

**Konditionale Modellsysteme zur  
Untersuchung der ERBB2-induzierten  
Tumorgenese**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz**

**Tatjana Trost  
geb. in Stuttgart**

**Mainz, 2005**

**Dekan:**

**1. Berichterstatter:**

**2. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Für meine Eltern und Marcus**

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	
1.1	Die EGFR-Familie	1
1.2	Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2	6
1.3	Induzierbare Expressionssysteme	11
1.3.1	Geninduktion mit dem Tet-System	12
1.4	<i>In vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Modelle mit ERBB2-Relevanz	14
1.5	Zielsetzung	17
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	
2.1	Material und Reagenzien	19
2.1.1	Puffer und Lösungen	19
2.1.2	Enzyme	23
2.1.3	Verwendete <i>Kits</i>	23
2.1.4	Antikörper	23
2.1.5	Vektoren	23
2.1.6	Inhibitoren	24
2.1.7	Größenstandards	24
2.1.8	Bakterienstämme	24
2.1.9	Radioisotope	24
2.1.10	Chemikalien	24
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.12	Zellkulturmaterialien	25
2.1.13	Tiere	25
2.1.14	Geräte	26
2.1.15	Oligonukleotidsequenzen	27
2.2	Methoden	29
2.2.1	Arbeiten mit DNA und RNA	29
2.2.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.1.2	Gelelektrophorese mit Agarosegelen	29
2.2.1.3	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.1.4	Auffüllen von überhängenden DNA-Enden	30
2.2.1.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.2.1.6	Fällung von DNA	30
2.2.1.7	Dephosphorylierung von Vektoren	31
2.2.1.8	Ligation	31
2.2.1.9	Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan	31

---

2.2.1.10	Herstellung elektrokompeter Bakterien	32
2.2.1.11	Transformation mittels Elektroporation und Selektion positiver Klone	32
2.2.1.12	Transformation mittels Hitzeschock	32
2.2.1.13	Herstellung von <i>E. coli</i> -Glycerinkulturen	33
2.2.1.14	Screening rekombinanter Plasmide	33
2.2.1.15	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	33
2.2.1.16	Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen	34
2.2.1.17	Isolierung von RNA aus Zellkulturen und Entfernung genomischer DNA	34
2.2.1.18	Isolierung von RNA aus Geweben	34
2.2.1.19	Sequenzierung von DNA	35
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.3	<i>Expand</i> -PCR	36
2.2.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR	37
2.2.5	Reverse Transkription	37
2.2.6	Generierung von Sonden und Hybridisierungstechniken auf Filtern	38
2.2.6.1	Radioaktive Markierung von Sonden	38
2.2.6.2	DNA-DNA Hybridisierung nach <i>Southern</i>	38
2.2.6.3	<i>Dot Blot</i>	39
2.2.6.4	DNA-RNA Hybridisierung ( <i>Northern</i> -Hybridisierung)	40
2.2.7	Arbeiten mit Proteinen	41
2.2.7.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen	41
2.2.7.2	Herstellung von Kernproteinextrakten	41
2.2.7.3	Proteingewinnung aus Geweben	41
2.2.7.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.7.5	Fällung von Proteinen	42
2.2.7.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.2.7.7	<i>Western Blot</i>	43
2.2.8	Zellkultur	44
2.2.8.1	Verwendete Zelllinien	44
2.2.8.2	Kultivierung von Zellen	44
2.2.8.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	44
2.2.9	Reporteranalysen (LacZ-Assay)	44
2.2.10	Stabile Transfektion und Generierung stabil transfizierter Klone	45
2.2.11	Fixierung und Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse	46
2.2.12	BrdU-Einbau zur Bestimmung zellulärer Proliferation	46
2.2.13	Immunfluoreszenzfärbung	47
2.2.14	Zelladhäsionsassay	48

2.2.15	Transfektion von <i>Antisense</i> - und <i>Sense</i> -Oligonukleotiden	48
2.2.16	$\beta$ -Galaktosidase-Färbung zum Nachweis seneszenten Zellen	48
2.2.17	Zymografie-Assay	49
2.2.18	Arbeiten mit Mäusen	49
2.2.18.1	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien	49
2.2.18.2	Präparation von Mausembryofibroblasten (MEFs)	50
2.2.18.3	Transiente Transfektion von Mausembryofibroblasten	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
<b>3.1</b>	<b>NeuT-induzierbare Zelllinien</b>	<b>51</b>
3.1.1	Generierung der Zelllinien	51
3.1.1.1	Konstrukte	51
3.1.1.2	Auswahl einer geeigneten Zelllinie	55
3.1.1.3	Transfektion und initiale Charakterisierung der Zelllinien	56
3.1.2	Charakterisierung der Zelllinien	60
3.1.2.1	NeuT induziert Überexpression von P21 und Zellzyklusarrest in MCF-7-Zellen	60
3.1.2.2	NeuT induziert verfrühte Seneszenz in MCF-7-Zellen	68
3.1.2.3	P21 <i>Antisense</i> -Oligonukleotide verhindern den NeuT-induzierten Wachstumsarrest	75
3.1.3	Untersuchung differenzieller Genexpression der NeuT48-Zellen im <i>Microarray</i>	77
3.1.3.1	Erhöhte ERBB2-Expression induziert Integrin $\alpha 5$	80
3.1.3.2	Induktion von Matrix-Metalloproteinasen durch NeuT	85
<b>3.2</b>	<b>Herstellung transgener <i>Responder</i>-Mäuse</b>	<b>92</b>
3.2.1	Herstellung transgener Mäuse mit Dox-induzierbarer NeuT-Expression	93
3.2.2	Identifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere	94
3.2.3	Charakterisierung transgener Tiere hinsichtlich der Induzierbarkeit des <i>NeuT</i> -Transgens	97
3.2.3.1	Untersuchung der TetO-NeuT-transgenen INS-Linien	97
3.2.3.2	Untersuchung der transgenen Tiere mit MEF-Assays	98
3.2.3.3	Untersuchung der NeuT-Induzierbarkeit der INS-Linien nach Kreuzung mit verschiedenen Effektor-Mäusen	101
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	
<b>4.1</b>	<b>ERBB2-induzierbare Zelllinien</b>	<b>108</b>
4.1.1	NeuT/hNeu-Expression induziert P21 und verfrühte Seneszenz in MCF-7-Zellen	109
4.1.2	<i>Microarray</i> zur Untersuchung der differenziellen Genexpression	115
4.1.2.1	Überexpression von ERBB2 induziert Integrin $\alpha 5\beta 1$	117

---

4.1.2.2	Induktion von Matrix-Metalloproteinasen durch NeuT	121
<b>4.2</b>	<b>Herstellung und Untersuchung transgener <i>Responder</i>-Mäuse</b>	<b>126</b>
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>133</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>135</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	
<b>7.1</b>	<b>Tabelle zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen</b>	<b>161</b>
<b>7.2</b>	<b>Tabelle der <i>Microarray</i>-Ergebnisse</b>	<b>161</b>
<b>7.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>167</b>
<b>7.4</b>	<b>Publikationen</b>	<b>168</b>
<b>7.5</b>	<b>Danksagung</b>	<b>169</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungen:

<b>Abb. 1.1</b>	Bau und Ligandenbindung eines ERBB-Rezeptors	2
<b>Abb. 1.2</b>	Übersicht ERBB-Liganden	4
<b>Abb. 1.3</b>	Signaltransduktionswege, die durch ERBB2 induziert werden	8
<b>Abb. 1.4</b>	Das Tet-System	13
<b>Abb. 3.1</b>	Expressionsplasmid pINSpBI-EGFP/NeuT	53
<b>Abb. 3.2</b>	Expressionsplasmid pINSpBI-EGFP/hNeu	54
<b>Abb. 3.3</b>	Expressionsplasmid pcDNA3Neo/rtTA	55
<b>Abb. 3.4</b>	Vergleich der ERBB2-Expression in 184-B5- und MCF-7-Zellen	56
<b>Abb. 3.5</b>	EGFP-Expression der NeuT-Klone und der Kontrollzelllinie EGFP10	57
<b>Abb. 3.6</b>	<i>Northern Blot</i> zur Untersuchung der stringenten Regulation von <i>NeuT</i>	58
<b>Abb. 3.7</b>	<i>Western Blot</i> -Analyse der ERBB2-Expression	58
<b>Abb. 3.8 A</b>	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der EGFP-Expression der hNeu-Klone	59
<b>Abb. 3.8 B</b>	Expression von EGFP und ERBB2 im <i>Western Blot</i>	59
<b>Abb. 3.9</b>	Zellzyklusanalyse der NeuT-Klone und EGFP10 im FACS	61
<b>Abb. 3.10</b>	Zellzyklusanalyse der hNeu-Klone im FACS	62
<b>Abb. 3.11</b>	FACS-Analyse von BrdU-Einbau und Propidiumiodidfärbung der NeuT-Klone und EGFP10	63
<b>Abb. 3.12</b>	Übersicht Zellzyklus	64
<b>Abb. 3.13</b>	Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Untersuchung differenzieller Expression von CDKIs	65
<b>Abb. 3.14</b>	Expression von P21 in EGFP10, NeuT48 und den hNeu-Klonen	66
<b>Abb. 3.15 A</b>	<i>Western Blot</i> -Analysen zur subzellulären Verteilung von P21	67
<b>Abb. 3.15 B</b>	Immunfluoreszenz zur subzellulären Verteilung von P21	67
<b>Abb. 3.16</b>	<i>Western Blot</i> der P53-Induktion	68
<b>Abb. 3.17</b>	Morphologische Veränderungen nach NeuT-Induktion	69
<b>Abb. 3.18 A</b>	SA- $\beta$ -Gal-Färbung zum Nachweis verfrühter Seneszenz	70
<b>Abb. 3.18 B</b>	Auswertung seneszenten Zellen	70
<b>Abb. 3.19</b>	SA- $\beta$ -Gal-Färbung zum Nachweis verfrühter Seneszenz	71
<b>Abb. 3.20</b>	Übersicht MAPK-Signaltransduktion	72
<b>Abb. 3.21</b>	<i>Western Blot</i> der verschiedenen MAPK und ihrer phosphorylierten Formen	73
<b>Abb. 3.22</b>	Morphologische Veränderungen von NeuT48-Zellen nach Induktion mit Dox und gleichzeitiger Inkubation mit verschiedenen Kinaseinhibitoren	74
<b>Abb. 3.23</b>	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR der <i>P21</i> -Induktion nach Behandlung von NeuT48-Zellen mit spezifischen Kinaseinhibitoren	75
<b>Abb. 3.24 A</b>	Effizienz der Transfektion mit P21-AS- und P21-S-Oligonukleotiden	76
<b>Abb. 3.24 B</b>	<i>Western Blot</i> der P21-Expression nach Transfektion mit P21-AS und P21-S	76
<b>Abb. 3.25</b>	Analyse der S-Phasen im FACS nach P21-AS-Behandlung	77
<b>Abb. 3.26</b>	Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Verifizierung der <i>Microarray</i> -Ergebnisse	79
<b>Abb. 3.27</b>	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR der <i>Integrin <math>\alpha 5</math></i> -Induktion	81
<b>Abb. 3.28</b>	<i>Western Blot</i> -Analyse der <i>Integrin <math>\alpha 5</math></i> -Expression	82
<b>Abb. 3.29 A</b>	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR der <i>Integrin <math>\beta 1</math></i> -Induktion	83
<b>Abb. 3.29 B</b>	<i>Western Blot</i> -Analyse der <i>Integrin <math>\beta 1</math></i> -Expression	83
<b>Abb. 3.30</b>	Adhäsionsassay zur Untersuchung der Funktionalität des Fibronektinrezeptors	84
<b>Abb. 3.31</b>	Expression von ERBB2, <i>Integrin <math>\alpha 5</math></i> und <i>Integrin <math>\beta 1</math></i> in Mammakarzinomen	85
<b>Abb. 3.32</b>	Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Untersuchung differenzieller Expression von <i>MMP-9</i>	86
<b>Abb. 3.33</b>	Zymografie-Assay mit den NeuT-Klonen und EGFP10	87
<b>Abb. 3.34</b>	Zymografie-Assay mit verschiedenen Kinaseinhibitoren	88
<b>Abb. 3.35</b>	Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der <i>MMP-13</i> -Expression	89



<b>Abb. 3.36</b>	Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der <i>MMP-13</i> -Expression	89
<b>Abb. 3.37</b>	Herstellung des Expressionsplasmides pBABE-NeuT	90
<b>Abb. 3.38 A</b>	<i>Western Blot</i> -Analyse der NeuT-Expression in NIH3T3-Zellen	91
<b>Abb. 3.38 B</b>	Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der <i>MMP-13</i> -Expression	91
<b>Abb. 3.39</b>	Konditionales Tiermodell für die NeuT-induzierte Karzinogenese	93
<b>Abb. 3.40</b>	<i>Responder</i> -Konstrukt mit Lage der zur Analyse verwendeten Oligonukleotide und Sonden	94
<b>Abb. 3.41</b>	PCR zur Identifizierung transgener <i>Founder</i> -Tiere	95
<b>Abb. 3.42</b>	<i>Southern Blot</i> putativ transgener <i>Founder</i> -Tiere	96
<b>Abb. 3.43</b>	<i>Dot Blot</i> zur Identifizierung transgener Nachkommen	96
<b>Abb. 3.44</b>	RT-PCR-Experimente zur Untersuchung der <i>NeuT</i> -Expression TetO-NeuT-transgener INS-Tiere	98
<b>Abb. 3.45</b>	Übersicht MEF-Assay	99
<b>Abb. 3.46</b>	RT-PCR-Ergebnisse der MEF-Assays	100
<b>Abb. 3.47</b>	Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS19/Fabp-rtTA-Tiere	103
<b>Abb. 3.48</b>	Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS69/Lck-rtTA-Tiere	104
<b>Abb. 3.49</b>	Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS12/CMV-rtTA-Tiere	105
<b>Abb. 3.50</b>	Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS20/LAP-tTA-Tiere	106
<b>Abb. 3.51</b>	Untersuchung der Induzierbarkeit von INS20/LAP-tTA-Tieren im <i>Western Blot</i>	107
<b>Abb. 4.1</b>	Modell der ERBB2-induzierten Karzinogenese	115
<b>Abb. 4.2</b>	Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der Expression von <i>ERBB2</i> und <i>Integrin <math>\alpha 5</math></i> in Endometrium- und Ovarialkarzinomen	120
<b>Abb. 4.3</b>	Zusammenspiel der durch ERBB2 induzierten Matrix-Metalloproteinasen	126
Tabellen:		
<b>Tab. 1.1</b>	Tumore mit ERBB2-Beteiligung	9
<b>Tab. 3.1</b>	Differenzielle Genexpression nach NeuT-Induktion	79
<b>Tab. 3.2</b>	Übersicht über die eingesetzten Effektor-Mäuse	102
<b>Tab. 3.3</b>	Expression der Transaktivatoren in den unterschiedlichen Geweben	102
<b>Tab. 3.4</b>	Übersicht über die Ergebnisse der INS-Linien	107
<b>Tab. 7.1</b>	Tabelle zur Herstellung von Polyacrylamidgelen	161
<b>Tab. 7.2</b>	Tabelle der <i>Microarray</i> -Ergebnisse	161

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenosin
AA	Aminosäure (amino acid)
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
Ci	Curie
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
G	Guanosin
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec.	Sekunde
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

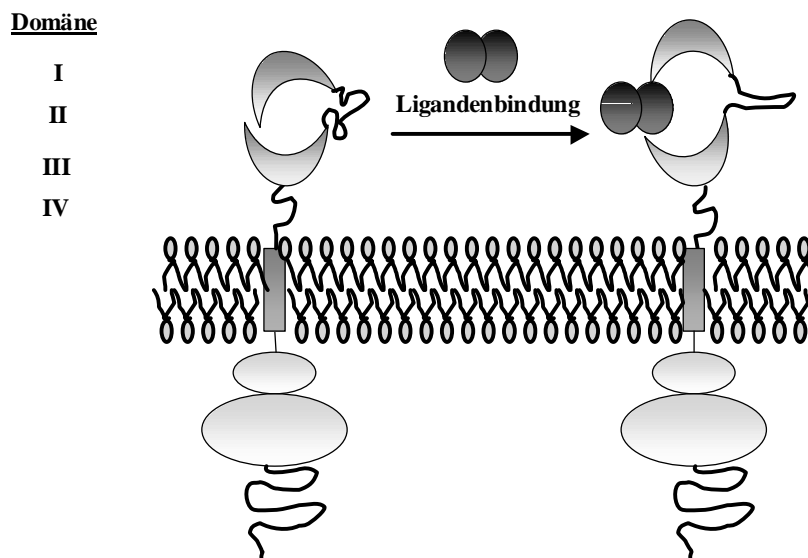
Jährlich erkranken ca. 395.000 Menschen in Deutschland an Krebs (Robert-Koch-Institut, Statistik 2000). Die Ursache dieser Erkrankung ist die Anhäufung von Veränderungen im genetischen Material einzelner Zellen, die dadurch entarten und durch klonales Wachstum zur Tumorbildung führen. Die Gendefekte können dabei ererbt sein, oder durch exogene Einflüsse wie Zigarettenrauch, radioaktive Strahlung etc. entstehen. Um unabhängig von anderen Zellen im Zellverband zu wachsen, müssen Tumorzellen verschiedene Eigenschaften erwerben. Dazu gehören neben dem autonomen Vorantreiben des Zellzyklus' und der Resistenz gegen wachstumshemmende Faktoren auch Mechanismen zur Umgehung der Apoptose, die Immortalisierung der Zellen, die Aktivierung der Angiogenese und die Invasion und Metastasierung in umliegende Gewebe (Hanahan und Weinberg, 2000). Die intensive Erforschung dieser Eigenschaften auf molekularer Ebene hat gezeigt, dass es sich bei der Tumorgenese um einen mehrstufigen Prozess handelt, bei dem verschiedene Gene involviert sind. Dabei wird unterschieden zwischen Proto-Onkogenen, deren Genprodukte das normale Zellwachstum vorantreiben, und Tumorsuppressorgenen, die übermäßiger Proliferation entgegenwirken. Bei den Proto-Onkogenen reicht die Fehlregulation des zellulären Geschehens durch Mutationen eines Allels aus, um dominante Funktionsgewinne zu erlangen, die zur Transformation von Zellen führen können. Bei den Tumorsuppressorgenen, auch rezessive Onkogene genannt, müssen hingegen beide Allele mutiert oder deletiert sein, um den Verlust der schützenden Genfunktion zu erwirken. Zu den Proto-Onkogenen gehören beispielsweise die im Folgenden ausführlicher beschriebenen Mitglieder der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Familie, die durch Überexpression oder Mutationen zur Fehlregulation des Zellwachstums und zur Entstehung von Tumoren beitragen können.

### 1.1 Die EGFR-Familie

Die EGFR-Familie gehört zur Superfamilie der Klasse I Rezeptor-Tyrosinkinase. Ihre vier Mitglieder EGFR/*v-erb-B avian erythroblastic leukemia viral oncogene homologue* (ERBB1)/*human EGF-receptor* (HER1) (Carpenter *et al.*, 1979), ERBB2/HER2 (Coussens *et al.*, 1985; Semba *et al.*, 1985), ERBB3/HER3 (Coussens *et al.*, 1985; Kraus *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1990) und ERBB4/HER4 (Plowman *et al.*, 1993) sind in essenzielle zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Entwicklung involviert (Casalini *et al.*, 2004). Evolutionär gehen die vier ERBBs und ihre Liganden aus einer einzelnen Rezeptor-Ligand-Kombination hervor, die in *Caenorhabditis elegans* (Aroian *et al.*, 1990) entdeckt

wurde. Diese ist den ERBB-Rezeptoren und Liganden der Vertebraten strukturell äußerst ähnlich. In *Caenorhabditis elegans* bindet der zu EGF analoge Ligand *lineage-3* (*lin-3*) an den Rezeptor *lethal-23* (*let-23*) und kontrolliert über die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen die Vulvabildung. Auch in *Drosophila melanogaster* konnte ein solcher Rezeptor (*deranged*, *der*) identifiziert werden, für den allerdings schon vier Liganden mit EGF-Motiven beschrieben worden sind (Wassermann und Freeman, 1997).

Alle humanen ERBB-Rezeptoren besitzen eine konservierte extrazelluläre Domäne, die über eine einzelne hydrophobe, membrandurchspannende Region mit der zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne verbunden ist. Der extrazelluläre Bereich unterteilt sich in vier Subdomänen I-IV, von denen die  $\beta$ -helikal gefalteten Bereiche I und III für die Ligandenbindung zuständig sind und die ausladende Struktur der cysteinreichen Domänen II und IV durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird (Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Bau und Ligandenbindung eines ERBB-Rezeptors (verändert nach Marmor *et al.*, 2004).** Die extrazellulären Domänen I und III des Rezeptors sind für die Bindung der Liganden zuständig, die cysteinreichen Domänen II und IV stabilisieren die Dimerisierung mit einem zweiten Rezeptor. Dafür bildet die Domäne II nach Ligandenbindung eine Dimerisierungsschleife aus, die tief in den Dimerisierungspartner eindringt. Der extrazelluläre Bereich wird über eine hydrophobe, membrandurchspannende Region mit dem intrazellulären Bereich verbunden, der die Kinasedomäne beherbergt und verschiedene Phosphorylierungsstellen am C-Terminus besitzt.

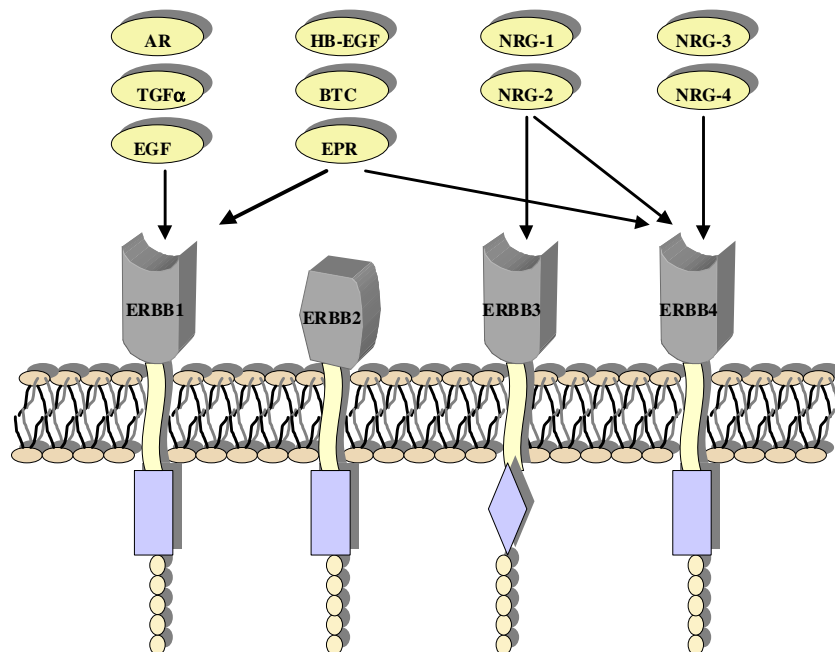
Die Untersuchung der Bindung von EGF an ERBB1 ergab, dass nach Bindung des Liganden eine  $\beta$ -Haarnadelstruktur, auch Dimerisierungsschleife genannt, aus der extrazellulären Domäne II hervortritt (Garret *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Diese Schleife dringt bei der Wechselwirkung zweier Rezeptoren weit in den Dimerisierungspartner ein und stabilisiert die Verbindung. Im Gegensatz hierzu konnte beim monomeren ERBB3-Rezeptor eine autoinhibierende Konformation in der extrazellulären Domäne IV beobachtet werden, die

durch die Dimerisierungsschleife vermittelt wird (Cho *et al.*, 2002). Hierbei hält die Interaktion der Dimerisierungsschleife und der Domäne IV die Liganden-bindenden Domänen I und III auseinander, so dass die Bindung eines Liganden zu drastischen Veränderungen der Rezeptorkonformation führt. Rezeptordimere werden allerdings nicht nur durch die Dimerisierungsschleife, sondern auch durch die extrazelluläre Domäne IV und die intrazelluläre Kinasedomäne stabilisiert (Schaefer *et al.*, 1999; Mendrola *et al.*, 2002; Sharpe *et al.*, 2002). Im zytoplasmatischen Bereich der Rezeptoren befinden sich neben den hochkonservierten Tyrosinkinase-Domänen Phosphorylierungsstellen, an die spezifische Adaptorproteine binden können. Die Bindung von Liganden führt zur Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren, wodurch die intrinsische Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert wird und diese spezifischen Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne phosphoryliert werden. Dies hat eine Erhöhung der Kinaseaktivität des Rezeptordimers zur Folge (Heldin, 1995; Hubbard *et al.*, 1998). Eine Ausnahme bildet der Rezeptor ERBB3, der zwar ATP binden kann, jedoch aufgrund von kritischen Aminosäuresubstitutionen am C-Terminus jegliche Kinaseaktivität verloren hat (Guy *et al.*, 1994).

Jedes ERBB-Protein verfügt am C-Terminus über ein unterschiedliches Muster potenzieller Phosphorylierungsstellen. An diese phosphorylierten Tyrosinreste werden Effektormoleküle mit Src Homologie 2 (SH2)- oder Phosphotyrosinbinde (PTB)-Domänen rekrutiert (Margolis, 1992; van der Geer und Pawson, 1995). Dabei bindet jeder Rezeptor ein unterschiedliches Spektrum von Proteinen. Zu diesen Proteinen gehören Adaptorproteine [*src homology 2 domain-containing protein C* (Shc), *avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog* (Crk), *growth factor receptor-bound protein* (Grb2 und Grb7) und *Grb2-associated binding protein* (Gab1)], Kinasen [*v-src avian sarcoma viral oncogene* (Src), *choline kinase* (Chk) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)] und Proteintyrosinphosphatasen [*src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatases* (SHP1 und SHP2)] (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001). Untersuchungen der Bindepräferenzen verschiedener SH2- und PTB-Domänen durch Kompetitionsstudien, mutierte Autophosphorylierungsstellen und Co-Immunpräzipitationen haben eine Überlappung der Signaltransduktionswege, die durch die verschiedenen ERBBs aktiviert werden, ergeben (Sweeney *et al.*, 2000). So aktivieren beispielsweise alle Rezeptoren, inklusive der homologen Rezeptoren der und let-23 von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, über Shc und/oder Grb2 Mitglieder der *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Familie (Burden und Yarden, 1997). Aber auch die Aktivierungsstärke verschiedener Signaltransduktionswege wird über die unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen moduliert. ERBB3 z. B. besitzt, im Gegensatz zu

den anderen Rezeptoren der EGFR-Familie, multiple Bindestellen für die aktivierende Untereinheit p85 der PI3K und kann daher die PI3K-Signalkaskade am effektivsten stimulieren (Prigent und Gullick, 1994; Fedi *et al.*, 1994).

Die große Bandbreite der Signaltransduktionswege, die durch ERBBs aktiviert werden können, kommt neben den vielfältigen Phosphorylierungsstellen durch die Anzahl an Rezeptorkombinationen und Liganden zustande. Die ERBB-Liganden werden als große transmembrane Vorläuferproteine synthetisiert und durch Proteolyse freigesetzt (Massague *et al.*, 1993). Dabei wirken sie in der Regel über kurze Distanzen als autokrine oder parakrine Wachstumsfaktoren. Charakteristisch für alle Liganden ist eine EGF-ähnliche Domäne am N-Terminus, die aus drei über Disulfidbrücken verbundene Schleifen besteht (Groenen *et al.*, 1994). Zu den Liganden gehören Amphiregulin (AR), *Transforming growth factor*  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) und *Epidermal growth factor* (EGF), die spezifisch an ERBB1 binden, Betacellulin (BTC), *Heparin-binding EGF* (HB-EGF) und Epiregulin (EPR), die eine duale Spezifität für ERBB1 und ERBB4 haben sowie die Neureguline (NRG, auch *neu differentiation factors* (NDF) bzw. Hereguline genannt), die durch alternatives Spleißen eines einzigen Gens entstehen. NRG-1 und NRG-2 (Riese *et al.*, 1995; Busfield *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1997) binden beide an ERBB3 und ERBB4, wohingegen NRG-3 (Zhang *et al.*, 1997) spezifisch an ERBB4 bindet (Abb. 1.2). Für ERBB2 konnte bis heute kein spezifischer Ligand entdeckt werden.



**Abbildung 1.2: Übersicht ERBB Liganden (verändert nach Holbro *et al.*, 2002).** Die verschiedenen Liganden der ERBB-Rezeptoren haben spezifische Affinitäten für ERBB1 (AR, TGF- $\alpha$ , EGF), ERBB1 und ERBB4 (HB-EGF, BTC, EPR), ERBB4 (NRG-3, NRG-4) sowie ERBB3 und ERBB4 (NRG-1, NRG-2). Für ERBB2 wurde bislang kein spezifischer Ligand entdeckt. AR=Amphiregulin, TGF- $\alpha$ =*transforming growth factor*  $\alpha$ , EGF=*epidermal growth factor*, HB-EGF=*heparin-binding-EGF*, BTC=Betacellulin, EPR=Epiregulin, NRG=Neuregulin.

Um eine überhöhte Aktivierung der Rezeptoren durch die Liganden zu vermeiden, stehen verschiedene Kontrollmechanismen zur Verfügung. Neben der Rezeptorspezifität der Liganden wird deren Verfügbarkeit durch Organ- und Entwicklungsstadien-spezifische Expressionsmuster limitiert. Außer EGF, welches in vielen Körperflüssigkeiten zu finden ist, und dem ubiquitär exprimierten NRG-1 (Meyer und Birchmeier, 1995) treten die anderen Liganden sehr eingeschränkt in den Geweben auf. Von NRG-4 finden sich beispielsweise nur größere Mengen im Pankreas (Harari *et al.*, 1999), wohingegen die Expression von NRG-3 auf das Nervensystem beschränkt ist (Zhang *et al.*, 1997) und EPR in größeren Mengen nur in Makrophagen und Plazentagewebe vorkommt (Toyoda *et al.*, 1997).

Durch ihren bivalenten Aufbau nehmen die ERBB-Liganden einen direkten Einfluss auf die sich bildenden Rezeptorhomo- bzw. -heterodimere und damit auch auf die Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden. Biophysikalische (Lemmon *et al.*, 1997) und strukturell-funktionale (Groenen *et al.*, 1994) Untersuchungen ergaben, dass die Liganden am N-Terminus ein Zentrum hoher Affinität für das zuerst gebundene ERBB-Rezeptormolekül haben, wohingegen der C-Terminus eine wesentlich geringere Bindeaffinität für den Dimerisierungspartner besitzt. Da ERBB2 das einzige Mitglied der EGFR-Familie ist, das keinen Liganden mit hoher Affinität bindet, fungiert es lediglich als Korezeptor für die anderen ERBB-Rezeptoren (Tzahar *et al.*, 1996; Tzahar *et al.*, 1997; Klappner *et al.*, 1999).

Die differenzielle Affinität der Liganden beeinflusst auch die Stärke und Dauer des jeweiligen Signals. So können Peptide, die den ERBB-Rezeptor mit schwacher Affinität binden, den Abbau der Rezeptormoleküle verhindern (Tzahar *et al.*, 1998) und durch verlängerte Signaltransduktion wesentlich potentere Induktoren als hochaffine Liganden sein. Aber auch die pH-Stabilität der Rezeptor-Ligand-Komplexe wirkt sich auf die Signaltransduktion aus. So dirigiert z. B. die relativ pH-resistente Verbindung von EGF und ERBB1 den Komplex zu den Lysosomen, wo dessen Abbau erfolgt. Im Gegensatz hierzu ermöglichen TGF- $\alpha$  und NRG-1 durch schnelle Dissoziation vom Rezeptor bei endosomalem pH 5-6 ein Rezeptor-Recycling (French *et al.*, 1995; Waterman *et al.*, 1998), bei dem der Rezeptor wieder an die Zelloberfläche zurückkehren und erneut die Aktivierung von Signaltransduktionswegen initiieren kann.

Durch die Interaktion der Rezeptoren mit einer Vielzahl von Liganden greifen die Mitglieder der EGFR-Familie in viele essenzielle zelluläre Prozesse ein. Dabei sind die stringente Regulation der Expression und die Aktivität der einzelnen Rezeptoren für das zelluläre Gleichgewicht von großer Bedeutung. Insbesondere die Überexpression oder Mutation der

ERBB2-Tyrosinkinase, die im nächsten Kapitel genauer beschrieben wird, hat schwerwiegende Folgen für die zelluläre Homöostase.

## 1.2 Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2

Das *ERBB2*-Gen auf Chromosom 17q21 kodiert ein Transmembranprotein mit etwa 50 %iger Homologie zum EGF-Rezeptor. Der Name ERBB leitet sich vom *avian erythroblastosis virus*, einem Retrovirus ab, das Erythroleukämien und Fibrosarkome in suszeptiblen Vögeln verursacht (Engelbreth-Holm und Meyer, 1935; Graf und Beug, 1978). Die transformierenden Eigenschaften des Virus konnten dem viralen Onkogen *v-erbB* zugeordnet werden, das durch Transduktion von *c-erbB* entstand (Roussel *et al.*, 1979; Vennstrom und Bishop, 1982). Downward *et al.* fanden 1984 heraus, dass das zelluläre *c-erbB* den EGF-Rezeptor kodiert. Eine onkogene Variante von *ERBB2*, *NeuT*, wurde aus Ratten mit chemisch induzierten Neuroblastomen isoliert (Shih *et al.*, 1981). Dieses aktivierte NeuT enthält eine Punktmutation in der Transmembrandomäne des Rezeptors, die einen Aminosäureaustausch von Valin zu Glutaminsäure an der Position 664 zur Folge hat (Bargmann *et al.*, 1986). Die Mutation führt zur Liganden-unabhängigen Dimerisierung und konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (Weiner *et al.*, 1989). Weitere Mechanismen, die zu erhöhter Signaltransduktion des Rezeptors führen können, sind die genomische Amplifikation des *ERBB2*-Lokus und die daraus resultierende Überexpression des Rezeptors (Venter *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989) sowie der Verlust der extrazellulären Domäne (Bargmann *et al.*, 1988; Christianson *et al.*, 1998; Egeblad *et al.*, 2001).

Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 wird in den meisten epithelialen Zellen in adulten Säugetieren exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte die Expression von ERBB2 während der fötalen Entwicklung nur in Muskeln, Haut, Herz, Lunge, Nervensystem, sich entwickelndem Knochen und in den intestinalen Epithelien nachgewiesen werden (Coussens *et al.*, 1985). Die bedeutende Rolle des Rezeptors zeigt sich insbesondere bei der murinen Herzentwicklung, während der ErbB2 im Myokard exprimiert wird. So sind ErbB2<sup>-/-</sup>-Mäuse in frühen Embryonalstadien wegen Fehlbildungen der Herztrabeculae letal (Lee *et al.*, 1995). Außerdem zeigt der Tod transgener Tiere mit Kinase-defizientem ErbB2, dass die katalytische Aktivität von ErbB2 bei der Herzentwicklung essenziell ist (Chan *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass die gezielte Inaktivierung von ErbB2 in Kardiomyozyten zur Dysfunktion im adulten Herzen führt (Crone *et al.*, 2002; Ozcelik *et al.*, 2002).

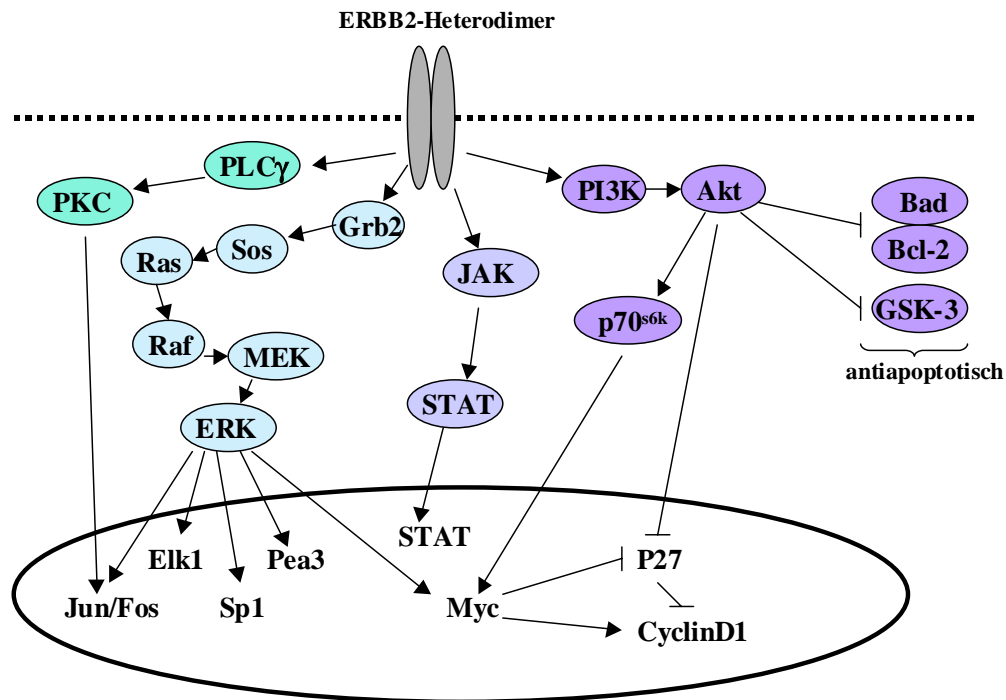


Neben der Funktion bei der Herzentwicklung übernimmt ERBB2 auch verschiedene Aufgaben in neuronalen Zellen. Morris *et al.* (1999) sowie Park und seine Mitarbeiter (2001) wiesen nach, dass ERBB2 für die späte Oligodendrozytendifferenzierung und für die Bildung von Myelin verantwortlich ist. Außerdem ist das ERBB2/ERBB3-Heterodimer während der Differenzierung der Schwannschen-Zellen aktiv (Grinspan *et al.*, 1996; Levi *et al.*, 1998). Die Auswirkungen auf das sympathische Nervensystem wurde an Mäusen demonstriert, die mutiertes ErbB2, ErbB3 oder NRG-1 exprimieren. Diese Tiere bilden keine Neuralleisten aus und können demzufolge kein funktionales sympathisches Nervensystem aufbauen (Britsch *et al.*, 1998).

Einen besonders großen Einfluss nimmt ERBB2 auf die Bildung und Umbildung der Brustdrüsen. Diese stellen eines der wenigen Gewebe dar, das, hormonell bedingt, auch nach der Geburt noch starken morphologischen Veränderungen unterworfen ist. Diese Veränderungen betreffen zum einen die Umbildung des Brustgewebes während der Pubertät, zum anderen die Vorbereitung der Brust auf die Stillzeit. Für alle ERBB-Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie während der meisten Entwicklungsstadien in den Brustdrüsen exprimiert werden, wohingegen die Expression ihrer Liganden stringent reguliert wird (Troyer und Lee, 2001). Die Untersuchung transgener Mäuse, die dominant negative Varianten der verschiedenen ErbB-Rezeptoren exprimieren, ergab, dass Tiere mit dominant negativem ErbB2 aufgrund der gestörten Differenzierung der alveolären Drüsenzellen eine reduzierte Milchproteinsekretion haben (Jones *et al.*, 1999).

ERBB2 reguliert das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Gewebe durch die Aktivierung und Repression unterschiedlicher Signaltransduktionskaskaden in den jeweiligen Zellen. Die Kinase besitzt selbst keinen spezifischen Liganden, erhöht aber die Bindeaffinität von Liganden an die Heterodimere und ist außerdem der bevorzugte Dimerisierungspartner für alle anderen EGFR-Familienmitglieder (Graus-Porta *et al.*, 1997; Karunagaran *et al.*, 1996; Sliwkowski *et al.*, 1994). Als potenteste Rezeptorpaarung erweist sich erstaunlicherweise das Heterodimer ERBB2/ERBB3, bei dem ein Partner (ERBB2) keinen Liganden, der andere (ERBB3) keine Kinaseaktivität besitzt. Über den RAS/ERK-Signaltransduktionsweg kann dieses Heterodimer z. B. die Proliferation in Zellen induzieren oder durch Aktivierung der PI3K das Überleben von Zellen positiv beeinflussen. Außerdem kann das Rezeptordimer Abbaumechanismen umgehen und verlängert dadurch die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden in der Zelle (Baulida *et al.*, 1996; Waterman *et al.*, 1999). Die Kombination von ERBB2 mit den anderen drei ERBB-Rezeptoren und deren Aktivierung durch eine Vielzahl von Liganden lässt erahnen, wie

vielschichtig das Signaltransduktionsnetzwerk in der Zelle durch ERBB2 beeinflusst werden kann. Abbildung 1.3 zeigt eine Auswahl bekannter Signaltransduktionskaskaden, über die ERBB2 in die zelluläre Physiologie eingreifen und Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren kann.



**Abbildung 1.3: Signaltransduktionswege, die durch ERBB2 induziert werden (verändert nach Marmor *et al.*, 2004).** Die Heterodimerisierung von ERBB2 mit anderen ERBBs führt u. a. zur Aktivierung des Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ )- (türkis), Ras-Raf-*extracellular signal-regulated kinase* (ERK)- (hellblau), Janus-Kinase (JAK)-*signal transducer and activator of transcription* (STAT)- (blau) und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt-Signaltransduktionsweges (lila), über die zelluläre Mechanismen, wie Apoptose, Proliferation und Differenzierung reguliert werden.

Wird das zelluläre System durch Veränderungen aus dem Gleichgewicht gebracht, hat dies gravierende Folgen für den Organismus. Verschiedene Mechanismen, z. B. in Form von Feedback-Loops, sorgen für die Erhaltung der zellulären Homöostase, und zelluläre Schutzmechanismen, wie Seneszenz oder Apoptose, können induziert werden, wenn einzelne Zellen im Verband so stark geschädigt sind, dass dies Auswirkungen auf benachbarte Zellen haben könnte. Dennoch kann gerade die Überexpression von Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren dazu führen, dass sich Zellen, unabhängig von inhibierenden Einflüssen der benachbarten Zellen oder eigenen Apoptoseprogrammen, über diese Schutzmechanismen hinwegsetzen und entarten. So konnte erstmals 1987 von Slamon *et al.* gezeigt werden, dass ERBB2 in etwa 30 % aller Mammakarzinome überexprimiert ist und diese Überexpression mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert (Ross und

Fletcher, 1999). Die Amplifikation des *ERBB2*-Lokus ist dabei die häufigste Ursache für die erhöhte Transkription und Proteinsynthese (Hynes und Stern, 1994). Mittlerweile wurde die erhöhte Expression von *ERBB2* in einer Vielzahl epithelialer Tumore, wie z. B. Ovarial-, nicht kleinzelligen Lungen-, Prostatakarzinomen oder Tumoren des gastrointestinalen Traktes beobachtet, die ein hohes Metastasierungspotenzial, aggressives Wachstum und überdies oftmals Chemoresistenz aufweisen (Slamon *et al.*, 1987; Allred *et al.*, 1992; Hynes *et al.*, 1994; Slamon *et al.*, 1988). Die Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über verschiedene Organe/Gewebe, bei deren Tumorentstehung *ERBB2* von Bedeutung ist.

**Tabelle 1.1: Tumore mit *ERBB2*-Beteiligung.** Verschiedene Gewebe, bei deren Tumorentstehung *ERBB2* beteiligt sein kann, sind mit den dazugehörigen Literaturangaben aufgeführt.

<b>Gewebe</b>	<b>Literatur</b>
<b>Brust</b>	Slamon <i>et al.</i> Science 1989 Slamon <i>et al.</i> Science 1987
<b>Ovar</b>	Berchuck <i>et al.</i> Cancer Research 1990 Slamon <i>et al.</i> Science 1989 Zhang <i>et al.</i> Oncogene 1989
<b>Lunge</b>	Schneider <i>et al.</i> Cancer Research 1989 Weiner <i>et al.</i> Cancer Research 1990
<b>Magen/Darm</b>	Yokota <i>et al.</i> Oncogene 1988 Yoshida <i>et al.</i> Virch Arch 1989
<b>Mundschleimhaut</b>	Hou <i>et al.</i> Cancer Lett 1992 Xia <i>et al.</i> Clin Cancer Res 1997
<b>Blase</b>	Zhau <i>et al.</i> Mol Carcinog 1990 Wright <i>et al.</i> Br J Cancer 1990
<b>Prostata</b>	Ware <i>et al.</i> Hum Pathol 1991 Zhau <i>et al.</i> Mol Carcinog 1992
<b>Pankreas</b>	Williams <i>et al.</i> Pathobiology 1991

Da *ERBB2* in vielen epithelialen Tumoren überexprimiert ist und zudem als bevorzugter Heterodimerisierungspartner für die anderen *ERBB*-Rezeptoren dient, stellt diese Tyrosinkinase ein interessantes therapeutisches Ziel dar. Erste Strategien zur Herstellung eines Medikamentes, das gegen die verstärkte, *ERBB2*-induzierte Proliferation von Zellen

eingesetzt werden kann, führte zur Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers (4D5), der gegen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet ist. Mit diesem Antikörper gelang es, spezifisch das Wachstum von ERBB2-überexprimierenden Tumorzellen *in vitro* zu inhibieren (Hudziak *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1996). Auch in Mausmodellen konnte durch den Einsatz von 4D5 ERBB2-induziertes Tumorwachstum gestoppt werden (Pegram *et al.*, 1999; Pegram *et al.*, 2000). Um Probleme beim Einsatz dieses murinen Antikörpers in ersten klinischen Studien zu umgehen, wurde eine humanisierte Form des Antikörpers (Trastuzumab) generiert (Carter *et al.*, 1992). Dieser zu 95 % humane Antikörper enthält lediglich die murine Antigen-Bindedomäne, die gegen den extrazellulären Bereich des ERBB2-Proteins gerichtet ist. Die Funktionalität von Trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>) wurde in verschiedenen klinischen Studien bei Patienten mit metastasierenden, ERBB2-überexprimierenden Mammakarzinomen validiert (Baselga *et al.*, 1996; Pegram *et al.*, 1998; Cobleigh *et al.*, 1999). Hierbei führt der Antikörper zur Verminderung des ERBB2-Rezeptors auf der Zelloberfläche, inhibiert dadurch die für das Tumorwachstum wichtigen Signaltransduktionskaskaden, wie den RAS-RAF-MAPK- und PI3K-AKT-Weg, und induziert darüber hinaus einen Wachstumsarrest durch die Bildung von P27/CDK2-Komplexen (Albanell *et al.*, 2003). Außerdem blockiert Trastuzumab die Tumorangiogenese und wirkt Komplement- und Antikörper-abhängig zytotoxisch auf die Zellen (Mineo *et al.*, 2004).

Neben der Behandlung von Brustkrebs sprechen einige klinische Daten auch für die Behandlung anderer ERBB2-überexprimierender Tumore mit Herceptin<sup>TM</sup>. Nicht kleinzellige Lungenkarzinome mit ERBB2-Überexpression (etwa 20 % der resezierten Tumore) zeigen erhöhte Chemoresistenz, Invasivität und ein verstärktes Metastasierungspotenzial. Da in Transplantationsexperimenten gezeigt werden konnte, dass Herceptin<sup>TM</sup> das Tumorwachstum in Nacktmäusen stoppt, wird in klinischen Phase-II-Untersuchungen die zusätzliche Gabe von Trastuzumab zur Standardchemotherapie in Lungenkarzinom-Patienten getestet (Azzoli *et al.*, 2002).

Probleme, die sich nach mehrjähriger Erfahrung aus der Behandlung von ERBB2-überexprimierenden Tumoren mit Herceptin<sup>TM</sup> ergeben, sind zum einen, dass ein gewisser Prozentsatz von Patienten nicht auf die Therapie mit Trastuzumab anspricht, zum anderen, dass dessen Anwendung auf stark ERBB2-überexprimierende Tumore limitiert ist. Viele Tumore zeigen aber eine niedrige oder moderate Expression von ERBB2, die zur erhöhten Signaltransduktion durch bevorzugte Heterodimerisierung mit anderen ERBB-Rezeptoren führt. Aus diesem Grund wurde ein weiterer humanisierter Antikörper (2C4) entwickelt, der

auch an die Ektodomäne von ERBB2 bindet aber, im Gegensatz zu Trastuzumab, sterisch die Heterodimerisierung von ERBB2 mit den anderen Mitgliedern der EGFR-Familie verhindert (Albanell *et al.*, 2003). Auf diese Weise kann auch die ERBB2-induzierte onkogene Signaltransduktion in niedrig und moderat ERBB2-exprimierenden Tumoren unterbunden werden. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* konnte für diesen neuen monoklonalen Antikörper in einer Reihe von Brust- und Prostatakarzinommodellen Antitumoraktivität demonstriert werden, weswegen jetzt auch dessen Einsatz in klinischen Phase-I-Studien getestet wird (Albanell *et al.*, 2003).

Trotz einiger vielversprechender Ansätze, die zur Therapie ERBB2-überexprimierender Tumore eingesetzt werden können, zeigt es sich, dass diese in der Regel keine Heilung bringen. Sie verlängern lediglich die Zeit bis zum Wiederauftreten von Tumoren, die dann ERBB2-unabhängig wachsen, und verbessern die Lebensqualität der Patienten. Neben der Erforschung weiterer Substanzen, die zur Behandlung eingesetzt werden können, steht nach wie vor die Entschlüsselung und das Verstehen der komplexen Vorgänge, die durch ERBB2-Überexpression in den Zellen ausgelöst werden, an erster Stelle. Zur Untersuchung des vielschichtigen Signaltransduktionsnetzwerkes der Zelle, in das ERBB2 auf so vielfältige Weise eingreifen kann, wurden in den vergangenen Jahren diverse Versuchsanordnungen sowohl in Zellkultur als auch mit Hilfe von Mausmodellen generiert, die zum Verständnis der ERBB2-induzierten Karzinogenese beitragen sollten.

### 1.3 Induzierbare Expressionssysteme

Nachdem sich das Einbringen oder Entfernen von Genen in die verschiedensten Zellen über die letzten Jahrzehnte als potentes Werkzeug in der Forschung etabliert hat, wurden in den letzten Jahren neben der Optimierung der alten Verfahren auch neue Systeme entwickelt, die eine konditionale, sogar reversible Genexpression ermöglichen.

Da die klassische *knock-out*-Technologie, die zur Ausschaltung endogener Sequenzen führt, in vielen Fällen schon im embryonalen Stadium zum Tod führt, spielt die regulierbare Genexpression für die Untersuchung der Genfunktion solcher Gene eine herausragende Rolle. Auch die artifizielle Expression von Transgenen, z. B. Onkogenen, kann die Lebensfähigkeit von Tieren so stark einschränken, dass keine Etablierung transgener Linien möglich ist. Aus diesem Grund wird schon seit einiger Zeit an Systemen gearbeitet, mit deren Hilfe die Genexpression in transgenen Tieren exogen, z. B. über die Nahrung, reguliert werden kann. Erste Entwicklungen konditionaler Genexpression basierten auf induzierbaren Promotor- und *Enhancer*-Sequenzen von Steroidrezeptoren, Hitze-Schock-Proteinen, Interferon- $\gamma$  und

Metallothionein. Der Nachteil dieser Systeme ist die weitgehende Limitierung auf die Zellkultur, da in Tieren pleiotrope Effekte durch die Induktoren (Hormone, Hitzeschock, Schwermetalle u. a.) hervorgerufen werden. Weitere Nachteile sind die ineffiziente Induktion und eine relativ hohe Basalexpression der Transgene (Gingrich und Roder, 1998; Bockamp *et al.*, 2002). Als geeigneter erwiesen sich regulierbare Systeme, die synthetische oder körperfremde Substanzen als Induktoren verwenden. Dazu gehört z. B. Ecdyson, ein Insektensteroidhormon, das Ligand für einen heterodimeren Rezeptor ist. Dieser Ligand-Rezeptor-Komplex kann an ein transgenes Ecdyson-responsives Element in einem Minimalpromotor mit nachgeschalteter cDNA binden und so deren Transkription induzieren (No *et al.*, 1996). Der Nachteil dieses Systems ist, dass die kombinierte Expression von drei Transgenen (die beiden Untereinheiten des Ecdysonrezeptors sowie die Ecdyson-responsive cDNA) nötig ist. Über ähnliche Mechanismen funktionieren Systeme, bei denen Hormonrezeptoren, wie z. B. der Estrogen-, Progesteron- oder Glucocorticoidrezeptor, durch Mutationen so verändert wurden, dass diese durch synthetische Liganden wie RU486 oder Tamoxifen aktiviert werden können (Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999; Zajchowski *et al.*, 2000). Allerdings können auch bei ihrer Verwendung Nebenwirkungen durch Bindung an körpereigene Steroidhormonrezeptoren auftreten.

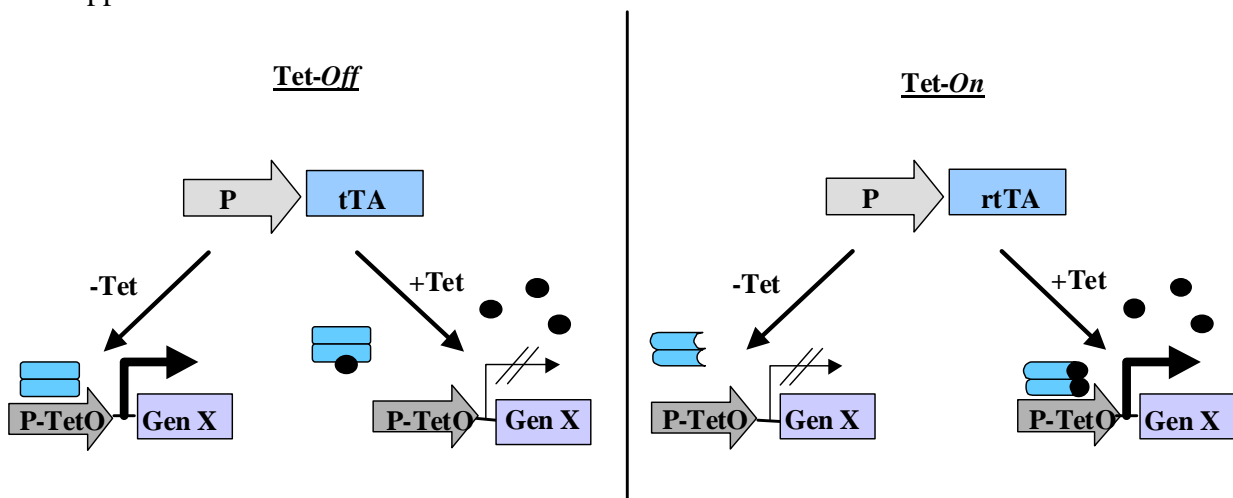
Als besonders effektiv erwiesen sich Systeme aus Prokaryoten, die auf Basis des LacZ- bzw. des Tetrazyklin-Resistenz-Operons von *E. coli* funktionieren. Die Induktoren IPTG (LacZ-System) und Tetrazyklin (Tet-System) können in sehr geringen Konzentrationen zur Induktion eingesetzt werden und haben keine pleiotropen Effekte. Da in der vorliegenden Dissertation das Tet-System verwendet wurde, wird im Folgenden genauer darauf eingegangen.

### 1.3.1 Geninduktion mit dem Tet-System

Das Tet-System, dessen Vorteil in der exogenen Transkriptionssteuerung liegt, basiert auf dem Tetrazyklin-Resistenz-Operon von *E. coli*. Bujard und Gossen entwickelten 1992 einen hochspezifischen Tetrazyklin (Tet)-abhängigen Transaktivator (tTA). Dieser ist ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Repressor des Tet-Resistenz-Operons (Tn10) von *E. coli* und der transkriptionsaktivierenden Domäne des Virionproteins VP16 des *Herpes simplex* Virus. Zielgene werden beim Tet-System unter Kontrolle einer regulatorischen Tet-Operator (TetO)-Sequenz des Tet-Resistenz-Operons exprimiert. An diese Sequenz binden homodimere tTA-Moleküle in Abwesenheit von Tetrazyklin und aktivieren die Transkription nachgeschalteter Gene durch Aktivierung eines Minimalpromotors (siehe Abb. 1.4). Bei Gabe

von Tetrazyklin führt die Bindung des Antibiotikums an den tTA zu Konformationsänderungen im TetR-Bereich des Proteins, wodurch die Bindung an die TetO-Sequenzen und somit die Transaktivierung des Zielgens unterbunden wird (Hinrichs *et al.*, 1994). Die Funktionalität des Tet-Systems wurde von Furth *et al.* (1994) demonstriert, indem sie zeigten, dass die Expression von Luziferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergenem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach siebentägiger Tetrazyklinbehandlung vollständig unterdrückt wird.

Trotz der Tatsache, dass Tetrazyklin und seine Derivate für Eukaryoten nicht toxisch sind und nur geringe Konzentrationen für die Blockade der Genexpression eingesetzt werden müssen, erweist es sich dennoch als ungünstig, für bestimmte Versuchsanordnungen dauerhaft Antibiotika zu verabreichen. Diese Überlegungen führten zur Entwicklung eines reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators (rtTA), bei dem durch Mutagenese vier Aminosäuren ausgetauscht wurden. Dadurch entstand ein Transaktivatorprotein (Gossen *et al.*, 1995), das im Gegensatz zum tTA nach Applikation von Tetrazyklin oder Derivaten wie Doxyzyklin den TetO-Minimalpromotor aktiviert und die Transkription des Zielgens zur Folge hat. Abbildung 1.4. zeigt die beiden Varianten des Tet-Systems und ihre Aktivierung bzw. Repression durch Tet-Applikation.



**Abbildung 1.4: Das Tet-System (verändert nach Bockamp *et al.*, 2002).** Das Tet-System kann zur konditionalen und reversiblen Genexpression eingesetzt werden. Beim Tet-Off System bindet der Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (tTA) an einen Minimalpromotor mit Tet-Operatorsequenzen (P-TetO) und induziert die Transkription eines Zielgens (Gen X). In Anwesenheit von Tetrazyklin (Tet) wird die Konformation des dimeren tTA durch Tet so verändert, dass dieser nicht an P-TetO binden kann und die Genexpression unterbunden wird. Beim Tet-On-System ist genau das Gegenteil der Fall: Der reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) kann nur in Anwesenheit von Tet an P-TetO binden und die Transkription von Gen X induzieren.

Ein Nachteil des rtTA-Proteins ist seine geringe Stabilität und eine basale, auch in Abwesenheit von Doxyzyklin vorhandene Affinität für die TetO-Sequenz, die zu einer ständig vorhandenen Hintergrundaktivität des Systems führt. Außerdem ist die Nutzung des Tet-On-

Systems durch die in einigen Organen unzureichende Induzierbarkeit begrenzt. Aus diesem Grund wurden mutagenisierte tTA-Expressionsplasmide in Hefen auf geringe Basalaktivität und erhöhte Doxyzyklinsensitivität selektioniert. Dabei wurden fünf neue rtTA-Proteine, unter anderem der in der vorliegenden Arbeit verwendete rtTA2-M2, entdeckt, die wesentlich stabiler als der herkömmliche rtTA sind und eine deutlich niedrigere Basalaktivität in Abwesenheit von Doxyzyklin aufweisen (Urlinger *et al.*, 2000).

