

UNTERSUCHUNG DER SUBZELLULÄREN LOKALISATION DER REZEPTORTYROSINKINASE HER-3

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der chemischen Fakultät der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von
Dipl. Biol. Wiebke Schormann
aus Northeim

Dortmund, 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. J.G. Hengstler
2. Gutachter: Prof. Dr. C.M. Niemeyer

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologische Kenngrößen des Mammakarzinoms	1
1.1.1 Die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	3
1.2 Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptorfamilie	4
1.2.1 Struktur der RTK-Moleküle	5
1.2.2 MAPK-Ras Signalweg	8
1.2.3 PI3-K-PKB/AKT-Signalkaskade	8
1.2.4 PLC-PKC-Signalweg	9
1.3 Die Bedeutung der ErbB-Rezeptoren für Tumorentstehung und –entwicklung	10
1.4 Nukleocytoplasmatischer Proteintransport	12
1.5 Zellmembranständige Rezeptoren im Zellkern	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit	15
2 MATERIAL	16
2.1 Zelllinien	16
2.2 Antikörper	17
2.2.1 Primärantikörper	17
2.2.2 Sekundärantikörper	18
2.2.3 Längenstandards für SDS-PAGE/Immunoblot	18
2.2.4 Nährmedien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen	18
2.3 Chemikalien	19
2.4 Lösungen und Puffer	21
2.4.1 Kommerzielle Kit-Systeme	25
2.5 Verbrauchsmaterialien	25
2.6 Geräte	25
3 METHODEN	26
3.1 Zellkulturtechniken	26
3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen	26
3.2 Gewebe für die in situ Expressionsanalyse	27
3.2.1 Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientinnenkollektivs	27
3.2.2 Beurteilung und Klassifizierung immunhistochemischer Färbungen am Ovarialkarzinom und Mammakarzinom	30

3.3	Chirurgie und Pathologie	31
3.3.1	In situ-Analysen zur Protein-Expression: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	31
3.3.2	Immunfluoreszenz	35
3.3.3	TUNEL-Assay in Kombination mit Immunfluoreszenzfärbung	36
3.4	Arbeiten mit Proteinen	37
3.4.1	Ernte des Gesamtzelllysates	37
3.4.2	Subzelluläre Fraktionierung (Slosberg et al., 1999)	37
3.4.3	Proteinbestimmung	38
3.4.4	Methanol/Chloroform-Fällung modifiziert (Wessel and Flugge, 1984)	38
3.4.5	Co-Immunpräzipitation	39
3.4.6	SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	39
3.4.7	Immunoblot	40
3.4.8	Bioluminometrische ATP-Messung	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Relation von HER-3 zur Prognose im primären Ovarialkarzinom	43
4.2	Relation von HER-2 und HER-3 sowie ihrer phosphorylierten Formen zur Prognose im Mammakarzinom	44
4.3	Subzelluläre Lokalisation von HER-3 <i>in vivo</i>	51
4.3.1	Subzelluläre Verteilung der Rezeptortyrosinkinase HER-3 im Mammakarzinom	51
4.3.2	Inverse Korrelation von nukleärem und cytoplasmatischem HER-3	52
4.3.3	Vergleich der subzellulären Lokalisation <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	56
4.3.4	Depletion von ATP induziert die nukleäre Akkumulation von HER-3 <i>in vitro</i>	64
4.3.5	Depletion von Glucose induziert die nukleäre Akkumulation von HER-3 <i>in vitro</i>	66
4.4	Subzelluläre Lokalisation von HER-3 <i>in vitro</i>	67
4.5	Mögliche Einflussgrößen der subzellulären Lokalisation von HER-3 <i>in vitro</i> (am Beispiel der Brustkrebszelllinie MCF-7)	68
4.5.1	Nukleäre HER-3 Expression in Abhängigkeit der Zelldichte	68
4.5.2	Einfluss der Ligand-abhängigen Aktivierung von HER-3 auf die subzelluläre Lokalisation	69
4.5.3	Einfluss der Ligand-unabhängigen Aktivierung von HER-3 auf die subzelluläre Lokalisation	73
4.5.4	Überexpression des Dimerisierungspartners von HER-3	75
4.5.5	Apoptose-unabhängige Translokation von HER-3 in den Zellkern	76
4.5.6	Inaktivierung vom nukleären Exportrezeptor führt zur Akkumulation von HER-3 im Nukleus	77
5	DISKUSSION	80
5.1	Rezeptortyrosinkinasen als prognostische Faktoren in gynäkologischen Karzinomen	80
5.2	Nukleäre HER-3 Lokalisation im Mammakarzinom – ein unerwartetes Ergebnis	81
5.3	Dreidimensionales Tumorwachstum forciert die Lokalisation von nukleärem HER-3	83
5.4	ATP- und Glucose-Mangel führt zur Akkumulation von HER-3 im Zellkern	83
5.4.1	Glucose-Entzug	83
5.4.2	ATP-Depletion	84
5.5	Genotoxischer Stress bedingt eine nukleäre Translokation von HER-3 in geringerem Ausmaß	85
5.6	Die nukleäre HER-3-Expression ist abhängig von der Zelldichte	86
5.7	Nukleäre HER-3-Expression ist unabhängig vom Expressionsstatus des Dimerisationspartners	87

5.8	Stimulation durch Heregulin zeigt keine Auswirkung auf die nukleäre HER-3-Lokalisation	88
5.9	Der Export von nukleärem HER-3 wird durch Leptomycin B inhibiert	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	90
7	LITERATURVERZEICHNIS	93
8	ANHANG	107

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CI	Konfidenzintervall (engl.: <i>confidence interval</i>)
cm ²	Quadratzentimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DCIS	Duktales <i>carcinoma in situ</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure,
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'- Tetraessigsäure
ERK	extracellular signal regulated kinase
ER	Estrogenrezeptor
ErbB	Erythroblastosis Onkogen B (engl.: <i>erythroblastosis oncogene B</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor (engl.: <i>Fibroblast growth factor receptor</i>)
FIGO	Internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde (franz.: <i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>)
HRG	Heregulin
HER	Humane epidermale Wachstumsfaktoren-Rezeptoren (engl.: <i>human epidermal growth factor receptor</i>)
IHC	Immunhistochemie
IB	Immunblot
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
min	Minute
mg	Milligramm
mA	Milliampere
NADP	Nicotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PI-3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKB	Proteinkinase B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
sec	Sekunde
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vs	versus
w/v	Gewicht (engl.: <i>weight</i>) pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organization</i>)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Deregulierendes (abnormes) Zellwachstum ist das Charakteristikum aller Tumore, unabhängig, ob sie einen benignen (gutartigen) oder malignen (bösartigen) Status besitzen. Die malignen Tumore zeichnen sich zusätzlich dadurch aus, dass sie die Fähigkeit haben, in gesundes Gewebe einzuwandern, zu metastasieren und weit ab vom eigentlichen Entstehungsort zu wachsen. Bevor dieses Ereignis des unkontrollierten Wachstums eintritt, befindet sich die Zelle in Balance zwischen Zellteilung (Zellzyklus-Progression) und Zellwachstum auf der einen Seite und dem programmierten Zelltod (Apoptose) auf der anderen Seite (Blume-Jensen and Hunter, 2001). Gelegentlich versagt allerdings das außerordentlich genau regulierende System, mit dem die Zellvermehrung gesteuert wird, so dass sich die Zellen vergrößern und teilen, obwohl für den Organismus keine Notwendigkeit besteht.

Diese oben genannten Kriterien fassten Hanahan und Weinberg (2000) zu sechs Merkmalen zusammen, die Tumorzellen vom Normalgewebe unterscheiden. Diese haben bis heute ihre Gültigkeit und können lediglich ergänzt werden. Diese Merkmale sind die autokrine Selbstversorgung von Wachstumssignalen (1), das Nichtansprechen auf Wachstumsinhibierende Signale (2), die Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose) (3) das unbegrenzte Teilungsvermögen (4), die Fähigkeit zur Angiogenese (5), sowie Invasion und Metastasenbildung (6).

1.1 Epidemiologische Kenngrößen des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste Tumor der Frau, nur etwa jeder hundertste Betroffene ist männlich. Über eine Million Neuerkrankungen werden weltweit pro Jahr registriert. In der BRD erkrankt etwa jede zehnte Frau unter 45 Jahren an einem Mammakarzinom. Für das Jahr 2002 lag die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland bei ca. 50.000 Fällen. Auch die höchste Mortalitätsrate der Krebserkrankungen bei Frauen in den westlichen Nationen wird vom Mammakarzinom angeführt. Seit Anfang der 90er Jahre ist aber ein deutlicher Abwärtstrend der Mortalitätsrate zu verzeichnen (Levi et al., 2001), (www.rki.de).

Die weibliche Brustdrüse (Mamma) unterliegt von der Geburt an über die Pubertät bis hin zur Schwangerschaft und Menopause einer ständigen Entwicklung. In dieser Zeit wird sie von Hormonen wie z.B. Östrogen und Progesteron beeinflusst. Jede Brust besteht aus 15-25 tubuloalveolaren Einzeldrüsen. Diese Einzeldrüsen haben jeweils ein eigenes Ausführungsgangssystem, das von einem zweischichtigen kubisch oder zylindrischen Epithel ausgekleidet ist. Die innere Schicht ist aus einheitlichen Zellen mit ovalen Kernen aufgebaut. Darunter ist eine diskontinuierliche Schicht aus Myoepithelzellen mit hellem Cytoplasma lokalisiert. Jeder Ausführungsgang ist von lockerem kollagenfaserigen Stützgewebe umgeben.

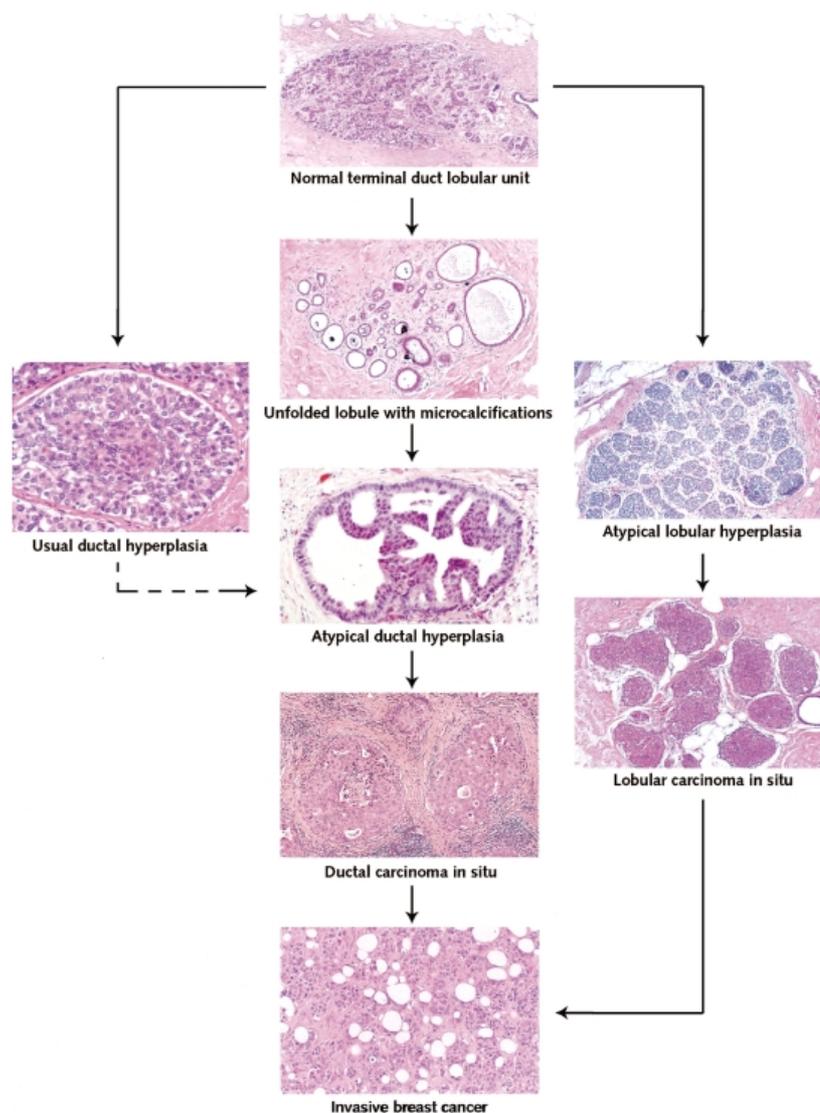


Abbildung 1: Theorie der linearen Progression der Brustkrebs-Pathogenese. Aus: (Arpino et al., 2005)

Die Mammakarzinom-Morphologie (Abbildung 1) kann aus histopathologischer Sichtweise in zwei Entitäten eingeteilt werden. Es wird unterschieden zwischen dem nicht-invasiven und dem invasiven Mammakarzinom. Das nicht-invasive Karzinom wird zum einen in das aus den Milchgängen hervorgehende Karzinom (duktales Mammakarzinom, DCIS, Abbildung 1) und zum anderen in das Drüsenläppchen-Mammakarzinom (lobuläres Mammakarzinom, LCIS, Abbildung 1) unterteilt. Das Erstgenannte stellt bei weitem die häufigste Form aller in-situ-Karzinome dar (90-95 %). Diese beiden Karzinome unterscheiden sich sowohl morphologisch und auch hinsichtlich Diagnostik, biologischen Verhalten und therapeutischen Konsequenzen. Bei den invasiven Formen des Mammakarzinoms tritt das invasive duktales Karzinom (60-70 %) häufiger auf als die invasiv lobuläre Karzinomform. Der Vollständigkeit halber sind noch andere weitaus seltenere Karzinomformen zu nennen wie das medulläre, das tubuläre, das muzinöse und das papilläre Karzinom.

1.1.1 Die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms

Mittels der TNM-Klassifikation (Tabelle 1) ist es möglich, den histopathologischen Mammakarzinomtyp zu beschreiben. Denn aus der Sicht des histologischen Typs können gewisse Rückschlüsse auf die Prognose vorgenommen werden. So haben duktal-invasive Karzinome in der Regel eine schlechtere Prognose und eine höhere Inzidenz positiver axillärer Lymphknoten als die weniger häufigen histologischen Typen (Kreienberg R. et al., 2006)

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.

Kenngroße			Beschreibung
Tumorgröße (T)	T1		Der Tumor ist nicht größer als 2 cm und hat sich nicht außerhalb der Brust ausgebreitet.
		T1a	Der Tumor ist nicht größer als 0,5 cm
		T1b	Der Tumor ist größer als 0,5 cm aber nicht größer als 1 cm
		T1c	Der Tumor ist größer als 1 cm aber nicht größer als 2 cm
	T2		Der Tumor ist größer als 2 cm aber nicht größer als 5cm
	T3		Der Tumor ist größer als 5 cm
	T4		Der Tumor ist beliebig groß und hat sich in das Gewebe in der Umgebung der Brust ausgebreitet.
		T4a	Der Tumor infiltriert die Brustwand
		T4b	Der Tumor infiltriert die Haut.
		T4c	Der Tumor infiltriert die Brustwand und die Haut
	T4d	Es handelt sich um einen entzündlichen Brustkrebs	
Lymphknotenstatus (N)	N1	N1mi	Es wird mikroskopisch Tumor in axillären Lymphknoten nachgewiesen, der größer als 0,2 mm aber nicht größer als 2 mm ist.
		N1a	1-3 axilläre Lymphknoten sind befallen
		N1b	Lymphknoten entlang des Brustbeines
		N1c	N1a + N1b
	N2	N2a	4-9 axilläre Lymphknoten sind befallen
		N2b	Lymphknoten entlang des Brustbeines, die mittels routinemäßig durchgeführter Untersuchungen nachweisbar sind.
	N3	N3a	Mehr als 9 axilläre Lymphknoten oder Lymphknoten unterhalb des Schlüsselbeines sind befallen.
		N3b	Lymphknoten entlang des Brustbeines, die mittels routinemäßig durchgeführter Untersuchungen nachweisbar sind.
	N3c	Lymphknoten oberhalb des Schlüsselbeines sind befallen.	
Metastasierung (M)	M	M0	Keine Fernmetastasen
		M1	Der Tumor hat sich auf andere Organe des Körpers ausgebreitet, meist Knochen, Lunge, Leber oder Gehirn.

1.2 Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptorfamilie

In allen vielzelligen Organismen wird durch ein kompliziertes Kommunikationssystem gewährleistet, dass Wachstum, Differenzierung und Stoffwechsel aufeinander abgestimmt sind. Zur Kommunikation verwenden die Zellen eine große Zahl unterschiedlicher chemischer Verbindungen als Signalmoleküle (Liganden). Lösliche Liganden übertragen durch Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren intrazelluläre Signale, die in entsprechende Genexpression umgesetzt werden.

Zu der Subklasse I der Superfamilie der Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) gehört die Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die sich evolutionsgeschichtlich stetig weiterentwickelt hat. Die Entwicklung ging vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der eine Ligand-Rezeptor-Kombination aufweist (Aroian et al., 1990), über die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit einem Rezeptor und vier Liganden (Wasserman and Freeman,

1997) bis hin zu Vertebraten, die vier Rezeptoren und verschiedene Liganden haben. Diese Rezeptoren sind ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 (HER-3) und ErbB-4 (HER4).

ErbB-Rezeptoren sind in einer Vielzahl von Geweben mit epitheliale, mesenchymalem und neuronalem Ursprung exprimiert, wo sie zentrale Rollen in der Embryonalentwicklung, Proliferation und Differenzierung übernehmen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der cell fate determination von Organen, was Studien an ErbB *knock-out* Mäusen belegen (Burden and Yarden, 1997). Zum Beispiel sterben ErbB-2 null-Mäuse schon in der Mitte der Gestation (E.10.5) aufgrund einer Trabekula-Fehlbildung des Herzens (Lee et al., 1995). Dagegen zeigen ErbB-3 *knock-out* Mäuse zwar normale Herztrabekula, aber eine defekte Herzklappenausbildung. Des Weiteren haben diese Tiere einen Defekt in der Neuralleiste und einen Mangel an Schwannschen Vorläuferzellen (Riethmacher et al., 1994, Erickson et al., 1997). Zusätzlich sind die ErbB-Proteine in der Brustdrüsenentwicklung (Stern, 2003) während der Pubertät und Schwangerschaft involviert und sorgen außerdem für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase.

1.2.1 Struktur der RTK-Moleküle

Die RTK-Moleküle bestehen aus drei stark konservierten Bereichen, einer extrazellulären Cystein-reichen Domäne (Domäne I, II, III & IV, Abbildung 3) mit der Ligandenbindungsstelle, einer einzigen hydrophoben Transmembran- α -Helix und einer cytosolischen Domäne mit der intrinsischen Aktivität der Tyrosin-spezifischen Proteinkinase. Die größten strukturellen Varianzen zwischen den verschiedenen Rezeptoren liegen im aminoterminalen Bereich, der für die Spezifität der Ligandenbindung sorgt. Je nach Affinität der Liganden zu den ErbB-Rezeptoren können die Liganden in drei Gruppen (Abbildung 2) unterteilt werden. (1) EGF, TGF- α und Amphiregulin (AR), die spezifisch an EGFR binden, (2) Betacellulin (BTC), Heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR), die sowohl an EGFR als auch an HER-4 binden und (3) die Neureguline (NRG) die eine hohe Affinität zu HER-3 und HER-4 aufweisen. Zwei Rezeptoren dieser Familie nehmen eine Sonderstellung ein. Zum einen HER-3, das zwar hoch-affin NRG bindet, aber N-terminal keine Tyrosinkinase-Aktivität aufweist (Guy et al., 1994). Allerdings konnten van der Horst et al. pyk2 (FAK2, CAK- β), ein Mitglied der FAK-Familie als Interaktionsprotein identifizieren (van der Horst et al., 2005). Zum anderen HER-2, das keinen Liganden

aufweist. Man geht davon aus, dass HER-2 lediglich die Aufgabe eines Ko-Rezeptors übernimmt (Klapper et al., 1999; Tzahar et al., 1996; Tzahar et al., 1997)

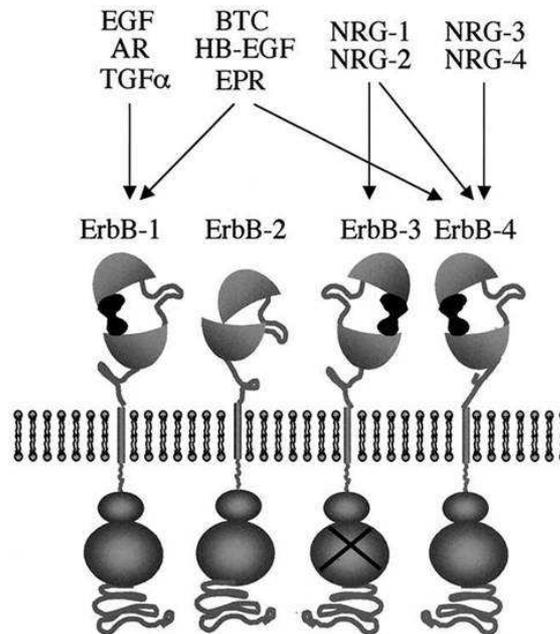


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptoren und ihre jeweiligen Liganden. EGF, Amphiregulin (AR) und TGF- α binden an ErbB-1. Betacellulin (BTC), Heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin binden sowohl an ErbB-1 und ErbB-4. Die Neureguline (Hereguline und Neu differentiation factors) NRG-1/NGR-2 haben eine Affinität zu ErbB-3 und NRG-3/NGR-4 zu ErbB-4. Aus: (Marmor et al., 2004).

Die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen beginnt mit der Bindung des Liganden am Rezeptor. Daraufhin kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoren, was mit einer Homo- oder Heterodimerisierung zweier RTK-Monomere (Abbildung 3) einhergeht. Dies hat zur Folge, dass die auf den Monomeren befindliche Proteinkinase bestimmte Tyrosin-Reste innerhalb der cytosolischen Rezeptordomäne des jeweils anderen Partners im Dimer phosphoryliert (Autophosphorylierung). HER-2 liegt dabei konstitutiv in der „offenen“ Konformation vor und stellt somit den bevorzugten Dimerisierungspartner der anderen Mitglieder der EGFR-Familie dar (Garrett et al., 2003). Durch diese Eigenschaft ist auch die spontane Bildung von HER-2-Homodimeren möglich.

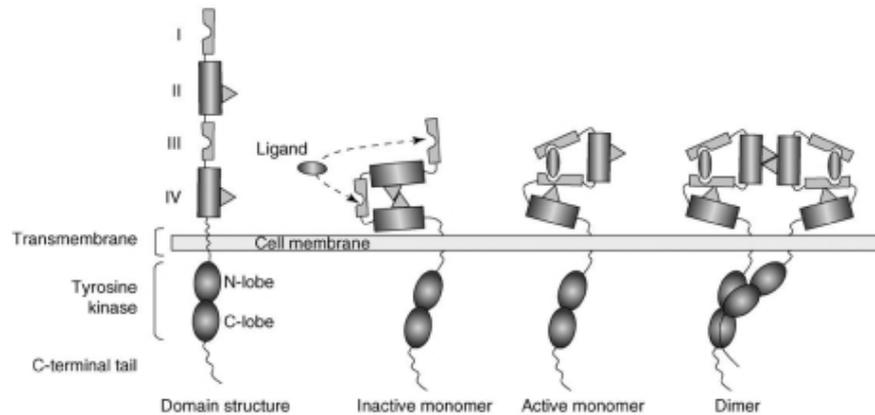


Abbildung 3: Aktivierung der ErbB-Proteine. Die extrazelluläre Region der ErbB-Proteine ist aus vier Domänen (I, II, III & IV) aufgebaut. Bereich I und III sind die Ligand-bindenden Domänen, dagegen binden die Domäne II und IV sich selbst oder andere Rezeptoren. Wenn ein Ligand an der ECD bindet, dann liegt eine geschlossene Konformation der extrazellulären Domäne vor (inactive monomer). Nach Ligand-Bindung an der Domäne I und III kommt es zur räumlichen Annäherung. Dies hat zur Folge, dass eine Konformationsänderung der Domäne II erfolgt („offene Form“, active monomer). Die Domäne II liegt nun als Dimerisationsverbindung vor und die intrazellulären Domänen kommen in räumliche Nähe zueinander. Die Interaktion der Kinasedomänen resultiert in einer Transphosphorylierung (dimer). Aus: (Sergina and Moasser, 2007).

Die Signalstärke und –dauer und die daraus resultierende Aktivierung des Signalweges wird durch die Kombination der Rezeptoren, aber auch durch die der Liganden nachhaltig beeinflusst. Für jedes Rezeptordimer gibt es charakteristische Phosphorylierungsmuster (Abbildung 4).

ErbB-3

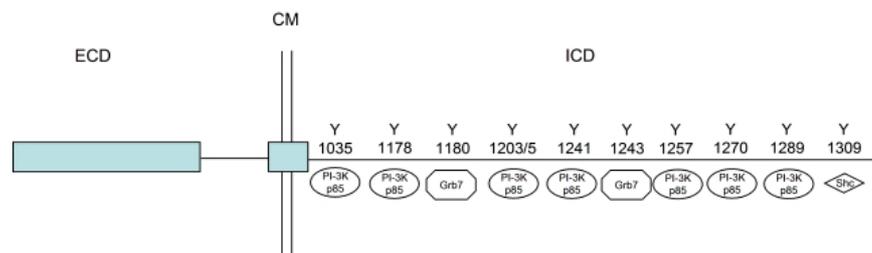


Abbildung 4: Schematische Darstellung der spezifischen Tyrosin (Y)-Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen der Adaptormoleküle an der Rezeptortyrosinkinase ErbB-3. Die einzelnen Adaptormoleküle sind im Text beschrieben. ECD = extrazelluläre Domäne, CM = Cytoplasmamembran, ICD = Intrazelluläre Domäne.

Diese Phosphorylierungsstellen gewährleisten, dass verschiedene Adaptorproteine (Grb2, Gab1, SHC, shc, u.a.) andocken, die wiederum andere Effektorproteine aktivieren. Diese Adaptorproteine weisen besondere Domänen wie z.B. SH2/SH3-(src homology 2/3), PH-

(pleckstrin homology) oder PTB-(phospho-tyrosine binding) Domänen (Schlessinger, 2000) auf. Diese gegenseitige Rekrutierung führt dazu, dass eine Vielzahl von Signalwegen gezielt aktiviert werden können. Die drei am besten untersuchten Signalwege, die durch die ErbB-Familie aktiviert werden, sind die Ras/MAPK,- PI3-K-PKB/AKT-und PLC-PKC-Signalkaskaden

1.2.2 MAPK-Ras Signalweg

Die Aktivierung des MAPK-Ras-Signalweges wird entweder direkt über die Bindung des Adaptorproteins Grb2 aktiviert oder indirekt über das Molekül Shc. Der an Grb2-assoziierte Guanin Nucleotide Exchange Faktor Sos (son of sevenless) aktiviert Ras durch den Austausch von GDP zu GTP. Das nun aktivierte Ras interagiert mit der Serin/Threoninkinase Raf-1 und Raf-1 wird zur Cytoplasmamembran transloziert. Im Anschluss kommt es zur Phosphorylierung von Raf-1 und dessen Aktivierung. Dies hat zur Folge, dass eine Reihe von Kinase-Kaskaden aktiviert werden. Begonnen mit der Serin-Phosphorylierung von MEK1/2 (MAPKK), gefolgt von der Tyrosin/Threonin-Phosphorylierung von Erk1/2 (MAPK). Das aktivierte Erk phosphoryliert verschiedenste cytoplasmatische Proteine und transloziert in den Zellkern, wo es in die Regulation der Genexpression involviert ist.

1.2.3 PI3-K-PKB/AKT-Signalkaskade

Nach erfolgter Aktivierung der RTK kann PI3-K über Adaptorproteine an EGFR und HER-2 indirekt binden. Dagegen weisen HER-3 und HER-4 Bindungsstellen (6 bzw. 1) auf, wo eine direkte Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-K möglich ist (Soltoff and Cantley, 1996). Aktiviertes PI3-K setzt das in der Plasmamembran befindliche Lipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ($PI(3,4,5)P_3$) um. Daraufhin wird die Rekrutierung von multiplen Effektorproteinen veranlasst. Durch die Translokation von $PI(3,4,5)P_3$ zur Membran ergibt sich daraus eine Nähe zu AKT Kinase (Protein Kinase B) ein Schlüsseffektor von PI3-K. Es kommt zur Phosphorylierung von AKT, was wiederum zur Phosphorylierung anderer Proteine führt, die Zellwachstum, Zellzyklus und Zellüberleben beeinflussen.

1.2.4 PLC-PKC-Signalweg

Die Phospholipase C γ (PLC γ) bindet über SH2-Domänen an aktivierte ErbB-1 und/oder ErbB-2-Proteine und wird somit an die Zellmembran transloziert. Nachfolgende PLC γ -Phosphorylierung durch die Rezeptortyrosinkinasen führt zur Aktivierung. Durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4'-5'-biphosphat wird dann der sekundäre Botenstoff (second messenger) Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat generiert. Nach Bindung von Inositol-Triphosphat an Rezeptoren, die sich im endoplasmatischem Retikulum (ER) befinden, wird eine Calcium-(Ca²⁺) Freisetzung verursacht, die die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht. Dieser erhöhte Calcium-Spiegel führt zur Aktivierung von Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen und Phosphatasen (z.B. Pyk2 und Calcineurin). Darüber hinaus aktivieren Calcium und DAG das ubiquitär vorkommende Enzym Proteinkinase C, das zur Phosphorylierung von verschiedensten Substraten führt (Marmor et al., 2004).

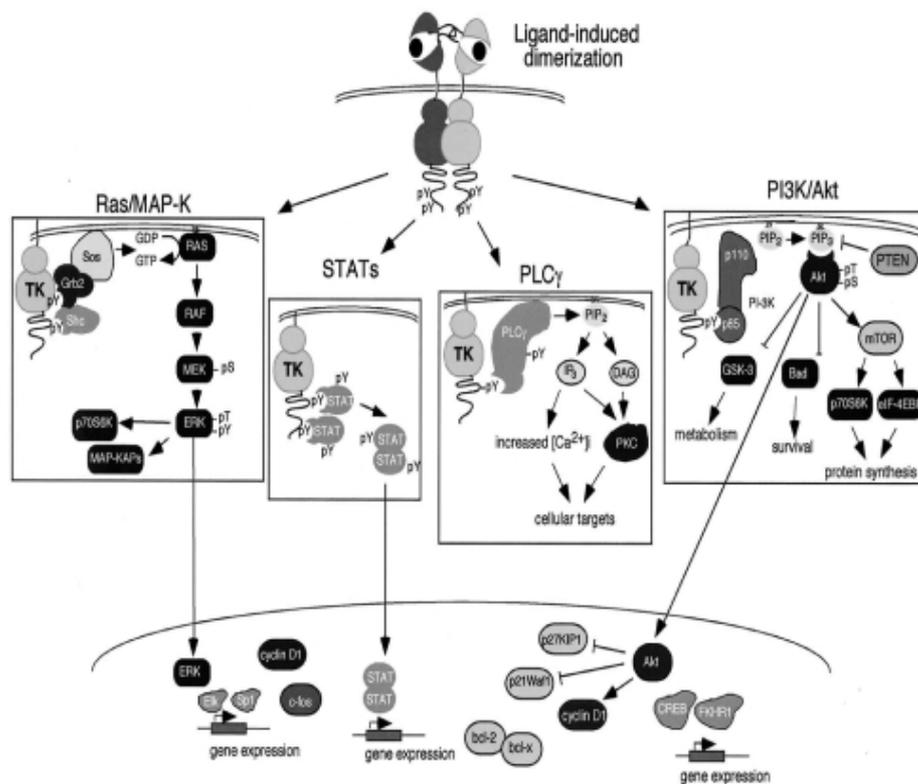


Abbildung 5: ErbB-induzierte Signalwege in der Zelle. Durch Ligandbindung kommt es entweder zur Homo- oder Heterodimerisation der ErbB-Rezeptoren. Dies hat eine Aktivierung der Tyrosinaktivität und Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste (pTyr) C-terminal der ErbB-Proteine zur Folge. Signaleffektoren mit SH2- oder PTB-Domänen werden an die aktivierten Rezeptoren rekrutiert. Dies induziert die Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden wie z. B. der Ras/MAPK, PI3K-AKT, PLC-PKC und STAT-Signalweg. Diese Signalkaskaden haben Einfluss auf die zelluläre Proliferation, Migration und das Zellüberleben. Aus: (Marmor et al., 2004).

Dieses oben beschriebene vielschichtige ErbB-Netzwerk schafft durch die kombinatorische Interaktion von Liganden, Rezeptoren, Effektoren und Transkriptionsfaktoren einen hohen Grad an Adaptabilität und Signaldiversifikation und gewährleistet durch verschiedenste regulatorische Stufen eine Kontrolle der biologischen Antwort.

1.3 Die Bedeutung der ErbB-Rezeptoren für Tumorentstehung und –entwicklung

In den frühen 80er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde das Onkogen v-erbB entdeckt, das aus dem EGF-Rezeptorgen hervorgeht. Es zeigte sich, dass dieses Onkogen von dem tumorinduzierenden Gen des AEV (avian erythroblastosis virus) abstammt und die kodierte Information für einen strukturell veränderten und dadurch unkontrollierte Signale sendenden EGF-Rezeptor enthielt. Die ständigen Signalimpulse des Onkogens führten zur Störung der Homöostase und dadurch zur karzinogenen Degeneration der Zelle. Mit dieser Entdeckung konnte ein Zusammenhang zwischen einem normalen wachstumsregulierenden Rezeptor und einem tumorinduzierenden Onkogen hergestellt werden. Einige Jahre später wurde ErbB-2 als Karzinogen-induzierendes Onkogen (Neu) mit einer Punktmutation in der transmembranen Domäne aus Ratten-Glioblastomen isoliert. Diese Mutation führt dazu, dass es zu einer Ligand-unabhängigen Homodimerisation und in der Folge zur konstitutiven Aktivierung kommt (Bargmann et al., 1986). Seitdem wurden immer mehr Studien publiziert, die zeigen, dass die ErbB-Familie in der Tumorentwicklung und –progression entweder durch Rezeptor-Überexpression, Genamplifikation oder Mutationen involviert ist.

Zum Beispiel wurde in verschiedensten humanen malignen Tumoren (Brustkrebs, Kopf- und Halskrebs und Lungenkrebs, Tabelle 2) eine Deregulation von EGFR gefunden. Mit einer besonders hohen Inzidenz von ErbB-1-Überexpression bei Glioma-Tumoren (Rasheed et al., 1999). Bei ErbB-2 wurde entdeckt, dass es von ca. 20 %-30 % aller Brust- und Ovarialkarzinome überexprimiert wird und dass die Überexpression mit einer Tumorchemoresistenz und einer schlechten Patientenprognose korreliert (Abd El-Rehim et al., 2004; Marmor et al., 2004; Witton et al., 2003). Für HER-3 (Tabelle 2) wurde berichtet, dass es zur Überexpression in Darm-, Blasen-, Prostata- und Brustkrebs kommt (Junttila et al., 2003; Lemoine et al., 1992b; Lemoine et al., 1992a; Roskoski, Jr., 2004; Wiseman et al., 2005; Witton et al., 2003). Die meisten Tumore (Brust, Blasen, Haut), die eine Überexpression von HER-3 aufwiesen, zeigten auch eine erhöhte Expression von HER-2

(Bodey et al., 1997; Maurer et al., 1998; Rajkumar et al., 1996; Siegel et al., 1999). Dies konnte auch in Zellkulturexperimenten belegt werden, wo die Expression HER-3 die HER-2-bedingte Transformation und das tumorogene Wachstum in NIH3T3-Zellen fördert (Alimandi et al., 1995; Cohen et al., 1996a; Cohen et al., 1996b; Rajkumar et al., 1996; Wallasch et al., 1995). Die verstärkten transformierenden Eigenschaften von Zellen, die multiple ErbB-Rezeptoren exprimieren, sind höchstwahrscheinlich auf die Signaldiversität und –potenz der verschiedenen Kombinationen zurückzuführen. Von allen möglichen Kombinationen der ErbB-Familienmitgliedern stellt das Paar HER-2/HER-3 das Mitogen-potenteste dar (Abbildung 6) (Pinkas-Kramarski et al., 1996).

