

**Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen
durch Opioide**

von

Julia Angelika Reizlein

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

Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen
durch Opioide

von Julia Angelika Reizlein
aus Ochsenfurt

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
Korreferent: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion:
18. Juli 2015

Für meine Familie

1	INHALT	
2	EINLEITUNG.....	1
3	LITERATURÜBERSICHT	2
3.1	Opioide und Opioidrezeptoren.....	2
3.1.1	Definition	2
3.1.2	Einteilung der Opioidrezeptoren.....	2
3.1.3	Aufbau und Struktur der Opioidrezeptoren.....	3
3.1.4	G-Protein-vermittelte Signaltransduktion	3
3.1.5	Signaltransduktion über Opioidrezeptoren	4
3.1.5.1	Adenylylcyclase	4
3.1.6	Desensibilisierung und Toleranz der Opioidrezeptoren	6
3.2	HER-Rezeptoren.....	6
3.2.1	Vorkommen	6
3.2.2	Aufbau und Struktur.....	7
3.2.3	Liganden	7
3.2.4	Aktivierung.....	8
3.2.5	Induzierte Signalwege	9
3.2.5.1	MAP-Kinase-Signalweg	11
3.2.5.2	Akt-Signaltransduktion	11
3.2.6	Beendigung des HER-Rezeptor-vermittelten Signals	12
3.2.6.1	Clathrin-vermittelte Internalisierung.....	12
3.2.6.2	c-Cbl-vermittelte Internalisierung	12
3.3	Trastuzumab.....	13
3.3.1	Aufbau	13
3.3.2	Wirkmechanismen	14
3.3.3	Resistenzmechanismen	14

3.3.4	Anwendungsbestimmungen beim Einsatz von Herceptin® zur Therapie von Brustkrebs.....	15
3.3.5	Nebenwirkungen.....	15
3.3.6	Weitere Möglichkeiten der Tumorthherapie	15
3.4	IGF-1-Rezeptor (Insulin-like-growth-factor Rezeptor 1)	16
3.5	Möglichkeiten der Interaktion der beiden Rezeptorsysteme: gemeinsame Signalwege	17
3.5.1	c-Src	17
3.5.2	MAP-Kinase.....	19
3.5.3	Akt	20
3.5.4	Internalisierung über Clathrin	20
3.6	SKBR3 Zellen	20
4	FRAGESTELLUNG	21
5	MATERIAL UND METHODEN	22
5.1	Material.....	22
5.1.1	Geräte.....	22
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
5.1.3	Zellen, Zellkulturmedien und Additive	24
5.1.4	Chemikalien und Lösungen	25
5.1.5	Antikörper.....	27
5.1.5.1	Primäre Antikörper	27
5.1.5.2	Sekundäre Antikörper.....	28
5.2	Methoden.....	28
5.2.1	Zellkultur, chronische Behandlung mit Herceptin® und U69,593.....	28
5.2.2	Einfrieren der Zellen	29
5.2.3	Auftauen der Zellen.....	30
5.2.4	Zellzählung.....	30

5.3	KV-Test	30
5.4	Proteinbestimmung nach Lowry	33
5.5	Radioligandenbindung	34
5.6	Western Blot.....	36
5.7	cAMP-Bestimmung	41
5.8	Annexin V-FITC / Propidium Jodid Färbung.....	44
5.9	TRICT-Phalloidin-Färbung	45
5.10	Immunzytochemie	45
5.11	Statistische Auswertung.....	46
6	ERGEBNISSE	47
6.1	Generierung Opioid-toleranter und Trastuzumab-resistenter SKBR3 Zelllinien..	47
6.2	Charakterisierung der Zelllinien.....	47
6.2.1	Phänotyp.....	47
6.2.2	Charakterisierung der Opioidrezeptoren.....	48
6.2.2.1	Radioligandenbindung	48
6.2.2.2	Regulation der Adenylylcyclase	49
6.2.3	Charakterisierung des Zellwachstums	51
6.2.3.1	Kristallviolett Assay	51
6.2.3.2	Apoptose.....	52
6.2.4	Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen	54
6.2.5	Regulation nachgeschalteter Signalwege	56
6.2.5.1	Proteinkinase B/Akt-Signalweg	56
6.2.5.2	Erk 1/2-Signalweg	57
6.2.6	Regulation von Resistenzmarkern	57
6.2.6.1	PTEN	57
6.2.6.2	p27kip1	58

6.2.6.3	c-Src	59
6.2.6.3.1	Western Blot	59
6.2.6.3.2	Immunzytochemie.....	59
6.2.6.4	c-Cbl.....	60
6.2.6.4.1	Western Blot	60
6.2.6.4.2	Immunzytochemie.....	61
6.2.7	Resistenz gegenüber Trastuzumab	61
6.2.8	Reversibilität der chronisch induzierten Wachstumsänderungen.....	62
6.2.9	Toleranz niedriger Trastuzumabkonzentrationen	63
7	DISKUSSION	65
7.1	Resistenzbildung nach chronischer Behandlung von SKBR3 Zellen mit Trastuzumab.	65
7.2	Trastuzumab sensibilisiert SKBR3 Zellen gegenüber Opioiden.....	66
7.3	Die gleichzeitige Verabreichung von U69,593 sensibilisiert die SKBR3 Zellen gegenüber Trastuzumab.....	66
7.4	c-Src, PTEN und p27kip1 stellen keine Resistenzmarker für Trastuzumab dar.	67
7.5	Interaktionen zwischen Opioid- und Rezeptor-Tyrosinkinase-Rezeptoren.	67
7.5.1	Möglichkeiten der Interaktion der beiden Rezeptorsysteme in SKBR3-TU Zellen.	68
7.5.1.1	MAP- und Akt-Kinase.....	68
7.5.1.2	c-Src vermittelte Interaktionen	68
7.5.1.2.1	Direkte Interaktion über c-Src.....	68
7.5.1.2.2	Interaktion auf Ebene der Clathrin-vermittelten Rezeptorinternalisierung	68
7.5.1.2.3	Interaktion durch Regulation von c-Cbl	69
7.6	Vergleich von SKBR3-TU mit SKBR3-T und SKBR3-U Zellen	71
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	72

9	SUMMARY	73
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
11	ANHANG	80
11.1	Abbildungsverzeichnis.....	80
11.2	Abkürzungsverzeichnis.....	81
12	DANKSAGUNG.....	83

2 EINLEITUNG

Ein geordnetes Zusammenspiel aller Zellen und deren geregeltes Wachstum, programmierter Tod und Erneuern sichern das Überleben und die Gesunderhaltung eines mehrzelligen Organismus. Das Wachstum und die Apoptose der Zellen werden vor allem über Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie die HER-Rezeptoren (HER1-4) reguliert, welche durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Eine Störung dieses Gleichgewichts von Wachsen und Sterben einer Zelle in einem Organismus führt zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit zur Tumorbildung. So ist dies unter anderem bei humanen SKBR3 Mammakarzinomzellen der Fall, welche den HER2-Rezeptor vermehrt aufweisen. Diese Art von Tumoren, die auch als HER2-positiv bezeichnet werden und ca. 20% aller an Brustkrebs erkrankten Menschen betreffen [1], gelten als besonders maligne. Denn sie gehen mit einer sehr niedrigen und kurzen Überlebensrate für die Patienten einher [1, 2]. In den letzten Jahren konnten erfolgversprechende zielgerichtete Behandlungsstrategien entwickelt werden, die eine Blockade der HER2-Rezeptoren bewirken und somit das Wachstum der Tumoren hemmen. Einen solchen Ansatzpunkt stellt zum Beispiel der monoklonale Antikörper gegen HER2, Trastuzumab (Herceptin®), dar. So vielversprechend dieser Ansatz auch ist, so sprechen doch nur 26% aller Patienten auf Trastuzumab als Monotherapie und 40-60% auf eine Kombination von Trastuzumab mit anderen Chemotherapeutika an [3]. Alle anderen Formen von Brustkrebs weisen primäre Resistenzen gegen diesen Wirkstoff auf. Aber auch HER2-positive Zellen können im Verlauf einer Therapie sehr schnell eine sekundäre Resistenz ausbilden [3]. Ein vornehmliches Ziel in der klinischen Pharmakologie ist es der Ausbildung sekundärer Resistenzen während einer Tumorthherapie entgegenzuwirken. Hierbei können Opiode einen wichtigen Beitrag leisten. Opioidrezeptoren werden von einer Reihe von Karzinomzellen exprimiert und greifen über nicht-kanonische Signalwege in die Wachstumsregulation ein. Sie besitzen in der Tat einen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion des HER-Rezeptor-Netzwerks [4]. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer längerfristigen Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Opioiden auf das Zellwachstum, die Wirksamkeit von HER2-basierten Therapiestrategien und die Ausbildung einer sekundären Resistenz dagegen untersucht werden.

3 LITERATURÜBERSICHT

3.1 Opioide und Opioidrezeptoren

Opioide sind seit der Antike bekannt für ihre schmerzstillende und euphorisierende Wirkung. So gewannen schon die alten Römer, Griechen und Ägypter den Milchsafte aus unreifen, grünen Samenkapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum*). Das Opium enthält 40 verschiedene Alkaloide, unter anderem Morphin und Codein und wurde für medizinische und kultische Zwecke eingesetzt. Heute kommt den Opioiden als potentesten uns zur Verfügung stehenden Analgetika zur Linderung starker Schmerzen vor allem in der Tumorschmerztherapie sowie in der Narkoseprämedikation eine große Bedeutung zu. Aufgrund ihres Abhängigkeitspotentials erfordert der Einsatz von Opioiden jedoch eine gründliche Nutzen-Risiko-Abwägung [5].

3.1.1 Definition

Bei Opioiden handelt es sich um „Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an die Opioid-Rezeptoren entfalten und durch Naloxon spezifisch antagonisiert werden“ [6]. Sie lassen sich anhand der Stärke ihrer intrinsischen Aktivität, die sie am Rezeptor entfalten, einteilen in volle Agonisten, partielle Agonisten und Antagonisten sowie in endogene, das heißt natürlicherweise im Körper vorkommende, und dem Körper exogen zugeführte Opioide.

3.1.2 Einteilung der Opioidrezeptoren

Alle Opioide entfalten ihre Wirkung an Opioidrezeptoren (OR). Diese werden in allen Geweben epithelialen Ursprungs exprimiert, wie den Nerven-, Immun-, Herzmuskel- und einigen Karzinomzellen [7]. Momentan sind drei verschiedene OR-Typen bekannt: der δ -OR (DOR, erstmals am Vas deferens der Maus entdeckt), der κ -OR (KOR, benannt nach seiner hohen Affinität für Ketocyclazocine) und der μ -OR (MOR, hohe Affinität für Morphin), die sich alle noch weiter in verschiedene Subtypen untergliedern lassen [8-10]. So können pharmakologisch δ_1 , und δ_2 [11, 12], κ_{1a} , κ_{1b} , κ_2 und κ_3 [13–15] sowie μ_1 , μ_2 und μ_3 differenziert werden [16, 17].

DOR, KOR und MOR unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verteilung in unterschiedlichen Geweben, ihrer Selektivität gegenüber verschiedenen Liganden und der durch sie vermittelten Wirkungen [18, 19]. Generell können alle Opioide an alle drei Rezeptortypen binden, weisen können dabei aber deutliche Präferenzen für einen speziellen Rezeptor auf. Opioidrezeptoren können auch Homo- bzw. Heterooligomere bilden, was ihre Affinität gegenüber selektiver Agonisten und teilweise auch ihre Signalwege beeinflusst [20-23].

3.1.3 Aufbau und Struktur der Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren sind membranständige Rezeptoren, die zur größten Familie der Oberflächenrezeptoren, nämlich den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören [24, 25]. Es handelt sich um heptahelikale Transmembranproteine. Das bedeutet, sie bestehen aus sieben in die Zellmembran eingebetteten Transmembrandomänen, die über jeweils drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind und einen extrazellulären Amino (N)- sowie einen intrazellulären Carboxyl (C)-Terminus besitzen [26]. Dabei fungieren die extrazellulären Schleifen als Ligandenbindungsdomäne, die intrazellulären als G-Protein-bindende Einheit. Die drei Rezeptortypen δ , κ , μ (DOR, KOR, MOR) unterscheiden sich nur in ihrer Aminosäuresequenz, vorzugsweise in den extrazellulären Schleifen und im N- und C-Terminus voneinander, wohingegen die Transmembrandomänen zu 70% identisch sind [27].

3.1.4 G-Protein-vermittelte Signaltransduktion

Guaninnukleotid-bindende-Proteine (G-Proteine) sind an der zytosolischen Seite der GPCRs lokalisiert und gliedern sich in eine α -, β - und γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand sind alle drei Untereinheiten miteinander vereinigt, weshalb sie auch als heterotrimere Proteine bezeichnet werden [28]. Dabei ist GDP an die α -Untereinheit gebunden. Infolge einer Agonist-induzierten Konformationsänderung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors, koppelt das heterotrimere G-Protein an den GPCR und das GDP wird durch GTP ausgetauscht [29]. Daraufhin dissoziieren sowohl das $\beta\gamma$ -Dimer als auch die aktivierte α -Untereinheit ab, können an Effektorproteine binden und so intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen [30]. Anschließend wird GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wieder zu

GDP hydrolysiert, was dazu führt, dass das G-Protein eine erneute Konformationsänderung erfährt. In Folge dieser reassoziert die $\beta\gamma$ -Untereinheit mit der GDP-gebundenen α -Untereinheit. Das G-Protein liegt nun wieder in einer für den inaktiven Rezeptor hochaffinen Konformation vor und kann erneut aktiviert werden. Aufgrund der Fähigkeit eines GPCRs bis zu 10 G-Proteine gleichzeitig zu aktivieren, fungieren G-Proteine nicht nur als Integratoren verschiedener extrazellulärer Signale, sondern auch als Signalverstärker [31]. Man unterscheidet mehrere Familien an G-Proteinen [32]. Sie werden unter anderem nach der Fähigkeit ihrer α -Untereinheit die Adenylylcyclase zu regulieren eingeteilt in hemmende (α_i) und stimulierende (α_s) G-Proteine [29]. Opioidrezeptoren binden vorzugsweise inhibitorische G-Proteine, können in Immunzellen aber auch Gq/11-Proteine regulieren [27, 33].

3.1.5 Signaltransduktion über Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren können ihre Signale entweder über G-Protein-abhängige, oder auch über G-Protein-unabhängige, sogenannte nicht-kanonische Wege, vermitteln [34]. Ein schematischer Überblick ist in Abbildung 3-1: Opioidrezeptor-vermittelte Signalwege dargestellt.

Zu den G-Protein-abhängigen Mechanismen werden die Schließung spannungsabhängiger Calciumkanäle [35], die Öffnung von Kaliumkanälen und die Signalweiterleitung über Adenylylcyclasen gezählt [36].

Über G-Protein-unabhängige Signalwege können Opioide unter anderem die extrazelluläre Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (Erk 1/2), die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und die Proteinkinase B (PKB, Akt) regulieren [34, 37].

3.1.5.1 Adenylylcyclase

Die Regulation der Adenylylcyclase (Adenylatzyklase) stellt einen der bedeutendsten Signalwege G-Protein-gekoppelter Rezeptoren dar. Über die Bildung des sekundären Botenstoffs (second messenger) cAMP können vielfältige zelluläre Mechanismen kontrolliert werden. Adenylylcyclasen gehören zur Gruppe der Lyasen, also der molekülsplattendenden Proteine, von denen beim Säuger derzeit 10 Isoenzyme bekannt sind (AC I–X) [36].

Strukturell bestehen die in die Zellmembran eingebetteten Adenylylcyclasen aus zwei transmembranen Domänen mit je sechs alpha-Helices sowie zwei im Zytoplasma lokalisierten Cyclase-(Homologie)-Domänen. Durch Bindung der GTP-gekoppelten, aktivierten α -Untereinheit eines Gs-Proteins an die Adenylylcyclase erfährt diese eine Konformationsänderung und setzt Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) um. cAMP kann dann entweder direkt als Botenstoff wirken oder indirekt über Aktivierung anderer Proteine wie z.B. der Proteinkinase A (PKA). Der Abbau von cAMP erfolgt über Phosphodiesterasen [37].

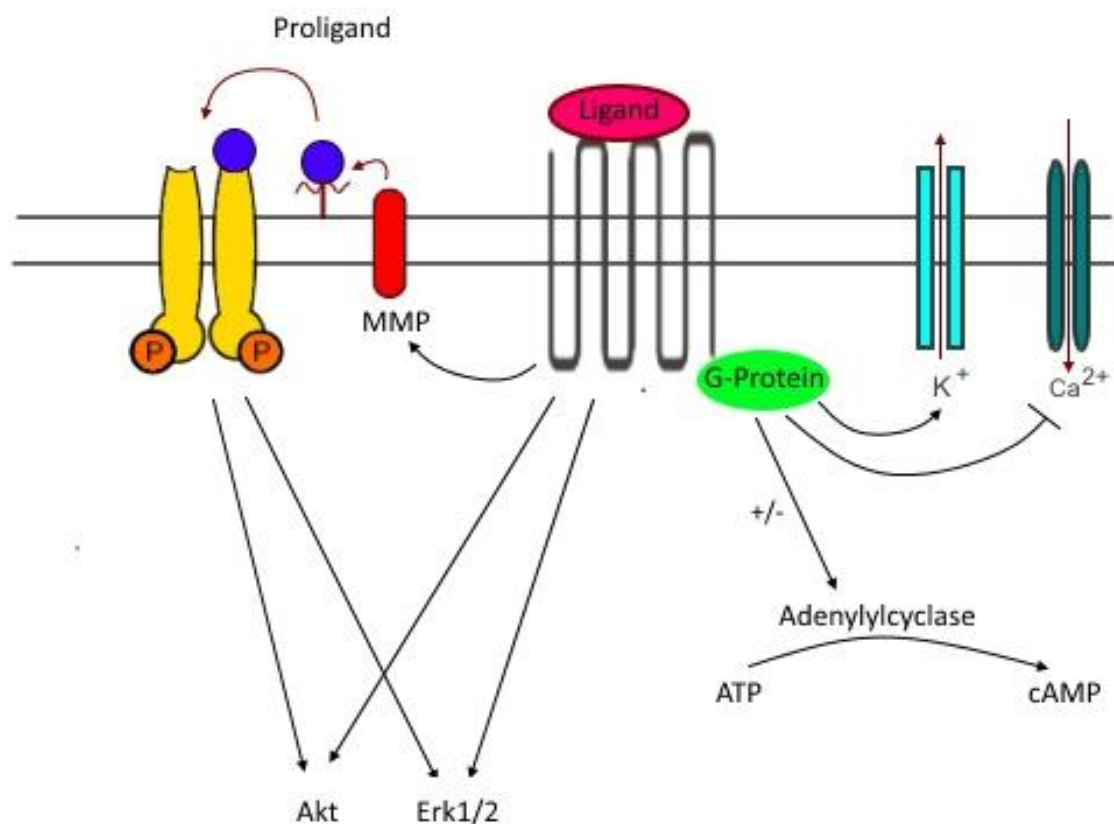


Abbildung 3-1: Opioidrezeptor-vermittelte Signalwege

Die Abbildung zeigt sowohl G-Protein-abhängige Signalwege der Opioidrezeptoren über Kalium- und Calciumkanäle sowie die Hemmung der Adenylylcyclase, als auch G-Protein-unabhängige Signalwege: Die Aktivierung der Akt und Erk1/2 sowie die Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen über Matrixmetalloproteasen (MMPs).

In neuronalen Zellen führt die Aktivierung von Opioidrezeptoren über inhibitorische G-Proteine zu einer Hemmung der Adenylylcyclasen vom Typ I, V und VI und damit verbundenen zu einem Abfall der intrazellulären cAMP Konzentration [38]. Im Gegensatz dazu können Opioidrezeptoragonisten in nicht-neuronalen Zellen über freigesetzte β -

Untereinheiten Adenylylcyclasen vom Typ II und IV aktivieren und damit die cAMP-Produktion steigern [38].

3.1.6 Desensibilisierung und Toleranz der Opioidrezeptoren

Die längerfristige Behandlung mit Opioiden führt zur Desensibilisierung der Opioidrezeptoren und zur Ausbildung von Toleranz [39]. Das Ausmaß der Rezeptordesensibilisierung ist abhängig vom Rezeptor-Typ und von Dauer, Konzentration und intrinsischer Aktivität der einwirkenden Agonisten. Die Desensibilisierung geht meist mit einer Abnahme der Zahl der Rezeptoren einher und ist grundsätzlich reversibel [40]. Dieser als Rezeptor-Internalisierung bezeichnete Prozess läuft folgendermaßen ab: β -Arrestin bindet an den durch Aktivierung phosphorylierten Rezeptor. Dort bedingt es, nachdem der Rezeptor von seinem G-Protein abgekoppelt wurde, dessen Transport in kleine Ausstülpungen der Zellmembran, die sogenannten „clathrin-coated-pits“. Diese schnüren sich mit Hilfe von Dynamin ab und reifen im Zytosol zu Endosomen heran [41-44]. Hierin wird der Rezeptor von seinem noch gebundenen Liganden getrennt, wieder dephosphoryliert und recycelt. Diesen Vorgang nennt man Resensibilisierung [45]. Im Falle einer länger andauernden oder sehr starken Aktivierung der Rezeptoren werden diese jedoch nicht recycelt, sondern über Endolysosomen degradiert. Es kommt zur Rezeptor-Downregulation [46]. Infolgedessen fällt die Zellantwort auf einen Opioidrezeptoragonisten deutlich geringer aus oder unterbleibt gänzlich. Dieses Phänomen trägt zur Ausbildung von Toleranz bei [34].

3.2 HER-Rezeptoren

3.2.1 Vorkommen

HER-Rezeptoren, auch ErbB-Rezeptoren genannt, sind Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die in nahezu allen Geweben vorkommen [47] und bei der Differenzierung von Zellen, z.B. während der Embryonalentwicklung, eine herausragende Bedeutung haben [48]. Es sind vier verschiedene HER-Rezeptoren beschrieben: HER1, der auch als HER1/neu, HER-1, ErbB1 oder EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) bezeichnet wird [49], HER2 (ErbB-2,

HER-2, HER2/neu) [50, 51], HER3 (ErbB-3, HER-3, HER3/neu) [52] und HER4 (ErbB-4, HER-4, HER4/neu) [53]. Bei einigen Tumorarten werden sie überexprimiert und tragen zum klonalen Wachstum bei. So liegt zum Beispiel der HER1 bei 40% [54] und HER3 bei 20% [55] aller Brustkrebspatientinnen in erhöhter Menge vor. Die Überexpression des HER2, wie sie bei 25 – 30% aller Mammakarzinome vorkommt [56], gilt als Zeichen für eine besonders aggressive Art von Brustkrebs. Denn sie führt zu einem schnelleren Voranschreiten der Erkrankung in Verbindung mit einer erhöhten Metastasierungsrate und Proliferation und somit letztendlich zu einer schlechteren Prognose für den Patienten [57].

3.2.2 Aufbau und Struktur

HER-Rezeptoren sind transmembranäre Glykoproteine mit Tyrosinkinaseaktivität. Sie bestehen aus einer extrazellulären Liganden-bindenden-Domäne (4 Subdomänen), einem signalübertragenden Transmembran-Segment und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Untereinheit [47]. Dabei stellen HER1 und HER4 vollständige Rezeptoren dar, da sie sowohl eine Ligandenbindungsstelle, als auch eine Tyrosinkinasefunktion besitzen. HER2 hingegen verfügt lediglich über die Tyrosinkinase-Domäne, ihm fehlt die Liganden-bindende-Untereinheit; bei HER3 verhält es sich umgekehrt [56]. Er bindet Liganden, hat aber keine Kinaseaktivität.

3.2.3 Liganden

Für die einzelnen Rezeptoren sind folgende endogene Liganden bekannt:

An HER1 binden: Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor- α (TGF- α), Epiregulin (ER), Amphiregulin (AR), Betacellulin (BTC) und der Heparin-bindende EGF-like growth factor (HB-EGF). Ein endogener Ligand für HER2 wurde bisher noch nicht entdeckt. HER3 bindet Heregulin-1 und Heregulin-2 (Hrg-1 und Hrg-2). Für HER4 fungieren die Hereguline 1-4 (Neureguline) als Liganden, ebenso wie Epiregulin (ER), Betacellulin (BTC) und der Heparin-bindende EGF-like growth factor (HB-EGF). Abbildung 3-2: HER Rezeptoren und ihre endogenen Liganden.

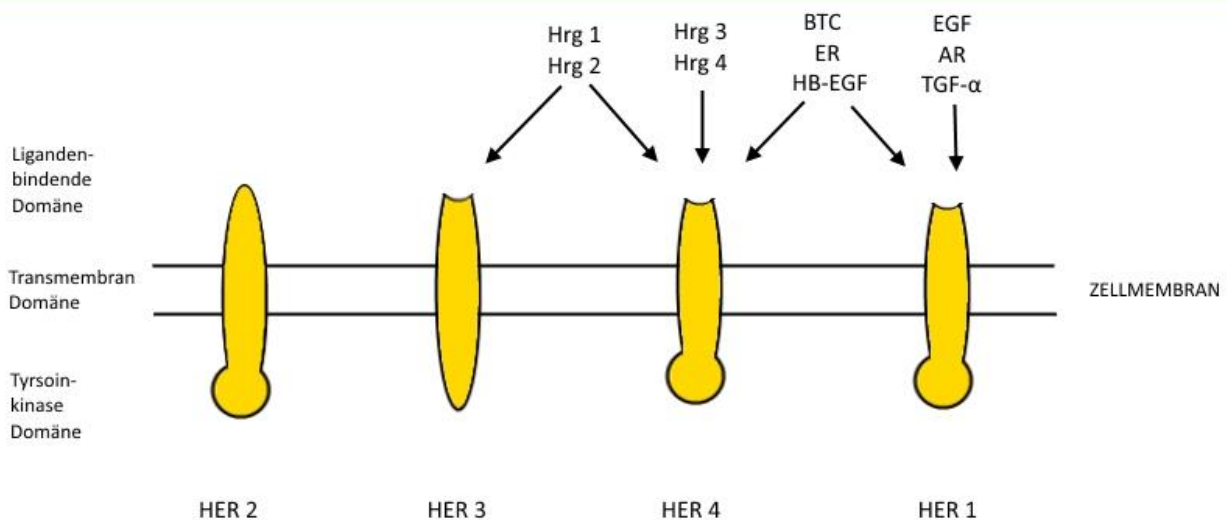


Abbildung 3-2: HER Rezeptoren und ihre endogenen Liganden.

