growth factors as mediators of estrogen/antiestrogen action in human breast cancer cells." *Cancer Treat Res* 53: 289-304.

Asensio, V. J., A. Miralles, et al. (2006). "Stimulation of mitogen-activated protein kinase kinases (MEK1/2) by mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in the rat brain: regulation by chronic morphine and opioid withdrawal." *Eur J Pharmacol* 539(1-2): 49-56.

Attali, B., D. Saya, et al. (1989). "Kappa-opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord." *J Neurochem* 52(2): 360-9.

Baselga, J. (2002). "Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy." *Oncologist* 7 Suppl 4: 2-8.

Baselga, J., L. Norton, et al. (1998). "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." *Cancer Res* 58(13): 2825-31.

Boe, R., B. T. Gjertsen, et al. (1995). "8-Chloro-cAMP induces apoptotic cell death in a human mammary carcinoma cell (MCF-7) line." *Br J Cancer* 72(5): 1151-9.

Bowers, G., D. Reardon, et al. (2001). "The relative role of ErbB1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells." *Oncogene* 20(11): 1388-97.

Boylan, M., H. W. van den Berg, et al. (1998). "The anti-proliferative effect of

suramin towards tamoxifen-sensitive and resistant human breast cancer cell lines in relation to expression of receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I: growth stimulation in the presence of tamoxifen." *Ann Oncol* 9(2): 205-11.

Brockhoff, G., B. Heckel, et al. (2007). "Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation." *Cell Prolif* 40(4): 488-507.

Brockhoff, G., P. Heiss, et al. (2001). "Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells." *Cytometry* 44(4): 338-48.

Bruchas, M. R., M. Xu, et al. (2008). "Repeated swim stress induces kappa opioid-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2." *Neuroreport* 19(14): 1417-22.

Casalini, P., L. Botta, et al. (2001). "Role of p53 in HER2-induced proliferation or apoptosis." *J Biol Chem* 276(15): 12449-53.

Chen, Y. L., P. Y. Law, et al. (2008). "The other side of the opioid story: modulation of cell growth and survival signaling." *Curr Med Chem* 15(8): 772-8.

Chen, Y. L., P. Y. Law, et al. (2008). "The other side of the opioid story: modulation of cell growth and survival signaling." *Curr Med Chem* 15(8): 772-8.

Cho-Chung, Y. S., T. Clair, et al. (1991). "Role of site-selective cAMP analogs in the control and reversal of malignancy." *Pharmacol Ther* 50(1): 1-33.

Choi, H. S., C. S. Kim, et al. (2006). "The opioid ligand binding of human mu-opioid receptor is modulated by novel splice variants of the receptor." *Biochem Biophys Res Commun* 343(4): 1132-40.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.

Clark, G. M. and W. L. McGuire (1991). "Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer." *Cancer Res* 51(3): 944-8.

Clarke, R., N. Brunner, et al. (1989). "The effects of a constitutive expression of transforming growth factor-alpha on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro and in vivo." *Mol Endocrinol* 3(2): 372-80.

Corbett, A. D., G. Henderson, et al. (2006). "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S153-62.

Crawford, K. W. and W. D. Bowen (2002). "Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines." *Cancer Res* 62(1): 313-22.

Cuello, M., S. A. Ettenberg, et al. (2001). "Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2." *Cancer Res* 61(12): 4892-900.

Davio, C., A. Baldi, et al. (1995). "Expression of histamine receptors in different cell lines derived from mammary gland and human breast carcinomas." *Inflamm Res* 44 Suppl 1: S70-1.

DeBlasi, A., K. O'Reilly, et al. (1989). "Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor." *Trends Pharmacol Sci* 10(6): 227-9.

Dhanasekaran, N. and J. M. Dermott (1996). "Signaling by the G12 class of G proteins." *Cell Signal* 8(4): 235-45.

Diermeier, S., G. Horvath, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation." *Exp Cell Res* 304(2): 604-19.

Emlet, D. R., K. A. Brown, et al. (2007). "Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines." *Mol Cancer Ther* 6(10): 2664-74.

Emlet, D. R., R. Schwartz, et al. (2006). "HER2 expression as a potential marker for response to therapy targeted to the EGFR." *Br J Cancer* 94(8): 1144-53.

Gianni, L., W. Eiermann, et al. "Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort." *Lancet* 375(9712): 377-84.

