

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

---

**Bedeutung der Interaktionen zwischen Östrogen- und  
Wachstumsfaktor-Signalwegen für die Wirkung antitumoraler Substanzen in den  
Ovarialkarzinomzelllinien BG-1 und SKOV-3**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Nicola Andrea Frey

aus München

Lübeck 2004



## Abkürzungen

AF	Activation Function
AK	Antikörper
AÖ	Antiöstrogen
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Binding-Protein
CRE	cAMP- Response-Element
CREB	CRE-Binding-Protein
DBD	DNA -Binding Domain
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Östrogen- Rezeptor
E <sub>2</sub>	17β-Östradiol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor-Receptor
ERE	Estrogen Response Element
FIGO	Fédération Internationale Gynécologie et d'Obstétrique
HRG	Heregulin
IGF-1	Insulin Like Growth Factor-1
IGFR	Insulin Like Growth Factor-Receptor
IRS-1	Insulin Receptor Substrate-1
KI	Kinase-Inhibitor
LBD	Ligand Binding Domain
LM	Lösungsmittel
MAPK	Mitogen- Activated- Protein- Kinase
NR-Boxes	Nuclear Receptor Boxes
OSE	Ovarian surface epithelium
PKB	Protein-Kinase B
PKC	Protein-Kinase C
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RTKI	Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor
SER	Serin
SIE	<i>Sis</i> -Inducible Element
SRE	Serum Response Element
TGFα	Transforming Growth Factor α
TGFR	Transforming Growth Factor-Receptor 1
TK	Tyrosin-Kinase
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
WF	Wachstumsfaktor

<b>1.0. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2.0. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<i>2.1. Charakterisierung der Zelllinien .....</i>	<i>9</i>
<i>2.2. Das Östrogen-Signal-System.....</i>	<i>11</i>
<i>2.3. Das Rezeptor-Tyrosin-Kinase-System.....</i>	<i>14</i>
2.3.1. Die erbB-Rezeptor-Familie .....	14
2.3.2. Das IGF-1-Signalsystem.....	17
<b>3.0. ERGEBNISSE.....</b>	<b>19</b>
<i>3.1. Lösungsmittelkontrollen .....</i>	<i>19</i>
<i>3.2. Proliferative Effekte auf BG-1 - und SKOV-3-Zellen.....</i>	<i>21</i>
3.2.1. Aktivierung der Zellproliferation durch Östrogen .....	21
3.2.2. Aktivierung der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren .....	23
<i>3.3. Antiproliferative Effekte auf BG-1- und SKOV-3-Zellen.....</i>	<i>24</i>
3.3.1. Einfluss von Antiöstrogenen auf die Östradiol-unabhängige Proliferation der Zellen .....	24
3.3.2. Einfluss von Inhibitoren des RTK-Signalweges auf die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von Ovarialkarzinomzellen .....	25
<i>3.4. Inhibitorischer Einfluss von Antiöstrogenen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation der BG-1- und SKOV-3-Zellen.....</i>	<i>26</i>
<i>3.5. Hemmung der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation durch spezifische Inhibitoren bei BG-1- und SKOV-3-Zellen.....</i>	<i>28</i>
3.5.1. Hemmung der EGF-induzierten Proliferation durch AG 1478 und ZD 1839 .....	28
3.5.2. Hemmung der TGF $\alpha$ -induzierten Proliferation durch PD 98059 .....	29
3.5.3. Hemmung der IGF-1- induzierten Proliferation durch AG 1024 und PD 98059 .....	30
3.5.4. Hemmung der Heregulin- induzierten Proliferation durch Herceptin.....	31
<i>3.6. Einfluss von Antiöstrogenen auf die Wachstumsfaktor- induzierte Proliferation von BG-1- und SKOV-3-Zellen.....</i>	<i>32</i>
3.6.1. Einfluss von Antiöstrogenen auf die EGF- induzierte Proliferation .....	32
3.6.2. Einfluss von Antiöstrogenen auf die TGF $\alpha$ - induzierte Proliferation .....	34
3.6.3. Einfluss von Antiöstrogenen auf die IGF-1-induzierte Proliferation.....	34
<i>3.7. Nutzung des RTK-Signalweges durch Östrogene bei BG-1- und SKOV-3-Zellen .....</i>	<i>36</i>
3.7.1. Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die E <sub>2</sub> -induzierte Proliferation .....	36
3.7.2. Einfluss von E <sub>2</sub> in Kombination mit Heregulin bzw. Herceptin auf die Proliferation der Zellen .....	37
3.7.3. Paralleler Einfluss von TK-Inhibitoren und Antiöstrogenen auf die E <sub>2</sub> -induzierte Proliferation: Versuch einer maximalen Wachstumsinhibition.....	39
<b>4.0. ERGEBNISSE: VERGLEICH DER BEIDEN ZELLINIEN .....</b>	<b>41</b>
<b>5.0. DISKUSSION.....</b>	<b>42</b>
<i>5.1. Wachstumsinduktion durch Östrogene und Wachstumsfaktoren in zwei unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien .....</i>	<i>42</i>
<i>5.2. Inhibition der proliferativen Wirkung von Östrogenen durch Antiöstrogene in den Zelllinien BG-1 und SKOV-3.....</i>	<i>46</i>
<i>5.3. Inhibition der proliferativen Wirkung von Wachstumsfaktoren in den Zelllinien BG-1 und SKOV-3 durch Inhibitoren des RTK-Signalweges.....</i>	<i>48</i>
<i>5.4. Crosstalk zwischen der erbB-Rezeptor-Familie und der E<sub>2</sub>-Signalkaskade .....</i>	<i>49</i>

<b>5.5. Crosstalk zwischen der IGF-induzierten Signalkette und der E<sub>2</sub>-Signalkaskade .....</b>	<b>56</b>
<b>5.6. Abschluss und Ausblick.....</b>	<b>57</b>
<b>6.0. MATERIAL .....</b>	<b>59</b>
<b>6.1. ZELLINIEN.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2. CHEMISCHE KOMPONENTEN .....</b>	<b>59</b>
6.2.1. Steroide.....	59
6.2.2. Wachstumsfaktoren .....	59
6.2.3. ER-Antagonisten.....	59
6.2.4. Inhibitoren des MAPK-Weges .....	59
6.2.5. 1. AK für Western-Blot .....	60
6.2.6. 2. AK für Western-Blot.....	60
6.2.7. Medien, Lösungen und Puffer .....	60
6.2.8. Gele für Western-Blot .....	62
6.2.9. Einzelsubstanzen.....	63
<b>6.3. Plastikmaterialien, Filter, Membranen und technische Geräte.....</b>	<b>63</b>
<b>7.0. METHODEN.....</b>	<b>65</b>
<b>7.1. ALLGEMEINE ZELLKULTURMETHODEN .....</b>	<b>65</b>
7.1.1. Kulturbedingungen.....	65
7.1.2. Auftauen von Zellen.....	65
7.1.3. Accutasebehandlung und "Splitten" .....	65
7.1.4. Einfrieren und Lagern von Zellen .....	65
7.1.5. Herstellung von „gestripptem“ Kälberserum .....	66
<b>7.2. Proliferationsassay (ELISA zur Quantifizierung der Proliferationsrate beider Zelllinien) 66</b>	<b>66</b>
7.2.1. Aussaat .....	66
7.2.2. Mediumwechsel .....	67
7.2.3. Inkubation .....	67
7.2.4. Messung der Proliferation mittels ELISA .....	67
<b>7.3. Western-Blot zur Bestimmung des Gehaltes an erbB-2 und EGFR.....</b>	<b>68</b>
7.3.1. Präparation von Zelllysate aus einem Zellpellet für Western-Blots .....	68
7.3.2. Quantifizierung der Proteinproben des Zelllysats.....	68
7.3.3. Auftrennung der Proteinproben und Durchführung des Western-Blots.....	69
<b>7.4. Statistik.....</b>	<b>69</b>
<b>8.0. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>9.0. DANKSAGUNG .....</b>	<b>83</b>
<b>10.0. TABELLARISCHER LEBENSLAUF.....</b>	<b>84</b>

## 1.0. Zusammenfassung

Zelluläres Wachstum sowie Differenzierung und Apoptose werden durch ein komplexes Netzwerk extra- und intrazellulärer Regelkreise bestimmt. Jedes Ungleichgewicht innerhalb der ablaufenden Prozesse stellt ein potentiell Risiko für eine maligne Entartung dar. In Epithelzellen des Ovars wird die Proliferation vor allem über zwei Signalwege gesteuert. Zum einen wird über verschiedene Isoformen des intrazellulären Östrogenrezeptors (ER) direkt die Transkription mitogener Gene aktiviert. Daneben fungieren membranständige Rezeptoren nach Bindung von Wachstumsfaktoren als Tyrosin-Kinasen (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, RTKs). Durch Phosphorylierung mehrerer im Zytoplasma gelegener Proteine wird letztlich ein Signal zur DNA-Transkription übermittelt.

Wie in jüngster Zeit immer deutlicher wurde, agieren beide Wachstumswege nicht getrennt voneinander, sondern gehen in hohem Masse Interaktionen ein. Beispiele hierfür sind u.a. der durch Rezeptor-Tyrosin-Kinase- Signalwege phosphorylierte und damit aktivierte ER, andererseits kann die Transkription von RTKs und deren Liganden von Östrogenen beeinflusst werden.

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung dieser Interaktionen für die Wirksamkeit antitumorale Substanzen am Modell ovarieller Karzinomzellen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Antiöstrogenen (Tamoxifen, ICI 182,780) und Inhibitoren des Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalweges (AG 1478, AG 1024, ZD 1839, Herceptin, PD 98059) auf die zelluläre Proliferation von Ovarialkarzinomen untersucht, die durch eine Stimulation mit  $17\beta$ -Östradiol und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird. Durch die Einbeziehung von Substanzen, die zum Teil bereits in der Klinik verwendet werden, sollte die praktische Bedeutung der Interaktionen beider Signalwege für verschiedene aktuelle antitumorale Therapiestrategien veranschaulicht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen die gegenseitige Beeinflussung beider Signalkaskaden in den verwendeten Zelllinien anhand der Beobachtungen, dass Antiöstrogene (AÖ) in der Lage sind, die Wirkung von Wachstumsfaktoren (WF) zu schwächen, sowie dass Inhibitoren der RTK-Signalkaskade die proliferative Wirkung eines Östrogenstimulus inhibieren können.

Desweiteren wurde die Abhängigkeit der in beiden Zelllinien zur Proliferation führenden Mechanismen vom jeweiligen Rezeptorstatus deutlich. In der ER $\alpha$ -trunkierten und HER2/neu- überexprimierenden Zelllinie SKOV-3 zeigten Inhibitoren der RTK-Signalkaskade stärkere Auswirkungen als bei BG-1-Zellen. Bei diesem Zellmodell

wiederum, das ein funktionsfähiges ER-Profil aufweist, hatten AÖ eine stärkere antiproliferative Wirkung als Tyrosin-Kinase-Inhibitoren.

Schliesslich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Kombination aus Tamoxifen und Inhibitoren des RTK-Signalweges keine zusätzliche Proliferationseinschränkung auslöst, da entweder AÖ oder TK- Inhibitoren je nach Zelllinie schon eine maximale Wachstumsinhibition ausgelöst haben, wobei ein negativer Einfluss des RTK-Signalweges auf die Wirkung von AÖ in einer der beiden Zelllinien beobachtet wurde.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Interaktionen zwischen Östrogenrezeptor- und Wachstumsfaktor-Signalwegen in Ovarialkarzinomzellen die Wirksamkeit antitumorale Substanzen determinieren, und dass das Bestehen einer Interaktion beider Signalwege in ovariellen Tumorzellen - abhängig vom Rezeptorstatus - AÖ oder TK-Inhibitoren allein in die Lage versetzt, beide proliferativen Signalwege zu inhibieren. Insofern muss eine Kombination beider Substanzklassen nicht notwendigerweise zu einer verstärkten Inhibition des Wachstums ovarieller Tumorzellen führen. Die hier vorgestellten Ergebnisse ermutigen weitere Studien zur besseren Einschätzung der Wirkung antitumorale Substanzen auf Ovarialkarzinomzellen mit unterschiedlichem Rezeptorstatus.

## 2.0. EINLEITUNG

Die Steuerung der Proliferation des weiblichen Genitaltraktes wird hauptsächlich von zwei unterschiedlichen Systemen übernommen: der Östrogen-Signalkaskade und dem Rezeptor-Tyrosin-Kinase-System. Beide agieren nicht etwa getrennt voneinander, sondern sind in hohem Masse Interaktionen unterworfen. Ein so kompliziertes System ist jedoch auch relativ störanfällig, da es zum einen viele Loci eines Fehlers geben kann, zum anderen können sich diese falschen Signale weitreichend und verzweigt ausbreiten. Die vielleicht schwerwiegendste Folge dieser Fehlregulationen ist das Auftreten maligner Neoplasmen. Ein besonderes Problem dabei ist die Entwicklung von Therapeutika, die auf der einen Seite möglichst spezifisch angreifen, auf der anderen Seite diese Komplexität der Strukturen beachten müssen. Ist einmal ein geeignetes Präparat gefunden, kommt es häufig zur Entstehung von Resistenzen. Die Zellen reagieren dann nicht mehr, wie im Fall der Tamoxifen-Resistenz in Mammakarzinomgewebe. Das Antiöstrogen Tamoxifen wird seit ca. 25 Jahren in der Mammakarzinom-Therapie vorwiegend hilfreich eingesetzt, und ist deswegen in Verbindung mit dem Brustgewebe am besten untersucht worden. In anderen Geweben wie dem Endometrium, zeigt es aber oft einen wachstumsstimulierenden Effekt (*Langdon et al., 1994*).

Das Ovarialkarzinom ist der 5. häufigste maligne Tumor der Frau, führt allerdings von allen gynäkologischen Tumoren am häufigsten zum Tode. Zum einen wird er durch seine Symptomlosigkeit und fehlende Möglichkeit der Früherkennung oft erst im FIGO-Stadium III oder IV entdeckt (5-Jahres-Überlebensrate 23 bzw. 14 %) (*Petterson, 1994; Makar et al., 1995*), zum anderen erfährt die Mehrheit der Patientinnen einen Rückfall trotz einer guten Ansprechbarkeit von durchschnittlich 70 % an die Therapie der ersten Wahl, einer Kombination aus Cisplatin und Taxol. Folgende Therapieversuche haben eine erschreckend hohe Refraktärrate. Hormonelle Therapieansätze wurden bis jetzt dank der ernüchternden Ergebnisse nicht für vielversprechend gehalten. Dabei ist schon seit den 60er Jahren bekannt, dass diese Malignome durch Östrogen und andere Steroide beeinflussbar sind (*zusammengefasst bei Makar et al., 2000*). Die ersten klinischen Studien mit dem Antiöstrogen Tamoxifen wurden Anfang der 80er Jahre in Angriff genommen (*Myers et al., 1981*). Viele der Resultate liessen keine grosse Hoffnung zu. Dabei muss man allerdings bedenken, dass aufgrund dieser Beobachtungen die getesteten Patientinnen schon von vornherein in einem eher ausweglosen Stadium waren, z.B. bei Wiedererstarben des Tumors nach Firstline-Therapie (*zusammengefasst bei Makar et al., 2000*).



Die Resistenz kann mit vielen Faktoren zusammenhängen. Beachtung schenken wir in dieser Arbeit u.a. der Überexpression von RT-Kinasen. Nicholson et al. beobachtete bei MCF-7-Zellen eine Resistenzentwicklung nach Behandlung mit Tamoxifen und ICI 164,384. Gleichzeitig wurde immunhistochemisch eine Vermehrung von EGF-Rezeptoren und erbB-2 vorgefunden. Der EGFR-Inhibitor ZD 1839 und der erbB-2-blockierende AK Herceptin inhibierten hochgradig und nachhaltig das Wachstum bei diesen Zellen (Nicholson et al., 2001). Brustkarzinomzellen stellten sich zwar bei in-vitro-Versuchen als phänotypisch generell etwas unstabiler heraus (Hua et al., 1995), doch spricht nichts dagegen, dass eine erworbene oder vorhandene Überexpression von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auch bei anderen Zellsystemen zu einer Umgehung des klassischerweise von E<sub>2</sub> benutzten Signalwegs führen könnte. Zudem beschreibt Moscatello et al. das Vorhandensein einer EGFR-Mutation (EGFRv3) in 73 % der Ovarialkarzinome. Diese Mutation, die zu einer ständigen Aktivierung des Rezeptors führt, fand er ebenso in Gliomen, Medulloblastomen und Mammakarzinomen (Moscatello et al., 1995). Der "Crosstalk" zwischen ER- und RTK-System kann zur Forcierung des einen Teils bei Blockierung des anderen führen, und dadurch eine Resistenz gegen bestimmte Substanzen schaffen. In Anbetracht dessen kommen immer öfter Überlegungen zu Kombinationstherapien auf, die den ER und das RTK-Netzwerk - sei es durch Antikörper, Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, Toxine oder Antisense Oligonukleotide - in gleicher Weise mit einbeziehen.

In dieser Arbeit wurden Proliferationsstudien der Ovarialkarzinomzelllinien BG-1 und SKOV-3 durchgeführt, die u.a. durch einen unterschiedlichen Rezeptorstatus imponieren. BG-1-Zellen zeigen mit ihrem intakten Östrogenrezeptor auch in Untersuchungen anderer Laboratorien eine deutliche Proliferation auf E<sub>2</sub>-Gabe. SKOV-3-Zellen zeichnen sich im Gegensatz dazu besonders durch die Überexpression von erbB-2 und die Verstümmelung des ER $\alpha$  aus, wodurch die klassische Östradiol-Wirkung in diesen Zellen beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit wird der antiproliferative Effekt von antitumoralen Substanzen wie Antiöstrogenen und RTK-Inhibitoren auf diese Ovarialkarzinomzellen untersucht. Zumal diese Arbeit Teil eines grösseren Projektes darstellt, das Mamma- und Endometriumgewebe mit einbezieht, erhoffen wir uns durch die Beobachtungen, die sich aus dem unterschiedlichen Ansprechen der beiden Zellmodelle auf Inhibitoren der Östrogen- oder Wachstumsfaktorsignaltransduktion ergeben, einen tieferen Einblick in die Interaktionen zwischen hormon- und wachstumsfaktorgesteuerter Proliferation von Karzinomen der

weiblichen Geschlechtsorgane. In dessen Konsequenz erwarten wir uns Aufschlüsse über Verbesserungsmöglichkeiten in der Therapie von gynäkologischen Karzinomen.

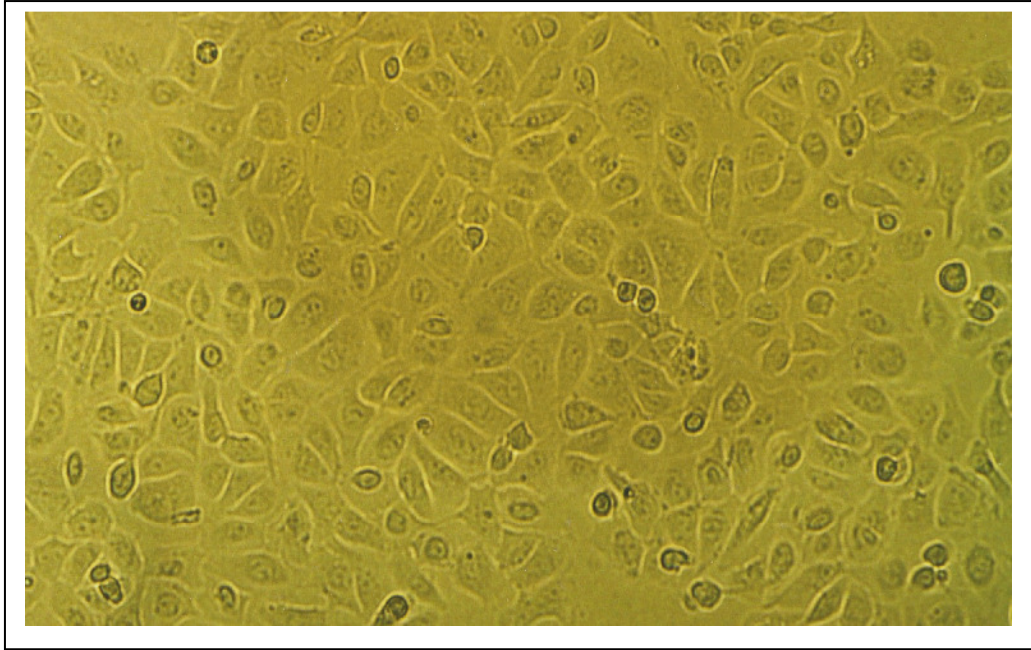
### 2.1. Charakterisierung der Zelllinien

Die beiden Zelllinien BG-1 und SKOV-3 stammen von menschlichem, epithelalem Adenokarzinomgewebe des Ovars ab. Sie werden seit über 20 Jahren in der Forschung eingesetzt. Der Durchmesser der polygonalen BG-1-Zellen beträgt ca. 11,5 µm, SKOV-3-Zellen stellen sich nur geringfügig grösser dar. Morphologisch sind bei SKOV-3-Zellen längere Zellausläufer zu erkennen. Beide Zelllinien wachsen in Plastikflaschen zunächst einschichtig, bei fortgeschrittenem Wachstum mehrschichtig. Die Verdopplungszeit beträgt für BG-1-Zellen ca. 24, für SKOV-3-Zellen ca. 48 Stunden.

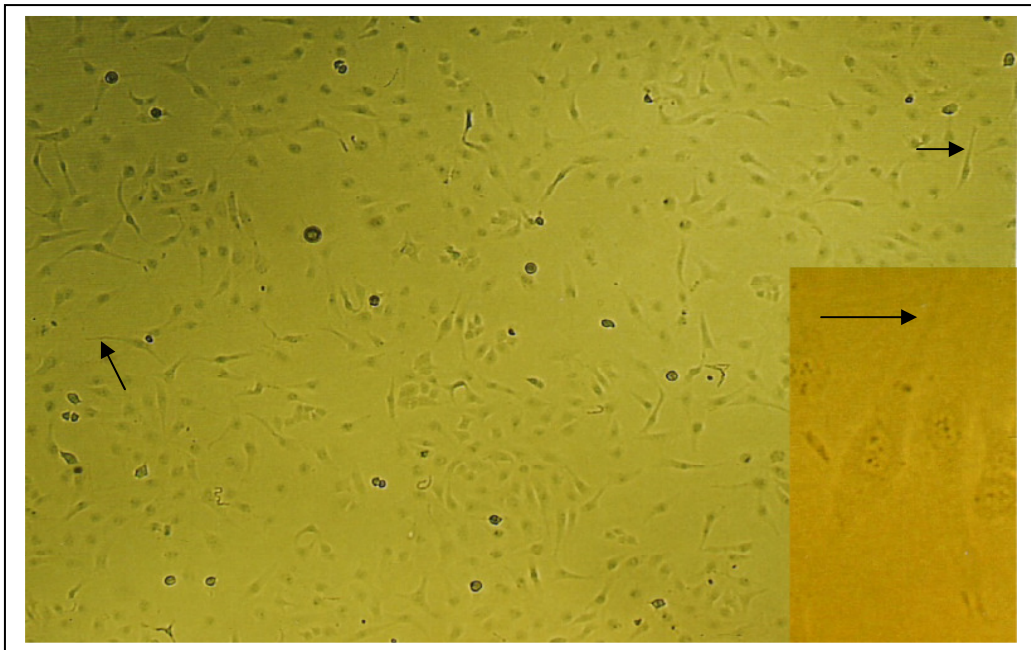
Für die Zwecke dieser Arbeit ist die Beurteilung des Rezeptorstatus entscheidend. Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren von BG-1- und SKOV-3-Zellen nach Sichtung der Literatur:

	ER		erbB-1	erbB-2	erbB-3	erbB-4	IGF1-R
	α	β					
BG-1	++	+	+	+	n.b.	n.b.	++
SKOV-3	+ mut	+	++	+++	+	+	n.b.

**Tabelle 1:** Die Tabelle stellt den Rezeptorstatus der Zelllinien BG-1- und SKOV-3 dar, wie er sich nach Zusammenschau der Literatur ergibt. Die Quellenangaben sind im Literaturverzeichnis aufgeführt, der Rezeptorstatus wird in der Diskussion behandelt. Auffallend ist das starke Vorhandensein von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen in SKOV-3-Zellen, speziell die Überexpression von HER2/neu (erbB-2). Die zwei Isoformen des E<sub>2</sub>-Rezeptors finden sich bei SKOV-3-Zellen in niedriger Konzentration. Zudem besteht eine Mutation in einem Abschnitt des ERα. (+++ = hohe Rezeptordichte, ++ = mittelhohe Rezeptordichte, + = geringe Rezeptordichte, n.b.= eine Arbeit, die sich explizit mit dem Nachweis dieser Rezeptoren in den angegebenen Zelllinien beschäftigt, ist mir nicht bekannt; ein Vorhandensein der Rezeptoren wird jedoch angenommen, da durch entsprechende Liganden eine Proliferation ausgelöst wird).

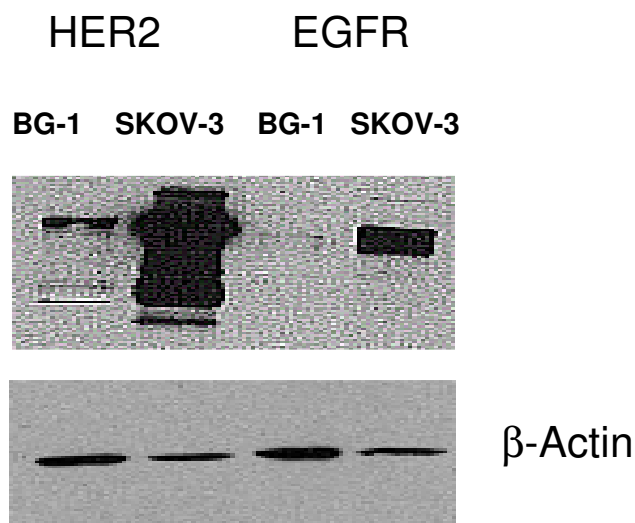


**Abbildung 1:** Fotografische Darstellung der BG-1-Zellen. Die Zellen sind annähernd vollständig konfluent. Sie sind polygonal, der Durchmesser beträgt 11 - 12  $\mu\text{m}$ . 820-fache Vergrößerung.



**Abbildung 2:** Fotografische Darstellung der SKOV-3-Zellen. Die Zellen stellen sich in dieser Abbildung wenig konfluent dar. Sie besitzen lange Zellausläufer ( $\rightarrow$ ), wodurch sie geringgradig grösser als BG-1-Zellen erscheinen. 385-fache Vergrößerung. Ausschnittsvergrößerung einer typischen SKOV-3-Zelle, 3460-fache Vergrößerung.

Um die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen zu verifizieren, untersuchten wir in unserem Labor das Vorhandensein von HER2/neu- und EGF-Rezeptoren semiquantitativ mittels Western-Blot. Das Ergebnis stellt eine Grundvoraussetzung unserer Überlegungen zum Versuchsaufbau der Proliferationsstudien dar, und soll dem eigentlichen Versuchsteil somit vorausgestellt werden (Abb.3). Der HER2/neu-Rezeptor ergibt bei SKOV-3-Zellen ein starkes Signal, bei BG-1-Zellen ein schwächeres. Ähnliche Ergebnisse liegen für den EGFR vor. SKOV-3-Zellen exprimieren ihn nicht ganz so stark wie den HER2/neu-Rezeptor, doch wird der Unterschied zu BG-1-Zellen deutlich.

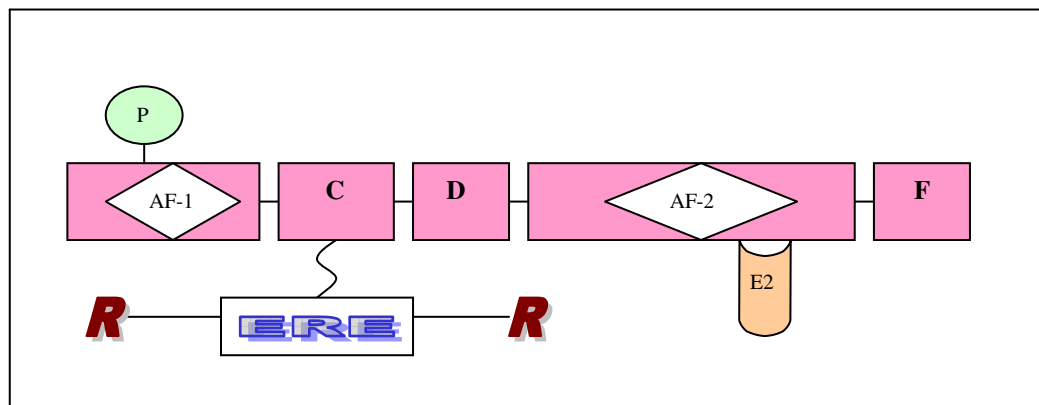


**Abbildung 3:** Der Western-Blot zeigt die deutliche Überexpression des HER2/neu-Rezeptors bei SKOV-3-Zellen. Der EGFR ist bei SKOV-3-Zellen ebenfalls in deutlich höherer Konzentration vorhanden als bei BG-1-Zellen, wo sich nur eine schwache Bande zeigt. Unten: Detektion des „housekeeping“ Gens  $\beta$ -Aktin als Kontrolle.