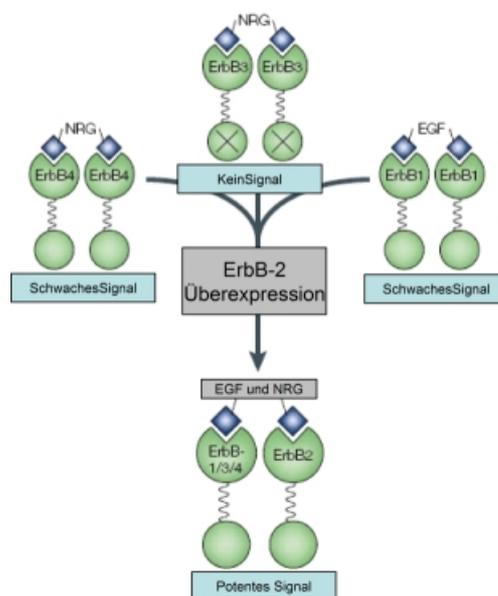


Abbildung 6: Signaltransduktion durch ErbB-Homodimere im Vergleich zu ErbB-2-Heterodimeren. Darstellung der möglichen Kombinationen der ErbB-Rezeptoren. Homodimere bestehend aus ErbB-1 und ErbB-4 vermitteln nur schwache Signale. ErbB-3-Homodimere zeigen keine Signalausendung. Kommt es allerdings zur ErbB-2-Überexpression, dann gehen vorrangig die ErbB-Monomere eine Dimerisierung mit ErbB-2 ein. Daraus folgt eine verstärkte und langanhaltende „downstream“-Signalkaskade. Aus: (Yarden and Sliwkowski, 2001)

Tabelle 2: Ausgewählte Literaturbeispiele von Mitgliedern der ErbB-Familie für Tumorentstehung und -entwicklung

Rezeptor-molekül	Art der Deregulation	Krebsart	Anmerkung	Referenz
ErbB-1	Überexpression	Hals und Kopf, Brust, Blasen, Prostata, Nieren, Lunge	Signifikanter Indikator für in operablen Brustkrebs, assoziiert mit kürzerer krankheitsfreier Zeit und dem Gesamtüberleben. Könnte als prognostischer Faktor in Blasen-, Prostata- und Lungenkrebs fungieren.	(Alimandi et al., 1995; Gorgoulis et al., 1992; Irish and Bernstein, 1993)
	Überexpression	Glioma	Amplifikation in 40 % der Glioma-Tumore. Die Überexpression korreliert mit höherem Grading und verkürzter Überlebenszeit.	(Wong et al., 1992)
	Mutation	Glioma, Lungen-, Ovarial- und Brustkrebs	Deletion in Bereichen der extrazellulären Domäne führt zu konstitutiv aktiven Rezeptoren	(Moscatello et al., 1995)
ErbB-2	Überexpression	Brust-, Lungen-, Pankreas-, Darm-, Speiseröhre, Endometrium und Zervixkrebs	Überexpression (15-30 %) in invasivem duktalem Brustkrebs durch Genamplifikation. Die Überexpression korreliert mit Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Grading, hohen Anteil an in S-Phase befindliche Zellen, Aneuploidi und Mangel an Steroidhormon-Rezeptoren.	(Ross and Fletcher, 1998)
ErbB-3	Expression	Brust-, Darm-, Ovarial- und Prostatakrebs	ErbB-3-Ko-Expression mit ErbB-1 oder ErbB-2 in Brustkrebs	(Lyne et al., 1997; Tanner et al., 2006; Xia et al., 1999)
	Überexpression	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	Überexpression korreliert mit der Beteiligung der Lymphknoten und dem Patientenüberleben	(Shintani et al., 1995)
ErbB-4	Reduzierte Expression	Brust und Prostata-Krebs	Korrelation mit differenziertem Phänotyp	(Kew et al., 2000)
	Expression	Medulloblastoma	Ko-Expression mit ErbB-2 hat einen prognostischen Wert	(Gilbertson et al., 1997)

1.4 Nukleocytoplasmatischer Proteintransport

Ein Merkmal in dem sich die eukaryotische Zelle von der prokaryotischen Zelle unterscheidet ist die Ausbildung von Kompartimenten innerhalb der Zelle, z.B. des Nukleus und des Mitochondriums. Jedes Kompartiment hat spezifische Aufgaben. Alle Vorgänge, die in der Zelle ablaufen, müssen gut koordiniert werden. Tausende von Makromolekülen müssen zwischen den einzelnen Organellen korrekt hin und her transportiert werden, um am

Bestimmungsort zu funktionieren. Der Nukleus, der die genetische Information enthält, antwortet auf Signale, die vom Cytoplasma oder der Cytoplasmamembran kommen. Diese werden durch entsprechende Genexpression umgesetzt und die daraus resultierende Instruktion wird dann an die ganze Zelle weitergeleitet. Der Transport zwischen Cytoplasma und Nukleus erfolgt über lösliche Rezeptoren, die spezifische Cargos durch den nukleären Porenkomplex (nuclear pore complex, NPC), welcher in der doppelschichtigen Kernmembran lokalisiert ist, transportieren. Kleine Moleküle (< 40-60 kDa) können diese Poren durch passive Diffusion durchqueren, während große Makromoleküle in den meisten Fällen durch die NPCs mittels eines Energie-abhängigen Mechanismus transportiert werden müssen (Gorlich and Mattaj, 1996; Richardson et al., 1988). Voraussetzung für einen Protein-Import sind spezifische Aminosäuresequenzen, die NLS (nuclear localization signal, NLS) in der Primärstruktur des Proteins. Diese werden von den Carrier-Proteinen (Karyopherine) erkannt. Nach Bildung eines Komplexes aus Cargo-Protein, Importin- β (Karyopherine) und Importin- α (Karyopherine) (Abbildung 7) dockt dieser an das NPC (auch Nukleopore genannt) an und vermittelt so die Translokation in den Zellkern. Die meisten β -Importine binden jedoch direkt an das zu transportierende Proteine unter Ausschluss von Importin- α (Fried and Kutay, 2003; Weis, 2003). Nach der Translokation erfolgt eine Dissoziation des Komplexes nach Bindung von nukleärem RanGTP und das Cargo-Protein wird freigegeben. Darauf bindet Importin- β Ran an die N-terminale Domäne und wird wieder zusammen in das Cytoplasma zurück transportiert. Durch GTP-Hydrolyse von Ran erfolgt im Cytoplasma ein Recycling. Der Export (Abbildung 7) von Proteinen erfolgt ebenfalls über die so genannten Exportine, die spezifische NES (nuclear export signal, NES) erkennen. Auch in diesem Fall bindet das Protein an ein Karyopherin und wird mit RanGTP vom Zellkern in das Cytoplasma transportiert. Durch Konversion von RanGTP zu RanGDP kommt es zur Freisetzung des Proteins. Der Aktivitätszustand von Ran wird zum einen durch RanGAP (Ran GTPase-activating protein) und durch dessen Kofaktor RanBp (Ran-binding protein) reguliert

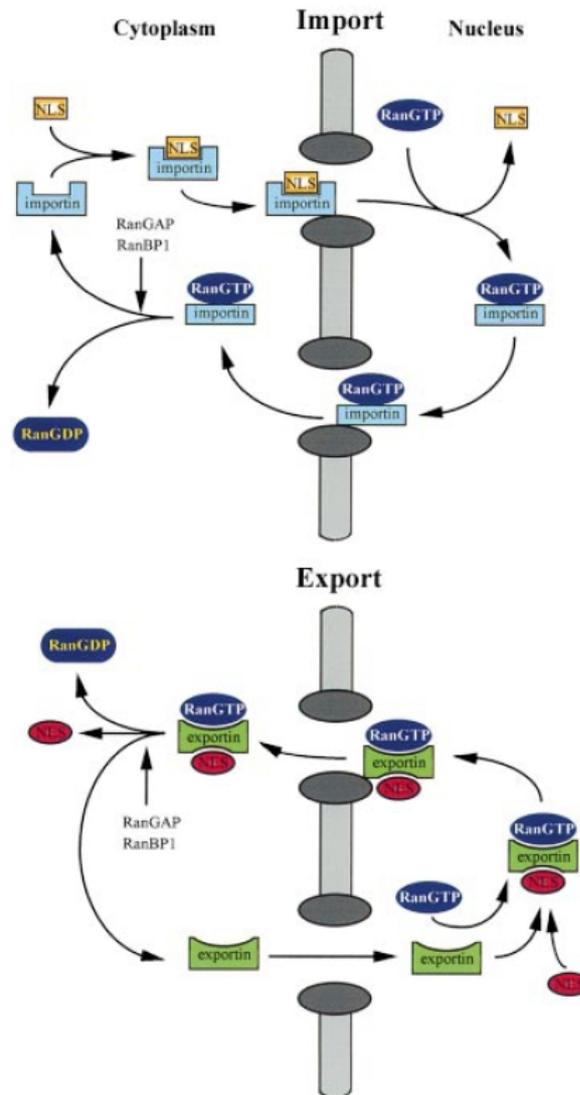


Abbildung 7: Schematische Darstellung für den nukleären Import und Export von Proteinen. Die Cargo Proteine werden durch Importine oder Exportine in oder aus dem Zellkern transportiert. Ran koordiniert den Transport der Proteine. NLS: Nukleäre Lokalisationssignal, NES: Nukleäres Exportsignal. Aus: (Yoneda, 2000)

1.5 Zellmembranständige Rezeptoren im Zellkern

In den letzten Jahren ist immer wieder das Phänomen aufgetreten, dass transmembrane Rezeptoren der Zellmembran von ihrem eigentlichen Funktionsort abweichen. Normalerweise agieren sie von der Zellmembran aus nach Ligand-Aktivierung durch die Entsendung von Botenstoffen, die nach vielen ablaufenden Signalkaskaden letztendlich die Genexpression im Zellkern i.d.R. durch Transkriptionsfaktoren modulieren. Trotz dieser gut untersuchten Funktion der Rezeptoren an der Zellmembran wurden wiederholt intakte (full length) und gespaltene transmembrane Rezeptoren im Zellkern detektiert. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass diese Rezeptoren oder Rezeptorfragmente direkt die Gentranskription

beeinflussen (Giri et al., 2005; Lin et al., 2001). Bereits gut beschriebene Beispiele sind ErbB-1 (Hanada et al., 2006), ErbB-2 (Giri et al., 2005), ErbB-3 (Bueter et al., 2006; Offterdinger et al., 2002; Raabe et al., 2004), FGFR-1 (Reilly and Maher, 2001), Prolactin-Rezeptor und IFN γ Rezeptoruntereinheit IFN γ R1. Dennoch bleiben der Mechanismus und die genaue Funktion ungeklärt.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Überexpression von Proteintyrosinkinasen ist mit zahlreichen Tumorerkrankungen assoziiert (Levitzki et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit sollte daher die prognostische Relevanz der HER-Familienmitglieder HER-2 und HER-3 und deren phosphorylierte Formen in einem Ovarial – und Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv untersucht werden. Neben der Expressionsstärke spielt auch die subzelluläre Lokalisation von RTK eine entscheidende Rolle. Daher sollte die subzelluläre Lokalisation in den Tumorproben untersucht werden. Weiterhin sollten Einflussgrößen und Mechanismen identifiziert werden, welche Änderungen der subzellulären Lokalisation von HER-3 zur Folge haben.

2 Material

2.1 Zelllinien

MCF-7 (Soule et al., 1973)

Die MCF-7-Zelllinie ist ein humanes Mammakarzinom, das aus einer pleuralen Effusion einer 69-Jahre alten kaukasischen Frau isoliert wurde. Diese adhärent wachsende Zelllinie ist Estrogenrezeptor-negativ und weist ein epitheliales Wachstum auf.

MCF-7/NeuT (Trost et al., 2005)

Diese humane Mammakarzinom-Zelllinie enthält zum einen das Expressionsplasmid pcDNA3Neo/rtTa und zum anderen den bidirektionalen Vektor pINSpBI-EGFP/NeuT. Dadurch kann ErbB2/NeuT konditional-reversibel über das Tet-on-System überexprimiert werden.

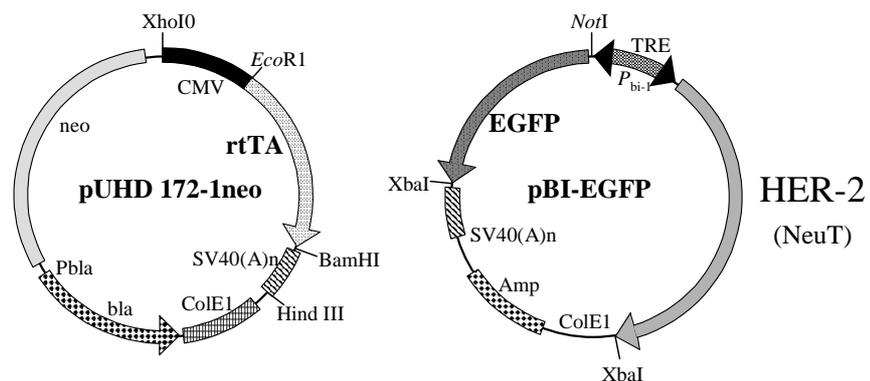


Abbildung 8: MCF-7/NeuT-Zellen Transfektionskonstrukte. Aus: (Trost et al., 2005)

HeLa (Scherer et al., 1953)

HeLa Zellen sind humanen Ursprungs und wurden aus Epithelzellen des Zervix-Karzinoms (Gebärmutterhalskrebs) 1951 isoliert.

NIH3T3-her-2 (Di Fiore et al., 1987)

Die immortalisierten NIH3T3-Zellen stammen aus embryonalen Mausfibroblasten. Die verwendeten NIH3T3-Zellen wurden sowohl als Wildtyp als auch gentechnisch veränderte Monolayer-Zellen kultiviert. Die gentechnisch veränderten Zellen (NIH3T3-her-2) exprimieren konditional HER-2. Die verwendeten Vektoren wurden in Abbildung 9

dargestellt. Die Funktionalität der Zelllinie wurde unter Schiffer et al. (Schiffer et al., 2003) beschrieben.

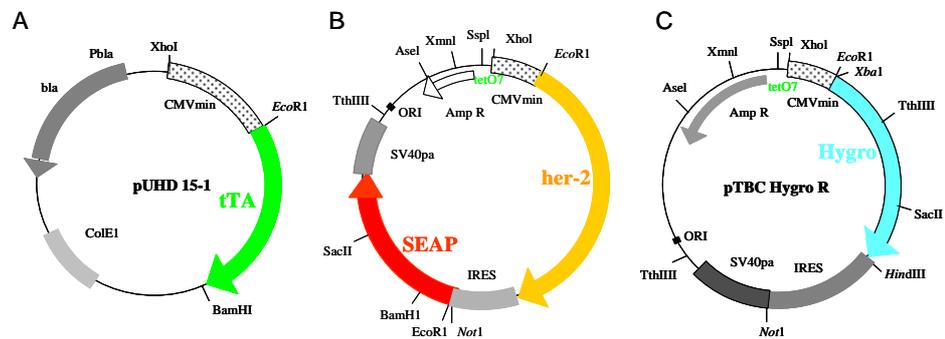


Abbildung 9: NIH3T3-Zellen Expressionskonstrukte: Plasmid für die Expression des Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (A). Expressionskonstrukt pTBC *her-2*/SEAP für das humane HER-2 (B). pTBC HygroR-Vektor für die Expression der Hygromycin-B Phosphotransferase (C) Durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin-Hydrochlorid (ATC, 10 mg/ml) kann die Expression von humanem HER-2 induziert. Aus: (Heimerding et al., 2005)

2.2 Antikörper

2.2.1 Primärantikörper

anti-HER3, aus Kaninchen	Santa Cruz
anti-Phospho-HER-3, aus Kaninchen	Cell Signaling
anti-HER2/Neu, aus Kaninchen	Santa Cruz
anti-alpha-Tubulin, aus Kaninchen	Cell Signaling
anti-Lamin A/C, aus Maus	BD Biosciences
anti-p85, aus Kaninchen	Cell Signaling
anti-Phospho-HER-2, aus Maus	Dako
anti-Phospho-MAPK (p42/p44), aus Kaninchen	Cell Signaling
anti-MAPK (p42/p44), aus Kaninchen	Cell Signaling
anti- β -Actin, aus Maus	Sigma, Steinheim

2.2.2 Sekundärantikörper

anti-Maus-HRP, aus Ziege
 anti-Kaninchen-HRP, aus Ziege
 anti-Kaninchen-Cy3, aus Esel

Sigma, Steinheim
 Cell Signaling
 ImmunoJacksonResearch

2.2.3 Längenstandards für SDS-PAGE/Immunoblot

Als Proteinstandard für die SDS-PAGE und den Immunoblot dienen der MagicMark-Standard bzw. der Prestained-Standard (Abbildung 10).

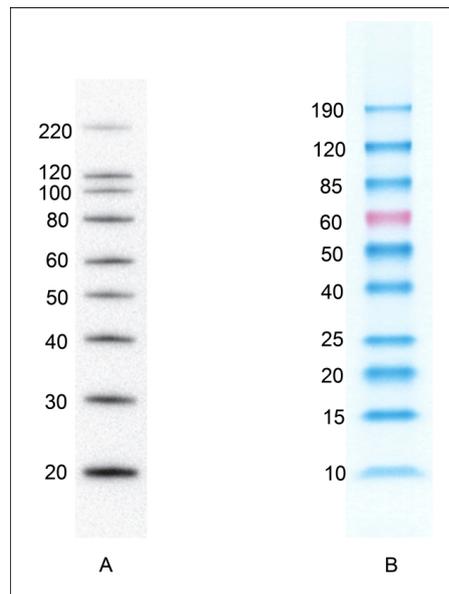


Abbildung 10: Längenstandards. A Magic Mark (Invitrogen), B Prestained BenchMark (Invitrogen)

2.2.4 Nährmedien für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Tabelle 3: Zusammensetzung der einzelnen Medien zur Kultivierung der eukaryotischen Zellen.

Zelllinie	Medium	FCS	Antibiotika	Weitere Zusätze
MCF-7	DMEM High Glucose	10 %	Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml Gentamycin 50 µg/ml	Non-essentielle As Insulin 10 µg/ml Na-Pyruvat 1 mM
MCF-7/NeuT	DMEM High Glucose	10 % Tetrazyklin- frei	Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml	-
HeLa	DMEM High Glucose	10 %	Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml Gentamycin 50 µg/ml	-
NIH3T3	DMEM High Glucose	10 % Tetrazyklin- frei	Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml Hygromycin 200 µg/ml	-

2.2.4.1 *Hitze-Inaktivierung von Fötalem Kälberserum (FCS)*

Dem Kulturmedium wurde stets hitzeinaktiviertes Fötale Kälberserum zugesetzt. Durch die Hitzebehandlung (56 °C, 30 min) wird das Komplementsystem des Serums inaktiviert, dass die Zellen beeinflussen kann. Nach der Inaktivierung wurde das FCS bei -20 °C gelagert.

2.3 *Chemikalien*

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Regel ohne weitere Reinigung eingesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien als p.A. verwendet. Hochgereinigtes Wasser (Dest.-Qualität) wurde mit Hilfe des Reinwassersystems Maxima Ultra-Pure der Firma ELGA gewonnen. Das verwendete CO₂-Gas wurde von der Firma Messer-Griesheim bezogen.

Acrylamid-Lösung (30 %)	C. Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim
Anodenpuffer 10x	C. Roth, Karlsruhe
BSA (für IHC)	Serva, Heidelberg
BSA (für WB)	C. Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	C. Roth, Karlsruhe
Dulbecco`s Eagle Medium	Pan Biotech, Nürnberg
Chloroform	C. Roth, Karlsruhe
Coomassie-Blau R250	C. Roth, Karlsruhe
CaCl ₂	C. Roth, Karlsruhe
Cisplatin (Cis-Gry)	Gry-GmbH, Kirchzarten
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Invitrogen, Karlsruhe
2`-Deoxy D-glucose	Sigma, Steinheim
DMSO	C. Roth, Karlsruhe
DTT-1,4-Dithiothreit	C. Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
EGTA	C. Roth, Karlsruhe
EDTA	C. Roth, Karlsruhe
Ethanol	Th.Geyer, Hamburg
Ethanol, vergällt	C. Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Pan Biotech, Nürnberg

Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	C. Roth, Karlsruhe
Glycin	C. Roth, Karlsruhe
D-Glucose	C. Roth, Karlsruhe
HCl	C. Roth, Karlsruhe
HEPES	C. Roth, Karlsruhe
Heregulin (β_1 -HRG)	Natutec, Frankfurt
Hygromycin B	Sigma, Steinheim
Insulin	Pan Biotech, Nürnberg
Kathodenpuffer 10x	C. Roth, Karlsruhe
KCl	C. Roth, Karlsruhe
KH_2PO_4	C. Roth, Karlsruhe
Konzentrat A und K (Puffer für IB)	C. Roth, Karlsruhe
Leptomycin B	Sigma, Steinheim
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
β -Mercaptoethanol	C. Roth, Karlsruhe
Methanol	Th.Geyer, Hamburg
MgCl_2	Merck, Darmstadt
Marker MagicMark	Invitrogen, Karlsruhe
Marker BenchMark	Invitrogen, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Fluka
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Sigma, Steinheim
NaCl	C. Roth, Karlsruhe
NaF	C. Roth, Karlsruhe
Natronlauge	C. Roth, Karlsruhe
Na_3VO_4	Sigma, Steinheim
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	C. Roth, Karlsruhe
NP-40	Roche
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	Pan Biotech
PMSF	C. Roth, Karlsruhe
Ponceau S	C. Roth, Karlsruhe
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma, Steinheim

Protein A-Sepharose	Amersham
Oligomycin B	Sigma, Steinheim
Rotihistol	C. Roth, Karlsruhe
Salzsäure	C. Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sucrose	C. Roth, Karlsruhe
TEMED	C. Roth, Karlsruhe
Tris	C. Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim
Triton X-100	C. Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	C. Roth, Karlsruhe
WB Stripping Buffer	Pierce, Rochford, IL, USA
Western Lightning ECL	Perkin Elmer, USA

2.4 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	
<u>Anodenpuffer</u>	Konzentrat A	10%
	Methanol	20%
<u>Ak-Verdünnungslösung (IHC)</u>	BSA	0,3 %
	PBS	1 x
	Tween 20	0,1 %
<u>Blocking-Lösung (IHC)</u>	BSA	3 %
	PBS	1 x
	Tween 20	0,1%
<u>Blocking-Puffer (IB)</u>	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	TBS	1 x
	Tween 20	0,1 %

<u>Citrat-Puffer pH 6,0</u>	Citronensäure-H ₂ O	0,21 %
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	Coomassie R-250	0,5 %
	Methanol	50 %
	Essigsäure	7 %
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u>	Methanol	20 %
	Essigsäure	7%
<u>IP-Buffer</u>	Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	Triton x-100	0,1%
<u>Mayers Hämalaun</u>	Mayers Hämalaun	20 % in H ₂ O _{dest.}
<u>Mowiol</u>	Mowiol 4-88	2,4 g
	Glycerol	6 g
	H ₂ O _{dest}	6 ml
	0,2 M Tris/HCl, pH 7,4	12 ml
	Die Lösung wurde 4 Stunden bei RT auf dem Magnetrührer gerührt, danach weitere 2 Stunden ohne zu rühren quellen gelassen. In einem 50°C warmen Wasserbad für 10 min inkubiert und im Anschluss 15 min bei 2.800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.	
<u>Paraformaldehyd für Fixierung von kultivierten Zellen</u>	4 g Paraformaldehyd in 20 ml H ₂ O _{bidest} bei 60°C lösen und mit 1 N NaOH zur Klärung bringen. Nach Abkühlen der Lösung wurden 50 ml Sörensen-Puffer hinzu gegeben und ad 100 ml H ₂ O _{bidest} aufgefüllt	
<u>B-Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,5	25 mM
	EDTA	2 mM
	EGTA	0,5 mM
	β-Mercaptoethanol	0,4 mM

<u>NB-Puffer</u>	Tris-HCl pH 7.5	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	0,5 mM
	Triton X-100	0,1 %
<u>Kathodenpuffer</u>	Konzentrat K	10 %
	Methanol	20 %
<u>10 x PBS, pH 7,4</u>	NaCl	8 %
	KCl	0,2 %
	Na ₂ HPO ₄	0,9 %
	KH ₂ PO ₄	0,2 %
<u>Ponceau-Lösung</u>	Trichloressigsäure	3 % (w/v)
	Ponceau S	0,1 % (w/v)
<u>2 x RIPA</u>	NaCl	150 mM
	Tris/HCl pH 7,4	50 mM
	NP-40	1 %
	Natriumdeoxycholat	1 %
	EDTA, pH 7,4	1 mM
	SDS	0,1 %
<u>0,2 M Sörensen-Puffer pH 7,4</u>	Lsg. A Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (40,5 ml Lsg. A)	35,61g/L
	Lsg. B, NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O (9,5 ml Lsg. B)	31,21g/L
<u>Sammelgel-Puffer</u>	Tris/HCl pH 6,8	0,625 M

<u>Sucrose-NB-Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	0,5 mM
	Triton X-100	0,1%
	Sucrose	45% (w/v)
<u>Sucrose-MgCl₂-NB-Puffer</u>	Tris/HCl pH 7,5	10 mM
	NaCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	EGTA	0,5 mM
	Triton X-100	0,1%
	MgCl ₂	1 mM
	Sucrose	10% (w/v)
<u>20 x SSC-Puffer, pH 7,0</u>	NaCl	3M
	Natrium-Citrat	0,3M
<u>10 x TBS, pH 7,4</u>	Tris	1,2 %
	NaCl	5,3 %
<u>Trenngel-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,8	1,88 M
<u>Tris-HCl Epitope-Retrieval-Puffer, pH 9,0</u>	Tris	0,6 %
	NaCl	0,8 %
	Tween 20	0,05 %
<u>Waschpuffer (Immunoblot)</u>	TBS	1 x
	Tween 20	0,1 %

2.4.1 Kommerzielle Kit-Systeme

BCA-Bestimmungs-kit	Pierce
Vectastain Elite ABC-Kit (anti-Kaninchen, aus Ziege)	Vectorlabs
Vectastain Elite ABC-Kit (anti-Maus, aus Pferd)	Vectorlabs
Avidin-Biotin-Blocking	Vectorlabs
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	Promega
Reagenzien für die ATP-Bestimmung:	DCS, Hamburg
Luziferin-Luziferase-Reagenz (E.C.1.13.12.7)	
Tumor Cell Extraction Reagent	
ATP-Standard 250 ng/ml	
Rekonstitutionspuffer	

2.5 Verbrauchsmaterialien

PVDF-Membran	Perkin-Elmer
Whatmanpapier 3MM	Schleicher & Schuell
25 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner
75 cm ² Zellkulturflaschen	Greiner
24-well Kulturplatten	Corning
Einmal-Küvetten	Brand
SuperFrost-Plus Objektträger	Menzel
Runde Deckgläser Stärke 1, Ø 14 mm	Menzel
Zellschaber	Sarstedt

2.6 Geräte

Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus, Hanau
Homogenisator „Dounce“, 2 ml	Gebrüder Buddeberg
Multigel-Long	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Schott
Spektralphotometer	Jasco
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Konfokales Laserscanmikroskop FV1000	Olympus
Fastblot B44	Biometra, Göttingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Schlittenmikrotom	Microm, Walldorf
Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Rotina 35R	Heraeus, Hanau

3 Methoden

3.1 Zellkulturtechniken

3.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank (Heraeus) durchgeführt. Zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurden beschichtete Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen (Greiner) eingesetzt. DMEM wurde vor Gebrauch mit FCS (10 % (v/v)) und Penicillin-Streptomycin-Lösung (1 % (v/v)) supplementiert und bei 4°C aufbewahrt. Wenn nicht anders erwähnt, wird im Folgenden bei der Angabe ‚DMEM‘ stets vom supplementierten Medium (Vollmedium) ausgegangen. Bei dem Hungermedium handelt es sich um Medium ohne fötales Kälberserum.

Die adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Zellkulturflaschen (75 cm², Greiner) kultiviert. Für das Umsetzen und Waschen der Zellen wurden alle Lösungen auf 37°C temperiert.

3.1.1.1 Subkultivierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden im 2 - 3 Tage-Rhythmus passagiert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand entfernt und die Zellen mit 10 ml sterilem 1 x PBS gewaschen. Nach Zugabe von ca. 2 ml Trypsin/EDTA und kurzer Einwirkphase wurde die Lösung wieder entfernt. Im Anschluss wurden die abtrypsinisierten Zellen durch Zugabe von Vollmedium und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspensiert, so dass eine Einzelzell-Suspension entsteht. Je nach Zelldichte wurden die Zellen 1/5 oder 1/10 in 12 ml Medium subkultiviert.

3.1.1.2 Mykoplasmen-Test

Die verwendeten Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen mittels PCR getestet.

3.1.1.3 Zellzahlbestimmung

Vor jedem Zellkulturexperiment wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und unter dem

Mikroskop innerhalb von 4 Groß-Quadraten die durchschnittliche Anzahl an Zellen bestimmt. Dieser Wert wurde mit dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro ml ergibt.

3.2 Gewebe für die *in situ* Expressionsanalyse

3.2.1 Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientinnenkollektivs

3.2.1.1 Mammakarzinom

Die Datenerhebung dieser Arbeit stammt von 201 Patientinnen, die im Zeitraum von 1986 bis 2005 in der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Abteilung Obstetrik und Gynäkologie) wegen eines histologisch gesicherten nodal-negativem Mammakarzinoms mit Tumorgrößen pT1_a-T3 behandelt wurden. Die Gewebeproben wurden durch eine Tumorresektion gewonnen, zum Zeitpunkt des Eingriffs erhielten die Patientinnen keine systemische adjuvante Therapie. Die Patientinnen wurden entweder einer modifizierten radikalen Mastektomie (44 %) unterzogen oder es wurde eine brusterhaltende Operation mit anschließender Bestrahlung (56 %) durchgeführt. In dieser Studie lag der Schwerpunkt auf Nodal-negativen Tumoren mit dem Status pT1-3 ohne Fernmetastasen (M0). Das durchschnittliche Alter der Patientinnen bei der Diagnose lag bei 58,8 Jahre (max. 91 Jahre, min. 33 Jahre). Das Follow-up wurde durch Brief- oder Telefonkontakt zu den Patientinnen, und durch das Durchsehen der Patientinnenakte mindestens einmal im Jahr zwischen der Operation und dem letzten Follow-up im Oktober 2007 erfasst. In dieser Periode wurde die Krankheit in aufgeführten Daten und klinischen Parameter erfasst (Tabelle 4). Des weiteren wurde dokumentiert, ob die Patientinnen am Krebs verstarben oder ob andere Ursachen zum Tod führten. Traf dies zu, wurde das Todesdatum als Ereignis für die Überlebensanalysen gewertet, falls der Todesfall im kausalen Zusammenhang mit der Tumorerkrankung stand. Zusätzlich wurde vermerkt, ob es zu einem Rezidiv und/oder einer Metastase kam oder ob ein Zweitkarzinom auftrat. Das histologische Grading wurde nach Elston und Ellis (Ellis et al., 1992) durch zwei routinierte Gynäkopathologen beurteilt. Die in dieser Arbeit vorliegende Studie entsprach den Richtlinien des ethischen Ausschusses der medizinischen Vereinigung von Rheinland-Pfalz.

Tabelle 4: Klinisch-pathologische Charakteristika von Patientinnen mit nodal-negativen Mammakarzinom (n = 201)

		n	%
Alter bei Diagnose	< 55	58	28,8
	≥ 55 Jahre	143	71,2
Tumorstadium	pT1	116	57,7
	pT2	82	40,7
	pT3	3	1,5
Histologisches Grading	Grad I	43	21,4
	Grad II	109	54,2
	Grad III	49	24,4
Östrogenrezeptor	Positiv	157	78,1
	Negativ	44	21,9
Progesteronrezeptor	Positiv	119	59,3
	Negativ	82	40,7
HER-2-Status	Positiv	26	12,9
	Negativ	175	87,1
pHER-2-Status	Positiv	37	18,4
	Negativ	164	81,1
HER-3-Status	Positiv	177	88,1
	Negativ	24	11,9
pHER-3-Status	Positiv	147	73,6
	Negativ	54	26,4

3.2.1.2 Ovarialkarzinom

Das Ovarialtumorgewebe von 116 Patientinnen wurde im Zeitraum von 1986 bis 1995 an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (Abteilung Gynäkologie) operativ gewonnen. Die Patientinnen wurden einer abdominalen Hysterektomie, einer bilateralen Salpingo-Oophorektomie und einer Omentektomie unterzogen. Alle Patientinnen die der FIGO-Stadien Ib, Ic, II, III und IV zugeordnet wurden, erhielten eine postoperative Chemotherapie mit sechs Administrationen von Carboplatin (350 mg/m²) oder Cisplatin (50 mg/m²) und Cyclophosphamid (1.000 mg/m²). Die Beurteilung der histologischen Typen erfolgte nach WHO-Kriterien. Die epithelialen Tumore wurden in serösen vs nicht serösen Karzinomtyp eingeteilt. Der Malignitätsgrad wurde dem entsprechenden histologischen Grad zugeordnet. Folgende Kriterien wurden diesbezüglich berücksichtigt: Tumorarchitektur, Anteil an solidem Tumor, Zellkernpleomorphismen, Nukleus-Cytoplasma-Verhältnis, Anzahl der

Kernkörperchen und Mitosen. Das Tumorstadium wurde nach den FIGO-Richtlinien eingeteilt. Aufgrund prognostischer Relevanz des Resttumors wurde zwischen Patientinnen unterschieden, bei denen makroskopisch eine vollständige Entfernung des Tumors vollzogen wurde und Patientinnen, die einen Resttumor (Durchmesser ≤ 2 cm und > 2 cm) nach der Operation aufwiesen.

Tabelle 5: Klinisch-pathologische Charakteristika von der Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom (n = 116).

		n	%
Alter bei Operation	< 55	24	20,7
	≥ 55 Jahre	92	79,3
FIGO-Stadium	Stage I	22	19,0
	Stage II	7	6,0
	Stage III	68	58,6
	Stage IV	19	16,0
Histologisches Grading	Grad I	15	12,9
	Grad II	51	44,0
	Grad III	50	43,1
Resttumor	Kein Resttumor	44	38,3
	Resttumor < 2 cm	35	30,4
	Resttumor > 2 cm	36	31,3
Histologischer Typ	Serös	73	18,4
	Nicht-serös	43	81,1
HER-3-Status	Positiv	62	53,4
	Negativ	54	46,6

3.2.2 Beurteilung und Klassifizierung immunhistochemischer Färbungen am Ovarialkarzinom und Mammakarzinom

3.2.2.1 Beurteilung von HER-2 und Phospho-HER-2 und HER-3 und Phospho-HER-3

Für die Bestimmung der HER-2 bzw. Phospho-HER-2-Expression wurde das Tumorgewebe hinsichtlich der Intensität der Zellmembranfärbung bewertet. Das verwendete Schema wurde in 0, 1+, 2+ und 3+ eingeteilt. Dabei wurden 0 (keine positive Färbung oder teilweise Membranfärbung in weniger als 10 % der Tumorzellen) und 1+ (schwache Färbintensität, bei mehr als 10 % der Tumorzellen) als negativ eingestuft. Scores von 2+ (schwache bis mittelmäßige Intensität mehr in 10 % der malignen Zellen) und 3+ (mittelmäßige bis starke Zellmembranfärbung in mehr als 10 % der zu bewertenden Zellen) als positiv bewertet.

Bei der Klassifizierung von HER-3 bzw. Phospho-HER-3 wurde hingegen so vorgegangen, dass der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen an der gesamten Tumorzellzahl bestimmt wurde. Dieser Anteil wurde in eine bestimmte Einteilung von 0 bis 4 vorgenommen. Dabei entsprach 0 einer negativen HER-3-Expression in den Tumorzellen. Der Score von 1 wurde einem prozentualen Anteil von 0,1 % bis 10 % zugewiesen. 11 % bis 50 % HER-3 positive Tumorzellen wurde als 2 klassifiziert. Ab 50 % bis 80 % wurde als 3 eingeteilt. Die Gewebeschnitte, die mehr als 80 % positive Tumorbereiche aufwiesen, wurden mit der 4 gekennzeichnet. Im Gegensatz zur HER-2-Bewertung wurden alle subzellulären Kompartimente (Membran, Cytosol und Zellkern) zur Auswertung einbezogen. Die Klassifizierung wurde im Anschluss durch einen erfahrenen Pathologen überprüft.

3.2.2.2 Statistische Analyse

Die Überlebensraten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Das krankheitsfreie Überleben (disease-free survival, DFS) wurde anhand der Daten beginnend mit der Erstdiagnose bis zum Versterben der Patientin oder bis zum Wiederauftreten der Krankheit, definiert. Alle statistischen Analysen wurden mittels des Statistik-Programmes SPSS 15.0 durchgeführt.

3.3 Chirurgie und Pathologie

3.3.1 In situ-Analysen zur Protein-Expression: Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

3.3.1.1 Herstellung von Gewebe-Paraffin-Blöcken und Gewebeschnitten

In dieser Arbeit wurde das humane Biopsiegewebe ausschließlich in Paraffin eingebettet, da Paraffin eine hervorragende Eigenschaft als Einbett-Medium aufweist. Es gibt gut die morphologischen Details wieder und ermöglicht eine hohe Auflösung. Auch auf Grund der Struktur eignet es sich sehr gut zur Anfertigung von Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 3-5 μm . Der Einbettung geht eine Fixierung des Gewebes voraus. Nach Entnahme der Gewebeprobe durch einen Chirurg wurde die Probe unmittelbar in das Fixans (hier: 4 % gepuffertes Formalin) überführt. Nach einer ausreichenden Penetrationsphase i.d.R. 24 h wurde das Gewebe sukzessiv entwässert (siehe Tabelle 6). Schrittweise wurde das Formalin durch Alkohol ersetzt. Danach wurde das Gewebe mit dem organischen Lösungsmittel Xylol behandelt. Nach Abschluss der Entwässerung wurde das Xylol durch das oben genannte Einbett-Medium Paraffin ausgetauscht. Nach Aushärtung des Paraffins wurden die Gewebestücke (10 x 10 x 3 mm) in vorgesehene Ausgießförmchen mit Paraffin eingebettet und am Schlittenmikrotom geschnitten. Die ca. 3 μm dünnen Gewebeschnitte wurden auf beschichtete SuperFrost Plus-Objektträger (Menzel) aufgezogen und bis zur weiteren Analyse sonnengeschützt und trocken gelagert.

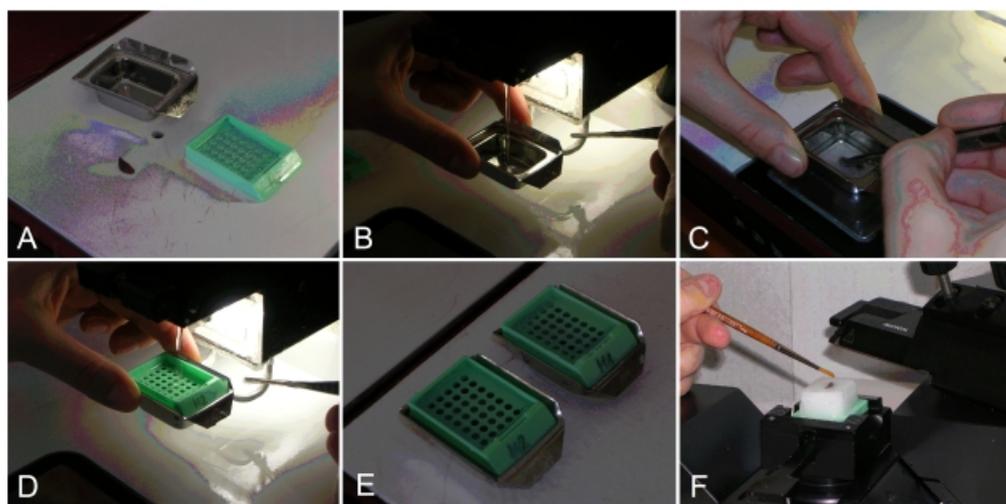


Abbildung 11: Einzelne Arbeitsschritte der Anfertigung von Gewebe-Paraffinschnitten. Vom Einbetten bis zum Mikrotom-Schneiden. A: Ausgießförmchen und das Gewebestück. B: Befüllen der Ausgießförmchen mit Paraffin. C: Gewebestück wird im noch flüssigem Paraffin fixiert. D: Auffüllen des Ausgießförmchen mit Paraffin. E: Aushärten des Paraffins auf einer Kühlplatte. F: Anfertigung von Paraffin-Schnitten vom fertigen Präparat am Schlittenmikrotom.

Tabelle 6: Entwässerungsprotokoll der Gewebeproben.

Lösungsmittel bzw. Paraffin	Prozent [%]	Dauer [h]
Ethanol	70	1
Ethanol	80	1
Ethanol	96	1,5
Ethanol	100	1,5
Xylol	100	1
Xylol	100	1
Xylol	100	1
Paraffin	-	2
Paraffin	-	3

3.3.1.2 Spezifitätssprüfung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verwendeten Primärantikörper einer Spezifitätssprüfung unterzogen, um unspezifische Bindungen (des Primärantikörpers) auszuschließen. Für die Antikörper, die das gesamte (unphosphorylierte) Protein detektieren, wurde die Spezifitätskontrolle mit dem entsprechenden Epitop/Peptid durchgeführt. Dazu wurde der jeweilige Antikörper mit einem Überschuss an Blocking-Peptid auf einem Überkopfschüttler für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Parallel dazu wurde die gleiche Konzentration des Antikörpers mit sterilem PBS unter den identischen Bedingungen inkubiert. Dies wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach Abschluss der Vorinkubation wurde wie im Kapitel 3.3.2 beschrieben mit dem immunhistologischen Protokoll verfahren.

3.3.1.3 Antigen-Demaskierung durch Antigen Retrieval-Methode

Um eine bestmögliche Penetration des Antikörpers zu gewährleisten wurden die Gewebeschnitte mit Rotihistol[®] (Xylol-Ersatz) behandelt, um das Paraffin herauszulösen (4 x 5 min). Nach dieser Entparaffinisierung wurden die Schnitte in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration (100 %, 95 %, 90 %, 70 %, 50 % und 30 %) jeweils 5 min inkubiert. Danach wurde in H₂O_{dest} rehydriert und nachfolgend in TBS (Tris-buffered saline)-Puffer der pH-Wert äquilibriert. Durch die Fixierung mit Formalin entsteht eine irreversible Reaktion der Proteine. Es kommt zu einer Quervernetzung der Schwefel-haltigen Seitengruppen der Aminosäuren. Dies hat zur Folge, dass das Epitop der Proteine im

Gegensatz zum nativen Zustand maskiert wird. Um sicherzustellen, dass der entsprechende Antikörper das Epitop/Antigen erkennt, muss das Epitop dem Antikörper zugänglich gemacht werden. Dies erfolgt durch die Antigen Retrieval-Methode. In dieser Arbeit wurden zum einen die hitzeinduzierte Freisetzung mit einem 0,1 M Citrat-Puffer pH 6,0 (unphosphorylierter Zustand der Proteine) und zum anderen ein hitzeinduzierten Aufschluss durch Tris-Tween 20[®]-EDTA pH 9,0 (phosphorylierte Proteine) gewählt. Bei beiden Protokollen wurden die Schnitte in eine Plastikkuvette mit den entsprechenden Puffern überführt und für 2 x 7 min bzw. 10 min in der Mikrowelle inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Schnitte auf ca. 50-60°C abgekühlt bevor sich weitere Behandlungen anschlossen.