Mit beiden Varianten (*Tet-On* und *Tet-Off*) ist es möglich, die Expression von Genen in verschiedenen Organismen zu steuern, und vielfältige Veröffentlichungen in den letzten Jahren haben demonstriert, dass das Tet-System sowohl in Zellkultur von Säugerzellen (Resnitzky *et al.*, 1994), Pflanzenzellen (Weinmann *et al.*, 1994) und Hefen (Gari *et al.*, 1997) als auch in transgenen Tieren wie *Drosophila melanogaster* (Girard *et al.*, 1998) und Mäusen (Kistner *et al.*, 1996) zu effizienter und stringent regulierbarer Genexpression führt.

#### 1.4 *In vitro*- und *in vivo*-Modelle mit ERBB2-Relevanz

Der von Coussens und seinen Mitarbeitern (1985) entdeckte Oberflächenrezeptor der Tyrosinkinase-Familie, dem aufgrund seiner großen Homologie zum EGF-Rezeptor der Name HER2 (*Human EGF-Receptor 2*) gegeben wurde, war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Schon bald nach seiner Erstbeschreibung wurde gezeigt, dass die konstitutive Überexpression von HER2/ERBB2 in NIH3T3 Mausfibroblasten zur Transformation dieser Zellen führt (Di Fiore *et al.*, 1987; Hudziak *et al.*, 1987). Dieselben Eigenschaften konnten wenig später auch für die onkogene Rattenvariante *NeuT* in NIH3T3-Zellen nachgewiesen werden (Di Marco *et al.*, 1990). In den darauffolgenden Jahren wurden nach und nach die onkogenen Eigenschaften von überexprimiertem ERBB2 bzw. NeuT aufgedeckt und die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen erforscht.

So konnten Yu *et al.* 1998 zeigen, dass durch Überexpression von ERBB2 in MDA-MB-435 Brustkrebszellen die Taxol-induzierte **Apoptose** inhibiert wird. Außerdem aktiviert ERBB2 über den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und induziert dadurch eine Resistenz gegen apoptotische Stimuli, wie *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) (Zhou *et al.*, 2000).

Auch die Regulation des **Zellzyklus** und das Proliferationsverhalten von Zellen werden durch ERBB2 beeinflusst. Das von ERBB2 transkriptionell aktivierte Zellzyklusprotein Cyclin D1 ist beispielsweise für die Transformation ERBB2-überexprimierender Zellen essenziell. Anhand dieser Erkenntnis konnte das Tumorwachstum von Mammakarzinomen durch die Behandlung mit Cyclin D1-*Antisense*-Molekülen *in vivo* arretiert werden (Lee *et al.*, 2000).



Für den negativen Zellzyklusregulator P27 konnte von Yang *et al.* (2000) gezeigt werden, dass die Überexpression von ERBB2 in NIH3T3- und MCF-7-Zellen zu dessen Ubiquitinylierung und nachfolgendem Abbau führt. Auch die Untersuchung primärer Mammakarzinome ergab eine Korrelation zwischen der ERBB2-Überexpression und einer Abnahme an P27 (Loden *et al.*, 2003).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die durch ERBB2-Überexpression induzierte **Chemoresistenz**. Sie ist eine Konsequenz der ERBB2-bedingten veränderten Zellzyklusregulation und der Fehlregulation von DNA-Reparatur und Apoptose. Tumore mit erhöhter ERBB2-Expression sind deswegen oft resistent gegen DNA-schädigende Agenzien wie Cisplatin, 5-Fluorouracil und andere Medikamente, die zur Krebstherapie eingesetzt werden (Yu und Hung, 2000; Tan *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002).

Außerdem konnten Zusammenhänge zwischen ERBB2-Überexpression und erhöhtem **Invasions- und Metastasierungspotenzial** von Zellen hergestellt werden. Die Überexpression einer N-terminal trunkierten Form von ERBB2 in MCF-7 Mammakarzinomzellen führte zu starken morphologischen Veränderungen der Zellen (Egeblad *et al.*, 2001). Die Ausbildung langer zytoplasmatischer Fortsätze wurde einem motileren und aggressiveren Phänotyp zugeschrieben. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Khoury *et al.* (2001) bei der Überexpression von konstitutiv aktivem ERBB2 in Nierenepithelzellen. Sie fanden heraus, dass ERBB2 in 2D-Kulturen den Zusammenbruch von Zell-Zell-Verbindungen induziert und die Zellen eine erhöhte Beweglichkeit aufweisen. Diese korreliert mit einer Reorganisation des Zytoskeletts und der Umlagerung der fokalen Adhäsionspunkte. Spencer *et al.* zeigten 2000, dass allein die Überexpression von ERBB2 ausreicht, um die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen zu induzieren. Diese veränderte Motilität konnte darüber hinaus mit der Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) assoziiert werden.

Neben den vielfältigen Zellkulturmodellen zur ERBB2-induzierten Karzinogenese wurde in den letzten Jahren auch an verschiedenen transgenen Mausmodellen gearbeitet. Die konstitutive Expression von NeuT unter Kontrolle des bovinen Keratin 5- (Bol *et al.*, 1998; Kiguchi *et al.*, 2000) oder Keratin 14-Promotors (Xie *et al.*, 1998) führte in der Epidermis transgener Tiere zu Hyperplasien und Plattenzellkarzinomen. Da sich die konstitutive, Keratin 14-Promotor gesteuerte NeuT-Expression als perinatal letal erwies, generierten Xie und seine Mitarbeiter (1999) konditional NeuT-exprimierende Mäuse auf der Basis des Tet-*On*-Systems. Bitransgene K14-rtTA/TetO-NeuT-Tiere entwickelten nach zweitägiger Doxyzyklin-Gabe Hauthyperplasien, die nach Entzug des Antibiotikums vollständig

reversibel waren. Die längerfristige Induktion mit Doxyzyklin führte auch bei diesen Tieren zu gravierenden, aber nach Dox-Entzug reversiblen Hyperplasien der Haut und der Haarfollikel.

Auch die konstitutive, brustspezifische Expression von NeuT unter Kontrolle des *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV)-Promotors induzierte die rasche Entstehung von Mammakarzinomen, die das gesamte Brustepithel betrafen (Muller *et al.*, 1988). Da die Tumore in allen transgenen Tieren synchron und zudem an vielen Stellen des Brustgewebes auftraten, gingen Muller *et al.* davon aus, dass NeuT allein ausreicht, um in einem einzigen Schritt die Transformation der Brustepithelzellen zu induzieren. Bouchard und seine Mitarbeiter (1989) entwickelten etwa zeitgleich ein Modell, bei dem NeuT gleichermaßen unter Kontrolle des MMTV-Promotors brustspezifisch exprimiert wurde. Auch in diesen Tieren führte die konstitutive Expression von NeuT zur Ausbildung multipler, wenig differenzierter Adenokarzinome. Allerdings entstanden die Tumore asynchron und erst nach einer Latenzzeit von 5-10 Monaten. Darüber hinaus konnte eine erhöhte NeuT-Expression nicht nur in den Tumoren, sondern auch im umliegenden Drüsengewebe detektiert werden. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die Expression von NeuT zwar nötig, aber nicht unbedingt ausreichend für die maligne Transformation des Brustgewebes ist (Bouchard *et al.*, 1989). Die Erkenntnis, dass bei Muller *et al.* und Bouchard *et al.* mit dem gleichen Modell unterschiedliche Resultate im Bezug auf das onkogene Potenzial von NeuT erzielt wurden, war der Anlass, weitere ERBB2-Modelle zu generieren.

Die konstitutive Expression des Wildtyp-ERBB2 unter Kontrolle des MMTV-Promotors führte zur Bildung einzelner Mammakarzinome nach langer Latenzzeit (Guy *et al.*, 1992). Interessanterweise zeigte sich bei der Untersuchung dieser Tumore, dass die Aktivierung von ERBB2 in etwa 70 % der Karzinome durch somatische Mutationen verursacht wurde (Siegel *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1996; Siegel *et al.*, 1999). Diese betrafen vor allem die cysteinreiche, extrazelluläre Region des transgenen Rezeptors. Siegel und seine Mitarbeiter fanden heraus, dass die Mutationen die Bildung von Disulfidbrücken begünstigen und zur Dimerisierung und Aktivierung der Rezeptoren führen. Da in humanen, ERBB2-überexprimierenden Mammakarzinomen keine Mutationen im *ERBB2*-Gen gefunden werden (Lemoine *et al.*, 1990), sondern in der Regel eine Amplifikation des Genlokus vorliegt, wurde von Andrechek *et al.* (2000) ein weiteres Mausmodell generiert. In diesen Tieren wurde NeuT mit Cre-Rekombinase induzierbar unter Kontrolle des endogenen ERBB2-Promotors exprimiert. Im Gegensatz zum starken MMTV-Promotor sollte die Nutzung des endogenen ERBB2-Promotors in diesem Modell die Expressionsstärke von NeuT auf ein basales Niveau

herabsetzen. Auch hier entwickelten sich nach langer Latenzzeit Mammakarzinome. Die Tumorprogression war allerdings mit einem drastischen Anstieg von *NeuT*-Transkripten und Proteinen verbunden, der mit der genomischen Amplifikation des transgenen *NeuT*-Lokus einherging (Andrechek *et al.*, 2000). Andrechek *et al.* schlossen daraus, dass die genomische Amplifikation des Lokus für die Mammakarzinogenese beim Menschen ein kritisches Ereignis darstellt.

Das neueste Mausmodell zur ERBB2-induzierten Karzinogenese wurde 2002 von Moody *et al.* generiert. Es basiert auf dem Tet-System und gewährleistet die spezifische Expression von NeuT im Brustepithel bitransgener MMTV-rtTA/TetO-NeuT-Tiere. Nach sechswöchiger Induktion mit Doxyzyklin entwickelten diese Tiere mit 100 %iger Penetranz invasive Mammakarzinome. Außerdem bildete ein Großteil der Tiere Lungenmetastasen aus, die die gleichen histologischen Charakteristika wie der Primärtumor aufweisen. Erstaunlicherweise gingen sowohl die Primärtumore als auch die Lungenmetastasen nach Entzug des Doxyzyklins so stark zurück, dass sie anatomisch nicht mehr nachweisbar waren. Demzufolge waren nach Moody *et al.* Primärtumor und Lungenmetastasen abhängig von der NeuT-Expression. Interessanterweise entwickelten sich nach etwa einem halben Jahr in sieben von elf Mäusen, bei denen die Tumore nach Tetrazyklin-Entzug vollständig zurückgegangen waren, neue Tumore. Diese Tumore zeigten weder NeuT-Expression noch erhöhte Proteinmengen des endogenen ErbB2. Da in nicht-induzierten Kontrolltieren auch nach einem Jahr keine Tumore nachgewiesen werden konnten, gehen Moody und ihre Mitarbeiter davon aus, dass einige der Zellen aus den primären Mammakarzinomen sich zu NeuT-unabhängigen Tumorzellen weiterentwickelt haben.

Die aufgeführten Beispiele zeigen die Realisierbarkeit ERBB2-abhängiger Tumor-Mausmodelle. Da die Überexpression von ERBB2 nicht nur in Mammakarzinomen, sondern auch in einer Vielzahl anderer epithelialer Tumore von Bedeutung ist (vergleiche hierzu Tab.1.1), wäre es für die Untersuchung der Tumorgenese wichtig, in naher Zukunft auch Mausmodelle für diese anderen Tumorarten zu generieren, bei deren Pathogenese ERBB2 eine Rolle spielt.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung konditionaler Modelle zur Untersuchung der ERBB2-vermittelten Tumorgenese. Die konstitutive Genexpression, wie sie in den meisten bisher generierten ERBB2-Modellen angewendet wurde, hat einige Nachteile. Zum einen können initiale Prozesse, die in Zellen oder Tieren direkt nach Induktion der Genexpression

einsetzen, durch zeitliche Verzögerungen, wie Selektion der Zellen oder Geburt der Tiere, nicht untersucht werden. Zum anderen ist es insbesondere bei der Untersuchung von Onkogenen interessant, die Vorgänge in Zellen oder Tieren zu untersuchen, die nach Abschalten der Onkogenexpression ablaufen. So können Anhaltspunkte über eine mögliche Tumorregression oder Informationen über die genauen molekularen Mechanismen, die bei Invasion und Metastasierung der Tumorzellen ablaufen, gewonnen werden.

Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Tet-Systems konditionale Modelle zur ERBB2-induzierten Karzinogenese im Zellkultursystem mit MCF-7 Mammakarzinomzellen und in transgenen Mäusen generiert werden, an denen verschiedene Fragestellungen untersucht werden können.

Nach Herstellung der für diese Arbeit benötigten Konstrukte sollte deren Funktionalität zunächst in der Zellkultur überprüft werden. Mittels Transfektion sollten MCF-7/TetO-ERBB2/rtTA-Zelllinien generiert und auf ihre Induzierbarkeit untersucht werden. Stringent regulierbare Zellklone sollten dann weiter charakterisiert und für Hybridisierungsexperimente eingesetzt werden. In einem cDNA-*Microarray* sollte die differenzielle Genexpression nicht-induzierter und induzierter Zellen eines stringent regulierbaren MCF-7/TetO-ERBB2/rtTA-Klons untersucht werden. Interessante, für die Tumorgenese relevante Gene, die aus dem *Array* als differenziell exprimiert hervorgehen, sollten dann genauer untersucht und deren Rolle bei der ERBB2-vermittelten Karzinogenese bestimmt werden.

Mit dem in Zellkultur verifizierten Konstrukt sollten in Kooperation mit der AG Bockamp (Toxikologie, Universität Mainz) transgene *Responder*-Mäuse generiert werden, die das onkogene *NeuT*-Gen unter Kontrolle eines Tetrazyklin-responsiven Promotors exprimieren. Die Kreuzung mit verschiedenen Effektor-Mäusen, die den rtTA- oder tTA unter Kontrolle gewebespezifischer Promotoren exprimieren, sollte in den Nachkommen zur organspezifischen, Doxyzyklin-induzierbaren Expression von onkogenem *NeuT* führen. Kann die Induzierbarkeit des onkogenen *NeuT* in den Tieren nachgewiesen werden, eignen sich diese für die Untersuchung der Mechanismen, über die ERBB2 in die zelluläre Regulation eingreift und zur Tumorentstehung beiträgt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Reagenzien

#### 2.1.1 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem, Millipore-gereinigtem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

Agarplatten	15 g Agar-Agar ad 1 l LB-Medium
Antibiotika	Ampicillin (Fa. Ratiopharm, Ulm) Stammlösung: 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O Endkonzentration: 50-100 µg/ml Doxyzyklin (Fa. Sigma, München) Stammlösung: 200 µg/ml in PBS Endkonzentration: 1 µg/ml Neomycin (Fa. PAA, Linz; Österreich) Stammlösung: 60 mg/ml in PBS Endkonzentration: 1 mg/ml Hygromycin (Fa. PAA, Linz; Österreich) Stammlösung: 50 mg/ml Endkonzentration: 200 µg/ml Puromycin (Fa. Sigma, München) Stammlösung: 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O Endkonzentration: 5 µg/ml
Blue-D-Puffer	25 mM EDTA pH 8,0 50 mg/ml Blue-Dextran
<i>Church</i> -Hybridisierungslösung	1 mM EDTA pH 8,0 0,5 M NaHPO <sub>4</sub> , pH 7,2 7 % SDS 1 % BSA
<i>Church</i> -Wash 1	0,5 % BSA 5 % SDS 1 mM EDTA pH 8,0 40 mM NaHPO <sub>4</sub>
<i>Church</i> -Wash 2	0,1 % SDS 1 mM EDTA pH 8,0 40 mM NaHPO <sub>4</sub>
Coomassie-Entfärbelösung	1 Volumenteil Methanol 0,75 Volumentteile Eisessig 8,25 Volumentteile H <sub>2</sub> O
Coomassie-Färbelösung	4,5 Volumentteile Coomassie brilliant blue (2 mg/l H <sub>2</sub> O)

---

	4,5 Volumenteile Methanol 1 Volumenteil Eisessig
DNA-Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
DNA-Ladepuffer	15 g Saccharose 0,175 g Orange G ad 50 ml H <sub>2</sub> O
DNA- Neutralisierungslösung	0,5 M TrisHCl, pH 7,0 1,5 M NaCl
6x DNA-Probenpuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Saccharose
10x DNaseI-Puffer	100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT
2x FM-Medium	65 % Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 0,025 M TrisHCl pH 8,0
10x Gewebelysepuffer	20 mM HEPES pH 7,7 0,2 M NaCl 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mM EDTA 1 % TritonX-100 2 mM PMSF
IP-Lysepuffer	10 mM Tris pH 7,5 140 mM NaCl 5 mM EDTA 1 % TritonX-100 1 mM DTT 1 mM PMSF frisch zugeben
Kernlysepuffer I	10 mM HEPES/ KOH pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF
Kernlysepuffer II	20 mM HEPES/ KOH pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA 25 % Glycerin 0,2 mM PMSF 0,5 mM DTT

---

10x Laufpuffer	144 g Glycin 30 g Tris 1 % SDS ad 1 l Aqua bidest
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H <sub>2</sub> O pH 7,5
10x MOPS	0,2 M 3-N-Morpholin-Propan-Sulfonsäure 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA pH 7,0
PBS	120 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM KaliumPhosphatpuffer pH 7,4
10x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM TrisHCl pH 8,3 15 mM MgCl <sub>2</sub>
6x Proteinprobenpuffer	350 mM TrisHCl pH 6,8 34,4 % Glycerol (w/v) 10 % SDS 0,93 g DTT 10 % β-Mercaptoethanol (w/v) 0,06 % Bromphenolblau (w/v)
RNA-Hydrolyselösung	50 mM NaOH 10 mM NaCl
6x RNA-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 30 % Glycerol
RNA-Neutralisierungslösung	10x SSC 0,2 M TrisHCl pH 7,4
1,5x RNA-Probenpuffer	61 µl Formaldehyd 150 µl Formamid (deionisiert) 37,5 µl 10x MOPS-Puffer 1,5 µl H <sub>2</sub> O
10x SSC-Puffer	1,5 M NaCl 0,15 M Natriumcitrat pH 7,0
STETL-Puffer	50 mM Tris pH 8,0 50 mM EDTA 5 % Triton X-100

---

10x TAE-Puffer	8 % Saccharose 400 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
<i>Tail</i> -Lysepuffer	50 mM TrisHCl pH 7,4 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1 % SDS 100-600 µg Proteinase K frisch zugeben
1x TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,3
10x TBS-Puffer	24,2 g Tris 80 g NaCl ad 1000 ml H <sub>2</sub> O pH 7,6 mit HCl
10x TE-Puffer	100 mM TrisHCl pH 7,0-8,0 10 mM EDTA pH 8,0
TfbI-Puffer	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin pH 5,8 mit Essigsäure
TfbII-Puffer	10 mM NaMOPS pH 7,0 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15 % Glycerin
10x Transferpuffer	144 g Glycin 30 g Tris ad 1 l Aqua bidest
5x Zellysepuffer	62,5 mM EDTA 2,5 % SDS
ZY-Entwicklungspuffer	50 mM TrisHCl pH 7,8 50 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 M NaCl
ZY-Ladepuffer	0,12 M TrisHCl pH 6,8 4 % SDS 20 % Glycerol 0,01 % Bromphenolblau



### 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fa. Roche (Mannheim)
DNaseI (RNase frei)	Fa. Roche (Mannheim)
Klenow Exo <sup>-</sup>	Fa. NEB (Frankfurt)
M-MLV Reverse Transkriptase	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinase K	Fa. Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	alle Fa. NEB (Frankfurt)
Ribonuklease Inhibitor	Fa. MBI Fermentas (Leon-Roth)
RNase A	Fa. Sigma (München)
T4-DNA-Ligase hc	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

### 2.1.3 Verwendete Kits

<i>Prime it II Labelling Kit</i>	Fa. Stratagene (Amsterdam)
<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Fa. Roche (Mannheim)
<i>Gel Extraction Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>Light Cycler Fast Start DNA</i>	
<i>Master SYBR Green I System</i>	Fa. Roche (Mannheim)
<i>M-MLV RT Kit</i>	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
<i>Nucleobond AX Kit</i>	Fa. Macherey und Nagel (Breitenfurt)
<i>RNeasy RNA Extraction Kit</i>	Fa. Qiagen (Hilden)
<i>BigDye Sequencing Kit Version 3.1</i>	Fa. Genterprise Genomics (Mainz)

### 2.1.4 Antikörper

P21 rabbit polyclonal IgG	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
Aktin goat polyclonal IgG	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
Her-2/neu rabbit polyclonal IgG	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
P38 rabbit polyclonal IgG	Fa. Cell Signaling (MA, USA)
p-P38 mouse monoclonal IgM	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
Erk1/2 rabbit polyclonal	Fa. Cell Signaling (MA, USA)
p-Erk1/2 rabbit polyclonal	Fa. Cell Signaling (MA, USA)
GFP mouse monoclonal IgG2a	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
Integrin $\alpha$ 5 mouse monoclonal IgG	Fa. BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Integrin $\beta$ 1 mouse monoklonal IgG	Fa. BioGenex (San Ramon, USA)
P53 mouse monoclonal IgG2a	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
BrdU mouse monoclonal IgG1	Fa. Roche (Mannheim)
goat anti-rabbit IgG-HRP	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
donkey anti-goat IgG-HRP	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
goat anti-mouse IgG-HRP	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)
Cy5-conjugated donkey anti rabbit	Fa. Dianova (Hamburg)
PE-conjugated goat anti mouse	Fa. Santa Cruz (Heidelberg)

### 2.1.5 Vektoren

pBI-EGFP	Fa. Clontech (Heidelberg)
pBlueskript II SK (+)	Fa. Stratagene (Heidelberg)
pcDNA3 Neo	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)

pcDNA3.1 Hygro	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
pUhrT 62-1	Prof. Bujard, ZMBH Heidelberg
pBABE	Morgenstern und Land, 1990

### 2.1.6 Inhibitoren

PD98059 (50 $\mu$ M)	Fa. Sigma (München)
RO31-8220 (2 $\mu$ M)	Fa. Sigma (München)
SB203580 (20 $\mu$ M)	Fa. Sigma (München)
SP600125 (10 $\mu$ M)	Fa. Calbiochem (Schwalbach)
Wortmannin (15 $\mu$ M)	Fa. Sigma (München)
Complete Proteaseinhibitorcocktail	Fa. Roche (Mannheim)

### 2.1.7 Größenstandards

100 bp DNA-Leiter	Fa. NEB (Frankfurt)
$\lambda$ DNA/HindIII-Fragments	Fa. GibcoBRL (Karlsruhe)
log2 DNA-Leiter	Fa. NEB (Frankfurt)
RNA-ladder	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
Prestained protein marker	Fa. Roth (Karlsruhe)
Rainbow marker RPN800	Fa. Amersham (Freiburg)

### 2.1.8 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , supE44, hsdR17, recA1, $\Delta$ lacU169, $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, endA1, gyrA96, ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ), thi-1, relA1, supE44, $\lambda$ -
<i>E. coli</i> TOP 10	F <sup>-</sup> , mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC), $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lac $\lambda$ 74, deoR, recA1, araD139, $\Delta$ (ara-leu)7697, ga/u, ga/K, rpsL, endA1, rmpG

### 2.1.9 Radioisotope

$\alpha$ ( <sup>32</sup> P)dCTP (3000Ci/mmol)	Fa. Amersham (Freiburg)
---	-------------------------

### 2.1.10 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad “reinst” oder “pA”.

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Fa. Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Fa. Difco (Heidelberg)
Agarose	Fa. Eurogentec (Seraing, Belgien)
5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)	Fa. Sigma (München)
EDTA	Fa. Gerbu (Gaiberg)
Ethanol	Fa. Riedel-de-Haen (München)
Ethidiumbromid	Fa. Q-Biogene (Heidelberg)
Hefeextrakt	Fa. Difco (Heidelberg)
IPTG	Fa. Applichem (Darmstadt)
Phenol	Fa. Roth (Karlsruhe)
Phenol/Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe)
Propidiumiodid	Fa. Sigma (München)

SDS	Fa. Serva (Heidelberg)
TEMED	Fa. Amresco (Ohio, USA)
Trypton	Fa. Difco (Heidelberg)
Tris	Fa. Roth (Karlsruhe)
TrisHCl	Fa. Roth (Karlsruhe)
X-Gal	Fa. Applichem (Darmstadt)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (München), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen.

### 2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten	Fa. Biorad (München)
FACS Rundbodenröhrchen	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg)
Hyperfilme	Fa. Amersham (Freiburg)
Kryoröhrchen	Fa. Nalgene (Schwerte)
Nylonmembran, Hybond N+	Fa. Amersham (Freiburg)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Fa. Peqlab (Erlangen)
Petrischalen	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Pipetten (5 ml, 10 ml und 25 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
PP-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Fa. Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Fa. Eppendorf (Hamburg)
Schnappdeckel PP-Röhrchen	Fa. Falcon (Heidelberg)
S&S-Rotrand Sterilfilter (0,22 µm)	Fa. Schleicher und Schuell (Dassel)
Szintillationsröhrchen	Fa. Roth (Karlsruhe)

### 2.1.12 Zellkulturmaterialien

DMEM	Fa. Cambrex (Verviers, Belgien)
FCS (Tet-frei)	Fa. PAN (Aidenbach)
L-Glutamin	Fa. PAN (Aidenbach)
Penicillin/Streptomycin	Fa. PAN (Aidenbach)
Trypsin/EDTA	Fa. PAN (Aidenbach)

Alle Zellkulturgefäße und Zellkulturplatten wurden von der Firma Renner (Dannstadt) bezogen.

### 2.1.13 Tiere

Die verwendeten Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden von der Firma Charles River (Sulzberg) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes in Filtertopkäfigen. Für die Generierung der transgenen Mauslinien wurden folgende Mausinzuchtstämme verwendet:

FVB/N  
C57BL/6

Für die Untersuchung doppelt transgener Tiere wurden uns freundlicherweise folgende Effektor-Mäuse zur Verfügung gestellt:

Fabp-rtTA	Saam <i>et al.</i> , 1999
Lck-rtTA	Dr. Ferrier, Universität Marseille

CMV-rtTA                      Kistner *et al.*, 1996  
 LAP-tTA                        Kistner *et al.*, 1996

### 2.1.14 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Easy-Cast electrophoresis system (versch. Größen); Fa. Owl Scientific (USA)
Bakterieninkubator	Typ B5042; Fa. Heraeus (Hanau)
DNA-Sequenziergerät	ABI Prism <sup>TM</sup> 377; Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt) Software: DNA-Analysis V2.1.2 Rechner: Power Macintosh 7200/90; Fa. Apple (USA)
Elektroporationsanlage	Gene Pulser; Fa. BioRad (München)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg) Software: CELLQuest Pro
Fluoreszenzmikroskop	Typ DMRX, Fa. Leica (Solms)
Geldokumentation	E.A.S.Y. System; Fa. Herolab (Wiesloch)
Heizblock	MR2002; Fa. Heidolph (Schwalbach)
Hybridisierungssofen	Hybridiser HB-2; Fa. Techne (GB)
Luminometer	Lumat LB-9507; Fa. Berthold (Wildbad)
MRX Microplate Reader	Fa. Dynex (USA)
PCR-Geräte	TC-1 DNA-Thermal Cycler; Fa. Perkin Elmer (Weiterstadt) PTC 200 und PTC 100; Fa. MJ Research (USA)
Photometer	Ultrospec III; Fa. Pharmacia (Freiburg)
Schüttelinkubator	Lab-Therm; Fa. Kühner (Schweiz)
Semi-Dry Blotting Apparat	Fa. Biometra (Göttingen)
Spannungsgeräte	LKB-GPS 200/400; Fa. Pharmacia (Freiburg) 2297 Macrodrive 5; Fa. LKB Bromma (USA)
Sterilbänke	DLF/BSS-6; Fa. Cleanair (Deutschland) Antair BSK
Szintillationszähler	Liquid Scintillations Counter Wallace-1410 Fa. Pharmacia (Freiburg)
Ultraschallstab	Sonifier Cell Disrupter B15; Fa. Branson (Danbury, USA)
Ultra-Turrax T25	Fa. Janke und Kunkel (Stauffen)
Vakuumtrockner	Univapo 100H, Refrigerated Aspirator; Fa. Uni-Equip (Martinsried)
Wasserbäder	2219 Multitemp II; Fa. LKB Bromma (USA) F10; Fa. Julabo (USA) Certomat WR; Fa. Braun (Melsungen)
Zellkulturinkubator	IR 1500 Automatic CO <sub>2</sub> Inkubator; Fa. Flow Laboratories (USA)
Zentrifugen	Biofuge A; Fa. Heraeus (Hanau) Zentrifuge 5415C; Fa. Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 5804R; Fa. Eppendorf (Hamburg) Kühlzentrifuge 6000D; Fa. Sorvall (Langenselbold)

### 2.1.15 Oligonukleotidsequenzen

#### Generierung und Sequenzierung pINSpBI-EGFP/NeuT:

Neu Nhe F	5'-AAAAA GCT AGC GCC GCA ATG ATC ATC ATG GAG CTG GCG-3'
Neu Nhe R	5'-AAAAA GCT AGC TCA TAC AGG TAC ATC CAG GCC TAG GTA-3'
Neu CMV R	5'-AGG AGG GCG AGG AGG AAC-3'
Neu rat F	5'-TAG AAA GAC CCA AGA CTC TCT CTC-3'
Neu rat R	5'-AAC GTT AGG GGG GGG GGA GGG AGA-3'
Neu rat R2	5'-TTC AAG CAG CAA GGA AAG GTT CCT-3'
Neu F1	5'-CTG CTT CCG CAA GAA TAA CCA ACT-3'
Neu F2	5'-TGA GAA ATG CAG CAA GCC CTG TGC-3'
Neu F3	5'-GGC CCT GCT CCA CAG TGG GAA CCG-3'
Neu F4	5'-GGT GAC ATT CAT CAT TGC AAC TGT-3'
Neu F5	5'-CCG AGA ACA CCG AGG TCG CCT AGG-3'
Neu F6	5'-GGA GTT GGT GTC AGA ATT TTC ACG-3'
Neu F7	5'-GAG TGT GCT ATG GTC TGG GCA-3'
Neu RI	5'-CCC TTC AGG ATC TCT GTG AG-3'
Neu RII	5'-CAG GAT CCC ACT TCC GTA GA-3'
Neu RIII	5'-TGG ATC CCC AGG CCT TGC AG-3'
Neu RIV	5'-TAG TGG GCG CAG GCT GCA CA-3'
Neu RV	5'-GCT CCT GAT CCA AGC ACC TT-3'
Neu RVI	5'-AGC AGC CGA GCC AGC CCG AA-3'
Neu RVII	5'-TCC AGC AGT GAA CGG TAG AA-3'
Neu RVIII	5'-GGA GGC TGA GGC TGA ACC TC-3'

#### Generierung und Sequenzierung pINSpBI/EGFP-hNeu:

hneuNhe F	5'-AAA AAG CTA GCA GCC GCA GTG AGC ACC AT-3'
hneuNhe R	5'-AAA AAG CTA GCG GTT CAC ACT GGC ACG TC-3'
hneu F1	5'-TCA CAA CCA AGT GAG GCA GGT-3'
hneu F2	5'-ACT CTG ACT GCC TGG CCT GCC-3'
hneu F3	5'-ACG ATT CTG CAC AAT GGC GCC-3'
hneu RI	5'-ACA GGC TGG CAT TGG TGG GCA-3'
hneu RII	5'-TTG GTG TCT ATC AGT GTG AGA-3'
hneu RIII	5'-AAA GGT AGT TGT AGG GAC AGG-3'
hneu RIV	5'-GAG CGC AGC CCC AGC CAG CTG-3'
hneu RV	5'-AGC AGT GCC CTC GGG CGC ACA-3'

#### Charakterisierung der Mäuse:

MusAktin A5	5'-GAA GAG CTA TGA GCT GCC TG-3'
MusAktin A3	5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TC-3'
βGloNeuT F	5'-TTC AGC CTC AGC CTC CTT TA-3'
βGloNeuT R	5'-GTA TTT GTG AGC CAG GGC AT-3'
MEFneuFn	5'-TGC TGT GGA GAA CCC TGA AT-3'
MEFneuRn	5'-TTT GCC CCC TCC ATA TAA CA-3'
rtTAi F	5'-GCT GTG GGG CAT TTT ACT TT-3'
rtTAii R	5'-AGG GCA TCG GTA AAC ATC TG-3'

rtTA62-1 F            5'-CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA G-3'  
 rtTA62-1 R            5'-CAT AGA ATC GGT GGT AGG TGT C-3'

Oligonukleotide zur Generierung der Sonden:

SV40pA F            5'-ACG CTG GTC GAG CTG ATA CT-3'  
 SV40pA R            5'-ACG CTA TCT GTG CAA GGT CC-3'  
 βGlobin F            5'-CTG AGA ACT TCA GGG TGA GTT-3'  
 βGlobin R            5'-CAG TGT ATA TCA TTG TAA CC-3'  
 NeuT F Northern    5'-TAG AAA GAC CCA AGA CTC TCT CTC CT-3'  
 NeuT R Northern    5'-TCA TAC AGG TAC ATC CAG GCC TAG GTA-3'

Oligonukleotide für RT-PCRs

BMP-1 F            5'-CAC AAG GTG ACA TCC ACC AG -3'  
 BMP-1 R            5'-CCA CAA TGA CCC ACT CAC AG -3'  
 FANCA F            5'-AGC TCG TCT TTT TCT GCT GC-3'  
 FANCA R            5'-TTA TTT ACA CGG GAG CTG GG-3'  
 GADD45α F        5'-AAA GGA TGG ATA AGG TGG GG-3'  
 GADD45α R        5'-TCC CGG CAA AAA CAA ATA AG-3'  
 HAktin A3         5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'  
 HAktin A5         5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3'  
 INTα5 F            5'-TAC AAA GCC CTG AAG ATG CC-3'  
 INTα5 R            5'-TGG GAG TCT GAA ATT GGG AG-3'  
 INTβ1 F            5'-TAC TTG TGA AGC CAG CAA CA-3'  
 INTβ1 R            5'-GGG GTA ATT TGT CCC GAC TT-3'  
 MMP9 F            5'-GTC CTG GTG CTC CTG GTG-3'  
 MMP9 R            5'-GAG ATT TCG ACT CTC CAC GC-3'  
 MMP13 F            5'-TTG AGC TGG ACT CAT TGT CG-3'  
 MMP13 R            5'-AGA AGT CGC CAT GCT CCT TA-3'  
 MusMMP13 F        5'-AGT TGA CAG GCT CCG AGA AA-3'  
 MusMMP13 R        5'-TCC TTG GAG TGA TCC AGA CC-3'  
 P16 F              5'-CAC TCT CAC CCG ACC CGT-3'  
 P16 R              5'-GCA TGG TTA CTG CCT CTG GT-3'  
 P21 F2             5'-GTC CGT CAG AAC CCA TGC-3'  
 P21 R2             5'-GGC GTT TGG AGT GGT AGA AA-3'  
 P21LC F            5'-GGA AGA CCA TGT GGA CCT GT-3'  
 P21LC R            5'-GGC GTT TGG AGT GGT AGA AA-3'  
 P27 F              5'-AAA TGT TTC AGA CGG TTC CC-3'  
 P27 R              5'-ACA GGA TGT CCA TTC CAT GA-3'  
 PDH F              5'-GAC CAA TGG ACA TGG AAA CC-3'  
 PDH R              5'-TGG CAA CCG TAA CAG ACA AA-3'  
 T16                5'-TTT TTT TTT TTT TTT T-3'  
 VEGF F             5'-CAT TGT TGG AAG AAG CAG CC-3'  
 VEGF R             5'-GGG CAG AGC TGA GTG TTA GC-3'

Vektor-Primer:

T3                    5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG G-3'  
 T7                    5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'

Alle Oligonukleotide wurden von der Fa. Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit DNA und RNA

#### 2.2.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Nukleinsäurekonzentrationen im Photometer erfolgte bei 260 nm, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt. Eventuelle Verunreinigungen durch Proteine können bei 280 nm gemessen werden. Der Quotient aus der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> liegt bei reinen DNA-Präparationen bei 1,8 bis 2,0. Bei  $\lambda=260$  nm entspricht eine OD von 1.0 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA und 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

Die DNA bzw. RNA wurde üblicherweise 1:100 verdünnt und anschließend die Konzentration in Quarzküvetten bei 260 nm gemessen.

#### 2.2.1.2 Gelelektrophorese mit Agarosegelen

Bei der Gelelektrophorese zeigen Nukleinsäuren je nach Größe ein unterschiedliches Laufverhalten. Dabei können DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 15 kbp auf 0,8-2 %igen Agarosegelen aufgetrennt werden. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 0,5x TBE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. Nach Verfestigung des Gels wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard zur Abschätzung der DNA-Fragmentgrößen wurden 5-10  $\mu\text{l}$  HindIII restringierte  $\lambda$ -DNA (Fa. GibcoBRL, Karlsruhe), log<sub>2</sub>-Marker (Fa. NEB, Frankfurt) oder 100 bp-Leiter (Fa. GibcoBRL, Karlsruhe) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in 0,5x TBE-Puffer bei 35-120 V für 2-6 h je nach Gelkonzentration und Fragmentgröße. Zur Darstellung der DNA wurden die Gele anschließend 5-10 min im Ethidiumbromidfärbebad (5  $\mu\text{g/ml}$ ) gefärbt und 10-20 min in Wasser entfärbt. Nach dem Färben wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei  $\lambda=312$  nm betrachtet und mit dem E.A.S.Y Videosystem (Fa. Herolab, Wiesloch) fotografiert oder einzelne DNA-Banden aus dem Gel extrahiert.

#### 2.2.1.3 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltungen von DNA wurden unter den von den Herstellern angegebenen Bedingungen und unter Verwendung der mitgelieferten Puffer ausgeführt.

Für die Spaltung von Plasmid DNA aus Mini- oder Maxipräparationen wurden 0,5-3  $\mu\text{g}$  DNA in einem Gesamtvolumen von 10-30  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Pro 1  $\mu\text{g}$  DNA wurden 3-5 Einheiten

Restriktionsenzym zugegeben. Die Inkubationszeit betrug mindestens 1 h bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die DNA-Spaltung mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

#### **2.2.1.4 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden**

Beim Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen können je nach Enzym stumpfe (*blunt ends*) oder überhängende (*sticky ends*) DNA-Enden entstehen. Für manche Klonierungen ist es nötig, *sticky ends* eines Fragmentes aufzufüllen, damit dieses z. B. in einen Vektor mit *blunt ends* ligiert werden kann. Dazu wurde zunächst die Restriktionsendonuklease im Verdauansatz (50 µl) 20 min hitzeinaktiviert und im folgenden der Ansatz mit 3 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl des Enzyms Klenow Exo- (5 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss folgte noch eine weitere Inkubation (20 min bei 65°C) zur Inaktivierung des Enzyms. Die mit den entsprechenden dNTPs aufgefüllten stumpfen Enden des Fragments konnten dann nach Aufreinigung durch Gelextraktion (siehe 2.2.1.5) oder Fällung (siehe 2.2.1.6) in einen Vektor mit *blunt ends* ligiert werden.

#### **2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Präparative Agarosegele (in der Regel 0,8 %) mit den entsprechenden DNA-Fragmenten wurden zum Ausschneiden der Banden möglichst kurz dem UV-Licht ausgesetzt, um DNA-Schädigungen zu verhindern. Zur Extraktion der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken wurde *Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### **2.2.1.6 Fällung von DNA**

Normalerweise wurde DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat und 3 Volumen 100 %igem Ethanol 30 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge gefällt. Nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol und anschließendem Trocknen im Vakuumtrockner, wurde die DNA dann in einem geeigneten Volumen destillierten Wassers oder 1/10 TE-Puffer aufgenommen. Vor der Fällung wurde die DNA in der Regel durch zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion und einmalige Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion von Enzymen und anderen Proteinen befreit.

PCR-Produkte wurden mit 1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumen frischem Isopropanol 30 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit gefällt. Dabei können die aus der PCR stammenden *Primer* und kleine DNA-Fragmente (< 80 bp) selektiv entfernt werden. Die gefällte DNA wurde dann ebenfalls mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach einem Trocknungsschritt in einem geeignetem Volumen Wasser oder ¼ TE aufgenommen.



### 2.2.1.7 Dephosphorylierung von Vektoren

Vor Einsatz der Vektor-DNA zur Ligation wurde diese einer AP-Behandlung (alkalische Phosphatase) unterzogen. Das enzymatische Entfernen der Phosphatreste unterbindet eine Ligation der Vektor-DNA untereinander.

Zu 50  $\mu\text{l}$  enzymatisch verdautem Vektoransatz wurde 1  $\mu\text{l}$  AP (1 U/ $\mu\text{l}$ ) pipettiert. Es folgten 15 min Inkubation bei 37°C und 15 min bei 56°C. Daraufhin wurde nochmals 1  $\mu\text{l}$  AP zugegeben und die Inkubationsschritte wiederholt. Vor der Ligation erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Gelextraktion oder Fällung (2.2.1.5 bzw. 2.2.1.6).

### 2.2.1.8 Ligation

Nach Spaltung von DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen, wurden diese zunächst mittels Gelextraktion oder Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (25:24:1), Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24:1) mit anschließender Ethanol-fällung von Verunreinigungen befreit und die Vektor-DNA einer AP-Behandlung (2.2.1.7) unterzogen. Anschließend wurden 2-5  $\mu\text{l}$  der DNA zur Mengenabschätzung auf einem Agarosegel analysiert. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10-20  $\mu\text{l}$ , wobei das einzufügende Fragment in 3-5 fachem (0,3-0,5 pmol) Überschuss gegenüber der Vektor-DNA (0,1 pmol) eingesetzt wurde. In den Ligationsansätzen waren außerdem 1x Ligase-Puffer und 1-2  $\mu\text{l}$  hochkonzentrierte T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) enthalten. Es wurde auf das jeweilige Endvolumen mit H<sub>2</sub>O bidest aufgefüllt. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C im Wasserbad.

### 2.2.1.9 Herstellung chemokompetenter Bakterien nach Hanahan

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* Bakterien erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1985). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit einer *E. coli* DH5 $\alpha$  ÜN-Kultur beimpft und bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann zentrifugiert (1200 g, 10 min, 4°C) und das Bakterienpellet in 30 ml eiskaltem Tfb I-Puffer resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (800 g, 6 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde im Anschluss vorsichtig in 4 ml Tfb II-Puffer resuspendiert, in 200  $\mu\text{l}$  Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zu Verwendung wurden die Bakterienaliquots bei -80°C gelagert.

### **2.2.1.10 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* TOP10 Bakterien wurden 10 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C mit 220 upm geschüttelt. Am folgenden Tag wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml ÜN-Kultur angeimpft und die Zellen bei 37°C und 220 upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 (etwa 2,5-3 h) geschüttelt. Nach Erreichen der optimalen OD wurden die Bakterien 20 min auf Eis inkubiert und dann 5 min bei 4°C, 2600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 ml eiskaltem 10 %igen Glycerol resuspendiert. Es erfolgte eine weitere 20-minütige Inkubation auf Eis woraufhin die Zellen wieder bei 4°C, 2600 g abzentrifugiert, in 50 ml eiskaltem 10 %igen Glycerol resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert wurden. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (4°C, 2000 g, 20 min) wurden die Bakterien in 2 ml eiskaltem 10 %igen Glycerol resuspendiert, aliquotiert (40 µl) und nach kurzem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

### **2.2.1.11 Transformation mittels Elektroporation und Selektion positiver Klone**

Elektrokompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2-4 µl Ligationsansatz vermischt und in vorgekühlte, sterile Elektroporationsgefäße (Elektrodenabstand 1 mm; Fa. Biorad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.0 V und 25 µFD mit einem Genpulser (Fa. Biorad, München). Danach wurden die Bakterien sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen, das Gemisch in ein 15 ml Schnappdeckelgefäß überführt und 45 min bei 37°C geschüttelt. Je Transformationsansatz wurden 100-300 µl auf LB<sub>AMP</sub>-Platten ausgestrichen und ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag konnten gewachsene Bakterienkolonien für 5 ml-ÜN-Kulturen verwendet werden.

### **2.2.1.12 Transformation mittels Hitzeschock**

Chemokompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 4-8 µl Ligationsansatz vermischt, in 15 ml Falcon-Transformationsröhrchen überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 45 sec bei 42°C im Wasserbad woraufhin unverzüglich 1 ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese 45 min bei 37°C geschüttelt wurden. Je Transformationsansatz wurden 100-300 µl auf LB<sub>AMP</sub>-Platten ausgestrichen und ÜN im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die entstandenen Bakterienkulturen für DNA-Minipräparationen verwendet werden.

### 2.2.1.13 Herstellung von *E. coli*-Glycerinkulturen

Für Glycerindauerkulturen wurden 500 µl einer *E. coli* ÜN-Kultur mit 500 µl FM-Medium in einem Kryoröhrchen vermischt und bei -80°C eingefroren.

### 2.2.1.14 Screening rekombinanter Plasmide

Beuken *et al.* haben 1998 eine Methode zur schnellen Überprüfung von Klonierungen in Biotechniques vorgestellt. Diese macht sich das unterschiedliche Laufverhalten von chromosomaler DNA, RNA und Plasmiden verschiedener Größe in Agarosegelen zu Nutze. Nach Ligation und Transformation entstandene Bakterienklone wurden ÜN in 2-3 ml LB<sub>AMP</sub>-Medium vermehrt. Am folgenden Tag wurden davon 150 µl in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 20 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die entstandenen Bakterienpellets wurden mit 30 µl 6x Blaumarker und 15 µl Phenolchloroform versetzt und 1 min gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, RT, maximale Geschwindigkeit) konnten 10 µl des Überstandes auf einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert werden, wobei chromosomale DNA, RNA und Plasmide unterschieden werden so und Klone mit Plasmiden richtiger Größe identifiziert werden konnten.

### 2.2.1.15 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Aufreinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA (Minipräparation) aus Bakterienkulturen erfolgte je nach benötigtem Reinheitsgrad entweder (für Sequenzierungen, Klonierungen u. a.) unter Verwendung des RPMI *Kits* (Fa. Q-Biogene, Heidelberg) genau nach Angaben des Herstellers oder (für die Analyse mit Restriktionsendonukleasen) nach einem Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989. Dazu wurden 1,5 ml einer Bakterienkultur 30 sec zentrifugiert (RT, maximale Geschwindigkeit), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 250 µl STETL Puffer aufgenommen und 1 min gekocht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, RT, maximale Geschwindigkeit) wurde das entstandene Bakterienpellet entfernt und die freigesetzte Plasmid-DNA durch Zugabe von 220 µl Isopropanol, Mischen und Zentrifugation (10 min maximale Geschwindigkeit bei RT) gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70 %igem Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 30 µl RNaseA-haltigem (50 µg/ml) Wasser aufgenommen.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi- oder Maxipräparation) wurde mit Hilfe des Nucleobond *AX-Kits* (Fa. Macherey und Nagel, Breitenfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde nach der Isolierung in einer geeigneten Menge ¼ TE gelöst.

### 2.2.1.16 Isolierung von genomischer DNA aus Zellkulturen

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen in 24-well-Platten wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen, in 200  $\mu$ l 1x Zellysepuffer mit 1 mg/ml ProteinaseK aufgenommen und 1-2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l NaCl (5 M) und 250  $\mu$ l Isopropanol wurde die DNA durch Zentrifugation (15 min, RT, maximale Geschwindigkeit) gefällt, mit 75 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30-40  $\mu$ l 1/10 TE gelöst. Für eine analytische PCR wurden davon 3  $\mu$ l eingesetzt.

### 2.2.1.17 Isolierung von RNA aus Zellkulturen und Entfernung genomischer DNA

Für die Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen wurden je Ansatz in der Regel eine 10 cm-Kulturschale verwendet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen trypsiniert, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und durch Zentrifugation (350 g, RT, 10 min) pelletiert. Die Überstände wurden vollständig abgenommen und die Zellen in 600  $\mu$ l RLT-Puffer aus dem QIAGEN *RNeasy Mini Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) aufgenommen. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte genau nach den Angaben des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurde die RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte photometrisch (vgl. 2.2.1.1).

Die Entfernung genomischer DNA aus den isolierten RNAs erfolgte durch einen DNaseI-Verdau (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 70  $\mu$ l RNA in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l (10  $\mu$ l 10x DNaseI-Puffer, 10  $\mu$ l 10x TE, 2  $\mu$ l RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l DNaseI (10 U/ $\mu$ l) und 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) 2 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss mit dem *RNA-Cleanup* Protokoll aus dem *RNeasy Mini-Kit* nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die RNA wurde beim letzten Schritt in 42  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.18 Isolierung von RNA aus Geweben

Die zu untersuchenden Gewebe wurden auf Eis präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Für die RNA-Extraktion wurden die Gewebe in 1 ml Trizol (je 50-100 mg Gewebe) in 15 ml PP-Schnappdeckelröhrchen überführt und 1 min mit einem Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke und Kunkel, Stauffen) homogenisiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation (2700 g, RT) wurden die Überstände in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 200  $\mu$ l Chloroform versetzt, 15 sec mit der Hand geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt (15 min, 12000 g, 4°C) erfolgte die Fällung der RNA durch Mischung der oberen, wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol. Die gefällte RNA wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in entsprechenden Mengen RNase-freiem H<sub>2</sub>O 10 min bei 60°C durch Schütteln gelöst bevor sie bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert wurde.

#### **2.2.1.19 Sequenzierung von DNA**

Sanger *et al.* beschrieben 1977 eine Methode mit der sich DNA sequenzieren lässt. Die Sequenzierarbeit wurde 1992 noch weiter vereinfacht, als Lee *et al.* die Verwendung fluoreszierender Didesoxynukleotide einführten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzierungen erfolgten unter Verwendung des *BigDye Sequencing Version 3.1 Kits* (Fa. Genterprise, Mainz). Für einen 10 µl Sequenzierungsansatz wurden 50-100 ng PCR-Produkt oder 1-3 µg Plasmid-DNA als Matrize eingesetzt. Außerdem enthielt der Sequenzieransatz 10 pmol eines spezifischen *Primers*, 2 µl *BigDye Version 3.1* und 2 µl 5x Sequenzierungspuffer Version 3.1.

##### Verwendetes Sequenzierprogramm:

1 min 95°C

30 sec 95°C/ 10 sec 50°C/ 4 min 60°C (30 Zyklen)

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wurden mit Natriumacetat/EtOH gefällt und zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen. Nach der Vakuumtrocknung wurde die DNA in 2,5 µl Sequenzier-Ladepuffer (Formamid und Blue-D-Puffer im Verhältnis 6:1) gelöst. Die anschließende Polyacrylamidgelelektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale und deren automatische Auswertung erfolgten genau nach den Angaben des Herstellers mit dem *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Fa. AB Applied Biosystems, Weiterstadt).

#### **2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR dient der exponentiellen, enzymatischen Amplifizierung von Nukleotidsequenzen *in vitro*. Dabei muss die Sequenz am 3'- und 5'-Ende der zu amplifizierenden DNA bekannt sein. An diese Matrizen-DNA können sich nach Denaturierung der DNA-Doppelstränge im Verlauf der PCR zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*Primer*) anlagern. An die *Primer* werden durch die hitzestabile Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* die zur Matrizen-DNA komplementären Nukleotide angeheftet. Die PCR verläuft in drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
2. Anlagerung (Annealing) der *Primer* an die DNA-Einzelstränge
3. Anlagerung (Extension) von Nukleotiden

Das Standardprogramm, das in der Regel für die PCRs in dieser Arbeit verwendet wurde, sah wie folgt aus:

3 min 94°C	}	18-35 Zyklen
1 min 94°C		
1 min 55-67°C		
1 min 72°C		
10 min 72°C		

Die Zyklenzahl sowie die Annealingtemperatur variierten je nach verwendeten Oligonukleotiden und Matrizen-DNA. Je PCR-Reaktion wurden in der Regel 50 µl angesetzt:

5 µl	10x PCR-Puffer
5 µl	dNTPs (je 1,25 mM)
1 µl	Taq-Polymerase (1 Unit/µl)
2 µl	5' <i>Primer</i> (20 pmol/ µl)
2 µl	3' <i>Primer</i> (20 pmol/ µl)
1-2 µl	DNA (10-500 ng)
ad. 50 µl	H <sub>2</sub> O bidest

Im Anschluss an die PCR wurden 5-10 µl der amplifizierten DNA auf 0,8-2 %igen Agarosegelen überprüft.

Für die Untersuchung differenzieller Genexpression wurden semiquantitative PCRs durchgeführt. Dazu wurde in der Regel 1 µl revers transkribierte cDNA aus der RT-PCR (siehe 2.2.5) eingesetzt und je nach Expressionsstärke des Gens 18-35 Amplifikationszyklen durchgeführt.

### 2.2.3 *Expand-PCR*

Für die Amplifikation besonders großer DNA-Produkte (bis 5 kb aus genomischer DNA, bis 12 kb aus Plasmiden) wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Fa. Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Generierung der NeuT- und der hNeu-cDNAs wurden hierzu Mix 1 (5 µl *Expand* Puffer mit MgCl<sub>2</sub>, 0,75 µl Enzym und 19 µl Aqua bidest) und Mix 2 (8 µl dNTPs [1,25 mM je NTP], 1 µl jedes Oligonukleotids (je 400 nM Endkonzentration), 2 µl Matrizen-DNA (100 ng) und 13 µl Aqua bidest) auf Eis vereinigt und mit folgendem *Expand-PCR*-Programm amplifiziert:

2 min 94°C  
 15 sec 94°C, 30 sec 60°C, 2 min 68°C (10 Zyklen)  
 15 sec 94°C, 30 sec 60°C, 2 min 68°C (20 Zyklen mit 5 sec Verlängerung je Zyklus)  
 7 min 72°C

Die PCR-Produkte wurden vor der Weiterverarbeitung auf 0,8 %igen Agarosegelen überprüft.

#### 2.2.4 Quantitative *real-time* PCR

Zur quantitativen Bestimmung differenzieller Genexpression wurden Amplifikationen von cDNA am *Light Cycler* (Fa. Roche, Mannheim) mit Hilfe des *Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kits* (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Die cDNAs, die zuvor durch die reverse Transkription von 4 µg zellulärer RNA (siehe 2.2.5) generiert worden waren, wurden zunächst 1:50 in Aqua bidest verdünnt. Für die Erstellung einer linearen Regression der *crossing points* wurde eine der cDNAs zusätzlich 1:10 und 1:100 verdünnt eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl bestehend aus 1-2 µl verdünnter cDNA, 1x *SYBR Green PCR Master Mix*, 4 pmol der jeweiligen Oligonukleotide und 3 mM MgCl<sub>2</sub> in *Light Cycler* Kapillaren (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Die Konditionen für die quantitativen PCRs mit den einzelnen Oligonukleotiden waren wie folgt:

<b>P21</b>	10 min 95°C 2 sec 95°C, 5 sec 62°C, 7 sec 72°C	(45 Zyklen)
<b>INTβ1/α5</b>	10 min 95°C 2 sec 95°C, 5 sec 61°C, 13 sec 72°C	(42 Zyklen)
<b>PDH</b>	10 min 95°C 2 sec 95°C, 5 sec 62°C, 15 sec 72°C	(40 Zyklen)

Die relative Quantifizierung der cDNA wurde mit Hilfe der *Roche Molecular Biochemicals Light Cycler Software* (V. 3.5) durchgeführt. Dabei wurden die *P21/INTα5/INTβ1*-Expressionslevel in Relation zu den Expressionsniveaus des *PDH*-Referenzgens berechnet.

#### 2.2.5 Reverse Transkription

Nach Isolation und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wurden von diesen, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, photometrisch die Konzentrationen bestimmt und je Ansatz 4 µg Gesamt-RNA zu einem Gesamtvolumen von 15,9 µl mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach 10-minütiger Denaturierung der RNA bei 70°C wurden die Proben 2 min auf Eis gestellt bevor 22,5 µl cDNA-Synthesemix zugegeben und die Erststrangsynthese 90 min bei 37°C durchgeführt wurde. Zur Inaktivierung der M-MLV Reversen Transkriptase erfolgte noch eine abschließende Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 min bei 95°C.

**cDNA-Synthesemix:**

8,0 µl 5x *first strand buffer* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

5,0 µl Oligo (dT)<sub>16</sub> (50 µM)

3,6 µl dNTPs (10 mM je dNTP)

2,0 µl RNase Inhibitor (20 U/µl; Fa. MBI Fermentas, Leon-Roth)

4,0 µl DTT (0,1 M; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

1,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl; Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

Für die Negativkontrollen wurden anstelle der M-MLV Reversen Transkriptase die gleichen Mengen RNase-freies H<sub>2</sub>O eingesetzt.

**2.2.6 Generierung von Sonden und Hybridisierungstechniken auf Filtern****2.2.6.1 Radioaktive Markierung von Sonden**

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem *Prime it II-Kit* (Fa. Stratagene, Amsterdam) gemäß den Angaben des Herstellers. Dazu wurden 10-50 ng mittels PCR generierter, aufgereinigter 100-500 bp DNA-Fragmente und 10 µl *Random 9mer Primer* (aus dem *Prime it II-Kit*) zu einem Volumen von 34 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und 5 min hitzedenaturiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 10 µl dCTP-Puffer (aus dem *Prime it II-Kit*), 5 µl bzw. 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP und 1 µl Klenow Exo- (aus dem *Prime it II-Kit*). Nach 15-30 minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C wurde die Reaktion mit 2 µl Stop-Mix (aus *Prime it II-Kit*) beendet und der Ansatz für 2 min auf Eis inkubiert. Das Entfernen nicht eingebauter Nukleotide erfolgte mit *Microspin G50 Columns* (Fa. Amersham, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Nach Abschluss der Markierung wurden 2 µl des Eluats in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Fa. Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler (Fa. Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) gemessen. Die Sonden wurden dann 5 min durch Aufkochen denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und die entsprechenden Mengen für die Hybridisierung eingesetzt.

**2.2.6.2 DNA-DNA Hybridisierung nach Southern**

Die Hybridisierung von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen erfolgte nach der von Southern (1975) beschriebenen Methode. Dazu wurden 10-20 µg genomischer DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen für 3-5 h verdaut (vgl. Kapitel 2.2.1.3) und mittels Phenol/Chloroform- und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt. Die Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgte gelelektrophoretisch auf 1 %igen Agarosegelen (mit Zusatz von 50 µl/500 ml Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml)). Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Markerbanden mit einem Spatel durchstochen und die Gele 15 min in 0,25 N HCl depuriniert. Nach zwei weiteren Inkubationsschritten für 30 min



in DNA-Denaturierungslösung und 30 min in DNA-Neutralisierungslösung, erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf Nylonmembranen (Hybond N+, Fa. Amersham, Freiburg) für 16-48 h in 10x SSC. Das *Blotten* der Fragmente erfolgte dabei durch Kapillarkräfte, wobei ein unidirektionaler Aufbau (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet wurde. Nach Abschluss des Transfers wurden mit Fettstift die Markerbanden eingezeichnet, der *Blot* kurz in 2x SSC gewaschen und 30 min luftgetrocknet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200kJ) in einem *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, Amsterdam).