## 2.2. Das Östrogen-Signal-System

Östrogene sind lipophile Hormone, die durch die Zellmembran diffundieren und an intrazelluläre Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  oder  $\beta$ ) binden (Abb. 4). Funktionell unterteilt man den ER $\alpha$  in fünf Domänen: A/B, C, D, E und F, wobei Domänen C, D und E grosse Homologie zu den verwandten Rezeptoren der "Zellkern-Rezeptor-Superfamilie" aufweisen. Abschnitt E stellt die "Ligand-Binding-Domain" (LBD) dar, an die sich direkt das Östrogen koppelt. Abschnitt C bindet an bestimmte Regionen der DNA innerhalb der Promoter: den Estrogen-response-elements (ERE) (Abb. 5). Domäne F hat modulierende Eigenschaften auf die Transkription, die von zwei "transcription-activation-functions" AF-1 und AF-2 ausgeübt wird. AF-1 liegt in der A/B-Domäne, ist Liganden unabhängig und

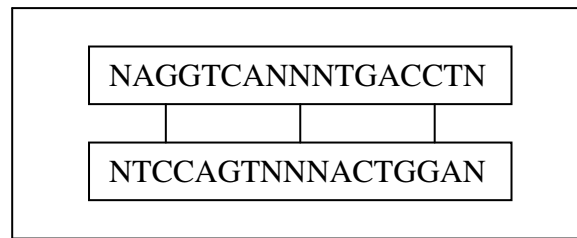
beim ER $\alpha$  (i.G. zu ER $\beta$ ) konstitutiv aktiv. AF-2 ist in der LBD positioniert und wird durch die Bindung von E<sub>2</sub> aktiviert. Beide "activation-functions" arbeiten je nach Zell- und Promotertyp unterschiedlich, können unabhängig oder gemeinsam agieren. Meistens hilft ihnen dabei ein Komplex aus vielen Koaktivatoren, wie u.a. p160s, CBP/p300 und p68, die den Rezeptor bei der Bindung und Aktivierung des Promoters unterstützen. Ihre Rekrutierung wird durch die Phosphorylierung von bestimmten Aminosäuren unterstützt, wobei Serin 118 eine besonders wichtige Rolle zukommt. Die Phosphorylierung kann eingeleitet werden entweder durch die Bindung von E<sub>2</sub> oder auch z.B. durch MAPKinasen (Endoh *et al.*, 1999). Zudem stellen einige dieser Koaktivatoren (z.B. p160, p300) (Webb *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2000) die Kommunikation zwischen den beiden AF her. Schlüsselstrukturen der AF-2-Domäne sind Helix 3,4,5 und 12 der LBD, die einen Spalt bilden, in den bestimmte Motive, sogenannte Nuclear-Receptor Boxes (NR-Boxes) mit der Sequenz LXXLL passen. Diese Motive finden sich in einigen der Koaktivatoren wieder (z.B. p160) (Kushner *et al.*, 2000). In Verbindung mit Tamoxifen widerfährt Helix 12 eine Rotation, die die Bindung mit Koaktivatoren unmöglich macht. Dadurch wird AF-2 blockiert, AF-1 bleibt aber unbelastet, wird sogar in einigen Zelltypen durch Tamoxifen aktiviert. ICI 182,780 als totaler ER-Antagonist blockiert beide "activation functions".



**Abbildung 4:** Der Östrogenrezeptor  $\alpha$  mit seinen fünf Abschnitten A-F. Abschnitt A/B und E enthalten jeweils eine activation function (AF). Der Phosphatrest P bezeichnet die wichtige Phosphorylierungsstelle Ser 118. Abschnitt C bindet an das Estrogen Response Element der DNA (ERE). Dessen Reste zu beiden Seiten sind mit R markiert. Abschnitt E bindet Östrogen (E<sub>2</sub>).

Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Sequenz des ERE (Abb. 5) die Konfiguration des Östrogenrezeptors beeinflusst, was wiederum zur Rekrutierung

unterschiedlicher Koaktivatoren führt, die verschiedene Funktionszustände des Rezeptors herbeiführen (Hall et al., 2002).



**Abbildung 5:** Die Sequenz des Estrogen Response Elements (ERE). A=Adenin, G=Guanin, C=Cytosin und T=Thymin. An den mit N bezeichneten Plätzen zeigt sich keine konstante Basenfolge.

Doch der Östrogenrezeptor agiert nicht nur in "klassischer" Weise über die ERE-Bindung. Er hat zudem Einfluss auf Gene, die durch AP-1 kontrolliert werden. AP-1 ist ein Transkriptionskomplex innerhalb einiger Promotoren, der aus vielen Koaktivatoren und Korepressoren besteht. Dazu gehören auch Jun- und Fos- Genprodukte. Er bindet CBP/p300 und andere Proteine, die ihn befähigen, die Transkriptionsmaschinerie in Gang zu bringen. Mit Hilfe der beiden "activation-functions" rekrutiert der ligandengebundene ER $\alpha$  ebenso Koaktivatoren wie p160, die sich mit dem AP-1-Komplex verbinden können. Dadurch versetzt er ihn in einen höheren Aktivierungszustand. Für diesen Weg ist besonders AF-1 zuständig (Kushner et al., 2000).

Ist Tamoxifen an ER $\beta$  (oder ER $\alpha$ , dem AF-1 fehlt) gebunden, wird ebenso eine Aktivierung von AP-1-regulierten Genen beobachtet. Das liegt daran, dass der Tamoxifen-gebundene ER Bindeplätze für Korepressoren wie z.B. Histon-Deacetylasen aufweist. Selbst wenn er nicht, auch nur indirekt, mit dem AP-1-Komplex verbunden ist, hat er die Möglichkeit, so viele Repressoren von diesem abzulösen, dass die Transkription nicht mehr behindert wird (Kushner et al., 2000).

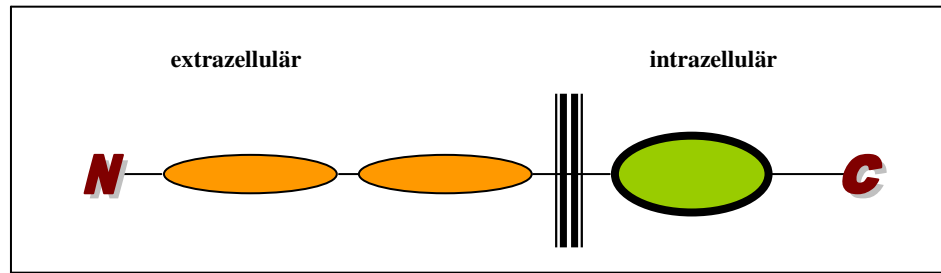
In jüngster Zeit tauchen immer mehr Hinweise auf, dass membrangebundene ER existieren, die ebenfalls durch Antiöstrogene blockiert werden (Seo et al., 2002; DosSantos et al., 2002). Zudem scheint Östrogen nicht nur über cytoplasmatische bzw. nukleäre Rezeptoren wirken zu können, sondern auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran, die u.a. für die Transaktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sorgen (Carmeci et al., 1997; Prenzel et al., 1999; Filardo et al., 2000; Filardo et al., 2002).

### **2.3. Das Rezeptor-Tyrosin-Kinase-System**

Viele Wachstumsfaktoren wirken auto- oder parakrin an membranständigen Rezeptoren, die durch ihre intrazelluläre Domäne Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen. Die in dieser Arbeit behandelten Rezeptoren repräsentieren zwei Klassen: die erbB-Rezeptor-Familie und das IGF-1-Rezeptor-Signalsystem.

#### **2.3.1. Die erbB-Rezeptor-Familie**

Zu dieser Familie gehören vier Rezeptoren: der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR, erbB-1) und die Rezeptoren erbB-2, erbB-3, erbB-4 (HER2, HER3, HER4) (Abb. 6). Sie zeichnen sich durch eine relativ hohe Homologie von 40-50 % aus (*Shawver et al., 1994; Chan et al., 1995*). Alle Rezeptoren sind sowohl in benignen als auch in malignen Zellen in unterschiedlicher Konzentration vorhanden (*Kohler et al., 1989*). Durch Verknüpfungen mit verschiedenen Signalkaskaden sind sie an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, u.a. an der Steuerung der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Motilität (*Wiechen et al., 1999*). Nicht immer geht die Aktivierung von ihnen aus, manchmal dienen sie auch nicht-Liganden-gebunden als "scaffold-protein" zur Kommunikation zwischen diversen Signalsystemen (*Olaloye et al., 2000*). Das wohl bedeutendste ist das "Mitogen-activated-protein-Kinase"-Netzwerk (MAPK), welches wiederum vielgestaltige Verknüpfungen mit Systemen, wie z.B. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, dem Proteinkinase-C-Netzwerk, der PI3-Kinase oder der Proteinkinase-A unterhält (*Peles et al., 1992; Alper et al., 1999*). Innerhalb der Familie gibt es Unterschiede. Während erbB-3 mehrere Bindeplätze für eine Untereinheit der PI3-Kinase aufweist, erweist sich erbB-1 als schwacher Aktivator dieses Enzyms. Überexpression und Mutationen von Rezeptoren oder Bausteinen der Signalkette (z.B. erbB-1, erbB-2, ras) kommen häufig in entarteten Zellen vor und sind mit einer schlechteren Überlebensrate vergesellschaftet (*Berger et al., 1988; Slamon et al., 1989; King et al., 1992; Berchuk et al., 1990; Moscatello et al., 1995; Fischer-Colbrie et al., 1997; Alper et al., 1999; McPhillips, 2001*).



**Abbildung 6:** Rezeptor-Tyrosin-Kinase Typ 1, zu dem der EGF-Rezeptor gehört. Das aminoternale Ende N schliesst an zwei extrazelluläre Domänen an (orange unterlegt). Der intrazelluläre Teil (grün unterlegt) hat Tyrosin-Kinase-Funktion. Das C-terminale Ende ist mit C markiert.

Durch Bindung eines Liganden, der in der Regel bivalent ist (*Tzahar et al., 1997*), bilden sich unter den erbB-Verwandten verschiedene Homo- und Heterodimere aus, die durch ihre Kinase-Funktion autophosphoryliert werden, und dadurch auch andere Proteine phosphorylieren können. Es folgt eine Aktivierung einer Signalkette klassischerweise über shc/Grb2/ras/raf/MEK bis zu den MAPKinasen ERK1 und ERK2, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie ELK-1 in einen höheren Aktivationszustand versetzen (Abb. 8). Dabei ist für die Kombination der sich bildenden Dimere die Beschaffenheit der Rezeptoren der Zelle, sowie die Spezifität der Liganden, oder biochemische Faktoren (pH-Wert etc.) ausschlaggebend. Für erbB-2 gibt es keinen passenden Liganden (er wird also durch Dimerisation mit einem anderen Rezeptor aktiviert), erbB-3 weist keine Kinase-Aktivität auf (*Stern et al., 1986; Akiyama et al., 1988; Pinkas-Kamarski et al., 1997; Weiss et al., 1997*). Doch erbB-2 stellt den potentesten Aktivator dar, da er zum einen die Liganden am stärksten festhält, wodurch das Signal verlängert wird, zum anderen wird er nach kurzer ligandeninduzierter Internalisierung schnell wieder an die Oberfläche "recycelt", wodurch er neuen Liganden zugänglich gemacht wird (*Karnuagaran et al., 1996; Waterman et al., 1998*). Je nach Dimerisationspartner werden unterschiedliche Andockstellen für Proteine freigelegt, und jedes Dimer entwickelt so in seinem Umfeld ein individuelles "Aussehen" und nachfolgend ein eigenes Aktivierungspotential (*Campiglio et al., 1999*). So hat jeder Rezeptor dieser Familie z.B. einen Bindeplatz für Shc, einem Baustein der MAPK-Kaskade.

Von den Liganden seien nur die hier behandelten genannt: Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor alpha ( $TGF\alpha$ ) und Heregulin (HRG). Sie werden teilweise endogen mit einem passenden Rezeptor produziert, und zunächst als Precursor-Glykoproteine an die Oberfläche entlassen. Dort sorgen Serin- oder Metalloproteinasen für



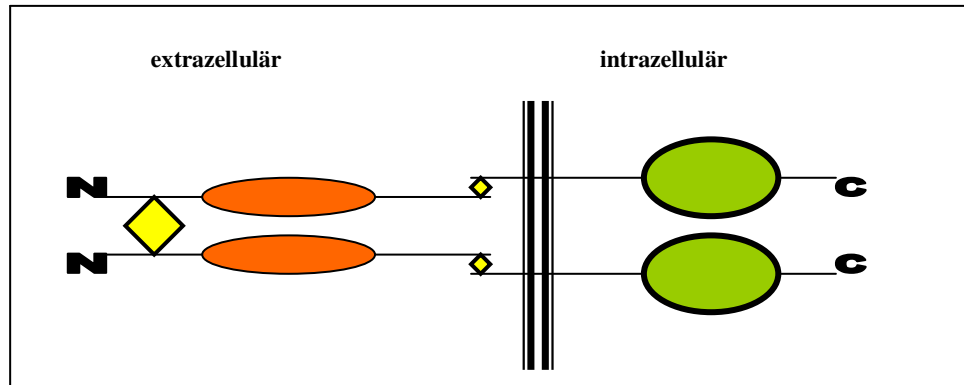
das endgültige Aussehen (*Prenzel et al., 2001*). Ausser EGF, das ubiquitär im Körper vorkommt, wirken die Liganden autokrin oder parakrin, also ziemlich streng lokal begrenzt. Heregulin oder eine der Isoformen wird in vielen Geweben exprimiert (*Olaloye et al., 2000*).

Kurz erwähnt sein soll hier noch die Rolle von Kalziumionen. Deren Einstrom in die Zelle wird u.a. von Östrogenen geregelt (*Improta-Bears et al., 1998*).  $\text{Ca}^{2+}$  hat Anteil an der Aktivierung von ras und anderen Kinasen. Viele der Kinasen werden aktiviert und können vice versa den Zustand ihres Aktivators beeinflussen.

Um die Proliferation auf diesem Weg zu verringern, hat man in den letzten 20 Jahren mehrere Inhibitoren synthetisiert. Hauptsächlich dienen zu diesem Zweck Antikörper, Antisense-Verfahren, Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und Konjugate aus Liganden- bzw. Immunotoxinen (*Deshane et al., 1996; Prenzel et al., 2001*). Die hier verwendeten Substanzen kommen aus der Klasse der monoklonalen Antikörper und der Tyrosin-Kinase-Inhibitoren. Herceptin ist ein spezifischer Antikörper des erbB-2-Rezeptors. Er bindet an die extrazelluläre Domäne und verringert dadurch die Aktivierung der Kinase-Aktivität, indem stimulierende Liganden nicht mehr andocken können. Herceptin zeigt in klinischen Studien an Patientinnen mit Mammakarzinom vielversprechende Ergebnisse (*Cobleigh et al., 1999*). PD 98059 inhibiert MEK-1, die Kinase, die u.a. für die Aktivierung der MAPK zuständig ist (*Alessi et al., 1995*). AG 1478 und ZD 1839 (Iressa) wirken als EGFR-spezifische Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (*Anderson et al., 2001*). Durch die Fähigkeit des EGF-Rezeptors mit seinen verwandten Rezeptoren eine Bindung einzugehen, werden diese durch die Inhibitoren ebenfalls indirekt inaktiviert.

### 2.3.2. Das IGF-1-Signalsystem

Auch IGF-1 greift an einem membrangebundenen Rezeptor an, der Tyrosin-Kinase-Funktion besitzt (Abb. 7). Es handelt sich um eine Typ 2- Rezeptor-Kinase.



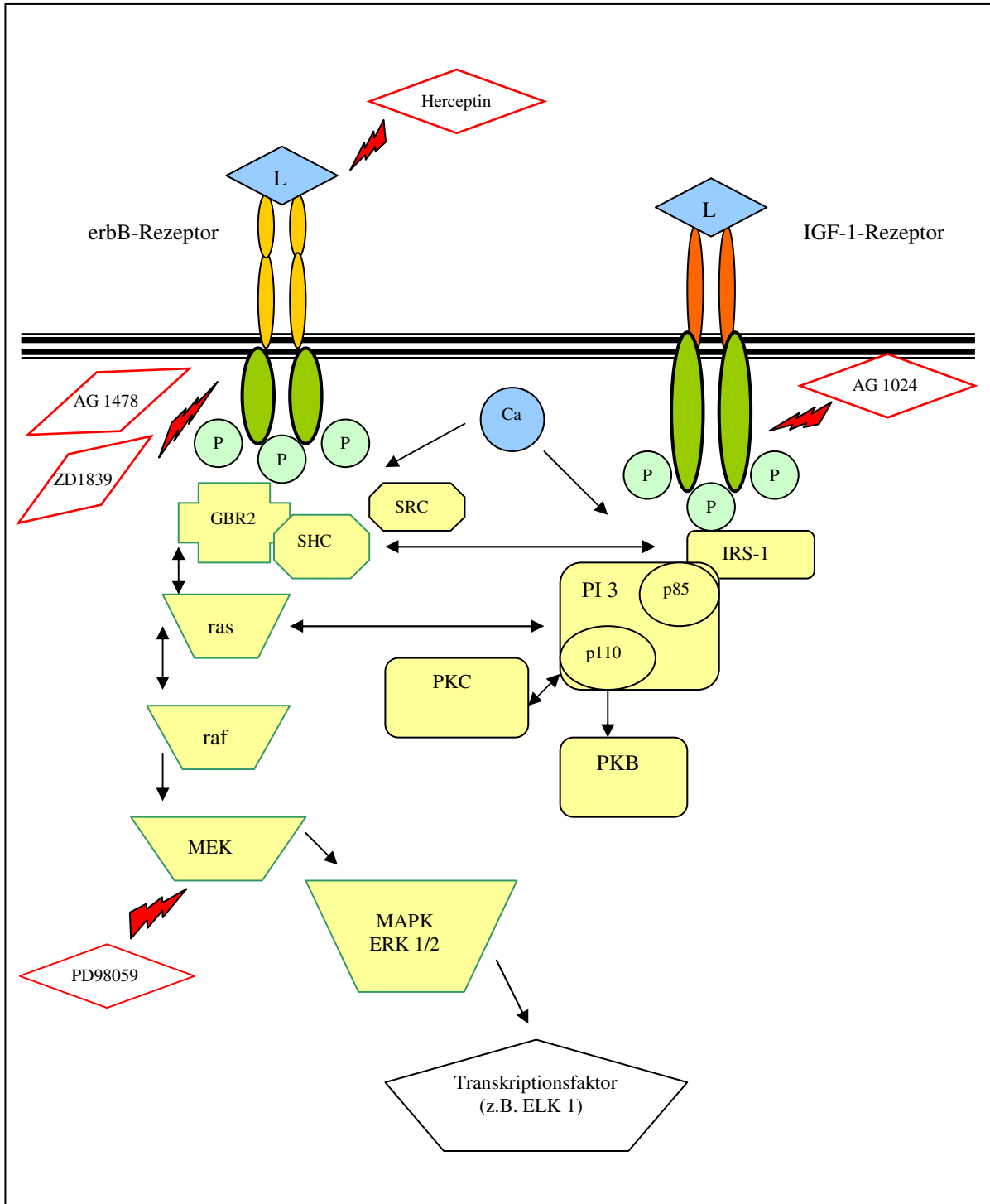
**Abbildung 7:** Rezeptor-Tyrosin-Kinase Typ 2: der IGF-Rezeptor. Zwei membrandurchspannende Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander gekoppelt (gelbe Rauten). Die extrazellulären Domänen sind orange unterlegt. Sie schliessen an das aminotermiale Ende N an. Die intrazellulären Teile sind grün dargestellt. C bezeichnet das C-terminale Ende.

Im Gegensatz zum Typ 1 besitzt sie jeweils zwei extrazelluläre Domänen, zwei einzelsträngige Abschnitte innerhalb der Membran und zwei intrazelluläre Domänen, die miteinander verbunden sind. Nach Autophosphorylierung bestimmter Tyrosin-Reste binden verschiedene Adapter-Moleküle, z.B. Insulin-Rezeptor-Substrate-1 (IRS-1) an die intrazelluläre Domäne. Über IRS-1 wird das Signal weitergeleitet auf die PI3-Kinase, deren p85-Untereinheit an IRS-1 bindet. Dadurch wird die katalytische Domäne p110 aktiviert, die weitere Proteinkinasen wie z.B. PKB (Akt) und Protein-Kinase C (PKC) in einen höheren Funktionszustand versetzt (Abb. 8). Über Shc/Grb hat der Rezeptor ebenfalls direkte Verbindung zur MAPK-Kaskade, doch scheint IGF-1 in dieser Hinsicht nicht so potent zu wirken, wie die erbB-Rezeptor-Familie. Wie schon erwähnt, sind die verschiedenen Signalketten miteinander vernetzt. Die katalytische Untereinheit p110 der PI3-Kinase besitzt z.B. die Fähigkeit, ras zu aktivieren, das auch an der Transaktivierung des EGF-Rezeptors beteiligt ist (Whitmarsh und Davis, 1996).

So hat IGF-1 ebenso wie die oben beschriebenen Liganden Anteil an Prozessen, die den Funktionszustand, die Proliferation und das Überleben der Zellen regulieren. Mehr als EGF-verwandte Moleküle ist es an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt (Dupont et al., 2001; Hamelers et al., 2002).

Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor AG 1024 blockiert spezifisch die Aktivität des IGF-Rezeptors (Parrizas et al., 1997).

**Abbildung 8:** Übersicht über die Interaktionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Die Rezeptoren sind ligandengebunden dargestellt. Ligand = blaue Raute. Die Inhibitoren zeigen sich als rot umrandete Rauten, wobei deren inhibitorischer Einfluss durch einen roten Blitz gekennzeichnet ist. P = Phosphatreste. Ca = Kalzium-Ionen. Verschiedene Kinasen und Bindungsproteine sind hellgelb unterlegt, wobei die Proteine des klassischen MAPK-Weges zusätzlich grün umrandet sind. Die Pfeile geben teils direkte, teils indirekte Verbindungen an. Der Transkriptionsfaktor ELK-1 bindet an die DNA.



### 3.0. Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit mussten die verwendeten Zellkulturmodelle BG-1 und SKOV-3 hinsichtlich ihrer Reaktion auf die Einzelsubstanzen charakterisiert werden. Dies war auf der einen Seite als Grundlage für weiterführende Experimente notwendig, da wir schliesslich auch neuartige Kombinationen untersuchten, die die Interaktionen verdeutlichen sollten. Auf der anderen Seite dienten die Ergebnisse zur Klärung teils kontrovers diskutierter Angaben in der Literatur.

Zunächst werden die Ergebnisse eines Versuches vergleichend für beide Zelllinien dargestellt. Dabei wird unter Punkt **a**) jeweils die BG-1-Zelllinie behandelt, unter Punkt **b**) die SKOV-3-Zellen beschrieben. Am Schluss folgt eine Zusammenfassung der Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Verhalten der Kulturen.

Jeweils der erste Balken im Diagramm stellt den Kontrollwert dar. Er ist mit einer Proliferation von 100 % angegeben. Hier wurde den Zellen in der 72-h-Inkubationsphase nur Serum-Replacement-Medium ohne jegliche Zusätze angeboten.

Konzentrationsangaben werden i.d.R. im Diagramm nicht angezeigt. Es wurden ausschliesslich folgende Konzentrationen verwendet, die sich an den Ergebnissen anderer Studien (*Ciardello et al., 2000; Cobleigh et al., 1999; Hua et al., 1995; Ignar-Trowbridge et al., 1996; Kahlert et al., 2000; Vacca et al., 2000*) orientierten:

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
E <sub>2</sub>	1nM bzw. 10nM	Tamoxifen	100nM, 1µM, 10µM
EGF	1nM	ICI 182,780	100nM bzw. 1µM
IGF	1nM	AG 1478	100nM
TGFα	1nM	AG 1024	1µM
Heregulin	10nM	PD 98059	10µM
		ZD 1839	100nM
		Herceptin	10µg/ml

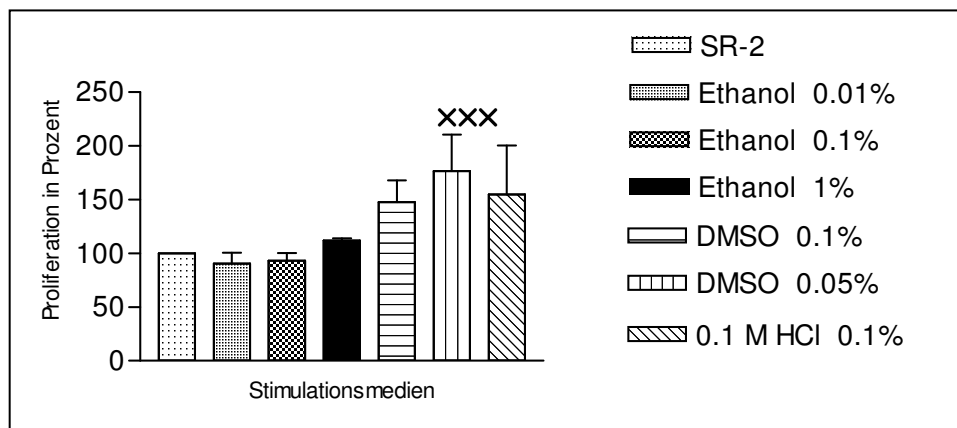
**Tabelle 2:** Dargestellt sind die proliferationsfördernden (links) sowie die proliferationsinhibierenden (rechts) Substanzen mit den dazugehörigen Konzentrationen. Im Fall von mehreren Angaben pro Zeile wird die entsprechende Konzentration noch mal explizit im Text angegeben.

#### 3.1. Lösungsmittelkontrollen

Mit den jeweiligen Lösungsmitteln der Wachstumsfaktorinhibitoren bzw. der Antiöstrogene wurden Kontrollversuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Lösungsmittel per se einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Zellen ausübt.

a) BG-1: Das Lösungsmittel Ethanol (95-prozentig, LM für Tamoxifen und ICI 182,780) übte in verschiedenen Verdünnungen weder einen stimulierenden noch einen inhibierenden Einfluss auf BG-1-Zellen aus.

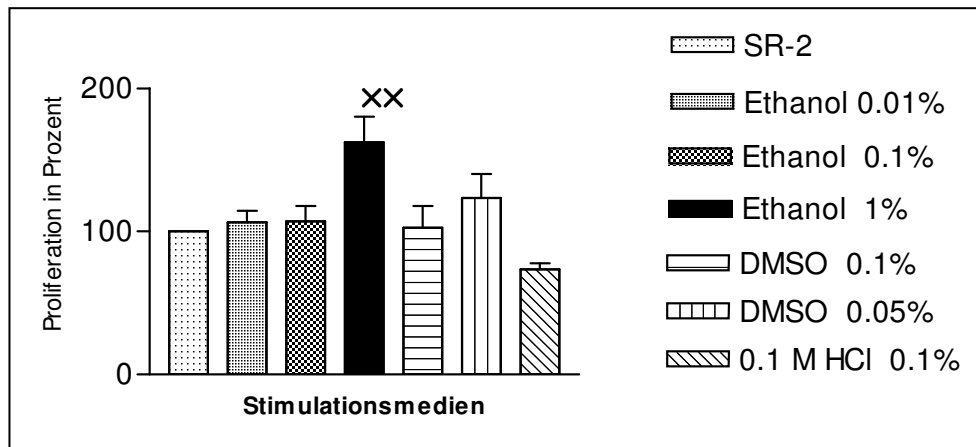
Die Inhibitoren AG 1478 und AG 1024, die direkt den EGF-Rezeptor bzw. den IGF-1-Rezeptor blockieren, wurden in DMSO gelöst, ebenso der MEK-1-Inhibitor PD 98059. In der Verdünnung, die 1  $\mu$ molarer AG 1024- Lösung entsprach (0,05%), besass DMSO einen stimulierenden Effekt auf BG-1-Zellen. Machte DMSO 0,1 % der Lösung aus, wie im Fall der Ansätze von AG 1478 und PD 98059, löste es keine signifikante Veränderung der Wachstumsrate aus. Auch 1 molare HCl- Lösung, das Lösungsmittel des Inhibitors ZD 1839, löste als 0,1- prozentige Verdünnung keine signifikante Stimulation bzw. Inhibition aus. Herceptin war in H<sub>2</sub>O gelöst (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Proliferation von BG-1-Zellen nach Behandlung mit den Lösungsmitteln der inhibitorischen Substanzen. Die Prozentangaben in der Legende verdeutlichen den Anteil des Lösungsmittels am SR-2-Medium. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche, sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++).

b) SKOV-3-Zellen reagierten auf Ethanol in niedrigeren Verdünnungen nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 1 % löste Ethanol eine Stimulation von ca. 160 % bei SKOV-3-Zellen aus. Dieser Anteil wurde jedoch nur bei der am stärksten konzentrierten, 10  $\mu$ M Tamoxifen- Lösung erreicht.

Wurden die Lösungsmittel der Inhibitoren des RTK-Signalweges alleine in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt, konnten bei SKOV-3-Zellen keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Die Proliferationswerte entsprachen ungefähr denen der Kontrolle. Signifikante Veränderungen ergaben sich nicht (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Proliferation von SKOV-3-Zellen nach Behandlung mit den Lösungsmitteln der inhibitorischen Substanzen. Die Prozentangaben in der Legende verdeutlichen den Anteil des Lösungsmittels am SR-2-Medium. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche, sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.01$  (++).