3.3.1.4 *Blockierung endogener Peroxidasen, unspezifischer Antikörperbindungsstellen und Antikörper-Inkubationen*

Um endogene Gewebseperoxidase zu inaktivieren, wurden die Schnitte in 7 % H₂O₂ in Methanol für 10 min unter Ausschluss von Licht bei RT inkubiert. Diesem Schritt wurde ein Waschschrift im 1 x PBS (2 x 5 min) angeschlossen. Um alle unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren wurden die Schnitte für eine Stunde mit 3 % BSA/PBS/0,1 % Tween 20 in einer Feuchtkammer inkubiert. Des weiteren wurden endogene Avidin und Biotin-Bindungsstellen mit entsprechenden Blocking-Reagentien (2 x 15 min) behandelt.

Erst dann wurden die Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörper (siehe Tabelle 7) behandelt. Pro Schnitt wurden ca. 100 µl Primärantikörper-Verdünnung eingesetzt. Diese Inkubation wurde auch in der Feuchtkammer durchgeführt, um Austrocknungseffekte vorzubeugen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

Die Detektion des Primärantikörpers wurde mit der im Folgenden beschriebenen ABC-Methode durchgeführt. Bei der ABC-Methode wird der Primärantikörper über einen biotinylierten sekundären Antikörper sowie Streptavidin, welches mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, nachgewiesen. Dabei wird ausgenutzt, dass Streptavidin und Biotin in einem beinahe quantitativen Verhältnis von 1:4 aneinander binden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Präzipitation zugegebenen Diaminobenzidins mit Wasserstoffperoxid zu einem braunen Lack/Polymer. Zur Durchführung der ABC-Methode wurde ein kommerzielles Sekundärantikörperkit (Fa. Vectorlabs) verwendet. Als Negativkontrolle

wurde bei Kontrollpräparaten nur der sekundäre Antikörper eingesetzt bzw. unspezifische, nicht-bindende Antikörper der jeweiligen Spezies verwendet. Der Sekundärantikörper wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben angesetzt. Es wurden 2 ml TBS mit 30 µl Blocking-Reagenz und 10 µl des Sekundärantikörpers gemischt. Die Schnitte wurden für eine Stunde mit dieser Lösung in der Feuchtkammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte mit Puffer (3 x 5 min) gewaschen. Das ABC-Reagenz wurde wie folgt angesetzt. Es wurden 2 ml TBS mit 40 µl Reagenz A und 40 µl Reagenz B zusammenpipettiert. In feuchter Atmosphäre wurden die Gewebeschnitte ebenfalls für 1 h damit inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS (3 x 5 min) gespült.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper im immunhistologischen Nachweis.

	Verdünnung	Inkubationsparameter	Sekundärer Antikörper
Kaninchen α-HER-3	1:50	RT, 1h, 0,3% BSA, 1 x PBS, 0,1% Tween 20	Esel α Kaninchen-Cy3, 1h, RT, 1:100
Kaninchen α-HER-2/NeuT	1:50	RT, 1h, 0,3% BSA, 1 x PBS, 0,1% Tween 20	Esel α Kaninchen-Cy3, 1h, RT, 1:100
Kaninchen α-HER-3	1:50	RT, 1h, 0,3% BSA, 1 x PBS, 0,1% Tween 20	Vectastain Elite ABC-Kit (anti-Kaninchen, aus Ziege)
Kaninchen α-pHER-3	1:50	RT, 1h, 0,3% BSA, 1 x PBS, 0,1% Tween 20	Vectastain Elite ABC-Kit (anti-Kaninchen, aus Ziege)
Maus α-pHER-2	1:25	RT, 1h, 0,3% BSA, 1 x PBS, 0,1% Tween 20	Vectastain Elite ABC-Kit (anti-Maus, aus Pferd)

3.3.1.5 Visualisierung mit 3,3 Diaminobenzidin (DAB)

Zur Visualisierung wurde das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) gewählt, welches in organischen Lösungsmitteln unlöslich ist. Dazu wurden 5 ml H₂O bidest mit 2 Tropfen des Puffer-Konzentrat versetzt. Kurz vor Anwendung wurden 4 Tropfen DAB Stocklösung und 2 Tropfen der H₂O₂-Lösung hinzugegeben. Nach guter Vermischung wurde die Substrat-Lösung auf die Schnitte pipettiert und für 6 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde das DAB vom Objektträger abgeklopft und unter fließendem Leitungswasser für 6 min gespült.

3.3.1.6 *Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun*

Zur Gegenfärbung der Zellkerne und zum Teil auch des Cytoplasmas wurde zuvor filtriertes Mayers Hämalaun (Merck) eingesetzt. Nach 90 sec wurde überschüssiges Hämalaun durch lauwarmes fließendes Leitungswasser beseitigt. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkohol-Konzentrationsreihe für jeweils 1 min inkubiert. Bevor die Schnitte permanent mittels Entellan und Deckgläschen eingedeckt wurden, mussten die Schnitte zweimal in Rotihistol für 2-3 min inkubiert werden.

3.3.2 **Immunfluoreszenz**

Parallel zu immunhistologischen Färbungen an Paraffin-eingebettetem Geweben wurden auch immunhistologische Färbungen an auf Objektträgern kultivierten Zellen durchgeführt. Am Vortag der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in DMEM-Medium auf autoklavierte runde Deckgläschen in einer 24-well-Platte (Costar Corning) mit einer Dichte von $0,25 \times 10^5$ Zellen pro well ausgestreut. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ für weitere 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit sterilem 1 x PBS (1 ml/well) gewaschen. Die Fixierung wurde mit 4 % Paraformaldehyd in Sörensen-Puffer pH 7,4 (0,5 ml/well) für 20 Minuten bei RT durchgeführt. Nach der Fixierung wurde das Fixans durch zweimaliges Waschen mit sterilem 1 x PBS ausgewaschen und die Zellen für 10 min in 50 mM NH₄Cl in 1 x PBS (0,5 ml/well) bei RT inkubiert. Das überschüssige Ammoniumchlorid-Salz wurde durch 1 x PBS entfernt. Eine Permeabilisierung der Zellen und eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde durch die Inkubation mit einer Saponin-Lösung (0,1 mg/ml) mit 3 % BSA/1 x PBS (RT, 0,5 ml/well) erreicht. Nach dieser Inkubation wurde jedes well mit 1ml der Saponin/PBS-Lösung für 10 min gewaschen, bevor eine Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern stattfinden konnte. Der Primärantikörper (Tabelle 7) wurde mit einer 1 %igen BSA/Saponin/PBS-Lösung verdünnt. Für die Inkubation (1 h, RT) wurden 30 µl dieser Lösung des Primärantikörpers auf einen Parafilmstreifen pipettiert. Auf diesen Antikörper-Tropfen wurden nun die runden Deckgläschen mit der Oberseite nach unten gelegt. Um Verdunstungen vorzubeugen wurde die Fläche mit feuchten Tüchern umlegt und durch eine Schale abgeschlossen. Nach Inkubationsende wurden die Deckgläschen wieder in die 24-well-Platte überführt und dreimal à 10 min mit Saponin/PBS-Lösung gewaschen. Für den Nachweis des Primärantikörpers wurde ein entsprechender Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 7). Die Vorgehensweise der Inkubation wurde, wie beim Primärantikörper beschrieben, durchgeführt. Zum Entfernen unspezifisch gebundener

Sekundärantikörper wurden die Zellen erneut dreimal mit Saponin/PBS-Lösung für jeweils 10 min gewaschen. Final wurden die Zellen mit 1 x PBS für 10 min gewaschen. Zur Darstellung der Kerne wurden die Zellen mit DAPI in einer Konzentration von 2,3 µg/ml für 5 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal à 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Bevor die Deckgläschen mit 20 µl Mowiol-Eindeckmedium auf Objektträger gebracht wurden, kurz in H₂O_{dest.} geschwenkt. Nach dem Trocknen wurden die fertigen Präparate bis zur Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung bei 4 °C gelagert.

3.3.3 TUNEL-Assay in Kombination mit Immunfluoreszenzfärbung

Der TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End-Labeling)-Nachweis erkennt apoptotische Zellen innerhalb einer Zellpopulation. Das Prinzip beruht darauf, dass die durch Apoptose verursachten DNA-Strangbrüche mit Fluorescein-12-dUTP durch das Enzym terminale Deoxynucleotidyl Transferase repariert werden. In dieser Arbeit wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) verwendet. Die adherent wachsenden Zellen wurde auf sterilen runden Glasplättchen (Menzel, Ø 14 mm) in einer 24-well Platte in einer Zelldichte von 25.000 Zellen pro well ausgestreut. Anschließend wurden die Zellen kurz mit sterilem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 4% Paraformaldehyd/Sörensen pH 7,4 für 20 Minuten bei RT fixiert. Nach Fixation wurden alle PFA-Rückstände mit 1x PBS beseitigt. Die Permeabilisierung wurde mit 0,2 % Triton X-100/PBS für 5 min durchgeführt. Im Anschluss wurde erneut zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Parallel zu den Proben wurde eine Kontrolle mitgeführt. Diese Proben bzw. Zellen wurden, damit die rTdT-Reaktion abläuft, mit dem Enzym DNase I behandelt. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl DNase I-Puffer für 5 Minuten bei RT äquilibriert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen mit 10 Einheiten pro ml DNase I im DNase I-Puffer bei RT für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit H₂O_{dest.} abgestoppt. Nach Beendigung der Behandlung der positiven Kontrolle wurden die Zellen mit dem Äquilibrierungspuffer für 10 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit wurden die einzelnen Reaktionskomponenten der rTdT-Reaktion zusammenpipettiert. Für eine Standard-Reaktion wurden 45 µl Äquilibrierungspuffer, 5 µl Nukleotid-Mix (Fluorescein-12-dUTP) und 1 µl rTdT-Enzym eingesetzt. Für die mitgeführte Negativ-Kontrolle ist zu beachten, dass anstatt des rTdT-Enzyms Wasser verwendet wurde. Die Inkubation wurde für eine Stunde bei 37°C durchgeführt (Hybridizer, Dako). Durch Feuchtigkeitsstreifen wurde verhindert, dass es zu Verdunstungen während der Inkubation kam. Das Abstoppen der Reaktion wurde mit 2 x SSC-Puffer durchgeführt (15 min). Um restliche ungebundene Fluorescein-markierte 12-

dUTPs zu beseitigen, wurden die Zellen zusätzlich mit 1 x PBS dreimal kurz hintereinander gewaschen. Der rTdT-Reaktion wurde eine immunhistochemische Detektion vom jeweiligen Protein wie im Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt.

3.4 Arbeiten mit Proteinen

3.4.1 Ernte des Gesamtzelllysates

Die kultivierten Zellen wurden zweimal kurz mit eiskaltem PBS gewaschen bevor sie geerntet wurden. Zur Zelllyse wurden pro Flasche (75 cm²) 1 ml 2 x RIPA-Puffer (+ Inhibitoren) eingesetzt. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgeschabt und in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Danach wurden die Lysate für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Lysate bei 13.000 upm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert und einer BCA-Proteinbestimmung unterzogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zelllysate bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Subzelluläre Fraktionierung (Slosberg et al., 1999)

Die in 75 cm² kultivierten Zellen wurden zweimal kurz mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Restflüssigkeit wurde vollständig abgesaugt bevor 1ml NB-Puffer zu den Zellen gegeben wurde. Nach ca. 30 Sekunden Einwirkzeit wurden die Zellen mittels eines Zellschabers geerntet und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für 10 min wurden die Zellen auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators (1 ml, Pistill A) auf Eis homogenisiert (10 Stöße). Das homogenisierte Zelllysate wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 min bei 2.300 upm in der Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert. In diesem Zentrifugationsschritt wurde das Cytosol von Kernproteinen getrennt. Das Pellet wurde vom Überstand befreit und erneut zentrifugiert (12.000 upm, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Das verbleibende Pellet wurde mit 300 µl NB-Puffer vollständig resuspendiert. Um sicher zu gehen, dass keine cytosolischen Proteine die Kernfraktion kontaminieren, wurden die resuspendierten Nukleusproteine über einen Sucrose-Gradienten gereinigt. Dazu wurden vorsichtig die 300 µl der Nukleusfraktion auf 300 µl Sucrose/NB-Puffer Lösung geschichtet. Dieser Gradient wurde für 30 min bei 4.300 upm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Sucrose-MgCl₂-NB-Puffer resuspendiert und einer Homogenisation (Dounce, Pistill A, 7 Stöße)

unterzogen. Das Homogenisat wurde erneut für 5 min bei 2.300 upm in der Kühlzentrifuge (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde je nach Größe in 50-250 µl Puffer B aufgenommen. Im Anschluss wurde die Nukleus-Fraktion mit einem Ultraschallstab (25 %, 10 sec) behandelt und erneut zentrifugiert (12.000 upm, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe der BCA-Methode (Pierce) bestimmt. Dieser Test beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung in einer Biuret-Reaktion einen Komplex bilden. Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Dieser Farbkomplex wird bei 562 nm im Spektralphotometer (Jasco) gemessen werden. Der eigentlichen Probenmessung wurde eine Anfertigung der Kalibriergerade vorangestellt. Dazu wurde eine BSA-Stammlösung (50 µg/ml) in verschiedenen Konzentrationen (2,5; 5,0; 7,5; 10,0 und 15,0 µg/ml) mit Wasser verdünnt, so dass ein Volumen von 800 µl in der Messküvette vorliegt. Zu diesem Volumen wurde 200 µl BCA-Lösung (49 Teile Lösung A + 1 Teil Lösung B) hinzu gegeben und bei 60 °C im Heizblock für 30 Minuten inkubiert. Bevor die Konzentrationsreihe vermessen wurde, mussten die Proben für 10 Minuten bei RT abkühlen. Im Anschluss wurden die Proben 1:10 verdünnt und wie anhand der Messreihe beschrieben, inkubiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.4.4 Methanol/Chloroform-Fällung modifiziert (Wessel und Flugge, 1984)

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das entsprechende Volumen für 50 µg Nukleus-Proteinlösung auf 300 µl 1 x PBS aufgefüllt. Zu diesen 300 µl wurde 600 µl Methanol zugegeben und gut vermischt. Anschließend wurden jeweils 200 µl Chloroform und Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) hinzupittetiert und es kam zur Ausbildung zweier Phasen. Nach 1-minütigen Vortexen wurde der Ansatz für 2 min und 12.000 upm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Die obere Phase wurde bis zur Interphase abgenommen und verworfen. Erneut wurde 1ml Methanol hinzugegeben und für eine Minute gevortext. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 12.000 upm zentrifugiert. Das Methanol wurde abgenommen ohne dabei das Proteinpellet zu berühren. Die Methanol-Reste wurden mit Hilfe einer SpeedVac (Thermo) beseitigt und das Pellet in 25 µl Probenpuffer aufgenommen.

3.4.5 Co-Immunpräzipitation

Die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) ermöglicht die Interaktion zweier Proteine im Zelllysat nachzuweisen. Für die Co-Immunpräzipitation wurden 250 µg Protein pro 300 µl Volumen verwendet. Der jeweilig entsprechende Antikörper (1 µg pro µg Protein) wurde zugegeben und für 1,5 h auf einem Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Ansatz 25 µl Protein-A-Sepharose (Amershan) dreimal mit 300 µl sterilem 1 x PBS versetzt und für 90 sec bei 7.000 upm abzentrifugiert. Zu der gewaschenen Sepharose wurde das Protein-Antikörper-Gemisch pipettiert und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach diesem Schritt wurde der Komplex bestehend aus Antikörper, Antigen und Sepharose dreimal für 10 min bei 3.000 upm in einer Kühlzentrifuge mit 1 ml IP-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde der Puffer vom Sepharose-Pellet vollständig entfernt, 25 µl 2 x Probenpuffer hinzugegeben und bei 95 °C für 5 min gekocht. Für die anschließende Analyse in der SDS-Gelelektrophorese wurde ein 10 %iges Gel verwendet.

3.4.6 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird zur Charakterisierung von Proteinen und zur Überprüfung von deren Reinheit eingesetzt. Die Technik beruht darauf, dass bei allen Proteinen das gleiche Ladung/Masse-Verhältnis vorliegt und die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung abhängt, sondern nur noch vom Molekulargewicht der Proteine. Diese negative Ladung wird durch das Detergenz SDS ermöglicht, was die Eigenladungen der Proteine überdeckt (pro 1 g Protein binden ungefähr 1,4 g SDS). Die Auftrennung erfolgt in einer Gelmatrix (Polyacrylamid), die durch die Mischung von Acrylamid und N, N'-ethylen-bisacrylamid, sowie aus Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxidisulfat (APS) hergestellt wird. Es wurde das System Multigel-Long der Firma Biometra verwendet. Die SDS-PAGE setzte sich aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel zusammen. Nach vollständiger Auspolymerisation des Gels wurden die Proben mit Kapillarspitzen in die Geltaschen pipettiert. Die Proben (i.d.R. 50 µg) wurden mit 2 x Probenpuffer bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Nachdem die Proben das Sammelgel bei einer Ampère-Zahl von 20 mA durchwandert haben, wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Die Gelelektrophorese wurde nachdem die Lauffront aus dem Trenngel gelaufen war, beendet.

3.4.7 Immunoblot

Unmittelbar nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran elektrophoretisch transferiert. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Semi-Dry-Blot Verfahren (Towbin et al., 1979) unter Verwendung der Blot-Apperatur der Firma Biometra angewendet. Nach dem Gellauf wurde das Gel vorsichtig freigelegt und das Sammelgel vom Trenngel mit einem Skalpell separiert. Das Trenngel wurde für mindestens 5 min im Kathodenpuffer äquilibriert. Zeitgleich wurde das zuvor auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene Whatman-Papier (4 Lagen) in Kathodenpuffer getränkt. Als Anode wurden 12 Lagen Whatman-Papier verwendet, die zuvor im Anodenpuffer kurz inkubiert wurden. Die Membran wurde vor Verwendung aktiviert, um Proteine besser binden zu können. Dies wurde durch kurzes Benetzen mit Methanol und anschließend kurzer Inkubation im Anodenpuffer durchgeführt. Anschließend wurden die oben genannten Komponenten wie folgt zu einer Einheit zusammengesetzt. Angefangen mit den 12 Lagen Whatman-Papier, der aktivierten Membran gefolgt von dem Gel und vier Lagen Whatman-Papier. Nach Abschluss wurden mögliche Luftblasen durch Herauswalzen mit einer Glaspipette beseitigt, dann die Blot-Aperatur in Betrieb genommen. Der Blotvorgang wurde bei 5 mA/cm^2 und für eine Stunde durchgeführt. Nach Beendigung wurde die Membran kurz in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ überführt und danach für ca. 1 min in Ponceau S inkubiert. Durch Waschen mit TBS-Tween 20 wurde die Membran wieder entfärbt. Um den Protein-Transfer zu kontrollieren wurde das zurückbleibende Gel mit Coomassie gefärbt.

3.4.7.1 Antikörper-Inkubation

Nach vollständigem Entfernen der Ponceau S-Färbelösung wurde die Membran für eine Stunde mit 5 % Magermilch/TBS-Tween-Lösung oder 5 % BSA/TBS-Tween auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach diesem Schritt wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 8) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran in einem Überschussvolumen an TBS-T dreimal für 5 min gewaschen. Dann wurde der Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt. Identisch zum Primärantikörper wurde der Blot dreimal mit TBS-Tween gewaschen.

Tabelle 8. Verwendete Antikörper im Immunoblot.

	Verdünnung	Inkubationsparameter	Sekundäre Antikörper
Maus α beta Actin	1: 10.000	RT, 30 min, 5% MM-TBS-T	Ziege α Maus-HRP, 30 min, RT, 1:10.000
Kaninchen α HER-3	1:200	RT, 2h, 5% MM-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Kaninchen α HER-2/NeuT	1:200	RT, 2h, 5% MM-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Kaninchen α Tubulin	1:1000	4°C, üN, 5% BSA-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Maus α Lamin	1:1000	RT, 2h, 5% MM-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Kaninchen α p85	1:1000	4°C, üN, 5% BSA-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Kaninchen α MAPK (p42/44)	1:1000	4°C, üN, 5% BSA-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000
Kaninchen α pMAPK (p42/44)	1:1000	4°C, üN, 5% BSA-TBS-T	Ziege α Kaninchen-HRP, 60 min, RT, 1:5.000

3.4.7.2 Chemilumineszenzdetektion

Zur Detektion wurde das ECL-System (Perkin Elmer) verwendet. Die vom Hersteller mitgelieferten Substratlösungen (Enhanced Luninol Reagent und Oxidizing Reagent) wurden zu gleichen Teilen vermischt und auf die Membran gegeben, so dass die Membran mit der Flüssigkeit vollständig benetzt war. Danach wurde die Membran mit einer CCD-Kamera (Intas) belichtet (Belichtungszeit: 25 sec, Binning 2x).

3.4.7.3 Coomassiefärbung

Die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Durch vollständiges Entfärben des Gels mit Coomassie-Entfärber für 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proteine visualisiert.

3.4.8 Bioluminometrische ATP-Messung

Zur Bestimmung des intrazellulären ATP-Gehalts wurde die bioluminometrische Messung mittels Luziferin und Luziferase gewählt. Die Grundlage dieser Methode ist, dass ATP in Anwesenheit von Luziferin mit dem Enzym Luziferase unter Lichtemission zu AMP, Phosphat und CO₂ umgesetzt wird. Das emittierte Licht ist proportional zum Adenosintriphosphat-Gehalt. Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurde zuvor eine Kalibriergerade mit einem ATP-Standard (250 ng/ml) erstellt. Dieser Standard wurde 1 : 2 mit Medium zu folgenden Konzentrationen verdünnt (250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5ng/ml, 31,25 ng/ml, 15,62 ng/ml, 7,8 ng/ml, 3,9 ng/ml und 1,9 ng/ml). Das Schlauchsystem des Luminometers wurde zuvor mit Ethanol (100 %) und Wasser durchspült. Im Anschluss wurde der Schlauch mit der Luziferase luftblasenfrei befüllt. Von jeder Konzentration und Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Pro Messröhrchen wurden 50 µl des ATP-Standards bzw. der Probe vorgelegt. Für die Reaktion, die bei 25°C abläuft, wurde 50 µl der Enzym-Lösung verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Relation von HER-3 zur Prognose im primären Ovarialkarzinom

Es ist bekannt, dass im Ovarialkarzinom nur ein kleiner Prozentsatz der Tumorzellen die Rezeptortyrosinkinase HER-2 überexprimiert (Bookman et al., 2003). Somit ist der Einsatz von Trastuzumab (Herceptin®), ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne von HER-2 bindet, zu Therapiezwecken nur eingeschränkt sinnvoll. Auch das Ansprechen nach Herceptin®-Gabe bei HER-2 überexprimierenden (2+ oder 3+ HER-2) Ovarialkarzinomen ist begrenzt. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Patientinnenkohorte mit primären Ovarialkarzinomen auf die Expressionsstärke von HER-3, einem Mitglied der gleichen Rezeptortyrosinkinase-Familie, immunhistologisch untersucht. In dieser Studie wurde HER-3 bei 62 (53,4 %) von 116 Patientinnen nachgewiesen. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde eine Kaplan-Meier-Analyse für das Überleben durchgeführt (Abbildung 12). Bei dieser Analyse wurde eine signifikante Assoziation ($p = 0,003$) zwischen der HER-3-Expression und der Überlebenszeit beobachtet.

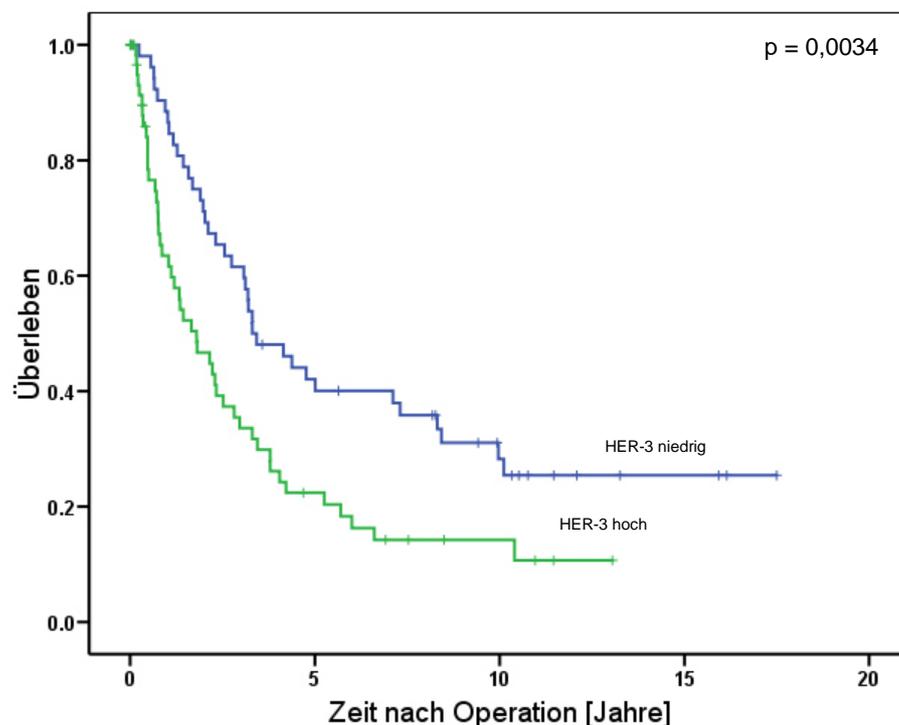


Abbildung 12: Assoziation von HER-3-Expression mit dem Überleben von Patientinnen ($n = 116$) mit primären Ovarialkarzinomen (log-rank Test, $p = 0,0034$).

Als nächster Schritt wurde eine univariate Cox-Analyse an HER-3 durchgeführt, um eine mögliche Assoziation von HER-3 mit dem Überleben zu untersuchen. Das Ergebnis dieser Auswertung zeigte einen ähnlichen Zusammenhang wie schon in der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt ($p = 0,004$, 95 % CI = 1,226 - 2,925, Relatives Risiko = 1,894). Anschließend wurde HER-3 einer multivariaten Cox-Analyse unterzogen, das auf klassische klinische Prognoseparameter wie FIGO-Stadium, Resttumor und Alter bei der Operation adjustiert wurde. Mittels dieser Methode wurde untersucht, ob eine Assoziation mit der Prognose unabhängig von bekannten klinischen Faktoren vorliegt. In dieser Analyse wurden die klinischen Prognosefaktoren dichotomisiert. Bei der Dichotomisierung des FIGO-Stadiums wurden die Stadien I und II den Stadien III und IV gegenübergestellt. Das Ergebnis der Operation des Primärtumors wurde in Resttumor versus kein Resttumor dichotomisiert. Das Lebensalter wurde in jünger als 55 Jahre (< 55 Jahre) und in gleich oder älter als 55 Jahre (≥ 55 Jahre) eingeteilt. Das Resultat der multivariaten Cox-Analyse (Tabelle 9) ergab, dass HER-3 in diesem untersuchten Ovarialkarzinom-Kollektiv als unabhängiger prognostischer Faktor fungiert.

Tabelle 9: Multivariate Cox Analyse für des Einflusses der HER-3-Expression auf das Überleben im Ovarialkarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 116).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-3-Expression (niedrig vs hoch)	1,711	1,095 - 2,674	0,018
FIGO-Stadium (Stadien I, II vs III, IV)	4,776	1,889 - 12,076	0,001
Resttumor (Resttumor vs kein Resttumor)	2,688	1,399 – 5,167	0,003
Alter bei OP (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	2,062	1,166 – 3,648	0,013

4.2 Relation von HER-2 und HER-3 sowie ihrer phosphorylierten Formen zur Prognose im Mammakarzinom

Basierend auf dem Ergebnis der Ovarialkarzinom-Studie wurde in einer weiteren Patientinnen-Studie untersucht, ob die Stärke der Expression von HER-3 sowie die phosphorylierte Form dieser Rezeptortyrosinkinase mit der Prognose beim Mammakarzinom assoziiert ist. Zusätzlich wurde auch HER-2 bzw. Phospho-HER-2 untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Tumorbank mit 201 Patientinnen mit nodal-negativen Mammakarzinomen

immunohistochemisch untersucht (3.2.1). Hierbei erwiesen sich 25,9 % der Tumore als positiv für HER-2, 88,1 % positiv für HER-3, 18,4 % positiv für pHER-2 und 73,6 % positiv für pHER-3. Basierend auf diesen Daten wurden zunächst Kaplan-Meier-Analysen für das krankheitsfreie Überleben (disease free survival) durchgeführt. Hierbei wurde eine signifikante Assoziation zwischen dem HER-2 Status und der Überlebenszeit der Patientinnen beobachtet (Abbildung 13). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde auch für die phosphorylierte Form von HER-2 gefunden (Abbildung 15). Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,232$). Hingegen war weder für HER-3, der Dimerisationspartner von HER-2, noch seine aktivierte Form (pHER-3) eine Assoziation mit dem Überleben zu beobachten (Abbildung 14, Abbildung 16).

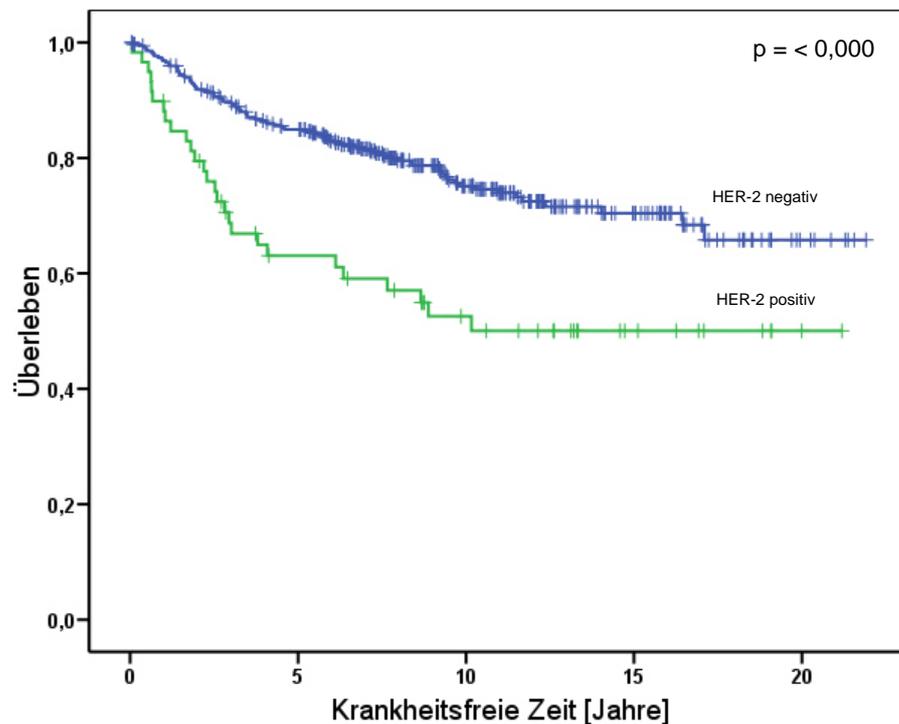


Abbildung 13: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit ergab eine Assoziation von HER-2 in 201 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (log-rank, $p = <0,001$). Patientinnen wurden entsprechend ihren HER-2-Status (negativ oder positiv) eingeteilt.

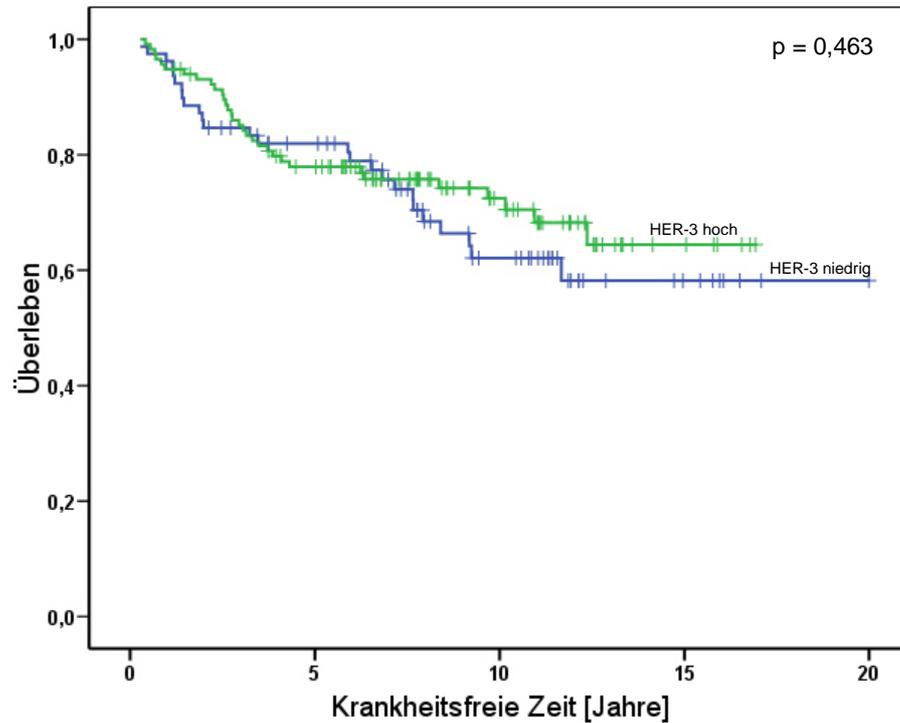


Abbildung 14: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit ergab keine Assoziation von HER-3 in 201 Patientinnen mit primären Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,463$). Patientinnen wurden entsprechend ihrer HER-3-Expression (hoch oder niedrig) eingeteilt.

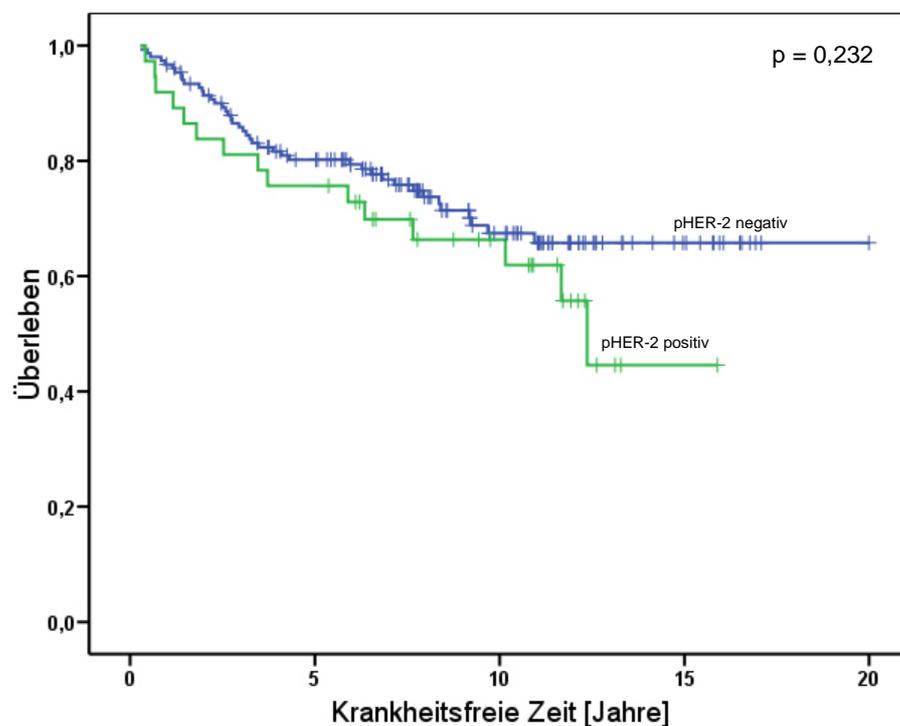


Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit ergab keine Assoziation von Phospho-HER-2 in 201 Patientinnen mit primären Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,232$). Patientinnen wurden entsprechend ihres Phospho-HER-2-Status (negativ oder positiv) eingeteilt.

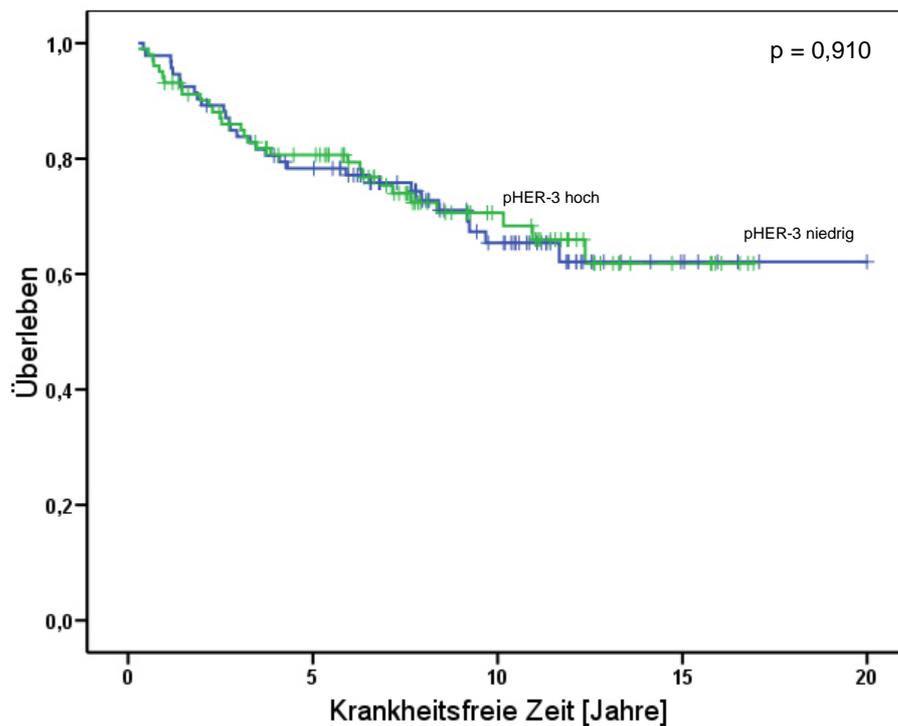


Abbildung 16: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit ergab keine Assoziation von Phospho-HER-3 in 201 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,910$). Patientinnen wurden entsprechend ihrer Phospho-HER-3-Expression (hoch oder niedrig) eingeteilt.

Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass die Dauer des Follow-ups der Patientinnen für das Identifizieren von Prognosefaktoren relevant sein kann (Schmidt et al., 2008), wurden die in Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16 dargestellten Kaplan-Meier Analysen auch für eine Follow-up Zeit von nur 10 Jahren durchgeführt (Anhang, Abbildung 50, Abbildung 51, Abbildung 52, Abbildung 53). Hierbei ergaben sich jedoch ähnliche Zusammenhänge wie für die Analyse mit dem gesamten Follow-up. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die zuvor mittels Kaplan-Meier analysierten Rezeptortyrosinkinasen bei einer multivariaten Cox-Analyse, adjustiert auf die klassischen klinischen Prognosefaktoren Hormonstatus, Tumorstadium, Lebensalter, histologisches Grading mit der Prognose assoziiert sind. Hierzu wurden die aufgeführten klinischen Prognosefaktoren dichotomisiert. Als Hormonstatus positiv wurden Tumore klassifiziert, falls entweder der Östrogenrezeptor oder der Progesteronrezeptor positiv waren. Das Tumorstadium wurde in ≤ 2 cm vs > 2 cm Tumordurchmesser dichotomisiert. Die Grenze für die Dichotomisierung für das Lebensalter lag bei 50 Jahren (< 55 vs ≥ 55 Jahre). Das histologische Grading, ein histologisches Maß für die Dedifferenzierung der Tumorzellen, wurde Grad 3 vs Grad 2 und 1 eingeteilt. Zur Orientierung wurde zunächst die univariate Analyse durchgeführt (Tabelle 10). Ähnlich wie bei der Kaplan-Meier Analyse wurde für HER-2 ein signifikanter Zusammenhang mit dem

krankheitsfreien Überleben beobachtet ($p = < 0,001$). Hingegen waren weder pHER-2, HER-3 noch pHER-3 mit dem krankheitsfreiem Überleben assoziiert (Tabelle 10). Auch bei der Verwendung des 10-Jahres-Follow-up wurden qualitativ ähnliche Ergebnisse erzielt (Anhang, Tabelle 16, Tabelle 17, Tabelle 18, Tabelle 19).

Tabelle 10: Univariate Cox-Analyse aller Faktoren ergab nur für die HER-2-Expression eine Assoziation mit dem Patientinnenüberleben im Mammakarzinom ($n = 201$).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-2-Expression (niedrig vs hoch)	2,261	1,464 – 3,493	< 0,000
pHER-2-Expression (niedrig vs hoch)	1,430	0,793 – 2,581	0,234
HER-3-Expression (niedrig vs hoch)	0,824	0,491 – 1,383	0,463
pHER-3-Expression (niedrig vs hoch)	0,523	0,580 – 1,625	0,971

Im nächsten Schritt wurde die multivariate Cox-Analyse angewendet. Hierbei wurden jeweils HER-2, pHER-2, HER-3 und pHER-3 auf die klinisch relevanten Parameter Hormonrezeptorstatus, Tumorstadien, Lebensalter und Grading adjustiert. Hierbei erwies sich HER-2 als unabhängiger Prognosefaktor (Tabelle 11, $R = 2,144$, $p = 0,001$). Hingegen erreichten die anderen Parameter keine Signifikanz. Sowohl pHER-2 (Tabelle 12), HER-3 (Tabelle 13) als auch pHER-3 (Tabelle 14) erlangten keine Signifikanz in der multivariaten Cox-Analyse. Auch bei einer Follow-up Zeit von 10 Jahren wurden in der multivariaten Cox-Analyse qualitativ ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei Einsatz der gesamten Follow-up Zeit. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Patientinnenkohorte nur der HER-2-Status eine prognostische Relevanz zeigt, während dies für HER-3 als auch die entsprechenden phosphorylierten Formen nicht gezeigt werden konnte.

Tabelle 11: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-2-Expression (niedrig vs hoch)	2,144	1,368 – 3,362	0,001
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,271	0,820 - 1,970	0,284
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,060	0,715 – 1,193	0,772
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,796	0,530 – 1,194	0,269
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	3,290	2,178 – 4,969	< 0,000

Tabelle 12: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des Phospho-HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
pHER-2-Expression (niedrig vs hoch)	1,131	0,621 – 1,758	0,690
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,240	0,612 - 2,122	0,500
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	0,964	0,558 – 1,665	0,894
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,865	0,491 – 1,576	0,627
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	4,926	2,753 – 8,574	< 0,000

Tabelle 13: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-3-Expression (niedrig vs hoch)	0,996	0,589 – 1,685	0,989
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,132	0,609 - 2,102	0,696
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,084	0,643 – 1,827	0,761
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,877	0,490 – 1,571	0,080
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	4,834	2,730 – 8,559	< 0,000

Tabelle 14: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des Phospho-HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
pHER-3-Expression (niedrig vs hoch)	1,045	0,621 – 1,758	0,868
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,139	0,612 - 2,122	0,681
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,086	0,558 – 1,665	0,757
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,880	0,491 – 1,576	0,666
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	4,859	2,753 – 8,574	< 0,000

4.3 Subzelluläre Lokalisation von HER-3 in vivo

4.3.1 Subzelluläre Verteilung der Rezeptortyrosinkinase HER-3 im Mammakarzinom

Wie schon erwähnt, wurden die Mammakarzinom-Patientinnen immunhistochemisch auf die HER-3-Expression hin untersucht und anschließend statistischen Analyse-Methoden unterzogen. In dem folgenden Kapitel wurden nun vornehmlich die dabei gewonnenen Bildinformationen ausgewertet und dargestellt. Die mikroskopische Untersuchung der Gewebeprobe zeigt überraschenderweise, dass bei einer Vielzahl der untersuchten Tumorgewebeprobe eine Lokalisation von HER-3 im Zellkern nachweisbar ist. Vom untersuchten Gesamtkollektiv wurden 24 Patientinnen hinsichtlich der HER-3-Expression als negativ eingestuft. Die restlichen Patientinnen-Proben wiesen eine unterschiedlich starke Expression von HER-3 auf. Sowohl für die Signalintensität als auch für den prozentualen Anteil an positiven Tumorzellen gab es Variationen. Die Abbildung 17 A zeigt ein Mammakarzinom, bei dem in nahezu 100 % aller Tumorzellen nukleäres HER-3 nachweisbar war. Auch Abbildung 17 B, ein invasives duktales Mammakarzinom zeigt mit 70 % einen hohen Anteil HER-3-positiver Nuklei. Das Karzinom aus Abbildung 17 C zeigt überwiegend Zellkerne, die positiv auf HER-3 sind. Zu bemerken ist, dass die Nukleoli (Kernkörperchen) von einer positiven HER-3-Färbung ausgespart sind. Ein weiteres Beispiel (Abbildung 17 D) weist eine cytoplasmatische und teilweise membranäre HER-3-Expression auf.

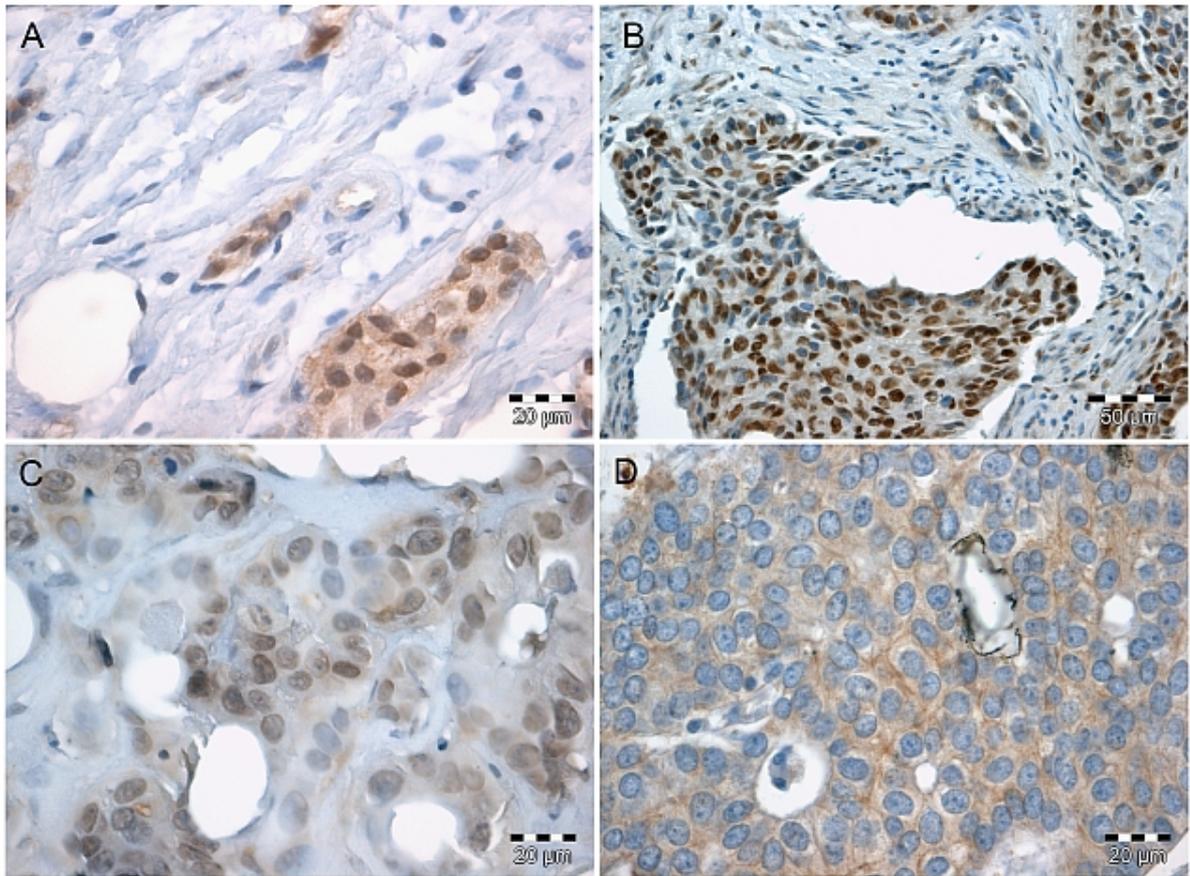


Abbildung 17: Beispiel für cytoplasmatische und nukleäre c-erbB-3/HER-3-Expression im Mammakarzinom. Die fixierten und in Paraffin-eingebetteten Tumore wurden nach der ABC-Methode mit anschließender DAB-Detektion (braune Färbung) untersucht. Die Gegenfärbung wurde mit Mayer's Hämalaun durchgeführt.

Auf die beschriebene Weise wurden 201 Mammakarzinome ausgewertet. Eine nukleäre Lokalisation wurde in 43,2 % (87 von 201) dieser Tumore detektiert (Tabelle 4). In diesen Tumoren wurde HER-3 im Mittel in 60 % (Median, 95 % CI) der Tumorzellen im Kern nachgewiesen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine nukleäre Lokalisation von HER-3 im Mammakarzinom ein relativ häufiges Ereignis darstellt.

4.3.2 Inverse Korrelation von nukleärem und cytoplasmatischem HER-3

Um das im vorherigen Kapitel beobachtete Auftreten von HER-3 im Zellkern eingehender zu untersuchen, wurde in 201 Mammakarzinomen analysiert, ob HER-3 nukleär oder cytoplasmatisch vorliegt. Die Häufigkeitsverteilungen sowohl für nukleäres als auch cytoplasmatisches HER-3 zeigen eine zweipfelige Kurve (Abbildung 18, Abbildung 19). Daher wurde eine Dichotomisierung am Median vorgenommen. Dies führte im Falle der cytoplasmatischen HER-3-Expression dazu, dass Tumoren mit 100 % cytoplasmatischer HER-3-Expression dem Status 1 zugeordnet wurden, Tumoren mit geringerer

cytoplasmatischer HER-3-Expression dagegen dem Status 0. Im Falle der nukleären HER-3-Expression erhielten Tumore mit 0 % HER-3 im Nukleus (Abbildung 20) den Status 0, allen anderen Tumore den Status 1.

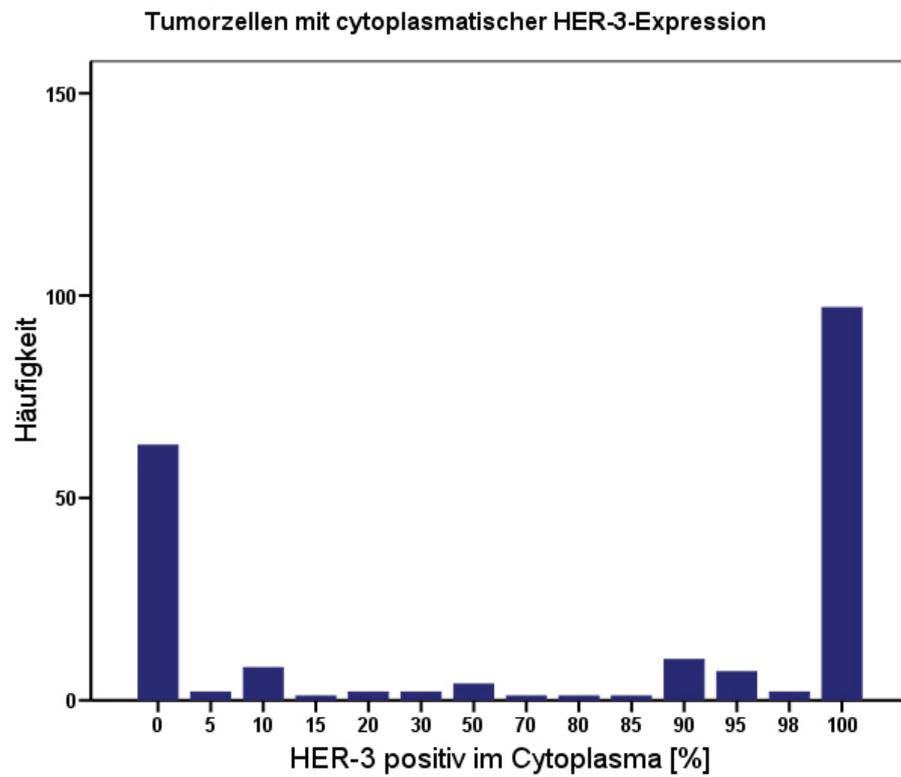


Abbildung 18: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine cytoplasmatische HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom (n = 201). Die Häufigkeitsverteilung diente als Grundlage für die anschließende Dichotomisierung am Median.

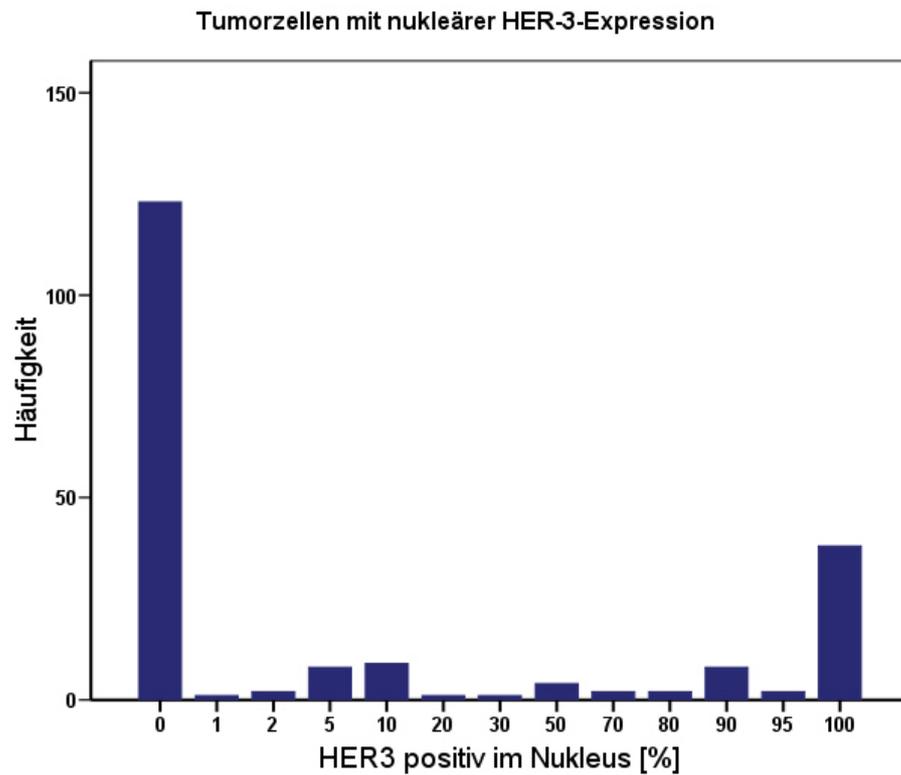


Abbildung 19: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine nukleäre HER-3-Expression [%] im Mammakarzinom-Patientinnen (n = 201). Die Häufigkeitsverteilung diente als Grundlage für die anschließende Dichotomisierung am Median.

Die dichotomisierten Daten wurden in Kreuztabellen (Tabelle 15) mittels Chi-Square Test untersucht.

Tabelle 15: Die HER-3-Expression im Nukleus und die HER-3-Expression im Cytoplasma wurde in einer Kreuztabelle gegenübergestellt. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson ergab einen Likelihood-Quotienten von $< 0,001$. Die dichotomisierten Daten dienten als Grundlage für diese Analyse. (,00 = geringe Expression, 1,00 = hohe Expression).

		HER-3 im Cytoplasma (HER3C)			
		,00	1,00	Gesamt	
HER-3 im Nukleus (HER3N)	,00	Anzahl	25	98	123
		% von HER3N	20,3%	79,7%	100%
		% von HER3C	26,3%	92,5%	61,2%
	1,00	Anzahl	70	8	78
		% von HER3N	89,7%	10,3%	100%
		% von HER3C	73,7%	7,5%	38,8%
Gesamt	Anzahl	95	106	201	
	% von HER3N	47,3%	52,7%	100%	
	% von HER3C	100%	100%	100%	

Hierbei ergab sich eine inverse Korrelation mit einem p-Wert kleiner als 0,001. Dies bedeutet, dass eine starke Expression im Zellkern mit vergleichsweise schwacher Expression im Cytoplasma einhergeht (Abbildung 20) bzw. umgekehrt (Abbildung 21).

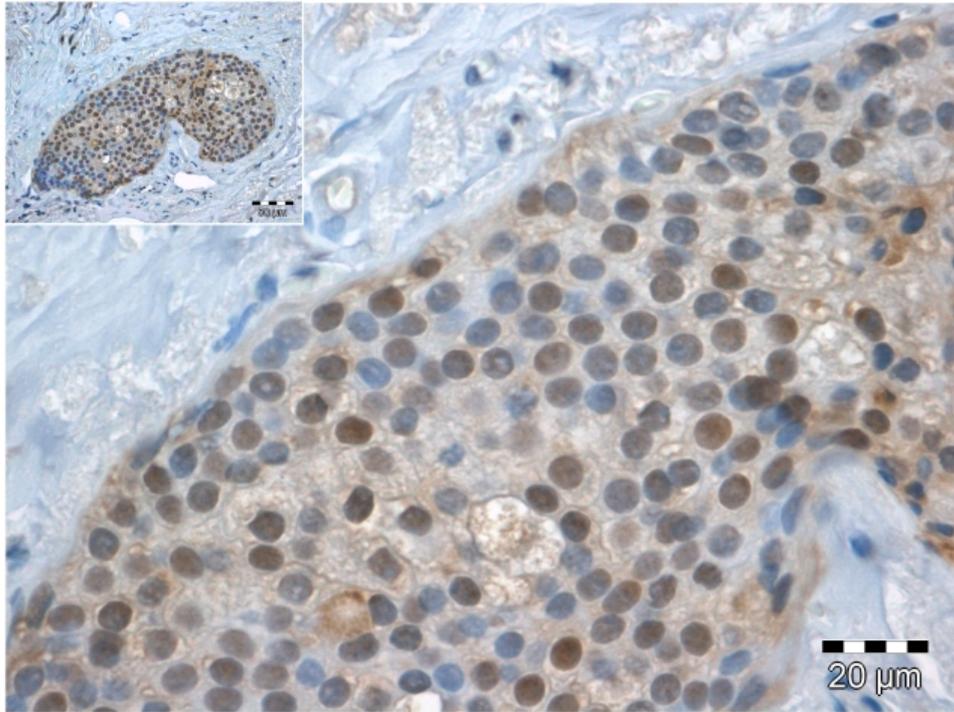


Abbildung 20: Inverse Korrelation zwischen der subzellulären HER-3-Expression im Mammakarzinom. Repräsentatives Beispiel für eine überwiegend nukleäre Lokalisation von HER-3. Der Nachweis von c-erbB3/HER-3 erfolgt über das ABC-System mit anschließender DAB-Visualisierung (braune Färbung). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun.

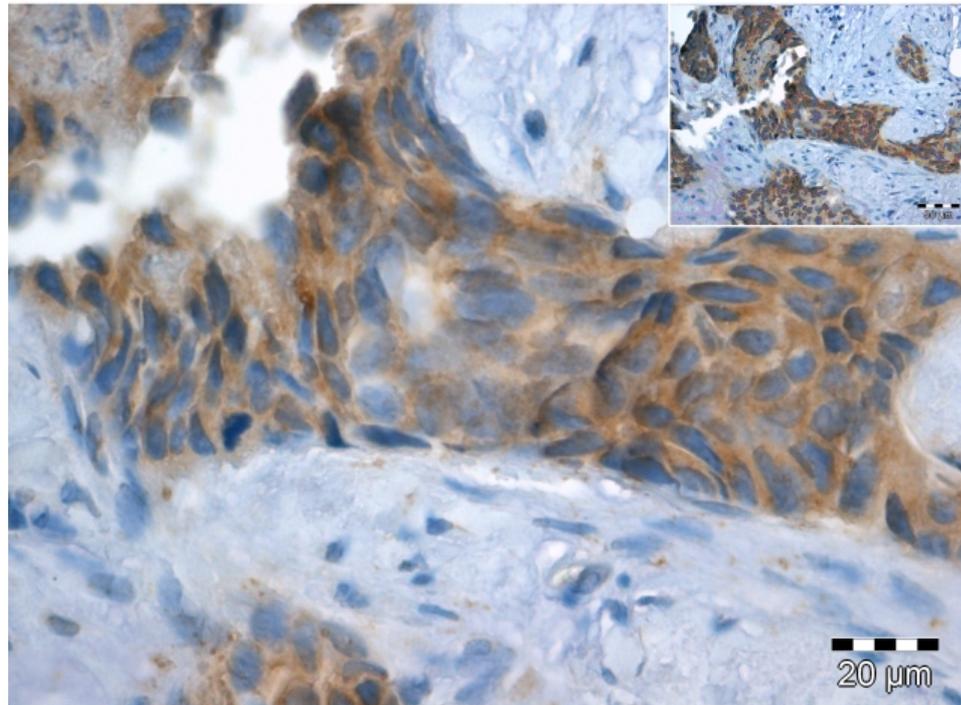


Abbildung 21: Inverse Korrelation zwischen der subzellulären HER-3-Expression im Mammakarzinom. Repräsentatives Beispiel für eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation von HER-3. Der IHC-Nachweis erfolgt wie schon in der vorherigen Abbildung beschrieben.

4.3.3 Vergleich der subzellulären Lokalisation *in vivo* und *in vitro*

Aus den vorherigen Kapiteln ist hervorgegangen, dass eine nukleäre Lokalisation von der Rezeptortyrosinkinase HER-3 in Mammakarzinomen relativ häufig ist und in etwa 42 % aller Tumorzellen auftritt, während kultivierte Brustkrebszellen nur in etwa 3 % aller Kerne HER-3 aufweisen. Aus diesem Grund wurde zunächst mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie überprüft, ob die bei nur einem kleinen Prozentsatz der MCF-7-Zellen auftretende nukleäre HER-3-Lokalisation bei der Untersuchung der geringst möglichen optischen Schnittdicke von 0,5 µm verifizierbar ist. Anschließend wurde zur besseren Darstellung des nukleären HER-3 ein konfokaler Laserscan entlang der z-Achse durchgeführt. Diese einzelnen Schnittebenen wurden mit Hilfe des Imaris-Programmes (Bitplane) zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet (Abbildung 22). Wie im 3D-Bild zu sehen ist (Abbildung 23) wurde in der dargestellten Zelle HER-3 hauptsächlich im Nukleoplasma nachgewiesen, was durch die Kolo-kalisation mit dem Kernfarbstoff DAPI untermauert wird. Zusätzlich wurde auch eine cytoplasmatische Expression detektiert.

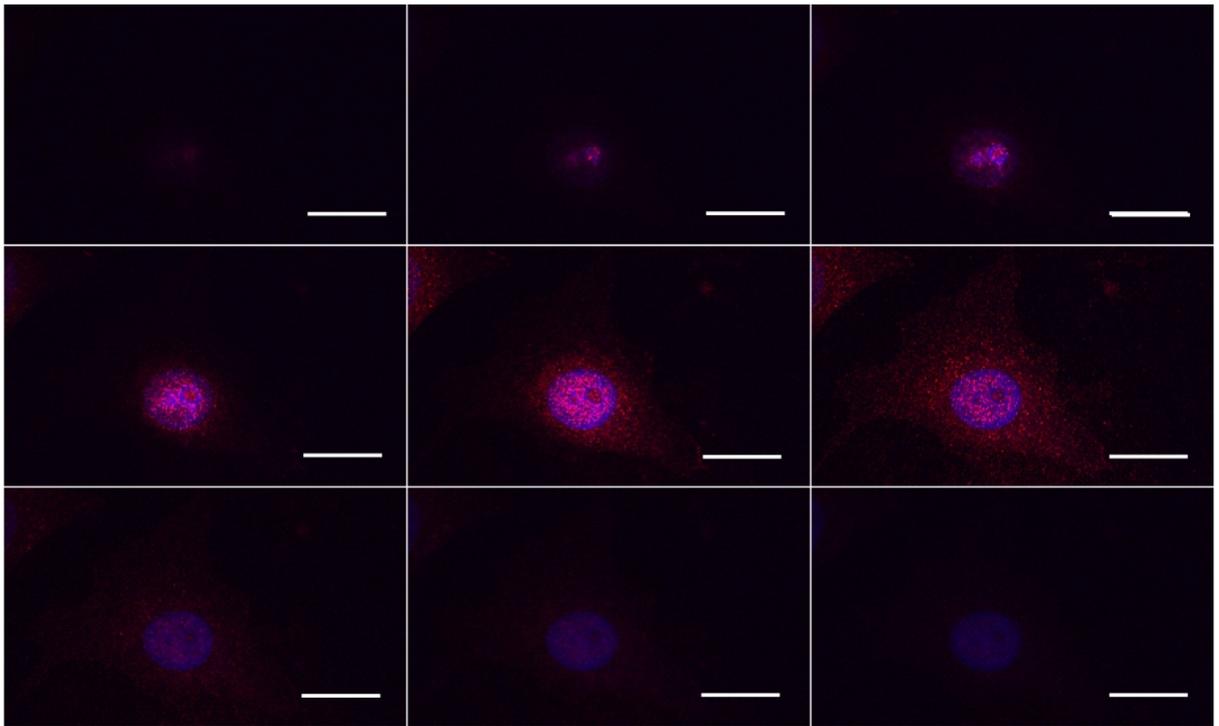


Abbildung 22: Konfokaler Laserscan entlang der z-Achse. MCF-7-Zellen mit nukleärem HER-3. HER-3-Expression (Cy3, rot). Kernfärbung mit DAPI (blau). Maßstabsbalken 20 µm.

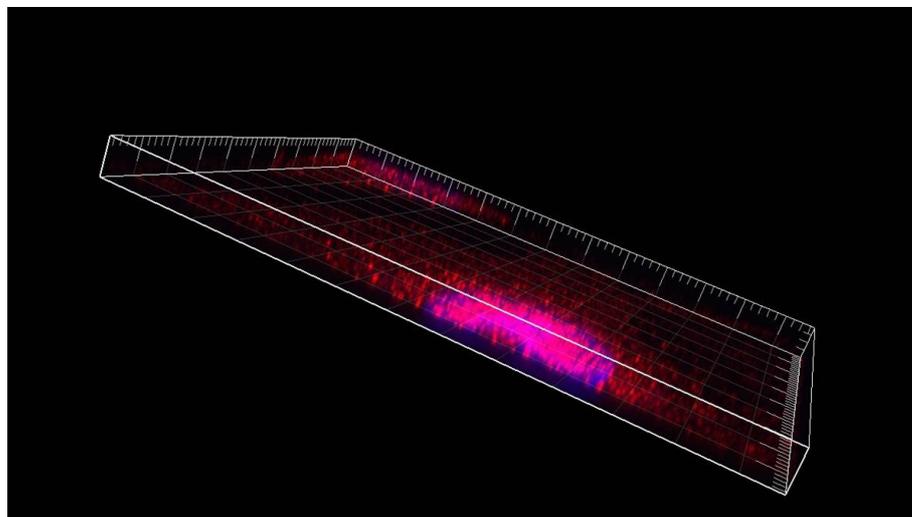


Abbildung 23: Dreidimensionale Darstellung von einer MCF-7-Zellen mit nukleärer HER-3-Expression. Als Grundlage für diese Darstellung dienten konfokale Laserscan-Schnitte (0,5 µm) entlang der z-Achse (siehe Abbildung 22).

Um auszuschließen, dass es sich möglicherweise um ein Fixierungsartefakt zu diesem Phänomen führt, wurden zusätzlich noch andere Fixierungen (Ethanol : Aceton, Ethanol : Essigsäure und Methanol) durchgeführt, die ein ähnliches Ergebnis wiedergaben (Abbildung 24).

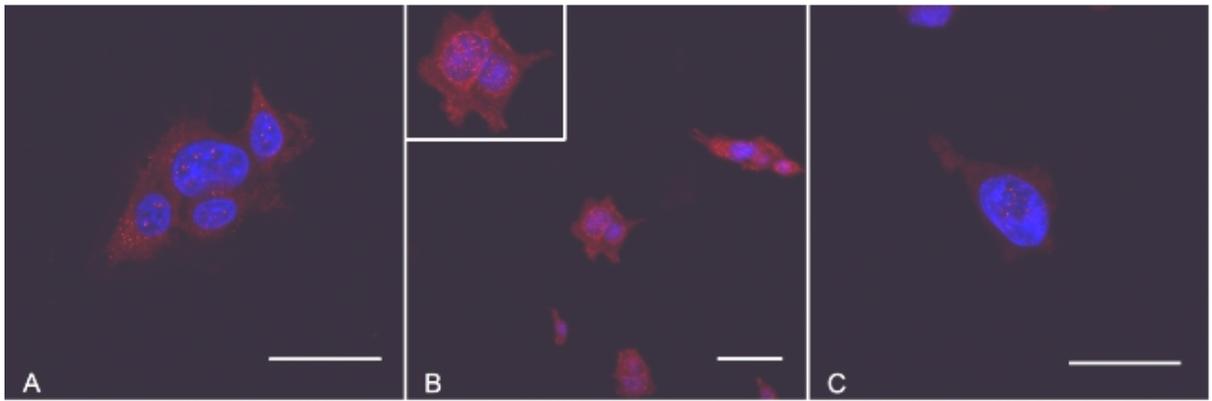


Abbildung 24: Repräsentatives Ergebnis eines IHC-Nachweises der Rezeptortyrosinkinase HER-3/c-erbB-3 in einer subkonfluenten MCF-7-Zellkultur. A Fixierung mit Ethanol:Aceton (-20°C, 5 min, 1:2). B Fixierung mit Ethanol:Essigsäure (RT, 5 min, 95 %:5 %). C Fixierung Methanol (-20°C, 5 min). HER-3-Expression (Cy3, rot). Kernfärbung mit DAPI (blau). A, C: Maßstabsbalken 30 µm, B: Maßstabsbalken 50 µm.

Nach der Verifizierung der Lokalisation von HER-3 im Zellkern, wurde auf die in den Tumoren gemachte Beobachtung näher eingegangen. Es stellt sich die Frage, ob die nukleäre Translokation von HER-3 ein Ereignis ist, das mit der Bildung eines dreidimensionalen Tumors assoziiert ist. Daher wurde das Ausmaß nukleärer HER-3-Lokalisation in kultivierten HeLa Zellen (Zervixkarzinom-Zelllinie) mit Tumoren in Nacktmäusen verglichen, die aus subkutan injizierten HeLa Zellen (6×10^6 Zellen pro Tier) hervorgegangen waren. Für diesen Vergleich wurden HeLa-Zellen in einer subkonfluenten Zelldichte (24 well-Kulturplatte, 25.000 Zellen pro well) ausgesät. Nach dem Adhärenz i.d.R. über Nacht wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und immunhistochemisch auf HER-3 hin untersucht. Die verwendeten Xenograft-Tumore wiesen einen Durchmesser von 1,5-1,8 cm (entspricht $1,7-2,0 \text{ cm}^3$) bei der Untersuchung auf. In Abbildung 25 ist das Ergebnis des konfokalen Laserscans der gefärbten HeLa-Kultur dargestellt. Die Zellen zeigen überwiegend eine cytoplasmatische HER-3-Expression. Zusätzlich zu diesem Erscheinungsbild wurden Zellen detektiert, die eine nukleäre Lokalisation von HER-3 aufweisen. Verglichen mit der untersuchten Brustkrebszelllinie MCF-7 (3 %) tritt dieses Ereignis häufiger (9 %) auf.

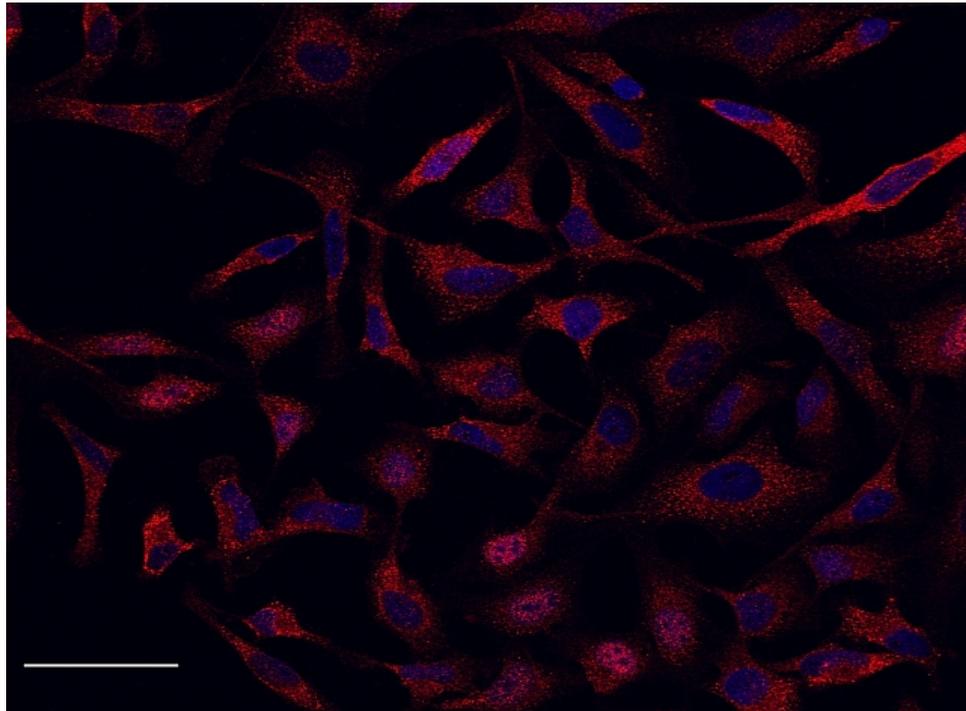


Abbildung 25: Cytoplasmatische und nukleäre HER-3-Expression in subkonfluent kultivierten HeLa-Zellen. Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) dargestellt. Maßstabsbalken 50 μm .

In Abbildung 26 wurden mehrere Beispiele der HER-3-Expression in aus HeLa-Zellen hervorgegangen Tumoren zusammengestellt. Neben HER-3 positiver Bereiche wurden auch negative Regionen im Tumorgewebe detektiert. Die Detailaufnahmen der positiven Bereiche in Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen deutlich die starke nukleäre HER-3-Expression, nur vereinzelt sind Zellen negativ.

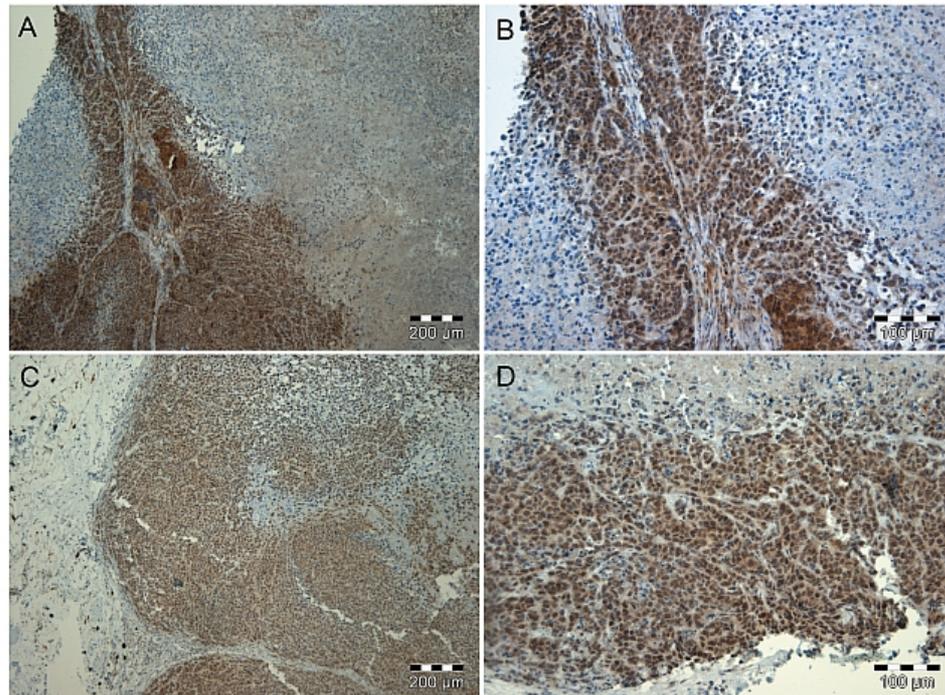


Abbildung 26: Massive nukleäre HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren entstanden aus einer Zervix-Karzinom-Zelllinie (HeLa) nach immunhistologischen Nachweis. Die Tumore wurden durch die subkutane Injektion von 6 Mio. HeLa-Zellen in Nacktmäuse gebildet. Nach Formierung wurden die Tumore in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Der Nachweis von HER-3 erfolgt über das ABC-System mit anschließender DAB-Visualisierung (braune Färbung). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. In den Tumoren sind große Bereiche positiv auf HER-3.

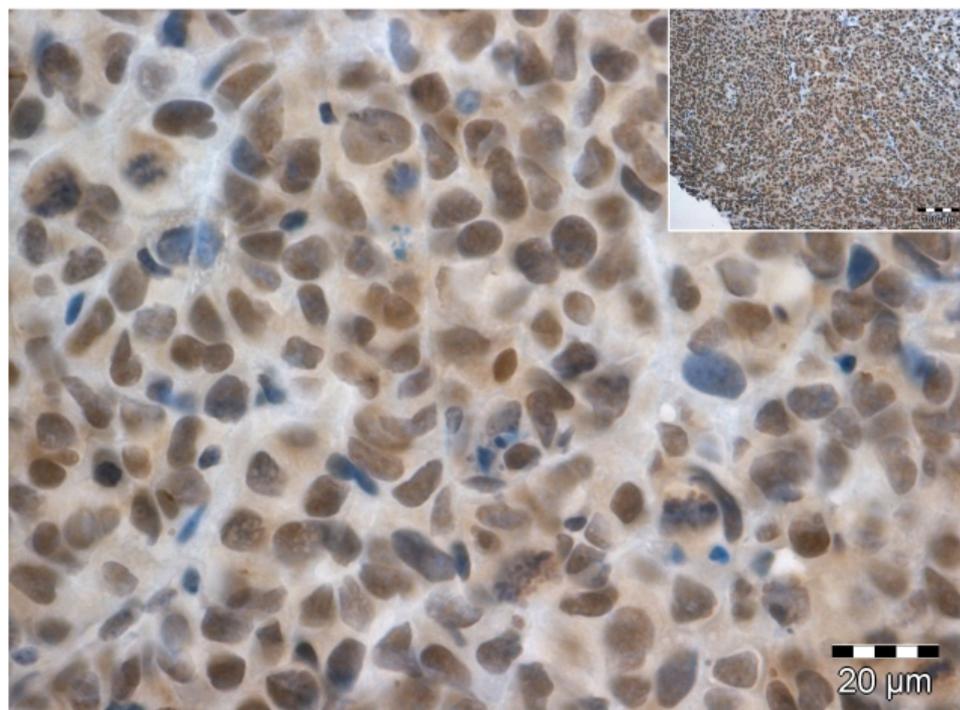


Abbildung 27: Detailaufnahme einer nukleären HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren hervorgegangen aus HeLa-Zellen.