Die Abbildung zeigt die drei Domänen der HER-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen: Die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne, welche alle HER-Rezeptoren besitzen mit Ausnahme von HER2, die Transmembran-Domäne und die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne, die dem HER3 fehlt. Zudem sind die Liganden der einzelnen HER-Rezeptoren dargestellt: Heregulin (Hrg) 1 und 2 binden an HER3 und HER 4. Heregulin (Hrg) 3 und 4 stellen spezifische Liganden für HER4 dar. Betacellulin (BTC), Epiregulin (ER) und der Heparin-bindende EGF-like growth factor (HB-EGF) koppeln sowohl an HER4 als auch HER1. Epidermal growth factor (EGF), Amphiregulin (AR) und Transforming-growth-factor- α (TGF- α) aktivieren spezifisch HER1.

3.2.4 Aktivierung

Durch die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne ändert der Rezeptor seine Konformation und bildet Homo- und Heterodimere mit anderen HER-Rezeptoren [47]. Dadurch werden die Rezeptoren aktiviert und es kommt zur Autophosphorylierung bzw. zur kreuzweisen Phosphorylierung, woraufhin Wachstumssignale über die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne ins Zellinnere weitergeleitet werden [48, 58]. Daraufhin laufen vor allem zwei Signalkaskaden ab: der PI3K/Akt- und der MAP-Kinase-Signalweg.

Heterodimere Rezeptoren besitzen eine deutlich stärkere Signalaktivität und somit höheres mitogenes Potential als Homodimere [48]. Dabei verfügen HER2/HER3-Dimere über eine besonders hohe Aktivität [59-62]. HER2 stellt einen bevorzugten Dimerisierungspartner für alle anderen HER-Rezeptoren dar [63]. Zudem zeichnen sich HER2-enthaltende Komplexe durch eine verstärkte Ligandenbindung, effektivere Signalweiterleitung und eine

verminderte Rezeptor-Herabregulation aus [47, 64-66]. Die Aktivierung von HER-Rezeptoren wird in Abbildung 3-3 schematisch dargestellt.

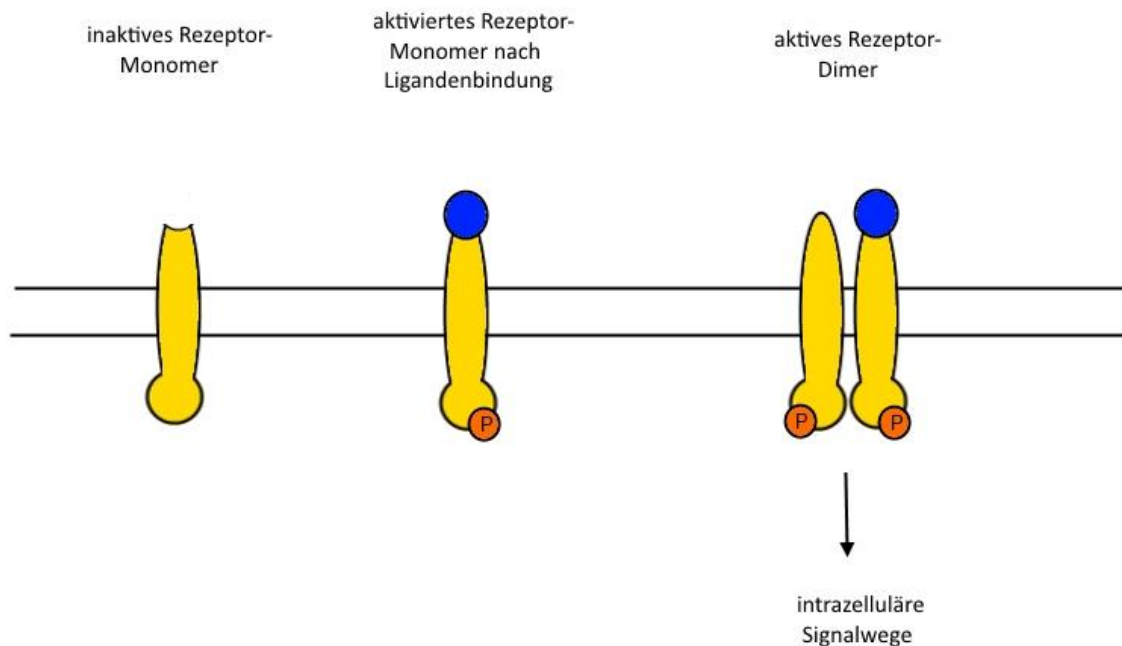


Abbildung 3-3: Aktivierung von HER-Rezeptoren.

Durch Bindung eines passenden Liganden (im Bild als blau gefüllter Kreis dargestellt) wird ein inaktives HER-Rezeptor-Monomer phosphoryliert; durch Dimerisierung werden HER-Rezeptoren in den vollständig aktiven Zustand versetzt und leiten intrazelluläre Signalwege ein.

3.2.5 Induzierte Signalwege

Wachstumsfaktorrezeptoren regeln das Zellwachstum über verschiedene proliferations- und differenzierungsfördernde sowie anti-apoptotische Signalwege. Tumorzellen weisen durch Überproduktion von Liganden, Rezeptoren oder konstitutiv aktivierte Rezeptormutanten oftmals eine gesteigerte Aktivität dieser Signalwege auf, die ein beschleunigtes Wachstum bedingt [67-69].

Die Spezifität und Stärke der über HER-Rezeptoren vermittelten intrazellulären Signalkaskaden wird durch die beteiligten Rezeptoren, die Zusammensetzung der Rezeptoroligomere und die jeweiligen Liganden bestimmt [48]. Dabei entscheidet das Phosphorylierungsmuster individueller Rezeptor-Tyrosinkinasen darüber, welcher Signalweg eingeschlagen wird [70, 71].

Die drei am besten charakterisierten HER-vermittelten Signalwege sind: der Ras/Raf/MAPK-, der PI3K/Akt- und der PLC/PKC-Weg [72, 73]. Der Akt- und MAPK-Signalweg werden in Abbildung 3-1 schematisch abgebildet.

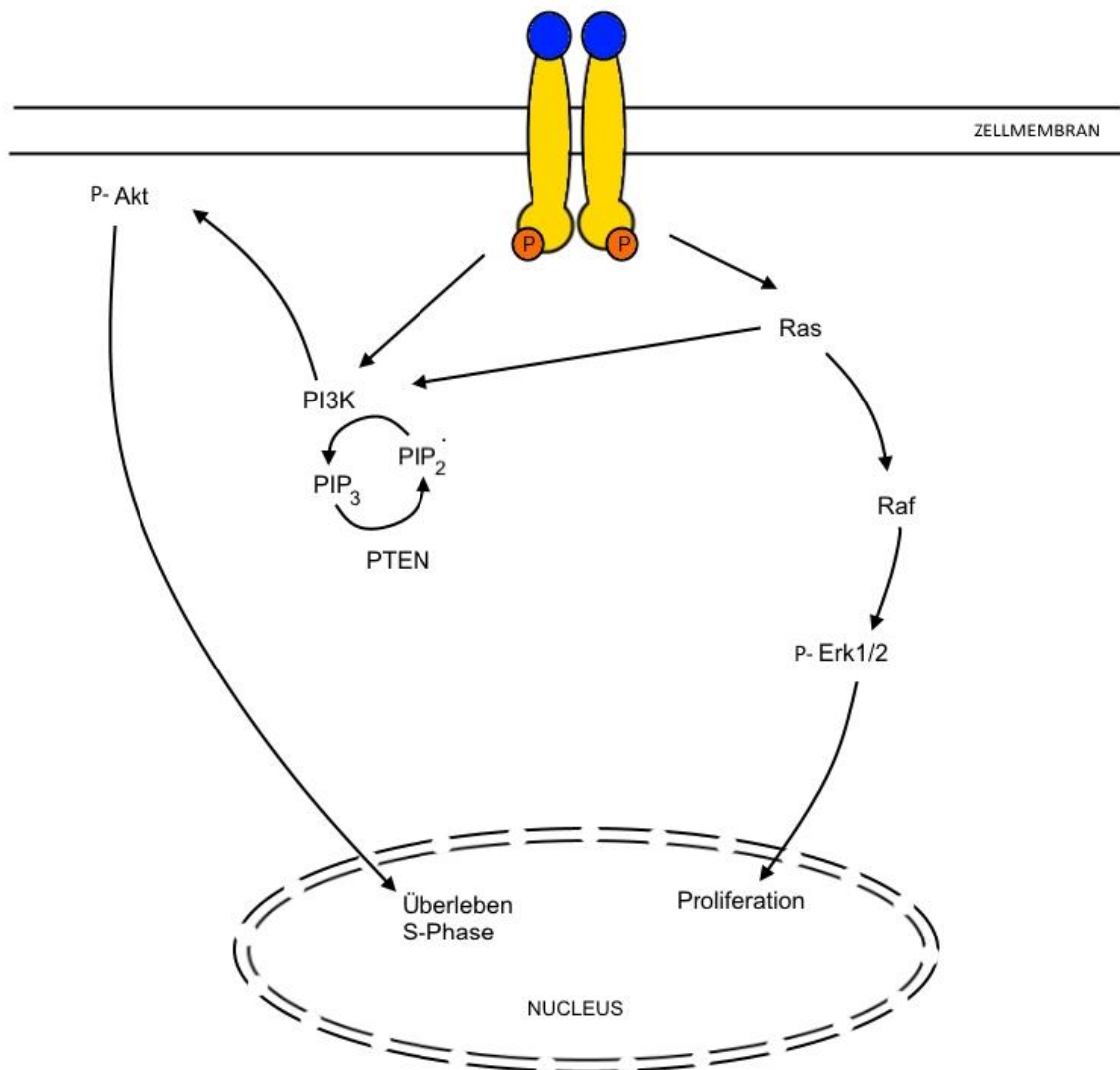


Abbildung 3-4: HER-vermittelte Signalwege.

Nach Ligandenbindung und damit einhergehender Phosphorylierung der HER-Rezeptoren können vor allem zwei Signalwege aktiviert werden: der Ras/Raf/MAPK-Signalweg, der zur Phosphorylierung des proliferationsfördernden Erk1/2-Weges führt und der PI3K/Akt-Signalweg, über welchen die Apoptose gehemmt und somit das Überleben gesteigert wird. PI3K wird entweder direkt durch HER3,4-Rezeptoren oder indirekt über Ras aktiviert und setzt PIP₂ zu PIP₃ um, das die Akt phosphoryliert. PTEN ist ein Gegenspieler zu PI3K und dephosphoryliert PIP₃. Es wirkt so der Akt-Aktivierung entgegen.

3.2.5.1 *MAP-Kinase-Signalweg*

Es gibt eine ganze Reihe unterschiedlicher Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK): die p38-Mitogen-aktivierte Kinase, die Jun-N-terminale-Kinase (JNK) und die extrazellulär-Signal-regulierte Kinase 1 und 2 (Erk 1/2) [73]. Die beiden ersten werden auch als stressinduzierte Proteinkinasen bezeichnet und sind vor allem bei Entzündungsvorgängen des Körpers beteiligt, während die Erk1/2 eine bedeutende Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielt. Sie liegt bei vielen Tumoren in einem hyperaktiven Zustand vor und bedingt eine schnellere Zellteilung, ein gesteigertes Wachstum und einen verminderten Zelltod.

Der MAPK-Signalweg kann durch alle HER-Rezeptoren und alle HER-Rezeptor-Liganden aktiviert werden. Über eine Reihe verschiedener Adapterproteine kommt es zu einer Guaninnukleotid-vermittelten Aktivierung von Ras, welches daraufhin die Raf-Kinase (eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase) aktiviert. Dies löst eine Kaskade sich selbst aktivierender MAP-Kinasen aus, bis schließlich durch die MAP-Kinase-Kinase (MAPKK oder MEK) die extrazellulär Signal-regulierte Kinase Erk1/2 phosphoryliert wird. Erk 1/2 überträgt nun Phosphatgruppen auf verschiedene zytoplasmatische und zytoskelettale Proteine. Zudem erfährt sie eine Translokation in den Zellkern. Hier aktiviert sie über Transkriptionsfaktoren proliferationssteigernde Gene und vermittelt so verstärktes Zellwachstum [47].

3.2.5.2 *Akt-Signaltransduktion*

Die Akt, auch Proteinkinase B (PKB), ist eine Serin-Threonin-Kinase, die ebenfalls häufig in Tumorzellen überexprimiert vorliegt. Durch Hemmung proapoptotischer Proteine wirkt sie dem programmierten Zelltod entgegen und steigert so das Überleben der Zellen [74]. Ihre Aktivierung erfolgt über PI3K und fällt abhängig von der Konstellation des jeweiligen Rezeptordimers unterschiedlich stark aus: Während HER1 und HER2 die PI3K indirekt über Adapterproteine binden, koppeln HER3 und HER4 direkt an die regulatorische p85-Untereinheit der PI3K [75].

Einen alternativen Weg stellt die Aktivierung von PI3K über Ras dar.

PI3K phosphoryliert den second messenger Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃), woraufhin die Akt an die Zellmembran rekrutiert und dort phosphoryliert wird. Anschließend vermittelt die PKB ihr Signal an Effektoren im Zytoplasma und wird in den Zellkern (Nucleus) transloziert, wo sie

verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst: So bewirkt sie unter anderem eine verminderte Expression eines Hemmstoffs der Cyclin-abhängigen Kinase, p27kip1, die mehr Zellen in die Synthesephase des Zellzyklus eintreten lässt. Außerdem vermittelt sie eine erhöhte Expression des Cyclin D1 und über die Aktivierung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) eine gesteigerte Proteintranslation, die der Induktion der Apoptose entgegenwirkt. Die Bedeutung der Akt in der Tumorigenese zeigt sich darin, dass das Phosphatase-und-Tensin-Homologon (PTEN) – das PIP₃ dephosphoryliert – in Tumorzellen häufig inaktiv ist [76].

3.2.6 Beendigung des HER-Rezeptor-vermittelten Signals

3.2.6.1 *Clathrin-vermittelte Internalisierung*

HER-Rezeptoren werden ebenfalls wie die G-Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren über Clathrin-vermittelte Mechanismen von der Zelloberfläche entfernt. Auffällig ist dabei, dass HER1/HER1-Homodimere größtenteils über Lysosomen degradiert werden [64, 77], wohingegen HER3-Rezeptoren im Wesentlichen recycelt werden [78]. Heterodimerisierung mit HER2 vermindert die Endozytose und steigert das Recycling der Bindungspartner [79, 80].

3.2.6.2 *c-Cbl-vermittelte Internalisierung*

Einen weiteren Mechanismus der Deaktivierung stellt die Ubiquitinierung der Rezeptoren durch c-Cbl dar. Über diese werden bevorzugt HER1/HER1-Homodimere und in geringerem Maße auch HER2/HER1-Heterodimere einer lysosomalen Degradation zugeführt [81-84]. Im Gegensatz dazu interagieren HER3 und HER4 nicht mit c-Cbl [83].

C-Cbl (cellular Casitas B-lineage Lymphoma) ist eine hochkonservierte, zytoplasmatische E3 Ubiquitin Ligase, die in allen Geweben exprimiert wird. Sie ist an der Regulation verschiedener Signalproteine, unter anderem der Rezeptor-Tyrosinkinasen, beteiligt, indem sie diese von der Zellmembran entfernt und so deren Signaltransduktion unterbricht [83]. Strukturell besteht c-Cbl aus einer N-terminalen Tyrosinkinase-bindenden Domäne (TKB bzw. PTB, Phosphotyrosinbinding Domain), einer Zink-bindenden RING Finger Domäne, einer prolinreichen Region und einer C-terminalen Ubiquitin-assoziierten Domäne. Dies ist

zusammen mit dem hohen Gehalt an Tyrosin und Serin ein typischer Aufbau für ein Adapterprotein.

Vor allem durch die Aktivierung des HER1- und in geringerem Maße auch des HER2-Rezeptors wird c-Cbl an die Zellmembran rekrutiert, bindet mit seiner PTB-Domäne an die Rezeptoren und vermittelt die Ubiquitination über den RING Finger, welcher das Ubiquitin überträgt [83, 85, 86]. Dadurch wird der aktivierte, ubiquitinierte Rezeptorkomplex in Clathrin-coated pits internalisiert, die letztendlich zu Endosomen heranreifen [83]. So verpackt werden sie von c-Cbl und einigen Verbindungsproteinen entlang von Aktin- und Tubulinstrukturen ins Zytosol verlagert [87-89]. Dort werden die internalisierten Rezeptoren entweder recycelt oder aber lysosomal degradiert [83, 87].

Ein anderer Mechanismus der c-Cbl vermittelten Internalisierung und Degradation von Rezeptor-Tyrosinkinasen läuft nicht über eine Ubiquitinierung, sondern über die direkte Bindung von c-Cbl an das Adapter-Protein CIN85, welches über Endophiline für die Invagination der Zellmembran zuständig ist [83].

Da einige Tumorzellen Mechanismen entwickeln, die c-Cbl hemmen, wird es als Resistenzmarker bezeichnet. Insbesondere sind eine Dephosphorylierung und damit einhergehende Deaktivierung des c-Cbl durch SHP1, eine Degradation nach Ubiquitinierung durch die E3-Ligase AIP4, eine Maskierung der Bindungsstelle am Rezeptor, ein niedriger Phosphorylierungsstatus des Rezeptors oder eine Entfernung des c-Cbl durch andere Proteine vom Rezeptor beschrieben [90].

3.3 Trastuzumab

3.3.1 Aufbau

Trastuzumab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des HER2 gerichtet ist. Er wird in Form des zugelassenen Arzneimittels Herceptin® häufig als adjuvante Therapie zu Chemotherapeutika eingesetzt, wenn mittels Immunhistochemie das Vorliegen eines HER2-überexprimierenden Mammakarzinoms, also ein HER2-positiver Tumor, festgestellt wurde. Obwohl Vogel et al. Trastuzumab als gut geeignetes Monotherapeutikum bei metastasierendem HER2-positiven Brustkrebs

beschreiben [91], wird es heute meist nur noch in Kombination mit Zytostatika wie z.B. Doxorubicin eingesetzt. In dieser Kombination führt es zu deutlich gesteigerten Überlebensraten und tumorfreien Intervallen bei den Patientinnen [92].

3.3.2 Wirkmechanismen

Zur Wirkungsweise von Trastuzumab werden verschiedene Mechanismen beschrieben und diskutiert: Als erstes sind Internalisierung und Degradierung und letztendlich die Herunterregulation des HER2-Rezeptors durch die Einwirkung des Trastuzumab zu nennen [93]. Auch hemmt es den PI3K/Akt-Signalweg durch Aktivierung des Phosphatase und Tensin Homologons (PTEN) [94]. Ebenso verhindert Trastuzumab über eine Inhibition der Metalloproteasen die proteolytische Spaltung der extrazellulären 185 kDa schweren Untereinheit des HER2-Rezeptors und damit die Entstehung eines dauerhaft aktivierten p95-Fragments des Rezeptors [95]. Des Weiteren wird ein direkter Einfluss auf den Zellzyklus beschrieben, indem der Antikörper einen G1-Arrest über die Hochregulation des Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Inhibitors p27kip1 induziert [96]. Einen wichtigen Aspekt der Trastuzumabwirkung stellen auch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) [97, 98] sowie eine Hemmung der Angiogenese [99] dar.

Über all diese Mechanismen wirkt Trastuzumab antiproliferativ und proapoptotisch [100].

3.3.3 Resistenzmechanismen

Leider besitzen ca. 30 - 50% der Patientinnen mit HER2-positivem Brustkrebs eine Resistenz gegen Trastuzumab *de novo* oder entwickeln eine sekundäre Resistenz während der Therapie [101]. Die zugrunde liegenden Mechanismen können vielfältig sein und sind immer noch Gegenstand aktueller Forschung. Hier soll nun in aller Kürze ein Überblick über die Wichtigsten gegeben werden. Resistenzverursachende Veränderungen können auf Ebene der Rezeptoren auftreten wie z. B. die vermehrte Bildung von HER1/HER1-Homo- sowie von HER1/HER3-Heterodimeren [102], die kompensatorische Überexpression des Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1)-Rezeptors [103, 104] sowie die Bildung von Heterotrimeren aus HER2, HER3 und IGF-1 [105], die Maskierung des HER2-Rezeptors durch das

membranständige Glykoprotein Mucin 4 (MUC4) [106, 107] oder die Entstehung eines daueraktivierten p95HER2 Fragments. Außerdem lassen sich Modulationen der Signalwege finden. Beispielhaft hierfür sind der Funktionsverlust von PTEN [94], ein konstitutiv aktivierter PI3K/Akt-Signalweg [101, 108, 109], die Herunterregulation des p27kip1 [110] sowie eine gesteigerte Aktivierung der zytosolischen Tyrosinkinase c-Src (cellulär Sarcoma) [1, 3].

3.3.4 Anwendungsbestimmungen beim Einsatz von Herceptin® zur Therapie von Brustkrebs

Herceptin® ist zugelassen für die Behandlung von Frauen mit HER2-positivem Brustkrebs. Es wird nach vorausgegangener Exzision des Tumors oder bei metastasierendem Brustkrebs als adjuvante Therapie in Kombination mit oder nach einer Chemotherapie angewandt [111, 112]. Vogel et al. empfehlen den Antikörper sogar als Monotherapie [91]. Die Verabreichung erfolgt intravenös oder subkutan wahlweise in wöchentlichem oder dreiwöchigem Abstand. Die Behandlung erstreckt sich in der Regel über ein Jahr.

3.3.5 Nebenwirkungen

Als Nebenwirkungen werden eine reversible Herzinsuffizienz, Muskel-, Gelenk- und Kopfschmerzen, Schwäche und gastrointestinale Symptome beobachtet [113].

3.3.6 Weitere Möglichkeiten der Tumorthherapie

Additiv und alternativ zur Trastuzumab-basierten Therapie von Brustkrebs kommen die großflächige Exzision des tumorös veränderten Gewebes, Strahlen-, Chemo-, Hormontherapien und andere zielgerichtete Tumorthapien zum Einsatz. Dazu gehören die Blockade von Östrogenrezeptoren mit Tamoxifen und die Blockade der Tyrosinkinasedomäne von HER1 und HER2 durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib (Tyverb®, Tykerb®) [114].

3.4 IGF-1-Rezeptor (Insulin-like-growth-factor Rezeptor 1)

Der Insulin-like-growth-factor Rezeptor 1 (IGF-1 Rezeptor, IGF1-R) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die den IGF-1-Faktor (Insulin-like-growth factor 1, auch bekannt als Somatomedin C) und mit niedriger Affinität auch Insulin sowie den IGF-2-Faktor bindet. Er wird als „Insulin-like“-growth factor bezeichnet, weil er dem Insulin sowohl in seiner Struktur, als auch in seiner Funktion ähnelt [115]. Strukturell stellt der Rezeptor ein Tetramer, bestehend aus zwei α - und zwei β -Ketten, dar. Dabei bilden die α -Ketten die ligandenbindende Domäne, wohingegen die β -Ketten als Tyrosinkinasedomäne fungieren (vgl. Abbildung 3-5). Nach Liganden-induzierter Aktivierung und Phosphorylierung des Rezeptors phosphoryliert dieser unterschiedliche Substrate, vor allem das Insulin-Rezeptor-Substrat 1 und 2 (IRS1/2), und trägt dadurch zur Regulation von Zellwachstum und Apoptose bei [116, 117]. Dies geschieht hauptsächlich über zwei Signalwege:

Durch die Phosphorylierung von IRS1/2 wird die regulatorische Untereinheit von PI3K und somit der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, was zu einer gesteigerten Proteinsynthese und verminderten Apoptose führt. Zudem bedingt IRS1 über den Ras/Raf/MAPK-Signalweg ein verstärktes Zellwachstum [118]. Der aktivierte Rezeptor und die durch ihn eingeleiteten Signalwege sind in Abbildung 3-6 schematisch dargestellt. Natürlicherweise ist der IGF-1-Rezeptor in fast allen Geweben zu finden; bei einigen Tumoren liegt er überexprimiert vor.