Abschliessend kann man sagen, dass in den meisten Fällen das Lösungsmittel wie erwartet keinen Einfluss auf das Verhalten der beiden Zelllinien ausübte. Bei BG-1-Zellen löste DMSO einen mittelgradig stimulierenden Effekt aus, bei den SKOV-3-Zellen führte Ethanol in einer hohen Konzentration dazu. Folgende Versuche im Ergebnisteil stellten klar inhibierende Einflüsse von Antiöstrogenen bzw. Inhibitoren der RTK-Signalkaskade dar, die somit nicht auf das jeweilige Lösungsmittel zurückzuführen waren. Bei der Darstellung der Ergebnisse sowie in der Diskussion wurden die Effekte der Lösungsmittel auf die Wirkungsprofile der inhibitorisch eingesetzten Substanzen generell berücksichtigt.

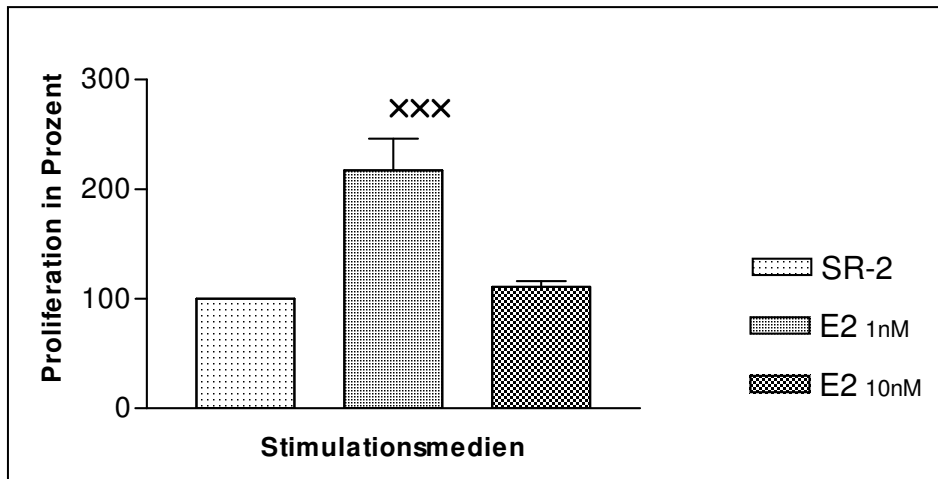
### **3.2. Proliferative Effekte auf BG-1 - und SKOV-3-Zellen**

Bis auf die letzten Jahre wurden in der Literatur hauptsächlich zwei klassische Signalkaskaden beschrieben, die zu einer Proliferation von Ovarialkarzinomzellen führen. Zum einen ist der intrazelluläre Östrogenrezeptor zu erwähnen, der nach Bindung von  $E_2$  ein ERE aktiviert, zum anderen die durch WF aktivierte zellmembranständige Tyrosinkinase, die über zahlreiche nachgeschaltete Kinasen im Zytoplasma ebenfalls zu einer Transkription mitogener Gene führt. Die Versuche aus Kapitel 3.2.1. und 3.2.2. überprüfen die proliferativen Wirkungen von Östrogen und der einzelnen Wachstumsfaktoren auf beide Zellmodelle.

#### **3.2.1. Aktivierung der Zellproliferation durch Östrogen**

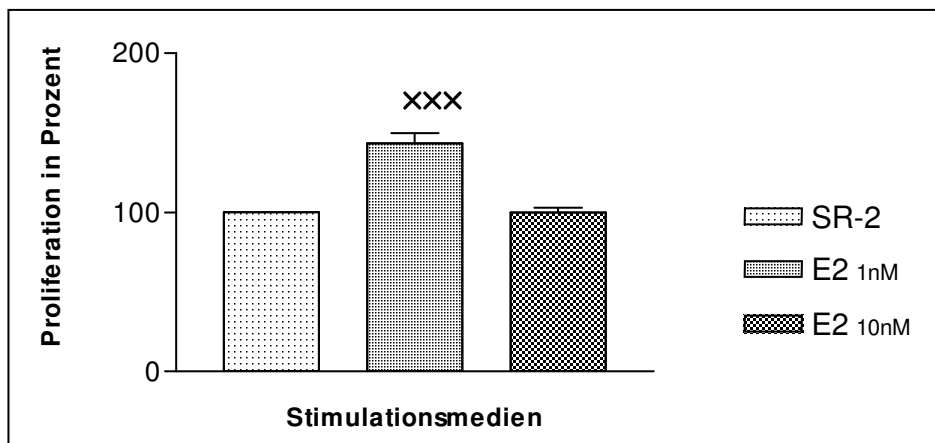
a) Die ER-positiven BG-1-Zellen zeigten eine deutliche Proliferationszunahme durch  $E_2$ . Schon in der Konzentration von 1 nM wurde 217,2 % Wachstum erreicht, das entspricht

einer Proliferationszunahme von 117,2 % gegenüber der Kontrolle ( $P < 0.001$ ). Bei einer zehnfach höheren Konzentration zeigten die Zellen keine signifikante Zunahme der Wachstumsrate (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Einfluss von  $E_2$  auf die Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++).

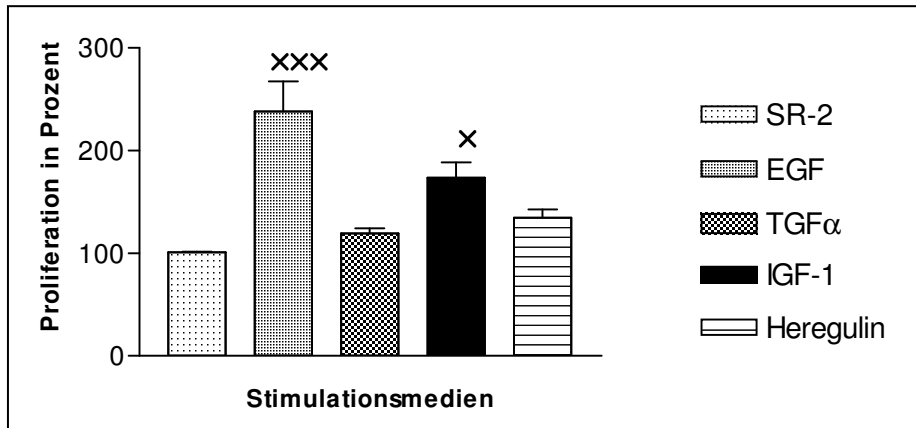
b) SKOV-3-Zellen besitzen keinen funktionsfähigen  $ER\alpha$ . Es wird kein Östrogen-Response-Element (ERE) aktiviert (O. Treack, persönliche Kommunikation). Auf der anderen Seite wird der erbB-2-Rezeptor im Gegensatz zu den BG-1-Zellen überexprimiert. Obwohl diese Zelllinie als  $ER\alpha$ -trunkiert beschrieben wird, war eine 43,2-prozentige Proliferationszunahme gegenüber der Kontrolle festzustellen, wenn man mit  $E_2$  1 nM inkubierte ( $P < 0.001$ ).  $E_2$  in zehnfach höherer Konzentration löste keinen Effekt aus (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Einfluss von  $E_2$  auf die Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++).

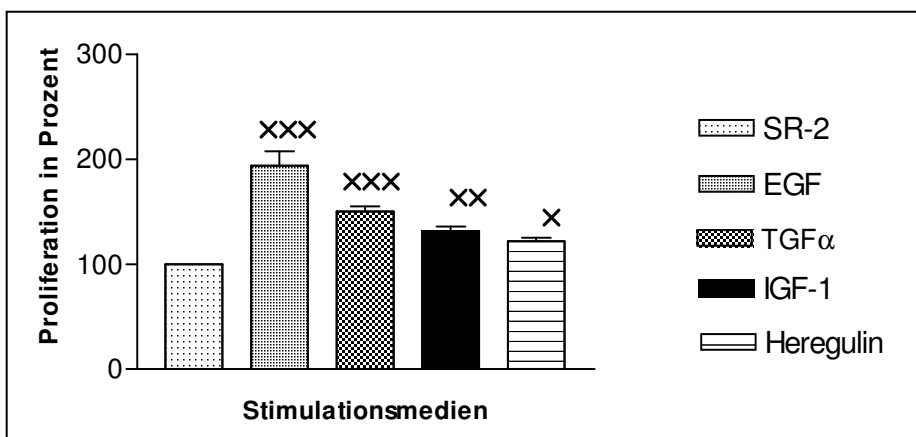
### 3.2.2. Aktivierung der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren

a) Hier bestätigten sich die teils schon in der Literatur beschriebenen positiven Wachstumsraten. EGF löste die ausgeprägteste Reaktion mit insgesamt 238,1 % Wachstum aus ( $P < 0.001$ ). Das am gleichen Rezeptor angreifende  $TGF\alpha$  löste dagegen keine signifikante Proliferation aus. Die Zellen zeigten auf das an den erbB-3- und erbB-4-Rezeptor bindende Heregulin ebenfalls keine signifikante Reaktion. IGF-1 führte zu einem Wachstum von 173,7 % ( $P < 0.05$ ), (Abb. 13).



**Abbildung 13:** Einfluss von RTK-Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.001$  (+++).

b) Während EGF insgesamt eine Proliferation von 194,1 % induzierte ( $P < 0.001$ ), löste  $TGF\alpha$  eine 150,2-prozentige Proliferation aus ( $P < 0.001$ ). Heregulin zeigte eine schwache, aber signifikante Erhöhung der Wachstumsrate um 21,8 % ( $P < 0.05$ ), ebenso wie IGF-1, dessen Rezeptor nicht zur erbB-Rezeptorfamilie gehört (131,7 % mit  $P < 0.01$ ), (Abb. 14).



**Abbildung 14:** Einfluss von RTK-Wachstumsfaktoren auf die Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+),  $P < 0.01$  (++) und  $P < 0.001$  (+++).



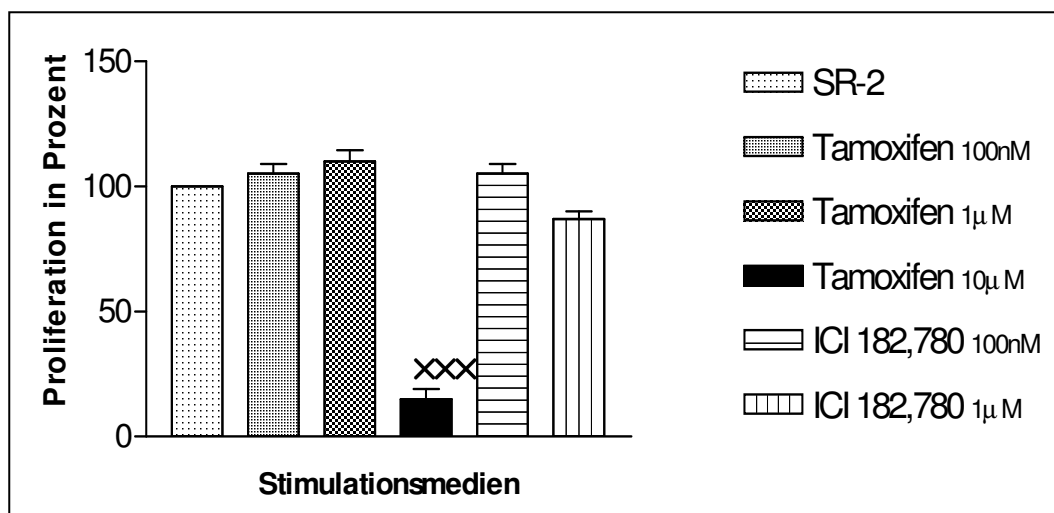
### 3.3. Antiproliferative Effekte auf BG-1- und SKOV-3-Zellen

Eine Proliferationseinschränkung wird durch Substanzen erreicht, die mindestens einen Schritt in den Signalkaskaden blockieren, die für das Wachstum massgeblich sind. In den Kapiteln 3.3.1. und 3.3.2. wird der Einfluss von Inhibitoren des ER-Signalweges und der RTK-Kaskade auf das basale Wachstum der Zelllinien gezeigt.

#### 3.3.1. Einfluss von Antiöstrogenen auf die Östradiol-unabhängige Proliferation der Zellen

Das Experiment wurde mit zwei am Östrogenrezeptor angreifenden Substanzen durchgeführt, mit Tamoxifen als dem partiellen Antagonisten und ICI 182,780 (Faslodex) als dem totalen Antagonisten am ER. Die zunächst dargestellten Ergebnisse stammen aus Experimenten in serum- und östradiolfreiem Medium, um die Östrogen-unabhängigen Effekte der Antiöstrogene nachweisen zu können.

a) Beide Inhibitoren zeigten in verschiedenen Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Lediglich Tamoxifen 10  $\mu\text{M}$  löste eine starke Inhibition aus ( $P < 0.001$ ). Tamoxifen war in Ethanol gelöst. Aus den Lösungsmittelkontrollen geht hervor, dass dieser starke Effekt nicht lösungsmittelbedingt war (Abb. 15).

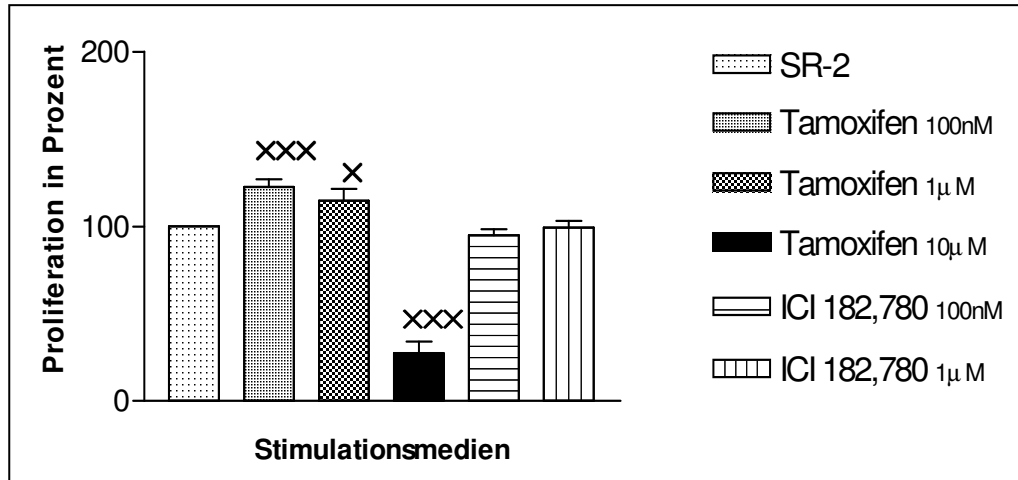


**Abbildung 15:** Einfluss von Antiöstrogenen (Tamoxifen; ICI 182,780) auf die Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++).

b) Bei SKOV-3-Zellen zeigten sich Unterschiede, die umso erstaunlicher sind, da - wie schon mehrmals beschrieben - die Funktion des ER eingeschränkt ist. Tamoxifen in den Konzentrationen 100 nM und 1  $\mu\text{M}$  führte zu einem schwachen, aber signifikanten Wachstum von 122,6 % ( $P < 0.001$ ) bzw. 114,8 % ( $P < 0.05$ ). Tamoxifen 10  $\mu\text{M}$  liess das

Wachstum ähnlich wie bei den BG-1-Zellen bis auf 27 % des Kontrollwertes sistieren ( $P < 0.001$ ).

ICI 182,780 löste keine signifikante Veränderung aus (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Einfluss von Antiöstrogenen (Tamoxifen; ICI 182,780) auf die Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum SR-2-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.001$  (+++).

### 3.3.2. Einfluss von Inhibitoren des RTK-Signalweges auf die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation von Ovarialkarzinomzellen

Die Zellen wurden allein mit Inhibitoren des RTK-Signalweges inkubiert. Es wurden Substanzen verwendet, die an verschiedenen Lokalisationen eingreifen: AG 1478, AG 1024 und Herceptin blockieren die Aktivierung membranständiger Rezeptoren, ZD 1839 (Iressa) ist ebenfalls ein relativ neu entwickelter Inhibitor der EGFR-Tyrosin-Kinase, der auch in vivo wirksam ist. PD 98059 ist ein Antagonist der cytoplasmatischen MEK-1-Kinase, wirkt also weiter "downstream". Dieses Experiment, das die Wirkung der einzelnen Inhibitoren der RTK-Signalkaskade auf die basale Proliferation in Wachstumsfaktor-freiem Medium untersuchte, wurde als Grundlagenversuch zur Einordnung der Ergebnisse späterer Experimente durchgeführt, die diese Inhibitoren in Kombination mit aktivitätsstimulierenden Substanzen darstellen.

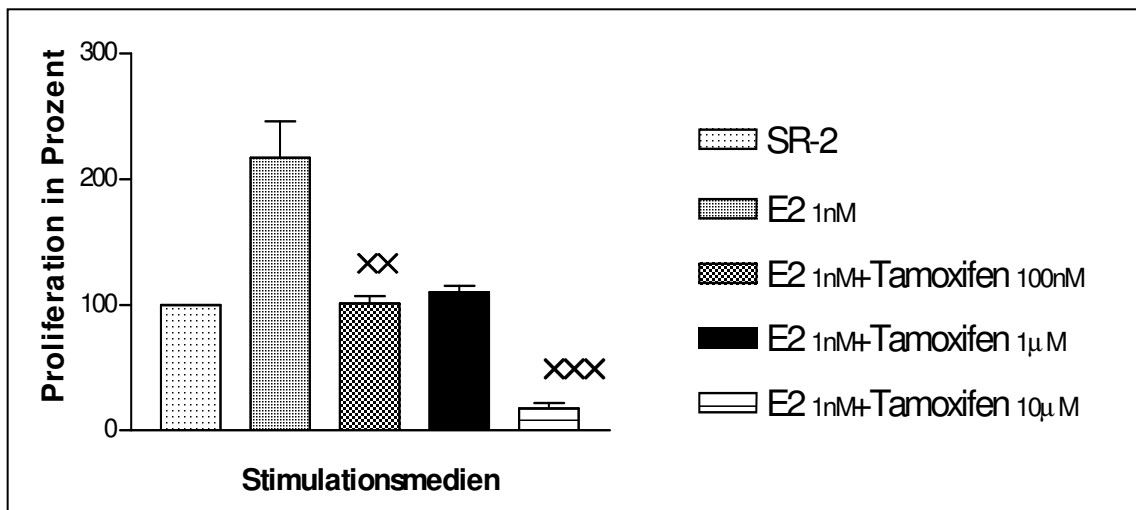
**a+b)** In beiden Zelllinien wurde kein signifikanter Effekt von RTK-Inhibitoren auf die Wachstumsfaktor-unabhängige Proliferation ermittelt.

### 3.4. Inhibitorischer Einfluss von Antiöstrogenen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation der BG-1- und SKOV-3-Zellen

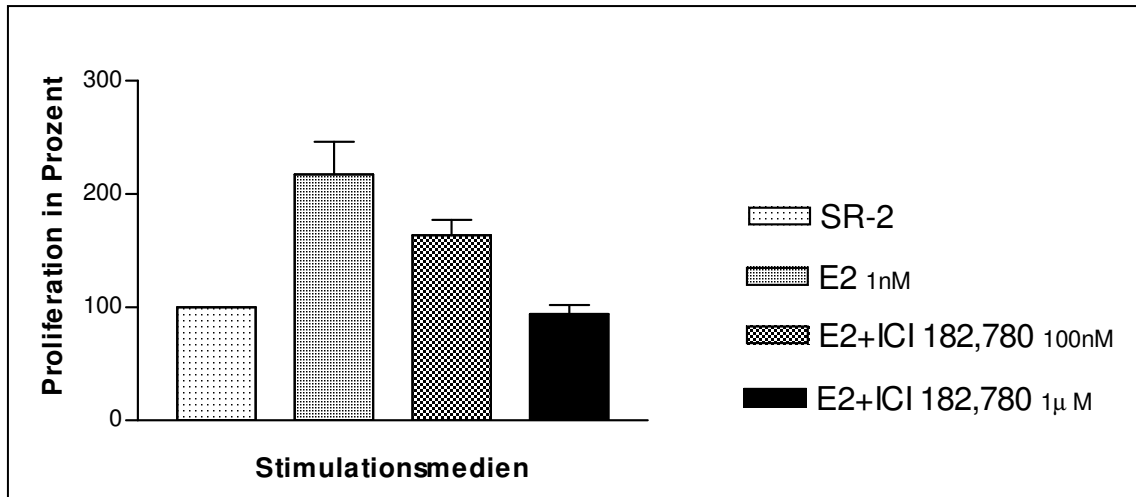
In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich ein erhöhtes Wachstum durch Zusatz von E<sub>2</sub> in beiden Zelllinien auslösen liess. Die folgenden Versuche kombinierten jeweils E<sub>2</sub> in der Konzentration von 1nM mit Tamoxifen oder ICI 182,780 in unterschiedlichen Konzentrationen. Dadurch sollte überprüft werden, ob die E<sub>2</sub>-induzierte Stimulation der Zellen durch AÖ effektiv inhibiert wurde.

a) Durch Tamoxifen 100 nM wurde die starke E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation der BG-1-Zellen fast auf den Ausgangswert der Kontrolle zurückgefahren (P<0.01). Ähnlich stellten sich die Ergebnisse mit Tamoxifen 1 µM dar, doch waren sie - wie wir annehmen aufgrund einer zu geringen Anzahl an Messwerten - nicht signifikant. In der höchsten Konzentration zeigte Tamoxifen wie erwartet eine sehr stark eingeschränkte Proliferation, die deutlich noch unter der des Kontrollwertes lag (P<0.001), (Abb. 17).

Die Versuche mit ICI 182,780 als Inhibitor zeigten keine Signifikanz aufgrund einer zu geringen Anzahl an Ergebnissen. Sie zeigten jedoch die Tendenz, dass ICI 182,780 dosisabhängig das E<sub>2</sub>-induzierte Wachstum aufheben konnte (Abb. 18).

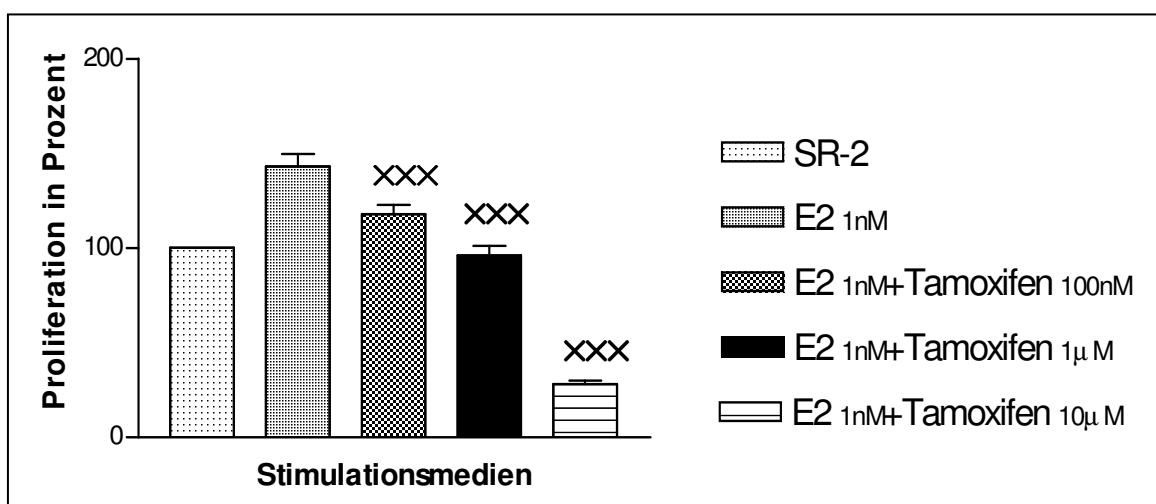


**Abbildung 17:** Einfluss von Tamoxifen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens zwei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum E<sub>2</sub>-Wert statistisch signifikant mit P<0.01 (++) und P<0.001 (+++).

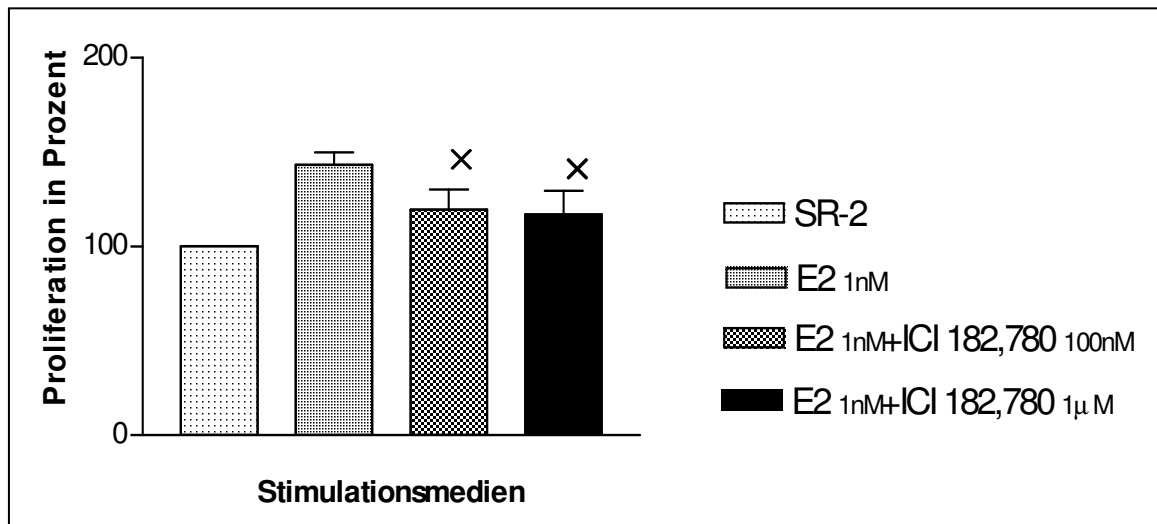


**Abbildung 18:** Einfluss von ICI 182,780 (Faslodex) auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen zwei unabhängige Versuche dar. Sie sind statistisch nicht signifikant, was wohl an einer zu geringen Anzahl an Messwerten liegt.

b) Nachdem sich herausstellte, dass SKOV-3-Zellen auch ohne einen funktionsfähigen ER $\alpha$  ein E<sub>2</sub>-induziertes Wachstum zeigten, wurde anhand dieser Ergebnisse deutlich, dass sowohl Tamoxifen als auch ICI 182,780 in allen Konzentrationen die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation in unterschiedlichem Ausmass einschränken konnten. Während Tamoxifen in der niedrigsten Konzentration (100 nM) die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation zu 58,6 % aufhob, sank der Wert bei Tamoxifen 1  $\mu$ M noch unter den der Kontrolle zurück (jeweils P<0.001), (Abb. 19). Unter ICI 182,780-Einfluss wurde die E<sub>2</sub>-Wirkung durch beide eingesetzte Konzentrationen (100 nM und 1  $\mu$ M) um ca. 57 % abgeschwächt (P jeweils <0.05), (Abb. 20). Die Ergebnisse sind umso erstaunlicher, da sie doch einen Einfluss des ER auf das zelluläre Wachstum vermuten lassen.



**Abbildung 19:** Einfluss von Tamoxifen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum E<sub>2</sub>-Wert statistisch signifikant mit P<0.001 (+++).



**Abbildung 20:** Einfluss von ICI 182,780 (Faslodex) auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum E<sub>2</sub>-Wert statistisch signifikant mit P<0.05 (+).

### **3.5. Hemmung der Wachstumsfaktor-induzierten Proliferation durch spezifische Inhibitoren bei BG-1- und SKOV-3-Zellen**

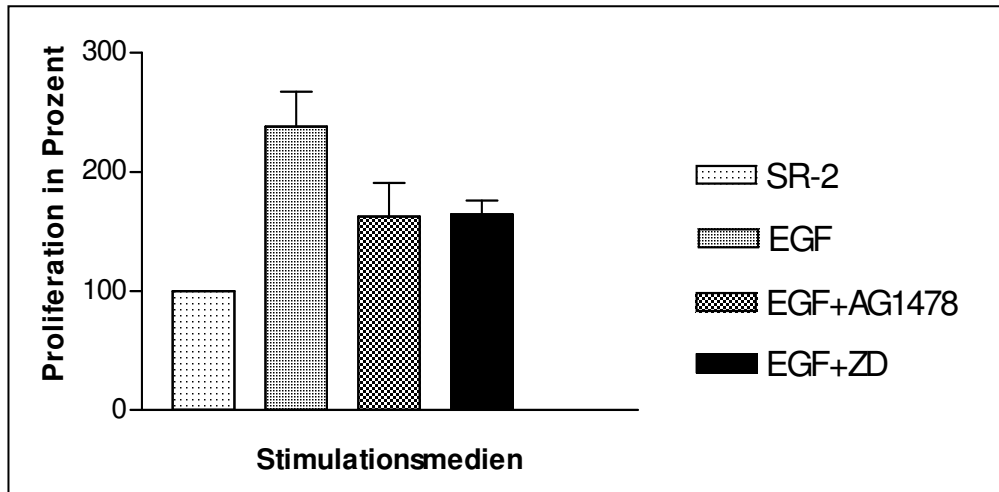
Um die von den unterschiedlichen Wachstumsfaktoren benutzten membranständigen Rezeptoren möglichst spezifisch zu blockieren, wurden unterschiedliche Hemmstoffe eingesetzt. Eine Ausnahme stellte PD 98059 dar, da mit ihm ein gemeinsamer Abschnitt aller hier verwendeten Wachstumsfaktoren inhibiert wurde: die weiter downstream im Signalweg liegende MAP-Kinase-Kinase MEK-1. EGF und TGF $\alpha$  benutzen den gleichen Rezeptor. Die Rezeptoren für Heregulin und IGF-1 stellen auch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen dar, gehören jedoch anderen Typen an (s. Einleitung).

