

**Konditionale Expression von HER-2, H-Ras oder  
BXB-Raf1 in einem Maustumormodell:  
Molekulare Mechanismen der Tumorremission**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Carolin Kim Hausherr

geb. in Seoul

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2005

Meinen Eltern  
und  
Arndt

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	HER-2 und die HER Familie.....	2
1.2	Die Bedeutung von HER-2 in der Tumorentwicklung .....	3
1.3	HER-2 vermittelte Signalkaskaden .....	4
1.3.1	Der Ras-MAP Kinase Signalweg.....	5
1.3.2	Der PI3K/Akt Signalweg.....	6
1.4	H-Ras und die Ras Familie .....	7
1.5	c-Raf-1 und die Raf Familie .....	8
1.6	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit .....	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>11</b>
2.1	Chemikalien .....	12
2.2	Geräte .....	13
2.3	Zellkultur .....	14
2.3.1	Zelllinien .....	14
2.3.2	Material .....	14
2.3.3	Nährmedium .....	15
2.3.4	Lösungen.....	15
2.4	In vivo Experimente .....	16
2.4.1	Versuchstiere.....	16
2.4.2	Material .....	16
2.4.3	Lösungen.....	16
2.5	Western Blot Analysen.....	16
2.5.1	Material .....	16
2.5.2	Antikörper.....	17

---

2.5.2.1	Erstantikörper .....	17
2.5.2.2	Zweitantikörper .....	17
<b>2.5.3</b>	<b>Lösungen.....</b>	<b>17</b>
2.5.3.1	Fertiglösungen.....	17
2.5.3.2	Proteinmarker .....	18
2.5.3.3	Lysepuffer .....	18
2.5.3.4	Lösungen für die Gelelektrophorese .....	20
2.5.3.5	Lösungen für die Immunfärbung.....	21
2.5.3.6	Coomassiefärbung.....	22
<b>2.5.4</b>	<b>Gele .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Immunhistochemische Färbung.....</b>	<b>23</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Lösungen.....</b>	<b>23</b>
2.6.2.1	Fertiglösungen.....	23
2.6.2.2	Lösungen .....	24
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>TET-OFF System .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>27</b>
3.2.1	Kultivierung der Zelllinien .....	27
3.2.2	Wachstumskurve .....	27
3.2.3	Inkubation mit Anhydrotetracyclin.....	27
<b>3.3</b>	<b>In vivo Experimente .....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Maustumormodell .....	28
3.3.2	Wachstumskurve .....	28
3.3.3	Behandlungsschema .....	30

3.3.3.1	Kurzzeitstudien für die Proteinisolierung und immunhistochemische Färbung .....	30
3.3.3.2	Behandlungsschema der HER-2 Tumore .....	32
<b>3.4</b>	<b>Western Blot Analysen.....</b>	<b>34</b>
3.4.1	Präparation der Zellysate .....	34
3.4.2	Präparation der Tumorlysate.....	35
3.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford .....	35
3.4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	36
3.4.4.1	SDS-PAGE.....	36
3.4.4.2	Proteintransfer .....	37
3.4.4.3	Immunfärbung.....	37
3.4.5	Verdünnungen und Inkubationsbedingungen der Antikörper .....	38
3.4.6	Auswertung .....	39
<b>3.5</b>	<b>Immunhistochemische Färbung.....</b>	<b>39</b>
3.5.1	Präparation der Objektträger für die <i>in vitro</i> Untersuchungen .....	39
3.5.2	Präparation der Tumorschnitte .....	40
3.5.3	Färbeprotokoll der Ki-67 Peroxidasefärbung .....	40
3.5.4	Auswertung .....	41
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
4.1	NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen <i>in vitro</i> .....	43
4.1.1	Wachstumsverhalten <i>in vitro</i> .....	43
4.1.2	Konditionale Expression von H-Ras bzw. BXB-Raf1 <i>in vitro</i> .....	43
4.2	Konditionale Expression von H-Ras bzw. BXB-Raf1 <i>in vivo</i> .....	45
4.3	Tumorwachstum der NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen <i>in vivo</i> .	48
4.3.1	Tumorremission nach Ausschalten von H-Ras.....	48
4.3.2	Tumorremission nach Ausschalten von BXB-Raf1 .....	49
4.3.2.1	NIH3T3 BXB-Raf1 1. Klon.....	49

---

4.3.2.2	NIH3T3 BXB-Raf1 2. Klon.....	50
4.4	H-Ras und BXB-Raf1 Expression in den Rezidivtumoren.....	52
4.5	Bestimmung der Proliferation.....	54
4.5.1	Proliferation der Zellen <i>in vitro</i> .....	54
4.5.2	Proliferation der Tumore <i>in vivo</i> .....	58
4.6	Untersuchung auf Apoptose <i>in vivo</i> .....	61
4.7	Einfluss der Herunterregulation von H-Ras bzw. BXB-Raf1 auf ERK und Akt. .....	63
4.7.1	Einfluss auf p-ERK.....	64
4.7.2	Einfluss auf p-Akt.....	65
4.7.3	Bestimmung des Akt Gesamtproteins.....	68
4.8	Untersuchung des Einflusses unterschiedlich langer ATc-Behandlungen auf Tumorverlauf und HER-2 Expression.....	69
4.8.1	Tumorverlauf nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung.....	70
4.8.2	Einfluss einer zweiten ATc-Behandlung.....	71
4.8.3	Erneute HER-2 Expression nach Beendigung der ATc-Behandlung.....	72
5	DISKUSSION.....	75
5.1	Konditionale Expression von Onkogenen – sind Tumore reversibel?.....	76
5.2	Inkubation mit Anhydrotetracyclin <i>in vitro</i> führte zu einer Herunterregulation der H-Ras und BXB-Raf1 Expression.....	77
5.3	Zwei neue Maustumormodelle zur Untersuchung des Einflusses von H-Ras bzw. BXB-Raf1.....	78
5.4	Ausschalten der BXB-Raf1 Expression führte zu einer mit den HER-2 Tumoren vergleichbaren Tumorremission.....	79
5.5	Die Rezidivbildung war unabhängig von den transfizierten Onkogenen HER-2, H-Ras bzw. BXB-Raf1.....	81
5.6	Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1 führte zu einem Proliferationsstopp.....	82
5.7	Die Tumore zeigten keine Induktion von Apoptose im Caspase-3 Western Blot nach Ausschalten von H-Ras bzw. BXB-Raf1.....	84
5.8	Die Dephosphorylierung von ERK ging der Tumorremission voraus.....	87

---

<b>5.9</b>	<b>Deaktivierung und Degradierung des Akt Gesamtproteins scheint eine Folge der Tumorremission zu sein .....</b>	<b>90</b>
<b>5.10</b>	<b>Anhydrotetracyclin kann die HER-2 Expression <i>in vivo</i> lang anhaltend unterdrücken .....</b>	<b>91</b>
<b>5.11</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>107</b>



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: HER-2 vermittelte Signalkaskaden.....	4
Abbildung 1.2: Die Ras-MAP Kinase Kaskade.....	6
Abbildung 3.1: TET-OFF System – Vektorkonstrukte am Beispiel von HER-2.....	26
Abbildung 3.2: Studienaufbau HER-2 Tumore.....	33
Abbildung 3.3: Aufbau des Semy-Dry Blots .....	37
Abbildung 4.1: Wachstumskurve der NIH3T3 WT, NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 <i>in vitro</i> .....	43
Abbildung 4.2: NIH3T3 H-Ras <i>in vitro</i> .....	44
Abbildung 4.3: NIH3T3 BXB-Raf1 <i>in vitro</i> .....	45
Abbildung 4.4: Herunterregulation von H-Ras <i>in vivo</i> .....	46
Abbildung 4.5: Herunterregulation von BXB-Raf <i>in vivo</i> .....	47
Abbildung 4.6: Vergleich des Wachstumsverhaltens der HER-2, H-Ras und BXB-Raf1 Tumore .....	48
Abbildung 4.7: Tumorverlauf der aus den NIH3T3 H-Ras Zellen und den NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen resultierenden Tumore ohne und mit ATc Behandlung.....	51
Abbildung 4.8: H-Ras Expression in den Rezidiven der H-Ras Tumore.....	52
Abbildung 4.9: BXB-Raf1 Expression in den Rezidiven der BXB-Raf1 Tumore .....	53
Abbildung 4.10: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den NIH3T3 H-Ras Zellen .....	55
Abbildung 4.11: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in dem 1. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen.....	56
Abbildung 4.12: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in dem 2. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen.....	57
Abbildung 4.13: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den H-Ras Tumoren .....	59

---

Abbildung 4.14: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den BXB-Raf1 Tumoren .....	60
Abbildung 4.15: Bestimmung der Caspase-3 in den H-Ras Tumoren.....	62
Abbildung 4.16: Bestimmung der Caspase-3 in den BXB-Raf1 Tumoren.....	63
Abbildung 4.17: Herunterregulation von p-ERK nach Ausschalten von H-Ras <i>in vivo</i> .....	64
Abbildung 4.18: Herunterregulation von p-ERK nach Ausschalten von BXB-Raf1 <i>in vivo</i> .	65
Abbildung 4.19: Einfluss des Ausschaltens von H-Ras <i>in vivo</i> auf p-Akt.....	66
Abbildung 4.20: Einfluss des Ausschaltens von BXB-Raf1 <i>in vivo</i> auf p-Akt.....	66
Abbildung 4.21: Vergleich der p-Akt Expression in den Kontrollen der H-Ras und BXB-Raf1 Tumoren .....	67
Abbildung 4.22: Einfluss des Ausschaltens von H-Ras <i>in vivo</i> auf Akt .....	68
Abbildung 4.23: Einfluss des Ausschaltens von BXB-Raf1 <i>in vivo</i> auf Akt.....	69
Abbildung 4.24: Langzeitverlauf der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung.....	70
Abbildung 4.25: Kurzzeitverlauf der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung.....	71
Abbildung 4.26: Rezidivwachstum der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung.....	72
Abbildung 4.27: Western Blot Nachweis der HER-2 Expression nach unterschiedlichen ATc-Behandlungen.....	73
Abbildung 4.28: HER-2 Expression nach Beendigung der ATc-Behandlung <i>in vivo</i> .....	74
Abbildung 5.1: Vergleich der Proliferation mit dem Tumolvolumen .....	83
Abbildung 5.2: Vergleich des Tumolvolumens mit der Menge an p-ERK, Teil I.....	88
Abbildung 5.3: Vergleich des Tumolvolumens mit der Menge an p-ERK, Teil II .....	89

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Gruppenaufteilung und Anzahl der H-Ras und Raf1 Mäuse in den Langzeitstudien .....	29
Tabelle 3.2: Gruppenaufteilung und Anzahl der H-Ras und Raf1 Mäuse in den Kurzzeitstudien.....	30
Tabelle 3.3: Aufschlüsselung der Fallzahlen für die einzelnen Bestimmungen .....	31
Tabelle 3.4: Gruppenaufteilung und Anzahl der HER-2 Mäuse.....	34
Tabelle 3.5: Eichgerade für Proteinbestimmung nach Bradford.....	35
Tabelle 3.6: Proteinmengen und Gele für die SDS-PAGE .....	36

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celcius
AS	Aminosäure
ATc	Anhydrotetracyclin-Hydrochlorid
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder g-Zahl (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Ko	Kontrolle
M	molar (mol·l <sup>-1</sup> )
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minuten(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	millimolar
μM	mikromolar

---

n	Anzahl der Messwerte
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

# **1 EINLEITUNG**

## 1.1 HER-2 und die HER Familie

HER-2/neu (erbB2) gehört zur Unterklasse I der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Die Abkürzung „HER“ steht für „human epidermal growth factor receptor“, dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor. Die HER Familie besitzt vier Mitglieder: den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptor, auch HER-1 (erbB1) genannt, HER-2/neu (erbB2), HER-3 (erbB3) und HER-4 (erbB4) (Olayioye et al., 2000). Die Aufgabe der Rezeptortyrosinkinasen ist es, Signale der Umgebung mit den Signalkaskaden in der Zelle zu verknüpfen. Durch Bindung entsprechender Liganden an den Rezeptor kommt es zu einer Aktivierung der Kinase, welche dann die dem Liganden entsprechende Signalkaskade in der Zelle aktivieren kann. Die Rezeptortyrosinkinasen der Unterklasse I sind von ihrer Grundstruktur her ähnlich aufgebaut. Sie besitzen eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne, eine einkettige transmembranäre Region und eine cytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne. Die extrazelluläre Domäne enthält zwei cysteinreiche Regionen und mögliche Glykosylierungsstellen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Carraway und Cantley, 1994; Reese und Slamon, 1997; Schlessinger, 2000).

Die Mitglieder der HER Familie besitzen eine unterschiedliche Ligandenspezifität. HER-1 bindet u.a. EGF (epidermaler Wachstumsfaktor), TGF $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin, HER-3 und HER-4 binden die Neureguline (Neu Differentiations Faktoren, NDF) (Holmes et al., 1992; Plowman et al., 1993; Carraway et al., 1997; Chang et al., 1997; Rubin und Yarden, 2001). Bei den Neuregulinen handelt es sich um eine Proteinfamilie, die durch differentielles Splicen aus einem einzigen Gen entsteht (Plowman et al., 1993; Nagata et al., 1994). Für HER-2 wurde bisher noch kein direkter Ligand gefunden (Rubin und Yarden, 2001). Nach Binden eines Liganden können die Mitglieder der HER Familie miteinander homo- bzw. heterodimerisieren. Die Mitglieder der HER Familie benötigen stets einen Dimerisationspartner um aktiv zu werden. Es wird davon ausgegangen, dass HER-2 in erster Linie als Co-Rezeptor agiert (Olayioye et al., 2000; Zwick et al., 2001). HER-2 ist der bevorzugte Dimerisationspartner der anderen Mitglieder der HER Familie (Tzahar et al., 1996; Graus-Porta et al., 1997). Eine HER-2 Homodimerisierung ist eher unwahrscheinlich (Reese und Slamon, 1997) und tritt vermutlich nur bei starker Überexpression von HER-2 auf. Außerdem spielt HER-2 eine wichtige Rolle in der Potenzierung der durch die HER-Rezeptoren ausgelösten Signalweiterleitung (Beerli et al., 1995; Graus-Porta et al., 1995). Die Art des Liganden gibt letztendlich die Art des Signals vor, das an die Zelle weitergegeben wird. Die Liganden der HER Familie besitzen 2 Bindungsstellen, wodurch sie die Dimerisationspartner bestimmen und damit die Signalweiterleitung beeinflussen (Beerli und Hynes, 1996; Riese et al., 1996). Die beiden Bindungsstellen besitzen eine unterschiedliche Affinität zu den Rezeptoren. Neuregulin-1 besitzt z.B. eine Bindungsstelle mit hoher Affinität zum ersten Bindungspartner (HER-3 oder HER-4) und eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität, an die als zweiter Bindungspartner bevorzugt HER-2 bindet (Tzahar et al., 1997). Nach der Homo- bzw. Heterodimerisierung kommt es zu einer Stimulierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren und

zu einer Autophosphorylierung innerhalb der cytoplasmatischen Domäne (Olayioye et al., 2000). An die phosphorylierten Stellen können dann Signalmoleküle der sich anschließenden Signalkaskaden binden und die Signalweiterleitung auslösen (siehe Kapitel 1.3).

## 1.2 Die Bedeutung von HER-2 in der Tumorentwicklung

Die Rezeptortyrosinkinasen der HER Familie sind in verschiedenen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert, und spielen dort eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung der Gewebe (Olayioye et al., 2000). Man findet Mitglieder der HER Familie z.B. im Herz (Carraway, 1996; Burden und Yarden, 1997), in der Brustdrüse (Fowler et al., 1995; Burden und Yarden, 1997; Xie et al., 1997) und im zentralen Nervensystem (Carraway, 1996; Burden und Yarden, 1997; Gassmann und Lemke, 1997). Her-2 ist ein Proto-Onkogen. Unter physiologischen Bedingungen erfüllt es die oben beschriebenen Aufgaben. Durch Veränderungen im Expressionsverhalten (durch Überexpression, Amplifikation oder Mutation) wird ein Proto-Onkogen definitionsgemäß zum Onkogen. Das erste Mal wurde her-2 als ein Onkogen in chemisch induzierten Neuroglioblastomen in Ratten definiert. Durch eine einzige Punktmutation in der transmembranären Region erhielt her-2 dabei sein onkogenes Potential (Reese und Slamon, 1997; Shi et al., 1981). Hieraus ist auch das Akronym „neu“ abzuleiten, das sich auf das „neu“-Gen des Neuroglioblastoms der Ratte bezieht. Das humane her-2 wird durch eine Genamplifikation zum Onkogen, wodurch es zu einer Proteinüberexpression in den Zellen kommt (Slamon et al., 1989; Venter et al., 1987).

Eine bedeutende Rolle spielt HER-2 bei der Prognose für Patientinnen mit einem Mamma- oder Ovarialkarzinom (Hengstler et al., 1999, Slamon et al., 1987; O'Reilly et al., 1991). Jedoch auch bei anderen Tumorarten, wie die der Lunge, des Magens, der Niere oder der Blase, ist HER-2 beteiligt (Hynes und Stern, 1994; Micke et al., 2001). Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in den westlichen Industrieländern, etwa 9 % der Frauen erkranken an einem Mammakarzinom (Engel et al., 2000 und 2001). Das Ovarialkarzinom (Eierstockkrebs) stellt die vierthäufigste Todesursache dar (Muir et al., 1987), etwa 1,4 % der Frauen erkranken an ihm (Wingo et al., 1995). In bis zu 30 % der Mamma- und Ovarialkarzinome konnte eine Amplifikation des her-2 Gens oder eine Überexpression des HER-2 Proteins nachgewiesen werden (Hengstler et al., 1999; Rubin und Yarden, 2001). Eine HER-2 Amplifikation und Proteinüberexpression ist sowohl beim Mamma- als auch beim Ovarialkarzinom mit einer schlechteren Prognose für die Patientinnen assoziiert (Hengstler et al., 1999, Slamon et al., 1987; O'Reilly et al., 1991). Zudem steigert eine Überexpression von HER-2 das metastatische Potential von humanen Brust- und Lungentumorzellen und korreliert mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen bei Patientinnen mit Brusttumoren (Yu und Hung, 2000).



Eine Untersuchung der Mamma- und Ovarialkarzinome auf eine HER-2 Überexpression und eine gezielte Therapie zur Unterdrückung der durch HER-2 ausgelösten Signalkaskade ist also für eine positive Beeinflussung der Tumorprognose von großer Bedeutung. Das seit dem Jahr 2000 zugelassene Medikament Trastuzumab (Handelsname Herceptin<sup>®</sup>) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER-2/neu. Es stellt eine neuere Behandlungsmethode in der Tumorthherapie dar, ist jedoch nur für fortgeschrittene Mammakarzinome in Kombination mit einer Chemotherapie (z.B. mit Taxanen) zugelassen. Durch Trastuzumab konnte die HER-2 Überexpression in Brusttumoren reduziert werden (Baselga et al., 1996; Cobleigh et al., 1999; Vogel et al., 2002). Auch führte eine Therapie mit Trastuzumab bei Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit (Baselga, 2001; Cobleigh et al., 1999; Burris, 2001; Osoba et al., 2002; Paik et al., 2002; Stebbing et al., 2000).

### 1.3 HER-2 vermittelte Signalkaskaden

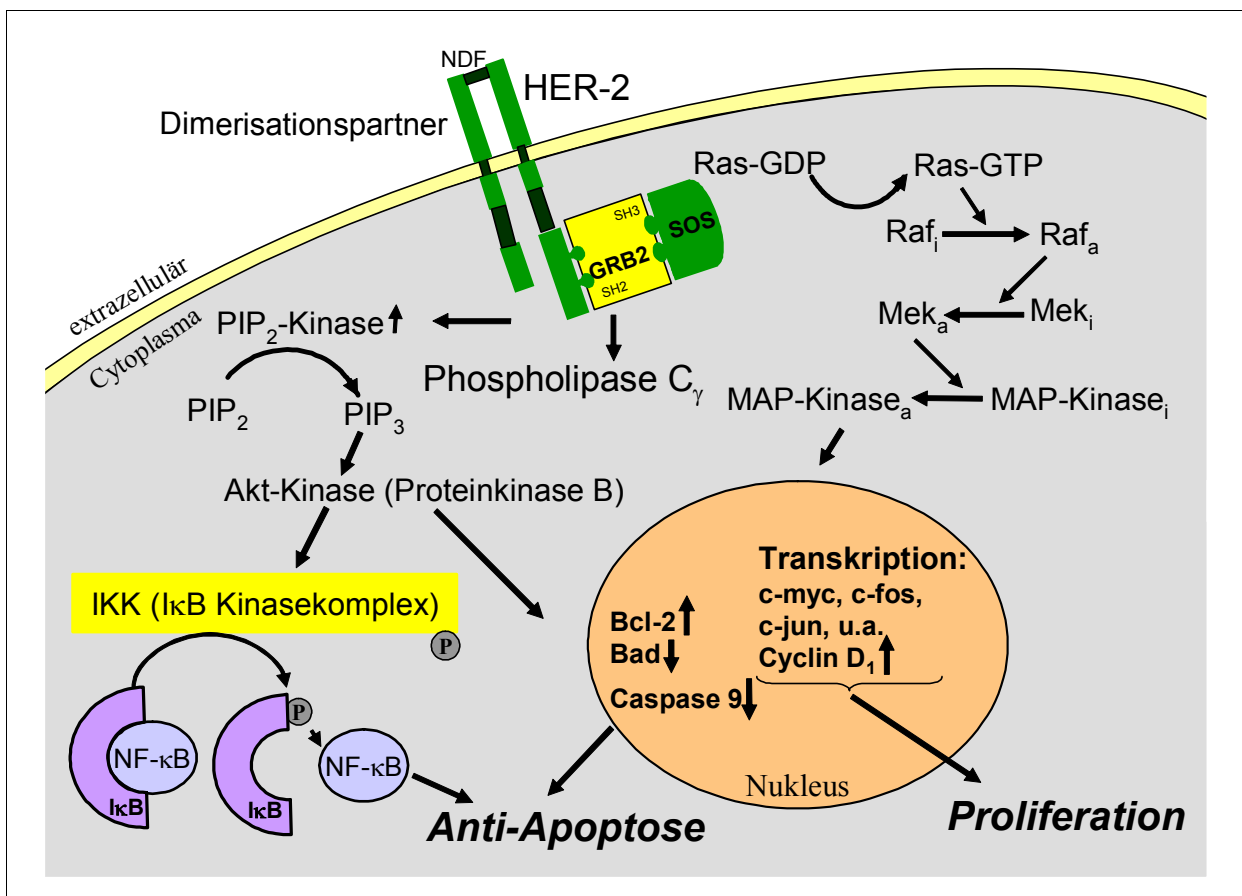


Abbildung 1.1: HER-2 vermittelte Signalkaskaden (Schiffer et al., 2003)

Heterodimerisiert HER-2 mit einem der anderen Mitglieder der HER Familie, so kommt es zu Autophosphorylierungen an der intrazellulären Seite der Rezeptortyrosinkinasen. An die phosphorylierten Stellen können nun Proteine andocken, die entweder eine SH2 (Src homology 2) oder eine PTB (phosphotyrosine binding) Domäne besitzen. Es handelt sich dabei um sogenannte Adapterproteine wie z.B. Grb2 oder um Kinasen wie z.B. die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Olayioye et al., 2000). Durch HER-2 kommt es hauptsächlich zur Aktivierung von 3 Signalwegen, die in Abbildung 1.1 dargestellt sind: (i) Aktivierung der Ras-MAP Kinase Kaskade (Olayioye et al., 2000; Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000), (ii) Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges (Olayioye et al., 2000; Harari und Yarden, 2000; Zhou et al., 2000 und 2001) und (iii) Aktivierung der Phospholipase C<sub>γ</sub> (Reese und Slamon, 1997). Da die ersten beiden Wege in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind, soll im Folgenden näher auf sie eingegangen werden.

### 1.3.1 Der Ras-MAP Kinase Signalweg

Zur Aktivierung des Ras MAP Kinase Signalweges bindet aktives HER-2 das Adapterprotein Grb2 (Citri et al., 2003). Dieses assoziiert mit SOS, welches wiederum Ras durch Austausch von GDP und GTP aktivieren kann. Ras stellt eine ganze Proteinfamilie dar, die zu den monomeren G-Proteinen gehört (Macaluso et al., 2002). Auf sie wird näher in Kapitel 1.4 eingegangen. Aktives Ras kann nun Raf an die Zellmembran rekrutieren und dort aktivieren (Tzivion et al., 1998). An der Aktivierung von Raf sind auch noch andere Faktoren beteiligt, die jedoch zum Teil noch nicht sehr gut beschrieben sind (Lee Jr und McCubrey, 2002). Aktives Raf wiederum phosphoryliert MEK (MAP/ERK Kinase) und aktiviert es dadurch. MEK kann sowohl Serin/Threonin als auch Tyrosin Domänen phosphorylieren (Crews et al., 1992; Kosako et al., 1992). Die Aktivierung von ERK (extracellular signal-regulated kinase) durch MEK erfolgt durch Phosphorylierung der Aminosäuren Thr-202 und Tyr-204. Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Schritte der Ras-MAP Kinase Kaskade.

Aktives ERK wird in den Zellkern transportiert (Khokhlatchev et al., 1998) und kann dort eine Reihe von Faktoren phosphorylieren und aktivieren, darunter Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-myc, c-fos und c-jun (Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000; Ishikawa et al., 1997, Karunakaran et al., 1996, Zwick et al., 2000 und 2001) oder die Topoisomerase II- $\alpha$ , welche eine Zellzyklusprogression vermittelt (Shapiro et al., 1999). Durch Aktivierung des Ras-MAP Kinase Signalweges kommt es also hauptsächlich zu proliferationsfördernden Signalen in der Zelle.

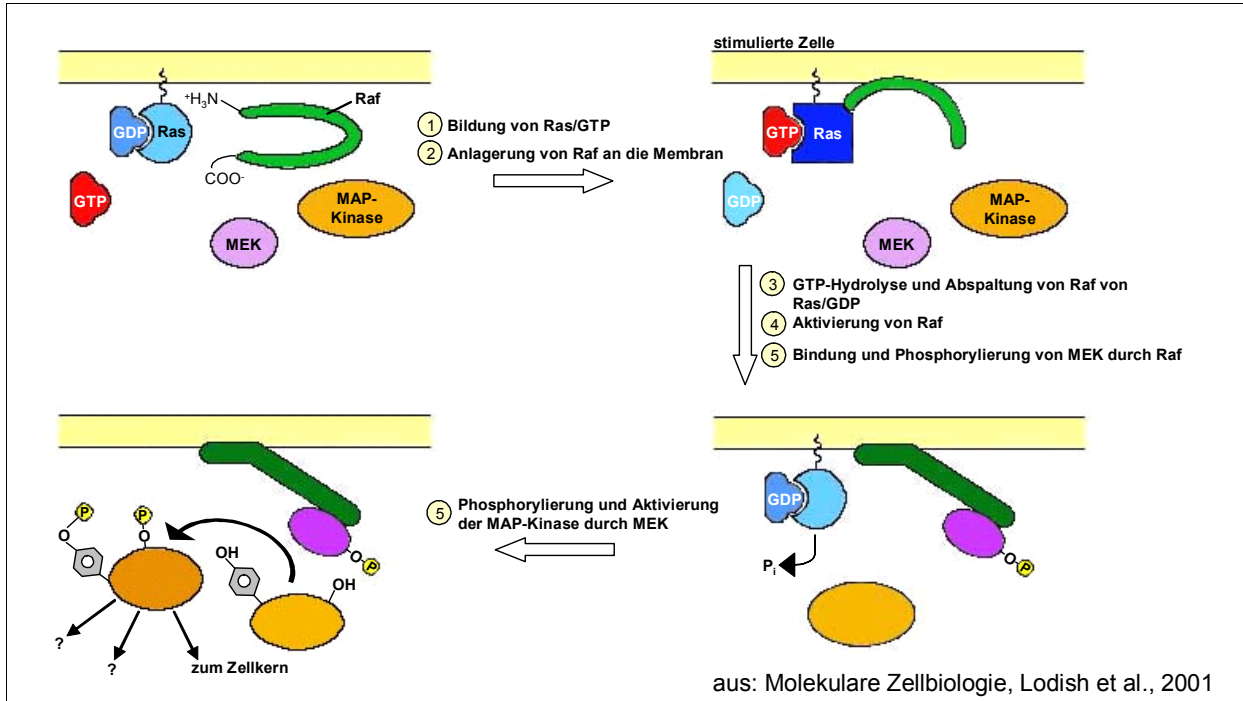


Abbildung 1.2: Die Ras-MAP Kinase Kaskade

### 1.3.2 Der PI3K/Akt Signalweg

Die PI3K besteht aus einer regulatorischen p85 Untereinheit und einer katalytischen p110 Untereinheit. Die p85 Untereinheit kann direkt an die intrazelluläre Domäne des aktiven HER-2 binden und dadurch die p110 Untereinheit allosterisch aktivieren (Schlessinger, 2000; Olayioye et al., 2000). Aktive PI3K phosphoryliert das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wodurch Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) entsteht (Citri et al., 2003; Shelton et al., 2003). Dieser Prozess geschieht innerhalb von Sekunden, so dass es zu einer raschen Zunahme an PIP<sub>3</sub> in der Zelle kommt. Die PI3K vermittelt auch die Translokalisierung der PDK-1 (Phosphatidylinositol-dependent kinase) und von Akt/PKB zur Zellmembran über deren lipidbindende PH (pleckstrin homology) Domäne. Die PDK-1 kann dann Akt an Thr308 in der catalytischen Domäne phosphorylieren. Anschließend wird Akt durch eine zweite PDK an Ser473 in der Carboxy-terminalen Domäne phosphoryliert, wodurch Akt aktiviert wird (Shelton et al., 2003). Aktives Akt kann viele Faktoren phosphorylieren, darunter z.B. die pro-apoptotischen Faktoren Bad und Caspase-9, die beide dadurch inaktiviert werden (Chen et al., 2002; Shelton et al., 2003). Phosphorylierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> führt zu deren Aktivierung. Eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges hat also ein anti-apoptotisches Signal zur Folge. Die anti-apoptotische Eigenschaft von Akt wird noch durch die Fähigkeit, IKK (IκB Kinasekomplex) zu aktivieren, verstärkt. Aktivierung von IKK führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, welcher den Prozess der Apoptose blockieren kann (Pianetti et al., 2001).

## 1.4 H-Ras und die Ras Familie

Die Ras Proteine gehören zur Familie der monomeren G-Proteine. In Säugetieren kommen mindestens drei unterschiedliche Ras Proteine vor: H-Ras, K-Ras und N-Ras. H-Ras und K-Ras wurden erstmals als virale Onkogene der Harvey und Kirsten Maus-Sarkomviren entdeckt. N-Ras wurde in einer Neuroblastomazelllinie identifiziert (Macaluso et al., 2002). Neben diesen drei Vertretern der Ras Familie gibt es noch M-Ras, R-Ras, Rap1/2 und Ral. Die Ras Proteine haben eine Molekularmasse von 21 kDa und können GTP (Guanosintriphosphat) binden und hydrolisieren. Die drei Hauptvertreter der Ras Proteine zeigen in den ersten 165 Aminosäuren eine hohe Homologie. Am carboxyterminalen Ende besitzen sie jedoch eine unterschiedliche Aminosäuresequenz. Die Aminosäuren 186-189 ermöglichen den Ras Proteinen die Bindung an die Plasmamembran, welche für ihre Funktionalität unerlässlich ist (Macaluso et al., 2002). Die Ras Proteine besitzen eine flexible dreidimensionale Struktur, welche eine funktionelle Bedeutung besitzt. Im inaktiven Status ist GDP (Guanosindiphosphat) an Ras gebunden, im aktiven GTP. Ras wird durch eine Interaktion mit einem sogenannten Guanin-Austauschfaktor (GEF, guanine exchange factor) aktiviert. SOS ist einer der bekanntesten GEFs. Durch SOS kommt es zu einer Konformationsänderung des Ras Proteins, und die Nukleotid-Bindungsstelle wird geöffnet. In weniger als einer Sekunde dissoziiert GDP von Ras. Ohne SOS wird GDP erst nach mehreren Stunden von Ras freigesetzt. Die Nukleotid-Bindungsstelle bleibt geöffnet, und GTP kann an Ras binden und SOS von Ras trennen. Ras-GTP bleibt nicht lange aktiv, da es durch die Kontrolle der GAPs (GTPase activating proteins) zu einer Hydrolyse des GTPs durch GTPasen kommt (Macaluso et al., 2002). Die Aminosäuren in Position 12, 59 und 61 sind essentiell für die GTPase Aktivität. Mutationen an diesen Stellen verhindern die GTP Hydrolyse und führen zu einem konstitutiv aktiven Protein, welches dadurch ein Onkogen darstellt (Macaluso et al., 2002).

Aktives Ras kann eine Reihe von Signalwegen aktivieren. Es interagiert hauptsächlich mit Raf, PI3K und Ral-GEFs (Macaluso et al., 2002). Die Aktivierung von Raf stellt den am besten bekannten Signalweg dar (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.5). Er führt zu einer Aktivierung der MAP Kinase ERK und letztendlich zu einem proliferationsfördernden Signal. Ein weiterer Effektor von Ras ist die PI3K. Ras kann direkt an die katalytische p110 Untereinheit der PI3K binden und sie dadurch aktivieren. Es kommt zur Aktivierung von Akt und letztendlich zu einem anti-apoptotischen Signal (siehe Kapitel 1.3.2). Der dritte Ras Effektor ist die Familie der GEFs (RalGDS, RGL und Rlf/RGL2), wodurch es letztendlich zu einer Aktivierung von Rho, RAC und Cdc42 kommt. Auf diesen Signalweg soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden. Die verschiedenen Ras Isoformen können Raf und die PI3K unterschiedlich gut aktivieren. K-Ras kann Raf-1 effektiver an die Zellmembran lokalisieren, und dort dann auch besser aktivieren als H-Ras. H-Ras kann im Gegenzug die PI3K besser aktivieren (Yan et al., 1998). Es ist somit möglich, dass eine Aktivierung der verschiedenen Ras Proteine unterschiedliche biologische Konsequenzen für die Zelle hat. Dies könnte auch erklären, warum in verschiedenen Tumorarten verschiedene Ras Proteine mutiert sind. So ist K-Ras in

Nicht-kleinzelligen Lungentumoren (33%), in Kolontumoren (44%) und in Pankreastumoren (90%) mutiert. N-Ras ist in Melanomen (13%), in Lebertumoren (30%) und in akuten Leukämien (30%) mutiert. H-Ras ist in Tumoren der Blase (10%) und der Niere (10%) mutiert (Macaluso et al., 2002).

## 1.5 c-Raf-1 und die Raf Familie

Die Raf Familie besteht aus drei Isoformen: Raf-1, A-Raf und B-Raf. Sie gehört zu den Serin/Threonin Kinasen. Raf-1 war das erste Raf Gen, das isoliert wurde, und wird im gesamten Körper exprimiert (Storm und Rapp, 1993; McCubrey et al., 1998; Shelton et al., 2003). A-Raf wird nur in urogenitalen Organen und in hämatopoetischen Zellen exprimiert, B-Raf in neuronalen und hämatopoetischen Zellen (McCubrey et al., 1998; Shelton et al., 2003). Die einzelnen Raf Isoformen besitzen ein unterschiedlich starkes Potential, MEK zu phosphorylieren. B-Raf ist stärker als Raf-1, welches jedoch noch deutlich stärker als A-Raf ist (McCubrey et al., 1998; Shelton et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass B-Raf wichtig für die Regulierung der Raf-1 Aktivität ist (Mizutani et al., 2001).

Raf wird in zwei Stufen aktiviert. Zuerst kann aktives Ras Raf an die Zellmembran lokalisieren. Dort können dann andere Kinasen Raf phosphorylieren. Mitglieder der Familie der Src Kinasen phosphorylieren dabei an Tyrosin-Stellen, Serin/Threonin Kinasen, vor allem die Proteinkinase C, phosphorylieren an Serin/Threonin-Stellen (Shelton et al., 2003; Lee Jr und McCubrey, 2002). Auch Akt kann Raf an Serin/Threonin-Stellen phosphorylieren, wodurch es zu einer Inaktivierung von Raf kommt (Shelton et al., 2003). Es wurde außerdem beschrieben, dass die Dimerisation von Raf Proteinen zu einer Raf Aktivierung führt (Shelton et al., 2003; Lee Jr und McCubrey, 2002). Aktives Raf kann MEK phosphorylieren und dadurch aktivieren (siehe Kapitel 1.3.1).

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Neuere Behandlungsmethoden bei der Krebstherapie setzen auf eine gezielte Blockade bestimmter Faktoren, die für die Tumorentwicklung relevant sind. Ein Beispiel dafür ist die Blockade der Rezeptortyrosinkinase HER-2 durch das Medikament Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>). Um diese Methoden jedoch effektiv anwenden zu können, müssen die Mechanismen, die hinter der Tumorentstehung und -entwicklung stehen, besser verstanden werden. Dazu können künstliche Modelle als ein erster Ansatzpunkt dienen. Baasner et al. (1996) beschrieben erstmals die konditionale Expression von humanem HER-2 in NIH3T3 Mausfibroblasten, die auf dem TET-OFF System nach Gossen und Bujard (1992; 1995) basiert. In diesen Zellen kann HER-2 durch Tetracycline dosisabhängig herunterreguliert

werden. Schiffer et al. (2003) etablierten mit Hilfe dieser Zellen ein Maustumormodell, welches die Untersuchung des Einflusses von HER-2 auf die Tumorentwicklung ermöglichte. Hierzu wurden die HER-2 transfizierten Zellen subkutan in Nacktmäuse injiziert. Es kam zu subkutan wachsenden Tumoren, die nach Behandlung der Mäuse mit Anhydrotetracyclin (ATc) und damit nach Ausschalten von HER-2 eine rasche Tumorremission zeigten. Das Ausmaß der Tumorremission war abhängig von der Tumorgröße bei Behandlungsbeginn. Der Tumorrückgang beruhte auf einem Proliferationsstopp und Apoptose. Nun wurden zwei der durch HER-2 vermittelten Signalwege näher untersucht: der Ras-MAP Kinase Signalweg, und der PI3K/Akt Signalweg. Zur Bestimmung, ob das Ausschalten von HER-2 zu einer Aktivierung bzw. Inaktivierung des einen oder des anderen Signalweges führte, wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK bzw. Akt als jeweiligen Endpunkt der Signalwege untersucht. Ausschalten von HER-2 führte zu einer Dephosphorylierung von ERK innerhalb von einem Tag nach Beginn der ATc-Behandlung, und zu einer Dephosphorylierung von Akt und einer Abnahme des Akt Gesamtproteins nach 3 Tagen ATc-Behandlung (Heimerdinger et al., 2004).

Um nun die Prozesse in der Zelle nach Ausschalten von HER-2 besser verstehen zu können, wurden dasselbe Zellsystem auch mit anderen Onkogenen etabliert, nämlich einer konstitutiv aktiven Form des humanen H-Ras (H-RasL<sup>61</sup>) und einer aktiven Form des humanen c-Raf-1 (BXB-Raf1). Diese beiden Zelllinien sollten in der vorliegenden Arbeit zu allererst auf ihre Funktionalität überprüft werden. Anschließend sollte für beide Zelllinien ein mit HER-2 vergleichbares Maustumormodell etabliert werden. Anhand dieser beiden neuen Modelle sollte dann der Einfluss von H-Ras bzw. BXB-Raf1 auf das Tumorstadium, die Proliferation, Apoptose und den Phosphorylierungsstatus von ERK bzw. Akt untersucht werden. Ein Vergleich der Ergebnisse der HER-2, H-Ras und BXB-Raf1 Maustumormodelle sollte dann weitere Informationen darüber liefern, welche Signalwege nach Ausschalten von HER-2 aktiviert bzw. deaktiviert werden. Eine Unterscheidung der Signalwege war insofern möglich, da BXB-Raf1 im Gegensatz zu HER-2 und H-Ras keinen aktivierenden Einfluss auf den PI3K/Akt Signalweg haben sollte. Ein besseres Verständnis der Relevanz einzelner Signalwege bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren, die auf einer Überexpression von HER-2 beruhen, könnte letztendlich zu einer gezielteren Therapie dieser Tumore führen. Eine solche Therapie könnte zum einen effektiver als die momentan übliche Chemotherapie sein, zum anderen könnte sie die Lebensqualität der Patientinnen während der Therapie verbessern.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte das Maustumormodell selbst noch genauer auf seine Funktionalität untersucht werden. Es wurde hierbei nur HER-2 untersucht, nicht H-Ras oder BXB-Raf1. Von Interesse war hierbei eine Verkürzung der Behandlungsdauer mit ATc und deren Einfluss auf den Tumorverlauf. Zudem sollte der Einfluss einer erneuten ATc-Behandlung nach einer Unterbrechung von unterschiedlich langer Dauer auf den Tumorverlauf untersucht werden. Zuletzt sollte festgestellt werden, wann die HER-2 Tumore

---

nach Ende einer ATc-Behandlung eine erneute HER-2 Expression zeigten. Diese Untersuchungen können bei einer weiteren Optimierung des Maustumormodells helfen.