Für die Hybridisierung der Filter mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (vgl Kapitel 2.2.6.1) wurden diese zunächst für mindestens 3 h in *ExpressHyb*-Lösung (1 ml/cm<sup>2</sup>; Fa. Clontech, Heidelberg) bei 60°C prähybridisiert, bevor die Hybridisierung ÜN bei 60°C in frischer *ExpressHyb*-Lösung (1ml/cm<sup>2</sup>) mit 1-2x 10<sup>6</sup> cpm/ml radioaktiv markierter Sonde, zuvor 5 min hitzedenaturiert, durchgeführt wurde. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter 45 min mit *WASH1* (2x SSC, 0,05 % SDS) bei RT mit mehrmaligen Wechseln der Waschlösung und 2x 10 min bei 50°C mit *WASH2* (0,1x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen. Die Filter wurden dann in Frischhaltefolie gewickelt und 1-7 Tage in mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassetten (QuantaIII, Cronex-Kassette, Fa. DuPont, Bad Homburg) bei -80°C autoradiographiert (Hyperfilm, Fa. Amersham, Freiburg). Nach erfolgreicher Detektion der Banden wurden die Filter zum Entfernen der hybridisierten Sonden 30 min in einer kochenden 0,5 % SDS-Lösung (w/v) gereinigt und bis zum weiteren Gebrauch in Frischhaltefolie gewickelt bei -20°C aufbewahrt.

### **2.2.6.3 Dot Blot**

Im Gegensatz zum unter 2.2.6.2 beschriebenen *Southern Blot* kann mit dem *Dot Blot* genomische DNA ohne Verdau mit Restriktionsenzymen und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente auf das Vorhandensein eines Transgens untersucht werden.

Dazu wurden 15 µl (etwa 0,5 µg/µl) genomischer Mausschwanz-DNA (Extraktion der DNA siehe 2.2.17.4) zur Denaturierung 5 min aufgekocht, auf Eis gestellt und 15 µl eiskaltes 20x SSC zugegeben. Als Membran wurde Hybond N+ (Fa. Amersham, Freiburg) verwendet, die vor dem Auftropfen der DNA mit Fettstift beschriftet und kurz in 10x SSC equilibriert wurde. Die Membran wurde dann auf 3 MM Whatman-Papier gelegt, die 30 µl DNA/SSC-Gemisch in 5 µl-Schritten aufgetropft und am Ende der Prozedur 5 min getrocknet. Danach folgten Denaturierung (5 min in Denaturierungspuffer) und Neutralisierung (2 min in Neutralisierungspuffer) der DNA auf der Membran. Nach 30-minütigem Trocknen des Filters

wurde dieser zweimal mit 1200kJ im *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, Amsterdam) zur Fixierung der DNA bestrahlt.

Für die Detektion des Transgens wurden die Filter mindestens 4 h bei 65°C in *Church-Hybridisierungslösung* (0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran) prähybridisiert und im Anschluss ÜN bei 65°C mit der entsprechenden radioaktiv-markierten cDNA-Sonde (Herstellung der Sonde siehe 2.2.6.1) in *Church-Hybridisierungslösung* (0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran) hybridisiert. Am folgenden Tag erfolgte das Waschen der Filter durch zweimaliges kurzes Spülen mit *Church-Wash 1* und viermaliges Waschen mit *Church-Wash 2*. Die Filter wurden dann in Frischhaltefolie gewickelt und 1-7 Tage in mit Verstärkerfolie ausgekleideten Kassetten (QuantaIII, Cronex-Kassette, Fa. DuPont, Bad Homburg) bei -80°C autoradiographiert (Hyperfilm, Fa. Amersham, Freiburg). Nach erfolgreicher Detektion der Banden wurden die Filter zum Entfernen der hybridisierten Sonden 30 min in einer kochenden 0,5 % SDS-Lösung (w/v) gereinigt und bis zum weiteren Gebrauch in Frischhaltefolie gewickelt bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.2.6.4 DNA-RNA Hybridisierung (*Northern-Hybridisierung*)**

Für die Untersuchung differenzieller Genexpression im *Northern Blot* wurden 5-15 µg zelluläre RNA (Extraktion siehe 2.2.1.17) vakuumgetrocknet und in 10 µl Ladepuffer (3 µl 6x RNA-Ladepuffer, 1 µl Ethidiumbromid (1:10 verdünnte Stammlösung (10 mg/ml)), 6 µl H<sub>2</sub>O) gelöst. Nach Zugabe von 20 µl 1,5x RNA-Probenpuffer wurden die Proben 10 min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte auf einem 1 %igen Agarosegel mit 6,5 % Formaldehyd (angesetzt mit 1x MOPS, Laufpuffer 1x MOPS) über 4-6 h bei 80-100 V. Als Molekulargewichtsstandard wurde die *RNA-ladder* (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Im Anschluss daran wurde das Gel 40 min in RNA-Hydrolyselösung und 2x 20 min in RNA-Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer der RNA auf Hybond N+ Membranen (Fa. Amersham, Freiburg) erfolgte für 48-72 h in 10x SSC nach der von Mason *et al.* 1993 beschriebenen Methode. Die Fixierung der RNA auf die Membran erfolgte durch zweimalige Bestrahlung (1200 kJ) im *UV Stratalinker 1800* (Fa. Stratagene, Amsterdam).

Die Filter wurden dann 1-4 h in *ExpressHyb-Lösung* (0,1 ml/cm<sup>2</sup> Membran) bei 65°C prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten cDNA-Sonde (siehe 2.2.6.1) für 2-3 h bei 65°C in *ExpressHyb-Lösung* (1-2x 10<sup>6</sup> cpm/ml Endkonzentration der Sonde). Das Waschen der Filter mit *WASH1* (2x SSC, 0,05 % SDS) und *WASH2* (0,1x SSC, 0,1 % SDS) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Detektion der Signale wurden die Filter in Frischhaltefolie gewickelt und in mit Verstärkerfolie ausgekleideten

Kassetten (QuantaIII, Cronex-Kassette, Fa. DuPont, Bad Homburg) 2-7 Tage auf Hyperfilmen (Fa. Amersham, Freiburg) exponiert. Nach Beendigung der Detektion wurden die Membranen zum Entfernen der radioaktiven Sondenreste 15-30 min in 0,5 %iger SDS-Lösung aufgekocht, noch feucht in Frischhaltefolie gewickelt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum erneuten Gebrauch aufbewahrt.

## **2.2.7 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.2.7.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Zellen**

Zur Gewinnung der Proteine wurden die Zellen zunächst zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Dann wurden je Zellkulturschale (10 cm) 200  $\mu\text{l}$  IP-Puffer zur Lyse der Zellen zugegeben. Die lysierten Zellen wurden mit einem Schaber abgeerntet, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Überstände wurden zur weiteren Verarbeitung abgenommen oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.7.2 Herstellung von Kernproteinextrakten**

Für die Gewinnung von Kernproteinen wurden die Zellen in 10 cm Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen, in 400  $\mu\text{l}$  Kernlysepuffer I mit einem Zellschaber von den Platten abgekratzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach kurzem Vortexen erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 sec, RT, maximale Geschwindigkeit) woraufhin der Überstand, der zytoplasmatische Proteine und Membranproteine enthält, abgenommen und entweder verworfen oder bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurde. Das entstandene Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  Kernlysepuffer II resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2 min,  $4^{\circ}\text{C}$ , maximale Geschwindigkeit) wurden die Überstände mit den Kernproteinen abgenommen und bis zum Gebrauch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.7.3 Proteingewinnung aus Geweben**

Die zu untersuchenden Gewebe wurden auf Eis präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Proteinextraktion wurden die Gewebe in 15 ml PP-Schnappdeckelgefäße mit 1 ml kaltem 1x Gewebe-Lysepuffer überführt, sofort mit einem Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke und Kunkel, Stauffen) 1 min zerkleinert und am Ultraschallgerät (Fa. Roth, Karlsruhe) mit 2 mal 10 Stößen (output control = 4, 40 % duty cycle, pulsed) geschallt. Nach dem Schallen wurden die

Lysate in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Gewebereste durch Zentrifugation (10 min, 4°C, maximale Geschwindigkeit) vom Proteinextrakt getrennt. Die Proteinüberstände wurden in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mit dem Biorad Protein Assay (Fa. Biorad, München). Dazu wurde 1 µl Proteinextrakt mit 799 µl H<sub>2</sub>O und 200 µl Biorad Protein Assay-Reagenz durch Vortexen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der durch die Reaktion des Biorad Protein Assay-Reagenz mit dem Protein entstandene Farbumschlag wurde bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Referenz diente eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle ohne Proteinextrakt. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer zuvor erstellten BSA-Eichkurve, bei der definierte Mengen BSA mit dem Biorad Protein Assay-Reagenz gemessen worden waren, bestimmt.

#### **2.2.7.5 Fällung von Proteinen**

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in Zellextrakten wurde die gewünschte Menge Lysat mit dem neunfachen Volumen eiskaltem Aceton 1 h bei -20°C in 1,5 ml Eppendorfgläser gefällt. Die ausgefallenen Proteine wurden 10 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert und der Acetonüberstand verworfen. Nach dem Trocknen der Proteine wurden diese in 20 µl 2x Proteinprobenpuffer resuspendiert, 5-10 min aufgeköcht und für die SDS-PAGE auf ein entsprechendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

#### **2.2.7.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt unter denaturierenden Bedingungen. Um den Proteinen eine gleichmäßige Ladung zu geben, wird das anionische Detergens SDS eingesetzt, das die Proteine umhüllt und eine Wanderung zur Kathode im elektrischen Feld ermöglicht.

Es wurden je nach Proteingröße 6-15 %ige Gele (siehe Tab. 7.1 im Anhang), bestehend aus Sammel- und Trenngel gegossen. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Gelapparatur eingebaut und diese mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben wurden mit entsprechenden Mengen 2 x Proteinprobenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgeköcht und

anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über 2-4 h Stunden bei 80-120 V.

#### **2.2.7.7 Western Blot**

Die Proteine aus SDS-PAGE-Gelen können durch ein elektrisches *Semi-Dry-Blotting*-Verfahren auf eine Nylon- oder Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Spezifische Erstantikörper erkennen das zu detektierende Protein. Zweitantikörper, an die Enzyme wie die alkalische Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, erkennen die konstante Region der Erstantikörper. Der Nachweis der Proteine erfolgt mit einer durch die enzymatische Aktivität vermittelten Farb- oder Lumineszenzreaktion.

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele in 1x Transferpuffer übertragen. Hybond-ECL Nitrozellulosemembranen (Fa. Amersham, Freiburg) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und zum Äquilibrieren in Transferpuffer gelegt. 3 MM Whatman-Papier wurde ebenfalls vor Gebrauch mit 1x Transferpuffer getränkt.

Aufbau des *Blots*:

Anode  
6 Lagen 3 MM Whatman-Papier  
Nitrozellulosemembran  
Trenngel  
6 Lagen 3 MM Whatman-Papier  
Kathode

Der Transfer erfolgte 1 h bei 130-180 mA. Nach dem Transfer wurden die Markerbanden mit Fettstiften auf die Membran gezeichnet. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die *Blots* 1 h in Blocklösung (5 % Magermilchpulver/ PBS/ 0,05 % Tween) bei RT geschüttelt. Die Erstantikörper wurden 1:1000 in Blocklösung verdünnt und die Membranen ÜN darin bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal 45 min mit PBS/ 0,05 % Tween gewaschen und 1 h mit dem Zweitantikörper (1:5000 verdünnt in Blocklösung) inkubiert. Anschließend wurden die *Blots* dreimal 15 min mit PBS/ 0,05 % Tween und abschließend 5-10 min mit PBS gewaschen.

Zur Detektion der Proteine wurde frische ECL-Lösung (Fa. Amersham, Freiburg) nach Angaben des Herstellers angesetzt, die Membranen 1-2 min in dieser Lösung geschwenkt und diese anschließend in eine Klarsichthülle gelegt. In der Dunkelkammer erfolgte die Darstellung der Proteinbanden durch entsprechend lange Exposition (10 sec bis 60 min) von Röntgenfilmen (Hyperfilme, Fa. Amersham, Freiburg).

## **2.2.8 Zellkultur**

### **2.2.8.1 Verwendete Zelllinien**

In der vorliegenden Arbeit wurden als Zelllinien MCF-7 (humane Brustkarzinomzellen mit epithelialem Wachstum, American Type Culture Collection ATCC # HTB-22) und 184B5 (humane Brustepithelzellen aus einer Brustreduktion ATCC # CRL-8799) verwendet.

### **2.2.8.2 Kultivierung von Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre im Zellkulturinkubator (Fa. Heraeus, Hanau). Als Nährmedium wurde DMEM Medium (Fa. Cambrex, Verviers; Belgien), das mit 10 % Tetrazyklin-freiem FCS, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) (alles Fa. PAN, Aidenbach) ergänzt wurde, verwendet. Nach Erreichen etwa 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen zur Passagierung mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA (Fa. PAN, Aidenbach) von den Zellkulturflaschenböden abgelöst und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 verdünnt und erneut in frischem DMEM ausplattiert.

### **2.2.8.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit entsprechenden Mengen Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschenböden abgelöst. Nach zehnmütiger Zentrifugation (RT, 350 g) wurde das Zellpellet in DMEM-Vollmedium (10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin) mit 10 % DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen, die mit Zellstoff umwickelt wurden, für einige Tage bei -80°C eingefroren, bevor die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte.

Zum Auftauen wurden die Zellen in den Kryoröhrchen 10 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss in der fünffachen Menge DMEM-Vollmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 350 g, RT), durch den DMSO-Reste entfernt werden, wurden die Zellen in DMEM-Vollmedium resuspendiert und in den entsprechenden Zellkulturgefäßen ausplattiert.

## **2.2.9 Reporteranalysen (LacZ-Assay)**

Die Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen für die MCF-7 Zellen erfolgte mit Hilfe von Reporteranalysen. Die Zellen wurden nach dem Trypsinieren dreimal mit DMEM ohne Zusätze gewaschen, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und 5x 10<sup>6</sup> Zellen in 700 µl DMEM ohne Zusätze aufgenommen. 10 µg Reporter-Plasmid (RSV-LacZ, kodiert

für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase; freundlicherweise von der AG Dr. Beato, Universität Marburg zur Verfügung gestellt) wurden in 100  $\mu$ l PBS verdünnt, mit den 700  $\mu$ l Zellen vereint und in Elektroporationsküvetten (4 mm Elektrodenabstand, Fa. Biorad, München) überführt. Mehrere Ansätze wurden unter verschiedenen Bedingungen (960  $\mu$ F, variable Voltzahlen zwischen 0,2-0,4 kV) im *Gene Pulser* (Fa. Biorad, München) elektroporiert und die Zellen direkt im Anschluss in 10 cm-Zellkulturschalen mit 10 ml vorgewärmtem DMEM-Vollmedium ausplattiert. Die Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den transfizierten Zellen zur Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte 48 h nach der Elektroporation. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 5 min bei RT fixiert (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS). Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Färbung mit 5 ml Färbelösung (50  $\mu$ l Kaliumferricyanid (400 mM), 50  $\mu$ l Kaliumferrocyanid (400 mM), 50  $\mu$ l  $MgCl_2$  (200 mM), 250  $\mu$ l X-Gal (20 mg/ml) und 4,6 ml PBS) für 30-120 min bei 37°C im Brutschrank. Die Transfektionseffizienz errechnet sich mit folgender Formel:

% Transfektionseffizienz = 100x Zahl blauer Zellen/ Gesamtzellzahl.

### **2.2.10 Stabile Transfektion und Generierung stabil transfizierter Klone**

Die Generierung stabil transfizierter eukaryotischer Zellklone erfolgte mittels Elektroporation. Dazu wurden MCF-7 Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von den Zellkulturflaschenböden abgelöst, in DMEM-Medium ohne Zusätze aufgenommen und 10 min bei RT (350 g) zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden noch weitere dreimal mit DMEM-Medium ohne Zusätze gewaschen, die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend so in DMEM-Medium ohne Zusätze aufgenommen, dass  $5 \times 10^6$  Zellen pro 700  $\mu$ l Medium vorlagen. 10  $\mu$ g der linearisierten Plasmide, die in die Zellen eingebracht werden sollten, wurden auf 100  $\mu$ l mit PBS aufgefüllt, mit den 700  $\mu$ l Zellen vermischt und in Elektroporationsküvetten (4 mm Elektrodenabstand, Fa. Biorad, München) überführt. Die Elektroporation erfolgte im Genpulser (Fa. Biorad, München) bei 960  $\mu$ F und 0,38 kV. Die Zellen wurden im Anschluss sofort in 10 cm-Kulturschalen mit 10 ml vorgewärmtem DMEM-Vollmedium ausplattiert. Mit der Selektion (1 mg/ml Neomycin) zur Generierung stabil transfizierter Klone wurde zwei Tage nach der Elektroporation begonnen. Die Selektionsbedingungen wurden bis zum ersten Einfrieren aufrecht erhalten bis alle Zellen einer nicht-transfizierten Kontrolle (entsprechend alle nicht-transfizierten Zellen der Elektroporation) abgestorben waren. Makroskopisch sichtbare Klone wurden (nach ca. vier Wochen) mit sterilen Pipettenspitzen von den Zellkulturschalen abgelöst und in 24-Loch-

Platten überführt. Die Zellen wurden weiter unter Selektion expandiert und im Anschluss mittels PCR, *Northern Blot* und *Western Blot* analysiert.

### **2.2.11 Fixierung und Propidiumiodid (PI)-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse**

Die Zellen wurden nach der entsprechenden Behandlung mit 1 ml Trypsin/EDTA von 10 cm-Zellkulturschalen abgelöst, in Rundbodenröhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und zur Verdünnung des Trypsins mit 4 ml filtriertem PBS aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (4 min, RT, 350 g) wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit 3 ml filtriertem PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden in 200 µl filtriertem PBS durch Vortexen resuspendiert und zum Fixieren wurde 800 µl eiskaltes Methanol zugegeben und nochmals gevortext. Die Lagerung der fixierten Zellen bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Für die PI-Färbung wurden die methanolfixierten Zellen durch Zentrifugation (4 min, 350 g, RT) pelletiert und mit 3 ml filtriertem PBS gewaschen. Die Überstände wurden vollständig abgesaugt und die Zellpellets in Färbelösung (1 ml filtriertes PBS, 5 µl Propidiumiodid [5 mg/ml], 100 µg/ml RNase) durch Vortexen vollständig resuspendiert. Für die Analyse der Zellzyklusprofile wurden 10.000 *gated* (Zelldupletten wurden aussortiert) Zellen im *Cell Sorter* FACSCalibur (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen und mit der *CellQuest* Software (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet.

### **2.2.12. BrdU-Einbau zur Bestimmung zellulärer Proliferation**

Zur Bestimmung der zellulären Proliferation kann der Einbau von Bromodeoxyuridin (BrdU) gemessen werden. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird spezifisch bei der DNA-Synthese inkorporiert. Die Menge an BrdU, die über einen bestimmten Zeitraum in die DNA eingebaut wird, kann mit spezifischen Antikörpern detektiert und im FACS quantifiziert werden.

Die zu untersuchenden Zellen in 10 cm Zellkulturschalen wurden dazu nach der jeweiligen Behandlung mit oder ohne Doxzyklin zweimal mit PBS gewaschen und für 4 h mit 100 µM BrdU in DMEM-Vollmedium bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Zellkulturschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS gewaschen, kurz mit 1 ml Trypsin/EDTA inkubiert, mit 5 ml PBS von den Zellkulturplatten gelöst und 5 min bei 200 g in 15 ml Röhrchen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Zellen in 10 ml 70 %igem Ethanol fixiert und mindestens 1 Jahr bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die BrdU-Färbung wurden die Zellen nach einem Zentrifugationsschritt (200 g, 5 min, RT) mit 5 ml PBS gewaschen, abermals pelletiert und nach Verwerfen des PBS in 1 ml eiskalter 0,1 M HCl/0,5 % TritonX-100 resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Verdünnung der Säure wurden im Anschluss daran 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$



bidest zugegeben und die Suspension 10 min bei 200 g zentrifugiert. Die verbliebenen Zellkerne wurden in 2 ml H<sub>2</sub>O bidest resuspendiert, in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und zum Denaturieren der DNA 10 min gekocht. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (200 g, 5 min, RT), nach dem die Kerne mit 500 µl PBS/TritonX-100 gewaschen und in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt wurden. Die Inkubation der Zellkerne mit dem Erstantikörper (200 µl PBS/0,1 % BSA/ 2 mg/ml Anti-BrdU) erfolgte nach Zentrifugation (5 min, 200 g, RT) für 30 min im Überkopftaumler bei RT. Die Zellkerne wurden nach der Antikörperbehandlung abzentrifugiert (5 min, 200 g, RT), mit PBS gewaschen (5 min, 200 g, RT) und 15 min bei RT in 200 µl Zweitantikörperlösung (PBS/0,5 % BSA/1:500 goat anti mouse-PE) inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift in 500 µl PBS/0,5 % BSA wurden die pelletierten Kerne (5 min, 200 g, RT) in 500 µl PBS/0,5 % BSA/ RNaseA (100 µg/ml)/Propidiumiodid (10 µg/ml) resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt, 50.000 Zellen im FACS gemessen und mit der *CellQuest* Software ausgewertet.

### 2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung

Für den Nachweis von Proteinen in humanen Zellen wurden spezifische Erstantikörper und Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper verwendet. Zellen, die in 10 cm Zellkulturschalen oder 6 cm Zellkulturschalen kultiviert worden waren, wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und 5 min mit eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert. Nach kurzem Trocknen erfolgten drei Waschschriffe mit PBS gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation in Blocklösung (10 % humanes Serum in PBS/ 0,05 % Tween). Die Behandlung mit dem Erstantikörper (1:100 verdünnt in PBS/0,05 % Tween/ 1 % Magermilchpulver) erfolgte nach kurzem Waschen mit PBS für 1 h. Die Kontrollfärbungen wurden ohne Erstantikörper in PBS/0,05 % Tween/1 % Magermilchpulver inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 45 min mit dem Zweitantikörper (1:300 verdünnt in PBS/1,5 % BSA/0,05 % Tween) inkubiert. Nach drei abschließenden Waschschriffen mit PBS (je 5 min bei RT) wurden die Zellen mit DAPI Antifade (Fa. Q-Biogene, Heidelberg) eingedeckelt und die Färbungen im Fluoreszenzmikroskop (DMRXA, Fa. Leica, Solms) ausgewertet und mit einer gekühlten, digitalen CCD-Kamera (Sensys, Fa. Photometrics, München) aufgenommen.

### 2.2.14 Zelladhäsionsassay

Zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von unterschiedlich behandelten Zellen wurde ein Zelladhäsionsassay mit Fibronectin-beschichteten 96-Loch-Platten (Fa. Greiner,

Frickenhausen) und unbeschichteten bzw. BSA-beschichteten (10 mg/ml BSA in PBS, ÜN) 96-Loch-Platten durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach zweitägiger Behandlung mit und ohne Doxzyklin (1 µg/ml) zweimal mit PBS gewaschen, mit 1/5 Trypsin/EDTA in PBS gelöst und in serumfreies DMEM-Medium aufgenommen. Nach zehnmütiger Zentrifugation (350 g, RT) erfolgten zwei Waschschrirte mit serumfreiem DMEM (10 min, 350 g, RT) woraufhin  $5 \times 10^4$  Zellen je 96-Loch plattiert und 30 min im Zellkulturschrnk bei 37°C inkubiert wurden. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 5 min bei RT mit 3 % Formaldehyd in PBS fixiert. Das Färben der Zellen erfolgte nach Entfernen der Fixierlösung durch zweimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT mit Methylenblau (0,1 % in H<sub>2</sub>O). Nach zwei weiteren Waschschrirten mit H<sub>2</sub>O wurde das verbliebene Methylenblau mit 100 µl 0,1 N HCl freigesetzt und die Farbintensitäten nach kurzem Schütteln bei 630 nm (Referenzwellenlänge 405 nm) im *MRX Microplate Reader* (Fa. Dynex, USA) gemessen.

### 2.2.15 Transfektion von *Antisense*- und *Sense*-Oligonukleotiden

*Antisense*- und *Sense*-Oligonukleotide für Transkripte des CDK-Inhibitors *P21* wurden mit Hilfe bereits publizierter Sequenzen (Caroll *et al.*, 2002) generiert. Allerdings wurden Oligonukleotide mit zusätzlichen 5'- und 3'-terminal gelegenen Phosphorothioatresten und einer Cy3-Modifikation am 5'-Terminus verwendet. Die Synthese der Nukleotide erfolgte durch die Fa. Metabion (Planegg-Martinsried).

Für die Experimente wurden  $2 \times 10^5$  Zellen ÜN in 6-Loch-Platten herangezogen. Am folgenden Tag wurden 4 µg des Oligonukleotids und 10 µl Lipofectamine Transfektionsreagenz (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) für 20 min in 500 µl Optimem (Fa. Gibco-BRL, Karlsruhe) inkubiert und anschließend auf die mit PBS gewaschenen Zellen pipettiert. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C im Zellinkubator wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und vor der Gabe von Doxzyklin (1 µg/ml) zur Regeneration 1 h in DMEM-Vollmedium inkubiert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen dann schließlich geerntet und für *Western Blot*- oder FACS-Analysen weiterverarbeitet.

### 2.2.16 β-Galaktosidase-Färbung zum Nachweis seneszenten Zellen

Dimri *et al.* haben (1995) eine Methode zum Nachweis seneszenten Zellen beschrieben, die sich von der Seneszenz final differenzierter Zellen unterscheidet. Ein Marker seneszenten Zellen ist die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase bei pH 6,0, die X-Gal als Substrat umsetzt und zur Blaufärbung seneszenten Zellen führt.

Zum Nachweis der Seneszenz wurden Zellen nach entsprechender Inkubation mit Doxyzyklin zweimal mit PBS gewaschen und 3-5 min bei RT mit 2 % Formaldehyd/ 0,2 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Inkubation der fixierten Zellen in frischer  $\beta$ -Gal-Färbelösung (1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indol  $\beta$ -D-Galaktosidase (X-Gal)/ 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphat pH 6,0/ 5 mM Kaliumferrocyanid/ 5 mM Kaliumferricyanid/ 150 mM NaCl/ 2mM  $MgCl_2$ ) bei 37°C ohne  $CO_2$ . Die Färbung der Zellen war frühestens nach 3-6 h spätestens nach 16-24 h detektierbar. Für die Herstellung von 40 mM Zitronensäure/Natriumphosphat pH 6,0 wurden  $Na_2HPO_4$  (50 mM) und Zitronensäure (50 mM) im Verhältnis 2:1 gemischt und der pH mit Zitronensäure auf 6,0 eingestellt.

### 2.2.17 Zymografie-Assay

Zur Messung der enzymatischen Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), deren Substrat Gelatine ist, dient der sogenannte Zymografie-Assay. Dazu wurden zu 80 % mit Zellen bewachsene 10 cm-Zellkulturschalen zweimal mit PBS gewaschen und 48 h in 6 ml serumfreiem DMEM-Medium in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin kultiviert. Von den Überständen, die sezernierte MMPs enthalten, wurden jeweils 20  $\mu$ l mit gleichem Volumen ZY-Ladepuffer versetzt und in 10 % igen SDS-Polyacrylamidgelen mit 1 mg/ml Gelatine gelelektrophoretisch in 1x Laufpuffer bei 80-110 V aufgetrennt. Nach dem Gellauf erfolgten drei 20-minütige Waschschrritte mit 2,5 % TritonX- 100 zur Entfernung des SDS gefolgt von zweimaligem kurzen Spülen der Gele mit Aqua bidest. Für die enzymatische Reaktion, bei der die MMPs die im Gel enthaltene Gelatine abbauen, wurden die Gele 18-20 h bei 37°C in ZY-Entwicklungspuffer inkubiert. Die Färbung der Gele erfolgte ca. 20 min in Coomassie-Färbelösung. Durch 30 minütiges Entfärben mit Coomassie-Entfärbelösung wurden die Stellen, an denen die MMPs die Gelatine abgebaut haben, sichtbar gemacht. Die Gele wurden dann mit einer digitalen E.A.S.Y 429K Kamera (Fa. Herolab, Wiesloch) aufgenommen.

### 2.2.18 Arbeiten mit Mäusen

#### 2.2.18.1 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien

Von mindestens drei Wochen alten Mäusen wurde 0,5 cm der Schwanzspitze mit einer Schere biopsiert und in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Biopsien wurden bis zur DNA-Extraktion bei -20°C aufbewahrt oder gleich in 750  $\mu$ l Tail-Lysepuffer mit Proteinase K (100-500  $\mu$ g/ml) aufgenommen und ÜN bei 55°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze kurz gevortext und im Anschluss 30 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit

zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und optional zunächst mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert oder sofort nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und anschließendem Mischen 30 min bei RT und maximaler Geschwindigkeit in der Zentrifuge gefällt. Die Pellets wurden nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol getrocknet, in 100-200 µl H<sub>2</sub>O oder 1x TE durch 1-2 stündiges Schütteln bei 50°C gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C (in TE gelöst) oder -20°C (in H<sub>2</sub>O gelöst) aufbewahrt.

### **2.2.18.2 Präparation von Mausembryofibroblasten (MEFs)**

Die Präparation der Mausembryofibroblasten erfolgte am Tag 13-15 nach der Paarung (Überprüfung anhand des Genitalpfropfes bei den weiblichen Tieren). Die trächtigen Tiere wurden getötet, kurz in Ethanol getaucht und die Embryonen in PBS überführt. Nachdem Kopf, Extremitäten und Innereien mit sterilem Präparierbesteck von den Embryonen entfernt worden waren, erfolgte die mechanische Zerkleinerung indem das Gewebe in 1 ml Trypsin/EDTA (T/E) aufgenommen, mit dem Skalpell zerteilt und schließlich durch eine 10 ml-Spritze mit Braun Sterican-Kanüle (0,9 x 40 mm) gepresst wurde. Die Gewebestücke in der T/E-Lösung wurden kurz gevortext und zur Freisetzung der Zellen aus dem Gewebeverband 10 min bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert. Nach wiederholtem Vortexen und einem weiteren 10-minütigen Inkubationsschritt wurden die Gewebereste abzentrifugiert (10 min, 350g, RT) und die Überstände mit den MEFs in 10 cm Zellkulturschalen in DMEM Vollmedium ausplattiert.

### **2.2.18.3 Transiente Transfektion von Mausembryofibroblasten (MEFs)**

Transiente Transfektionen für die MEF-Assays wurden mit dem *Fugene 6 Transfection Reagent* (Fa. Roche, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden zu 60-80 % mit Mausembryofibroblasten (Gewinnung siehe 2.2.18.2) bewachsene 10 cm Zellkulturschalen mit 10 µg Plasmid (pcDNA3Neo-rtTA) transfiziert. Die DNA wurde dabei vorgelegt und 15 min mit einem Gemisch aus 18 µl Fugene und 82 µl DMEM-Medium ohne Zusätze bei RT inkubiert. Die Komplexe aus Plasmid und Transfektionsreagenz wurden dann tropfenweise auf die Zellen (diese blieben für die Transfektion in 10 ml DMEM-Vollmedium) pipettiert. Nach 4 h wurde ohne Wechsel des Mediums die zweitägige Inkubation mit Dox (1 µg/ml) gestartet in deren Anschluss für weitere Untersuchungen RNA oder Proteine aus den Zellen präpariert werden konnten.

### 3 Ergebnisse

Das Protoonkogen *ERBB2* ist aufgrund seiner Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Tumore Gegenstand intensiver Forschung. Doch trotz mannigfaltiger Versuchsanordnungen sind noch immer viele Fragen ungeklärt, was im Hinblick auf das komplexe Signaltransduktionsnetzwerk der Zelle, in das *ERBB2* auf vielfältige Weise eingreifen kann, nicht verwunderlich ist. In der vorliegenden Arbeit sollten mehrere wichtige Aspekte mit einbezogen werden. Zum einen können mit dem hier verwendeten induzierbaren System genaue zeitliche Abfolgen und die Auswirkungen veränderter Genexpression erfasst werden. Zum anderen sollte neben den *in vitro*-Experimenten mit induzierbaren, humanen Zelllinien ein *in vivo*-Modell zur konditionalen Expression von NeuT in transgenen Mäusen generiert und damit die Möglichkeit eröffnet werden, die aus den Zellen gewonnenen Ergebnisse auf die wesentlich komplexeren Vorgänge in einem lebenden System zu übertragen.

#### 3.1 NeuT-induzierbare Zelllinien

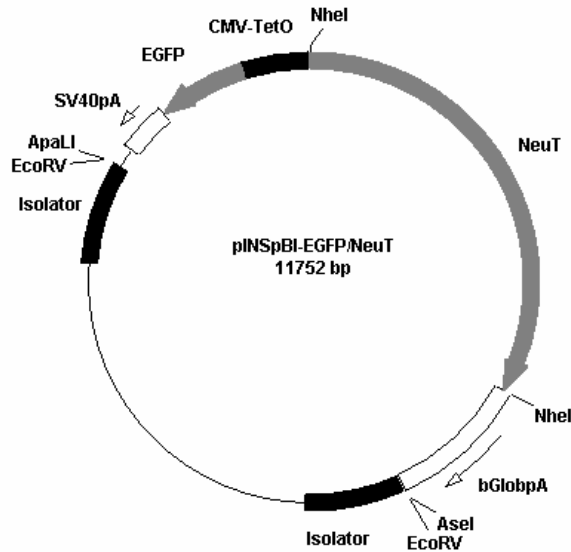
##### 3.1.1 Generierung der Zelllinien

###### 3.1.1.1 Konstrukte

Zur Generierung eines Systems, bei dem *ERBB2* konditional-reversibel exprimiert werden kann, wurde der Vektor pBI-EGFP der Firma Clontech als Ausgangsplasmid verwendet. Der Vektor verfügt über einen bidirektionalen CMV-Minimalpromotor, der ein Tetrazyklin-responsives Element (TRE) enthält, das aus sieben Kopien der 42 bp Tetrazyklin-Operator (TetO)-Sequenz besteht. An diese kann ein reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator (rtTA) in Anwesenheit von Tetrazyklin oder einem Derivat binden und die Transkription der entsprechenden Gene initiieren. Der bidirektionale Promotor steuert auf der einen Seite die Expression eines Induktionsmarkers, dem fluoreszierenden *enhanced green fluorescent protein* (EGFP), wohingegen auf der anderen Seite eine beliebige cDNA in das Plasmid eingebracht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde als cDNA das Ratten-Protoonkogen *NeuT*, ein zum menschlichen *ERBB2* homologes Gen, verwendet. Das *NeuT*-Onkogen wurde ursprünglich aus dem Neuroglioblastom einer Ratte isoliert und unterscheidet sich von der Wildtypsequenz durch eine aktivierende Punktmutation (Val<sup>664</sup>→Glu) in der Transmembrandomäne des Rezeptors (Schechter *et al.*, 1984; Bargmann *et al.*, 1986). Diese Mutation ermöglicht eine Liganden-unabhängige Rezeptorstimulierung, die sich in erhöhter Autophosphorylierung und dadurch konstitutiv aktiver Signaltransduktion des Rezeptors auswirkt (Bargmann *et al.*, 1988; Weiner *et al.*, 1989). Die *NeuT*-cDNA wurde mittels

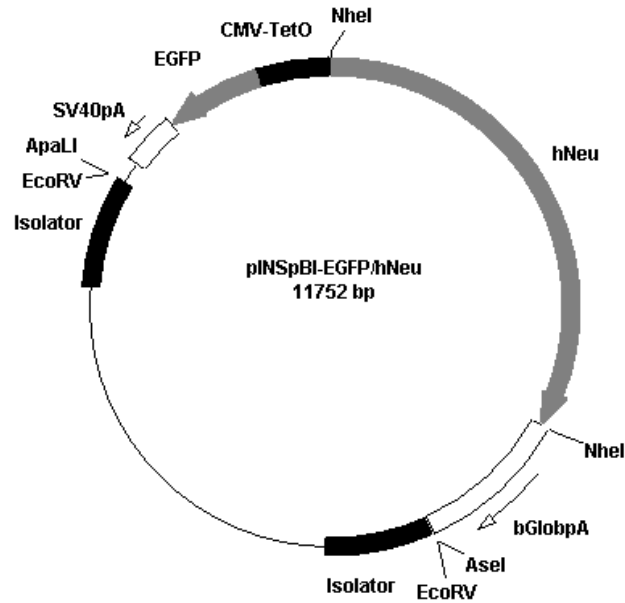
*Expand*-PCR (siehe 2.2.3) aus dem Plasmid pUHDNeuT-EMC/GFP amplifiziert, das uns freundlicherweise von Prof. Dr. Pelletier (McGill Cancer Center Montreal, Kanada) zur Verfügung gestellt wurde. Die cDNA wurde durch geeignete Oligonukleotidwahl (NeuNhe F und NeuNhe R) so generiert, dass am 3'- und am 5'-Ende Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *NheI* vorhanden waren, die eine Ligation über komplementäre Überhänge in den pBI-EGFP ermöglichen. Durch das zusätzliche Einfügen einer Kozaksequenz vor dem Startkodon des *NeuT*-Gens sollte die optimale Translation des Gens gewährleistet werden.

Ein Problem konditionaler Systeme ist die ungewollte Genexpression in Abwesenheit oder die nicht vorhandene Expression in Anwesenheit des Induktors, die durch ungünstige Integration des Konstruktes in die DNA der Zielzelle begünstigt werden kann. Um die Einflüsse von *Silencer*- und *Enhancer*-Elementen, die durch die ungerichtete Integration des Plasmides Auswirkungen auf dessen Promotor haben können zu minimieren, wurde pBI-EGFP/NeuT mit den Restriktionsenzymen *AseI* und *ApaLI* linearisiert und nach Auffüllen der überhängenden Enden über die *EcoRV*-Schnittstelle in einem weiteren Vektor (pINS) mit Isolatorsequenzen (Bell *et al.*, 2001) subkloniert. Der Vektor pINS wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Dr. Marko Maringer (AG Dr. Bockamp, Universität Mainz) hergestellt und besteht aus dem pBlueskript II SK (+)-Vektor der Firma Stratagene, in den zwei Matrix-Anheftungsregionen (MAR, Bell *et al.*, 1999) aus dem menschlichen  $\beta$ -Globin Gen eingefügt wurden, die als Isolatoren zum Schutz vor oben genannten Positionseffekten fungieren. Abbildung 3.1 zeigt das Konstrukt des pINSpBI-EGFP/NeuT. Zur Überprüfung der Insertion wurde pINSpBI-EGFP/NeuT mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut und das inserierte Gen sowie die Übergänge in das Plasmid mit geeigneten Oligonukleotiden (Neu F1-7, Neu RI-VIII) vollständig sequenziert.



**Abbildung 3.1: Expressionsplasmid pINSpBI-EGFP/NeuT.** Die Abbildung zeigt die wichtigsten Charakteristika des Plasmides sowie die Restriktionsendonukleaseschnittstellen, über die das Konstrukt zusammengesetzt wurde. Nach Amplifikation der *NeuT*-cDNA mit den Oligonukleotiden NeuNhe F und NeuNhe R wurden die 3'- und 5'-Enden der cDNA mit dem Restriktionsenzym *NheI* verdaut und in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pBI-EGFP-Vektors eingebracht. Das Plasmid wurde dann mit den Enzymen *AseI* und *ApaI* geschnitten, die überhängenden 3'- und 5'-Enden mit Nukleotiden aufgefüllt und in die *EcoRV*-Schnittstelle des pINS-Plasmides eingeführt. CMV-TetO=CMV-Minimalpromotor mit sieben TetO-Wiederholungen,  $\beta$ GlobpA und SV40pA=Polyadenylierungssignal (aus *SV40*- und  $\beta$ -*Globin*-Gen), EGFP=cDNA des *enhanced green fluorescent protein*-Gens, NeuT=cDNA des *NeuT*-Gens.

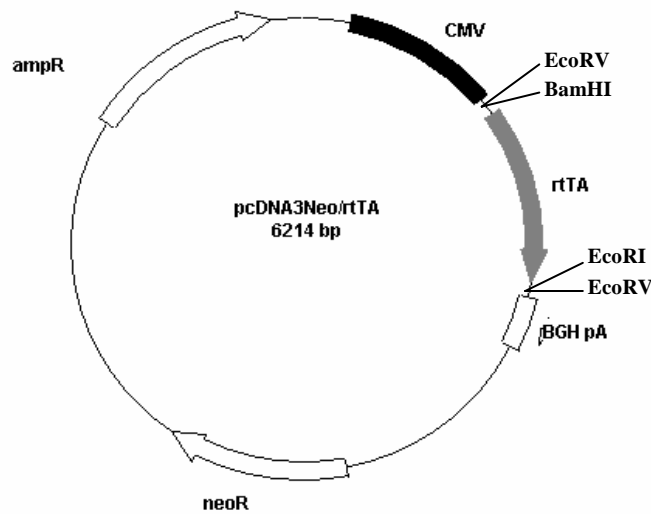
Die *NeuT*-cDNA der Ratte wurde schon vielfach erfolgreich für Studien der onkogenen ERBB2-Signaltransduktion sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eingesetzt (Guy *et al.*, 1996; Moody *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Dankort *et al.*, 2001). Die konstitutive Aktivität des NeuT-Rezeptors infolge der Punktmutation in der Transmembrandomäne erleichtert die Erforschung der ERBB2-Signaltransduktionswege erheblich. Allerdings sind bei den meisten humanen mit ERBB2-assoziierten Tumoren bislang keine aktivierenden Mutationen beschrieben worden. In diesen liegt ERBB2 lediglich genomisch amplifiziert und/oder überexprimiert vor, was aufgrund der hohen Rezeptordichte in der Zellmembran zu erhöhter Dimerisierung und Signaltransduktion führt. Aus diesem Grund sollten die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit Zellen, die konditional die humane Form von ERBB2 überexprimieren verglichen und verifiziert werden. Dazu wurde die humane *ERBB2*-cDNA (hier hNeu genannt) mittels *Expand*-PCR (Oligonukleotide hneuNhe F und hneuNhe R) aus dem Plasmid pTBC-HER2/SEAP (freundlicherweise von Dr. Baasner, ASTA Medica AG, Frankfurt zur Verfügung gestellt; siehe auch Baasner *et al.*, 1996) amplifiziert und, der Ratten *NeuT*-cDNA entsprechend, in das Plasmid pINSpBI-EGFP ligiert (Abb. 3.2). Auch hier wurde das Plasmid pINSpBI-EGFP/hNeu mit geeigneten Oligonukleotiden (hneu F1-3, hneuRI-V) sequenziert.



**Abbildung 3.2: Expressionsplasmid pINSpBI-EGFP/hNeu.** Die Abbildung zeigt die wichtigsten Charakteristika des Plasmides sowie die Restriktionsendonukleaseschnittstellen, über die das Konstrukt zusammengesetzt wurde. Nach Amplifikation der humanen *ERBB2*-cDNA mit den Oligonukleotiden hneuNheF und hneuNheR in einer Expand-PCR wurden 3'- und 5'-Ende der cDNA mit dem Restriktionsenzym *NheI* verdaut und an Stelle der *NeuT*-cDNA in die *NheI*-Schnittstelle des pINSpBI-EGFP-Plasmides eingefügt. CMV-TetO=CMV-Minimalpromotor mit sieben TetO-Wiederholungen,  $\beta$ GlobpA und SV40pA=Polyadenylierungssignal (aus *SV40*- oder  $\beta$ -*Globin*-Gen), EGFP=cDNA des *enhanced green fluorescent protein* Gens, hNeu=cDNA des humanen *ERBB2*-Gens.

Für die Herstellung des Vektors pcDNA3Neo/rtTA (Abb. 3.3), der die Expression des reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators (rtTA) gewährleistet, wurde in den Vektor pcDNA3Neo der Firma Invitrogen über die *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle die cDNA des *rtTA2-M2* (Urlinger *et al.*, PNAS 2000) eingefügt. Die cDNA wurde zuvor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* aus dem Plasmid pUHrt 62-1, das unserem Labor freundlicherweise von Prof. Dr. Bujard (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde, ausgeschnitten und die Enden für die *blunt-end*-Ligation in das Plasmid pcDNA3Neo (siehe 2.2.1.4) aufgefüllt. Die Verifizierung des pcDNA3Neo/rtTA (Abb. 3.3) erfolgte durch Sequenzierung des Plasmides mit geeigneten Oligonukleotiden (T7).

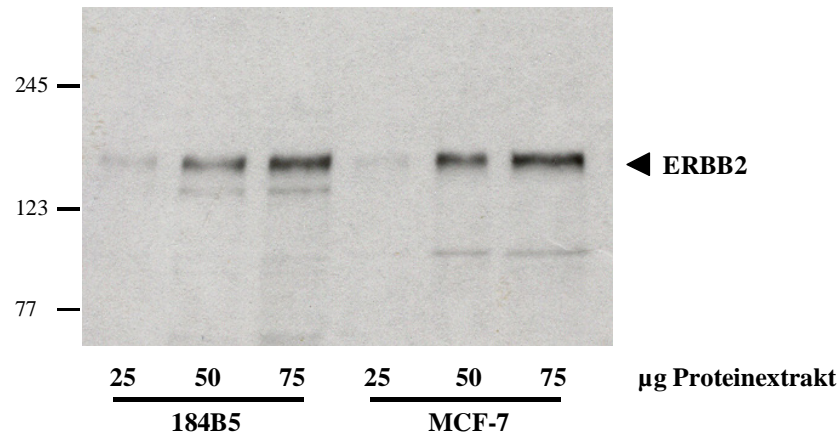




**Abbildung 3.3: Expressionsplasmid pcDNA3Neo/rtTA.** Der *rtTA2-M2* wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* aus dem Plasmid pUHrt 62-1 geschnitten, die 3'- und 5'-Überhänge mit Nukleotiden aufgefüllt und über die *EcoRV*-Schnittstelle in das Plasmid pcDNA3Neo eingefügt. AmpR=ORF  $\beta$ -Lactamase, neoR=ORF Aminoglykosid-Phosphotransferase, CMV=CMV-Promotor, BGHpA=Polyadenylierungssignal (aus *bovine growth hormone* (BGH)-Gen), rtTA=ORF reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator.

### 3.1.1.2 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

Für die konditional-induzierbare Expression von NeuT bzw. hNeu fiel die Wahl auf die Zelllinie MCF-7, die von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurde. Bei diesen Zellen handelt es sich um epitheliale Mammaadenokarzinomzellen, die wegen ihrer guten Charakterisierung und breiten Anwendung in der Krebsforschung ausgewählt wurden. Im Vergleich zu anderen Mammakarzinomzelllinien, von denen viele ERBB2 stark überexprimieren, konnte für die MCF-7 gezeigt werden, dass deren endogene ERBB2-Expression niedrig ist und „normalem“ Mammaepithel entspricht (Janes *et al.*, 1994). Um den ERBB2-Status der MCF-7-Zellen noch genauer zu definieren, erfolgte außerdem ein Vergleich mit der Zelllinie 184B5 (bezogen von der ATCC; siehe 2.2.8.1). Dabei handelt es sich um eine Brustepithelzelllinie, die im Rahmen einer Brustreduktion generiert wurde und ERBB2 nicht überexprimiert. Die Stärke der ERBB2-Proteinexpression der beiden Zelllinien wurde mit Hilfe eines *Western Blots* überprüft. Es konnte gezeigt werden (Abb. 3.4), dass die Expression von ERBB2 in beiden Zelllinien vergleichbar ist und die MCF-7 Zellen als System für die konditionale NeuT- und hNeu-Expression geeignet sind.



**Abbildung 3.4: Vergleich der ERBB2-Expression in 184B5- und MCF-7-Zellen.** Detektion der ERBB2-Expression mittels *Western Blot* in Brustepithelzellen (184B5) und Mammakarzinomzellen (MCF-7). Zum Vergleich wurden jeweils unterschiedliche Proteinkonzentrationen (25 µg, 50 µg und 75 µg) verwendet. Am linken Rand dargestellt sind die Größen des Molekulargewichtsstandards in kDa.

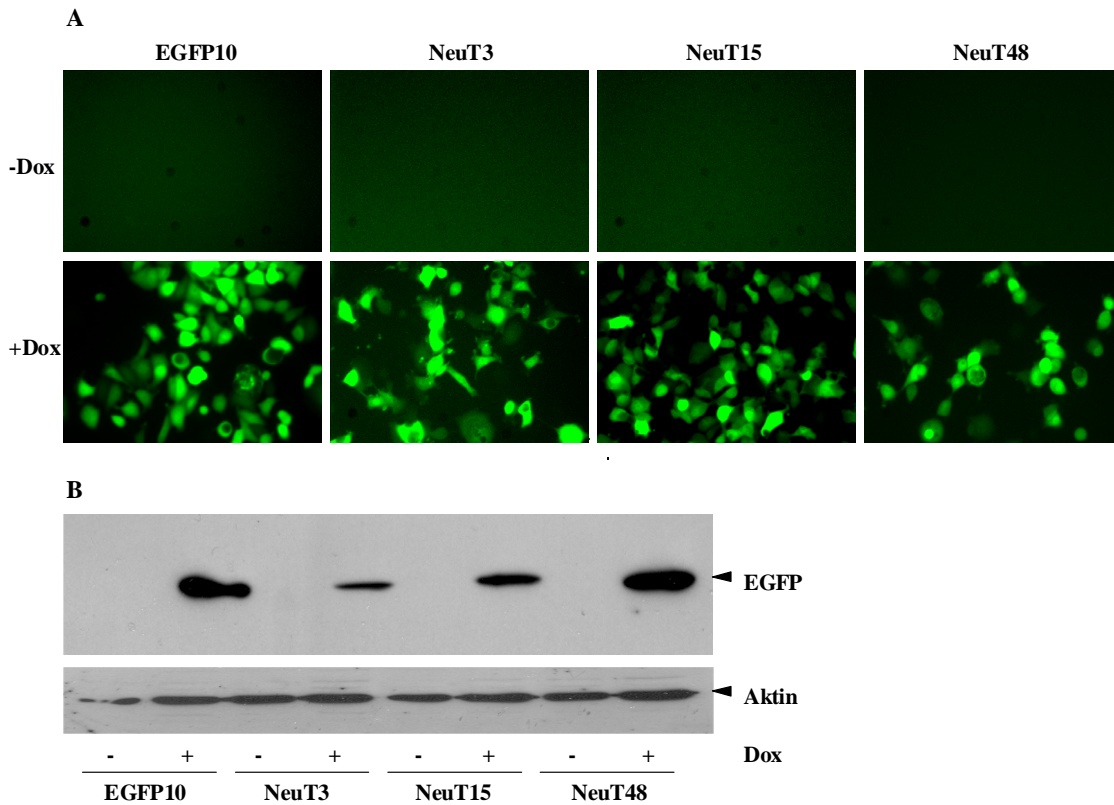
### 3.1.1.3 Transfektion und initiale Charakterisierung der Zelllinien

Nach Fertigstellung und Überprüfung der Plasmide pcDNA3Neo/rtTA und pINSpBI-EGFP/NeuT wurden diese mit den Restriktionsenzymen *ScaI* (rtTA) bzw. *ApaI* (NeuT) linearisiert und mittels Elektroporation in MCF-7 Zellen transfiziert. Da nur pcDNA3Neo/rtTA über ein Neomycinresistenzgen für die Selektion transfizierter Zellen verfügt, wurde das Plasmid im Verhältnis 1:10 mit pINSpBI-EGFP/NeuT in derselben Transfektion (siehe 2.2.10) eingesetzt. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um am Ende der Neomycinselektion eine möglichst hohe Ausbeute an Zellklonen, die beide Konstrukte in ihre DNA integriert haben, zu erhalten. Auf die gleiche Weise erfolgte die Transfektion von pcDNA3Neo/rtTA und dem Leervektor pINSpBI-EGFP in MCF-7 Zellen für die Generierung einer Kontrollzelllinie (ohne das *NeuT*-Gen).

Nach zwei- bis vierwöchiger Neomycinselektion der transfizierten Zellen wurden die einzelnen entstandenen Zellklone in 24-Loch-Platten überführt und analysiert. Die Auswertung der Klone erfolgte zunächst optisch, indem die Zellen in An- und Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) im Fluoreszenzmikroskop auf die Expression von EGFP überprüft wurden. Klone mit fluorimetrisch stringenter Regulierbarkeit wurden dann im Folgenden zur Bestimmung der NeuT-Expression für *Northern*- und *Western Blot*-Analysen herangezogen.

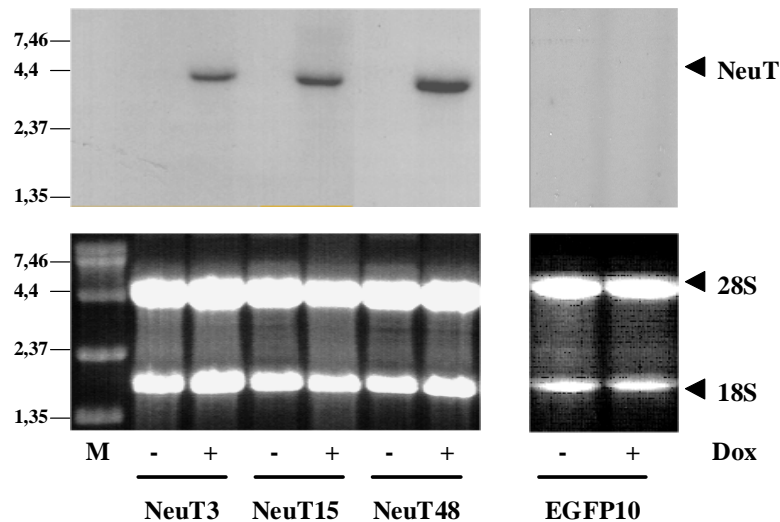
Die Untersuchung diverser Zellklone führte zur Identifizierung einer Kontrollzelllinie EGFP10 (enthält pcDNA3Neo/rtTA und pINSpBI-EGFP) und drei NeuT-induzierbaren Klone NeuT3, NeuT15 und NeuT48 (enthalten pcDNA3Neo/rtTA und pINSpBI-EGFP/NeuT), die stringent durch Doxycyclin regulierbar sind. In Abbildung 3.5 ist die

Expression von EGFP nach zweitägiger Induktion der verschiedenen Klone mit Doxyzyklin in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und *Western Blot*-Analysen dargestellt.



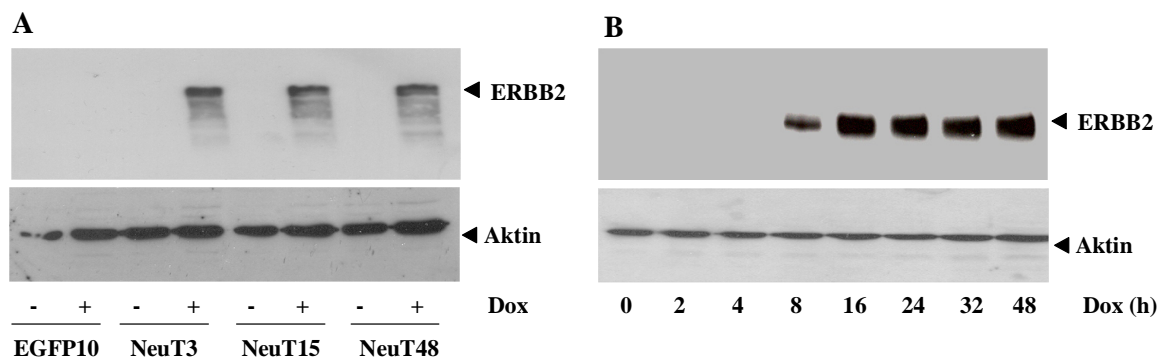
**Abbildung 3.5: EGFP-Expression der NeuT-Klone und der Kontrollzelllinie EGFP10.** **A** Nach zweitägiger Inkubation in Abwesenheit (-Dox) oder Anwesenheit (+Dox) von Doxyzyklin wurden die verschiedenen Zelllinien am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die stringente Regulation von EGFP in Abhängigkeit von Doxyzyklin ist deutlich erkennbar. **B** Die *Western Blot*-Analyse der EGFP-Expression mit jeweils 50 µg Proteinextrakt der verschiedenen Klone zeigt eine ebenso stringente Regulation des Proteins. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung wurde der *Blot* mit Aktin-spezifischen Antikörpern (untere Abbildung) inkubiert.

Die Untersuchung der Expression von NeuT auf Proteinebene erweist sich insofern als schwierig, da es keine Antikörper für die Anwendung im *Western Blot* gibt, mit denen zwischen dem humanen ERBB2 und dem Rattenprotein unterschieden werden kann. Deshalb wurde eine *NeuT*-spezifische Sonde für *Northern Blot*-Analysen generiert, mit der die stringente Regulation der *NeuT*-Expression auf RNA-Ebene untersucht werden kann. Der in Abbildung 3.6 dargestellte *Northern Blot* zeigt die Induktion der *NeuT*-RNA nach zweitägiger Inkubation der Klone in Doxyzyklin-haltigem Medium. Wie erwartet, zeigte der Kontrollklon EGFP10 kein Signal auf Höhe des *NeuT* RNA-Produktes (4,4 kbp), wohingegen die Zelllinien NeuT3, NeuT15 und NeuT48 auch nach längerer Exposition nur im induzierten Zustand ein *NeuT*-spezifisches Signal aufwiesen und somit eine stringente Regulierbarkeit der Genexpression gewährleistet ist.



**Abbildung 3.6: Northern Blot zur Untersuchung der stringenten Regulation von *NeuT*.** Nach zweitägiger Dox-Administration wurden 15 µg Gesamt-RNA aus den NeuT-Klonen (NeuT3, NeuT15, NeuT48) und der Kontrollzelllinie (EGFP10) für einen Northern Blot verwendet, der mit einer *NeuT*-spezifischen Sonde (generiert mit den Oligonukleotiden NeuT F Northern/NeuT R Northern) hybridisiert wurde. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung und die Integrität der RNA ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegelbild mit 18S- und 28S-rRNA abgebildet. Die Größen des verwendeten Längenstandards (in kbp) sind am linken Bildrand angegeben.