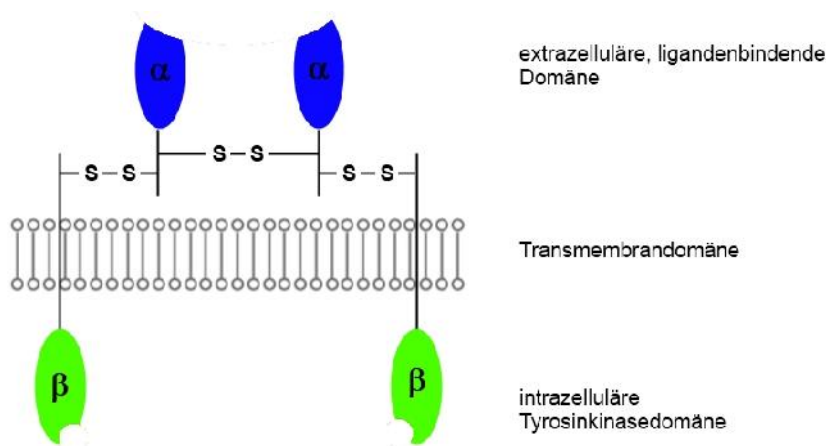


Abbildung 3-5: IGF-1-Rezeptor im inaktiven Zustand.

Der Insulin-like-growth-factor (IGF-1)-Rezeptor besteht aus zwei extrazellulären, ligandenbindenden α -Ketten, einer Transmembrandomäne und zwei intrazellulären β -Ketten, die als Tyrosinkinasedomäne fungieren.

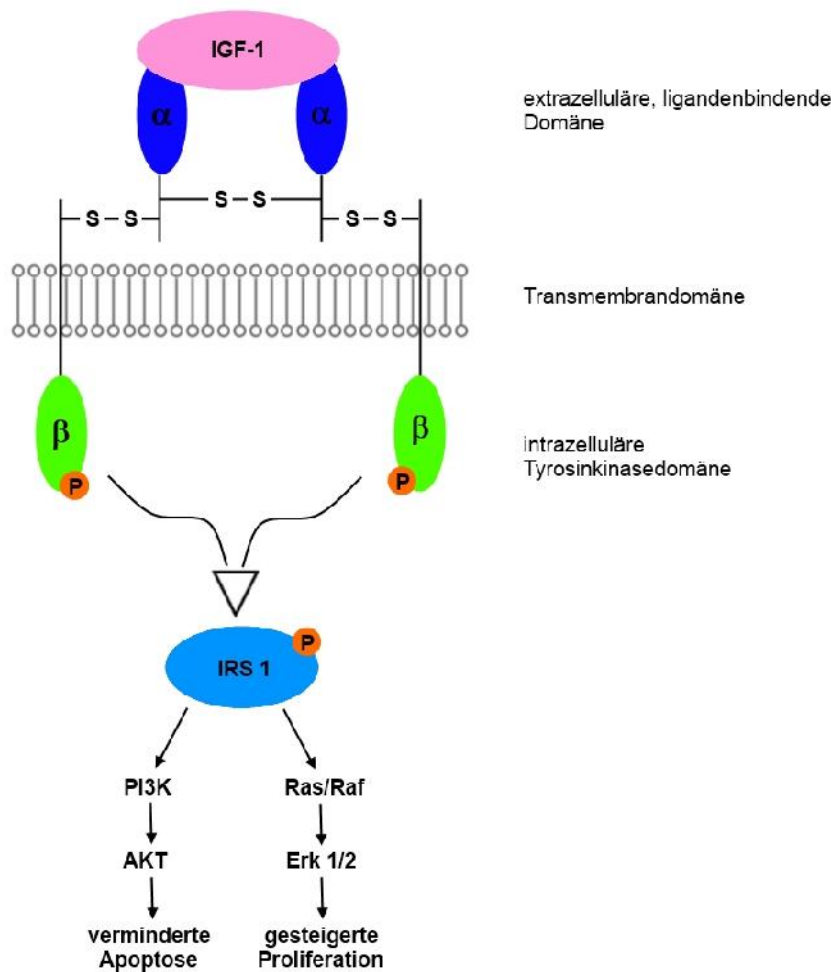


Abbildung 3-6: Aktivierter IGF-1-Rezeptor nach Ligandenbindung.

Durch Bindung eines Liganden, i.d.R. des Insulin-like-growth-factor 1 (IGF-1), kommt es zur Phosphorylierung der Tyrosinkinasedomäne. Daraufhin aktiviert der IGF-1-Rezeptor die Insulin-Rezeptor-Substrate 1 und 2 (IRS1 und 2) und induziert dadurch über den PI3K/Akt-Signalweg eine verminderte Apoptose bzw. über den Ras/Raf/Erk1/2-Signalweg eine gesteigerte Proliferation.

3.5 Möglichkeiten der Interaktion der beiden Rezeptorsysteme: gemeinsame Signalwege

3.5.1 c-Src

c-Src gehört zur Familie der zytosolischen, nicht Rezeptor-gebundenen Tyrosinkinasen [87] und wird in allen Geweben exprimiert [119]. Strukturell besteht sie aus einem myristoylierten N-terminalen Rest zur Verankerung in der Zellmembran, der unique Domain, die sich zwischen allen Src-Familienmitgliedern unterscheidet, der SH2 (Src homology 2) und

SH3 Domäne, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, einem regulatorischen Linker und der katalytisch aktiven SH1 Domäne am C-Terminus [119, 120]. Nach Phosphorylierung von Tyrosin 527 kommt es über dessen Bindung an SH2 zu einer Konformationsänderung verbunden mit Inaktivierung und Herunterregulierung von c-Src. Durch Autophosphorylierung von Tyrosin 416 bindet dieses an SH3, wodurch c-Src in seine aktivierte Konformation versetzt wird [121]. Normalerweise liegt c-Src in einem inaktiven Zustand in der Zelle vor [122] und wird durch Rekrutierung an Proteine in Zellmembranen aktiviert, wo es Signale über Multiprotein Komplexe weitergibt [86].

C-Src zeigt unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen. An die Zytoplasmamembran rekrutiert ist es an mitogenen Signalen durch RTKs und GPCRs beteiligt sowie an der Adhäsion und Migration der Zellen und dem Zell-zu-Zell-Kontakt. An der Membran von Zellorganellen wie Endosomen, Golgi-Apparat und mikrotubulären Strukturen und an der Membran des Zellkerns hat es Einfluss auf die Regulation und den Transport in endosomalen Membranen, die Modifikation von Proteinen und den Zellzyklus [122].

c-Src kann sowohl durch RTKs, als auch direkt durch GPCRs aktiviert werden [86, 123]. Es stellt daher ein mögliches Verbindungsglied zwischen beiden Rezeptorsystemen dar. Seine Aktivierung führt in jedem Fall zur Stimulation der Proliferation und zur Hemmung der Apoptose durch Aktivierung des PI3K/Akt- und MAP-Kinase-Signalwegs [3, 120, 124-126].

In einigen Trastuzumab-resistenten Tumorzellen wurde zudem ein positiver Feedbackmechanismus zwischen c-Src und HER1, HER2 und HER3 nachgewiesen [1]. Außerdem tritt eine Überexpression von c-Src häufig zusammen mit einer Herabregulation von PTEN auf, die durch eine gegenseitige Inaktivierung vermittelt wird [1].

In einigen Tumorarten wird c-Src in erhöhtem Maße exprimiert oder aktiviert. Dies führt aufgrund seiner Beteiligung an der Regulation des Zytoskeletts und der Mitogenese zu einem verstärkten Tumorwachstum [127].

Des Weiteren kann eine gesteigerte c-Src-Aktivität in Tumorzellen die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Epithelzellen und somit die Zellmigration fördern [128].

3.5.2 MAP-Kinase

Opioidrezeptoren können genau wie Rezeptor-Tyrosinkinasen die Erk1/2 aktivieren. Dies geschieht entweder über eine indirekte Aktivierung von c-Src, welche die HER-Rezeptoren phosphoryliert, oder über eine Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen (MMPs). MMPs wie z.B. die Cleaved Caspase setzen die Vorläuferproteine von HER-Rezeptorliganden aus der Zellmembran frei und führen so zu einem positiven Feedback-Mechanismus [129, 130] (vgl. Abbildung 3-7).

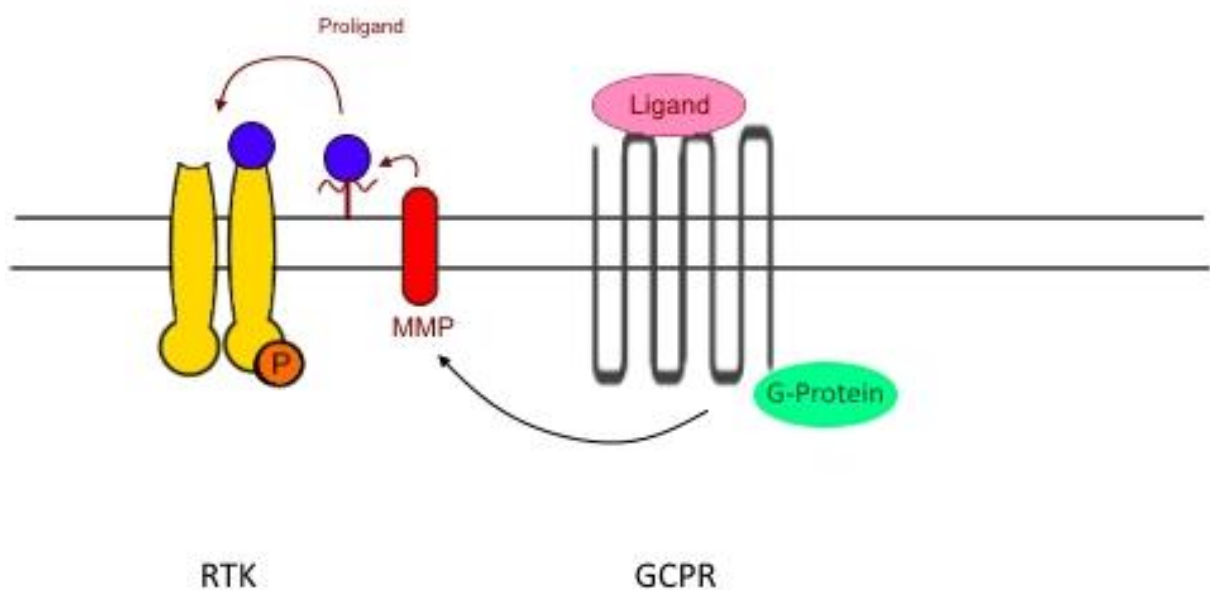


Abbildung 3-7: Transaktivierung von HER-Rezeptoren über MMP.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wie z.B. Opioidrezeptoren können nach Agonistenbindung über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie z.B. HER-Rezeptoren transaktivieren, indem sie Vorstufen von HER-Liganden (Proligand) aus der Zellmembran freisetzen, welche dann an HER-Rezeptoren binden.

Im Signaling des IGF-1-Rezeptor sind die Aktivierung der Erk1/2 sowie der Akt ebenfalls fester Bestandteil. Außerdem wurde über die Bildung von HER2/HER3/IGF-1-Heterotrimeren bei Mammakarzinomzellen berichtet [105]

3.5.3 Akt

Auch der PI3K/Akt-Signalweg wird von HER- und Opioid-Rezeptoren genutzt und kann somit eine Interaktionsmöglichkeit beider Rezeptorsysteme darstellen. Dabei wird sowohl eine direkte Aktivierung der PI3K durch die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine nach Stimulation durch Opioide, als auch eine indirekte über Transaktivierung von RTKs beschrieben [131].

3.5.4 Internalisierung über Clathrin

Beide Rezeptorarten können über Clathrin-vermittelte Mechanismen internalisiert werden, wodurch eine Interaktion auch auf dieser Ebene denkbar ist [33, 132].

3.6 SKBR3 Zellen

Bei SKBR3 Zellen handelt sich um epitheliale, hyperploide Tumorzellen, die als besonderes Merkmal den HER2-Rezeptor überexprimieren und zudem κ -Opioidrezeptoren enthalten [133]. Sie wurden 1970 aus der Pleuralflüssigkeit einer 43-jährigen Frau mit mammärem Adenokarzinom isoliert.

4 FRAGESTELLUNG

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von HER2-überexprimierenden Zellen mit Opioiden zu einer Hemmung des Zellwachstums führt. Nun stellte sich die Frage, ob diese Wachstumshemmung durch eine kombinierte Behandlung mit Opioiden und einem gegen HER2 gerichteten Antikörper verstärkt würde und welche Veränderungen dabei auf Rezeptor- und Signalebene auftreten würden. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine langfristige Opioidbehandlung die Resistenz gegenüber Trastuzumab verhindern könnte. Zu diesem Zweck wurden SKBR3 Zellen, die HER2-Rezeptoren verstärkt exprimieren und zudem über κ -Opioidrezeptoren verfügen, über 6 Monate mit dem κ -Agonisten U69,593 und dem HER2-Antikörper Trastuzumab behandelt. Anschließend wurden sie hinsichtlich ihres Phänotyps und Wachstumsverhaltens, der Regulation ihrer Rezeptor-Tyrosinkinasen und Opioidrezeptoren sowie der assoziierten Signalmechanismen und typischer Marker für eine Trastuzumab-Resistenz charakterisiert. Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit Ursprungszellen (SKBR3-wt) und lediglich mit Trastuzumab oder U69,593 behandelten Zellen (SKBR3-T und SKBR3-U) verglichen.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec 2540 EL	Biomedis Laborservice GmbH; Gießen
Brutschrank Heraeus BB6220	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Brutschrank Heraeus Function Line BB16	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Chemilumineszenz- und Fluoreszenzsystem Fusion SL4 400. WL Viber Lourmat	Peqlab VWR International GmbH; Erlangen
Eismaschine AF 100	Scotsman ICE Systems Frimont S.P.A.; Mailand, Italien
ELISA-Reader Tecan spectra	Tecan Group Ltd.; Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop ZEISS LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Flüssigkeitsabsaugsystem BVC01	Vacuubrand GmbH & Co. KG; Wertheim
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH); Burgwedel
Gelelektrophoresekammer- und Semi-dry Blot, Power supply 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Gelgießstand und Elektrophoresesystem Mini Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Mikroskop Labovort	Leitz; Wetzlar
pH-Meter WTW ph522	Wissenschaftl.-techn. Werkstätten; Weilheim
Photometer Genesys 10S UV-Vis Spectrometer	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Pipette Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt
Pipetten 1-10, 10-100, 100-1000, 500-5000 µl	Eppendorf AG; Hamburg
Rüttelplatte Mini Rocking Platform	Biometra GmbH; Göttingen
Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
Schüttler TPM-2	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Scintillationsmesssystem LS 6500	Beckmann-Coulter; Krefeld
Semi-dry Blotter Multiphor II	Pharmacia LKB; Uppsala, Schweden

Sterilbank Laminar Flow. Modell 6.12 S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen
Sterilisator UL50	Memmert GmbH & Co. KG; Schwabach
Stickstoffbehälter Cryogenie GT40 IATA-BVT N°1039/147	Air Liquide Kryotechnik GmbH; Düsseldorf
Thermomixer compact	Eppendorf AG; Hamburg
Ultraschall Processor Vibra Cell™	Sonics & Materials Inc.; Danbury, USA
Vakuumpumpe VNC1	Vacuubrand GmbH & Co. KG; Wertheim
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG; Zürich, Schweiz
Vortex Heidolph REAX 2000	Heidolph instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
Waage Mettler Feinwaage H54AR/9	Mettler Toledo GmbH; Gießen
Waage Sartorius excellence E200D	Sartorius GmbH; Göttingen
Wasserbad 3047	Köttermann Labortechnik; Ketze-Hänigsen
Wasserbad Julabo 20 B	Helmut Saur; Reutlingen
Zellhomogenisator Kinematica® 8/EU 9452	Bachofer; Reutlingen
Zentrifuge 1306	Hettich; Tuttlingen
Zentrifuge Micro Rapid/K	Andreas Hettich GmbH & Co. DG; Tuttlingen
Zentrifuge Minifuge	Heraeus Holding GmbH; Hanau
Zentrifuge Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Deckgläser 24x 32 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Einmalküvetten Halbmikro PS 1,6 ml	Kuhnle GmbH; Karlsruhe
Electrode Paper Novablot (PKG/500) Filterpapier für Semi-Blotting	GE Healthcare Bio-Science AB; Uppsala, Schweden
ELISA-Platte Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp	Nunc A/S; Roskilde, Dänemark
Filterpipettenspitzen MultiGuard™ Barrier Tips 1-10/10-100/100-1000 µl	Sorenson BioScience, Inc.; Salt Lake City, USA

Immobilon™ PVDF Membran (Immobilon-P Transfer membrane 0,45 µm)	Merck GmbH; Schwalbach
Mikroglasfilterpapier (Glass-Mikrofibre Discs grade MGB)	Muntkell & Filtrak GmbH; Bärenstein
Objektträger 76 x 26 mm	Gerhard Menzel GmbH; Braunschweig
Parafilm „M“® Laboratory film	Pechiney Plastic Packaging; Chicago, IL., USA
Pipettenspitzen 1-10/10-100/100-1000 µl	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindling-Arnhofen
Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Schraubtube 1,5/2 ml (APEX® Screw-Cap Micorcentrifugation Tubes)	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindling-Arnhofen
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindling-Arnhofen
Vakuum Filtrationssysteme 150 ml	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zählubes Minis®	Zinsser Analytic GmbH; Frankfurt am Main
Zellkultur Schalen Ø 60/100 mm	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zellkultur Testplatten 6/12/24/96	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen mit Vent Schraubkappen 25/75 cm ²	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zentrifugen Röhrchen PP 15/50 ml	TPP®; Trasadingen, Schweiz

5.1.3 Zellen, Zellkulturmedien und Additive

Produkt	Abkürzung	Hersteller
DMEM		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Epidermal Growth Factor (rec EGF human)	EGF	Bachem AG; Bubendorf, Schweiz
Enrofloxacin		ICN Biomedicals Inc; Ohio USA
Fötales Kälberserum	FKS	PAA Laboratories GmbH; Cölbe
Forskolin	For	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Heregulin-β1 (rhNRG-1-β/HRG-β1, Extracellular domain, recombinant human, 377-HB)	Heregulin	R&D Systems; Minneapolis, USA
3-Isobutyl-1-Methylxanthin	IBMX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Insulin-like-Growth factor I human	IGF-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
L-Glutamin	Glut	PAN Biotech GmbH; Aidenbach

McCoy's 5a Medium Modified	McCoy's 5a	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Norbinaltorphimin	NorBNI	ATCC; Manassas USA
Trastuzumab	Trast.	Roche Pharma AG; Grenzach-Wyhlen
Trypsin-EDTA	Trypsin	PAN Biotech GmbH; Aidenbach
U69,593	U69	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
U50,488	U50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen

5.1.4 Chemikalien und Lösungen

Produkt	Abkürzung	Hersteller
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Bovines Serumalbumin	BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Bromphenolblau (3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfonephthalein)		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Citronensäure		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Complete Protease Inhibitor Mix	Complete	Roche Pharma AG; Grenzach-Wyhlen
p-Cumarsäure		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Dithiothreitol	DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck GmbH; Schwalbach
H ³ -Diprenorphin		Perkin Elmer; Hamburg
ε-Aminocapronsäure	EACA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Essigsäureanhydrid	EAH	Sigma Chemical co., St. Louis, USA
Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-	EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH;

N,N,N',N'-Tetraessigsäure)		Taufkirchen
Folin-Ciocalteus's Phenol Reagenz	Folin-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Formaldehyd 37%	CH ₂ O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Glycerin ROTIPURAN®		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Glycin		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Etansulfonsäure)	HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck GmbH; Schwalbach
Kalium-Natrium-Tartrat		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Kupfer-II-sulfat x 5 H ₂ O	CuSO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat reinst	KH ₂ PO ₄	E. Merck, Darmstadt
Luminol (3-Aminophtalhydrazid)		Fluka (Teil der Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen)
Poly-L-Lysin Hydrobromid 70000-15000		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Kristallviolett	KV	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Methanol	MeOH	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumcarbonat	NaCO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumdeoxycholat		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	E. Merck; Darmstadt
Phalloidin Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	TRICT-Phalloidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Polyethylenglycol 6000	PEG	Merck GmbH; Schwalbach
Roti®-Block ready to use 10x Konzentrat	Roti®-Block	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Gebrauchsfertige, gasstabilisierte,	Rotiphorese® Gel	Carl Roth GmbH Co.KG; Karlsruhe

wässrige 30% Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1		
Salzsäure rauchend, 37%	HCL	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Sodiumdeoxycholate		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat	SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin	TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Tetramethylbenzamidin	TMB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
TRIS Ultra Qualität (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Triton® X-100 reinst	Triton®	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Trypanblau 0,4%		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Tween® 20	Tween	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Urea		Merck GmbH; Schwalbach
Vectashield® Mounting Medium for fluorescence		Vector Laboratories, Inc.; California, USA
Wasserstoffperoxid 30%	H ₂ O ₂	Merck GmbH; Schwalbach

5.1.5 Antikörper

5.1.5.1 Primäre Antikörper

Zielantigen	Antikörper	Spezies	Molekulargewicht
HER1	EGF Receptor (D38B1) XP (R)	Kaninchen	175 kDa
HER2	HER2/ErbB2 (29D8) Rabbit mAb	Kaninchen	185 kDa
HER3	HER3/ErbB3 (1B2E) Rabbit mAb	Kaninchen	185 kDa
IGF-1	IGF-I Receptor beta Rabbit Ab	Kaninchen	95 kDa
Akt	Akt (pan) (40D4) Mouse mAb	Maus	60 kDa
Erk1/2	P44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	Kaninchen	42/44 kDa
c-Src	Src (32G6) Rabbit mAb	Kaninchen	60 kDa

Phospho-c-Src	Phospho-Src (Tyr 527) Antibody Rabbit mAb	Kaninchen	60 kDa
c-Cbl	c-Cbl (D4E10) Rabbit mAb	Kaninchen	120 kDa
PTEN	PTEN (D4.3) XP (R) Rabbit mAb	Kaninchen	55 kDa
Phospho-PTEN	P-PTEN (S380/T382/383) (44A7) Rabbit mAb	Kaninchen	54 kDa
P27kip1	p27kip1 (D37H1)mAb	Kaninchen	27 kDa
β -Tubulin	Beta-Tubulin Rabbit Ab	Kaninchen	55 kDa
cAMP	Rabbit-anti-cAMP	Kaninchen	0,3 kDa

Abgesehen vom Antikörper Rabbit-anti-cAMP, welcher am Institut hergestellt vorhanden war, wurden alle anderen primären Antikörper von Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main bezogen. Für Western Blot Experimente wurden diese Antikörper 1:2.000 in TBS/T verdünnt und mit 0,02% BSA stabilisiert.

5.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Mouse IgG HRP Conjugate 1mg/ml (W402B 20373203)	Promega; Madison USA
Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate 1mg/ml (W401B 29303402)	Promega; Madison USA
Goat-anti-Rabbit IgG	Eigene Herstellung

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur, chronische Behandlung mit Herceptin® und U69,593

Sämtliche Zellkultivierungsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow.

SKBR3 Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Sie wurden in Flaschen mit 75 cm² Bodenfläche und Ventilationsschraubdeckel in McCoy's 5a Medium, dem 10% hitzeinaktiviertes FKS (fötales Kälberserum), 100 IU/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamin und 0,33% Enrofloxacin zugesetzt wurden, in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die Zellen wurden im Abstand von 7 – 10 Tagen, wenn sie zu mehr als 80% konfluent waren, im Verhältnis 1:3 und 1:2 gesplittet. Für die Versuche zur cAMP-Akkumulation, die Gewinnung von Proben für den Western Blot bzw. den Nachweis des Wachstums im KV-Test wurden sie auf 24- bzw. 12-Well-Platten ausgesät. Die Anzucht auf Cover Slips

erfolgte in Platten mit sechs Vertiefungen. Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen wurde das Medium abgesaugt, zwei Mal mit 37°C-warmem PBS (Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA für 1 – 2 Minuten im Brutschrank inkubiert. Sobald sich alle Zellen abgelöst hatten, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in neue Flaschen verteilt.

Die Trastuzumab-resistente Zelllinie SKBR3-T wurde durch chronische Behandlung über sechs Monate mit 20 µg/ml affinitätsgereinigtem Herceptin® [133] erzeugt. SKBR3-U Zellen wurden über den gleichen Zeitraum mit 20 µg/ml U69,593 behandelt. SKBR3-TU Zellen wurden in Gegenwart von 20 µg/ml Herceptin® und 1µM U69,593 kultiviert.

PBS:

140 mM	NaCl
3 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	Aqua bidest.; auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert

5.2.2 Einfrieren der Zellen

Über den gesamten Behandlungszeitraum wurden in regelmäßigen Abständen Rückstellproben verschiedener Passagen eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer 75 cm²-Kulturflasche, wenn sie sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, 2 Mal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend für ca. 2 min mit 2 ml Trypsin-EDTA bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml vollständigem Kulturmedium gestoppt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 300 x g bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in 2 vorgekühlte einfriergeeignete Eppendorfgefäße mit Schraubverschluss aliquotiert, die sofort reguliert auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei – 196°C gelagert wurden.

Einfriermedium:

20%	FKS
10%	DMSO (Dimethylsulfoxid)
100 IU/ml	Penicillin
0,1 mg/ml	Streptomycin
4 mM	L-Glutamin
0,33%	Enrofloxacin
	McCoy's 5a Medium

5.2.3 Auftauen der Zellen

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigem Stickstoff genommen und langsam in 10 ml eiskaltem McCoy's 5a Medium resuspendiert. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 300 x g und 4°C wurden sie in eine 75 cm² Kulturflasche mit 20 ml vorgewärmtem Medium (37°C) überführt und im Brutschrank inkubiert.

5.2.4 Zellzählung

Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz, wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und für 10 min bei 300 x g und 4° C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml warmem vollständigem Kulturmedium sorgfältig resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt.