## **2 MATERIAL**



## 2.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid	Acros Chimica, Gel
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
BSA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Chaps	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
2,3-Dihydroxy-1,4-dithiobutan (DTT)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hygromycin-B	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Methanol	Roth, Karlsruhe
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
1 N Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	ICN Biomedicals Inc., Irvine, CA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe

Piperazin-N,N-bis(2-Ethansulfonsäure-Dinatriumsalz) (Pipes)	Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA
Polyoxoethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Wasserstoffperoxid (30%ig)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

## 2.2 Geräte

Blotapparatur „Fastblot™“	Whatman Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitalkamera Nikon® Coolpix 990	Nikon Deutschland GmbH, Düsseldorf
Folienschweißgerät „Severin Folio“	Severin
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leitz DMRB mit digitaler Kamera Leica DC200	Leica Microscopy Systems LTD & Co., Heerbrugg, Schweiz
Mikroskop Zeiss Invertoskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter MP225	Mettler Toledo, Gießen
Photometer DU 640	Beckman Coulter, Krefeld
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polyacrylamid-Gelelektrophorese „Multigel-Long“	Whatman Biometra, Göttingen
Power Supply „Standard Power Pack P25“	Whatman Biometra, Göttingen
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach

Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
Wärmeschrank Heraeus	Heraeus Instruments, Hanau
Zählkammer nach Neubauer	Brand GmbH & Co., Wertheim
Zentrifuge (Modell 5804 R)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Sigma 3K12	Sigma, Osterode am Harz

## 2.3 Zellkultur

### 2.3.1 Zelllinien

NIH3T3 WT	Baxter Oncology GmbH, Heidelberg
NIH 3T3 tet HER-2	Baxter Oncology GmbH, Heidelberg
NIH 3T3 tet Ha-RasL <sup>61</sup> (N59.4 clone 15)	Baxter Oncology GmbH, Heidelberg
NIH 3T3 tet BXB-Raf1 (N54.7 clone 3)	Baxter Oncology GmbH, Heidelberg
NIH 3T3 tet BXB-Raf1 (N54.7 clone 58)	Zentaris GmbH, Frankfurt

### 2.3.2 Material

20ml Einmalspritzen	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Einmalpipetten 2ml, 10ml und 25 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (Falcon 15ml und 50ml)	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S (rotband)	Schleicher & Schuell, Dassel

Zellkulturflaschen T25 und T75	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellschaber	Nunc GmbH, Wiesbaden

### 2.3.3 Nährmedium

DMEM	PAN, Aidenbach bzw. Biochrom AG, Berlin
FCS (Tet System Approved FBS, USDA-Approved)	Clontech, Palo Alto
Penicillin-(10 <sup>4</sup> U/ml)/Streptomycin-(10 mg/ml) Lösung	PAN, Aidenbach
Trypsin/EDTA (0,05/0,02 % w/v)	PAN, Aidenbach

### 2.3.4 Lösungen

#### ATc-Stammlösung:

1 µg/ml Kulturmedium,  
Lagerung bei 4°C über 4 Wochen

#### Hygromycin-B Stammlösung:

69,375 mg in 1 ml Kulturmedium, aliquotiert,  
Lagerung bei -20°C

#### PBS:

0,2 g            KCl  
0,2 g            KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,92 g          Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
8,0 g            NaCl  
Ad 1l H<sub>2</sub>O dest., pH 7,4

## 2.4 In vivo Experimente

### 2.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche, vier bis fünf Wochen alte Nacktmäuse (Cd1 nu-/-; Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogen frei) und unter künstlichen Tag-Nacht-Lichtverhältnissen gehalten.

### 2.4.2 Material

Kanülen und 1ml Einmalspritzen

B. Braun Medical AG,  
Emmenbrücke

Reaktionsgefäße (Falcon 15ml und 50ml)

Greiner bio-one GmbH,  
Frickenhausen

### 2.4.3 Lösungen

ATc-Lösung:

1,25 mg/ml in PBS

## 2.5 Western Blot Analysen

### 2.5.1 Material

Filterpapiere

Schleicher & Schuell, Dassel

Handelsübliche Haushaltsgefrierbeutel

diverse Hersteller

Kodak Scientific Imaging Film [X-Omat; Blue XB-1]

Kodak GmbH, Stuttgart

Poly Screen PVDF Transfer Membrane

NEN<sup>®</sup> Life Science, Boston

Reaktionsgefäße 0,5 ml und 1,5ml

Eppendorf AG, Hamburg

## 2.5.2 Antikörper

### 2.5.2.1 Erstantikörper

Akt, rabbit polyclonal IgG	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Caspase-3, rabbit polyclonal IgG	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
C-erbB-2/HER-2/neu, mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Quartett, Berlin
ERK 2 (D-2), mouse monoclonal IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
H-Ras (C-20), rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Monoclonal Anti-β-Actin, mouse IgG <sub>2a</sub> isotype	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phospho-Akt (Ser473), rabbit polyclonal IgG	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204), rabbit polyclonal IgG	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Raf-1 (C-20), rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

### 2.5.2.2 Zweitantikörper

Goat anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling, New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Sheep anti-rabbit IgG (POD gekoppelt)	Chemicon International, Inc., Hofheim/Ts
Rabbit anti mouse IgG (POD gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

## 2.5.3 Lösungen

### 2.5.3.1 Fertiglösungen

Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Processing Chemicals, Kodak, Polymax RT Developer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Processing Chemicals, Kodak, Polymax RT Fixer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Perbio, Bonn
Roti-Block®	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot® A + K	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer Life Science, Boston

### 2.5.3.2 Proteinmarker

BenchMark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Color Marker, Ultralow	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
MagicMark™ Western Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.5.3.3 Lysepuffer

#### Lysepuffer für membranständige Proteine:

25 mM	Tris
2 mM	EDTA
2 mM	DTT
10% (v/v)	Glycerin
1% (v/v)	Triton-X-100
in H <sub>2</sub> O dest., pH 8,0 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	

Vor Gebrauch 1% Protease Inhibitor Cocktail zusetzen.

#### Modifizierter Radioimmunoprecipitation (RIPA) Puffer für phosphorylierte Proteine:

##### EDTA-Stammlösung:

100 mM	EDTA
in H <sub>2</sub> O dest., pH 7,4	

## Natriumdeoxycholat-Stammlösung:

10% (w/v) Na-deoxycholat  
in H<sub>2</sub>O dest., vor Licht schützen

## NP-40-Stammlösung:

10% (v/v) NP-40  
in H<sub>2</sub>O dest.

## Natriumorthovanadat-Lösung:

200 mM Natriumorthovanadat  
(1) pH 10,0 mit NaOH oder HCl einstellen → gelbe Lösung  
(2) Lösung aufkochen → farblose Lösung  
(3) Lösung abkühlen, pH wieder auf 10,0 einstellen  
Schritte 1-3 solange wiederholen, bis Lösung farblos bleibt und sich  
der pH-Wert bei 10,0 einstellt.  
Lösung aliquotieren und bei -20°C lagern.

## Natriumfluorid-Stammlösung:

200 mM NaF  
in H<sub>2</sub>O dest.

## Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Stammlösung:

200 mM PMSF  
in Isopropanol

## RIPA-Puffer (ohne Protease- und Phosphatase-Inhibitoren):

790 mg Tris  
ad 75 ml H<sub>2</sub>O dest.  
900 mg NaCl  
pH 7,4 mit HCl  
10 ml 10% NP-40  
2,5 ml 10% Na-deoxycholat  
1 ml 100 mM EDTA-Lösung  
auf 100 ml H<sub>2</sub>O dest. auffüllen, Lagerung bei 4°C lichtgeschützt

## Am Tag der Isolierung frisch zusammenmischen:

975 µl RIPA-Puffer  
10 µl Protease Inhibitor Cocktail  
5 µl Na-Vanadat-Stammlösung  
5 µl Na-Fluorid-Stammlösung  
5 µl PMSF



Endkonzentrationen im modifizierten RIPA Puffer:

50 mM	Tris, pH 7,4
1% (v/v)	NP-40
0,25% (w/v)	Na-deoxycholat
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	PMSF
1% (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail
1 mM	Na-Vanadat
1 mM	NaF

Chaps-Lysepuffer für Kernproteine:

20 mM	Pipes
0,1 % (w/v)	Chaps
10 mM	DTT
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10 % (w/v)	Sucrose
in H <sub>2</sub> O dest., pH 7,2 mit KOH	

Vor Gebrauch 1% Protease Inhibitor Cocktail zusetzen.

BSA-Stammlösung für Proteinbestimmung nach Bradford:

50 µg/ml BSA in H<sub>2</sub>O dest., Lagerung bei -20°C aliquotiert.

#### **2.5.3.4 Lösungen für die Gelelektrophorese**

Sammelgelpuffer (SG-Puffer):

0,47 M Tris in H<sub>2</sub>O dest., pH 6,7 mit HCl

Trenngelpuffer (TG-Puffer):

3 M Tris in H<sub>2</sub>O dest., pH 8,9 mit HCl

SDS-Lösung:

10% (w/v) in H<sub>2</sub>O dest.

APS-Lösung:

10% (w/v) in H<sub>2</sub>O dest., Lagerung bei -20°C aliquotiert

Probenpuffer (nach Laemmli, 1970):

3% (w/v) SDS  
20% (v/v) Glycerin  
5% (v/v) 2-Mercaptoethanol (frisch zusetzen!)  
1 Spatelspitze Bromphenolblau  
in H<sub>2</sub>O dest.

Laufpuffer:

3 g Tris  
14,4 g Glycin  
5 ml SDS-Lösung  
ad 500 ml H<sub>2</sub>O dest., frisch zubereiten!

Blottingpuffer:Anodenpuffer:

10% (v/v) Roti-Blot<sup>®</sup> A  
70% (v/v) H<sub>2</sub>O dest.  
20% (v/v) Ethanol

Kathodenpuffer:

10% (v/v) Roti-Blot<sup>®</sup> K  
70% (v/v) H<sub>2</sub>O dest.  
20% (v/v) Ethanol

**2.5.3.5 Lösungen für die Immunfärbung**PBS-T:

PBS + 0,1% (v/v) Tween 20

Blocklösung:

PBS-T + 10% (v/v) Roti-Block<sup>®</sup>

Entwickler-Lösung:

Polymax RT Developer 1:5 mit Leitungswasser verdünnen

Fixierer-Lösung:

Polymax RT Fixer 1:4 mit Leitungswasser verdünnen

### 2.5.3.6 Coomassiefärbung

#### Fixierlösung:

50% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure  
in H<sub>2</sub>O dest.

#### Coomassie-Färbelösung:

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G  
in Fixierlösung

#### Entfärber:

5% (v/v) Ethanol  
7% (v/v) Essigsäure  
in H<sub>2</sub>O dest.

### 2.5.4 Gele

#### Trenngel mit 10% Acrylamid (für 2 Gele à 10 ml):

6,7 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Stammlösung  
(Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30)  
5 ml TG-Puffer  
200 µl SDS-Lösung  
7,9 ml H<sub>2</sub>O dest.  
  
200 µl APS-Lösung  
8 µl TEMED

#### Trenngel mit 12% Acrylamid (für 2 Gele à 10 ml):

8,0 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Stammlösung  
(Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 30)  
5 ml TG-Puffer  
200 µl SDS-Lösung  
6,6 ml H<sub>2</sub>O dest.  
  
200 µl APS-Lösung  
8 µl TEMED

Trenngel mit 15% Acrylamid (für 2 Gele à 10 ml):

10,0 ml	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30)
5 ml	TG-Puffer
200 µl	SDS-Lösung
4,6 ml	H <sub>2</sub> O dest.
200 µl	APS-Lösung
8 µl	TEMED

Sammelgel (für 5 Gele):

3,0 ml	30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30)
2,5 ml	SG-Puffer
200 µl	SDS-Lösung
14,5 ml	H <sub>2</sub> O dest.
300 µl	APS-Lösung
15 µl	TEMED

## 2.6 Immunhistochemische Färbung

### 2.6.1 Material

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
MBT-PAP-PEN Mini	MBT, Gießen
SUPERFROST <sup>®</sup> PLUS Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

### 2.6.2 Lösungen

#### 2.6.2.1 Fertiglösungen

Entelan Neu <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Mayer's Hämalan <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
N-Histofine <sup>®</sup> Simple Stain MAX PO	Nichirei Corporation, Tokyo, Japan

Purified Mouse Anti-Human Ki-67 Antibody

BD Pharmingen™, San Diego,  
CA, USA

Roti-Histol®

Roth, Karlsruhe

### 2.6.2.2 Lösungen

#### TBS:

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
in H<sub>2</sub>O dest., pH 7,4 mit HCl

#### Peroxidase-Blocklösung:

100 ml Methanol  
24 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%ig)

#### BSA-Blocklösung:

3% BSA in TBS

#### Erstantikörper:

20 µl Antikörper + 930 µl TBS + 50 µl Normalserum

#### DAB-Lösung:

0,6 mg DAB/ml H<sub>2</sub>O dest.  
Zusatz von 0,3 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kurz vor Gebrauch

#### Hämatoxylin-Färbelösung:

Mayer's Hämalan® 1: 5 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnen

## **3      METHODEN**

### 3.1 TET-OFF System

Bei den NIH3T3 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die aus den Fibroblasten von Embryonen der Maus gewonnen wurde. Die konditionale Expression von HER-2, Ha-RasL<sup>61</sup> bzw. BXB-Raf1 basiert auf dem TET-OFF System von Bujard (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995). Kotransfektion der NIH3T3 WT Zellen mit 3 Vektoren (pUHD 15-1, pTBC \*GEN\*/SEAP und pSBC TTH Hygro; \*GEN\* steht für HER-2, Ha-RasL<sup>61</sup> bzw. BXB-Raf1) führt zu einer Tetracyclin kontrollierten Expression des entsprechenden Gens. Die so erhaltenen Zelllinien werden im weiteren als NIH3T3 HER-2, NIH3T3 H-Ras sowie NIH3T3 BXB-Raf1 bezeichnet. Abbildung 3.1 zeigt die 3 Vektoren am Beispiel von HER-2.

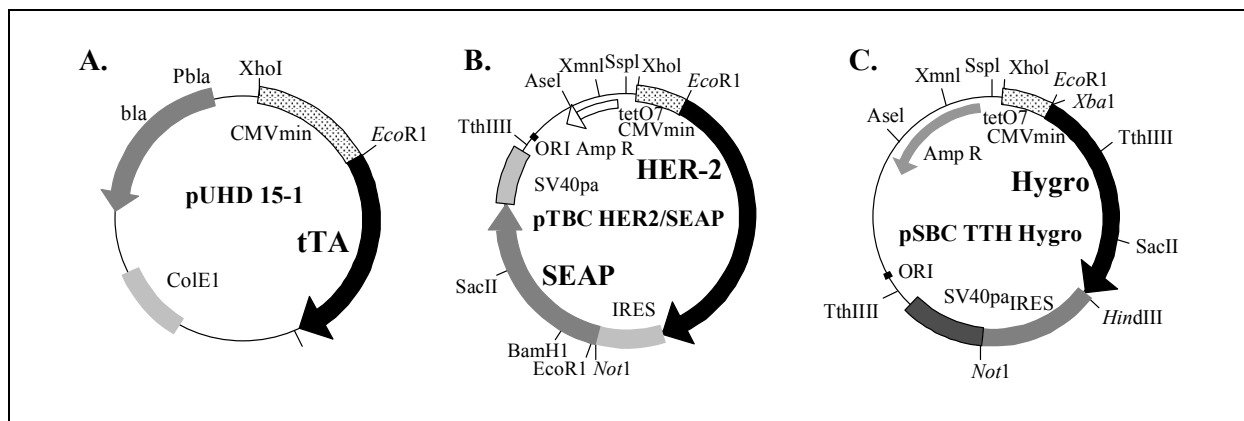


Abbildung 3.1: TET-OFF System – Vektorkonstrukte am Beispiel von HER-2

**A.** Vektor für die Expression des Tetracyclin kontrollierten Transaktivator Proteins tTA (Gossen et al., 1995). pUHD 15-1 simuliert die Expression von HER-2 vom Vektor pTBC HER2/SEAP und die Expression der Hygromycin-B Phosphotransferase vom Vektor pSBC TTH Hygro<sup>®</sup>. **B.** Vektor für die tTA kontrollierte Expression von humanem HER-2 (Baasner et al., 1996). **C.** Vektor für die tTA kontrollierte Expression der Hygromycin-B Phosphotransferase, das Resistenzprotein gegen Hygromycin-B (Baasner et al., 1996).

Im Falle der NIH3T3 HER-2 Zellen erhalten die transfizierten Zellen ihr tumorigenes Potential durch eine Überexpression von humanem HER-2. Die NIH3T3 H-Ras Zellen enthalten eine konstitutiv aktive Form des humanen H-Ras, bei der eine Punktmutation der Aminosäure 61 (Glutamin → Leucin) vorliegt. Das in den NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen exprimierte BXB-Raf1 entspricht einer verkürzten Form des humanen c-Raf1, bei der die Aminosäuren 26-302 fehlen. In diesem fehlenden Bereich liegt auch die minimale Ras-Bindungsstelle. Durch die Verkürzung entsteht eine von Ras unabhängige, aktive Form des Raf1.

Im späteren Verlauf der hier vorliegenden Arbeit wurde ein zweiter Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen untersucht, da sich bei dem ersten Klon ein unstabiles Kontrollwachstum zeigte. Im Weiteren wird die Zelllinie „NIH 3T3 tet BXB-Raf1 (N54.7 clone 3)“ als 1. Klon und die Zelllinie „NIH 3T3 tet BXB-Raf1 (N54.7 clone 58)“ als 2. Klon bezeichnet.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zusatz von 10% Tetracyclin freiem FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert. Während der Erhaltungskultur wurde dem Medium zusätzlich 125 µg/ml Hygromycin B zugegeben, um eine Selektion der transfizierten Zellen zu garantieren. Sämtliche Versuche fanden ohne Hygromycin-Selektion statt.

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in FCS/10% DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.2.2 Wachstumskurve

Zur Ermittlung des Zellwachstums *in vitro* wurden je  $3 \cdot 10^4$  Zellen in T25er Kulturflaschen ausgesät. Nach dem Anheften der Zellen fand eine erste Bestimmung der Zellzahl 24 h nach dem Aussäen statt. Dazu wurden von je 2 Flaschen die Zellen mittels Trypsin geerntet und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dies stellte den Tag 0 dar. Zu den Zeitpunkten 2d, 4d, 6d sowie 8d wurde jeweils wieder die Zellzahl in je 2 Flaschen bestimmt. Pro Flasche fand eine Doppelbestimmung statt. Die erhaltenen Zellzahlen pro Zeitpunkt wurden gemittelt. Das Ergebnis wurde dargestellt als Millionen Zellen pro T25er Kulturflasche und gegen die Zeit aufgetragen.

### 3.2.3 Inkubation mit Anhydrotetracyclin

Zur Untersuchung der NIH3T3 H-Ras und der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen auf ihre Schaltbarkeit durch Anhydrotetracyclin (ATc) wurden die Zellen mit 10 ng/ml ATc inkubiert und nach 1, 3 und 7 Tagen geerntet. Zellen ohne ATc-Inkubation dienten als Kontrolle. Zur Überprüfung, ob es nach Beendigung der ATc-Inkubation zu einer erneuten Expression des transfizierten Gens kommt, wurden die Zellen zuerst über 3 Tage mit 10 ng/ml ATc inkubiert. Dies entsprach einem fast vollständigen Rückgang der Expression. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Reste von ATc sicher zu entfernen. Die Weiterkultur erfolgte in DMEM-Kulturmedium über 1, 3 und 7 Tage. Die Ab- bzw. Zunahme von H-Ras und BXB-Raf1 wurde im Western Blot bestimmt (siehe Kapitel 3.4).



### 3.3 In vivo Experimente

#### 3.3.1 Maustumormodell

Die NIH3T3 HER-2, die NIH3T3 H-Ras und die NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen wurden in einer Konzentration von  $7 \cdot 10^6$  Zellen/0,2 ml PBS subkutan in die dorsale Hautpartie von männlichen Nacktmäusen gespritzt. Bei den NIH3T3 HER-2 Zellen bildeten sich nach ca. 8 bis 10 Tagen kleine, subkutan wachsende Tumore mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 cm, im Weiteren als HER-2 Tumore bezeichnet (Schiffer et al., 2003). Der mittlere Durchmesser wurde hierbei definiert als der Mittelwert des größten und des kleinsten Durchmessers. Nach 14 bis 16 Tagen erreichten die Tumore einen mittleren Durchmesser von  $1,2 \pm 0,1$  cm, welcher als Therapiegröße definiert wurde. Bei den NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten sich schon vier Tage nach Injektion der Zellen kleine, subkutan wachsende Tumore mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 cm, im Weiteren als H-Ras Tumore bzw. Raf1 Tumore bezeichnet. Die Tumore der NIH3T3 H-Ras Zellen erreichten bereits nach 6-8 Tagen die Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1$  cm, die Tumore des 1. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen nach 7-9 Tagen und die Tumore des 2. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen nach 11-14 Tagen.

Mit Erreichen der Therapiegröße wurde den Mäusen täglich 10 mg ATc/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Bei einem mittleren Körpergewicht der Mäuse von 25 g bei Therapiebeginn entsprach dies einer Injektion von 200  $\mu$ l einer ATc-Lösung mit der Konzentration 1,25 mg/ml. Gleichzeitig wurden Nacktmäuse ohne ATc-Behandlung als Kontrollen gehalten. Mäuse, die eine ATc-Behandlung bekamen, wurden stets separat von den Mäusen gehalten, die noch nicht die Therapiegröße erreicht hatten, oder die als Kontrollmäuse dienten. Dadurch wurde eine Kontamination dieser Mäuse mit ATc aus dem von den mit ATc behandelten Mäusen ausgeschiedenen Kot vermieden. Zur weiteren Untersuchung der Tumore wurden die Nacktmäuse zu den entsprechenden Zeitpunkten durch Genickbruch getötet. Die Tumore wurden sofort herauspräpariert, grob zerkleinert und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Die Tumore wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.2 Wachstumskurve

Zur Bestimmung des Tumorumfanges der aus den Zellen resultierenden subkutanen Tumore wurden der kleinste und der größte Durchmesser mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Das Tumorumfang wurde nach der Formel „ $a \cdot b \cdot b/2$ “ berechnet, wobei „a“ dem kleinsten und „b“ dem größten Durchmesser entsprach. Die Messungen wurden bis zum Erreichen der Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1$  cm alle zwei Tage und ab Therapiegröße täglich vorgenommen. Die daraus resultierende Wachstumskurve entsprach dem Kontrollwachstum der Tumore. Zur

Bestimmung des Tumorverlaufs nach ATc-Gabe wurde das Tumolvolumen nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben von Nacktmäusen bestimmt, denen ab der Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1$  cm täglich 10 mg ATc/kg Körpergewicht subkutan injiziert wurde. In einer ersten Studie wurde für jede Zelllinie der Langzeit-Tumorverlauf aufgenommen. Dabei wurde das Kontrollwachstum bis zu einem mittleren Tumordurchmesser von 2,5 cm verfolgt. Anschließend wurden die Tumore wie unter 3.3.1 beschrieben für weitere Untersuchungen isoliert. Zur Bestimmung des Tumorverlaufs nach ATc-Gabe wurde den Mäusen ab der Therapiegröße ununterbrochen ATc verabreicht, bis die erneut wachsenden Rezidivtumore einen mittleren Tumordurchmesser von 2,0 cm erreichten, längstens jedoch über 55 Tage. Die Rezidivtumore wurden dann wie unter 3.3.1 beschrieben für weitere Untersuchungen isoliert. Für die NIH3T3 H-Ras Zellen wurden 2 Langzeit-Studien durchgeführt. Zur Erhöhung der Fallzahl wurden für die Berechnung der Wachstumskurven zusätzlich die Messwerte aus den Kurzzeitstudien (siehe Kapitel 3.3.3.1) mit einbezogen.

Die genaue Anzahl der untersuchten Mäuse und der jeweiligen Gruppen ist in Tabelle 3.1 dargestellt. Ein Teil der Mausstudien wurden von Andreas Banić durchgeführt (Banić, 2003), diese sind in der Tabelle mit einem Stern gekennzeichnet.

Langzeit-Studien	Kontrollmäuse	ATc-behandelte Mäuse
NIH3T3 H-Ras	Studie 1*: 4 Mäuse Studie 2: 5 Mäuse	Studie 1*: 5 Mäuse Studie 2: 5 Mäuse
NIH3T3 BXB-Raf1, 1. Klon	Studie 1*: 5 Mäuse	Studie 1*: 4 Mäuse
NIH3T3 BXB-Raf1, 2. Klon	Studie 1: 5 Mäuse	Studie 1: 5 Mäuse

Tabelle 3.1: Gruppeneinteilung und Anzahl der H-Ras und Raf1 Mäuse in den Langzeitstudien

Die Wachstumskurven der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langen ATc-Gaben wurden genauso wie oben beschrieben bestimmt und die Tumore nach Ende des Beobachtungszeitraumes isoliert. Das Behandlungsschema wich jedoch von dem oben beschriebenen ab und wird genauer unter 3.3.3.2 erläutert.

### 3.3.3 Behandlungsschema

#### 3.3.3.1 Kurzzeitstudien für die Proteinisolierung und immunhistochemische Färbung

H-Ras Tumore	Kontrollmäuse	ATc-behandelte Mäuse
1d ATc	Studie 3: 1 Maus Studie 4: 1 Maus Studie 5: 1 Maus	Studie 3: 4 Mäuse Studie 4: 3 Mäuse Studie 5: 4 Mäuse
3d ATc	Studie 3: 1 Maus Studie 4: 1 Maus Studie 5: 1 Maus	Studie 3: 4 Mäuse Studie 4: 3 Mäuse Studie 5: 4 Mäuse
7d ATc	Studie 3: 1 Maus Studie 4: 1 Maus Studie 5: 1 Maus	Studie 3: 4 Mäuse Studie 4: 3 Mäuse Studie 5: 4 Mäuse
10d ATc	Studie 3: 1 Maus Studie 4: 1 Maus Studie 5: 1 Maus	Studie 3: 4 Mäuse Studie 4: 3 Mäuse Studie 5: 3 Mäuse
Raf1 Tumore, 1.Klon	Kontrollmäuse	ATc-behandelte Mäuse
1d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 4 Mäuse Studie 3: 4 Mäuse
3d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 4 Mäuse Studie 3: 4 Mäuse
7d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 8 Mäuse Studie 3: 8 Mäuse
Raf1 Tumore, 2.Klon	Kontrollmäuse	ATc-behandelte Mäuse
1d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 3 Mäuse Studie 3: 3 Mäuse
3d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 3 Mäuse Studie 3: 3 Mäuse
7d ATc	Studie 2: 1 Maus Studie 3: 1 Maus	Studie 2: 6 Mäuse Studie 3: 2 Mäuse

Tabelle 3.2: Gruppenaufteilung und Anzahl der H-Ras und Raf1 Mäuse in den Kurzzeitstudien

Um den Einfluss des Ausschaltens von H-Ras oder BXB-Raf1 auf die Tumorbilogie untersuchen zu können, wurden Tumore aus Nacktmäusen isoliert, die eine bestimmte Anzahl

von ATc-Gaben erhalten hatten. Den Mäusen mit H-Ras Tumoren wurde über 1, 3, 7 oder 10 Tage täglich ATc subkutan injiziert. Den Mäusen mit Raf1-Tumoren wurde über 1,3 oder 7 Tage täglich ATc subkutan injiziert. Anschließend wurden die Tumore wie unter 3.3.1 beschrieben isoliert. Als Kontrollen wurden Tumore von Mäusen isoliert, die keine ATc-Behandlung bekamen, und deren Tumore ab der Therapiegröße über den gleichen Zeitraum wie die ATc-behandelten Tumore weiterwuchsen. Die genaue Anzahl der untersuchten Mäuse und der jeweiligen Gruppen ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Bestimmung	Anzahl der Studien	Anzahl der ATc-Mäuse pro Zeitpunkt				Anzahl der Bestimmungen
		1d	3d	7d	10d	
H-Ras Tumore:						
H-Ras	3	10	11	11	10	1 x dreifach, 2 x einfach
Ki-67	1	4	4	4	3	einfach
Caspase-3	2	7	8	8	7	1 x doppelt, 1 x einfach
ERK und Akt	2	6	7	7	7	1 x doppelt, 1 x einfach
Raf1 Tumore 1. Klon:						
Raf1	2	8	8	8	---	1 x einfach, 1 x doppelt
Caspase-3	1	4	4	6	---	dreifach
ERK	1	4	4	4	---	dreifach
Akt	1	4	4	4	---	doppelt
Raf1 Tumore 2. Klon:						
Raf1	2	6	6	5	---	2 x einfach
Ki-67	1	3	3	2	---	einfach
ERK und Akt	2	6	6	5	---	1 x doppelt, 1 x einfach

Tabelle 3.3: Aufschlüsselung der Fallzahlen für die einzelnen Bestimmungen

Die Bestimmungen der einzelnen Faktoren im Western Blot bzw. die immunhistochemischen Färbungen wurden nicht immer mit allen oben erwähnten Studien durchgeführt. Eine genaue

Aufschlüsselung der verwendeten Studien und damit der genauen Fallzahlen für jede Bestimmung gibt Tabelle 3.3 wieder.

### 3.3.3.2 Behandlungsschema der HER-2 Tumore

Zur Bestimmung des Wachstums der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langen ATc-Behandlungen wurden zwei verschiedene Studien durchgeführt. Sie sind schematisch in Abbildung 3.2 wiedergegeben.

In der 1. Studie wurde der Einfluss unterschiedlich langer ATc-Behandlungen auf den Tumorverlauf ermittelt. Dazu wurde der Tumorverlauf der üblichen ATc-Dauerbehandlung dem Tumorverlauf nach 5 täglichen ATc-Gaben und dem Tumorverlauf bei ATc-Gabe bis zur Rezidiventwicklung gegenüber gestellt. Dazu erhielt eine Gruppe von Mäusen ab der Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1$  cm über 5 Tage ATc, anschließend wurde das Tumorstadium ohne ATc-Gabe weiter beobachtet. Eine weitere Gruppe von Mäusen erhielt solange ATc, bis ein erneutes Wachstum der Rezidivtumore erkennbar wurde. Die beiden Gruppen wurden so lange weiterbeobachtet, bis durch erneutes Tumorstadium wieder ein Tumor der Therapiegröße entstand. Nun wurden jeweils die Tumore der Hälfte der Gruppe isoliert, um den HER-2 Status im Western Blot zu überprüfen. Die jeweils andere Hälfte der Gruppe erhielt eine erneute ATc-Behandlung, um deren Einfluss auf den weiteren Tumorverlauf herauszufinden. Dabei erhielten die Mäuse ihren Gruppen entsprechend die gleiche ATc-Behandlung wie beim ersten Mal. Zusätzlich wurde eine Gruppe mit Mäusen ohne ATc-Behandlung als Kontrollen verwendet.

Zur Erhöhung der Fallzahl der Kontrollmäuse und der Mäuse, die eine dauerhafte ATc-Behandlung erhielten, wurden die Daten aus einer früheren HER-2 Langzeitstudie mit einbezogen. Hierbei wurden jeweils 5 Mäuse pro Gruppe wie in 3.3.2 beschrieben behandelt.

Die 2. Studie diente zur Überprüfung, ob auch mit einer noch kürzeren ATc-Behandlung von nur 3 Tagen ein vergleichbarer Tumorrückgang beobachtet werden konnte. Auch sollte festgestellt werden, nach wie vielen Tagen nach Beendigung einer ATc-Behandlung in den Tumoren eine erneute HER-2 Expression im Western Blot nachgewiesen werden konnte. Die Mäuse wurden hierfür in 6 verschiedene Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 als Kontrollgruppe ohne ATc-Behandlung; Gruppe 2, deren Tumore sofort nach der dreitägigen ATc-Behandlung isoliert wurden; Gruppe 3, deren Tumore einen Tag nach Beendigung der ATc-Behandlung isoliert wurden (= 1d post); Gruppe 4, deren Tumore 3 Tage nach Beendigung der ATc-Behandlung isoliert wurden (= 3d post); Gruppe 5, deren Tumore 7 Tage nach Beendigung der ATc-Behandlung isoliert wurden (= 7d post); und Gruppe 6, deren Tumore 10 Tage nach Beendigung der ATc-Behandlung isoliert wurden (= 10d post).

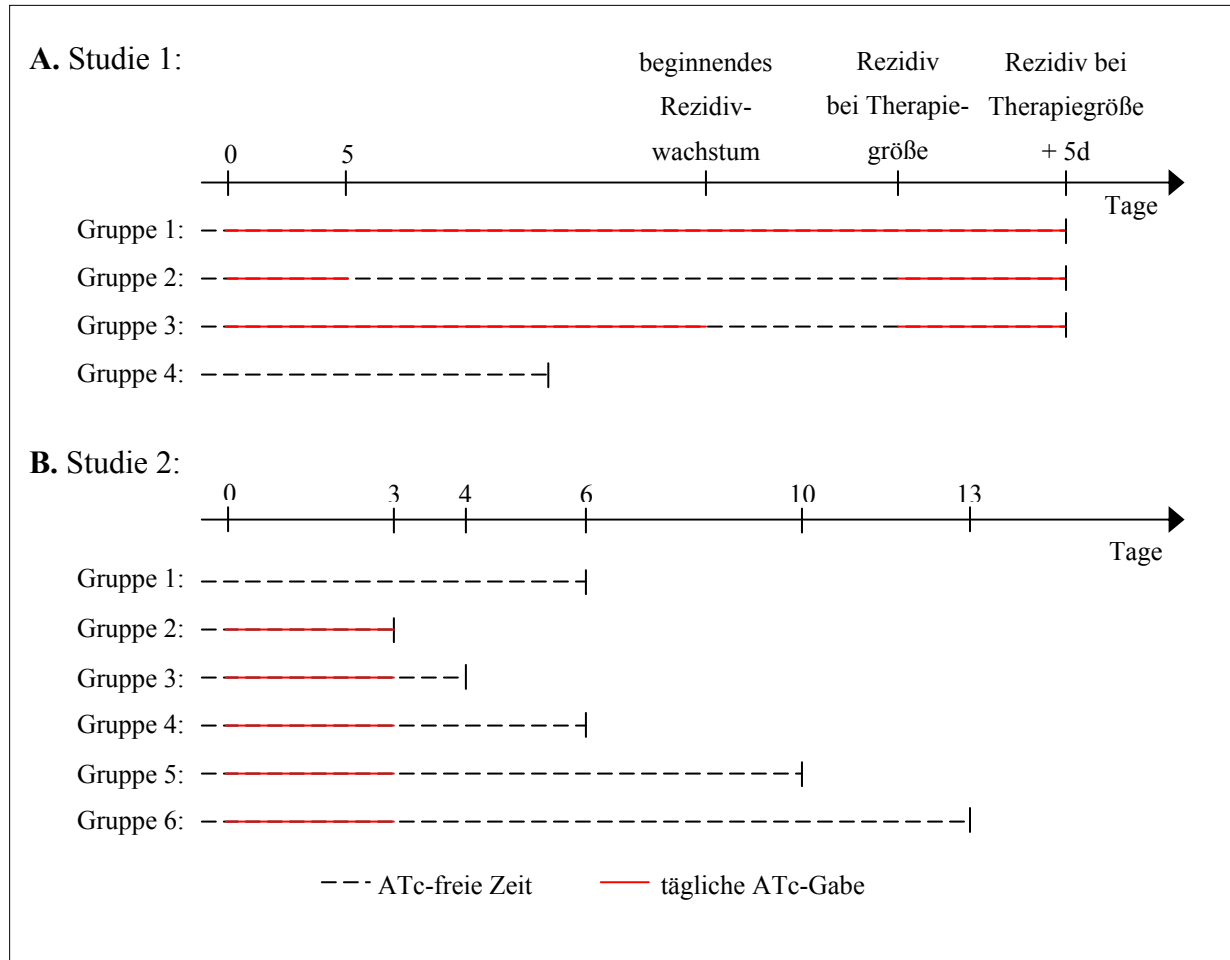


Abbildung 3.2: Studienaufbau HER-2 Tumore

**A.** Einfluss unterschiedlich langer ATc-Behandlungen auf den Langzeitumorverlauf und Einfluss einer zweiten ATc-Gabe auf den Tumorverlauf bei erneutem Erreichen der Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1$  cm. Gruppe 1 erhielt die übliche ATc-Dauerbehandlung. Gruppe 2 erhielt über 5 Tage ATc, anschließend folgte ein Zeitraum ohne ATc bis zum erneuten Erlangen der Therapiegröße. Dann kam es zu einer weiteren ATc-Behandlung über 5 Tage. Gruppe 3 erhielt solange ATc, bis ein Rezidivwachstum erkennbar wurde. Bis zum erneuten Erlangen der Therapiegröße wurden die Mäuse ohne ATc gehalten. Die erneute ATc-Gabe wurde bis zum Erreichen eines mittleren Tumordurchmessers von 2,0 cm durchgeführt. Gruppe 4 diente als Kontrolle ohne ATc-Behandlung.

**B.** Einfluss einer dreitägigen ATc-Behandlung auf den weiteren Tumorverlauf und Behandlungsschema zur Ermittlung der wiederinsetzenden HER-2 Expression nach Beendigung der ATc-Behandlung. Gruppe 1 diente als Kontrolle ohne ATc-Behandlung. Gruppe 2 diente als Positivkontrolle mit dreitägiger ATc-Behandlung. Gruppe 3 bis 6 erhielten je über 3 Tage ATc. Die Tumore wurden 1, 3, 7 und 10 Tage nach Ende der ATc-Behandlung isoliert.

Mäuse, bei denen die ATc-Behandlung beendet wurde, wurden stets täglich in frische Käfige gesetzt, um eine weitere ATc-Aufnahme durch Verspeisen des mit ATc belasteten Kots möglichst gering zu halten. Mäuse, die schon einige Tage ohne ATc gehalten wurden, wurden nie mit Mäusen zusammengesetzt, bei denen gerade frisch die ATc-Behandlung beendet wurde.

Die genaue Anzahl der untersuchten Mäuse und der jeweiligen Gruppen ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Studie 1 wurde von Andreas Banić durchgeführt (Banić, 2003).

Studie 1	Kontrolle	1 x ATc	2 x ATc
Gruppe 1	---	2 + 5 Mäuse	---
Gruppe 2	---	4 Mäuse	4 Mäuse
Gruppe 3	---	3 Mäuse	4 Mäuse
Gruppe 4	2 + 5 Mäuse	---	---
Studie 2	Kontrolle	1 x ATc	2 x ATc
Gruppe 1	2 Mäuse	---	---
Gruppe 2	---	2 Mäuse	---
Gruppe 3	---	4 Mäuse	---
Gruppe 4	---	4 Mäuse	---
Gruppe 5	---	4 Mäuse	---
Gruppe 6	---	4 Mäuse	---

Tabelle 3.4: Gruppenaufteilung und Anzahl der HER-2 Mäuse

## 3.4 Western Blot Analysen

### 3.4.1 Präparation der Zellysate

Die zu lysierenden Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und dann mit Hilfe eines sterilen Zellschabers in etwas PBS vom Flaschenboden abgeschabt. Die Zellsuspensionen aus je 3 T75 Zellkulturflaschen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und die Zellen bei 1000 rpm und 4°C 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert, in 2 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge bei 4°C 15 min zentrifugiert. Das PBS wurde abgegossen und das Zellpellet entweder sofort in Lysepuffer aufgenommen oder aber für eine spätere Lyse bei -70°C gelagert.