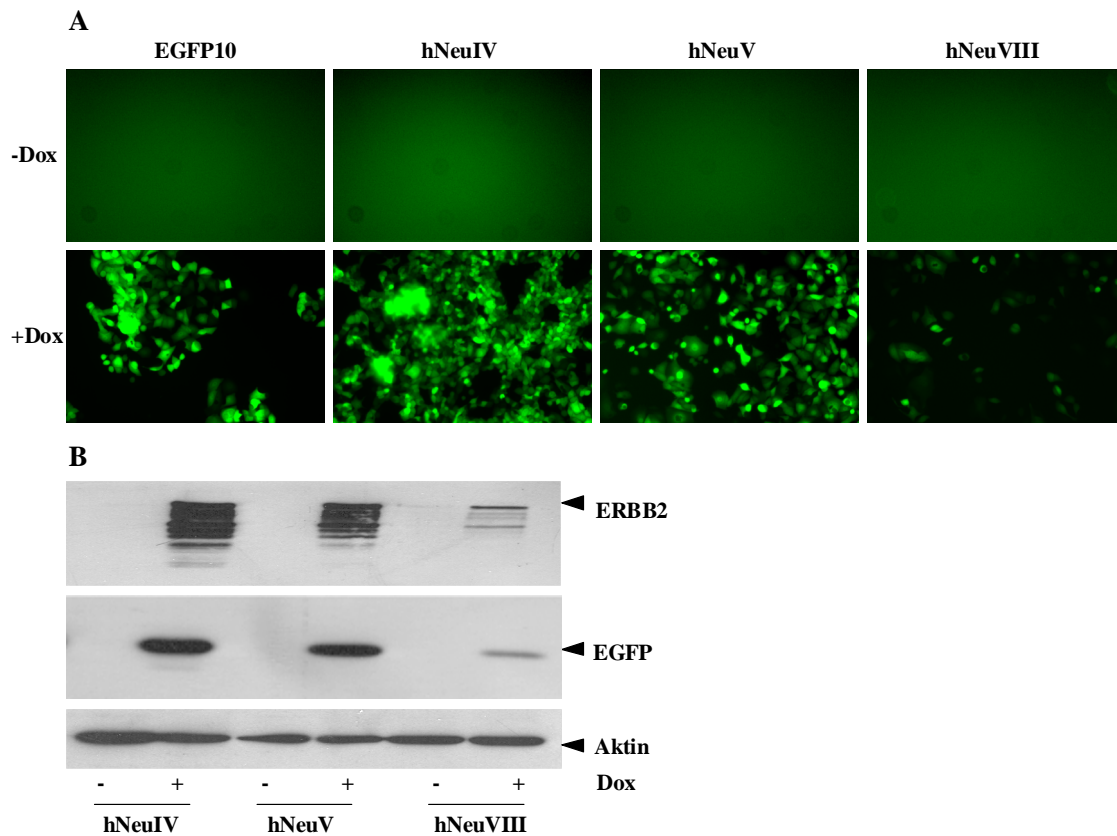
Trotz der bereits beschriebenen Antikörperproblematik wurde zur vollständigen Analyse der Zelllinien deren ERBB2-Gesamtproteinexpression im an- und abgeschalteten Zustand untersucht. Um möglichst geringe Mengen des endogenen ERBB2 zu detektieren und in der aus dem Northern Blot resultierenden Annahme, dass NeuT in den Zelllinien stark überexprimiert wird, wurden nur geringe Mengen Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Abbildung 3.7 A demonstriert deutlich die im Vergleich zur Kontrollzelllinie EGFP10 starke Expression von NeuT nach zweitägiger Doxyzyklin-Gabe in allen drei NeuT-Zelllinien.



**Abbildung 3.7: Western Blot-Analyse der ERBB2-Expression.** A 30 µg Proteinextrakt der NeuT-Klone und der Kontrollzelllinie wurden im Western Blot eingesetzt. Nur die NeuT-Klone zeigen eine starke Expression von NeuT nach zweitägiger Induktion mit Dox. B 30 µg Gesamtprotein, extrahiert aus NeuT48-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Dox-Induktion, wurden im Western Blot auf den Beginn der NeuT-Expression untersucht. Es zeigt sich, dass nach etwa 8 h die NeuT-Expression einsetzt und ab 16 h nach Dox-Gabe ihr Maximum erreicht ist. Als Kontrolle wurden beide Western Blots mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

Zur Identifizierung des genauen Zeitpunktes, an dem die NeuT-Expression in den Zelllinien nach Induktion mit Doxyzyklin einsetzt, wurde, stellvertretend für alle NeuT-Klone, die NeuT-Expression in Abhängigkeit von der Zeit in NeuT48-Zellen im *Western Blot* analysiert. Wie in Abbildung 3.7 B zu sehen ist, setzte die NeuT-Proteinexpression etwa 8 h nach der Zugabe von Doxyzyklin ein und erreichte ihren Maximalwert nach etwa 16 h.

Die Generierung der konditionalen hNeu-Kontrollzellen, die zur Verifizierung der Ergebnisse mit den NeuT-Zellen herangezogen werden sollten, erfolgte wie für die NeuT-Zellen beschrieben. Nach Elektroporation der Plasmide pINSpBI-EGFP/hNeu und pcDNA3Neo/rtTA in MCF-7 Zellen und Neomycinselektion ließen sich drei Zellklone hNeuIV, hNeuV und hNeuVIII identifizieren (Abb. 3.8), die eine stringente Regulation von hNeu und EGFP in Abhängigkeit von Doxyzyklin aufwiesen.



**Abbildung 3.8: A Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der EGFP-Expression der hNeu-Klone.** Nach zweitägiger Inkubation in Abwesenheit (-Dox) oder Anwesenheit (+Dox) von Doxyzyklin wurden die verschiedenen Zelllinien am Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Die stringente Regulation von EGFP in Abhängigkeit von Doxyzyklin ist deutlich erkennbar.

**B Expression von EGFP und ERBB2 im *Western Blot*.** Von induzierten (+Dox) und nicht-induzierten (-Dox) Zellen wurden 30 µg Proteinextrakt für die Untersuchung der Expression im *Western Blot* eingesetzt.

Als Kontrolle wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

Die unterschiedlich starke Induzierbarkeit von ERBB2 in den hNeu-Klonen bietet für die weiteren Experimente die Möglichkeit, Effekte, die eventuell abhängig von der ERBB2-Expressionsstärke sind, mit zu untersuchen.

Die so zunächst charakterisierten NeuT- und hNeu-Zelllinien, in denen das *NeuT*-Onkogen bzw. *hNeu* stringent induziert werden kann, sollten im Folgenden dazu verwendet werden, verschiedene Aspekte der ERBB2-abhängigen Tumorentstehung, des Tumorzellwachstums und der Metastasierung detailliert zu untersuchen.

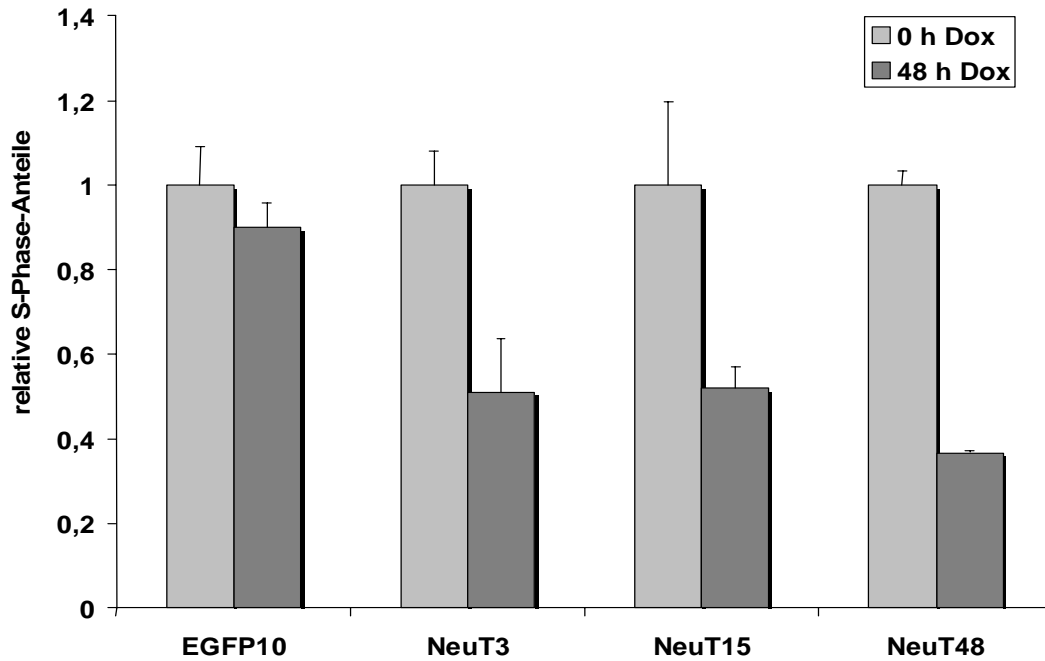
### 3.1.2 Charakterisierung der Zelllinien

#### 3.1.2.1 NeuT induziert Überexpression von P21 und Zellzyklusarrest in MCF-7-Zellen

Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 spielt sowohl bei der Proliferation gesunder eukaryotischer Zellen, als auch beim ungeordneten Wachstum von Tumorzellen eine signifikante Rolle. Aus diesem Grund lag es nahe, zunächst das proliferative Verhalten der generierten Zelllinien nach Induktion von NeuT zu untersuchen. Dazu sollten die Zelllinien NeuT3, NeuT15, und NeuT48 48 h mit Doxozyklin inkubiert und im Folgenden ihr Wachstum mit dem von unbehandelten Zellen und induzierten Kontrollzellen (EGFP10) verglichen werden. Die Analyse der Zellzyklusprofile liefert hierbei wichtige Hinweise über die Anzahl an Zellen, die sich in den jeweiligen Phasen des Zellzyklus befinden und gibt somit Aufschluss über das Proliferationsverhalten.

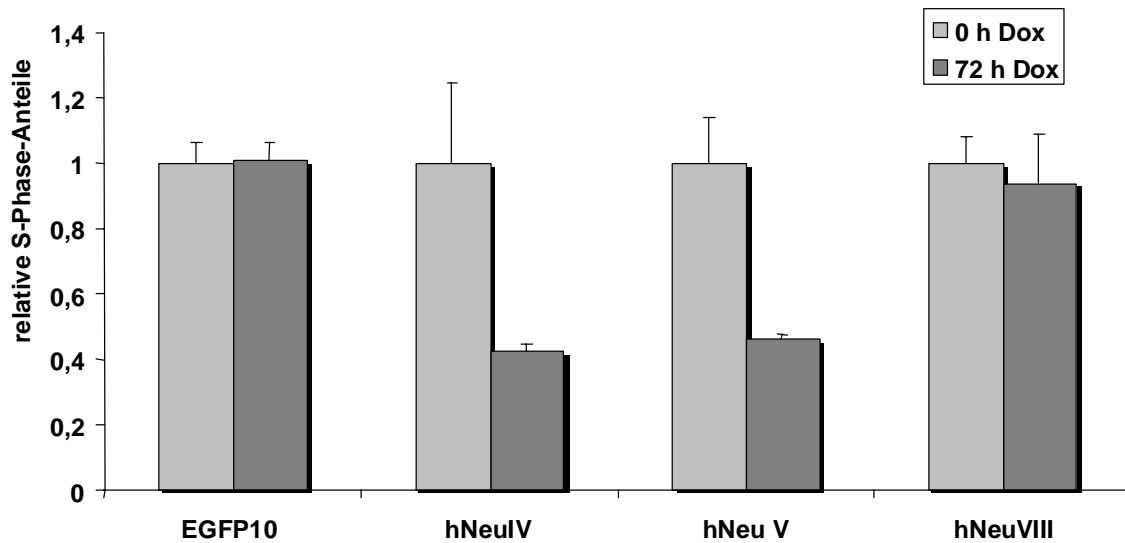
Alle Zelllinien wurden nach der zweitägigen Inkubation in Anwesenheit und Abwesenheit von Doxozyklin Methanol-fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt (siehe 2.2.11). 10.000 Zellen wurden im *Fluorescence Activated Cell Sorter* (FACS) gezählt und die Menge an eingebautem Propidiumiodid pro Zelle gemessen. Die Auswertung der fluorimetrisch bestimmten DNA-Gehalte der unterschiedlichen Ansätze erfolgte mit dem Computerprogramm *CellQuest*. Dabei kann aufgrund des unterschiedlich starken Fluoreszenzsignals des Propidiumiodids, das sich in die DNA der Zellen einlagert, unterschieden werden, ob sich die einzelnen Zellen in der G1-, S-, oder G2-Phase des Zellzyklus befinden.

Bei der Bestimmung der DNA-Gehalte der Zellen im FACS stellte sich heraus, dass in den NeuT-Klonen der Anteil an Zellen in der S-Phase zwei Tage nach Induktion von NeuT drastisch abgenommen hat (48 % (NeuT15) bis 63 % (NeuT48) Abb. 3.9). Dass es sich hierbei um einen NeuT-spezifischen Effekt handelt zeigt die weitgehend unveränderte Anzahl von Zellen, die sich beim Kontrollklon EGFP10 nach Gabe von Doxozyklin in S-Phase befanden.



**Abbildung 3.9: Zellzyklusanalyse der NeuT-Klone und EGFP10 im FACS.** Die unterschiedlichen Zelllinien wurden zwei Tage in Anwesenheit (+Dox) bzw. Abwesenheit (-Dox) von Dox inkubiert, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Im FACS wurde von je 10.000 Zellen (Zell-Dubletten und apoptotische Zellen ausgeschlossen) fluorimetrisch der DNA-Gehalt bestimmt und mit der *CellQuest*-Software die Zellzyklusprofile erstellt. Hier abgebildet sind die relativen S-Phase-Anteile der induzierten Klone im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (deren S-Phasen sind hier zum besseren Vergleich der Zelllinien untereinander auf den Wert 1 normiert).

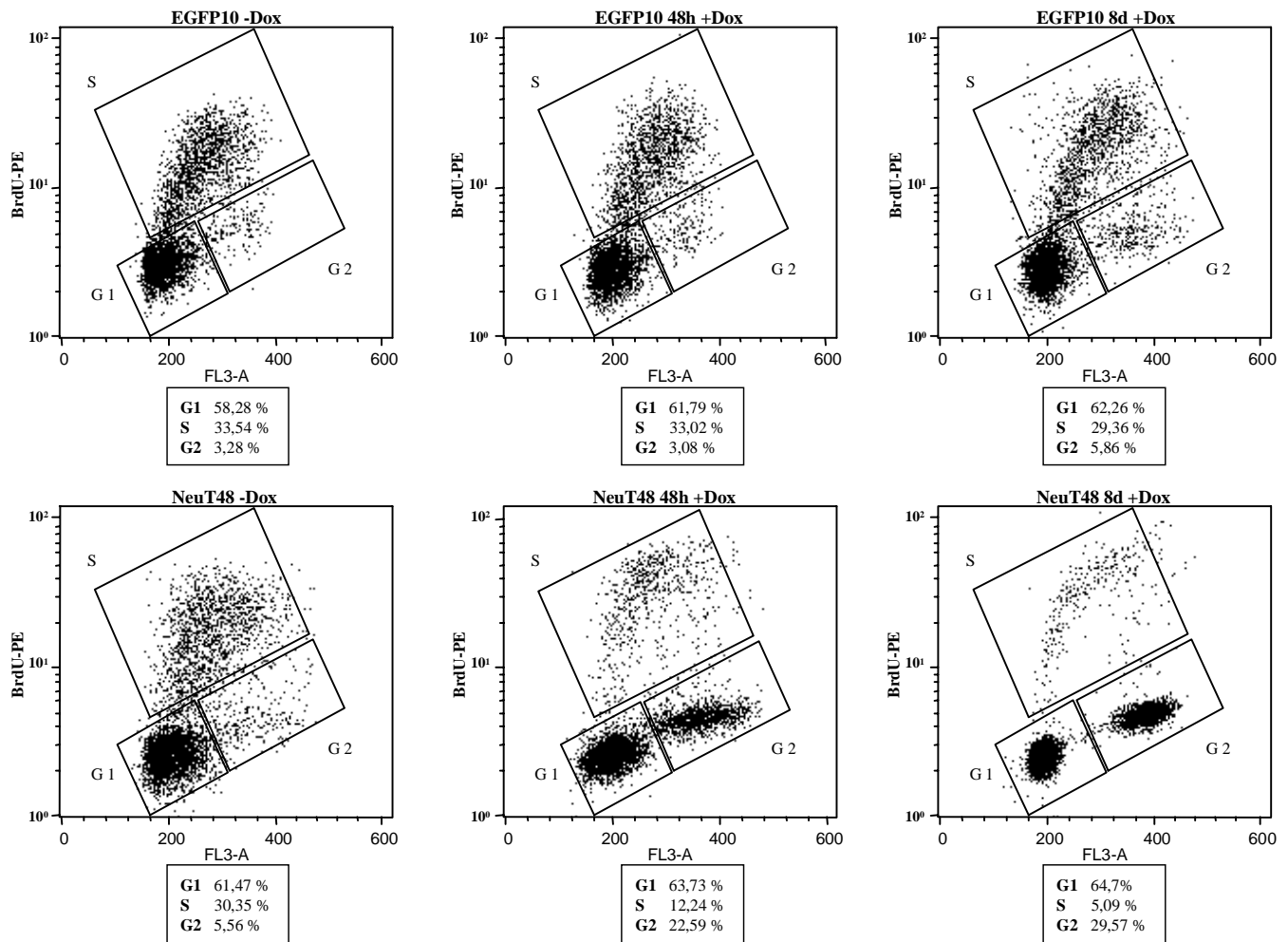
Dieses Ergebnis ist insofern erstaunlich, als die onkogene Wirkung von NeuT bei Überexpression eigentlich eine proliferative Antwort der Zellen hätte erwarten lassen. Deswegen sollte dieses Resultat unter Verwendung der hNeu-Zelllinien verifiziert werden. Die Klone hNeuIV, hNeuV und hNeuVIII wurden drei Tage mit Doxyzyklin induziert und, wie schon für die NeuT-Zellen beschrieben, mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS untersucht. Es zeigte sich (Abb. 3.10), dass auch bei Überexpression des humanen ERBB2 eine deutliche Reduktion der S-Phasen bei den Klonen hNeuIV (58 % weniger Zellen in S-Phase) und hNeuV (54 % weniger Zellen in S-Phase) eintritt. Nur beim schwach ERBB2-exprimierenden Klon hNeuVIII (6 % weniger Zellen in S-Phase) war fast keine Veränderung der S-Phaseanteile zu erkennen.



**Abbildung 3.10: Zellzyklusanalyse der hNeu-Klone im FACS.** Die unterschiedlichen Zelllinien wurden zwei Tage in Anwesenheit (+Dox) und Abwesenheit (-Dox) von Dox inkubiert, fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Im FACS wurde von je 10.000 Zellen (Zell-Dubletten und apoptotische Zellen ausgeschlossen) fluorimetrisch der DNA-Gehalt bestimmt und mit der *CellQuest*-Software die Zellzyklusprofile erstellt. Hier abgebildet sind die relativen S-Phase-Anteile der induzierten Klone im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Eine weitere Untersuchung der Proliferation von Zellen ist mit dem Einbau von 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) möglich. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird bei der DNA-Synthese mit eingebaut. Im Vergleich zur Propidiumiodideinlagerung, die den DNA-Gehalt der Zellen anzeigt, kann durch den BrdU-Einbau zum Zeitpunkt der Aufarbeitung die Proliferation von Zellen gemessen werden. Die NeuT-Klone und EGFP10 wurden 48 h und acht Tage mit bzw. ohne Doxyzyklin im Medium kultiviert, in deren Anschluss die Zugabe von BrdU folgte. Nach vierstündiger BrdU-Inkubation wurden die Zellen fixiert und das eingebaute BrdU mit BrdU-spezifischen Erstantikörpern und Phycoerithrin (PE)-gekoppelten Zweitantikörpern (siehe 2.2.12) markiert. Für die zusätzliche Darstellung des DNA-Gehaltes wurden die Zellen vor der Messung im FACS noch mit Propidiumiodid versetzt. Bei den 50.000 im FACS gemessenen Zellen wurde dann der BrdU-Gehalt gegen den Propidiumiodidgehalt in Graphen aufgetragen (Abb. 3.11) und so der Anteil von Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus' bestimmt.



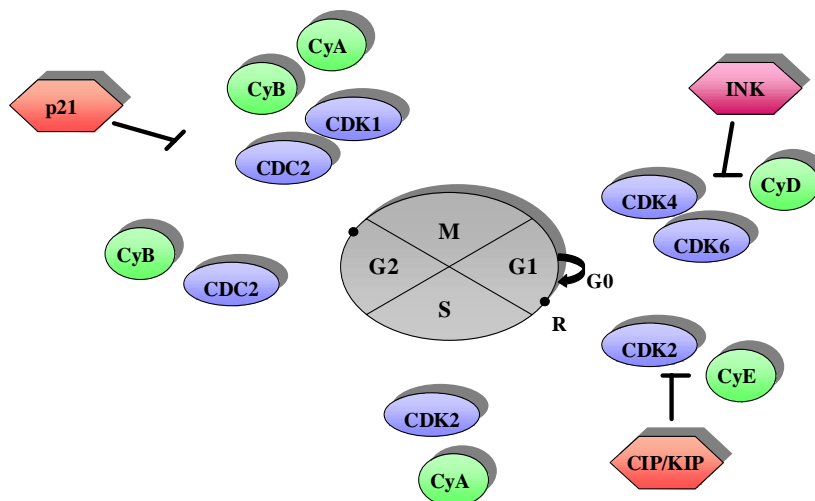


**Abbildung 3.11: FACS-Analyse von BrdU-Einbau und Propidiumiodidfärbung der NeuT-Klone und EGFP10.** Zellen aller Klone wurden ohne (-Dox) und mit Doxyzyklin (48 h und 8 Tage +Dox) inkubiert, im Anschluss daran über 4 h mit BrdU inkubiert und nach Markierung des eingebauten BrdU mit PE-gekoppelten Antikörpern und Färbung mit Propidiumiodid 50.000 Zellen im FACS gemessen. Dargestellt ist auf der x-Achse der Propidiumiodidgehalt und auf der y-Achse der BrdU-Gehalt der Zellen. Die Raster zeigen die verschiedenen Zellzyklusphasen G1, G2 und S sowie den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase.

Die Ergebnisse des BrdU-Einbaus entsprachen denen, die bei der Untersuchung der Zellzyklusprofile mit Propidiumiodid gefunden wurden. Die S-Phaseanteile der NeuT48-Zellen waren nach 48-stündiger Behandlung mit Doxyzyklin um 60 % zurückgegangen, nach achttägiger Doxyzyklin-Administration sogar um 83 %, wohingegen der Kontrollklon EGFP10 nach 48 h eine 2 %ige und nach acht Tagen lediglich eine 12 %ige Reduktion der S-Phasen aufwies. Auffällig war, dass die NeuT48 Zellen vornehmlich in der G2-Phase arretierten, wohingegen sich die G1-Phaseanteile über die Zeit kaum veränderten. Um die Gründe für diesen unerwarteten Wachstumsstillstand der Zelllinien nach Induktion von NeuT bzw. hNeu genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden etwas genauer auf den Zellzyklus eingegangen.

Das Durchlaufen des Zellzyklus' ist abhängig von der Aktivierung verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen (CDKs), die sich sukzessive zusammenlagern und den Übergang von der G1- in die S-Phase und von der G2-Phase in die Mitose einleiten und vorantreiben. Um die abnorme Proliferation von Zellen zu verhindern, kontrollieren Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CKIs) auf sehr stringente Art und Weise die katalytische Aktivität der CDK/Cyclin-Komplexe.

Zellzyklusarrest und zelluläre Wachstumsinhibition können oftmals mit der Induktion von CKIs in Verbindung gebracht werden. Diese gliedern sich in zwei Familien, die INK-Familie, zu der P15, P16, P18 und P19 gehören und die CIP/KIP-Familie, deren Vertreter P21, P27 und P57 sind. Dabei zeichnet sich die CIP/KIP-Familie durch ein breites Interaktionsspektrum mit praktisch allen Cyclin/CDK-Komplexen, aber auch durch die Bindung an die einzelnen Untereinheiten aus, wohingegen die Vertreter der INK-Familie auf die Interaktion mit CDK4 oder CDK6 und die daraus resultierende Verdrängung der D-Cycline spezialisiert sind. Außerdem können die Vertreter der CIP/KIP-Familie in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus' agieren, während die Mitglieder der INK-Familie aufgrund ihrer Restriktion auf CDK4 und CDK6 G1-Phase-spezifisch sind (Abb. 3.12).

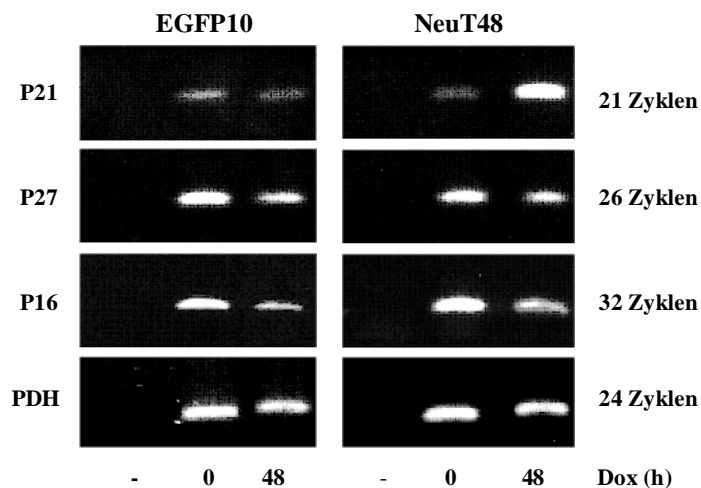


**Abbildung 3.12: Übersicht Zellzyklus.** Dargestellt sind die verschiedenen Phasen des Zellzyklus' G1, S, G2, M und G0 mit den jeweils aktiven Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und Cyclinen (Cy). Die Kontrolle der CDK/Cyclin-Komplexe bzw. der einzelnen Untereinheiten durch die beiden Familien der Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (INK-Familie= P15, P16, P18, P19 und CIP/KIP-Familie= P21, P27, P57) ist durch die dicken Blockierungspfeile angedeutet. Außerdem dargestellt ist der Restriktionspunkt (R), nach dessen Durchlaufen der Eintritt in die S-Phase irreversibel ist.

Die CKIs nehmen eine Schlüsselrolle bei der negativen Regulation des eukaryotischen Zellzyklus' ein, indem sie an definierten Punkten als CDK/Cyclin-Inhibitoren wirken und im

Zusammenspiel mit anderen Faktoren die fehlerfreie Replikation der DNA, Wachstum und Teilung der Zelle gewährleisten.

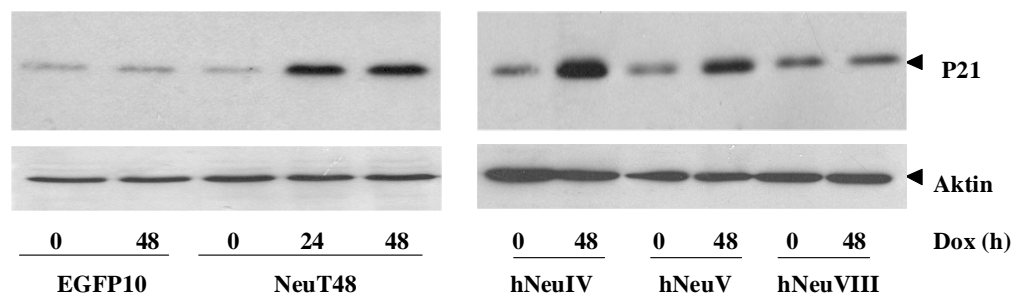
Um einen eventuellen Zusammenhang des NeuT-induzierten Zellzyklusarrestes mit den CDKIs zu überprüfen, sollte mittels semiquantitativer RT-PCR-Experimente die potenziell differenzielle Genexpression von P16, P21 und P27 untersucht werden. Da aufgrund der vergleichbaren NeuT-Expressionsstärke davon auszugehen ist, dass sich die drei Klone NeuT3, NeuT15 und NeuT48 ähnlich verhalten, erfolgten die weiteren Experimente nur mit der Zelllinie NeuT48, stellvertretend für alle NeuT-Klone und mit dem Kontrollklon EGFP10. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte nach 48-stündiger Inkubation von NeuT48- und EGFP10-Zellen in Doxyzyklin-haltigem Kulturmedium vergleichend zu Zellen, die in Dox-freiem Medium kultiviert wurden. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und mit den entsprechenden Oligonukleotiden (P16F/R; P21F/R; P27F/R) semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Abbildung 3.13 zeigt die Expression der unterschiedlichen CDKIs ohne und zwei Tage nach Dox-Induktion in NeuT48- und EGFP10-Zellen.



**Abbildung 3.13: Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Untersuchung differenzieller Expression von CDKIs.** 4 µg DNaseI-verdaute Gesamt-RNA aus unbehandelten und Dox-behandelten EGFP10- und NeuT48-Zellen wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und in semiquantitativen PCRs auf die Expression der CDKIs *P16*, *P21* und *P27* hin untersucht. Die Anzahl der Amplifikationszyklen ist am rechten Bildrand vermerkt. Die Expression des Haushaltsgens *Pyruvatdehydrogenase* (PDH, *Primer*: PDH F/R) wurde als Kontrolle zum Vergleich der eingesetzten cDNA-Mengen benutzt. PCR Negativkontrollen sind mit „-“ gekennzeichnet. In den Negativkontrollen der reversen Transkription wurde keine Amplifikation beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zeigten einen deutlichen Anstieg der *P21*-mRNA in Doxyzyklin-behandelten NeuT48-Zellen, wohingegen die *P21*-Expression im Kontrollklon EGFP10 unverändert blieb. Für *P16* und *P27* konnte in beiden Klonen keine deutliche differenzielle Genexpression nachgewiesen werden. Dieses Resultat legte die Vermutung nahe, dass P21 am NeuT-induzierten Wachstumsarrest beteiligt ist.

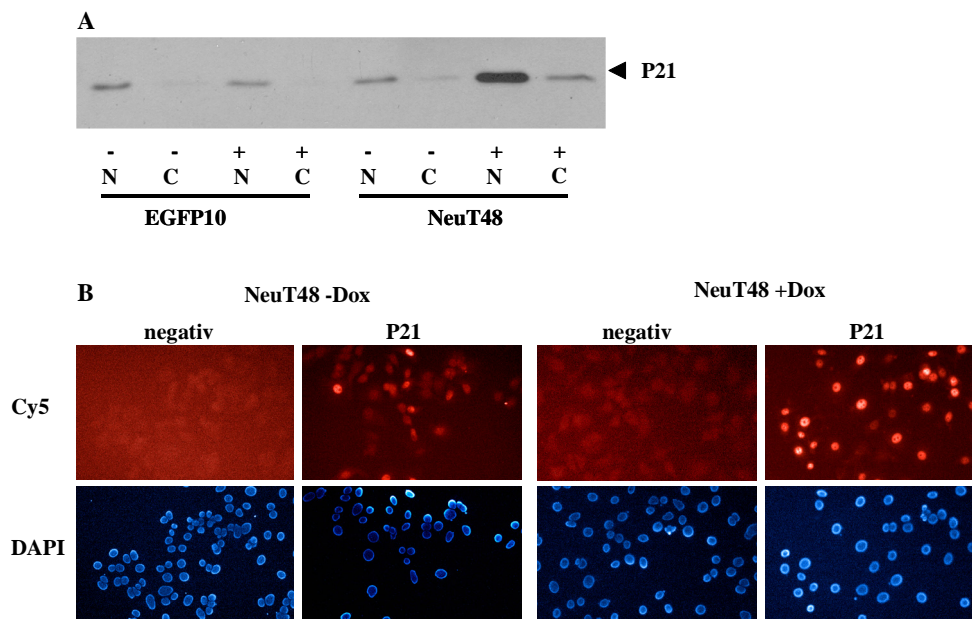
Da nur das funktionale P21-Protein einen Zellzyklusarrest initiieren kann, erfolgte zudem noch die Untersuchung der P21-Proteinexpression. Dabei wurden neben NeuT48 und EGFP10 auch die hNeu-Klone verwendet. *Western Blot*-Analysen der behandelten und unbehandelten Zellen bestätigten, wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, den Zuwachs an P21-Protein in induzierten NeuT48-, hNeuIV- und hNeuV-Zellen im Gegensatz zu den EGFP10 Kontrollzellen. Die schwache ERBB2-Expression der hNeuVIII-Zellen reichte, wie anhand der Resultate aus den Zellzyklusanalysen im FACS zu erwarten war, nicht aus, um eine differenzielle Proteinexpression des CDK-Inhibitors P21 zu induzieren.



**Abbildung 3.14: Expression von P21 in EGFP10, NeuT48 und den hNeu-Klonen.** Nach Inkubation der Zellen mit (24 h bzw. 48 h) und ohne (0 h) Doxyzyklin wurden 100 µg Proteinextrakt im *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern auf differenzielle P21-Proteinexpression hin untersucht. Als Kontrolle wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

Das P21-Protein spielt eine herausragende Rolle bei der Induktion des Zellzyklusarrestes in eukaryotischen Zellen, indem es als Vertreter der CIP/KIP-Familie mit fast allen CDK/Cyclin-Komplexen interagiert und diese inhibiert (Sherr *et al.*, 1992). Dieses Bild der klassisch inhibitorischen Rolle für P21 änderte sich im Laufe der letzten Jahre, in denen zunehmend Hinweise auf wachstumsfördernde Eigenschaften dieses CDK-Inhibitors gefunden wurden. So kann P21 z. B. die Bildung von CDK4/6-Komplexen stimulieren (LaBaer *et al.*, 1997) und übt durch die Interaktion mit der *apoptotic signal regulating kinase* (ASK1) eine antiapoptotische Funktion aus (Asada *et al.*, 1999). Diese ambivalente Funktion des P21-Proteins kann durch posttranskriptionelle Modifikationen erklärt werden, die zur Umverteilung des Proteins in den zellulären Kompartimenten führt. Die phosphorylierte Form von P21 kann aufgrund der Maskierung der *nuclear localization sequence* (NLS) durch den Phosphatrest nicht in den Nukleus gelangen (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2002), um dort die Inhibierung der Cyclin/CDK-Komplexe durchzuführen. Die Funktion von P21 im Zellzyklus korreliert demzufolge mit seiner subzellulären Lokalisierung (El Deiry, 2001). Nukleäres P21-Protein fungiert als Tumorsuppressor durch seine Zellzyklus-inhibierende Funktion, wohingegen zytoplasmatisches P21 eine Rolle bei der zellulären Proliferation spielt. In der

vorliegenden Arbeit lag aufgrund des Proliferationsblocks infolge der NeuT-Expression der Verdacht nahe, dass der Zuwachs an P21-Protein in erster Linie im nukleären Kompartiment der Zellen zu beobachten ist. Da kürzlich aber von Zhou *et al.* gezeigt wurde, dass die Aktivierung von ERBB2 in NIH3T3-Zellen zur Umverteilung von P21 vom Nucleus ins Zytoplasma führt (Zhou *et al.*, 2001), sollte im Folgenden die subzelluläre Verteilung von P21 in NeuT48-Zellen untersucht werden. *Western Blot*-Analysen (Abb. 3.15 A) mit nukleären und zytoplasmatischen Proteinextrakten der Zelllinien EGFP10 und NeuT48 zeigten, dass sich der NeuT-induzierte P21-Zuwachs in erster Linie auf den Nucleus beschränkt. Diese Anhäufung von nukleärem P21 konnte auch in indirekten Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden, bei denen die Zellen nach zwei Tagen in An- bzw. Abwesenheit von Doxyzyklin im Kulturmedium mit P21-spezifischen Erstantikörpern und Cy5-markierten Zweitantikörpern inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden (Abb. 3.15 B).

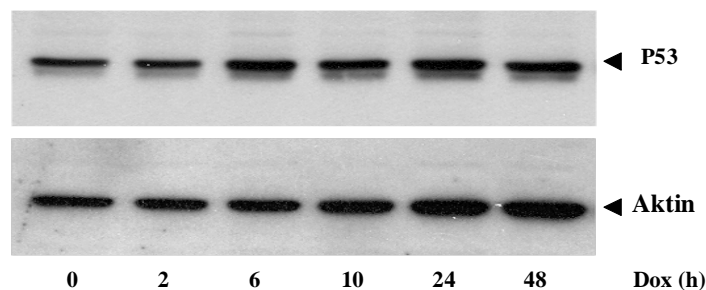


**Abbildung 3.15: A Western Blot-Analysen zur subzellulären Verteilung von P21.** NeuT48- und EGFP10-Zellen wurden zwei Tage in Anwesenheit (+) oder Abwesenheit (-) von Dox inkubiert. 50 µg zytoplasmatischer (C) und nukleärer (N) Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die P21-Expression durch *Immunoblotting* nachgewiesen.

**B Immunfluoreszenz zur subzellulären Verteilung von P21.** NeuT48-Zellen wurden zwei Tage nach der Behandlung (+/- Dox) fixiert und mit P21-spezifischen Erstantikörpern und Cy5-markierten Zweitantikörpern inkubiert. Der Inkubationsschritt mit P21-spezifischem Antikörper wurde in den Negativkontrollen (negativ) durch Inkubation mit Blocklösung ersetzt. Nach der Färbung der Zellen erfolgte die Einbettung zur Visualisierung der Zellkerne in *DAPI-antifade*. Die Aufnahmen wurden unter Konditionen zur Anregung von DAPI oder Cy5 mit einer gekühlten CCD-Digitalkamera gemacht.

Die Expression des CDK-Inhibitors P21 wird durch das Tumorsuppressorprotein P53 reguliert, das als Transkriptionsfaktor durch zellulären Stress, Onkogeneinwirkung oder

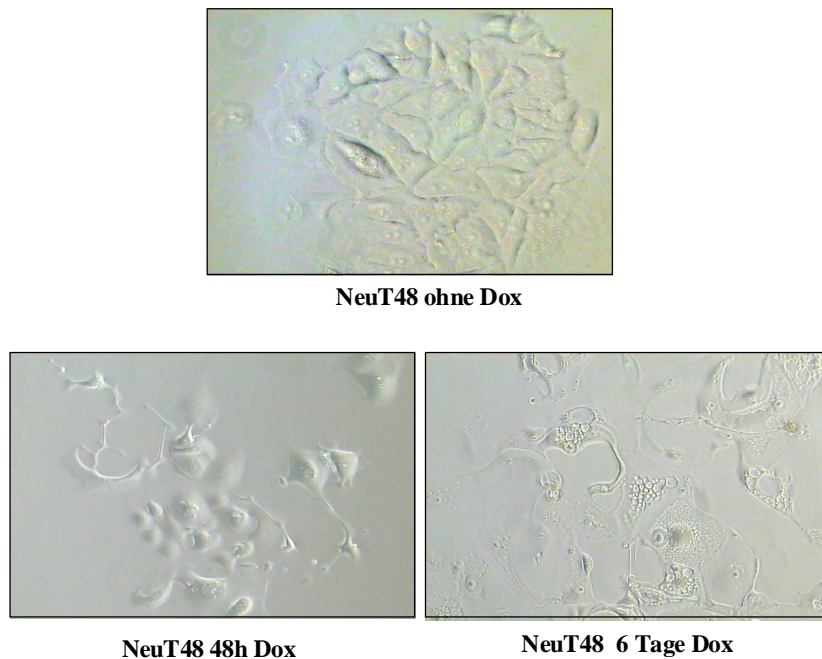
DNA-Schädigung aktiviert wird (Roninson *et al.*, 2000). Es existieren aber auch P53-unabhängige Mechanismen der P21-Induktion, wie die Aktivierung durch TGF- $\beta$  (Datto *et al.*, 1995) oder Mimosin (Alpan *et al.*, 1996). Da die MCF-7 Zellen zwei funktionale Kopien des *P53*-Gens besitzen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob mit der Doxyzyklin-induzierten NeuT-Expression ein Anstieg des P53-Proteins einhergeht. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Doxyzyklin-Gabe ins Kulturmedium von NeuT48-Zellen Proteinextrakte für die Analyse im *Western Blot* gewonnen. Wie in Abbildung 3.16 ersichtlich ist, blieben die P53-Proteinkonzentrationen im Verlauf der Dox-Induktion konstant. Demzufolge scheint die P21-Expression über einen P53-unabhängigen Mechanismus reguliert zu werden.



**Abbildung 3.16: Western Blot der P53-Induktion.** Proteine aus unbehandelten und Dox-behandelten NeuT48-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert und 50  $\mu$ g für *Western Blot*-Analysen zur P53-Expression eingesetzt (obere Reihe). Die Aktin-spezifische Immunfärbung in der unteren Reihe demonstriert die gleichmäßige Beladung des Gels.

### 3.1.2.2 NeuT induziert verfrühte Seneszenz in MCF-7 Zellen

Ein weiteres Phänomen, das neben der Wachstumsinhibition infolge der NeuT-Induktion in allen Klonen auffiel, waren morphologische Veränderungen der Zellen, die 48 h nach Gabe von Doxyzyklin einsetzten. Nachdem die Zellen zunächst einen spindelförmigen Phänotyp mit langen, zytoplasmatischen Fortsätzen ausbildeten, ging dieser nach 3-5 Tagen in eine Zellform über, in der die Zellen ein stark vergrößertes Volumen mit zahlreichen Vakuolen aufwiesen (Abb. 3.17). Dass dieser Phänotyp eine spezifische Reaktion auf die Überexpression von NeuT war zeigte sich daran, dass der Kontrollklon EGFP10 über die Zeit hinweg keine morphologischen Veränderungen als Folge der Doxyzyklin-Administration durchlief.

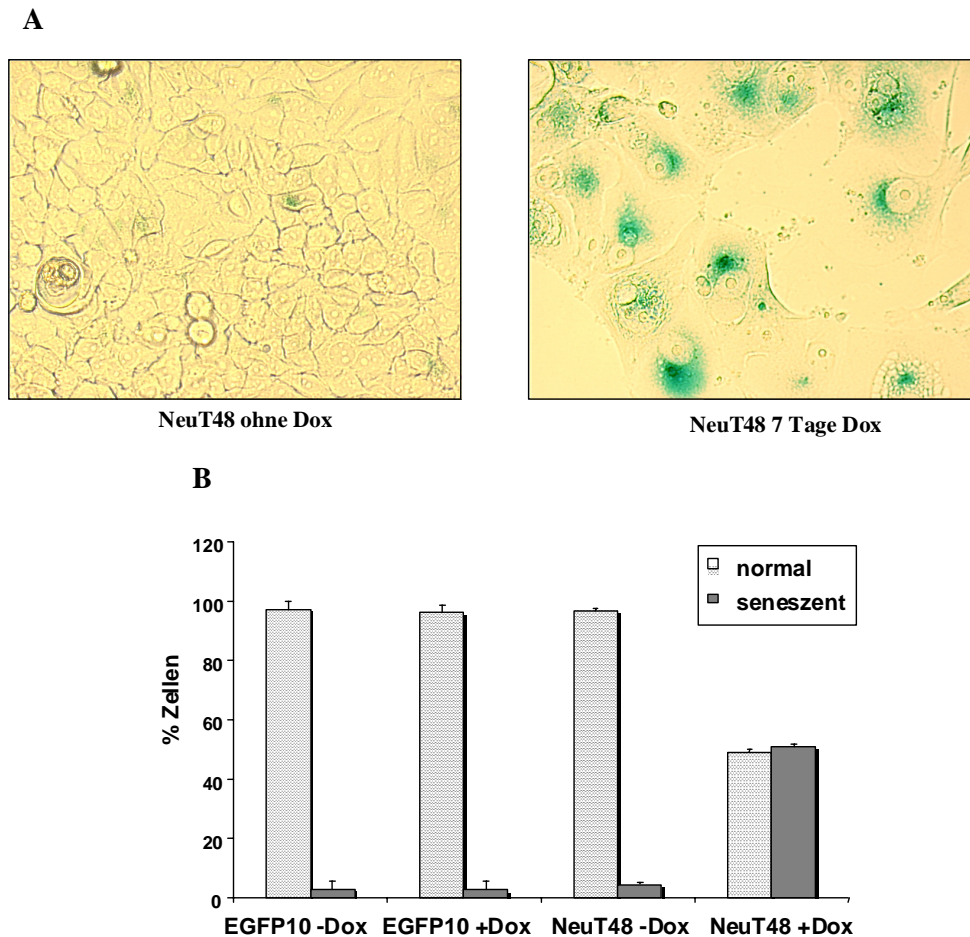


**Abbildung 3.17: Morphologische Veränderungen nach NeuT-Induktion.** Mikroskopische Aufnahmen zeigen die Veränderungen des Phänotyps von NeuT48-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion von NeuT. In nicht-induziertem Zustand (ohne Dox) haben die Zellen kleine, eckige Zellkörper und wachsen in Inseln. Zwei Tage nach Dox-Gabe (48 h Dox) bilden einzelne Zellen lange Fortsätze, die Zellkörper nehmen eine spindelförmige Morphologie an. Am Tag 6 nach Induktion mit Dox (6 Tage Dox) sind alle Zellen abgeflacht und stark vergrößert mit einer Vielzahl von Vakuolen im Zytoplasma.

Im Zusammenhang mit der starken Induktion von P21 lag der Verdacht nahe, dass verlängerte NeuT-Signaltransduktion zur Seneszenz in MCF-7 Zellen führt. Die intensive Erforschung der zellulären Seneszenz in den letzten Jahren führte zur Entdeckung zweier unterschiedlicher Formen dieses Phänomens. Die klassische, replikative Seneszenz manifestiert sich in einem langsamen Prozess mit fortschreitender Verkürzung der Telomere (De Pinho *et al.*, 2000), wohingegen die beschleunigte, verfrühte Seneszenz durch Schädigung der DNA oder die Aktivierung eines Onkogens, wie z. B. *RAS*, hervorgerufen wird (Serrano *et al.*, 1997). Der CDK-Inhibitor P21 spielt eine Schlüsselrolle bei beiden Formen der Seneszenzinduktion, die durch Zellzyklusarrest, vergrößerte Zellvolumina mit abgeflachter Morphologie und die Aktivierung Seneszenz-spezifischer Marker, wie der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) Aktivität, gekennzeichnet ist. Der Nachweis der SA- $\beta$ -Gal, die bei pH 6,0 aktiv ist, erfolgt nach einer Methode, die von Dimri *et al.* 1995 beschrieben wurde. Da alle NeuT-Klone sowohl die Seneszenz-typischen morphologischen Veränderungen als auch die erhöhte P21-Expression aufwiesen, sollte im Folgenden die SA- $\beta$ -Gal-Aktivität untersucht werden. Sieben Tage nach Doxyzyklin-Induktion wurden hierfür NeuT48-Zellen und der Kontrollklon EGFP10 mit PBS gewaschen, fixiert und mit SA- $\beta$ -Gal-Färbelösung inkubiert (siehe 2.2.16).



Der Prozentsatz SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen in unbehandelten NeuT48-Zellen war mit 4,4 % ähnlich niedrig wie derjenige von behandelten und unbehandelten EGFP10-Zellen (Abb. 3.18). Im Gegensatz hierzu waren mehr als die Hälfte (51 %) der induzierten NeuT48-Zellen positiv für die SA- $\beta$ -Gal.

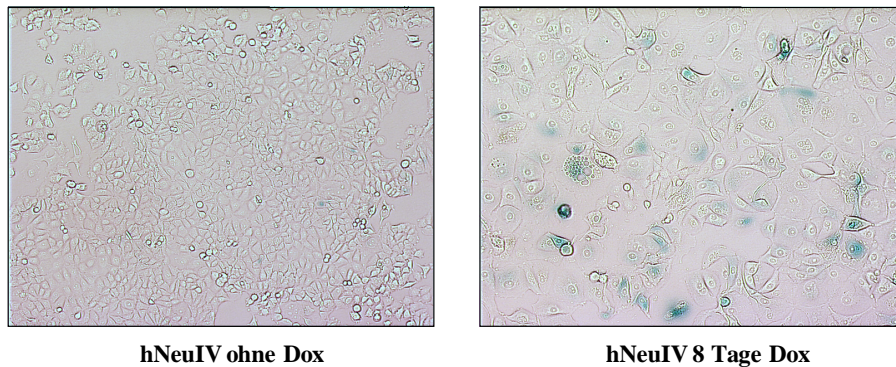


**Abbildung 3.18: A SA- $\beta$ -Gal-Färbung zum Nachweis verfrühter Seneszenz.** EGFP10- und NeuT48-Zellen wurden sieben Tage in An- und Abwesenheit von Dox inkubiert und im Anschluss einer SA- $\beta$ -Gal-Färbung unterzogen (sichtbar an den blauen Zellkörpern).

**B Auswertung seneszenter Zellen.** Die Anzahl normaler (helle Balken) und seneszenter (dunkle Balken) EGFP10- und NeuT48-Zellen in den Zellkulturen wurde nach dem Auszählen SA- $\beta$ -Gal-positiver Zellen berechnet.

In Anbetracht der Tatsache, dass ERBB2 bislang noch nicht in den Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz gebracht werden konnte, wurde das Experiment mit dem stark ERBB2-exprimierenden Klon hNeuIV wiederholt. Nach achttägiger Induktion von hNeu mit Doxyzyklin waren auch in diesem Klon die schon bei den NeuT-Zellen beobachteten morphologischen Veränderungen und die stark erhöhte Aktivität der SA- $\beta$ -Gal (Abb. 3.19) zu sehen.

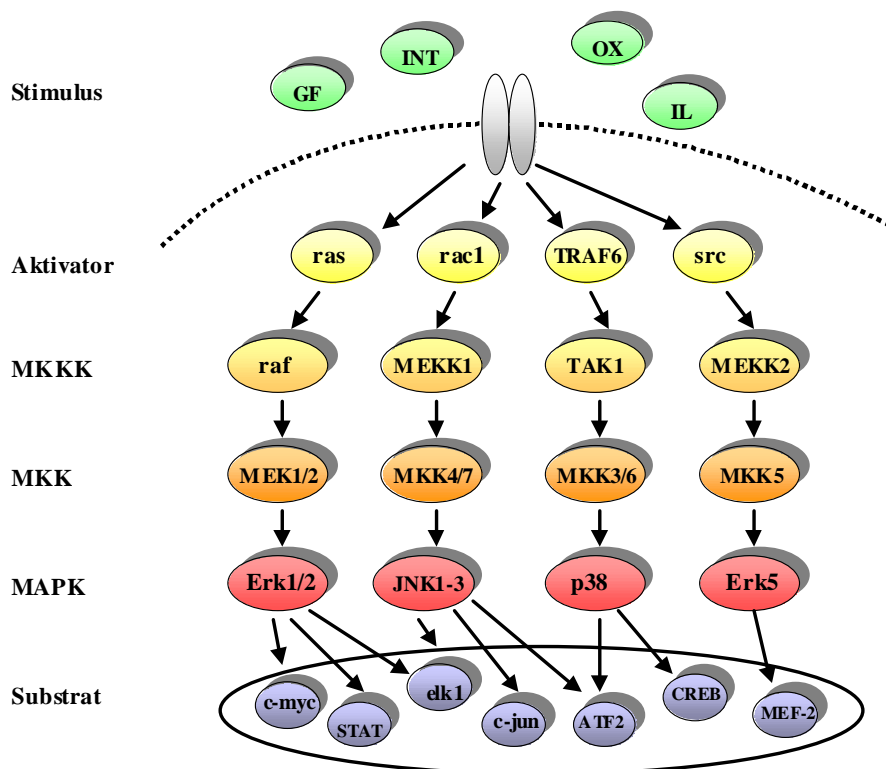




**Abbildung 3.19: SA-β-Gal-Färbung zum Nachweis verfrühter Seneszenz.** hNeuIV-Zellen wurden acht Tage in An- und Abwesenheit von Dox inkubiert und im Anschluss einer SA-β-Gal-Färbung unterzogen (sichtbar an den blauen Zellkörpern).

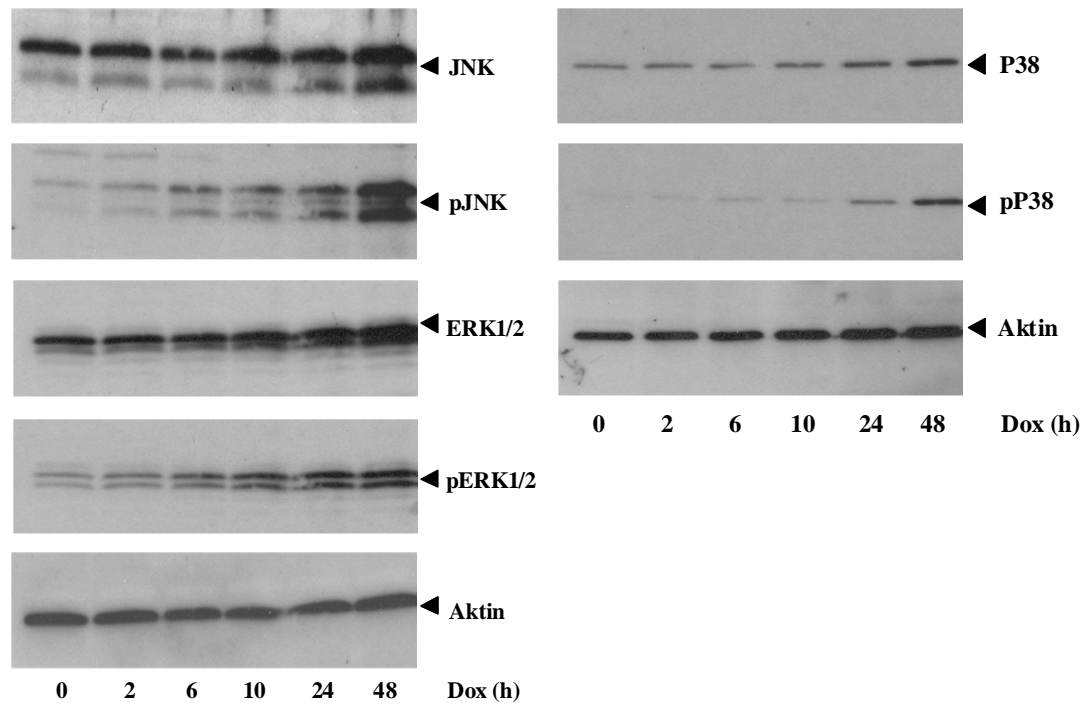
Folglich konnte gezeigt werden, dass sowohl der P21-induzierte Zellzyklusarrest als auch die morphologischen Veränderungen und die Aktivität der SA-β-Gal Teile eines verfrühten Seneszenz-Programms sind, das durch Signaltransduktion sowohl von onkogenem *NeuT* als auch durch Überexpression von ERBB2 in MCF-7 Zellen initiiert wurde.

Verfrühte Seneszenz, hervorgerufen durch mitogene Stimuli, konnte in den letzten Jahren der Aktivierung der Mitglieder der *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Familie zugeordnet werden (Haq *et al.*, 2002; Iwasa *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004). Die MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, die auf vielfältige Weise in die Regulation zellulärer Proliferation, Differenzierung und Apoptose eingreifen und sich in drei Unterfamilien gliedern: Die *extracellular signal-regulated* Kinasen (ERK) werden in erster Linie durch Wachstumsfaktoren stimuliert, wohingegen sich die *c-jun N-terminal* Kinasen (JNK) und die P38-Kinasen durch Stressstimuli aktivieren lassen. Die MAPK werden nach Stimulierung der Zellen über ein komplexes Netzwerk vorgeschalteter Kinasen reguliert und leiten ihrerseits die Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren ein, deren Expressionsinduktion bestimmter Gene zur adäquaten Reaktion der Zelle auf den Stimulus führt. Abbildung 3.20 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Signaltransduktionswege der MAPK.



**Abbildung 3.20: Übersicht MAPK-Signaltransduktion (verändert nach Johnson und Lapadat, 2002).** Schematische Darstellung der MAPK-Signaltransduktionskaskaden ausgehend von einem Stimulus (OX=oxidativer Stress, IL=Interleukin, GF=Wachstumsfaktor, INT=Integrin), der einen Rezeptor in der Zellmembran stimuliert und über Aktivatoren (ras, rac1, TRAF6, src) und vorgeschaltete Kinasen (MKKK=Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kinase Kinase, MKK=MAPK Kinase) die Mitglieder der MAPK-Familie (ERK=*extracellular signal-regulated kinase*, JNK=*c-jun N-terminal kinase* und P38) aktiviert und letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (c-myc, STAT, elk1, c-jun, ATF2, CREB, MEF2) führt.

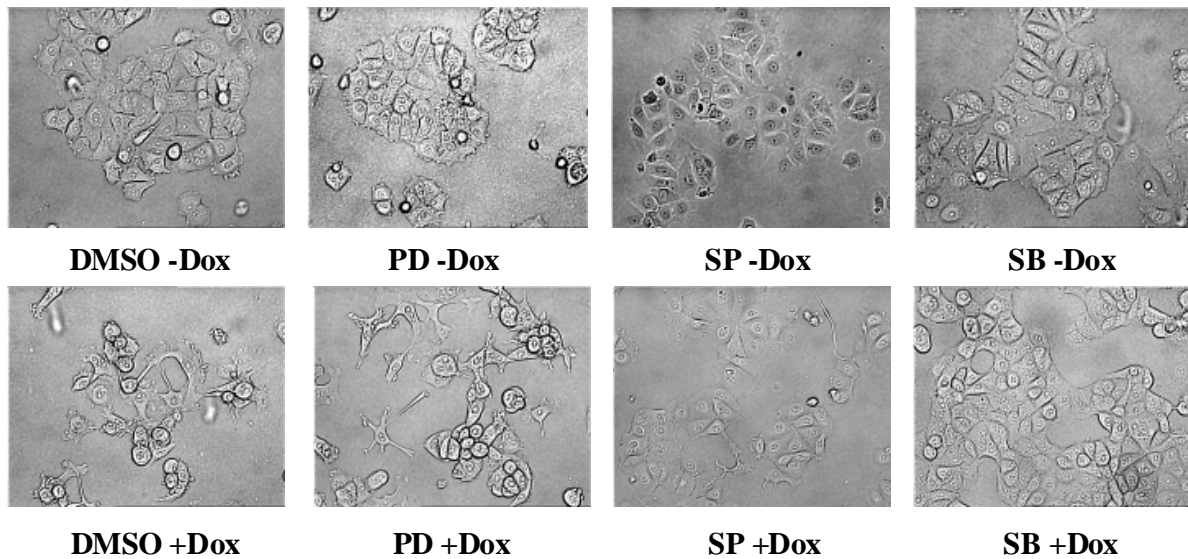
Um herauszufinden, ob die NeuT-induzierte Seneszenz auch über die Signaltransduktionswege der MAPK-Familie gesteuert wird, wurden zunächst *Western Blot*-Analysen der verschiedenen Mitglieder der MAPK in einer zeitlichen Abfolge nach Induktion mit Doxyzyklin gemacht. Dabei wurde sowohl die Expressionsstärke der jeweiligen Kinase als auch deren Phosphorylierungsgrad, der ein Maß für die Aktivität der Kinasen ist, untersucht. Abbildung 3.21 zeigt, dass in NeuT48-Zellen eine Aktivierung aller drei Kinasen, die durch die gesteigerte Phosphorylierung der jeweiligen Kinase belegt ist, infolge der Expression von NeuT eintrat. Die Expression der MAPK an sich blieb durch die Induktion mit Doxyzyklin allerdings weitgehend unbeeinflusst.