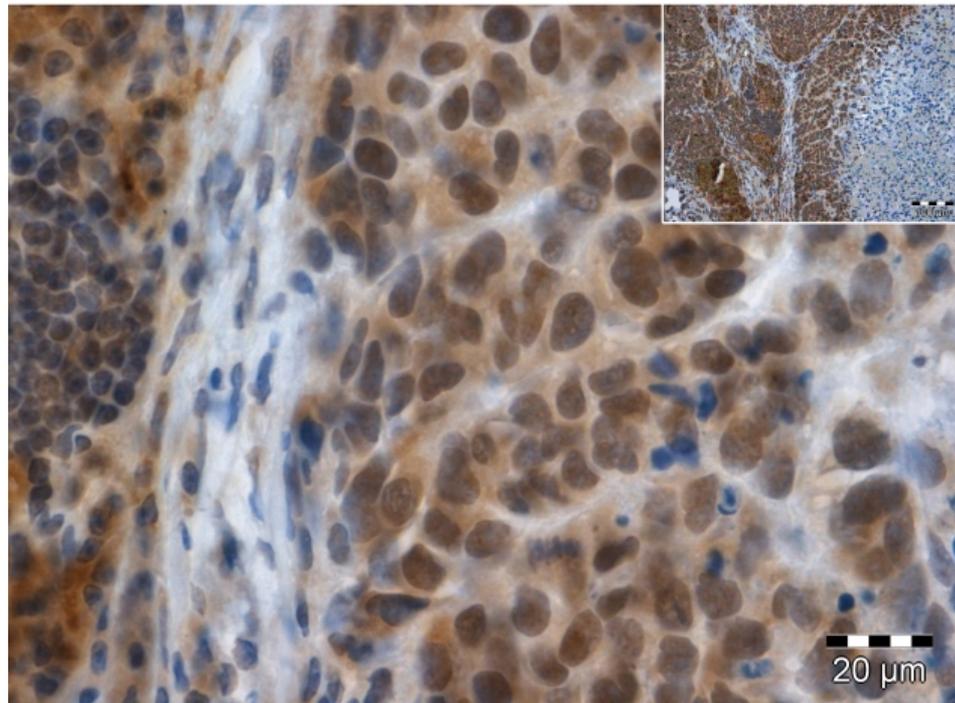


Abbildung 28: Detailaufnahme einer nukleären HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren hervorgegangen aus HeLa-Zellen.

Hiermit wurde bestätigt werden, dass in Folge der Tumorbildung im Vergleich zu den kultivierten Zellen der Anteil der HER-3 im Zellkern aufweisender Zellen stark zunimmt. Dieses Phänomen wurde an einem zweiten Zelltyp überprüft. Auch für NIH3T3-Zellen (Mausfibroblasten) wurde ein ähnlicher Zusammenhang gefunden. Dazu wurden ebenfalls NIH3T3-*her-2*-Zellen im 24-well-Format (25.000 Zellen pro well) kultiviert und nach Fixation immunhistologisch auf die HER-3-Expression analysiert. Parallel dazu wurden Tumore untersucht, die nach subkutaner Injektion von 6×10^6 Zellen in 100 μ l PBS in Nacktmäuse (nu/nu, Charles River, Sulzfeld) gebildet wurden sind. Diese Zellen überexprimieren konstitutiv mit Hilfe des tet-off-Systems (Gossen and Bujard, 1992) das humane HER-2 (Hermes et al., 2008; Schiffer et al., 2003). Das Ergebnis der *in vitro* Untersuchung ist in Abbildung 29 abgebildet. Die Zellkultur zeigt, dass nur vereinzelt eine nukleäre Lokalisation zu detektieren ist. Das Ereignis der nukleären HER-3-Expression in den Tumoren tritt weitaus häufiger aus als in *in vitro*. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass in Folge der Tumorbildung aus Zelllinien HER-3 in den Zellkern transloziert.

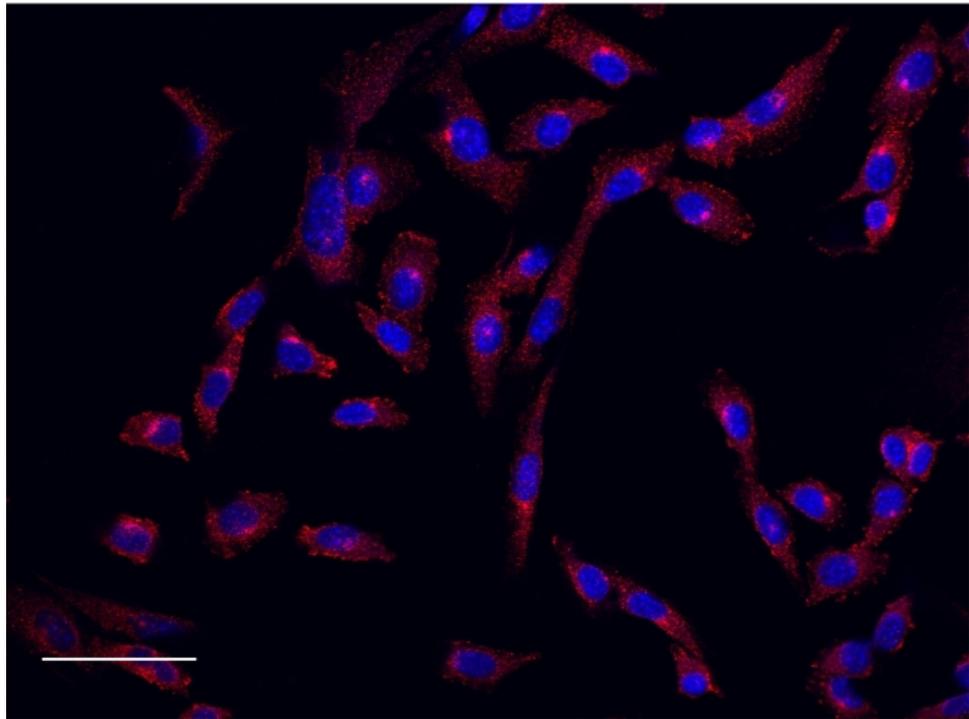


Abbildung 29: Cytoplasmatische HER-3-Expression in subkonfluent kultivierten NIH3T3-*her-2*-Mausfibroblasten. Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) dargestellt. Maßstabsbalken 50 μm .

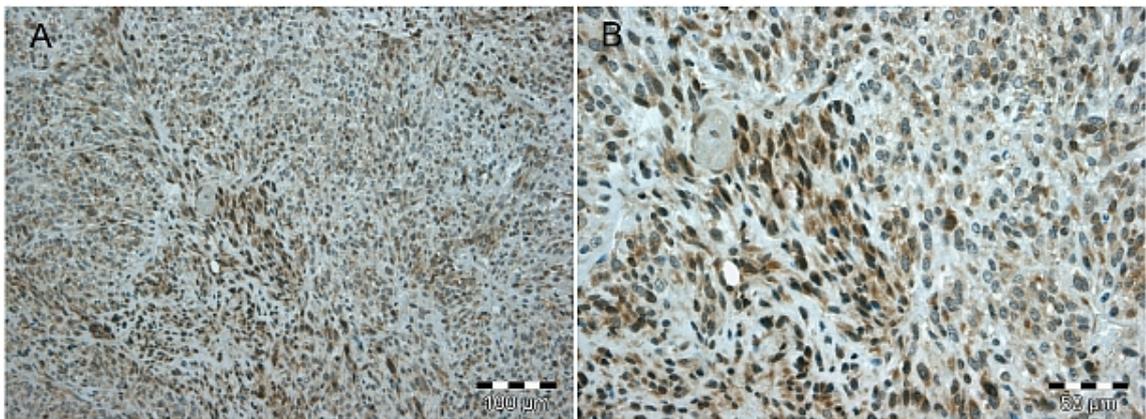


Abbildung 30: Starke nukleäre HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren entstanden aus einer Mausfibroblasten-Zelllinie (NIH3T3-*her-2*) nach immunhistologischen Nachweis. Die Tumore wurden durch die subkutane Injektion von 6 Mio. NIH3T3-*her-2*-Zellen in Nacktmäuse gebildet. Nach Formierung wurden die Tumore in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Der IHC-Nachweis von HER-3 erfolgt wie schon in der Abbildung 26 beschrieben.

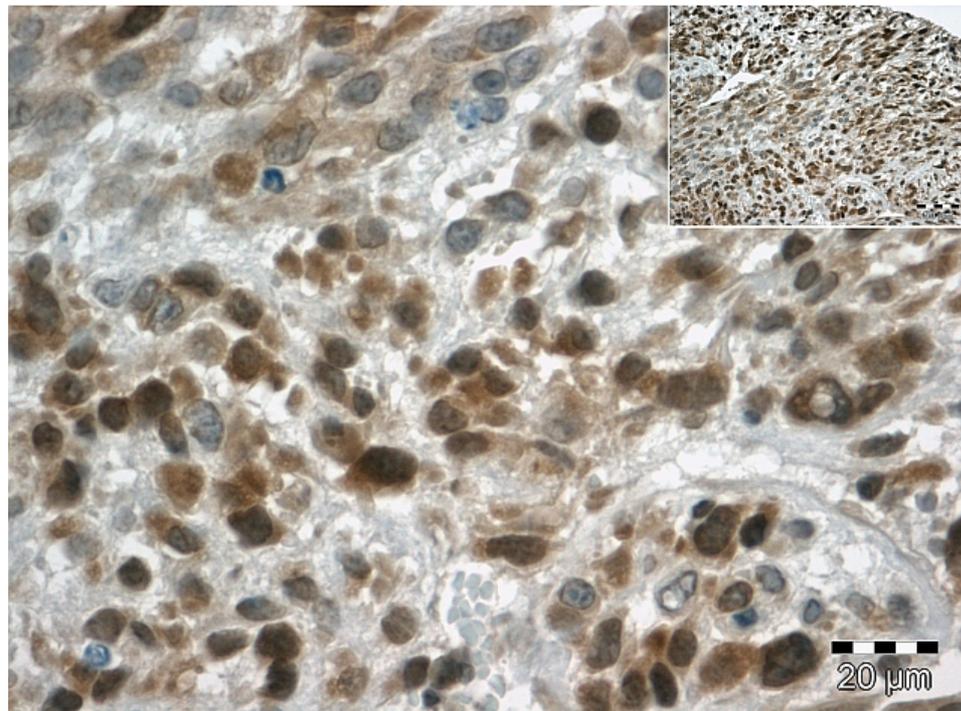


Abbildung 31: Detailaufnahme eines HER-3-Expressionsnachweises in Xenograft-Tumoren entstanden durch die transgene Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3-*her-2*.

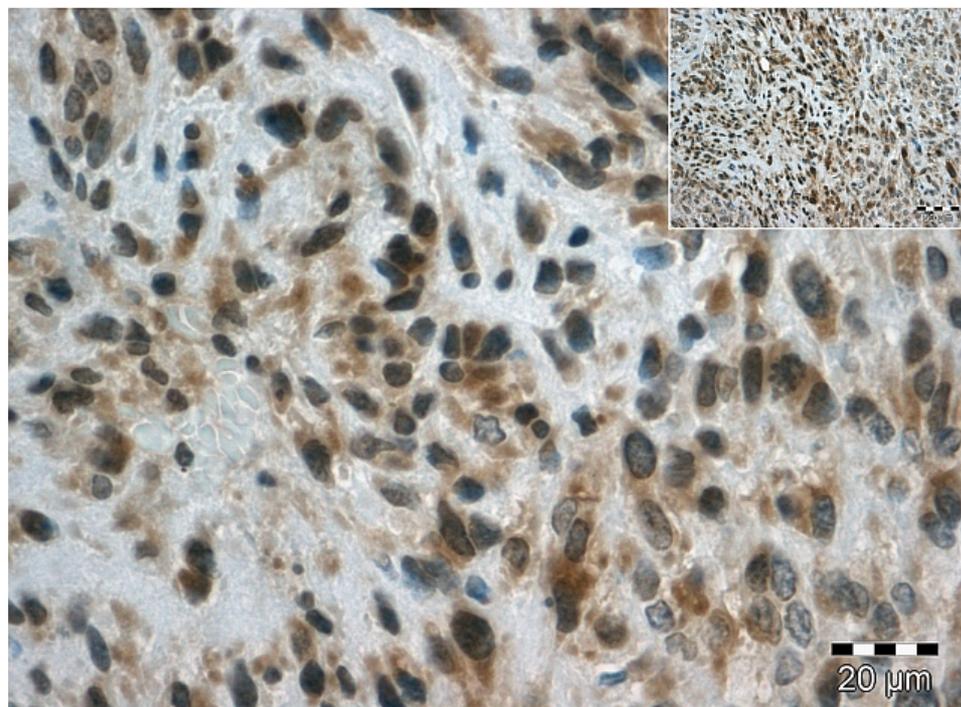


Abbildung 32: Detailaufnahme eines HER-3-Expressionsnachweises in Xenograft-Tumoren entstanden durch die transgene Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3-*her-2*.

4.3.4 Depletion von ATP induziert die nukleäre Akkumulation von HER-3 *in vitro*

4.3.4.1 ATP-Depletion

Um die im vorherigen Kapitel beobachtete nukleäre Translokation zu erklären, wurden Überlegungen angestellt, welche Mechanismen diesen Prozess forcieren könnten. Eine Eigenschaft vieler Tumore ist ein Mangel an ATP im Tumorgewebe (Eskey et al., 1993; Reilly and Maher, 2001; Vaupel et al., 1989). Daher wurde untersucht, ob durch ATP-Depletion eine nukleäre Translokation von HER-3 herbeigeführt werden kann. Für diesen Versuch wurden MCF-7 und HeLa-Zellen subkonfluent ausgestreut und nach 24 Stunden Adhäsion nach einem Standardprotokoll (Reilly and Maher, 2001) mit dem ATPase-Inhibitor Oligomycin B (50 μ M) und mit 2-Deoxy D-Glucose (6 mM) für 4 h bei 37 °C in Glucose-freiem Medium inkubiert. Um zu überprüfen, ob Oligomycin B den F_0 -Teil der in der Mitochondrien-Membran integrierten ATP-Synthase hemmt, wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt bestimmt. Dazu wurde eine luminometrische ATP-Bestimmung unter Verwendung des Enzyms Luziferase herangezogen. Durch die Inhibition wurde der anfängliche ATP-Gehalt von 7856 ng/ml pro μ g Protein durch Oligomycin B und 2-Deoxy D-Glucose auf 8 ng/ml ATP pro μ g Protein reduziert. Nach Abschluss der Inkubation wurde ein immunhistochemischer Nachweis auf HER-3 durchgeführt. Parallel dazu wurde immer eine entsprechende Kontrolle, ohne Inhibitoren mitgeführt. Der Energieentzug in Form von ATP verursacht morphologische Veränderungen, was sich in einem Schrumpfen des Zellkörpers und Zellkerns bemerkbar machte. Wie in Abbildung 33 B zu sehen ist, zeigen depletierte MCF-7-Zellen keine cytoplasmatische HER-3-Expression. In Folge der ATP-Depletion wiesen sie auch relativ kleine Zellkerne auf. Dieses Phänomen wurde bei den ATP-depletierten HeLa-Zellen in diesem Ausmaß nicht beobachtet (Abbildung 34 B). Des weiteren unterscheiden sich die Brustkrebszellen von den Zervixkarzinom-Zellen darin, dass sie im depletierten Zustand eine cytoplasmatische HER-3-Expression aufweisen.

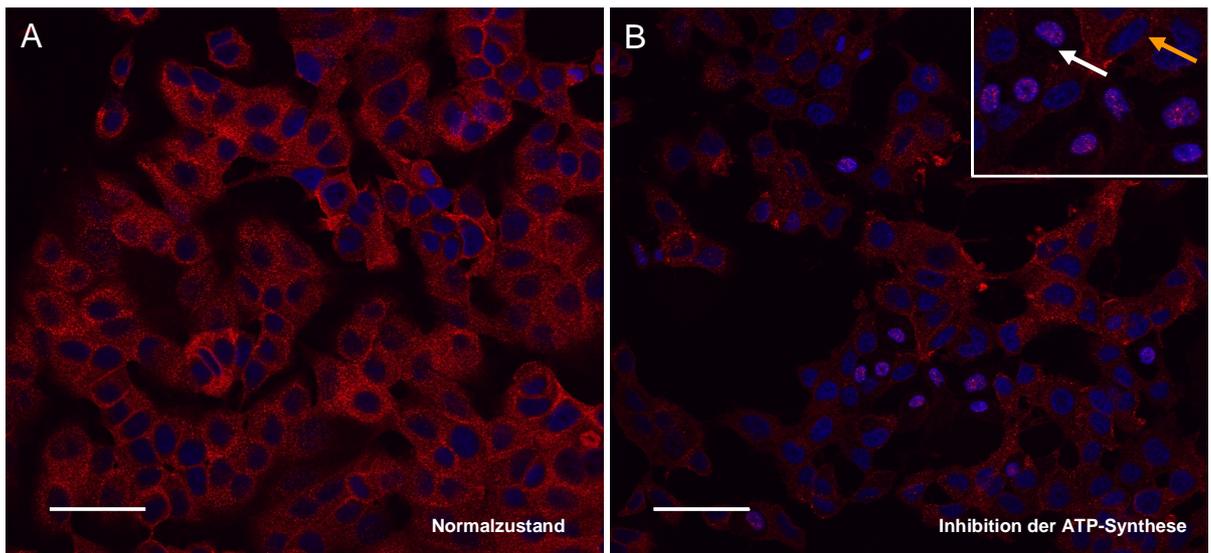


Abbildung 33: ATP-Depletion durch Oligomycin B ($50 \mu\text{M}$) und 2-Deoxy D-Glucose (6 nM) für 4 h induziert die Akkumulation von HER-3 in MCF-7-Zellen. Kontrolle (A). Inhibition der ATP-Synthese durch Oligomycin B und 2-Deoxy D-Glucose (B). Der weiße Pfeil im Inset der Abbildung B zeigt eine depletierte Zelle, die keine HER-3-Expression im Cytoplasma aufweist. Das Cytoplasma erscheint „leer“. Dagegen deutet der gelbe Pfeil auf eine Zelle hin, die dem Normalzustand (Kontrolle) entspricht. Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) dargestellt. Maßstabsbalken $50 \mu\text{m}$.

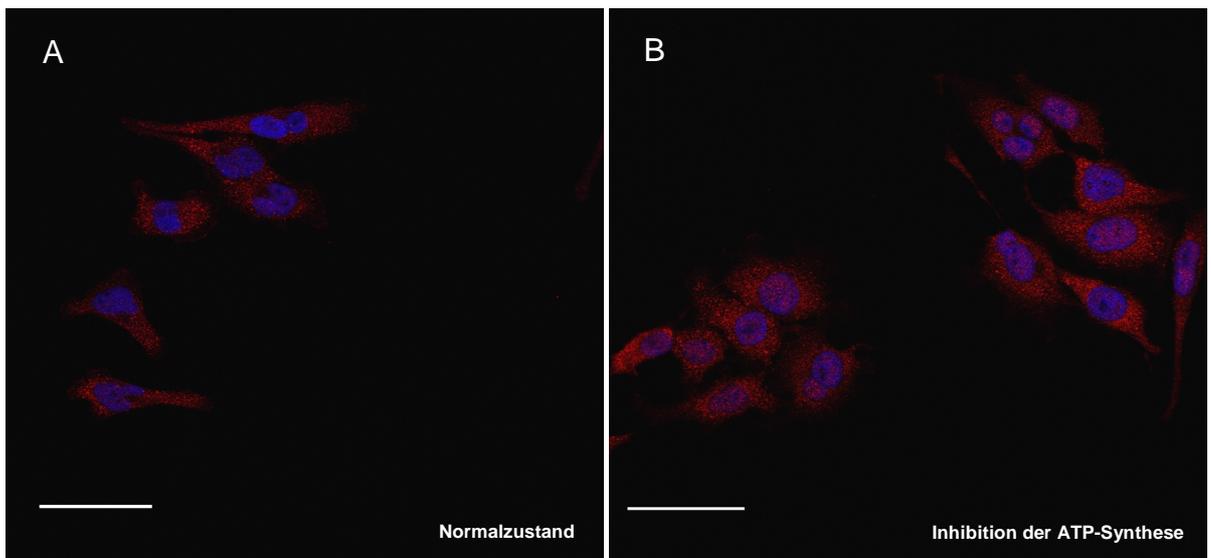


Abbildung 34: ATP-Depletion durch Oligomycin B ($50 \mu\text{M}$) und 2-Deoxy D-Glucose (6 nM) für 4 h induziert die Akkumulation von HER-3 in HeLa-Zellen. Kontrolle (A). Inhibition der ATP-Synthese durch Oligomycin B und 2-Deoxy D-Glucose (B). Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) dargestellt. Maßstabsbalken $50 \mu\text{m}$.

4.3.5 Depletion von Glucose induziert die nukleäre Akkumulation von HER-3 *in vitro*

4.3.5.1 Glucose-Depletion

Ein weiteres Merkmal solider Tumore ist, dass sie einen hypoglykämischen Zustand im Vergleich zum Normalgewebe aufweisen (North et al., 2005). Aus diesem Grund wurde folgender Versuch durchgeführt, um durch Glucose-Mangel eine nukleäre Translokation von HER-3 herbeizuführen. Dazu wurden sowohl HeLa als auch MCF-7-Zellen in subkonfluenter Zelldichte in einem 24-well-Platten-Format im Vollmedium ausgestreut. Nach 24 Stunden wurde das Vollmedium durch Glucose-freies Medium ersetzt und weiter kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und ein immunhistologischer HER-3-Nachweis durchgeführt. Das Ergebnis dieser Färbung wurde für MCF-7-Zellen in Abbildung 35 und für HeLa-Zellen in Abbildung 36 dargestellt. Durch den Glucose-Entzug wurde nach 4 Stunden eine vermehrte HER-3-Translokation in der HeLa-Zelllinie beobachtet, im Gegensatz zur Brustkrebszelllinie MCF-7, die nach 120 Stunden ohne Glucose keine nukleäre HER-3-Expression aufweist.

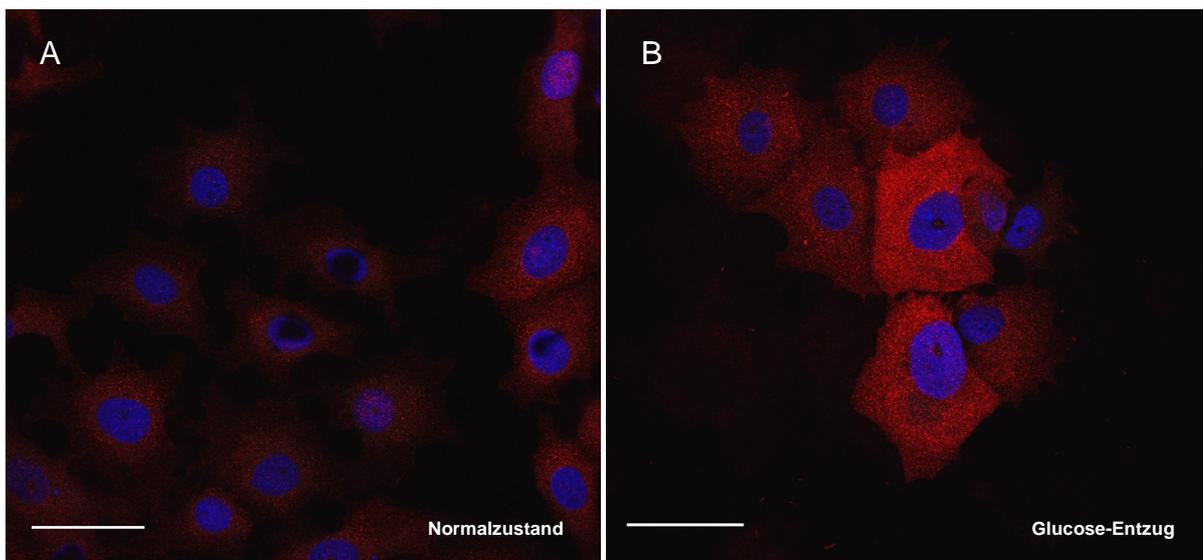


Abbildung 35: Glucose-Depletion verursacht keine gesteigerte HER-3-Expression im Zellkern bei subkonfluenten MCF-7-Zellen. Die Zellen wurden über 120 Stunden im Glucose-freiem Medium kultiviert. Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) dargestellt. Maßstabsbalken 50 μm .

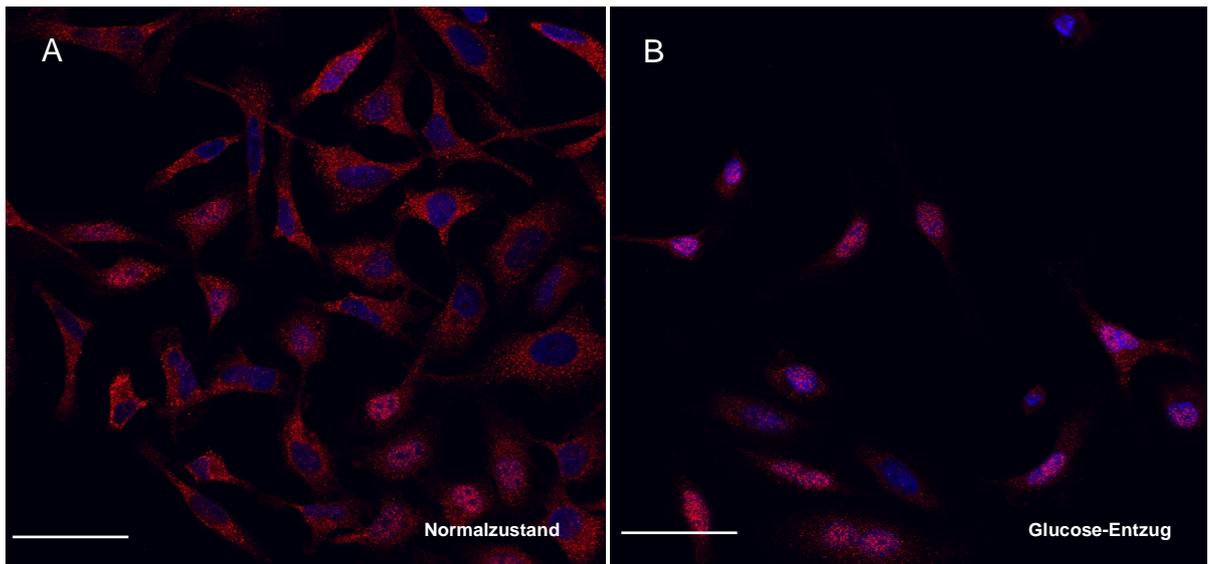


Abbildung 36: Nukleäre Akkumulation von HER-3 durch den Entzug von Glucose bei subkonfluent kultivierten Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa-Zellen). Durch konfokalen Laserscan wurde die HER-3-Expression (Cy3, rot) und Kernfärbung (DAPI, blau) visualisiert. Maßstabsbalken 50 μm .

4.4 Subzelluläre Lokalisation von HER-3 *in vitro*

Um das Expressionsmuster von HER-3 *in vitro* zu analysieren, wurde die Brustkrebszelllinie MCF-7 immunhistologisch auf HER-3 untersucht. Nach Aussaat der Zellen im 24-well-Platten-Format (25.000 Zellen pro well, subkonfluent und 100.000 Zellen pro well, konfluent) wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und nach dem Protokoll, wie im Kapitel 3.3.2 beschrieben, immunhistologisch gefärbt. Durch konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde sowohl die konfluente als auch die subkonfluente Kultur mikroskopisch analysiert. Das HER-3-Expressionsmuster bei der konfluenten Zellkultur zeigt in Abbildung 37 A eine typisch epitheliale Morphologie, die so genannte „Kopfsteinmuster“-Morphologie („cobblestone“). Die HER-3-Expression ist sowohl cytoplasmatisch als auch membranär in der Immunhistochemie nachweisbar. Dagegen wurde (Abbildung 37) bei der subkonfluenten Kultur ein eher heterogener Phänotyp der Zellen beobachtet. Die Zellen zeigen eine HER-3 Expression im Cytoplasma und eine schwache membranäre Lokalisation von HER-3. Zusätzlich zu diesen beiden Hauptentitäten wurde das Phänomen beobachtet, dass Zellen HER-3 im Nukleus aufweisen.

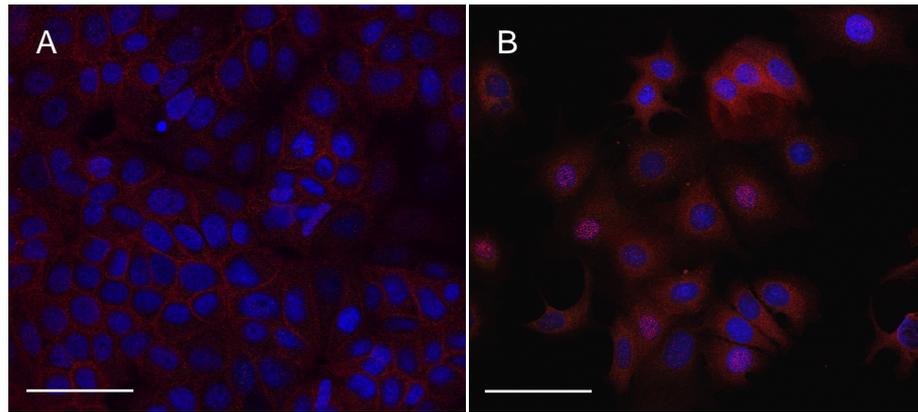


Abbildung 37: Repräsentatives Ergebnis eines immunhistologischen Nachweises der Rezeptortyrosinkinase HER-3/c-erbB-3 in konfluenter (A) und subkonfluenter (B) MCF-7-Kultur. HER-3-Expression (Cy3, rot). Kernfärbung mit DAPI (blau) Maßstabsbalken 50 μ m

4.5 Mögliche Einflussgrößen der subzellulären Lokalisation von HER-3 in vitro (am Beispiel der Brustkrebszelllinie MCF-7)

4.5.1 Nukleäre HER-3 Expression in Abhängigkeit der Zelldichte

Wie schon in der Immunhistochemie zu sehen, wurde bei der konfluenten Zellkultur (Abbildung 37 A) kein nukleäres HER-3 nachgewiesen. Dagegen wurde bei der subkonfluenten Kultur (Abbildung 37 B) vermehrt nukleäres HER-3 detektiert. Dies lässt die Vermutung zu, dass die nukleäre HER-3-Expression abhängig von der Zelldichte ist. Für diesen Nachweis wurden MCF-7 Zellen verschieden dicht im Vollmedium ausgestreut (75 cm² Zellkulturflasche) und nach 24 h in Cytosol und Nukleus fraktioniert. In Abbildung 38 ist das Ergebnis des Immunoblots dargestellt. Wie zu sehen ist, kommt es zur Abnahme des nukleären HER-3 in Abhängigkeit von der Zelldichte. Je konfluenter die Kultur ist, desto weniger HER-3 wurde im Zellkern detektiert.

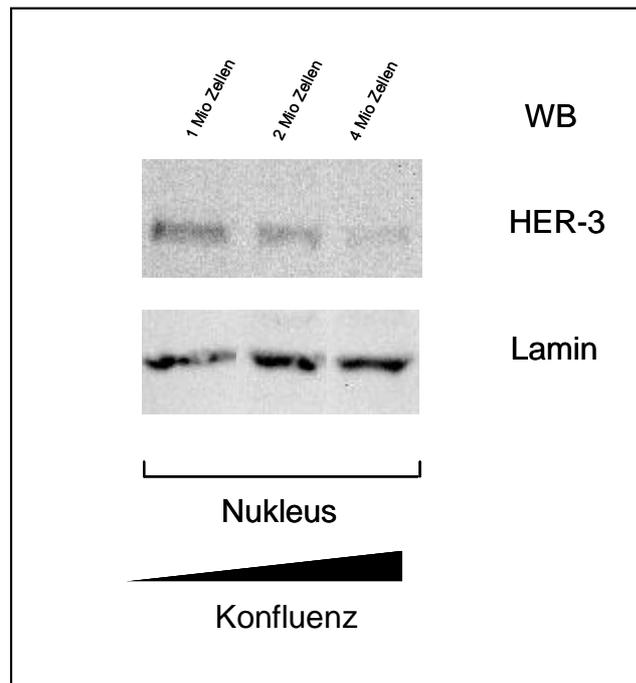


Abbildung 38: Nukleäre HER-3-Expression bei verschiedenen Zellkonfluenzen. MCF-7-Zellen wurden in verschiedenen Zelldichten (1 Mio, 2 Mio, 4 Mio) in Kultur genommen. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und subzellulär fraktioniert. Bei Zellernte betrug das Ausmaß der Konfluenz etwa 50 % bei Aussaat von 1 Mio. Zellen, 70 % bei Aussaat von 2 Mio. Zellen und 100 % bei 4 Mio. Zellen. Pro Lane wurden 50 µg der Zellkernfraktion auf ein 10 % Arcylamid-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion wurde mit einem HER-3 Antikörper durchgeführt.

4.5.2 Einfluss der Ligand-abhängigen Aktivierung von HER-3 auf die subzelluläre Lokalisation

Die Mitglieder der ErbB-Familie weisen eine extrazelluläre Ligand - und Dimerisierungsdomäne, eine transmembrane Region und einen intrazellulären Bereich auf. Nach erfolgter Ligand-Stimulation mit Neuregulin (β_1 -HRG) wird die Heterodimerisierung von HER-3 oder HER-4 mit HER-2 induziert, gefolgt von der N-terminalen Phosphorylierung. Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden unter anderem der MAPK- und PI-3K/AKT-Signalweg aktiviert. Der eigentlichen Analyse der Ligand-Stimulation wurde eine Überprüfung der Stimulierbarkeit der MCF-7-Zellen durch β_1 -HRG vorangestellt. Dazu wurden zum einen der MAPK-Signalweg und zum anderen die PI-3K/AKT Signalkaskade als Kontrollpunkte gewählt. Im Speziellen wurde für den MAPK-Signalweg die phosphorylierte Form von ERK1/2 gewählt. Dagegen wurde bei der PI-3K/AKT-Signalkaskade das Protein p85, eine Untereinheit von PI-3K verwendet, die sechs spezifische Bindungsstellen für HER-3 aufweist.

Für den MAPK-Signalweg wurde folgender Versuch durchgeführt. MCF-7-Zellen wurden in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in einer Kulturflasche (75 cm^2) ausgesät. Nach dem Adhärenz wurden die Zellen für 24 Stunden in einem Hungermedium (ohne FCS) kultiviert. Im Anschluss wurde mit 50 ng/ml β_1 -HRG für 60 min bei 37°C stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und wie im Kapitel 3.4.1 beschrieben aufgearbeitet. Vom Lysat wurden $50 \mu\text{g}$ elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Es wurde zum einen das Gesamt-ERK1/2 (Isoformen p42/p44, 42/44 kDa) und zum anderen die phosphorylierte Form des ERK1/2-Proteins mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Wie Abbildung 39 zeigt, wurde nach β_1 -HRG-Stimulation (+ β_1 -HRG) die aktive Form von ERK im Immunoblot detektiert. Dagegen wurde im unstimulierten Zustand (\emptyset β_1 -HRG) kein phosphoryliertes ERK nachgewiesen.

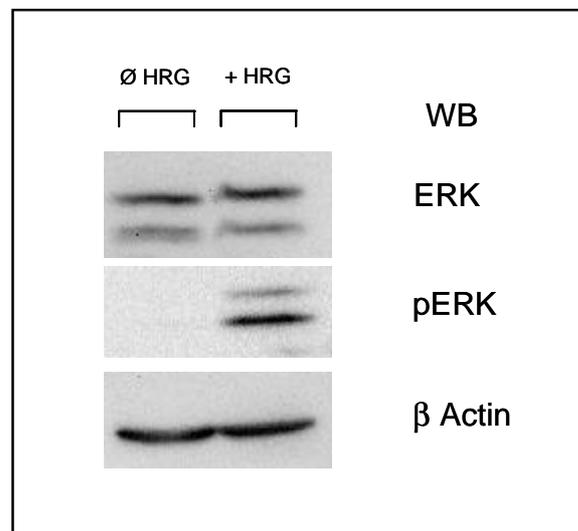


Abbildung 39: MAPK-Signalweg. MCF-7-Zellen wurden mit (+) β_1 -HRG (50 ng/ml , 60 min, 37°C) und ohne (-) β_1 -HRG behandelt. Nach der Ernte wurden pro Lane $50 \mu\text{g}$ Zelllysate in einem 10% Arcylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion wurde mit ERK und pERK Antikörpern durchgeführt. β -Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

Die Rezeptortyrosinkinase HER-3 führt zur Aktivierung des PI-3K/AKT-Signalwegs indem HER-3 unmittelbar an PI-3K bzw. an p85, eine Untereinheit der PI-3K, bindet. Diese Interaktion von p85 (85 kDa) an HER-3 (185 kDa) nach erfolgter β_1 -HRG-Stimulation wurde über eine Co-Immunpräzipitation verfolgt. Dazu wurden die Zellen ebenfalls in Kulturflaschen ausgestreut (75 cm^2), 24 h gehungert und mit β_1 -HRG (50 ng/ml , 60 min, 37°C) stimuliert. Danach wurde im Gesamtzelllysate mit einem HER-3 Antikörper das Protein HER-3 und alle möglichen Interaktionspartner immunpräzipitiert bzw. isoliert. Nach erfolgter Immunpräzipitation mit dem HER-3-Antikörper wurde eine Gelelektrophorese und

ein entsprechender Immunoblot durchgeführt. Zuerst wurde die Membran mit dem p85-Antikörper inkubiert. Danach wurde der p85-Antikörper von der Membran befreit („Stripping“) und erneut mit dem HER-3-Antikörper inkubiert. Dies wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob HER-3 erfolgreich von dem HER-3-Antikörper präzipitiert wurde. Als Kontrolle der Immunpräzipitation wurde ein IgG-Antikörper aus der Spezies des Primärantikörpers (hier: Kaninchen) mitgeführt. Das Ergebnis der Co-Immunpräzipitation zeigt, dass durch HRG eine Interaktion zwischen p85 mit der Rezeptortyrosinkinase HER-3 stattfindet, da im Immunoblot ein Signal nach p85-Antikörper-Inkubation detektiert wurde (Abbildung 40).