5.3 KV-Test

Das Wachstum der verschiedenen Zelllinien wurde mit dem KV-Test (Kristallviolett-Test) bestimmt. Mit der Substanz Kristallviolett werden Zellkerne angefärbt. Die Intensität der Farbe ist dabei direkt proportional zur Zelldichte. Es wurde folgendermaßen vorgegangen: 10⁵ bzw. 5 x 10⁴ Zellen wurden in 12- und 24-Well-Platten mit vollständigem Kulturmedium

ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und anschließend ein Wechsel auf serumfreies Medium (McCoy's 5a, mit L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Enrofloxacin und 0,1% FKS). Anschließend wurden die Zellen für weitere drei Tage im CO₂-Inkubator kultiviert. Während der gesamten Zeit waren Pharmaka nach folgendem Schema zugegeben (Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2):

	1	2	3	4
A	SKBR3-wt -	SKBR3-T +T	SKBR3-TU +T + U69	SKBR3-U + U69
B	SKBR3-wt -	SKBR3-T -	SKBR3-TU -	SKBR3-U -
C	SKBR3-wt +T	SKBR3-T +T	SKBR3-TU +T	SKBR3-U +T

Abbildung 5-1: Belegung einer 12-Well-Zellkulturplatte.

Die vier verschiedenen Zelllinien (SKBR3-wt, SKBR3-T, SKBR3-TU, SKBR3-U) wurden für 3 Tage entweder ohne (-) oder mit Trastuzumab (T) und U69,593 (U69) inkubiert.

	1	2	3	4	5	6
A	SKBR3-wt -	SKBR3-T -	SKBR3-TU -	SKBR3-U -		
B	SKBR3-wt +T	SKBR3-T +T	SKBR3-TU +T	SKBR3-U +T		
C	SKBR3-wt +T +U69	SKBR3-T +T +U69	SKBR3-TU +T +U69	SKBR3-U +T +U69		
D	SKBR3-wt +U69	SKBR3-T +U69	SKBR3-TU +U69	SKBR3-U +U69		

Abbildung 5-2: Belegung einer 24-Well-Platte:

Die vier verschiedenen Zelllinien wurden wie dargestellt entweder ohne Pharmaka (-), mit Trastuzumab (T) oder U69,593 (U69) für 3 Tage kultiviert.

Zum Färben der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt, 2 Mal mit 250 µl PBS gewaschen, anschließend mit 250 µl Kristallviolett für 20 Minuten gefärbt und erneut 5 – 6 Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 250 – 1250 µl 0,1 M Zitronensäure für zwei Stunden auf dem Rüttler aufgelöst. Jeweils 100 µl der Überstände wurden in 96-Well-Platten pipettiert und nach eventueller Vorverdünnung die Extinktion bei $\lambda=492$ nm gemessen.

Erstellung einer Sterbekurve

Durch die Erstellung einer Sterbekurve lässt sich die Sensitivität der Zelllinien gegen unterschiedliche Konzentrationen von Trastuzumab feststellen. Dazu wurden 5×10^4 Zellen/Vertiefung in serumhaltigem Medium auf 24-Well-Platten ausgesät. Nach 4 Stunden erfolgte der Wechsel auf serumfreies McCoy's 5a Medium, dem ansteigende Konzentrationen an Trastuzumab (0,15 bis 1,25 µg/ml) zugesetzt waren (Abbildung 5-3). 5 Tage später wurde wie oben beschrieben ein KV-Test durchgeführt. Zur prozentualen Auswertung der Zellzahl wurde die gemessene Extinktion jeweils auf die Kontrolle der jeweiligen Zelllinie normalisiert. Alle Experimente erfolgten in mindestens 3 unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmung ausgeführt wurden.

	0	0,156	0,313	0,625	1,25	µg/ml Trastuzumab
SKBR3-wt						
SKBR3-T						
SKBR3-TU						
SKBR3-U						

Abbildung 5-3: Plattenbelegung bei der Sterbekurve.

Die vier Zelllinien (SKBR3-wt, SKBR3-T, SKBR3-TU, SKBR3-U) wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Trastuzumab von 0 – 1,25 µg/ml für 5 Tage kultiviert.

5.4 Proteinbestimmung nach Lowry

Es handelt sich um eine von Oliver Howe Lowry (1910 – 1996) entwickelte Methode zur Bestimmung des Proteingehalts von Lösungen [134].

Prinzip: In alkalischer Lösung bilden die in Proteinen enthaltenen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex. Dabei wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Diese reduzierten Cu^+ -Ionen reduzieren daraufhin ihrerseits das Folin-Phenol-Reagenz zu Molybdänblau. Dessen Intensität wird bei $\lambda=550$ nm im Photometer gemessen und anhand einer vorher mit definierten Proteingehalten erstellten Standardkurve der Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelt.

Reagenzien:

Zur Herstellung des Lowry A Reagenz wurden Sodiumdodecylsulfat (10% SDS), Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat (CTC), Natriumhydroxid (0,8 M NaOH) in Aqua bidest. zu gleichen Teilen gemischt. Lowry B setzt sich aus Folin-Phenol-Reagenz und Aqua bidest. im Verhältnis 1:6 zusammen.

CTC:

4 mM	Kupfersulfat x 5 H ₂ O
7 mM	Kalium-Natrium-Tartrat
940 mM	Natriumcarbonat
	Aqua bidest.

Tris-MgCl₂-Puffer (TM-Puffer):

50 mM	Tris
5 mM	MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)
	Aqua bidest., pH eingestellt auf 7,4

Vorgehen:

Zuerst wurde durch Verdünnen einer BSA-Lösung (bovines Serumalbumin; 100 µg/ml) mit Aqua bidest. eine Standardkurve über 0; 2,5; 5; 7,5 und 10 µg Protein/100 µl erstellt. Danach wurden die in TM-Puffer aufgenommenen Membranpräparationen von SKBR3-wt, SKBR3-T, SKBR3-TU, SKBR3-U (Verfahren der Membranpräparation in 5.5 beschrieben) auf Eis angetaut, 5 µl von jeder Probe entnommen und jeweils in Doppelbestimmung 1:40 mit Aqua bidest. verdünnt. Sowohl zu den Standards als auch zu 100 µl der Proben wurden je 400 µl Lowry A pipettiert, gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf erfolgte die Zugabe von jeweils 200 µl Lowry B, ein erneutes Mischen und eine Inkubation von 30 Minuten. Anschließend wurden die Proben in Einmalküvetten überführt und die Extinktion bei $\lambda=550$ nm gemessen. Anhand der erstellten Standardkurve konnte der Proteingehalt der Proben ermittelt werden.

5.5 Radioligandenbindung

Mittels Radioligandenbindung wurde die κ -Opioidrezeptorendichte auf der Zelloberfläche ermittelt. Hierfür wurden Zellmembranen hergestellt und mit radioaktiv markierten und nicht markierten Liganden inkubiert.

Zellernte:

Von allen vier Zelllinien wurden jeweils drei 75 cm²-Zellkulturflaschen mit einer Zelldichte von mehr als 80% zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Bodenfläche abgelöst, in 15 ml PBS aufgenommen und bei 4° C bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde nach Verwerfen des Überstands bei – 80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Membranpräparation:

Zum Zweck der Radioligandenbindung wurden die geernteten Zellen (SKBR3-wt, -T, -TU, -U) in jeweils 10 ml Homogenisierungspuffer (HB) aufgenommen, durch 10-sekündiges Ultrathoraxen zerstört und intakte Zellen bzw. Zellkerne bei 4°C und 300 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Die jetzt zusammen mit Zytoplasmabestandteilen im Überstand befindlichen Doppellipid-Zellmembranen wurden für 30 Minuten bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde anschließend in 1 ml des mit dem Protease-Hemmer Complete™

versetzten TM-Puffer aufgenommen. Die im TM-Puffer enthaltenen Magnesiumionen stabilisieren den hochaffinen Rezeptorzustand. Die gesamten Membranpräparation wurde stets auf Eis durchgeführt, um eine enzymatisch bedingte Proteolyse zu vermeiden.

Homogenisierungspuffer (HB -Puffer):

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

Bindung:

Durch Zugabe eines nicht-selektiven radioaktiv markierten Opioidantagonisten (Diprenorphin) werden alle Opioidbindungsstellen an den Zellmembranen abgesättigt. Die spezifische Bindung an κ-Opioidrezeptoren wird in Anwesenheit eines Überschusses von U50,488 bestimmt, einem selektiven Agonisten an κ_{1,2}-Opioidrezeptoren. Nach Einstellung eines Gleichgewichts kann aus der emittierten Strahlung des radioaktiv markierten Liganden die spezifische Bindung (B_0) nach folgender Formel berechnet werden:

$$B_0 = B_{\text{total}} - B_{\text{unspezifisch}}$$

Dabei handelt es sich bei B_{total} um die Bindung von triziiertem Diprenorphin in Abwesenheit von U50,488 und bei $B_{\text{unspezifisch}}$ um die Bindung von triziiertem Diprenorphin in Anwesenheit von U50,488.

Jeder Reaktionsversuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei enthielten die Reaktionsgefäße in 200 µl Gesamtvolumen insgesamt 160 µl Membransuspension in TM-Puffer und 20 µl des radioaktiv markierten Liganden. Dazu wurden 20 µl U50,488 (10^{-6} M) bzw. 20 µl TM-Puffer gegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben bei Raumtemperatur bis zum Einstellen eines Äquilibrium für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mittels Zugabe von eiskaltem TM-Puffer über Glasfaserfilter abgetrennt, bei denen vorher durch 15-minütige Inkubation in 0,1%iger Polyethylenglycol (PEG) – Lösung alle Bindungsstellen abgesättigt worden waren. Das Abwaschen der ungebundenen Liganden erfolgte durch mehrmaliges Spülen mit einer Vakuum Filtrationseinheit. Anschließend wurden die an die Filter gebundenen Membranen in ein

Zählfläschchen überführt und zusammen mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit bis zur Messung über Nacht geschüttelt.

Bestimmung der Rezeptorendichte (B_{\max}):

Die Rezeptorendichte (B_{\max}) kann bei einer Einzelmessung nach der Formel von DeBlasi [135] aus der spezifischen Bindung (B_0), der Radioligandenkonzentration (L) und der Dissoziationskonstante des Radioliganden (K_d) folgendermaßen ermittelt werden:

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

B_{\max} = maximale Bindung

B_0 = spezifische Bindung bei L

L = Konzentration des Radioliganden

K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

Über die dazugehörige Proteinbestimmung nach Lowry konnte anschließend die Zahl der Rezeptoren pro mg Membranprotein berechnet werden.

5.6 Western Blot

Zum Nachweis der HER-Rezeptoren und ausgewählter Signalproteine ihrer nachgeschalteten Systeme wie Akt, Erk 1/2, PTEN, p27kip1, c-Cbl und c-Src wurde der Western Blot benutzt. Bei diesem Verfahren werden Proteine im Acrylamidgel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Nach Überführung der Proteine mittels Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinylmembran können diese mit primären Antikörpern, die gegen das Zielprotein gerichtet sind, identifiziert werden. Die Bindung der primären Antikörper wird durch enzymgekoppelte sekundäre Antikörper nachgewiesen, die ein entsprechendes Substrat umsetzen.

Probengewinnung:

Es wurden jeweils 10^5 Zellen/Well auf einer Platte mit 12 bzw. 24 Vertiefungen in vollständigem Kulturmedium ausgesät. Sobald die gewünschte Dichte von ca. 70% erreicht

war, wurden die Zellen der 12-Well-Platte auf Eis überführt, 3 Mal mit je 2 ml PBS gewaschen und in 250 µl Ripa-Puffer/Well aufgenommen.

Anschließend wurde der Proteingehalt im Lowry gemessen und jede Probe mit Ladepuffer nach Laemmli [136] auf identische Proteinkonzentrationen eingestellt.

RIPA-Puffer (Radio Immunoprecipitation Assay):

50 mM	Tris-HCL (pH 7,4)
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0,1%	SDS
2%	Sodium-dodecyl-cholat
	Proteaseinhibitor: Complete™ 1/20 verdünnt
	Phosphataseinhibitoren: 200 µM Natriumvanadat, Natriumfluorid 10 mM
	Aqua bidest.

DDT-Sample Puffer nach Laemmli:

1 ml	1,25 M Tris pH 6,8
2 ml	25% Glycerin
2 ml	10%iges SDS
1,2 ml	Bromphenolblau
2 ml	1 M DTT (DL-Dithiothreitol solution)
13,3 ml	Aqua bidest.

Herstellung der Gele:

Die Auftrennung von Zellmembranen erfolgte im 8% Trenngel, die von Zellsolubilisaten im 10% Gel. Im Gelgießstand wurden zwei 10 x 5 cm große Trenngele gegossen und, nachdem sie mindestens 45 Minuten polymerisiert waren, mit einem Sammelgel überschichtet, in das ein Kamm mit 15 Zacken als Platzhalter für die Proben eingefügt wurde. Nach der vollständigen Polymerisation in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht wurden der Elektrophoresestand mit Elektrophoresepuffer befüllt, die Kämme entfernt und jeweils 10 µl Probe bzw. Auftragspuffer pro Geltasche aufgetragen.

10% Trenngel für 2 Gele:

5 ml	30% Rotiphorese® Gel
3,75 ml	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
0,15 ml	10% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
6 ml	Aqua bidest.
entgasen	
0,015 ml	TEMED
0,075 ml	APS (Ammoniumpersulfat)

8% Trenngel für 2 Gele

4 ml	30% Rotiphorese® Gel
3,75 ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
0,15 ml	10% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
7,1 ml	Aqua bidest.
entgasen	
0,015 ml	TEMED
0,075 ml	10% APS (Ammoniumpersulfat)

Sammelgel für 2 Gele:

1,7 ml	30% Rotiphorese® Gel
1 ml	1,25 M Tris-HCl, pH 6,8
0,1 ml	10% SDS (Sodiumdodecylsulfat)
7 ml	Aqua bidest.
entgasen	
0,02 ml	TEMED
0,1 ml	APS (Ammoniumpersulfat)

Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
3 mM	SDS (Sodiumdodecylsulfat)
	Aqua bidest.

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

25 mM	Tris
190 mM	NaCl
0,1%	Tween-20
	Aqua bidest, auf pH 8,0 eingestellt

Elektrophorese:

Nach dem Auftragen der Proben wurden die Proteine in der puffergefüllten Elektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 20 min durch das Sammelgel geleitet und anschließend für 40 min mit 200 V im Trenngel aufgetrennt.

Blotting:

Anschließend wurden die Proteine im Semi-dry-Blot mittels puffergetränkter Filterpapiere auf eine vorher für 15 Minuten in Methanol aktivierte PVDF-Membran übertragen. Der Blot wurde zwischen zwei angefeuchteten Graphitplatten aufgebaut, und bestand aus 6 in Anodenpuffer I und 3 in Anodenpuffer II getränkten Filterpapieren, den aktivierten Membranen, den Gelen und 9 in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren. Nach Anlegen einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden wanderten die Proteine mit dem Puffer in Richtung Anode und wurden auf der Polyvinylidendifluorid-Transfermembran fixiert.

Anode I:

0,25 M	Tris
20%	MeOH (Methanol)
	Aqua bidest.

Anode II:

0,025 M	Tris
20%	MeOH (Methanol)
	Aqua bidest.

Kathode:

2,6 g	ϵ -Amino-n-Caprinsäure
-------	---------------------------------

20%	MeOH (Methanol)
	Aqua bidest.

Blockieren, Antikörperinkubation und Detektion:

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die nicht gesättigten Bindungsstellen auf den Membranen durch Inkubation mit RotiBlock® (1:10 in Aqua bidest.) für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit einem spezifisch gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper (1:2.000 in TBS/T mit 0,1% BSA) inkubiert, am nächsten Tag 4 Mal für je 15 Minuten mit TBS/T gewaschen, für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (HRP/Horseradish-Peroxidase) inkubiert und erneut gewaschen. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden erfolgte durch 1 – 2 minütige Entwicklung in ECL-Lösung (Enhanced ChemoLuminescence) und die anschließende Detektion der Lichtsignale im Fusion SL4 400, WL Viber Lourmat.

Entfernen anheftender Antikörper von der Membran:

Um das Expressionsmuster verschiedener Proteine direkt miteinander vergleichen zu können, war es notwendig, die exakt gleichen Proben zu verwenden. So wurden die Gehalte an Akt, phospho-Akt, Erk1/2 und phospho-Erk1/2 sowie zur Sicherung eines vergleichbaren Gesamtproteingehalts auch β -Tubulin jeweils auf derselben Membran bestimmt. Dazu musste diese zuerst von den noch anheftenden Antikörpern gereinigt werden: Die Membranen wurden hierfür unter Schütteln 4 Mal für je 15 Minuten bei Raumtemperatur und schließlich über Nacht bei 4°C mit je 20 ml Strip-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen zuerst zwei Mal für je 10 Minuten mit 20 ml Aqua bidest. und danach für 20 Minuten mit 20 ml TBS/T gewaschen. Daran schloss sich eine 1-stündige Inkubation mit Roti®-Block (1:10 in Aqua bidest.) an, woraufhin die Membranen erneut mit dem gewünschten Antikörper inkubiert werden konnten.

Strip-Puffer:

100 mM	NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)
	Aqua bidest., auf pH 2,0 eingestellt

Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Software „ImageJ (Java-based image processing program, National Institutes of Health, Bethesda, ML, USA.)“.

5.7 cAMP-Bestimmung

Die Regulation der Adenylylcyclase durch κ -Agonisten wurde durch Bestimmung der cAMP-Produktion in intakten Zellen untersucht. Das gebildete cAMP wurde anschließend mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) gemessen.

Prinzip:

Ein ELISA ist ein sensitiver immunologischer Test, der auf dem Einsatz eines Enzym-gekoppelten Antigens beruht, welches an alle nicht durch Probenantigen besetzte Antikörperbindungsstellen bindet und ein chromogenes Substrat umsetzt. In diesem Fall handelt es sich bei dem Enzym um die Meerrettich-Peroxidase. Das durch Spaltung des Peroxids entstehende O_2^- reagiert mit dem farblosen $TMBH_2$ zu blau gefärbtem TMB. Die anschließend messbare Extinktion ist umgekehrt proportional zur in den Zellen enthaltenen Menge an cAMP: Je stärker die Farbreaktion ausfällt, desto weniger cAMP war in den Zellen enthalten und desto mehr Enzym-gekoppeltes cAMP konnte binden.

Intrazelluläre cAMP-Akkumulation und Probengewinnung:

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation wurden die Zellen in einer Dichte von 10^5 Zellen/Well auf einer Zellkultur Testplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät, wobei jeweils vier Vertiefungen mit SKBR3-wt, -T, -TU und -U befüllt wurden. Die verschiedenen Zelllinien wuchsen in vollständigem Kulturmedium und ihrer gewohnten Trastuzumab- bzw. U69,593-Konzentration für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 . Sobald die gewünschte Konfluenz erreicht war, wurde das Medium abgesaugt und durch 500 μ l hepesgepuffertes, serumfreies DMEM-Medium (DMEH = DMEM mit 25 mM Hepes) ersetzt, in dem die Zellen für 30 Minuten im 37°C-Wasserbad inkubiert wurden. Währenddessen wurden vier unterschiedliche Lösungen vorbereitet:

- a) DMEH mit 100 μ M IBMX
- b) DMEH mit 100 μ M IBMX, 1 μ M Forskolin

- c) DMEH mit 100 μ M IBMX, 1 μ M Forskolin, 1 μ M U50,488
- d) DMEH mit 100 μ M IBMX, 1 μ M Forskolin, 1 μ M U50,488, 10 μ M NorBNI

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und auf Eis nach folgendem Schema 250 μ l der Substanzlösungen zupipettiert. Eine repräsentative Plattenbelegung ist in Abbildung 5-4 dargestellt.

Nach 15-minütiger Inkubation im 37°C warmen Wasserbad wurden die Platten auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 50 mM HCl pro Well gestoppt. Dadurch kam es zu einer Lyse der Zellen, so dass cAMP in den Überstand treten konnte.

SKBR3-wt						
SKBR3-T						
SKBR3-TU						
SKBR3-U						
	-	IBMX	IBMX Forskolin	IBMX Forskolin U50,488	IBMX Forskolin U50,488 NorBNI	-

Abbildung 5-4: Plattenbelegung für die Bestimmung der cAMP-Akkumulation.

Die vier Zelllinien (SKBR3-wt, -T, -TU, -U) wurden jeweils in einer Reihe ausplattiert und für 3 Tage kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Bildung von cAMP in Anwesenheit der dargestellten Substanzen bestimmt.

Anschließend wurden die Proben unter dem Abzug auf einem Rüttler mit jeweils 25 μ l eines Triethylamin (TEA)-Essigsäureanhydrid (EAH)-Gemisches acetyliert, das drei Teile TEA und 1 Teil EAH enthielt. Die Proben wurden entweder bis zur weiteren Verwendung mit Parafilm verschlossen bei – 20°C gelagert oder nach einer mindestens 30-minütigen Ruhezeit, in der sich der Zelldetritus am Grund absetzen konnte, direkt für den ELISA verwendet.

Durchführung des ELISA:

Zur Durchführung des ELISAs wurden 96er Mikrotitrierplatten benutzt, welche mit einem am Boden gebundenen sekundären gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper aus der Ziege und einem daran gebundenen primären anti-cAMP-Antikörper aus dem Kaninchen beschichtet waren. Als Standardreihe wurde eine absteigende Verdünnungsreihe ausgehend von 10 µM cAMP Lösung (Standard I in Assaypuffer) hergestellt und acetyliert. Es wurden jeweils 100 µl der Standards sowie der 1:4 mit dem 50 mM Acetatpuffer (Assaypuffer) verdünnten Probenüberstände in Dreifachbestimmung eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl cAMP-Peroxidase-Konjugat (1:5.000 verdünnt in Assaypuffer) und dem Verschluss mit Parafilm inkubierte die Platte rüttelnd über Nacht bei 4°C. Es folgte ein neunmaliges Waschen mit Waschpuffer, Trockenklopfen und die Zugabe von 150 µl Substratgemisch (Substrat A und B im Verhältnis 1:1). Sobald sich nach ca. 15-minütiger Inkubation ein Farbumschlag zeigte, wurde die Farbreaktion mit 50 µl 1 M HCl/Vertiefung abgestoppt und die Extinktion bei $\lambda=450$ nm im Photometer gemessen. Anhand der Standardkurve ließ sich die cAMP-Menge bestimmen.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Assaypuffer:

50 mM	Natriumacetat
	Aqua bidest., auf pH 6,0 eingestellt

Waschpuffer:

10 mM	Phosphatpuffer
0,01%	Tween-20
	Aqua bidest., auf pH 7,4 eingestellt

Substratlösung:

Lösung A:

6,5 mM	Wasserstoffperoxid-Harnstoff
130 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
49 mM	Citronensäure
	Aqua bidest.

Lösung B:

2,08 mM	Tetramethylbenzidin (TMB)
40 ml	DMSO
49 mM	Citronensäure
960 ml	Aqua bidest.

5.8 Annexin V-FITC / Propidium Jodid Färbung

Prinzip:

Die Einleitung der Apoptose wurde in den vier verschiedenen Zelllinien vergleichend mit Hilfe der Annexin V-FITC / Propidium Jodid Färbung in der konfokalen Mikroskopie dargestellt. Annexin V-FITC emittiert grüne Fluoreszenz und zeigt frühe Apoptosestadien an, indem es in geschädigten Zellen an Phosphatidyl-Serin auf der Zellmembran bindet. Propidiumjodid hingegen kann nur durch die perforierte Membran toter Zellen in den Kern gelangen, wo es mit der DNS interkaliert.

Durchführung:

Von allen vier Zelllinien wurden Parallelansätze von jeweils 10^5 Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (Cover Slips) in serumhaltigem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde auf serumfreies Medium umgestellt. Ein Ansatz wurde für weitere 12 Tage in Anwesenheit der für die chronische Vorbehandlung eingesetzten Konzentrationen von Trastuzumab und U69,593, der andere ausschließlich in Anwesenheit von 20 µg/ml Trastuzumab kultiviert. Die Cover-Slips wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in der Dunkelkammer mit je 200 µl Annexin V-FITC-Lösung (1:20 in Bindungspuffer verdünnt) inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen erfolgte für weitere 7 Minuten eine Inkubation mit 1:10 in Bindungspuffer verdünntem Propidium Jodid (Endkonzentration 1 µg/ml). Es schlossen sich ein weiterer Waschschrift und eine 30-minütige Inkubation in 4%igem Paraformaldehyd zur Fixation der Zellen an. Daraufhin wurden die Cover Slips in Vectashield® Mounting Medium auf Objektträgern mit der Oberseite nach unten - „upside down“ - eingebettet. Nach einer Nacht im Kühlschrank erfolgte die Versiegelung mit Nagellack und die anschließende Betrachtung bei $\lambda=488$ und 543 nm mit einem 63x/1.4 Objektiv im konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Zur Ermittlung der Apoptoserate wurden mindestens 345 Zellen einer jeden Zelllinie gezählt und die prozentuale Apoptoserate bestimmt.

5.9 TRICT-Phalloidin-Färbung

Die Morphologie der Zellen wurde durch Anfärben des Zytoskeletts mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat (TRICT-Phalloidin) dargestellt.