**Abbildung 3.21: Western Blot der verschiedenen MAPK und ihrer phosphorylierten Formen.** Proteinextrakte, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit Dox aus den Zellen gewonnen wurden, wurden im *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern für die Kinasen ERK1/2, JNK und P38 und deren phosphorylierte Formen untersucht. In der oberen Reihe ist immer die nicht phosphorylierte Form, in der unteren Reihe die phosphorylierte, aktive Form dargestellt.

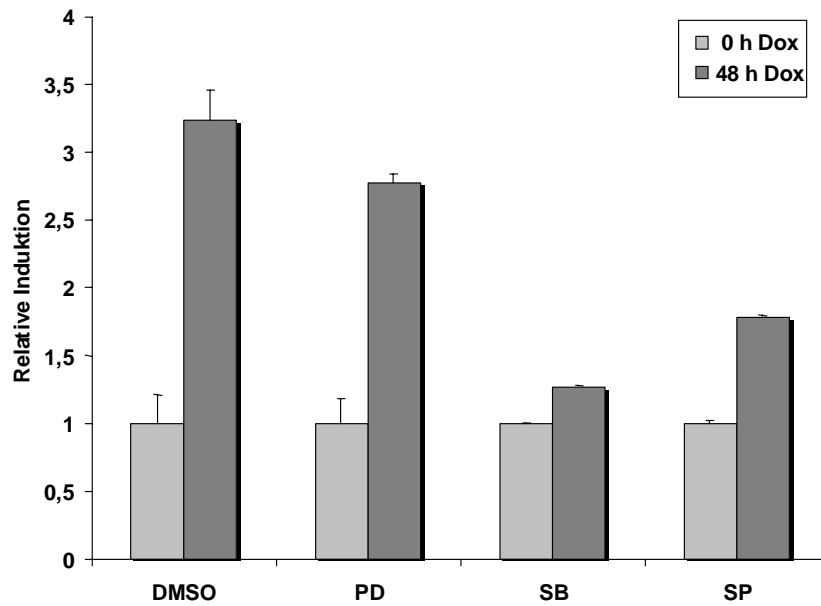
Die Aktin-spezifische Immunfärbung in der untersten Reihe demonstriert die gleichmäßige Beladung des Gels.

Für die Blockierung der einzelnen MAPK gibt es spezifische Inhibitoren, mit deren Hilfe untersucht werden kann, welche der Kinasen bei der Induktion der verfrühten Seneszenz eine Rolle spielt. Hierfür erfolgte die Inkubation von NeuT48-Zellen für 48 h in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin und den spezifischen Inhibitoren für ERK1/2 (PD098059), P38 (SB203580) und JNK (SP60025). Dabei wurden die Inhibitoren 1 h vor Gabe von Doxyzyklin zu den Zellen gegeben, um eine mögliche Beeinflussung des Antibiotikums auf die Inhibitoren zu umgehen. Als Kontrolle wurde Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem alle Inhibitoren gelöst worden waren, verabreicht. Die in Abbildung 3.22 dargestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen die morphologischen Veränderungen der NeuT48-Zellen zwei Tage nach Beginn der Inkubation mit den Inhibitoren bzw. Doxyzyklin. Die Seneszenz-assoziierten phänotypischen Veränderungen konnten nur durch den P38-Inhibitor SB203580 unterbunden werden, wohingegen die Blockade des ERK1/2- und des JNK-Signaltransduktionsweges die Ausbildung der spindelförmigen Zellkörper mit den langen Fortsätzen nicht verhindern konnten.



**Abbildung 3.22: Morphologische Veränderungen von NeuT48-Zellen nach Induktion mit Dox und gleichzeitiger Inkubation mit verschiedenen Kinaseinhibitoren.** NeuT48-Zellen wurden 48 h mit Dox induziert und während dieser Zeit in An- und Abwesenheit verschiedener Kinaseinhibitoren (SB= 20  $\mu$ M SB203580 inhibiert P38; SP= 10  $\mu$ M SP60025 inhibiert JNK und PD= 50  $\mu$ M PD98059 inhibiert ERK1/2, DMSO als Kontrolle) inkubiert. Die morphologischen Veränderungen, die nach der Induktion von NeuT eintreten, können nur mit dem P38-Inhibitor SB203580 vollständig verhindert werden.

Nachdem die phänotypischen Veränderungen der Aktivierung von P38 durch onkogenes *ERBB2* zugeordnet werden konnten, sollte nun in quantitativen *real-time* RT-PCRs im *Light Cycler* untersucht werden, inwieweit Zusammenhänge zwischen der Aktivierung der P38-Kinase und der Induktion von *P21* bestehen. Nach Extraktion und reverser Transkription von RNA aus NeuT48-Zellen, die mit den unterschiedlichen Inhibitoren und Doxyzyklin inkubiert worden waren, wurden quantitative PCRs am *Light Cycler* durchgeführt, die exakte Aussagen über die Stärke der Induktion von *P21* ermöglichen sollten. Zur Normierung der cDNA-Mengen in den einzelnen Ansätzen wurde das Haushaltsgen *Pyruvatdehydrogenase (PDH)* verwendet. Die in Abbildung 3.23 dargestellten Daten demonstrieren, dass die Blockade des P38-Signaltransduktionsweges, und zu einem geringeren Teil auch die des JNK-Weges, die Induktion von *P21* verhinderten.



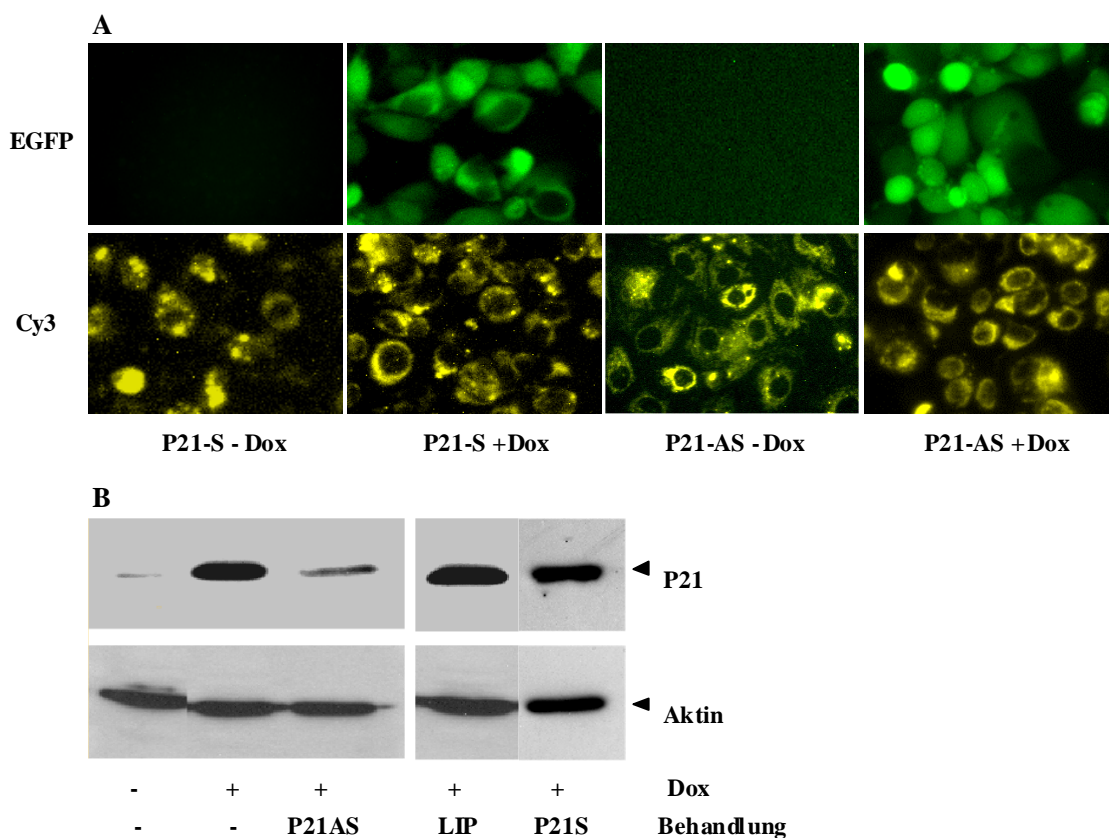
**Abbildung 3.23: Quantitative *real time* RT-PCR der *P21*-Induktion nach Behandlung von NeuT48-Zellen mit spezifischen Kinaseinhibitoren.** Die Inkubation von NeuT48-Zellen mit spezifischen Inhibitoren der Kinasen ERK1/2 (PD 50  $\mu$ M), P38 (SB 20  $\mu$ M) und JNK (SP 10  $\mu$ M) oder DMSO (Kontrolle) in Anwesenheit (dunkle Säulen) oder Abwesenheit (helle Säulen) von Dox erfolgte über einen Zeitraum von 48 h, in dessen Anschluss 4  $\mu$ g isolierter Gesamt-RNA für RT-PCRs verwendet wurden. Die cDNAs wurden im *Light Cycler* auf ihre *P21*-Expression (Oligonukleotide: p21LC F/R) hin untersucht, wobei die *P21*-Transkriptmengen ohne Dox als Standard genommen und die Induktion nach Dox-Stimulation anhand dieser berechnet wurde. Als interne Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen wurden quantitative RT-PCRs derselben Proben mit *PDH* (Oligonukleotide: PDH F/R) durchgeführt, die mit den Werten des *P21*-Experiments verrechnet wurden.

Damit konnte eine wichtige Rolle für die P38-Kinase bei der Ausprägung des seneszenten Phänotyps und der Zunahme von P21 infolge onkogener *ERBB2*-Aktivierung gezeigt werden.

### 3.1.2.3 *P21 Antisense*-Oligonukleotide verhindern den NeuT-induzierten Wachstumsarrest

Um noch weiter auf die Funktion des CDK-Inhibitors P21 einzugehen, sollte überprüft werden, ob dieses Protein allein für den NeuT-induzierten Zellzyklusarrest verantwortlich ist. Die selektive Blockade der P21-Expression kann mit Hilfe von *Antisense*-Oligonukleotiden realisiert werden. Die Oligonukleotide wurden, basierend auf schon publizierten Sequenzen (Caroll *et al.*, 2002), mit Phosphorothioatresten an den 3'- und 5'-Enden von der Firma Metabion generiert. Außerdem wurden die *Sense*- und *Antisense*-Oligonukleotide am 5'-Ende durch das Anhängen von Cy3-Molekülen modifiziert, mit deren Hilfe die Transfektionseffizienz im Fluoreszenzmikroskop bei entsprechender Anregung bestimmt werden kann. NeuT48-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine transient mit P21 *Antisense*-Oligonukleotiden (AS) und P21 *Sense*-Oligonukleotiden (S) transfiziert, 24 h mit Doxyzyklin inkubiert und im Anschluss die Effizienz der Transfektion überprüft.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abb. 3.24 A) zeigten neben der hohen Transfektionseffizienz (fast alle Zellen sind Cy3-positiv) auch die weiterhin funktionale Induktion von EGFP durch Doxyzyklin, stellvertretend für die NeuT-Expression vom bidirektionalen CMV-TetO-Promotor. *Western Blot*-Analysen der P21-Expression (Abb. 3.24 B) in behandelten und unbehandelten NeuT48-Zellen demonstrierten die Effizienz und Spezifität der *Antisense*-Transfektion. Während in der Kontrolltransfektion mit P21-S die Expressionsstärke des CDK-Inhibitors vergleichbar mit der Doxyzyklin-induzierter, nicht-transfizierter Zellen ist, gelang es mit Hilfe des P21-AS, die P21-Expression um ein Vielfaches zu verringern.

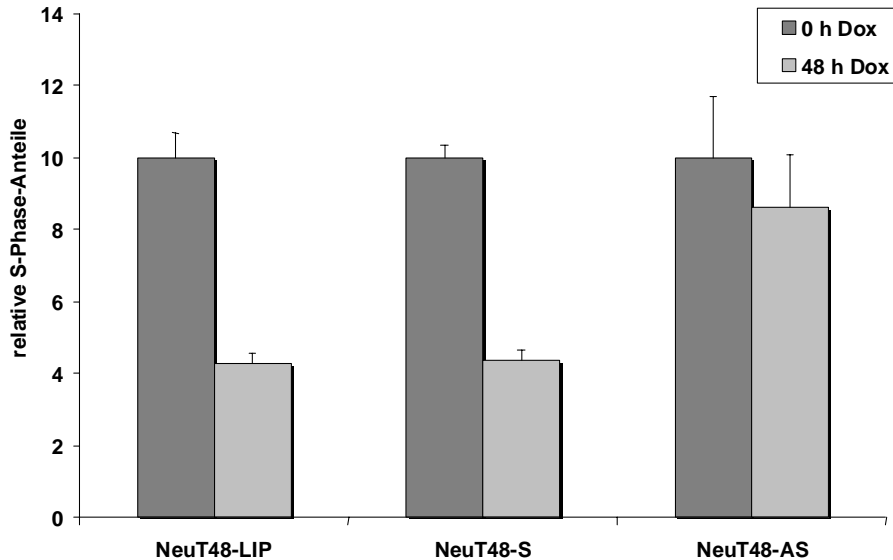


**Abbildung 3.24: A Effizienz der Transfektion mit P21-AS- und P21-S-Oligonukleotiden.**  $2 \times 10^5$  Zellen wurden mit den entsprechenden Oligonukleotiden transfiziert und nach 48-stündiger Inkubation mit Dox fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In der oberen Reihe dargestellt ist EGFP, das nur infolge der Induktion mit Dox (+Dox) exprimiert wird. Die untere Reihe zeigt die Aufnahme der Zellen unter Anregung des Oligonukleotid-gekoppelten Cy3-Fluorochroms in An- und Abwesenheit von Dox (+/-Dox).

**B Western Blot der P21-Expression nach Transfektion mit P21-AS und P21-S.** 50  $\mu$ g Proteinextrakt von NeuT48-Zellen mit unterschiedlicher Behandlung wurden im *Western Blot* mit spezifischen Antikörpern auf die P21-Expression hin untersucht. Die obere Reihe zeigt die P21-Expression behandelter (Transfektion mit P21-S- oder P21-AS-Oligonukleotiden und LIP=Kontrolltransfektion ohne Oligonukleotide) und unbehandelter (-) Zellen in An- und Abwesenheit von Dox (+/- Dox). Die Aktin-spezifische Immunfärbung in der unteren Reihe demonstriert die gleichmäßige Beladung des Gels.

Für die Zellzyklusanalysen im FACS wurden NeuT48 Zellen 7 h nach der Transfektion mit P21-AS, P21-S und LIP (LIP=Lipofectamine, Transfektionsreagenz als Kontrolle) für 48 h in

DMEM-Vollmedium +/- Dox inkubiert. Nach Fixierung und Färbung der Zellen mit Propidiumiodid wurden die Zellzyklusprofile der unterschiedlich behandelten Zellen im FACS gemessen und die relativen S-Phase-Anteile mit dem Programm *CellQuest* ausgewertet.



**Abbildung 3.25: Analyse der S-Phasen im FACS nach P21-AS-Behandlung.** Nach transientscher Transfektion von NeuT48-Zellen mit P21-Sense (S), P21-Antisense (AS) oder Lipofectamine allein (LIP) wurden die Zellen 48 h +/- Dox inkubiert, fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und im FACS die Zellzyklusprofile untersucht. Die relative Zahl der Zellen in S-Phase sind durch die Säulen dargestellt, wobei die Zellen, die in Abwesenheit von Dox (dunkle Säulen) kultiviert wurden, als Standard für die Werte der korrespondierenden Dox-behandelten Zellen (helle Säulen) dienten.

Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, behielten die Zellen, deren P21-Expression durch P21-AS blockiert wurde, ihre Fähigkeit, den Zellzyklus kontinuierlich zu durchlaufen, wohingegen der Zellzyklusarrest in den Kontrolltransfektionen (P21-S und LIP) durch die Induktion von P21 infolge der Doxyzyklin-Gabe ausgelöst wurde. P21 ist demzufolge ein Schlüsselprotein, das durch onkogene *NeuT*-Aktivierung in MCF-7 Zellen zum Zellzyklusarrest und zur Anschaltung eines verfrühten Seneszenz-Programms führt.

### 3.1.3 Untersuchung differenzieller Genexpression der NeuT48-Zellen im *Microarray*

Wie schon in der Einleitung geschildert, greift die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 auf vielfältige Weise in das Signaltransduktionsnetzwerk der Zelle ein und ist an essenziellen Prozessen wie Proliferation, Angiogenese und Differenzierung beteiligt. Da die Überexpression von ERBB2 zur Tumorentstehung führen kann, ist es wichtig herauszufinden, welche Gene durch die verstärkte ERBB2-Expression differenziell reguliert werden und somit einen Beitrag zur Entartung der Zelle leisten. Die in dieser Arbeit hergestellten induzierbaren Zellen können für solche Studien optimal genutzt werden, da die entsprechenden differenziell

regulierten Gene in ein und derselben Zelllinie (in Anwesenheit und Abwesenheit von Doxyzyklin) untersucht werden können.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Sahin/Dr. Türeci (Hämatologie, Universität Mainz) und der Firma Memorec Biotec, Köln wurden deswegen zur Untersuchung von ERBB2-Effekten auf Zielgene Expressionsstudien auf einem cDNA-basierenden *Microarray* durchgeführt. Auf dem von Memorec Biotec hergestellten *Oncoimmunochip* sind 1152 humane Gene aufgebracht. Die ausgewählten Gene sind hauptsächlich Onkogene, Zytokine, Tumormarker, Stressgene und SEREX-Gene sowie Gene die eine Rolle bei der Zellzyklusregulation, Apoptose, DNA-Reparatur oder Signaltransduktion spielen.

Für die Hybridisierungen wurden zwei Induktionszeitpunkte ausgewählt, an denen das Expressionsprofil induzierter mit dem nicht-induzierter NeuT-Zellen verglichen werden sollte. Da im *Western Blot* die Proteinexpression von NeuT nach etwa 8 h detektierbar war und nach 48 h deutliche phänotypische Veränderungen an den Zellen zu beobachten waren, wurden diese beiden Zeitpunkte ausgewählt.

NeuT48-Zellen wurden 8 h und 48 h mit Doxyzyklin behandelt und im Anschluss RNA aus den induzierten und nicht-induzierten Zellen präpariert. 100 µg RNA jedes Ansatzes wurden an die Firma Memorec Biotec weitergeleitet, wo die RNAs für die Hybridisierung aufgearbeitet wurden. Dazu gehörte die Isolierung der mRNA und die Markierung mit fluoreszierenden Cy3- und Cy5-Farbstoffen. Die Hybridisierung erfolgte nach den Protokollen von Memorec Biotec. Bei der fluorimetrischen Auswertung konnten dann anhand der unterschiedlichen Farbintensitäten der einzelnen Spots Aussagen über die quantitative Erhöhung oder Verringerung der Expressionsstärke jedes Gens gemacht werden. Im Anhang (Tab. 7.2) sind tabellarisch die Ergebnisse der Hybridisierung zusammengefasst, wobei jeweils NeuT48 (-Dox)/ NeuT48 (8 h Dox) und NeuT48 (-Dox)/ NeuT48 (48 h Dox) miteinander verglichen wurden. In grün dargestellt sind die durch NeuT reprimierten Gene, die in rot aufgelisteten Gene wurden infolge der NeuT-Induktion überexprimiert. Nach Erfahrungswerten von Memorec Biotec wurden solche Gene als „überexprimiert“ bezeichnet, deren Induktion größer als Faktor 2 im Vergleich zur Kontrolle war, „reprimierte“ Gene waren halb so stark oder geringer exprimiert.

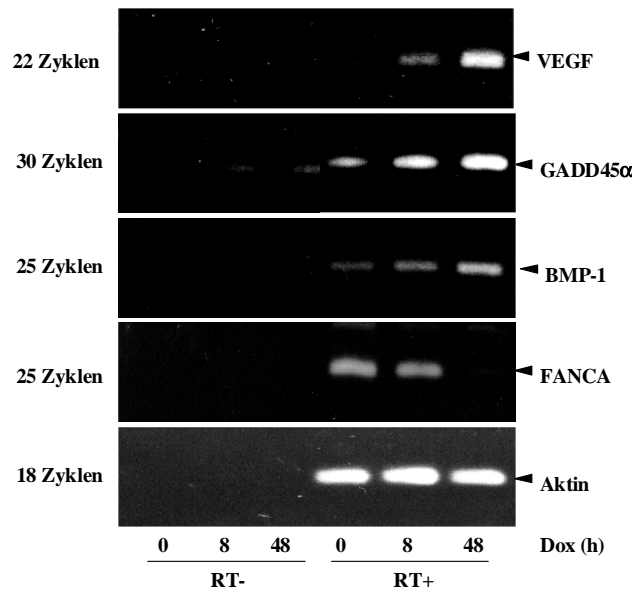
Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurden im Folgenden stichprobenartig Gene herausgesucht, deren Expressionsveränderungen in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin mittels semiquantitativer RT-PCRs überprüft werden sollten. Die hier abgebildete Tabelle 3.1 zeigt einige ausgewählte Gene und deren differenzielle Expression infolge der NeuT-Induktion.



**Tabelle 3.1: Differenzielle Genexpression nach NeuT-Induktion.** NeuT48-Zellen wurden 8 h und 48 h mit Doxyzyklin induziert, die RNA extrahiert und die differenzielle Genexpression im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen im *Microarray* von der Firma Memorec Biotec untersucht. Einige differenziell regulierte Gene sind hier exemplarisch dargestellt. Dabei wurde jeweils der induzierte (8 h Dox oder 48 h Dox) mit dem nicht-induzierten Zustand (ohne Dox) verglichen. Es bedeuten: schwarz=Gen nicht differenziell exprimiert, rot=Expression induziert, grün=Expression reprimiert.

Gen	8 h Dox	48 h Dox
VEGF C	1,71	2,84
GADD45 $\alpha$	1,05	2,15
BMP-1	3,15	4,04
FANCA	0,25	0,11

Zur Verifizierung der Daten aus dem *Microarray* wurden die in Tabelle 3.1 exemplarisch aufgeführten Gene in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten untersucht. Die Ergebnisse der PCRs von vier verschiedenen differenziell exprimierten Genen (*VEGF*, *GADD45 $\alpha$* , *BMP-1* und *FANCA*) sind in Abbildung 3.26 dargestellt.



**Abbildung 3.26: Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Verifizierung der *Microarray*-Ergebnisse.** Aus induzierten (8 h Dox und 48 h Dox) und nicht-induzierten (0 h Dox) NeuT48-Zellen wurde RNA extrahiert, revers transkribiert und in semiquantitativen PCRs die Expressionsstärke der Gene *VEGF*, *GADD45 $\alpha$* , *BMP-1* und *FANCA* (Oligonukleotide: *VEGF* F/R, *GADD45 $\alpha$*  F/R, *BMP-1* F/R, *FANCA* F/R und als Kontrolle hAktinA3/A5) untersucht. Die Anzahl der Amplifikationszyklen ist jeweils am linken Bildrand aufgeführt, das untersuchte Gen am rechten Bildrand. Als Negativkontrolle wurde bei der reversen Transkription jeweils ein Ansatz ohne reverse Transkriptase (RT-) mitgeführt.

Die Regulierbarkeit der Genexpression in Abhängigkeit der NeuT-Induktion konnte für alle hier dargestellten Gene übereinstimmend mit den Ergebnissen im *Microarray* gezeigt werden.

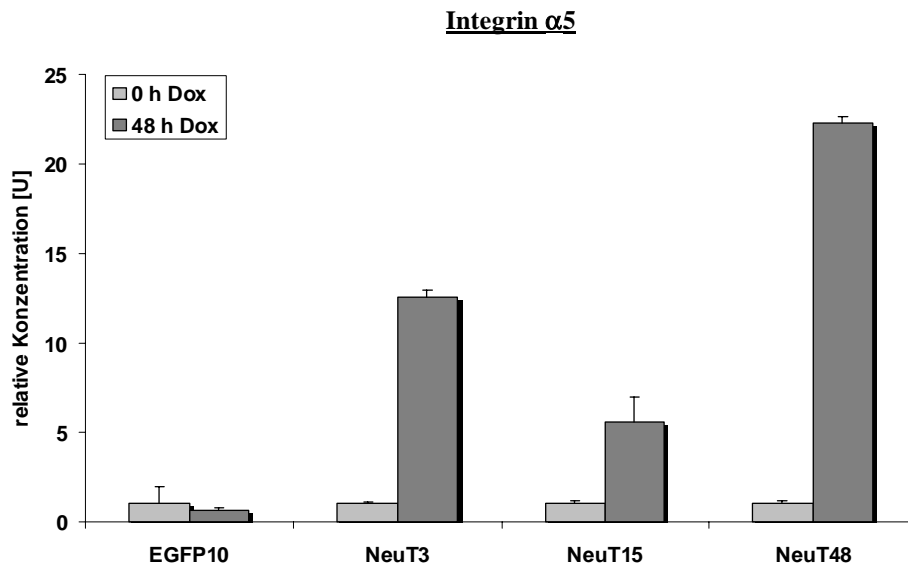
Da allerdings im Rahmen weiterer semiquantitativer RT-PCR-Experimente auch kleinere Abweichungen zu den *Microarray*-Daten gefunden wurden, empfiehlt es sich, die Induzierbarkeit aller differenziell exprimierten Gene, die weiter bearbeitet werden sollen, zunächst in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten zu überprüfen.

### 3.1.3.1 Erhöhte ERBB2-Expression induziert Integrin $\alpha 5$

Nachdem semiquantitative RT-PCRs einiger ausgewählter Gene die Ergebnisse des *Microarrays* bestätigen konnten, sollten im Folgenden für die Tumorentstehung potenziell relevante Gene aus dem *Array* hinsichtlich ihrer Expression und ihrer Funktionalität untersucht werden.

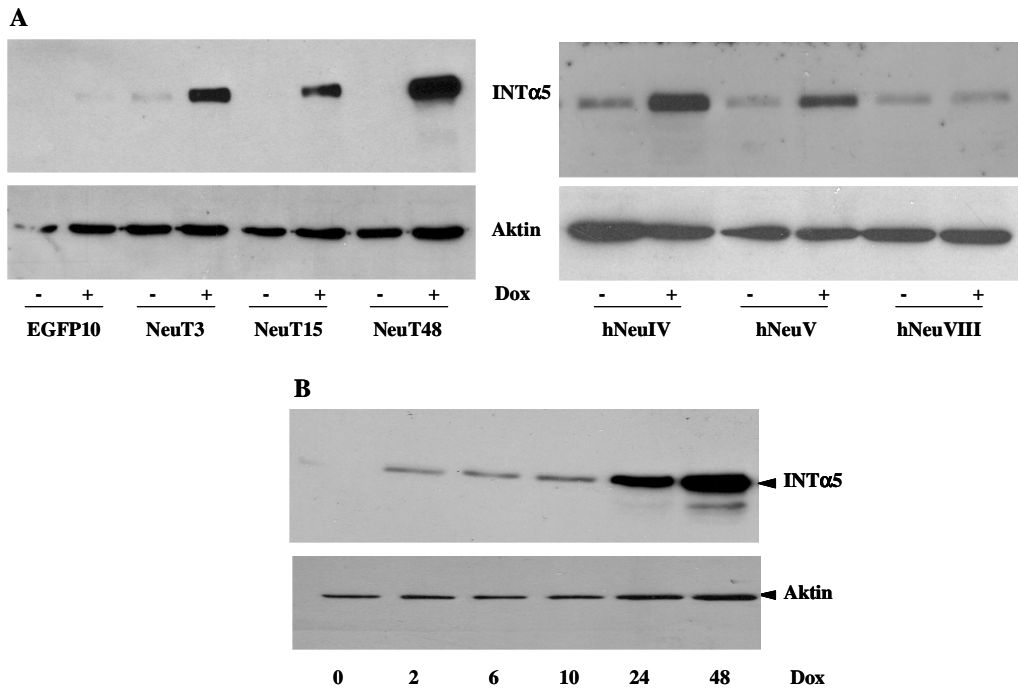
Ein sehr interessantes Gen, dessen Expression sowohl 8 h als auch 48 h nach Induktion von NeuT erhöht vorlag, ist *Integrin  $\alpha 5$* . Die Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, zusammengesetzt aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, deren Liganden Komponenten der extrazellulären Matrix sind. Als Adhäsionsmoleküle und Signaltransduktoren nehmen sie Einfluss auf die Proliferation, Migration und Invasion von Zellen. Die fundamentale Rolle verschiedener Integrine bei der Tumorinvasion und Metastasierung ist schon länger bekannt, ein Zusammenhang zwischen der Integrin  $\alpha 5$ -Expression und ERBB2 wurde allerdings noch nicht beschrieben. Integrin  $\alpha 5$  bildet zusammen mit Integrin  $\beta 1$  den Fibronektinrezeptor, der selektiv Fibronektin als Liganden in der extrazellulären Matrix bindet.

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst auch für *Integrin  $\alpha 5$*  die Ergebnisse aus dem *Microarray* mittels quantitativer *real-time* RT-PCR im *Light Cycler* verifiziert werden. Abbildung 3.27 zeigt die PCR-Ergebnisse für die *Integrin  $\alpha 5$* -Induktion auf revers transkribierten RNAs der NeuT-Klone und EGFP10 in An- und Abwesenheit von Doxzyklin.



**Abbildung 3.27: Quantitative *real time* RT-PCR der *Integrin  $\alpha 5$* -Induktion.** RNA aus induzierten (48 h Dox) und nicht-induzierten (0 h Dox) NeuT- und EGFP10-Zellen wurde für RT-PCRs verwendet. Die cDNAs wurden im *Light Cycler* auf ihre *Integrin  $\alpha 5$* -Expression (Oligonukleotide: INT $\alpha 5$  F/R) hin untersucht, wobei die *Integrin  $\alpha 5$* -Transkriptmengen ohne Dox als Standard genommen und die Induktion nach Dox-Stimulation anhand dieser berechnet wurde. Als interne Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen dienten quantitative RT-PCRs derselben Proben mit *PDH* (Oligonukleotide: PDH F/R).

In allen NeuT-Klonen führte die Induktion des Onkogens *NeuT* zur Erhöhung der *Integrin  $\alpha 5$* -Expression. Die Untersuchung der NeuT- und hNeu-Klone im *Western Blot* (Abb. 3.28 A) zeigte, dass auch auf Proteinebene eine starke Induktion von *Integrin  $\alpha 5$*  infolge der erhöhten ERBB2-Expression detektierbar war, wohingegen die *Integrin  $\alpha 5$* -Expression in der Kontrollzelllinie EGFP10 weitgehend unbeeinflusst blieb. Die unterschiedlich starke *Integrin  $\alpha 5$* -Induktion in den hNeu-Klonen demonstrierte anschaulich deren Abhängigkeit von der hNeu-Expressionsstärke.

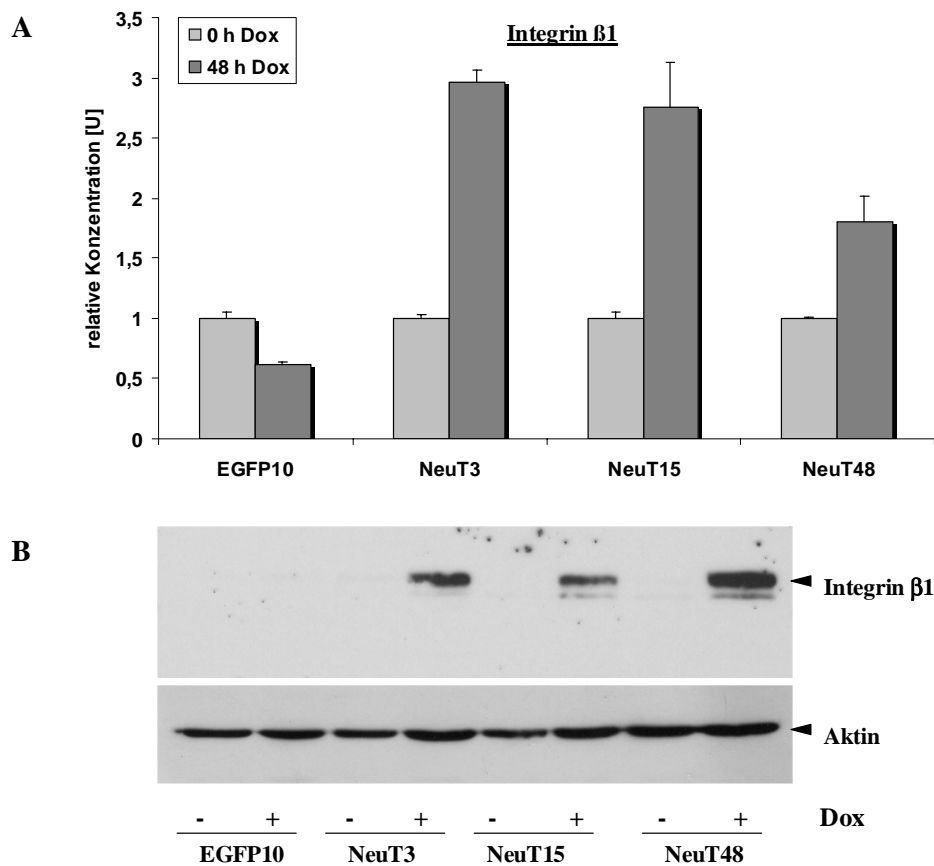


**Abbildung 3.28: Western Blot-Analyse der Integrin  $\alpha 5$ -Expression.** A 50  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt der NeuT-, hNeu-Klone und der Kontrollzelllinie EGFP10 wurden im *Western Blot* eingesetzt. Nur die Neu-Klone zeigen eine starke Expression von Integrin  $\alpha 5$  nach zweitägiger (NeuT) bzw. dreitägiger (hNeu) Induktion mit Dox. Als Kontrolle wurden beide *Western Blots* mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

**B** 50  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Dox-Induktion aus NeuT48-Zellen extrahiert und im *Western Blot* auf den Beginn der Integrin  $\alpha 5$ -Expression hin untersucht. Es zeigt sich, dass nach etwa 24 h die Integrin  $\alpha 5$ -Expression einsetzt.

Die Untersuchung der zeitlichen Induktion von Integrin  $\alpha 5$  im *Western Blot* (Abb. 3.28 B) ergab einen deutlichen Anstieg des Integrin  $\alpha 5$ -Proteingehaltes ab etwa 24 h nach Gabe von Doxyzyklin.

Da Integrin  $\alpha 5$  nur eine Untereinheit des Fibronektinrezeptors stellt, sollte auch die Auswirkung von NeuT auf die Expression der zweiten Untereinheit, Integrin  $\beta 1$ , untersucht werden. Den *Microarray*-Ergebnissen zu Folge wird auch Integrin  $\beta 1$  durch verstärkte NeuT-Signaltransduktion induziert (siehe Tab. 7.2 im Anhang). Zur Verifizierung dieser Daten wurde die Expressionsstärke von Integrin  $\beta 1$  in induzierten und nicht-induzierten NeuT-Zellen in quantitativen RT-PCRs und *Western Blots* ermittelt (Abb. 3.29).

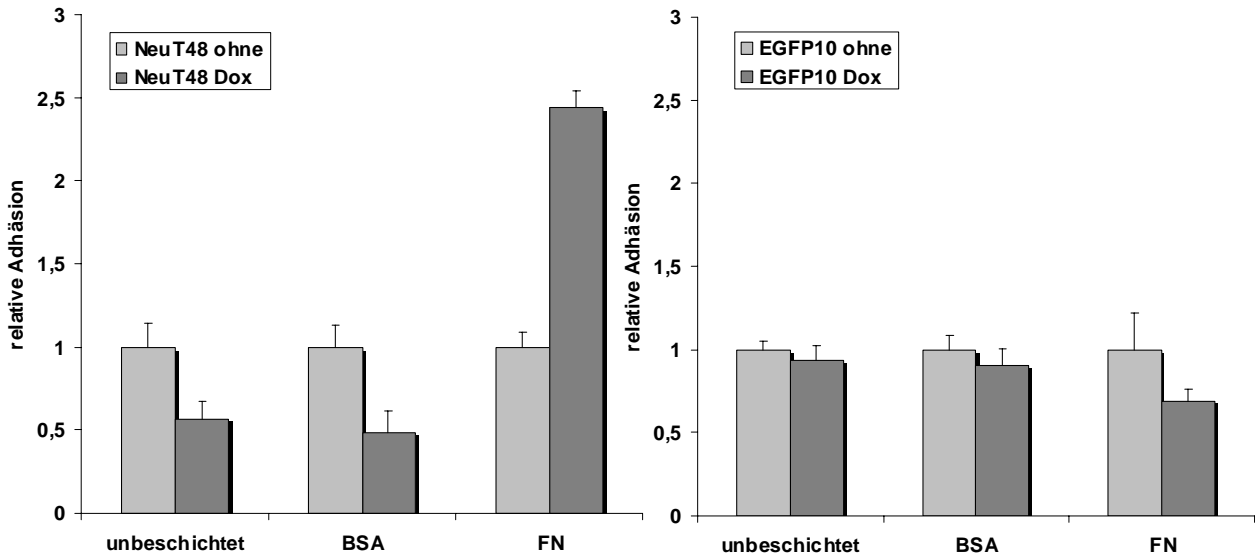


**Abbildung 3.29: A Quantitative real time RT-PCR der Integrin  $\beta 1$ -Induktion.** RNA aus induzierten (48 h Dox) und nicht-induzierten (0 h Dox) NeuT- und EGFP10-Zellen wurde isoliert und für RT-PCRs verwendet. Die cDNAs wurden im *Light Cycler* auf ihre Integrin  $\beta 1$ -Expression (Oligonukleotide: INT $\beta 1$  F/R) hin untersucht wobei die Integrin  $\beta 1$ -Transkriptmengen ohne Dox als Standard genommen und die Induktion nach Dox-Stimulation anhand dieser berechnet wurde. Als interne Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen dienten quantitative RT-PCRs derselben Proben mit *PDH* (Oligonukleotide: PDH F/R).

**B Western Blot-Analyse der Integrin  $\beta 1$ -Expression.** 100  $\mu$ g Proteinextrakte der NeuT-Klone und der Kontrollzelllinie EGFP10 wurden im *Western Blot* eingesetzt. Nur die NeuT-Klone zeigen eine starke Expression von Integrin  $\beta 1$  nach zweitägiger Induktion mit Dox. Als Kontrolle wurde der *Western Blot* mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

Die Funktionalität von Integrinen bzw. der aus alpha- und beta-Untereinheit bestehenden Rezeptoren kann durch die erhöhte Adhäsion von Zellen an Substrate des jeweiligen Rezeptors nachgewiesen werden. Wie schon erwähnt, kodieren Integrin  $\alpha 5$  und Integrin  $\beta 1$  für die beiden Untereinheiten des Fibronektinrezeptors, dessen Substrat Fibronektin ist. Um die Funktionalität des Fibronektinrezeptors in den induzierten NeuT48-Zellen zu überprüfen, wurde ein Adhäsionsassay etabliert, mit dem die Adhäsion nicht-induzierter, sowie induzierter NeuT- und Kontrollzellen an Fibronektin bestimmt wurde. Wie in Abbildung 3.30 deutlich zu erkennen ist, führte die erhöhte Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Expression im Adhäsionsassay zu einer starken Bindung der induzierten NeuT48-Zellen an das Fibronektin auf den

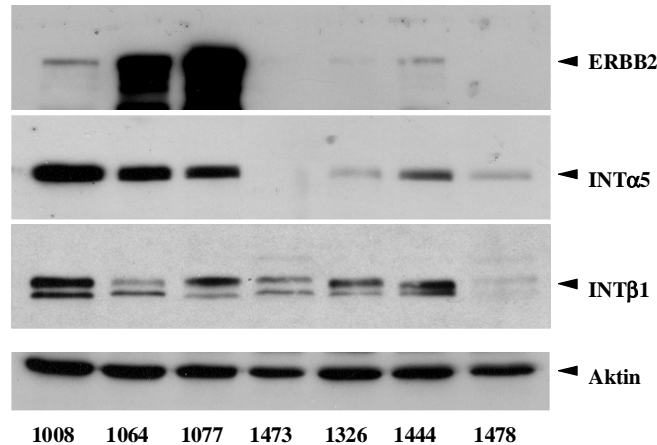
Zellkulturplatten. Diese verstärkte Adhäsion ist spezifisch für Fibronektin, da die Kontrollzellen (EGFP10 +/- Dox und nicht-induzierte NeuT48-Zellen) ein wesentlich schlechteres Adhäsionsverhalten aufwiesen.



**Abbildung 3.30: Adhäsionsassay zur Untersuchung der Funktionalität des Fibronektinrezeptors.**  $5 \times 10^4$  Zellen der Zelllinien NeuT48 und EGFP10 (jeweils -Dox bzw. 48 h +Dox) wurden 30 min in serumfreiem Medium auf beschichteten (BSA als Kontrolle oder Fibronektin) oder unbeschichteten 96-Loch-Platten inkubiert, fixiert und mit Metylenblau gefärbt. Die Messung der Farbintensitäten der auf den Platten verbliebenen Zellen erfolgte mit dem *MRX Microplate Reader* bei 630 nm. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten gemessen.

So konnte ein Zusammenhang zwischen der Induktion von NeuT und der Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -Expression hergestellt werden, der sich auf das Adhäsionsverhalten der Zellen an Fibronektin auswirkt und eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung in ERBB2-überexprimierenden Tumoren spielen könnte.

Für die Untersuchung einer potenziellen Korrelation zwischen der ERBB2- und Integrin  $\alpha 5 \beta 1$ -Expression in Tumorgewebe wurden uns freundlicherweise von der Frauenklinik der Universität Mainz Gewebe aus sieben Mammakarzinombiopsien zur Verfügung gestellt. In diesen wurde, nach Aufarbeitung der Proteine, in *Western Blot*-Experimenten die Expression von ERBB2, Integrin  $\alpha 5$  und Integrin  $\beta 1$  ermittelt (Abb. 3.31).



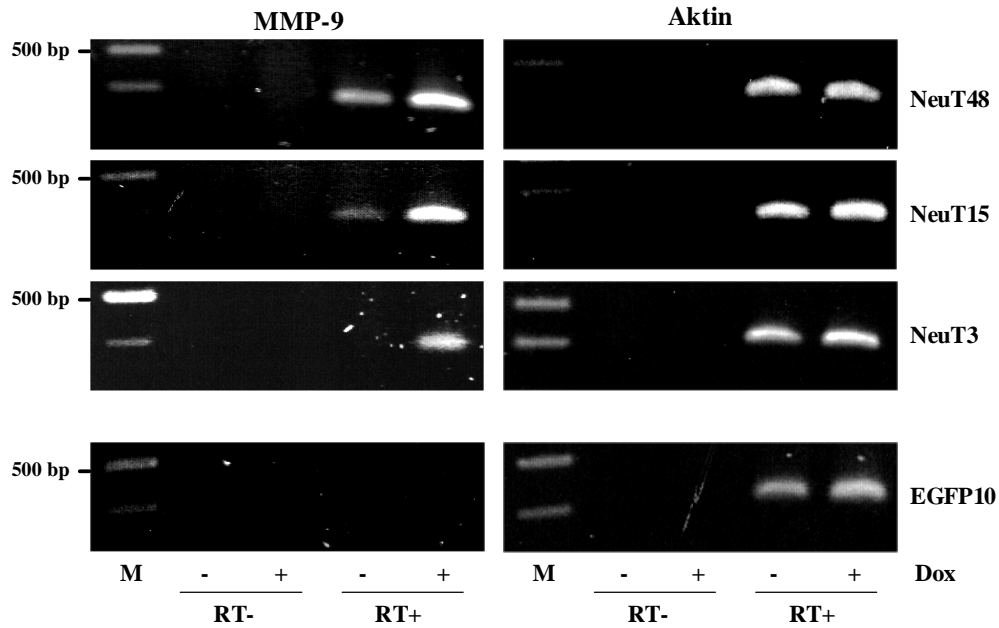
**Abbildung 3.31: Expression von ERBB2, Integrin  $\alpha$ 5 und Integrin  $\beta$ 1 in Mammakarzinomen.** Aus sieben Tumorbiopsien (1008, 1064, 1077, 1473, 1326, 1444 und 1478) wurden Proteine extrahiert und 100  $\mu$ g in *Western Blot*-Analysen auf die Expression von ERBB2, Integrin  $\alpha$ 5 und Integrin  $\beta$ 1 untersucht. Als Kontrolle gleichmäßiger Beladung wurde der *Western Blot* am Ende mit Aktin-spezifischen Antikörpern inkubiert.

Es zeigte sich, dass nur die ERBB2-exprimierenden Tumore eine signifikante Integrin  $\alpha$ 5-Expression aufwiesen, wohingegen Integrin  $\beta$ 1 in den meisten Tumoren ähnlich stark exprimiert war. Durch die geringe Anzahl der verwendeten Tumore ist jedoch noch keine allgemein gültige Aussage über eine Korrelation zwischen ERBB2 und Integrin  $\alpha$ 5 möglich, aber ein erster Hinweis auf die Induktion des Integrins infolge der ERBB2-Überexpression in Mammakarzinomen konnte aufgezeigt werden. Da die Expression von Integrin  $\alpha$ 5 nur bei ERBB2-Überexpression auftritt, die Expressionsstärke aber nicht mit der des ERBB2 korreliert, ist anzunehmen, dass weitere Faktoren die Expressionsstärke von Integrin  $\alpha$ 5 beeinflussen.

### 3.1.3.2 Induktion von Matrix-Metalloproteinasen durch NeuT

Ein weiteres interessantes Gen, das im *Microarray* nach 48 h stark induziert vorlag, ist *MMP-9*. *MMP-9*, oder auch Gelatinase B, gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen, die für den Abbau verschiedenster Substrate der extrazellulären Matrix verantwortlich sind. Neben ihrer Funktion bei der Umbildung von Geweben wird diesen Proteinen auch eine bedeutende Rolle bei der Tumordinvasion und Metastasierung zugeschrieben.

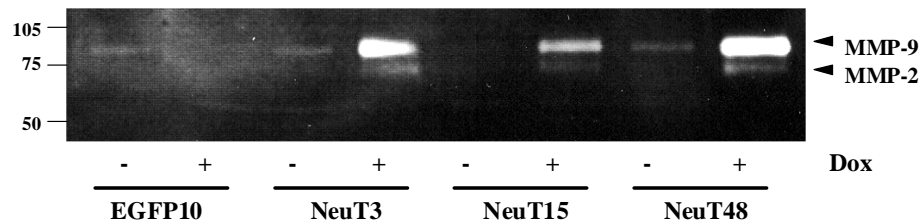
Zunächst wurde auch hier das Ergebnis des *Microarrays* mit semiquantitativen RT-PCRs auf den unterschiedlichen NeuT-Klonen und der Kontrollzelllinie EGFP10 verifiziert (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.32: Semiquantitative RT-PCR-Experimente zur Untersuchung differenzieller Expression von *MMP-9*.** 4 µg DNaseI-verdauter Gesamt-RNA aus unbehandelten und Dox-behandelten EGFP10- und NeuT-Zellen wurden mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und in semiquantitativen PCRs auf die Expression von *MMP-9* (Oligonukleotide: MMP-9 F/R, 30 Amplifikationszyklen) hin untersucht. Die Expression des Haushaltsgens *Aktin* (Oligonukleotide: hAktin A5/A3) wurde als Kontrolle zum Vergleich der eingesetzten cDNA-Mengen benutzt. In den Negativkontrollen der reversen Transkription (RT-) wurde keine Amplifikation beobachtet.

Nachdem die Induktion von *MMP-9* infolge der NeuT-Expression für alle NeuT-Klone gezeigt werden konnte, sollte der funktionelle Nachweis für dieses Protein durch einen Zymografie-Assay erbracht werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass *MMP-9* Gelatine abbauen kann. Zur Messung der enzymatischen Aktivität wurde 10 %igen Polyacrylamidgelen 1 mg/ml Gelatine beigemischt. Überstände, die von NeuT3-, NeuT15-, NeuT48- und EGFP10-Zellen abgenommen wurden, die zwei Tage +/- Doxyzyklin in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert worden waren, wurden in den Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und ÜN in einem speziellen Entwicklungspuffer, der den enzymatischen Abbau der Gelatine durch *MMP-9* unterstützt, bei 37°C inkubiert (siehe 2.2.17). Am folgenden Tag konnte dann mittels Coomassie-Färbung die *MMP-9*-Aktivität nachgewiesen werden: An den Stellen im Gel, an denen *MMP-9* aktiv war, konnte die Coomassie-Färbelösung wegen der fehlenden Gelatine keine Färbung hervorrufen.

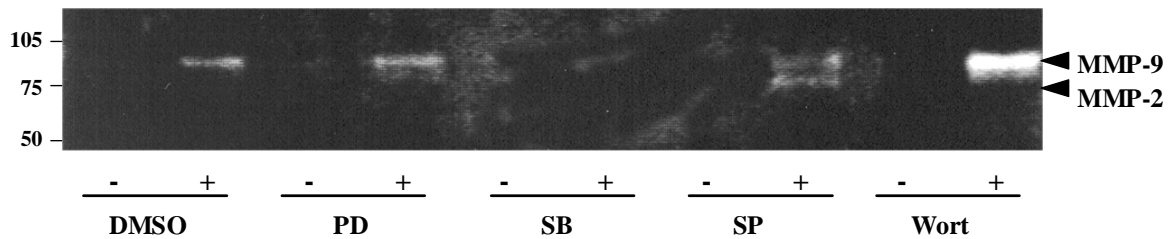




**Abbildung 3.33: Zymografie-Assay mit den NeuT-Klonen und EGFP10.** Alle Klone wurden 48 h +/- Dox in 8 ml serumfreiem DMEM-Medium in 10 cm Zellkulturschalen inkubiert. 20  $\mu$ l der jeweiligen Überstände wurden auf 10 %igen Polyacrylamidgelen mit Gelatine (1 mg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt und ÜN in Entwicklungspuffer bei 37°C inkubiert. Nach der Färbung mit Coomassie-Lösung sind nur die Stellen im Gel hell, an denen die Gelatine durch MMP-2 (Bande bei 75 kDa) oder MMP-9 (Bande bei 92 kDa) abgebaut wurde. Am linken Bildrand sind die Größen des Proteingewichtsstandards (in kDa) angegeben.

Der in Abbildung 3.33 dargestellte Zymografie-Assay zeigte für alle NeuT-Klone, wie aufgrund der *MMP-9*-Induktion in den RT-PCR-Experimenten erwartet, enzymatische Aktivität der Gelatinase B, wohingegen diese in den Überständen der Kontrollzellen EGFP10 nicht nachgewiesen werden konnte. Neben der Aktivität von MMP-9 (Gelatinase B) konnte auch der Abbau der Gelatine durch MMP-2 (Gelatinase A) im Zymografie-Assay detektiert werden. Diese manifestiert sich in einer zusätzlichen Bande bei 75 kDa, die bei MMP-2-Aktivität neben der 92 kDa-Bande der MMP-9 auftritt. Auch MMP-2-Aktivität konnte nur in den NeuT-Klonen nach Induktion mit Doxyzyklin nachgewiesen werden. Die Induzierbarkeit der MMP-2 nach Überexpression von ERBB2 wurde bereits 1995 von Giunciuglio *et al.* beschrieben und konnte hier als Nebenbefund gezeigt werden.

Die Induktion der Gelatinase MMP-9 in Brustkarzinomzellen konnte nach Gabe von Heregulin- $\beta$ 1, einem Liganden für ERBB2/ERBB3- und ERBB2/ERBB4-Heterodimere, der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden zugeordnet werden (Yao *et al.*, 2001). Die Blockade von P38 oder der Proteinkinase C (PKC) mit spezifischen Inhibitoren verhinderte die Aktivierung der MMP-9 vollständig, wohingegen die Inaktivierung von ERK nur partiell und die Blockade der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) dazu gar nicht in der Lage waren (Yao *et al.*, 2001). Die Abhängigkeit der MMP-9-Induktion von den verschiedenen Signaltransduktionswegen in den NeuT-Zellen sollte in einem weiteren Zymografie-Assay, dem die Inkubation der Zellen mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren vorausgegangen war, untersucht werden. NeuT48-Zellen wurden dazu zwei Tage in serumfreiem Medium in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin und den Inhibitoren für ERK, P38, JNK und PI3K inkubiert, die Überstände im Anschluss daran auf gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die MMPs detektiert (Abb. 3.34).

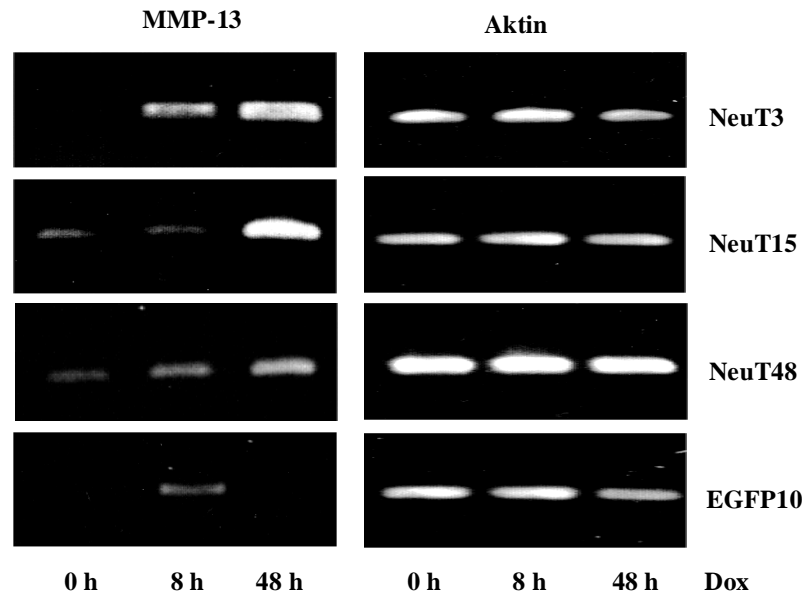


**Abbildung 3.34: Zymografie-Assay mit verschiedenen Kinaseinhibitoren.** NeuT48-Zellen wurden 48 h +/- Dox und den Inhibitoren PD098059 (50  $\mu$ M, blockiert ERK), SB203580 (20  $\mu$ M, blockiert P38), Wortmannin (15  $\mu$ M, blockiert PI3K), SP60025 (10  $\mu$ M, blockiert JNK) bzw. DMSO als Kontrolle in 8 ml serumfreiem DMEM-Medium in 10 cm Zellkulturschalen inkubiert. 20  $\mu$ l der jeweiligen Überstände wurden auf 10 %igen Polyacrylamidgelen mit Gelatine (1 mg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt und ÜN in Entwicklungspuffer bei 37°C inkubiert. Nach der Färbung mit Coomassie-Lösung sind nur die Stellen im Gel hell, an denen die Gelatine durch MMP-2 (Bande bei 75 kDa) oder MMP-9 (Bande bei 92 kDa) abgebaut wurde. Am linken Bildrand sind die Größen des Proteingewichtsstandards (in kDa) angegeben.

Die Induktion von MMP-9 infolge der NeuT-Expression konnte nur mit dem P38-Inhibitor SB203580 vollständig blockiert werden. Alle anderen Inhibitoren zeigten keinen oder im Falle des PI3K-Inhibitors Wortmannin sogar einen gegenläufigen Effekt auf die MMP-9-Aktivität. Untersuchungen mit dem PKC-Inhibitor RO-318220 konnten leider nicht ausgewertet werden, da die Zellen bei gleichzeitiger Gabe des Inhibitors mit Doxyzyklin abstarben.

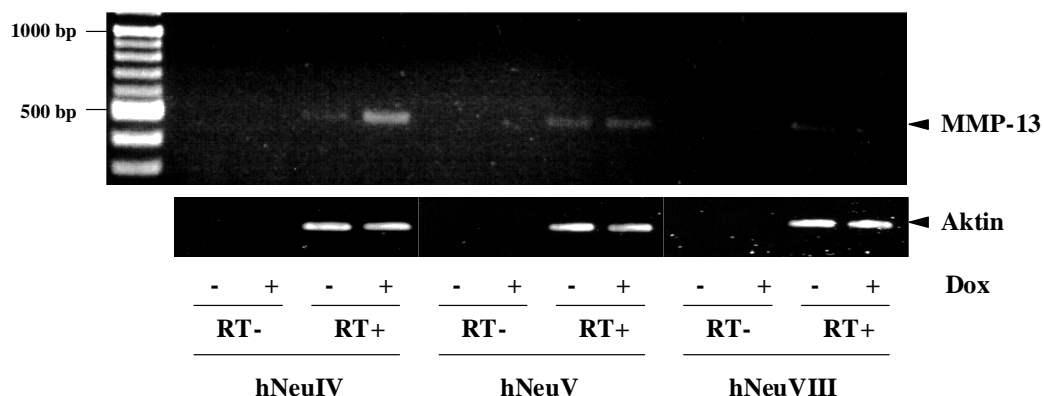
Bei der Literaturrecherche im Rahmen der Matrix-Metalloproteinasen zeigte sich, dass diesen eine immer bedeutendere Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren, aber auch bei der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden zuteil wird.

Ein weiteres, sehr interessantes Protein aus dieser Familie ist die Collagenase 3 (MMP-13), die bei differenziellen Expressionsuntersuchungen in Mammakarzinomgewebe entdeckt wurde (Freije *et al.*, 1994). Erstaunlicherweise wurde die MMP-13 aufgrund ihrer Relevanz bei der Knochenentwicklung und der Beteiligung an verschiedenen Knochen- und Knorpelerkrankungen zunächst kaum in Verbindung mit Tumorgenese und Metastasierung untersucht. Erst in letzter Zeit mehren sich Publikationen, die MMP-13 in verschiedenen Tumoren, wie Chondrosarkomen, Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich sowie Magenkarzinomen überexprimiert gefunden haben (Uria *et al.*, 1998; Airola *et al.*, 1997; Elnemr *et al.*, 2003). Eine detaillierte Untersuchung von Mammakarzinomen und insbesondere ein Zusammenhang mit ERBB2 wurden aber bisher nicht veröffentlicht. Aus diesem Grund lag es nahe, die *MMP-13*-Expression in den im Rahmen dieser Arbeit generierten Zelllinien zu untersuchen. Die verschiedenen NeuT-Klone und die Kontrollzelllinie EGFP10 wurden hierfür in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten auf ihre jeweilige *MMP-13*-Expression untersucht (Abb. 3.35).



**Abbildung 3.35: Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *MMP-13*-Expression.** NeuT3-, NeuT15-, NeuT48- und EGFP10-Zellen wurden 8 h, 48 h mit und zur Kontrolle ohne (0 h) Dox inkubiert und 4 µg der extrahierten RNA revers transkribiert. PCRs auf den cDNAs der verschiedenen Klone wurden für *MMP-13* (Oligonukleotide: MMP-13 F/R, 35 Amplifikationszyklen) und als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen mit *Aktin* (Oligonukleotide: hAktinA3/A5, 18 Amplifikationszyklen) durchgeführt. Die Negativkontrollen der reversen Transkription ohne reverse Transkriptase wiesen keine Produkte auf und sind hier nicht abgebildet.