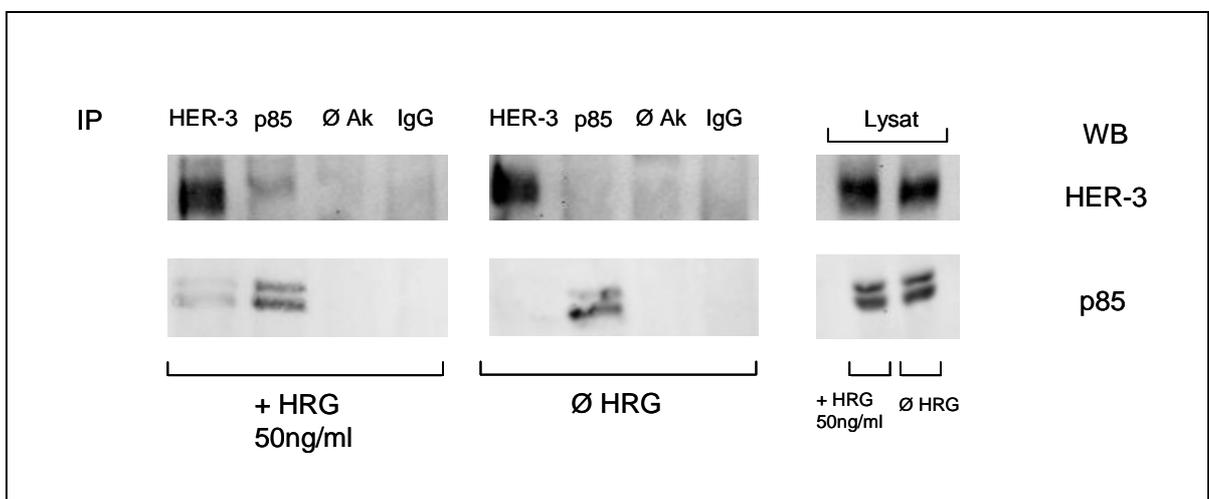


Abbildung 40: AKT/PI-3K-Signalweg. MCF-7-Zellen wurden mit (+) β_1 HRG (50 ng/ml, 60 min, 37°C) und ohne (-) β_1 HRG behandelt. Im Anschluß wurde eine Co-Immunpräzipitation sowohl mit HER-3 als auch mit p85 durchgeführt. Die Separation wurde in einem 10% Arcylamid-Gel durchgeführt. Für den Transfer wurde eine PVDF-Membran verwendet.

Die Stimulierbarkeit der AKT und ERK Signaltransduktionswege der Brustkrebszelllinie wurden durch diese Vorexperimente bestätigt. Nun wurde untersucht, ob die nukleäre Lokalisation von HER-3 ein Ligand-abhängiges Ereignis darstellt und es zu einer Steigerung der Translokation in den Zellkern kommt. Zu diesem Zweck wurde die Brustkrebszelllinie MCF-7 in einer Zelldichte von $3,0 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche (75 cm^2) im Vollmedium ausgesät. Um eine niedrige Grundaktivität der Zellen zu erreichen, wurden die Zellen für 24 Stunden in einem Hungermedium kultiviert. Nach dieser Hungerphase wurden die Zellen mit dem HER-3 Ligand β_1 -HRG in einer Konzentration von 50 ng/ml für verschiedene Zeitpunkte (5, 15, 30, 60 und 90 min) bei 37°C stimuliert (Abbildung 41). Nach Stimulation wurden die Zellen in die Zellkompartimente Cytosol und Nukleus nach der Methode von (Slosberg et al., 1999) fraktioniert. Sowohl die cytosolische als auch die

nukleäre Fraktionen wurden im Immunoblot auf phosphoryliertes (pHER-3) und Gesamt-HER-3 (HER-3) hin untersucht. Auf Proteinebene zeigte sich, dass nach zeitabhängiger Ligand-Stimulation (+ β_1 -HRG) in beiden Zellkompartimenten HER-3 detektiert wurde. Im Cytosol ist das Expressionsniveau von HER-3 wesentlich stärker und zeigt in den frühen Zeitpunkten (5-30 min) einen leichten Anstieg. Dagegen wurde im Nukleus nur ein gleichmäßig schwaches Signal von HER-3 detektiert. Wie zu erwarten, kam es nach β_1 -HRG-Inkubation zu einer Phosphorylierung von HER-3 im Cytosol. Dies steht im Gegensatz zu den Nukleus-Fractionen, in denen kein phosphoryliertes HER-3 detektiert wurde. Die Fraktionen wurden bezüglich etwaiger Verschleppungen mit entsprechenden Antikörpern gegen spezifische Markerproteine kontrolliert. Für das Cytosol wurde alpha-Tubulin (52 kDa) und für die nukleäre Fraktion Lamin A/C (64/72 kDa) gewählt. Diese Resultate zeigen, dass der Prozess der Translokation von HER-3 in den Zellkern Ligand-unabhängig ist. Stimulation mit β_1 -HRG führt nicht zu einer vermehrten Anhäufung von HER-3 im Nukleus.

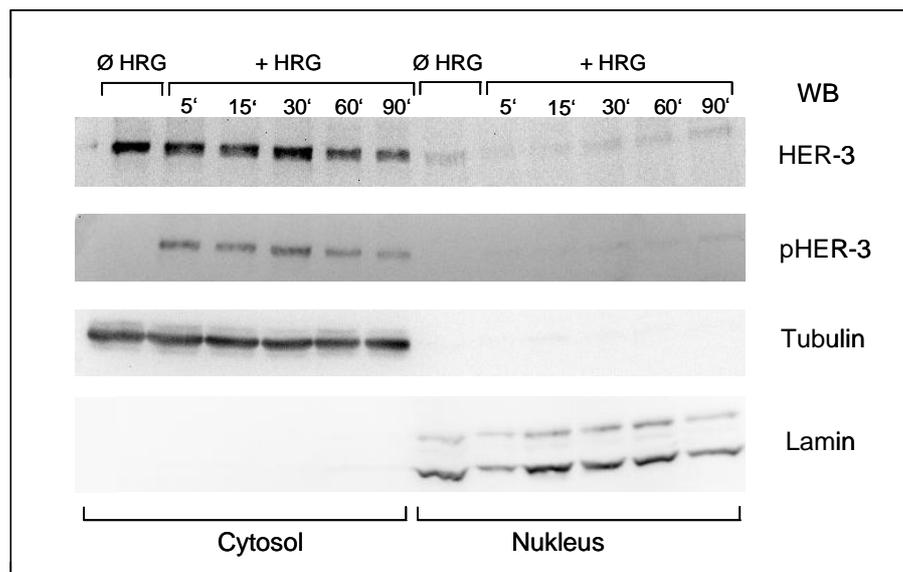


Abbildung 41: Ligand-abhängige Stimulation. MCF-7-Zellen wurden mit (+) β_1 -HRG (50 ng/ml, 37°C) zu bestimmten Zeitpunkten behandelt. Nach der Ernte wurde in Cytosol und Nukleus fraktioniert. Pro Lane wurden 50 μ g der Fraktion in einem 10% Arcylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion wurde mit HER-3 und pHER-3-Antikörpern durchgeführt. Die Fraktionen wurden mit spezifischen Marker-Proteinen überprüft.

4.5.3 Einfluss der Ligand-unabhängigen Aktivierung von HER-3 auf die subzelluläre Lokalisation

Der Ligand-abhängigen Aktivierung steht die Ligand-unabhängige Aktivierung gegenüber, die durch genotoxischen Stress induziert werden kann. Von Dittmann et al., (2005) wurde gezeigt, dass das Zytostatikum Cisplatin eine nukleäre Lokalisation des EGFR herbeiführt. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde in den nachstehenden Versuchen untersucht, ob auch eine Translokation von HER-3 in den Zellkern nach Cisplatin-Behandlung (Cis-Gry) eintritt. Dazu wurde die Brustkrebszelllinie MCF-7 in einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm^2) im Vollmedium ausgestreut. Nach 24 h wurden die Zellen mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen ($0 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $12,5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und in die Zellkompartimente Cytosol und Nukleus separiert. In der Abbildung 42 wurde die Expression von HER-3 in der Zellkernfraktion nach konzentrationsabhängiger Cisplatin-Einwirkung im Immunoblot dargestellt. In den ersten Konzentrationen ($2,5 \mu\text{M}$ - $10 \mu\text{M}$) wurde kein Anstieg im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert. Dagegen wurde eine erhöhte Expression von HER-3 bei der Konzentration von $12,5 \mu\text{M}$ gemessen. Bei der höchsten Konzentration wurde eine starke Abnahme beobachtet.

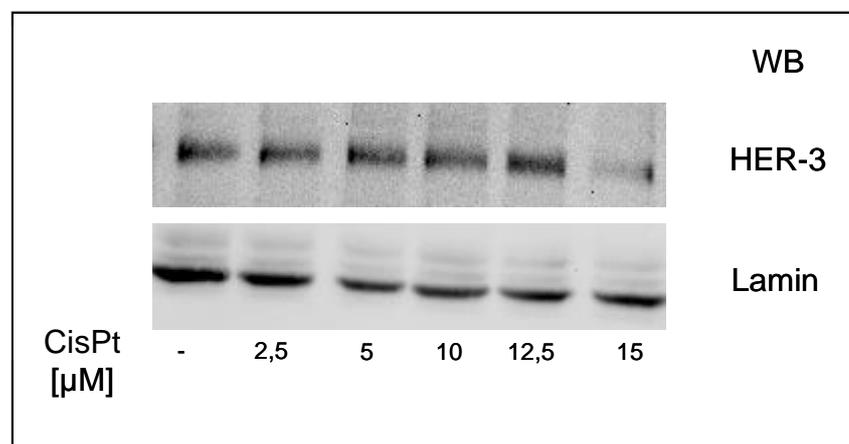


Abbildung 42: Konzentrationsabhängige Cisplatin-Exposition und nukleäre HER-3-Expression. MCF-7 Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen bei 37°C im Vollmedium inkubiert. Nach Cisplatin (CisPt)-Gabe wurde die nukleäre HER-3-Expression im Immunoblot untersucht. Als Ladungskontrolle wurde Lamin verwendet.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde anschließend eine zeitabhängige Cisplatin-Exposition durchgeführt. Dazu wurden MCF-7-Zellen (3×10^6 Zellen pro 75 cm^2 Kulturflasche) mit der effektstärksten Cisplatin-Konzentration ($12,5 \mu\text{M}$) zu verschiedenen Zeitpunkten inkubiert. Der Immunoblot auf HER-3 zeigt, dass die Expression von nukleärem HER-3 mit Dauer der

Exposition ansteigt. Nach 24 h wurde allerdings ein Abfall des Signals detektiert. Somit wurde gezeigt, dass HER-3 im Zellkern sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig ist.

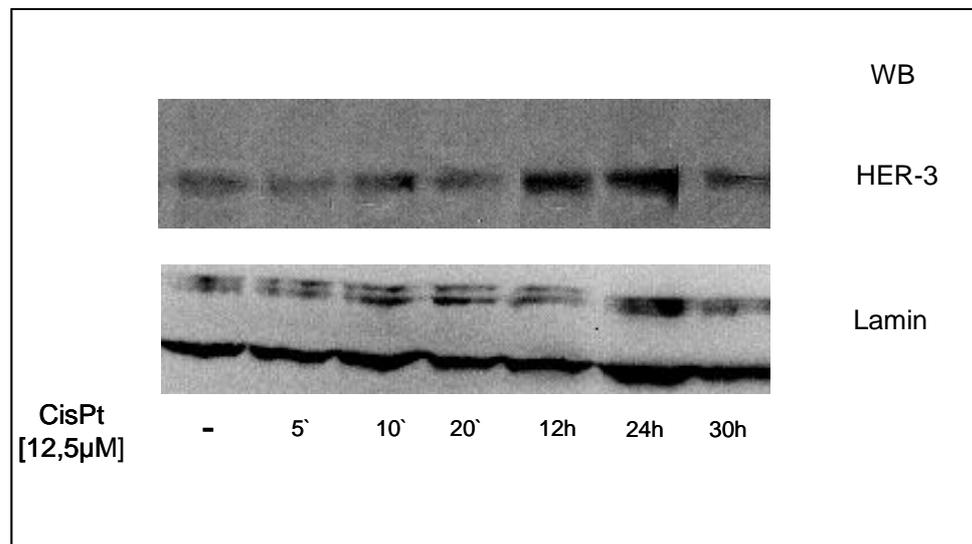


Abbildung 43: Zeitabhängige Cisplatin-Exposition und nukleäre HER-3-Expression. MCF-7 Zellen wurden mit Cisplatin (12,5 μM) bei 37°C im Vollmedium zu verschiedenen Zeiten inkubiert. Nach Cisplatin (CisPt)-Gabe wurde die nukleäre HER-3-Expression im Immunoblot untersucht. Als Ladungskontrolle wurde Lamin verwendet.

Cisplatin steht im Zusammenhang mit oxidativen Stress auszulösen, daher wurde eine weitere Untersuchung mit einer oxidativen Stress-induzierende Verbindung durchgeführt. Da im Fall des EGF-Rezeptors gezeigt werden konnte, dass die nukleäre Translokation durch Wasserstoffperoxid induziert werden konnte (Dittmann et al., 2005), wurde folgender Versuch durchgeführt. Der klassische Radikalbildner Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde als oxidativer Stressor in zwei verschiedenen Konzentrationen für verschiedene Inkubationszeiten (1 h, 4 h, 24 h) auf eine MCF-7-Zellkultur gegeben. Nach Expositionsende wurden die Zellen geerntet, subzellulär fraktioniert und die nukleäre Fraktion auf HER-3 im Immunoblot analysiert. Das Resultat der Detektion ist in Abbildung 44 dargestellt. Die HER-3-Expression der exponierten Zellen zeigte keinen Anstieg der nukleären Expression im Vergleich zur Kontrolle ohne H_2O_2 . Damit wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid keinen Einfluss auf den nukleären HER-3-Status hat.

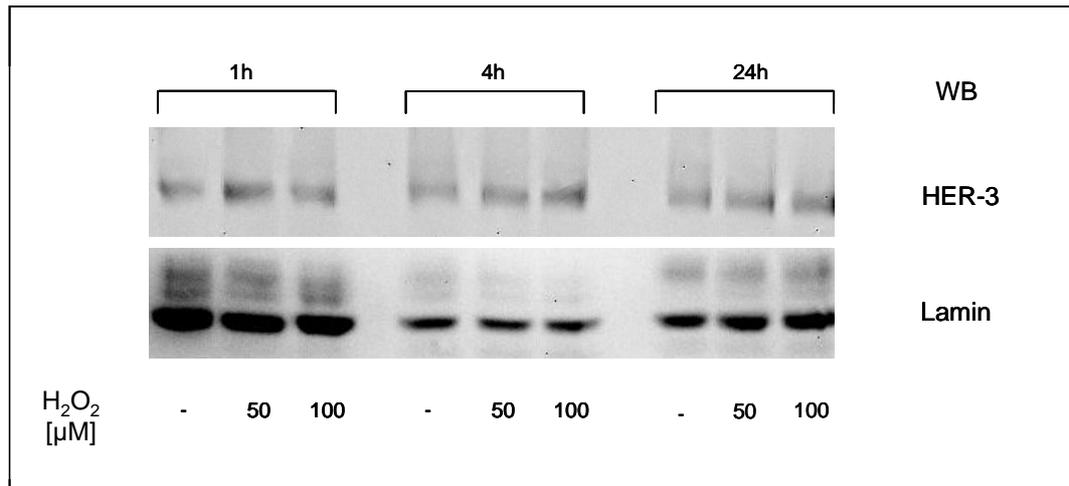


Abbildung 44: Konzentrations – und zeitabhängige Wasserstoffperoxid-Exposition (H₂O₂) und nukleäre HER-3/c-erbB-3-Expression. Die Brustkrebszelllinie (MCF-7) wurde mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei 37 °C für 1 h, 4 h und 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden Zellen in die subzellulären Kompartimente (Cytosol und Nukleus) fraktioniert und im Immunoblot die HER-3-Expression analysiert. Lamin stellt die Ladungskontrolle dar.

4.5.4 Überexpression des Dimerisierungspartners von HER-3

Es ist bekannt, dass die einzelnen HER-Familienmitglieder untereinander entweder eine Homo – oder Heterodimerisierung eingehen. Die potenteste Kombination ist das Heterodimer aus HER-3 und HER-2 (Pinkas-Kramarski et al., 1996). Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob eine vermehrte HER-2-Expression zu einer Verlagerung von HER-3 in den Zellkern führt. Für diese Untersuchung wurde die konditional schaltbare Brustkrebszelllinie MCF-7/NeuT verwendet, die nach Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) HER-2 mit Hilfe des tet-on-Systems überexprimiert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm²) in einer Zelldichte von 3 x 10⁶ Zellen ausgestreut und zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 24h, 3d, 5d) mit Doxycyclin (1 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels der subzellulären Fraktionierung in die Kompartimente Cytosol und Zellkern aufgetrennt. Sowohl die HER-2 (NeuT) Überexpression bzw. die Kontrolle des Anschaltens von HER-2 (NeuT), als auch die HER-3-Expression wurden im Immunoblot nachgewiesen. Die Fraktionen wurden wie in vorherigen Fraktionierungsversuchen auf mögliche Verschleppungen mit entsprechenden Antikörpern (alpha-Tubulin und Lamin) untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 dargestellt und zeigt, dass durch die Doxycyclin-Gabe es zu einem erfolgreichen Anschalten der HER-2/NeuT-Zellen kommt (24 h). Die Expression steigt mit der Dauer der Doxycyclin-Exposition. Durch die Überexpression von HER-2 wurde keine vermehrte Translokation von HER-3 in den Zellkern verursacht.

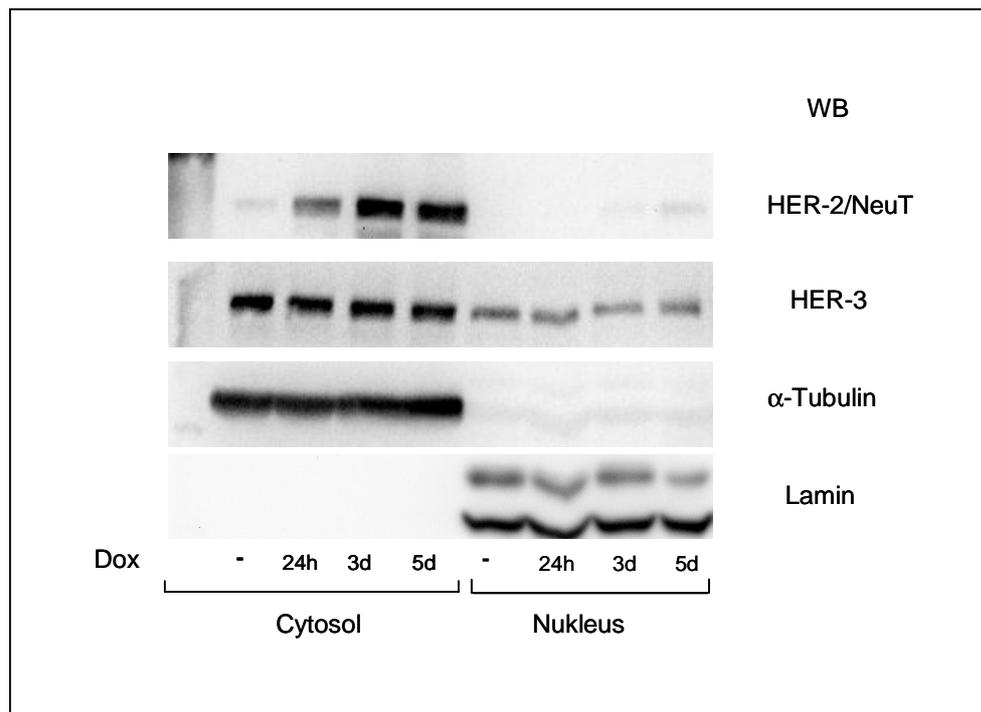


Abbildung 45: HER-2 Überexpression in MCF-7/NeuT-Zellen. MCF-7/NeuT-Zellen wurden mit Doxycyclin (1µg/ml) für bestimmte Zeiten (24 h, 3 d, 5 d) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und in Cytosol und Nukleus fraktioniert. Pro Lane wurden 50 µg der Fraktion in einem 10% Arcylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion wurde mit NeuT (185 kDa) und HER-3 (185 kDa)-Antikörpern durchgeführt. Die Fraktionen wurden mit spezifischen Marker-Proteinen (alpha Tubulin, Lamin) überprüft.

4.5.5 Apoptose-unabhängige Translokation von HER-3 in den Zellkern

Um auszuschließen, dass die nukleäre Lokalisation der Rezeptortyrosinkinase HER-3/c-erbB-3 in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod (Apoptose) steht, wurde ein TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Nachweis an kultivierten MCF-7-Zellen durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die Zellen im 24-well-Format mit Vollmedium auf runden autoklavierten Glasplättchen kultiviert und nach 24 h mit 4 % Paraformaldehyd (RT, 20 min) fixiert. Die TUNEL-Färbung wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit basierend auf einer Fluoreszenz-Detektion (Cy2, grün) durchgeführt. Das Resultat wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops dokumentiert. Als Positivkontrolle für die TUNEL-Detektion wurden parallel zur Probe DNase-behandelte MCF-7-Zellen (Abbildung 46 C) mitgeführt. Um eine Aussage über die subzelluläre Expression von HER-3 zu treffen, wurde im Anschluss ein immunhistologischer Nachweis auf HER-3 durchgeführt.

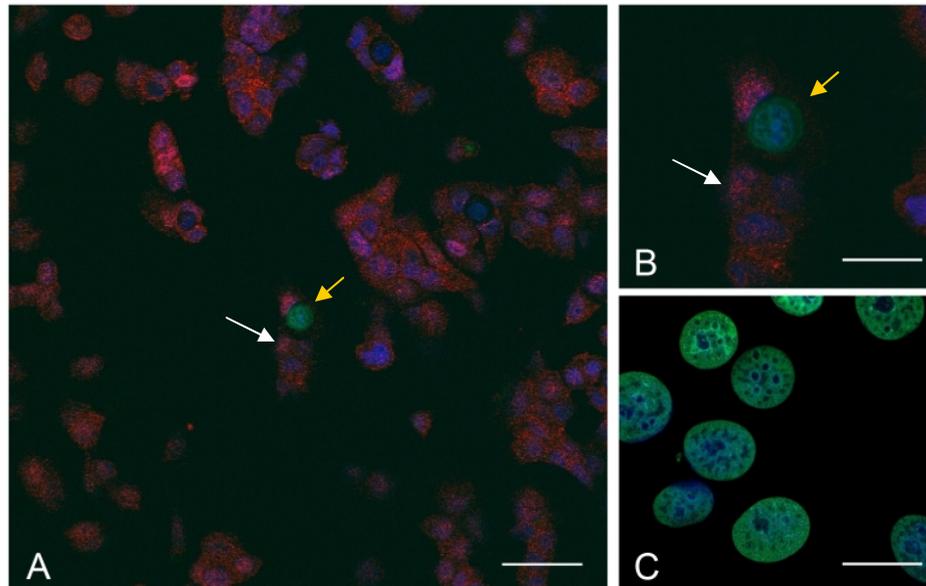


Abbildung 46: TUNEL-Nachweis und HER-3-IHC an kultivierten MCF-7-Zellen. A Subkonfluente MCF-7-Zellkultur nach TUNEL und IHC-Nachweis, weißer Pfeil: nukleäre HER-3-Lokalisation (Cy3, rot), gelber Pfeil TUNEL-positive Zelle (Cy2, grün), Maßstabsbalken 50 μm , B Vergrößerung von A, Maßstabsbalken 20 μm , C Positivkontrolle, TUNEL-positive DNase-behandelte MCF-7-Zellen (Cy2, grün) mit Kernfärbung (DAPI, blau), Maßstabsbalken 20 μm .

Das Ergebnis der TUNEL-Färbung zeigt (Abbildung 46) eine MCF-7-Kultur, die wenig TUNEL-positive Zellen (1 %) aufweist. Dieser Wert entspricht einer spontanen Apoptoserate einer statischen Zellkultur (Danforth, Jr., 2004), die sich im Bereich von 0,5 %-7 % befindet. In Abbildung 46 A ist exemplarisch zu sehen, dass eine in Apoptose befindliche Zelle (Cy2, grün) keine gleichzeitige nukleäre HER-3-Expression aufweist. Dagegen wurden Zellen, die eine nukleäre HER-3-Lokalisation aufweisen, ausschließlich als TUNEL-negativ identifiziert. Damit wurde kein Zusammenhang zwischen dem nukleären Erscheinungsbild der Rezeptortyrosinkinase HER-3 und dem programmierten Zelltod (Apoptose) gefunden.

4.5.6 Inaktivierung vom nukleären Exportrezeptor führt zur Akkumulation von HER-3 im Nukleus

Der Export von Proteinen aus dem Nukleus erfolgt über Exportin-Rezeptoren den so genannten Exportinen. Wird dieser Export gezielt gehemmt, kommt es zur Akkumulation von Proteinen im Zellkern (z.B. I κ B α , Cyclin B1, MDM2, (Freedman and Levine, 1998; Kudo et al., 1999; Yang et al., 1998). Ein bekannter Proteinexport-Inhibitor ist Leptomycin B (LMB). Diese Substanz kann spezifisch die CRM1 (chromatin region maintenance 1) durch kovalente Modifikation hemmen (Kudo et al., 1999). Mit dem nachfolgenden Experiment

wurde überprüft, ob eine Anhäufung von HER-3 im Zellkern durch LMB-Behandlung erzielt werden kann. Dazu wurde der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen (1 nM, 5 nM und 10 nM) für vier Stunden mit kultivierten MCF-7-Zellen (3×10^6 Zellen pro 75 cm^2 Kulturflasche) inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die nukleären Fraktionen der Zellen auf HER-3 (185 kDa) im Immunoblot untersucht.

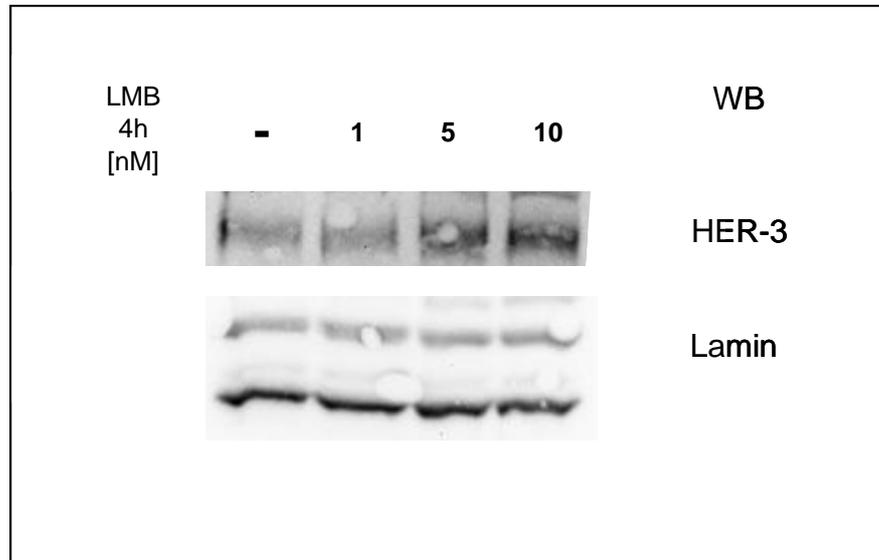


Abbildung 47: Inaktivierung des nukleären Exportrezeptor führt zur Akkumulation von HER-3 im Nukleus. Nukleäre Proteinfractionen von Leptomycin B (LMB)-behandelte MCF-7-Zellen wurden auf nukleäres HER-3 mittels Immunoblot analysiert.

Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, wurde durch die Leptomycin B-Inkubation eine Akkumulation von HER-3 im Nukleus erzielt. Der Gehalt steigt mit der LMB-Konzentration an, bei gleich bleibenden Lamin-Gehalt (Ladungskontrolle für den Zellkern). Zusätzlich zu dieser Untersuchung wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Abbildung 48 A zeigt Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden. Vereinzelt wurden HER-3 positive Zellkerne detektiert. Dagegen sind in Abbildung 48 B MCF-7 Zellen dargestellt, die der höchsten Konzentration (10 nM) an Leptomycin B über vier Stunden ausgesetzt wurden. Es wurde eine HER-3-Anhäufung im Zellkern detektiert. Somit zeigt dieses Ergebnis, dass der Exportprozess von HER-3 aus dem Zellkern unter Beteiligung von CRM-1 abläuft. Zusammenfassend kann man sagen, dass HER-3 über den CRM1-vermittelten nukleären Export aus dem Zellkern transportiert wird.

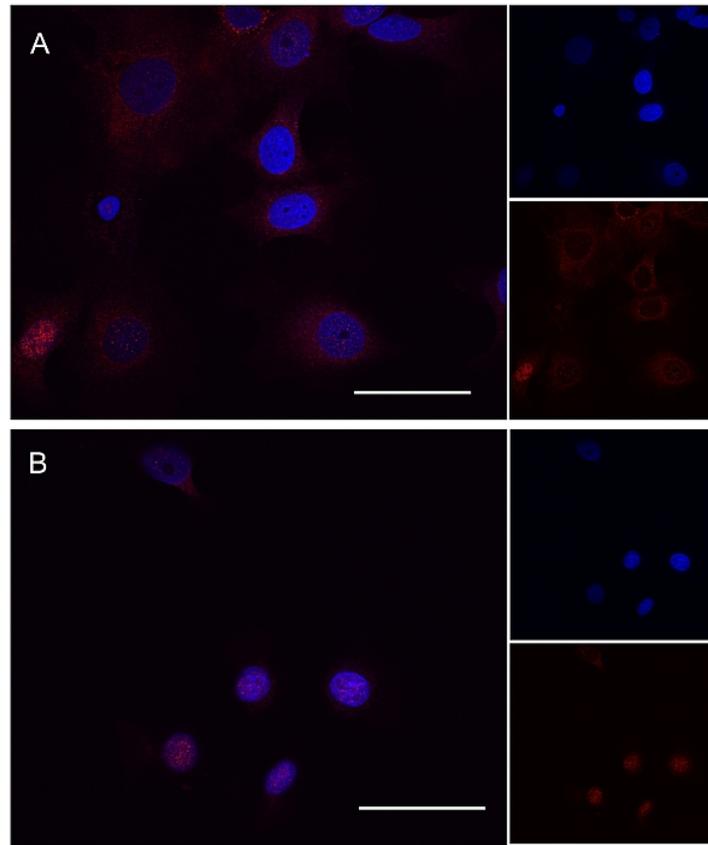


Abbildung 48: Leptomycin B (LMB) inhibiert den nukleären Export. Es kommt zur Anhäufung von HER-3 im Zellkern. MCF-7-Zellen wurden mittels Fluoreszenz-IHC auf HER-3 (Cy3, rot) untersucht, Kontrolle (A). Inkubation mit LMB (10 nM, 4h) (B). Die Kernfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Maßstabsbalken 50µm.

5 Diskussion

5.1 *Rezeptortyrosinkinasen als prognostische Faktoren in gynäkologischen Karzinomen*

Die Mitglieder der HER-Familie rufen schon seit Jahren großes Interesse in der Krebsforschung hervor. Durch die Deregulation der von ihnen gesteuerten zellulären Signalwege sind sie an der Tumorentstehung beteiligt. Die Überaktivität dieser Proteine wurde in einer Vielzahl verschiedener Tumore beobachtet. Zum Beispiel ist die Rezeptortyrosinkinase HER-2 in 25 % bis 30 % aller Mammakarzinome überexprimiert und geht mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen einher (Slamon et al., 1987; Toikkanen et al., 1992). Die Überexpression von HER-2 wurde dazu ausgenutzt, diese Rezeptortyrosinkinase als therapeutisches Target zu nutzen. Hierzu wurde ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Trastuzumab, Handelsname Herceptin[®]) entwickelt. Dieser bindet an die extrazelluläre Domäne von HER-2 und ruft dadurch eine zellvermittelte Toxizität (ADCC, antibody dependent cell mediated cytotoxicity) hervor (Stein et al., 2006). Somit ist es möglich, neben der konventionellen systemischen Chemotherapie die Patientinnen mit Herceptin[®] zu therapieren. Dieses Beispiel zeigt, dass es notwendig ist neue Zielmoleküle zu identifizieren, die eine maßgeschneiderte Therapie („targeted therapy“) ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde in einer Ovarial- und Mammakarzinom-Tumorbank die Expression der Rezeptortyrosinkinasen HER-2 und HER-3 immunhistochemisch untersucht. Die anschließenden Überlebensanalysen nach Kaplan und Meier ergaben, dass beim Ovarialkarzinom eine Assoziation zwischen dem Überleben und der HER-3-Expression besteht. Patientinnen mit einer hohen Expression haben eine schlechtere Prognose im Gegensatz zu Patientinnen, die wenig HER-3 exprimieren. Des weiteren zeigte die multivariate Cox-Analyse, dass HER-3 als unabhängiger prognostischer Faktor im Ovarialkarzinom fungiert.

Die Situation im Mammakarzinom zeigte dagegen, dass für HER-2 eine Relation zwischen dem Überleben und der Expression besteht. Sowohl in der Kaplan-Meier-Kurve als auch in der multivariaten Cox-Analyse wurde dieser Zusammenhang gezeigt. Hierbei erwies sich HER-2 als unabhängiger Prognosefaktor. Die Ursache für dieses Ergebnis hinsichtlich der unterschiedlichen Relevanz der Rezeptortyrosinkinasen je nach Tumorart ist jedoch unklar.

Allerdings ist von vielen Beispielen bekannt, dass dieselben Faktoren in unterschiedlichen Tumorentitäten eine unterschiedliche Relevanz aufweisen können.

5.2 Nukleäre HER-3 Lokalisation im Mammakarzinom – ein unerwartetes Ergebnis

Nach abschließender Analyse bezüglich prognostischer Relevanz der RTKs, wurde im Anschluss auf die subzelluläre Lokalisation speziell der Rezeptortyrosinkinase HER-3 im Mammakarzinom eingegangen. Überraschenderweise zeigen die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse der Tumorproben des Mammakarzinoms ein ungewohntes Expressionsmuster von HER-3. Bei einer Vielzahl der Patientinnen wurde eine nukleäre Lokalisation von HER-3 beobachtet. Die im Zuge der statistischen Auswertung erstellten Häufigkeitsverteilungen von cytoplasmatischem und nukleärem HER-3 verdeutlichen, dass es zu einer Gegenläufigkeit in dem Patientinnenkollektiv kommt. Die Diagramme spiegeln eine Art „Alles-oder-Nichts“-Situation wider. Das heißt, Patientinnen mit überwiegend nukleärer HER-3-Lokalisation weisen keine cytoplasmatische HER-3-Expression auf und umgekehrt. Im Gegensatz zum EGFR wurde bei HER-3 keine Assoziation zwischen dem Überleben und der subzellulären Verteilung gefunden. Denn der nukleäre EGFR zeigte eine schlechtere Überlebensprognose bei Patientinnen mit Brustkrebs und Mund-Rachen-Raum-Karzinom (Lo et al., 2005b; Psyrri et al., 2005).

Seit Jahren ist bekannt, dass sich die Lokalisation von Membranrezeptoren nicht nur auf die Membran beschränkt. Ebenso wurde HER-3 in venösen und arteriellen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC, HUAEC) im Zellkern detektiert (Bueter et al., 2006). Dasselbe Phänomen der nukleären Lokalisation von HER-3 wurde auch in Schwann-Zellen beobachtet (Raabe et al., 2004).

Nach Rezeptoraktivierung kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose, wodurch der Rezeptor internalisiert wird. Im Anschluss werden die Rezeptoren entweder im Lysosom abgebaut oder sie gelangen im Sinne eines Recyclingprozesses wieder an die Zelloberfläche (Conner and Schmid, 2003). Dagegen herrscht über das Phänomen der nukleären Rezeptoren Unklarheit. Möglicherweise erfolgt die Translokation Karyopherin-vermittelt, da Lo et al. (Lo et al., 2006) und Giri et al. (Giri et al., 2005) für den EGFR und HER-2 eine Beteiligung zeigen konnten. Des Weiteren ist bekannt, dass die in den Zellkern translozierten Rezeptoren entweder ein „nuclear localization signal“ (NLS) oder eine Bindungsstelle für Chaperon-

ähnliche Proteine aufweisen (Offterdinger et al., 2002). Der Mechanismus der Translokation momentan ist weitgehend unbeantwortet.

Zusätzlich stellt sich die Frage bezüglich der möglichen Funktion der Rezeptoren im Zellkern. Für den EGFR wurden von Lin et al. (Lin et al., 2001) in der Brustzelllinie MDA-MB-468 mittels CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) und EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) Hinweise gefunden, dass dieser Rezeptor als Transkriptionsfaktor in der Cyclin D 1-Promotorregion fungiert. Auch für HER-2 wurde gezeigt, dass nukleäres HER-2 an den Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Promotorbereich bindet (Wang et al., 2004). Diese Gene sind in Tumorentwicklung und Tumorprogression involviert (Hunter and Pines, 1994; Oshima et al., 1996; Thomsen et al., 1997).

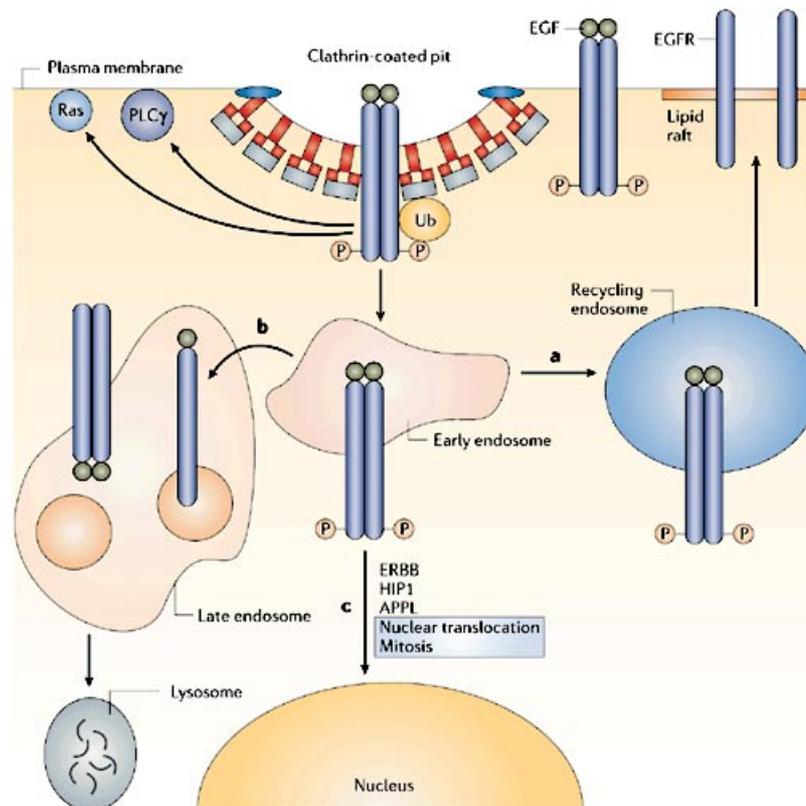


Abbildung 49: Endozytose am Beispiel des EGFR. Nach Ligand-Bindung kommt es zur Autophosphorylierung des EGFR. Dies führt zur Ubiquitinierung (Ub) des Rezeptors und zur Entfernung des Rezeptors von der Zelloberfläche (Endozytose) in das frühe Endosom. Der Ligand-Rezeptor-Komplex aktiviert in Folge dessen verschiedene Signalwege über die Aktivierung von Ras und Phospholipase C γ (PLC γ). Vom frühen Endosom gelangt der Rezeptor im Zuge eines Recycling-Prozesses wieder an die Zelloberfläche (a) oder er wird in das späte Endosom, überführt (b). Das späte Endosom fusioniert dann mit dem Lysosom und es kommt zur Degradation des Rezeptors. Eine dritte Möglichkeit ist, dass der Rezeptor in den Zellkern transportiert (c) wird. Allerdings ist der Mechanismus der Translokation unklar. Aus: (Massie and Mills, 2006)

5.3 Dreidimensionales Tumorwachstum forciert die Lokalisation von nukleärem HER-3

Im vorherigen Kapitel wurde das Phänomen der nukleären HER-3 Lokalisation im Mammakarzinom diskutiert. Der Mechanismus und mögliche Funktionen des nukleär lokalisierten HER-3 bleiben derzeit unklar. Da aber in dieser Arbeit auch andere Tumorentitäten wie z.B. Xenografttumore aus HeLa-Zellen und Mausfibroblasten das gleiche Erscheinungsbild zeigten, wäre es vorstellbar, dass die dreidimensionale Tumorbildung einen Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von HER-3 hat. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse der *in vitro*-Experimente in dieser Arbeit gestützt. Verglichen mit Tumorgewebe weisen als Monolayer kultivierte Tumorzellen eine weitaus geringere nukleäre HER-3-Expression auf. Somit ist denkbar, dass die nukleäre Verteilung von HER-3 mit der Tumorbildung assoziiert ist. Möglicherweise spielt das Mikromilieu eine entscheidende Rolle für die Translokation von HER-3 und erklärt somit die Diskrepanz zwischen Tumorgewebe und kultivierten Zellen.