Im Folgenden wird das inhibitorische Potential der einzelnen Substanzen auf die WF-induzierte Proliferation dargestellt, um eine eventuelle Wirkeinschränkung auf Grund negativer Einflüsse der Interaktionen beider Signalwege zu überprüfen.

#### **3.5.1. Hemmung der EGF-induzierten Proliferation durch AG 1478 und ZD 1839**

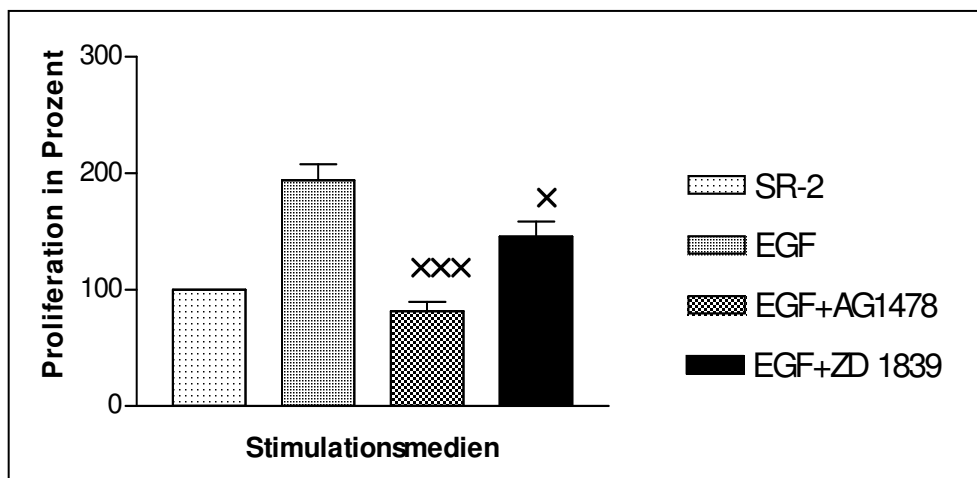
Beide Stoffe inhibieren den membranständigen Rezeptor direkt.

a) Bei BG-1-Zellen liess sich keine signifikante Beeinflussung des EGF-vermittelten Wachstums durch beide Substanzen beobachten (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Einfluss von RTK-Inhibitoren (AG 1478, ZD=ZD 1839) auf die EGF-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar und sind statistisch nicht signifikant.

b) Das EGF-induzierte Wachstum von 191,1 % wurde bei SKOV-3-Zellen durch AG 1478 auf 81,5 % reduziert ( $P < 0.001$ ). ZD 1839 zeigte keinen so ausgeprägten Effekt, es verringerte die EGF-induzierte Proliferation um 51,4 % ( $P < 0.05$ ), (Abb. 22).

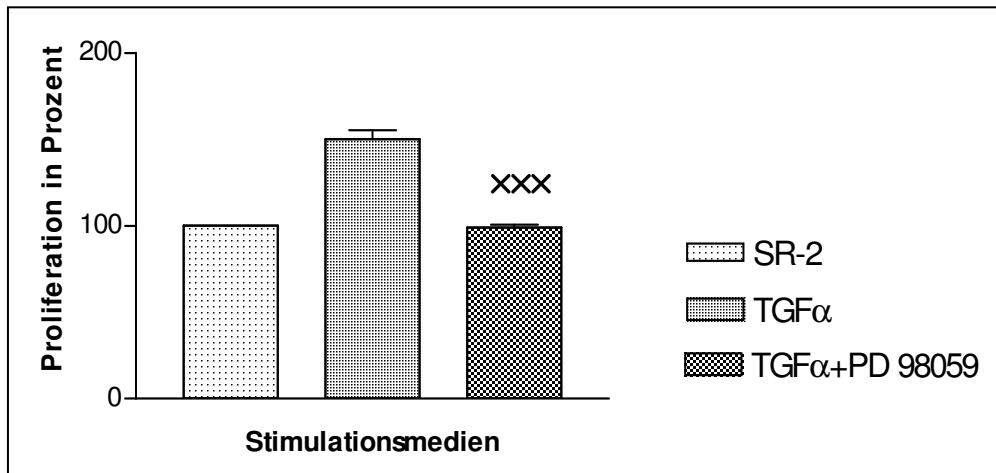


**Abbildung 22:** Einfluss von RTK-Inhibitoren auf die EGF-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum EGF-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.001$  (+++).

### 3.5.2. Hemmung der $TGF\alpha$ -induzierten Proliferation durch PD 98059

a) Unter alleiniger  $TGF\alpha$ -Zugabe wurde keine signifikante Zunahme der Proliferation bei BG-1-Zellen beobachtet (s. 3.1.2.). Deshalb wurden BG-1-Zellen nicht mit der Kombination  $TGF\alpha$  + PD 98059 inkubiert.

b) Sehr einheitliche Ergebnisse stellten sich bei den SKOV-3-Zellen für jeden Einzelversuch dar. Die TGF $\alpha$ -induzierte Proliferation (150,2 %) wurde durch den MEK-1-Inhibitor vollständig aufgehoben (P<0.001), (Abb. 23).

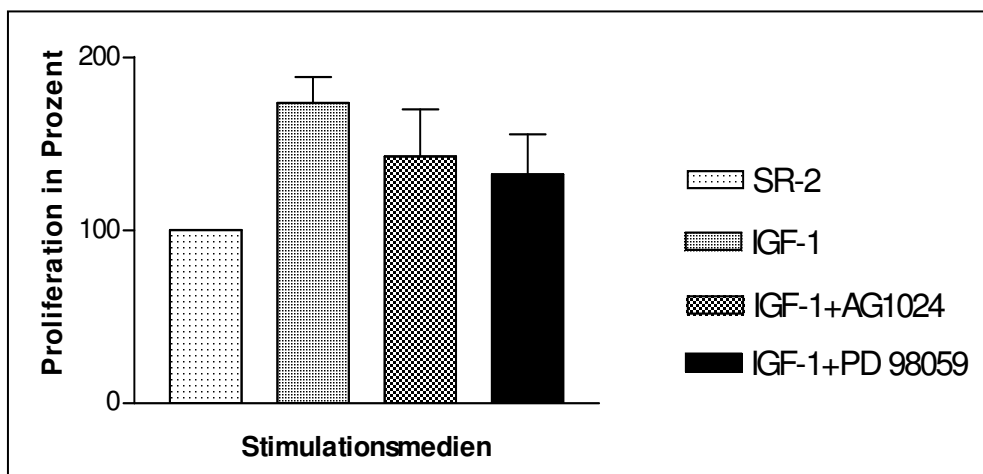


**Abbildung 23:** Einfluss von PD 98059 auf die TGF $\alpha$ -induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum TGF $\alpha$ -Wert statistisch signifikant mit P<0.001 (+++).

### 3.5.3. Hemmung der IGF-1- induzierten Proliferation durch AG 1024 und PD 98059

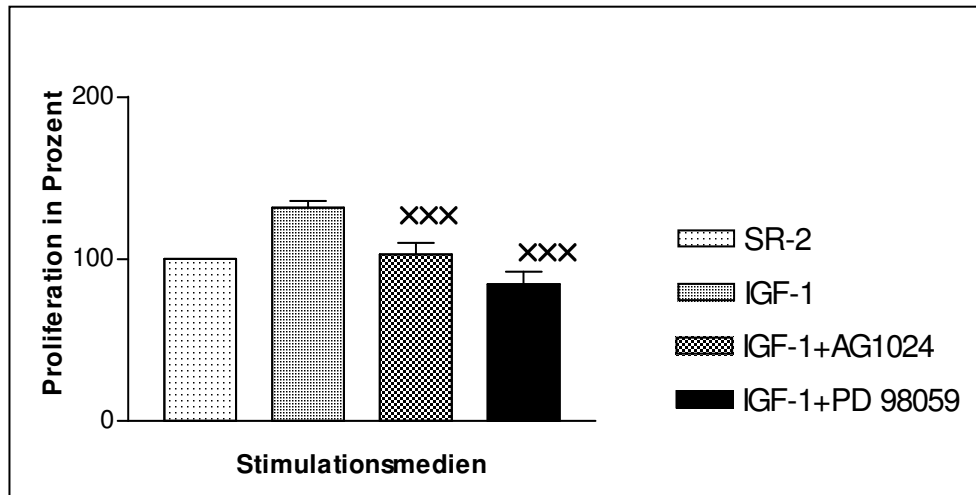
In diesem Versuch wurde ein Inhibitor des IGF-Rezeptors (AG 1024) und ein Inhibitor der weiter downstream liegenden MAP-Kinase-Kinase MEK-1 (PD 98059) untersucht.

a) Bei BG-1-Zellen zeigten beide Inhibitoren keinen signifikanten Effekt auf die Wirkung von IGF-1, auch wenn ein entsprechender Trend beobachtet werden konnte (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Einfluss von RTK-Inhibitoren auf die IGF-1-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind statistisch nicht signifikant.

**b)** AG 1024 führte bei SKOV-3-Zellen zu einer 90,9-prozentigen Inhibition der IGF-1-Wirkung ( $P < 0.001$ ). PD 98059 blockierte noch stärker, insgesamt erreichten die Zellen nur eine Proliferation von 84,4 % ( $P < 0.001$ ), (Abb. 25).



**Abbildung 25:** Einfluss von RTK-Inhibitoren auf die IGF-1-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum IGF-1-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++).

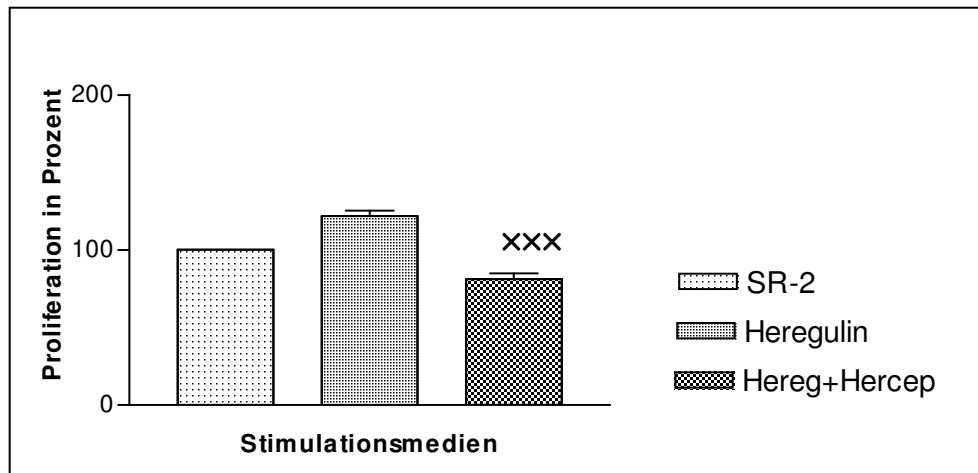
#### 3.5.4. Hemmung der Heregulin- induzierten Proliferation durch Herceptin

Der HER2/neu-Rezeptor wird spezifisch durch Herceptin blockiert. Zwar kennt man für diesen Rezeptor bislang keine Agonisten, doch wird er aktiviert über Dimerisierung mit anderen Rezeptoren aus seiner Familie, etwa nach Stimulation mit dem Peptidhormon Heregulin. Dementsprechend kann theoretisch ein spezifischer Inhibitor das Wachstum beeinflussen.

**a)** Mit BG-1-Zellen wurde der Versuch nicht durchgeführt, da diese Zellen schon keine signifikante Reaktion auf die alleinige Gabe von Heregulin zeigten.

**b)** Das schwache Heregulin-induzierte Wachstum der SKOV-3-Zellen (121,8 %) wurde vollständig durch Herceptin aufgehoben ( $P < 0.001$ ). Die Wachstumsrate verkleinerte sich noch unter die der Kontrolle auf 81,1 % (Abb. 26).





**Abbildung 26:** Einfluss von Herceptin auf die Heregulin-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse stellen mindestens drei unabhängige Versuche dar. Sie sind zum Heregulin-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.001$  (+++). Hercep=Herceptin; Hereg=Heregulin.

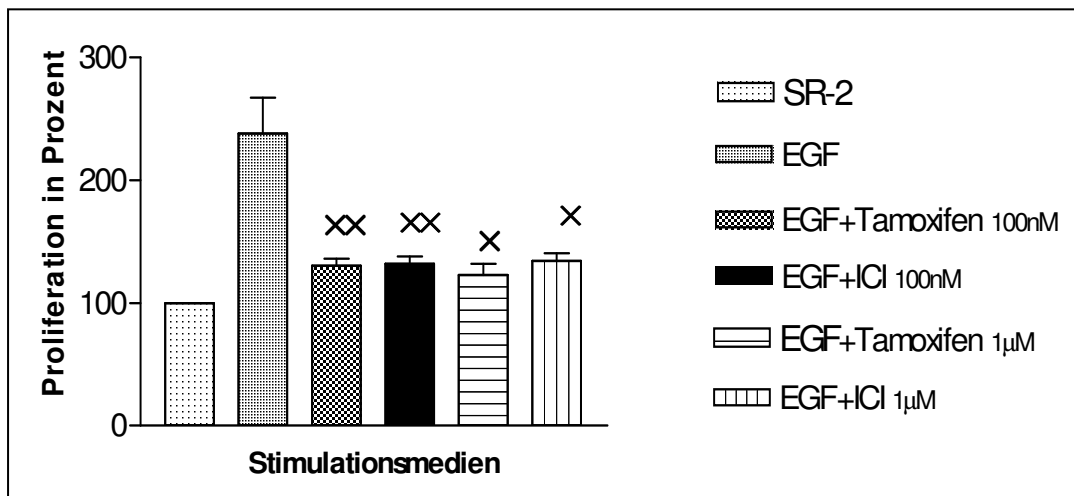
### **3.6. Einfluss von Antiöstrogenen auf die Wachstumsfaktor- induzierte Proliferation von BG-1- und SKOV-3-Zellen**

Dass eine Kommunikation zwischen beiden klassischen Wachstumswegen besteht, ist für die BG-1-Zellen schon mehrfach diskutiert worden. Der Studienlage zufolge wird das bei SKOV-3-Zellen auch diskutiert. In diesem Versuchsteil sollte das Bestehen einer Interaktion zwischen Östrogenrezeptor- und Wachstumsfaktor-Signalwegen in den beiden ovariellen Zelllinien überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde untersucht, ob die Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation durch Antiöstrogene beeinträchtigt werden kann. Das spräche dafür, dass Wachstumsfaktoren an Rezeptoren binden, die durch Antiöstrogene blockiert werden können, sprich dass ein Teil der proliferativen Wirkung der Wachstumsfaktoren über Östrogen-Signalwege vermittelt wird. In unseren Experimenten wurden zunächst Wachstumsfaktoren mit Tamoxifen bzw. ICI 182,780 kombiniert. Die Wachstumsfaktoren behielten immer die Konzentration 1 nM, wobei die AÖ einmal mit 100 nM und einmal mit 1  $\mu$ M vertreten waren.

#### **3.6.1. Einfluss von Antiöstrogenen auf die EGF- induzierte Proliferation**

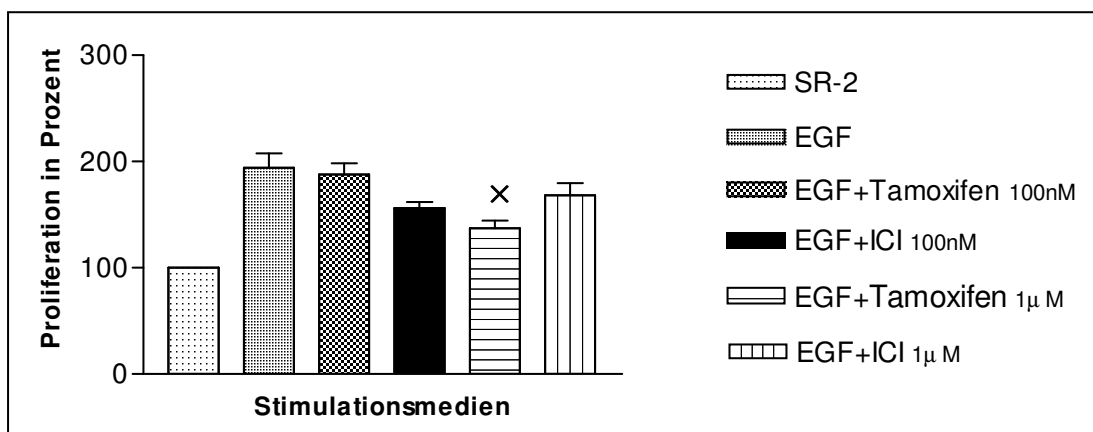
a) In allen Versuchen wurde am Modell der Zelllinie BG-1 die EGF-induzierte Proliferation zu ca. 80 % (83,4% - 75,2%) durch die Zugabe von Tamoxifen als auch durch ICI 182,780 vermindert. Die Unterschiede zwischen den einzelnen AÖ und deren Konzentrationen schwankten nur gering. Eine stärkere Inhibition bei höher dosierten AÖ konnte nicht gezeigt werden ( $P < 0.01$  bzw.  $P < 0.05$ ), (Abb. 27). Zum Vergleich sollen hier

noch einmal die Ergebnisse von Abbildung Nr. 21 erwähnt werden: Die RTK-Inhibitoren konnten die EGF-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen nicht signifikant beeinflussen.



**Abbildung 27:** Einfluss von Antiöstrogenen auf die EGF-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum EGF-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.01$  (++) . ICI=ICI182,780.

b) Bei den SKOV-3-Zellen zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Während hier die Wachstumsfaktoren in ihrer Wirkung durch RTK-Inhibitoren negativ beeinflusst werden konnten (Abb. 22), wurden sie durch Tamoxifen (100 nM) als auch ICI 182,780 (100 nM, 1 µM) nicht signifikant in ihrer Wirkung eingeschränkt. Lediglich Tamoxifen in der Konzentration 1 µM vermochte die EGF-induzierte Proliferation zu 60,6 % zu hemmen ( $P < 0.01$ ), (Abb. 28).

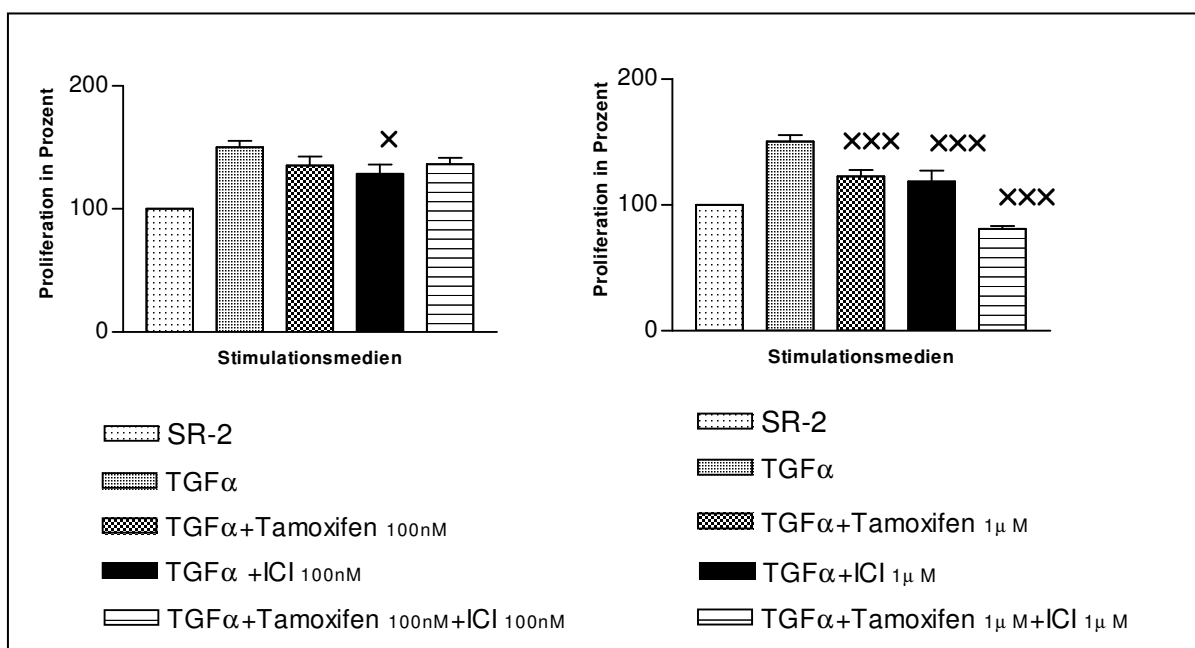


**Abbildung 28:** Einfluss von Antiöstrogenen auf die EGF-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum EGF-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+). ICI=ICI 182,780.

### 3.6.2. Einfluss von Antiöstrogenen auf die TGF $\alpha$ - induzierte Proliferation

a) TGF $\alpha$  löste bei BG-1-Zellen keine proliferative Antwort aus. Insofern wurde kein Experiment mit TGF $\alpha$  in der Kombination mit Antiöstrogenen angesetzt.

b) Die Versuche mit den SKOV-3-Zellen zeigten eine Dosisabhängigkeit. Wurden die Antiöstrogene in der niedrigeren Konzentration von 100 nM eingesetzt, zeigte lediglich der totale Antagonist am Östrogenrezeptor ICI 182,780 eine signifikante Hemmung der TGF $\alpha$ -induzierten Proliferation um ca. 40 % (P<0.05). In der höheren Konzentration von 1  $\mu$ M waren alle AÖ zur Inhibition der TGF $\alpha$ -induzierten Proliferation wie folgt befähigt: TGF $\alpha$  alleine löste 150,2 % Wachstum aus, das durch Tamoxifen (1  $\mu$ M) auf 122,7 % (P<0.001) und durch ICI 182,780 auf 118,5 % (P<0.001) gesenkt wurde. Setzte man gleichzeitig beide AÖ (jeweils 1  $\mu$ M) ein, wurde nur noch ein Wachstum von 81,0 % erreicht (P<0.001), (Abb. 29).



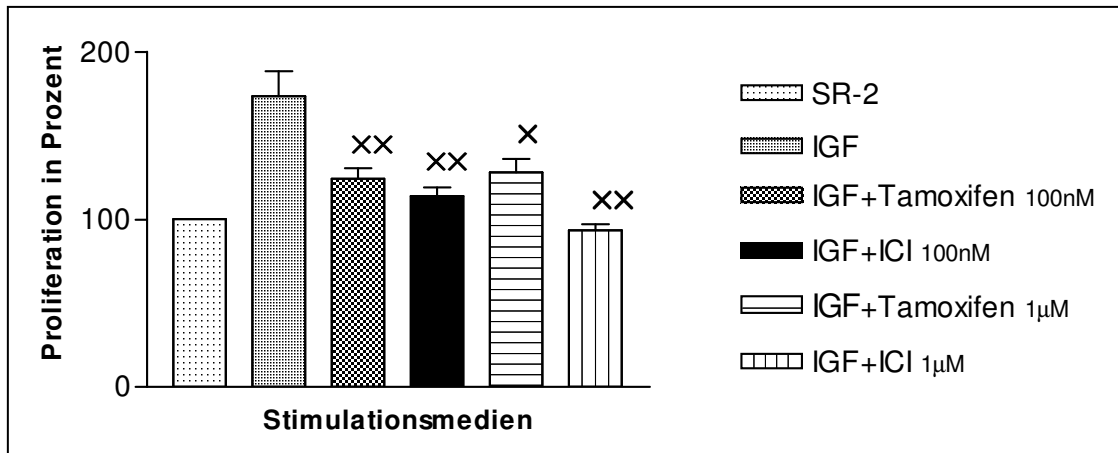
**Abbildung 29:** Einfluss von Antiöstrogenen auf die TGF $\alpha$ -induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum TGF $\alpha$ -Wert statistisch signifikant mit P<0.05 (+) und P<0.001(+++). ICI=ICI 182,780.

### 3.6.3. Einfluss von Antiöstrogenen auf die IGF-1-induzierte Proliferation

Analog der beiden vorangehenden Versuche wurde jetzt überprüft, ob die IGF-1-induzierte Wirkung durch AÖ gehemmt werden konnte. Das spräche für eine Einflussnahme auf den Östrogenrezeptorsignalweg durch IGF-1.

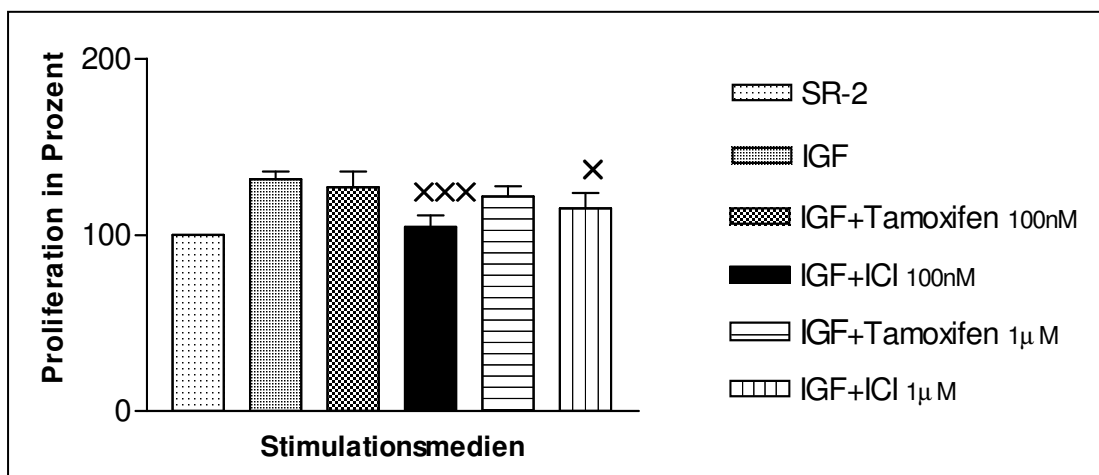
a) Die IGF-1- induzierte Proliferation konnte bei BG-1-Zellen durch beide AÖ beider Konzentrationen signifikant (P<0.01 bzw. P<0.05) vermindert werden. Dabei zeigten sich nur

minimale Unterschiede in den unterschiedlichen Konzentrationen. Keine signifikanten Unterschiede gab es im direkten Vergleich zwischen den zwei AÖ (Abb. 30).



**Abbildung 30:** Einfluss von Antiöstrogenen auf die IGF-1-induzierte Proliferation von BG-1-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum IGF-1-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.01$  (XX). ICI=ICI 182,780; IGF=IGF-1.

b) Anders stellte es sich bei den SKOV-3-Zellen dar. Unter Tamoxifen-Zugabe zeigte sich weder in der Konzentration 100 nM noch in der Konzentration 1 µM ein signifikanter Unterschied zur alleinigen IGF-1-Wirkung. Der totale Antagonist am ER ICI 182,780 konnte das IGF-1-induzierte Wachstum von 131,7 % auf 104,6 % reduzieren ( $P < 0.001$ ). In der zehnfach höheren Konzentration wurde es um 52,4 % inhibiert ( $P < 0.05$ ), (Abb.31).



**Abbildung 31:** Einfluss von Antiöstrogenen auf die IGF-1-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum IGF-1-Wert statistisch signifikant mit  $P < 0.05$  (+) und  $P < 0.001$  (XXX). ICI=ICI 182,780; IGF=IGF-1.

### **3.7. Nutzung des RTK-Signalweges durch Östrogene bei BG-1- und SKOV-3-Zellen**

Bisher wurde gezeigt, dass Wachstumsfaktoren durch AÖ in ihrer Wirkung gehemmt werden konnten. Es stellte sich nun die Frage, ob E<sub>2</sub> auch in den Signalweg eingriff, der von den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ausgeht und klassischerweise von den Wachstumsfaktoren genutzt wird, d.h. ob zumindest ein Teil der proliferativen E<sub>2</sub>-Wirkung über WF-Signalwege vermittelt wird. Dies ist besonders bei den ER $\alpha$ -trunkierten SKOV-3-Zellen von Bedeutung, da ein E<sub>2</sub>-induziertes Wachstum nachgewiesen werden konnte.