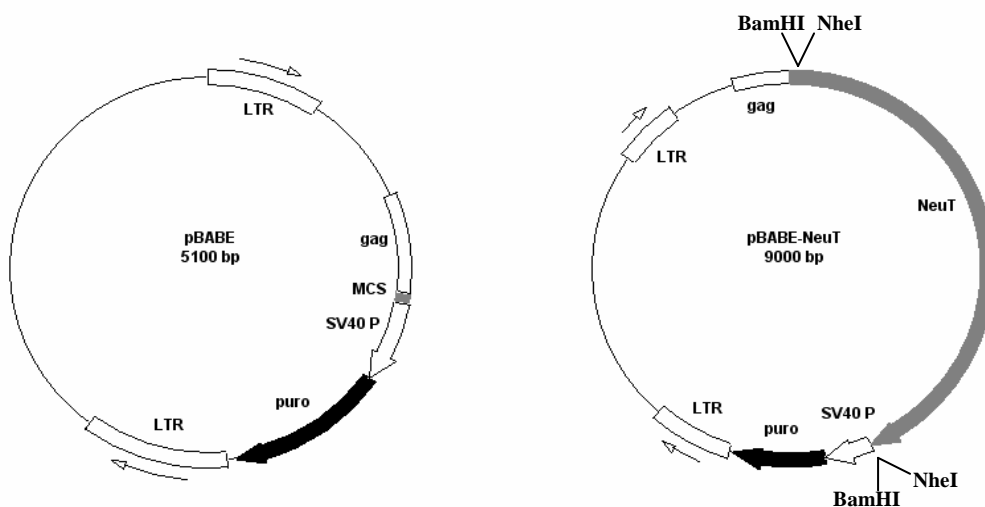
Interessanterweise zeigte sich für alle NeuT-Klone eine eindeutige Induktion von *MMP-13*, wohingegen der Kontrollklon EGFP10 nur transient eine schwache Bande nach achtstündiger Inkubation mit Doxyzyklin aufwies, die nach längerer Inkubation mit dem Antibiotikum aber wieder verschwand. Um diesen Befund zu stärken und eine NeuT-spezifische Induktion auszuschließen, wurden auch mit den induzierten und nicht-induzierten hNeu-Klonen semiquantitative RT-PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 3.36).



**Abbildung 3.36: Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der *MMP-13*-Expression.** hNeuIV-, hNeuV- und hNeuVIII-Zellen wurden 72 h +/- Dox inkubiert und 4 µg der extrahierten RNA revers transkribiert. PCRs auf den cDNAs der verschiedenen Klone wurden für *MMP-13* (Oligonukleotide: MMP-13 F/R, 35 Amplifikationszyklen) und als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen für *Aktin* (Oligonukleotide: hAktinA3/A5, 18 Amplifikationszyklen) durchgeführt. Die Negativkontrollen der reversen Transkription ohne reverse Transkriptase (RT-) weisen keine Produkte auf. Am linken Bildrand sind die Größen des 100 bp-Markers angegeben.

Auch in Zellen, die die humane Form von ERBB2 überexprimieren, zeigte sich eine Induktion von *MMP-13*. Allerdings schien diese von der Intensität der ERBB2-Expression abhängig zu sein, weil nur im am stärksten ERBB2-exprimierenden Klon hNeuIV die *MMP-13*-Expression induziert wurde.

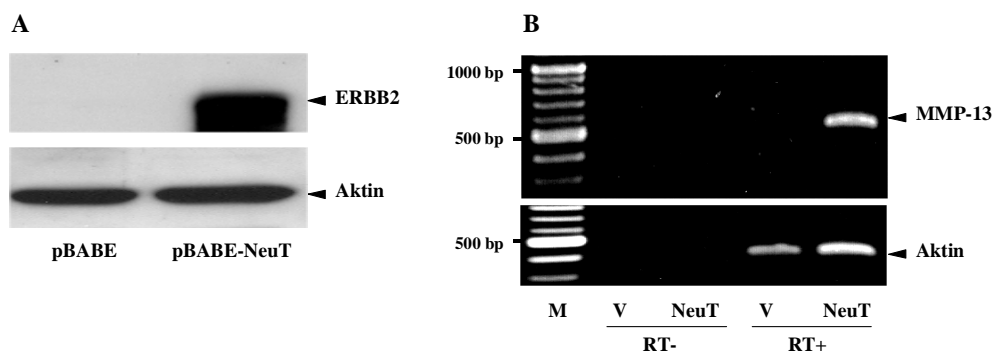
Da in der Literatur keine Hinweise auf die Regulation von MMP-13 durch ERBB2 gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob diese Beobachtung sich auf MCF-7-Zellen beschränkt, oder ob auch andere Zelllinien in dieser Form auf die Überexpression von ERBB2 reagieren. Zur Beantwortung dieser Frage sollte NeuT in NIH3T3 Fibroblasten überexprimiert und die *MMP-13*-Expression untersucht werden. Da die Etablierung konditionaler Zelllinien mit dem Tet-System sehr aufwendig ist, wurden hier konstitutiv NeuT-exprimierende Zellen durch Infektionen hergestellt. Morgenstern und Land haben 1990 pBABE-Vektoren mit retroviralen Elementen auf der Basis des Moloney murinen Leukämie Virus (MMLV) entwickelt, die solche Infektionen ermöglichen (pBABE-Vektoren, Abb. 3.37). In die mit Nukleotiden aufgefüllte *Bam*HI-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsregion eines solchen pBABE-Vektors wurde die *NeuT*-cDNA nach Ausschneiden aus dem pINSpBI-EGFP/NeuT über die *Nhe*I-Schnittstellen (auch diese wurden mit Nukleotiden aufgefüllt) eingefügt (Abb. 3.37).



**Abbildung 3.37: Herstellung des Expressionsplasmids pBABE-NeuT.** *NeuT* wurde mit der Restriktionsendonuklease *NheI* aus dem Plasmid pINSpBI-EGFP/NeuT ausgeschnitten, die Enden mit Nukleotiden aufgefüllt und in die ebenfalls aufgefüllten Enden der *Bam*HI-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pBABE ligiert. Es bedeuten: MCS= multiple Klonierungsstelle, gag=gruppenspezifisches Antigen des MMLV, P=Promotor des *SV40*-Gens, puro=Puromycinresistenzgen, LTR=long terminal repeats des MMLV, von denen aus die Expression des inserierten Gens (hier *NeuT*) reguliert wird.

Das fertige Plasmid wurde zur Überprüfung der Klonierung mit den entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert (NeuCMV R/Neurat F). Daraufhin wurde das Konstrukt

pBABE-NeuT mittels Kalziumphosphatpräzipitation in die Verpackungszelllinie BOSC-23 transfiziert, in der die transkribierte RNA in infektiöse, replikationsinkompetente Partikel verpackt wird. Diese viralen Partikel können mit den Zellüberständen abgenommen und für die Infektion der NIH3T3 Zellen verwendet werden. Neben Partikeln mit pBABE-NeuT-Konstrukt wurden zur Kontrolle auch solche, die das Leerplasmid pBABE enthalten, für die Infektionen eingesetzt. Die Generierung der Viruspartikel und die Infektion der NIH3T3 Zellen wurde freundlicherweise von Dr. Lausch (AG Zabel, Universität Mainz) durchgeführt. Am Ende der Puromycinselektion, nach der alle nicht mit pBABE-NeuT bzw. pBABE infizierten Zellen abgestorben waren, wurden die Zellen der jeweiligen Ansätze vereint und sowohl RNA für semiquantitative RT-PCR-Experimente, als auch Proteine zur Analyse im *Western Blot* aus den Zellen extrahiert. *Western Blot*-Analysen (Abb. 3.38 A) zeigten, dass NeuT in den mit pBABE-NeuT infizierten NIH3T3 Zellen stark exprimiert wird. Nachdem die konstitutive Expression von NeuT nachgewiesen werden konnte, wurde die Induktion von *MMP-13* in diesen Zellen mit Hilfe von RT-PCR-Experimenten untersucht (Abb. 3.38 B).



**Abbildung 3.38: A Western Blot-Analyse der NeuT-Expression in NIH3T3 Zellen.** NIH3T3 Zellen wurden mit pBABE-NeuT oder als Kontrolle mit dem leeren Plasmid pBABE infiziert, mit Puromycin selektioniert und Proteine aus den vereinten Zellen gewonnen. 50 µg Proteinextrakt wurden auf 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, geblottet und auf ihre ERBB2-Expression hin untersucht. Als Kontrolle gleichmäßiger Beladung wurde dieselbe Membran zusätzlich mit Aktin-Antikörpern inkubiert.

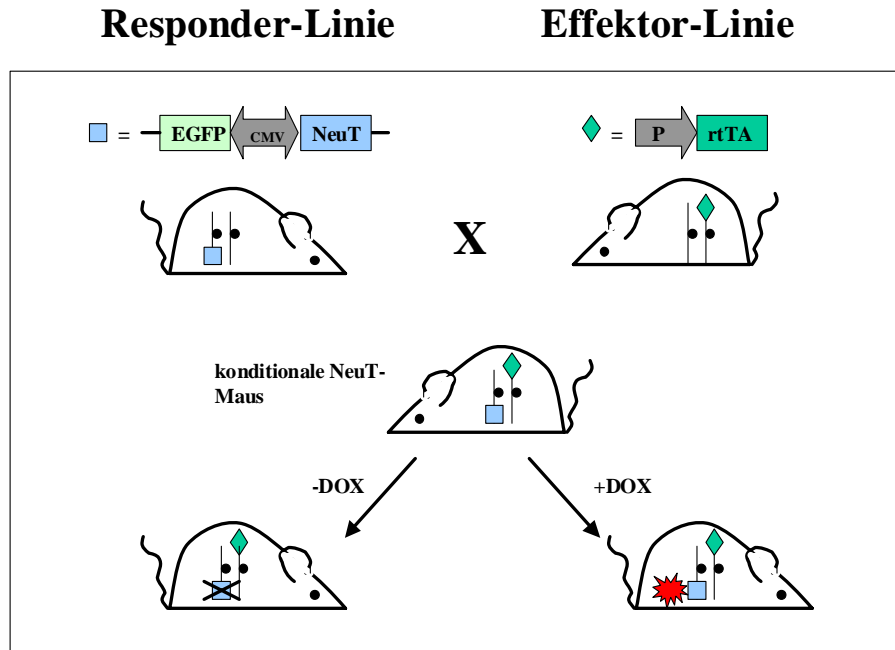
**B Semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der MMP-13-Expression.** Von der aus NIH3T3-pBABE (V) und NIH3T3-pBABE-NeuT (NeuT) isolierten RNA wurden 4 µg revers transkribiert (RT+) und mittels PCR (Oligonukleotide: MMP-13 Maus F/R, 35 Amplifikationszyklen) auf *MMP-13*-Expression untersucht. Als Negativkontrollen dienten jeweils Ansätze ohne reverse Transkriptase (RT-). Zum Beweis gleichmäßig eingesetzter cDNA-Mengen wurden PCRs mit Aktin-Oligonukleotiden (MusAktin A5/A3, 18 Amplifikationszyklen) durchgeführt.

Die Collagenase MMP-13 wurde durch die Überexpression von NeuT auch in NIH3T3 Zellen stark induziert. Somit konnte gezeigt werden, dass NeuT auch in anderen Zellen und sogar einer anderen Spezies die Expression von *MMP-13* induziert und vielleicht tatsächlich ein weiterer wichtiger Baustein in der ERBB2-vermittelten Tumorgenese ist.

### 3.2 Herstellung transgener *Responder*-Mäuse

Die Generierung transgener Mäuse, deren Genexpression steuerbar ist, spielen in der Krebsforschung eine immer bedeutendere Rolle. So können beispielsweise die Mechanismen untersucht werden, über die Onkogene Entstehung, Proliferation und Metastasierung von Tumoren verursachen. Das Tet-System liefert hierbei unter zwei Gesichtspunkten einen wertvollen Beitrag. Zum einen können definierte Zeitpunkte gewählt werden, an denen das entsprechende Gen angeschaltet wird. Auf diese Weise können insbesondere die ersten Schritte der Tumorentstehung und die unterschiedlichen Mechanismen, durch die diese gesteuert wird, untersucht werden. Zum anderen besteht durch das gezielte Abschalten der Genexpression die Möglichkeit, Informationen über den Zeitpunkt, an dem noch eine Tumorregression oder das Verhindern von Metastasen möglich sein könnte, zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des Tet-Systems eine *NeuT-Responder*-Linie für ein konditionales Tiermodell der ERBB2-induzierten Tumorgenese generiert werden. Die Möglichkeit, dabei das Onkogen *NeuT* unter Kontrolle des CMV-TetO-Promotors in ein *Responder*-Tier und den Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator rtTA bzw. tTA unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors in ein Effektor-Tier einzubringen, eröffnet die Gelegenheit, die NeuT-induzierte Tumorentstehung gezielt in unterschiedlichen Organen zu untersuchen. Da in den letzten Jahren diverse Effektor-Tiere, die den Transaktivator (rtTA oder tTA) spezifisch in den verschiedensten Organen exprimieren, veröffentlicht und der Allgemeinheit zugänglich gemacht wurden, sollte nun eine *NeuT-Responder*-Maus generiert werden, die durch Paarung mit solchen Effektor-Tieren ein geeignetes Tiermodell für die ERBB2-induzierte Karzinogenese in den relevanten Geweben hervorbringt. In Abbildung 3.39 ist schematisch der Ablauf zur Herstellung eines solchen Tiermodells dargestellt.



**Abbildung 3.39: Konditionales Tiermodell für die NeuT-induzierte Karzinogenese.** Effektor-Mäuse, die den rtTA aufgrund eines gewebespezifischen Promotors in für die ERBB2-Tumorgenese relevanten Geweben exprimieren, sollen mit den im Rahmen dieser Arbeit herzustellenden NeuT-Responder-Mäusen gepaart werden. Die Administration von Doxyzyklin an die transgenen Nachkommen soll zur Expression von NeuT und schließlich zur Bildung von Tumoren in den entsprechenden Geweben führen. EGFP=*enhanced green fluorescent protein*, CMV=bidirektionaler Cytomegalieviruspromotor-TetO, P=gewebespezifischer Promotor, rtTA=reverser Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator.

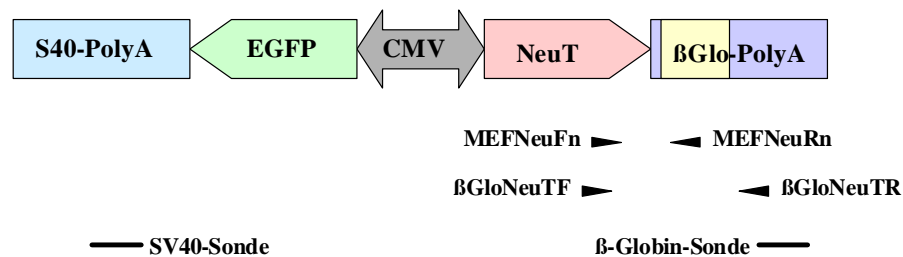
### 3.2.1 Herstellung transgener Mäuse mit Dox-induzierbarer NeuT-Expression

Nachdem das Plasmid pINSpBI-EGFP/NeuT mittels Restriktionsenzymverdau-Analysen und Sequenzierungen verifiziert und in Zellkulturexperimenten die Funktionalität des Konstruktes gezeigt werden konnte, sollten für die *in vivo*-Analyse der NeuT-induzierten Onkogenese transgene NeuT-Responder-Mäuse generiert werden. Dazu wurden 150 µg des NeuT-Konstruktes mit dem Restriktionsenzym *ApaI* linearisiert und über Gelextraktion und Fällung der DNA aufgereinigt. Die lineare Form des Plasmides ist wichtig für die Generierung der transgenen Mäuse, da so ein Aufbrechen des NeuT-Konstruktes an einer ungünstigen Stelle bei der Integration in das Mausgenom umgangen werden kann. Die transgenen *Founder*-Linien entstanden durch Mikroinjektion in Mauszygoten. Die Injektion in Zygoten bietet den Vorteil, dass nach Fusion von Spermium und Eizelle Veränderungen an der Oozytenmembran ablaufen, die das Eindringen weiterer Spermien verhindern, aber die Elastizität der Eizellmembran herabsetzen und somit die Injektion erleichtern. Die Injektion erfolgt unter dem Mikroskop mit Hilfe von hauchdünnen Glaskapillaren in den paternalen Vorkern der Mauszygote, die durch Ansaugen mit einer Haltekapillare fixiert wird. In der Regel wird die DNA in den männlichen Pronukleus injiziert, da dieser sich früher bildet,

größer als der weibliche ist und zudem an einer günstigeren Position innerhalb der Zygote liegt. Die transgenen Zygoten werden in pseudoschwangere Ammenweibchen implantiert, die dann die potenziell transgenen Tiere austragen.

Die Injektion der DNA, sowie die Bereitstellung pseudoschwangerer Ammenweibchen und der Transfer der injizierten Zygoten wurde freundlicherweise von Dr. Leonid Eshkind und Frau Swetlana Ohngemach aus der Arbeitsgruppe von Dr. Ernesto Bockamp (Institut für Toxikologie, Universität Mainz) durchgeführt.

Bevor mit der Beschreibung der Identifizierung und Charakterisierung transgener *Responder*-Mäuse begonnen wird, gibt Abbildung 3.40 zunächst einen Überblick über das Konstrukt und die Lage der verwendeten Oligonukleotidpaare bzw. der Sonden, die zur Analyse der Mäuse verwendet wurden. Dabei gilt zu beachten, dass durch die Bindung des *Primers* MEFNeuRn im Intron der  $\beta$ -Globin-PolyA-Kassette ein Einsatz des Oligonukleotidpaares MEFNeuFn/Rn nur für Untersuchungen auf DNA-Ebene möglich ist.



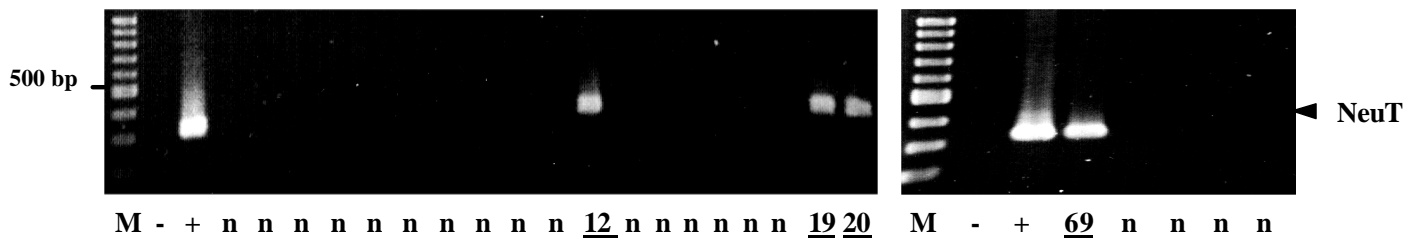
**Abbildung 3.40: Responder-Konstrukt mit Lage der zur Analyse verwendeten Oligonukleotide und Sonden.** Das *Primer*-Paar MEFNeuFn/Rn diente der Identifizierung transgener Mäuse auf DNA-Ebene, wohingegen die *Primer*  $\beta$ GloNeuT F/R für Expressionsanalysen in RT-PCR-Experimenten eingesetzt wurden. Die  $\beta$ -Globin-PolyA- und die SV40-PolyA-Sonde wurden radioaktiv markiert zur Detektion transgener Tiere im *Southern* und *Dot Blot* eingesetzt. Der gelbe Bereich im  $\beta$ -Globin-PolyA stellt die Lage des Introns dar.

### 3.2.2 Identifizierung transgener *Founder*-Tiere

Durch die Pronukleusinjektionen mit dem linearisierten Plasmid pINSpBI-EGFP/NeuT wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Bockamp 36 putative *Founder*-Tiere generiert. Von diesen Tieren wurden Schwanzbiopsien entnommen, daraus DNA extrahiert und diese mit Hilfe einer *NeuT*-spezifischen PCR auf die Integration des Plasmides überprüft. Aufgrund der großen Homologie zwischen dem *Neu*-Gen der Maus und dem *NeuT*-Gen der Ratte wurden die Oligonukleotide für die PCR so gewählt, dass der 5'-*Primer* (MEFNeuFn) im 3'-Bereich des *NeuT*-Gens liegt wohingegen der 3'-*Primer* (MEFNeuRn) im 5'-Bereich der  $\beta$ -Globin-PolyA-Kassette im Konstrukt bindet (siehe Abb. 3.40). Auf diese Weise kann die Amplifikation des endogenen *Neu*-Gens der Maus umgangen werden. Die in Abbildung 3.41

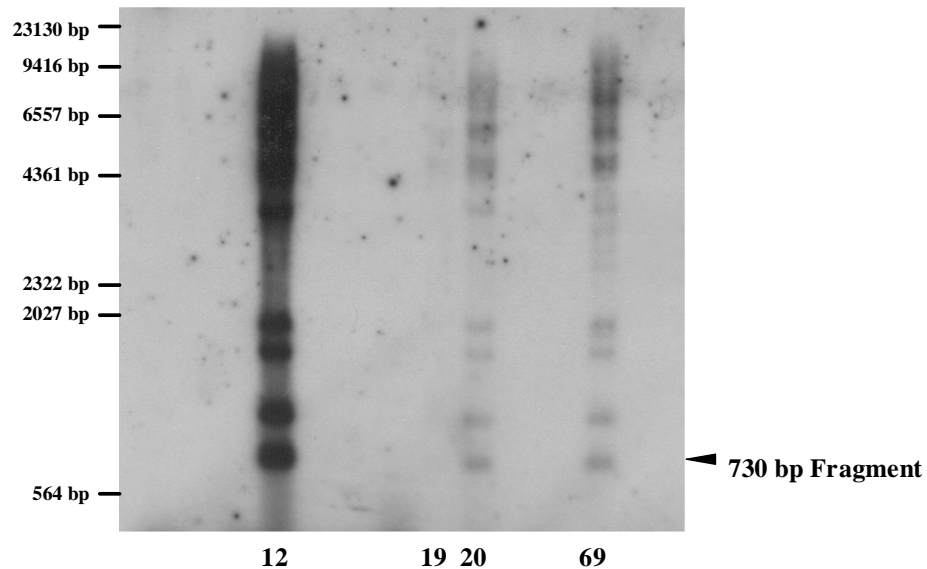


dargestellten PCRs zeigen exemplarisch die Ergebnisse von DNA-Analysen mit den *NeuT*-spezifischen Oligonukleotiden.



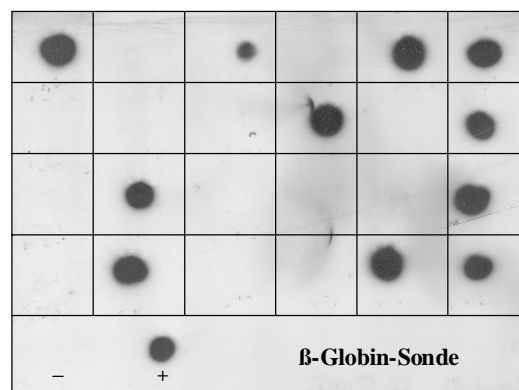
**Abbildung 3.41: PCR zur Identifizierung transgener *Founder*-Tiere.** Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, die bei einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide MEFNeuFn/Rn) auf DNA-Extrakten potenzieller *Founder*-Tiere entstanden sind. Es wurden verschiedene Tiere untersucht, wobei negative Tiere mit „n“ bezeichnet und transgene Tiere durch Unterstreichen hervorgehoben sind. Pfeile indizieren das PCR-Produkt richtiger Größe. Als PCR-Kontrollen wurde anstelle der Maus-DNA H<sub>2</sub>O (-) oder Plasmid-DNA (+) eingesetzt. Größenstandard (M) ist der 100 bp-Marker.

Aus den PCR-Analysen gingen vier potenziell transgene *Founder*-Tiere für *Responder*-Linien hervor, die im Folgenden INS12, INS19, INS20 und INS69 genannt werden. Zur weiteren Verifizierung der Tiere wurden *Southern Blot*-Analysen mit einer radioaktiv markierten Sonde (generiert mit den Oligonukleotiden SV40pA F/SV40pA R), die spezifisch an die SV40-PolyA-Kassette des Konstruktes binden, durchgeführt. Die DNA der Tiere wurde hierfür mit dem Enzym *Xba*I so restringiert, dass im *Southern Blot* ein Produkt spezifischer Größe (730 bp) zu sehen war. Wie Abbildung 3.42 zeigt, konnten die vier in der PCR positiven Tiere auch im *Southern Blot* als Träger des *NeuT*-Transgens nachgewiesen werden. Bei den positiven Signalen, die neben dem erwarteten Produkt von 730 bp auftauchten, handelt es sich vermutlich um partiell verdaute DNA.



**Abbildung 3.42: Southern Blot putativ transgener Founder-Tiere.** 15 µg der extrahierten DNA wurden mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* enzymatisch verdaut und die Fragmente über ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde das Transgen mit einer SV40PolyA-spezifischen, radioaktiv-markierten Sonde nachgewiesen (schwarzer Pfeil am rechten Bildrand). Die einzelnen Spuren zeigen verschiedene potenziell transgene Tiere, wobei nur die tatsächlich transgenen Founder-Tiere (12, 19, 20 und 69) hervorgehoben sind. Als Größenstandard (M) wurde  $\lambda$ HindIII Marker verwendet.

Die Etablierung der transgenen Linien INS12, INS19, INS20 und INS69 erfolgte durch Paarung der *Founder*-Tiere mit FVB/N und C57BL/6 Wildtyptieren deren Filialgenerationen auf den Erhalt des Transgens untersucht wurden. Die Verifizierung transgener Tiere erfolgte durch PCR (Oligonukleotide MEFNeuFn/Rn) und mit Hilfe von *Dot Blots* (siehe 2.2.6.2). Als Sonden für die Hybridisierung der *Dot Blots* dienten die auch für die *Southern Blots* verwendeten SV40-PolyA- und  $\beta$ -Globin-PolyA-Sonden. Abbildung 3.43 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines *Dot Blots* zum Nachweis transgener Nachkommen der *Founder*-Tiere.



**Abbildung 3.43: Dot Blot zur Identifizierung transgener Nachkommen.** Beispielhafte Darstellung eines Autoradiogramms, für das aufgetropfte DNA (5-10 µg DNA je Tier) mit einer  $\beta$ -Globin-spezifischen, radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert wurde. Als Kontrollen wurden anstelle der extrahierten DNA H<sub>2</sub>O (-) oder Plasmid-DNA (+) eingesetzt.

Nachdem für alle vier Linien die Weitergabe des Transgens an die Filialgenerationen gezeigt werden konnte und genügend transgene Nachkommen zum Erhalt der Linien gezüchtet worden waren, konnte im Folgenden mit der Analyse der Tiere begonnen werden.

### **3.2.3 Charakterisierung transgener Tiere hinsichtlich der Induzierbarkeit des *NeuT*-Transgens**

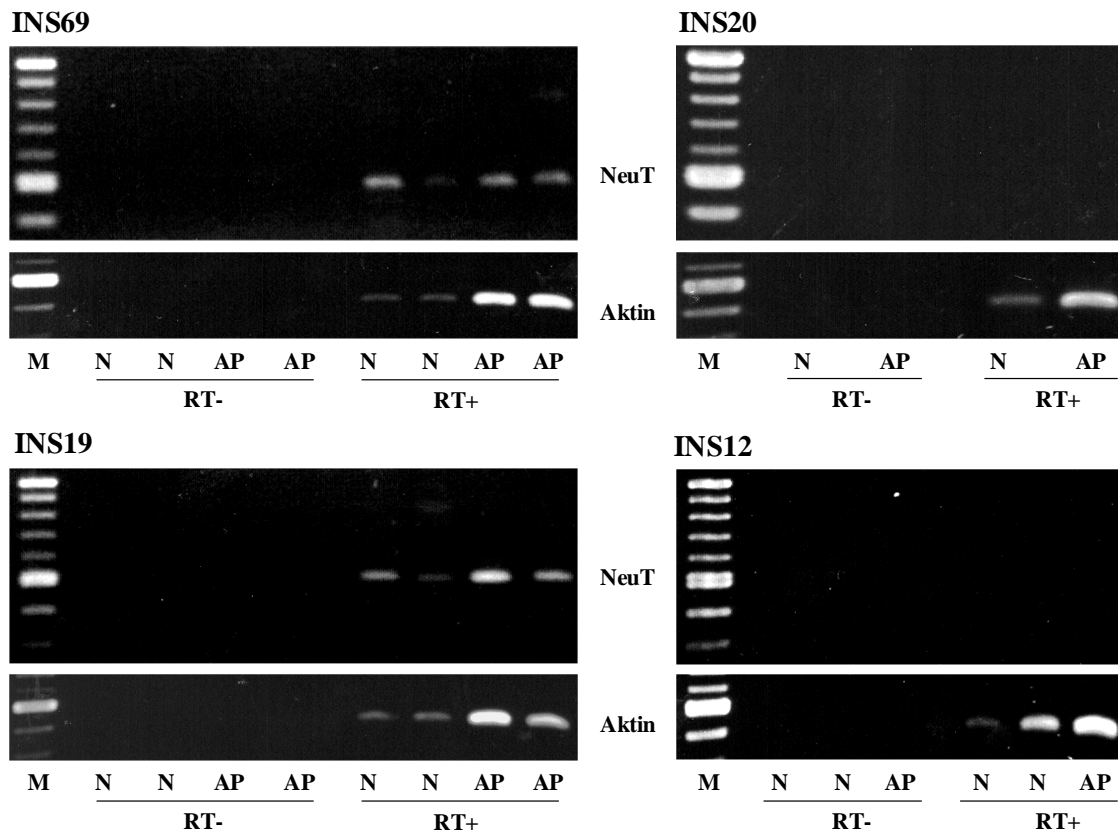
Die Charakterisierung der Linien INS12, INS19, INS20 und INS69 erfolgte in drei Stufen. Um auszuschließen, dass die Tiere der einzelnen TetO-*NeuT*-Linien unkontrolliert *NeuT* exprimieren, wurde zunächst die Expression des Onkogens in den transgenen INS-Tieren mittels RT-PCR untersucht. Den Untersuchungen der TetO-*NeuT*-transgenen Tiere folgten Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF)-Assays, die erste Schlüsse auf die Induzierbarkeit zulassen. Am Ende der Experimente standen dann Paarungen mit Effektor-Mäusen, mit deren Hilfe die Regulierbarkeit des *NeuT*-Transgens in verschiedenen Organen der Maus überprüft werden sollte. Die einzelnen Untersuchungsschritte sind im Folgenden in den Unterkapiteln genauer erläutert und für alle vier transgenen Mauslinien aufgeführt.

#### **3.2.3.1 Untersuchung der TetO-*NeuT*-transgenen INS-Linien**

Der erste Schritt bei der Charakterisierung der INS-Linien war die Überprüfung der *NeuT*-Expression in Abwesenheit des Transaktivators (tTA oder rtTA) in TetO-*NeuT*-transgenen Tieren. Wie schon zu Beginn des Ergebnisteiles erwähnt, ist die Integration des Transgen-Konstruktes bei der Pronukleusinjektion ungerichtet. Deswegen kann es passieren, dass das Transgen an einer Stelle in das Mausgenom inseriert, an der durch Positionseffekte von z. B. *Enhancer*- oder *Silencer*-Elementen die Expression des Transgens unabhängig von der Anwesenheit des Transaktivators oder Doxyzyklin gesteuert wird. Führt dieser Effekt zur permanenten, unkontrollierbaren Expression des Transgens, kann dies mit Hilfe von RT-PCRs schon in den TetO-*NeuT*-transgenen Tieren nachgewiesen werden.

Deswegen wurde aus verschiedenen Organen von transgenen TetO-*NeuT*-Tieren aller INS-Linien RNA präpariert und diese mit Hilfe von reverser Transkriptase in cDNA (siehe 2.2.5) umgeschrieben. Die RT-PCRs zur Quantifizierung einer eventuellen, konstitutiven *NeuT*-Expression wurden mit *NeuT*-spezifischen Oligonukleotiden ( $\beta$ Glo*NeuT* F/R) durchgeführt, sodass zwischen dem endogenen *ErbB2* der Maus und dem transgenen *NeuT* der Ratte unterschieden werden konnte.

Die Ergebnisse der RT-PCR für die einzelnen INS-Linien sind in Abbildung 3.44 aufgeführt.



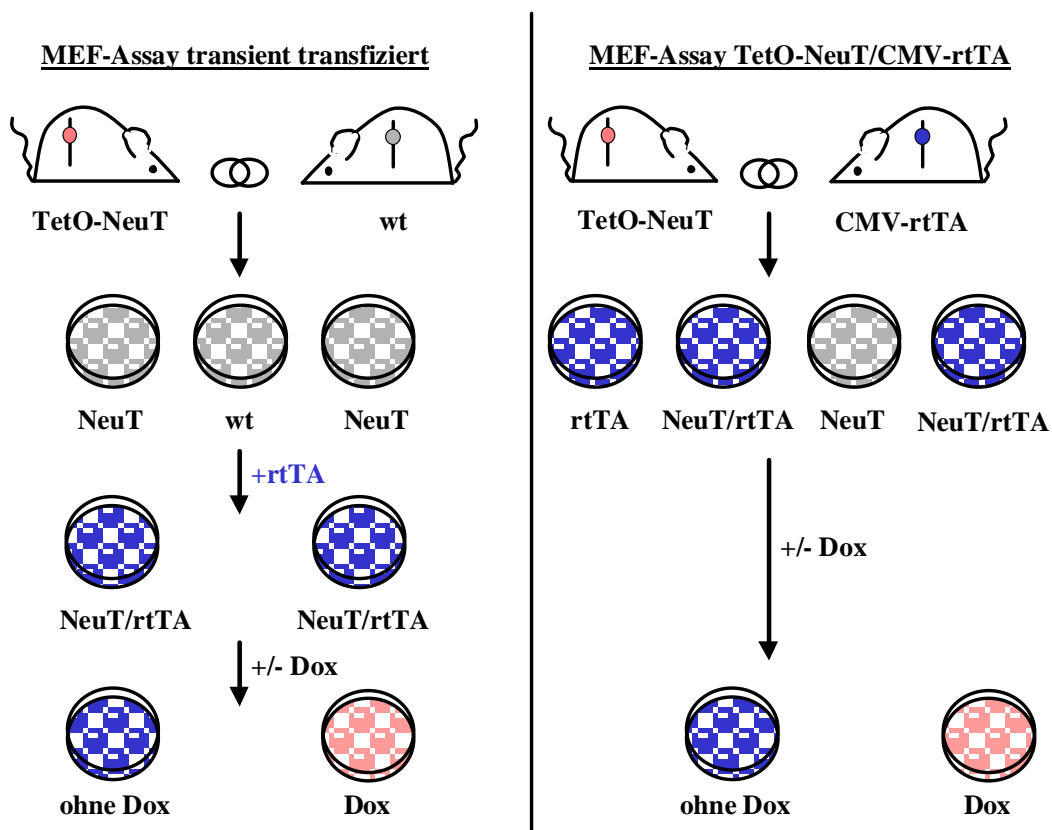
**Abbildung 3.44: RT-PCR-Experimente zur Untersuchung der *NeuT*-Expression TetO-*NeuT*-transgener INS-Tiere.** Aus TetO-*NeuT*-Tieren der Linien INS12, INS19, INS20 und INS69 wurden Nieren (N) und Appendices (AP) entnommen und die *NeuT*-Expression in RT-PCRs untersucht (Oligonukleotide:  $\beta$ GloNeuT F/R, 35 Amplifikationszyklen). Dabei wurden RT-PCRs mit reverser Transkriptase (RT+) und Kontrollen ohne das Enzym (RT-) durchgeführt. Als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen diente eine *Aktin*-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). In der linken Spur ist jeweils der 100 bp-Marker (M) als Größenstandard aufgetragen.

Die Untersuchung verschiedener Organe (hier exemplarisch abgebildet nur die Ergebnisse der PCRs auf cDNAs aus Appendix und Niere) ergab, dass die Linien INS12 und INS20 keine Expression des Transgens in Abwesenheit eines Transaktivators zeigen. Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere der Linien INS19 und INS69 in allen untersuchten Organen eine basale *NeuT*-Expression auf und schienen somit als *Responder*-Mäuse für regulierbare *NeuT*-Genexpression ungeeignet.

### 3.2.3.2. Untersuchung der transgenen Tiere mit MEF-Assays

Durch die Untersuchung embryonaler Fibroblasten in MEF-Assays können erste Aussagen über die Induzierbarkeit des *NeuT*-Transgens in Anwesenheit des rtTA gemacht werden. Die Durchführung von MEF-Assays kann dabei auf zwei Arten erfolgen. Zum einen können am Tag 13-15 der Schwangerschaft Embryonen aus transgenen TetO-*NeuT*-Tieren präpariert werden und Fibroblastenkulturen aus deren Geweben angelegt werden (siehe 2.2.17.4). Diese

Fibroblasten werden transient mit einem CMV-rtTA Expressionskonstrukt (hier: pcDNA3Neo/rtTA) transfiziert (siehe 2.2.17.5), zwei Tage in An- bzw. Abwesenheit von Doxzyklin (1 µg/ml) inkubiert und im Anschluss mittels RT-PCR auf die Induzierbarkeit der *NeuT*-Expression hin untersucht. Eine weitere Möglichkeit ist die Paarung der verschiedenen INS-Linien mit Effektor-Mäusen, die den rtTA unter Kontrolle eines CMV-Promotors in allen Geweben exprimieren (freundlicherweise von Prof. Dr. Bujard, ZMBH Heidelberg zur Verfügung gestellt; siehe auch Kistner *et al.*, 1996). Die Fibroblasten, die aus den TetO-*NeuT*/CMV-rtTA-transgenen Embryonen isoliert werden, können dann, ohne den Zwischenschritt der transienten Transfektion, direkt in An- bzw. Abwesenheit von Doxzyklin inkubiert und mittels RT-PCRs untersucht werden. Eine Übersicht über die beiden Methoden zeigt Abbildung 3.45.

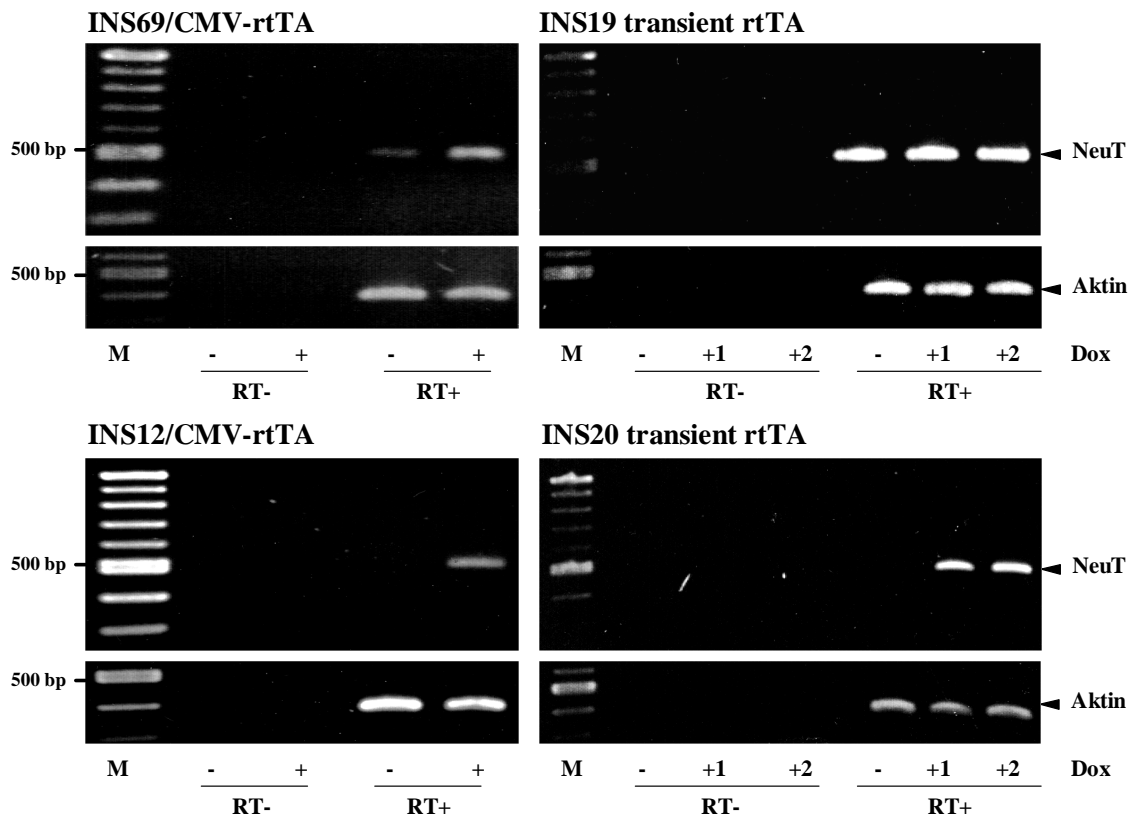


**Abbildung 3.45: Übersicht MEF-Assay.** Am Tag 13-15 pc werden MEFs aus Embryonen präpariert und mittels PCR auf das Vorhandensein des/der Transgens/Transgene (*NeuT* bzw. *rtTA*) hin untersucht. TetO-*NeuT*/CMV-rtTA-transgene MEFs können direkt mit Dox induziert werden, wohingegen TetO-*NeuT*-transgene MEFs aus TetO-*NeuT*/Wildtyp(wt)-Paarungen erst transient mit *rtTA* transfiziert werden müssen. Das Vorhandensein der *NeuT*-Induktion wird in beiden Fällen nach zweitägiger Dox-Gabe in RT-PCR-Experimenten untersucht. Blau=Expression *rtTA*; rot=Expression *rtTA* und *NeuT*.

Zu Beginn der Untersuchungen zur Induzierbarkeit des Transgens in MEFs standen dem Labor leider noch keine CMV-rtTA-Effektor-Mäuse zur Verfügung, sodass die ersten MEF-Assays mit den Linien INS19 und INS20 über transiente Transfektionen mit dem *rtTA*-

Expressionskonstrukt durchgeführt wurden, wohingegen für die Assays der Linien INS12 und INS69 nach Paarung mit Effektor-Mäusen die TetO-NeuT/CMV-rtTA-transgenen Fibroblasten verwendet werden konnten.

Die MEF-Assays für die einzelnen INS-Linien erbrachten, wie in Abbildung 3.46 dargestellt, unterschiedliche Ergebnisse:



**Abbildung 3.46: RT-PCR-Ergebnisse der MEF-Assays.** Tiere der INS-Linien wurden mit Wildtyp-Tieren (INS20/INS19) oder mit CMV-rtTA-Effektor-Mäusen (INS12/INS69) gepaart. Nach Präparation der MEFs wurden diese direkt (INS12/INS69) oder nach Transfektion mit pcDNA3Neo/rtTA (INS19/INS20) für 48 h mit (+Dox) oder ohne (-Dox) Dox inkubiert, bevor RNA aus den Zellen extrahiert und 4 µg davon für RT-PCRs eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der *NeuT*-spezifischen PCR (Primer: βGloNeuT F/R, 35 Amplifikationszyklen) sind jeweils in der oberen Reihe dargestellt. Die untere Reihe zeigt eine *Aktin*-spezifische PCR (Primer: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen) als Kontrolle für die eingesetzten cDNA-Mengen. Als Kontrollen für die reverse Transkription wurde jeder Ansatz auch ohne reverse Transkriptase (RT-) inkubiert. Bei den transient transfizierten MEFs gab es neben den rtTA-transfizierten, induzierten Zellen (+1 Dox) auch noch eine Positivkontrolle, bei der neben dem rtTA auch das Ausgangsplasmid pINSpBI-EGFP/NeuT in die MEFs transfiziert wurde (+2 Dox). Am linken Rand dargestellt ist jeweils der 100 bp-Marker (M) als Größenstandard.

Für die Linie INS19 stellte sich wie erwartet heraus, dass in An- und Abwesenheit des Transaktivators bzw. Doxyzyklin die Expression des *NeuT*-Transgens vorhanden und die Tiere dieser Linie somit ungeeignet sind. Bei transgenen Fibroblasten aus der Paarung INS69/CMV-rtTA zeigte sich eine deutliche Induzierbarkeit von *NeuT* nach Inkubation der Zellen mit Doxyzyklin. Allerdings erschwert die im nicht-induzierten Zustand detektierbare

basale Expression des *NeuT*-Onkogens die Möglichkeit einer Verwendung dieser Linie für die Generierung eines induzierbaren Mausmodells, da schon kleine Mengen des Onkogens für die Tumorinduktion ausreichen könnten. Die Ergebnisse aus den Assays mit den Linien INS12 und INS20 demonstrierten die stringente Induzierbarkeit von *NeuT* nach Inkubation der Zellen mit Doxyzyklin und waren ein erster Hinweis auf die exogen regulierbare Transgenexpression in diesen Tieren.

### 3.2.3.3 Untersuchung der NeuT-Induzierbarkeit der INS-Linien nach Kreuzung mit verschiedenen Effektor-Mäusen

Wie schon zu Beginn dieses Ergebnisteiles beschrieben, war es mit Hilfe des Tet-Systems in den letzten Jahren möglich, verschiedene Effektor- und *Responder*-Mäuse für die unterschiedlichsten Fragestellungen zu generieren. Der Zugang zu einigen dieser Effektor-Mäuse ermöglichte die Untersuchung transgener Tiere in Bezug auf die organspezifische Induzierbarkeit des Transgens in dieser Arbeit. Dazu wurden die TetO-NeuT-*Responder*-Mäuse mit verschiedenen Effektor-Mäusen gepaart und die Nachkommen mittels PCR und *Dot Blot* auf das Vorhandensein beider Transgene (*rtTA* bzw. *tTA* und *NeuT*) untersucht. TetO-NeuT/*rtTA*-transgene Tiere konnten dann nach zweiwöchiger Behandlung mit Doxyzyklin (Applikation im Trinkwasser; 0,375 g Dox, 2,5 g Saccharose in 50 ml Trinkwasser) auf RNA-Ebene mit RT-PCR-Experimenten (siehe 2.2.5) oder auf Proteinebene im *Western Blot* (siehe 2.2.7) hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit und Stärke der NeuT-Expression überprüft werden.

Für die Paarungen standen verschiedene Effektor-Tiere, die uns freundlicherweise von den jeweiligen Arbeitsgruppen überlassen wurden, zur Verfügung. Neben den bereits bei den MEF-Assays beschriebenen CMV-*rtTA*-Mäusen, die den Transaktivator *rtTA* aufgrund des vorgeschalteten CMV-Promotors ubiquitär exprimieren, konnten noch drei weitere Effektor-Linien in die Untersuchungen mit einbezogen werden. *Fabp-rtTA*-Tiere (Saam *et al.*, 1999) exprimieren den Transaktivator unter Kontrolle des *fatty acid-binding protein*-Promotors in Kolon, Ileum, Jejunum und Cecum. Die spezifische Expression des *rtTA* in Lymphozyten wird durch den *Lck* (*lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase*)-Promotor in *Lck-rtTA*-Effektor-Mäusen (Dr. Ferrier, Universität Marseille, unveröffentlicht) ermöglicht. Außerdem wurden noch *LAP-tTA*-Tiere (Kistner *et al.*, 1996) verwendet, die unter Kontrolle des *LAP*-Promotors der Ratte, der für die spezifische Expression des *liver enriched activator protein* (C/EBP $\beta$ )-Transkriptionsfaktors in der Leber verantwortlich ist, den *tTA* exprimieren. In

Tabelle 3.2 sind die unterschiedlichen Effektor-Tiere, deren gewebespezifische Transaktivator-Expression und die jeweiligen Literaturangaben zusammengefasst.

**Tabelle 3.2: Übersicht über die eingesetzten Effektor-Mäuse.** Die hier aufgeführten Effektor-Mäuse wurden für Paarungen mit den INS-Linien zur Untersuchung induzierbarer Genexpression eingesetzt und uns freundlicherweise von den jeweiligen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

Effektor-Maus	Promotor	Expression	Literatur
<b>Fabp-rtTA</b>	<b>fatty acid bindig protein</b>	<b>Darm</b>	<b>Saam et al., JBC 1999</b>
<b>Lck-rtTA</b>	<b>lymphocyte specific kinase</b>	<b>Lymphozyten</b>	<b>Dr. Ferrier unveröffentlicht</b>
<b>CMV-rtTA</b>	<b>Cytomegalie-virus</b>	<b>ubiquitär</b>	<b>Kistner et al., PNAS 1996</b>
<b>LAP-tTA</b>	<b>liver enriched activator protein</b>	<b>Leber</b>	<b>Kistner et al., PNAS 1996</b>

Zur Überprüfung der Expressionsstärke der Transaktivatoren in den Organen der Effektor-Tiere wurden in Kooperation mit der AG Sahin/Türeci (Universität Mainz) quantitative *real-time* PCRs durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Leber, Thymus, Niere, Milz, Knochenmark, Gehirn, Duodenum und Kolon der Effektor-Mäuse (LAP-tTA, Fabp-rtTA und CMV-rtTA) präpariert, revers transkribiert und im *Light Cycler* quantifiziert. Tabelle 3.3 zeigt die Transaktivator-Expressionsstärken in den Geweben der unterschiedlichen Effektor-Tiere.

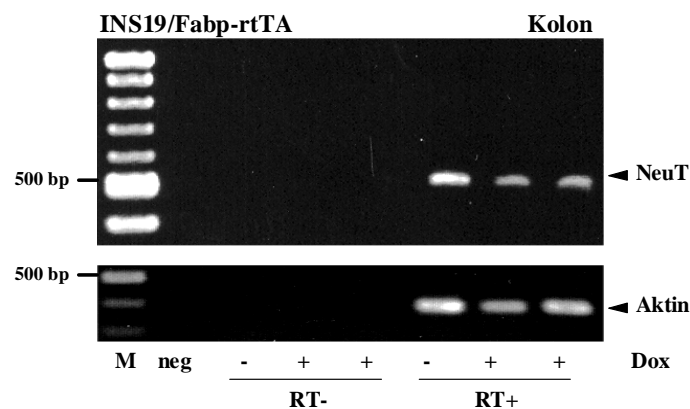
**Tabelle 3.3: Expression der Transaktivatoren in den unterschiedlichen Geweben.** Aus den Organen der verschiedenen Effektor-Tiere wurde RNA präpariert, revers transkribiert und in Zusammenarbeit mit der AG Türeci/Sahin die Expression von tTA bzw. rtTA im *Light Cycler* quantifiziert. Die Expressionsstärke der Transaktivatoren in den jeweiligen Organen der Effektor-Tiere ist mit 0= nicht exprimiert, += schwach exprimiert, ++= stark exprimiert und +++= sehr stark exprimiert angegeben.

	LAP-tTA	Fabp-rtTA	CMV-rtTA
<b>Knochenmark</b>	+	-	++
<b>Leber</b>	+++	-	+
<b>Thymus</b>	+	-	+
<b>Niere</b>	++	-	++
<b>Milz</b>	-	-	++
<b>Gehirn</b>	++	-	++
<b>Duodenum</b>	-	++	++
<b>Kolon</b>	-	-	+++



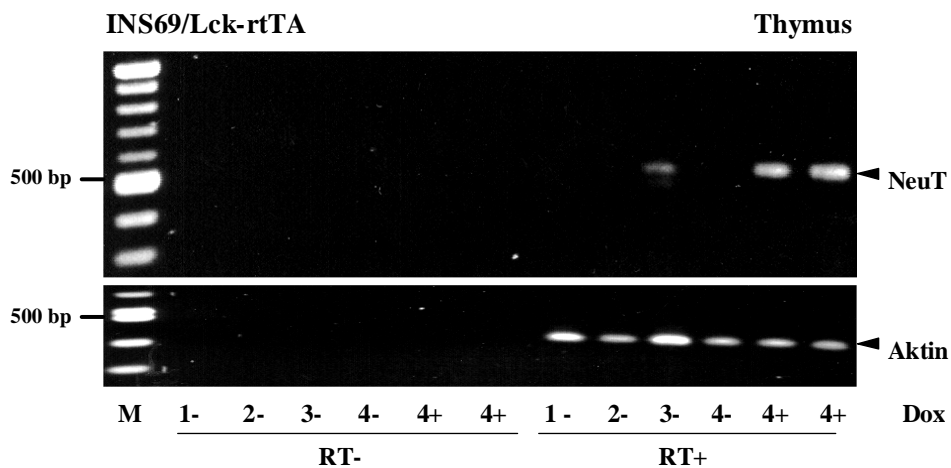
In Abhängigkeit der Verfügbarkeit der unterschiedlichen Effektor-Tiere wurden zu Beginn der Experimente zunächst Paarungen mit Fabp-rtTA- und Lck-rtTA-Tieren durchgeführt, wohingegen das Arbeiten mit LAP-rtTA- und CMV-rtTA-Tieren erst zu einem späteren Zeitpunkt möglich war. Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse sind nach den einzelnen Linien geordnet aufgeführt. Es wird jeweils exemplarisch die Untersuchung einer repräsentativen Paarung gezeigt, wobei die einzelnen Linien teilweise mit verschiedenen, aber nicht mit allen vorhandenen Effektor-Mäusen gekreuzt wurden.

So wurden Tiere der Linie INS19 ausschließlich mit Fabp-Effektor-Mäusen gekreuzt und analysiert, da diese Linie aufgrund ihrer basalen *NeuT*-Expression, die sich infolge der Ergebnisse aus den RT-PCRs der TetO-*NeuT*-transgenen Tiere, sowie denen aus den MEF-Assays ergeben haben, für die Generierung des induzierbaren Mausmodells ungeeignet schien. Die Nachkommen der Paarung INS19/Fabp-rtTA wurden mittels PCR und *Dot Blot* auf die Anwesenheit beider Transgene (*NeuT* und *rtTA*) überprüft. TetO-*NeuT*/rtTA-transgenen Tieren wurde über zwei Wochen Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht, woraufhin Dünndarm, Kolon und Appendix für die Analyse der Transgenexpression aus den Tieren präpariert wurden. Die aus den Organen isolierte RNA wurde revers transkribiert und in einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide:  $\beta$ GloNeuT F/R) die Expression des Transgens in den nicht-induzierten und Dox-induzierten Geweben untersucht. Wie aus Abbildung 3.47 zu entnehmen ist, bestätigten sich die aus den Vorversuchen gewonnenen Resultate bezüglich der konstitutiven Expression des Transgens. Die Expression von *NeuT* zeigte sich in der Kontrolle ohne Doxyzyklin genauso stark, wie in den induzierten Tieren. Somit schied die Linie INS19 definitiv für die weitere Verwendung aus.



**Abbildung 3.47: Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS19/Fabp-rtTA-Tiere.** Aus Kolons transgener INS19/Fabp-rtTA-Tiere wurde nach zweiwöchiger Dox-Applikation RNA extrahiert, revers transkribiert und in einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide:  $\beta$ GloNeuT F/R, 35 Amplifikationszyklen) die Expression des Transgens untersucht. Als Abgleich für die Menge der eingesetzten cDNA-Mengen diente eine *Aktin*-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). Die RT-PCRs wurden jeweils einmal mit reverser Transkriptase (RT+) bzw. ohne Enzym (RT-) durchgeführt. Pfeile indizieren NeuT und Aktin. Negativkontrolle der PCR (neg) war ein Ansatz bei dem die Zugabe der cDNA durch H<sub>2</sub>O ersetzt wurde. Als Größenstandard diente der 100 bp-Marker (M).

Für Linie INS69, die sich im Verlauf der bisherigen Untersuchungen als induzierbar, aber mit basaler *NeuT*-Expression gezeigt hatte, ist hier exemplarisch das Ergebnis aus der Kreuzung mit Lck-rtTA-Effektor-Mäusen, die den rtTA vornehmlich in Thymus und Milz exprimieren, gezeigt. Die transgenen TetO-*NeuT*/Lck-rtTA-Nachkommen wurden nach Analyse mit PCR und *Dot Blot* zwei Wochen auf Doxyzyklin gesetzt, woraufhin die Organe präpariert, revers transkribiert und mit *NeuT*-spezifischer PCR auf Induktion des Transgens untersucht wurden. Abbildung 3.48 zeigt das Ergebnis der PCR auf Thymi transgener INS69/Lck-rtTA-Tiere.

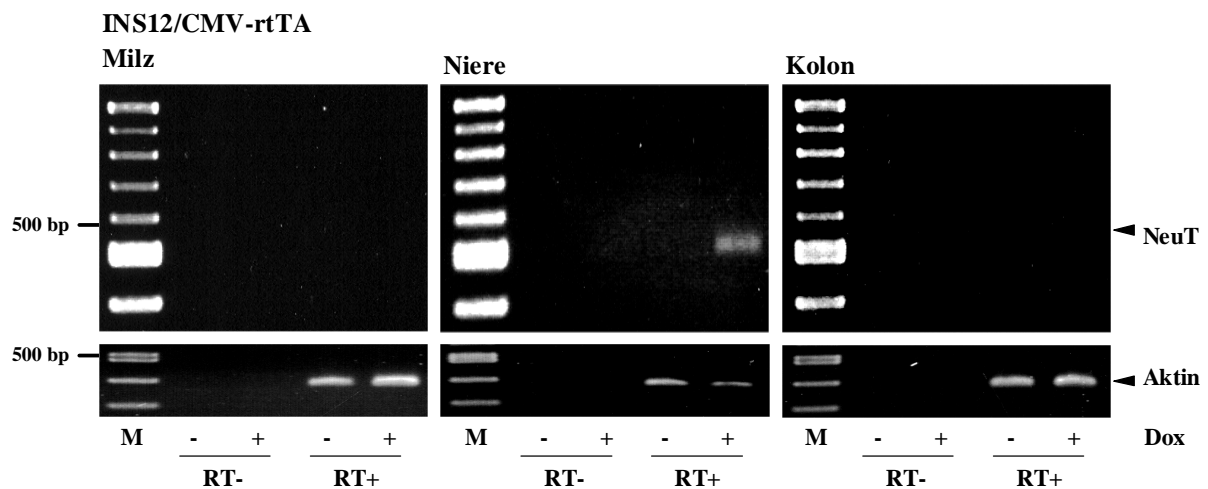


**Abbildung 3.48: Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS69/Lck-rtTA-Tiere.** Aus Thymi verschiedener Tiere (1=Wildtyp, 2=Lck-rtTA transgen, 3=INS69 TetO-*NeuT* transgen, 4=INS69/Lck-rtTA transgen) wurde nach zweiwöchiger Dox-Applikation (-/+ Dox) RNA extrahiert, revers transkribiert und in einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide:  $\beta$ Glo*NeuT* F/R, 35 Amplifikationszyklen) die Expression des Transgens untersucht. Als Abgleich für die Menge der eingesetzten cDNA-Mengen diente eine *Aktin*-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). Die RT-PCRs wurden jeweils einmal mit reverser Transkriptase (RT+) bzw. Enzym durch H<sub>2</sub>O ersetzt (RT-) durchgeführt. Pfeile indizieren *NeuT* und *Aktin*. Als Größenstandard diente der 100 bp-Marker (M).