Zur Bestimmung von H-Ras bzw. Raf1 wurden die Zellpellets mit je 200 µl Lysepuffer für membranständige Proteine gut durchmischt. Dann wurden die Lösungen zur besseren Lyse 15 min auf Eis stehen gelassen. Die Lösung wurde bei 13000 rpm in der Eppendorfszentrifuge bei 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in saubere Reaktionsgefäße à 40 µl Aliquots überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### 3.4.2 Präparation der Tumorlysate

Die Tumore wurden in Aluminiumfolie gewickelt, die zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Dann wurden die Tumore mit Hilfe eines in flüssigem Stickstoff gekühlten Hammers pulverisiert und mit einem in flüssigem Stickstoff gekühlten Spatel in 2,0 ml Reaktionsgefäße überführt. Je nach Menge wurden die Tumore mit 50 - 500  $\mu$ l Lysepuffer durchmischt. Mit Hilfe eines Minipistills wurden die Tumore im Lysepuffer weiter zerkleinert und zerquetscht. Die entstandene Lösung wurde zur besseren Lyse 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 13000 rpm in der Eppendorfzentrifuge bei 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in saubere Reaktionsgefäße à 10  $\mu$ l Aliquots überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Der Lysepuffer wurde je nach Art der späteren Bestimmung im Western Blot gewählt:

- Für HER-2, H-Ras oder Raf1: Lysepuffer für membranständige Proteine
- Für p-ERK/ERK2 oder p-Akt/Akt: Modifizierter RIPA Puffer
- Für Caspase-3: Chaps-Lysepuffer für Kernproteine

### 3.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Zellysate wurden 1:10 mit H<sub>2</sub>O dest. vorverdünnt, die Tumorlysate 1:100.

Der Proteingehalt der Lysate wurde anhand einer BSA-Eichgerade ermittelt. Das Pipettierschema der Eichgeraden zeigt Tabelle 3.5.

Endkonz. in der Küvette [ $\mu$ g/ml]	BSA Stamm-lösung [ $\mu$ l]	H <sub>2</sub> O dest. [ $\mu$ l]	Bradfordlösung [ $\mu$ l]
0	0	800	200
2,5	40	760	200
5,0	80	720	200
7,5	120	680	200
10,0	160	640	200
15,0	240	560	200

Tabelle 3.5: Eichgerade für Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

5, 10 oder 20  $\mu$ l der verdünnten Lysate, abhängig vom Proteingehalt, wurden in den Küvetten mit dest. H<sub>2</sub>O auf 800  $\mu$ l aufgefüllt und mit 200  $\mu$ l Bradfordlösung durchmischt. Es wurde darauf geachtet, dass die Extinktion der Proben in etwa zwischen dem ersten und dem dritten



Messpunkt der Eichgeraden lag. Eventuell wurden zwei verschiedene Verdünnungen der Proben hergestellt und das Ergebnis gemittelt.

Die Eichgerade und die Proben wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

### 3.4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

#### 3.4.4.1 SDS-PAGE

Die Zell- und Tumorlysate wurden in den entsprechenden Proteinkonzentrationen mit H<sub>2</sub>O dest. und Probenpuffer nach folgendem Schema gemischt:

$$x \mu\text{l Probe} + 8-x \mu\text{l H}_2\text{O dest.} + 4 \mu\text{l Probenpuffer}$$

Damit ergab sich ein Probenvolumen pro Geltasche von 12  $\mu\text{l}$ . Je nach Bestimmung betrug die absolute Proteinmenge pro Tasche 15, 30 oder 50  $\mu\text{g}$ . Die Proben wurden abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins auf 10%igen, 12%igen oder 15%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht über die eingesetzten Proteinmengen und die verwendeten Gele.

Zu bestimmendes Protein	Gesamtproteinmenge pro Geltasche	verwendetes Gel
HER-2	30 $\mu\text{g}$	10%
H-Ras <i>in vitro</i>	15 $\mu\text{g}$	15%
H-Ras <i>in vivo</i>	30 $\mu\text{g}$	15%
Raf1 <i>in vitro</i>	15 $\mu\text{g}$	12%
Raf1 <i>in vivo</i>	30 $\mu\text{g}$	12%
p-ERK und p-Akt	50 $\mu\text{g}$	12%
Caspase-3	50 $\mu\text{g}$	15%

Tabelle 3.6: Proteinmengen und Gele für die SDS-PAGE

Die Proben mit Probenpuffer wurden im Heizblock 10 min lang bei 95°C gekocht. Anschließend wurde die Kondensflüssigkeit durch kurzes Zentrifugieren wieder aufgesammelt. Die polymerisierten Acrylamidgele wurden in die mit Laufpuffer gefüllte Gelapparatur eingespannt. In die erste Tasche jedes Gels wurden 8  $\mu\text{l}$  BenchMark<sup>TM</sup> zur optischen Kontrolle der Proteinauftrennung während des Gelelektrophoreselaufs aufgetragen. Für die Auftrennung von Proteinen <30 kDa auf 15%igen Acrylamidgelen wurde anstelle des

BenchMark™ der Color Marker für kleine Proteine aufgetragen. Neben dem BenchMark™ oder dem Color Marker wurde jeweils auch der MagicMark™ als interner Proteinstandard aufgetragen, der erst durch Inkubation mit einem Zweitantikörper sichtbar wurde. Neben den beiden Markern wurden nun die restlichen Geltaschen mit den Proben beladen. Der Gellauf fand mit 28 mA bei einem Gel und 56 mA bei 2 Gelen statt und dauerte zwischen 1,5 und 2 h je nach Gel und Größe des zu bestimmenden Proteins.

### 3.4.4.2 Proteintransfer

Die Proteine wurden mittels Semi-Dry Blotting vom Gel auf die PVDF Membran transferiert. Dazu wurden 12 Filterpapiere in Anodenpuffer und 4 Filterpapiere in Kathodenpuffer 30 min lang gut getränkt. Die Membranen wurden kurz in Ethanol geschwenkt und 30 min lang in Anodenpuffer equilibriert. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Gele ebenfalls in Kathodenpuffer kurz equilibriert und dann der Semi-Dry Blot nach folgendem Schema aufgebaut (Abbildung 3.3).

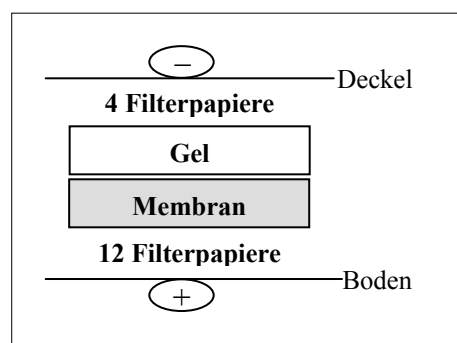


Abbildung 3.3: Aufbau des Semy-Dry Blots

Die Blotbedingungen waren abhängig von der Größe der Membran. Die Milliamperezahl betrug 5 mA pro cm<sup>2</sup>. Die Dauer des Transfers betrug 30 min, unabhängig von der Größe der Membran und vom Prozentsatz an Acrylamid im Gel. Die fertig geblotteten Membranen wurden direkt in PBS-T gelegt, oder aber an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.4.4.3 Immunfärbung

Bei -20°C gelagerte Membranen wurden kurz in Ethanol geschwenkt und 30 min in PBS-T equilibriert. Frisch geblottete Membranen wurden direkt eingesetzt. Zur Abblockung unspezifischer Proteinbindungen wurden die Membranen 1 h lang in Blocklösung gelegt. Danach wurden die Membranen direkt in Tütchen mit dem entsprechenden Erstantikörper eingeschweißt und für die entsprechende Zeit auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend

wurden die Membranen 4 x 5 min in PBS-T gewaschen. Für die Zweitantikörperinkubation wurden die Membranen erneut in Tütchen eingeschweißt. Abschließend wurden die Membranen nochmals 4 x 5 min in PBS-T gewaschen.

Zur Detektion der Antikörper wurden die beiden Lösungen des Chemilumineszenzreagenzes frisch 1:1 gemischt. Die Membranen wurden mit der Mischung überschichtet und 1 min inkubiert. Die weiteren Arbeiten fanden unter Ausschluss von Licht statt. Die Chemilumineszenz, die durch die an den Zweitantikörpern gekoppelte Peroxidase verursacht wurde, wurde auf Filmen festgehalten und mit Entwickler- und Fixiererbädern fixiert. Die durchschnittliche Belichtungszeit der Filme betrug 1-5 min abhängig von dem zu detektierenden Protein. Die belichteten Filme wurden 1,5 min im Entwicklerbad entwickelt und 3 min im Fixiererbädern fixiert.

### 3.4.5 Verdünnungen und Inkubationsbedingungen der Antikörper

Alle Antikörper wurden in Blocklösung verdünnt.

p-Akt (Phospho-Akt (Ser473), rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:1000	über Nacht bei 4°C
Zweitantikörper (goat anti-rabbit)	1:5000	20 min bei RT

Akt (Akt, rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:1000	über Nacht bei 4°C
Zweitantikörper (goat anti-rabbit)	1:5000	20 min bei RT

$\beta$ -Aktin (Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin, mouse IgG<sub>2a</sub> isotype):

Erstantikörper	1:5000	30 min bei RT
Zweitantikörper	1:10 000	20 min bei RT

Caspase-3 (Caspase-3, rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:1000	über Nacht bei 4°C
Zweitantikörper (goat anti-rabbit)	1:5000	20 min bei RT

p-ERK1/2 (Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204), rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:1000	über Nacht bei 4°C
Zweitantikörper (goat anti-rabbit)	1:5000	20 min bei RT

ERK2 (ERK 2(D-2), mouse monoclonal IgG<sub>2b</sub>):

Erstantikörper	1:10 000	1,5 h bei RT
Zweitantikörper	1:10 000	20 min bei RT

HER-2 (C-erbB-2/HER-2/neu, mouse monoclonal IgG<sub>1</sub>):

Erstantikörper	15 µl auf 4 ml	1,5 h bei RT
Zweitantikörper	1:50 000	20 min bei RT

H-Ras (H-Ras (C-20), rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:200	1,5 h bei RT
Zweitantikörper (sheep anti-rabbit)	1:50 000	20 min bei RT

Raf-1 (Raf-1 (C-20), rabbit polyclonal IgG):

Erstantikörper	1:500	1,5 h bei RT
Zweitantikörper (sheep anti-rabbit)	1:50 000	20 min bei RT

### 3.4.6 Auswertung

Die Filme wurden in den Computer eingescannt und die einzelnen Banden densitometrisch ausgewertet. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Scion Image. Bei den *in vitro* Untersuchungen wurden die Werte für die verschiedenen Zeitpunkte der ATc-behandelten Zellen jeweils zur Kontrolle in Relation gesetzt. Die Kontrolle wurde dabei als 100% definiert. Bei den *in vivo* Untersuchungen wurden die Werte für die ATc-behandelten Mäuse jeweils zur entsprechenden Kontrollmaus in Relation gesetzt. Die Kontrolle wurde dabei als 100% definiert. Die Prozentzahlen der Mäuse pro Zeitpunkt und der verschiedenen Ansätze wurden insgesamt gemittelt.

## 3.5 Immunhistochemische Färbung

### 3.5.1 Präparation der Objektträger für die *in vitro* Untersuchungen

Für die *in vitro* Untersuchungen wurden Zellen über Objektträger wachsen gelassen. Die Objektträger wurden dazu vorab in 70%igem Ethanol sterilisiert. Je 5 Objektträger wurden in 125 cm<sup>2</sup> Petrischalen gelegt und mit Kulturmedium überschichtet. Das Aussäen der Zellen und die Versuchsbedingungen entsprechen den unter 3.2 beschriebenen Experimenten.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Objektträger in PBS gewaschen und die Zellen in eiskaltem Aceton 10 min auf den Objektträgern fixiert. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.2 Präparation der Tumorschnitte

Von den Tumoren wurden jeweils zwei Kryoschnitte pro Objektträger angefertigt. Somit konnte bei jeder Färbung gleichzeitig eine Negativkontrolle des Tumors mitgeführt werden. Die Kryoschnitte wurden dankenswerterweise von einer Mitarbeiterin des Histologischen Labors der Frauenklinik angefertigt. Die fertigen Kryoschnitte wurden in eiskaltem Aceton 10 min lang fixiert, an der Luft getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.3 Färbeprotokoll der Ki-67 Peroxidasefärbung

Die gefrorenen Objektträger wurden an der Luft vollständig getrocknet, und die zu färbenden Schnitte bzw. Zellareale wurden mit einem Fettstift umkreist. Dabei wurde jeweils ein Kreis für die Ki-67 Färbung und ein Kreis für die Negativkontrolle angefertigt. Die Schnitte wurden 5 min in TBS gewässert. Zum Abblocken der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 30 min lang in einem Gemisch aus Methanol und Wasserstoffperoxid gestellt. Anschließend wurde 3 x 5 min in TBS gewaschen. Zum Abblocken unspezifischer Antikörperbindungen wurden nun die Schnitte mit einer 3%igen BSA-Lösung überschichtet. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT. Ohne erneutes Waschen wurden die Schnitte direkt mit der Ki-67 Antikörperlösung bzw. TBS als Negativkontrolle überschichtet. Die Inkubationszeit betrug auch hier eine Stunde bei RT. Danach wurden die Objektträger 3 x 5 min in TBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Zweitantikörper-Reagenz N-Histofine<sup>®</sup> überschichtet. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei RT. Es wurde erneut 3 x 5 min in TBS gewaschen. Die Schnitte wurden dann mit DAB-Lösung überschichtet, die zuvor mit  $20\ \mu\text{l}\ \text{H}_2\text{O}_2/\text{ml}$  DAB-Lösung aktiviert wurde. Die Reaktionszeit betrug 4 min bei RT. Die überschüssige DAB-Lösung wurde zur Entsorgung in Natrium-Hypochlorit-Lösung gegeben. Die Objektträger wurden 10 min unter fließendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 2 min in Hämalaunlösung gegengefärbt und 10 min unter fließendem Wasser gebläut. Zur Entwässerung der Schnitte wurden nun die Objektträger nacheinander jeweils 10 sec. in 80%, 96% und 2 x 100% Isopropanol gestellt und letztendlich 4 x je 4 min in Roti-Histol<sup>®</sup> vollständig entwässert. Dann wurden die Schnitte mit Hilfe von Entelan Neu<sup>®</sup> eingedeckelt.

### 3.5.4 Auswertung

Mittels einer am Mikroskop angebrachten digitalen Kamera wurden Bilder von den gefärbten Schnitten gemacht. Dabei wurden für die *in vitro* Untersuchungen 5 Bilder pro Objektträger gemacht und für die Tumorschnitte 9 Bilder pro Schnitt. Die Bilder wurden regelmäßig über den Schnitt verteilt aufgenommen, um eine gleichmäßige Auswertung des Schnittes zu ermöglichen. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne sowie die negativen blauen Kerne gezählt. Die Ki-67 Rate ergab sich aus dem Verhältnis der braunen Kerne zur Gesamtzahl der Kerne. Die erhaltenen Prozentzahlen wurden je Zeitpunkt gemittelt. Die Tumore der ATc-behandelten Mäuse wurden mit dem Tumor der gleich alten Kontrollmaus verglichen

## **4 ERGEBNISSE**

Ausschalten der HER-2 Expression führte zu einer raschen Tumorremission, die auf einem Proliferationsstopp und Apoptose beruhte (Schiffer et al., 2003). Um nun genauer verstehen zu können, auf welchen Signalwegen diese Tumorremission vermittelt wird, wurde dasselbe Zellsystem auch mit anderen Onkogenen etabliert, nämlich mit H-Ras und BXB-Raf1. Die beiden resultierenden Zelllinien NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihren Einfluss auf das Tumorwachstum untersucht. Da der zuerst erhaltene Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen ein unstabiles Kontrollwachstum während des Behandlungszeitraumes zeigte, wurde zum Teil ein zweiter Klon als Vergleich untersucht.

## 4.1 NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen *in vitro*

### 4.1.1 Wachstumsverhalten *in vitro*

Das Zellwachstum der NIH3T3 H-Ras und der NIH3T3 BXB-Raf1 wurde mit dem Wachstum der NIH3T3 Wildtyp (WT) Zellen verglichen (Abbildung 4.1). Es zeigte sich dabei, dass die Zelllinien durch die Transfektion mit den Onkogenen H-Ras bzw. BXB-Raf1 keinen Wachstumsvorteil erhielten. Das Wachstum der NIH3T3 BXB-Raf1 entsprach dem der Wildtyp-Zellen, während die H-Ras Zellen ein deutlich langsames Wachstum zeigten.

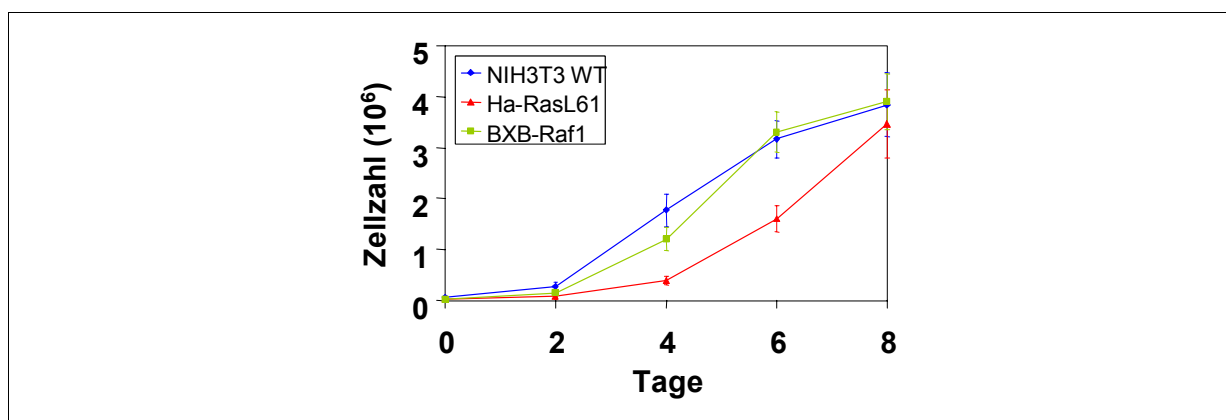


Abbildung 4.1: Wachstumskurve der NIH3T3 WT, NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 *in vitro*. Dargestellt ist die Zellzahl pro T25er Kulturflasche in Millionen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 2 Kulturflaschen pro Zeitpunkt. Tag 0 entspricht der Zellzahl einen Tag nach dem Aussäen der Zellen.

### 4.1.2 Konditionale Expression von H-Ras bzw. BXB-Raf1 *in vitro*

Zur Kontrolle der Funktion des TET-OFF Systems in den NIH3T3 H-Ras bzw. BXB-Raf1 Zellen wurden diese über 1, 3 und 7 Tage mit ATc inkubiert. Zur Überprüfung, ob das System nach ATc-Inkubation wieder reversibel ist, wurden die Zellen zunächst 3 Tage lang mit ATc



inkubiert. Dadurch konnte eine deutliche Herunterregulation von H-Ras bzw. BXB-Raf1 garantiert werden. Anschließend wurden die Zellen 1, 3, 7 und 10 Tage ohne ATc weiterkultiviert (Postinkubation).

Die NIH3T3 H-Ras Zellen zeigten nach Inkubation mit ATc eine deutliche Herunterregulation von H-Ras im Western Blot (Abbildung 4.2). Die Expression von H-Ras konnte dabei nach einem Tag auf  $82,22 \pm 2,95$  % (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und nach 3 Tagen auf  $22,77 \pm 15,82$  % herunterreguliert werden. Nach 7 Tagen konnte H-Ras im Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Wurde dem System das ATc wieder entzogen, zeigte sich eine stetige Zunahme von H-Ras. Nach einem Tag betrug die H-Ras Expression  $42,49 \pm 5,34$  %, nach 3 Tagen  $74,24 \pm 0,55$  % und nach 7 Tagen entsprach die Menge an H-Ras wieder der der Kontrolle ( $100,68 \pm 0,70$  %).

Durch Gabe von ATc konnte also die Expression von H-Ras in den NIH3T3 H-Ras Zellen ausgeschaltet werden. Entzog man den Zellen das ATc wieder, so kam es zu einer erneuten H-Ras Expression.

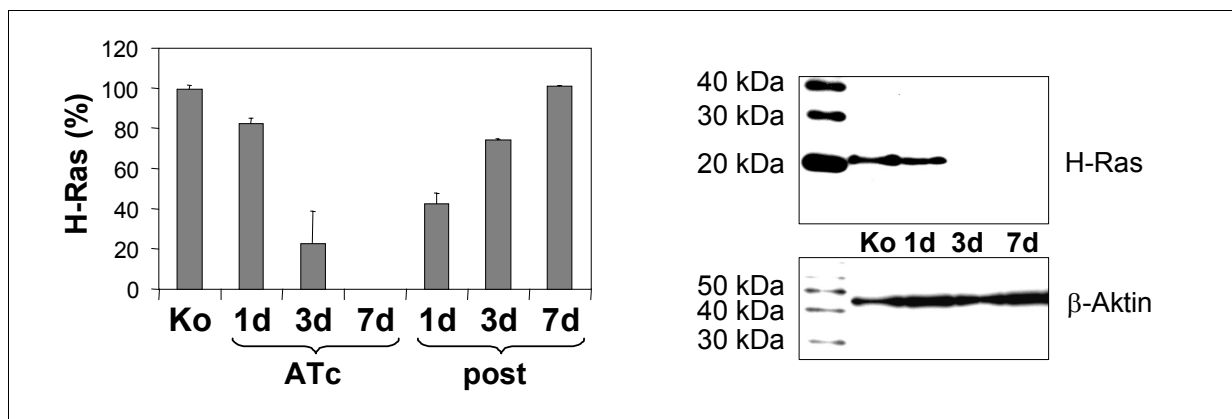


Abbildung 4.2: NIH3T3 H-Ras *in vitro*

Herunterregulation von H-Ras nach ATc Inkubation und erneute H-Ras Expression nach Ende der ATc Inkubation. Die Menge an H-Ras wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Auch in den NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen konnte durch ATc Inkubation die BXB-Raf1 Expression herunterreguliert werden (Abbildung 4.3). Die Untersuchung der beiden Klone der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen ergaben im Western Blot ein sehr ähnliches Bild. Die BXB-Raf1 Expression des 1. Klons betrug nach einem Tag ATc Inkubation  $22,10 \pm 15,59$  %, nach 3 Tagen  $1,79 \pm 3,10$  % und nach 7 Tagen  $0,84 \pm 1,45$  % des Wertes der Kontrolle ohne ATc Inkubation. Für den 2. Klon waren es nach einem Tag  $33,19 \pm 23,02$  %, nach 3 Tagen  $4,48 \pm 5,23$  % und nach 7 Tagen  $2,51 \pm 3,54$  %.

Im Gegensatz zu den NIH3T3 HER-2 und den NIH3T3 H-Ras Zellen kam es jedoch bei den NIH3T3 BXB-Raf1 nicht mehr zu einer erneuten BXB-Raf1 Expression wenn dem System

das ATc wieder entzogen wurde. Die Menge an BXB-Raf1 betrug für den 1. Klon einen Tag nach Ende der ATc Inkubation  $1,99 \pm 0,60$  %, nach 3 Tagen  $2,76 \pm 2,46$  % und nach 7 Tagen  $3,01 \pm 2,68$  %, für den 2. Klon nach einem Tag  $1,84 \pm 1,84$  %, nach 3 Tagen  $0,01 \pm 0,01$  % und nach 7 Tagen  $2,79 \pm 2,79$  %. Dies entsprach der Expression nach 7 Tagen ATc Inkubation. Die Herunterregulation von BXB-Raf1 in den NIH3T3 BXB-Raf1 war also irreversibel. Die Ursache für den Verlust der Regulierbarkeit nach einmaliger ATc-Inkubation wurde nicht näher untersucht.

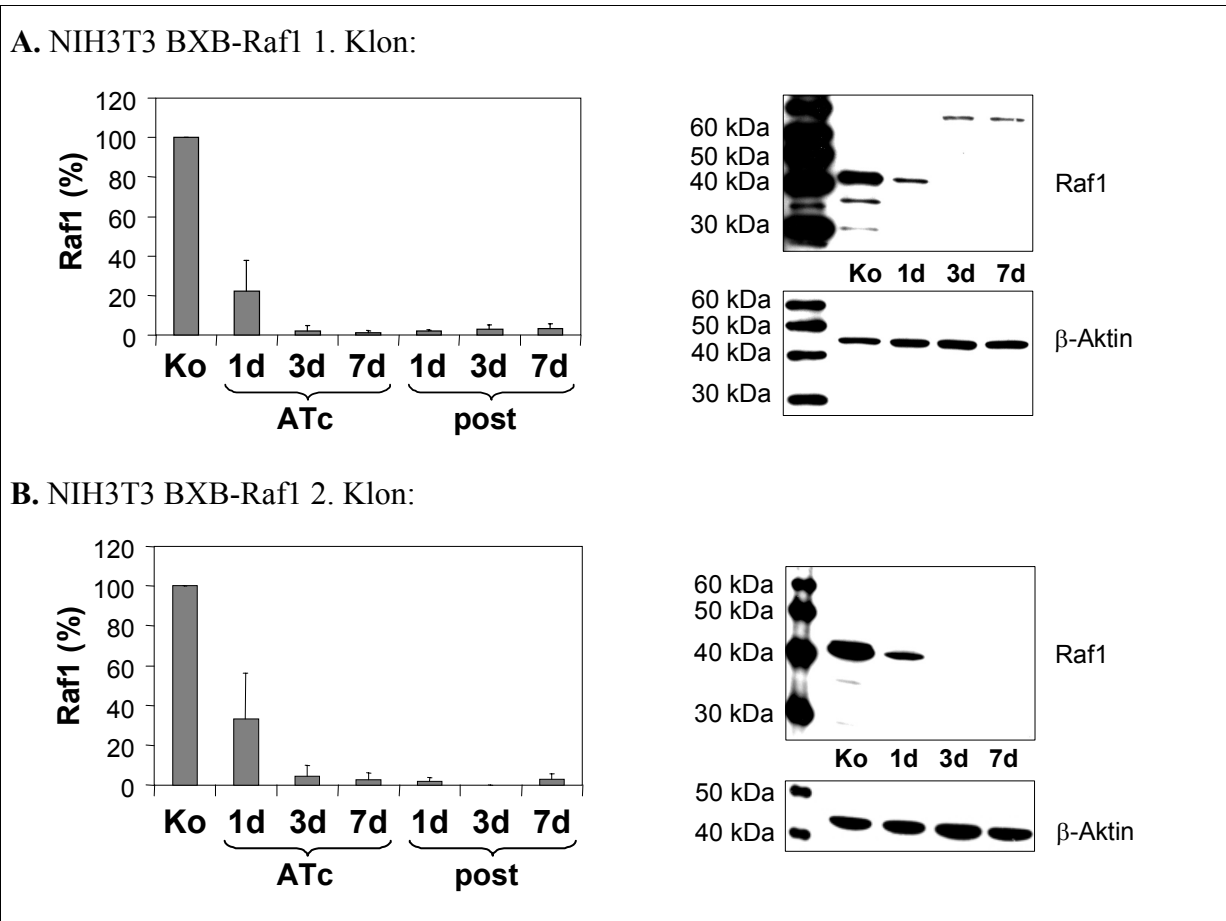


Abbildung 4.3: NIH3T3 BXB-Raf1 *in vitro*

Herunterregulation von BXB-Raf1 nach ATc Inkubation und erneute BXB-Raf1 Expression nach Ende der ATc Inkubation. **A.** NIH3T3 BXB-Raf1 1. Klon. **B.** NIH3T3 BXB-Raf1 2. Klon. Die Menge an BXB-Raf1 wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

## 4.2 Konditionale Expression von H-Ras bzw. BXB-Raf1 *in vivo*

Applizierte man die NIH3T3 H-Ras bzw. BXB-Raf1 Zellen subkutan in Nacktmäuse, so entwickelten sich subkutane Tumore, die als lokal begrenzte, kugel- bis ellipsenförmige Einheit wuchsen. Nach ca. 6-8 Tagen erreichten die aus den NIH3T3 H-Ras Zellen

resultierenden Tumore (H-Ras Tumore) einen mittleren Tumordurchmesser von  $1,2 \pm 0,1$  cm. Diese Größe wurde als Therapiegröße definiert. Die aus dem 1. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen resultierenden Tumore (Raf1 Tumore) erreichten nach ca. 7-9 Tagen die Therapiegröße. Die Tumore des 2. Klons benötigten etwa 4 Tage länger. Mit Erreichen der Therapiegröße wurde die Mäuse täglich mit einer subkutanen Applikation von 10 mg ATc/kg Körpergewicht behandelt. Die Mäuse wurden in Gruppen mit unterschiedlicher Behandlungsdauer eingeteilt, um die Funktion des TET-OFF Systems zu überprüfen. Für die H-Ras Mäuse wurden Behandlungsdauern von 1, 3, 7 und 10 Tagen gewählt. Die BXB-Raf1 Mäuse erhielten nur über 1, 3 und 7 Tage ATc, da der Tumorrückgang deutlich stärker war als bei den H-Ras Tumoren und nach 7 Tagen kaum mehr Tumormasse übrig war. Jedem Behandlungszeitraum entsprechend wurde ein unbehandelter Kontrolltumor mitgeführt. Die Tumore wurden nach der entsprechenden Behandlungsdauer isoliert.

Durch Behandlung der Mäuse mit ATc konnte in den H-Ras Tumoren ein rascher und deutlicher Rückgang der H-Ras Expression im Western Blot verzeichnet werden (Abbildung 4.4). Dieser verlief schneller als *in vitro*. Nach einem Tag konnte H-Ras bereits auf  $35,06 \pm 25,40$  % reduziert werden. Nach 3 Tagen waren es nur noch  $0,11 \pm 0,21$  %, nach 7 Tagen  $0,26 \pm 0,89$  % und nach 10 Tagen  $3,90 \pm 8,68$  %. Einzelne Mäuse der 10-Tage-Gruppe zeigten im Western Blot ein erneutes, wenn auch schwaches H-Ras Signal. Dies deutete bereits auf die wiederkehrende H-Ras Expression hin, die in den auftretenden Rezidivtumoren beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.4).

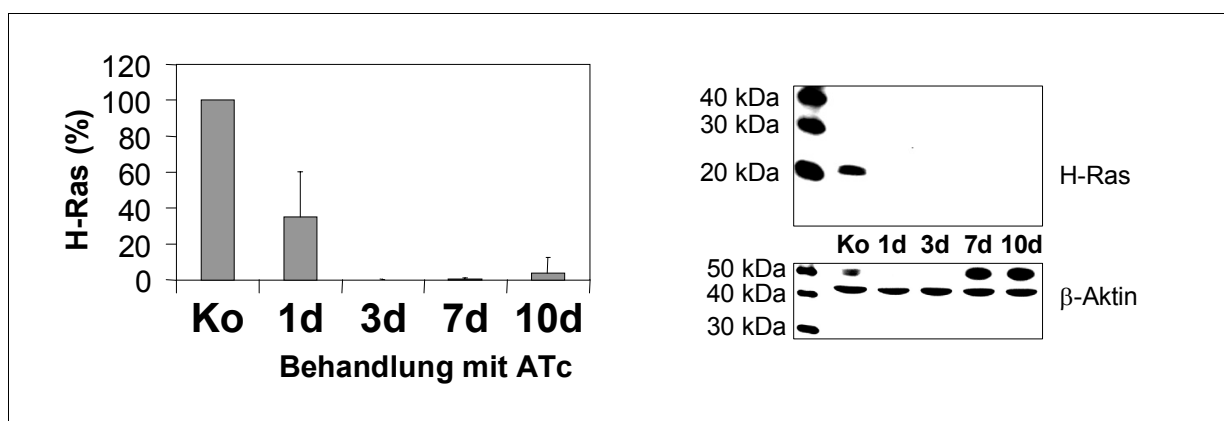


Abbildung 4.4: Herunterregulation von H-Ras *in vivo*

Die Menge an H-Ras wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Auch *in vivo* zeigten die beiden NIH3T3 BXB-Raf1 Klone eine miteinander vergleichbare Herunterregulation von BXB-Raf1 (Abbildung 4.5). Ebenso wie bei den NIH3T3 H-Ras Zellen verlief auch hier die Abnahme schneller als *in vitro* beobachtet. Der 1. Klon konnte nach einem Tag auf  $26,46 \pm 18,88$  % herunterreguliert werden, nach 3 Tagen auf  $12,46 \pm$

7,63 % und nach 7 Tagen auf  $3,70 \pm 3,48$  %. Der 2. Klon konnte nach einem Tag auf  $3,81 \pm 1,71$  % herunterreguliert werden, nach 3 Tagen auf  $1,21 \pm 2,48$  % und nach 7 Tagen auf  $12,29 \pm 24,58$  %. Bei dem vergleichsweise hohen Wert für die 7 Tage ATc Behandlung handelte es sich nicht um einen allgemeinen Anstieg der BXB-Raf1 Expression. Der Wert kam vielmehr durch einen einzelnen Ausreißer zustande, der nach 7 Tagen ATc Behandlung noch 61,45 % BXB-Raf1 vorwies. Ohne diesen Ausreißer betrug die Menge an BXB-Raf1 nach 7 Tagen  $0,01 \pm 0,01$  %. Der Grund für die hohe BXB-Raf Expression kann nicht erklärt werden, da der Tumor einen vergleichbaren Tumorrückgang wie die anderen Tumore verzeichnete.

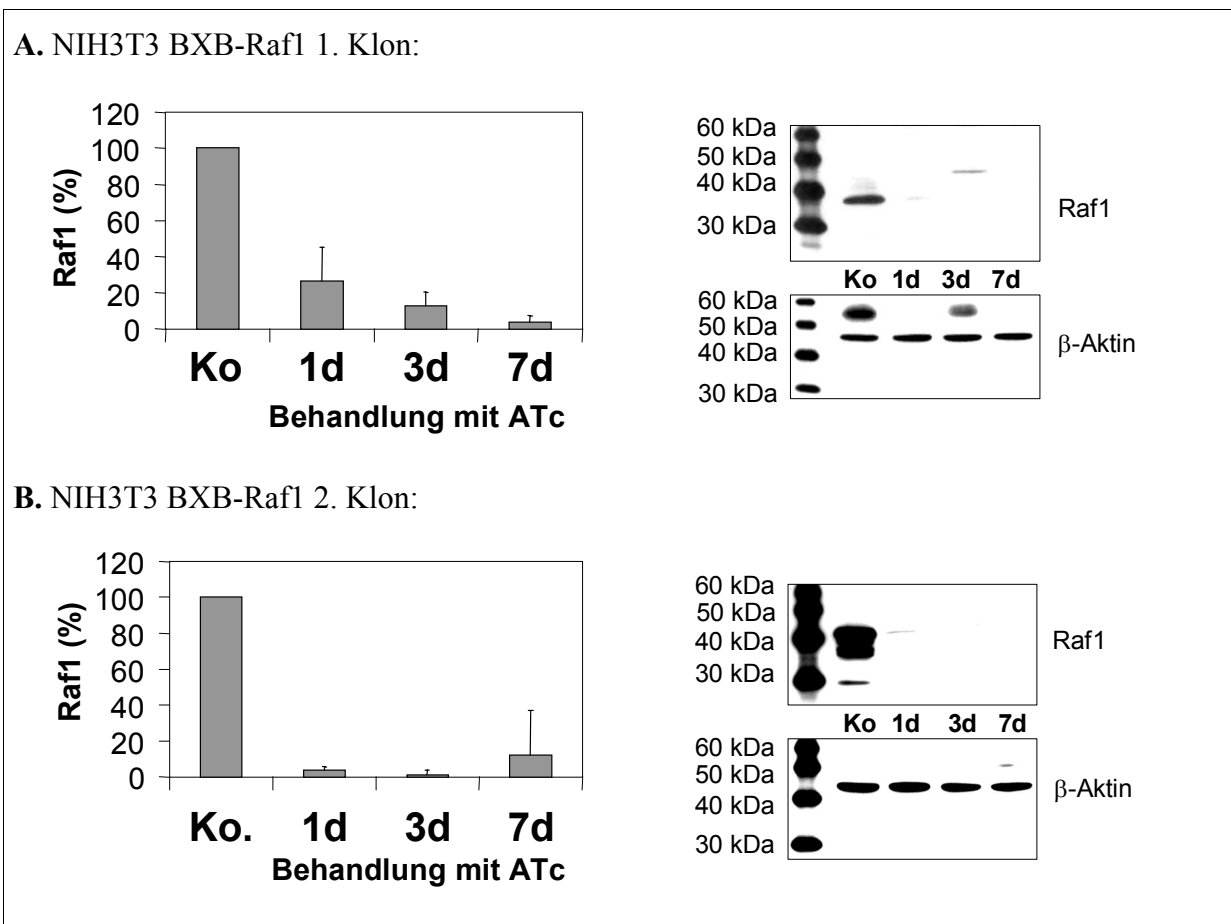


Abbildung 4.5: Herunterregulation von BXB-Raf *in vivo*

**A.** NIH3T3 BXB-Raf1 1. Klon. **B.** NIH3T3 BXB-Raf1 2. Klon. Die Menge an BXB-Raf1 wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

### 4.3 Tumorwachstum der NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen in vivo

Die nach Injektion der NIH3T3 H-Ras bzw. BXB-Raf1 Zellen subkutan wachsenden H-Ras bzw. BXB-Raf1 Tumore zeigten ein stetiges Wachstum (Abbildung 4.6). Die ersten Tumore waren ca. 4 Tage nach der Applikation erkennbar. Beide Zelllinien zeigten somit eine frühere Tumorentwicklung als die NIH3T3 HER-2 Zellen, bei denen erst nach ca. 7 Tagen erste Tumore erkennbar waren (Schiffer et al., 2003).

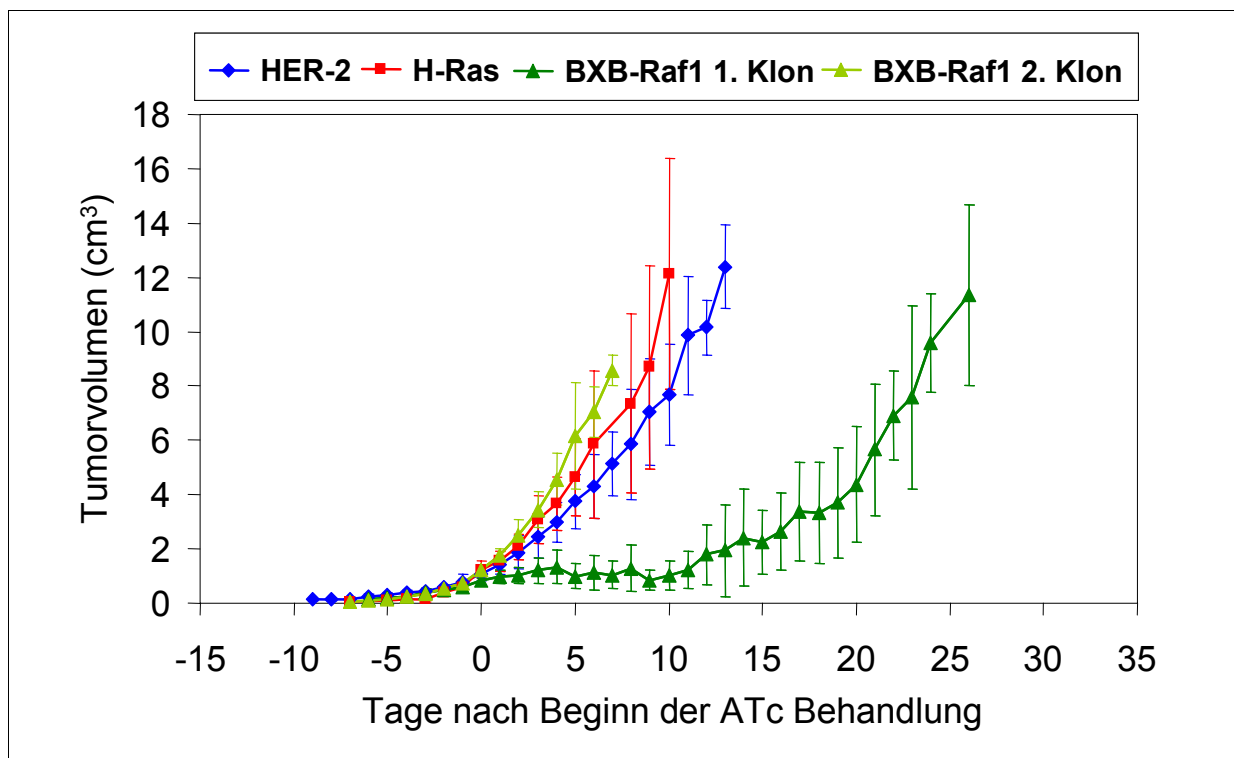


Abbildung 4.6: Vergleich des Wachstumsverhaltens der HER-2 (blau), H-Ras (rot) und BXB-Raf1 (grün) Tumore

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 3 unabhängigen Studien. Die einzelnen Kurven wurden auf die Therapiegröße (Mittler Tumordurchmesser =  $1,2 \pm 0,1$  cm) als Tag 0 normiert.