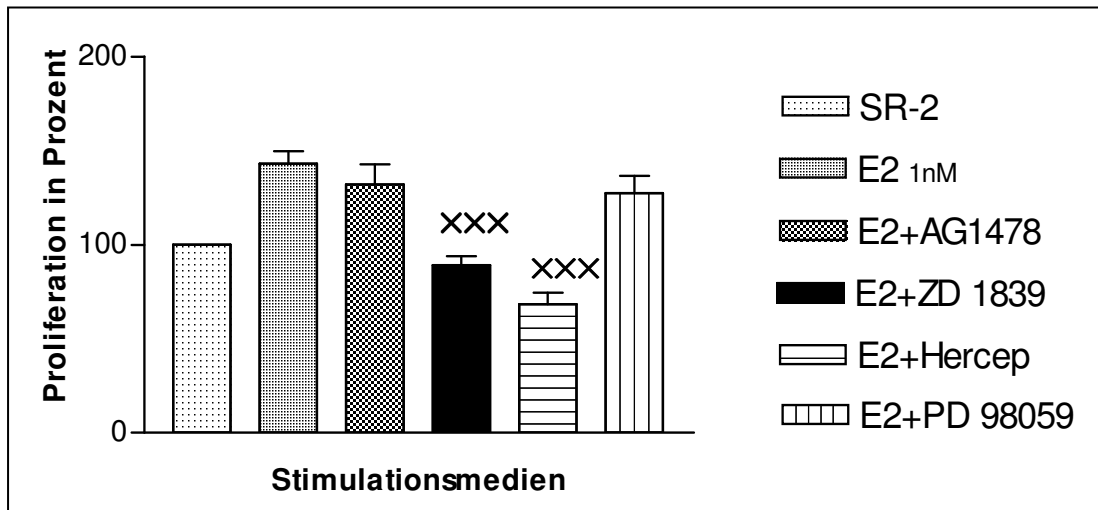
Zur Beantwortung der Frage wurde die alleinige Wirkung von E<sub>2</sub> mit der Kombination aus E<sub>2</sub> + Inhibitor des RTK-Signalweges verglichen. Wie beschrieben, wurden proximal angreifende Antagonisten und PD 98059 als ein distal ansetzender Blocker benutzt.

Zusätzlich wurden dann Dreierkombinationen getestet, bei denen nicht nur die RTK-Kaskade, sondern durch Tamoxifen auch der ER beeinträchtigt werden sollte (E<sub>2</sub>+ WF-Inhibitor+ Tamoxifen). Der Vergleich zwischen diesen Ergebnissen und den Resultaten aus der Kombination E<sub>2</sub>+WF-Inhibitor alleine sollte zeigen, ob eine maximale Hemmung des Wachstums möglich war, wenn man beide bisher beschriebenen Signalwege sperrte.

#### **3.7.1. Einfluss von Kinase-Inhibitoren auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation**

**a)** Beim Vergleich der Wachstumsraten von alleiniger E<sub>2</sub>-Inkubation und dem Zusatz von Wachstumsfaktorinhibitoren zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, d.h. Wachstumsfaktorinhibitoren waren bei BG-1-Zellen nicht in der Lage, die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation zu hemmen (nicht gezeigt).

**b)** Bei SKOV-3-Zellen lösten AG 1478 und PD 98059 keine signifikante Hemmung des E<sub>2</sub>-induzierten Wachstums aus. ZD 1839 und Herceptin jedoch senkten die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von 143,2 % auf 89,1 % (P<0.001) bzw. 68,3 % (P<0.001). Damit wurde das Wachstum noch unter das der Kontrolle gesenkt (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Einfluss von RTK-Inhibitoren auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Sie sind zum E<sub>2</sub>-Wert statistisch signifikant mit P<0.001 (+++). Hercep=Herceptin.

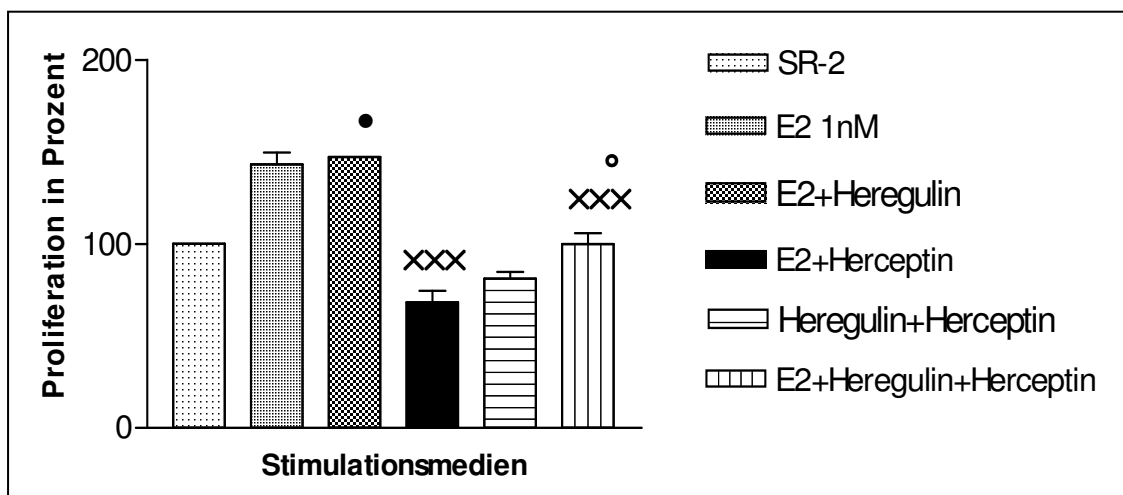
### 3.7.2. Einfluss von E<sub>2</sub> in Kombination mit Heregulin bzw. Herceptin auf die Proliferation der Zellen

Bei dem folgenden Diagramm sind zwei neue Werte bzw. Versuche vertreten: neuartig sind die Kombinationen E<sub>2</sub>+Heregulin sowie E<sub>2</sub>+Heregulin+Herceptin. Die anderen Balken wurden weiter oben schon aufgeführt, einschliesslich des Heregulin-induzierten Wachstums von knapp 122 %. Sie werden zur Veranschaulichung nochmals gezeigt. Dabei interessierte uns, wiederum einen Anhalt für das Eingreifen von E<sub>2</sub> in Tyrosin-Kinase-Kaskaden zu finden. Würden E<sub>2</sub> und Heregulin über gänzlich verschiedene Signalwege ihre nachgewiesene Proliferation erreichen, könnte man einen starken Unterschied der Wachstumsrate von E<sub>2</sub> alleine und der der Kombination aus E<sub>2</sub>+Heregulin erwarten. Durch Vergleich der Dreierkombination mit den anderen Balken untersuchte man die Wirkung von E<sub>2</sub> auf die inhibitorische Herceptin-Wirkung.

a) BG-1-Zellen reagierten nicht signifikant auf die einzelnen Kombinationen. Der E<sub>2</sub>-Einfluss konnte weder durch Herceptin beeinflusst werden, noch löste die Zugabe von Heregulin zu E<sub>2</sub> ein zusätzliches Wachstum aus. Zur Erinnerung: Heregulin alleine sowie die alleinige Herceptin-Gabe lösten jeweils keine proliferativen oder inhibitorischen Antworten aus. Der Proliferationswert für E<sub>2</sub> alleine ähnelte dem für die Kombination aus E<sub>2</sub> + Heregulin + Herceptin.

b) Durch Zusatz von Heregulin zu E<sub>2</sub> zeigte sich auch bei SKOV-3-Zellen kein verändertes Wachstum. Die Werte lagen um die Werte für die alleinige E<sub>2</sub>-Gabe (143,2 %) und damit

höher als die für die alleinige Heregulin-Gabe (121,8 %). Jedoch liess sich die E<sub>2</sub>-Wirkung durch Herceptin eindeutig stark hemmen (P<0.001). Gab man zu der Kombination aus E<sub>2</sub> + Herceptin den Agonisten Heregulin, konnte das Wachstum auf Werte der Kontrolle angehoben werden (P<0.05), jedoch nicht auf Werte der alleinigen Heregulin-Gabe. Gab man zu der Kombination aus Heregulin + Herceptin noch E<sub>2</sub> dazu, konnte das Wachstum nicht signifikant angehoben werden. Ausserdem wurde eine Proliferationsabnahme beobachtet, wenn man die Kombination aus E<sub>2</sub> + Heregulin + Herceptin mit der Kombination aus E<sub>2</sub> + Heregulin verglich (P<0.05), wobei die Werte nicht so stark absanken wie unter der Zweierkombination aus E<sub>2</sub> + Herceptin. Vergleicht man die Werte der E<sub>2</sub>-induzierten Proliferation mit denen der Kombination aus E<sub>2</sub> + Heregulin + Herceptin, fällt auf, dass immer noch eine Wachstumseinschränkung bestand, wenn auch nicht so stark wie die von E<sub>2</sub> + Herceptin (P<0.001), (Abb. 33). Alle diese Werte sprechen für eine starke Beteiligung des RTK-Signalweges an der Steuerung der zellulären Proliferation, wobei neben den WF insbesondere auch E<sub>2</sub> mit einbezogen wird.



**Abbildung 33:** Einfluss von E<sub>2</sub> in Kombination mit Heregulin bzw. Herceptin auf die Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Die Kombinationen [E<sub>2</sub>+Herceptin] und [E<sub>2</sub>+Heregulin+Herceptin] sind statistisch signifikant zu E<sub>2</sub> mit P<0.001 (+++). Die Kombination [E<sub>2</sub>+Heregulin] ist statistisch signifikant zu der Kombination [E<sub>2</sub>+Heregulin+Herceptin] mit P<0.05 (•). Ebenso ist der Proliferationsunterschied zwischen den Kombinationen [E<sub>2</sub>+Herceptin] und [E<sub>2</sub>+Herceptin+Heregulin] statistisch signifikant mit P<0.05 (o).

### 3.7.3. Paralleler Einfluss von TK-Inhibitoren und Antiöstrogenen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation: Versuch einer maximalen Wachstumsinhibition

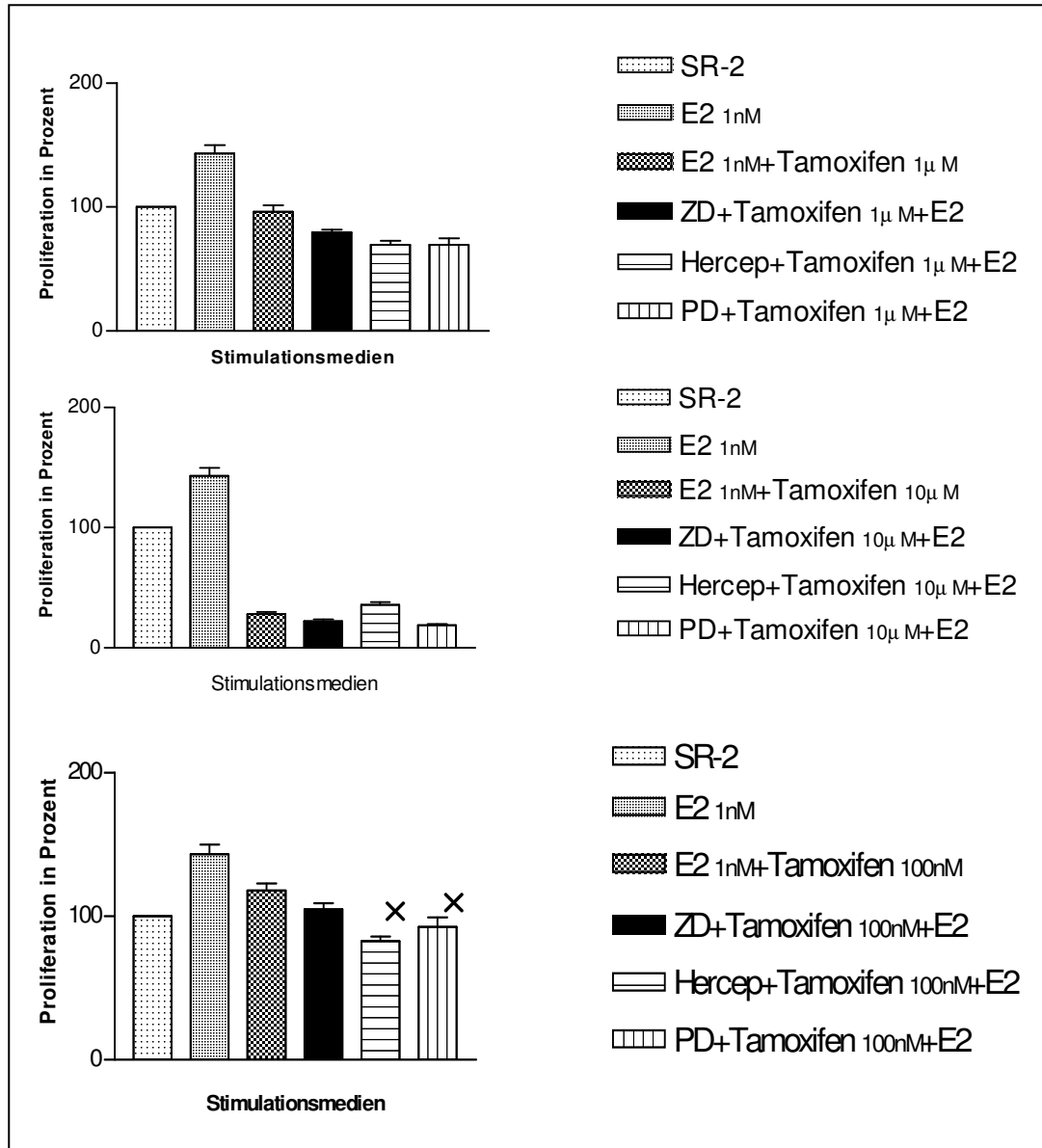
In den vorhergehenden Kapiteln wurde deutlich gemacht, dass E<sub>2</sub> je nach Zelllinie über unterschiedliche Signalwege seine proliferative Wirkung ausüben kann. Nun sollte durch Zugabe von TK-Inhibitoren und Tamoxifen als Antiöstrogen die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation maximal beeinflusst werden, indem beide Signalkaskaden blockiert wurden.

Die Grafen zeigen sechs Balken, von denen jeweils die ersten beiden die Kontrolle und die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation darstellen. Der dritte Balken hat nochmal das Thema aus Kapitel 3.4. aufgegriffen, nämlich die Hemmung der E<sub>2</sub>-gesteuerten Proliferation durch Tamoxifen, wobei Tamoxifen in jedem Grafen eine andere Konzentration annimmt. Die übrigen drei Balken stellen die Dreierkombination dar, in der ein RTK-Inhibitor dazugekommen ist.

a) BG-1-Zellen waren relativ unempfindlich bei Zugabe von RTK-Inhibitoren. Im Vergleich zu der Kombination aus E<sub>2</sub> + Tamoxifen lösten RTK-Inhibitoren keine weitere signifikante Inhibition der Proliferation aus. Dabei spielte die Konzentration des AÖ keine Rolle. Zum Vergleich soll noch einmal auf die Ergebnisse von Kapitel 3.6.1. verwiesen werden: die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation konnte von keinem der Inhibitoren des RTK-Signalweges verringert werden. Auch lösten diese Inhibitoren keine Hemmung der WF-induzierten Proliferation aus. Einzig AÖ vermochten die E<sub>2</sub>-Wirkung als auch die WF-vermittelte Proliferation zu verringern.

b) Eine zusätzliche Inhibition durch RTK-Wachstumsfaktoren konnte nur ausgelöst werden, wenn Tamoxifen in der niedrigsten Konzentration von 100 nM angeboten wurde. Hierbei konnte durch Herceptin das Wachstum von 117,9 % (E<sub>2</sub> + Tamoxifen 100 nM) auf 82,7 %, also um etwa 30 % gesenkt werden (P<0.05). Durch PD 98059 fiel der Wert nicht ganz so stark, aber immerhin auf 92,6 % (P<0.05). ZD 1839 vermochte das Wachstum nicht zusätzlich zu verringern. Zur Erinnerung: Herceptin konnte das E<sub>2</sub>-induzierte als auch das Heregulin-induzierte Wachstum signifikant verringern, ebenso wie ZD 1839. Dabei konnte Herceptin alleine jeweils stärker inhibitorisch auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation wirken, als in der Kombination mit Tamoxifen 100 nM. PD 98059 konnte zwar die Proliferation durch WF, nicht aber die allein E<sub>2</sub>-induzierte abschwächen (vgl. 3.4.; 3.6.1.). Tamoxifen konnte das E<sub>2</sub>-vermittelte Wachstum als auch in höherer Konzentration die Wirkung eines WF abschwächen (vgl. 3.3.; 3.5.2.). Wurde Tamoxifen in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM angeboten, konnten RTK-Inhibitoren keine Veränderung mehr bewirken (Abb. 34).





**Abbildung 34:** Einfluss von RTK-Inhibitoren und Tamoxifen in drei verschiedenen Konzentrationen auf die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation von SKOV-3-Zellen. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens drei unabhängige Versuche. Die mit (+) versehenen Balken sind zu {E<sub>2</sub> + Tamoxifen} statistisch signifikant mit P<0.05. ZD=ZD 1839; Hercep=Herceptin; PD=PD 98059.

#### 4.0. Ergebnisse: Vergleich der beiden Zelllinien

Die wichtigsten Punkte werden noch einmal im Überblick zusammengestellt, um die unterschiedlichen proliferativen Antworten auf Östrogene, Wachstumsfaktoren, Antiöstrogene und Inhibitoren des RTK-Signalweges der beiden Zelllinien vergleichen zu können. SKOV-3-Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu BG-1-Zellen durch einen funktionsunfähigen ER $\alpha$ , sowie durch eine RTK-Überexpression aus.

- 1) SKOV-3-Zellen waren nur etwa halb so E<sub>2</sub>-responsiv wie BG-1-Zellen.
- 2) SKOV-3-Zellen wurden von allen hier untersuchten Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt, BG-1-Zellen nur von EGF und IGF-1, nicht aber von TGF $\alpha$  und Heregulin.
- 3) Antiöstrogene verminderten sowohl in der ER $\alpha$ -positiven Linie BG-1, als auch in der ER $\alpha$ -trunkierten Zelllinie SKOV-3 die proliferative Antwort auf Östrogen.
- 4) Die E<sub>2</sub>-Antwort liess sich bei BG-1-Zellen nicht durch Inhibitoren des RTK-Signalweges hemmen, bei SKOV-3-Zellen dagegen schon.
- 5) Inhibitoren des RTK-Signalweges wirkten bei SKOV-3-Zellen inhibitorisch auf die WF- induzierte Proliferation, bei BG-1-Zellen konnten sie die durch WF gesteigerte Proliferationsrate nicht vermindern. Das spräche unter Berücksichtigung des folgenden Punktes dafür, dass die WF-induzierte Proliferation in BG-1-Zellen vor allem über ER-Wege vermittelt wird.
- 6) Antiöstrogene konnten die WF-induzierte Proliferation bei BG-1-Zellen deutlich einschränken, bei SKOV-3-Zellen nur bedingt. Hier war v.a. der totale ER-Antagonist ICI 182,780 wirksam.
- 7) Wenn die klassische Signalkaskade von E<sub>2</sub> durch Tamoxifen gehemmt wurde, liess sich durch RTK-Antagonisten bei BG-1-Zellen keine weitere Inhibition der Wachstumsraten erreichen, bei SKOV-3-Zellen dagegen schon, jedoch durch die zusätzliche Gabe von Herceptin nicht stärker, als durch die alleinige Gabe dieses RTK-Inhibitors in der Kombination E<sub>2</sub> + Herceptin.

## 5.0. DISKUSSION

### **5.1. Wachstumsinduktion durch Östrogene und Wachstumsfaktoren in zwei unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien**

Östrogen löste bei BG-1-Zellen eine Steigerung der Proliferation um ca. 117 % aus. Damit decken sich die Ergebnisse mit Beobachtungen anderer Labore (*Geisinger et al., 1989; Geisinger et al., 1990; Galtier-Dereure et al., 1992; Pavlik et al., 1991; Baldwin et al., 1998*). Diese Zellen weisen einen ER-Gehalt von 4,5-23 fmol/mg Protein auf (*Geisinger et al., 1989; Zimmiski et al., 1989; Galtier-Dereure et al., 1992*), wobei nach immunologischen Färbungen und E<sub>2</sub>-Behandlung der Rezeptor ausschliesslich im Zellkern zu finden war (*Geisinger et al., 1989*). Insgesamt wurde deutlich, dass selbst innerhalb einer Kultur die Rezeptordichte breiten Schwankungen unterworfen war (*Geisinger et al., 1989*), was den relativ grossen Fehlerbalken bei unseren Ergebnissen erklären würde. Zimmiski et al. berichteten, dass die Östrogenbehandlung zu einer Vermehrung der ER führen würde. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch keine Proliferationszunahme bei hochdosierten (10 nM) E<sub>2</sub>-Gaben. Dies spräche eher für eine Downregulation des Rezeptors, was zu den Ergebnissen von Ignar-Trowbridge passt, die bei BG-1-Zellen eine reduzierte Rezeptorzahl nach E<sub>2</sub>-Gabe vorfand. Zimmiski hatte seine Beobachtungen an In-vivo-Xenografts durchgeführt, während Ignar-Trowbridge In-vitro-Zellkulturen verwendete, deren Lebensbedingungen sehr ähnlich den unseren waren (*Zimmiski et al., 1989; Ignar-Trowbridge et al., 1996*).

SKOV-3-Zellen wiesen ein anderes Verhalten auf. Während sich bei E<sub>2</sub> 10 nM kein Effekt auf die gemessene Zellzahl zeigte, war bei Gabe von E<sub>2</sub> 1 nM immerhin 143 % Proliferation zu verzeichnen. Hua et al. beobachteten 1995 keine Reaktion auf die Gabe von E<sub>2</sub>, sie kultivierten die Zellen allerdings auch in 10 nM E<sub>2</sub> und über einen längeren Zeitraum, so dass hier eventuell die von Ignar-Trowbridge beobachtete Downregulation des ER zum Tragen kommen könnte. Somit widersprechen seine Ergebnisse den unsrigen nicht. In SKOV-3-Zellen sind beide Isoformen des ER auf mRNA- und Proteinebene vorhanden, und zwar in ähnlicher Menge vergleichbar mit normalen Ovarialepithelzellen. Das ER $\beta$ -Level wurde bei Brandenberger et al. als etwas erniedrigt, und bei Lau et al. als 2-fach erhöht relativ zu benignen Zellen beschrieben (*Brandenberger et al., 1998; Lau et al., 1999*). Während in der DNA-Sequenz des ER $\beta$  keine Anzeichen für eine Abnormalität vorliegen (*Brandenberger et al., 1998*), weist ER $\alpha$  eine Deletion von 32 Basenpaaren im Exon 1 auf. Auf Proteinebene führt das zu einem Rezeptor, dem die DBD und die LBD,

und damit AF-2 fehlt. AF-1 ist partiell erhalten (*Lau et al., 1999*). ER $\beta$  zeichnet sich dadurch aus, dass bei ihm die sonst konstitutiv aktive AF-1-Funktion nicht dauernd aktiv ist. Somit wäre die niedrigere Proliferationsrate im Vergleich zu den BG-1-Zellen mit den veränderten ER-Eigenschaften zu erklären. Ein anderer Grund könnte sein, dass SKOV-3-Zellen endogen Östrogene produzieren, während bei BG-1-Zellen eine fehlende Aromataseaktivität nachgewiesen wurde (*Zimmiski et al., 1989; Hua et al., 1995*). Dadurch könnten SKOV-3-Zellen durch exogen zugeführtes E<sub>2</sub> nicht mehr so stark stimuliert werden.

Angenommen die Aktivität der ER in SKOV-3-Zellen wäre so niedrig, dass sie wirklich nicht zu einer messbaren Proliferation beitragen könnten, gäbe es zusätzlich die Möglichkeiten der nicht-genomischen E<sub>2</sub>-Effekte, über Eingriff in das MAPK-System und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wobei u.a. auch der ER eine Rolle spielen kann. Immerhin wurde die E<sub>2</sub>-Wirkung durch Tamoxifen und ICI 182,780 teilweise aufgehoben. Diese Aspekte werden weiter unten ausführlicher behandelt.

Epidermal Growth Factor (EGF) und besonders Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) werden oft von Krebszellen und auch benignen OSE-Zellen sezerniert (*Sporn et al., 1985; Stromberg et al., 1992; Doraiswamy et al., 2000*). Ihre Überexpression führt zu Neoplasien und Karzinomen (*Jhappan et al., 1990*). Beide greifen spezifisch nur an erbB-1 (EGFR) an, nicht an den verwandten Rezeptoren.

BG-1-Zellen weisen ein eher niedriges Kontingent an EGFR auf. Neuere Ergebnisse sprachen von kleiner 20000 bzw. 6300 Rezeptoren pro Zelle (*Stromberg et al., 1992; Baldwin et al., 1998*). Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen (siehe Abb. 3). BG-1-Zellen antworten mit einer erhöhten Transkriptionsrate und Proliferation auf exogen zugeführtes EGF (*Ignar-Trowbridge et al., 1996; Baldwin et al., 1998*). Dies deckt sich mit den hier vorgestellten Ergebnissen. Es zeigte sich eine Proliferationssteigerung auf 238 % als Folge eines EGF-Stimulus, allerdings keine durch TGF $\alpha$ . Obwohl beide Liganden den gleichen Rezeptor binden, vermehrten sich die Zellen unter TGF $\alpha$ -Gabe längst nicht so stark wie durch EGF. Und das, obwohl der EGF/EGFR-Komplex pH-stabiler ist als der Komplex aus TGF $\alpha$  und dem Rezeptor. Nach Bindung der Liganden und Aktivierung des Rezeptors werden eps 15 und cbl an der intrazellulären Domäne gebunden - zwei Proteine, die an der Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind. Durch die pH-Stabilität lässt sich der EGF-gebundene Rezeptor besser in Lysosomen verpacken und halten. Der mit TGF $\alpha$  verbundene Rezeptor jedoch nicht, was zu einer schnellen Wiederausschleusung führt, wo

er dann an der Zellmembran neue Signale empfangen kann (*Olaloye et al., 2000*). Insofern müsste TGF $\alpha$  das stärkere Proliferationspotential aufweisen. Allerdings spielen natürlich bei diesen Prozessen noch viel mehr Faktoren eine Rolle. EGF und TGF $\alpha$  sind bivalente Liganden (*Tzahar et al., 1997*). Das bedeutet, dass sie zunächst mit einer Domäne, die hohe Affinität besitzt, an den EGFR docken. Dadurch werden sie an der Zellmembran fester verankert, wodurch sie schliesslich an einen zweiten Rezeptor binden können, zu dem sie eine nicht so hohe Affinität aufweisen. Je nach Ligand und Rezeptorexpression der Zelle zeigen sich nun unterschiedliche Dimere und somit weitergeleitete Signale. Dadurch könnte durchaus das unterschiedliche Verhalten der Zelle auf diese Wachstumsfaktoren erklärt werden. Stromberg et al. berichteten von einer niedrigen Bindungsaffinität von TGF $\alpha$  zu seinem Rezeptor, für EGF gab er keine Werte an (*Stromberg et al., 1992*). Auf jeden Fall betreiben BG-1-Zellen eine endogene TGF $\alpha$ -Produktion (*Stromberg et al., 1992*). Häufig wird zwar die gleichzeitige Expression von EGF-Rezeptor und TGF $\alpha$  beobachtet (*zusammengefasst bei Stromberg et al., 1992*), selten aber die von EGF- und TGF $\alpha$ -Substrat, ein weiterer Hinweis, wie es zu der vermindert gemessenen TGF $\alpha$ -induzierten Wachstumsrate gegenüber der von EGF kommen konnte. Auch sind für EGF - und bis jetzt nicht für TGF $\alpha$  - endocytotische Vorgänge beschrieben worden, die eine direkte Bindung an Chromatin zulassen und somit Transkriptionsprozesse beeinflussen (*Rakowicz-Szulczynska et al., 1989*).

Heregulin induzierte bei BG-1-Zellen kein signifikant vermehrtes Wachstum. Dieser Wachstumsfaktor greift nur an erbB-3 und erbB-4 an. Diese können allerdings untereinander und mit erbB-1 bzw. erbB-2 Dimere formen. Mir sind keine Veröffentlichungen bekannt, die sich mit dem HER3/neu - bzw. HER4/neu - Rezeptorstatus von BG-1-Zellen beschäftigen. Letztendlich bleibt unklar, ob diese Rezeptoren von BG-1-Zellen exprimiert werden.

IGF-1 erwies sich unter diesen Kulturbedingungen als mittelstarkes Stimulanz. Die Zellen zeigten ca. 175 % Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Die Rezeptordichte ist relativ hoch (*Baldwin et al., 1998*). Damit decken sich die Ergebnisse mit denen anderer Beobachter (*Ignar-Trowbridge et al., 1995; Ignar-Trowbridge et al., 1996; Baldwin et al., 1998*).

SKOV-3-Zellen reagierten mit einer Proliferation von 194 bzw. 150 % auf die Gabe von EGF bzw. TGF $\alpha$ . Wie bei den BG-1-Zellen haben sie im Vergleich zu anderen Ovarialkarzinomzelllinien wenig Rezeptoren (kleiner 11000 pro Zelle), zeigen aber für TGF $\alpha$  eine hohe Affinität (*Stromberg et al., 1992; Cassinelli et al., 2000*). Immerhin war

die TGF $\alpha$ -induzierte Proliferation gegenüber BG-1-Zellen erhöht. Sewell et al. und Xu et al. berichteten sogar von mittelgrossen Rezeptordichten (Xu et al., 1999; Sewell et al., 2000). Unsere Western-Blot Ergebnisse zeigten gegenüber BG-1-Zellen eine vermehrte Expression dieses Proteins (siehe Abb. 3). Der EGFR antwortet auf die Ligandenbindung mit Phosphorylierung z.B. von erbB-2 und ERK1/2 (Simpson et al., 1999; Sewell et al., 2000; Anderson et al., 2001) und DNA-Synthese (Doraiswamy, 2000).

TGF $\alpha$  und EGF (nur PCR: mRNA) werden von SKOV-3-Zellen endogen gebildet (Stromberg et al., 1992; Sewell et al., 2002).