Gospodarowicz, M. K., D. Miller, et al. (2004). "The process for continuous improvement of the TNM classification." *Cancer* 100(1): 1-5.

Gudermann, T., F. Kalkbrenner, et al. (1996). "Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 429-59.

Gupta, K., S. Kshirsagar, et al. (2002). "Morphine stimulates angiogenesis by activating proangiogenic and survival-promoting signaling and promotes breast tumor growth." *Cancer Res* 62(15): 4491-8.

Haberland, J., J. Bertz, et al. "German cancer statistics 2004." *BMC Cancer* 10(1): 52.

Hanoune, J., Y. Pouille, et al. (1997). "Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily." *Mol Cell Endocrinol* 128(1-2): 179-94.

Hartwell, L. (1994). "Cell cycle. cAMPing out." *Nature* 371(6495): 286.

Heiss, A., H. Ammer, et al. (2009). "delta-Opioid receptor-stimulated Akt signaling in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells involves receptor tyrosine kinase-mediated PI3K activation." *Exp Cell Res* 315(12): 2115-25.

Hunt, R., B. Fazekas, et al. (1999). "A comparison of subcutaneous morphine and fentanyl in hospice cancer patients." *J Pain Symptom Manage* 18(2): 111-9.

Ishikawa, M., K. Tanno, et al. (1993). "Enhancement of tumor growth by morphine and its possible mechanism in mice." *Biol Pharm Bull* 16(8): 762-6.

Janecka, A., J. Fichna, et al. (2004). "Binding of the new morphiceptin analogs to human MCF-7 breast cancer cells and their effect on growth." *Regul Pept* 120(1-3): 237-41.

Janicke, R. U., M. L. Sprengart, et al. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." *J Biol Chem* 273(16): 9357-60.

Jeffrey, K. L., M. Camps, et al. (2007). "Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses." *Nat Rev Drug Discov* 6(5): 391-403.

Ji, T. H., M. Grossmann, et al. (1998). "G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." *J Biol Chem* 273(28): 17299-302.

Joseph, D. B. and J. M. Bidlack (1994). "The kappa-opioid receptor expressed on the mouse lymphoma cell line R1.1 contains a sulfhydryl group at the binding site." *Eur J Pharmacol* 267(1): 1-6.

Kapoor Neeraj, Santosh T Menon, Radha Chauhan, Pallavi Sachdev, Thomas P Sakmar (2009). "Structural evidence for "Intermediate" along the activation pathway of Heterotrimeric G-proteins" (Poster)

Kholodenko, B. N. and M. R. Birtwistle (2009). "Four-dimensional dynamics of MAPK information processing systems." *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1(1): 28-44.

Kim, K. W., Y. A. Eun, et al. (1996). "Ligand binding profiles of U-69, 593-sensitive and-insensitive sites in human cerebral cortex membranes: evidence of kappa opioid receptors heterogeneity." *Life Sci* 58(19): 1671-9.

Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, et al. (2003). "Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells." *Endocrinology* 144(3): 1032-44.

Koltermann, A., J. Liebl, et al. (2009). "Ginkgo biloba extract EGb 761 exerts anti-angiogenic effects via activation of tyrosine phosphatases." *J Cell Mol Med* 13(8B): 2122-30.

Kraus, J. (2009). "Regulation of mu-opioid receptors by cytokines." *Front Biosci (Schol Ed)* 1: 164-70.

Kraus, J., C. Borner, et al. (2001). "Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site." *J Biol Chem* 276(47): 43901-8.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-5.

Lahti, R. A., P. F. VonVoigtlander, et al. (1982). "Properties of a selective kappa agonist, U-50,488H." *Life Sci* 31(20-21): 2257-60.

Lee, Y. S. and R. D. Wurster (1994). "Differential effects of methionine enkephalin on the growth of brain tumor cells." *J Neurooncol* 19(1): 11-5.

Li, J. P., Y. N. Fu, et al. "JNK pathway-associated phosphatase dephosphorylates focal adhesion kinase and suppresses cell migration." *J Biol Chem* 285(8): 5472-8.

Liang, Y., C. Yan, et al. (2001). "Apoptosis in the absence of caspase 3." *Oncogene* 20(45): 6570-8.

Lin, A. and H. S. Rugo (2007). "The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations." *Curr Treat Options Oncol* 8(1): 47-60.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.

Mach, R. H., C. R. Smith, et al. (1997). "Sigma 2 receptors as potential biomarkers of proliferation in breast cancer." *Cancer Res* 57(1): 156-61.