Durchführung:

150.000 Zellen jeder Zelllinie wurden jeweils in Doppelbestimmung serumhaltig mit ihrer gewohnten Trastuzumab- bzw. U69,593-Konzentration für 2 Tage auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen in 6-Well-Platten kultiviert. Daraufhin wurde das Medium abgesaugt. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit jeweils 2 ml PBS/Well und die Inkubation mit 3ml/Well 2%igem Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur. Die so fixierten Zellen wurden erneut 2 Mal mit 2ml/Well PBS gewaschen und durch 15-minütige Inkubation mit 2,5 ml/Well 0,2%ig in PBS gelöstem Triton® bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl/Deckgläschen TRICT-Phalloidin-Lösung für 45 min in der Dunkelkammer angefärbt. Nach einem weiteren zweimaligen Waschschrift mit jeweils 2 ml PBS/Well wurden die Cover Slips direkt mit Mounting Medium auf Objektträger fixiert, die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und die Proben lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert. Die Auswertung wurde im konfokalen Mikroskop bei $\lambda=540-545$ nm durchgeführt.

5.10 Immunzytochemie

Durch Immunzytochemie ist es möglich, die subzelluläre Lokalisation eines Proteins mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpers zu betrachten.

Durchführung:

Die vier Zelllinien wurden in einer Konzentration von 2×10^5 -Zellen in vollständigem Kulturmedium mit ihren gewohnten Liganden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Cover Slips in 6-Well-Platten ausgesät. Nach zwei Tagen Wachstum wurde das Medium abgesaugt, die Zellen drei Mal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit 2 ml 4%igem

Paraformaldehyd/Kavität für 1,5 Stunden fixiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit je 2 ml TBS, wurden 5 ml Blotto pro Vertiefung für 30 Minuten zugegeben. Das darin enthaltene Triton permeabilisiert die Zellen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen entweder mit 100 µl pro Well c-Cbl Antikörper (1:100 in Blotto verdünnt) oder 200 µl c-Src Antikörper (1:50 in Blotto verdünnt) für 1 Stunde inkubiert. Daraufhin wurde 3 Mal mit je 2 ml TBS gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit 100 µl/Well des sekundären FITC-markierten gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörpers (1:400 in Blotto) im Dunkeln inkubiert. Es schloss sich ein dreimaliger Waschschrift mit je 2 ml TBS an. Die Cover Slips wurden mit Vectashield® Mounting Medium auf Objektträgern fixiert, über Nacht im Kühlschrank gelagert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Verwendete Puffer und Lösungen:

TBS:

20 mM	Tris
0,9%	NaCl
	Aqua bidest., auf pH 7,4 eingestellt

Blotto:

0,1%	BSA (bovines Serumalbumin)
0,1%	Triton® X-100 (Octoxinol-9)
	TBS

5.11 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert (MW) \pm SEM der angegebenen Anzahl von Experimenten dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Grundgesamtheiten wurden mittels T-Test oder ANOVA bestimmt.

6 ERGEBNISSE

6.1 Generierung Opioid-toleranter und Trastuzumab-resistenter SKBR3 Zelllinien

Humane SKBR3-Mammakarzinomzellen wurden für mindestens 6 Monate in Anwesenheit von 20 µg/ml Trastuzumab, 1 µM U69,593 oder beider Pharmaka kultiviert. Die daraus resultierenden Zellpopulationen sind an das Wachstum in Gegenwart hoher HER2-Antikörper- bzw. Opioid-Konzentrationen adaptiert und werden mit SKBR3-T, SKBR3-U und SKBR3-TU bezeichnet. Unbehandelte Zellen der Ausgangspassage wurden parallel dazu weitergezogen und dienten als Kontrolle (Parentalzellen, SKBR3-wt).

Die erzeugten Zellpopulationen werden im Folgenden funktionell charakterisiert, wobei besonderes Augenmerk auf möglichen Interaktionen zwischen dem Opioid- und RTK-System bzw. auf Adaptationen auf Ebene der nachgeschalteten Signalwege gelegt wurde.

6.2 Charakterisierung der Zelllinien

6.2.1 Phänotyp

Zunächst wurde der Einfluss der 6-monatigen Behandlung der Zellen auf den Phänotyp bestimmt. Zu diesem Zweck wurde das F-Aktin-Gerüst im Zytoskelett mit TRICT-Phalloidin angefärbt und im konfokalen Lasermikroskop untersucht.

Kulturen parentaler SKBR3-wt Zellen enthalten Zellen unterschiedlicher Größe und Morphologie. Im Vergleich dazu weist die SKBR3-T Zelllinie überdurchschnittlich viele langgestreckte Zellformen auf. Bei den 6 Monate in Anwesenheit des Opioids kultivierten Zellen (SKBR3-U) werden dagegen vermehrt rundliche, bei SKBR3-TU Zellen dreieckige Formen beobachtet (Abbildung 6-1). Allerdings enthalten alle vier Zelllinien auch geringe Anteile aller anderen Zellformen.

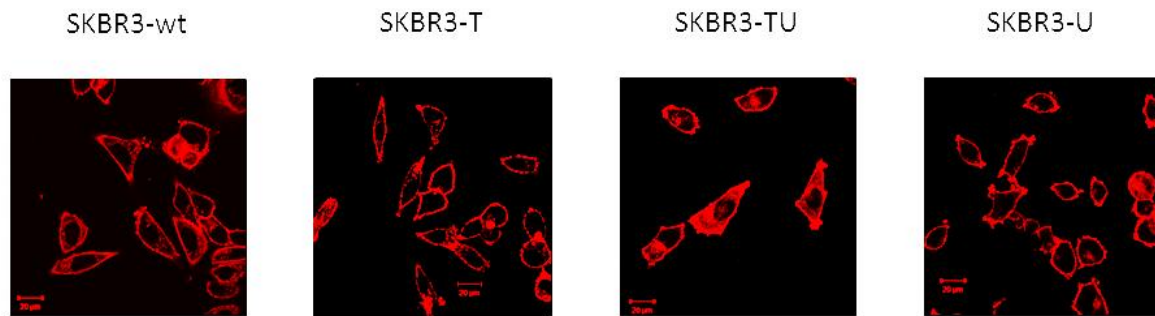


Abbildung 6-1: Darstellung des Tubulingerüsts der verschiedenen SKBR3 Zelllinien durch Phalloidin:

Je $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden in 6-Well-Platten ausgesät, für weitere 4 Tage in Anwesenheit der entsprechenden Pharmaka kultiviert, mit TRICT-Phalloidin angefärbt und im konfokalen Mikroskop betrachtet. Die Abbildung zeigt repräsentative Aufnahmen der verschiedenen SKBR3-Zelllinien.

6.2.2 Charakterisierung der Opioidrezeptoren

SKBR3 Zellen besitzen geringe Mengen an endogenen κ -Opioidrezeptoren [133]. Um die Anwesenheit funktionell aktiver κ -Opioidrezeptoren in den chronisch behandelten Zelllinien nachzuweisen, wurde die Rezeptordichte und die Kopplung der Rezeptoren an die nachgeschalteten Signalmechanismen untersucht.

6.2.2.1 Radioligandenbindung

Die Dichte membranständiger κ -Opioidrezeptoren wurde in Radioligandenbindungsstudien mit Hilfe des Opioidantagonisten ^3H -Diprenorphin bestimmt. Membranen der Parentalzellen (SKBR3-wt) enthalten $40,86 \pm 11,3$ fmol/mg Membranprotein κ -Opioidrezeptoren. Die chronische Behandlung der Zellen mit U69,593 (SKBR3-U) führt zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptormenge um 52,9% ($19,25 \pm 11,4$ fmol/mg). Eine vergleichbare Herabregulation der κ -Opioidrezeptoren um ca. 61,4% ($15,76 \pm 8,3$ fmol/mg) ist auch in den chronisch mit Trastuzumab und U69,593 behandelten Zellen (SKBR3-TU) zu beobachten. Nach Behandlung der Zellen mit Trastuzumab (SKBR3-T) hingegen stieg die Rezeptormenge um 16,5% an auf $47,61 \pm 11,3$ fmol/mg. Die längerfristige Blockade des HER2-Rezeptors besitzt demnach einen Einfluss auf die Dichte an κ -Opioidrezeptoren, während sie die Herabregulation der κ -Opioidrezeptoren in Anwesenheit von U69,593 nicht aufheben kann (Abbildung 6-2).

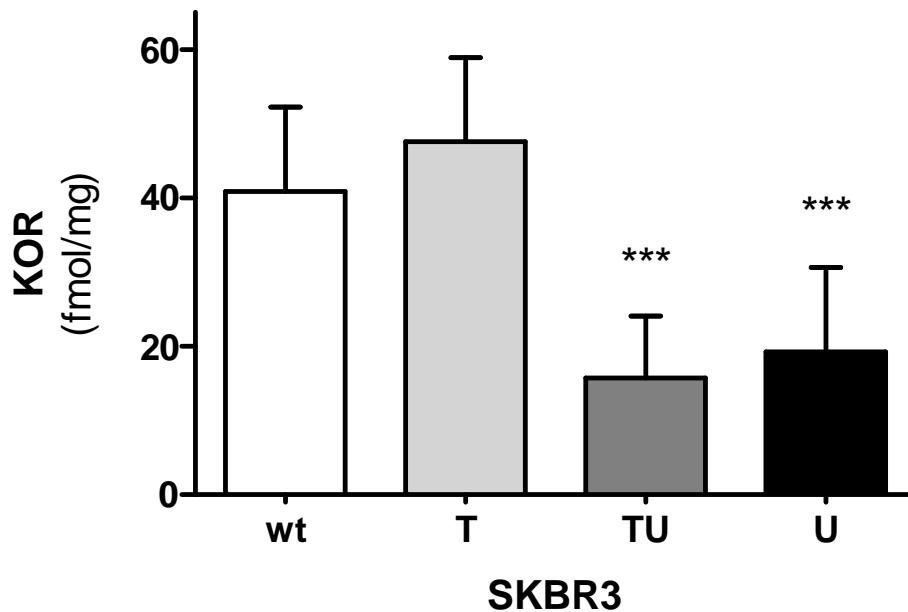


Abbildung 6-2: Regulation von κ -Opioidrezeptoren (KOR) durch den HER2-Inhibitor Trastuzumab und U69,593.

Die spezifische Bindung des Radioliganden ^3H -Diprenorphin an κ -Opioidrezeptoren wurde nach Verdrängung mit dem κ -Opioidrezeptoragonisten U50,488 bestimmt und in fmol/mg Membranprotein dargestellt. Im Vergleich zu unbehandelten SKBR3-wt-Zellen führt die chronische Behandlung mit dem Opiat U69,593 zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptoren um 61,4% (SKBR3-TU) bzw. 52,9% (SKBR3-U), wohingegen die Rezeptordichte nach Behandlung mit dem HER2-Antikörper um 16,5% (SKBR3-T) ansteigt. Die Blockade des HER2-Rezeptors sensibilisiert demnach die Zellen gegenüber der Wirkung von Opioiden. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von n=4 unabhängigen Versuchen, jeweils durchgeführt in Doppelbestimmung. *** $p < 0,001$.

6.2.2.2 Regulation der Adenylylcyclase

Die funktionelle Kopplung der κ -Opioidrezeptoren an ihre nachgeschalteten Signalwege wurde durch die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion in Anwesenheit des κ -Opioidrezeptoragonisten U50,488 und des κ -Opioidrezeptorantagonisten Nor-Binaltorphimin (NorBNI) bestimmt.

Zunächst ist zu erkennen, dass die chronische Behandlung der Zellen mit Trastuzumab die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclasen mit Forskolin verstärkt. Im Gegensatz zu neuronalen Zellen resultiert die akute Aktivierung des κ -Opioidrezeptors in SKBR3-wt nicht in einer Hemmung, sondern in einer Zunahme der intrazellulären cAMP Produktion. Nach chronischer Behandlung der Zellen mit Trastuzumab (SKBR3-T) nimmt die Stimulierbarkeit

der Adenylylcyclasen durch Opioide zu. In jedem Fall ist die durch Opioide vermittelte Zunahme der cAMP-Produktion durch NorBNI aufhebbar. In SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen hingegen besitzt U50,488 keine Wirkung auf die cAMP-Produktion. Dies weist darauf hin, dass die chronische Behandlung der Zellen mit U69,593 zu einer funktionellen Desensibilisierung der κ -Opioidrezeptoren, also einer Abkopplung von ihren G-Proteinen, führt. Dagegen bedingt die chronische Blockade der HER2-Rezeptoren durch Trastuzumab eine Sensibilisierung der κ -Opioidrezeptoren, die sich in einer Zunahme ihrer funktionellen Aktivität äußert (Abbildung 6-3).

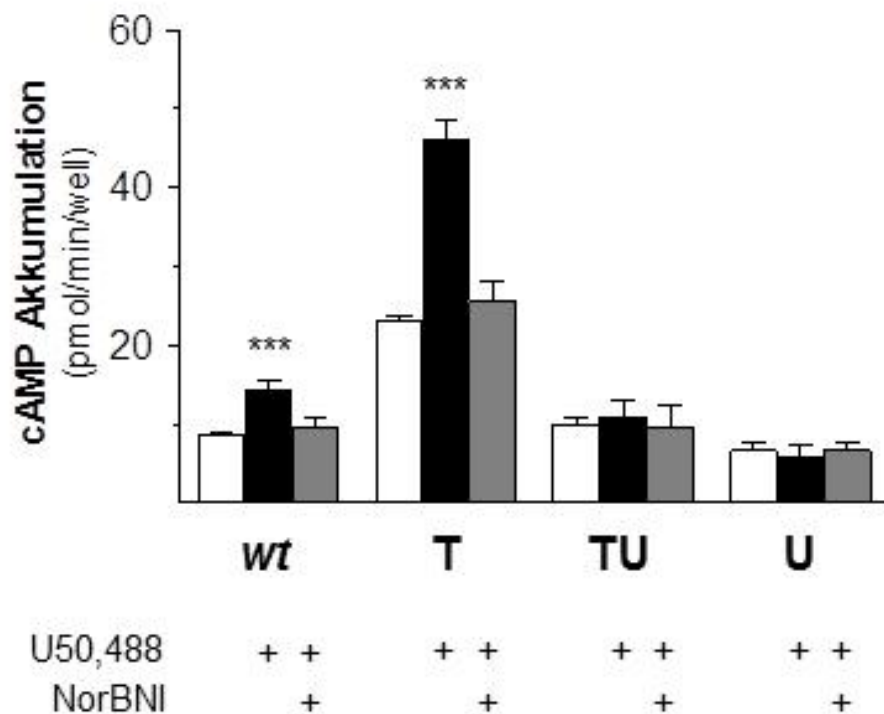


Abbildung 6-3: Regulation der cAMP-Akkumulation durch Opioide.

Die Bestimmung der cAMP-Akkumulation (pmol/min/Well) erfolgte nach 15-minütiger Stimulation der κ -Opioidrezeptoren in Anwesenheit von 1 μ M Forskolin. In SKBR3-wt und SKBR3-T führt die Zugabe von U50,488 zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Produktion, der durch NorBNI wieder aufhebbar ist. In Opioid-behandelten SKBR3-TU und SKBR3-U hingegen ist U50,488 wirkungslos. Die chronische Exposition der Zellen gegenüber Opioiden führt demnach zu einer Abkopplung des κ -Opioidrezeptors von seinen G-Proteinen.

6.2.3 Charakterisierung des Zellwachstums

6.2.3.1 Kristallviolett Assay

Um den Einfluss von Trastuzumab und U69,593 auf das Zellwachstum zu erfassen, wurden die einzelnen Zelllinien (10^5 Zellen/Well) auf eine 12-Well-Platte ausgesät und für 3 Tage in Anwesenheit der jeweiligen Pharmaka kultiviert. Die Zelldichte wurde durch Anfärbung der Nuklei mit Kristallviolett bestimmt. Es zeigt sich Folgendes: Die Behandlung der Zellen mit Trastuzumab (SKBR3-T) führt zu einer signifikanten Abnahme des Zellwachstums auf $76,0\% \pm 5,42$. Obwohl U69,593 (SKBR3-U) alleine keinen Einfluss auf das Zellwachstum besitzt ($100,4\% \pm 14,94$), verstärkt es die den inhibitorischen Effekt von Trastuzumab geringfügig (SKBR3-TU; $69,0\% \pm 5,27$; Abbildung 6-4).

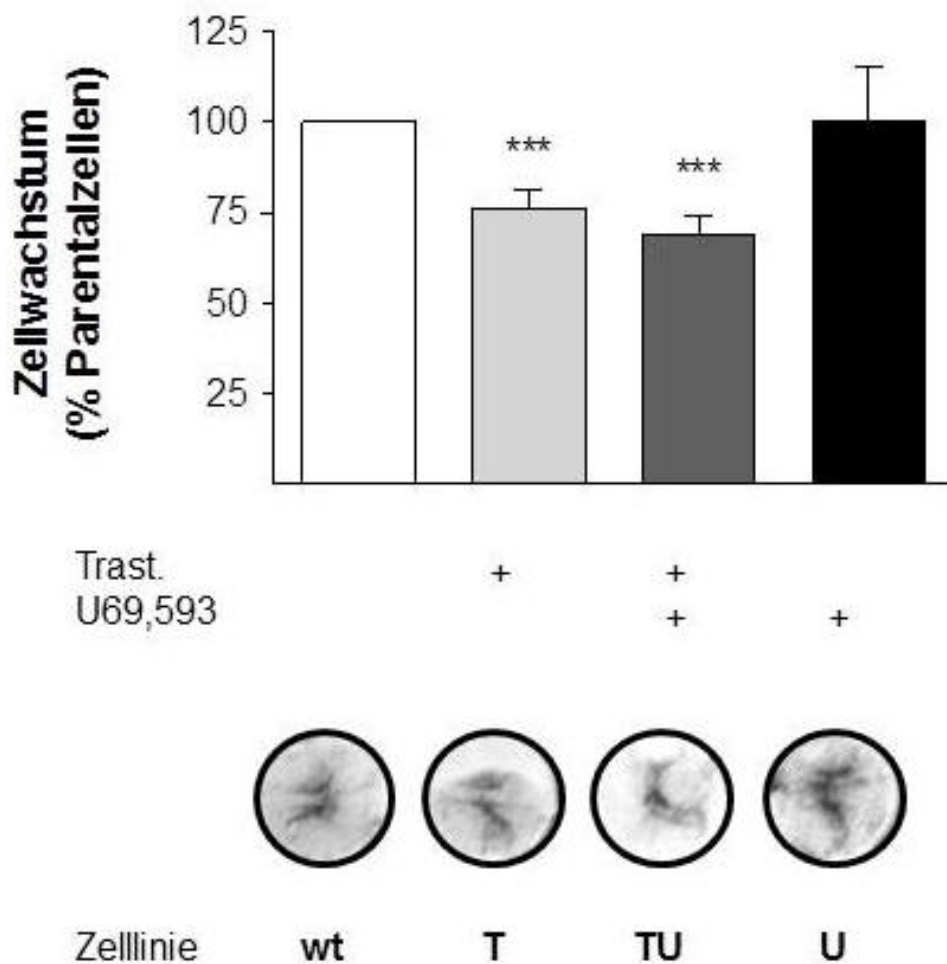


Abbildung 6-4: Bestimmung des Zellwachstums mittels Kristallviolett:

Die Zellen wurden für 3 Tage unter serumfreien Bedingungen in Anwesenheit der jeweiligen Pharmaka kultiviert und mit Kristallviolett angefärbt. Oben dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden auf die Zelldichte der Parentalzellen

normalisiert (100%). Darunter sind repräsentative Aufnahmen der angefärbten Zellen vor der Auflösung und Freisetzung des Farbstoffes abgebildet. SKBR3-T weisen ein hochsignifikant geringeres Zellwachstum als SKBR3-wt auf. Die gleichzeitige Behandlung mit U69,593 verstärkt die durch Trastuzumab induzierte Wachstumshemmung geringfügig (SKBR3-TU). ***; $p < 0,001$.

6.2.3.2 Apoptose

Die Hemmung des Zellwachstums in SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen kann durch Veränderungen in der Proliferation und/oder Apoptose verursacht werden. Nachdem bei der Bestimmung der Zellproliferation mit BrdU keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien zu beobachten waren, wurde die stressinduzierte Apoptose untersucht. Hierfür wurden die Zellen 12 Tage unter serumfreien Bedingungen in Anwesenheit der jeweiligen Pharmaka kultiviert. Zur Bestimmung des apoptotischen Effekts von Trastuzumab wurden die Zellen gewaschen und für denselben Zeitraum mit Trastuzumab inkubiert. Die verschiedenen Apoptosestadien wurden durch Anfärbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumjodid im konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht.

Wie aus Abbildung 6-5 hervorgeht, enthalten die SKBR3-T und SKBR3-TU Zellpopulationen apoptotische Zellen. Dabei sind etwa vergleichbare Anteile an frühen (grüne Fluoreszenz) und späten (rote Fluoreszenz) Apoptosestadien vertreten. In Parentalzellen und SKBR3-U Zellpopulationen sind hingegen kaum apoptotische Zellen zu beobachten. Dies bedeutet, dass die chronische Exposition der Zellen gegenüber Trastuzumab die Apoptose stimuliert. Die Co-Inkubation der Zellen mit U69,593 hat dagegen keinen Einfluss auf den apoptotischen Effekt von Trastuzumab. Bestimmt man dagegen die akute Wirkung von Trastuzumab, so ist dieses sowohl in Parentalzellen, als auch in mit U69,593 behandelten Zellpopulationen (SKBR3-TU; SKBR3-U) in der Lage Apoptose zu induzieren. In den opioidbehandelten Zellen treten dabei vermehrt späte Apoptosestadien auf.

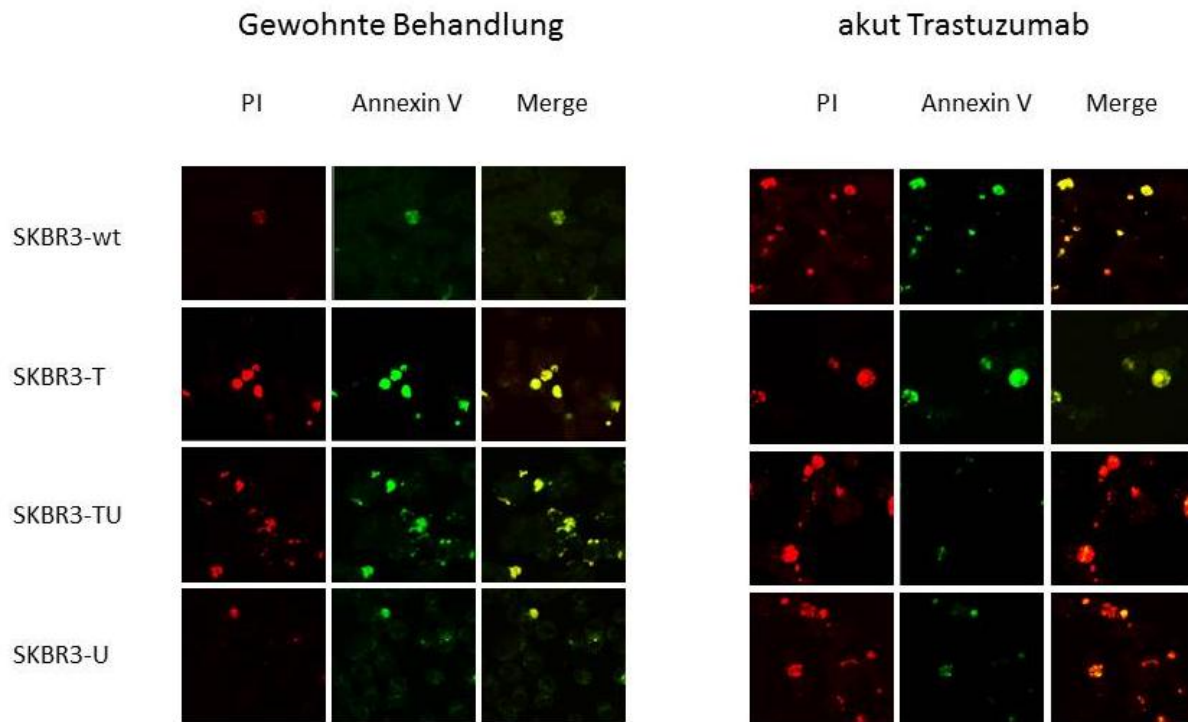


Abbildung 6-5: Bestimmung der Apoptose mittels Annexin V/PI-Färbung.

Die Zellen wurden für 12 Tage in serumfreiem Medium kultiviert und entweder in Anwesenheit der für die chronische Vorbehandlung der Zellen verwendeten Pharmaka (linke Seite; Gewohnte Behandlung) oder von Trastuzumab alleine (rechte Seite; akut Trastuzumab) kultiviert. Die Zellen wurden mit Annexin V (grüne Fluoreszenz) und Propidiumjodid (PI; rote Fluoreszenz) angefärbt. Merge zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle. Die unbehandelten und chronisch mit U69,593 behandelten Zellenpopulationen weisen kaum apoptotische Zellen auf. Dagegen enthalten die mit Trastuzumab behandelten Zelllinien (SKBR3-T, SKBR3-TU) apoptotische Zellen. Nach akuter Zugabe von Trastuzumab sind in allen Zellpopulationen apoptotische Zellen zu erkennen. Aufgrund des erhöhten Anteils der rot fluoreszierenden Zellen scheint die Apoptose in den mit U69,593 vorbehandelten Zellen weiter fortgeschritten zu sein.

Die Apoptoserate wurde durch Auszählen fluoreszierender Zellen/Gesichtsfeld quantifiziert. Pro Zelllinie wurden 345 bis 431 Zellen in 5 bis 16 Gesichtsfeldern ausgezählt, wobei sämtliche Apoptosestadien berücksichtigt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-6 dargestellt. Während die Co-Inkubation der Zellen mit U69,593 nicht in der Lage ist, den Anstieg der Trastuzumab-induzierten basalen Apoptoserate aufzuheben, verhindert diese die Entstehung einer sekundären Resistenz gegenüber Trastuzumab.