Im Rahmen der Diskussion um Heregulin und den erbB-Rezeptoren kommt den SKOV-3-Zellen besondere Beachtung insofern zu, da erbB-2 überexprimiert ist. Im Vergleich zu anderen Ovarialkarzinomzellen ist die Expression durchschnittlich um das 2-3-fache erhöht (Simpson et al., 1999), King et al. beschrieben sogar eine 100-200-fache Überexpression der mRNA und des Proteins, was durch 5-9-fache Amplifikation der die für den Rezeptor kodierenden DNA-Sequenz verursacht wird (King B., 1992; Chan et al., 1995). Unsere Beobachtungen decken sich mit diesen Ergebnissen, die starke Expression des Rezeptorproteins konnte ebenfalls in unserem Labor nachgewiesen werden (siehe Abb. 3). Zusätzlich zu dem auch in anderen Zellen vorhandenen 4,5 kb-Transkript, zeigen SKOV-3-Zellen ein anderes, grösseres Transkript mit einer mehr als doppelt so langen Halbwertszeit wie das normale. Dies führt zu einer grösseren Stabilität und damit zu vermehrter Verfügbarkeit (King et al., 1992; Doherty et al., 1999). Mehrere Autoren berichteten von Wachstumsinhibition oder keiner Antwort auf HRG-Gabe, obwohl eine Phosphorylierung der Rezeptoren nachzuweisen sei (Xu et al., 1999). Unsere Ergebnisse zeigten eine schwache Proliferationssteigerung von ca. 122 %, obwohl SKOV-3-Zellen so viele erbB-2-Rezeptoren und auch erbB-1-Rezeptoren besitzen. Allerdings ist die Dichte von erbB-4-Rezeptoren sehr gering und die Konzentration von erbB-3 wenn überhaupt verschwindend niedrig (Chan et al., 1995; Daly et al., 1997; Pegues et al., 1999; Xu, 1999; Hsieh et al., 2000). Dies hat mehrere Konsequenzen: 1) Homodimere sind schwächer wirksam als Heterodimere (Pinkas-Kamarski et al., 1996). Durch eine hohe Dichte an erbB-2-Rezeptoren kann es zu einer spontanen Dimerisierung kommen, wodurch ein relativ verhaltenes Signal weitergegeben wird. Tatsächlich ist in erbB-2-überexprimierenden SKBR-Zellen (Mammakarzinom) eine hohe basale Phosphorylierung beobachtet worden (Daly et al., 1997), ebenso in SKOV-3-Zellen (Pegues et al., 1999). 2) Heregulin bindet nicht an erbB-2, sondern nur an erbB-3 und erbB-4. Diese Rezeptoren sind in nur geringer Konzentration vorhanden, wodurch lediglich wenige für eine Dimerisierung zur Verfügung

stehen. 3) Das Heterodimer aus erbB-2/erbB-3 scheint am potentesten zu wirken (s. Einleitung).

Nun ist erbB-3 der Rezeptor, der am wenigsten vertreten ist, und somit stehen keine Dimere mit überragender Aktivierungsleistung zur Verfügung.

Dieses Verhalten kann mitverantwortlich dafür sein, dass Heregulin nur schwach zu einer Proliferationssteigerung führte. Heregulin wird in SKOV-3-Zellen endogen gebildet (*Xu et al., 1999; Pegues et al., 1999*).

Insulin Like Growth Factor-1 (IGF-1) rief ein Wachstum von 131,7 % hervor. Obwohl mir keine Veröffentlichungen bekannt sind, die sich mit dem IGF-1-Rezeptorstatus von SKOV-3-Zellen beschäftigen, ist aufgrund dieses Ergebnisses und der Tatsache, dass das Wachstum durch den spezifischen IGF-1-Rezeptorantagonisten AG 1024 fast vollständig inhibiert wurde (Abb. 25), ein positiver IGF-1-Rezeptorstatus in SKOV-3-Zellen anzunehmen.

## **5.2. Inhibition der proliferativen Wirkung von Östrogenen durch Antiöstrogene in den Zelllinien BG-1 und SKOV-3**

Die beiden Antiöstrogene Tamoxifen und ICI 182,780 repräsentieren je einen partiellen und einen totalen Antagonisten am ER. Tamoxifen blockiert durch Konfigurationsänderung die AF-2-Funktion, indem Koaktivatoren mit ihren NR-Boxen der Zugriff dort verwehrt bleibt. AF-1 wird nicht behindert und kann seine intrinsische Transaktivationsfunktion ausüben. Einige Zelltypen, z.B. des Uterus, reagieren mit Proliferation auf zugeführtes Tamoxifen. ICI 182,780 blockiert beide "activation functions" und führt so zur Downregulation von ER $\alpha$ .

BG-1 zeigte praktisch keine Reaktion auf Tamoxifen in den Konzentrationen 100 nM und 1  $\mu$ M bzw. ICI 182,780 100 nM und 1  $\mu$ M. Nur Tamoxifen (10  $\mu$ M) zeigte wie bei SKOV-3-Zellen beinahe schon einen toxischen Effekt, was nicht auf das Lösungsmittel zurückzuführen war (siehe Kap. 3.1.). Eventuell werden durch die aktivierte AF-1-Funktion Gene aktiviert, die für Apoptosevorgänge entscheidend sind. Aber auch nicht ER-gesteuerte Effekte von Tamoxifen führen zum programmierten Zelltod. In mehreren Geweben, darunter z.B. Zellen des Multiplen Myeloms und Mammakarzinomzellen, beeinflusst Tamoxifen Apoptosevorgänge (*Fassas et al., 2001; Zheng et al., 2000*). Dafür sind eine Reihe von Mechanismen verantwortlich: z.B. 4-OH-Tamoxifen-induzierte Aktivierung von Mad 1, einem Gegenspieler des die Proliferation positiv beeinflussenden c-myc;

Calmodulin- TGF $\beta$ -Involvierung; Modulation von Caspasen und MAPKinasen (c-Jun, JNK); Zellmembranveränderungen u.v.m. (Mandlekar et al., 2001; Cerni et al., 2001).

Wie schon beschrieben, führen Tamoxifen und ICI 182,780 dosisabhängig bei BG-1-Zellen zu einer Reduzierung des E<sub>2</sub>-Effekts (Geisinger et al., 1990; Pavlik et al., 1991; Ignar-Trowbridge et al., 1996; Gehm et al., 2000). Ähnliche Effekte waren auch - entgegen den Beobachtungen von Hua et al. - bei SKOV-3-Zellen zu beobachten. Er hatte allerdings auch schon keinen proliferativen Effekt durch exogen zugeführtes E<sub>2</sub> gemessen, und verwendete andere Kulturbedingungen (Hua et al., 1995). Prozentual gesehen war der inhibitorische Effekt durch Tamoxifen 100 nM bei SKOV-3-Zellen schwächer ausgeprägt als bei BG-1-Zellen. Eventuell ein Hinweis darauf, dass der E<sub>2</sub>-induzierte proliferative Effekt tatsächlich nicht nur durch den klassischen ER-gekoppelten Signalweg übermittelt wird. Würde das E<sub>2</sub>-induzierte Wachstum nur durch diesen Weg zustande kommen, müsste man eine vollständige Inhibition durch AÖ erkennen können - in etwa wie bei BG-1-Zellen. Insofern kann man bei SKOV-3-Zellen davon ausgehen, dass E<sub>2</sub> über andere Kaskaden wirkt, die nicht durch Tamoxifen blockiert werden, wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (s.u.). Zudem wurde durch die alleinige Tamoxifengabe eine leichte Zunahme des Wachstums der SKOV-3-Zellen beobachtet. Wie erwähnt, enthalten diese Zellen nur einen funktionsfähigen ER $\beta$ , dessen Dichte aber bis zu 2-fach erhöht im Vergleich zu normalen OSE-Zellen (Lau et al., 1999). ER $\beta$  soll in Verbindung mit Tamoxifen und ohne die Mithilfe der beiden "activation functions" ein beträchtliches Potential zur Aktivierung der Transkriptionsmaschinerie aufweisen. Das geschieht, indem der Tamoxifen-gebundene ER Bindeplätze für Korepressoren aufweist, mit denen er sie vom AP-1-Transkriptionskomplex abzieht (Paech et al., 1997; Webb et al., 1998; Webb et al., 1999; Kushner et al., 2000). Damit ist eine direkte oder indirekte Anlagerung an den AP-1-Komplex nicht nötig. Koaktivatoren wie p160 oder p300, die auch den Kontakt zwischen AF-1 und AF-2 herstellen, kommen nicht ins Spiel, ja AF-1 bzw. AF-2 sollen sogar einen inhibierenden Einfluss auf diesen Mechanismus ausüben (Kushner et al., 2000). Eine andere Möglichkeit, wie es zu der leichten Proliferationssteigerung kommen könnte, ist folgende: Nicholson et al. berichteten von ihren Experimenten mit Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen, bei denen nach Tamoxifenbehandlung die Zahl der EGF-Rezeptoren und erbB-2-Rezeptoren pro Zelle deutlich erhöht war (Nicholson et al., 2001). In mit ER $\alpha$  transfizierten Brustkrebszellen wird ER-abhängig sehr schnell durch Tamoxifen TGF $\alpha$ -mRNA und -Protein synthetisiert (MacGregor-Schafer et al., 2001). Dieser Mechanismus und die Tatsache, dass SKOV-3-



Zellen passende Liganden und Rezeptoren produzieren, könnten ebenfalls zu der Proliferation durch Tamoxifen beitragen. Allerdings ist dieser Punkt unwahrscheinlich, denn Tamoxifen in 1  $\mu$ molarer Dosis reduzierte das EGF- als auch das TGF $\alpha$ -induzierte Wachstum zu ca. 50 %. Und nach jetzigem Stand der Dinge muss ER $\alpha$  als nicht funktionsfähig betrachtet werden.

SKOV-3-Zellen reagierten auf beide ICI 182,780-Konzentrationen nicht, übereinstimmend mit der Beobachtung, dass funktionelle Östrogenrezeptoren durch die Mutation des ER $\alpha$ -Gens spärlicher vorhanden sind (Hua *et al.*, 1995). AF-1 ist im ER $\beta$  nicht konstitutiv aktiv, und beide Rezeptoren unterstützen sich selbst durch Anlagerung von Koaktivatoren u.a. an die LBD und A/B-Domäne, die in diesem ER $\alpha$  nicht oder nur partiell vorhanden sind (Webb *et al.*, 1998; Endoh *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000). Ausserdem modulieren sie sich auf AF-1-Ebene gegenseitig, wenn beide Isoformen in einer Zelle exprimiert werden (Pettersson *et al.*, 2000). So kamen auch Lau *et al.* zu der Überlegung, dass ein funktionierender ER $\beta$  eventuell von einem intakten ER $\alpha$  abhängig ist, zumindest was die Steuerung der Proliferation betrifft (Lau *et al.*, 1999).

### **5.3. Inhibition der proliferativen Wirkung von Wachstumsfaktoren in den Zelllinien BG-1 und SKOV-3 durch Inhibitoren des RTK-Signalweges**

SKOV-3-Zellen zeigten auf die alleinige Gabe von WF-Inhibitoren keine Reaktionen. Auch BG-1-Zellen zeigten keine Wachstumsinhibition auf die alleinige Gabe von Inhibitoren des RTK-Signalweges. Eine endogene Produktion von EGF, TGF $\alpha$ , Heregulin und IGF-1 ist zwar beschrieben worden (Olaloye *et al.*, 2000; Pegues *et al.*, 1999; Sewell *et al.*, 2000), doch wahrscheinlich ist ihr Einfluss nicht so gross, um zu einer dauerhaften Aktivierung der Zellen führen zu können.

Die bei SKOV-3-Zellen erreichte Proliferationssteigerung durch EGF, TGF $\alpha$ , IGF-1 und Heregulin wurde durch passende Inhibitoren der RTK-Signalkaskade deutlich aufgehoben. Bei BG-1-Zellen wurde zwar eine erhöhte Proliferationsrate nach Gabe von EGF und IGF-1 beobachtet, doch dieser Effekt war durch genannte Inhibitoren nicht reversibel. AG 1478, ZD 1839, PD 98059 und AG 1024 wirkten nicht signifikant inhibitorisch. Im Folgenden Diskussionsteil wird deutlich, dass in BG-1-Zellen die WF anscheinend ihre Wirkung massgeblich über den ER entfalten bzw. diesen in WF-gesteuerte Signalkaskaden involvieren. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung entscheidend, dass die WF-

induzierte Proliferation in diesem Zellmodell durch Antiöstrogene hochgradig inhibiert wurde, und eben nicht durch Inhibitoren des RTK-Signalweges.

#### **5.4. Crosstalk zwischen der erbB-Rezeptor-Familie und der E<sub>2</sub>-Signalkaskade**

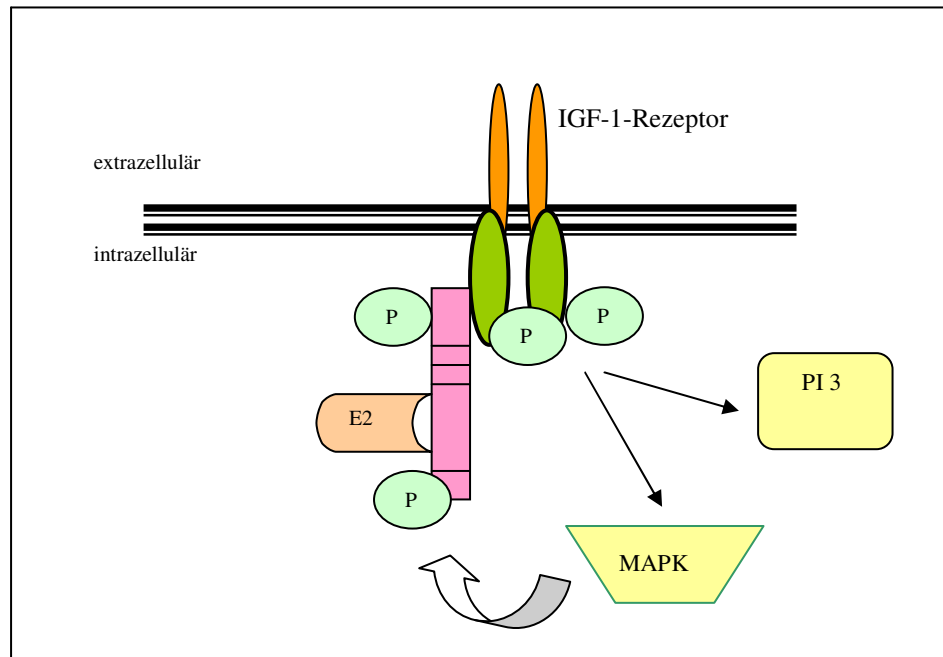
TGF $\alpha$  und EGF induzierten in den Ovarialkarzinomzelllinien BG-1 und SKOV-3 die zelluläre Proliferation. Dieser Effekt wurde durch Tyrosin-Kinaseinhibitoren wie AG 1478 und MEK-1-Inhibitoren wie PD 98059 bei SKOV-3-Zellen aufgehoben. Die Proliferation sank nach Gabe von EGF + AG 1478 sogar geringfügig unter den Wert der Kontrollgruppe ab.

Antiöstrogene können den Effekt, der durch Wachstumsfaktoren in manchen Zellen hervorgerufen wird und phänotypisch dem des E<sub>2</sub> sehr ähnlich ist, aufheben (*Smith et al., 1998*). In vivo Experimente an ERknockout-Mäusen als auch in vitro Experimente belegen das. So sorgen z.B. Wachstumsfaktoren für eine Translokation des ER in den Zellkern, was ebenfalls unter E<sub>2</sub>-Gabe beobachtet wird. Mehrere Gruppen stellten fest, dass EGF oder TGF $\alpha$  ein ERE aktivieren können. Gehm et al. verneinten dabei die Beteiligung von ER und dem eigentlichen ERE, da AÖ keinen oder einen zu geringen Effekt auf das Ergebnis hatten. Sie erklärten, dass die erhöhte Aktivierung von ERE-Luciferase-Reportern auf die erhebliche Anfälligkeit dieses Genabschnittes gegen nicht-spezifische Aktivierung zurückzuführen sei. Nach Heraustrennen von möglichst vielen für den ER "überflüssigen" Basenpaaren beobachteten sie dann auch einen deutlich geringeren WF-induzierten Effekt (*Gehm et al., 2000*). Im Gegensatz dazu beobachtete Ignar-Trowbridge et al. schon einige Jahre vorher, ebenfalls an BG-1-Zellen, eine ER-abhängige Aktivierung eines ERE. Sie wandte nicht die Technik von Gehm an, d.h. sie achtete nicht in vergleichbarer Weise auf die Ausschaltung bestimmter DNA-Abschnitte, an die andere Transkriptionsfaktoren andocken können. Das AP-1-Motiv ist solch ein Abschnitt, der in vielen Promotoren vorkommt. Allerdings wurde durch Zusatz von Antiöstrogenen der WF-abhängige Effekt eindeutig inhibiert, was für eine Beteiligung des ER spricht. Unseren Ergebnissen ist klar abzulesen, dass in beiden Zelllinien, v.a. aber bei BG-1-Zellen, EGF als auch TGF $\alpha$  (SKOV-3) dosisabhängig von Tamoxifen als auch ICI 182,780 in ihrer Wirkung eingeschränkt wurden. Dabei wurde keine Präferenz zwischen Tamoxifen und ICI 182,780 eindeutig klar, eine leichte Tendenz zu ICI 182,780 als dem stärkeren Inhibitor war jedoch gegeben. Spekulativ könnte das assoziiert sein mit der Funktion als totaler Antagonist, der ebenfalls an der AF-1 angreift, und so beide activation functions negativ beeinträchtigt. AF-

1 wird nicht nur durch E<sub>2</sub>-Bindung phosphoryliert, sondern auch die MAPK ist dazu befähigt. Neben SER 104, SER 106, SER 167 wird SER 118 phosphoryliert, was die Aktivationsfunktion verstärkt, indem dadurch Coaktivatoren, insbesondere das AF-1-spezifische p68 andocken können (*Kato et al., 2000*). Ebenso zeichnete sich klarer ab, dass die Effekte der AÖ bei den BG-1-Zellen ausgeprägter sind. Wie schon des Öfteren erwähnt, nimmt der ER bei BG-1-Zellen eine prägendere Rolle ein, da offensichtlich beide Rezeptorformen im Gegensatz zu SKOV-3-Zellen voll funktionsfähig sind. Dadurch zeigte sich ein stärkerer inhibitorischer Effekt durch Antiöstrogene auf die Proliferation durch E<sub>2</sub> sowie durch Wachstumsfaktoren.

Im Gegensatz dazu inhibierte Herceptin die Heregulin-Wirkung bei SKOV-3-Zellen viel stärker, bzw. löste Heregulin alleine bei BG-1-Zellen schon kein signifikant vermehrtes Wachstum aus. Heregulin ist Ligand für erbB-3- und erbB-4-Rezeptoren, die durch Verbindung mit erbB-2-Rezeptoren auch diese phosphorylieren und aktivieren. Überexpression von erbB-3- und -4 ist bis jetzt nicht beschrieben worden. SKOV-3-Zellen sind jedoch bekannt für ihre erbB-2-Überexpression (s.o.). Bei hoher Rezeptordichte kann es zu spontaner Dimerisierung kommen. Folglich hat der erbB-2-selektive Antagonist Herceptin erheblichere Auswirkungen auf die Proliferation von SKOV-3-Zellen als das bei BG-1-Zellen der Fall ist.

In den vorhergehenden Abschnitten wurden Überlegungen zum Mechanismus des beobachteten Eingreifens von WF in den E<sub>2</sub>-Signalweg geschildert. Auf der anderen Seite wiesen die Ergebnisse einer Kombination E<sub>2</sub> + TK-Inhibitor bzw. MEK-1-Inhibitor auf ein Eingreifen von Östrogenen in die RTK-Kaskade hin. Erstaunlicherweise wurde die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation durch ZD 1839 und Herceptin nicht nur aufgehoben, sondern das Wachstum wurde bis auf ca. 70 % der Kontrollgruppe bei SKOV-3-Zellen vermindert. Bei der BG-1-Zelllinie zeigten sich keine Veränderungen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie es zu diesem Effekt kommen könnte. Für den IGF-1-Rezeptor wurde beschrieben, dass der E<sub>2</sub>-ER $\alpha$ -Komplex direkt an ihn binden kann (Abb. 35). Dadurch wird der IGFR phosphoryliert und aktiviert, was u.a. zur Aktivierung der PI3Kinase und der MAPKinase führt. MAPK kann dann wiederum durch die erwähnte Phosphorylierung des ER zu einer Potenzierung des Effekts führen (*Kahlert et al., 2000*).



**Abbildung 35:** Der IGF-Rezeptor ist den vorangehenden Abbildungen entsprechend orange und grün dargestellt. Ebenso die Phosphatreste P in hellgrün, der Östrogenrezeptor in rosa sowie E<sub>2</sub> in hellbraun. Die Pfeile weisen auf eine mögliche Aktivierung der Kinasen (gelb) hin. Wie im Text erläutert, kann der IGF-Rezeptor direkt an den E<sub>2</sub>-ER $\alpha$ -Komplex binden. Dadurch wird der IGF-Rezeptor phosphoryliert, was seiner Aktivierung gleichkommt. Er kann nun die PI3Kinase und die MAPKinase aktivieren, wodurch der ER zusätzlich phosphoryliert wird und in einen höheren Funktionszustand versetzt wird.

Der MEK-1-Inhibitor PD 98059 müsste in diesem Fall zu einem besonders ausgeprägten Effekt führen, tat dies aber nicht. Ausserdem wurde schon mehrfach auf die Rolle des trunkierten ER $\alpha$  in SKOV-3-Zellen hingewiesen. Deswegen greift E<sub>2</sub> wohl nicht massgeblich auf diesem Weg ein. Migliaccio et al. beobachteten 1996, dass der E<sub>2</sub>-gebundene ER Erk-1 und -2, sowie ras, Shc und die intrazelluläre, nicht-membrangebundene Tyrosin-Kinase Src aktivieren kann. In den folgenden Jahren bestätigte sich das (Migliaccio et al., 1996; Belsches et al., 1997; Migliaccio et al., 1998; Nuedling et al., 1999). Später wurde beschrieben, dass ER $\alpha$  direkt an Shc bindet, wodurch diese aktiviert wird (Song et al., 2002). Das alles sind Mechanismen, die sich downstream der Rezeptor-Tyrosin-Kinase abspielen, und zunächst nicht die starke Inhibition durch Herceptin und ZD 1839 erklären. Doch in letzter Zeit häuften sich Hinweise darauf, dass E<sub>2</sub> auch über membranständige Rezeptoren angreifen kann, über die eine sehr schnelle Verbindung zu Second-Messenger-Signalen aufgebaut wird. Immunologische Untersuchungen zeigten in der Zellmembran der Fettzellen von Ratten einen ER, der die MAPK aktiviert und durch ICI 182,780 blockierbar ist (Dos Santos et al., 2002). Zudem

kann  $E_2$  anscheinend über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren angreifen, die den EGFR und andere erbB-Mitglieder transaktivieren. Das führt zur Aktivierung von MAPKinasen. GPR30 heisst das zuständige Protein und hat Verbindung zu Src und Shc. Auf diesem Weg wird die Freisetzung von HB-EGF betrieben, einem EGF-Vorläuferprotein, das an der extrazellulären Domäne an seinen Rezeptor bindet. HB-EGF ist befähigt, an erbB-1 oder erbB-4 zu binden. Somit ist die extrazelluläre Domäne des Rezeptors in den Vorgang integriert (*Carmeci et al., 1997; Prenzel et al., 1999; Filardo et al., 2000*). Andere Untersuchungen berichteten nur von einer Beteiligung der intrazellulären Domäne an dem Transaktivierungsvorgang durch Src und ras. Wie auch immer, ras, Src und Shc sind Kinasen mit vielfältigen Beziehungen, die upstream und downstream von sich wirken können. Die starke Inhibition des Wachstums durch Inhibitoren bzw. Antikörper des Rezeptors können für eine Involvierung des Transaktivationsvorgangs sprechen.

Ein anderes Indiz dafür, dass  $E_2$  seine proliferative Wirkung bei SKOV-3-Zellen v.a. über den TK-Signalweg ausübt, liefern die Versuche von Kap. 3.7.1. und 3.7.2.: Herceptin hatte auf den proliferativen  $E_2$ -Effekt bei SKOV-3-Zellen einen starken inhibitorischen Einfluss; nicht so in BG-1-Zellen, die keine Überexpression der erbB-Rezeptor-Familie aufweisen. Man kann also davon ausgehen, dass in BG-1-Zellen aufgrund dessen und der Tatsache, dass funktionsfähige ER vorhanden sind, zumindest die Benutzung der RTK-Signalkaskade durch  $E_2$  nicht so bevorzugt wird wie bei SKOV-3-Zellen. Tatsächlich zeigte der erwähnte Versuch keinerlei signifikante Veränderungen bei BG-1-Zellen. Auf der anderen Seite stieg die Proliferation bei SKOV-3-Zellen durch die Zugabe von  $E_2$  zu der Kombination aus Herceptin und Heregulin zwar etwas an, aber nicht auf den Wert von  $E_2$  alleine, sondern nur in etwa auf den Wert der Kontrolle, der ca. 40 % unter dem des  $E_2$ -induzierten Wachstums liegt. Vergleicht man die Proliferationsrate von  $E_2$  mit der der Kombination aus  $E_2$  + Heregulin, stellt man fest, dass die Kombination kein zusätzliches Wachstum hervorrief; im Gegenteil, die Werte waren in etwa gleich. Würden zwei gänzlich verschiedene Signalkaskaden eingeschlagen werden, könnte man annehmen, dass die Kombination zu einem stark vermehrten Wachstum geführt hätte. Das sind mehrere Beobachtungen, die gut zu dem Modell der Transaktivierung passen. SKOV-3-Zellen haben so eine Möglichkeit gefunden, mit Hilfe von  $E_2$  die insgesamt funktionsverminderten ER by-zu-passen. Viele Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass eine negative Korrelation zwischen dem Vorhandensein funktionsfähiger ER und aktivierter MAPK in verschiedenen Zelltypen besteht. Lundholt beschrieb, dass die ER-Expression oft negativ mit der EGFR-Expression korreliert (*Lundholt et al., 2001*), Gee et al. beschrieben, dass ein

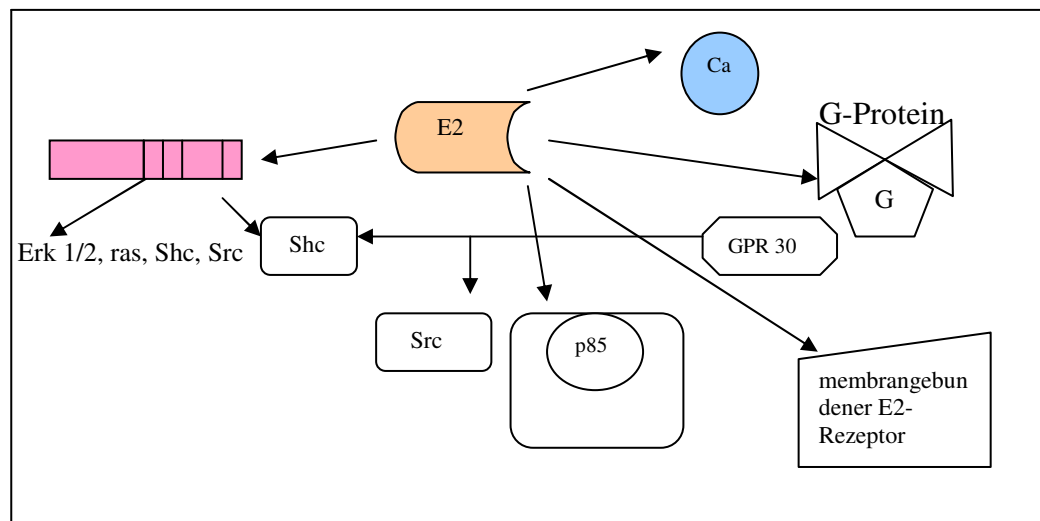
Verhältnis zwischen E<sub>2</sub>- bzw. Tamoxifen-Resistenz und der Menge an phospho-MAPK existiert (*Gee et al., 2001*), Ähnliches wurde auch bei Nicholson et al. zusammengefasst (*Nicholson et al., 2001*). BG-1-Zellen erfahren eine 40-prozentige Reduktion ihres ER-Gehaltes nach einer 18-stündigen Inkubation mit TGF $\alpha$  (*Ignar-Trowbridge et al., 1996*).