5.4 ATP-und Glucose-Mangel führt zur Akkumulation von HER-3 im Zellkern

Ein Hauptmerkmal der zuvor erwähnten Tumorbildung ist die schlechte Gefäßausbildung. Die im Tumor neu gebildeten Mikrogefäße weichen von der normalen Morphologie ab. Sie zeigen eine Reihe von strukturellen und funktionellen Anomalitäten auf. Die Gefäße sind meist dilatiert, gewunden, elongiert und sacculär. Dies hat zur Folge, dass es zur Unterversorgung innerhalb des Tumors kommt. Zum Beispiel bedingt ein lokaler Abfall in der Blutversorgung einen Glucose-Mangel. Dies ist häufig bei Ischämien zu beobachten (Vaupel et al., 1989; Vaupel and Hockel, 2000). Merkmale der Tumore sind unter anderem eine eingeschränkte Sauerstoffversorgung. (Hockel and Vaupel, 2001). Des weiteren herrscht ein nachteiliger bioenergetischer Status. Aufgrund dessen werden andere Energie-abhängige zelluläre Vorgänge beeinflusst.

5.4.1 Glucose-Entzug

In dieser Arbeit wurden unter dem Gesichtspunkt der Energie-Depletion zwei Tumorzelllinien (MCF-7 und HeLa) hinsichtlich der nukleären HER-3-Lokalisation untersucht. Diese Zellen wurden einem Glucose- und ATP-Entzug ausgesetzt. Der Glucose-

Entzug zeigte bei der Zervixkarzinomzelllinie (HeLa) schon nach wenigen Stunden (ca. 4 h) einen deutlichen Effekt. Durch den Entzug der Energiequelle kam es bei einigen der Zellen bereits zu einem Verlust der Zelladhäsion. Bei den verbleibenden Zellen konnte immunhistologisch eine überwiegend nukleäre HER-3-Lokalisation detektiert werden. Es zeigte sich, dass durch den Glucose-Entzug eine Steigerung der nukleären HER-3-Expression von 9 - 11 % auf 31 - 38 % erzielt werden konnte. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass es zu einer verstärkten Translokation und Akkumulation von HER-3 in den Zellkern in Folge des Glucose-Entzugs kommt. Es würde zu einer Anreicherung von nukleärem HER-3 führen. Dieser Effekt wurde bereits in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 beschrieben. Durch Glucose-Mangel wurde eine nukleäre Akkumulation der Proteasom-Untereinheit p27 induziert (Ogiso et al., 1999). Denkbar wäre aber auch, dass die Zellen, die bereits nukleäres HER-3 aufweisen, eine gewisse Resistenz gegenüber der Glucose-Depletion zeigen. Somit würde eine nukleäre HER-3-Expression den Zellen einen Selektionsvorteil verschaffen. Diese Hypothese würde mit der allgemeinen Beobachtung übereinstimmen, dass solide Tumore auf Grund des Mikromilieus eine Resistenz gegenüber Bestrahlung und chemotherapeutischen Reagenzien aufweisen (Tredan et al., 2007; Vaupel and Hockel, 2000). Im Fall der Brustkrebszelle MCF-7 konnte auch nach 120 Stunden kein Effekt des Glucose-Entzugs auf die nukleäre HER-3-Lokalisation beobachtet werden. Das Wachstum war zwar vermindert, aber die Zellen reagierten nicht mit einer verstärkten nukleären HER-3-Expression verglichen mit den HeLa-Zellen.

5.4.2 ATP-Depletion

Eine weitere Form des Energiemangels wurde in dieser Arbeit durch die Inhibition der mitochondrialen Atmungskette und der Glykolyse mittels Oligomycin B bzw. mit dem Glucose-Analoga 2-Deoxy-D-Glucose bewirkt. Durch den Einsatz dieser Substanzen konnte auch in HeLa-Zellen eine vermehrte nukleäre HER-3-Lokalisation bewirkt werden. Diese Beobachtung könnte so interpretiert werden, dass auf Grund der fehlenden Energie Export von HER-3 aus den Zellen nicht mehr abläuft. Folglich akkumuliert HER-3 im Zellkern. Diese Hypothese würde sich auch mit der Tatsache decken, dass der aktive CRM-1-vermittelte Transport aus dem Zellkern durch Leptomycin B (LMB) inhibierbar ist (Kapitel 4.5.6). In dieser Arbeit wurden somit zwei Möglichkeiten beschrieben, um die subzelluläre HER-3 Lokalisation gezielt zu beeinflussen. Diese Ergebnisse könnten zur Aufklärung der Funktion von HER-3 im Zellkern beitragen.

5.5 Genotoxischer Stress bedingt eine nukleäre Translokation von HER-3 in geringerem Ausmaß

Beim genotoxischen Stress kommt es in der Zelle zu DNA-Schädigungen. Substanzen die diese Schäden induzieren, sind beispielsweise Cisplatin und Derivate davon, die auch in der Krebstherapie eingesetzt werden. Cisplatin gelangt über passive Diffusion in die Zellen und fungiert als ein bivalentes Elektrophil. Der Wirkmechanismus läuft über die Bildung von 1,2 Intrastrang d(GpG)-DNA Crosslinks ab (Kelland, 1993). Es werden bevorzugt das N₇-Atom von Guanin und Adenin quervernetzt. Dies hat zur Folge, dass die so quervernetzten DNA-Stränge die DNA-Synthese behindern und daraufhin zelluläre Reparaturmechanismen ausgelöst werden, um diese Addukte zu beseitigen. Eine weitere Eigenschaft von Cisplatin ist, dass es Punktmutationen in der DNA verursacht. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Cisplatin das Gefäßsystem der Niere stört und somit zur Hypoperfusion oder Hypoxie führt (Tanaka et al., 2005; Winston and Safirstein, 1985).

Unter Einsatz dieses Zytostatikums konnten Dittmann et al. (Dittmann et al., 2005) für den EGFR zeigen, dass es nach Cisplatin-Exposition zu einer stress-induzierten, Ligand-unabhängigen Translokation des EGFR in den Zellkern kommt. Von Dittmann et al. wurde in einer humanen Bronchialkarzinomzelllinie gezeigt, dass Cisplatin schon nach relativ kurzer Zeit (5 min) eine Translokation des EGFR in den Nukleus bewirkt. Ausgehend von diesem Ergebnis wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, ob Brustkrebszellen nach Cisplatin-Applikation vermehrt nukleäres HER-3 aufweisen. Nach 24 h Inkubation mit 12,5 µM Cisplatin konnte in den Brustkrebszellen eine Translokation von HER-3 in den Zellkern induziert werden. Allerdings wurde eine späte Antwort auf die Exposition von Cisplatin beobachtet. Anders als von Dittmann et al. beschrieben konnte nach 24 Stunden ein leichter Anstieg der nukleären HER-3-Expression detektiert werden. Dieser Unterschied könnte möglicherweise darin begründet sein, dass ein anderes Zellsystem verwendetet wurde. Da die Zellen erstmalig mit Cisplatin behandelt wurden, ist eine induzierte Resistenz gegenüber dieser Substanz unwahrscheinlich. Es kann somit festgehalten werden, dass durch genotoxischen Stress in Form von einer DNA-schädigenden Substanz eine Translokation von RTK in den Zellkern forciert werden kann.

5.6 Die nukleäre HER-3-Expression ist abhängig von der Zelldichte

Die Proliferation stellt eine weitere mögliche Einflussgröße für die Lokalisation nukleärer Rezeptortyrosinkinasen dar. Erste Hinweise für dieses Phänomen lieferte Marti et al. (Marti et al., 1991) aus Experimenten mit regenerierenden Ratten-Hepatozyten. In den Versuchen wurde gezeigt, dass 8 Stunden nach einer partiellen Hepatektomie (70 %) der Leber es zu einer Akkumulation von ^{125}I -EGF im Nukleus kam. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die regenerierenden Zellen in der Prä-S-Phase des Zellzyklus. Während dieser Phase wurde nachgewiesen, dass ein kleiner aber signifikanter Anteil an EGFR im Zellkern detektierbar war.

Um eine mögliche Assoziation zwischen Proliferation und der HER-3 Lokalisation zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit nukleäres HER-3 in unterschiedlich konfluent kultivierten Brustkrebszellen bestimmt. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigte, dass die Proliferation tatsächlich einen Einfluss auf die nukleäre HER-3-Expression hat, da die subkonfluente Zellkultur einen höheren Anteil an nukleärem HER-3 aufweist als konfluente Kulturen. Diese Beobachtung wurde auch durch den immunhistologischen HER-3-Nachweis gestützt. Eine 100 % konfluente Zellkultur zeigt fast ausschließlich eine cytoplasmatische HER-3-Expression im Gegensatz zu subkonfluent kultivierten Zellen.

Dieses Phänomen ist in der Literatur auch für den Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR-1) beschrieben (Reilly and Maher, 2001; Wiedlocha et al., 1996). Zum Beispiel zeigt FGFR-1 in einer Astrozyten-Kultur das gleiche Verhalten wie HER-3. Mit zunehmender Zelldichte kommt es zu einem Abfall an nukleärem FGFR-1 (Stachowiak et al., 1997). Des Weiteren konnten neuere Arbeiten einen funktionalen Zusammenhang zeigen, nämlich dass nukleärer EGFR als Co-Aktivatoren am Zellzyklus eingreift. Hanada et al. (Hanada et al., 2006) konnten in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 anhand von ChIP-Analysen zeigen, dass EGFR eine wichtige Rolle für die B-Myb-Expression spielt. B-Myb ist ein Transkriptionsfaktor, der in schnell proliferierenden Zellen und Krebszellen vermehrt detektiert wurde (Lin et al., 1994; Sala and Calabretta, 1992). Bei Brustkrebspatientinnen führt Überexpression von B-Myb zu einer schlechteren Überlebensprognose (Amatschek et al., 2004). Außerdem spielt es eine entscheidende Rolle in der Zellzyklus-Progression und wird durch die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie streng reguliert (Arsura et al., 1992; Raschella et al., 1995; Sala et al., 1996). In den Experimenten von Hanada et al. konnte

beobachtet werden, dass eine Ligand-induzierte Assoziation von nukleärem EGFR an der B-Myb-Promoterregion stattfindet. Diese Assoziation wurde nur in der G₁/S-Phase des Zellzyklus beobachtet und konnte zu dem noch durch EGFR-Kinase-Inhibitoren gehemmt werden. Mit diesen Experimenten konnte ein Mechanismus identifiziert werden, der zeigt, dass nukleäres EGFR in der Progression des Zellzyklus involviert ist.

5.7 Nukleäre HER-3-Expression ist unabhängig vom Expressionsstatus des Dimerisationspartners

Die Überexpression der HER-Familienmitglieder ist in einer Vielzahl von Krebserkrankungen beschrieben. Eine große Bedeutung spielt die kombinierte Überexpression von HER-2 und HER-3 im Brustkrebs. Durch gezielte Inhibition der Dimerisierung konnte gezeigt werden, wie essentiell das Zusammenspiel beider Rezeptortyrosinkinasen ist. Als Folge der Inhibition konnte eine Blockierung der Proliferation in HER-2 überexprimierenden Zellen beobachtet werden. Damit einher wurde ein Rückgang an phosphorylierten HER-3 und dem HER-3-PI-3K-Komplex beobachtet. Durch die Versuche von Holbro et al. (Holbro et al., 2003) wurde die Abhängigkeit von HER-2 und HER-3 voneinander deutlich.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob HER-3 durch die Überexpression seines Dimerisationspartners verstärkt in den Zellkern transloziert. Für die Überexpression von HER-2 wurde das MCF7/NeuT-Zellsystem verwendet. Es handelt sich um die Brustkrebszelllinie MCF-7, die zwei Expressionsvektoren stabil trägt. Diese Konstrukte stehen unter der Kontrolle des Tet-on-Systems. Dieses System umfasst zum einen den reversen Tetrazyklin-gesteuerten Transaktivator (rtTA) und den bidirektionalen Expressionsvektor mit dem Tetrazyklin-responsiven Element (TRE) für das NeuT-Gen. In Anwesenheit von Tetrazyklin oder einem Derivat kann das rtTA an das Tetrazyklin-responsive Element (TRE) binden und die Transkription von NeuT initiieren. Für die Kontrolle der Expression diente das fluoreszierende *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). In diesem System wird das Ratten-Onkogen NeuT, ein Homolog zum humanen her-2-Gen überexprimiert. Es unterscheidet sich in einer Punktmutation in der Transmembranregion des Rezeptors. Diese Mutation ermöglicht eine Liganden-unabhängige Rezeptor-Stimulierung, die sich in einer erhöhten Autophosphorylierung und dadurch konstitutiv aktiver Signaltransduktion des Rezeptors auswirkt. Zur Induktion wurde das

Tetrazyklin-Derivat Doxyzyklin verwendet, da es eine längere Halbwertszeit hat und in einer 100-fach niedrigeren Konzentration einsetzbar ist.

Ein Anschalten der HER-2-Überexpression konnte durch Doxyzyklin induziert und 24 h darauf per Immunoblot nachgewiesen werden. Allerdings wurde durch die Überexpression von HER-2 keine verstärkte nukleäre HER-3-Expression beobachtet. Somit konnte der Prozess der Translokation von HER-3 in den Zellkern nicht durch den Expressionsstatus der Rezeptortyrosinkinase HER-2 forciert werden und scheint daher vom Dimerisationspartner unabhängig zu sein.

5.8 Stimulation durch Heregulin zeigt keine Auswirkung auf die nukleäre HER-3-Lokalisation

In der Vergangenheit wurde bei Mitgliedern der nukleären Rezeptortyrosinkinasen gezeigt, dass der entsprechende Ligand als Translokationsstimulus fungierte. Zum Beispiel wurde durch EGF-Stimulation eine Translokation des EGFR in den Zellkern von A431-Zellen beobachtet (Lo et al., 2005a). Ebenso wurde bei 3T3-Mausfibroblasten eine Translokation des FGFR durch den entsprechenden Ligand (FGF-2) bewirkt (Maher, 1996). Von den Autoren wurde nach Stimulation mit FGF-2 eine zeitabhängige Zunahme nukleären FGFRs detektiert.

Ausgehend von dieser Beobachtung wurde die Fragestellung untersucht, ob auch im Fall von HER-3 ein Translokationsstimulus von β_1 -HRG (NRG1/2) ausgeht. Wie in der Einleitung erwähnt, ist Heregulin der aktivierende Ligand für HER-3. Infolge der Ligandbindung erfolgt die mehrstufige Phosphorylierung der Signalkaskaden in der Zelle. Beispielsweise läuft der MAPK-Signalweges über RAF, MEK bis hin zum ERK1/2 ab oder die Stimulation der PI-3K/AKT-Signalkaskade. Die Aktivierung dieser Signalwege wurde in dieser Arbeit in Form von phosphoryliertem ERK1/2 bzw. der Interaktion der p85-PI-3K-Untereinheit mit HER-3 via Co-Immunpräzipitation nachgewiesen. Im Gegensatz zum EGFR und FGFR wurde in dieser Arbeit keine Abhängigkeit zwischen HER-3-Lokalisation und Ligandstimulation beobachtet.

5.9 Der Export von nukleärem HER-3 wird durch Leptomycin B inhibiert

Der bidirektionale Transport von Molekülen zwischen Cytoplasma und Nukleus erfolgt über Energie-abhängige Vorgänge. Alle Moleküle mit einem Durchmesser bis zu 26-28 nm müssen aktiv durch die Kernpore (nuclear pore complex, NPC) transportiert werden. Für den Transport sind Rezeptoren verantwortlich. Sowohl für den Import als auch für den Export gibt es bestimmte Transportrezeptoren. Eine Voraussetzung für den Protein-Transport sind Sequenzen, die das zu transportierende Protein aufweisen muss, um vom Rezeptor erkannt zu werden.

Zum Beispiel wurde für den nukleären Export die Kern-Export-Signale (nuclear export signal, NES) bei Arbeiten am viralen Protein HIV Rev und am Protein PKI (protein kinase inhibitor) entdeckt (Fischer et al., 1995; Wen et al., 1995). Dieses nukleäre Exportsignal weist ein Motiv von einer kurzen Abfolge von Leucinen oder von anderen hydrophoben Aminosäuren auf. Des weiteren wurde für das Exportin-1 (CRM-1 oder Xpo1p) gezeigt, dass es direkt an das nukleäre Exportsignal (NES) bindet.

Über Gelshift-Analysen wurde eine direkte Interaktion zwischen dem Antibiotikum Leptomycin B (LMB) aus *Streptomyces spec.* (Hamamoto et al., 1983) und CRM-1 beobachtet. Leptomycin B bindet kovalent an einen Cystein-Rest des CRM-1 und verhindert somit die Bindung zwischen CRM-1 und der NES-Proteine. Mit LMB besteht nun die Möglichkeit, den Export über Exportin-1 (CRM-1) gezielt zu inhibieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der nukleäre Export von HER-3 CRM-1-abhängig abläuft. Hierzu wurden MCF-7-Zellen mit Leptomycin B für 4 h inkubiert. Wie erwartet wurde durch die Inhibition des Exports HER-3 im Zellkern akkumuliert. Dies bestätigt die Annahme, dass nukleäres HER-3 nicht über passive Diffusion zwischen Cytoplasma und Nukleus transportiert wird. Außerdem wurde mit der Verwendung von LMB gezeigt, dass es sich um einen CRM-1 vermittelten Export handelt, da LMB selektiv an CRM-1 bindet. Diese Beobachtung stützt zusätzlich, dass HER-3 im c-terminalen Bereich vermeintliche NES-Sequenzen aufweist.

6 Zusammenfassung

Die Expression von Rezeptortyrosinkinasen spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung und -entwicklung. Dies konnte bei Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und zahlreichen anderen malignen Tumorerkrankungen gezeigt werden. Bei etwa 20-30 % aller Brustkrebs-Erkrankungen ist eine Überexpression der Rezeptortyrosinkinase HER-2 zu verzeichnen. Diese Beobachtung wurde dazu genutzt, HER-2 als therapeutisches Target in der Klinik zu verwenden. Daher wurde ein monoklonaler Antikörper (Herceptin[®]) gegen die extrazelluläre Domäne von HER-2 generiert, der derzeit zu Therapie Zwecken bei Brustkrebspatientinnen erfolgreich eingesetzt wird.

Der klassische Expressionsort der Rezeptortyrosinkinasen ist bekanntlich die Cytoplasmamembran, wo sie an der Signalweiterleitung nach Stimulation durch Wachstumsfaktoren beteiligt sind. In den vergangenen Jahren wurde jedoch eine Reihe von Rezeptortyrosinkinasen (RTKn) im Zellkern beobachtet. Obwohl es eine Vielzahl von Beispielen an nukleären RTKn gibt, bleibt diese Funktion dennoch weitgehend unklar.

Um einen Überblick über die Expression der Familienmitglieder HER-2 und HER-3 zu bekommen, wurden zu diesem Zweck zwei Tumorbanks mit Ovarial- und Mammakarzinomen immunhistochemisch untersucht. Für das Ovarialkarzinom konnte in der Überlebensanalyse gezeigt werden, dass HER-3 eine prognostische Relevanz im Patientinnenkollektiv aufweist. Patientinnen mit hoher HER-3-Expression wiesen eine schlechtere Überlebensprognose auf, als Patientinnen mit einer niedrigeren HER-3-Expression. Dagegen wurde für das Mammakarzinom eine signifikante Assoziation der HER-2-Expression mit der Überlebenszeit der Patientinnen aufgezeigt. Bemerkenswert ist, dass in 43,2 % der Mammakarzinom-Patientinnen im Fall vom HER-3 eine nukleäre Lokalisation beobachtet wurde. Interessanterweise wiesen die Patientinnen, die nukleäres HER-3 exprimierten, keine bzw. nur geringe cytoplasmatische HER-3-Expression auf und umgekehrt. Es herrschte somit eine „Alles oder Nichts“-Situation in den Tumorproben. Die dahinter stehenden Mechanismen bzw. die Antriebsfaktoren für dieses Phänomen sind derzeit unklar. Auffällig ist, dass kultivierte Tumorzellen eine weitaus geringere nukleäre HER-3-Expression (3-9%) aufweisen als die untersuchten Tumorgewebe. Möglicherweise ist dies auch der Grund dafür, dass in der Vergangenheit diese Beobachtung vernachlässigt wurde.

Um die Ursache für dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden *in vitro* kultivierte Tumorzellen (HeLa und NIH3T3-Zellen) subkutan in Nacktmäuse injiziert. Nach Tumorformierung wurde die nukleäre HER-3-Expression immunhistochemisch untersucht, wobei eine gesteigerte HER-3-Expression im Zellkern der Xenograft-Tumore detektiert wurde. Dies lässt vermuten, dass die nukleäre HER-3-Expression mit der Dreidimensionalität des Tumors assoziiert ist. Ein Hauptmerkmal solider Tumore ist die veränderte Morphologie, wodurch es zur Unterversorgung an Nährstoffen, Sauerstoff und Energie innerhalb des Tumors kommt. Anhand von Depletionsversuchen, bei denen diese Bedingungen nachgestellt wurde, wurde bei den untersuchten Zelllinien eine gesteigerte nukleäre HER-3-Expression beobachtet. Depletion von ATP erfolgte unter Verwendung von Oligomycin B und 2-Deoxy-D-Glucose, was dazu führte, dass HER-3 im Zellkern akkumulierte.

Im Fall des Glucose-Entzugs reagierten die Zelllinien sehr unterschiedlich. Die Zervixkarzinomzelllinie HeLa zeigte schon nach kurzer Zeit eine gesteigerte nukleäre HER-3-Expression. Hingegen wurde bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 keinerlei Steigerung in der nukleären HER-3-Lokalisation nach Glucose-Entzug verzeichnet.

Von Dittmann et al. wurde nach Exposition von Zellen gegenüber Cisplatin eine Translokation des EGFR in den Zellkern beschrieben. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde diese Fragestellung auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 übertragen. Nach Exposition wurde eine nukleäre Translokation von HER-3 beobachtet. Dieser Effekt war jedoch deutlich weniger ausgeprägt als der oben beschriebene Einfluss durch ATP-Depletion oder Glucose-Entzug. Das Ergebnis zeigt, dass genotoxischer Stress einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von HER-3 hat.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurde eine Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der nukleären Lokalisation von HER-3 beobachtet. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass subkonfluent kultivierte Zellen eine höhere nukleäre HER-3-Expression aufweisen, als konfluent gewachsene Zellen. Somit kann eine mögliche Assoziation zwischen Proliferation und der HER-3-Lokalisation in Betracht gezogen werden.

Zwei wesentliche Bestandteile, die unmittelbar in der Biologie von HER-3 involviert sind, sind zum einem der Dimerisationspartner HER-2 und zum anderen der entsprechende Ligand (β_1 .HRG) von HER-3. Beide Größen wurden bezüglich einer Auswirkung auf die

subzelluläre Lokalisation von HER-3 untersucht. Durch eine Überexpression von HER-2 mit Hilfe des Tet-on-Systems sollte die Auswirkung auf die subzelluläre Lokalisation von HER-3 untersucht werden. Die Überexpression von HER-2 ergab keine Steigerung der nukleären HER-3-Expression. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Stimulation durch β_1 -HRG keine Translokation von HER-3 in den Zellkern hervorruft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die nukleäre HER-3-Lokalisation in Tumoren weitaus häufiger zu detektieren ist als *in vitro*. Die subzelluläre Verteilung von HER-3 *in vitro* wurde durch Glucose bzw. Energie-Mangel beeinflusst. Andere Faktoren wie genotoxische Substanzen oder Ligand-Stimulation scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Obwohl einige Einflussgrößen identifiziert wurden, bleibt dennoch die funktionelle Auswirkung von der nukleären HER-3-Expression zurzeit ungeklärt. Da solide Tumore eine gewisse Resistenz gegenüber Bestrahlung und chemotherapeutischen Reagenzien aufweisen, könnte die nukleäre HER-3-Expression in einem Zusammenhang mit dieser Beobachtung stehen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abd El-Rehim, DM, S E Pinder, C E Paish, J A Bell, R S Rampaul, R W Blamey, J F Robertson, R I Nicholson, I O Ellis, 2004, Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma: *Br. J. Cancer*, v. 91, p. 1532-1542.
2. Alimandi, M, A Romano, M C Curia, R Muraro, P Fedi, S A Aaronson, P P Di Fiore, M H Kraus, 1995, Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas: *Oncogene*, v. 10, p. 1813-1821.
3. Amatschek, S, U Koenig, H Auer, P Steinlein, M Pacher, A Gruenfelder, G Dekan, S Vogl, E Kubista, K H Heider, C Stratowa, M Schreiber, W Sommergruber, 2004, Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes: *Cancer Res.*, v. 64, p. 844-856.
4. Aroian, RV, M Koga, J E Mendel, Y Ohshima, P W Sternberg, 1990, The let-23 gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily: *Nature*, v. 348, p. 693-699.
5. Arpino, G, R Laucirica, R M Elledge, 2005, Premalignant and in situ breast disease: biology and clinical implications: *Ann. Intern. Med.*, v. 143, p. 446-457.
6. Arsura, M, M Introna, F Passerini, A Mantovani, J Golay, 1992, B-myb antisense oligonucleotides inhibit proliferation of human hematopoietic cell lines: *Blood*, v. 79, p. 2708-2716.
7. Bargmann, CI, M C Hung, R A Weinberg, 1986, Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185: *Cell*, v. 45, p. 649-657.
8. Blume-Jensen, P, T Hunter, 2001, Oncogenic kinase signalling: *Nature*, v. 411, p. 355-365.

9. Bodey, B, B Bodey, Jr., A M Groger, J V Luck, S E Siegel, C R Taylor, H E Kaiser, 1997, Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas: *Anticancer Res.*, v. 17, p. 1319-1330.
10. Bookman, MA, K M Darcy, D Clarke-Pearson, R A Boothby, I R Horowitz, 2003, Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group: *J. Clin.Oncol.*, v. 21, p. 283-290.
11. Bueter, W, O Dammann, K Zscheppang, E Korenbaum, C E Dammann, 2006, ErbB receptors in fetal endothelium--a potential linkage point for inflammation-associated neonatal disorders: *Cytokine*, v. 36, p. 267-275.
12. Burden, S, Y Yarden, 1997, Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis: *Neuron*, v. 18, p. 847-855.
13. Cohen, BD, J M Green, L Foy, H P Fell, 1996a, HER4-mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. Evidence for HER1-HER4 heterodimers: *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 4813-4818.
14. Cohen, BD, P A Kiener, J M Green, L Foy, H P Fell, K Zhang, 1996b, The relationship between human epidermal growth-like factor receptor expression and cellular transformation in NIH3T3 cells: *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 30897-30903.
15. Conner, SD, S L Schmid, 2003, Regulated portals of entry into the cell: *Nature*, v. 422, p. 37-44.
16. Danforth, DN, Jr., 2004, All trans-retinoic acid acts synergistically with hydroxytamoxifen and transforming-growth factor beta to stimulate apoptosis in MCF-7 breast cancer cells: *J. Endocrinol.*, v. 183, p. 395-404.
17. Di Fiore, PP, J H Pierce, M H Kraus, O Segatto, C R King, S A Aaronson, 1987, erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells: *Science*, v. 237, p. 178-182.

18. Dittmann, K, C Mayer, B Fehrenbacher, M Schaller, U Raju, L Milas, D J Chen, R Kehlbach, H P Rodemann, 2005, Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase: *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 31182-31189.
19. Ellis, IO, M Galea, N Broughton, A Locker, R W Blamey, C W Elston, 1992, Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up: *Histopathology*, v. 20, p. 479-489.
20. Erickson, SL, K S O'Shea, N Ghaboosi, L Loverro, G Frantz, M Bauer, L H Lu, M W Moore, 1997, ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice: *Development*, v. 124, p. 4999-5011.
21. Eskey, CJ, A P Koretsky, M M Domach, R K Jain, 1993, Role of oxygen vs. glucose in energy metabolism in a mammary carcinoma perfused ex vivo: direct measurement by ³¹P NMR: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 90, p. 2646-2650.
22. Fischer, U, J Huber, W C Boelens, I W Mattaj, R Luhrmann, 1995, The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs: *Cell*, v. 82, p. 475-483.
23. Freedman, DA, A J Levine, 1998, Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6: *Mol. Cell Biol.*, v. 18, p. 7288-7293.
24. Fried, H, U Kutay, 2003, Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory: *Cell Mol. Life Sci.*, v. 60, p. 1659-1688.
25. Garrett, TP, N M McKern, M Lou, T C Elleman, T E Adams, G O Lovrecz, M Kofler, R N Jorissen, E C Nice, A W Burgess, C W Ward, 2003, The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors: *Mol. Cell*, v. 11, p. 495-505.

26. Gilbertson, RJ, R H Perry, P J Kelly, A D Pearson, J Lunec, 1997, Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma: *Cancer Res.*, v. 57, p. 3272-3280.
27. Giri, DK, M Ali-Seyed, L Y Li, D F Lee, P Ling, G Bartholomeusz, S C Wang, M C Hung, 2005, Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor: *Mol. Cell Biol.*, v. 25, p. 11005-11018.
28. Gorgoulis, V, D Aninos, P Mikou, P Kanavaros, A Karameris, J Joordanoglou, A Rasidakis, M Veslemes, B Ozanne, D A Spandidos, 1992, Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas: *Anticancer Res.*, v. 12, p. 1183-1187.
29. Gorlich, D, I W Mattaj, 1996, Nucleocytoplasmic transport: *Science*, v. 271, p. 1513-1518.
30. Gossen, M, H Bujard, 1992, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 89, p. 5547-5551.
31. Guy, PM, J V Platko, L C Cantley, R A Cerione, K L Carraway, III, 1994, Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91, p. 8132-8136.
32. Hamamoto, T, H Seto, T Beppu, 1983, Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation: *J. Antibiot. (Tokyo)*, v. 36, p. 646-650.
33. Hanada, N, H W Lo, C P Day, Y Pan, Y Nakajima, M C Hung, 2006, Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor: *Mol. Carcinog.*, v. 45, p. 10-17.
34. Hanahan, D, R A Weinberg, 2000, The hallmarks of cancer: *Cell*, v. 100, p. 57-70.
35. Hermes, M, W Schormann, M Brulport, K Uhlemann, F Lupatsch, L C Horn, A Schumann, C Allgaier, M Weishaupt, K Engeland, G A Muller, J Mossner, A Bauer, I B Schiffer, S Gebhard, M Schmidt, E Lausch, D Prawitt, C Wilhelm, J G Hengstler, 2008, Trastuzumab therapy vs tetracycline controlled ERBB2 downregulation: influence on tumour development in an ERBB2-dependent mouse tumour model: *Br. J. Cancer*, v. 98, p. 1525-1532.

36. Hockel, M, P Vaupel, 2001, Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects: *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 93, p. 266-276.
37. Holbro, T, R R Beerli, F Maurer, M Koziczak, C F Barbas, III, N E Hynes, 2003, The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 100, p. 8933-8938.
38. Hunter, T, J Pines, 1994, Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age: *Cell*, v. 79, p. 573-582.
39. Irish, JC, A Bernstein, 1993, Oncogenes in head and neck cancer: *Laryngoscope*, v. 103, p. 42-52.
40. Junttila, TT, M Laato, T Vahlberg, K O Soderstrom, T Visakorpi, J Isola, K Elenius, 2003, Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients: *Clin. Cancer Res.*, v. 9, p. 5346-5357.
41. Kelland, LR, 1993, New platinum antitumor complexes: *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, v. 15, p. 191-219.
42. Kew, TY, J A Bell, S E Pinder, H Denley, R Srinivasan, W J Gullick, R I Nicholson, R W Blamey, I O Ellis, 2000, c-erbB-4 protein expression in human breast cancer: *Br. J. Cancer*, v. 82, p. 1163-1170.
43. Klapper, LN, S Glathe, N Vaisman, N E Hynes, G C Andrews, M Sela, Y Yarden, 1999, The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, p. 4995-5000.
44. Kreienberg, R, Jonat W., Volm T., Möbus V., Alt D. (Hrsg.) *Management des Mammakarzinoms: Onkologie aktuell*, Springer 3. Auflage, 2006

45. Kudo, N, N Matsumori, H Taoka, D Fujiwara, E P Schreiner, B Wolff, M Yoshida, S Horinouchi, 1999, Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, p. 9112-9117.
46. Laemmli, UK, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4: *Nature*, v. 227, p. 680-685.
47. Lee, KF, H Simon, H Chen, B Bates, M C Hung, C Hauser, 1995, Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development: *Nature*, v. 378, p. 394-398.
48. Lemoine, NR, D M Barnes, D P Hollywood, C M Hughes, P Smith, E Dublin, S A Prigent, W J Gullick, H C Hurst, 1992a, Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer: *Br.J.Cancer*, v. 66, p. 1116-1121.
49. Lemoine, NR, M Lobresco, H Leung, C Barton, C M Hughes, S A Prigent, W J Gullick, G Kloppel, 1992b, The erbB-3 gene in human pancreatic cancer: *J. Pathol.*, v. 168, p. 269-273.
50. Levi, F, F Lucchini, E Negri, C La Vecchia, 2001, The fall in breast cancer mortality in Europe: *Eur. J. Cancer*, v. 37, p. 1409-1412.
51. Lin, D, M Fiscella, P M O'Connor, J Jackman, M Chen, L L Luo, A Sala, S Travali, E Appella, W E Mercer, 1994, Constitutive expression of B-myb can bypass p53-induced Waf1/Cip1-mediated G1 arrest: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91, p. 10079-10083.
52. Lin, SY, K Makino, W Xia, A Matin, Y Wen, K Y Kwong, L Bourguignon, M C Hung, 2001, Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor: *Nat. Cell Biol.*, v. 3, p. 802-808.
53. Lo, HW, M Ali-Seyed, Y Wu, G Bartholomeusz, S C Hsu, M C Hung, 2006, Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1: *J. Cell Biochem.*, v. 98, p. 1570-1583.

54. Lo, HW, S C Hsu, M Ali-Seyed, M Gunduz, W Xia, Y Wei, G Bartholomeusz, J Y Shih, M C Hung, 2005a, Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway: *Cancer Cell*, v. 7, p. 575-589.
55. Lo, HW, W Xia, Y Wei, M Ali-Seyed, S F Huang, M C Hung, 2005b, Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer: *Cancer Res.*, v. 65, p. 338-348.
56. Lyne, JC, M F Melhem, G G Finley, D Wen, N Liu, D H Deng, R Salup, 1997, Tissue expression of neu differentiation factor/heregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro: *Cancer J. Sci. Am.*, v. 3, p. 21-30.
57. Maher, PA, 1996, Nuclear Translocation of fibroblast growth factor (FGF) receptors in response to FGF-2: *J. Cell Biol.*, v. 134, p. 529-536.
58. Marmor, MD, K B Skaria, Y Yarden, 2004, Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 58, p. 903-913.
59. Marti, U, S J Burwen, A Wells, M E Barker, S Huling, A M Feren, A L Jones, 1991, Localization of epidermal growth factor receptor in hepatocyte nuclei: *Hepatology*, v. 13, p. 15-20.
60. Massie, C, I G Mills, 2006, The developing role of receptors and adaptors: *Nat. Rev. Cancer*, v. 6, p. 403-409.
61. Maurer, CA, H Friess, B Kretschmann, A Zimmermann, A Stauffer, H U Baer, M Korc, M W Buchler, 1998, Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2: *Hum. Pathol.*, v. 29, p. 771-777.
62. Moscatello, DK, M Holgado-Madruga, A K Godwin, G Ramirez, G Gunn, P W Zoltick, J A Biegel, R L Hayes, A J Wong, 1995, Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors: *Cancer Res.*, v. 55, p. 5536-5539.
63. North, S, M Moenner, A Bikfalvi, 2005, Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors: *Cancer Lett.*, v. 218, p. 1-14.

64. Offterdinger, M, C Schofer, K Weipoltshammer, T W Grunt, 2002, c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells: *J. Cell Biol.*, v. 157, p. 929-939.
65. Ogiso, Y, A Tomida, H D Kim, T Tsuruo, 1999, Glucose starvation and hypoxia induce nuclear accumulation of proteasome in cancer cells: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 258, p. 448-452.
66. Oshima, M, J E Dinchuk, S L Kargman, H Oshima, B Hancock, E Kwong, J M Trzaskos, J F Evans, M M Taketo, 1996, Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2): *Cell*, v. 87, p. 803-809.
67. Pinkas-Kramarski, R, L Soussan, H Waterman, G Levkowitz, I Alroy, L Klapper, S Lavi, R Seger, B J Ratzkin, M Sela, Y Yarden, 1996, Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions: *EMBO J.*, v. 15, p. 2452-2467.
68. Psyri, A, Z Yu, P M Weinberger, C Sasaki, B Haffty, R Camp, D Rimm, B A Burtness, 2005, Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis: *Clin. Cancer Res.*, v. 11, p. 5856-5862.
69. Raabe, TD, G Deadwyler, J W Varga, G H Devries, 2004, Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells: *Glia*, v. 45, p. 197-207.
70. Rajkumar, T, G W Stamp, C M Hughes, W J Gullick, 1996, c-erbB3 protein expression in ovarian cancer: *Clin. Mol. Pathol.*, v. 49, p. M199-M202.
71. Raschella, G, A Negroni, A Sala, S Pucci, A Romeo, B Calabretta, 1995, Requirement of b-myb function for survival and differentiative potential of human neuroblastoma cells: *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 8540-8545.
72. Rasheed, BK, R N Wiltshire, S H Bigner, D D Bigner, 1999, Molecular pathogenesis of malignant gliomas: *Curr. Opin. Oncol.*, v. 11, p. 162-167.
73. Reilly, J F, P A Maher, 2001, Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation: *J. Cell Biol.*, v. 152, p. 1307-1312.

74. Richardson, WD, A D Mills, S M Dilworth, R A Laskey, C Dingwall, 1988, Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores: *Cell*, v. 52, p. 655-664.
75. Roskoski, R, Jr., 2004, The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 319, p. 1-11.
76. Ross, JS, J A Fletcher, 1998, The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy: *Oncologist.*, v. 3, p. 237-252.
77. Sala, A, B Calabretta, 1992, Regulation of BALB/c 3T3 fibroblast proliferation by B-myb is accompanied by selective activation of cdc2 and cyclin D1 expression: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 89, p. 10415-10419.
78. Sala, A, I Casella, T Bellon, B Calabretta, R J Watson, C Peschle, 1996, B-myb promotes S phase and is a downstream target of the negative regulator p107 in human cells: *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 9363-9367.
79. Scherer, WF, J T Syverton, G O Gey, 1953, Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix: *J. Exp. Med.*, v. 97, p. 695-710.
80. Schiffer, IB, S Gebhard, C K Heimerdinger, A Heling, J Hast, U Wollscheid, B Seliger, B Tanner, S Gilbert, T Beckers, S Baasner, W Brenner, C Spangenberg, D Prawitt, T Trost, W G Schreiber, B Zabel, M Thelen, H A Lehr, F Oesch, J G Hengstler, 2003, Switching off HER-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission: *Cancer Res.*, v. 63, p. 7221-7231.
81. Schlessinger, J, 2000, Cell signaling by receptor tyrosine kinases: *Cell*, v. 103, p. 211-225.