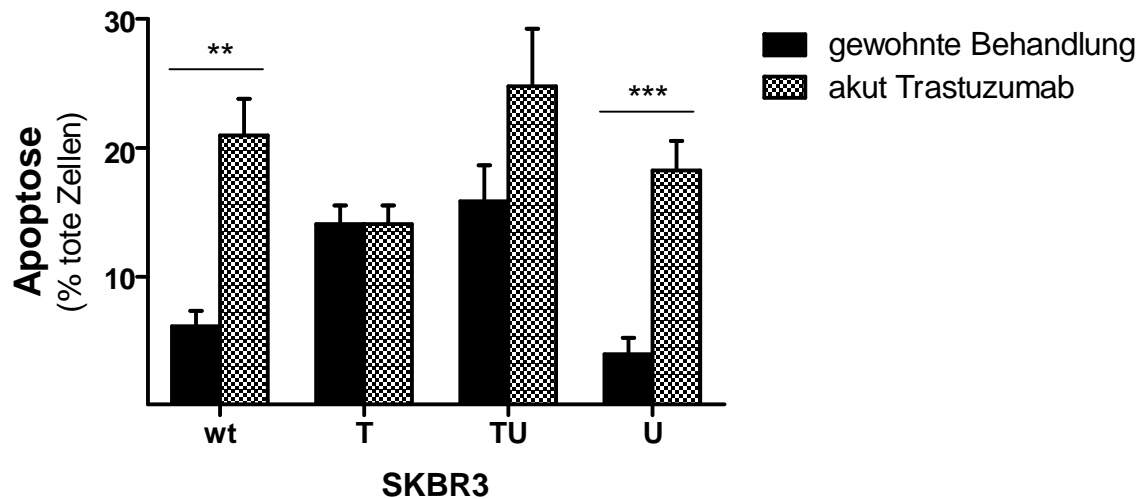


Abbildung 6-6: Quantifizierung der Apoptose in SKBR3 Zellen.

Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durch Auszählen der fluoreszierenden Zellen unter dem konfokalen Mikroskop bestimmt. Zu beachten ist, dass die Co-Inkubation Zellen mit U69,593 die Sensitivität gegenüber der akuten apoptotischen Trastuzumabwirkung aufrechterhält. Die Daten stellen die Mittelwerte \pm SEM dar. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

6.2.4 Regulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die beobachteten Änderungen im Zellwachstum können entweder durch Adaptationen auf Ebene der Rezeptor-Tyrosinkinasen und/oder auf Ebene der nachgeschalteten Signalmechanismen vermittelt werden. Im Folgenden werden zunächst Auswirkungen der chronischen Behandlung der Zellen mit Trastuzumab und U69,593 auf einzelne Vertreter der Familie der HER- und IGF-Rezeptoren erfasst. Hierzu wurde die relative Rezeptordichte in Zellmembranen mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot bestimmt (Abbildung 6-7).

Durch kombinierte chronische Trastuzumab- und Opioidbehandlung kommt es in SKBR3-TU zu einer verstärkten Expression des HER2-Rezeptors im Western Blot wie dies auch in SKBR3-U zu beobachten ist. Dieser Effekt überlagert die durch alleinige T-Behandlung vermittelte Herabregulation des Rezeptors.

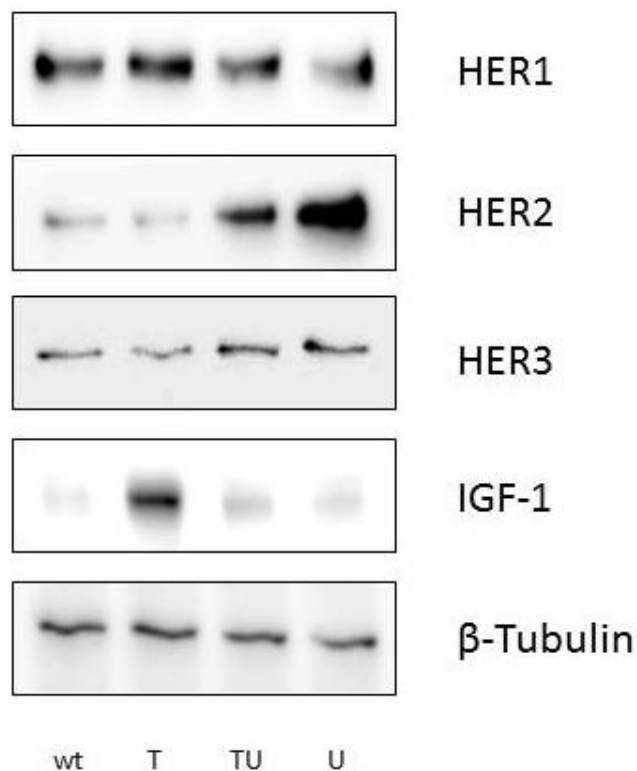


Abbildung 6-7: Regulation ausgewählter Rezeptoren für Wachstumsfaktoren.

Während die chronische Behandlung der Zellen mit Trastuzumab mit einer Abnahme des HER2- und HER3-Rezeptors einhergeht, werden der HER1- und IGF-1-Rezeptor hochreguliert. Die chronische Behandlung der Zellen mit U69,593 alleine führt zu einer Zunahme der HER2-Rezeptoren, besitzt aber keine Auswirkung auf die anderen Rezeptoren. Bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit dem Opioid wird der durch Trastuzumab vermittelte Effekt auf die Rezeptorregulation aufgehoben.

Durch die verstärkte Anwesenheit des HER2-Rezeptors werden die SKBR3-TU Zellen gegenüber der Wirkung von Trastuzumab sensibilisiert, was das verminderte Wachstum dieser Zellen im KV-Test erklärt.

In Bezug auf die Expression des HER1-, HER3- und IGF-1-Rezeptor lassen sich bei SKBR3-TU keinerlei Abweichungen zu den Parentalzellen erkennen, wohingegen durch alleinige T-Behandlung eine Hoch- und durch alleinige U-Behandlung eine kompensatorische Herunterregulation des HER1-Rezeptors festgestellt werden kann.

Der HER3-Rezeptor erfährt in SKBR3-T Zellen eine Herabregulation, die durch Einwirkung von U69,593 verhindert wird. Auch eine kompensatorische Hochregulation des IGF-1 Rezeptors, wie sie oftmals nach Behandlung der Zellen mit Trastuzumab beschrieben wird, findet sich in

den SKBR3-T Zellen, jedoch nicht in den Opioid-behandelten Zelllinien SKBR3-TU und SKBR3-U.

6.2.5 Regulation nachgeschalteter Signalwege

6.2.5.1 *Proteinkinase B/Akt-Signalweg*

Zur Erfassung der anti-apoptotischen Signalwege wurde die Auswirkungen der chronischen Behandlungen auf die Menge und Aktivität der PKB/Akt im Western Blot untersucht (Abbildung 6-8). Die chronische Exposition der Zellen gegenüber Trastuzumab besitzt keinen Einfluss auf die relativen Konzentrationen der Akt. Dagegen ist eine starke Dephosphorylierung des Proteins an Serin 473 in SKBR3-T festzustellen. Wurden die Zellen in Anwesenheit von U69,593 kultiviert, so ist eine leichte Zunahme der Proteinmengen und eine stark vermehrte Phosphorylierung an Serin 473 erkennbar. Die gleichzeitige Behandlung mit U69,593 in SKBR3-TU verhindert die durch Trastuzumab induzierte Dephosphorylierung der Akt.

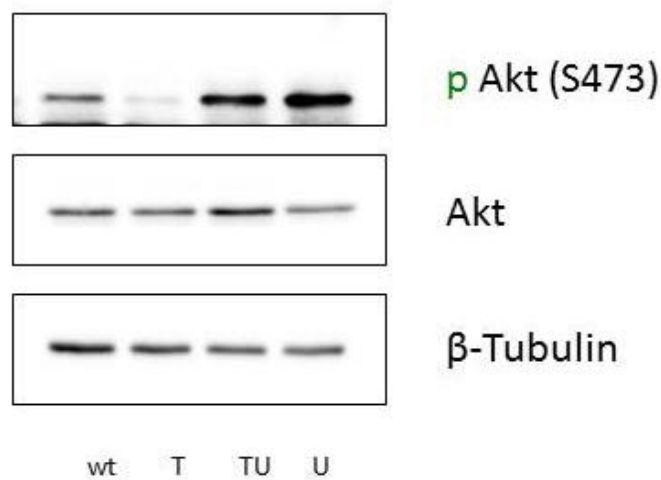


Abbildung 6-8: Regulation der Akt in chronisch behandelten SKBR3 Zellen.

Die Regulation der Akt und ihrer an Serin 473 phosphorylierten Form wurde mittels spezifischer Antikörper in Solubilisaten von SKBR3-wt und chronisch mit Trastuzumab und Opioiden behandelten Zellen dargestellt. Der Auftrag vergleichbarer Proteinmengen wurde durch den Nachweis vergleichbarer β-Tubulinmengen dargestellt.

6.2.5.2 *Erk 1/2-Signalweg*

Durch Untersuchung der Menge und Phosphorylierung der Erk1/2 lassen sich Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der verschiedenen Zelllinien ziehen. Während in den vier SKBR3 Zellpopulationen kein Unterschied in der Menge der Erk 1/2 festzustellen ist, zeigt sich eine Verminderung der basalen Phosphorylierung in SKBR3-T Zellen. In SKBR3-U Zellen tritt dagegen eine erhöhte basale Phosphorylierung auf. Durch Co-Inkubation der Zellen mit U69,593 wird der Trastuzumab-Effekt aufgehoben (Abbildung 6-9).

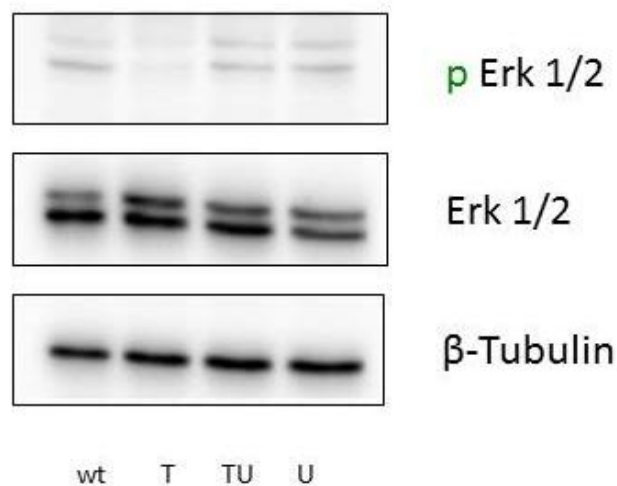


Abbildung 6-9: Regulation der Erk1/2 in chronisch behandelten Zellen.

Durch spezifische Antikörper wurden Menge und Phosphorylierungsstatus der Erk1/2 in Zellsolubilisaten der vier Zelllinien SKBR3-wt, SKBR3-T, SKBR3-TU und SKBR3-U im Western Blot dargestellt. β-Tubulin diente dabei als Ladekontrolle.

6.2.6 Regulation von Resistenzmarkern

Bei einer längerfristigen Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Trastuzumab bildet sich eine Resistenz aus. Diese geht auf zellulärer Ebene z.B. mit einer Erniedrigung des Tumorsuppressors PTEN und des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p27kip1, einer Erhöhung der Tyrosinkinase c-Src und der Ubiquitin Ligase c-Cbl einher. Deshalb wurde der Einfluss einer kombinierten Behandlung der Zellen mit U69,593 auf die Regulation der Resistenzmarker untersucht.

6.2.6.1 *PTEN*

In chronisch mit Trastuzumab behandelten Zellen (SKBR3-T) wird PTEN herabreguliert. Demgegenüber kommt es unter Opioidenfluss (SKBR3-TU, SKBR3-U) zu einer Steigerung der

absoluten Menge an in den Zellen vorhandenem PTEN. Zudem liegt in mit U69,593 behandelten Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung von PTEN an den Aminosäuren Serin 380, Threonin 382 und 383 vor. Die Phosphorylierung der genannten Aminosäuren führt zu einer Inaktivierung von PTEN. Abbildung 6-10 zeigt die Ergebnisse.

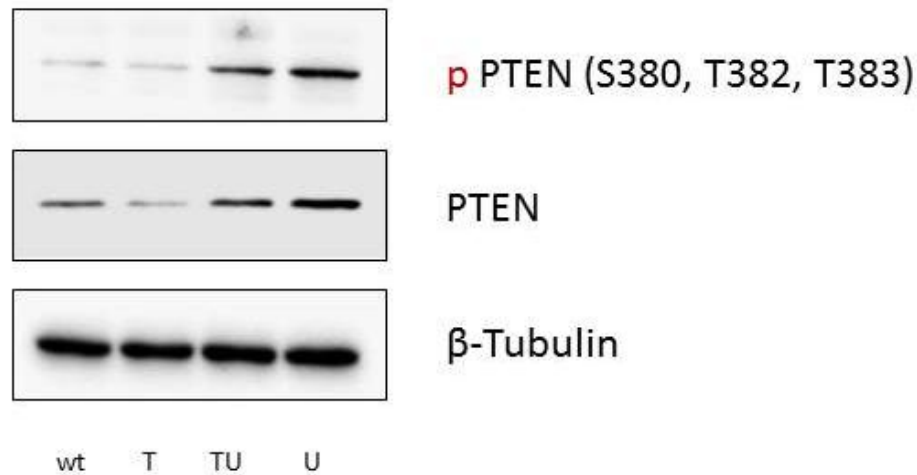


Abbildung 6-10: Regulation von PTEN in chronisch behandelten Zellen.

PTEN wurde in Solubilisaten der unterschiedlichen Zelllinien SKBR3-wt, -T, -TU und -U im Western Blot bestimmt. Dargestellt sind sowohl die Gesamtmenge des Proteins als auch die phosphorylierte Form (pPTEN). β -Tubulin wurde zur Kontrolle des Auftrags vergleichbarer Tubulinmengen herangezogen.

6.2.6.2 *P27kip1*

In Zellsolubilisaten von SKBR3-T liegt p27kip1 in verminderter Menge vor. In SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen kommt es dagegen zu einer Hochregulation von p27kip1. Somit reguliert U69,593 diesen für Trastuzumab typischen Resistenzmarker gegenläufig (Abbildung 6-11).

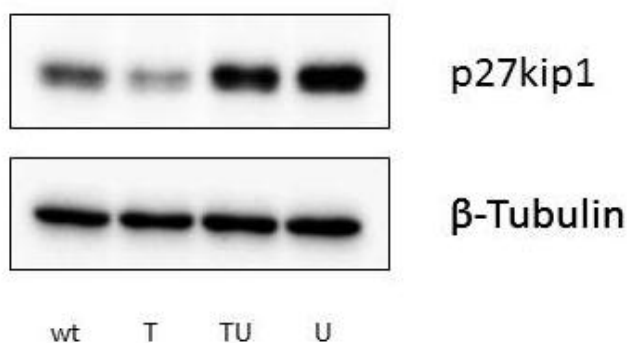


Abbildung 6-11: Regulation von p27kip1 in chronisch behandelten Zellen.

Die Menge des in den Zellen enthaltenen p27kip1 wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot dargestellt. Als Ladekontrolle diente β -Tubulin.

6.2.6.3 c-Src

6.2.6.3.1 *Western Blot*

Weiterhin wurde die in den Zelllinien vorhandene Menge an c-Src im Western Blot verglichen (Abbildung 6-12). Im Vergleich zu SKBR3-wt und SKBR3-T Zellen weisen SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen eine erhöhte Menge an c-Src auf. Zudem ist in den opioidbehandelten Zellen die Phosphorylierung von c-Src an Tyrosin 527 (p c-Src) erhöht. Die Phosphorylierung an Tyr 527 resultiert in einer Inaktivierung des Proteins.

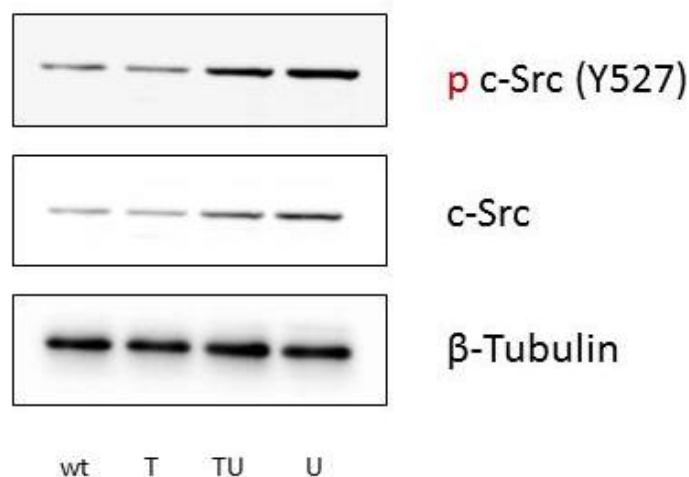


Abbildung 6-12: Regulation von c-Src.

In Solubilisaten von SKBR3-wt, -T, -TU und -U Zellen wurde mittels spezifischer Antikörper im Western Blot sowohl die gesamte Menge von c-Src, als auch die Menge des an Tyrosin 527 phosphorylierten c-Src nachgewiesen

6.2.6.3.2 *Immunzytochemie*

Die Verteilung des c-Src in die unterschiedlichen intrazellulären Kompartimente wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht.

Während in Parentalzellen lediglich eine schwache, über das Zytosol verteilte Fluoreszenz erkennbar ist, zeigen SKBR3-T, -TU und -U-Zellen eine membranständige Fluoreszenz. Dies spricht für eine Aktivierung und Umverteilung von c-Src an die Zellmembran durch

chronische Behandlung mit U69,593 bzw. Trastuzumab (Abbildung 6-13).

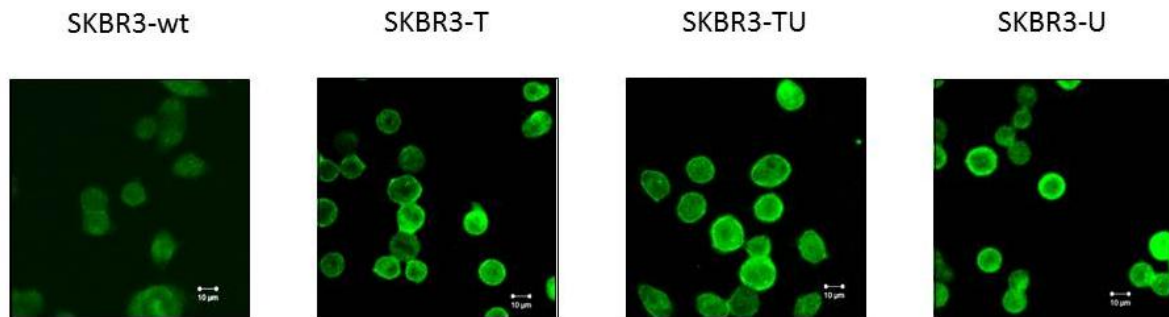


Abbildung 6-13: Immunzytochemischer Nachweis von c-Src

Die Zellen wurden ausplattiert und für 2 weitere Tage in vollständigem Medium in Anwesenheit der Pharmaka kultiviert. Sowohl chronisch mit Opiat als auch mit dem HER2-Antikörper behandelte Zellen zeigen eine verstärkte Anreicherung von c-Src an der Zellmembran.

6.2.6.4 *c-Cbl*

Auch c-Cbl, das an der Endozytose von HER1- und HER2-Rezeptoren beteiligt ist, unterliegt einer Regulation durch Trastuzumab.

6.2.6.4.1 *Western Blot*

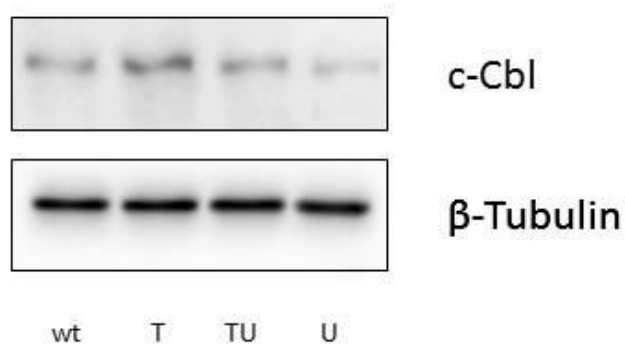


Abbildung 6-14: Regulation von c-Cbl.

Die Regulation von c-Cbl wurde in Zellsolubilisaten im Western Blot untersucht. β -Tubulin wurde als Marker für den Auftrag vergleichbarer Proteinmengen herangezogen.

Zunächst wurden die absoluten Mengen von c-Cbl im Western Blot dargestellt (Abbildung 6-14). In SKBR3-T Zellen liegt c-Cbl in größerer Menge vor als in Parental- und SKBR3-TU

Zellen. Die chronische Behandlung mit U69,593 bedingt eine Abnahme von c-Cbl. Somit unterliegt c-Cbl einer gegenteiligen Regulation durch Trastuzumab und U69,593.

6.2.6.4.2 Immunzytochemie

Nach Aktivierung von HER1- und HER2- Rezeptoren wird c-Cbl an die Zellmembran transloziert. Aus diesem Grund wurde die subzelluläre Verteilung von c-Cbl mittels Immunzytochemie untersucht.

SKBR3-wt und SKBR3-U zeigen nur eine schwache, über das Zytosol verteilte Fluoreszenz. Dagegen ist in SKBR3-T und SKBR3-TU eine starke membranassoziierte Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 6-15).

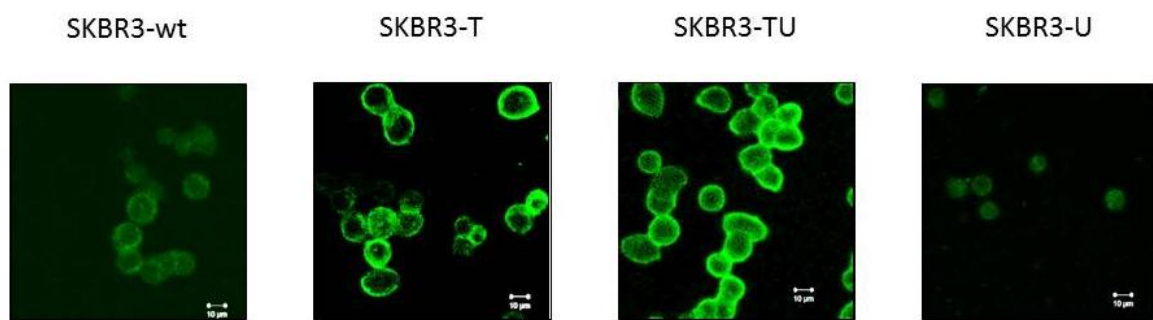


Abbildung 6-15: Immunzytochemischer Nachweis von c-Cbl.

Nach 2-tägiger Kultivierung in Anwesenheit der Pharmaka wurden die Zellen mit einem gegen c-Cbl gerichteten Antikörper angefärbt. Im Vergleich zu Parental- und opioidbehandelten Zellen zeigen SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen eine starke Anreicherung von c-Cbl an der Zellmembran.

6.2.7 Resistenz gegenüber Trastuzumab

Die funktionellen Konsequenzen der beschriebenen Veränderungen auf Ebene der Opioidrezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen und nachgeschalteten Signalmechanismen auf die akute Wirkung von Trastuzumab auf das Zellwachstum wurde in den verschiedenen Zelllinien bestimmt, die über drei Tage in serumfreiem Medium in An- oder Abwesenheit von Trastuzumab oder Trastuzumab und U69,593 kultiviert wurden. Zunächst ist ersichtlich, dass Trastuzumab wie erwartet das Zellwachstum in Parentalzellen hemmt. Die chronische Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von U69,593 besitzt keinen Einfluss auf die akute Trastuzumabwirkung. Im Gegensatz dazu entwickelt sich nach chronischer Behandlung der

Zellen eine Resistenz gegen die akute Trastuzumabwirkung. Die Co-Inkubation der Zellen mit U69,593 (SKBR3-TU) hat keinen Einfluss auf die Resistenzbildung. Bestimmt man die akute Trastuzumabwirkung in Gegenwart des Opioids, so verstärkt U69,593 die akute Hemmung des Wachstums von SKBR3-T Zellen signifikant.

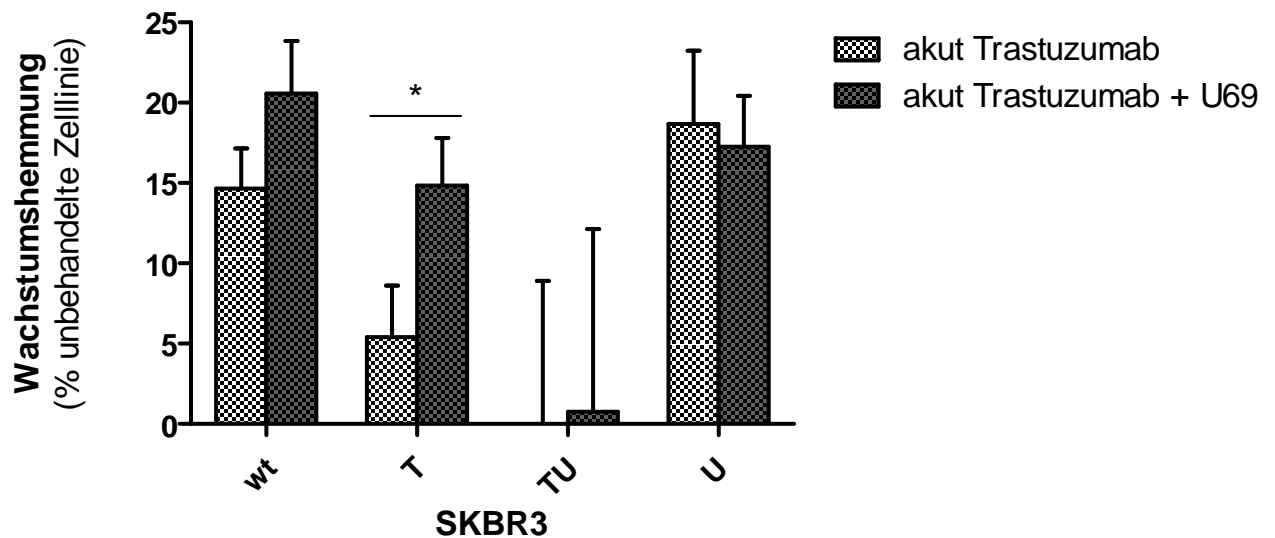


Abbildung 6-16: Akute Hemmung des Zellwachstums durch Trastuzumab und U69,593.