In den Thymi induzierter Tiere zeigte sich eine deutliche Expression von *NeuT*, wohingegen bei den Kontrolltieren nur im TetO-*NeuT*-transgenen INS69-Tier, nicht aber im nicht-induzierten, transgenen INS69/Lck-rtTA-Tier eine *NeuT*-Expression nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es Individuum-abhängige Unterschiede in der basalen *NeuT*-Expression gibt und *NeuT* daher im nicht-induzierten Zustand in den Thymi der INS69-Tiere sehr schwach oder gar nicht exprimiert wird.

Die Ergebnisse der TetO-*NeuT*/(r)tTA-transgenen Tiere der beiden bisher vielversprechendsten Linien INS12 und INS20, die keine basale Expression des Transgens in TetO-*NeuT*-transgenen Tieren, aber Doxyzyklin-abhängige Induzierbarkeit im MEF-Assay gezeigt haben, sind hier beispielhaft anhand der Paarung mit den Effektor-Tieren CMV-rtTA bzw. LAP-tTA gezeigt.

Nachkommen der INS12/CMV-rtTA-Paarung wurden mit PCR und *Dot Blot* analysiert und transgene Nachkommen einer zweiwöchigen Doxyzyklin-Behandlung (Kontrolltiere bekamen normales Trinkwasser) unterzogen. Wegen der ubiquitären Expression des rtTA standen mehrere Organe für die Analyse der Induzierbarkeit zur Verfügung. Im Hinblick auf die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR (siehe Tab. 3.3) wurden aufgrund der rtTA-Expressionsstärke und der Zugänglichkeit der Organe Niere, Milz und Kolon für die RNA-Extraktion und anschließende RT-PCR-Analyse verwendet. Abbildung 3.49 zeigt *NeuT*-spezifische PCRs auf revers transkribierter RNA induzierter und nicht-induzierter INS12/CMV-rtTA-Tiere.



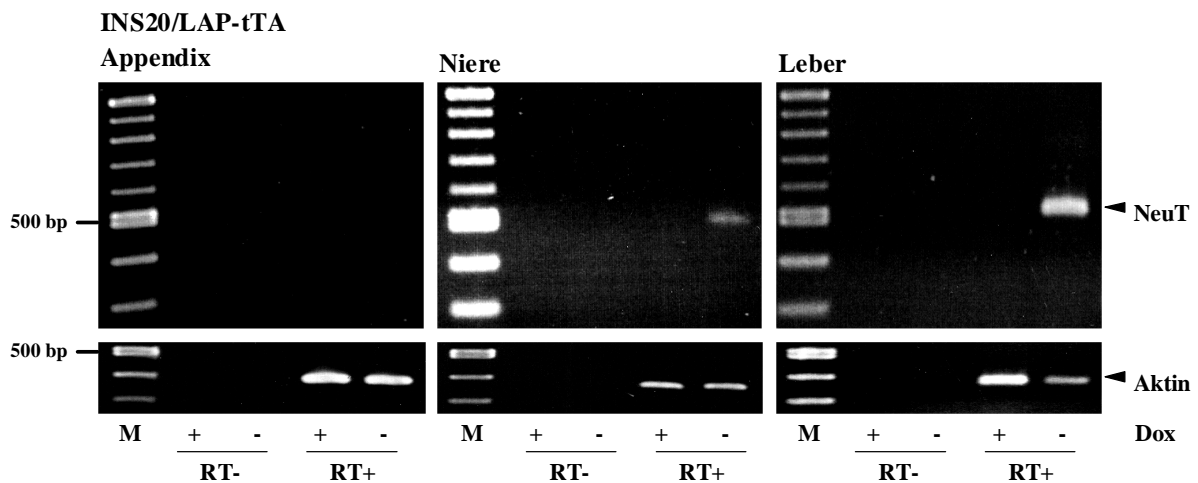
**Abbildung 3.49: Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS12/CMV-rtTA-Tiere.** Aus Niere, Milz und Kolon transgener INS12/CMV-rtTA-Tiere wurde nach zweiwöchiger Dox-Applikation RNA extrahiert, revers transkribiert und in einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide:  $\beta$ GloNeuT F/R, 35 Amplifikationszyklen) die Expression des Transgens untersucht. Als Abgleich für die Menge der eingesetzten cDNA-Mengen diente eine *Aktin*-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). Die RT-PCRs wurden jeweils einmal mit reverser Transkriptase (RT+) bzw. Enzym durch H<sub>2</sub>O ersetzt (RT-) durchgeführt. Pfeile indizieren *NeuT* und Aktin. Als Größenstandard diente der 100 bp-Marker (M).

Nach 35 Amplifikationszyklen konnte nur in der Niere induzierter INS12/CMV-rtTA-Tiere die Expression von *NeuT* nachgewiesen werden. In Milz und Kolon, die eigentlich auch größere Mengen des Transaktivators exprimieren, war dies nicht möglich.

Die transgenen Nachkommen der INS20/LAP-tTA-Tiere wurden nach der Identifizierung der Transgene (*NeuT* und *tTA*) zwei Wochen in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin gehalten. Da die LAP-Effektor-Mäuse unter Kontrolle des LAP-Promotors den tTA exprimieren, ist hier zu beachten, dass die Expression von NeuT in den INS20/LAP-tTA-transgenen Nachkommen konstitutiv vorhanden ist und erst durch die Gabe von Doxyzyklin abgeschaltet wird.

Untersucht wurden bei den INS20/LAP-tTA-Tieren Appendix, Niere und Leber, wobei die Expression des *NeuT*-Transgens, ausgehend von den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR

der Transaktivatorexpression (siehe Tab. 3.3) in der Leber am stärksten, in der Niere schwach und im Appendix gar nicht vorhanden sein sollte. Wie aus Abbildung 3.50 ersichtlich wird, war die *NeuT*-Expression analog zum Expressionsprofil des Transaktivators und konnte nur in Leber und Niere in der RT-PCR nachgewiesen werden. Beachtlich ist, dass die *NeuT*-Expression infolge zweiwöchiger Doxyzyklin-Gabe in beiden Organen völlig abschaltbar und somit die stringente Regulierbarkeit des Transgens möglich war. Die konditionale Expression des *NeuT*-Onkogens konnte in Geweben von transgenen INS20/CMV-rtTA-Tieren reproduziert werden (Ergebnisse hier nicht abgebildet).

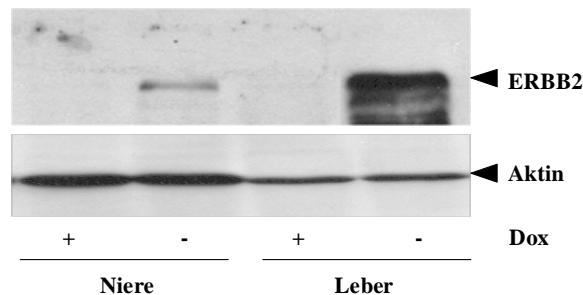


**Abbildung 3.50: Untersuchung der Induzierbarkeit transgener INS20/LAP-tTA-Tiere.** Aus Appendix, Niere und Leber transgener INS20/LAP-tTA-Tiere wurde nach zweiwöchiger Dox-Applikation RNA extrahiert, revers transkribiert und in einer *NeuT*-spezifischen PCR (Oligonukleotide:  $\beta$ GloNeuT F/R, 35 Amplifikationszyklen) die Expression des Transgens untersucht. Als Abgleich für die Menge der eingesetzten cDNA-Mengen diente eine *Aktin*-spezifische RT-PCR (Oligonukleotide: musAktin A3/A5, 18 Amplifikationszyklen). Die RT-PCRs wurden jeweils einmal mit reverser Transkriptase (RT+) bzw. Enzym durch H<sub>2</sub>O ersetzt (RT-) durchgeführt. Pfeile indizieren NeuT und Aktin. Als Größenstandard diente der 100 bp-Marker (M).

Nachdem die Induzierbarkeit auf RNA-Ebene in der RT-PCR erfolgreich demonstriert werden konnte, sollte im Folgenden die Induzierbarkeit der Proteinexpression im *Western Blot* (siehe 2.2.7.7) untersucht werden. Von den TetO-NeuT/rtTA bzw. tTA-transgenen Nachkommen war nach der Präparation der Organe nur die Hälfte für die RNA-Extraktion eingesetzt worden, sodass die anderen Organhälften derselben Tiere für die Extraktion von Proteinen herangezogen werden konnten.

In *Western Blot*-Analysen von Niere, Milz und Kolon der INS12/CMV-rtTA-Tiere konnte keine Induktion von NeuT in den induzierten Organen nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet). Eine mögliche Erklärung dafür ist die schon in den RT-PCR-Analysen sehr schwache Induzierbarkeit des Transgens *NeuT*. Sie reicht vermutlich nicht aus, um eine auf Proteinebene sichtbare Induktion von NeuT zu zeigen. Für die Untersuchung der INS20/LAP-

tTA-Tiere im *Western Blot* wurde, da in den Appendices schon in der RT-PCR keine Expression des Transgens nachweisbar war, nur Leber- und Nierengewebe verwendet. Abbildung 3.51 zeigt die ERBB2-Expression der INS20/LAP-tTA-Tiere in Abhängigkeit von Doxyzyklin im *Western Blot*.



**Abbildung 3.51: Untersuchung der Induzierbarkeit von INS20/LAP-tTA-Tieren im *Western Blot*.** Aus induzierten bzw. nicht-induzierten (+/- Dox), transgenen Tieren wurden Niere und Leber entnommen, Proteine extrahiert und 100 µg Proteinextrakt auf 10 %igen Polyacrylamidgelen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte der Nachweis der entsprechenden Proteine durch Verwendung spezifischer Antikörper. Pfeile zeigen die untersuchten Proteine an, wobei Aktin in der unteren Reihe als Kontrolle verwendet wurde.

Das Abschalten der Onkogenexpression nach zweiwöchiger Doxyzyklin-Applikation auf Proteinebene und die somit nachgewiesene, stringente Regulierbarkeit der NeuT-Expression, stellten ein wichtiges Ergebnis auf dem Weg zum induzierbaren Tiermodell dar.

Letztendlich erwiesen sich die *Responder*-Linien INS12 und INS20 aufgrund der Ergebnisse aus den MEF-Assays und den Induktionsversuchen mit TetO-NeuT/rtTA bzw. tTA-transgenen Tieren als vielversprechende Linien für die Paarung mit relevanten Effektor-Mäusen zur Untersuchung der ERBB2-induzierten Karzinogenese.

Abschließend sind in Tabelle 3.4 alle INS-Linien und die Ergebnisse aus den einzelnen Untersuchungsschritten zusammengefasst.

**Tabelle 3.4: Übersicht über die Ergebnisse der INS-Linien.** Aufgeführt sind die Ergebnisse der RT-PCRs auf Organen TetO-NeuT-transgener Tiere (NeuT), der MEF-Assays und der RT-PCRs auf Organen TetO-NeuT/rtTA- bzw. tTA-transgener Tiere (Fabp, Lck, LAP und CMV). Dabei wird unterschieden zwischen nd=nicht detektiert, kE=keine Expression, k=konstitutiv exprimiert, k/i=konstitutiv exprimiert aber induzierbar, i=induzierbar.

Linie	NeuT	MEF-Assay	Organ			
			Fabp	Lck	LAP	CMV
INS12	keine Expression	induzierbar	kE	kE	nd	i
INS19	Expression	konstitutiv	k	nd	nd	nd
INS20	keine Expression	induzierbar	nd	kE	i	i
INS69	Expression	konstitutiv aber induzierbar	nd	k/i	nd	nd

## 4 Diskussion

Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 wurde in den letzten Jahren mit der Entstehung verschiedener epithelialer Adenokarzinome assoziiert. Nachdem zunächst eine Überexpression des Rezeptors in etwa 30 % aller Mammakarzinome diagnostiziert werden konnte, hat sich die Anzahl der Gewebe, bei deren maligner Entartung ERBB2 eine Rolle spielt, noch um einiges erweitert. So konnte auch bei der Pathogenese von Ovarial- und Prostatakarzinomen, nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), Blasenkrebs und Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Slamon *et al.*, 1989; Ware *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1989; Zhau *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1989) eine Beteiligung von ERBB2 festgestellt werden. Die erhöhte ERBB2-Expression in Tumoren bedeutet für die Patienten eine schlechte Prognose, die mit früher Metastasierung und verminderter Überlebenszeit nach Diagnose einhergeht. Aus diesem Grund ist die Entschlüsselung der Signaltransduktionskaskaden, über die der Rezeptor in den normalen Ablauf zellulärer Proliferation und Differenzierung eingreift, von großer Bedeutung. Besonders wichtig für das Verstehen der Pathogenese ist die Untersuchung früher zellulärer Prozesse, die sich als direkte Folge der Onkogenaktivierung abspielen.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Dissertation mit Hilfe des Tet-Systems Zelllinien mit induzierbarer NeuT-Expression generiert. Durch gezieltes Anschalten der Rezeptorexpression kann in diesen Zellen die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege und die Induktion für die Tumorgenese relevanter Gene untersucht werden. Außerdem wurden transgene TetO-NeuT-Responder-Mäuse generiert, die nach Paarung mit tTA- bzw. rtTA-Effektor-Mäusen, ein zu den Zelllinien analoges *in vivo*-Modell zur Untersuchung der ERBB2-vermittelten Tumorgenese liefern sollen.

### 4.1 ERBB2-induzierbare Zelllinien

Die Untersuchung von ERBB2 in einem induzierbaren System eröffnet die Möglichkeit, die Mechanismen zu erforschen, die zu Beginn der Karzinogenese ablaufen und essenziell für die weitere Entwicklung des Tumors sind. Die Auswahl der Mammaadenokarzinomzelllinie MCF-7 für dieses konditionale System begründet sich in dem mit gesunden Brustepithelzellen vergleichbaren ERBB2-Expressionsniveau (Janes *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000) und der breiten Anwendung dieser Zelllinie in der Krebsforschung. Um eine effiziente Aktivierung des Rezeptors zu gewährleisten, wurde die cDNA der onkogenen Rattenvariante *NeuT*, die zum menschlichen *ERBB2*-Gen homolog ist, verwendet. Die Funktionalität der *NeuT*-cDNA

wurde schon in vielen Versuchsanordnungen demonstriert (Guy *et al.*, 1996; Moody *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Dankort *et al.*, 2001). NeuT zeichnet sich durch eine aktivierende Punktmutation in der Transmembrandomäne aus (Schechter *et al.*, 1984; Bargmann *et al.*, 1986), die eine Liganden-unabhängige Aktivierung und konstitutive Signaltransduktion des Rezeptors bewirkt. Da für das humane ERBB2, außer in Lungenkarzinomen (Senior, 2004; Stephens *et al.*, 2004), bisher keine Mutationen beschrieben worden sind (Lemoine *et al.*, 1990) und in den ERBB2-assoziierten Tumoren lediglich eine Amplifikation und/oder Überexpression des Rezeptors vorliegt, wurden in der vorliegenden Arbeit neben den Zelllinien mit regulierbarer NeuT-Expression auch konditionale Zelllinien hergestellt, die das humane ERBB2 (hier hNeu genannt) überexprimieren. Dabei war die stringente Regulierbarkeit der ERBB2-Expression, die in *Northern* und *Western Blots* überprüft wurde, besonders wichtig, da schon die geringe Überexpression des Onkogens zur Aktivierung zellulärer Prozesse führen und die aus der eigentlichen Induktion mit Doxyzyklin gewonnenen Ergebnisse verfälschen könnte.

Die Analyse vieler Klone erbrachte letztendlich drei NeuT-Zelllinien (NeuT3, NeuT15 und NeuT48), drei unterschiedlich stark induzierbare hNeu-Zelllinien (hNeuIV, hNeuV und hNeuVIII) und die Kontrollzelllinie EGFP10 (enthält die Plasmidkonstrukte ohne Neu cDNA-Variante), die stringent durch Doxyzyklin regulierbar sind. Kinetische Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der NeuT-Expression ergaben, dass der Rezeptor sechs bis acht Stunden nach Induktion mit Doxyzyklin auf Proteinebene nachweisbar ist. Daher können initiale Prozesse, die durch onkogene NeuT-Expression eingeleitet werden, ab diesem Zeitpunkt untersucht werden.

#### **4.1.1 NeuT/hNeu-Expression induziert P21 und verfrühte Seneszenz in MCF-7-Zellen**

Da die Überexpression von ERBB2 in verschiedenen Tumormodellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur malignen Transformation und Tumorprogression geführt hat, wurde in der vorliegenden Dissertation zunächst das Proliferationsverhalten der induzierten Zellen gegenüber uninduzierten Zellen bzw. EGFP10-Kontrollzellen untersucht. Erstaunlicherweise zeigte sich für alle Klone, dass die Überexpression von NeuT bzw. hNeu zwei bis drei Tage nach Induktion zur Reduktion der S-Phasen um etwa 50 % führt. Diese Beobachtung erscheint, im Hinblick auf die bisher veröffentlichten Ergebnisse, nach denen ERBB2 vor allem über den RAS-RAF-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg zur Proliferation und Entartung von Zellen beiträgt, paradox. Dennoch ließen sich die Ergebnisse in wiederholten Zellzyklusanalysen im *fluorescence activated cell sorter* (FACS), sowie durch die Messung

der Einbauraten von BrdU in einem Proliferationsassay bestätigen. Darüber hinaus konnten diese Daten in murinen Fibroblasten mit niedriger Passagenzahl reproduziert werden.

Zur genaueren Identifizierung der Ursachen dieses Zellzyklusarrestes wurden verschiedene Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren (CDKI) in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten in induzierten versus nicht-induzierten Zellen untersucht. Das Ergebnis war in allen Zelllinien eine starke Induktion des CDKI P21, die sich auch in *Western Blot*-Analysen auf Proteinebene bestätigen ließ. Die Verwendung von P21-*Antisense* und P21-*Sense* Oligonukleotiden in der vorliegenden Arbeit ergab, dass der durch NeuT induzierte Zellzyklusarrest spezifisch in den P21-*Antisense*-transfizierten Zellen aufgehoben werden konnte. Aufgrund dieser Ergebnisse war es möglich, die wachstumsinhibierenden Vorgänge in den NeuT-überexprimierenden Zellen eindeutig der Expression des CDKI P21 zuzuordnen. P21 wurde ursprünglich von unabhängigen Gruppen als Cyclin-abhängige Kinasen (CDK)-bindendes (Harper *et al.*, 1993), P53-reguliertes, wachstumsinhibierendes Protein (El Deiry *et al.*, 1993) beschrieben, welches in seneszenten Fibroblasten überexprimiert ist (Noda *et al.*, 1994). Das Protein gehört zur CIP/KIP-Familie der CDKIs und zeichnet sich durch Interaktionen mit praktisch allen CDK/Cyclin-Komplexen aus (Sherr *et al.*, 1994). P21 kann neben einem G1-Phase Arrest, den auch die CDKI-Vertreter der INK-Familie induzieren, auch Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus' arretieren (Niculescu III *et al.*, 1998). Dabei wird die G1-Blockade durch die Interaktion mit G1-spezifischen CDK4 oder CDK6/CyclinD- bzw. CDK2/CyclinE-Komplexen bewerkstelligt (Boonstra, 2003). Beim G2-Arrest hingegen wird zum einen die aktivierende Phosphorylierung am Thr<sup>161</sup> von CDC2 (Smits *et al.*, 2000), zum anderen die Transkription von Cyclin B1, CDC2 und anderer Mitose-relevanter Gene (Chang *et al.*, 2000) durch P21 inhibiert. Neben der Hemmung der Aktivität von Cyclinen und CDKs kann P21 auch durch die Interaktion mit anderen Proteinen wachstumsinhibierende Funktionen ausüben. So führt z. B. die direkte Bindung von P21 an das Protein *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) zur Inhibierung der DNA-Replikation (Waga *et al.*, 1994).

Zusätzlich zu seiner klassischen inhibitorischen Rolle im Zellzyklus wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Hinweise auf wachstumsfördernde Eigenschaften des P21-Proteins gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass P21 die Bildung von Komplexen aus CDK4 und CDK6 mit D-Cyclinen stimuliert (La Baer *et al.*, 1997) und der nukleäre Import von Cyclin D1 durch P21 erhöht wird. Außerdem wirkt P21 antiapoptotisch, indem es mit der *apoptotic signal regulating kinase 1* (ASK1) interagiert (Asada *et al.*, 1999) und durch Bindung an die Procaspase 3 deren katalytische Aktivierung zur funktionalen Caspase 3 inhibiert (Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). Die Überexpression von P21 in



verschiedenen Tumoren, wie Pankreaskarzinomen (Biankin *et al.*, 2001), Astrocytomen (Kamiya *et al.*, 2002) und Mammakarzinomen mit Lymphknotenbefall (O'Halon *et al.*, 2002) sowie die Korrelation zwischen ERBB2-Überexpression und zytoplasmatischer Anhäufung von P21 in Tumoren von Brustkrebspatienten (Winters *et al.*, 2003) liefern weitere Indizien für die Beteiligung von P21 an wachstumsfördernden Prozessen.

Diese beiden konträren Rollen von P21 können, zumindest teilweise, durch posttranskriptionelle Modifikationen des Proteins erklärt werden. So wird beispielsweise nach Phosphorylierung von P21 am Threonin 145 durch AKT die Bindung des PCNA-Proteins unterbunden und dadurch die Proliferation endothelialer Zellen unterstützt (Rössig *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung am Serin 146 führt darüber hinaus zur erhöhten Stabilität des Proteins (Li *et al.*, 2001). Neben AKT können auch weitere Kinasen, wie die Proteinkinasen A und C (Scott *et al.*, 2002) und die Proteinkinase Pim-1 (Wang *et al.*, 2002) P21 phosphorylieren. Da diese Phosphorylierungen von P21 zur Maskierung der nukleären Lokalisierungssequenz (NLS), die den Transport des Proteins in den Zellkern ermöglicht, führen kann (Rodriguez-Vilarrupla *et al.*, 2002), hängt die Funktion von P21 möglicherweise von der subzellulären Lokalisation des Proteins ab. Vor kurzem veröffentlichte Daten weisen darauf hin, dass Onkogene wie *ERBB2* oder *E7* zum nukleären Export von P21 beitragen können (Westbrook *et al.*, 2002) und die zytoplasmatische Lokalisation für die Transformation der Zelle von Bedeutung ist. Von Zhou *et al.* konnte 2001 gezeigt werden, dass die Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionsweges durch *ERBB2* zur Phosphorylierung von P21 am Threonin 145 führt. Neben der weiter oben beschriebenen Wirkung auf die Interaktion von P21 und PCNA führt diese Modifikation zur Relokalisation von P21 ins Zytoplasma, durch die die Proliferation ebenfalls aktiviert wird. Die Phosphorylierung durch AKT scheint demzufolge ein wichtiger Mechanismus zur Umverteilung von P21 in den zellulären Kompartimenten zu sein. Weitere Befunde, die diese Beobachtungen unterstützen, konnten aus Untersuchungen in klinischen Studien gewonnen werden. Nachdem zunächst die Aktivierung von AKT mit schlechter Prognose für Brustkrebspatientinnen korreliert werden konnte (Perez-Tenorio *et al.*, 2002), waren Xia *et al.* (2004) in der Lage, eine Assoziation zwischen *ERBB2*-Überexpression, Aktivierung von AKT und der daraus resultierenden Phosphorylierung und zytoplasmatischen Lokalisation von P21 zu zeigen.

Die Untersuchung der intrazellulären Verteilung von P21 in den in dieser Arbeit generierten NeuT-Zelllinien hat sowohl in *Western Blot*-Analysen, als auch in indirekten Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt, dass die starke Induktion von P21 in erster Linie das

nukleäre Kompartiment der Zelle betrifft. Dieses Ergebnis war, in Anbetracht des NeuT-induzierten Zellzyklusarrestes, der eindeutig für eine nukleäre, wachstumsinhibierende Funktion von P21 spricht, nicht erstaunlich. Es stellt sich allerdings die Frage, was genau den Wechsel zwischen Tumorsuppression und Proliferationsförderung verursacht und zu welchem Zeitpunkt die Rolle von P21 sich ändert. In der vorliegenden Dissertation konnte weder die Umverteilung von P21 in das Zytoplasma, noch eine erhöhte Proliferation der Zellen als direkte Folge der onkogenen *ERBB2*-Überexpression beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ergibt sich aus dem Mehrschritt-Modell der Karzinogenese. Für die meisten Tumore konnte gezeigt werden, dass mehrere genetische Veränderungen in der Zelle für deren vollständige Transformation nötig sind. Im Fall der *ERBB2*-vermittelten Tumorgenese könnte die Aktivierung von AKT ein zweites Ereignis sein, das die Phosphorylierung und subzelluläre Umverteilung von P21 zur Folge hat. Auf diese Weise wird, nachdem zunächst durch nukleäres P21 Wachstumsarrest induziert wurde, die Proliferation in diesen Zellen aktiviert.

Auch für andere potente Onkogene, wie *RAS* und *RAF*, konnte bereits gezeigt werden, dass diese zunächst Wachstumsarrest in primären Zellen induzieren können (Serrano *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Crespo und Leon, 2000; Deng *et al.*, 2004). Dieser Zellzyklusarrest ist Teil eines Seneszenz-Programms, das in den Zellen abläuft, um sie vor Onkogeneinwirkung und zellulärem Stress zu schützen (Campisi, 2001; Okada und Mak, 2004). Die zelluläre Seneszenz gliedert sich dabei in zwei Arten, denen unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen. Bei der klassischen, replikativen Seneszenz handelt es sich um einen langsamen Prozess, der aus der sukzessiven Verkürzung der Telomere im Zuge der Replikation resultiert (De Pinho, 2000). Die sogenannte verfrühte Seneszenz (*premature senescence*) wird als Antwort auf DNA-Schäden (Di Leandro *et al.*, 1994; Robles *et al.*, 1998) oder infolge der Aktivierung starker Onkogene, wie beispielsweise *RAS* (Serrano *et al.*, 1997), eingeleitet. Dabei spielt die Verkürzung der Telomere keine Rolle (Michishita *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2001), weswegen die künstliche Telomerase-Expression in diesen Zellen die Einleitung der Seneszenz auch nicht verhindern kann (Morales *et al.*, 1999).

Typische Merkmale für beide Formen der Seneszenz sind P21- oder P16-assoziiertes Zellzyklusarrest, spezifische Veränderungen der zellulären Morphologie und die Expression von Seneszenzmarkern (Campisi, 1997; De Pinho, 2000). Einer dieser Marker ist die von Dimri *et al.* (1995) beschriebene Aktivität der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal), die durch Blaufärbung in seneszenten Zellen bei pH 6,0 nachgewiesen werden kann.

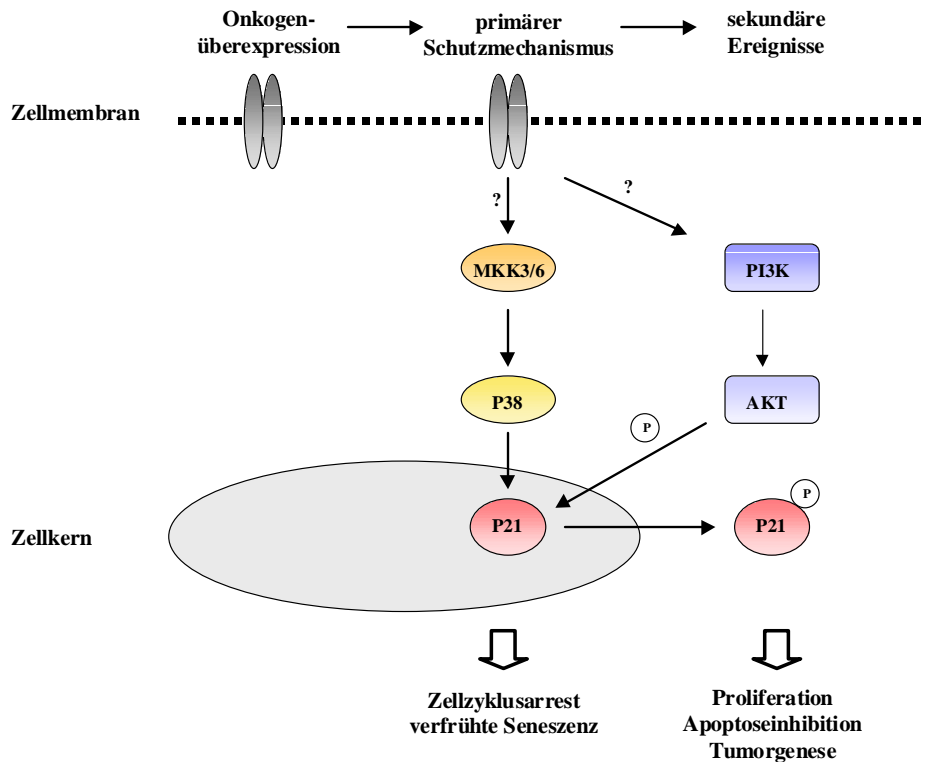
Bei den im Rahmen dieser Arbeit generierten Zelllinien konnten 48 h nach Induktion von NeuT erste morphologische Veränderungen beobachtet werden. Die eigentlich epithelialen, in Inseln aus mehreren Zellen wachsenden MCF-7 Zellen entwickelten einen spindelförmigen, fibroblastenähnlichen Phänotyp mit langen, zytoplasmatischen Zellfortsätzen. Ähnliche morphologische Veränderungen konnten auch von Egeblad *et al.* (2001) nach Überexpression einer N-terminal trunkierten ERBB2-Form in MCF-7-Zellen beobachtet werden. Nach Durchlaufen dieser spindelförmigen Zwischenstufe bildeten die Zellen ca. fünf Tage nach NeuT-Induktion einen Phänotyp aus, der dem seneszenten Zellen entspricht. Es entstanden große, abgeflachte Zellkörper mit einer Vielzahl vakuolärer Gebilde. Neben den morphologischen Veränderungen und der Induktion von P21, war auch die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase in über 50 % der NeuT-überexprimierenden Zellen aktiv (zum Vergleich: nur 4,4 % der uninduzierten Zellen waren positiv für diesen Marker). Zusammenfassend konnten die Induktion von P21, die phänotypischen Veränderungen der Zellen, sowie die erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten Galaktosidase einem NeuT-induzierten, verfrühten Seneszenz-Programm zugeordnet werden.

Die Induktion eines primären Schutzmechanismus durch ERBB2 war ein neuer Befund. Deswegen stellte sich die Frage, warum dieser Effekt in bisherigen Arbeiten nicht beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Versuchsaufbau, der dieser Arbeit zu Grunde lag. In den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen wurde ERBB2 bzw. NeuT konstitutiv in Zellen überexprimiert. Dadurch wurde möglicherweise auf zusätzliche Veränderungen, wie die Aktivierung von AKT selektioniert, mit Hilfe derer das initial induzierte Schutzprogramm der Zelle, die verfrühte Seneszenz, bereits überwunden wurde. Mit dem hier verwendeten Tet-*On*-System blieben die Zellen bis zur Induktion von NeuT durch Doxyzyklin unverändert, sodass initiale Prozesse, die durch die Onkogenaktivierung ausgelöst werden, nachweisbar waren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, über welche Signaltransduktionswege das Programm der verfrühten Seneszenz ausgelöst wird. Da P21 klassischerweise durch das Tumorsuppressorgen *P53* aktiviert wird, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proteine aus induzierten NeuT48-Zellen extrahiert und im *Western Blot* auf veränderte P53-Expression untersucht (Abb. 3.16). Da kein Anstieg der P53-Proteinkonzentrationen beobachtet werden konnte, war davon auszugehen, dass die durch onkogenes *ERBB2* ausgelöste Seneszenz über einen anderen Mechanismus gesteuert wird. Erst kürzlich konnte von Wang und seinen Mitarbeitern (2002) die durch RAS induzierte, verfrühte Seneszenz dem P38-MAPK-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden. Die

essenzielle Rolle von P38 bei der Induktion der verfrühten Seneszenz zeigte sich darin, dass bei Blockade dieses Proteins keine Seneszenz durch RAS induziert werden konnte. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die konstitutive Aktivierung von P38 durch die vorgeschalteten Kinasen MKK3 und MKK6 ausreicht, um Seneszenz in primären Fibroblasten oder Osteosarkomzellen auszulösen (Wang *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2002). Durch die Verwendung verschiedener Inhibitoren, die spezifisch die Aktivität einzelner Mitglieder der MAPK-Familie (ERK1/2, P38 und JNK) blockieren, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nur bei Blockade von P38 durch SB203580 die typischen Seneszenz-assoziierten morphologischen Veränderungen in den induzierten NeuT-Zellen unterbunden werden (siehe Abb. 3.22). Darüber hinaus ergaben quantitative Untersuchungen der P21-Expression in Inhibitor-behandelten und unbehandelten NeuT-Zellen mit bzw. ohne Doxyzyklin-Exposition (Abb. 3.23), dass die Blockade von P38 die ERBB2-induzierte P21-Expression fast vollständig unterbindet. Damit konnten zwei wichtige Bestandteile des verfrühten Seneszenz-Programms, namentlich die Aktivierung des CDKI P21 sowie die auffälligen morphologischen Veränderungen, dem P38-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden.

Zusammenfassend erlauben die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten, verknüpft mit bereits veröffentlichten Erkenntnissen, ein Modell der ERBB2-induzierten malignen Transformation epithelialer Zellen aufzustellen (Abb. 4.1). Dabei wird zunächst ein primärer Schutzmechanismus, die verfrühte Seneszenz, durch die Onkogenexpression induziert. Sie zeigt sich in Form von P21-Überexpression mit Lokalisation im Nukleus, morphologischen Veränderungen und Aktivierung der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase. Die Induktion des Seneszenz-Programms verläuft dabei vermutlich über den MEK-MKK3/6-P38-Signaltransduktionsweg. Sekundäre Ereignisse, wie z. B. die Aktivierung von AKT, infolgedessen die Phosphorylierung von P21 und dessen Translokation ins Zytoplasma erfolgen, führen dann zur Inaktivierung des Seneszenz-Programms, zur verstärkten Proliferation und Inhibierung der Apoptose in ERBB2-überexprimierenden Zellen. Die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, die in ERBB2-überexprimierenden Zellen zur Transformation führen, liefert neue Ansatzpunkte für Therapien. Neben der direkten Blockade von ERBB2 durch Medikamente, wie beispielsweise Herceptin<sup>TM</sup>, besteht die Möglichkeit, Wirkstoffe zu entwickeln, die gegen andere für die Tumorgenese essenzielle Proteine wie P21 (Weis *et al.*, 2003) oder AKT gerichtet sind.



**Abbildung 4.1: Modell der ERBB2-induzierten Karzinogenese.** Die Überexpression von ERBB2 führt zunächst über die Aktivierung der Kinasen MKK3/6 und P38 zur Expression des CDKI P21, der Zellzyklusarrest und verfrühte Seneszenz in den betroffenen Zellen induziert. Die Lokalisation von P21 ist dabei vorwiegend auf den Zellkern beschränkt. Weitere Mutationen und/oder die Aktivierung von Proteinen, wie beispielsweise AKT über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) führen zur Phosphorylierung und Relokalisierung von P21 ins Zytoplasma. Dort verliert das Protein seine wachstumsinhibierenden Eigenschaften und wirkt antiapoptotisch und proliferationsaktivierend, was letztendlich die Tumorentstehung fördert.

#### 4.1.2 *Microarray* zur Untersuchung der differentiellen Genexpression

Durch die Überexpression von ERBB2 in Tumorzellen wird die normale Signalweiterleitung über einige Signaltransduktionswege stark verändert, was zur Induktion bzw. Repression verschiedener Gene führt. Die Identifizierung dieser Gene trägt nicht nur zum besseren Verständnis der Vorgänge bei, die zur Entartung einer Zelle führen, sondern kann auch helfen, potenzielle Ziele für therapeutische Ansätze zu finden. Die Untersuchung der differentiellen Genregulation mit Hilfe von *Microarrays* wird mittlerweile häufig eingesetzt, um diagnostisch und prognostisch relevante Faktoren zu identifizieren. Dazu gehören z. B. der Vergleich verschiedener Krebszelllinien (Ross *et al.*, 2000) und Tumorgewebe (Perou *et al.*, 1999), aber auch die komparative Untersuchung von Geweben oder Zelllinien unter Berücksichtigung ihrer Östrogenabhängigkeit (Gruvberger *et al.*, 2001), der Invasivität oder ihres Metastasierungspotenzials (Zajchowski *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002) sowie die Suche nach vererbten Mutationen (Hedenfalk *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002). Optimal

für die Untersuchung differenzieller Genexpression infolge von Onkogenüberexpression wäre der Vergleich von Tumorgewebe mit benachbartem, gesundem Gewebe. Allerdings besteht bei solchen Experimenten, neben der klinischen und ethischen Bedenklichkeit, das Problem, dass die Heterogenität der Tumor- und Normalgewebe einen Vergleich erschweren kann. Außerdem häufen sich in den Tumoren oft weitere Mutationen an, die eine Aussage über die Effekte, die ein bestimmtes Onkogen verursacht, erschweren.

Durch die Verwendung von Tumorzelllinien können einige dieser Probleme umgangen werden, da diese in der Regel genau charakterisiert sind. Die in der vorliegenden Arbeit generierten, konditionalen NeuT-Zellen bieten aufgrund ihrer stringenten Regulierbarkeit weitere Vorteile für Hybridisierungsexperimente. Das gezielte An- und Abschalten der Genexpression in diesen Zellen ermöglicht eine zeitlich definierte „Aktivierung“ des Onkogens. Außerdem besitzen alle Zellen aufgrund der klonalen Selektion einen identischen genetischen Hintergrund. Mögliche klonale Effekte wiederum können durch die Untersuchung mehrerer unabhängiger Klone identifiziert werden. Da etwa sechs bis acht Stunden nach Doxyzyklin-Administration im *Western Blot* ein Anstieg der ERBB2-Proteinkonzentration in den NeuT48-Zellen erkennbar ist und nach 48 h erste morphologische Veränderungen in den Zellen auftreten, wurden diese beiden Induktionszeitpunkte gewählt, um die differenzielle Genexpression im Vergleich zu uninduzierten NeuT48-Zellen im *Microarray* zu analysieren. In Kooperation mit der AG Sahin/Türeci und der Firma Memorec Biotec wurde die RNA der Zellen auf einen *Gen-Chip* mit 1152 verschiedenen cDNAs hybridisiert und die Expressionsunterschiede quantifiziert. Dabei wurden alle Gene, deren Expressionsstärke sich um mindestens Faktor 2 von der nicht induzierter Zellen unterschieden, als differenziell exprimiert bewertet. Es zeigte sich, dass 105 Gene (davon 51 überexprimiert, 54 reprimiert) beim Vergleich uninduziert/8 h induziert und 156 Gene (davon 42 überexprimiert, 114 reprimiert) beim Vergleich uninduziert/48 h induziert unterschiedliche Expressionsmuster aufwiesen (Siehe Tab. 7.2 im Anhang). Zur Kontrolle der Hybridisierungsergebnisse wurden stichprobenartig einige Gene (VEGF, GADD45 $\alpha$ , BMP-1 und FANCA) ausgewählt, die in semiquantitativen RT-PCRs auf ihre differenzielle Expression überprüft wurden. Die Untersuchung der Induzierbarkeit mit dieser zweiten Methode ergab weitgehend übereinstimmende Ergebnisse (Abb. 3.26) mit den Daten aus dem *Microarray*-Experiment. Dies war der Anlass im Folgenden einzelne differenziell regulierte Gene auszuwählen, die bei der Entstehung ERBB2-induzierter Tumore eine Rolle spielen könnten und diese im Detail zu untersuchen.

#### 4.1.2.1 Überexpression von ERBB2 induziert Integrin $\alpha 5\beta 1$

Bei der Auswertung der *Microarray*-Daten hinsichtlich potenziell Tumor-relevanter Gene fiel die Induktion von *Integrin  $\alpha 5$*  (12,11 (8 h)/2,79 (48 h) siehe auch Tabelle 7.2 im Anhang) und *Integrin  $\beta 1$*  (3,97 (8 h)/3,58 (48 h)) auf. Sie bilden zusammen den Fibronektinrezeptor.

Die Integrine repräsentieren eine Familie transmembraner Zelladhäsionsmoleküle, die Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix verbinden. Die 23 bisher bekannten, heterodimeren Rezeptoren setzen sich aus Kombinationen von 17  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten zusammen (Reddy *et al.*, 2003). Darüber hinaus erhöhen alternatives Spleißen und posttranskriptionelle Modifikationen die Diversität der Integrine. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Integrin  $\alpha 5\beta 1$  bindet mit hoher Affinität und Spezifität an Fibronektin (Hemler *et al.*, 1990). Nachdem für beide Untereinheiten des Fibronektinrezeptors die Induktion durch ERBB2 sowohl auf RNA-Ebene als auch im *Western Blot* gezeigt werden konnte, wurde für die funktionale Untersuchung des Proteins ein Adhäsionsassay etabliert. Mit diesem Assay konnte gezeigt werden, dass induzierte NeuT48-Zellen im Vergleich zu uninduzierten NeuT48-Zellen oder induzierten EGFP10-Kontrollzellen tatsächlich eine fast dreimal höhere Affinität für Fibronektin haben (siehe Abb. 3.30).

Da das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Zellen bei der Invasion von Tumorzellen in benachbartes Gewebe und bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielt, wurde die Expression und Funktion von Integrinen schon vielfach sowohl in Tumoren als auch in Zellkulturexperimenten untersucht. Es zeigte sich, dass die Ablösung einzelner Zellen vom Primärtumor, deren Migration und Adhäsions-unabhängiges Wachstum auf veränderte Integrin-Expressionsmuster in den Tumoren zurückzuführen sind. Dies wurde besonders intensiv in malignen Melanomen untersucht, bei denen erhöhte Integrin  $\alpha 2\beta 1$ - und  $\alpha v\beta 3$ -Expression zu verstärkter Invasion und Metastasierung führen (Gehlsen *et al.*, 1992; Nip *et al.*, 1992). Erste Studien über die Expression des Fibronektinrezeptors in verschiedenen Tumoren ergaben allerdings eine inverse Korrelation zwischen der Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Expression und dem transformierten Phänotyp von Tumorzellen (Plantefaber und Hynes, 1989; Giancotti und Ruoslahti, 1990). Außerdem zeigte Ruoslahti (1994), dass die Tumorigenität von Zellen durch Transfektion und Überexpression von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  unterdrückt werden kann, wohingegen sie in Fibronektinrezeptor-negativen Zellen erhöht ist. Im Widerspruch zu diesen Daten stehen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass die Bindung von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  an Fibronektin Mitogen-abhängig die Proliferation von epithelialen und endothelialen Zellen fördert und das Durchlaufen des Zellzyklus' stimuliert (Symington *et al.*, 1995; Sastry

*et al.*, 1996; Danen *et al.*, 2000; Kuwada und Li, 2000). Eine mögliche Erklärung für diese ambivalente Rolle des Fibronektinrezeptors ist die Verfügbarkeit seines Liganden Fibronektin. So konnten Varner *et al.* (1995) zeigen, dass der unbesetzte Fibronektinrezeptor zelluläre Proliferation inhibiert, wohingegen die Bindung an Fibronektin diesen Effekt umkehrt. Eine ähnliche Konstellation wurde auch für Integrin  $\alpha 2\beta 1$  und dessen Bindung an Collagen demonstriert (Koyama *et al.*, 1996; Henriët *et al.*, 2000). In Anbetracht dieser Befunde ist es möglich, dass die erhöhte Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Expression in den induzierten NeuT- und hNeu-Zellen, durch den Mangel an Fibronektin, auch einen Teil zur Proliferationsinhibition in diesen Zellen beiträgt. Demzufolge wäre es für weiterführende Experimente interessant zu untersuchen, ob und wie sich das Wachstum induzierter NeuT-Zellen auf unbeschichteten und Fibronektin-beschichteten Zellkulturschalen voneinander unterscheidet. Zhang und seine Mitarbeiter konnten 1995 zeigen, dass Hamsteroarialzellen, die Integrin  $\alpha 5\beta 1$  exprimieren, bei Serumentzug nicht apoptotisch werden, wenn sie auf Fibronektin-beschichteten Oberflächen wachsen. Auch O'Brien *et al.* kamen 1996 zu dem Schluss, dass eine erhöhte Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Expression Zellen vor Apoptose schützt. Diese Apoptoseresistenz konnte der Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -vermittelten Induktion des antiapoptotischen Proteins *B-cell lymphoma* (BCL)-2 zugeordnet werden (Zhang *et al.*, 1995). Lee und seine Mitarbeiter fanden 2000 heraus, dass die Überexpression von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  in Darmepithelzellen den PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg aktiviert. Durch die Aktivierung dieser Kaskade werden Prozesse wie Proliferation, zelluläres Überleben und Apoptoseresistenz reguliert. Interessanterweise wird über diesen Weg auch BCL-2 aktiviert. Die Blockade der PI3K mit spezifischen Inhibitoren oder die Expression von dominant-negativem AKT inhibierte diese Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -induzierten, antiapoptotischen Effekte. Folglich scheint der Schutz gegen proapoptotische Stimuli durch Integrin  $\alpha 5\beta 1$  über eine Aktivierung des PI3K-AKT-Weges realisiert zu werden.

Neben ihrer Aufgabe, an die hochmolekularen Bestandteile der extrazellulären Matrix oder an Rezeptoren anderer Zellen zu binden, spielen die Integrine auch eine wichtige Rolle als Signaltransduktoren. Sie besitzen zwar selbst keine intrinsische Enzymaktivität, stimulieren aber verschiedene Signaltransduktionskaskaden durch die Assoziation mit Kinasen und Adaptorproteinen in den fokalen Adhäsionskomplexen und können so die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration von Zellen beeinflussen. Auf diese Weise stimulieren Integrine beispielsweise zelluläre Proliferation über die Expression von Cyclinen (Assoian und Schwartz, 2001) und initiieren durch die Aktivierung von RHO- und RAC-GTPasen Zellmigration (Ren *et al.*, 1999). Durch das Zusammenspiel von Integrinen und



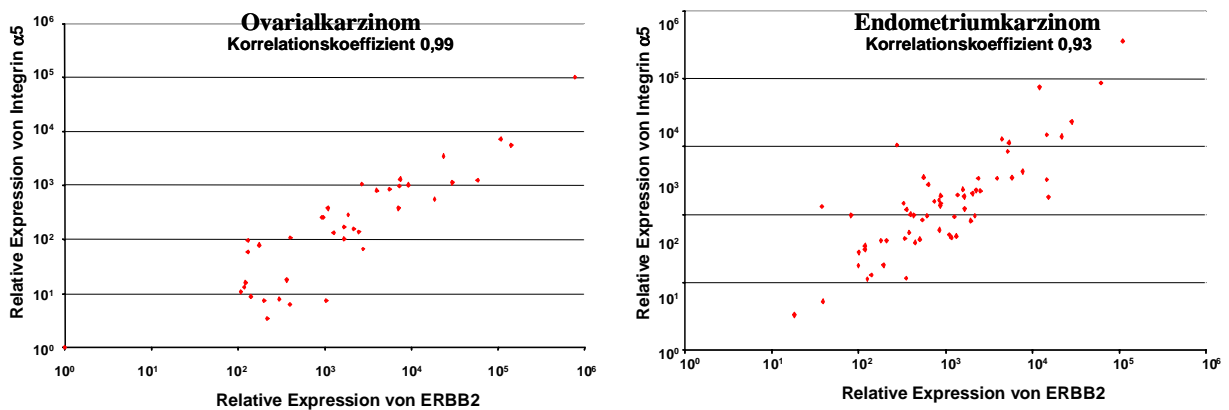
Wachstumsfaktorrezeptoren können biochemische Reaktionen in der Zelle verstärkt werden, was zur schnelleren und effizienteren Umsetzung initialer Signale führt. Eine der ersten Interaktionen zwischen Integrin und Wachstumsfaktorrezeptor konnte 1995 von Woodard *et al.* an Integrin  $\alpha v\beta 3$  und dem *Platelet derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor nachgewiesen werden. Sie regulieren gemeinsam endotheliale Zellmigration und potenzieren Signale, die durch PDGF initiiert werden (Schneller *et al.*, 1997). Mittlerweile konnten auch für die Rezeptoren der EGFR-Familie und ihre Liganden Interaktionen mit Integrinen aufgezeigt werden. EGF und Heregulin- $\beta$  stimulieren beispielsweise die Integrin  $\beta 1$ -abhängige Adhäsion und Migration von MDA-MB-435 Brustkarzinomzellen an Oberflächen, die mit Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet sind (Adelsman *et al.*, 1999) und die Wechselwirkung von Integrinen mit dem EGF-Rezeptor resultiert in der Aktivierung von MAP-Kinasen (Miyamoto *et al.*, 1996; Moro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Für ERBB2 konnte bereits die Assoziation mit den Integrinen  $\alpha 6\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 4$  nachgewiesen werden (Falcioni *et al.*, 1997; Gambaletta *et al.*, 2000). Die Bedeutung für die ERBB2-induzierte Integrin-Expression liegt somit nicht nur im veränderten Adhäsions- und Migrationsverhalten der Zellen, sondern möglicherweise auch in der Modulation der Signaltransduktion durch ein Zusammenspiel von ERBB2 und Integrin  $\alpha 5\beta 1$ .

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Tumorgenese ist die Beteiligung einiger Integrine an der Bildung von Blutgefäßen. Die Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  sind in Endothelien während der Angiogenese signifikant erhöht (Kim *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 1994), wohingegen sie in ruhenden Endothelien nicht exprimiert werden. Für Integrin  $\alpha 5\beta 1$  konnte außerdem gezeigt werden, dass dessen Deletion in Mausembryonen Defekte bei der Organisation des vaskulären Systems verursacht (Yang *et al.*, 1993; Goh *et al.*, 1997). In Blutgefäßbiopsien humaner Tumore wurde sowohl die Überexpression von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  als auch die seines Liganden Fibronectin nachgewiesen. Antagonisten in Form von Antikörpern und Peptiden gegen Integrin  $\alpha 5\beta 1$ , Integrin  $\alpha v\beta 3$  oder Fibronectin inhibieren sowohl die normale Wachstumsfaktor- als auch die Tumor-induzierte Angiogenese und darüber hinaus sogar Tumorwachstum und -metastasierung (Brooks *et al.*, 1994; Carron *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Stoeltzing *et al.*, 2003). Aus diesem Grund werden momentan humanisierte  $\alpha 5\beta 1$ -Antikörper in klinischen Studien getestet und an der Entwicklung  $\alpha 5\beta 1$ -blockierender Peptide zur Inhibierung Integrin-induzierter Angiogenese und Metastasierung gearbeitet (Carron *et al.*, 1998; Reinmuth *et al.*, 2003; Stoeltzing *et al.*, 2003).

Die Expression von Integrin  $\alpha 5\beta 1$  in induzierten NeuT- und hNeu-Zellen stellt einen vor diesem Hintergrund sehr interessanten Befund dar. Da bisher noch kein Zusammenhang

zwischen der Expression des Fibronectinrezeptors und der Überexpression von ERBB2 beschrieben wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Korrelation zwischen ERBB2 und Integrin  $\alpha 5\beta 1$  in einigen Mammakarzinombiopsien, die uns freundlicherweise von der Uniklinik Mainz zur Verfügung gestellt wurden, untersucht werden. Bei den Tumoren wurde auf Proteinebene im *Western Blot* sowohl die Stärke der ERBB2- als auch die der Integrin  $\alpha 5$ - und Integrin  $\beta 1$ -Expression ermittelt. Es konnte gezeigt werden (siehe Abb. 3.31), dass die Expression von Integrin  $\alpha 5$  weitgehend mit dem ERBB2-Status der Tumore korreliert. Für Integrin  $\beta 1$  konnte dieser Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Die Expression dieses Proteins war, unabhängig von der ERBB2-Expressionsstärke, in den meisten Tumoren nachweisbar. Die Verfügbarkeit von Integrin  $\beta 1$  in praktisch allen Mammakarzinomen weist Integrin  $\alpha 5$  die Rolle als limitierenden Faktor für die Bildung des Fibronectinrezeptors zu.

Nachdem mit der Untersuchung der Mammakarzinome erste Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem ERBB2-Status von Tumoren und der Integrin  $\alpha 5$ -Expression gefunden werden konnten, wurden in Kooperation mit der AG Sahin/Türeci Endometrium- und Ovarialkarzinom-Tumorbanken in quantitativen RT-PCRs auf die *ERBB2*- und *Integrin  $\alpha 5$* -Expression untersucht (Abb. 4.2).



**Abbildung 4.2: Quantitative RT-PCR zur Untersuchung der Expression von *ERBB2* und *Integrin  $\alpha 5$*  in Endometrium- und Ovarialkarzinomen.** RNA aus 39 Ovarialkarzinomen und 61 Endometriumkarzinomen wurde in quantitativen *real time* RT-PCRs im *TaqMan* auf die Expression von *ERBB2* und *Integrin  $\alpha 5$*  untersucht und die Expressionsniveaus miteinander in Beziehung gesetzt. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten sind in der Abbildung angegeben. Die Normalisierung der Proben erfolgte über die Quantifizierung der 18s-RNA in jeder Probe.

Bei diesen Untersuchungen ergab sich eine lineare Korrelation zwischen der *ERBB2*- und *Integrin  $\alpha 5$* -Expression in beiden Tumorarten. Mit der signifikanten Korrelation der beiden Proteine, sowohl auf Zellkulturebene als auch in unterschiedlichen Tumoren, konnte nicht nur

ein weiteres durch ERBB2 induzierbares Gen gefunden werden, sondern auch ein potenzielles Ziel für therapeutische Ansätze in ERBB2-überexprimierenden Tumoren.

#### 4.1.2.2 Induktion von Matrix-Metalloproteinasen durch NeuT

Ein weiteres interessantes Gen, das nach Auswertung des *Microarrays* als NeuT-induziert eingestuft wird, ist *MMP-9*. Es gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die aufgrund ihrer unterschiedlichen Proteaseaktivitäten praktisch alle Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) prozessieren können (Vu und Werb, 2000; Egeblad und Werb, 2002; Puente *et al.*, 2003). Die MMPs sind  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängige Enzyme, die durch das Entfernen einer Prodomäne am N-Terminus aktiviert werden. Die Aktivierung verläuft schrittweise und kann sowohl durch Autoproteolyse als auch mittels enzymatischen Verdaus durch eine andere MMP oder eine Serinprotease initiiert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind 24 humane *MMP*-Gene bekannt, die sich aufgrund ihrer Substratspezifität in sechs Untergruppen gliedern: Die Collagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), die Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), die Matrilysine (MMP-7, MMP-26), die MMPs vom Membran-Typ (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) und die Gruppe der anderen MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-23, MMP-27, MMP-28), die sich in keine der vorherigen Gruppen einordnen lassen. Die proteolytische Aktivität der MMPs wird durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen reguliert. Dazu gehören die Kontrolle auf transkriptioneller Ebene, die fein abgestimmte Aktivierung der Vorläufer-MMPs, die Inhibierung der MMPs durch Interaktion mit spezifischen ECM-Komponenten, sowie die Blockade der MMP-Aktivität durch die endogenen *tissue inhibitors of MMPs* (TIMPs) (Visse und Nagase, 2003). Ursprünglich wurde den MMPs aufgrund ihrer Fähigkeit, die Komponenten der ECM zu degradieren, eine bedeutende Rolle bei der Tumormetastasierung zugeschrieben. Allerdings hat die Charakterisierung dieser Proteinasen gezeigt, dass sie nicht nur als Mediatoren in späten Tumorstadien fungieren, sondern auch Anteil an Effekten in frühen Stadien der Tumorgenese haben. So beeinflussen einige MMPs die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, indem sie beispielsweise deren Bindeproteine degradieren. Außerdem können durch die Freisetzung verschiedener ECM-gebundener Mitogene, wie z. B. TGF- $\beta$  (Imai *et al.*, 1997) Signaltransduktionskaskaden initiiert werden, die Tumorinitiation und -wachstum steuern.

Bei der Untersuchung differenzieller Genexpression in NeuT48-Zellen, die 8 h bzw. 48 h mit Doxyzyklin induziert und im *Microarray* mit den uninduzierten Zellen verglichen wurden,

zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von *MMP-9* nach 48-stündiger Doxyzyklin-Inkubation (*Microarray*-Ergebnisse: 0,81 (8 h)/4,14 (48 h); siehe auch Tabelle 7.2 im Anhang). Semiquantitative RT-PCR-Experimente aller NeuT-Klone und des Kontrollklons EGFP10 bestätigten dieses Ergebnis (siehe Abb. 3.32). *MMP-9* (Gelatinase B) gehört zusammen mit *MMP-2* (Gelatinase A) zu den Gelatinasen, die sich von den anderen MMPs durch drei FibronectinII-Tandemwiederholungen am N-Terminus der katalytischen Domäne unterscheiden, welche die Bindung an Gelatine ermöglichen (Murphy *et al.*, 1994). Diese Eigenschaft kann zum Nachweis der Gelatinaseaktivität in sogenannten Zymografie-Assays genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden für diesen Assay Überstände der NeuT-Zellen und der Kontrollzelllinie EGFP10 (jeweils 48 h +/- Doxyzyklin) in gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und der Abbau der Gelatine untersucht. Für alle induzierten NeuT-Klone konnte eine massive Aktivität von *MMP-9* nachgewiesen werden. Neben der Gelatinase B-Aktivität zeigte sich auch ein Abbau der Gelatine infolge aktiver Gelatinase A (*MMP-2*) in den NeuT-überexprimierenden Zellen. Die erhöhte Expression und Aktivität von *MMP-2* nach Transfektion von ERBB2 oder RAS in MCF-10 Zellen konnte bereits 1995 von Giunciuglio *et al.* gezeigt werden und ist eine weitere Bestätigung für die Funktionalität des im Rahmen dieser Arbeit generierten konditionalen Systems. Sowohl *MMP-9* als auch *MMP-2* wurden mit dem Stadium der Invasivität verschiedener Karzinome korreliert. Dieser Zusammenhang erscheint logisch in Anbetracht ihrer Eigenschaft, Kollagen Typ IV, den Hauptbestandteil der Basalmembran, zu degradieren (Stetler-Stevenson, 1990).