Bis hierhin wurden hinsichtlich des Crosstalks anhand unserer Ergebnisse mögliche molekulare Mechanismen des gegenseitigen Eingreifens diskutiert. Dabei wurde sowohl die Wirkung eines E<sub>2</sub>-Stimulus auf den RTK-Weg als auch die Wirkung von WF auf den Östrogensignalweg unter Einbeziehung des Rezeptorstatus berücksichtigt. Doch Aussagen über mögliche negative Einflüsse der Interaktionen auf die antitumorale Therapie wurden noch nicht getroffen. Unter Zuhilfenahme der Kombinationsversuche aus Kapitel 3.7.3. soll das Thema erörtert werden. In BG-1-Zellen löste die zusätzliche Gabe eines Inhibitors des RTK-Weges zu der Kombination aus E<sub>2</sub> + Tamoxifen keine weitere Wachstumshemmung aus. Bei SKOV-3-Zellen zeigte sich ein anderes Bild. Wenn Tamoxifen in den höheren Konzentrationen (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) angeboten wurde, konnten RTK-Inhibitoren ebenfalls keine zusätzliche Inhibition hervorrufen. Doch Herceptin und PD 98059 konnten das Wachstum zusätzlich inhibieren, wenn Tamoxifen nur in einer niedrigen Konzentration eingesetzt wurde. Wie in Kapitel 3.4. ersichtlich konnten bei SKOV-3-Zellen AÖ das E<sub>2</sub>-induzierte Wachstum nur unvollständig inhibieren. Mögliche Erklärungen dazu lieferte die Diskussion. In den Versuchen von Kapitel 3.7.3. konnte die Wirkung der AÖ durch Hinzugabe eines TK-Inhibitors verstärkt werden. Es kam also zu einer Verstärkung der antiöstrogenen Wirkung bei Blockierung des RTK-Signalwegs. Insofern bestätigten die beiden Versuche einen negativen Einfluss des RTK-Signalwegs auf die Wirkung der AÖ und damit auf die antitumorale Therapie. Aus vorherigen Versuchen wurde klar, dass Herceptin in der Lage war, die WF-induzierte als auch die E<sub>2</sub>-induzierte Proliferation deutlich zu hemmen, und zwar stärker, als in der Kombination mit Tamoxifen. Dies macht die dominante Rolle des RTK-Signalwegs in SKOV-3-Zellen deutlich.

Die Frage, ob der E<sub>2</sub>-Signalweg negativ auf den - bisher meist nur experimentell erfolgten - Einsatz von TK-Inhibitoren als antitumoraler Therapie Einfluss nimmt, lässt sich anhand unserer Ergebnisse nicht mit Sicherheit beantworten. Zwei Indizien sind die Tatsachen, dass erstens bei BG-1-Zellen die RTK-Inhibitoren ihre Aufgabe, sprich die Hemmung der WF-induzierten Proliferation, nicht erfüllten. Zweitens vermochten TK-Inhibitoren das E<sub>2</sub>-induzierte Wachstum bei BG-1-Zellen nicht einzuschränken.

Betrachtet man die Interaktionen zwischen beiden Signalkaskaden, muss man bedenken, dass der zelluläre Stoffwechsel ein fast unentwirrbares Mit- und Gegeneinander von

unterschiedlichsten Molekülen darstellt. Allein schon die Aktivierung von ras führt nicht nur zu Phosphorylierung von raf, MEK u.s.w., hier werden auch Verbindungen zur PI3-Kaskade hergestellt, die wiederum z.B. die PKB/Akt beeinflusst. Unterstrichen wird die wichtige Rolle von ras als einem integrativen Baustein durch Untersuchungen an Brustkarzinomgewebe, in dem in ca. 29 % eine ras-Überexpression festgestellt wurde (*Hori et al., 2000*). Hohe Level von der u.a. von ras aktivierten, dualen Serin/Threonin-Kinase raf sind in ovariellen Adenokarzinomen mit abnehmenden Überlebensraten assoziiert (*McPhillips et al., 2001*). Auch E<sub>2</sub> kann in einem Tripel-Komplex Src und p85, eine Untereinheit der PI3-Kinase binden und aktivieren (Abb. 36) (*Castoria et al., 2001*). Und alle Wege führen letztendlich zur Inhibition oder Stimulation der Transkription von Genen.



**Abbildung 36:** Mögliche Einflussnahme von E<sub>2</sub> in verschiedene Vorgänge des Zellstoffwechsels. Analog zu den vorangehenden Abbildungen ist der Östrogenrezeptor rosa und E<sub>2</sub> hellbraun dargestellt. Ca<sup>2+</sup> ist hellblau unterlegt. Die anderen Figuren stellen Proteine dar. Die Pfeile weisen auf direkte und indirekte Verbindungen hin. E<sub>2</sub> kann die Funktion aller dargestellten Proteine modulieren.

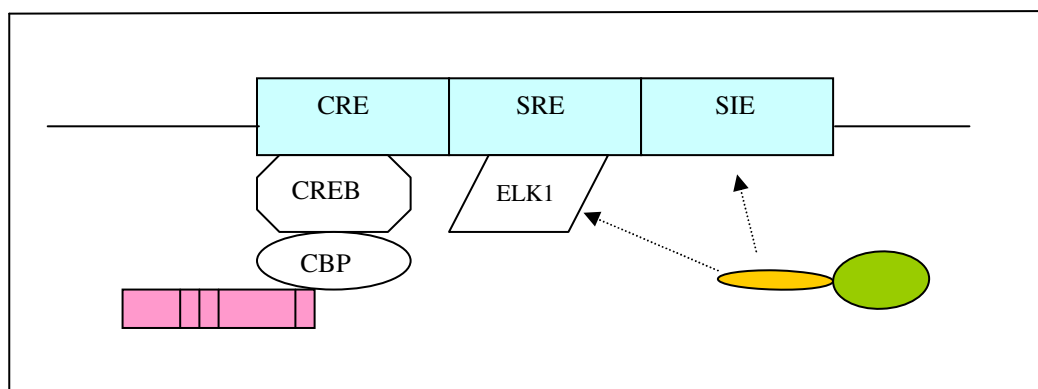
Neuerdings wird die MAPKinase Erk-5 eingehender untersucht. Nicht nur EGF, sondern auch Heregulin führt zu dessen Aktivierung. In manchen Zellen ist dieser Weg ras-abhängig, in manchen wiederum nicht. Vor allem soll sie durch Stress, wie Hyperosmolarität oder mechanische Einflüsse reguliert werden, doch eindeutig spielt Src dabei eine Rolle (*Esparis-Ogando et al., 2002*). Src übt eine kommunikative Rolle aus, wodurch z.B. über eine Verbindung zu GPR30 (s.o.) ein Anknüpfungspunkt an die Transaktivierung gegeben wäre.

Unter Umgehung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase aktivierte MAPKinasen können direkt durch Phosphorylierung von Corepressoren und Coaktivatoren die Regulation der

Gentranskription kontrollieren (Wagner et al., 1998; Gehm et al., 2000). MAPKinasen gelangen durch den Einfluss von E<sub>2</sub> in den Zellkern (DosSantos et al., 2002). E<sub>2</sub>-Level werden in einigen Zellen wiederum von Wachstumsfaktoren beeinflusst. EGF kann die Transkription des Aromatasegens fördern. Zimmiski hat in seinen In-vivo-Experimenten an BG-1-Xenografts in ovariectomierten Mäusen eine basale E<sub>2</sub>-Konzentration im Serum gemessen, obwohl er in der Zelllinie keine eigene Aromataseaktivität nachwies (Zimmiski et al., 1989). Es ist durchaus möglich, dass in vivo E<sub>2</sub> im Fettgewebe oder durch Einfluss von dem weit verbreiteten EGF gebildet wird.

Der Einfluss von Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurde bisher ganz ausser Acht gelassen. Erhöhung des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels führt über einige Zwischenschritte zu Liganden-unabhängiger Aktivierung des EGF-Rezeptors (zusammengefasst bei Whitmarsh und Davis, 1996). Auf der anderen Seite hat E<sub>2</sub> Einfluss auf die Homöostase des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels der Zelle (Improta-Brears et al., 1999).

Eine einfache Erklärung für das Zusammenspiel zwischen Wachstumsfaktoren und E<sub>2</sub> ist die Tatsache, dass einige Gene schlicht und ergreifend von beiden Stoffen aktiviert werden können. Das c-fos-Gen ist ein Beispiel. Der Promoter enthält drei Abschnitte: CRE (cAMP-response element), SRE (serum response element) und SIE. An CRE bindet das CRE-binding-Protein (CREB) als Dimer. Dieses geht Verbindung mit dem CREB-binding Protein (CBP) ein, welches gleichzeitig die Funktion eines Coaktivators in dem grossen Komplex um den ER einnimmt. SRE und SIE werden mehr von MAPKinasen beeinflusst. Die von den erbB-Rezeptoren aktivierte MAPKinase ELK-1 bindet auch an SRE. So findet eine feine Regulierung des Funktionszustandes der Transkriptionsmaschinerie statt (Abb. 37).



**Abbildung 37:** Zwei unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung des c-fos-Gens (helltürkies). Dabei wird das cAMP-response-element (CRE) über die Bindungsproteine CREB und CBP vom ER (rosa) beeinflusst, die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (in grün und orange) hat aktivierende Funktion in Bezug auf die Abschnitte SRE und SIE, teilweise über den Transkriptionsfaktor ELK-1.



Welche Mechanismen nun in den einzelnen Zelltypen ausgeprägter sind, bestimmt das individuelle Verhalten auf bestimmte Reize, und kann schon unter Zellarten eines Organs sehr unterschiedlich aussehen. Bei den hier benutzten Zellreihen wurde dies besonders deutlich in Bezug auf erbB-Überexpression und einen funktionstüchtigen ER $\alpha$ .

### **5.5. Crosstalk zwischen der IGF-induzierten Signalkette und der E<sub>2</sub>-Signalkaskade**

BG-1-Zellen zeigten keine PD 98059-induzierte signifikante inhibitorische Reaktion (der Wert für die Kombination IGF-1 + AG 1024 ist aufgrund des Lösungsmittelleffektes eingeschränkt beurteilbar). Das IGF-1-induzierte Wachstum wurde durch spezifische Inhibitoren (AG 1024, PD 98059) bei SKOV-3-Zellen sehr stark blockiert. Dabei wies der MEK-1-Inhibitor PD 98059 das stärkere Potential auf. MEK-1 empfängt Signale verschiedener Kaskaden, und dient praktisch als deren Integrator. Insofern spiegelt das Ergebnis wahrscheinlich nicht nur die Hemmung exogen zugeführten IGF wider. Doch bei BG-1-Zellen inhibierten die beiden Antiöstrogene Tamoxifen und ICI 182,780 die IGF-1-induzierte Proliferation erheblich, bei SKOV-3-Zellen vermochte das nur der totale ER-Antagonist ICI 182,780. Der ER war also an dem proliferativen Effekt dieses Wachstumsfaktors beteiligt. Verschiedene Labore berichteten über die Fähigkeit von IGF-1, mit Hilfe von ER die ERE-abhängige Transkription von Genen in vitro und in vivo zu aktivieren (*Ignar-Trowbridge et al., 1993; Ignar-Trowbridge et al., 1996; Aronica und Katzenellenbogen, 1991; Klotz et al., 2002*). Dem voraus geht eine erhöhte Phosphorylierung des ER und eine WF-induzierte Translokation des Rezeptors in den Zellkern (*Ignar-Trowbridge et al., 1995; Smith et al., 1998*). Bei BG-1-Zellen war prozentual gesehen ein deutlich stärkerer AÖ-induzierter inhibitorischer Effekt zu verzeichnen. BG-1-Zellen haben ein grösseres Potential, über funktionierende ER zu wirken. Zudem berichteten Ignar-Trowbridge et al., dass IGF-1 für die Entfaltung seiner Wirkung am ER die AF-1-Domäne benötigt. SKOV-3-Zellen sind in dieser Hinsicht BG-1-Zellen klar unterlegen (s.o.) (eventuell hat diese Beobachtung damit zu tun, dass IGF-1 bei BG-1-Zellen ein Wachstum von 173,7 %, bei SKOV-3-Zellen eines von 131,7 % hervorrief). Zwar kann EGF durch Aktivierung der MAPKinase und Phosphorylierung von SER 118 neben ER $\alpha$  auch ER $\beta$  aktivieren (*Kato et al., 2000*), doch IGF-1 ist dazu anscheinend nur am ER $\alpha$  befähigt (*Kahlert et al., 2000*). Dieser ist bei SKOV-3-Zellen stark, wenn nicht sogar vollkommen eingeschränkt.

Über einen funktionierenden ER sind manche Zelltypen in der Lage, die Expression von WF und ihren Rezeptoren, darunter auch IGF-1 zu stimulieren (*Smith et al., 1998; Gehm et al., 2000; Dupont et al., 2001; MacGregor et al., 2001*). Auch Zellzykluskomponenten und IRS-1, welches als Adapterprotein am IGFR die Verbindung zur MAPK-Kaskade und zum PI3Kinase-Signalweg herstellt, werden mit Hilfe von E<sub>2</sub> und des ER in MCF-7-Zellen (Mammakarzinom) vermehrt gebildet und phosphoryliert (COS-7- und HEK-Zellen, zwei differente nierengewebliche Zellmodelle) (*Kahlert et al., 2000; Dupont et al., 2001*). In SKOV-3-Zellen sind quantitativ als auch qualitativ die ER geringer vorhanden. Dadurch konnten AÖ hier im Gegensatz zu BG-1-Zellen durch ihren Angriff am ER nicht so sehr zum Tragen kommen wie die Inhibitoren des IGF-1-Rezeptors AG 1024 bzw. der weiter downstream angreifende Inhibitor PD 98059.

## **5.6. Abschluss und Ausblick**

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Östrogen- und Wachstumsfaktorsignalwegen für die antiproliferative Wirkung verschiedener aktueller Tumorthapeutika auf Ovarialkarzinomzellen untersucht, um einen Beitrag dazu zu leisten, die Wirksamkeit dieser Substanzen bei der Therapie des Ovarialkarzinoms besser beurteilen zu können.

Aktuelle Therapieschemata sehen in der Klinik Platinverbindungen und/oder Taxol vor. Ebenso werden Anthracycline wie Epirubicin, Doxorubicin oder Abkömmlinge des Alkaloids Camptothecin (z.B. Topotecan) im Rahmen der Zytostatikatherapie getestet. Andere Ansätze schliessen Retinoide, Aromatase-Inhibitoren, GnRH-Analoga und TRAILs (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligands) mit ein.

Endokrine Therapien unter Verwendung von Antiöstrogenen und solche, die die Wachstumsfaktorinhibition mit einbeziehen, scheinen in der Praxis bei der Therapie des Ovarialkarzinoms nur wenig effektiv zu sein. Dies ist aufgrund der bei vielen Ovarialkarzinomen nachgewiesenen Expression von Östrogenrezeptoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie HER2 und EGFR nur schwer erklärbar. Wie auch unsere Arbeiten zeigten, haben der Rezeptorstatus und die dadurch bedingten Interaktionen zwischen verschiedenen Signalwegen grossen Einfluss auf die Wirkung antitumoraler Substanzen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Östrogenrezeptor- und Wachstumsfaktor-Signalwegen es ermöglicht, dass Inhibitoren eines Signalwegs auch die Aktivierung des interagierenden Signalwegs hemmen können. So schloss z.B. die Wirkung von Antiöstrogenen nicht nur die Inhibition des klassischerweise

von E<sub>2</sub> gewählten Signalwegs mit ein, sondern führte indirekt zu einer Hemmung der WF-induzierten Proliferation, da Wachstumsfaktoren auch auf der Ebene des ER zur Wirkung kommen (s.o.).

Diese Arbeit verdeutlicht aber auch, dass eine Kombination aus TK-Inhibitoren und AÖ nicht immer den grössten Vorteil bedeutet, nämlich die maximale Wachstumssuppression. Zwar können AÖ nicht immer ihre vollständige tumorsuppressive Wirkung entfalten, da sie durch über den Crosstalk ausgeübte negative Einflüsse des RTK-Signalwegs daran gehindert werden. Doch zeigten in diesem Fall Inhibitoren der RTK-Signalkaskade alleine eine durch Interaktionen ermöglichte umfassende inhibitorische Wirkung auf beide Wachstumswege. Antitumorale Therapiestrategien können somit einen Vorteil als auch einen Nachteil aus dem Crosstalk ziehen.

Eine qualitative als auch quantitative Einschätzung des Rezeptorstatus des malignen Gewebes liefert wertvolle Hinweise auf mögliche Reaktionen der neoplastischen Zellen, um so eventuell auch antitumorale Kombinationen vermeiden zu können, die neben einer gesundheitlichen und wirtschaftlichen Mehrbelastung keinen therapeutischen Vorteil für die Patientin erbringen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse ermutigen weitere Studien zur besseren Einschätzung der Wirkung antitumoraler Substanzen auf Ovarialkarzinomzellen mit unterschiedlichem Rezeptorstatus. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit erscheint es sinnvoll, die Wirkung von Antiöstrogenen und RTK-Inhibitoren bzw. ihrer Kombination bei der Therapie des Ovarialkarzinoms differenziert weiter zu prüfen.

## 6.0. MATERIAL

### 6.1. ZELLINIEN

BG-1:	Ovarialkarzinomzelllinie	ATCC
SKOV-3 :	Ovarialkarzinomzelllinie	ATCC

### 6.2. CHEMISCHE KOMPONENTEN

#### 6.2.1. Steroide

<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Anmerkung</u>
17 $\beta$ -Estradiol	Sigma	LM: H <sub>2</sub> O

#### 6.2.2. Wachstumsfaktoren

<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Anmerkung</u>
Epidermal Growth Factor	Sigma	LM: H <sub>2</sub> O; Mix aus 50% Mäuse- und 50% rekomb. Human-EGF
Insulin Like Growth Factor	Sigma	LM: CH <sub>3</sub> -COOH
Transforming Growth Factor $\alpha$	Sigma	LM: H <sub>2</sub> O
Heregulin	Oncogene	LM: PBS

#### 6.2.3. ER-Antagonisten

<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Anmerkung</u>
Tamoxifen	Sigma	LM: Ethanol
ICI 182,780	Tocris	LM: Ethanol

#### 6.2.4. Inhibitoren des MAPK-Weges

<u>Name</u>	<u>Firma</u>	<u>Anmerkung</u>
Tyrphostin AG 1478	Alexis	LM: DMSO
Tyrphostin AG 1024	Alexis	LM: DMSO
PD 98059	Alexis	LM: DMSO
Herceptin	Roche	LM: H <sub>2</sub> O
ZD 1839 (Iressa)	AstraZeneca	LM: HCl 0,1 M

#### 6.2.5. 1. AK für Western-Blot

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Anti- HER2 c-18 rabbit poly-IgG	Santa Cruz Biotech
Anti- EGFR 1005 rabbit poly-IgG	Santa Cruz Biotech
Anti- EGFR 1005 goat poly-IgG	Santa Cruz Biotech

#### 6.2.6. 2. AK für Western-Blot

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Peroxidase anti-rabbit IgG	Calbiochem
Peroxidase anti-goat IgG	Santa Cruz Biotech

#### 6.2.7. Medien, Lösungen und Puffer

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
Serum Replacement-2 (SR-2)	Sigma
PBS-Dulbecco	Biochrom AG
BSA	BioRAD
DMSO	Sigma
ELISA-BrdU-Zellproliferationskit	Roche
ECL Western-Blot Kit	Pharmacia Biotech

<u>Name</u>	<u>Zusammensetzung</u>	
Einfriermedium:	DMEM	100 ml
	DMSO	5 ml
	FCS	20 ml
Zellkultur-Nährmedium:	DMEM	100 ml
	FCS (inaktiviert)	10 ml

Zum Inaktivieren wird das benötigte Volumen FCS 30 min. lang bei 56°C im Wasserbad inkubiert.

Nährmedium 96-Well-Platte:

DMEM	100 ml
FCS (5 %) bzw.	5 ml
FCS (0.5 %)	0.5 ml
FCS jeweils inaktiviert+gestrippt	

Acrylamid Stocklösung:

Acrylamid	30 g
Bis	1.6 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 200.0 ml

10 % SDS Lösung:

Sodium dodecylsulfate	5.0 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 50 ml

10 % APS Lösung:

Ammoniumpersulfat 0,44 M	0.1 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 1.0 ml

RIPA-Puffer:

1 x PBS	
1 % Igepal CA-630	
0.5 % Natrium Deoxycholat	
0.1 % SDS	
Aprotinin, 30 µl / ml RIPA	
Natrium Orthovanadat, 10 µl einer 100 mM-Lsg. / ml RIPA	

Trenngelpuffer:

Tris 1,5 M	36.3 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 200 ml
4 N HCl	bis pH 8,8

Sammelpuffer:

Tris 0,5 M	3.0 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 50 ml
4 N HCl	bis pH 6,8

Elektrophoresepuffer:

Tris 0,25 M	30.275 g
Glycin 1,92 M	144.1 g
SDS 35 mM	10.0 g
deionisiertes H <sub>2</sub> O	bis 1,0 L

Transferpuffer:

Tris 25 mM	3.0 g
Glycin 192 mM	14.4 g
SDS 3,5 mM	1.0 g

### 6.2.8. Gele für Western-Blot

<u>Name</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Trenngel 10 %:	
A. dest.	12.1 ml
Acrylamid Stock	10.0 ml
1,5 M TrisCl pH 8,8	7.5 ml
10 % SDS	300 µl
10 % APS	150 µl
TEMED	10 µl

#### Sammelgel 4 %:

A. dest.	6.0 ml
Acrylamid Stock	1340 µl
0,5 M TrisCl pH 6,8	2.5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

#### 6.2.9. Einzelsubstanzen

<u>Name</u>	<u>Firma</u>
Accutase	PAA Laboratories GmbH
Acrylamid	Sigma
Ammonium persulfat (APS)	MG Chemicals
Bis	BioRAD
n-Butanol	Merck
Dextran T70	Pharmacia Biotech
Glycin	Merck
HCl	Merck
Marker für SDS-PAGE-Elektrophorese (Kaleidoscop 161-0324)	BioRAD
Milchpulver / Skin Milk	Becton Dickinson
Norit A=charcoal	Serva
Protein Assay Dye Reagent	BioRAD
Sodium dodecylsulfat (SDS)	Amersham Biosciences
Tris	Amersham Biosciences

#### **6.3. Plastikmaterialien, Filter, Membranen und technische Geräte**

<u>Posten</u>	<u>Firma</u>
Brutschrank	NUAIRE
Combitips,10ml, unsteril	Eppendorf, Hamburg
Einwegspritze,10ml, steril	BectonDickinson
Einwegpipetten,3ml, steril	Copan / Italien



ELISA Detektiergerät		Dynatech Laboratories
Falcon-Röhrchen		Greiner
Feinwaage		KERN
Filterpapier Tankblot-Sandwich,3 mm		BioRAD
Kanülen, 0.9 x 70 mm		Neolus
Membran (Nitrocellulose) "Optitran" BA-S 85		BioRAD
0,45µm		
Mikroskop		Wetzlar
Neubauer-Zählkammer;0,1mmTiefe; 0,0025mm <sup>2</sup>		Assistent
Pipetten, steril, serologisch	25 ml	Greiner
Pipetten, steril, serologisch	10 ml	Greiner
Pipetten, steril, serologisch	5 ml	Greiner
Pipetten, steril, serologisch	2 ml	Greiner
Pipetten, steril, serologisch	1 ml	Greiner
Pipettenspitzen, mit Filter, steril, 10 µl		Sarstedt
Pipettenspitzen, mit Filter, steril, 100 µl		Sarstedt
Pipettenspitzen, mit Filter, steril, 200 µl		Sarstedt
Pipettenspitzen, mit Filter, steril, 1000 µl		Sarstedt
Pipettenspitzen, filterlos, steril, 1000 µl		Biozym
Reaktionsgefäß / Cryo Vial, 1.8 ml		NUNC
Reaktionsgefäß,15 ml, steril		Greiner
Reaktionsgefäß,50 ml, steril		Greiner
Sterilbank		BioHazard
Wasserbad		Memmert/Köttermann
96-Well-Platten für Zellkulturen, mit Deckel		NUNC
Zellkulturflaschen, 175 cm <sup>2</sup> , 650 ml, steril, mit Filter		Sarstedt
Zentrifuge Universal 32 R		Hettich

## **7.0. METHODEN**

### **7.1. ALLGEMEINE ZELLKULTURMETHODEN**

#### 7.1.1. Kulturbedingungen

Beide Zelllinien wurden in einem NUAIRE-Brutschrank bei 37°C und einer 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Begasung gehalten. Die Luftfeuchtigkeit betrug über 95 %. Bei der Aussaat der Zellen in die ZK-Flaschen lagen pro Flasche (175 cm<sup>2</sup>) 2 Mio. Zellen vor. Das entsprach einer Zelldichte von ca. 11 400 Zellen pro cm<sup>3</sup>. In diesem Zustand lagen sie weitgehend nicht konfluent vor.

Zu jeder Zeit der Zellbehandlung und -lagerung waren sterile Bedingungen gegeben.

#### 7.1.2. Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in Aliquots in Cryo Vials gelagert. Um sie nicht irreversibel zu schädigen, wurden diese im Wasserbad bis auf 37°C aufgewärmt, und sofort in die vorbereiteten ZK-Flaschen mit Nährmedium gegeben. Die Lagerung erfolgte unter oben angegebenen Bedingungen.

#### 7.1.3. Accutasebehandlung und "Splitten"

Um die Zellen von ihrer Unterlage in der ZK-Flasche möglichst schonend abzulösen, wurden sie mit dem Enzym Accutase behandelt, das kollagenolytische und proteolytische Eigenschaften besitzt. Dazu wurden zunächst das Nährmedium unter sterilen Bedingungen abgenommen und die Zellen einmalig mit PBS gespült. Darauf folgte die Gabe von 5 ml Accutase / ZK-Flasche. Hatten sich die Zellen abgerundet und zu ca. 90 % abgelöst (nach einer Einwirkungszeit von wenigen Minuten im Brutschrank bei 37°C), wurden sie in ein Reaktionsgefäß überführt, und mit dem gleichen Volumen des gewünschten Mediums versetzt. Um den Enzymzusatz weitgehend zu entfernen, erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei einer Umdrehungszahl 1000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem gewünschten Medium versetzt. Nun standen die Zellen für weitere Verwendung (z.B. teilen und neu kultivieren) zur Verfügung.

#### 7.1.4. Einfrieren und Lagern von Zellen

Bei längeren Unterbrechungen mit dem Arbeiten an Zellkulturen empfiehlt es sich, die Zellen in Aliquots bei sehr niedrigen Temperaturen zu halten. So können sie keine nennenswerten Veränderungen erfahren, werden praktisch "frisch" gehalten, und der Gefahr der Kontamination wird vorgebeugt.

Nach der Trypsinbehandlung (s.o.) wurde das Pellet in dem Einfriermedium resuspendiert, und jeweils 1 ml in NUNC-Cryo Vials überführt. Das Einfrieren erfolgte langsam, um die Zellen nicht irreversibel zu schädigen: zunächst eine Lagerung auf Eis, dann in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussell. Über ca. 24 Stunden erfuhren hier die Zellen eine langsame und gleichmässige Abkühlung auf  $-80^{\circ}\text{C}$ . Schliesslich folgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff.

#### 7.1.5. Herstellung von „gestripptem“ Kälberserum

Ziel dieses Vorgangs war es, alle Steroide einschliesslich  $17\beta$ -Estradiol aus dem fötalen Kälberserum zu entfernen. Dazu wurde 500 ml FCS mit 0,5 g Dextran und 2,5 g Norit A (Charcoal) in einem 1-Liter-Kolben versetzt. Für 30 min. wurde der mit Parafilm abgedeckte Kolben im Schüttelwasserbad bei  $55^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Anschliessend erfolgte die Portionierung in 50 ml Falcon-Röhrchen. Diese wurden bei 400 rpm 15 min. lang zentrifugiert. Der sich bildende Überstand wurde in einen anderen 2-Liter-Kolben abgegossen, der wiederum bei  $55^{\circ}\text{C}$  für 30 min. im Schüttelbad bearbeitet wurde. Abermals erfolgte die Zentrifugation. Der Überstand wurde durch Sterilfilter ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) und nochmals durch  $0,22\ \mu\text{m}$ -Sterilfilter filtriert. Die Lagerung erfolgte in Portionen à 50 ml.

### **7.2. Proliferationsassay (ELISA zur Quantifizierung der Proliferationsrate beider Zelllinien)**

#### 7.2.1. Aussaat

Waren die Zellen in den ZK-Flaschen zu ca. 90 % konfluent, wurden sie ihrer weiteren Behandlung unterzogen. Nach der Accutasebehandlung wurden sie mit Nährmedium versetzt, das nur noch 5 % gestripptes Normalserum (NS) enthielt. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer sterilen Einmalpipette wurde eine gleichmässige Verteilung im Reaktionsgefäss erreicht. Um mit einer definierten Zellzahl pro Well arbeiten zu können, wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Konzentration der Zellsuspension festgestellt und eine entsprechende Verdünnung angefertigt. Von ihr wurden  $100\ \mu\text{l}$  in jedes Well pipettiert. Ziel war es, pro Well gleichmässig 5000 Zellen zu inkubieren. Ein mehrschichtiges Wachstum der Zellen wurde dadurch möglichst vermieden. So wurde jede Zelle gleichmässig von Medium umgeben. Die 96-Well-Platten wurden im Brutschrank gelagert.

### 7.2.2. Mediumwechsel

24 Stunden nach der Aussaat wurde das alte Medium vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Möglichst rasch, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde 100 µl 0,5-prozentiges gestripptes NS dazugegeben. Mit der Verdünnung wollte man den Zellen möglichst viele Nährstoffe entziehen und sie "aushungern". Dadurch erhoffte man sich ein möglichst gutes und unbeeinflusstes Ansprechen auf die folgende Inkubation mit den Versuchssubstanzen. Die Lagerung der Platten erfolgte im Brutschrank.