Maneckjee, R., R. Biswas, et al. (1990). "Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth." *Cancer Res* 50(8): 2234-8.

McLaughlin, J. P., M. Xu, et al. (2003). "Phosphorylation of a carboxyl-terminal serine within the kappa-opioid receptor produces desensitization and internalization." *J Biol Chem* 278(36): 34631-40.

Melnikova, V. and M. Bar-Eli (2007). "Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor." *Cancer Metastasis Rev* 26(3-4): 359-71.

Mercadante, S., M. Caligara, et al. (1997). "Subcutaneous fentanyl infusion in a patient with bowel obstruction and renal failure." *J Pain Symptom Manage* 13(4): 241-4.

Miller, W. T. and E. T. Kaiser (1988). "Probing the peptide binding site of the cAMP-dependent protein kinase by using a peptide-based photoaffinity label." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(15): 5429-33.

Moon, T. D. (1988). "The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth." *Biochem Biophys Res Commun* 153(2): 722-7.

Muller, D. L. and E. M. Unterwald (2004). "In vivo regulation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and protein kinase B (Akt) phosphorylation by acute and chronic morphine." *J Pharmacol Exp Ther* 310(2): 774-82.

Nahta, R. and F. J. Esteva (2004). "In vitro effects of trastuzumab and vinorelbine in trastuzumab-resistant breast cancer cells." *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2): 186-90.

Nahta, R., M. C. Hung, et al. (2004). "The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells." *Cancer Res* 64(7): 2343-6.

Nakagawa, S., T. Fujii, et al. (2003). "Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase." *Mol Carcinog* 38(3): 106-16.

Nauck, F. (2009). "[Cancer pain therapy]." *Urologe A* 48(10): 1175-6, 1178-81.

Pavan, B., C. Biondi, et al. (2009). "Adenylyl cyclases as innovative therapeutic goals." *Drug Discov Today* 14(19-20): 982-91.

Pierce, K. L., A. Tohgo, et al. (2001). "Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding." *J Biol Chem* 276(25): 23155-60.

Pietras, R. J., J. Arboleda, et al. (1995). "HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells." *Oncogene* 10(12): 2435-46.

Polakiewicz, R. D., S. M. Schieferl, et al. (1998). "mu-Opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control." *J Biol Chem* 273(36): 23534-41.

Radhika, V. and N. Dhanasekaran (2001). "Transforming G proteins." *Oncogene* 20(13): 1607-14.

Rüschoff, J., I. Nagelmeier, et al. (2009). "[ErbB2 diagnostics in breast cancer--an update]." *Pathologe* 30(2): 147-55.

Sadana, R., N. Dascal, et al. (2009). "N terminus of type 5 adenylyl cyclase scaffolds Gs heterotrimer." *Mol Pharmacol* 76(6): 1256-64.

Schulz, R., D. A. Eisinger, et al. (2004). "Opioid control of MAP kinase cascade." *Eur J Pharmacol* 500(1-3): 487-97.

Shabalina, S. A., D. V. Zaykin, et al. (2009). "Expansion of the human mu-opioid receptor gene architecture: novel functional variants." *Hum Mol Genet* 18(6): 1037-51.

Simon, R. H. and T. E. Arbo (1986). "Morphine increases metastatic tumor growth." *Brain Res Bull* 16(3): 363-7.

Spiegelberg, B. D. and H. E. Hamm (2007). "Roles of G-protein-coupled receptor signaling in cancer biology and gene transcription." *Curr Opin Genet Dev* 17(1): 40-4.

Spruce, B. A., L. A. Campbell, et al. (2004). "Small molecule antagonists of the sigma-1 receptor cause selective release of the death program in tumor and self-reliant cells and inhibit tumor growth in vitro and in vivo." *Cancer Res* 64(14): 4875-86.

Tay, W. and K. Y. Ho (2009). "The role of interventional therapies in cancer pain management." *Ann Acad Med Singapore* 38(11): 989-97.

Tegeder, I. and G. Geisslinger (2004). "Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications." *Pharmacol Rev* 56(3): 351-69.

Treff, N. R., D. Pouchnik, et al. (2004). "High-mobility group A1a protein regulates Ras/ERK signaling in MCF-7 human breast cancer cells." *Oncogene* 23(3): 777-85.

Walsh, T. D. and T. S. West (1988). "Controlling symptoms in advanced cancer." *Br Med J (Clin Res Ed)* 296(6620): 477-81.