#### 4.3.1 Tumorremission nach Ausschalten von H-Ras

Die aus den NIH3T3 H-Ras Zellen resultierenden Tumore erreichten etwa 6-8 Tage nach Applikation der Zellen einen mittleren Tumordurchmesser von  $1,2 \pm 0,1$  cm, und damit die Tumorgöße, bei der mit der ATc-Behandlung begonnen wurde. Einem Teil der Mäuse wurde nun täglich 10 mg ATc/kg Körpergewicht subkutan verabreicht (Abbildung 4.7 A). Während der ersten zwei Tage der ATc Behandlung wurde das Tumorwachstum nicht beeinflusst, obwohl es im Tumor schon zu einer deutlichen Abnahme der H-Ras Expression kam (siehe Kapitel 4.2, Abbildung 4.4). Das Tumolvolumen nahm in diesen beiden Tagen von  $1,09 \pm$

0,21 cm<sup>3</sup> auf  $1,74 \pm 0,47$  cm<sup>3</sup> zu. Erst am dritten Tag nach Beginn der ATc Behandlung konnte bei den Mäusen eine Stagnation bzw. ein leichter Rückgang des Tumolvolumens beobachtet werden. Bis zum Tag 9 nach Beginn der ATc Behandlung nahm das Tumolvolumen stetig ab und erreichte ein mittleres Volumen von  $0,33 \pm 0,22$  cm<sup>3</sup>. Geht man von der Tumorgöße bei Beginn der ATc Behandlung aus, so entspricht dies einer Abnahme um 70 %. Nimmt man das größte Tumolvolumen an Tag 2 als Ausgangsvolumen, so ergibt sich eine Abnahme um 81 %. Ab Tag 10 konnte ein erneutes Tumorwachstum beobachtet werden, obwohl den Mäusen weiterhin ATc appliziert wurde. Bis Tag 18 nahm das Tumolvolumen auf  $3,02 \pm 0,86$  cm<sup>3</sup> zu. Bei keiner der Mäuse konnte eine vollständige Tumorremission beobachtet werden. Die Messdaten der Wachstumskurven der H-Ras Tumore stammen zum Teil von Banić (2003) (siehe Kapitel 3.3.2).

### **4.3.2 Tumorremission nach Ausschalten von BXB-Raf1**

#### **4.3.2.1 NIH3T3 BXB-Raf1 1. Klon**

Die aus dem 1. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen resultierenden Tumore zeigten in den ersten 10-12 Tagen nach Applikation der Zellen ein stetiges Wachstum. Die ersten Tumore waren etwa 4 Tage nach Applikation der Zellen sichtbar. Nach 7-9 Tagen erreichten die Tumore die Therapiegröße. 2-3 Tage später konnte jedoch in der Mehrzahl der Tumore eine Stagnation des Wachstums beobachtet werden, die ungefähr 7 Tage andauerte. In einzelnen Fällen kam es sogar zu einem leichten Tumorrückgang. Das mittlere Tumolvolumen schwankte in dieser Zeit zwischen 1,00 und 1,30 cm<sup>3</sup> und lag somit nur leicht über dem Tumolvolumen der Therapiegröße. Nach dieser Zeit zeigten alle Tumore ein erneutes Tumorwachstum, welches dem Kontrollwachstum der H-Ras oder HER-2 Tumore entsprach (Abbildung 4.6). Die Tumore der mit ATc behandelten Mäuse zeigten bereits einen Tag nach Beginn der Behandlung einen deutlichen Tumorrückgang (Abbildung 4.7 B). Innerhalb von 9 Tagen nahm das Tumolvolumen von  $0,99 \pm 0,15$  cm<sup>3</sup> auf  $0,02 \pm 0,02$  cm<sup>3</sup> ab. Dies entspricht einer Abnahme um 98 % des Ausgangsvolumens bei Behandlungsbeginn. In der Langzeitstudie kam es bei 2 von 4 Mäusen zu einer vollständigen Tumorremission. In den Kurzzeitstudien konnte keine vollständige Remission beobachtet werden, die Tumore wurden jedoch nach spätestens 7 Tagen ATc Behandlung isoliert, da sie für weitere Untersuchungen dienten. Die Tumorremission hielt im Mittel über etwa 10 Tage (= Tag 19) an. Ab Tag 20 konnte ein erneutes Tumorwachstum verzeichnet werden. Der Tumorverlauf wurde über weitere 23 Tage aufgezeichnet. Dabei wurde auch die ATc Behandlung weiter durchgeführt. An Tag 43 betrug das Tumolvolumen  $2,63 \pm 2,44$  cm<sup>3</sup>. Es kam in allen Mäusen zu einem Rezidivwachstum, unabhängig davon, ob zuvor eine vollständige Remission beobachtet werden konnte. Das Rezidivwachstum setzte jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei den einzelnen Mäusen ein, wodurch es zu den großen Fehlerbalken in Abbildung 4.7 B kam. Die

Messdaten der Wachstumskurven des ersten Klons der BXB-Raf1 Tumore stammen zum Teil von Banić (2003) (siehe Kapitel 3.3.2).

#### 4.3.2.2 NIH3T3 BXB-Raf1 2. Klon

Im Gegensatz zu den Tumoren aus dem 1. Klon zeigten die Tumore des 2. Klons keine Stagnation des Wachstums. Die ersten Tumore waren auch hier nach 4 Tagen erkennbar. Etwa 11-14 Tage nach Applikation der Zellen erreichten die Tumore die Therapiegröße. Der Tumorrückgang nach ATc Behandlung entsprach dem der Tumore des 1. Klons (Abbildung 4.7 C). Auch hier setzte die Remission bereits einen Tag nach Beginn der ATc Behandlung ein. Innerhalb von 9 Tagen nahm das Tumolvolumen von  $1,11 \pm 0,16 \text{ cm}^3$  auf  $0,03 \pm 0,02 \text{ cm}^3$  ab. Dies entspricht einer Abnahme um 97 % vom Ausgangsvolumen bei Behandlungsbeginn. In der Langzeitstudie kam es bei 2 von 5 Mäusen zu einer vollständigen Tumorremission. In den Kurzzeitstudien konnte keine vollständige Remission beobachtet werden, die Tumore wurden jedoch nach spätestens 7 Tagen ATc Behandlung isoliert, da sie für weitere Untersuchungen dienten. Die Tumorremission hielt länger an als bei den Tumoren des 1. Klons. Drei der fünf Mäuse der Langzeitstudie zeigten nach etwa 20 Tagen (= Tag 30) ein erneutes Tumorwachstum. Bei einer weiteren Maus setzte das Tumorwachstum nach etwa 30 Tagen (= Tag 40) wieder ein. Die letzte Maus zeigte an Tag 55, dem Ende der Studie, ein beginnendes Tumorwachstum. Somit konnte gezeigt werden, dass es in allen Mäusen zu einem erneuten Tumorwachstum kam. In Abbildung 4.7 C ist der Tumorverlauf bis Tag 44 dargestellt. Dieser Tag entspricht dem Tag, an dem der erste Rezidivtumor wieder einen mittleren Tumordurchmesser von 2,0 cm erreicht hatte. Die Wahl von Tag 44 als Endpunkt der Kurve diente auch der Vereinheitlichung der Darstellung der 3 Wachstumskurven in Abbildung 4.7. An Tag 44 betrug das mittlere Tumolvolumen  $1,70 \pm 2,37 \text{ cm}^3$ . Die hohen Standardabweichungen beim Rezidivwachstum beruhen auf dem oben beschriebenen Unterschied der Tumorverläufe der 5 ATc-behandelten Mäuse der Langzeitstudie.

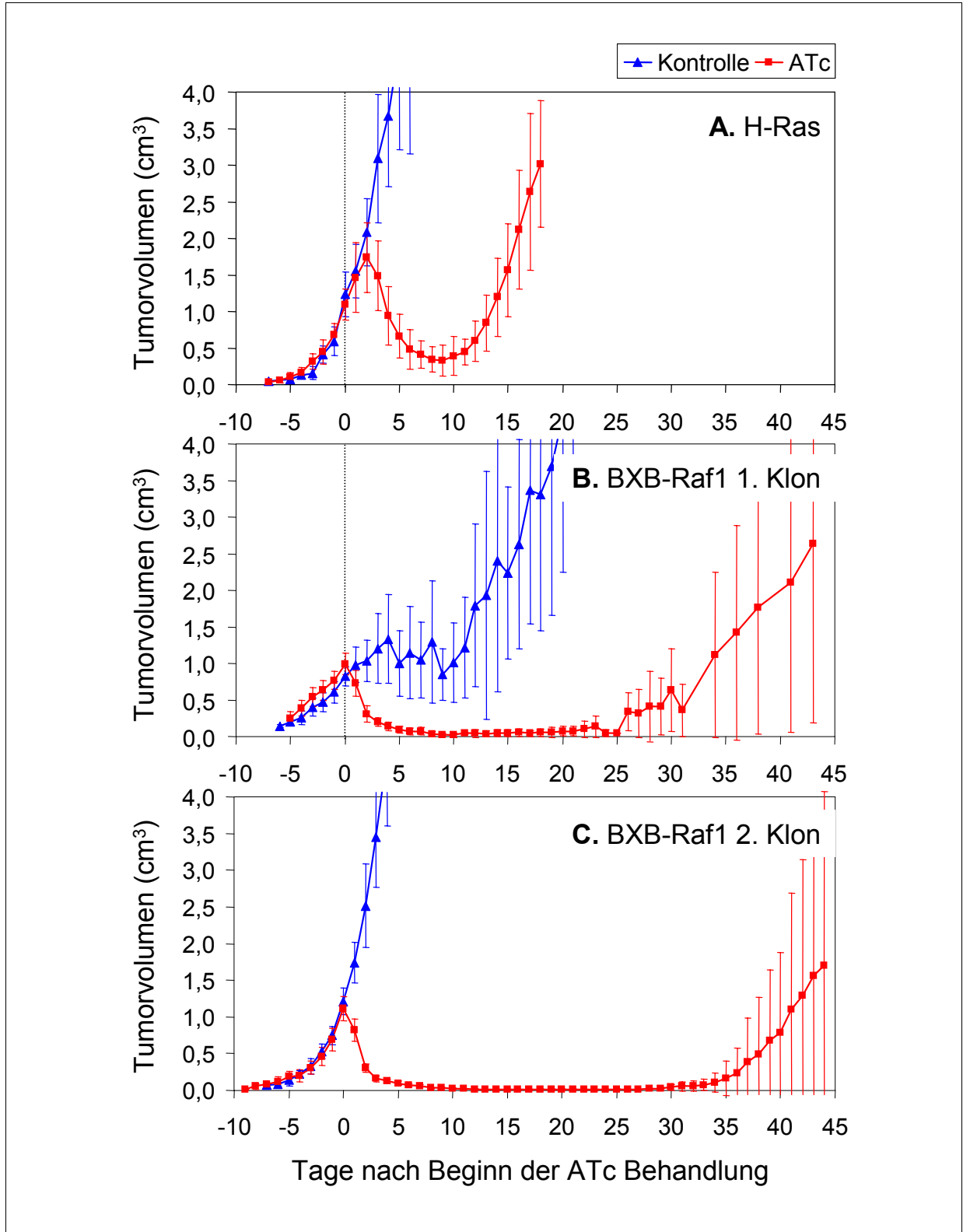


Abbildung 4.7: Tumorverlauf der aus den NIH3T3 H-Ras Zellen (A.) und den NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen (B. 1. Klon; C. 2. Klon) resultierenden Tumore ohne (blau) und mit (rot) ATc Behandlung. Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1 führte zu Tumorremission. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Mäusen aus 4 bzw. 3 unabhängigen Studien. Die einzelnen Kurven wurden auf die Therapiegröße (Mittlerer Tumordurchmesser =  $1,2 \pm 0,1$  cm) als Tag 0 normiert.



#### 4.4 H-Ras und BXB-Raf1 Expression in den Rezidivtumoren

Trotz andauernder ATc Behandlung der Mäuse kam es in allen Tumoren nach einiger Zeit zu einem Rezidivwachstum. Dieses Rezidivwachstum kann zwei Ursachen haben. Zum einen könnte es zu einem Verlust der Regulierbarkeit des transfizierten Onkogens im Laufe der Zeit kommen. Eine erneute, ATc unabhängige Expression des Onkogens könnte somit das Tumorwachstum verursachen. Zum anderen könnte es in den Tumorzellen zu einer oder mehreren Mutation kommen, die ein von H-Ras bzw. BXB-Raf1 unabhängiges Tumorwachstum auslösen könnten. Schiffer et al. (2003) zeigten, dass in den Rezidiven der HER-2 Tumore die HER-2 Expression weiterhin ausgeschaltet war. Es handelte sich hierbei also um ein HER-2 unabhängiges Tumorwachstum. Die Rezidive der H-Ras Tumore und der BXB-Raf1 Tumore wurden nun ebenfalls auf H-Ras bzw. BXB-Raf1 überprüft.

10,70 ± 1,00 Tage nach Beginn der ATc-Behandlung kam es in den H-Ras Tumoren zu einem erneuten Tumorwachstum. Die entstandenen Rezidivtumore wurden an Tag 17-18 mit einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 2,93 ± 1,00 cm<sup>3</sup> isoliert. In den Rezidiven der H-Ras Tumore konnte eine erneute H-Ras Expression im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Diese betrug 39,78 ± 14,35 % der Kontrolle.

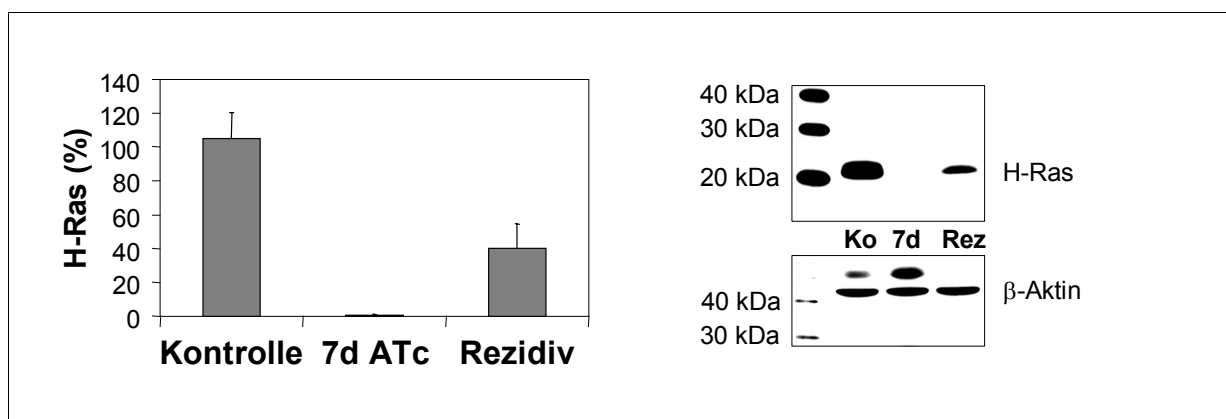


Abbildung 4.8: H-Ras Expression in den Rezidiven der H-Ras Tumore

Die Menge an H-Ras wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 10 Mäusen. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Die Entstehung der BXB-Raf1 Rezidivtumore war nicht ganz so einheitlich wie bei den H-Ras Tumoren. Das erste Rezidivwachstum trat bei dem 1. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen an Tag 19 nach Beginn der ATc-Behandlung auf. Der letzte Rezidivtumor entwickelte sich ab Tag 38. Bei dem 2. Klon zeigte sich das erste Rezidivwachstum an Tag 28. An Tag 38 zeigte der vorletzte Tumor ein erneutes Wachstum. Der letzte Tumor, der erst an Tag 53 ein erneutes Wachstum zeigte, wurde zur Bestimmung von BXB-Raf1 in den Rezidiven nicht mehr herangezogen, da kaum Tumormasse vorhanden war. Auf Grund des unterschiedlichen Rezidivwachstums wurden die Rezidive auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert und

auch zum Teil mit unterschiedlichen Tumorgößen. Die Untersuchungen zeigten aber, dass dies keinen Einfluss auf die BXB-Raf1 Expression in den Rezidiven hatte.

Die beiden Klone der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten ein gegensätzliches Bild bezüglich der BXB-Raf1 Expression in den Rezidivtumoren (Abbildung 4.9). Die Rezidive des 1. Klons zeigten praktisch keine BXB-Raf1 Expression ( $1,06 \pm 1,65$  % der Kontrolle). In den Rezidiven des 2. Klons hingegen war die BXB-Raf1 Expression vergleichbar mit der der Kontrolle und betrug  $101,58 \pm 9,22$  %. Der Grund dafür, warum in dem einen Klon die Expression ausgeschaltet blieb und in dem anderen Klon die Expression trotz ATc Behandlung wieder mit der der Kontrollen vergleichbar war, wurde nicht näher untersucht. Bemerkenswert ist lediglich, dass sich die Rezidive mit BXB-Raf1 (2. Klon) erst später entwickelten als die Rezidive ohne BXB-Raf1 (1. Klon).

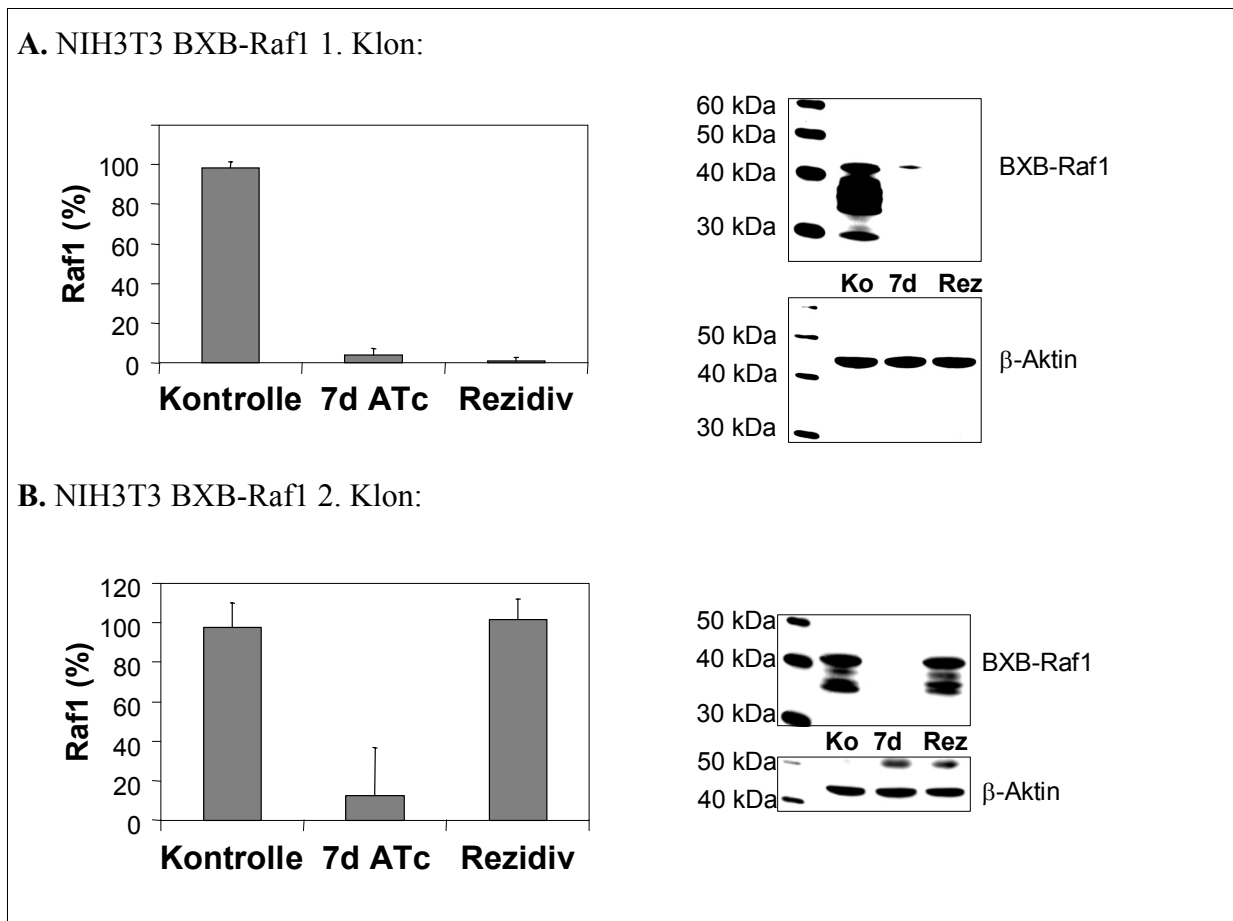


Abbildung 4.9: BXB-Raf1 Expression in den Rezidiven der BXB-Raf1 Tumore

**A.** Tumore des 1. Klons. **B.** Tumore des 2. Klons. Die Menge an BXB-Raf1 wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 5 Mäusen. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

## 4.5 Bestimmung der Proliferation

Wurde in den HER-2 Tumoren HER-2 durch Gabe von ATc ausgeschaltet, so zeigte sich eine rasche Tumorremission. Diese beruhte auf einem Proliferationsstopp und Apoptose (Schiffer et al., 2003). Auch die H-Ras und BXB-Raf1 Tumore zeigten eine Tumorremission nach Ausschalten von H-Ras bzw. BXB-Raf1. Im Folgenden wurde untersucht, ob es auch hierbei zu einem Rückgang der Proliferation kam.

### 4.5.1 Proliferation der Zellen *in vitro*

Die Proliferation wurde mittels immunhistochemischer Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 bestimmt. Ki-67 wird nur während der aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert und kann in der Ruhephase der Zelle nicht detektiert werden. Es ist im Zellkern lokalisiert, Ki-67 positive Zellen zeigen somit eine braune Färbung des Zellkerns. Negative Kerne wurden mit Hämatoxylin-Lösung blau gegengefärbt. *In vitro* wurde die Proliferation der NIH3T3 H-Ras Zellen und der beiden Klone der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen ohne ATc Inkubation und nach 1, 3 und 7 Tagen ATc Inkubation bestimmt.

In den NIH3T3 H-Ras Zellen kam es durch ATc Inkubation zu einer deutlichen Abnahme der Ki-67 positiven Zellen (Abbildung 4.10). In den Kontrollen betrug die Anzahl der Ki-67 positiven Zellkerne  $78,26 \pm 8,08$  %. Nach einem Tag ATc Inkubation nahm die Proliferation auf  $53,98 \pm 4,65$  % ab, nach 3 Tagen auf  $17,04 \pm 1,47$  % und nach 7 Tagen auf  $4,50 \pm 2,06$  %. Innerhalb von 7 Tagen kam es somit durch Ausschalten von H-Ras in den Zellen zu einer Abnahme der Proliferation um 94 %.

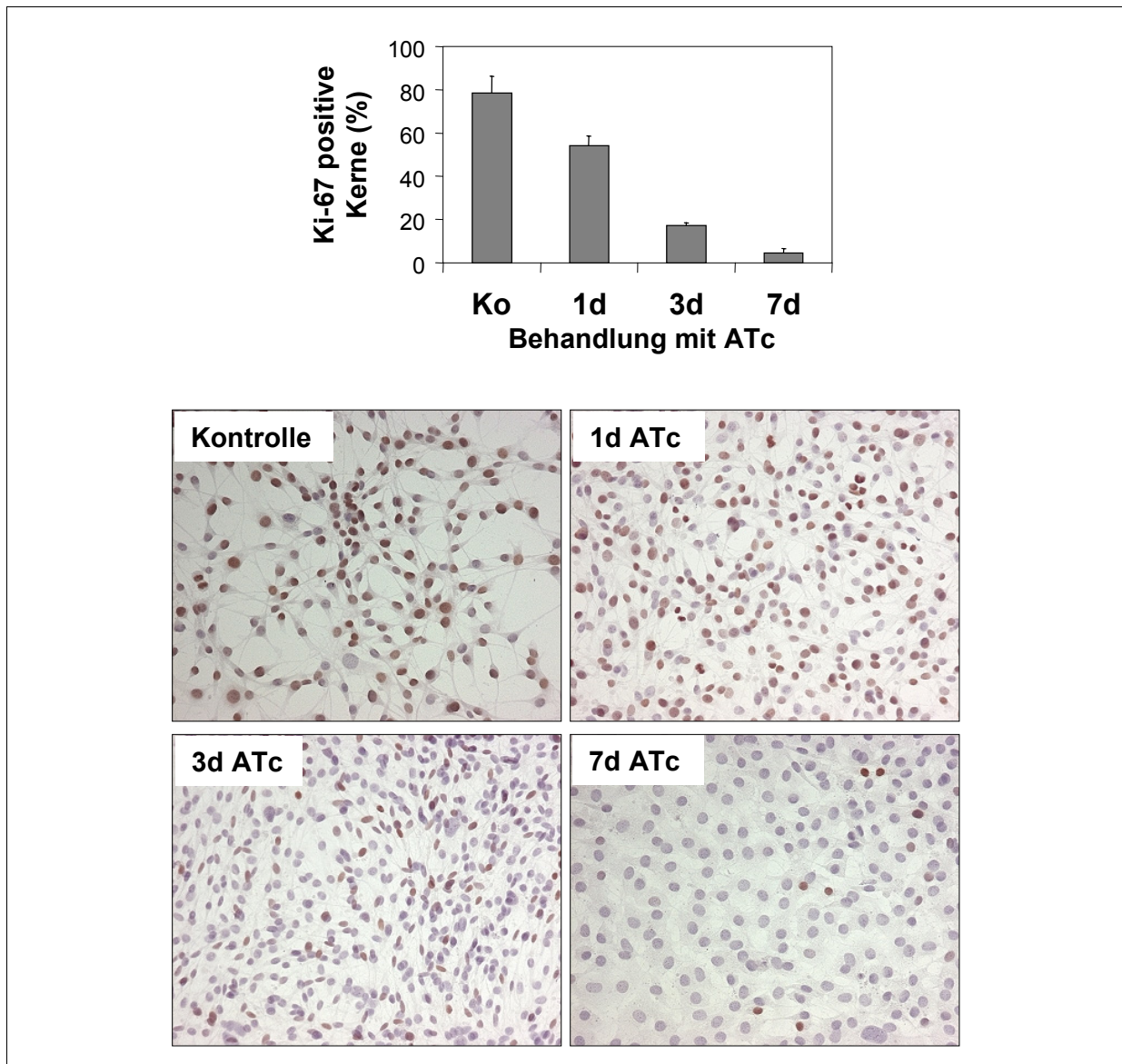


Abbildung 4.10: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den NIH3T3 H-Ras Zellen. Die Proliferation nahm in den Zellen mit Dauer der ATc-Behandlung ab. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne und die negativen blauen Kerne gezählt und zueinander in Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Bildern pro Zeitpunkt dargestellt. Pro Zeitpunkt ist eine beispielhafte Aufnahme abgebildet.

Die ATc Inkubation führte in den Zellen des 1. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 zu keiner erkennbaren Abnahme der Proliferation (Abbildung 4.11). Die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne betrug in den Kontrollen  $68,56 \pm 7,15$  %, nach einem Tag ATc Inkubation  $60,63 \pm 7,31$  %, nach 3 Tagen  $67,02 \pm 10,59$  % und nach 7 Tagen  $55,83 \pm 10,23$  %. Die unverändert hohe Proliferation zeigte sich auch schon optisch in der Zelldichte, wenn man die Kontrollen und die 7 Tage ATc Ansätze bei gleicher Anfangszellzahl über den gleichen Zeitraum wachsen lies.

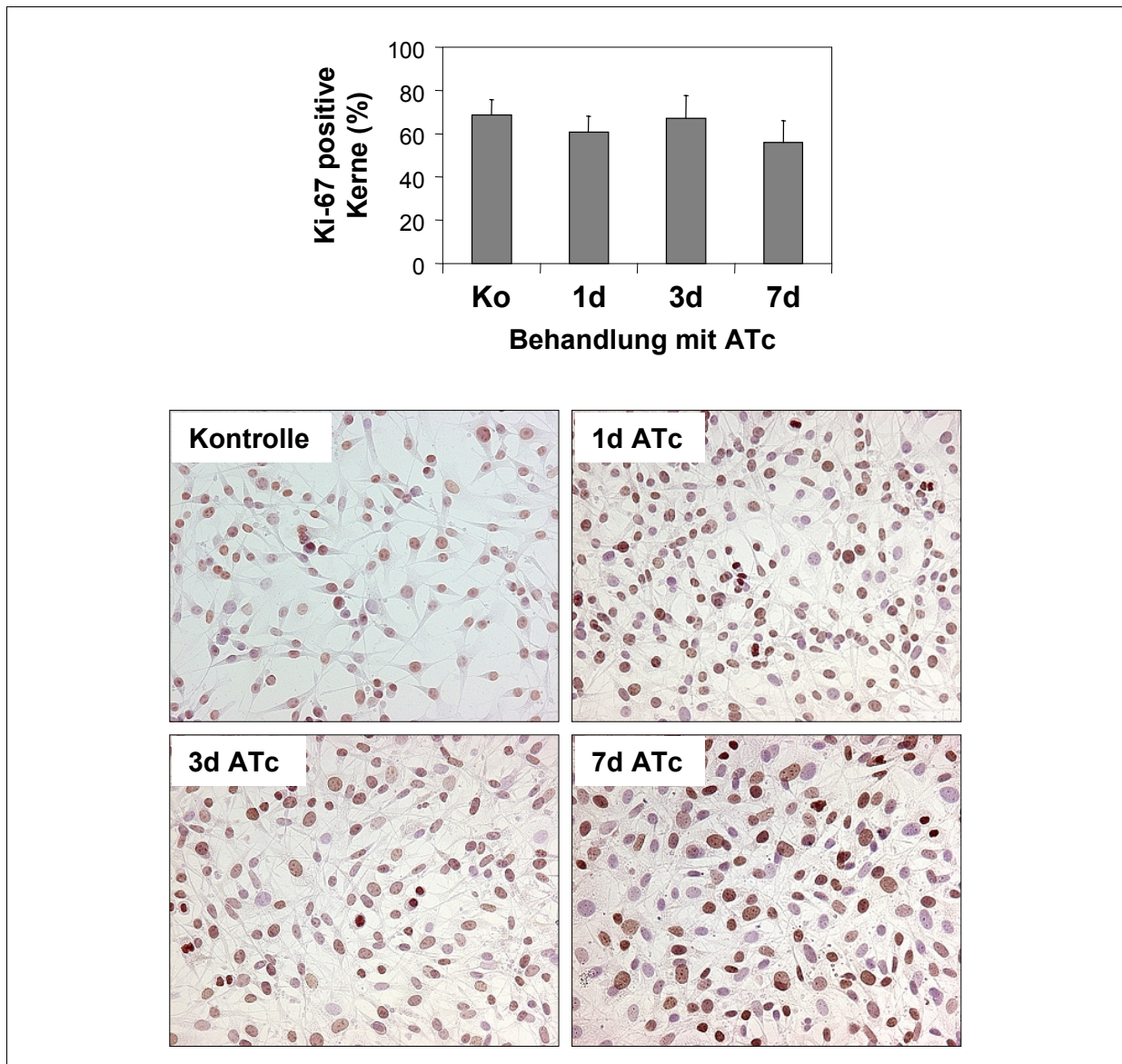


Abbildung 4.11: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in dem 1. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen

Die Proliferation der Zellen blieb durch eine ATc-Behandlung unverändert. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne und die negativen blauen Kerne gezählt und zueinander in Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Bildern pro Zeitpunkt dargestellt. Pro Zeitpunkt ist eine beispielhafte Aufnahme abgebildet.



In dem 2. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen kam es zu einer leichten Abnahme der Proliferation (Abbildung 4.12), diese war jedoch bei Weitem nicht so stark wie in den NIH3T3 H-Ras Zellen. Die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen betrug in den Kontrollen  $80,51 \pm 6,19 \%$ , nach einem Tag ATc Inkubation  $70,92 \pm 1,58 \%$ , nach 3 Tagen  $52,04 \pm 9,34 \%$  und nach 7 Tagen  $42,89 \pm 8,69 \%$ . Innerhalb von 7 Tagen kam es somit durch Ausschalten von BXB-Raf1 in den Zellen zu einer Abnahme der Proliferation um 47 %.

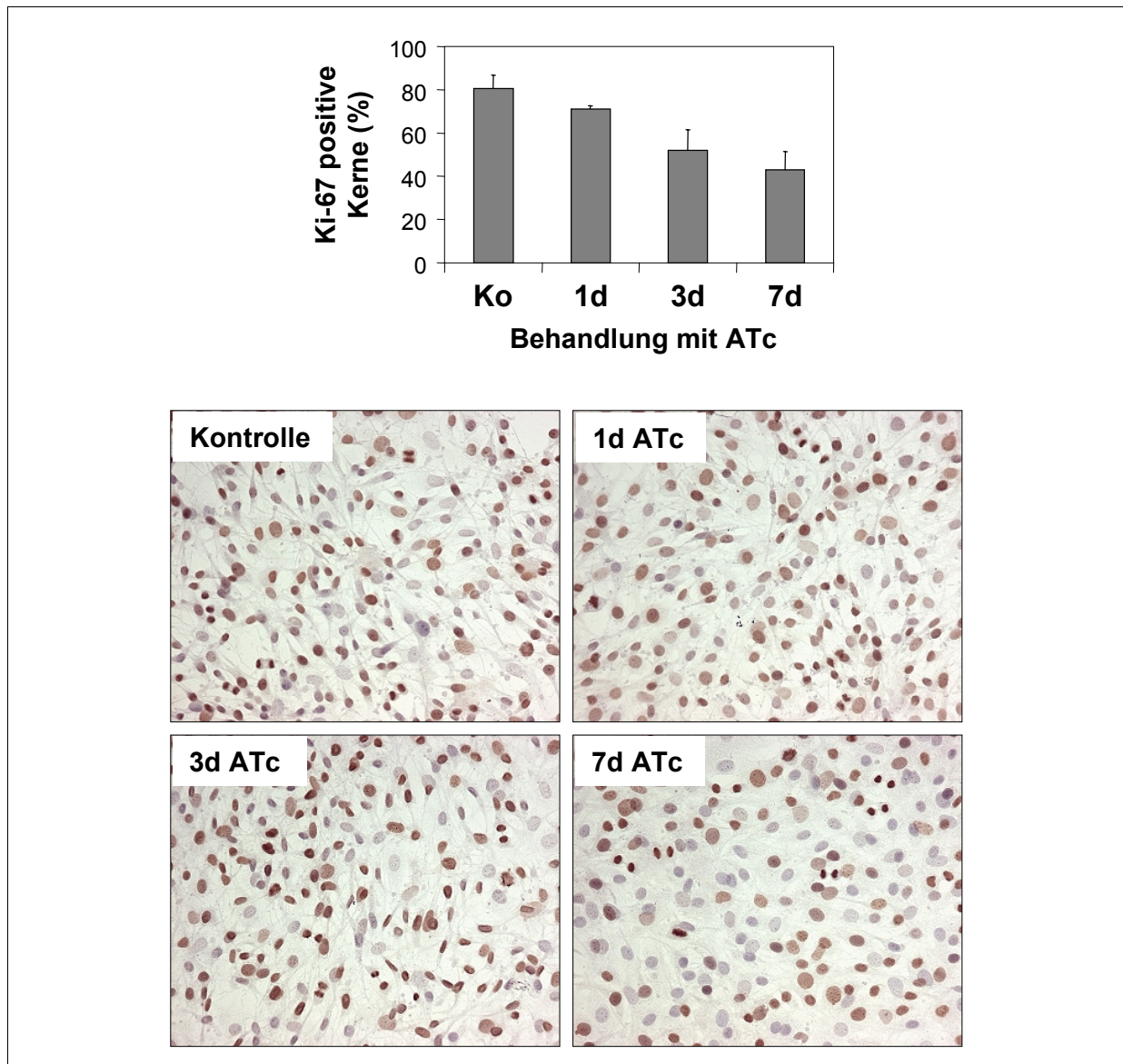


Abbildung 4.12: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in dem 2. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen

Die Proliferation nahm in den Zellen mit Dauer der ATc-Behandlung nur leicht ab. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne und die negativen blauen Kerne gezählt und zueinander in Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Bildern pro Zeitpunkt dargestellt. Pro Zeitpunkt ist eine beispielhafte Aufnahme abgebildet.

### 4.5.2 Proliferation der Tumore *in vivo*

Die Proliferation wurde auch in den Tumoren vor und nach Ausschalten von H-Ras bzw. BXB-Raf1 untersucht. Bei den BXB-Raf1 Tumoren wurden dabei die Tumore untersucht, die aus dem 2. Klon resultierten. Der 1. Klon wurde nicht untersucht, da die Kontrolltumore im Behandlungszeitraum eine Stagnation des Tumorstwachstums aufwiesen (Abbildung 4.7 B), und daher von einer geringeren oder sogar nicht vorhandenen Proliferation in den Kontrolltumoren auszugehen war. Da jedoch sowohl der Tumorrückgang als auch die Abnahme von BXB-Raf1 nach ATc-Behandlung in den Tumoren der beiden Klone vergleichbar war, wurde davon ausgegangen, dass eine alleinige Untersuchung des 2. Klons ein für beide Klone geltendes Ergebnis liefern würde. Die Proliferation in den ATc-behandelten Tumoren wurde stets mit der Proliferation des gleich alten Kontrolltumors verglichen.

In den H-Ras Tumoren kam es zu einer deutlichen Abnahme der Proliferation (Abbildung 4.13). Die Proliferation war jedoch niemals ganz unterdrückt. Nach einem und 3 Tagen ATc-Behandlung war die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne in den ATc-behandelten Tumoren nur unwesentlich geringer als in den Kontrolltumoren. Sie betrug für einen Tag in der Kontrolle  $32,15 \pm 9,26$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $25,70 \pm 10,91$  %. Nach 3 Tagen waren es in der Kontrolle  $36,28 \pm 11,82$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $25,01 \pm 11,13$  %. Nach 7 und 10 Tagen ATc-Behandlung kam es zu einer leichten Abnahme der Proliferation in den Kontrolltumoren. Außerdem zeigte sich eine deutliche Abnahme der Proliferation in den ATc-behandelten Tumoren. Die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne betrug nach 7 Tagen in der Kontrolle  $20,33 \pm 3,94$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $7,40 \pm 5,34$  %. Nach 10 Tagen betrug sie in der Kontrolle  $22,28 \pm 10,39$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $2,35 \pm 3,03$  %. Von Tag 1 bis Tag 3 zeigte sich also keine Änderung der Proliferation in den ATc-behandelten Tumoren. Dies spiegelte sich auch in dem unveränderten Wachstum dieser Tumore wieder (Abbildung 4.7). Von Tag 3 bis Tag 10 nahm dann die Proliferation in den ATc-behandelten Tumoren um 91 % ab. Insgesamt war die Proliferation in den Kontrolltumoren niedrig, verglichen mit der Proliferation der Zellen *in vitro*.