### 7.2.3. Inkubation

24 Stunden nach der Überführung in 0,5-prozentiges Nährmedium wurden die Wells mit einer Pipette bis auf die am Boden anhaftenden Zellen entleert. Den festgelegten Wells wurden jeweils 150 µl frisch angesetzte Inkubationsmedien zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über 3 Tage im Brutschrank.

### 7.2.4. Messung der Proliferation mittels ELISA

Am 3. Tag nach der Stimulation erfolgte die Messung der Vermehrung der Zellen mit Hilfe des Enzym-vermittelten kolorimetrischen Immunassays im Sandwich-Verfahren. Dabei wird der Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die zelluläre DNA herbeigeführt, und dieses mit einem Antikörper (AK) versetzt, an den ein Enzym gekoppelt ist, was eine Farbstoffreaktion katalysiert. Je nach Ausmass der Farbreaktion wurde BrdU eingebaut, bzw. eine Proliferation erreicht.

Die verschiedenen Zusätze wurden als Kombinations-Kit bezogen (s.o.). Der Vorgang erfolgte unter unsterilen Bedingungen.

Zusatz von BrdU: Am Tag der Messung wurden dem Stimulationsmedium 80 µl pro Well der AK-Lösung zugesetzt. Die Einwirkzeit betrug 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C.

Trocknen: Die Wells wurden entleert und zum Abfluss der AK-Lösung für kurze Zeit umgekehrt auf Zellstoff gelegt. Um die Zellwand zu zerstören und Flüssigkeitsreste zu entfernen, wurden die Platten für 30 min. bei 60°C ohne Deckel gelagert.

Freilegung der DNA: Damit der AK ungehindert an das BrdU andocken kann, müssen die Zellstrukturen soweit zerstört werden, dass die DNA frei vorliegt. Dazu diente jeweils 200 µl FixDenat, mit dem die Zellen 30 min. bei Zimmertemperatur inkubiert wurden. Anschliessend wurde die Flüssigkeit abgekippt.

Zugabe von AK-Enzym-Kopplung: Jeweils 100 µl der Lösung wurden pro Well pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit bei Zimmertemperatur wurde der Überstand

verworfen und die Platten zum Abfließen restlicher Flüssigkeit umgekehrt auf Zellstoff deponiert.

Waschen: Der Waschvorgang ist der letzte Schritt vor Zugabe des Farbstoffs. Er dient der Eliminierung möglicher nicht gebundener AK-Enzym-Kopplung, die zu falschpositiven Ergebnissen führen könnte. Dazu wurden die Wells für mindestens 1 min. mit 250 µl des Waschpuffers versetzt. Nach der Einwirkzeit wurde er verworfen, und die Platte umgekehrt auf Zellstoff gelegt. Dieser Vorgang wurde noch 2 Mal wiederholt. Zum Schluss blieb die Platte allerdings mindestens 3 min. auf dem Zellstoff liegen.

Zugabe von Farbstoff: Möglichst zügig wurden pro Well 100 µl des Farbstoffs dazugegeben. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten unter Raumbedingungen (BG-1 ca. 4 min., SKOV-3 ca. 7 min.) wurden die Platten zum Messen der blauen Farbintensität in das Detektorgerät geschoben.

### **7.3. Western-Blot zur Bestimmung des Gehaltes an *erbB-2* und *EGFR***

#### **7.3.1. Präparation von Zelllysats aus einem Zellpellet für Western-Blots**

Die Zellen wurden aufgetaut und sofort in ein Eppendorfgefäß überführt, wo sie einmal mit 1 ml PBS gewaschen wurden (resuspendieren, abzentrifugieren).

Das Pellet wurde in 150 µl RIPA-Puffer (4°C) aufgenommen, wo die Zellen mit einer Pipettenspitze geschert wurden. In einem auf Eis gelegten Eppendorfgefäß wurde 1,5 µl einer PMSF-Lösung (10mg/ml) dazugegeben. Nach langsamem Vortexen wurde die Lösung 30-60 min. lang auf Eis inkubiert. Anschliessend wurde das Lysat bei 10000g für 10 min. gekühlt zentrifugiert. Der Überstand, der das gereinigte Lysat enthält, wurde bei -80°C gelagert.

#### **7.3.2. Quantifizierung der Proteinproben des Zelllysats**

Zur Quantifizierung der Proteine des Zelllysats wurden Verdünnungsreihen der Proben hergestellt. Nach Zugabe von BSA (1,4 mg/ml) und 200 µl Protein Assay Dye Reagent zu jeder Probe wurde bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Messreihen wurden mit Hilfe des Programms "GraphPadPrism" ausgewertet.

### 7.3.3. Auftrennung der Proteinproben und Durchführung des Western-Blots

Nachdem die Proteinproben mit 4x Sammelpuffer versetzt worden waren, wurden sie und die parallel laufenden Marker mit Hilfe der SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Tankblot-Verfahren wurden die Banden auf Nitrocellulosemembranen transferiert.

Zur Durchführung der Antikörperreaktion wurden die Blots mit PBS gewaschen und mindestens 1 Stunde mit in PBS gelöstem 5-prozentigem Milchpulver geblockt. Über Nacht wurden sie mit dem korrespondierenden Primär-AK bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde die AK-Lösung jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 angeboten. Nach erneutem Waschvorgang wurde ebenfalls bei Raumtemperatur für 1-2 Stunden der Peroxidase-konjugierte Sekundär-AK jeweils in einer Verdünnung von 1:2000 dazugegeben. Die folgenden Schritte wurden gemäss des Protokolls des ECL Western-Blot Kits der Firma Amersham durchgeführt.

### **7.4. Statistik**

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogramms "GraphPadPrism" ausgewertet. Es wurde der Newman-Keuls-Test als Post-Test im One-way-ANOVA - Verfahren gewählt. Das Konfidenzintervall betrug 95 %.

## 8.0. LITERATURVERZEICHNIS

- Akiyama T, Saito T, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T (1988): Tumor promotor and epidermal growth factor stimulate phosphorylation of the c-erbB-2 gene product in MKN-7 human adenocarcinoma cells.  
Mol. Cell. Biol Mar; 8 (3): 1019-26
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995): PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen- activated protein kinase kinase in vitro and in vivo.  
J Biol Chem. Nov 17; 270 (46): 27489-94
- Alper O, Hacker, NF, Cho-Chung YS (1999): Protein kinase A-1alpha subunit-directed antisense inhibition of ovarian cancer cell growth: crosstalk with tyrosine kinase signaling pathway.  
Oncogene Sep 2; 18 (35): 4999-5004
- Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R, Bundred NJ (2001): ZD (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression.  
Int. J. Cancer Dec 15; 94 (6): 774-82
- Aronica SM, Katzenellenbogen BS (1991): Progesterone receptor regulation in uterine cells: Stimulation by Estrogen, Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate, and Insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors.  
Endocrinology Jan 128 (4): 2045-2052
- Baldwin WS, Curtis SW, Cauthen C A, Risinger JI, Korach KS, Barrett JC (1998): BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro.  
In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. Sep 34 (8): 649-54
- Belsches AP, Haskell MD, Parsons SJ (1997): Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis.  
Front. Biosci. Oct 15;2: 501-18
- Berchuk A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson DL, Marks P, et al. (1990): Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer.  
Cancer Res. Jul 1; 50 (13): 4087-91

- Berger MS, Locher GW, Saurer S, Gullick WJ, Waterfield MD, Groner B, Hynes NE (1988): Correlation of c-erbB-2 gene amplification and protein expression in human breast carcinoma with nodal status and nuclear grading.  
Cancer Res. Mar 1; 48: 1238-1243
- Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe W?B (1998): Estrogen receptor alpha (ERalpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serious cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. Mar 83 (3): 1025-8
- Campiglio M, Ali S, Knyazev PG, Ullrich A (1999): Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer.  
J. Cell. Biochem. Jun 15; 73 (4): 522-32
- Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ (1997): Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.  
Genomics Nov;1; 45 (3): 607-17
- Castoria G, Barone MV, Di Domenico M, Bilancio A, Ametrano D, Migliaccio A, Auricchio F (1999): Non-transcriptional action of estradiol and progestin triggers DNA synthesis.  
EMBO J. May: 4; 18 (9): 2500-10
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001): PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells.  
EMBO J. Nov: 1; 20 (21): 6050-9
- Cerni C, Skrzypek B, Popov N, Sasgarry S, Schmidt G, Larsson LG, Luscher B, Nenriksson M (2002): Repression of in vivo growth of Myc/Ras transformed tumor cells by Mad 1.  
Oncogene Jan 17; 21 (2): 447-59
- Chan SD, Antonucci DM, Fok KS, Alajoki ML, Harkins RN, Thompson SA, Wada HG (1995): Heregulin activation of extracellular acidification in mammary carcinoma cells is associated with expression of HER2 and HER3.  
J. Biol. Chem. Sep 22; 270 (38): 22608-13
- Chan SD, Dill K, Blomdahl J, Wada HG (1996): Nonisotopic quantitation of mRNA using a novel RNase protection assay: measurement of erbB-2 mRNA in tumor cell lines.  
Anal. Biochem. Nov 15; 242 (2): 214-20



- Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Palcido S, Bianco AR, Tortora G (2000): Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor- selective tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res.* Jun; 6: 2053-2036
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Walter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2- overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* Sep; 17(9): 2639-48
- Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE (1997): Neu differentiation factor induces ErbB2 down-regulation and apoptosis of ErbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res.* Sep 1; 57 (17): 3804-11
- Deshane J, Grim J, Loechel S, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT (1996): Intracellular antibody against erbB-2 mediates targeted tumor cell eradication by apoptosis. *Cancer Gene Ther.* Mar-Apr; 3 (2): 89-98
- Doherty JK, Bond CT, Hua W, Adelman JP, Clinton GM (1999): An alternative HER-2/neu transcript of 8 kb has an extended 3'UTR and displays increased stability in SKOV-3- ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* Sep; 74 (3): 408-15
- Doraiswamy V, Parrott JA, Skinner MK (2000): Expression and action of transforming growth factor alpha in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Biol. Reprod.* Sep; 63 (3): 789-96
- DosSantos EG, Dieudonne MN, Pecquery R, LeMoal V, Giudicelli Y, Lacasa D (2002): Rapid nongenomic E2 effects on p 42/p 44 MAPK, activator protein -1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* Mar; 143 (3): 930-40
- Dupont J, Karas M, LeRoith D (2000): The potentiation of estrogen on insulin-like growth factor 1 action in MCF-7 human breast cancer cells includes cell cycle components. *J. Biol. Chem.* Nov.17; 275 (46): 35893-901
- Dupont J, LeRoith D (2001): Insulin-like growth factor 1 and oestradiol promote cell proliferation of MCF-7 breast cancer cells: new insights into their synergistic effects. *Mol. Pathol.* Jun; 54 (3): 149-54

- Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, Yanagisawa J, Metzger D, Hashimoto, S., Kato, S. (1999): Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha.  
Mol. Cell. Biol. Aug; 19 (8): 5363-72
- Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A (2002): Erk 5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2.  
Mol. Cell. Biol. Jan; 22 (1): 270-85
- Fassas AB, Rapoport AP, Bolanos-Meade J, Shanholtz C, Cottler-Fox M, Tricot G (2001): Tamoxifen-based treatment induces clinically meaningful responses in multiple myeloma patients with relapsing disease after autotransplantation.  
Leuk Lymphoma Nov-Dec; 42 (6): 1323
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR jr (2000): Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G-protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF.  
Mol. Endocrinol. Oct; 14 (10): 1649-60
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton ARjr, Bland KI (2002): Estrogen action via the G-protein-coupled receptor, GPR30: Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis.  
Mol. Endocrinol. Jan; 16 (1): 70-84
- Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, Speiser P, Czerwenka K, Sevela P, Zeillinger R (1997): EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients.  
Anticancer Res. Jan-Feb; 17 (1B): 613-9
- Galtier-Dereure F, Capony F, Maudelonde T, Rochefort H (1992): Estradiol stimulates cell growth and secretion of procathepsin D and a 120-kilodalton protein in the human ovarian cancer cell line BG-1.  
J. Clin. Endocrinol. Metab. Dec 75 (6): 1497-502
- Gee JMW, Robertson JFR, Nicholson E, Nicholson RI (2001): Phosphorylation of ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer.  
Int. J. Cancer: 95, 247-254

- Gehm BD, McAndrews J.M, Jordan VC, Jameson JL (2000): EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway.  
Mol. Cell Endocrinol. Jan 25; 159 (1-2): 53-62
- Geisinger KR, Kute TE, Pettenati MJ, Welander CE, Dennard Y, Collins LA, Berens ME (1989):  
Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors.  
Cancer Jan 15; 63 (2): 280-8
- Geisinger KR, Berens ME, Duckett Y, Morgan TM, Kute TE, Welander CE (1990): The effects of estrogen, progesterone and tamoxifen alone and in combination with cytotoxic agents against human ovarian carcinoma in vitro.  
Cancer Mar 1; 65 (5): 1055-61
- Hall JM, McDonnell DP, Korach KS (2002): Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements.  
Mol. Endocrinol. Mar; 16 (3): 469-86
- Hamelers IH, van Schaik RF, van Teffelen HA, Sussenbach JS, Steenbergh PH (2002): Synergistic proliferative action of insulin-like growth factor 1 and 17 beta-estradiol in MCF-7S breast tumor cells.  
Exp. Cell. Res. Feb; 1; 273 (1): 107-17
- Havrilesky LJ, McMahon CP, Lobenhofer EK, Whitaker R, Marks JR, Berchuk A (2001): Relationship between expression of coactivators and corepressors of hormone receptors and resistance of ovarian cancers to growth regulation by steroid hormones.  
J. Soc. Gynecol. Investig. Mar-Apr; 8 (2): 104-13
- Hori M, Inagawa S, Shimazaki J, Itabashi M, Hori M (2000): Overexpression of mitogen-activated protein kinase superfamily proteins unrelated to Ras and AF-1 of estrogen receptor alpha mutation in advanced stage human breast cancer.  
Pathol. Res. Pract. 196 (12): 817-26
- Hsieh SS, Malerczyk C, Aigner A, Czubyko F (2000): ERbB-2 expression is rate-limiting for epidermal growth factor-mediated stimulation of ovarian cancer cell proliferation.  
Int. J. Cancer Jun 1; 86 (5): 644-51

- Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H, Clinton GM (1995): SKOV-3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* Dec; 55 (3-4): 279-89
- Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA (1993): Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol. Endocrinol.* Aug; 7 (8): 992-8
- Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Teng CT, Korach KS, McLachlan JA (1995): Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems. *Environ. Health Perspect.* Oct; 103 Suppl. 7: 35-8
- Ignar-Trowbridge DM, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS (1996): Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* May; 137 (5): 1735-44
- Improta Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, MyDonnell DP (1999): estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Apr; 96 (8): 4686-91
- Jones J, Lagasse LD, Karlan BY (1994): Steroid hormonal independence of HER-2 /neu mRNA expression in four human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol. Oncol.* Dec; 55 (3 Pt 1): 421-6
- Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C (2000): Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J. Biol. Chem.* Jun; 275 (24): 18447-53
- Karlan BY, Jones J, Slamon DJ, Lagasse LD (1994): Glucocorticoids stabilize HER-2/neu messenger RNA in human epithelial ovarian carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* Apr; 53 (1): 70-7
- Kato S, Masuhiro Y, Watanabe M, Kobayashi Y, Takeyama KI, Endoh H, Yanagisawa J (2000): Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signaling pathways. *Genes Cells* Aug; 5 (8): 593-601
- Kato S (2001): Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer* 8; (1): 3-9

- King BL, Carter D, Foellmer HG, Kacinski BM (1992): Neu proto-oncogene amplification and expression in ovarian adenocarcinoma cell lines.  
Am. J. Pathol. Jan; 140 (1): 23-31
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey J., Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS (2002): Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk.  
J.Biol. Chem. Mar; 277 (10): 8531-8537
- Kobayashi Y, Kitamoto T, Matsuhira Y, Watanabe M, Kase T, Metzger D, Yanagisawa J, Kato S (2000): p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains.  
J. Biol. Chem. May; 275 (21): 15645-51
- Kohler M, Janz I, Wintzer HO, Wagner E, Bauknecht T (1989): The expression of EGF receptors, EGF-like factors and c-myc in ovarian and cervical carcinomas and their potential clinical significance.  
Anticancer Res. Nov-Dec; 9 (6): 1537-47
- Kurachi H, Morishige K, Amemiya K, Adach H, Hirota K, Miyake A, Tanizawa O (1991): Importance of transforming growth factor alpha / epidermal growth factor receptor autocrine growth mechanism in an ovarian cancer cell line in vivo.  
Cancer Res. Nov 1; 51 (21): 5956-9
- Kushner PJ, Agard D A, Greene GL, Scalan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P (2000): Estrogen receptor pathways to AP-1.  
J. Steroid Biochem. + Mol. Biol. 74: 311-17
- Langdon SP, Crew AJ, Ritchie AA, Muir M, Wakeling A, Smyth JF, Miller WR (1994): Growth inhibition of oestrogen receptor-positive human ovarian carcinoma by anti-oestrogens in vitro and in a xenograft model.  
Eur. J. Cancer 30A (5): 682-686
- Lau KM, Mok SC, Ho SM (1999): Expression of human estrogen receptor-alpha and-beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA May 11; 96 (10): 5722-7
- Lundholt BK, Briand P, Lykkesfeldt AE (2001): Growth inhibition and growth stimulation by estradiol of estrogen receptor transfected human breast epithelial cell lines involve different pathways.  
Breast Cancer Re. Treat. Jun; 67(3): 199-214

- McPhillips F, Mullen P, Monia BP, Ritchie AA, Dorr FA, Smyth JF, Langdon SP (2001): Association of c-Raf expression with survival and its targeting with antisense oligonucleotides in ovarian cancer.  
Br. J. Cancer 85 (11): 1753-1759
- MacGregor Schafer J, Liu H, Levenson AS, Horiguchi J, Chen Z, Jordan VC (2001): Estrogen receptor alpha mediated induction of the transforming growth factor alpha gene by estradiol and 4-hydroxytamoxifen in MDA-MB-231 breast cancer cells.  
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. Jul; 78(1): 41-50
- Makar AP (2000): Hormone therapy in epithelial ovarian cancer.  
End Rel Cancer 7: 85-93
- Mandlekar S, Kong AN (2001): Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis.  
Apoptosis Ce; 6 (6): 469-77
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F (1996): Tyrosine kinase/p21 ras/ MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells.  
EMBO J. Mar: 15; 15 (6): 1292-300
- Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M, Auricchio F (1998): Activation of the Src/p21 ras/ Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor.  
EMBO J. Apr: 1; 17(7): 2008-18
- Modjtahedi H, Komurasaki T, Toyoda H, Dean C (1998): Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGFalpha, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of epiregulin to EGFR-expressing tumours.  
Int. J. Cancer Jan 19; 75 (2): 310-6
- Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J (2001): Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells.  
Cancer Res. Jun 15; 61 (12): 4744-9
- Moscattello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, Biegel JA, Hayes RL, Wong AJ (1995): Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumours.  
Cancer Res. Dec 1; 55 (23): 5536-9

- Myers AM, Moore GE, Major FJ (1981): Advanced ovarian carcinoma. Response to antiestrogen therapy.  
Cancer 48: 2368-2370
- Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, Jones HE, Wakeling AE, Gee JMW (2001): Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer.  
End Rel Cancer 8, 175-182
- Nuedling S, Kahlert S, Loebbert K, Meyer R, Vetter H, Grohe C (1999): Differential effects of 17-beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes.  
FEBS Lett. Jul; 454 (3): 271-6
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.  
EMBO Vol. 19 No. 13 pp.3159-3167
- Ouyang X, Gulliford T, Zhang H, Huang GC, Epstein R (1996): Human cancer cells exhibit protein kinase C-dependent c-erbB-2 transmodulation that correlates with phosphatase sensitivity and kinase activity.  
J. Biol. Chem. Sep 6; 271 (36): 21786-92
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scalani TS (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites.  
Science Sep; 277 (5331): 1508-10
- Parrizas M, Gazit A, Levitzki A, Wertheimer E, LeRoith D (1997): Specific inhibition of insulin-like growth factor-1 and insulin receptor tyrosine kinase activity and biological function by tyrphostins.  
Endocrinology Apr 138(4): 1427-33
- Pavlik EJ, Nelson K, van Nagell JR jr, Gallion HS, Donaldson ES, DePriest P, Meares K, van Nagell JR 3rd. (1991): The growth response of BG-1-ovarian carcinoma cells to estradiol, 4 OH-tamoxifen, and tamoxifen: evidence for intrinsic antiestrogen activation.  
Gynecol. Oncol. Sep; 42 (3): 245-9
- Pegues JC, Kannan B, Stromberg K (1999): ErbB receptor expression and growth response to heregulin beta 1 in five ovarian carcinoma lines.  
Int. J. Oncol. Jun; 14 (6): 1169-76

- Peles E, Lamprecht R, Ben-Levy R, Tzahar E, Yarden Y (1992): Regulated coupling of the Neu receptor to phosphatidylinositol 3'-kinase and its release by oncogenic activation.  
J. Biol. Chem. Jun 15; 267 (17): 12266-74
- Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling.  
Oncogene Oct 12; 19 (43): 4970-8
- Pinkas-Kamarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y (1996): Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions.  
EMBO J. May 15; 15 (10): 2452-67
- Pinkas-Kamarski R, Alroy I, Yarden Y (1997): ErbB receptors and EGF-like ligands: cell lineage determination and oncogenesis through combinatorial signaling.  
J. Mammary Gland Biol. Neoplasia Apr; 2 (2): 97-107
- Plowman GD, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, Rothwell VM, Buckley S (1993): Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/ p180erbB4.  
Nature Dec 2; 366 (6454): 473-5
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999): EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF.  
Nature Dec;23-30; 402 (6764): 884-8
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001): The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification.  
End. Rel. Cancer 8, 11-31
- Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T (1998): Differential expression of estrogen receptor-alpha and beta RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis.  
Cancer Res. Dec 1; 58 : 5367-5373
- Rakowicz-Szulczynska EM, Otwiaska D, Rodeck U, Koprowski H (1989): Epidermal Growth Factor (EGF) and monoclonal antibody to cell surface EGF Receptor bind to the same chromatin receptor.  
Arch. Biochem.Biophys Feb 1; 268 (2): 456-464



- Sehouli J, Stengel D, Elling D, Ortmann O, Blohmer J, Riess H, Lichtenegger W (2002): First-line chemotherapy with weekly Paclitaxel and Carboplatin for advanced ovarian cancer: a phase 1 study.  
Gynecol.Oncol. May; 85 (2): 321-6
- Seo HS, Leclercq G (2002): Evaluation of potential implication of membrane estrogen binding sites on ERE-dependent transcriptional activity and intracellular estrogen receptor-alpha regulation in MCF-7 breast cancer cells.  
J.Steroid. Biochem. Mol. Biol. Jan; 80 (1): 109-23
- Sewell JM, Macleod KG, Ritchie A, Smyth JF, Langdon SP (2002): Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839 (Iressa).  
Br. J. Cancer Feb 1; 86 (3): 456-62
- Shawver LK, Mann E, Elliger SS, Dugger TC, Arteaga CL (1994): Ligand-like effects induced by anti-c-erbB-2 antibodies do not correlate with and are not required for growth inhibition of human carcinoma cells.  
Cancer Res. Mar 1; 54 (5): 1367-73
- Simpson BJ, Bartlett JM, Macleod KG, Rabiasz G, Miller EP, Rae AL, Gordge P, Leake RE, Miller WR, Smyth J, Langdon SP (1999): Inhibition of transforming growth factor alpha (TGFalpha)-mediated growth effects in ovarian cancer cell lines by a tyrosine kinase inhibitor ZM 252868.  
Br. J. Cancer Mar; 79 (7-8): 1098-103
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF (1989): Studies of HER-2/neu Proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.  
Science May 12; 244: 707-712
- Smith CL (1998): Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways.  
Biol. Repro. 58: 627-632
- Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ (2002): Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc-association and Shc Pathway activation.  
Mol. Endocrinol. Jan; 16 (1): 116-27
- Sporn MB, Roberts AB (1985): Autocrine growth factors and cancer.  
Nature Feb; 313 (28): 745-747

- Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986): p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity.  
Mol. Cell Biol. May; 6 (5): 1729-40
- Stromberg K, Collins TJ 4th, Gordon AW, Jackson CL, Johnson GR (1992): Transforming growth factor alpha acts as an autocrine growth factor in ovarian carcinoma cell lines.  
Cancer Res. Jan 15; 52 (2): 341-7
- Tzahar E, Pinkas-Kamarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y (1997): Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network.  
EMBO J. Aug 15; 16 (16): 4938-50
- Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, Imano E, Iwama N, Morishima T, Yamasaki Y, Kajimoto Y, Kamada T (1994): Estrogen regulation of the insulin-like growth factor 1 gene transcription involves an AP-1 enhancer.  
J. Biol. Chem. Jun; 10; 269 (23): 16433-42
- Vacca F, Bagnato A, Catt KT, Tecce R (2000): Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells.  
Cancer Res. Sep; 15; 60(18): 5310-7???
- Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL, McDonnell DP (1998): The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor.  
Mol. Cell. Biol. Mar 18 (3):1369-1378
- Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y (1998): Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency.  
J.Biol. Chem. May; 29; 273 (22): 13819-13827
- Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ (1998): Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins.  
Mol. Endocrinol. Oct; 12 (10): 1605-18
- Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInterney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ (1999): The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions.  
Mol. Endocrinol. Oct; 13 (10): 1672-85

- Weiss FU, Wallasch C, Campiglio M, Issing W, Ullrich A (1997): Distinct characteristics of heregulin signals mediated by HER3 or HER4.  
J. Cell. Physiol. Nov; 173 (2): 187-95
- Weisz A, Rosales R (1990): Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor.  
Nucleic. Acids Res. Sep 11; 18 (17):5097-106
- Whitmarsh AJ and Davis RJ (1996): Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways.  
J. Mol. Med. 74: 589-607
- Wiechen K, Karaaslan S, Diemel M (1999): Involvement of the c-erbB-2 oncogene product in the EGF-induced cell motility of SK-OV-3 ovarian cancer cells.  
Int. J. Cancer Oct 29; 83 (3): 409-14
- Xu F, Yu Y, Le XF, Boyer C, Mills GB, Bast RCjr (1999): The outcome of heregulin-induced activation of ovarian cancer cells depends on the relative levels of HER-2 and HER-3 expression.  
Clin. Cancer Res. Nov; 5 (11): 3653-60
- Zheng J, Yao Z (2000): Effect of tamoxifen on apoptosis and drug resistance of breast cancer cells in vitro.  
Zhonghua Zhong Liu Za Zhi Jan; 22 (1):55-7
- Zimniski SJ, Garola RE, Fendl K, Peterson CM (1989): Endocrine characterization of a human ovarian carcinoma (BG-1) established in nude mice.  
Steroids Dec; 54 (6): 593-606

## 9.0. Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Diedrich danke ich sehr für die Bereitstellung des Laborplatzes sowie für die Überlassung der Materialien und Geräte.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. O. Ortmann gilt mein ausdrücklicher Dank für die Auswahl des Themas, durch das ich einen recht tiefen Einblick in die onkologische Grundlagenforschung gewinnen durfte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mir durch seine Betreuung gute Hilfestellungen gab und mich oft nicht verzweifeln liess. Auch nach seinem Weggang aus Lübeck beantwortete er weiterhin immer meine Fragen.

Ohne die Unterstützung v.a. von Constanze Siggel und Nicole Bohnert, aber auch von Stephan Pollack und Katja Petersen hätte ich viel mehr Steine im Weg gehabt. Vielen Dank für das geduldige Zeitnehmen bei oft bohrenden Fragen über Laborarbeit, Firmennamen und Bestellscheine !

Auch meinen beiden Kommilitoninnen Simone Porz und Michaela Böster möchte ich für ihre Hilfe bei der Labor- und Schreibaarbeit danken.

Obwohl ich Euch fast zuletzt nenne: Hildegunn Horne und Anne Skrzykowski - vielen Dank, Ihr wisst schon wofür !

Nicht zuletzt lebe ich in einem recht privilegierten Land, das mir die mit einer Doktorarbeit verbundene Ausbildung relativ einfach ermöglicht.

## 10.0. Tabellarischer Lebenslauf

Name: Frey  
Vorname: Nicola Andrea  
Geburtsdatum: 7. Juni 1978  
Geburtsort: München, Deutschland  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Markt 4  
D- 01662 Meißen

### Schulischer Werdegang:

1984-1988 Grundschule in Weyhe bei Bremen  
1988-1990 Orientierungsstufe in Weyhe bei Bremen  
1990-1997 Gymnasium in Weyhe bei Bremen  
1997 Abitur

### Studium:

10/1997-9/1999 Vorklinische Semester an der medizinischen Universität zu Lübeck (MUL)  
9/1999 Ärztliche Vorprüfung  
10/1999 bis 4/04 klinische Semester an der MUL  
3/2001 1. Staatsexamen  
3/2003 2. Staatsexamen  
4/2003 Beginn des Praktischen Jahres mit Aufhalten in Deutschland, Spanien und der Schweiz  
4/2004 3. Staatsexamen  
ab 8/2004 Arbeit als Ärztin in Weiterbildung am Krankenhaus Meißen (Lehrkrankenhaus der Carl-Gustav-Carus Universität Dresden), Medizinische Klinik I