Die chronisch behandelten Zellen wurden ausplattiert und für drei Tage in serumfreiem Medium in An- oder Abwesenheit von Trastuzumab oder Trastuzumab und U69,593 kultiviert. Das Zellwachstum wurde im Kristallviolett-Assay ermittelt. Die Resistenz der SKBR3-T Zellen gegen die akute Hemmung des Zellwachstums durch Trastuzumab wird bei gleichzeitiger Aktivierung des κ -Opioidrezeptors aufgehoben. Dargestellt sind Mittelwert und SEM aus n=4 unabhängigen Versuchen, normalisiert auf unbehandelte Parentalzellen. * Statistisch signifikant bei $p < 0,05$

6.2.8 Reversibilität der chronisch induzierten Wachstumsänderungen

Um festzustellen, ob die beobachteten Effekte der chronischen Exposition gegenüber Trastuzumab- und/oder U69,593 auf das Zellwachstum und die Auslösung der Apoptose von Dauer sind, wurden die Zellen gewaschen und für drei Tage ohne Pharmaka kultiviert. Nach Beendigung der chronischen Exposition von SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen gegenüber ihren Pharmaka gleicht sich das Zellwachstum den Parentalzellen wieder an. Die Ergebnisse zeigen, dass die chronische Einwirkung von κ -Opioid und HER2-Antikörper keine irreversible Wachstumshemmung verursacht. Die Zellen entwickeln somit keine dauerhafte Resistenz gegenüber der eingesetzten Konzentration von Trastuzumab.

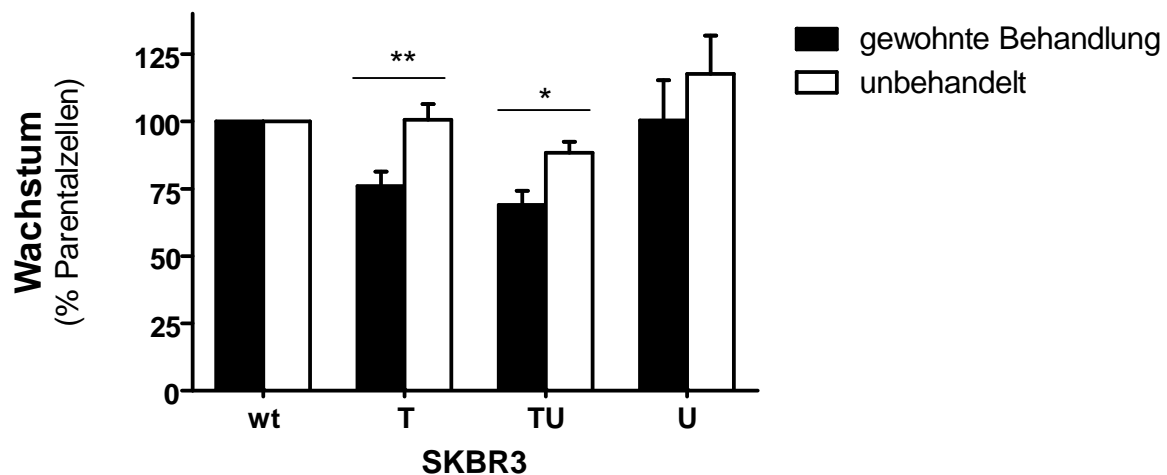


Abbildung 6-17: Wachstumsverhalten in Abwesenheit von Trastuzumab und U69,593.

Die Zellen wurden ausplattiert und das Zellwachstum nach dreitägiger, serumfreier Kultivierung im Kristallviolett-Assay ermittelt. Die Daten wurden auf Parentalzellen normalisiert. SKBR3-T und SKBR3-TU zeigen nach Beendigung der chronischen Behandlung eine signifikante Steigerung des Wachstums, wobei SKBR3-T wieder das gleiche Niveau erreichen wie SKBR3-wt Zellen. Die Daten zeigen Mittelwert und SEM von n=4 unabhängigen Versuchen, durchgeführt jeweils in Doppelbestimmung. Statistisch signifikant * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.2.9 Toleranz niedriger Trastuzumabkonzentrationen

Schließlich stellte sich die Frage, ob die chronische Vorbehandlung der Zellen die Empfindlichkeit gegenüber Trastuzumab grundsätzlich verändert und inwieweit man die SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen als resistent bezeichnen könnte.

Aus diesem Grund wurde eine Sterbekurve erstellt, bei der die Zellen für 5 Tage in Gegenwart geringer Konzentrationen von Trastuzumab (160 – 1200 ng/ml) kultiviert wurden. Dabei zeigte sich, dass sowohl SKBR3-T als auch SKBR3-TU Zellen eine Toleranz gegenüber niedrigen Trastuzumab-Konzentrationen aufweisen. Auch SKBR3-U entwickeln eine, wenngleich geringer ausgeprägte Toleranz gegenüber der akuten Trastuzumabwirkung. Nicht nur der HER2-Antikörper, sondern auch der κ -Opioidagonist setzen die Empfindlichkeit gegenüber Trastuzumab herab. Eine vollständige Resistenz bildet sich dagegen bei keiner der Zelllinien aus.

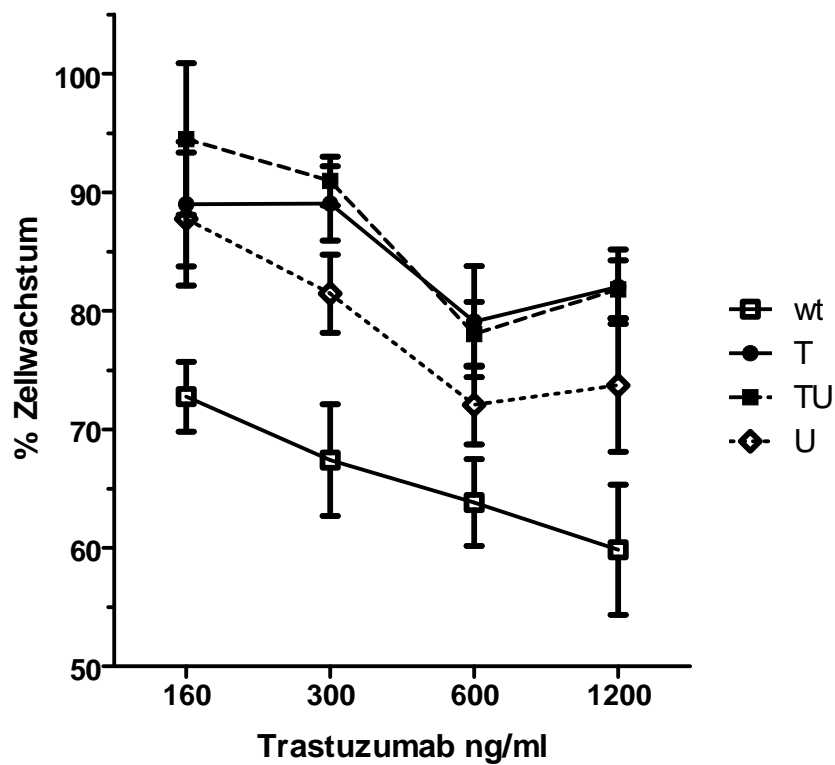


Abbildung 6-18: Sterbekurve mit ansteigenden Konzentrationen an Trastuzumab.

Die Zellen wurden 5 Tage lang unter serumfreien Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Trastuzumab kultiviert und mit Kristallviolett angefärbt. Dargestellt ist die Zellzahl jeweils in Bezug auf Zellen der gleichen Linie, die über die gleiche Zeitdauer ohne Liganden kultiviert waren. Zu beachten ist, dass die Co-Inkubation der Zellen mit U69,593 die Resistenzentwicklung gegenüber niedriger Konzentrationen von Trastuzumab nicht beeinflusst. Die Daten zeigen Mittelwert und SEM von n=4 unabhängigen Experimenten.

7 DISKUSSION

7.1 Resistenzbildung nach chronischer Behandlung von SKBR3 Zellen mit Trastuzumab.

SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen wurden durch Kultivierung über 6 Monate in Anwesenheit von 20 µg/ml Trastuzumab bzw. Trastuzumab und 1 µM U69,593 aus HER2-positiven parentalen SKBR3 Zellen (SKBR3-wt) hergestellt. Die verwendete Dosis führt nach kurzzeitiger Exposition von Parentalzellen zu einer starken Hemmung des Zellwachstums. Im Vergleich dazu fällt die Wachstumshemmung bei SKBR3-T und SKBR3-TU deutlich geringer aus. Dass SKBR3-T und SKBR3-TU Zellen bei diesen hohen Dosen von Trastuzumab immer noch gut wachsen, lässt auf die Selektion weniger sensibler Zellen schließen. In der Literatur werden solche Zellpopulationen, die aufgrund einer 3-monatigen Kultivierung unter kontinuierlichem Trastuzumabefluss eine geringer ausgeprägte Trastuzumab-induzierte Hemmung des Zellwachstums zeigen, in der Regel als resistent definiert [137].

Die derzeit gängige Definition wird in der vorliegenden Arbeit anhand von drei Beobachtungen infrage gestellt:

1. Trastuzumab besitzt nach 6-monatiger Behandlung der Zellen nach wie vor eine akut inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum und die Induktion der Apoptose. Zwar fällt die Hemmung des Zellwachstums in chronisch mit Trastuzumab behandelten Zellen deutlich schwächer aus als in SKBR3-wt Zellen, aber sie ist dennoch noch vorhanden.
2. Die Abschwächung des inhibitorischen Effekts auf das Zellwachstum ist transient. Bereits nach einem 3-tägigen Entzug von Trastuzumab gleicht sich das Zellwachstum von SKBR3-T Zellen demjenigen der Parentalzellen an.
3. Zudem reagieren diese Zellen bereits auf 0,6 µg/ml Trastuzumab mit einer 20%igen Wachstumshemmung, einer Dosis die weit unter der für die chronische Behandlung benutzten Dosis von 20 µg/ml liegt.

Aufgrund der Reversibilität der Veränderungen und der Wirksamkeit von Trastuzumab in geringeren Konzentrationen können die Zellen nicht als resistent oder tolerant bezeichnet werden. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, wie sich die in der vorliegenden Arbeit für SKBR3-T Zellen charakteristischen Veränderungen auf Ebene der Rezeptor-

Tyrosinkinasen und intrazellulären Signalwege nach einer Beendigung der chronischen Behandlung entwickeln.

Wie in der Annexin V/Propidiumjodidfärbung erkennbar, weisen chronisch mit Trastuzumab behandelte Zellen eine gesteigerte Apoptose auf. Nachdem die Zellen nur eine geringfügige Hemmung des Zellwachstums aufweisen, müsste dieser Effekt durch eine erhöhte Proliferationsrate kompensiert werden.

Während die verstärkte Apoptoserate bei SKBR3-T auch im Western Blot in einer verminderten Phosphorylierung der Akt zum Ausdruck kommt, findet sich bei Opioid-behandelten Zellen eine stärkere Phosphorylierung der Akt. Die ebenso starke Phosphorylierung der Akt in SKBR3-TU Zellen deutet darauf hin, dass die chronische Opioidbehandlung die durch Trastuzumab vermittelte Dephosphorylierung der Akt verhindert.

7.2 Trastuzumab sensibilisiert SKBR3 Zellen gegenüber Opioiden.

SKBR3-T Zellen zeigen eine moderate Hochregulation der Anzahl voll funktionsfähiger κ -Opioidrezeptoren. Damit steigert die chronische Behandlung mit Trastuzumab die Sensibilität der Zellen gegenüber Opioiden. Die Tatsache, dass dieser Effekt in SKBR3-TU nicht festgestellt werden kann, deutet auf eine Interaktion der beiden Rezeptorsysteme auf Ebene der Rezeptorregulation hin.

7.3 Die gleichzeitige Verabreichung von U69,593 sensibilisiert die SKBR3 Zellen gegenüber Trastuzumab.

Während der HER2-Rezeptor durch die chronische Einwirkung von Trastuzumab in SKBR3-T Zellen herabreguliert wird, kommt es in SKBR3-TU Zellen zu einer Hochregulation von HER2. Da dies auch in SKBR3-U zu beobachten ist, kann eine Regulation der Endozytose von HER2-Rezeptoren durch Opioiden in Erwägung gezogen werden. Durch die Hochregulation des HER2-Rezeptors durch Opioiden werden die Zellen gegenüber der Wirkung von Trastuzumab sensibilisiert. Dadurch kann die Verstärkung der Wachstumshemmung in SKBR3-TU Zellen erklärt werden. Allerdings muss dieser Effekt auf eine längerfristige Rezeptoradaptation

zurückgeführt werden, da eine vergleichbare Beeinflussung des Zellwachstums bei kurzfristiger Einwirkung von Trastuzumab und U69,593 auf SKBR3-wt Zellen nicht beobachtet wird. Im Gegenteil, durch die gleichzeitige Zugabe des κ -Agonisten über nur 3 Tage wird der wachstumshemmende Effekt von Trastuzumab leicht abgeschwächt. Ebenso zeigen auch SKBR3-TU Zellen nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Trastuzumab und U69,593 eine starke Wachstumshemmung. Nach Entzug des Opioids wachsen sie wieder schneller.

7.4 c-Src, PTEN und p27kip1 stellen keine Resistenzmarker für Trastuzumab dar.

In der Literatur werden Veränderungen der Expression von c-Src, PTEN und p27kip1 als spezifische Kennzeichen einer Resistenz gegenüber Trastuzumab aufgeführt, da sie zeitgleich mit einer Abschwächung der akuten Wirkung von Trastuzumab einhergehen [3, 94, 101, 137]. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass Veränderungen dieser Proteine auch nach einer längerfristigen Behandlung mit Opioiden auftreten. Opiode regulieren diese Proteine in der Regel gegenteilig. Sie sind somit keinesfalls als spezifische Resistenzmarker für Trastuzumab in Mammakarzinomzellen zu interpretieren. Da c-Src, PTEN und p27kip1 in SKBR3-TU und SKBR3-U gleichsinnig reguliert werden, dominiert auch hier der Opioideneffekt. Trotzdem zeigen diese Zellen eine den SKBR3-T Zellen entsprechende Trastuzumab-Resistenz. Dies weist darauf hin, dass die Resistenz gegen Trastuzumab unabhängig von Veränderungen der bekannten Resistenzmarker auftritt.

7.5 Interaktionen zwischen Opioid- und Rezeptor-Tyrosinkinase-Rezeptoren.

Die Regulation des Zellwachstums durch die Behandlung mit U69,593 und dem HER2-Antikörper resultiert aus Adaptationen auf Ebene der Rezeptor-Tyrosinkinase-Rezeptoren. Während der HER2-Rezeptor in SKBR3-T Zellen deutlich herunterreguliert wird, ist seine Expression in SKBR3-TU und SKBR3-U stark erhöht. Offensichtlich liegt eine Interaktion von Trastuzumab und U69,593 vor. Dies hat eine unmittelbare Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der SKBR3 TU Zellen: Aufgrund der Hochregulation des HER2 in SKBR3-

TU Zellen sind mehr Rezeptoren vorhanden, an die Trastuzumab binden und so das Zellwachstum hemmen kann.

7.5.1 Möglichkeiten der Interaktion der beiden Rezeptorsysteme in SKBR3-TU Zellen.

7.5.1.1 *MAP- und Akt-Kinase*

Opioidrezeptoren können ebenso wie Rezeptor-Tyrosinkinasen die Erk1/2 aktivieren. Hierfür stehen als alternative Signalwege entweder eine Aktivierung von c-Src oder eine durch Matrix-Metalloproteasen vermittelte Crossregulation von HER-Rezeptoren zur Verfügung [33, 73]. Die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), wie z.B. der Cleaved Caspase, setzt Vorläuferproteine von HER-Rezeptorliganden aus der Zellmembran frei [129], die ihrerseits eine auto- und parakrine Regulation von HER-Rezeptoren auslösen können. Auch der PI3K/Akt-Signalweg wird von HER- und Opioidrezeptoren genutzt und kann somit eine Interaktionsmöglichkeit zwischen beiden Rezeptorsysteme darstellen [33, 74].

7.5.1.2 *c-Src vermittelte Interaktionen*

7.5.1.2.1 *Direkte Interaktion über c-Src*

Sowohl über Opioid- als auch HER-Rezeptoren kann c-Src wie oben beschrieben aktiviert werden. Die verstärkte Immunfluoreszenz in allen drei behandelten Zelllinien lässt auf eine Aktivierung und damit verbundene Rekrutierung des c-Src an die Zellmembran schließen. Eine Zunahme von c-Src ist allerdings nur in SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen erkennbar. In weiterführenden Studien wäre es daher interessant, den Phosphorylierungszustand von Tyrosin 416 zu untersuchen.

7.5.1.2.2 *Interaktion auf Ebene der Clathrin-vermittelten Rezeptorinternalisierung*

Eine denkbare Möglichkeit für die Interaktion zwischen Opioid- und HER-Rezeptoren könnte auf Ebene der Internalisierung und des Recyclings liegen: Sowohl GPCRs als auch RTKs werden über Clathrin-vermittelte Mechanismen von ihren Liganden getrennt und degradiert bzw. recyclet [33, 132]. Diese Internalisierung besitzt zwei Effekte: Sie ist zum einen ein Teil des ligandenvermittelten Signals, zum anderen führt sie zu einem verminderten Vorhandensein der Rezeptoren an der Zellmembran.

c-Src ist an mehreren Stufen der Clathrin-vermittelten Internalisierung beteiligt. Zum einen trägt es direkt zu dessen Phosphorylierung bei, zum anderen phosphoryliert es die GTPase Dynamin, welche die Abspaltung der Clathrin-coated-pits von der Plasmamembran vermittelt [44].

Durch eine Wechselbeziehung der beiden Rezeptorsysteme auf dieser Ebene ließe sich erklären, weshalb die Zellen entweder mit einer Hochregulation des κ -Opioidrezeptors oder des HER2-Rezeptors auf eine Behandlung mit Trastuzumab und U69,593 reagieren. Dies könnte auf eine vermehrte Internalisierung des jeweils anderen Rezeptors zurückgeführt werden. Durch eine vollständige Inanspruchnahme des Clathrin-Systems wird die verbleibende Kapazität für die Internalisierung des jeweils anderen Rezeptorsystems eingeschränkt. Infolgedessen könnte bei SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen, die eine gesteigerte Expression des HER2 aufweisen, der Antikörper Trastuzumab besser wirken. Ebenso könnten bei SKBR3-T Zellen, die eine erhöhte Dichte von κ -Opioidrezeptoren aufweisen, Opiode besser wirken. Bemerkenswert dabei ist, dass in SKBR3-TU Zellen die Internalisierung der Opioidrezeptoren eine höhere Priorität besitzt als die Internalisierung der HER2-Rezeptoren. Dadurch könnte das verminderte Wachstum dieser Zelllinie erklärt werden. Die beschriebenen Zusammenhänge sind in Abbildung 7-1 dargestellt.

Die Hochregulation von HER1 in SKBR3-T Zellen stellt keinen Widerspruch zu dieser Theorie dar. Da die Zellen nicht dauerhaft mit einem HER1-Liganden behandelt werden, kommt es auch nicht zu einer verstärkten Internalisierung dieses Rezeptors. Stattdessen ist seine vermehrte Expression als kompensatorische Maßnahme zu sehen, die der Herunterregulation von HER2 entgegen wirkt [138].

7.5.1.2.3 Interaktion durch Regulation von c-Cbl

Auch über den Einfluss, den c-Src auf c-Cbl besitzt, kann eine Interaktion zwischen GPCR- und RTK-Systemen zustande kommen. Wie oben beschrieben, trägt die Ubiquitinierung durch c-Cbl zur Internalisierung des HER1-Rezeptors bei und unterstützt so dessen Herunterregulation. Durch die Aktivierung von c-Src, wie sie nach Opioidbehandlung in den Zellen auftritt, kann es zur Degradierung von c-Cbl kommen [139], die der Herunterregulation von HER1 entgegen wirkt. Diese Theorie lässt sich in Bezug auf SKBR3-TU und SKBR3-U Zellen allerdings nur teilweise mit den Ergebnissen der Western Blot

Experimente untermauern. Denn diese Zelllinien zeigen eine Hochregulation von c-Src. Insbesondere SKBR3-U Zellen weisen zudem eine verringerte Expression von c-Cbl auf.

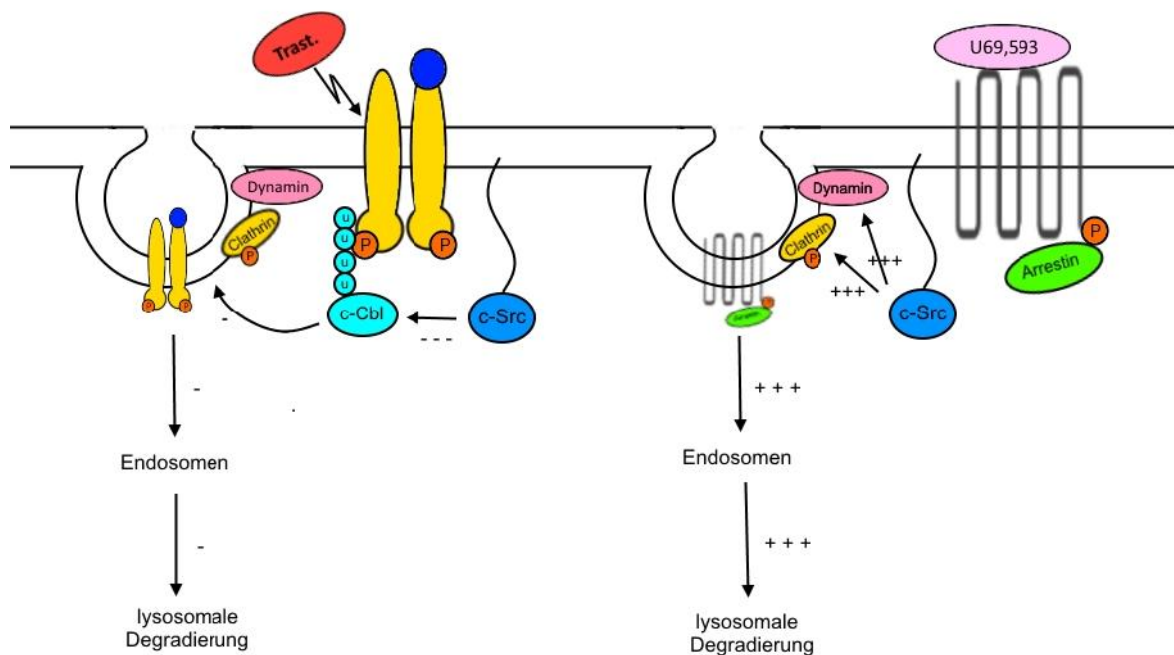


Abbildung 7-1: Modell der Internalisierung der Rezeptorsysteme über Clathrin in SKBR3-TU Zellen.

Durch die dauerhafte Anwesenheit des κ -Opioidrezeptoragonisten U69,593 und die damit einhergehende Stimulierung des KOR, kommt es zur vermehrten Internalisierung dieses Rezeptors. Die Internalisierung des KOR erfolgt nach Bindung von β -Arrestin1 über Clathrin-vermittelte Mechanismen, wobei Dynamin für die Abschnürung der sog. Clathrin-coated pits von der Zellmembran verantwortlich ist. Dieser Vorgang wird durch c-Src initiiert. Durch Interaktion auf Ebene des c-Src kann die Internalisierung der RTKs beeinflusst werden. Dies könnte über eine c-Src-vermittelte Regulation von c-Cbl erfolgen. Aufgrund dessen stehen mehr HER2-Rezeptoren auf der Zellmembran für die Bindung von Trastuzumab zur Verfügung, was in einem verminderten Zellwachstum der SKBR3-TU Zellen resultiert.

In SKBR3-TU Zellen scheint die vermehrte Expression von c-Src sich nicht auf die Regulation von c-Cbl auszuwirken. Auch die Expression von HER1 ist unverändert. Alternativ könnte eine Interaktion zwischen der Trastuzumab-vermittelten Hochregulation von c-Cbl und der U69,593-bedingten Herunterregulation vorliegen.

In SKBR3-T Zellen wird die Menge an c-Src nicht verändert, weshalb keine Degradierung von c-Cbl beobachtet wird. Im Gegenteil, es zeigt sich im Western Blot und in der

Immunzytochemie sogar eine Zunahme der Expression von c-Cbl, welches aktiv an die Zellmembran rekrutiert wird. Hier wird ihm normalerweise die Aufgabe zu Teil, für die Internalisierung vor allem der HER1- und in geringerem Maße auch der HER2-Rezeptoren zu sorgen. Da in SKBR3-T Zellen aber gleichzeitig eine erhöhte Menge an HER1-Rezeptoren vorliegt, scheint es zu einer schnelleren Umsatzrate des HER1 durch eine gesteigerte Expression mit anschließend verstärkter Internalisierung und vermehrtem Recycling zu kommen.