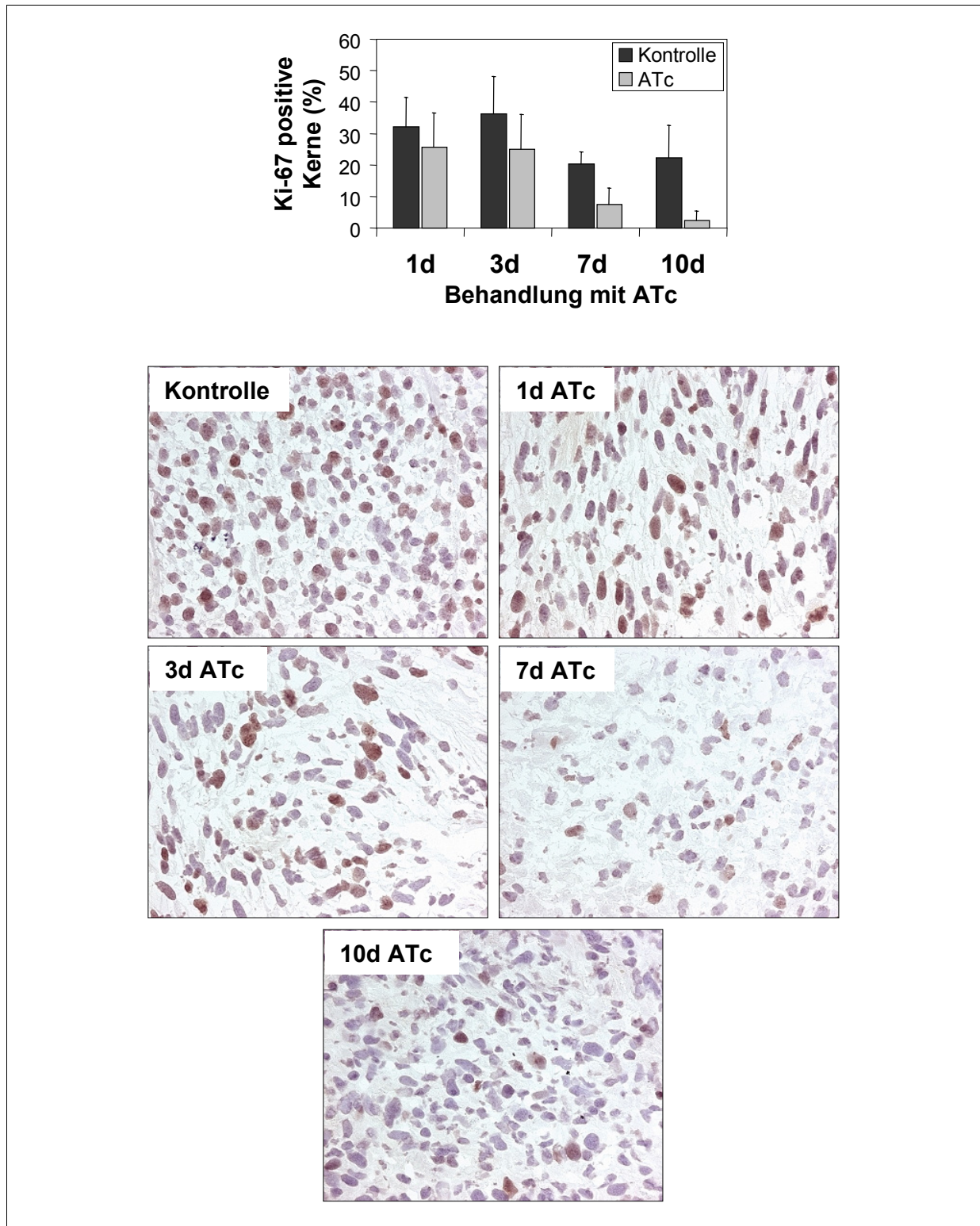


Abbildung 4.13: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den H-Ras Tumoren  
 Die Proliferation nahm in den Tumoren mit Dauer der ATc-Behandlung ab. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne und die negativen blauen Kerne gezählt und zueinander in Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Mäusen pro Zeitpunkt dargestellt. Pro Zeitpunkt ist eine beispielhafte Aufnahme abgebildet.



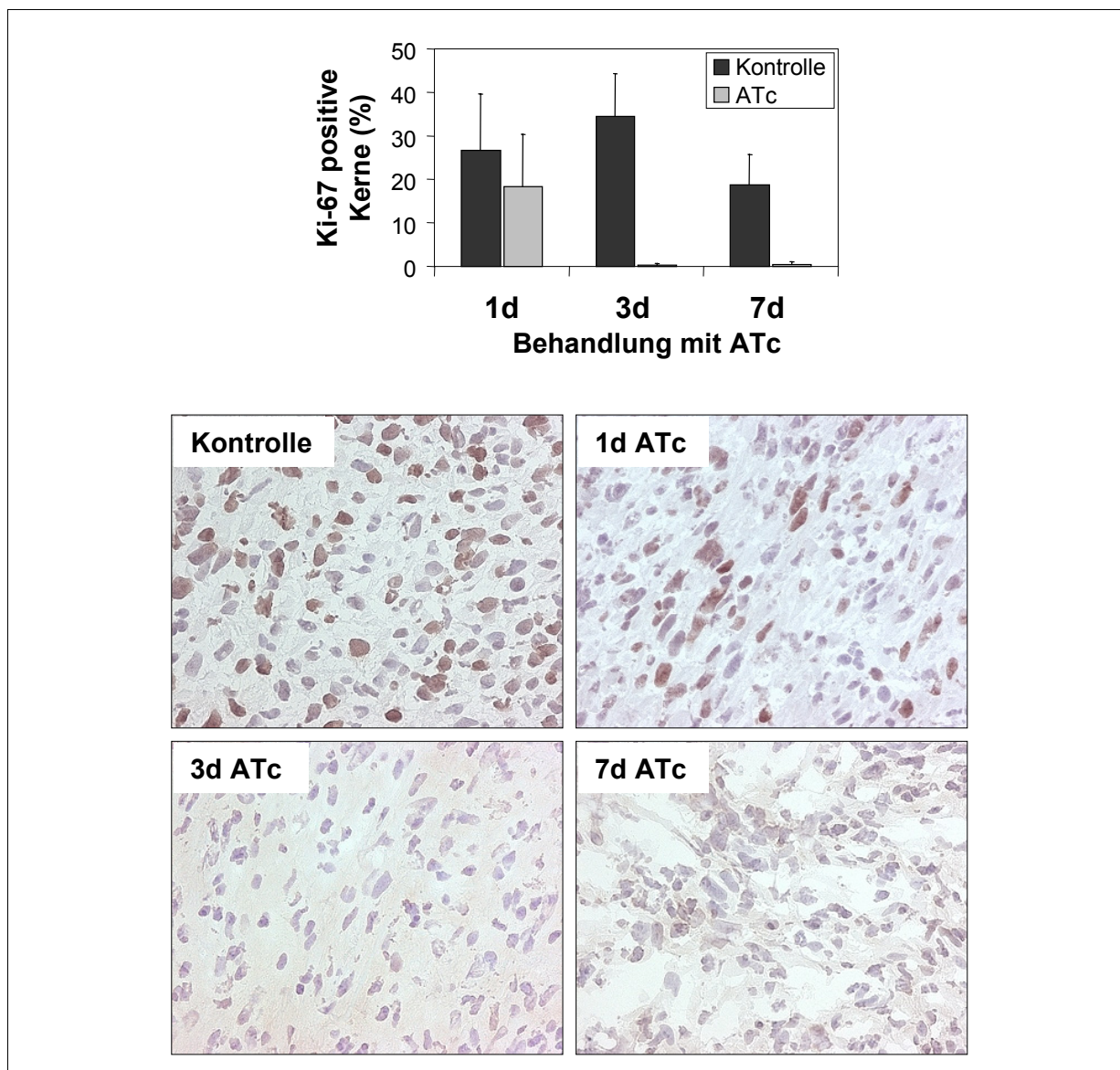


Abbildung 4.14: Immunhistochemische Färbung der Ki-67 positiven Kerne in den BXB-Raf1 Tumoren. Die Proliferation nahm in den Tumoren mit Dauer der ATc-Behandlung ab. Pro Bild wurden die positiven braunen Kerne und die negativen blauen Kerne gezählt und zueinander in Verhältnis gesetzt. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Mäusen pro Zeitpunkt dargestellt. Pro Zeitpunkt ist eine beispielhafte Aufnahme abgebildet.

Auch die Tumore aus dem 2. Klon der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten nach ATc-Behandlung einen sehr deutlichen Rückgang der Proliferation (Abbildung 4.14). Nach einem Tag zeigte sich noch keine große Abnahme der Ki-67 positiven Kerne. In der Kontrolle waren es  $26,65 \pm 12,91$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $18,37 \pm 11,95$  %. Nach 3 Tagen war die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne jedoch bei annähernd 0 % in den ATc-behandelten Tumoren. Die Proliferation in den Kontrolltumoren blieb dabei vergleichbar. Nach 3 Tagen betrug die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne in der Kontrolle  $34,42 \pm 9,95$  % und in den ATc-behandelten Tumoren  $0,22 \pm 0,48$  %. Nach 7 Tagen waren es  $18,79 \pm 6,88$  % in der Kontrolle und  $0,34 \pm 0,75$  % in den ATc-behandelten Tumoren. Von Tag 1 bis Tag 3 nahm damit die

Proliferation um 99 % ab. Auch in den BXB-Raf1 Kontrolltumoren zeigte sich eine deutlich niedrigere Proliferation als in den Zellen *in vitro*.

In beiden Tumorarten konnte mit zunehmender Dauer der ATc-Behandlung ein zunehmender Zerfall des Tumorgewebes beobachtet werden. Dieser trat optisch durch zerstörte Zellkerne und eine diffuse Zellmasse ohne Zellkerne zum Vorschein.

## 4.6 Untersuchung auf Apoptose *in vivo*

Der in Kapitel 4.5.2 beschriebene Rückgang der Proliferation kann alleine nicht die beobachtete starke Tumorremission erklären. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es bei den H-Ras Tumoren und den BXB-Raf1 Tumoren ebenfalls zu Apoptose kommt.

Die Apoptose wurde an Hand der Caspase-3 im Western Blot bestimmt. Caspase-3 wird durch Spaltung aktiviert. Die aktiven Spaltprodukte führen letztendlich zu Apoptose in der Zelle. Ein Vorliegen der Spaltprodukte zeigt also an, dass eine Zelle in Apoptose geht. Zur Bestimmung wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl die inaktive, ungespaltene Form der Caspase-3 bei 35 kDa erkennt, als auch zwei aktive Spaltprodukte bei 17 und 19 kDa. Die Menge an inaktiver und aktiver Caspase-3 in den ATc-behandelten Tumoren wurde jeweils mit der Kontrolle gleichen Alters verglichen. Folglich stellen die Kontrolltumore 100 % dar, und die für die ATc-behandelten Tumore ermittelten Prozentzahlen beziehen sich auf diese 100 % der Kontrollen. Da es aber auch innerhalb der Kontrollen zu Schwankungen kam, wurden die Kontrollen selbst immer auf die 1-Tage-Kontrolle als 100 % genormt. Deshalb zeigen die 3, 7 und 10 Tage Kontrolltumore einen von 100 % abweichenden Wert in den Diagrammen in Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16.

Abbildung 4.15 zeigt die Menge an ungespaltener, inaktiver sowie gespaltener, aktiver Caspase-3 in den H-Ras Tumoren ohne und mit ATc-Behandlung. Die Kontrolltumore zeigten mit zunehmendem Alter keine wesentliche Änderung in der Menge der ungespaltenen Form. Die 1-Tage Kontrollen besaßen  $100,00 \pm 0,00$  %, die 3-Tage Kontrollen  $115,74 \pm 15,74$  %, die 7-Tage Kontrollen  $104,86 \pm 16,24$  % und die 10-Tage Kontrollen  $116,32 \pm 7,83$  %. In den 10-Tage Kontrolltumoren konnte eine leicht erhöhte Spontanapoptose im Vergleich zu den anderen Kontrolltumoren festgestellt werden. Die Menge der gespaltene Caspase-3 betrug in den 1- und 3-Tage Kontrollen  $100,00 \pm 0,00$  %, in den 7-Tage Kontrollen  $93,25 \pm 19,79$  % und in den 10-Tage Kontrollen  $119,13 \pm 18,15$ .

Die ATc-behandelten Tumore zeigten nach 3, 7 und 10 Tagen eine leichte Abnahme der ungespaltenen Form im Vergleich zur Kontrolle. Die Menge an ungespaltener Caspase-3 betrug nach 1 Tag ATc-Behandlung  $113,13 \pm 13,40$  %, nach 3 Tagen  $81,74 \pm 8,15$  %, nach 7 Tagen  $84,08 \pm 10,27$  % und nach 10 Tagen  $90,39 \pm 17,74$  %. Die Menge an gespaltener

Caspase-3 in den ATc-behandelten Tumoren war stets niedriger als in den Kontrolltumoren. Sie nahm von Tag 1 auf Tag 3 leicht zu und nach 7 und 10 Tagen deutlich ab. Sie betrug nach 1 Tag  $65,11 \pm 34,99$  %, nach 3 Tagen  $77,95 \pm 25,98$  %, nach 7 Tagen  $31,34 \pm 29,04$  und nach 7 Tagen  $17,08 \pm 15,81$  %.

In den H-Ras Tumoren konnte somit nach Ausschalten von H-Ras keine Zunahme der aktiven Form der Caspase-3 im Vergleich zur Kontrolle bestimmt werden. Vielmehr zeigten die ATc-behandelten Tumore ein schwächeres Signal der aktiven Form als die Kontrolltumore. Im Laufe der ATc-Behandlung nahm die Menge an aktiver Caspase-3 stark ab, während es in den Kontrolltumoren sogar zu einer leichten Zunahme kam.

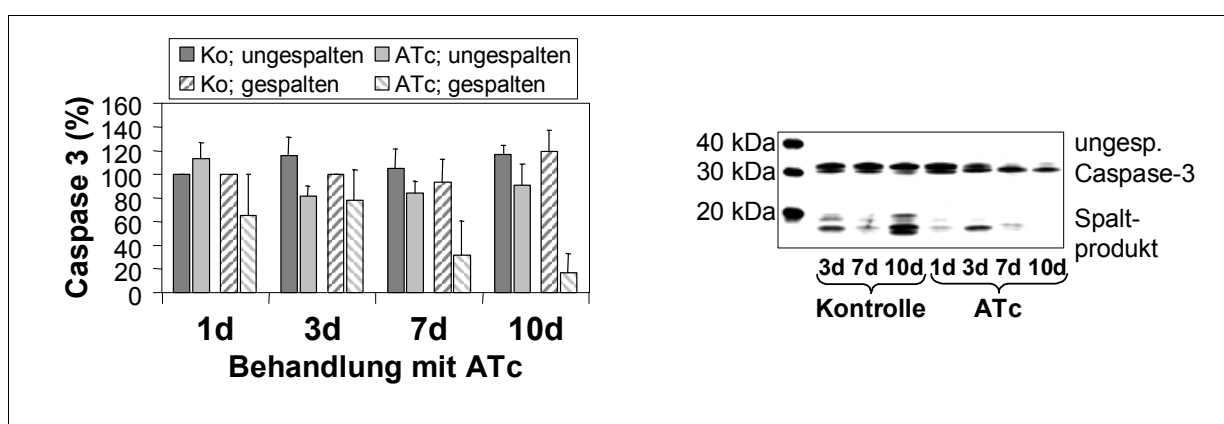


Abbildung 4.15: Bestimmung der Caspase-3 in den H-Ras Tumoren

Es wurde die Menge an ungespaltenen Caspase-3 (volle Balken) in den Kontrolltumoren (Ko; ungespalten) und in den ATc-behandelten Tumoren (ATc; ungespalten) sowie die Menge an gespaltenen Caspase-3 (gestreifte Balken) in den Kontrolltumoren (Ko; gespalten) und in den ATc-behandelten Tumoren (ATc; gespalten) im Western Blot untersucht und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Die Bestimmung der Caspase-3 in den BXB-Raf1 Tumoren ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Zur Bestimmung wurden die Tumore des 1. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen herangezogen. In den Kontrolltumoren kam es zu einer Zunahme der ungespaltenen als auch der gespaltenen Form der Caspase-3. Die Werte für die ungespaltenen Form waren für die 1-Tage Kontrollen  $100,00 \pm 0,00$  %, für die 3-Tage Kontrollen  $106,03 \pm 3,38$  und für die 7-Tage Kontrollen  $135,52 \pm 0,51$  %. Die Werte für die gespaltenen Form betragen für die 1-Tage Kontrolle  $100,00 \pm 0,00$  %, für die 3-Tage Kontrollen  $115,51 \pm 11,63$  und für die 7-Tage Kontrollen  $108,46 \pm 3,91$  %.

Nach einem Tag ATc-Behandlung kam es zu keiner wesentlichen Änderung der Menge der ungespaltenen Caspase-3. Nach 3 und 7 Tagen nahm wie bei den H-Ras Tumoren die ungespaltenen Form leicht ab. Die Werte betragen nach 1 Tag  $99,30 \pm 7,39$  %, nach 3 Tagen  $75,63 \pm 6,98$  % und nach 7 Tagen  $82,69 \pm 11,13$  %. Das Signal für die gespaltenen Form war nach einem Tag ATc-Behandlung nur wenig schwächer als das der Kontrolle. Nach 3 und 7

Tagen zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme. Die Werte für die gespaltene Caspase-3 betragen nach 1 Tag  $85,10 \pm 18,90$  %, nach 3 Tagen  $15,94 \pm 22,78$  % und nach 7 Tagen  $22,26 \pm 33,97$  %.

Auch nach Ausschalten von BXB-Raf1 kam es also in den Tumoren nicht zu einer Zunahme der aktiven Form der Caspase-3. Vielmehr zeigte sich ein vergleichbares Bild zwischen Tag 1 und Tag 7 in den BXB-Raf1 Tumoren und Tag 3 und Tag 10 in den H-Ras Tumoren, d.h. eine deutliche Abnahme der aktiven Form um ca. 20 - 25 %. In den Kontrollen der BXB-Raf1 Tumore kam es zu einer leichten Zunahme der aktiven Caspase-3 mit zunehmendem Alter der Tumore.

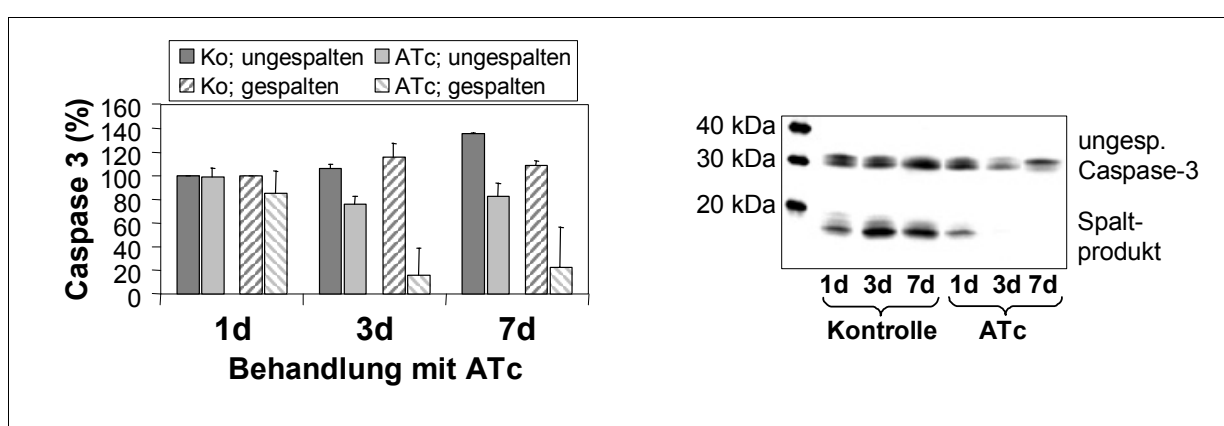


Abbildung 4.16: Bestimmung der Caspase-3 in den BXB-Raf1 Tumoren

Es wurde die Menge an ungespaltenen Caspase-3 (volle Balken) in den Kontrolltumoren (Ko; ungespalten) und in den ATc-behandelten Tumoren (ATc; ungespalten) sowie die Menge an gespaltenen Caspase-3 (gestreifte Balken) in den Kontrolltumoren (Ko; gespalten) und in den ATc-behandelten Tumoren (ATc; gespalten) im Western Blot untersucht und densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 4 Mäusen für die 1 und 3 Tage und 6 Mäuse für die 7 Tage. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

## 4.7 Einfluss der Herunterregulation von H-Ras bzw. BXB-Raf1 auf ERK und Akt

Zwei durch HER-2 vermittelte Signalwege sind der Ras-MAP Kinase Signalweg und die Aktivierung von Akt über die PI-3 Kinase. Um genauer herauszufinden, was in den Tumoren nach Ausschalten von HER-2 passiert, wurde der Aktivierungsgrad von Akt und ERK als Schaltpunkte der beiden Signalwege untersucht (Heimerdinger et al., 2004). Es zeigte sich, dass es nach Ausschalten von HER-2 innerhalb von einem Tag auch zu einer Herunterregulation der phosphorylierten Form von ERK1/2 (p-ERK) kam. Nach 3 Tagen kam es zudem zu einer Herunterregulation der phosphorylierten Form von Akt (p-Akt) sowie zu einer Abnahme des Akt-Gesamtproteins. Eine weitere Untersuchung der H-Ras und BXB-Raf1 Tumore auf den p-ERK und p-Akt Status vor und nach ATc-Behandlung sollte nun weitere Hinweise darüber geben, über welchen Weg die Tumorremission hauptsächlich

vermittelt wird. H-Ras und Raf1 sind beide Teile des Ras-MAP Kinase Signalweges und üben somit einen Einfluss auf ERK aus. Im Gegensatz zu H-Ras sollte jedoch Raf1 keinen Einfluss auf Akt besitzen.

#### 4.7.1 Einfluss auf p-ERK

Ausschalten von H-Ras in den H-Ras Tumoren führte nach einem Tag zu keiner wesentlichen Veränderung im Phosphorylierungsstatus von ERK (Abbildung 4.17). Nach 3 und 7 Tagen ATc-Behandlung kam es jedoch zu einem deutlichen Rückgang von p-ERK. Nach 10 Tagen zeigte sich wieder eine leichte Zunahme. Die Werte betragen nach einem Tag  $87,20 \pm 26,38$  %, nach 3 Tagen  $30,82 \pm 24,49$  %, nach 7 Tagen  $17,81 \pm 18,03$  % und nach 10 Tagen  $42,92 \pm 23,83$  %. Die Menge an ERK2 blieb unverändert.

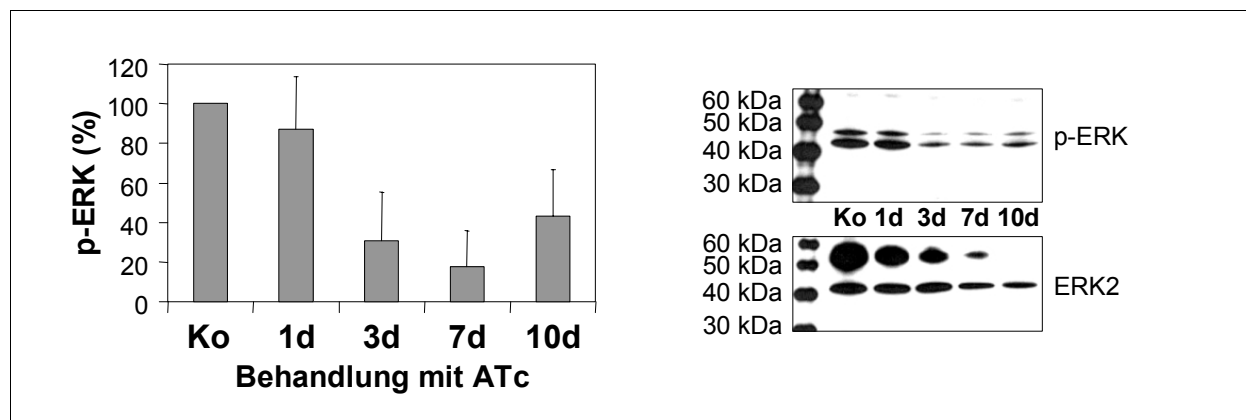


Abbildung 4.17: Herrunterregulation von p-ERK nach Ausschalten von H-Ras *in vivo*

Die Menge an p-ERK wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Ausschalten von BXB-Raf1 in den Tumoren des 1. Klons führte bereits einen Tag nach Beginn der ATc-Behandlung zu einer starken Abnahme von p-ERK (Abbildung 4.18 A). Nach einem Tag betrug die Menge an p-ERK nur noch  $26,43 \pm 15,58$  %, nach 3 Tagen  $13,18 \pm 7,26$  und nach 10 Tagen  $22,65 \pm 7,71$  %. Die Menge an ERK2 blieb unverändert.

Ausschalten von BXB-Raf1 in den Tumoren des 2. Klons zeigte ein ähnliches Bild (Abbildung 4.18 B), wobei die Herunterregulation von p-ERK nicht ganz so stark ausgeprägt war wie bei den Tumoren des 1. Klons. Nach einem Tag betrug hier die Menge an p-ERK  $34,62 \pm 26,02$  %, nach 3 Tagen  $24,24 \pm 29,39$  % und nach 7 Tagen  $32,69 \pm 17,72$  %. Die Menge an ERK2 blieb unverändert.

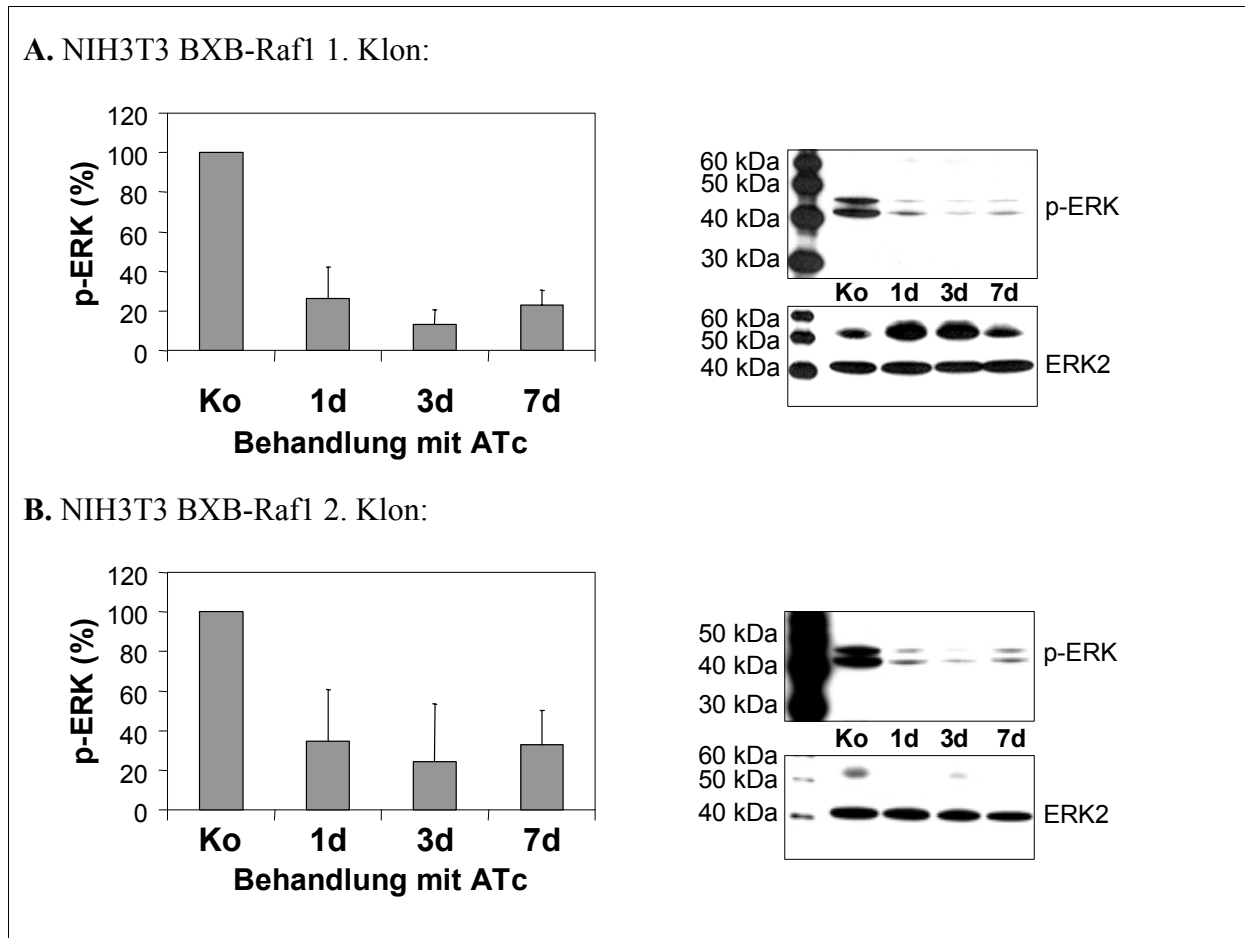


Abbildung 4.18: Herunterregulation von p-ERK nach Ausschalten von BXB-Raf1 *in vivo*

**A.** p-ERK in den Tumoren des 1. Klons. **B.** p-ERK in den Tumoren des 2. Klons. Die Menge an p-ERK wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm **A** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 4 Mäusen pro Zeitpunkt. Das Diagramm **B** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

#### 4.7.2 Einfluss auf p-Akt

H-Ras kann direkt die Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) aktivieren und darüber einen Einfluss auf Akt ausüben (Macaluso et al., 2002). Trotzdem konnte nach Ausschalten von H-Ras keine wesentliche Veränderung im Phosphorylierungsstatus von Akt beobachtet werden (Abbildung 4.19). Die Menge an p-Akt nahm zwar nach einem Tag geringfügig ab, sie blieb jedoch auch nach 10 Tagen noch auf diesem relativ hohen Niveau. Auffällig war das leicht erhöhte p-Akt Signal an Tag 3. Die Werte betragen nach einem Tag  $79,45 \pm 31,28$  %, nach 3 Tagen  $110,84 \pm 18,76$  %, nach 10 Tagen  $67,89 \pm 15,90$  % und nach 10 Tagen  $78,83 \pm 34,38$  %.

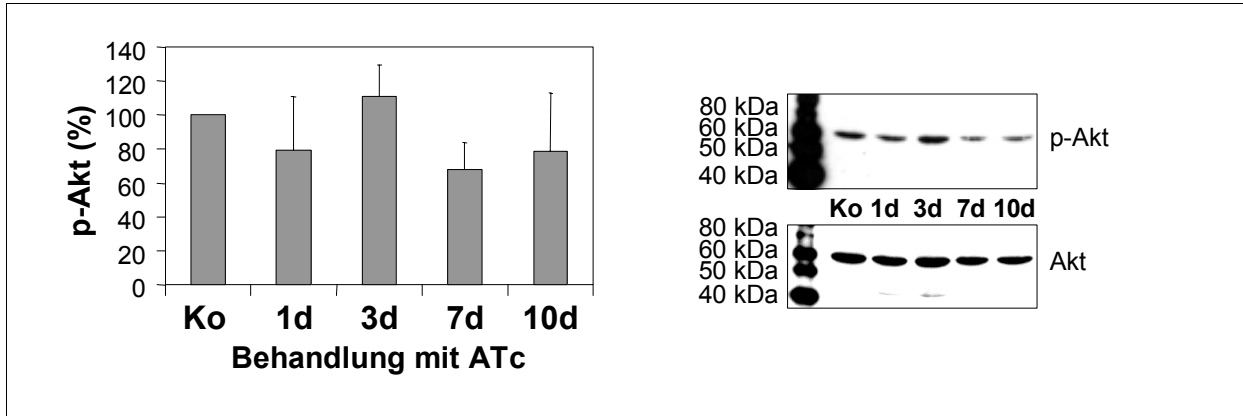


Abbildung 4.19: Einfluss des Ausschaltens von H-Ras *in vivo* auf p-Akt

Die Menge an p-Akt wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

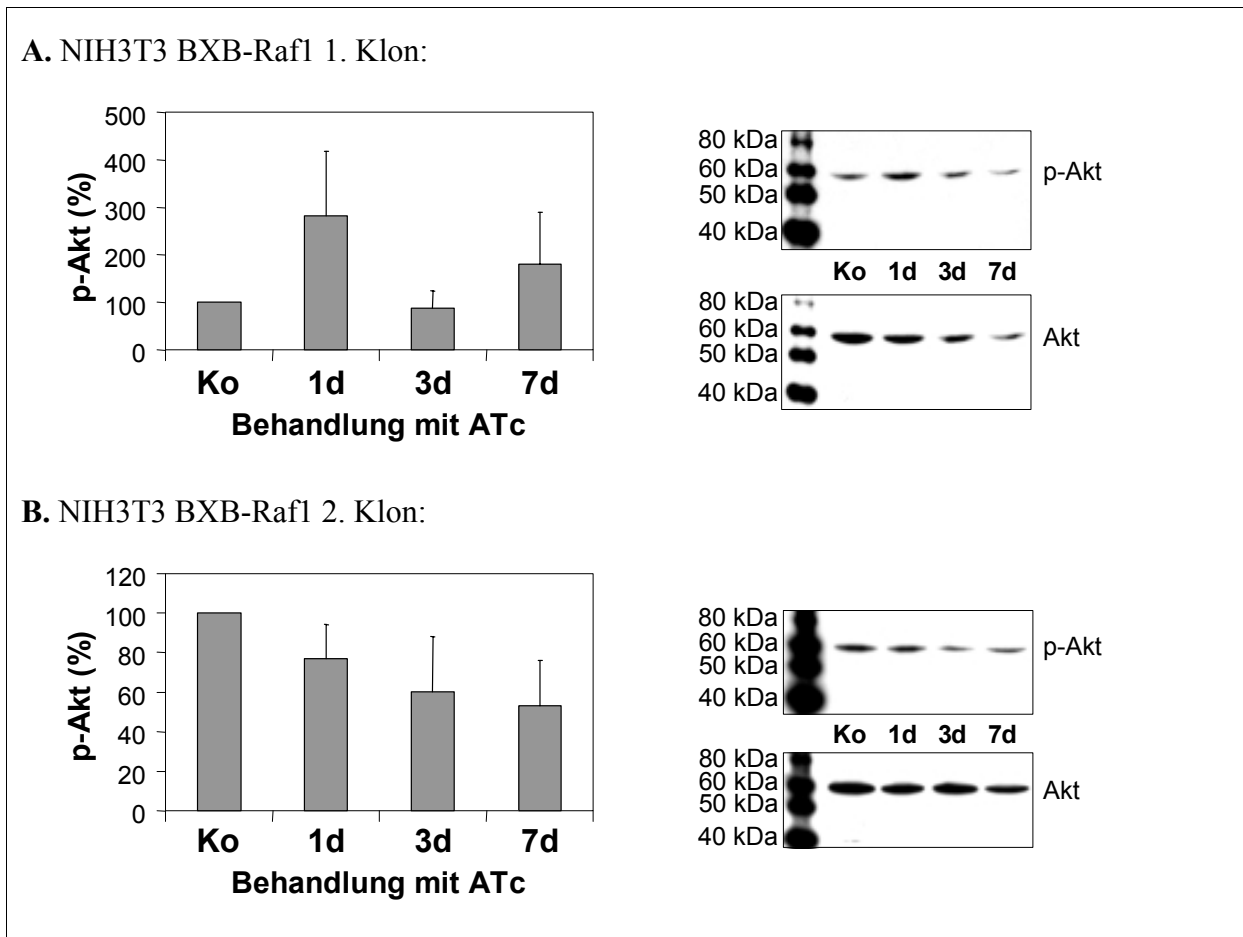


Abbildung 4.20: Einfluss des Ausschaltens von BXB-Raf1 *in vivo* auf p-Akt

**A.** p-Akt in den Tumoren des 1. Klons. **B.** p-Akt in den Tumoren des 2. Klons. Die Menge an p-Akt wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm **A** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 4 Mäusen pro Zeitpunkt. Das Diagramm **B** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Ausschalten von BXB-Raf1 zeigte in den Tumoren der beiden Klone der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen ein unterschiedliches Ergebnis (Abbildung 4.20). In den Tumoren des 1. Klons kam es nach einem Tag ATc-Behandlung zu einer deutlichen Zunahme des p-Akt Signals (Abbildung 4.20 A). Anschließend zeigten sich recht große Schwankungen. Die Werte betragen nach einem Tag  $282,84 \pm 135,08 \%$ , nach 3 Tagen  $86,57 \pm 38,07 \%$  und nach 7 Tagen  $181,21 \pm 108,64 \%$ . Ausschalten von BXB-Raf1 führte in den Tumoren des 2. Klons zu einer leichten Herunterregulation von p-Akt (Abbildung 4.20 B). Nach einem Tag nahm das Signal für p-Akt auf  $77,02 \pm 17,15 \%$  ab, nach 3 Tagen auf  $60,12 \pm 28,03 \%$  und nach 7 Tagen auf  $53,21 \pm 22,64 \%$ .

Die Kontrolltumore des 1. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten allgemein ein relativ schwaches Signal für p-Akt (Abbildung 4.21). Ein direkter Vergleich der H-Ras Kontrolltumore und der Kontrolltumore der beiden BXB-Raf1 Klone zeigte, dass die Kontrolltumore des 1. Klons nur ein p-Akt Signal von  $54,12 \pm 8,46 \%$  im Vergleich zu den H-Ras Kontrollen aufwiesen. Die Kontrolltumore des 2. Klons zeigten ein p-Akt Signal von  $90,76 \pm 11,07 \%$  im Vergleich zu den H-Ras Kontrollen. Vergleicht man die beiden Klone direkt miteinander, so besitzen die Kontrollen des 1. Klons etwa 40 % weniger p-Akt als die Kontrollen des 2. Klons.

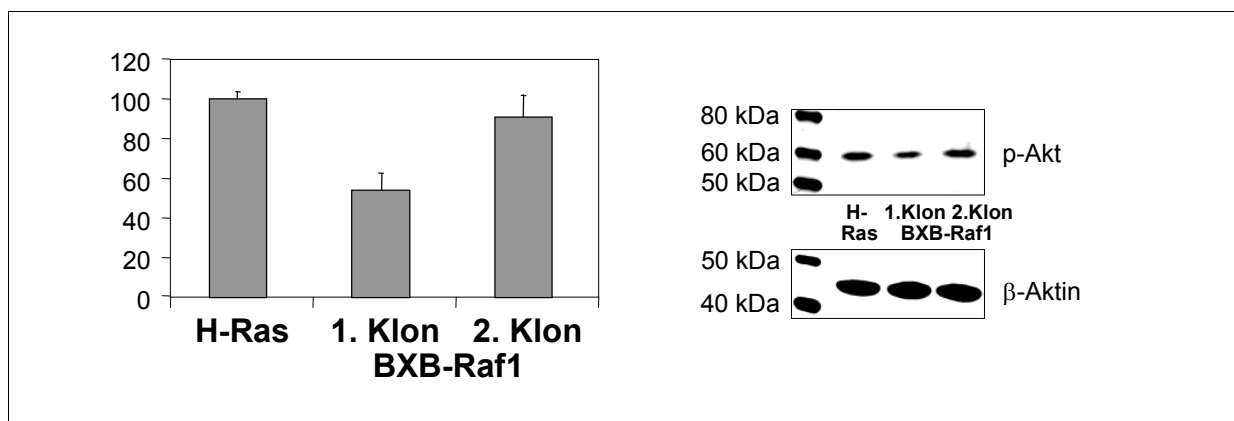


Abbildung 4.21: Vergleich der p-Akt Expression in den Kontrollen der H-Ras und BXB-Raf1 Tumoren  
Die Menge an p-Akt wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 3 Kontrolltumoren pro Tumorart. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der H-Ras Kontrolltumore.