82. Schmidt, M, D Hasenclever, M Schaeffer, D Boehm, C Cotarelo, E Steiner, A Lebrecht, W Siggelkow, W Weikel, I Schiffer-Petry, S Gebhard, H Pilch, M Gehrman, H A Lehr, H Koelbl, J G Hengstler, M Schuler, 2008, Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer: *Clin.Cancer Res.*, v. 14, p. 5849-5855.
83. Sergina, NV, M M Moasser, 2007, The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets: *Trends Mol. Med.*, v. 13, p. 527-534.
84. Shintani, S, T Funayama, Y Yoshihama, R E Alcalde, T Matsumura, 1995, Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma: *Cancer Lett.*, v. 95, p. 79-83.
85. Siegel, PM, E D Ryan, R D Cardiff, W J Muller, 1999, Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer: *EMBO J.*, v. 18, p. 2149-2164.
86. Slamon, DJ, G M Clark, S G Wong, W J Levin, A Ullrich, W L McGuire, 1987, Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene: *Science*, v. 235, p. 177-182.
87. Slosberg, ED, M G Klein, Y Yao, E K Han, I Schieren, I B Weinstein, 1999, The alpha isoform of protein kinase C mediates phorbol ester-induced growth inhibition and p21cip1 induction in HC11 mammary epithelial cells: *Oncogene*, v. 18, p. 6658-6666.
88. Soltoff, SP, L C Cantley, 1996, p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells: *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 563-567.
89. Soule, HD, J Vazquez, A Long, S Albert, M Brennan, 1973, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma: *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 51, p. 1409-1416.
90. Stachowiak, EK, P A Maher, J Tucholski, E Mordechai, A Joy, J Moffett, S Coons, M K Stachowiak, 1997, Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells-association with cell proliferation: *Oncogene*, v. 14, p. 2201-2211.

91. Stein, MN, J Shin, O Gudzowaty, A M Bernstein, J M Liu, 2006, Antibody-dependent cell cytotoxicity to breast cancer targets despite inhibitory KIR signaling: *Anticancer Res.*, v. 26, p. 1759-1763.
92. Stern, DF, 2003, ErbBs in mammary development: *Exp. Cell Res.*, v. 284, p. 89-98.
93. Tanaka, T, I Kojima, T Ohse, R Inagi, T Miyata, J R Ingelfinger, T Fujita, M Nangaku, 2005, Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity: *Am. J. Physiol Renal Physiol*, v. 289, p. F1123-F1133.
94. Tanner, B, D Hasenclever, K Stern, W Schormann, M Bezler, M Hermes, M Brulport, A Bauer, I B Schiffer, S Gebhard, M Schmidt, E Steiner, J Sehouli, J Edelman, J Lauter, R Lessig, K Krishnamurthi, A Ullrich, J G Hengstler, 2006, ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer: *J. Clin. Oncol.*, v. 24, p. 4317-4323.
95. Thomsen, LL, J M Scott, P Topley, R G Knowles, A J Keerie, A J Frend, 1997, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a novel inhibitor: *Cancer Res.*, v. 57, p. 3300-3304.
96. Toikkanen, S, H Helin, J Isola, H Joensuu, 1992, Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up: *J. Clin. Oncol.*, v. 10, p. 1044-1048.
97. Towbin, H, T Staehelin, J Gordon, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications: *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, v. 76, p. 4350-4354.
98. Tredan, O, C M Galmarini, K Patel, I F Tannock, 2007, Drug resistance and the solid tumor microenvironment: *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 99, p. 1441-1454.
99. Trost, TM, E U Lausch, S A Fees, S Schmitt, T Enklaar, D Reutzel, L R Brixel, P Schmidtke, M Maringer, I B Schiffer, C K Heimerdinger, J G Hengstler, G Fritz, E O Bockamp, D Prawitt, B U Zabel, C Spangenberg, 2005, Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells: *Cancer Res.*, v. 65, p. 840-849.

100. Tzahar, E, R Pinkas-Kramarski, J D Moyer, L N Klapper, I Alroy, G Levkowitz, M Shelly, S Henis, M Eisenstein, B J Ratzkin, M Sela, G C Andrews, Y Yarden, 1997, Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network: *EMBO J.*, v. 16, p. 4938-4950.
101. Tzahar, E, H Waterman, X Chen, G Levkowitz, D Karunakaran, S Lavi, B J Ratzkin, Y Yarden, 1996, A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor: *Mol. Cell Biol.*, v. 16, p. 5276-5287.
102. van der Horst, EH, M Murgia, M Treder, A Ullrich, 2005, Anti-HER-3 MAbs inhibit HER-3-mediated signaling in breast cancer cell lines resistant to anti-HER-2 antibodies: *Int. J.Cancer*, v. 115, p. 519-527.
103. Vaupel, P, M Hockel, 2000, Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance: *Int. J.Oncol.*, v. 17, p. 869-879.
104. Vaupel, P, F Kallinowski, P Okunieff, 1989, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review: *Cancer Res.*, v. 49, p. 6449-6465.
105. Wallasch, C, F U Weiss, G Niederfellner, B Jallal, W Issing, A Ullrich, 1995, Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3: *EMBO J.*, v. 14, p. 4267-4275.
106. Wang, SC, H C Lien, W Xia, I F Chen, H W Lo, Z Wang, M Ali-Seyed, D F Lee, G Bartholomeusz, F Ou-Yang, D K Giri, M C Hung, 2004, Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2: *Cancer Cell*, v. 6, p. 251-261.
107. Wasserman, JD, M Freeman, 1997, Control of EGF receptor activation in *Drosophila*: *Trends Cell Biol.*, v. 7, p. 431-436.
108. Weis, K, 2003, Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle: *Cell*, v. 112, p. 441-451.

109. Wen, W, J L Meinkoth, R Y Tsien, S S Taylor, 1995, Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus: *Cell*, v. 82, p. 463-473.
110. Wessel, D, U I Flugge, 1984, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids: *Anal. Biochem.*, v. 138, p. 141-143.
111. Wiedlocha, A, P O Falnes, A Rapak, R Munoz, O Klingenberg, S Olsnes, 1996, Stimulation of proliferation of a human osteosarcoma cell line by exogenous acidic fibroblast growth factor requires both activation of receptor tyrosine kinase and growth factor internalization: *Mol.Cell Biol.*, v. 16, p. 270-280.
112. Winston, JA, R Safirstein, 1985, Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat: *Am.J.Physiol*, v. 249, p. F490-F496.
113. Wiseman, SM, N Makretsov, T O Nielsen, B Gilks, E Yorida, M Cheang, D Turbin, K Gelmon, D G Huntsman, 2005, Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival: *Cancer*, v. 103, p. 1770-1777.
114. Witton, CJ, J R Reeves, J J Going, T G Cooke, J M Bartlett, 2003, Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer: *J. Pathol.*, v. 200, p. 290-297.
115. Wong, AJ, J M Ruppert, S H Bigner, C H Grzeschik, P A Humphrey, D S Bigner, B Vogelstein, 1992, Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas: *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A*, v. 89, p. 2965-2969.
116. Xia,W, Y K Lau, H Z Zhang, F Y Xiao, D A Johnston, A R Liu, L Li, R L Katz, M C Hung, 1999, Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members: *Clin. Cancer Res.*, v. 5, p. 4164-4174.
117. Yang, J, E S Bardes, J D Moore, J Brennan, M A Powers, S Kornbluth, 1998, Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1: *Genes Dev.*, v. 12, p. 2131-2143.

118. Yarden, Y, M X Sliwkowski, 2001, Untangling the ErbB signalling network: Nat. Rev. Mol. Cell Biol., v. 2, p. 127-137.

119. Yoneda, Y, 2000, Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function: Genes Cells, v. 5, p. 777-787.

8 Anhang

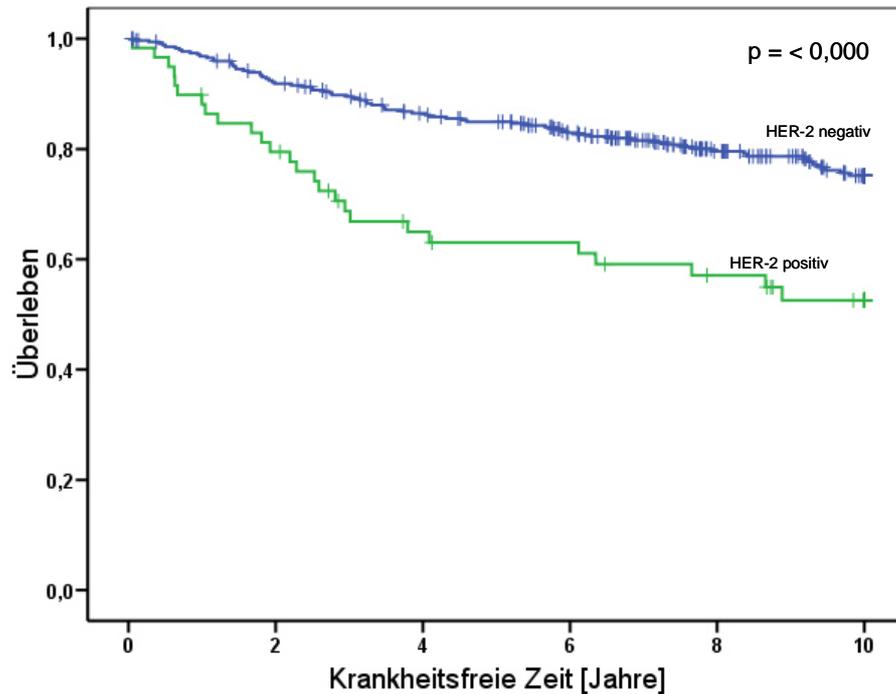


Abbildung 50: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre ergab eine Assoziation von HER-2 in 201 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (log-rank, $p = <0,001$). Die Patientinnen wurden entsprechend ihren HER-2-Status (negativ oder positiv) eingeteilt.

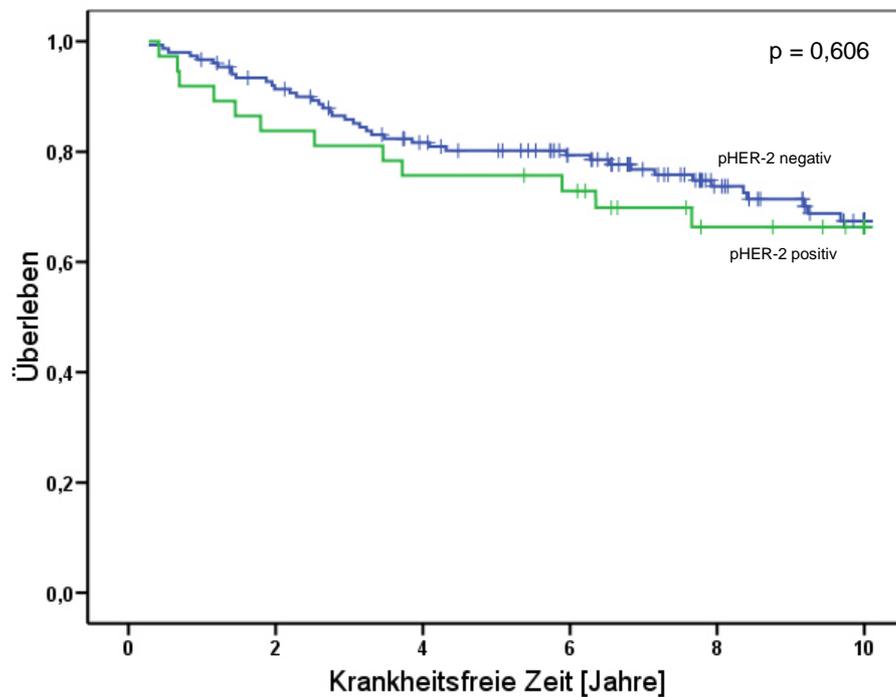


Abbildung 51: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre ergab keine Assoziation von Phospho-HER-2 in 201 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,606$). Die Patientinnen wurden entsprechend ihren Phospho-HER-2-Status (negativ oder positiv) eingeteilt.

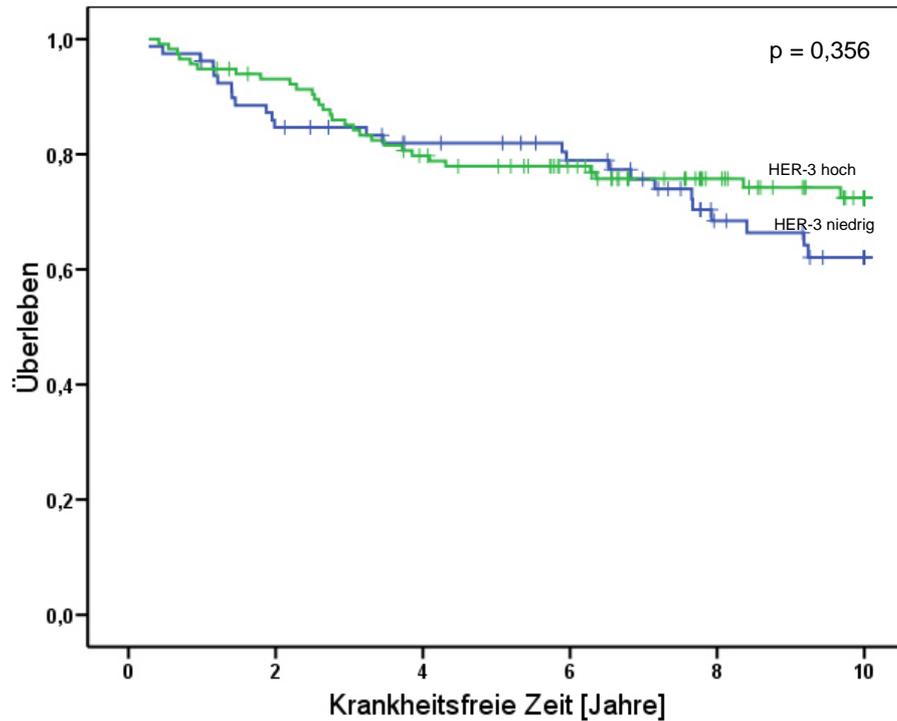


Abbildung 52: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre ergab keine Assoziation von HER-3 in 201 Patientinnen mit primären Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,356$). Die Patientinnen wurden entsprechend ihrer HER-3-Expression (hoch oder niedrig) eingeteilt.

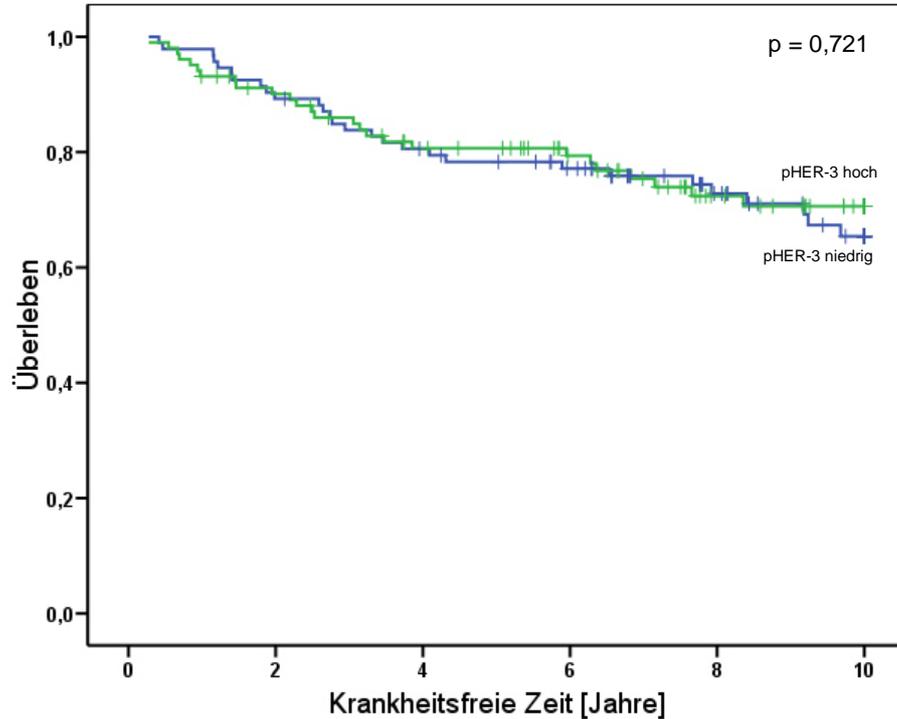


Abbildung 53: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre ergab keine Assoziation von Phospho-HER-3 in 201 Patientinnen mit primären Mammakarzinom (log-rank, $p = 0,721$). Die Patientinnen wurden entsprechend ihrer Phospho-HER-3-Expression (hoch oder niedrig) eingeteilt.

Tabelle 16: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-2-Expression (niedrig vs hoch)	2,392	1,505-3,800	< 0,000
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,392	0,879-2,205	0,158
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,171	0,778-1,760	0,449
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,682	0,449-1,034	0,072
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	3,628	2,372-5,550	< 0,000

Tabelle 17: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des pHER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10 Jahre Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
pHER-2-Expression (niedrig vs hoch)	0,921	0,447-1,780	0,807
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,379	0,716-2,657	0,336
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	0,985	0,559-1,734	0,958
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,772	0,426-1,401	0,395
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	5,607	3,093-10,162	< 0,000

Tabelle 18: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
HER-3-Expression (niedrig vs hoch)	0,957	0,556-1,647	0,874
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,236	0,648-2,359	0,521
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,134	0,662-1,941	0,647
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	0,774	0,429-1,396	0,394
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	5,262	2,919-9,487	$< 0,000$

Tabelle 19: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des pHER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).

	Relatives Risiko	95 % CI	p-Wert
pHER-3-Expression (niedrig vs hoch)	0,984	0,574-1,688	0,954
Hormonstatus (ER/PR-Status negativ vs ER/PR-Status positiv)	1,238	0,647-2,370	0,519
Tumorstadium (≤ 2 cm vs > 2 cm)	1,137	0,665-1,944	0,639
Alter bei Diagnose (< 55 vs ≥ 55 Jahre)	5,228	0,429-1,397	0,395
Histologisches Grading (Grad III vs Grad I, II)	5,288	2,942-9,505	$< 0,000$

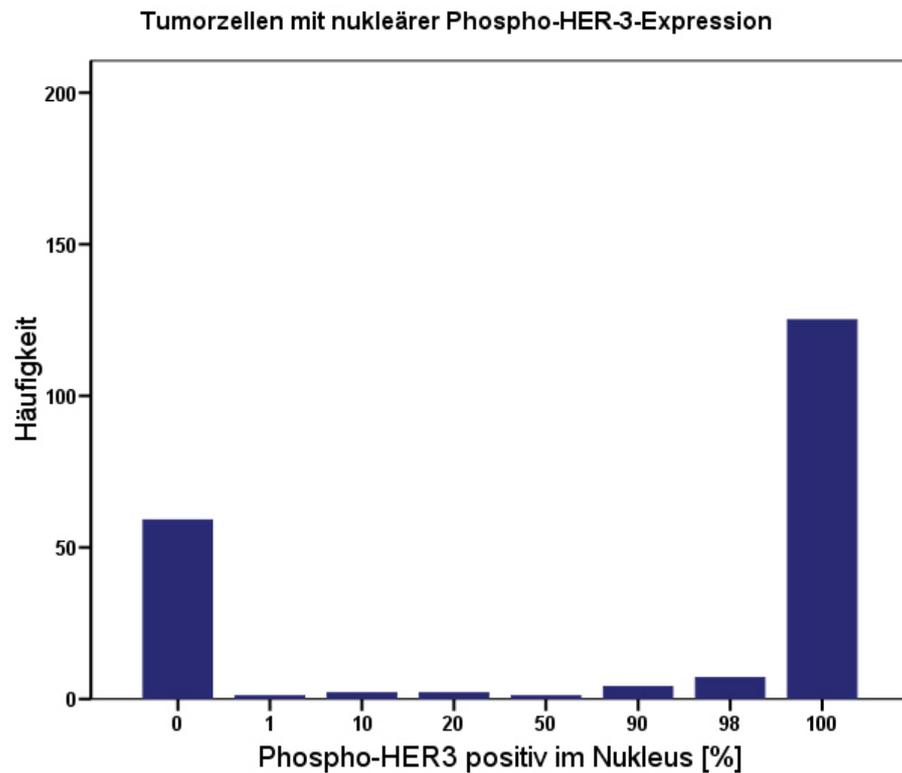


Abbildung 54: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine nukleäre Phospho-c-erbB-3/HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom (n = 201). Die Häufigkeitsverteilung diente als Grundlage für die anschließende Dichotomisierung am Median.

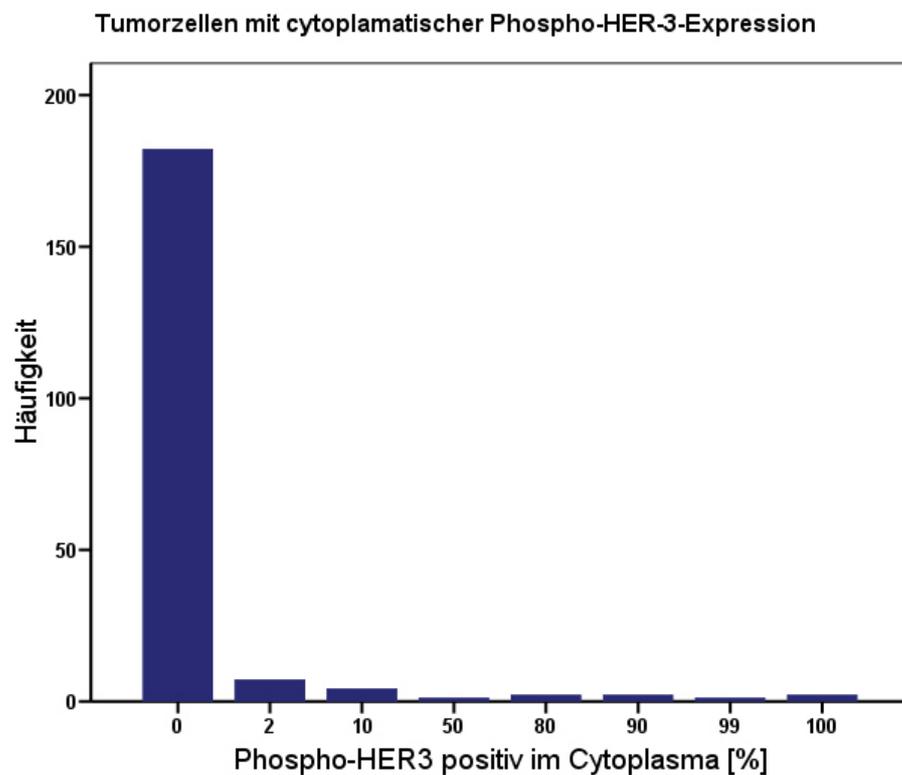


Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung für eine cytoplasmatische Phospho-c-erbB-3/HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom (n = 201). Die Häufigkeitsverteilung diente als Grundlage für die anschließende Dichotomisierung am Median.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progression der Brustkrebs-Pathogenese.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptoren und ihre jeweiligen Liganden	6
Abbildung 3: Aktivierung der ErbB-Proteine.	7
Abbildung 4: Darstellung der spezifischen Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen der Adaptormoleküle an der Rezeptortyrosinkinase HER-3.	7
Abbildung 5: ErbB-induzierte Signalwege in der Zelle.	9
Abbildung 6: Signaltransduktion durch ErbB-Homodimere im Vergleich zu ErbB-2-Heterodimeren.	11
Abbildung 7: Schematische Darstellung für den nukleären Import und Export von Proteinen	14
Abbildung 8: MCF-7/NeuT-Zellen Transfektionskonstrukte	16
Abbildung 9: NIH3T3-Zellen Expressionskonstrukte	17
Abbildung 10: Längenstandards.	18
Abbildung 11: Einzelne Arbeitsschritte der Anfertigung von Gewebe-Paraffinschnitten.	31
Abbildung 12: Assoziation von HER-3-Expression mit dem Überleben von Patientinnen mit primären Ovarialkarzinomen.	43
Abbildung 13: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit mit der HER-2 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	45
Abbildung 14: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit mit der HER-3 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	46
Abbildung 15: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit Phospho-HER-2 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	46
Abbildung 16: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit mit der Phospho-HER-3 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	47
Abbildung 17: Beispiel für cytoplasmatische und nukleäre HER-3-Expression im Mammakarzinom.	52
Abbildung 18: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine cytoplasmatische HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom.	53
Abbildung 19: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine nukleäre HER-3-Expression [%] im Mammakarzinom-Patientinnen.	54

- Abbildung 20: Inverse Korrelation zwischen der subzellulären HER-3-Expression im Mammakarzinom. 55
- Abbildung 21: Inverse Korrelation zwischen der subzellulären HER-3-Expression im Mammakarzinom. 56
- Abbildung 22: Konfokaler Laserscan entlang der z-Achse. MCF-7-Zellen mit nukleärem HER-3. 57
- Abbildung 23: Dreidimensionale Darstellung von einer MCF-7-Zellen mit nukleärer HER-3-Expression. 57
- Abbildung 24: Repräsentatives Ergebnis eines IHC-Nachweises der Rezeptortyrosinkinase HER-3 in einer subkonfluenten MCF-7-Zellkultur. 58
- Abbildung 25: Cytoplasmatische und nukleäre HER-3-Expression in subkonfluent kultivierten HeLa-Zellen. 59
- Abbildung 26: Massive nukleäre HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren entstanden aus einer Zervix-Karzinom-Zelllinie (HeLa) nach immunhistologischen Nachweis. 60
- Abbildung 27: Detailaufnahme einer nukleären HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren hervorgegangen aus HeLa-Zellen. 60
- Abbildung 28: Detailaufnahme einer nukleären HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren hervorgegangen aus HeLa-Zellen. 61
- Abbildung 29: Cytoplasmatische HER-3-Expression in subkonfluent kultivierten NIH3T3-*her-2*-Mausfibroblasten. 62
- Abbildung 30: Starke nukleäre HER-3-Expression in Xenograft-Tumoren entstanden aus einer Mausfibroblasten-Zelllinie nach immunhistologischen Nachweis 62
- Abbildung 31: Detailaufnahme eines HER-3-Expressionsnachweises in Xenograft-Tumoren entstanden durch die transgene Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3-*her-2*. 63
- Abbildung 32: C-erbB-3/HER-3-Expressionsnachweises in Xenograft-Tumoren entstanden durch die transgene Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3-*her-2*. 63
- Abbildung 33: ATP-Depletion durch Oligomycin B und 2-Deoxy D-Glucose in MCF-7. 65
- Abbildung 34: ATP-Depletion durch Oligomycin B und 2-Deoxy D-Glucose in HeLa. 65
- Abbildung 35: Glucose-Depletion verursacht keine gesteigerte HER-3-Expression im Zellkern bei subkonfluenten MCF-7-Zellen. 66
- Abbildung 36: Nukleäre Akkumulation von HER-3 durch den Entzug von Glucose bei subkonfluent kultivierten Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa-Zellen). 67
- Abbildung 37: Ergebnis eines immunhistologischen Nachweises der Rezeptortyrosinkinase HER-3 in konfluenter und subkonfluenter MCF-7-Kultur. 68

Abbildung 38: Nukleäre HER-3-Expression bei verschiedenen Zellkonfluenzen.	69
Abbildung 39: MAPK-Signalweg.	70
Abbildung 40: AKT/PI-3K-Signalweg.	71
Abbildung 41: Ligand-abhängige Stimulation.	72
Abbildung 42: Konzentrationsabhängige Cisplatin-Exposition und nukleäre HER-3-Expression.	73
Abbildung 43: Zeitabhängige Cisplatin-Exposition und nukleäre HER-3-Expression.	74
Abbildung 44: Konzentrations – und zeitabhängige Wasserstoffperoxid-Exposition und nukleäre HER-3-Expression.	75
Abbildung 45: HER-2 Überexpression in MCF-7/NeuT-Zellen.	76
Abbildung 46: TUNEL-Nachweis und HER-3-IHC an kultivierten MCF-7-Zellen.	77
Abbildung 47: Inaktivierung des nukleären Exportrezeptor führt zur Akkumulation von HER-3 im Nukleus.	78
Abbildung 48: Leptomycin B (LMB) inhibiert den nukleären Export.	79
Abbildung 49: Endozytose am Beispiel des EGFR.	82
Abbildung 50: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre von HER-2 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	107
Abbildung 51: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre von Phospho-HER-2 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	107
Abbildung 52: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre von HER-3 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	108
Abbildung 53: Kaplan-Meier Analyse der krankheitsfreien Zeit über 10 Jahre von Phospho-HER-3 Expression in Patientinnen mit primären Mammakarzinom.	108
Abbildung 54: Zweigipfelige Häufigkeitsverteilung für eine nukleäre Phospho-HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom.	111
Abbildung 55: Häufigkeitsverteilung für eine cytoplasmatische Phospho-HER-3-Expression [%] in Tumoren von Patientinnen mit Mammakarzinom.	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms	4
Tabelle 2: Ausgewählte Literaturbeispiele von Mitgliedern der ErbB-Familie für Tumorentstehung und -entwicklung.	12
Tabelle 3: Zusammensetzung der einzelnen Medien zur Kultivierung der eukaryotischen Zellen.	18
Tabelle 4: Klinisch-pathologische Charakteristika von Patientinnen mit nodal-negativen Mammakarzinom (n = 201).	28
Tabelle 5: Klinisch-pathologische Charakteristika von Patientinnen mit primärem Ovarialkarzinom (n = 116).	29
Tabelle 6: Entwässerungsprotokoll der Gewebeproben.	32
Tabelle 7: Verwendete Antikörper im immunhistologischen Nachweis.	34
Tabelle 8. Verwendete Antikörper im Immunoblot.	41
Tabelle 9: Multivariate Cox Analyse für des Einflusses der HER-3-Expression auf das Überleben im Ovarialkarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 116).	44
Tabelle 10: Univariate Cox-Analyse aller Faktoren ergab nur für die HER-2-Expression eine Assoziation mit dem Patientinnenüberleben im Mammakarzinom (n = 201).	48
Tabelle 11: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	49
Tabelle 12: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des Phospho-HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	49
Tabelle 13: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	50
Tabelle 14: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des Phospho-HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	50
Tabelle 15: Die HER-3-Expression im Nukleus und die HER-3-Expression im Cytoplasma wurde in einer Kreuztabelle gegenübergestellt.	54
Tabelle 16: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	109
Tabelle 17: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des pHER-2-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10 Jahre Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201).	109

Tabelle 18: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des HER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201). 110

Tabelle 19: Multivariate Cox Analyse des Einflusses des pHER-3-Status auf die krankheitsfreie Zeit (10-Jahre-Follow-up) im Mammakarzinom-Patientinnenkollektiv (n = 201). 110

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen genutzt als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Dortmund, den 02.10.2008

Wiebke Schormann

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. J. G. Hengstler für die interessante Themenstellung, die Betreuung und die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. C. M. Niemeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. L.C. Horn und Dr. M. Hermes für die Bereitstellung der Xenograft-Tumore danken.

Ferner danke ich Herrn Dr. M. Schmidt für die Durchsicht der IHC-Proben.

Besonders danke ich Dr. J. Grosche für die Unterstützung beim LSM in meiner „Leipziger Zeit“ und die wertvollen Anregungen. Jeder Freitag war besonders, egal mit oder ohne Termin.

Diese Arbeit wäre nicht das Gleiche ohne Euch. Vielen lieben Dank an Alex, Christian, Daniela, Elke, Marc und Matthias. Ich möchte keinen Tag missen!

Mein spezieller Dank gilt den Leipziger Medizindoktoranden Caro, Jakob, Michal, Peter und Verena für die nette Atmosphäre im Labor.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des IfADo für ihre freundliche Unterstützung danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie (insbesondere bei meiner Mutter).

Lebenslauf

Name: Schormann
Vorname: Wiebke
Geburtsdatum: 09.02.1976
Geburtsort: Northeim, Niedersachsen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1982-1986 Grundschohle Moringen
1986-1992 Kooperative Gesamtschule, Moringen
1992-1995 Berufsbildende Schulen I Wirtschaft und Verwaltung,
Northeim
Mai 1995 Abiturprüfung

Berufsausbildung:

1995- 1998 Ausbildung zur Biologielaborantin am Institut für Forstbotanik der
Georg-August-Universität Göttingen

Hochschulausbildung:

WS 1998/1999 Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen

Oktober 2000 Vordiplom in den Fächern Botanik, Mikrobiologie, anorganische
Chemie und physikalische Chemie

Juni 2002 Hauptdiplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Immunologie
und Biochemie

August 2002-
Juni 2003 Externe Diplomarbeit im Zentrum für Hygiene und Humangenetik,
Abteilung Virologie der Georg-August-Universität Göttingen
Titel der Diplomarbeit: „Expression von Hepatitis B Virus-ähnlichen
Partikeln in Abwesenheit des viralen Genoms“
Abschluss: Diplom/Biologie

September 2003-
Januar 2004 Auslandsaufenthalt University of Manchester, UK
(ERASMUS-Programm)

2004–2006 Beginn der Promotion am Zentrum für Toxikologie der Universität
Leipzig, (Prof. J.G. Hengstler)

seit 2007 Fortführung der Promotion am Leibniz-Institut für
Arbeitsphysiologie an der Technischen Universität Dortmund (Prof.
J.G. Hengstler)

Publikationsliste

Glahn, F, W Schmidt-Heck, S Zellmer, R Guthke, J Wiese, K Golka, R Hergenroder, G H Degen, T Lehmann, M Hermes, W Schormann, M Brulport, A Bauer, E Bedawy, R Gebhardt, J G Hengstler, H Foth, 2008, Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors: Arch.Toxicol., v. 82, p. 513-524.

Hermes, M, W Schormann, M Brulport, K Uhlemann, F Lupatsch, L C Horn, A Schumann, C Allgaier, M Weishaupt, K Engeland, G A Muller, J Mossner, A Bauer, I B Schiffer, S Gebhard, M Schmidt, E Lausch, D Prawitt, C Wilhelm, J G Hengstler, 2008, Trastuzumab therapy vs tetracycline controlled ERBB2 downregulation: influence on tumour development in an ERBB2-dependent mouse tumour model: Br. J.Cancer, v. 98, p. 1525-1532.

Steiner, E, K Pollow, D Hasenclever, W Schormann, M Hermes, M Schmidt, A Puhl, M Brulport, A Bauer, I B Petry, H Koelbl, J G Hengstler, 2008, Role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) for prognosis in endometrial cancer: Gynecol. Oncol., v. 108, p. 569-576.

Schormann, W, F J Hammersen, M Brulport, M Hermes, A Bauer, C Rudolph, M Schug, T Lehmann, A Nussler, H Ungefroren, J Hutchinson, F Fandrich, J Petersen, K Wursthorn, M R Burda, O Brustle, K Krishnamurthi, M von Mach, J G Hengstler, 2008, Tracking of human cells in mice: Histochem. Cell Biol., v. 130, p. 329-338.

Aurich, I, L P Mueller, H Aurich, J Luetzkendorf, K Tisljar, M M Dollinger, W Schormann, J Walldorf, J G Hengstler, W E Fleig, B Christ, 2007, Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers: Gut, v. 56, p. 405-415.

Brulport, M, W Schormann, A Bauer, M Hermes, C Elsner, F J Hammersen, W Beerheide, D Spitkovsky, W Hartig, A Nussler, L C Horn, J Edelmann, O Pelz-Ackermann, J Petersen, M Kamprad, M von Mach, A Lupp, H Zulewski, J G Hengstler, 2007, Fate of extrahepatic human stem and precursor cells after transplantation into mouse livers: Hepatology, v. 46, p. 861-870.

Schormann, W, A Kraft, D Ponsel, V Bruss, 2006, Hepatitis B virus particle formation in the absence of pregenomic RNA and reverse transcriptase: J. Virol., v. 80, p. 4187-4190.

Nussler, A, S Konig, M Ott, E Sokal, B Christ, W Thasler, M Brulport, G Gabelein, W Schormann, M Schulze, E Ellis, M Kraemer, F Nocken, W Fleig, M Manns, S C Strom, J G Hengstler, 2006, Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases: J. Hepatol., v. 45, p. 144-159.

Hengstler, JG, E O Bockamp, M Hermes, M Brulport, A Bauer, W Schormann, I B Schiffer, C Hausherr, L Eshkind, C Antunes, A Franzen, K Krishnamurthi, E Lausch, R Lessig, T Chakrabarti, D Prawitt, B Zabel, C Spangenberg, 2006, Oncogene-blocking therapies: new insights from conditional mouse tumor models: Curr. Cancer Drug Targets., v. 6, p. 603-612.

Tanner, B, D Hasenclever, K Stern, W Schormann, M Bezler, M Hermes, M Brulport, A Bauer, I B Schiffer, S Gebhard, M Schmidt, E Steiner, J Sehouli, J Edelmann, J Lauter, R Lessig, K Krishnamurthi, A Ullrich, J G Hengstler, 2006, ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer: J. Clin.Oncol., v. 24, p. 4317-4323.

Klingmuller, U, A Bauer, S Bohl, P J Nickel, K Breitkopf, S Dooley, S Zellmer, C Kern, I Merfort, T Sparna, J Donauer, G Walz, M Geyer, C Kreutz, M Hermes, F Gotschel, A Hecht, D Walter, L Egger, K Neubert, C Borner, M Brulport, W Schormann, C Sauer, F Baumann, R Preiss, S MacNelly, P Godoy, E Wiercinska, L Ciuculan, J Edelmann, K Zeilinger, M Heinrich, U M Zanger, R Gebhardt, T Maiwald, R Heinrich, J Timmer, F von Weizsacker, J G Hengstler, 2006, Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways: Syst. Biol. (Stevenage.), v. 153, p. 433-447.

Eger, K, M Hermes, K Uhlemann, S Rodewald, J Ortwein, M Brulport, A W Bauer, W Hengstler, JG, M Brulport, W Schormann, A Bauer, M Hermes, A K Nussler, F Fandrich, M Ruhnke, H Ungefroren, L Griffin, E Bockamp, F Oesch, M A von Mach, 2005, Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte: Expert. Opin. Drug Metab Toxicol., v. 1, p. 61-74.

Ringel, M, M A von Mach, R Santos, P J Feilen, M Brulport, M Hermes, A W Bauer, W Schormann, B Tanner, M R Schon, F Oesch, J G Hengstler, 2005, Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction: Toxicology, v. 206, p. 153-167.

Ruhnke, M, H Ungefroren, A Nussler, F Martin, M Brulport, W Schormann, J G Hengstler, W Klapper, K Ulrichs, J A Hutchinson, B Soria, R M Parwaresch, P Heeckt, B Kremer, F

Fandrich, 2005, Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells: *Gastroenterology*, v. 128, p. 1774-1786.

von Mach, MA, J G Hengstler, M Brulport, M Eberhardt, W Schormann, M Hermes, D Prawitt, B Zabel, J Grosche, A Reichenbach, B Muller, L S Weilemann, H Zulewski, 2004, In vitro cultured islet-derived progenitor cells of human origin express human albumin in severe combined immunodeficiency mouse liver in vivo: *Stem Cells*, v. 22, p. 1134-1141.