Waskiewicz, A. J. and J. A. Cooper (1995). "Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast." *Curr Opin Cell Biol* 7(6): 798-805.

Watt, H. L., G. Kharmate, et al. (2008). "Biology of somatostatin in breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* 286(1-2): 251-61.

Way, S. S., T. R. Kollmann, et al. (2003). "Cutting edge: protective cell-mediated immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of myeloid differentiation factor 88." *J Immunol* 171(2): 533-7.

Wiseman, S. M., N. Makretsov, et al. (2005). "Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival." *Cancer* 103(9): 1770-7.

Yang, H., D. Cooley, et al. (2003). "Phosphorylation of the Ras-GRF1 exchange factor at Ser916/898 reveals activation of Ras signaling in the cerebral cortex." *J Biol Chem* 278(15): 13278-85.

Yin, Y., S. Wang, et al. (2009). "JNK/AP-1 pathway is involved in tumor necrosis factor-alpha induced expression of vascular endothelial growth factor in MCF7 cells." *Biomed Pharmacother* 63(6): 429-35.

Yue, W., J. P. Wang, et al. (2002). "Activation of the MAPK pathway enhances sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to the mitogenic effect of estradiol." *Endocrinology* 143(9): 3221-9.

X Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Struktur eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Ji et al., 1998)	9
Abb. 2:	G-Protein-Zyklus (Kapoor et al., 2009)	10
Abb. 3:	Struktur der Adenylylcyclase (Kandel, 2000)	11
Abb. 4:	Schematische Darstellung der wichtigsten MAP-Kinase Signalwege (Jefrey et al., 2007)	14
Abb. 5:	Schematische Darstellung EGF-Rezeptor-assoziiierter Signalwege (Baselga, 2002)	16
Abb. 6:	Schematische Darstellung HER-2 überexprimierender Brustkrebszellen (www.brustkrebs-kompetenz.de)	18
Abb. 7:	Schematische Darstellung der von Trastuzumab induzierten Signalwege (Genentech)	19
Abb. 8:	PCR zur Darstellung des GAPDH-Fragmentes (186 bp)	54
Abb. 9:	Nachweis des μ -Opioidrezeptors (342 bp)	55
Abb. 10:	Nachweis des δ -Opioidrezeptors (494 bp)	56
Abb. 11:	Nachweis des κ -Opioidrezeptors (322 bp)	57
Abb. 12:	Nachweis von κ -Opioidrezeptoren mittels Radioliganden-Bindung	58
Abb. 13:	Nachweis von G-Proteinen im Western Blot	59
Abb. 14:	Regulation der cAMP-Produktion durch Opioide in SKBR-3 und- 7 Zellen	61
Abb. 15:	Regulation der ERK1/2-Aktivität in SKBR-3 Zellen durch Opioide und Herceptin®	63
Abb. 16:	Regulation der ERK1/2-Aktivität in MCF-7 Zellen durch Opioide und Herceptin®	64

Abb. 17: Regulation der p38 und JNK in SKBR-3 und MCF-7 Zellen durch Opioide und Herceptin®	66
Abb. 18: Regulation der AKT-Phosphorylierung und Procaspase-3- Spaltung in SKBR-3 und MCF-7 Zellen durch Opioide und Herceptin®	68
Abb. 19: Regulation des Zellwachstums durch Opioide und Herceptin®	69

XI Danksagung

Meinen größten Dank möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer aussprechen, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Hinweise, die wesentlich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem bedanke ich mich herzlich für die ausführlichen Erklärungen und unermüdlichen Hilfestellungen im Labor. Schließlich möchte ich ihm an dieser Stelle danken für das wunderbare und einmalige Arbeitsklima, die einzigartige Teamgemeinschaft und die Motivation, die ich Tag für Tag bekommen habe.

Herrn Thomas Christ, der leider viel zu früh und völlig unerwartet im September 2009 von uns gegangen ist, möchte ich für seine bewundernswerte Geduld, die ausführlichen Erklärungen, seine ausgezeichnete Einführung ins Laborleben und das Erlernen der in der Arbeit verwendeten Methoden danken.

Sarah Koutnik möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Mitarbeit im Labor danken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie des ganzen Institutes für ihre Freundlichkeit und ihre aufmunternden und anregenden Gespräche.

Schließlich möchte ich mich bei der Chirurgischen Poliklinik der LMU München für die Bereitstellung der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 bedanken.