### 4.7.3 Bestimmung des Akt Gesamtproteins

Da es in den HER-2 Tumoren zu einer Abnahme des Akt Gesamtproteins nach 3 Tagen ATc-Behandlung kam (Heimerdinger et al., 2004), wurde auch bei den H-Ras und BXB-Raf1 Tumoren eine nähere Untersuchung des Akt Gesamtproteins vorgenommen.

Ausschalten von H-Ras hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Menge an Akt Gesamtprotein (Abbildung 4.22). Die Werte schwankten um 100 % und betrugen nach einem Tag  $118,61 \pm 37,61$  %, nach 3 Tagen  $99,77 \pm 32,85$  %, nach 7 Tagen  $77,06 \pm 18,58$  % und nach 10 Tagen  $86,40 \pm 41,83$  %.

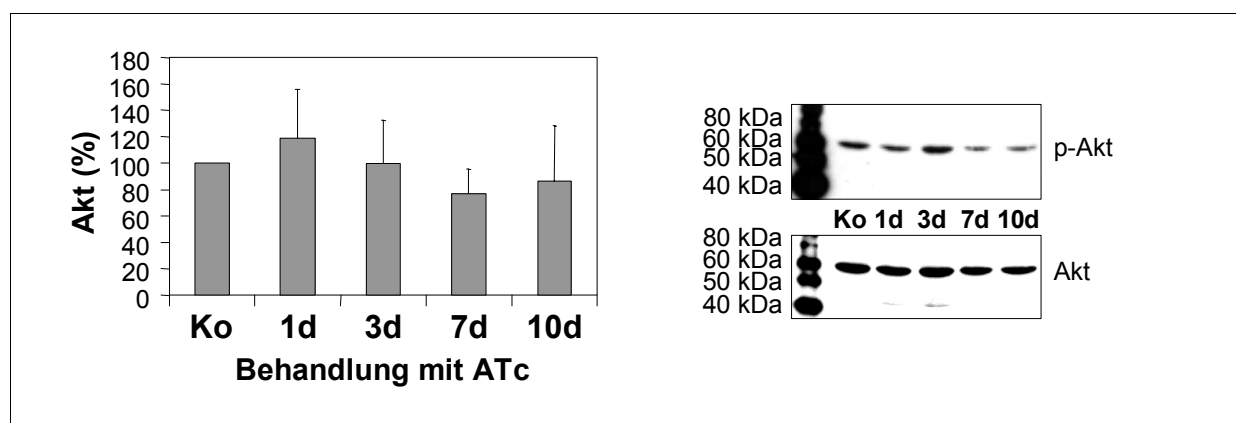


Abbildung 4.22: Einfluss des Ausschaltens von H-Ras *in vivo* auf Akt

Die Menge an Akt wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

Die Tumore des 1. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten insgesamt ein sehr uneinheitliches Bild in Bezug auf die Akt Expression (Abbildung 4.23 A), wodurch es zu sehr großen Fehlerschwankungen kam. Einen Tag nach Ausschalten von BXB-Raf1 kam es zunächst zu keiner Änderung des Akt Gesamtproteins. 3 Tage ATc-Behandlung führten zu einer Abnahme des Akt Gesamtproteins. Die 7-Tage Tumore zeigten sehr große individuelle Unterschiede, die Mehrzahl der Tumore zeigte jedoch eine deutliche Zunahme des Akt Gesamtproteins. Die Werte betrugen nach einem Tag  $102,57 \pm 67,26$  %, nach 3 Tagen  $28,05 \pm 34,99$  % und nach 7 Tagen  $235,71 \pm 218,65$  %.

Die Tumore des 2. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten eine leichte Abnahme des Akt Gesamtproteins nach ATc-Behandlung (Abbildung 4.23 B). Die Abnahme war etwas schwächer als die Abnahme von p-Akt und betrug nach einem Tag  $77,23 \pm 22,47$  %, nach 3 Tagen  $67,79 \pm 22,36$  % und nach 7 Tagen  $63,25 \pm 17,35$  %.

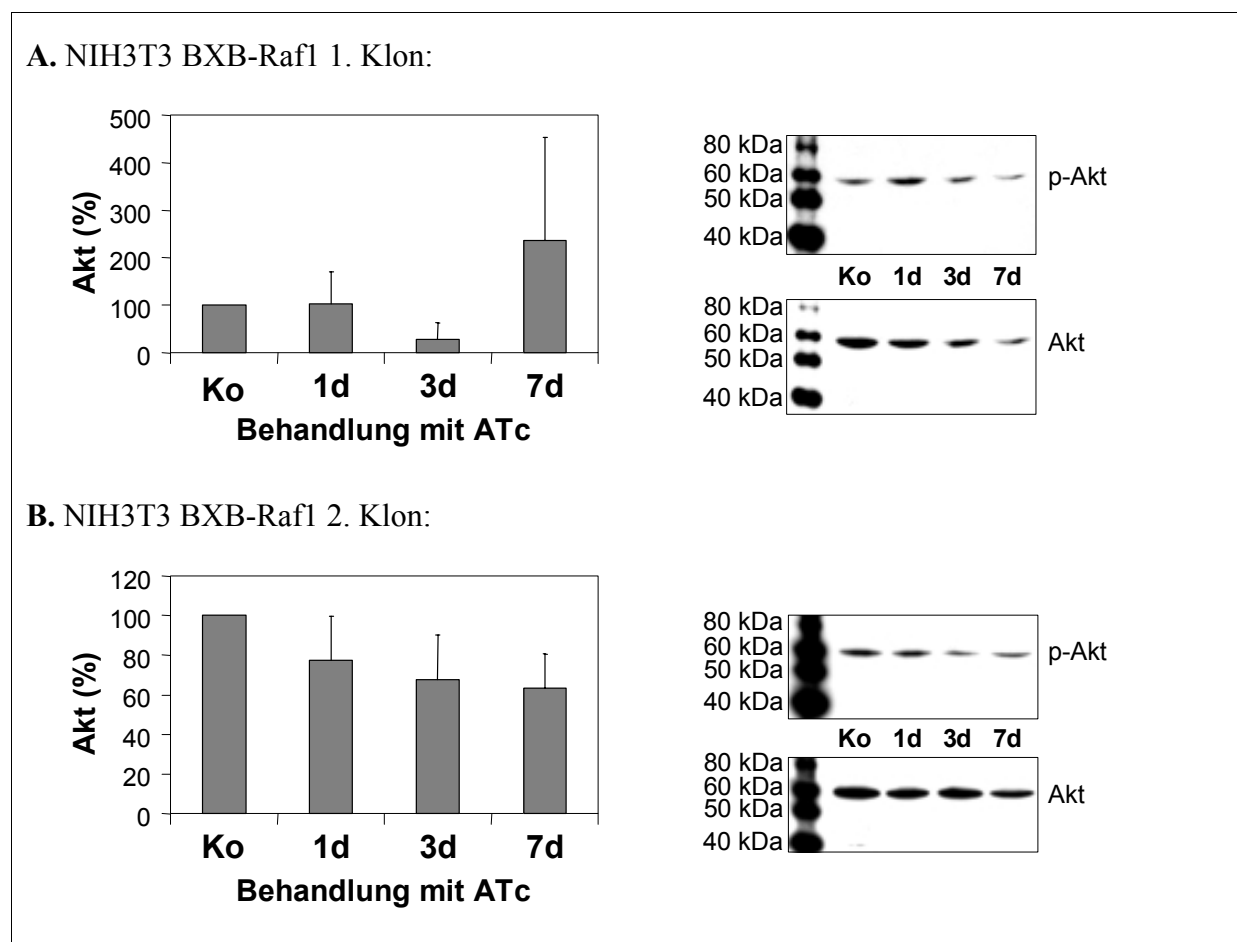


Abbildung 4.23: Einfluss des Ausschaltens von BXB-Raf1 *in vivo* auf Akt

**A.** Akt in den Tumoren des 1. Klon. **B.** Akt in den Tumoren des 2. Klon. Die Menge an Akt wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm **A** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 4 Mäusen pro Zeitpunkt. Das Diagramm **B** zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 unabhängigen Studien. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

## 4.8 Untersuchung des Einflusses unterschiedlich langer ATc-Behandlungen auf Tumorverlauf und HER-2 Expression

Werden Mäuse, die einen HER-2 Tumor tragen, täglich mit 10 ng ATc/kg Körpergewicht behandelt, so kommt es durch Ausschalten von HER-2 im Tumor zu einer deutlichen Remission (Schiffer et al., 2003). Ziel der folgenden Untersuchungen war, herauszufinden, ob zum einen eine kürzere ATc-Behandlung den Tumorverlauf verändern würde. Außerdem sollte herausgefunden werden, ob und wann es nach Beendigung der ATc-Behandlung zu einer erneuten HER-2 Expression kommen würde. Tumore, die entweder 5 Tage lang oder bis zum auftretenden Rezidivwachstum mit ATc behandelt wurden, wurden ein zweites Mal mit ATc behandelt, sobald sie wieder die Therapiegröße (Mittlerer Durchmesser  $1,2 \pm 0,1$  cm) erreicht hatten. Dabei wurde einerseits untersucht, ob eine zweite ATc-Behandlung einen Einfluss auf das Tumorstadium hat, und andererseits, ob HER-2 immer noch regulierbar ist.

### 4.8.1 Tumorverlauf nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung

Eine Gruppe Mäuse mit HER-2 Tumoren wurde ab Erreichen der Therapiegröße 5 Tage lang mit ATc behandelt. Eine zweite Gruppe wurde so lange täglich mit ATc behandelt, bis die Tumore wieder zu wachsen begannen. Der Tumorverlauf dieser beiden Gruppen wurde mit dem Tumorverlauf der schon bekannten ATc-Dauerbehandlung verglichen (Abbildung 4.24). In allen drei Fällen kam es zu einem vergleichbaren Tumorrückgang innerhalb der ersten 9 Tage. Durch die dauerhafte ATc-Behandlung kam es zu einer Abnahme von  $1,17 \pm 0,30 \text{ cm}^3$  auf  $0,03 \pm 0,03 \text{ cm}^3$ , durch die 5-tägige ATc-Behandlung von  $1,20 \pm 0,13 \text{ cm}^3$  auf  $0,04 \pm 0,02 \text{ cm}^3$  und durch die ATc-Behandlung bis zum Rezidivwachstum von  $1,01 \pm 0,15 \text{ cm}^3$  auf  $0,05 \pm 0,02 \text{ cm}^3$ . Auch die Dauer der Remission war vergleichbar lang. Sie dauerte bei der dauerhaften ATc-Behandlung von Tag 8 bis Tag 17, bei der 5-tägigen ATc-Behandlung von Tag 9 bis Tag 19 und bei der ATc-Behandlung bis zum Rezidivwachstum von Tag 8 bis Tag 16. Eine kürzere ATc-Behandlung, selbst über nur 5 Tage, hat also keinen Einfluss auf den Tumorverlauf. Die Messdaten dieser Studie stammen von Banić (2003) (siehe Kapitel 3.3.3.2).

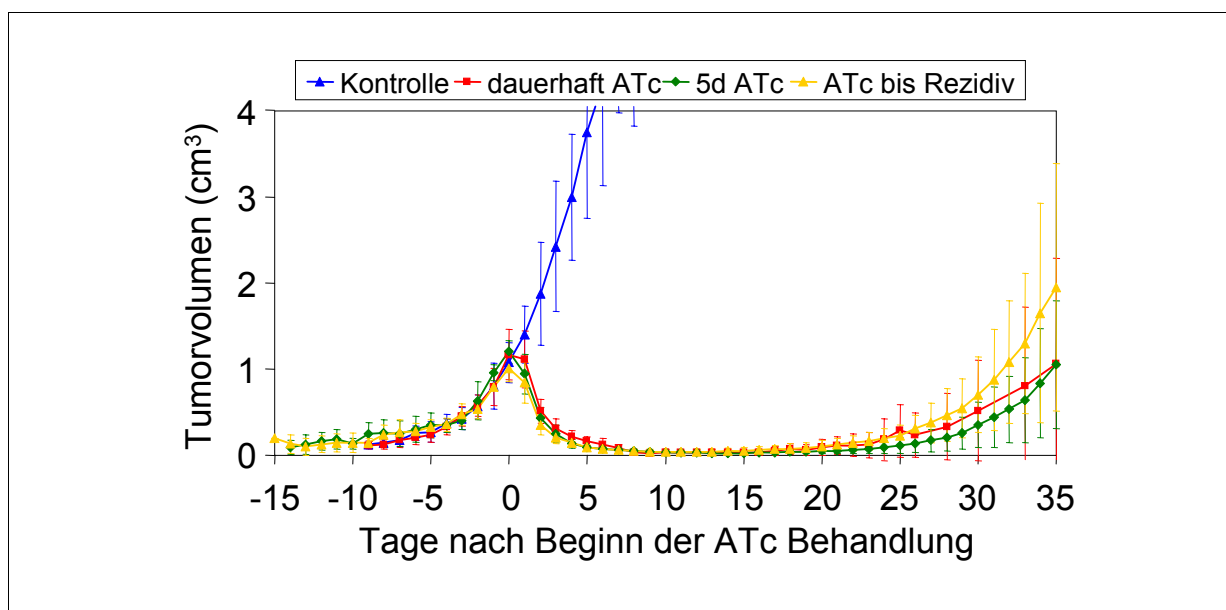


Abbildung 4.24: Langzeitverlauf der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung

Die Tumore wurden dauerhaft (rot) mit ATc behandelt, über 5 Tage (grün) oder bis zur Rezidivbildung (gelb). Es waren keine Unterschiede im Tumorverlauf erkennbar. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 7 bzw. 8 Mäusen pro Gruppe. Die einzelnen Kurven wurden auf die Therapiegröße (Mittlerer Tumordurchmesser =  $1,2 \pm 0,1 \text{ cm}$ ) als Tag 0 normiert.

In einer zweiten Studie wurde untersucht, ob eine noch kürzere ATc-Behandlung von nur 3 Tagen immer noch zu einer vergleichbaren Tumorremission führte. Die Mäuse wurden dazu über 3 Tage mit ATc behandelt, und bis zu 10 Tage nachbeobachtet. Es wurde kein längerer Beobachtungszeitraum gewählt, da die Tumore gleichzeitig zur Untersuchung auf eine erneute HER-2 Expression herangezogen wurden. Die sich ergebende Kurve wurde mit der

Kurve der dauerhaften ATc-Behandlung und der Kurve der 5-tägigen ATc-Behandlung verglichen (Abbildung 4.25). Auch nach nur 3 Tagen ATc-Behandlung konnte eine vergleichbare Tumorremission beobachtet werden. Die Tumore nahmen von Tag 0 auf Tag 9 von  $1,35 \pm 0,12 \text{ cm}^3$  auf  $0,07 \pm 0,03 \text{ cm}^3$  ab. An Tag 13, dem letzten Tag der Beobachtung, betrug das Tumorumfang  $0,04 \pm 0,01 \text{ cm}^3$ .

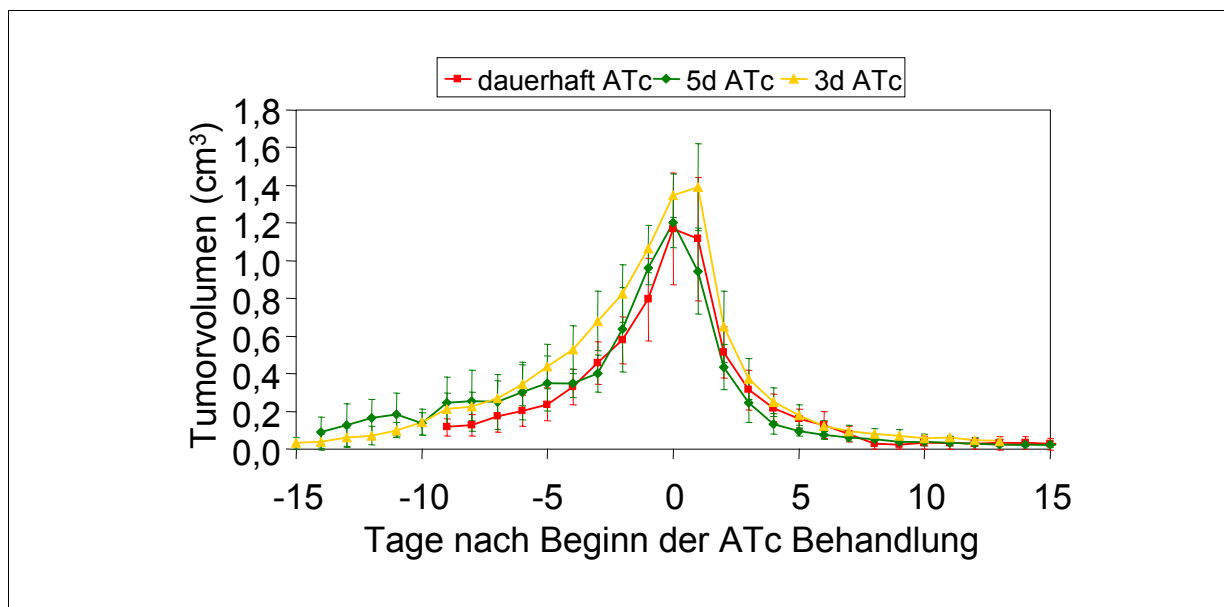


Abbildung 4.25: Kurzzeitverlauf der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung  
Die Tumore wurden dauerhaft (rot) mit ATc behandelt, über 5 Tage (grün) oder über 3 Tage (gelb). Alle Tumore zeigten eine vergleichbare Remission, unabhängig von der Dauer der ATc-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 7 bzw. 8 Mäusen pro Gruppe. Die einzelnen Kurven wurden auf die Therapiegröße (Mittlerer Tumordurchmesser =  $1,2 \pm 0,1 \text{ cm}$ ) als Tag 0 normiert.

#### 4.8.2 Einfluss einer zweiten ATc-Behandlung

Die Mäuse, die eine 5-tägige ATc-Behandlung erhalten hatten (siehe Kapitel 4.8.1), wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, sobald die entstehenden Rezidive wieder die Therapiegröße erreicht hatten. Die Mäuse der einen Gruppe wurden sofort getötet und die Tumore isoliert, um den HER-2 Status der Tumore vor einer zweiten ATc-Behandlung bestimmen zu können. Die andere Gruppe wurde ein zweites Mal über 5 Tage mit ATc behandelt. Bei den Mäusen, die eine ATc-Behandlung bis zum Rezidivwachstum erhalten hatten, wurde entsprechend vorgegangen. Die zweite ATc-Behandlung dauerte in diesem Fall solange, bis die Tumore einen mittleren Durchmesser von 2,0 cm erreicht hatten.

Die einzelnen Tumorverlaufskurven wurden auf den Tag normiert, bei dem die Rezidive die Therapiegröße von  $1,2 \pm 0,1 \text{ cm}$  erreicht hatten. Der Vergleich der beiden Rezidivverläufe mit dem Rezidivverlauf unter dauerhafter ATc-Behandlung ist in Abbildung 4.26 dargestellt. Es zeigte sich, dass alle drei Gruppen ein sehr ähnliches Rezidivwachstum aufwiesen. Eine zweite ATc-Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Wachstum, die Tumore wuchsen

ungehindert weiter. Das Rezidivwachstum kann also allein durch eine ATc-Behandlung nicht unterbrochen werden. Ob die zweite ATc-Behandlung auch eine erneute HER-2 Herunterregulierung verursachen konnte, wurde im Weiteren untersucht.

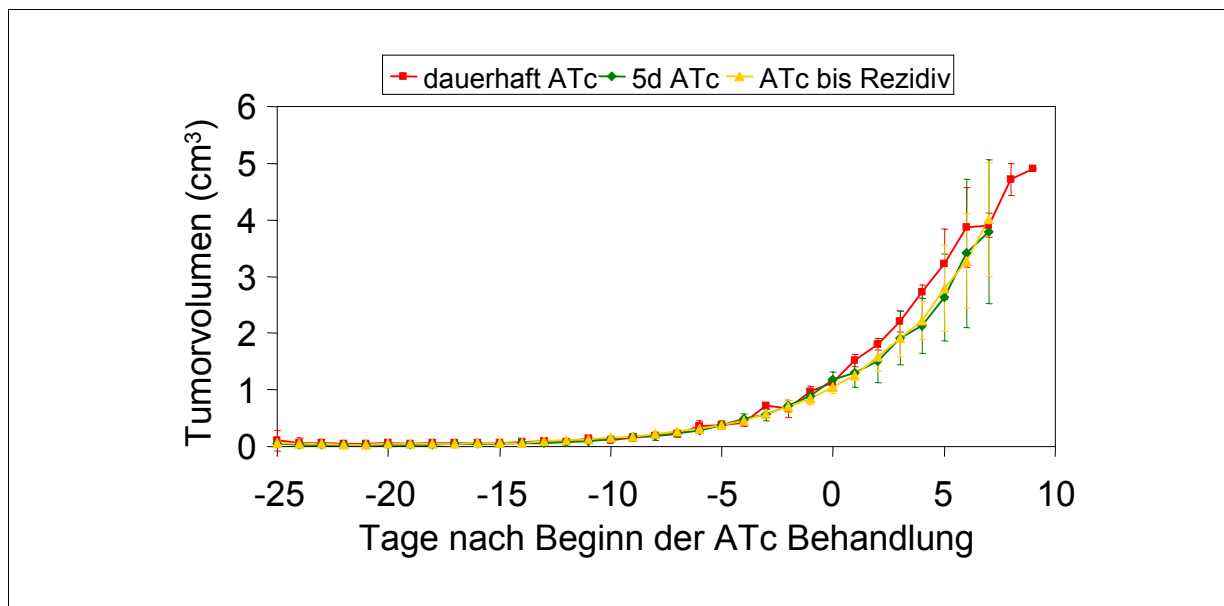


Abbildung 4.26: Rezidivwachstum der HER-2 Tumore nach unterschiedlich langer ATc-Behandlung  
Die Tumore zeigten ein vergleichbares Rezidivwachstum, unabhängig von der Dauer der ATc-Behandlung. Eine zweite ATc-Behandlung ab einem mittleren Tumordurchmesser der Rezidive von  $1,2 \pm 0,1$  cm hatte keinen Einfluss auf das Rezidivwachstum. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 7 bzw. 8 Mäusen pro Gruppe. Tag 0 entspricht dem Tag, an dem die Rezidive wieder die Therapiegröße (Mittlerer Tumordurchmesser =  $1,2 \pm 0,1$  cm) erreicht hatten. Die einzelnen Kurven wurden auf diesen Tag normiert.

### 4.8.3 Erneute HER-2 Expression nach Beendigung der ATc-Behandlung

Die Tumore der ersten Studie (siehe Kapitel 3.3.3.2) wurden im Western Blot auf ihre HER-2 Expression untersucht (Abbildung 4.27). Da die Fallzahlen der Studie zum Teil zu gering ausfielen, wurde keine densitometrische Auswertung des Western Blots vorgenommen. Die Kontrollen zeigen ein sehr deutliches HER-2 Signal. Das zu starke HER-2 Signal der Kontrollen im Western Blot wurde hier in Kauf genommen, damit im Gegenzug auch geringe HER-2 Signale noch nachgewiesen werden konnten. Die beiden dauerhaft mit ATc behandelten Mäuse zeigten keine HER-2 Expression in den Rezidiven (siehe auch Schiffer et al., 2003). Die beiden Mäuse, die über 5 Tage ATc erhielten, und deren Tumore vor einer zweiten ATc-Behandlung isoliert wurden, zeigten ein HER-2 Signal, das deutlich schwächer als die Kontrolle war und auch untereinander noch unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die Mäuse hatten bis zur Tumorisolierung 30 Tage lang kein ATc mehr erhalten. Durch eine zweite ATc-Behandlung konnte in dieser Gruppe HER-2 wieder vollständig unter die Nachweisgrenze gesenkt werden. Die Tumore, die bis zum Rezidivwachstum mit ATc behandelt wurden, zeigten keine deutliche HER-2 Expression vor der zweiten ATc-Behandlung. Ein sehr schwaches Signal im Western Blot bei einer der Mäuse deutete an, dass

sich die Menge an HER-2 vermutlich an der Nachweisgrenze bewegte. Nach einer zweiten ATc-Behandlung konnte in dieser Gruppe ebenfalls kein HER-2 nachgewiesen werden. Auch hier deutete wieder ein sehr schwaches Signal darauf hin, dass sich die Menge an HER-2 an der Nachweisgrenze bewegte.

HER-2 wurde also wieder in den Tumoren exprimiert, nachdem eine 5-tägige ATc-Behandlung beendet wurde. Die Expression war jedoch deutlich schwächer als in den Kontrolltumoren. Durch eine erneute ATc-Behandlung konnte die HER-2 Expression wieder herunterreguliert werden. Das TET-OFF System funktionierte also in diesen Tumoren noch. Wurden die Tumore bis zum beginnenden Rezidivwachstum mit ATc behandelt, so zeigte sich keine HER-2 Expression mehr.

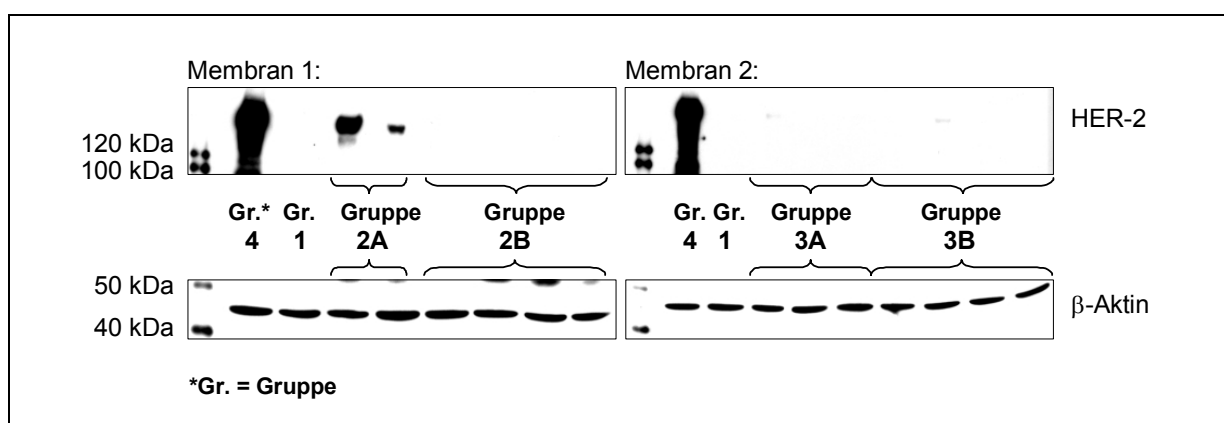


Abbildung 4.27: Western Blot Nachweis der HER-2 Expression nach unterschiedlichen ATc-Behandlungen  
 Erläuterung der Gruppen: Gruppe 1 = dauerhafte ATc-Behandlung; Gruppe 2A = 5d ATc-Behandlung, danach ATc-freie Zeit, Tumorisolierung bei Therapiegröße (Mittlerer Durchmesser =  $1,2 \pm 0,1$  cm); Gruppe 2B = 5d ATc-Behandlung, danach ATc-freie Zeit, bei Therapiegröße erneut 5d ATc-Behandlung; Gruppe 3A = ATc-Behandlung bis Rezidivwachstum erkennbar war, danach ATc-freie Zeit, Tumorisolierung bei Therapiegröße; Gruppe 3B = ATc-Behandlung bis Rezidivwachstum erkennbar war, danach ATc-freie Zeit, bei Therapiegröße erneute ATc-Behandlung; Gruppe 4 = Kontrolle ohne ATc-Behandlung.  
 In den Rezidiven, die aus einer 5-tägigen ATc-Behandlung hervorgingen, war eine erneute HER-2 Expression zu verzeichnen (Gruppe 2A). Eine zweite ATc-Behandlung konnte die HER-2 Expression wieder ausschalten (Gruppe 2B). In den Rezidiven, bei denen erst mit Einsetzen des Rezidivwachstums die ATc-Behandlung unterbrochen wurde, war keine erneute HER-2 Expression erkennbar (Gruppe 3B).

Auch die Tumore der 2. Studie (siehe Kapitel 3.3.3.2) wurden im Western Blot auf ihre HER-2 Expression untersucht (Abbildung 4.28). In dieser Studie wurden alle Tumore über 3 Tage mit ATc behandelt. Anschließend wurde die HER-2 Expression bestimmt. Sie betrug  $0,49 \pm 0,48$  % im Vergleich zur Kontrolle. Weitere Mäuse wurden über 1, 3, 7 und 10 Tage ohne ATc-Behandlung weiterbeobachtet. Es zeigte sich, dass selbst 10 Tage nach Beendigung der ATc-Behandlung immer noch kein HER-2 nachgewiesen werden konnte. Einzelne Tumore wiesen jedoch schon zu früheren Zeitpunkten sehr schwache Signale auf, was darauf hindeutet, dass sich die HER-2 Expression um die Nachweisgrenze bewegte. Die Werte für die HER-2 Expression betragen einen Tag nach Ende der ATc-Behandlung  $0,11 \pm 0,12$  %, nach 3 Tagen  $0,14 \pm 0,14$  %, nach 7 Tagen  $2,41 \pm 2,50$  % und nach 10 Tagen  $0,01 \pm 0,01$  %.

Da nach einer 5-tägigen ATc-Behandlung in den Rezidiven eine HER-2 Expression nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass HER-2 10 Tage nach Ende der ATc-Behandlung immer noch herunterreguliert war. Es benötigt also eine längere Zeit bis HER-2 in den Tumoren wieder exprimiert wird.

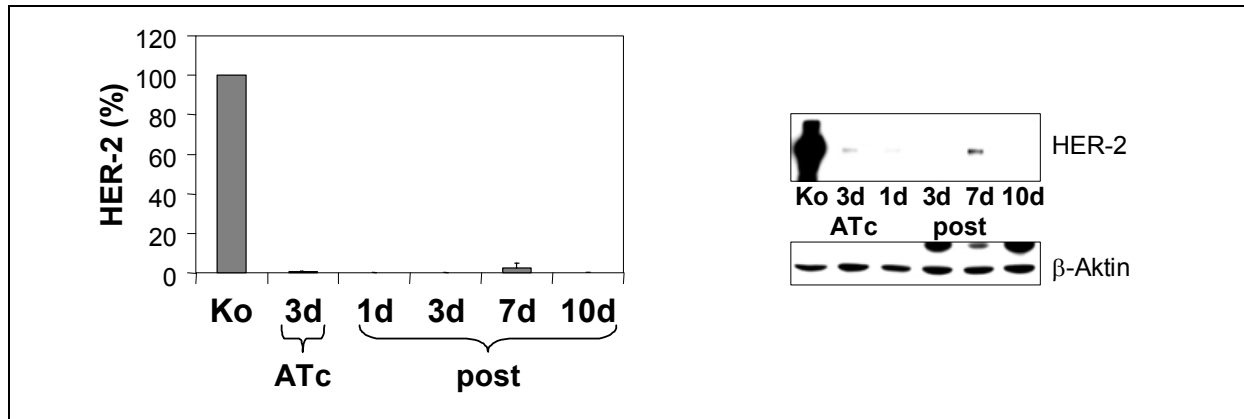


Abbildung 4.28: HER-2 Expression nach Beendigung der ATc-Behandlung *in vivo*

HER-2 blieb nach einer 3-tägigen ATc-Behandlung über mindestens 10 weitere Tage herunterreguliert. Die Menge an HER-2 wurde im Western Blot bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von je 4 Mäusen pro Gruppe. Die Angaben erfolgen in Prozent und beziehen sich auf den Wert der Kontrolle.

## **5 DISKUSSION**



## 5.1 Konditionale Expression von Onkogenen – sind Tumore reversibel?

Obwohl die Tumorentstehung ein komplexer Prozess ist, hat es sich gezeigt, dass die Aktivität eines einzigen Onkogens die Eigenschaften eines Tumors negativ beeinflussen kann. Eine HER-2 Überexpression in Mamma- oder Ovarialkarzinomen geht z.B. mit einer schlechteren Prognose und Überlebenszeit der Patientinnen einher (Hengstler et al., 1999; Slamon et al., 1987; O'Reilly et al., 1991). Es stellt sich nun die Frage, ob die Tumorzellen durch gezielte Blockade dieses Onkogens ihr tumorigenes Potential verlieren, und dadurch das Tumorstadium zumindest zeitweise unterbunden werden kann. Die Erfolge bei der Therapie von Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom mit Trastuzumab, einem Antikörper gegen HER-2, weisen darauf hin. Zum besseren Verständnis des Einflusses von HER-2 dient ein Maustumormodell, in dem HER-2 konditional exprimiert werden kann. Hierfür wurden Mausfibroblasten mit dem Onkogen HER-2 transfiziert, wodurch die tumorigenen NIH3T3 HER-2 Zellen entstanden (Baasner et al., 1996). Diese Zellen wurden nun Nacktmäusen appliziert, wodurch subkutan wachsende Tumore entstanden, in denen die HER-2 Expression durch Gabe von Anhydrotetracyclin ausgeschaltet werden konnte (Schiffer et al., 2003). Anhand dieses Maustumormodells konnte nun der Einfluss von HER-2 auf die Tumorentwicklung genauer untersucht werden. Es zeigte sich, dass es nach Ausschalten der HER-2 Expression in den Tumoren zu einer raschen Tumorremission kam, welche auf einem Proliferationsstopp und Apoptose beruhte (Schiffer et al., 2003). Um die molekularen Mechanismen in der Zelle während der Tumorremission besser verstehen zu können, wurde der Einfluss von HER-2 auf zwei seiner wichtigen Signalwege, den Ras-MAP Kinase Signalweg (Olayioye et al., 2000; Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000) und die Aktivierung von Akt über die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) (Olayioye et al., 2000; Harari und Yarden, 2000; Zhou et al., 2000 und 2001), untersucht. Der Ras-MAP Kinase Signalweg besitzt hauptsächlich proliferationsfördernde Eigenschaften (Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000), während eine Aktivierung des PI3K/Akt Weges zu anti-apoptotischen Signalen führt (Chen et al., 2001). Eine Deaktivierung der beiden Wege führt also zu einer Unterdrückung der Proliferation und zu Apoptose. Als Identifikationspunkt, ob die jeweiligen Signalwege aktiviert bzw. deaktiviert wurden, wurde einerseits der Phosphorylierungsgrad von ERK für den Ras-MAP Kinase Signalweg gewählt, und andererseits der Phosphorylierungsgrad von Akt für die Aktivierung von Akt. Durch Ausschalten von HER-2 in den Tumoren kam es zu einer Abnahme von p-ERK innerhalb von einem Tag, und zu einer Abnahme von p-Akt und des Akt Gesamtproteins nach 3 Tagen ATc-Behandlung (Heimerdinger et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden nun zwei weitere Zelllinien untersucht, die ebenfalls auf dem TET-OFF System nach Bujard (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) beruhen. Durch Transfektion der Vektoren „pTBC1 Ha-RasL61/SEAP“ bzw. „pTBC1 BXB-Raf/SEAP“ an Stelle des Vektors „pTBC HER2/SEAP“ in die NIH3T3 Mausfibroblasten konnte nun auch humanes H-Ras bzw. BXB-Raf1 konditional exprimiert werden. Die beiden

Zelllinien wurden nun in gleicher Weise wie die NIH3T3 HER-2 Zellen in dem Maustumormodell angewandt. Es bot sich jetzt also die Möglichkeit, auch den Einfluss von H-Ras sowie von BXB-Raf1 auf die Tumorentwicklung zu untersuchen. Sowohl H-Ras als auch BXB-Raf1 sind Teile des Ras-MAP Kinase Signalweges. Sollte ein Ausschalten dieser Gene dieselben Effekte auf die Tumore besitzen, so wäre dies ein guter Hinweis darauf, dass die Aktivierung des Ras-MAP Kinase Signalweges eine bedeutende Rolle in der Tumorentwicklung in dem vorliegenden Modell besitzt. Wie schon oben erwähnt kann HER-2 nicht nur den Ras-MAP Kinase Signalweg aktivieren, sondern auch Akt über die PI3K. Auch H-Ras kann direkt die PI3K aktivieren (Macaluso et al., 2002) und damit letztendlich auch Akt. Es ist jedoch nicht beschrieben, dass Akt durch Raf aktiviert werden kann. Vielmehr kann Akt Raf phosphorylieren und dadurch inaktivieren, wodurch eine Signalweiterleitung über den Ras-MAP Kinase Signalweg unterbunden werden kann (Moelling et al., 2002). Dieser Unterschied zwischen HER-2 und H-Ras einerseits und BXB-Raf1 andererseits ermöglichte es, feststellen zu können, welcher der beiden Hauptsignalwege von HER-2 die bedeutendere Rolle in der Tumorentwicklung spielt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit den Ergebnissen für HER-2 aus früheren Arbeiten der Gruppe (Schiffer et al., 2003; Heimerdinger et al., 2004) verglichen und gemeinsam diskutiert.

## **5.2 Inkubation mit Anhydrotetracyclin *in vitro* führte zu einer Herunterregulation der H-Ras und BXB-Raf1 Expression**

Zur Feststellung der Funktionalität des TET-OFF Systems in den beiden neuen Zelllinien wurden die NIH3T3 H-Ras und NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen über verschiedene Zeiträume mit 10 ng Anhydrotetracyclin (ATc)/ml Kulturmedium inkubiert. H-Ras konnte nach einer 7-tägigen ATc Inkubation im Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden. BXB-Raf1 nahm um ca. 98 % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle ab. Die Expression der transfizierten Onkogene war also herunterregulierbar. Damit stehen neben der NIH3T3 HER-2 Zelllinie zwei weitere Zelllinien zur Verfügung, die eine konditionale Expression nach dem TET-OFF System besitzen.

Zusätzlich wurden die Zelllinien daraufhin untersucht, wie schnell die Expression von H-Ras bzw. BXB-Raf1 nach Ende einer ATc Inkubation wieder einsetzte. Im Falle der NIH3T3 H-Ras Zellen nahm die Menge an H-Ras im Western Blot nach Ende der ATc Inkubation stetig zu. Die H-Ras Expression ist also voll reversibel, so wie es auch bei den NIH3T3 HER-2 Zellen der Fall war (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Warum es in beiden Klonen der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zu keiner erneuten BXB-Raf1 Expression nach Ende der ATc-Inkubation kam, wurde nicht näher untersucht und war für die durchgeführten Versuche nicht relevant. Für die weiteren Untersuchungen war lediglich wichtig, dass die Expression

herunterregulierbar war. Eine erfolgreiche Herunterregulation der BXB-Raf1 Expression durch ATc war ausreichend, da nur die Auswirkungen auf Tumorstadium oder Aktivierung bzw. Deaktivierung von Signalwegen nach Ausschalten des Gens untersucht wurden. Trotzdem könnte es sich bei der nicht wieder auftretenden BXB-Raf1 Expression um eine sehr interessante Beobachtung handeln, die an dieser Stelle diskutiert werden soll. Da die Versuchsbedingungen mit denen der NIH3T3 H-Ras Zellen identisch waren, und die nicht wieder auftretende Expression in unabhängigen Versuchen bestätigt wurde, kann es sich um keinen methodischen Fehler handeln. Einmalige ATc-Inkubation der Zellen hatte somit zur Folge, dass die Expression von BXB-Raf1 dauerhaft unterdrückt blieb. Da die beiden Klone identisch reagierten, es aber weder in den NIH3T3 HER-3 noch in den NIH3T3 H-Ras Zellen zu einer dauerhaften Unterdrückung der Expression kam, liegt die Vermutung nahe, dass BXB-Raf1 selbst eine Rolle in der dauerhaften Unterdrückung der Expression spielen könnte. Sollte es in den Zellen nur zu einer Inaktivierung des „pTBC1 BXB-Raf/SEAP“ Vektors gekommen sein, so sollte der Vektor für die Hygromycin B Resistenz noch funktionsfähig sein. Eine Kultivierung der Zellen mit Hygromycin B nach einer ATc-Inkubation sollte also bewirken, dass die Zellen nicht absterben. Würde ein solcher Versuch zu einem vollständigen Absterben der Zellen führen, so könnte dies zwei Ursachen haben. Entweder könnte das Transaktivatorprotein tTA einen dauerhaften Komplex mit ATc eingegangen sein und deshalb auch dauerhaft die Expression der beiden anderen Vektoren unterdrücken. Oder aber das Transaktivatorprotein tTA könnte seine Konformationsänderung, die für die Bindung an die tetO7 Region des CMV-Promotors der beiden anderen Vektoren notwendig ist, auch nach Entzug von ATc beibehalten haben. In beiden Fällen wäre es interessant herauszufinden, ob BXB-Raf1 eine Rolle dabei spielte, d.h. dass eine BXB-Raf1 Expression das TET-OFF System außer Kraft setzen könnte. Die Untersuchung des Grundes für die nicht wiederkehrende Expression von BXB-Raf1 war jedoch für die vorliegende Arbeit nicht von Interesse.