Die Hochregulation von HER1 lässt eine Zunahme von HER1/HER3-Dimeren in SKBR3-T Zellen vermuten, da c-Cbl eine Präferenz für HER1-Homodimere besitzt [83]. Diese These müsste in weiterführenden Rezeptor-Copräzipitationsversuchen untersucht werden.

7.6 Vergleich von SKBR3-TU mit SKBR3-T und SKBR3-U Zellen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sich zusammen mit U69,593 und Trastuzumab behandelte Zellen weder wie SKBR3-T noch wie SKBR3-U Zellen verhalten. Bei einigen Eigenschaften gleichen SKBR3-TU den SKBR3-U Zellen wie z.B. bei der Expression von Opioid- und HER1-Rezeptoren, der Regulation von Akt, Erk1/2 und der Resistenzmarker. Bei einigen anderen hingegen lassen sich Parallelen zu SKBR3-T Zellen erkennen wie z.B. bei der Rekrutierung von c-Cbl an die Zellmembran, der verminderten Wachstumsrate und der relativen Unempfindlichkeit gegenüber der Wirkung von Trastuzumab. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass in SKBR3-TU Zellen sowohl opioidvermittelte Effekte zum Tragen kommen als auch Trastuzumab vermittelte. Auf zellulärer Ebene scheint jedoch U69,593 die Ausprägung Trastuzumab-vermittelter Effekte zu regulieren.

8 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer chronischen Behandlung von SKBR3 Mammakarzinomzellen mit Opioiden auf die Wirksamkeit von Trastuzumab, einem gegen HER2 gerichteten, therapeutischen Antikörper, und Ausbildung einer sekundären Resistenz gegen dieses untersucht. Hierfür wurden SKBR3 Zellen für 6 Monate mit Trastuzumab und/oder dem spezifischen κ -Opioidrezeptoragonisten U69,593 behandelt und hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und der Ausbildung von Resistenzmarkern charakterisiert.

Obwohl die chronische Opioidbehandlung zu einer Desensibilisierung und Herabregulation der κ -Opioidrezeptoren führt, wird die durch Trastuzumab vermittelte Hemmung des Zellwachstums verstärkt. Damit einher geht eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber der akuten inhibitorischen Wirkung von Trastuzumab. Dieser chronische Opioideffekt wird durch eine Erhöhung der Trastuzumab-induzierten Apoptoserate vermittelt. Die Beeinflussung des Wachstumsverhaltens ist zum einen auf adaptive Veränderungen auf Ebene der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) zurückzuführen. Während die chronische Behandlung der Zellen mit Trastuzumab zu einer Hochregulation des HER1- und IGF-1-Rezeptors sowie einer Herabregulation des HER2- und HER3-Rezeptors führt, blockiert die Co-Inkubation der Zellen mit Opioiden diese Effekte. Darüber hinaus induziert die chronische Opioidbehandlung eine Zunahme des HER2-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die Veränderungen auf RTK-Ebene besitzen Auswirkungen auf die nachgeschalteten Signalmechanismen. So bedingt die chronische Behandlung der Zellen mit Trastuzumab eine verminderte Phosphorylierung des antiapoptotischen Proteins Akt und des proliferationsfördernden Proteins Erk1/2. Diese Effekte werden durch eine Hochregulation der Akt- und Erk1/2-Phosphorylierung durch chronische Behandlung der Zellen mit Opioiden maskiert. Opiode maskieren darüber hinaus die Herabregulation typischer Resistenzmarker für Trastuzumab (PTEN, p27kip1, c-Src), indem sie diese selbst hochregulieren. Die Blockade der Trastuzumab-induzierten Regulation zellulärer Resistenzmarker beeinflusst allerdings nicht die Entstehung einer funktionellen Resistenz gegenüber der durch Trastuzumab vermittelten Hemmung des Zellwachstums. Ein möglicher Erklärungsversuch hierfür könnte die weiterhin in Anwesenheit von Opioiden aufrecht erhaltene Regulation der HER1- und HER2-Rezeptoren durch c-Cbl darstellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Opiode die längerfristige Regulation RTK-assoziierter Signalmechanismen und Resistenzmarker für Trastuzumab, nicht aber die Entstehung einer sekundären Resistenz beeinflussen.

9 SUMMARY

Opioid-mediated Regulation of Receptor-Tyrosin-Kinases

The present study investigates in SKBR3 human breast cancer cells how chronic opioid-treatment influences the efficiency of and acquired resistance against Trastuzumab, therapeutic HER2-antibody. SKBR3 cells had been cultured in presence of either Trastuzumab, the selective κ -opioid receptor agonist U69,593 or both for 6 months, when they were characterized in view of their growth properties and markers of Trastuzumab-resistance. Although chronic exposure of the cells to opioids leads to desensitization and down-regulation of κ -opioid receptors (KOR), it still enhances Trastuzumab-induced growth inhibition slightly. Furthermore opioids sensitize cells to the acute inhibitory influences of Trastuzumab, which results in an increased rate of apoptosis. These opioid-induced effects on cell growth are associated with adapted regulations of receptor-tyrosine kinases (RTK), RTK-associated signaling systems as well as markers of Trastuzumab resistance. While chronic exposure to Trastuzumab leads to up-regulation of HER1- and IGF-1- and down-regulation of HER2- and HER3-receptors, co-incubation with opioids prevents these effects and in turn up-regulates HER2. Similar regulations were observed at the level of RTK-associated signaling pathways. Here chronic opioid treatment prevents attenuation of Erk1/2 and Akt phosphorylation by Trastuzumab. In addition down-regulation of typical markers of resistance to Trastuzumab (PTEN, p27kip1, c-Src) is masked by opioids. Most interestingly, the changes observed at the level of RTK-associated signal transduction pathways do not influence the development of functional Trastuzumab resistance. One possible explanation for this could be that in the presence of opioids HER1 and HER2 are still regulated by c-Cbl. Taken together, the results indicate that opioids are able to regulate RTK-associated signaling mechanisms and markers of Trastuzumab resistance, but not development of resistance.

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Muthuswamy, S.K., *Trastuzumab resistance: all roads lead to SRC*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 416-8.
2. Gusterson, B.A., et al., *Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 1992. **10**(7): p. 1049-56.
3. Zhang, S., et al., *Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 461-9.
4. Weingärtner, I.R., *Regulation des Wachstums von BT474 humanen Mammakarzinomzellen durch Morphin*. 2013, München.
5. Koch, T. and V. Holtt, *Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 199-206.
6. Gartner, V. and H. Watzke, *[Palliative treatment. Basic principles and symptom control]*. Wien Klin Wochenschr, 2006. **118**(17-18 Suppl 2): p. 123-33; quiz 134.
7. Afsharimani, B., P. Cabot, and M.O. Parat, *Morphine and tumor growth and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(2): p. 225-38.
8. Dhawan, B.N., et al., *International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors*. Pharmacol Rev, 1996. **48**(4): p. 567-92.
9. Kosterlitz, H.W., et al., *Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu- and delta-receptors*. Br J Pharmacol, 1980. **68**(2): p. 333-42.
10. Martin, W.R., et al., *The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1976. **197**(3): p. 517-32.
11. Mattia, A., et al., *Spinal opioid delta antinociception in the mouse: mediation by a 5'-NTII-sensitive delta receptor subtype*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **260**(2): p. 518-25.
12. Sofuoglu, M., P.S. Portoghesi, and A.E. Takemori, *Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for delta opioid receptor subtypes*. Life Sci, 1991. **49**(19): p. P153-6.
13. Morre, M., et al., *Kappa binding sites in guinea-pig brain membranes: evidence for a dynorphin-resistant subtype*. Life Sci, 1983. **33 Suppl 1**: p. 179-82.
14. Castanas, E., et al., *Kappa 3: a novel subtype of the kappa opioid site in bovine adrenal medulla, highly selective for Met-enkephalin-Arg6-Phe7*. Neuropeptides, 1984. **5**(1-3): p. 133-6.
15. Clark, J.A., et al., *Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **251**(2): p. 461-8.
16. Stefano, G.B., et al., *Presence of the mu3 opiate receptor in endothelial cells. Coupling to nitric oxide production and vasodilation*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30290-3.
17. Pasternak, G.W., *High and low affinity opioid binding sites: relationship to mu and delta sites*. Life Sci, 1982. **31**(12-13): p. 1303-6.
18. Reisine, T. and G.I. Bell, *Molecular biology of opioid receptors*. Trends Neurosci, 1993. **16**(12): p. 506-10.
19. Law, P.Y., Y.H. Wong, and H.H. Loh, *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 389-430.
20. George, S.R., et al., *Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26128-35.
21. Bouvier, M., *Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(4): p. 274-86.
22. Devi, L.A., *Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(10): p. 532-7.
23. Milligan, G., *G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology*. Mol Pharmacol, 2004. **66**(1): p. 1-7.
24. Lagerstrom, M.C. and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.

25. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 615-49.
26. Gudermann, T., F. Kalkbrenner, and G. Schultz, *Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 429-59.
27. Wu, H., et al., *Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 327-32.
28. Fung, B.K., *Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. I. Separation and reconstitution of the subunits*. J Biol Chem, 1983. **258**(17): p. 10495-502.
29. Neer, E.J., *G proteins: critical control points for transmembrane signals*. Protein Sci, 1994. **3**(1): p. 3-14.
30. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
31. Eisinger, D.A., *Internalisierung von akut und chronisch aktivierten Opioidrezeptoren*. 2000, München.
32. Standifer, K.M. and G.W. Pasternak, *G proteins and opioid receptor-mediated signalling*. Cell Signal, 1997. **9**(3-4): p. 237-48.
33. Tegeder, I. and G. Geisslinger, *Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(3): p. 351-69.
34. Williams, J.T., et al., *Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance*. Pharmacol Rev, 2013. **65**(1): p. 223-54.
35. Hescheler, J., et al., *The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels*. Nature, 1987. **325**(6103): p. 445-7.
36. Corbett, A.D., et al., *75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S153-62.
37. Chen, Y.L., P.Y. Law, and H.H. Loh, *The other side of the opioid story: modulation of cell growth and survival signaling*. Curr Med Chem, 2008. **15**(8): p. 772-8.
38. Olianias, M.C. and P. Onali, *Mediation by G protein betagamma subunits of the opioid stimulation of adenylyl cyclase activity in rat olfactory bulb*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(6): p. 649-52.
39. Fry, J.P., W. Zieglgansberger, and A. Herz, *Development of acute opioid tolerance and dependence in rat striatal neurones*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1980. **313**(2): p. 145-9.
40. Minami, M. and M. Satoh, *Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions*. Neurosci Res, 1995. **23**(2): p. 121-45.
41. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 447-50.
42. Ferguson, S.S., et al., *G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins*. Can J Physiol Pharmacol, 1996. **74**(10): p. 1095-110.
43. Bailey, C.P. and M. Connor, *Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence*. Curr Opin Pharmacol, 2005. **5**(1): p. 60-8.
44. Kim, J., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor internalization by G protein-coupled receptors*. Biochemistry, 2003. **42**(10): p. 2887-94.
45. Eisinger, D.A., H. Ammer, and R. Schulz, *Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization*. J Neurosci, 2002. **22**(23): p. 10192-200.
46. Sibley, D.R., et al., *Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation*. Cell, 1987. **48**(6): p. 913-22.
47. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-13.
48. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
49. Schlessinger, J. and A. Ullrich, *Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases*. Neuron, 1992. **9**(3): p. 383-91.

50. Bargmann, C.I., M.C. Hung, and R.A. Weinberg, *Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185*. Cell, 1986. **45**(5): p. 649-57.
51. Yamamoto, T., et al., *Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor*. Nature, 1986. **319**(6050): p. 230-4.
52. Kraus, M.H., et al., *Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9193-7.
53. Plowman, G.D., et al., *Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1746-50.
54. Rajkumar, T. and W.J. Gullick, *The type I growth factor receptors in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1994. **29**(1): p. 3-9.
55. Gullick, W.J., *The c-erbB3/HER3 receptor in human cancer*. Cancer Surv, 1996. **27**: p. 339-49.
56. Chen, X., T.K. Yeung, and Z. Wang, *Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(3): p. 757-63.
57. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
58. Warren, C.M. and R. Landgraf, *Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control*. Cell Signal, 2006. **18**(7): p. 923-33.
59. Mitri, Z., T. Constantine, and R. O'Regan, *The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy*. Chemotherapy Research and Practice, 2012. **2012**: p. 7.
60. Alimandi, M., et al., *Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas*. Oncogene, 1995. **10**(9): p. 1813-21.
61. Pinkas-Kramarski, R., et al., *The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin*. Oncogene, 1998. **16**(10): p. 1249-58.
62. Wallasch, C., et al., *Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3*. Embo j, 1995. **14**(17): p. 4267-75.
63. Graus-Porta, D., et al., *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling*. Embo j, 1997. **16**(7): p. 1647-55.
64. Pinkas-Kramarski, R., et al., *Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions*. Embo j, 1996. **15**(10): p. 2452-67.
65. Riese, D.J., 2nd, et al., *The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5770-6.
66. Karunakaran, D., et al., *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer*. Embo j, 1996. **15**(2): p. 254-64.
67. Lonardo, F., et al., *The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand*. New Biol, 1990. **2**(11): p. 992-1003.
68. Yarden, Y., *Biology of HER2 and its importance in breast cancer*. Oncology, 2001. **61 Suppl 2**: p. 1-13.
69. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **19**(3): p. 183-232.
70. Sweeney, C., et al., *Ligand discrimination in signaling through an ErbB4 receptor homodimer*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19803-7.
71. Olayioye, M.A., et al., *ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5042-51.
72. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
73. Prenzel, N., et al., *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 11-31.
74. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.

75. Soltoff, S.P. and L.C. Cantley, *p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(1): p. 563-7.
76. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4240-5.
77. Baulida, J., et al., *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired*. J Biol Chem, 1996. **271**(9): p. 5251-7.
78. Waterman, H., et al., *Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13819-27.
79. Worthylake, R. and H.S. Wiley, *Structural aspects of the epidermal growth factor receptor required for transmodulation of erbB-2/neu*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8594-601.
80. Lenferink, A.E., et al., *Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers*. Embo j, 1998. **17**(12): p. 3385-97.
81. Muthuswamy, S.K., M. Gilman, and J.S. Brugge, *Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6845-57.
82. Levkowitz, G., et al., *c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor*. Genes Dev, 1998. **12**(23): p. 3663-74.
83. Dikic, I., I. Szymkiewicz, and P. Soubeyran, *Cbl signaling networks in the regulation of cell function*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(9): p. 1805-27.
84. Levkowitz, G., et al., *Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins*. Oncogene, 1996. **12**(5): p. 1117-25.
85. Harari, D. and Y. Yarden, *Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer*. Oncogene, 2000. **19**(53): p. 6102-14.
86. Luttrell, D.K. and L.M. Luttrell, *Not so strange bedfellows: G-protein-coupled receptors and Src family kinases*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7969-78.
87. Belsches, A.P., M.D. Haskell, and S.J. Parsons, *Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d501-18.
88. Chan, S.D., et al., *Heregulin activation of extracellular acidification in mammary carcinoma cells is associated with expression of HER2 and HER3*. J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22608-13.
89. Colagar, A.H., et al., *Minimal HER1 and HER2 expressions in CHO and HEK-293 cells cause them appropriate negative cells for HERs-related studies*. Research in Molecular Medicine, 2013. **1**(3): p. 6-12.
90. Schmidt, M.H. and I. Dikic, *The Cbl interactome and its functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(12): p. 907-18.
91. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(3): p. 719-26.
92. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
93. Cuello, M., et al., *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, 2001. **61**(12): p. 4892-900.
94. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-27.
95. Molina, M.A., et al., *Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4744-9.
96. Baselga, J., et al., *Mechanism of action of trastuzumab and scientific update*. Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 4-11.

97. Park, S., et al., *The therapeutic effect of anti-HER2/neu antibody depends on both innate and adaptive immunity*. Cancer Cell, 2010. **18**(2): p. 160-70.
98. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
99. Wen, X.F., et al., *HER2 signaling modulates the equilibrium between pro- and antiangiogenic factors via distinct pathways: implications for HER2-targeted antibody therapy*. Oncogene, 2006. **25**(52): p. 6986-96.
100. Nahta, R., *Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer*. ISRN Oncology, 2012. **2012**: p. 16.
101. Gallardo, A., et al., *Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas*. Br J Cancer, 2012. **106**(8): p. 1367-73.
102. Diermeier, S., et al., *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, 2005. **304**(2): p. 604-19.
103. Lu, Y., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin)*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(24): p. 1852-7.
104. Nahta, R., et al., *Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 11118-28.
105. Huang, X., et al., *Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-I receptor in breast cancer cells resistant to herceptin*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 1204-14.
106. Price-Schiavi, S.A., et al., *Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance*. Int J Cancer, 2002. **99**(6): p. 783-91.
107. Fessler, S.P., et al., *MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells*. Breast Cancer Res Treat, 2009. **118**(1): p. 113-24.
108. Jimenez, C., et al., *Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase*. Embo j, 1998. **17**(3): p. 743-53.
109. Saal, L.H., et al., *PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma*. Cancer Res, 2005. **65**(7): p. 2554-9.
110. Le, X.F., et al., *The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23441-50.
111. Viani, G.A., et al., *Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 153.
112. Pegram, M.D., et al., *Results of two open-label, multicenter phase II studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in HER2-positive advanced breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(10): p. 759-69.
113. Moja, L., et al., *Trastuzumab containing regimens for early breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **4**: p. Cd006243.
114. Fumoleau, P., et al., *A phase I pharmacokinetics study of lapatinib and tamoxifen in metastatic breast cancer (EORTC 10053 Lapatam study)*. Breast, 2014. **23**(5): p. 663-9.
115. Tollefsen, S.E. and K. Thompson, *The structural basis for insulin-like growth factor I receptor high affinity binding*. J Biol Chem, 1988. **263**(31): p. 16267-73.
116. Tollefsen, S.E., R.M. Stoszek, and K. Thompson, *Interaction of the alpha beta dimers of the insulin-like growth factor I receptor is required for receptor autophosphorylation*. Biochemistry, 1991. **30**(1): p. 48-54.
117. Kato, H., et al., *Role of tyrosine kinase activity in signal transduction by the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Characterization of kinase-deficient IGF-I receptors and the action of an IGF-I-mimetic antibody (alpha IR-3)*. J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2655-61.

118. Galvan, V., et al., *Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)*. J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 13325-32.
119. Engen, J.R., et al., *Structure and dynamic regulation of Src-family kinases*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(19): p. 3058-73.
120. Schwartzberg, P.L., *The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1463-8.
121. Ma, Y.C. and X.Y. Huang, *Novel regulation and function of Src tyrosine kinase*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(3): p. 456-62.
122. Bjorge, J.D., A. Jakymiw, and D.J. Fujita, *Selected glimpses into the activation and function of Src kinase*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5620-35.
123. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
124. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. Nature, 1996. **379**(6565): p. 557-60.
125. Luttrell, L.M., et al., *Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation*. J Biol Chem, 1997. **272**(7): p. 4637-44.
126. Luttrell, L.M., et al., *Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19443-50.
127. Sen, B. and F.M. Johnson, *Regulation of SRC family kinases in human cancers*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 865819.
128. Rodier, J.M., et al., *pp60c-src is a positive regulator of growth factor-induced cell scattering in a rat bladder carcinoma cell line*. J Cell Biol, 1995. **131**(3): p. 761-73.
129. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
130. Weingaertner, I.R., S. Koutnik, and H. Ammer, *Chronic morphine treatment attenuates cell growth of human BT474 breast cancer cells by rearrangement of the ErbB signalling network*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53510.
131. Heiss, A., H. Ammer, and D.A. Eisinger, *delta-Opioid receptor-stimulated Akt signaling in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells involves receptor tyrosine kinase-mediated PI3K activation*. Exp Cell Res, 2009. **315**(12): p. 2115-25.
132. Yang, X.L., et al., *Neuregulin-induced expression of the acetylcholine receptor requires endocytosis of ErbB receptors*. Mol Cell Neurosci, 2005. **28**(2): p. 335-46.
133. Speckmaier, E.K., *Interaktion von Opioiden mit Herceptin® in humanen Mammakarzinomzellen*. 2010, München.
134. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
135. DeBlasi, A., K. O'Reilly, and H.J. Motulsky, *Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor*. Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(6): p. 227-9.
136. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
137. Nahta, R., et al., *P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3981-6.
138. Fiszman, G.L. and M.A. Jasniz, *Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer*. Int J Breast Cancer, 2011. **2011**: p. 352182.
139. Eisinger, D.A. and H. Ammer, *Down-regulation of c-Cbl by morphine accounts for persistent ERK1/2 signaling in delta-opioid receptor-expressing HEK293 cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34819-28.

11 ANHANG

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Opioidrezeptor-vermittelte Signalwege	5
Abbildung 3-2: HER Rezeptoren und ihre endogenen Liganden.	8
Abbildung 3-3: Aktivierung von HER-Rezeptoren.....	9
Abbildung 3-4: HER-vermittelte Signalwege.	10
Abbildung 3-5: IGF-1-Rezeptor im inaktiven Zustand.	16
Abbildung 3-6: Aktivierter IGF-1-Rezeptor nach Ligandenbindung.	17
Abbildung 3-7: Transaktivierung von HER-Rezeptoren über MMP.....	19
Abbildung 5-1: Belegung einer 12-Well-Zellkulturplatte.....	31
Abbildung 5-2: Belegung einer 24-Well-Platte:	31
Abbildung 5-3: Plattenbelegung bei der Sterbekurve.	32
Abbildung 5-4: Plattenbelegung für die Bestimmung der cAMP-Akkumulation.	42
Abbildung 6-1: Darstellung des Tubulingerüsts der verschiedenen SKBR3 Zelllinien durch Phalloidin:	48
Abbildung 6-2: Regulation von κ -Opioidrezeptoren (KOR) durch den HER2-Inhibitor Trastuzumab und U69,593.....	49
Abbildung 6-3: Regulation der cAMP-Akkumulation durch Opioide.....	50
Abbildung 6-4: Bestimmung des Zellwachstums mittels Kristallviolett:	51
Abbildung 6-5: Bestimmung der Apoptose mittels Annexin V/PI-Färbung.....	53
Abbildung 6-6: Quantifizierung der Apoptose in SKBR3 Zellen.....	54
Abbildung 6-7: Regulation ausgewählter Rezeptoren für Wachstumsfaktoren.	55
Abbildung 6-8: Regulation der Akt in chronisch behandelten SKBR3 Zellen.....	56
Abbildung 6-9: Regulation der Erk1/2 in chronisch behandelten Zellen.	57
Abbildung 6-10: Regulation von PTEN in chronisch behandelten Zellen.	58
Abbildung 6-11: Regulation von p27kip1 in chronisch behandelten Zellen.....	58
Abbildung 6-12: Regulation von c-Src.....	59
Abbildung 6-13: Immunzytochemischer Nachweis von c-Src	60
Abbildung 6-14: Regulation von c-Cbl.	60
Abbildung 6-15: Immunzytochemischer Nachweis von c-Cbl.	61
Abbildung 6-16: Akute Hemmung des Zellwachstums durch Trastuzumab und U69,593.....	62
Abbildung 6-17: Wachstumsverhalten in Abwesenheit von Trastuzumab und U69,593.	63

Abbildung 6-18: Sterbekurve mit ansteigenden Konzentrationen an Trastuzumab..... 64

Abbildung 7-1: Modell der Internalisierung der Rezeptorsysteme über Clathrin in SKBR3-TU
Zellen..... 70

11.2 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
AK	Antikörper
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
AR	Amphiregulin
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEH	DMEM mit Hepes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOR	δ-Opioidrezeptor
DTT	Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Epiregulin
Erk1/2	Extracellular regulated kinase 1/2
FKS	Fötales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-protein coupled receptor; G-Protein gekoppelter Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintri-phosphat
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HRP	Horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
kDa	Kilo Dalton
KOR	κ-Opioidrezeptor

mAB	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MOR	μ -Opioidrezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase-und-Tensin-Homologon
SEM	Standard Error of the mean
SKBR3	Humane Mammakarzinomzellen
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin

12 DANKSAGUNG

Großer Dank gebührt zuallererst Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer, der die Idee für diese Doktorarbeit entwickelt und die Rahmenbedingungen für ihre Entstehung geschaffen hat. Er stand mir jederzeit mit seinem umfassenden Fachwissen und tatkräftiger Unterstützung bei so manchem technischen Problem zur Seite. Dank seiner immer freundlichen, geduldigen und optimistischen Einstellung und nicht zuletzt der exzellenten wissenschaftlichen und umfassenden Betreuung mit vielen konstruktiven Gesprächen und anregenden Diskussionen, hätte ich mir keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sarah Koutnik für die hervorragende Einführung in die verwendeten Methoden und ihre Unterstützung und bei Sarah Bolda für die vielen konstruktiven Diskussionen. Vielen Dank euch beiden für die schöne Zeit!

Andreas Blaschke danke ich für die sehr gute Einführung in die konfokale Mikroskopie.

Ein Dankeschön geht auch an Iris Wagner für das Korrektur lesen dieser Arbeit. Vielen Dank, dass du dir so viel Mühe gemacht hast.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Freund, Sebastian. Danke für die gemeinsame Eroberung der Welt der Statistik und der Graphikprogramme und danke für deinen Rückhalt.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meinen Eltern und meinem Bruder, Andreas, danken. Ihr glaubt immer an mich und unterstützt mich in allen Lebenslagen.

Danke!