### **5.3 Zwei neue Maustumormodelle zur Untersuchung des Einflusses von H-Ras bzw. BXB-Raf1**

Maustumormodelle vereinfachen die Untersuchung molekularer Mechanismen, die in Tumoren ablaufen. Sie ermöglichen eine gezielte Untersuchung der beteiligten Faktoren, was in menschlichen Tumoren nicht möglich ist. Das Produkt eines Onkogens besitzt prinzipiell immer dieselben Eigenschaften, das Umfeld der Tumorzelle kann jedoch für die Auswirkungen entscheidend sein. In verschiedenen Tumorarten und Geweben kann also ein Onkogen unter Umständen unterschiedliche Signalwege aktivieren. Zum sicheren Vergleich müssen deshalb die Einflüsse von H-Ras bzw. BXB-Raf1 auf den Tumorverlauf im gleichen System wie schon HER-2 untersucht werden. Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Maustumormodelle für H-Ras und BXB-Raf1 entsprechen dem von Schiffer et al. (2003)

etablierten Maustumormodell für HER-2. Beide Zelllinien waren tumorigen in Nacktmäusen, und nach subkutaner Applikation der Zellen kam es zu einer raschen Tumorentstehung. Die subkutan wachsenden Tumore zeigten ein mit den HER-2 Tumoren vergleichbares Wachstum. Eine tägliche ATc-Behandlung der Mäuse mit 10 mg ATc/kg Körpergewicht führte bereits nach einem Tag zu einer deutlichen Herunterregulation sowohl von H-Ras als auch von BXB-Raf1. Das TET-OFF System funktionierte also auch *in vivo*. Somit konnte nun in demselben Maustumormodell der Einfluss von drei verschiedenen Faktoren auf die Tumorentwicklung untersucht werden. Eine konditionale Expression von H-Ras oder BXB-Raf1 ist in dieser vorliegenden Art und Weise noch nicht beschrieben worden. Es handelt sich um zwei neue Maustumormodelle. Für H-Ras wurde bereits 2000 ein anderes Maustumormodell beschrieben, bei dem H-Ras konditional mittels des TET-ON Systems (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) exprimiert wurde (Wong und Chin, 2000). Es gab jedoch mehrere Unterschiede zu unserem Modell: (i) Die konditionale H-Ras Expression wurde in die Melanocyten von Mäusen eingeführt, d.h. die Tiere trugen die veränderten Zellen von Geburt an in sich. In unserem Modell wurde eine Zelllinie transfiziert, und die transfizierten Zellen in 4-5 Wochen alte Mäuse injiziert. (ii) Bei Wong und Chin entwickelten sich aus den veränderten Melanocyten Melanome. In unserem Modell handelte es sich um Tumore, die subkutan wuchsen, und nicht aus Zellen der Mäuse hervorgingen. (iii) Durch das TET-ON System wurde die H-Ras Expression durch Doxycyclin gewährleistet. Entzug von Doxycyclin führte zu einer Herunterregulation der H-Ras Expression. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, dass zumindest Anhydrotetracyclin noch über lange Zeit im Körper der Maus eine Wirkung verursachen kann. Das TET-OFF System gewährleistet somit eine zuverlässigere und womöglich schnellere Unterdrückung der Genexpression. Eine konditionale Expression von BXB-Raf1 in NIH3T3 Zellen beschrieben 1997 Kerkhoff und Rapp. Die Expression wurde durch 4-Hydroxytamoxifen reguliert. Diese Zellen wurden jedoch nur *in vitro* untersucht, und nicht im Mausmodell.

#### **5.4 Ausschalten der BXB-Raf1 Expression führte zu einer mit den HER-2 Tumoren vergleichbaren Tumorremission**

Im HER-2 Maustumormodell kam es zu einer Tumorremission nach Ausschalten der HER-2 Expression (Schiffer et al., 2003). Der Tumor konnte also nicht überleben, wenn ihm der Faktor entzogen wurde, der für die tumorigenen Eigenschaften der Zellen verantwortlich war. Mit den zwei neuen Tumormodellen sollte nun überprüft werden, ob es auch nach Ausschalten von H-Ras bzw. BXB-Raf1 zu einer Tumorremission kommt, d.h. auch hier ein Fehlen der treibenden Kraft zum Absterben des Tumors führt. In beiden Fällen konnte durch eine ATc-Behandlung eine deutliche Tumorremission beobachtet werden, die jedoch unterschiedlich ausgeprägt war. Die Ergebnisse für H-Ras und BXB-Raf1 werden deshalb im Folgenden getrennt diskutiert. Das bedeutendste Ergebnis ist, dass eine tägliche ATc-

Behandlung der BXB-Raf1 Tumore über einen längeren Zeitraum zu einem nahezu identischen Tumorverlauf wie bei den HER-2 Tumoren führte. In beiden Fällen setzte die Tumorremission schon am ersten Tag ein. Nach 9 Tagen wiesen beide einen Tumorrückgang von etwa 98 % auf. Die Tumorremission dauerte in beiden Fällen etwa bis Tag 20-25. Die Wachstumsgeschwindigkeit der auftretenden Rezidivtumore war vergleichbar. Das Ausschalten von BXB-Raf1 hatte also dieselbe Auswirkung auf die Tumorentwicklung wie das Ausschalten von HER-2. Da Raf1 keinen Einfluss auf Akt haben sollte, liegt die Vermutung nahe, dass der Ras-MAP Kinase Signalweg eine bedeutende Rolle in der auftretenden Tumorremission besitzt.

Die H-Ras Tumore zeigten zwar auch eine Tumorremission nach einer ATc-Behandlung, doch begann diese erst drei Tage nach Beginn der ATc-Behandlung. Auch war sie schwächer ausgeprägt als bei den HER-2 oder den BXB-Raf1 Tumoren. Die Tumore hatten nach 9 Tagen noch ein deutliches Tumorrestvolumen von im Mittel  $0,33 \text{ cm}^3$ . Die HER-2 und BXB-Raf1 Tumore besaßen zur selben Zeit nur noch ein mittleres Tumolvolumen von  $0,02 \text{ cm}^3$ . Die Tumorremission setzte bereits an Tag 10 ein, d.h. deutlich früher als bei den anderen beiden Tumoren. Dass die H-Ras Tumore noch zwei Tage wie die Kontrolltumore weiter wuchsen, obwohl H-Ras in den Tumoren schon am ersten Tag deutlich herunterreguliert war, kann folgende Ursachen haben: Zum einen könnte es in den Zellen durch die künstliche H-Ras Expression zu einer Aktivierung von Ras unabhängigen Signalwegen gekommen sein, die dann mit Ausschalten von H-Ras in den Vordergrund traten. Zum anderen könnten auch geringe Mengen an H-Ras eine ausreichende Signalweiterleitung bewirkt haben, da die eingesetzte Variante des H-Ras durch die Mutation der Aminosäure 61 dauerhaft aktiv war. Letzteres könnte jedoch nur das anfängliche Weiterwachsen der Tumor erklären, nicht jedoch das mehr als 10fach größere Tumorrestvolumen und das deutlich früher einsetzende Rezidivwachstum. Eher wahrscheinlich ist, dass es durch die H-Ras Expression in den Zellen zu weiteren Mutationen gekommen ist, die dann das Tumorwachstum mit beeinflussen. So kann ein Ausschalten von H-Ras immer noch eine Tumorremission verursachen, die Tumore reagieren jedoch erst verzögert auf die Signalunterbrechung, und die anderen Mutationen verhindern zum einen eine vollständige Remission wie in den HER-2 oder BXB-Raf1 Tumoren und zum andern verursachen sie ein baldiges Einsetzen eines Rezidivwachstums. Der relativ hoch bleibende Level an p-Akt in den H-Ras Tumoren weist auch darauf hin, dass die H-Ras Tumore noch von anderen Faktoren beeinflusst werden. Eine Untersuchung der H-Ras Tumore auf zusätzliche Mutationen wurde nicht vorgenommen.

## 5.5 Die Rezidivbildung war unabhängig von den transfizierten Onkogenen HER-2, H-Ras bzw. BXB-Raf1

Die Beobachtung, dass es nach Entzug eines einzelnen Faktors zu einer massiven Abnahme des Tumolvolumens kam, lässt darauf hoffen, dass dies ein Schlüssel für künftige Krebstherapien ist, die nur den Tumor selbst gezielt zerstören, und dadurch schonender für die Patienten sind. Leider zeigte sich in unseren Maustumormodellen bei allen drei Faktoren ein erneutes Wachstum der Tumore nach einer bestimmten Zeit trotz andauernder ATc-Behandlung. Selbst Tumore, die optisch nicht mehr sichtbar waren, zeigten dieses Rezidivwachstum. Die Rezidivtumore entstanden stets an derselben Stelle wie die Primärtumore. Das Rezidivwachstum kann unterschiedliche Ursachen besitzen. Zum einen könnte das TET-OFF System seine Schaltbarkeit verloren haben, wodurch es trotz ATc-Behandlung zu einer erneuten Expression der transfizierten Onkogene kommen könnte. Zum anderen könnte es durchaus sein, dass das Ausschalten eines einzelnen Faktors nur einen unmittelbaren Effekt hat, jedoch keine dauerhafte Remission verursachen kann. Mit der Zeit könnten dann andere Faktoren in den Vordergrund treten, die den Zellen ihr tumorigenes Potential zurückgeben. In diesem Fall sollte keine erneute Expression der transfizierten Onkogene in den Rezidiven nachweisbar sein. Natürlich können auch beide Ursachen zusammenwirken. Die HER-2 Rezidivtumore zeigten keine erneute HER-2 Expression zum Zeitpunkt ihrer Isolierung (Schiffer et al., 2003; Kapitel 4.8.3). Die auftretenden Rezidivtumore wuchsen also HER-2 unabhängig. In den H-Ras Rezidivtumoren konnte hingegen eine erneute H-Ras Expression von etwa 40 % trotz andauernder ATc-Behandlung nachgewiesen werden. Bereits nach 10 Tagen ATc-Behandlung deutete sich diese erneute H-Ras Expression an. Das im Western Blot detektierte H-Ras Signal muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass die H-Ras Expression durch ATc nicht mehr vollständig unterdrückt werden konnte, d.h. dass das TET-OFF System nicht mehr funktionierte. Es könnte auch zu einer Erhöhung der endogenen H-Ras Expression gekommen sein, da der verwendete H-Ras Antikörper sowohl das humane H-Ras, als auch das der Maus und der Ratte detektiert. Es gibt jedoch keinen nur Mensch- oder nur Maus-spezifischen Antikörper, da sich die Aminosäuresequenz des humanen und des murinen H-Ras nur in einzelnen Aminosäuren unterscheidet. Ein sicherer Nachweis wäre also nur durch Isolierung und Sequenzierung der mRNA möglich. Dies wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Da jedoch auch schon der Tumorverlauf darauf hinwies, dass es in den Zellen der H-Ras Tumore zu Veränderung gekommen sein könnte (siehe Kapitel 5.4), ist eine Mutation des endogenen H-Ras durchaus denkbar.

Die Untersuchung der Rezidivtumore aus den beiden Klonen der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigte ein unterschiedliches Bild. Die Rezidive des 1. Klons wiesen keine erneute BXB-Raf1 Expression auf. In den Rezidiven des 2. Klons war die Expression jedoch wieder mit der der Kontrolle vergleichbar. Es handelte sich dabei sicher um das transfizierte BXB-Raf1, da das Signal durch die Verkürzung des Proteins bei ca. 42 kDa auftrat, und nicht bei 74 kDa, der Größe des ungekürzten Raf1. Da die Expression des BXB-Raf1 zudem genauso stark wie in

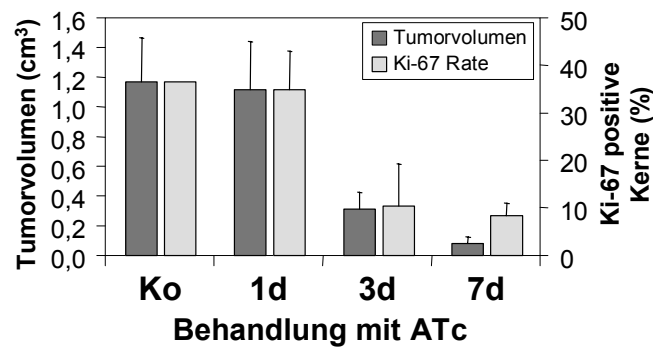
den Kontrollen des 2. Klons war, ist davon auszugehen, dass das TET-OFF System in dem 2. Klon der BXB-Raf1 Zellen zum Zeitpunkt der Rezidivtumore nicht mehr funktionsfähig war. Was den Verlust der konditionalen Expression verursacht hatte, wurde nicht weiter untersucht. Die Rezidive, die ein erneutes BXB-Raf1 Signal aufwiesen, bildeten sich jedoch erst später als die Rezidive ohne BXB-Raf1 Expression. Auch war das Rezidivwachstum nicht schneller. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Rezidivbildung BXB-Raf1 unabhängig ist.

Betrachtet man alle drei Maustumormodelle, so lässt sich für die Rezidivbildung der Schluss ziehen, dass die Entstehung der Rezidive nicht von den transfizierten Onkogenen abhängt, sondern eher von der verwendeten Zellmatrix, den NIH3T3 Mausfibroblasten. In den Rezidiven muss es zu weiteren Mutationen gekommen sein, die ein so starkes Signal weitergeben, dass das ursprüngliche Onkogen auch bei voller Expression keinen Einfluss mehr auf das Tumorwachstum besitzt.

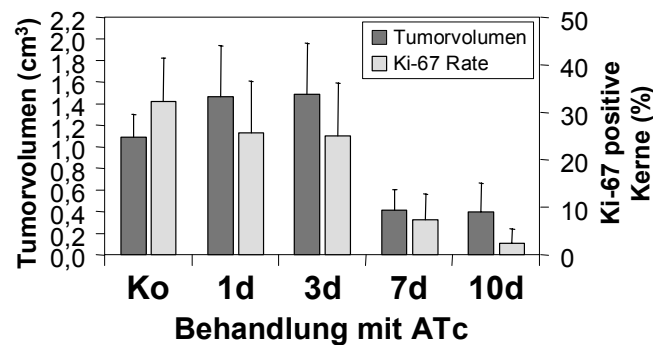
## **5.6 Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1 führte zu einem Proliferationsstopp**

Die immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 bietet eine einfache Methode, proliferierende von ruhenden Zellen zu unterscheiden. Ki-67 bezeichnet ursprünglich einen Antikörper, der Proteine im Zellkern detektiert, die in allen Zellzyklusphasen außer der G0-Phase (Ruhephase) exprimiert werden. Bislang ist jedoch noch wenig darüber bekannt, welche Proteine Ki-67 anfärbt. Ein Proliferationsstopp aller Tumorzellen sollte zu einer Stagnation des Tumorwachstums führen, jedoch nicht unmittelbar zu einem Rückgang des Tumolvolumens. Der Proliferationsstopp könnte aber als Auslöser für andere Prozesse fungieren, die dann letztendlich zu der beobachteten Tumorremission führen. Auch unterstützt ein Proliferationsstopp die Remission, indem ein weiteres Wachstum der verbleibenden Zellen unterdrückt wird. Aus diesen Gründen wurde die Menge der Ki-67 positiven Zellen vor und nach Ausschalten von HER-2, H-Ras oder BXB-Raf1 bestimmt. Die Proliferation der NIH3T3 HER-2 Zellen nahm *in vitro* innerhalb von 7 Tagen unter ATc-Inkubation von 84,2 % auf 23,5 % ab. *In vivo* kam es zu einer Abnahme der Proliferation von 36,5 % in den Kontrollen auf  $34,8 \pm 8,2$  % nach einem Tag,  $10,3 \pm 8,9$  % nach 3 Tagen und  $8,3 \pm 2,7$  % nach 7 Tagen ATc-Behandlung (Schiffer et al., 2003). Auch die H-Ras und die BXB-Raf1 Tumore zeigten eine deutliche Abnahme der Proliferation nach Ausschalten der transfizierten Gene. Da sowohl HER-2 als auch H-Ras und Raf1 über ERK einen proliferationsfördernden Einfluss auf die Zelle haben (Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000), ist der beobachtete Proliferationsstopp nach Ausschalten der Gene nicht unerwartet. Trotzdem ergibt sich ein interessantes Bild, wenn man die Abnahme der Proliferation direkt mit dem Tumolvolumen vergleicht (Abbildung 5.1).

### A. HER-2 Tumore



### B. H-Ras Tumore



### C. BXB-Raf1 Tumore

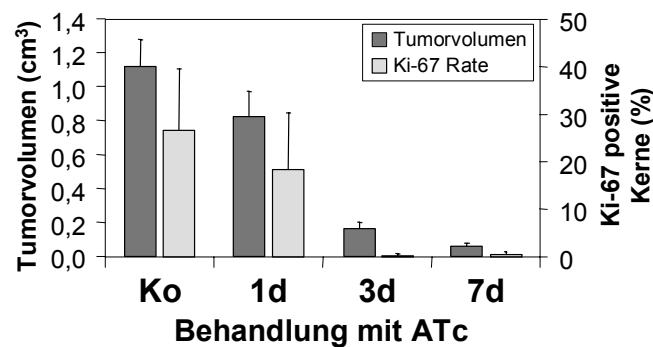


Abbildung 5.1: Vergleich der Proliferation mit dem Tumorvolumen

In den Diagrammen sind die Anzahl der Ki-67 positiven Kerne und das Tumorvolumen nach ATc-Behandlung in den HER-2 Tumoren (A), den H-Ras Tumoren (B) und den BXB-Raf1 Tumoren (2. Klon) (C) gegenübergestellt. A. Die Daten für das Tumorvolumen entsprechen den Messdaten der Kurve der HER-2 Tumore mit dauerhafter ATc-Behandlung in Abbildung 4.24. Die Daten für Ki-67 stammen von Schiffer et al. (2003). B. und C. Die Daten für das Tumorvolumen entsprechen denen in Abbildung 4.7. Die Daten für Ki-67 entsprechen denen in Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14.

Es zeigte sich, dass die Proliferation zeitgleich mit dem Tumorvolumen abnahm. Betrachtet man die HER-2 und die BXB-Raf1 Tumore, so fällt auf, dass nach einem Tag ATc-Behandlung zwar das Tumorwachstum schon stagnierte bzw. zurück ging, die



Proliferationsrate jedoch noch mit der in der Kontrolle vergleichbar war. Das gleiche galt auch für die H-Ras Tumore, betrachtet man hier den Unterschied zwischen Tag 1 und Tag 3. An Tag 1 befand sich der Tumor noch im Wachstum, an Tag 3 stagnierte das Tumorstadium. Die Proliferation war jedoch an Tag 1 und Tag 3 vergleichbar. Die Tumore zeigten also schon vor Abnahme der Ki-67 positiven Zellen eine Stagnation des Wachstums, weshalb die Abnahme der Proliferation nicht der Auslöser für den Tumorrückgang sein sollte. Heidebrecht et al. (1996) zeigten, dass die von Ki-67 detektierten Proteine eine ungefähre Halbwertszeit von 90 min besitzen. Nach 3 Stunden konnten sie das Protein nicht mehr nachweisen. Sollte ein Proliferationsstopp also die Tumorremission auslösen, so müsste nach einem Tag ATc-Behandlung schon eine deutliche Abnahme der Ki-67 positiven Zellen zu verzeichnen sein. Sollte die von Heidebrecht et al. (1996) bestimmte Halbwertszeit für Ki-67 im vorliegenden Modell jedoch nicht zutreffen, d.h. die Halbwertszeit wäre bedeutend länger, dann könnte es sein, dass die Proliferation der Tumore vor der beobachteten Stagnation des Wachstums abnahm. In diesem Falle könnte der Proliferationsstopp doch einen Auslöser der Tumorremission darstellen. Es kann nicht gesagt werden, wie wahrscheinlich diese Annahme ist, da eine eigene Bestimmung der Halbwertszeit von Ki-67 nicht vorgenommen wurde. Es kann jedoch mit Sicherheit gesagt werden, dass es im späteren Verlauf der Tumorremission durch den ausgelösten Proliferationsstopp zu einer effektiven Unterdrückung des Tumorstadiums und damit zu der lang anhaltenden Tumorremission kommt.

## **5.7 Die Tumore zeigten keine Induktion von Apoptose im Caspase-3 Western Blot nach Ausschalten von H-Ras bzw. BXB-Raf1**

Der wichtigere Faktor für die Tumorremission, wie ihn Schiffer et al. (2003) für die HER-2 Tumore beschrieben hatten, ist die Induktion von Apoptose nach Herunterregulation von HER-2. Deshalb wurden auch die H-Ras und die BXB-Raf1 Tumore auf Apoptose untersucht. Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein komplexer Prozess, an dem viele Faktoren beteiligt sind. Somit stehen verschiedenste Methoden zur Detektion von Apoptose zur Verfügung. Bei Schiffer et al. (2003) wurde die Induktion der Apoptose auf drei Arten festgestellt: (i) durch Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels des TUNEL-Assays, (ii) durch Detektion der Spaltprodukte von PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) mittels Western Blot und (iii) durch Detektion der aktiven Caspase-3 mittels Western Blot. Mit allen drei Methoden konnte eine Induktion der Apoptose nachgewiesen werden. Da die ersten beiden Methoden jedoch technische Probleme aufwiesen (Schiffer et al., 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Apoptose ausschließlich die Caspase-3 im Western Blot untersucht. Bei der Arbeit von Schiffer et al. wurde keine Quantifizierung des Caspase-3 Western Blots vorgenommen, so dass die Ergebnisse im folgenden nur in ihrer Tendenz

verglichen werden können, und nicht in absoluten Zahlen. Stattdessen werden auch die Ergebnisse des TUNEL-Assays aufgeführt.

Im TUNEL-Assay zeigte sich nach Ausschalten von HER-2 in den Tumoren eine deutliche Zunahme der TUNEL-positiven Kerne, d.h. der Kerne, die DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche enthalten. Nach einem Tag waren es 15,9 %, nach 3 Tagen 52,7 % und nach 7 Tagen 62,5 % (Schiffer et al., 2003). Die Kontrolltumore wiesen eine hohe Spontanapoptose mit im Mittel 21 % TUNEL-positiver Kerne auf. Die aktive Caspase-3 zeigte im Western Blot das stärkste Signal nach einem Tag ATc-Behandlung. In den Kontrollen war ein deutliches Signal zu erkennen, es war jedoch schwächer als in den 1-Tage-ATc Tumoren. In den 3-Tage und den 7-Tage Tumoren konnte kaum mehr aktive Caspase-3 nachgewiesen werden. Dies wurde mit dem allgemeinen Zelluntergang im Laufe der Remission erklärt.

In den H-Ras und den BXB-Raf1 Tumoren konnte nach Ausschalten der Gene zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme der aktiven Caspase-3 festgestellt werden. Die Menge an aktiver Caspase-3 war stets geringer als in den entsprechend alten Kontrolltumoren. Die Kontrolltumore selbst zeigten ein recht deutliches Signal, d.h. die Spontanapoptose in den Kontrolltumoren war hoch und nahm sogar mit dem Alter der Tumore zu. Eine zunehmende Spontanapoptose konnte auch in den HER-2 Tumoren nachgewiesen werden (Schiffer et al., 2003). Die Kontrolltumore schienen sich also in Bezug auf die Apoptose ähnlich zu verhalten. Nach 7 und 10 Tagen bei den H-Ras Tumoren bzw. nach 3 und 7 Tagen bei den BXB-Raf1 Tumoren, also in dem Zeitraum, in dem die Tumorremission schon ein paar Tage eingesetzt hatte, kam es zu einer deutlichen Abnahme der aktiven Caspase-3. In manchen Tumoren war sie sogar nicht mehr nachweisbar. Auch dieser Befund stimmte mit dem der HER-2 Tumore überein. Der einzige Unterschied war also, dass weder in den H-Ras noch in den BXB-Raf1 Tumoren eine Zunahme der aktiven Caspase-3 nachgewiesen werden konnte. Dies ist in sofern erstaunlich, da beide Tumore einen starken Tumorrückgang verzeichneten.

Die Caspase-3 gehört zur so genannten Gruppe der „Todes-Caspasen“ und ist an fast allen Formen des apoptotischen Zelltods beteiligt (Marks et al., 1998). Man kann also davon ausgehen, dass es zu keiner Induktion von Apoptose kommt, wenn die Caspase-3 nicht aktiviert wird. In den H-Ras Tumoren könnte es theoretisch nach Ausschalten von H-Ras durch die dadurch nicht mehr vorhandene Aktivierung der PI3K (Macaluso et al., 2002) zu einer Induktion von Apoptose kommen. Die Untersuchungen des p-Akt Levels zeigten jedoch, dass die Tumore auch nach Ausschalten von H-Ras einen hohen Level an p-Akt aufwiesen und damit ein ausreichend anti-apoptotischer Einfluss zu erwarten war. Die BXB-Raf1 Tumore sollten keinen Einfluss auf die Aktivität von Akt haben, und somit über diesen Weg auch nicht die Apoptose beeinflussen können. In beiden Fällen wären aber auch andere Wege zur Induktion von Apoptose denkbar.

Die einfachste Erklärung ist, dass die Tumore durch Störung des Gleichgewichts zwischen apoptotischen und proliferationsfördernden Faktoren in Apoptose gingen. In den

Kontrolltumoren vermag die durch ERK vermittelte Proliferation den Einfluss der beobachteten Spontanapoptose überlagern, die Tumore zeigen ein deutliches Wachstum. Durch Ausschalten der Proliferation könnte nun die vorhandene Spontanapoptose in den Vordergrund treten. Es könnte zu einer Induktion von Apoptose in den Tumoren kommen, ohne dass die Menge der aktiven Caspase-3 erhöht sein müsste. Für diese Theorie spricht, dass die Menge an aktiver Caspase-3 in den Tumoren, bei denen ein erster Tumorrückgang zu verzeichnen war (d.h. Tag 3 für die H-Ras Tumore und Tag 1 für die BXB-Raf1 Tumore), noch mit der Menge an aktiver Caspase-3 in den Kontrolltumoren vergleichbar war. Erst später kam es zu einer Abnahme der aktiven Caspase-3. Die vorhandene aktive Caspase-3 am ersten Tag des Tumorrückgangs könnte ausreichend sein, um den Prozess der Tumorremission auszulösen. Gegen die Theorie spricht jedoch, dass auch die Proliferation an diesem Tag noch mit der in der Kontrolle vergleichbar war, es also überhaupt nicht zu einer Störung des Gleichgewichtes kam. Erst später kam es zu einer Abnahme der Proliferation, dann hatte aber auch schon die aktive Caspase-3 abgenommen, d.h. das Gleichgewicht war auch zu diesen Zeitpunkten nicht wesentlich gestört. Zudem war dann die Tumorremission sowieso schon in Gange. Die Theorie könnte nur dann zutreffen, wenn die Annahme zuträfe, dass die Proliferation doch schon sofort nach Ausschalten von HER-2 oder BXB-Raf1, bzw. schon an Tag 3 nach Ausschalten von H-Ras, abnahm, obwohl die Menge an Ki-67-positiver Zellen nicht abgenommen hatte (siehe Kapitel 5.6). Nur dann kann die in den Tumoren vorhandene Spontanapoptose als Auslöser für die Tumorremission angesehen werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Ausschalten der H-Ras bzw. BXB-Raf1 Expression in den Tumoren einen Stress für die Zellen bedeuten könnte, wodurch es zu einer Aktivierung der SAPK/JNK (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases) kommen könnte (Kyriakis et al., 1994; Johnson und Lapadat, 2002). Die SAPK/JNK gehört ebenso wie ERK zur Familie der MAP Kinasen. Im Gegensatz zu ERK besitzt sie jedoch vorwiegend proapoptotische Eigenschaften (Xia et al., 1995). Eine Induktion von Apoptose durch die SAPK/JNK sollte jedoch auch über die Caspase-3 vermittelt werden. Zudem konnte in den H-Ras Tumoren keine Aktivierung der JNK beobachtet werden (Heimerdinger et al., 2004). In den BXB-Raf1 Tumoren kam es zu einer Aktivierung der p54 Isoform der JNK, nicht jedoch der p46 Isoform. Yang et al. (2003) berichteten jedoch, dass gerade die p54 Isoform in Prostatakarzinomen eine proliferationsfördernde Wirkung besitzt, und somit eine Aktivierung in den BXB-Raf1 Tumoren nicht unbedingt eine Induktion von Apoptose bedeuten muss. Die beobachtete Tumorremission ist also auch nicht durch eine Aktivierung der SAPK/JNK ausgelöst worden.

Alternativ zur Apoptose könnte ein Tumorrückgang durch Nekrose erklärt werden. Typische nekrotische Bereiche konnten jedoch optisch in den Tumoren nicht festgestellt werden (siehe Gewebsschnitte in Kapitel 4.5.2). Eine genauere Untersuchung auf Nekrose wurde nicht vorgenommen, sollte jedoch zum besseren Verständnis der Tumorremission in einer weiterführenden Arbeit durchgeführt werden. Auf der Basis der bislang vorliegenden Ergebnisse ist noch nicht vollständig interpretierbar, ob eine Induktion von Apoptose auftritt

oder nicht, und welche Rolle sie spielt. Eventuell liegen sogar nur technische Probleme bei der Bestimmung der aktiven Caspase-3 vor, wodurch keine Zunahme derselben bestimmt werden konnte, obwohl es in den Tumoren zu einer Induktion der Apoptose kam. Der Aspekt der Apoptose in den H-Ras bzw. BXB-Raf1 Tumoren sollte in weiteren Studien noch eingehender untersucht werden, um entgültig herausfinden zu können, was zu der beobachteten Tumorremission führt. Solange wird jedoch die Induktion der Apoptose durch Störung des Gleichgewichts zwischen proliferationsfördernden und apoptotischen Signalen trotz der Widersprüche als am wahrscheinlichsten angesehen.

## **5.8 Die Dephosphorylierung von ERK ging der Tumorremission voraus**

ERK stellt den Endpunkt des Ras-MAP Kinase Signalweges dar. Durch Aktivierung von ERK kommt es zu einer Reihe von Signalweiterleitungen, darunter die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-myc, c-fos und c-jun (Busse et al., 2000; Harari und Yarden, 2000; Ishikawa et al., 1997, Karunagaran et al., 1996, Zwick et al., 2000 und 2001). Letztendlich kommt es zu einer Aktivierung von Cyclin D1, welches eine zentrale Rolle in der Zellzyklusprogression spielt (Zwick et al., 2001). ERK besitzt somit einen direkten Einfluss auf die Proliferation.

Nach Ausschalten von HER-2 kam es zu einem raschen Rückgang der phosphorylierten Form von ERK (p-ERK) innerhalb von einem Tag auf 17,8 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 3 Tagen nahm die Menge an p-ERK weiter ab auf 7,5 % und nach 7 Tagen auf 4,8 % (Heimerdinger et al., 2004). Die BXB-Raf1 Tumore zeigten einen mit den HER-2 Tumoren vergleichbaren Rückgang. Bei den H-Ras Tumoren nahm die Menge an p-ERK erst nach 3 Tagen deutlich ab, und damit an dem Tag, an dem auch der Tumorrückgang einsetzte. Die Abnahme war mit der der BXB-Raf1 Tumore vergleichbar. Wie schon bei Ki-67 und der Caspase-3 zeigte sich bei den H-Ras Tumoren eine Verschiebung der Effekte um 3 Tage, dem Zeitraum, in dem die H-Ras Tumore noch weiter wuchsen. Trotz Herunterregulation von H-Ras nach einem Tag ATc-Behandlung kam es also zu einer zeitverzögerten Unterbindung der Signalweiterleitung, d.h. dass andere Faktoren zuerst noch das Tumorstadium aufrechterhalten konnten. Danach zeigten sich aber dieselben Effekte wie in den HER-2 oder den BXB-Raf1 Tumoren.

Vergleicht man die Abnahme der Menge an p-ERK in den HER-2, H-Ras oder BXB-Raf1 Tumoren mit dem Tumorstadium (Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3), so erkennt man, dass in allen drei Fällen stets zuerst eine Abnahme von p-ERK zu verzeichnen war, und danach der Tumorrückgang einsetzte. Die HER-2 Tumore stagnierten in ihrem Wachstum nach einem Tag ATc-Behandlung, die Menge an p-ERK hatte jedoch schon um ca. 82 % abgenommen. Auch die H-Ras Tumore zeigten an Tag 3 eine Stagnation des Tumorstadiums, die Menge

an p-ERK hatte jedoch um ca. 69 % abgenommen. Die BXB-Rafl Tumore zeigten zwar schon an Tag 1 einen leichten Tumorrückgang, die Menge an p-ERK hatte jedoch im Vergleich dazu stärker abgenommen. Die Abnahme der phosphorylierten Form von ERK ging also immer der Tumorremission voraus.

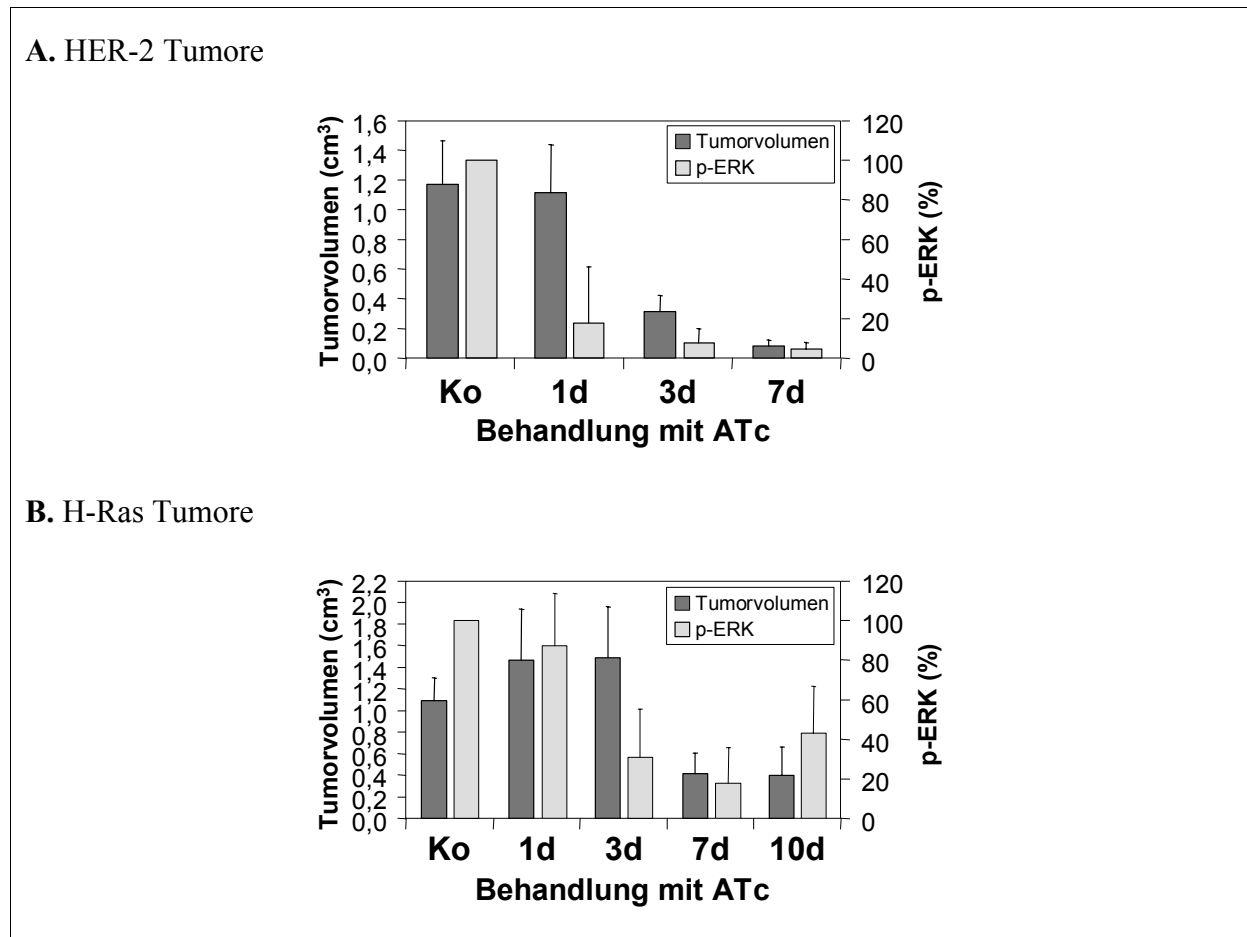
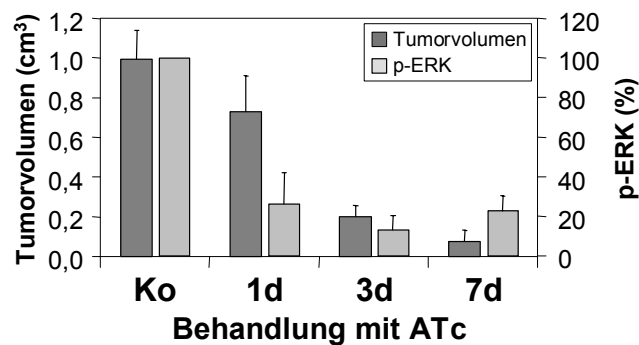


Abbildung 5.2: Vergleich des Tumorvolumens mit der Menge an p-ERK, Teil I

Im Diagramm sind das Tumorvolumen und die Menge an p-ERK nach ATc-Behandlung in den HER-2 Tumoren (A) und den H-Ras Tumoren (B) gegenübergestellt. **A.** Die Daten für das Tumorvolumen entsprechen den Messdaten der Kurve der HER-2 Tumore mit dauerhafter ATc-Behandlung in Abbildung 4.24. Die Daten für p-ERK stammen von Heimerdinger et al. (2004). **B.** Die Daten für das Tumorvolumen entsprechen denen in Abbildung 4.7. Die Daten für p-ERK entsprechen denen in Abbildung 4.17.

### A. BXB-Raf1 Tumore (1. Klon)



### B. BXB-Raf1 Tumore (2. Klon)

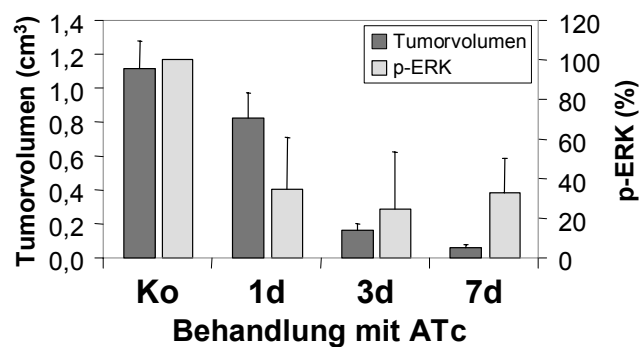


Abbildung 5.3: Vergleich des Tumorvolumens mit der Menge an p-ERK, Teil II

Im Diagramm sind das Tumorvolumen und die Menge an p-ERK nach ATc-Behandlung in den BXB-Raf1 Tumoren (A. 1. Klon; B. 2. Klon) gegenübergestellt. Die Daten für das Tumorvolumen entsprechen denen in Abbildung 4.7. Die Daten für p-ERK entsprechen denen in Abbildung 4.18.

Die Abnahme von p-ERK war das einzige in dieser Arbeit untersuchte Ereignis, dass vor der Tumorremission eintrat, abgesehen von der Herunterregulation der transfizierten Gene. Alle anderen Ereignisse traten zeitgleich oder sogar nach Beginn der Tumorremission ein. Damit scheint ERK eine bedeutende Rolle in der Tumorremission zu haben. Die Herunterregulation von aktivem phosphoryliertem ERK hat natürlich die Abnahme der Proliferation zur Folge. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass ERK auch noch andere Einflüsse hat, damit die Tumorremission überhaupt erst in Gang gesetzt werden kann. Ansonsten könnte nur die Herunterregulation der transfizierten Gene selbst einen zusätzlichen Einfluss auf die Tumorbilologie besitzen, die bislang noch nicht beschrieben wurde. Da es eher unwahrscheinlich ist, dass alle drei Gene unabhängig voneinander einen Einfluss auf denselben Faktor haben, muss die Tumorremission durch Raf oder einem Effektor von Raf, zu denen auch ERK gehört, auf einem unbekanntem Weg ausgelöst worden sein. Raf könnte also womöglich mehr Einfluss haben als bisher beschrieben.

## **5.9 Deaktivierung und Degradierung des Akt Gesamtproteins scheint eine Folge der Tumorremission zu sein**

Akt stellt den Endpunkt eines anderen Signalweges dar, der durch HER-2 aktiviert werden kann. Durch Aktivierung von Akt kommt es zur Inaktivierung der pro-apoptotischen Faktoren Bad und Caspase-9 sowie zur Aktivierung der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> (Chen et al., 2001). Somit hat eine Aktivierung von Akt eine anti-apoptotische Wirkung. Ausschalten von HER-2 in den HER-2 abhängigen Tumoren hatte eine Abnahme der phosphorylierten Form von Akt (p-Akt) nach 3 Tagen zur Folge. Zum selben Zeitpunkt kam es auch zu einer Abnahme des Akt Gesamtproteins, die jedoch ein wenig schwächer ausfiel als die Abnahme von p-Akt. Die Menge an p-Akt betrug nach einem Tag 127,2 %, nach 3 Tagen 21,1 % und nach 7 Tagen 31,0 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Menge des Akt Gesamtproteins betrug nach einem Tag 87,5 %, nach 3 Tagen 33,6 % und nach 7 Tagen 39,5 % (Heimerdinger et al., 2004). Die Abnahme sowohl von p-Akt als auch des Akt Gesamtproteins geschah damit erst zu einem Zeitpunkt, an dem die Tumore schon in Remission waren. Auch konnte die Induktion der Apoptose vor der Abnahme von p-Akt beobachtet werden. Damit ist eine durch Inaktivierung von Akt vermittelte Induktion der Apoptose ausgeschlossen. Trotzdem wurden auch die H-Ras und die BXB-Raf1 Tumore auf p-Akt und Akt untersucht.

In den H-Ras Tumoren kam es zu keiner großen Änderung der Menge an p-Akt oder Akt. Das Signal blieb dabei im Western Blot auf einem hohen Niveau. Da H-Ras aber direkt die PI3K aktivieren kann (Macaluso et al., 2002), und damit auch Akt, sollte es nach Herunterregulation von H-Ras auch zu einer Abnahme von p-Akt kommen. Dass dies nicht der Fall war, weist darauf hin, dass die Tumorzellen bereits eine weitere Mutation erhalten haben, die unabhängig von dem transfizierten H-Ras zu einer Aktivierung von Akt führte. Das starke p-Akt Signal kann mit erklären, warum es in den H-Ras Tumoren zu keiner Induktion der Apoptose kam.

Die BXB-Raf1 Tumore aus den beiden Klonen zeigten ein unterschiedliches Bild in Bezug auf p-Akt. Im 1. Klon kam es nach einem Tag ATc-Behandlung zu einer starken Zunahme des p-Akt Signals. Nach 3 Tagen war das Signal wieder mit der Kontrolle vergleichbar, und nach 7 Tagen kam es wieder zu einer Erhöhung des Signals. Ausschalten von BXB-Raf1 führte im 2. Klon zu einer leichten aber stetigen Abnahme von p-Akt bereits nach einem Tag. Die Abnahme war nicht so stark wie bei den HER-2 Tumoren, nach 7 Tagen waren es aber immerhin beinahe 50 %. Ein direkter Vergleich der Kontrollen der H-Ras und BXB-Raf1 Tumore zeigte, dass das p-Akt Signal in den Tumoren des 1. Klons deutlich schwächer war als in den anderen beiden Tumorarten. Das niedrige p-Akt Signal kann zwei Ursachen haben: Zum einen könnte Akt generell in den BXB-Raf1 Tumoren nicht stark aktiviert sein, da ja Raf keinen Einfluss auf Akt haben sollte. Zum anderen kann das schwache p-Akt Signal durch den Wachstumsverlauf der Kontrolltumore erklärt werden, da diese genau in dem Zeitraum der Bestimmung eine Stagnation des Wachstums aufwiesen. Diese Stagnation könnte mit

einer Deaktivierung von Akt einhergehen. Die erste Ursache ist in sofern unwahrscheinlich, da die Tumore des 2. Klons ein p-Akt Signal aufwiesen, dass beinahe so stark wie das der H-Ras Tumore war. Da diese Kontrolltumore zudem ein stetiges Wachstum aufwiesen, wird davon ausgegangen, dass die zweite Ursache zutrifft.

Die Abnahme von p-Akt in den BXB-Raf1 Tumoren des 2. Klons ist unerwartet, da ja Raf keinen direkten Einfluss auf Akt haben sollte. Entweder kann Raf also doch eine Dephosphorylierung von Akt bewirken, oder aber die Dephosphorylierung ist eine Folge der Tumorremission und nicht die Tumorremission eine Folge der Akt Dephosphorylierung. Da in den HER-2 Tumoren p-Akt erst nach Einsetzen der Tumorremission abnahm, ist letzteres wahrscheinlicher. Die Tumore des 2. Klons der NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen zeigten außerdem auch eine Abnahme des Akt Gesamtproteins, diese war jedoch schwächer ausgeprägt als bei den HER-2 Tumoren. Eine mögliche Rolle bei der Abnahme von p-Akt als auch des Akt Gesamtproteins könnte das Heat-shock-protein 90 (HSP90) spielen. Solit et al. (2003) zeigten, dass HSP90 zur Stabilisierung von Akt notwendig ist. Ohne funktionelles HSP90 kommt es zu einer raschen Inaktivierung und Degradierung von Akt. HSP90 schützt aber auch andere Proteine, darunter HER-2 und Raf (Zhang und Burrows, 2004; Citri et al., 2004; Stancato et al., 1997; Schulte et al., 1996). Somit konkurrieren HER-2, Raf1 und Akt um die Komplexbildung mit HSP90. Es wäre nun möglich, dass durch die rasche Herunterregulation von HER-2 oder Raf1 in den Tumoren die Komplexbildung von HSP90 insgesamt gestört werden könnte. Dadurch könnte Akt aus dem Komplex mit HSP90 gelöst werden, was zu der beobachteten Abnahme der Phosphorylierung und auch zu der Abnahme des Gesamtproteins führen könnte.

## **5.10 Anhydrotetracyclin kann die HER-2 Expression *in vivo* lang anhaltend unterdrücken**

Zum besseren methodischen Verständnis des Maustumormodells, wurden zwei HER-2 Studien durchgeführt. Ziel war es, zum einen festzustellen, ob die HER-2 Expression in dem Modell reversibel ist. Außerdem sollte festgestellt werden, ob eine kürzere ATc-Behandlung den Tumorverlauf beeinflusst. Die NIH3T3 HER-2 Zellen zeigten *in vitro* bereits einen Tag nach Ende einer ATc Inkubation ein HER-2 Signal im Western Blot. Das Signal war zwar noch schwächer als in der Kontrolle, es zeigte aber, dass die Wirkung des ATcs nach einem Tag nicht mehr sehr effektiv war. Überträgt man diese Beobachtung auf die *in vivo* Situation, so sollte nach Beendigung einer ATc-Behandlung recht bald wieder die HER-2 Expression einsetzen, und dadurch auch wieder das Tumorwachstum. Deshalb wurden Mäuse mit HER-2 Tumoren über 5 Tage mit ATc behandelt. Bis zu diesem Zeitpunkt betrug das Ausmaß der Remission für gewöhnlich etwa 85 %, d.h. es wäre noch ein deutliches Tumorrestvolumen vorhanden. Würde die HER-2 Expression nach einem Tag wieder einsetzen, und würde das



Tumorwachstum mit höchstens 2 Tage Verzögerung auch wieder einsetzen, so wären die Tumore mit großer Wahrscheinlichkeit nie ganz verschwunden gewesen, d.h. das erneute Wachstum würde aus dem Primärtumor direkt hervorgehen. Sobald der Tumor erneut einen mittleren Durchmesser von  $1,2 \pm 0,1$  cm erreicht hätte, würde eine zweite ATc-Behandlung über 5 Tage vorgenommen. Dadurch sollte festgestellt werden, ob HER-2 auch ein zweites Mal herunterregulierbar wäre, und ob es zu einer vergleichbaren Remission käme. Parallel sollten Mäuse mit HER-2 Tumoren solange mit ATc behandelt werden, bis das in der Dauertherapie beobachtete Rezidivwachstum einsetzte. Ziel war es, damit beweisen zu können, dass trotz HER-2 Expression das Rezidivwachstum HER-2 unabhängig wäre, d.h. ein erneutes Ausschalten von HER-2 keine Auswirkung auf das Tumorwachstum mehr hätte.

Die Beobachtung der Tumorentwicklung brachte jedoch ein unerwartetes Ergebnis. Eine 5-tägige ATc-Behandlung zeigte eine genauso effektive Tumorremission wie eine ATc Dauertherapie. Die Tumore gingen genauso stark zurück, und die Remission dauerte genauso lange wie wenn die Mäuse täglich ATc bekamen. Eine zweite ATc Behandlung wurde dann trotzdem mit den entstandenen Rezidivtumoren durchgeführt. Auch die Tumore, die bis zum beginnenden Rezidivwachstum mit ATc behandelt wurden, wurden ein zweites Mal mit ATc behandelt. In beiden Fällen kam es zu keiner Änderung des Wachstums. Eine Untersuchung der Tumore zeigte, dass es nach der 5-tägigen ATc-Behandlung und mehr als 20 Tagen ATc Abstinenz zu einer erneuten HER-2 Expression in den Rezidivtumoren kam. Diese konnte auch wieder erfolgreich ausgeschaltet werden. Nach der langen Tumorremission hatten also Zellen überlebt, in denen HER-2 immer noch nach dem TET-OFF System regulierbar war. In den Tumoren, die bis zum beginnenden Rezidivwachstum mit ATc behandelt wurden, konnte keine HER-2 Expression nachgewiesen werden. Unklar war in dem Fall, ob die lange ATc-Behandlung die Funktion des TET-OFF Systems zerstört hatte, oder ob die HER-2 Expression trotz mehrerer Tage Behandlungspause immer noch erfolgreich unterdrückt war. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Rezidivtumore wirklich HER-2 unabhängig wuchsen, denn selbst ein erneutes Ausschalten von HER-2 machte keinen Unterschied im Verlauf der Rezidivtumore. Auch konnte gezeigt werden, dass eine ATc-Behandlung alleine keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte, d.h. die Tumorremission der Primärtumore beruht ausschließlich auf der Herunterregulation der transfizierten Gene.

Zur Überprüfung, wann die Tumore nach Beendigung einer ATc-Behandlung wieder HER-2 exprimieren, wurde eine zweite Studie durchgeführt. Die Mäuse wurden dafür nur über 3 Tage mit ATc behandelt. Zum einen sollte so herausgefunden werden, ob auch eine noch kürzere Behandlung zu einer vergleichbaren Remission führt. Zum anderen wurde so die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Tumore im Falle einer vergleichbaren Remission nicht zum längsten Zeitpunkt von 10 Tage nach Beendigung der ATc-Behandlung vollständig verschwunden wären. Die Tumorremission war tatsächlich auch nach einer 3-tägigen ATc-Behandlung vergleichbar. Die Western Blot Untersuchungen zeigten, dass die HER-2 Expression nach 10 Tagen immer noch unterhalb der Nachweisgrenze lag. Vermutlich war auch in den Rezidivtumoren der 5-tägigen ATc-Behandlung die HER-2 Expression noch

teilweise unterdrückt, da die Signale deutlich schwächer als die Signale der Kontrollen waren. In der Literatur wurden keine Werte für die Halbwertszeit von ATc in Mäusen oder anderen Säugetieren gefunden. Trotzdem ist eine Wirkung des ATcs über mehr als 20 Tage erstaunlich lang. Auch kann nach einer 3-tägigen Behandlungsdauer nicht von einer übermäßigen Aufaddierung der verabreichten Dosen ausgegangen werden. Durch einen täglichen Wechsel der Käfige nach Beendigung einer ATc-Behandlung wurde zudem versucht, die Wiederaufnahme von mit ATc belastetem Kot möglichst gering zu halten. Dass der Kot ausreichende Mengen an ATc enthält wurde bei der Etablierung des Maustumormodells festgestellt, als behandelte und noch nicht behandelte Mäuse weiterhin in demselben Käfig gehalten wurden. Die noch nicht behandelten Mäuse zeigten dann ohne ATc-Behandlung eine vergleichbare Tumorremission. Vermutlich kann sich das ATc sehr gut in den Mäusen z.B. im Fettgewebe anreichern. Auch ist unbekannt, ob die Abbauprodukte des ATcs auch noch eine Wirkung besitzen. Es wäre auch möglich, dass das System so empfindlich ist, dass selbst Spuren von ATc noch eine gute Wirkung erzielen könnten. Fest steht jedenfalls, dass die gewählte ATc Dosis und die Frequenz, mit der die Mäuse das ATc verabreicht bekommen, zwar für die Mäuse selbst unschädlich ist, jedoch eine Reduzierung durchaus angebracht wäre. Eine Verringerung der Dosis würde Materialkosten sparen, und eine Verringerung der Frequenz würde eine Erleichterung für Tier und Forscher darstellen.

## 5.11 Schlussfolgerung

Mit den NIH3T3 H-Ras und den NIH3T3 BXB-Raf1 Zellen stehen zwei neue Zelllinien zur Verfügung, mit deren Hilfe besser verstanden werden soll, wodurch es nach Ausschalten von HER-2 zu einer Tumorremission kommt. Ein Vergleich der Einflüsse von HER-2, H-Ras oder BXB-Raf1 auf die Tumorbiologie soll einen Hinweis darauf geben, welcher der von HER-2 vermittelten Signalwege eine Rolle in der beobachteten Tumorremission spielt. Nicht nur Ausschalten von HER-2, sondern auch Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1 führt zu Tumorremission, d.h. der Ras-MAP Kinase Signalweg muss maßgeblich an der Tumorremission nach Ausschalten von HER-2 beteiligt sein. ERK spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorremission, da die Dephosphorylierung und damit Deaktivierung von ERK als einziger der untersuchten Faktoren der Tumorremission vorausgeht. In den Tumoren kommt es nach Ausschalten der Gene zu einem Proliferationsstopp. Es scheint jedoch so, als ob eine Stagnation des Tumorwachstums schon vor der Abnahme der Ki-67 positiven Zellen beginnt. Der beobachtete Proliferationsstopp ist also möglicherweise nicht der Auslöser der Tumorremission. Auf Ebene der aktiven Caspase-3 weisen lediglich die HER-2 Tumore eine Induktion von Apoptose nach Ausschalten von HER-2 auf. In den H-Ras und BXB-Raf1 Tumoren kommt es zur Tumorremission ohne erhöhte Apoptoserate. Die Kontrolltumore weisen aber eine hohe Spontanapoptose auf, die auch noch am ersten Tag der beginnenden Tumorremission vorhanden ist. Der beobachtete Proliferationsstopp könnte das

Gleichgewichts zwischen proliferationsfördernder und apoptotischer Signale stören und dadurch bewirken, dass die Spontanapoptose ausreicht, die Tumore in die Remission zu bringen. Akt scheint keine Rolle in der beobachteten Tumorremission zu spielen, da die verschiedenen Tumorarten unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf den Phosphorylierungsgrad von Akt und damit dessen Aktivität aufweisen. Bei den HER-2 Tumoren und dem 2. Klon der BXB-Raf1 Tumore kommt es nach der ATc-Behandlung zu einer Abnahme von p-Akt und des Akt Gesamtproteins. Nach Ausschalten von H-Ras kommt es zu keiner wesentlichen Veränderung von p-Akt oder Akt. Der 1. Klon der BXB-Raf1 Tumore zeigte eine Zunahme von p-Akt, das Signal der Kontrolltumore ist jedoch recht schwach im Vergleich zu den anderen Tumorarten. Da zudem die Abnahme von p-Akt und des Akt Gesamtproteins erst 3 Tage nach Ausschalten von HER-2 bzw. BXB-Raf1 auftritt, ist es wahrscheinlicher, dass die Tumorremission zu einer Dephosphorylierung von Akt und einer Abnahme des Akt Gesamtproteins führt.

Die Tumorremission verläuft rasch und dauert bei den HER-2 und den BXB-Raf1 Tumoren über mindestens 10-15 Tage an. Bei einigen der Tumore war sogar optisch kein Tumor mehr erkennbar. Trotzdem zeigten alle Tumore nach einiger Zeit ein erneutes Tumorwachstum. Bei den H-Ras Tumoren schloss sich das erneute Tumorwachstum direkt an die Tumorremission an, d.h. es gab keinen Zeitraum, in dem die Tumore auf einer Tumorgröße stagnierten. In den Rezidiven der HER-2 Tumore war keine erneute HER-2 Expression detektierbar. Die H-Ras Rezidive wiesen ein erneutes H-Ras Signal von ca. 40 % im Vergleich zu den Kontrolltumoren auf. Bei den BXB-Raf1 Rezidiven war bei dem einen Klon keine BXB-Raf1 Expression detektierbar, und bei dem anderen Klon war die BXB-Raf1 Expression vergleichbar mit den Kontrolltumoren. Der Tumorverlauf war jedoch vergleichbar. Auch wenn in den Rezidivtumoren nach einer ATc Abstinenz HER-2 erneut exprimiert wird, so hat ein erneutes Ausschalten von HER-2 keinen Einfluss auf das Rezidivwachstum. Daraus lässt sich schließen, dass das beobachtete Rezidivwachstum unabhängig von dem transfizierten Gen ist. Es wird davon ausgegangen, dass so genannte „second hits“ das Rezidivwachstum verursachen. Die Entstehung der Rezidive beruht wahrscheinlich auf der verwendeten Zellmatrix, den NIH3T3 Mausfibroblasten, und nicht auf den transfizierten Genen, da auch schon die Wildtyp-Zellen nach einiger Zeit Tumore in Nacktmäusen erzeugen können (Schiffer et al., 2003).

## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Es ist bekannt, daß die Überexpression eines einzigen Onkogens im Tumorgewebe einen maligneren Phänotyp zur Folge haben kann. Ein Beispiel hierfür ist die Rezeptortyrosinkinase HER-2. Besonders in Mamma- und Ovarialkarzinomen tritt häufig eine HER-2 Überexpression auf, die mit einer schlechteren Prognose für die Patientinnen einhergeht. Die HER-2 blockierende Therapie mit Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) konnte zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit bei Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom führen. Es ist deshalb von großem Interesse herauszufinden, ob ein Tumor durch gezielte Blockade eines bestimmten Onkogens sein tumorigenes Potential verlieren kann, und dadurch das Tumorstadium zumindest zeitweise unterbunden wird. Die Frage ist also, ob ein Tumor reversibel sein kann, wenn die Expression seiner Onkogene blockiert wird. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Tumore, die konditional humanes HER-2 exprimierten, nach Ausschalten von HER-2 tatsächlich in Remission gingen, d.h. reversibel waren. Tumorgrößenabhängig konnte sogar eine vollständige Tumorremission beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit soll nun helfen, die beobachtete Remission nach Ausschalten von HER-2 besser verstehen zu können. Von Interesse sind dabei vor allem die molekularen Mechanismen, die in dem Tumor nach Ausschalten der HER-2 Expression ablaufen. Die konditionale Expression von HER-2 wurde mit Hilfe des TET-OFF Systems in NIH3T3 Mausfibroblasten erreicht. Mit dieser Technik wurde ein Maustumormodell etabliert, das ermöglichte, die Veränderungen in den Tumoren nach Ausschalten von HER-2 zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf zwei der durch HER-2 vermittelten Signalwege gerichtet, den Ras-MAP Kinase Signalweg und die Aktivierung von Akt über die Phosphoinositol-3 Kinase. Beide wurden nach Ausschalten der HER-2 Expression deaktiviert. Um herausfinden zu können, welcher der beiden Wege eine wichtigere Rolle bei der Tumorremission spielt, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei weitere Maustumormodelle zur konditionalen Expression von humanem H-Ras bzw. einer Form des humanen c-Raf-1 (BXB-Raf1) etabliert. Die Modelle funktionierten auf dieselbe Weise wie das HER-2 Maustumormodell und es wurden auch dieselben Faktoren untersucht. Ras und Raf sind Mitglieder des Ras-MAP Kinase Signalweges. Raf ist aber im Gegensatz zu HER-2 und Ras nicht in der Lage, Akt zu aktivieren. Durch Vergleich der Ergebnisse der drei Maustumormodelle war es deshalb möglich zu differenzieren, ob Einflüsse auf die Tumorentwicklung über den Ras-MAP Kinase oder den PI3K/Akt Signalweg vermittelt wurden. Auch Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1 führte zu einer raschen Tumorremission. Damit wurde erneut die Frage nach der Reversibilität eines Tumors beantwortet. Ob die Remission auf einer Induktion von Apoptose beruhte, konnte nicht endgültig geklärt werden, da es zwar nach Ausschalten von HER-2 zu einer Erhöhung der Apoptoserate kam, nicht jedoch nach Ausschalten von H-Ras oder BXB-Raf1. Aufgrund der vorhandenen Ergebnisse wird vermutet, dass es zu einer Störung des Gleichgewichtes zwischen proliferationsfördernden und apoptotischen Faktoren nach Ausschalten der Onkogene kam. Die in den Tumoren vorhandene Spontanapoptose könnte dann ausreichen, den Prozess der Tumorremission auszulösen. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ERK bzw. der Ras-MAP Kinase Signalweg die bedeutendere Rolle bei der Tumorremission spielte.

Zum einen wurde dies belegt durch die Beobachtung, dass die Tumorverläufe von HER-2 und BXB-Raf1 nahezu identisch waren. Zum anderen kam es in allen drei Modellen zu einer Dephosphorylierung von ERK, die der Tumorremission als einziger der untersuchten Faktoren vorausging. Akt schien dagegen keine Rolle zu spielen, da das Ausschalten der HER-2, H-Ras oder BXB-Raf1 Expression zu keiner einheitlichen Veränderung des Phosphorylierungsgrades von Akt führte. Auch sollte ja Raf, nach dessen Herunterregulation es zu einer deutlichen Remission kam, keinen Einfluss auf Akt besitzen. Demnach ist die Blockade des Ras-MAP Kinase Signalweges, der hauptsächlich proliferationsfördernde Eigenschaften besitzt, wichtiger für die Tumorremission als die Blockade des PI3K/Akt Signalweges, der hauptsächlich anti-apoptotische Eigenschaften vermittelt.

## **7 LITERATURVERZEICHNIS**

**Baasner S**, Melchner H, Klenner T, Hilgard P, Beckers T. Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER2/c-erbB2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1996;13:901-11.

**Banić A**. Dissertation, Fachbereich Medizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz 2003.

**Baselga J**. Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). *Eur J Cancer* 2001;37:18-24.

**Baselga J**, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Henderson IC, Norton L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:737-44.

**Beerli RR**, Graus-Porta D, Woods-Cook K, Chen X, Yarden Y, Hynes NE. Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2. *Mol Cell Biol* 1995;15:6496-6505.

**Beerli RR**, Hynes NE. (1996) Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of erbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 1996;271:6071-6.

**Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

**Burden S**, Yarden Y. Neuregulins and their receptors: a versatile signalling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron* 1997;18:847-55.

**Burris HA**. Docetaxel (Taxotere) plus trastuzumab (Herceptin) in breast cancer. *Semin Oncol* 2001;28:38-44.

**Busse D**, Doughty S, Arteaga CL. HER-2/neu (erbB-2) and the cell cycle. *Semin Oncol* 2000;27(6):3-8.

**Carraway KL 3rd**, Cantley CL. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signalling. *Cell* 1994;78:5-8.

**Carraway KL 3rd**. Involvement of the neuregulins and their receptors in cardiac and neural development. *Bioassays* 1996;18:263-6.

**Carraway KL 3rd**, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai K. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature* 1997;387: 512-16.

**Chang H**, Riese DJ 2nd, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 1997;387:509-12.



**Chen F**, Demers LM, Shi X. Upstream signal transduction of NF-kappaB activation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1(2):137-49.

**Citri A**, Kochupurakkal BS, Yarden Y. The achilles heel of ErbB-2/HER2: regulation by the Hsp90 chaperone machine and potential for pharmacological intervention. *Cell Cycle* 2004;3(1):51-60.

**Citri A**, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284:54-65.

**Cobleigh MA**, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.

**Crews C**, Alesandrini A, Erikson R. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 1992;258:478-80.

**Engel J**, Schmidt M, Schubert-Fritschle G, Tretter W, Hölzel D. Jahresbericht 1999 des klinisch-epidemiologischen Krebsregisters am Tumorzentrum München – Schwerpunkt: Gynäkologische Tumoren. Zuckschwerdt, München Bern Wien New York, 2000.

**Engel J**, Schubert-Fritschle G, Hölzel D. Epidemiologie. Manual Mammakarzinome, Tumorzentrum München, 2001.

**Fowler K**, Walker JF, Alexander W, Hibbs ML, Nice EC, Bohmer M, Mann GB, Thumwood C, Maglitto R, Danks JA. A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1465-9.

**Gassmann M**, Lemke G. Neuregulins and neuregulin receptors in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 1997;7:87-92.

**Gossen M**, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5547-51.

**Gossen M**, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995;268:1766-69.

**Graus-Porta D**, Beerli RR, Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 1995;15:1182-91.

**Graus-Porta D**, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J*, 1997;16:1647-55.

**Harari D**, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000;19:6102-14.

**Heidebrecht HJ**, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif* 1996;29(7):413-25.

**Heimerdinger CK**, Schiffer IB, Fritz G, Gebhard S, Banić A, Baasner S, Gilbert S, Oesch F, Hengstler JG. Conditional expression of HER-2, H-Ras and BXB-Raf1 in a mouse tumor model: Relation of tumor remission to phosphorylation of ERK1/2, Akt, p38 MAPK and JNK. *Naunyn Schmiedeberg's Arch* 2004;369:R 128 511.

**Hengstler JG**, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M, Knapstein PG, Becker R, Oesch F, Tanner B. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase II $\alpha$  to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 1999;59:3206-14.

**Holmes WE**, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 1992;256:1205-10.

**Hynes N**, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:165-84.

**Ishikawa T**, Kobayashi M, Mai M, Suzuki T, Ooi A. Amplification of the c-erbB2 (HER-2/neu) gene in gastric cancer cells. Detection by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1997;151:760-68.

**Johnson GL**, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;298:1911-2.

**Karunakaran D**, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF Receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996;15:254-64.

**Kerkhoff E**, Rapp UR. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol* 1997;17(5):2576-86.

**Khokhlatchev AV**, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH. Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 1998;93:605-15.

**Kosako H**, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M, Nishida E. *Xenopus* MAP Kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J* 1992;11:2903-8.

**Kyriakis JM**, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;369:156-60.

**Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-85.

**Lee Jr JT**, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002;16:486-507.

**Lodish H**, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. Kapitel 20.5 MAP-Kinase-Signalwege. *Molekulare Zellbiologie* 4. Auflage 2001;950.

**Macaluso M**, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol* 2002;192:125-30.

**Marks N**, Berg MJ, Guidotti A, Saito M. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 1998;52:334-41.

**McCubrey JA**, Steelman LS, Hoyle PE, Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Franklin RA, Cherwinski H, Bosch E, McMahan M. Differential abilities of activated Raf oncoproteins to abrogate cytokine dependency, prevent apoptosis and induce autocrine growth factor synthesis in human hematopoietic cells. *Leukemia* 1998;12(12):1903-29.

**Micke P**, Hengstler JG, Oesch F, Buhl R. C-erbB-2 expression in small-cell lung cancer is associated with poor prognosis. *Int J Cancer* 2001;92(2):474-9.

**Mizutani S**, Inouye K, Koide K, Kaziro Y. Involvement of B-Raf in Ras-induced Raf-1 activation. *FEBS Lett* 2001;507:295-8.

**Moelling K**, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem* 2002;277:31099-106.

**Muir C**, Waterhouse J, Mack T. *Cancer Incidence in five Continents*. Vol 8 Lyon France: IARC Scientific Publication 88, 1987.

**Nagata K**, Kohda D, Hatanaka H, Ichikawa S, Matsuda S, Yamamoto T, Suzuki A, Inagaki F. Solution structure of the epidermal growth factor-like domain of heregulin-alpha, a ligand for p180erbB-4. *EMBO J* 1994;13:3517-23.

**Olayioye MA**, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159-67.

**O'Reilly SM**, Barnes DM, Campeljohr RS, Bartkova J, Gregory WM, Richards MA. The relation between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1991;63:444-6.

**Osoba D**, Slamon DJ, Burchmore M, Murphy M. Effects on quality of life of combined trastuzumab and chemotherapy in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(14):3106-13.

**Paik S**, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K, Brown A, Yothers G, Anderson S, Smith R, Wickerkam DL, Wolmark N. Real-world performance of HER2 testing--National surgical adjuvant breast and bowel project experience. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(11):852-4.

**Pianetti S**, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. HER-2/neu overexpression induces NF- $\kappa$ B via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$  that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 2001;20:1287-99.

**Plowman GD**, Green JM, Culouscou JM, Carlton GW, Rothwell VM, Buckley S. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 1993;266:473-5.

**Reese DM**, Slamon DJ. HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 1997;15:1-8.

**Riese DJ 2nd**, Bermingham Y, van Raaij TM, Buckley S, Plowman GD, Stern DF. Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* 1996;12:345-53.

**Rubin I**, Yarden Y. The basic biology of HER2. *Ann Oncol* 2001;12 Suppl 1:S3-8.

**Schiffer IB**, Gebhard S, Heimerdinger CK, Heling A, Hast J, Wollscheid U, Seliger B, Tanner B, Gilbert S, Beckers T, Baasner S, Brenner W, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Schreiber WG, Zabel B, Thelen M, Lehr HA, Oesch F, Hengstler JG. Switching off HER-2/neu in a tetracycline controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size dependent remission. *Cancer Res* 2003;63:7221-31.

**Schlessinger J**. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000;103:211-25.

**Schulte TW**, Blagosklonny MV, Romanova L, Mushinski JF, Monia BP, Johnston JF, Nguyen P, Trepel J, Neckers LM. Destabilization of Raf-1 by geldanamycin leads to disruption of the Raf-1-MEK-mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Mol Cell Biol* 1996 Oct;16(10):5839-45.

**Shapiro PS**, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froehlich-Ammon SJ, Garcia M, Osheroff N, Ahn NG. Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase II $\alpha$  through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999;19:3551-60.

**Shelton JG**, Steelman LS, Lee JT, Knapp SL, Blalock WL, Moye PW, Franklin RA, Pohnert SC, Mirza AM, McMahon M, McCubrey JA. Effects of the Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 2003;22:2478-92.

**Shi C**, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and Neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981;290:261-4.

**Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.

**Slamon DJ**, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-12.

**Solit DB**, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003;63:2139-44.

**Stancato LF**, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *J Biol Chem* 1997;272(7):4013-20.

**Stebbing J**, Copson E, O'Reilly S. Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000;26:287-90.

**Storm SM**, Rapp UR. Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors. *Toxicol Lett* 1993;67:201-10.

**Tzahar E**, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, Shelly M, Henis S, Eisenstein M, Ratzkin BJ, Sela M, Andrews GC, Yarden Y. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 1997;16:4938-50.

**Tzahar E**, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996;16:5276-87.

**Tzivion G**, Luo Z, Avruch J. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 1998;394:88-92.

**Ullrich A**, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-12

**Venter DJ**, Tuzi NL, Kumar S, Gullick WJ. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* 1987;2:69-72.

**Vogel C**, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:719-26.

**Wingo PA**, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995;45:8-30.

**Wong AK**, Chin L. An inducible melanoma model implicates a role for RAS in tumor maintenance and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:121-29.

**Xia Z**, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-31.

**Xie W**, Paterson AJ, Chin E, Nabell LM, Kudlow JE. Targeted expression of a dominant negative epidermal growth factor receptor in the mammary gland of transgenic mice inhibits pubertal mammary duct development. *Mol Endocrinol* 1997;11:1766-81.

**Yan J**, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273(37):24052-6.

**Yang YM**, Bost F, Charbono W, Dean N, McKay R, Rhim JS, Depatie C, Mercola D. C-Jun NH(2)-terminal kinase mediates proliferation and tumor growth of human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:391-401.

**Yu D**, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 2000;19:6115-21.

**Zhang H**, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of HSP90. *J Mol Med* 2004;82:488-99.

**Zhou BP**, Hu MCT, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY and Hung MC. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *J Biol Chem* 2000;275(11):8027-31.

**Zhou BP**, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung CM. Cytoplasmic localization of p21<sup>Cip/WAF1</sup> by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu overexpressing cells. *Nature Cell Biol* 2001;3:245-52

**Zwick E**, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:161-73.

**Zwick E**, Wallasch C, Ullrich A. HER2/neu: a target for breast cancer therapy. *Breast Disease* 2000;11:7-18.





## Publikationsliste

### Publikationen

**Hausherr CK**, Schiffer IB, Gebhard S, Banić A, Tanner B, Thoenes E, Beckers T, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Zabel B, Oesch F, Hengstler JG. Dephosphorylation of p-ERK1/2 is critical for tumor remission after HER-2 and Raf1 blocking therapy in a conditional mouse tumor model. submitted 2004.

Trost TM, Lausch EU, Fees SA, Schmitt S, Enklaar T, Reutzel D, Brixel LR, Schmidtke P, Maringer M, Schiffer IB, **Heimerdinger CK**, Hengstler JG, Fritz G, Bockamp EO, Prawitt D, Zabel BU, Spangenberg C. Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2005;65(3):840-9.

Eger K, Hermes M, Uhlemann K, Rodewald S, Ortwein J, Brulport M, Bauer AW, Schormann W, Lupatsch F, Schiffer IB, **Heimerdinger CK**, Gebhard S, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Zabel B, Sauer C, Tanner B, Kolbl H, Krugel U, Franke H, Illes P, Madaj-Sterba P, Bockamp EO, Beckers T, Hengstler JG. 4-Epidoxycycline: an alternative to doxycycline to control gene expression in conditional mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323(3):979-86.

Tanner B, Schiffer IB, **Heimerdinger C**, Glawatz C, Schmidt M, Brulport M, Hermes M, Pasuello V, Boehm DU, Neubert S, Naumann G, Kolbl H, Hengstler JG. Perspectives for HER-2 blocking strategies in the mouse model: Rapid tumor remission depending on the tumor stage but no long-term heating. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2004;64(8):821-830

Tanner B, Grimme S, Schiffer I, **Heimerdinger C**, Schmitt M, Dutkowski P, Neubert S, Oesch F, Franzen A, Kolbl H, Fritz G, Kaina B, Hengstler JG. Nuclear expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease increases with progression of ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 2004;92(2):568-77.

Schiffer IB, Gebhard S, **Heimerdinger CK**, Heling A, Hast J, Wollscheid U, Seliger B, Tanner B, Gilbert S, Beckers T, Baasner S, Brenner W, Spangenberg C, Prawitt D, Trost T, Schreiber WG, Zabel B, Thelen M, Lehr HA, Oesch F, Hengstler JG. Switching off HER-2/neu in a tetracycline controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size dependent remission. *Cancer Res* 2003;63:7221-31.

## Reviews

Hengstler JG, **Heimerdinger C**, Schiffer IB, Brulport M. Toxikologie und Kanzerogenität: Gibt es einen Schwellenmechanismus? Forum DKG 2003;6:26-30

Hengstler JG, **Heimerdinger CK**, Schiffer IB, Gebhard S, Sagemüller J, Tanner B, Bolt HM, Oesch F. Dietary topoisomerase-II-poisons: Contribution of soy products to infant leucemia? Excli J 2002;1:8-14

## Posterbeiträge

Schiffer IB, **Heimerdinger CK**, Gebhard S, Baasner S, Gilbert S, Oesch F, Hengstler JG. Switching off HER-2/neu in a tetracyclin-controlled mouse tumor model leads in spite of complete tumor remission to HER-2 independent recurrent tumor growth. Naunyn Schmiedeberg's Arch 2004;369:R 128 510

**Heimerdinger CK**, Schiffer IB, Gebhard S, Baasner S, Gilbert S, Beckers T, Oesch F, Hengstler JG. Conditional expression of H-Ras and Raf1: Influence on tumor development. Naunyn Schmiedeberg's Arch 2003;367:R 149 584

## Vorträge

**Heimerdinger CK**, Schiffer IB, Fritz G, Gebhard S, Banić A, Baasner S, Gilbert S, Oesch F, Hengstler JG. Conditional expression of HER-2, H-Ras and BXB-Raf1 in a mouse tumor model: Relation of tumor remission to phosphorylation of ERK1/2, Akt, p38 MAPK and JNK. Naunyn Schmiedeberg's Arch 2004;369:R 128 511

Schiffer IB, Gebhard S, **Heimerdinger CK**, Seliger B, Gilbert S, Beckers T, Baasner S, Oesch F, Hengstler JG. Switching off HER-2/neu in a tetracycline controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size dependent remission. Naunyn Schmiedeberg's Arch 2003;367:R 149 583

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Die Anfertigung erfolgte unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Literatur und Hilfsmittel.

Mainz, im Januar 2005

---

(Carolin Hausherr)

## Lebenslauf

### Carolin Kim Hausherr

geb. Heimerdinger

Diplom-Lebensmittelchemikerin

\* 03. Juli 1977 in Seoul, Süd-Korea

Am Gonsenheimer Spieß 107

55122 Mainz

Tel.: 0 61 31-570 24 89

Familienstand:

verheiratet, keine Kinder

### Schule

09/1987 – 06/1996                      Schelztor-Gymnasium, Esslingen

20/06/1996                                Abitur (Note 1,3)

### Studium und Promotion

10/1996 – 03/2001                      Studium der Lebensmittelchemie an der Universität  
Kaiserslautern

16/10/1998                                staatliche Vorprüfung

06/09/2000                                Erste Staatsprüfung

10/2000 – 03/2001                      Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. Dr. D. Schrenk  
Thema der Arbeit: Etablierung und Optimierung  
fluoreszenzgestützter Methoden zur Bestimmung der  
Zytotoxizität im Mikroplattenformat

31/03/2001                                Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemikerin (Note sehr gut)

11/2001 – 03/2005                      Promotion in der Toxikologie (bis 07/2004) und den Laboren  
der Frauenklinik (ab 08/2004) der Universität Mainz in der  
Gruppe von Prof. Dr. J.G. Hengstler und Dr. I.B. Schiffer

## **Auslandsaufenthalt**

02/2000 – 04/2000                      Forschungspraktikum im Rahmen des SOKRATES-  
Austauschprogramms im Laboratoire de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire der Université de Bourgogne, Dijon, Frankreich

## **Praktikum**

05/2001 – 09/2001                      Praktikum im Labor der Werksqualitätskontrolle der Firma  
Rich. Hengstenberg GmbH & Co. KG, Esslingen

## **Lehrtätigkeit und Studentenbetreuung während der Ausbildung**

Hauptstudium                              Betreuung von Studenten des 5. Fachsemesters im  
lebensmittelchemischen Praktikum (WS 99/00 und WS 00/01)

Promotion                                    Betreuung von 3 Praktikanten im Fortgeschrittenenpraktikum  
Biologie (SS 02),

Mitbetreuung von 2 medizinischen Doktoranden (WS 02/03 –  
WS 04/05),

Assistentin bei den Studentenveranstaltungen „Kursus  
Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie“  
(SS 03 und WS 03/04) sowie „Allgemeine Pharmakologie für  
Naturwissenschaftler“ (SS 04).