Die erhöhte Expression von *MMP-9* ist bei vielen Krebsarten, wie Brust-, Prostata-, Blasen-, Hirntumoren und Melanomen mit erhöhter Metastasierung assoziiert worden (Hujanen *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1993 und Sehgal *et al.*, 1996). Bei der Untersuchung klinisch signifikanter Zusammenhänge zwischen der Expression von ERBB-Rezeptoren und MMPs in Plattenepithelkarzinomen des HNO-Bereiches, konnten erhöhte ERBB2- und EGFR-Level mit der Expression von u. a. *MMP-2* und *MMP-9* korreliert werden (O-charoenrat *et al.*, 2002). Auch in einer Brustkrebsstudie mit 80 Patientinnen und 22 freiwilligen Kontrollpersonen, bei der *MMP-2* und *MMP-9* als putative Tumormarker untersucht wurden, konnte die erhöhte Gelatinase-Aktivität in Seren der Patienten mit ERBB2-Überexpression korreliert werden (La Rocca *et al.*, 2004). Der klinische Zusammenhang zwischen ERBB2-Überexpression und der erhöhten Aktivität von *MMP-9* in verschiedenen untersuchten Tumoren untermauert die in den NeuT-Zellen beobachtete Induktion der *MMP-9*-Expression und der Gelatinaseaktivität im Zymografie-Assay. Bei *in vitro*-Experimenten mit unterschiedlichen Brustkarzinomzelllinien wurden auf der Suche nach

den relevanten Signaltransduktionskaskaden, die zur Expression von MMP-9 führen, verschiedene Liganden der EGF-Rezeptorfamilie eingesetzt. Dabei konnte in Arbeiten mit SKBR3- (starke Metastasierung) und MCF-7-Zellen (keine Metastasierung) gezeigt werden, dass epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Amphiregulin (AR), beides Liganden des EGF-Rezeptors, zur Expression von MMP-9 führen (Kondapaka *et al.*, 1997). Ferner konnten Yao *et al.* (2001) in diesen Zellen zeigen, dass die MMP-9-Expression durch Heregulin- $\beta$ 1, einem Liganden für ERBB3/ERBB2- und ERBB4/ERBB2-Heterodimere, induziert wird und dieser Effekt über mehrere Signaltransduktionswege gesteuert wird. Durch gezielte Blockade mit spezifischen Inhibitoren konnten er und seine Mitarbeiter die MAPK P38 und die Proteinkinase C (PKC) als entscheidende Mediatoren der Heregulin- $\beta$ 1-vermittelten MMP-9-Induktion identifizieren. Die Inhibierung der MAPK ERK1/2 und der PI3K erwiesen sich hingegen als wenig bzw. gar nicht involviert. Aufgrund dieser Befunde war es interessant, in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, welche Signaltransduktionswege für die Induktion der MMP-9 infolge der NeuT-Expression in MCF-7-Zellen verantwortlich sind. Nach Blockade der Proteinkinasen ERK1/2, JNK, P38 und PI3K mit spezifischen Inhibitoren wurden die verschiedenen NeuT-Zellen und die Kontrolllinie EGFP10 (+/- Doxyzyklin) im Zymografie-Assay auf die verbleibende MMP-9-Aktivität untersucht (siehe Abb. 3.34). Nur der Einsatz des P38-Inhibitors SB203580 führte dabei zur vollständigen Blockade der MMP-9-Aktivität. Leider war es nicht möglich, die MMP-9-Aktivität nach Inkubation der NeuT-Zellen mit dem Inhibitor für die PKC zu untersuchen, da die Zellen die kombinierte Gabe von Inhibitor und Doxyzyklin nicht überlebten. Dieses Experiment wäre im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Heregulin- $\beta$ 1-induzierten Aktivierung der PKC und der MMP-9-Expression in MCF-7- und SKBR3-Zellen sehr interessant gewesen. Trotzdem stellt die Überexpression von NeuT einen wichtigen Mechanismus zur Induktion der MMP-9-Aktivität dar, der im Rahmen dieser Dissertation dem P38-Signaltransduktionsweg zugeordnet werden konnte.

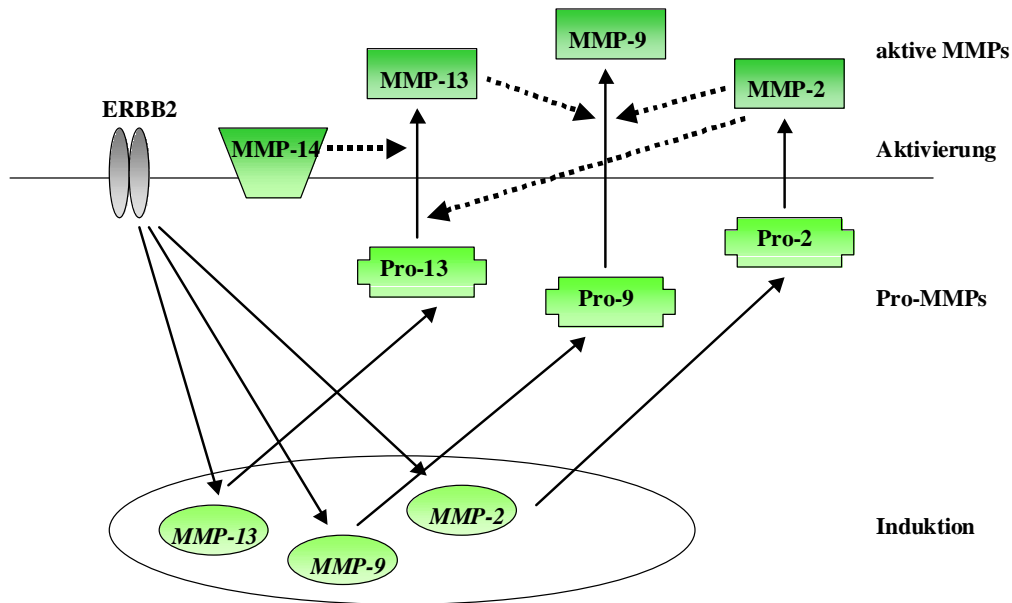
Die differenzielle Genexpressionsanalyse induzierter und uninduzierter NeuT48-Zellen im *Microarray* erbrachte leider aufgrund nicht detektierbarer Hybridisierungen keine Hinweise auf weitere MMPs, die durch die NeuT-Expression induziert werden. Allerdings ergaben sich bei Literaturrecherchen Hinweise auf ein weiteres Mitglied der MMP-Familie, dessen Expression für die NeuT-induzierte Karzinogenese interessant sein könnte. MMP-13 wurde 1994 von Freije *et al.* im Rahmen von Expressionsstudien aus einer Brustkarzinom-cDNA-Bank isoliert. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu den anderen Collagenasen wurde dieser neu entdeckten MMP der Name Collagenase-3 gegeben. Neben dem proteolytischen Abbau

von fibrillärem Collagen, insbesondere Collagen Typ II, kann MMP-13 aufgrund seiner Gelatinaseaktivität auch Gelatine als Substrat verarbeiten. Expressionsstudien ergaben, dass MMP-13 in erster Linie während der Knochenentwicklung (Johansson *et al.*, 1997) exprimiert wird, wohingegen eine Expression in adulten Geweben nicht detektierbar ist. Durch die enorme Bandbreite an Substraten, die von MMP-13 degradiert werden können, bedarf diese Collagenase einer stringenten Regulierung, wobei sie gleichzeitig ein potentes „Werkzeug“ für Tumorzellen sein könnte. Trotz der Entdeckung von MMP-13 in Brustkarzinomen wurde das Enzym aufgrund seiner Expression in sich entwickelndem Knochengewebe und der Beteiligung an entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen (Wernicke *et al.*, 1996; Reboul *et al.* 1996) zunächst überwiegend in diesem Zusammenhang untersucht. Erst in den letzten Jahren wurde die Expression dieser Proteinase in verschiedenen malignen Tumoren, wie Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich (Johansson *et al.*, 1997; Uria *et al.*, 1998), Chondrosarkomen, Oesophagus- und Blasenkarzinomen (Bostrom *et al.*, 2000) entdeckt. In einer Studie mit Magenkrebspatienten zeigten immerhin 21 % MMP-13-Expression, wohingegen in den gesunden, korrespondierenden Schleimhautgeweben der Patienten keine MMP-13 detektiert werden konnte (Elnemr *et al.*, 2003). Sowohl in der oben genannten Magenkrebsstudie als auch in einer Studie, in der kolorektale Tumore analysiert wurden (Leeman *et al.*, 2002), konnte die MMP-13-Expression mit schlechter Prognose für die Patienten korreliert werden. Die Tatsache, dass die Expression von MMP-13 in verschiedenen Tumoren, insbesondere auch bei Mammakarzinomen eine Rolle spielt und bisher weder *in vivo* noch *in vitro* Untersuchungen im Zusammenhang mit ERBB2 gemacht wurden, war der Anlass, im Rahmen dieser Arbeit die MMP-13-Expression in den NeuT-Zellen zu untersuchen. Semiquantitative RT-PCR-Experimente zeigten eine eindeutige Induktion von *MMP-13* in den induzierten NeuT3, NeuT15 und NeuT48-Zellen (Abb. 3.35). Die analoge Untersuchung der *MMP-13*-Expression in den hNeu-Zellen ergab lediglich für den am stärksten ERBB2-exprimierenden Klon hNeuIV eine deutliche *MMP-13*-Induktion, was auf eine Korrelation der MMP-13-Expression mit der Stärke der Überexpression der humanen ERBB2-Variante schließen lässt. Da MMP-13 neben der Collagenase- auch Gelatinaseaktivität besitzt, sollte die Funktionalität des Enzyms in NeuT-Zellen in der vorliegenden Arbeit, wie auch schon für MMP-2 und MMP-9, mit Hilfe eines Zymografie-Assays überprüft werden. Leider konnte keine MMP-13-Aktivität in gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die hohe Sensitivität der Collagenasen gegenüber Tetrazyklin und analoger Substanzen *in vitro*. So konnten Greenwald *et al.* (1998) zeigen, dass Tetrazyklin und analoge Substanzen zur

Inhibierung der Matrix-degradierenden Eigenschaften von MMPs führen kann. Dabei ist MMP-13 am sensitivsten und schon geringste Mengen Tetracyclin blockieren bei diesem Enzym sowohl die Collagenase- als auch die Gelatinaseaktivität. Da für die Expression von NeuT Doxyzyclin im Zellkulturmedium verabreicht werden muss, kann zwar die Expression von MMP-13 durch NeuT induziert werden, die Messung der Aktivität in den Zellkulturüberständen ist aber nicht möglich, weil diese vermutlich durch das Antibiotikum inhibiert wird.

Die Expression von *MMP-13* durch erhöhte ERBB2-Expression stellt ein neues, bisher unveröffentlichtes Ergebnis dar. Um sicherzugehen, dass die Induktion von *MMP-13* durch ERBB2 kein für MCF-7-Zellen spezifisches Phänomen ist, sondern ein genereller Mechanismus, wurde dieser Zusammenhang zwischen ERBB2 und MMP-13 in einem weiteren zellulären System untersucht. So konnte für NIH3T3 Mausfibroblasten gezeigt werden (Abb. 3.38), dass auch in diesem Zelltyp die Überexpression von NeuT zur Induktion der *MMP-13* führt.

Die potenzielle Rolle, die MMP-13 bei der ERBB2-induzierten Tumorgenese haben könnte, erweist sich als sehr interessant. Nicht nur die breite Substratverwertung, die MMP-13 zum optimalen „Werkzeug“ von Tumorzellen bei so relevanten Prozessen wie Invasion und Metastasierung macht, sondern auch das Zusammenspiel mit anderen MMPs (Abb. 4.3) demonstrieren die Wichtigkeit dieses Enzyms. So können MMP14 (MT1-MMP), eine MMP vom Membran-Typ und MMP-2, die auch durch ERBB2-Expression induziert wird, zur Aktivierung der Pro-MMP-13 führen (Knäuper *et al.*, 1996). Diese aktiviert dann ihrerseits wiederum Pro-MMP-9, die ebenfalls ERBB2-reguliert ist (Knäuper *et al.*, 1997). Neben der aktiven MMP-13 kann außerdem auch MMP-2 zur Aktivierung von MMP-9 führen (Fridman *et al.*, 1995). Zusammenfassend führt die Überexpression von ERBB2 zur Induktion verschiedener MMPs, die sich durch ein verzweigtes Zusammenspiel gegenseitig aktivieren können.



**Abbildung 4.3: Zusammenspiel der durch ERBB2 induzierten Matrix-Metalloproteinasen.** ERBB2 induziert die Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13, die als Pro-MMPs so lange ohne Funktion bleiben, bis sie durch andere MMPs oder Enzyme aktiviert werden. Die Aktivierung der verschiedenen MMPs untereinander ist hier durch unterbrochene Pfeile dargestellt.

#### 4.2 Herstellung und Untersuchung transgener *Responder*-Mäuse

Gentechnisch veränderte Mäuse spielen eine fundamentale Rolle als Modellorganismen in der biomedizinischen Forschung. Die Entwicklung der konditional-induzierbaren Genexpression, beispielsweise mit Hilfe des Tet-Systems (Gossen und Bujard, 1992), hat Arbeiten mit solchen Modellorganismen zur Untersuchung verschiedenster Erkrankungen eine weitere Qualität verliehen. Besonders in der Krebsforschung bietet das gezielte An- und Abschalten von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen die Möglichkeit, Entstehung, Wachstum und Metastasierung von Tumoren schrittweise zu untersuchen und dabei z. B. jene Stadien zu identifizieren, in denen eine Tumorregression noch möglich ist. Außerdem kann mit Hilfe solcher induzierbarer Modelle Tumorstadien-spezifisch die Regulation der unterschiedlichsten zellulären Signaltransduktionskaskaden und das Potenzial verschiedener Medikamente getestet werden. Da die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 bei der Entstehung vieler epithelialer Tumore, wie Mamma-, Ovarial-, Lungenkarzinome und Tumore des gastrointestinalen Traktes beteiligt ist, stellt eine Mauslinie, die induzierbar und reversibel ERBB2 in verschiedenen relevanten Geweben exprimiert ein optimales Modell zur Erforschung der ERBB2-vermittelten Tumorgenese dar. Nachdem die Funktionalität des in der vorliegenden Arbeit klonierten pINSpBI-EGFP/NeuT-Konstruktes in verschiedenen Zellkultur-experimenten demonstriert werden konnte, sollte neben den oben beschriebenen *in vitro*-Systemen ein *in vivo*-Modell generiert werden, mit dessen Hilfe NeuT, die onkogene zum



menschlichen *ERBB2*-Gen homologe Rattenvariante, gewebespezifisch und regulierbar in Mäusen exprimiert wird. Die gewebespezifische Expression von NeuT in unterschiedlichen Epithelien ist hier deswegen möglich, weil beim Mausmodell, im Gegensatz zu den Zelllinien das rtTA- bzw. tTA-Effektor-Konstrukt vom NeuT-Responder-Konstrukt getrennt in zwei unterschiedlichen Mauslinien vorliegt. Im Verlauf der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an Effektor-Mäusen generiert, die den tTA bzw. rtTA unter der Kontrolle verschiedener gewebespezifischer Promotoren exprimieren. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch Paarung von Effektor-Tieren mit transgenen Tet-O/GenX-Responder-Mäusen, ein beliebiges GenX regulierbar und gewebespezifisch zu exprimieren. Mit einer NeuT-Responder-Maus kann durch Kreuzung mit Effektor-Mäusen, die den rtTA oder tTA spezifisch in Mamma-, Ovarial-, Lungenepithel oder anderen relevanten Epithelien exprimieren, für verschiedene Tumore mit *ERBB2*-Relevanz ein Tumormodell generiert werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt existieren schon konditional-induzierbare *ERBB2*-Modellmäuse, die das Onkogen spezifisch im Epithel der Brust (Moody *et al.*, 2002) und der Haut (Xie *et al.*, 1999) überexprimieren. In diesen konnte auch die Bildung von Hyperplasien und soliden Tumoren beobachtet werden. Dennoch sind die genauen Mechanismen, über die *ERBB2* zur Tumorentstehung führt noch weitgehend ungeklärt. Die Herstellung weiterer Tumormodelle, mit denen die *ERBB2*-induzierte Tumorgenese in unterschiedlichen Geweben verglichen werden kann, ist ein wichtiger Schritt zum Verständnis der komplexen Vorgänge, die zur Bildung des jeweiligen Tumors führen.

Die Untersuchung von 36 putativ transgenen *Founder*-Tieren ergab vier transgene *Founder*-Linien (INS12, INS19, INS20 und INS69), die das pINSpBI-EGFP/NeuT-Konstrukt in ihr Genom integriert haben. Nachdem überprüft worden war, dass das NeuT-Konstrukt jeder Linie auch an die Filialgeneration weitergegeben wird und genügend Nachkommen von allen vier Linien für weitere Experimente zur Verfügung stehen, sollte untersucht werden, inwieweit die generierten Linien stringent Doxyzyklin-regulierbar sind. Da bei Pronukleusinjektionen das Konstrukt ungerichtet in das Genom des Tieres integriert wird, besteht die Möglichkeit, dass durch Positionseffekte die stringente Regulierbarkeit des transgenen Locus nicht gewährleistet ist. Diese Effekte sollten durch die Verwendung von Isolatorsequenzen (Potts *et al.*, 2000) unterbunden werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolatoren stammen aus dem  $\beta$ -Globin-Genlocus des Huhnes, in dem am 5'-Ende vier DNaseI-hypersensitive Stellen (HS1-4) aneinander gereiht in der sogenannten Locus Kontrollregion (LCR) liegen (Fleenor *et al.*, 1993). Diese üben klassische Isolatoraktivität aus, indem sie die Interaktion zwischen dem Promotor und *Enhancer*-Elementen unterbinden

und die Genexpression unabhängig von der Positionierung im Chromatinkontext gewährleisten. Die Auswirkung des Einbaus von Isolatoren auf die Genexpression in transgenen Mäusen wurde 2003 eindrucksvoll von Rival-Gervier *et al.* demonstriert. Die Analyse sechs transgener Mauslinien, die Luziferase unter Kontrolle des *whey acidic protein* (WAP)-Promotors exprimieren und von Isolatorsequenzen flankiert waren, ergab Luziferase-Expression in allen Linien wohingegen von acht untersuchten Linien ohne Isolatorsequenzen nur in zwei Luziferaseaktivität nachweisbar war. Es zeigte sich aber in der Vergangenheit auch, dass diese Sequenzen die Regulierbarkeit der Gene zwar verbessert, aber Einflüsse von *Enhancer*- und *Silencer*-Elementen nicht vollständig unterbinden können. Besonders für konditionale Modelle wie das Tet-System tragen Isolatorsequenzen zwar zur Verbesserung der Regulierbarkeit bei, können aber leider nicht immer das Auftreten einer basalen Transgenexpression verhindern.

Aus diesem Grund war es nach Herstellung der transgenen Gründerlinien wichtig, zunächst eine eventuell vorhandene basale Expression des *NeuT*-Onkogens in den Tieren auszuschließen. Die stringente Regulierbarkeit der Expression ist bei Onkogenen besonders wichtig, da diese schon bei geringer Expression das fein abgestimmte Signaltransduktionsnetzwerk der Zelle nachhaltig beeinflussen und verändern können. Von den transgenen Mäusen wurde deshalb aus verschiedenen Organen RNA extrahiert und in RT-PCR-Experimenten mit *NeuT*-spezifischen Oligonukleotiden die Expression des Transgens untersucht. Es zeigte sich, dass zwei der vier Linien (INS19 und INS69) auch in Abwesenheit eines Induktors *NeuT* exprimieren und mit diesen Linien aufgrund der ständig vorhandenen Aktivität des Onkogens nur schwer Untersuchungen über *NeuT*-induzierte Veränderungen gemacht werden können. Da unklar ist, inwieweit sich die in INS19 und INS69 beobachtete basale *NeuT*-Expression auf den Organismus auswirkt oder ob die Expression auf Proteinebene überhaupt detektierbar ist, wurden die beiden Linien INS19 und INS69 in den weiteren Schritten trotz der Basalexpression analysiert.

Erste Aussagen über die Induzierbarkeit der Genexpression können aus Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) gewonnen werden. Diese wurden entweder aus Embryonen TetO-*NeuT*-transgener INS-Tiere, oder aus Embryonen von Kreuzungen der INS-Linien mit CMV-rtTA-Effektor-Mäusen (Kistner *et al.*, 1996) isoliert. Für die Bereitstellung des Transaktivators wurden die MEFs, die nicht aus Paarungen mit CMV-rtTA-Tieren hervorgegangen waren, mit einem rtTA-Konstrukt transient transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation der Fibroblasten in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin wurden diese in RT-PCR-Experimenten auf die Expression von *NeuT* getestet (Abb. 3.46). Auch bei den MEF-Assays bestätigte sich die

basale Expression von *NeuT* in den Linien INS19 und INS69, die schon bei der Untersuchung der TetO-NeuT-transgenen Tiere aufgefallen war. Allerdings zeigte sich in den analysierten Embryonen, die aus der Paarung INS69/CMV-rtTA hervorgegangen waren, dass durch Inkubation der transgenen Fibroblasten mit Doxzyklin eine eindeutige Induktion des Transgens erfolgte, wohingegen die Stärke der *NeuT*-Expression in den Fibroblasten der INS19-Embryonen von der Gabe des Antibiotikums unbeeinflusst blieb. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Expressionsstärke bzw. Induzierbarkeit von *NeuT* auch in nicht-induziertem Zustand in den NeuT-exprimierenden Linien INS19 und INS69 ist der Integrationsort des Konstruktes im Genom der Maus. Die Verwendung der Isolatorsequenzen vermindert zwar das Risiko inadäquater, basaler Expression, ganz ausgeschlossen werden kann diese aber, wie sich auch an diesen Linien herausgestellt hat, nicht. Erfreulicherweise zeigte sich aber bei den MEF-Assays, die mit Fibroblasten der Linien INS12 und INS20 durchgeführt wurden, eine stringente Regulierbarkeit des Transgens in Abhängigkeit von Doxzyklin. Die Untersuchungen an den Fibroblasten lassen erste Schlüsse auf die Induzierbarkeit von NeuT in den verschiedenen INS-Linien zu, die im weiteren Verlauf der experimentellen Arbeiten durch Kreuzung mit verschiedenen Effektor-Mäusen verifiziert werden sollten.

Für Fragestellungen zur gewebespezifischen Regulierbarkeit des Transgens standen unserem Labor vier verschiedene tTA- und rtTA-Effektor-Linien zur Verfügung. Die LAP-tTA- und die bereits bei den MEF-Assays erwähnten CMV-rtTA-Effektor-Mäuse wurden uns von Prof. Bujard (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die CMV-rtTA-Effektor-Tiere (Kistner *et al.*, 1996) exprimieren den rtTA unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus-Promotors (Boshart *et al.*, 1985), der ubiquitär in allen Geweben aktivierbar sein sollte. Die Test-Kreuzung der CMV-rtTA-Effektor-Mäuse mit transgenen Tieren, die Tet-abhängig Luziferase exprimieren können, ergab eine rasche Induktion der Luziferase in den meisten untersuchten Geweben, die 4 h nach Administration von Doxzyklin einsetzte und nach 24 h ihren Maximalwert erreichte (Kistner *et al.*, 1996). Auch die in Kooperation mit der AG Sahin/Türeci durchgeführten quantitativen RT-PCRs zur Bestimmung der rtTA-Expression in verschiedenen Geweben der CMV-rtTA-Tiere ergab eine praktisch ubiquitäre Expression, wobei die Expressionsstärke in den einzelnen Organen, wie auch von Kistner *et al.* beschrieben, deutlich unterschiedlich war.

Bei den LAP-tTA-Effektor-Mäusen (Kistner *et al.*, 1996) wird das Transaktivatorprotein unter Kontrolle des *liver enriched activator protein* (LAP)-Transkriptionsfaktor-Promotors exprimiert (Talbot *et al.*, 1994). Die Expression des tTA sollte in diesen

Mäusen auf die parenchymalen Hepatozyten restringiert sein. Aber auch hier ergaben Untersuchungen von LAP-tTA/Luziferase-Kreuzungen (Kistner *et al.*, 1996) und von unserem Labor durchgeführte quantitative Untersuchungen der tTA-Expression im *Light Cycler*, dass der tTA zwar sehr stark in der Leber, aber auch in z. B. Niere und Gehirn nachweisbar ist. Als weitere Effektor-Mäuse wurden die von Saam *et al.* 1999 generierten Fabp-rtTA-Mäuse verwendet, die unter Kontrolle des *fatty acid binding protein* (Fabp)-Promotors den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transaktivator spezifisch in Enterozyten des Darmes exprimieren. Die Tiere der vierten Effektor-Linie (von Dr. Ferrier, Universität Marseille zur Verfügung gestellt), die für die Untersuchungen genutzt wurden, exprimieren den rtTA unter der Kontrolle des Promotors der Lymphozyten-spezifischen Protein-Tyrosinkinase (Lck), die spezifisch in Lymphozyten exprimiert wird. Leider exprimiert keine dieser Effektor-Mäuse den tTA bzw. rtTA spezifisch in einem für die ERBB2-induzierte Tumorgenese relevanten Gewebe. Trotzdem können mit Hilfe dieser Effektor-Mäuse wichtige Daten über die Regulierbarkeit, Expressionsstärke und Funktionalität von NeuT gewonnen werden. Da dem Labor zu Beginn der Untersuchungen noch keine CMV-rtTA- und LAP-tTA-Effektor-Mäuse zur Verfügung standen, wurden zunächst INS-Tiere mit Fabp-rtTA- bzw. Lck-rtTA-Tieren gekreuzt und mit deren Analyse begonnen. Für die Untersuchung der Induzierbarkeit TetO-NeuT/rtTA bzw. tTA-transgener Tiere wurden die INS-Linien nicht mit allen Effektor-Linien gepaart, wenn sich schon vorher eindeutige Aussagen über die Regulierbarkeit der Transgenexpression machen ließen. Die Administration des Doxyzyklins erfolgte oral über das Trinkwasser (0,375 mg/ 50 ml, 5 % Saccharose) nachdem von Tremblay *et al.* 1998 gezeigt werden konnte, dass subkutane oder intraperitoneale Injektionen von Doxyzyklin nicht nötig sind. Die Regulierbarkeit der NeuT-Expression wurde in TetO-NeuT/(r)tTA-transgenen Tieren mit RT-PCR-Experimenten unter der Verwendung *NeuT*-spezifischer Oligonukleotide und im Falle induzierbarer Expression auch auf Proteinebene im *Western Blot* untersucht.

Transgene INS19/Fabp-rtTA-Nachkommen zeigten bei der Untersuchung des Darmes unabhängig von der Gabe von Doxyzyklin eine gleichmäßige *NeuT*-Expression. Dieses Ergebnis war im Hinblick auf die basale NeuT-Expression in den TetO-NeuT-transgenen INS19-Tieren und die konstitutive Onkogenexpression in den INS19/rtTA-MEFs zu erwarten. Der Integrationsort des Konstruktes scheint bei dieser Linie so ungünstig zu sein, dass die Isolatorsequenzen keinen Schutz vor benachbarten *Enhancer*-Elementen bieten. Da die Administration des Antibiotikums auch keine Verstärkung der *NeuT*-Expression induzierte, sind die INS19-Responder-Tiere gänzlich ungeeignet für die Generierung eines konditionalen

ERBB2-Tumormodells. Die konstitutive Überexpression des *NeuT*-Onkogens in den Tieren dieser Linie ließ eigentlich erwarten, dass die verstärkte Signaltransduktion durch das Onkogen über kurz oder lang zur Induktion von Tumoren in den INS19-Mäusen führt. Erstaunlicherweise konnte auch über einen langen Zeitraum bei diesen Tieren keine Tumorbildung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung dafür ergibt sich aus Untersuchungen, die 2004 von Andrechek *et al.* veröffentlicht wurden. Sie konnten zeigen, dass die Expression des onkogenen *NeuT* unter Kontrolle des endogenen ERBB2-Promotors in Keimzellen zur Resistenz gegen die Entwicklung von Mammakarzinomen in den adulten Tieren führt. Besonders interessant ist hierbei, dass NeuT/NeuT-homozygote Nachkommen am Tag 12,5 pc embryonal letal sind, wohingegen die heterozygoten NeuT/WT-Nachkommen keinen von Wildtyp-Tieren unterscheidbaren Phänotyp und keine erhöhte Tumorsuszeptibilität aufweisen. Das Unvermögen von NeuT in den heterozygoten Tieren zur Induktion von Karzinomen zu führen, ist möglicherweise eine Folge der Adaption der epithelialen Gewebe an die konstitutive NeuT-Signaltransduktion. Ein ähnliches Phänomen wurde bei der Rous Sarcoma Virus (RSV)-induzierten Karzinogenese beobachtet. Hier führte die Infektion mit RSV in Hühnern zur Expression von aktiviertem *v-src*, die mit der Ausbildung von Sarkomen einherging. Injizierte man entsprechende Virusmengen in Hühnereier, führte dies zwar zur Expression von aktivem *v-src*, die Entstehung von Sarkomen konnte allerdings nicht detektiert werden (Dolberg und Bissell, 1984; Howlett *et al.*, 1988). Darüber hinaus konnte in Patienten, die über aktivierende Keimbahnmutationen des *fibroblast growth factor* (FGF)-Rezeptors verfügen gezeigt werden, dass diese zwar verschiedene Entwicklungsstörungen, aber keine erhöhte Tumorprädisposition aufwiesen (De Moerlooze und Dickson, 1997). Die konstitutive und im induzierten und uninduzierten Zustand vergleichbare Expression von *NeuT* in den Tieren der INS19-Linie scheint demzufolge die Anpassung an einen basal erhöhten *NeuT*-Expressionslevel verursacht zu haben, durch die diese Tiere vor der Induktion von Tumoren geschützt sind.

Ob das Gleiche auch für die Tiere der INS69-Linie gilt, die nur eine minimale, basale *NeuT*-Expression aufweisen, ist fraglich. Zudem konnte bei dieser Linie nach Paarung mit Lck-rtTA-Effektor-Mäusen eine eindeutige Induktion von *NeuT* in den induzierten Tieren nachgewiesen werden. Theoretisch könnte die verstärkte *NeuT*-Expression in diesen Tieren nach Gabe von Doxzyklin zur Tumorbildung führen. Da aber unklar ist, inwieweit die schwache Basalexpression von *NeuT* in den Tieren zur Adaption des Organismus an das Onkogen führen könnte, wurde die Arbeit mit der INS69-Linie an dieser Stelle eingestellt.

Bei der Charakterisierung der INS12- und INS20-Linie zeigte sich sowohl bei der Kreuzung INS12/CMV-rtTA als auch bei der Paarung INS20/LAP-tTA, dass die Expression von *NeuT* in Abhängigkeit von Doxyzyklin induzierbar ist. Die Expressionsstärke des Onkogens war dabei analog zu den rtTA- bzw. tTA-Konzentrationen, die bei der Untersuchung der einzelnen Organe in den quantitativen RT-PCRs gefunden wurden. Allerdings konnte in den transgenen INS12/CMV-rtTA-Tieren nur eine schwache *NeuT*-Expression in der Niere nachgewiesen werden, wohingegen in den noch schwächer rtTA-exprimierenden Geweben Milz und Kolon kein *NeuT* in den RT-PCR-Ansätzen detektierbar war. Im Gegensatz dazu war die mittels RT-PCR nachgewiesene *NeuT*-Expression in INS20/LAP-tTA-Tieren in der Leber sehr stark und auch in der Niere eindeutig vorhanden. Die zweiwöchige Gabe von Doxyzyklin führte in diesen Tieren auch zur vollständigen Abschaltung der Transgenexpression. Nachdem mit RT-PCR-Experimenten eine stringente Regulierbarkeit der Transgenexpression in den beiden Linien gezeigt werden konnte, wurde im Anschluss daran die NeuT-Expression auf Proteinebene im *Western Blot* untersucht. Für Kreuzungen der Linie INS12 mit CMV-rtTA-Effektor-Mäusen konnte leider keine Induktion von NeuT im *Western Blot* nachgewiesen werden. Vermutlich ist die schon in der RT-PCR kaum nachweisbare Expression des Onkogens zu gering, um sich auf Proteinebene auszuwirken. Dies kann zum einen an der Expression des rtTA bzw. tTA in den Effektor-Tieren liegen, die das Transaktivator-Protein eventuell nur sehr schwach oder individuell unterschiedlich stark exprimieren. Zum anderen könnte auch die Zugänglichkeit des CMV-TetO-Promotors durch die Lage des Integrationsortes im Genom beeinträchtigt sein oder die Tiere der INS12-Linie sind wegen inhibierenden Elementen im genomischen Kontext generell nur schwach induzierbar.

*Western Blot*-Analysen der INS20/LAP-tTA-Tiere ergaben, analog zu den RT-PCR-Ergebnissen, eine starke NeuT-Expression in der Leber und eine schwächere, aber vorhandene Expression des Onkogens in den Nieren transgener Tiere (siehe Abb. 3.51). Die zweiwöchige Gabe von Doxyzyklin führte auch auf Proteinebene zur Abschaltung von NeuT, wobei hier zu beachten ist, dass der Antikörper auch endogenes ERBB2 nachweist und somit keine absoluten Angaben zur Induzierbarkeit gemacht werden können.

Insgesamt sprechen die Untersuchungen an TetO-NeuT-transgenen Tieren, die MEF-Assays und die Analyse der TetO-NeuT/(r)tTA-transgenen Tiere eindeutig für eine stringente Induzierbarkeit der Linien INS12 und INS20. Von vier transgenen Linien der ursprünglich erhaltenen 36 *Founder*-Tiere konnten somit zwei Linien identifiziert werden, die als *Responder*-Tiere für ein induzierbares ERBB2-Tumormodell verwendet werden können.

### 4.3 Ausblick

Mit den in der vorliegenden Dissertation generierten induzierbaren Zelllinien konnten wichtige Aspekte der ERBB2-vermittelten Tumorgenese untersucht werden. So konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die verfrühte Seneszenz als primärer Schutzmechanismus auch infolge der onkogenen Aktivierung von ERBB2 zu beobachten ist. Außerdem wurden in *Microarray*-Hybridisierungen Gene identifiziert, die ERBB2-abhängig differenziell exprimiert werden. Dazu gehören *MMP-9*, *MMP-13* und *Integrin  $\alpha 5$* , die eine potenzielle Rolle bei der ERBB2-induzierten Invasion und Metastasierung von Tumoren spielen. In Zukunft können weitere differenziell regulierte Gene wie z. B. DNA-Reparaturgene oder Angiogenese-relevante Gene aus dem *Microarray* ausgesucht und im Bezug auf ihre Tumorrelevanz untersucht werden.

Die Charakterisierung transgener TetO-NeuT-Responder-Mäuse ergab zwei Linien, INS12 und INS20, die eine stringent Doxyzyklin-regulierbare NeuT-Expression aufwiesen. Die Tiere dieser Linien können nun mit Effektor-Mäusen gekreuzt werden, die den tTA bzw. rtTA in für die ERBB2-Tumorgenese relevanten Epithelien exprimieren.

Erst kürzlich wurden induzierbare Tumormodelle veröffentlicht, in denen die Aktivierung von Onkogenen, wie *MYC* (Shachaf *et al.*, 2004) oder die kombinierte Induktion von mutiertem *Kras* und Deletion von *Ink4a/Arf* (Aguirre *et al.*, 2003) zur Bildung reversibler Leber- bzw. Pankreasadenokarzinome geführt hat. Die Funktionalität und Reversibilität solcher Modelle bietet nicht nur die Möglichkeit, molekulare Mechanismen, die zur Entstehung eines Tumors führen zu untersuchen, sondern auch detaillierte Informationen zu bekommen, wie die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen nach Abschaltung des jeweiligen Onkogens beeinflusst wird.

Bereits existierende Effektor-Mäuse, die für die gewebespezifische Expression von NeuT in der Brust verwendet werden können, sind z. B. die MMTV/LTR-tTA- (Hennighausen *et al.*, 1995),  $\beta$ -Lactoglobulin-rtTA- (Soulier *et al.*, 1999) und *whey acidic protein* (WAP)-rtTA-Tiere (Utomo *et al.*, 1999). Außerdem kann für ein Ovarialkarzinogenese-Modell eine Wilms Tumor 1 (Wt1)-tTA-Effektor-Maus (hergestellt im Rahmen der Doktorarbeit von Diplom-Biologe Stephan Fees in unserem Labor), die den Transaktivator spezifisch im Urogenitalsystem exprimiert, genutzt werden. Neben Mamma- und Ovarialkarzinomen ist ERBB2 vor allem in vielen nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen überexprimiert. Da für NSCLC noch kein induzierbares Mausmodell existiert, wäre die Paarung von Tet-O-NeuT-Responder-Mäusen mit geeigneten Effektor-Mäusen sehr interessant. Hierfür könnten *Clara cell 10 kD protein* (CC10)-rtTA- (Temann *et al.*, 2002), *surfactant protein C* (SP-C)-rtTA-

---

sowie *Clara cell secretory protein* (CCSP)-rtTA-Effektor-Mäuse (beide Perl *et al.*, 2002) herangezogen werden, bei denen die Transaktivatoren durch die Verwendung geeigneter Promotoren in den Lungenepithelien exprimiert werden. Mit diesen Tumormodellen können initiale Schritte der ERBB2-vermittelten Tumorgenese sowie grundlegende Fragestellungen zur Metastasierung und Invasion von Tumorzellen untersucht werden. Darüber hinaus können die *in vitro* mit den induzierbaren Zelllinien gewonnenen Ergebnisse mit *in vivo*-Daten aus den Mausmodellen verglichen werden.



## 5 Zusammenfassung

Die Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB2 ist in einer Vielzahl epithelialer Tumore, wie Mamma- und Ovarialkarzinomen, überexprimiert. Diese erhöhte Expression korreliert mit aggressivem Tumorwachstum, verstärkter Metastasierung und schlechter Prognose für den Patienten. Zur genaueren Untersuchung molekularer Mechanismen, die zur Tumorentstehung infolge der ERBB2-Überexpression führen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Tet-Systems induzierbare MCF-7 Zelllinien generiert. Diese exprimieren bei Gabe von Doxyzyklin ERBB2 bzw. die zum humanen ERBB2 homologe und durch Punktmutation onkogen aktivierte Rattenvariante NeuT. Nachdem die stringente Regulierbarkeit durch Doxyzyklin für die untersuchten Zellklone gezeigt werden konnte, stellte sich bei der Charakterisierung der Zelllinien heraus, dass die Induktion von ERBB2 erstaunlicherweise nicht zur Proliferation der Zellen, sondern zum Wachstumsarrest führt. Bei der Untersuchung verschiedener Zellzyklusregulatoren konnte dieser Zellzyklusarrest dem CDK-Inhibitor P21 zugeordnet werden, dessen Expression durch ERBB2 induziert wird. In P21-*Antisense*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass P21 eine Schlüsselrolle beim ERBB2-induzierten Zellzyklusarrest spielt. Neben der Induktion von P21 und der daraus resultierenden Wachstumsinhibition zeigten die Zellen starke morphologische Veränderungen und waren positiv beim Nachweis der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Induktion des Onkogens *ERBB2* nicht zur Proliferation, sondern zur Aktivierung eines verfrühten Seneszenz-Programms führt, welches der Zelle Schutz gegen die Onkogeneinwirkung bietet. Bei der Untersuchung verschiedener Signaltransduktionskaskaden mit Inhibitormolekülen konnte die Aktivierung dieses Seneszenz-Programms der Stress-aktivierten Proteinkinase P38 zugeordnet werden.

Zur Identifizierung von Genen, die für die ERBB2-induzierte Tumorgenese relevant sind, wurde die differenzielle Genexpression eines NeuT-Klons nach 8- bzw. 48-stündiger Induktion mit Doxyzyklin in einem cDNA-Array untersucht. Dabei zeigte sich eine besonders starke Induktion von *Integrin  $\alpha 5$*  und *Integrin  $\beta 1$* , die zusammen den Fibronektinrezeptor bilden. Der funktionale Nachweis des Rezeptors in einem Adhäsionsassay demonstrierte ein stark erhöhtes Adhäsionsverhalten ERBB2-überexprimierender Zellen an Fibronektin. Bei der Untersuchung von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomen konnte die Expression von ERBB2 mit der von Integrin  $\alpha 5$  korreliert werden. Diese Ergebnisse machen Integrin  $\alpha 5$  zu einem potenziellen neuen Tumormarker und Therapieziel in ERBB2-überexprimierenden Tumoren.

Ein weiteres interessantes Gen, das sich im Array durch ERBB2 überexprimiert zeigte, war die Matrix-Metalloproteinase *MMP-9*. In einem Zymografieassay konnte die erhöhte Gelatinaseaktivität von MMP-9 in Dox-induzierten Zellen nachgewiesen werden. Der Einsatz verschiedener Signaltransduktionsinhibitoren ergab, dass auch die ERBB2-induzierte Expression von MMP-9 über die Aktivierung von P38 läuft. Bei der Suche nach weiteren MMPs, die für die ERBB2-induzierte Tumorgenese relevant sein könnten, wurde MMP-13

untersucht. Erstmals konnte gezeigt werden, dass diese Matrix-Metalloproteinase von ERBB2 induziert wird. Dieser interessante Befund wurde auch in einem anderen Zellmodell in NIH3T3 Mausfibroblasten verifiziert. Durch ihre Matrix-degradierenden Eigenschaften sind MMPs potente „Werkzeuge“ für Tumorzellen und stellen ein wichtiges Ziel zur Unterbindung der Invasion und Metastasierung dieser Zellen dar.

Neben den Zellkulturarbeiten wurden im Rahmen dieser Dissertation transgene *Responder*-Mäuse generiert, die NeuT unter Kontrolle eines Tet-responsiven Promotors exprimieren. Von vier transgenen Gründerlinien zeigten zwei eine unerwünschte, basale *NeuT*-Expression, für die beiden anderen Linien konnte sowohl in MEF-Assays, als auch nach Kreuzung mit rtTA- bzw. tTA-Effektor-Mäusen eine Dox-abhängige Regulation des Transgens gezeigt werden. Die Tiere dieser Linien sollen in Zukunft mit Effektor-Mäusen gepaart werden, die den rtTA bzw. tTA spezifisch in für die ERBB2-Tumorgenese relevanten Geweben, wie Ovarial- oder Lungenepithelzellen, exprimieren. So können individuelle Tumormodelle für die verschiedenen epithelialen Tumore, bei denen die Überexpression von ERBB2 von Bedeutung ist, entwickelt und untersucht werden.

## 5 Literaturverzeichnis

**Adelsman, M.A., McCarthy, J.B., Shimizu, Y. (1999)** *Stimulation of  $\beta 1$ -integrin function by epidermal growth factor and Heregulin- $\beta$  has distinct requirements for erbB2 but a similar dependence on phosphoinositol 3-OH kinase.* Molecular Biology of the Cell 10: 2861-2878.

**Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., DePinho, R.A. (2003)** *Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma.* Genes and Development 17: 3112-3126.

**Airola, K., Johansson, N., Kariniemi, A.L., Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U.K. (1997)** *Human collagenase-3 is expressed in malignant squamous epithelium of the skin.* Journal of The Investigative Dermatology 109: 225-231.

**Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B., Gascon, B. (2003)** *Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4.* Advanced Experience in Medical Biology 532: 253-268.

**Allred, D.C., Clark, G.M., Tandon, A.K., Molina, R., Tormey, D.C., Osborne, C.K., Gilchrist, K.W., Mansour, E.G., Abeloff, M., Eudey, L., et al. (1992)** *HER-2/neu in node-negative breast cancer: prognostic significance of overexpression influenced by the presence of in situ carcinoma.* Journal of Clinical Oncology 10: 599-605.

**Alpan, R.S., Pardee, A.B. (1996)** *P21<sup>WAF1/CIP1</sup> is elevated through a p53-independent pathway by mimosine.* Cell Growth and Differentiation 7: 893-901.

**Andrechek, E.R., Hardy, W.R., Siegel, P.M., Rudnicki, M.A., Cardiff, R.D., Muller, W.J. (2000)** *Amplification of the neu/erbB-2 oncogene in a mouse model of mammary tumorigenesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 3444-3449.

**Andrechek, E.R., Hardy, W.R., Laing, M.A., Muller, W.J. (2004)** *Germ-line expression of an oncogenic erbB2 allele confers resistance to erbB2-induced mammary tumorigenesis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101: 4984-4989.

**Aroian, R.V., Koga, M., Mendel, J.E., Oshima, Y., Sternberg, P.W. (1990)** *The let-23 gene necessary for Caenorhabditis elegans vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor family.* Nature 348: 693-699.

**Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K., Mizutani, S. (1999)** *Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocyte differentiation.* The EMBO Journal 18: 1223-1234.

**Assoian, R.K., Schwartz, M.A. (2001)** *Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression.* Current Opinion in Genetics and Development 11: 48-53.

**Azzoli, C.G., Krug, L.M., Miller, V.A., Kris, M.G., Mass, R. (2002)** *Trastuzumab in the treatment of non-small cell lung cancer.* Seminars in Oncology 29: 59-65.

- Baasner, S., von Melchner, H., Klenner, T., Hilgard, P., Beckers, T. (1996)** *Reversible tumorigenesis in mice by conditional expression of the HER2/c-erbB2 receptor tyrosine kinase.* *Oncogene* 13: 901-911.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., Weinberg, R.A. (1986)** *The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein.* *Nature* 319: 226-230.
- Bargmann, C.I., Weinberg, R.A. (1988)** *Increased tyrosine kinase activity associated with the protein encoded by the activated neu oncogene.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 5394-5398.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C.C., Dantis, L., Sklarin, N.T., Seidman, A.D., Hudis, C.A., Moore, J., Rosen, P.P., Twaddell, T., Henderson, I.C., Norton, L. (1996)** *Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer.* *Journal of Clinical Oncology* 14: 737-744.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P., Carpenter, G. (1996)** *All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired.* *Journal of Biological Chemistry* 271: 5251-5257.
- Bell, A.C., Felsenfeld, G. (1999)** *Stopped at the border: boundaries and insulators.* *Current Opinion in Genetics and Development* 9: 191-198.
- Bell, A.C., West, A.G., Felsenfeld, G. (2001)** *Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome.* *Science* 291: 447-450.
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J.T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D.L., Marks, P., et al. (1990)** *Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer.* *Cancer Research* 50: 4087-4091.
- Beuken, E., Vink, C., Bruggemann, C.A. (1998)** *One-step procedure for screening recombinant plasmids by size.* *Biotechniques* 24: 748-750.
- Biankin, A.V., S.A., Kench, J.G., Morey, A.L., Lee, C.S., Biankin, S.A., Head, D.R., Hugh, T.B., Henshall, S.M., Sutherland, R.L. (2001)** *Overexpression of p21 (WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia.* *Cancer Research* 61: 8830-8837.
- Bockamp, E.O., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., Zabel, B. (2002)** *Of mice and models: improved animal models for biochemical research.* *Physiological Genomics* 11: 115-132.
- Bol, D., Kiguchi, K., Beltran, L., Rupp, T., Moats, S., Gimenez-Conti, I., Jorcano, J., DiGiovanni, J. (1998)** *Severe follicular hyperplasia and spontaneous papilloma formation in transgenic mice expressing the Neu oncogene under the control of the bovine keratin 5 promotor.* *Molecular Carcinogenesis* 21: 2-12.
- Boonstra, J. (2003)** *Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle.* *Journal of Cellular Biochemistry* 90: 244-252.

- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W. (1985)** *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus.* Cell 41: 521-530.
- Bostrom, P.J., Ravanti, L., Reunanen, N., Aaltonen, V., Soderstrom, K.O., Kahari, V.M., Laato, M. (2000)** *Expression of collagenase-3 (MMP-13) in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.* International Journal of Cancer 88: 417-423.
- Bouchard, L., Lamarre, L., Tremblay, P.J., Jolicoeur, P. (1989)** *Stochastic appearance of mammary tumors in transgenic mice carrying the MMTV/c-neu oncogene.* Cell 57: 931-936.
- Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., Riethmacher, D. (1998)** *The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system.* Genes and Development 12: 1825-1836.
- Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresh D.A. (1994)** *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.* Science 264: 569-571.
- Burden, S., Yarden, Y. (1997)** *Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis.* Neuron 18: 847-855.
- Busfield, S.J., Michnick, D.A., Chickering, T.W., Revett, T.L., Ma, J., Woolf, E.A., Comrack, C.A., Dussault, B.J., Woolf, J., Goodearl, A.D., Gearing, D.P. (1997)** *Characterization of a neuregulin-related gene, Don-1, that is highly expressed in restricted regions of the cerebellum and hippocampus.* Molecular and Cellular Biology 17: 4007-4014.
- Campisi, J. (1997)** *The age of cancer.* Nature 408: 248-254.
- Campisi, J. (2001)** *Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism.* Trends in Cell Biology 11: S27-S31.
- Caroll, J.S., Swarbrick, A., Musgrove, E.A., Sutherland, R.L. (2002)** *Mechanisms of growth arrest by c-myc antisense oligonucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens.* Cancer Research 62: 3126-3131.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1979)** *Epidermal Growth Factor.* Annual Review of Biochemistry 48: 193-216.
- Carron, C.P., Meyer, D.M., Pegg, J.A., Engleman, V.W., Nickols, M.A., Settle, S.L, Westlin, W.F., Ruminski, P.G., Nichols, G.A. (1998)** *A peptidomimetic antagonist of the integrin  $\alpha\beta 3$  inhibits Leyding cell tumor growth and development of hypercalcemia of malignancy.* Cancer Research 58: 1930-1955.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., Shepard, H.M. (1992)** *Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89: 4285-4289.
- Casalini, P., Iorio, M.V., Galmozzi, E., Menard, S. (2004)** *Role of HER receptor family in development and differentiation.* Journal of Cellular Physiology 200: 343-350.

- Chan, R., Hardy, W.R., Laing, M.A., Hardy, S.E., Muller, W.J. (2002)** *The catalytic activity of the ErbB-2 receptor tyrosine kinase is essential for embryonic development.* Molecular and Cellular Biology 22: 1073-1078.
- Chang, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V., Roninson, I.B. (2000)** *Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 4291-4306.
- Chang, H., Riese, D.J.II, Gilbert, W., Stern, D.F., McMahan, U.J. (1997)** *Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene.* Nature 387: 509-512.
- Cho, H.S., Leahy, D.J. (2002)** *Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether.* Science 297: 1330-1333.
- Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J., Clinton, G.M. (1998)** *NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer.* Cancer Research 58: 5123-5129.
- Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., Slamon, D.J. (1999)** *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease.* Journal of Clinical Oncology 17: 2639-2648.
- Coussens, L., Yang Feng, T.I., Liao, C.Y., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U., Levinson, A., Ullrich, A. (1985)** *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene.* Science 230: 1132-1139.
- Crespo, P., Leon, J. (2000)** *Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation.* Cellular and Molecular Life Sciences 57: 1613-1636.
- Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G., Ross Jr, R., Chien, K.R., Lee, K.F. (2002)** *ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy.* Nature Medicine 8: 459-465.
- Danen, E.H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A., Yamada, K.M. (2000)** *Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression.* Journal of Cell Biology 151: 1413-1422.
- Dankort, D., Jeyabalan, N., Jones, N., Dumont, D.J., Muller, W.J. (2001)** *Multiple ErbB2/Neu phosphorylation sites mediate transformation through distinct effector proteins.* Journal of Biological Chemistry 276: 38921-38928.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., Wang, X.F. (1995)** *Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 5545-5549.

- Davies, B., Waxman, J., Wasan, H., Abel, P., Williams, G., Krausz, T., Neal, D., Thomas, D., Hanby, A., Balkwill, F. (1993) *Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion*. *Cancer Research* 53: 5365-5369.
- De Moerlooze, L., Dickson, C. (1997) *Skeletal disorders associated with fibroblast growth factor receptor mutations*. *Current Opinion in Genetics and Development* 7: 378-385.
- Deng, Q., Liao, R., Wu, B.L., Sun, P. (2004) *High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 1050-1059.
- DePinho, R.A. (2000) *The age of cancer*. *Nature* 408: 248-254.
- Di Fiore, P.P., Pierce, J.H., Kraus, M.H., Segatto, O., King, C.R., Aaronson, S.A. (1987) *ErbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells*. *Science* 237: 178-182.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M. (1994) *DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts*. *Genes and Development* 8: 2540-2551.
- Di Marco, E., Pierce, J.H., Knicley C.L., Di Fiore, P.P. (1990) *Transformation of NIH 3T3 cells by overexpression of the normal coding sequence of the rat neu gene*. *Molecular and Cellular Biology* 10: 3247-3252.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. *et al.* (1995) *A biomarker that identifies senescent human cells in culture in aging skin in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 9363-9367.
- Dolberg, D.S., Bissell, M.J. (1984) *Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo*. *Nature* 309: 552-556.
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E.L., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, G., Waterfield, M.D. (1984) *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. *Nature* 307: 5231-5237.
- Egeblad, M., Mortensen, O.H., Jäättelä, M. (2001) *Truncated ErbB2 receptor enhances ErbB1 signaling and induces reversible, ERK-independent loss of epithelial morphology*. *International Journal of Cancer* 94: 185-191.
- Egeblad, M., Werb, Z. (2002) *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nature Reviews Cancer* 2: 161-174.
- El Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993) *WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression*. *Cell* 75: 817-825.
- Elnemr, A., Yonemura, Y., Bandou, E., Kinoshita, K., Kawamura, T., Takahashi, S., Tochiori, S., Endou, Y., Sasaki, T. (2003) *Expression of collagenase-3 (matrix-metalloproteinase-13) in human gastric cancer*. *Gastric Cancer* 6: 30-38.

- Engelbreth-Holm, J., Meyer, A.R. (1935)** *On the connection between erythroblastosis (haemoerythroblastosis), myelosis and sarcoma in chicken.* Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 12: 352-377.
- Falcioni, R., Antonini, A., Nistico, P., Di Stefano, S., Crescenzi, M., Natali, P.G., Sacchi, A. (1997)**  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 6\beta 1$  integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. Experimental Cell Research 236: 76-85.
- Fedi, P., Pierce, J.H., Fiore, P.P., Krasu, M.H. (1994)** Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase  $C\gamma$  or GTP-ase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. Molecular and Cellular Biology 14: 492-500.
- Fleenor, D.E., Kaufman, R.E. (1993)** Characterization of the DNaseI Hypersensitive Site 3' of the Human  $\beta$ -Globin Gene Domain. Blood 81: 2781-2790.
- Freije, J.P., Diez-Itzu, I., Balbin, M., Sanchez, L.M., Blasvo, R., Tolivia, J., Lopez-Otin, C. (1994)** Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. Journal of Biological Chemistry 269: 16766-16773.
- French, A.R., Tadaki, D.K., Niyogi, S.K., Lauffenburger, D.A. (1995)** Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. Journal of Biological Chemistry 270: 4334-4340.
- Fridman, R., Toth, M., Pena, D., Mobashery, S. (1995)** Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). Cancer Research 55: 2548-2555.
- Furth, P.A., St Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., Hennighausen, L. (1994)** Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 9302-9306.
- Gambalatta, D., Marchetti, A., Benedetti, L., Mercurio, A.M., Sacchi, A., Falcioni, R. (2000)** Cooperative signaling between  $\alpha 6\beta 4$  integrin and ErbB-2 receptor is required to promote phosphatidylinositol-3-kinase-dependent invasion. Journal of Biological Chemistry 275: 10604-10610.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., Herrero, E. (1997)** A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 13: 837-848.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.J., Walker, F., Frenkel, M.J., Hoyne, P.A., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W., Ward, C.W. (2002)** Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. Cell 110: 763-773.
- Gehlsen, K.R., Davis, G.E., Sriramarao, P. (1992)** Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. Clinical and Experimental Metastasis 10: 111-120.



- Giancotti, F.G., Ruoslahti, E. (1990)** *Elevated levels of the alpha5 beta1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells.* Cell 60: 849-859.
- Gingrich, J.R., Roder, J. (1998)** *Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice.* Annual Review of Neuroscience 21: 377-405.
- Girard, F., Bello, B., Laemmli, U., Gehring, W.J. (1998)** *In vivo analysis of scaffold-associated regions in Drosophila: a synthetic high-affinity SAR binding protein suppresses position effect variegation.* The EMBO Journal 17: 2079-2085.
- Giunciuglio, D., Culty, M., Fassina, G., Masiello, L., Melchiori, A., Paglialunga, G., Arand, G., Ciardiello, F., Basolo, F., Thompson, E.W., Albini, A. (1995)** *Invasive phenotype of MCF-10A cells overexpressing c-H-ras and c-erbB-2 oncogenes.* International Journal of Cancer 63: 815-822.
- Goh, K.L., Yang, J.T., Hynes, R.O. (1997)** *Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in  $\alpha 5$  integrin null embryos.* Development 124: 4309-4319.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992)** *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89: 5547-5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995)** *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.* Science 28: 1766-1769.
- Graf, T., Beug, H. (1978)** *Avian leukemia viruses: interaction with their target cells in vivo and in vitro.* Biochimica et Biophysica Acta 516: 2269-2299.
- Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., Hynes, N. (1997)** *ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.* The EMBO Journal 16:1647-1655.
- Greenwald, R.A., Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., Chowdhury, M., Moak, S.A., Sorsa, T. (1998)** *In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation.* Bone 22: 33-38.
- Grinspan, J.B., Marchionni, M.A., Reeves, M., Coulaloglou, M., Scherer, S.S. (1996)** *Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins.* Journal of Neurosciences 16: 6107-6118.
- Groenen, L.C., Nice, E.C., Burgess, A.W. (1994)** *Structure-function relationship for the EGF/TGF- $\alpha$  family of mitogens.* Growth Factors 11: 235-257.
- Gruvberger, S., Ringner, M., Chen, Y., Panavally, S., Saal, L.H., Borg, A., Ferno, M., Peterson, C., Meltzer, P.S. (2001)** *Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression pattern.* Cancer Research 61: 5979-5984.
- Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D., Muller, W.J. (1992)** *Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces*

*metastatic disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89: 10578-10582.

**Guy, C.T., Cardiff, R.T., Muller, W.J. (1996)** *Activated neu induces rapid tumor progression*. Journal of Biological Chemistry 271: 7673-7678.

**Guy, P.M., Platko, J.V., Cantley, L.C., Cerione, R.A., Carraway, K.L. (1994)** *Insect cell-expressed p180<sup>ErbB3</sup> possesses an impaired tyrosine kinase activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 8132-8136.

**Hanahan, D. (1985)**. *Techniques for transformation in Escherichia coli*. DNA cloning I: 109-135.

**Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000)** *The hallmarks of cancer*. Cell 100: 57-70.

**Haq, R., Brenton, J.D., Takahashi, M., Finan, D., Rottapel, R., Zanke, B. (2002)** *Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence*. Cancer Research 62: 5076-5082.

**Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J.H., Andrews, G.C., Yarden, Y. (1999)** *Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase*. Oncogene 18: 2681-2689.

**Harper, J.W., Adami, G.R., Wie, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993)** *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. Cell 75: 805-816.

**Hedenfalk, I., Duggan, D., Chen, Y., Radmacher, M., Bittner, M., Simon, R., Meltzer, P., Gusterson, B., Esteller, M., Kallioniemi, O.P., Wilfond, B., Borg, A., Trent, J. (2001)** *Gene-expression profiles in hereditary breast cancer*. The New England Journal of Medicine 344: 539-548.

**Heldin, C.-H. (1995)** *Dimerization of cell surface receptors in signal transduction*. Cell 80: 213-223.

**Hemler, M.E. (1990)** *VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes*. Annual Review of Immunology 8: 365-400.

**Hennighausen, L., Wall, R.J., Tillmann, U., Li, M., Furth, P.A. (1995)** *Conditional gene expression in secretory tissues and skin of transgenic mice using the MMTV-LTR and the tetracycline responsive system*. Journal of Cellular Biochemistry 59: 463-472.

**Henriet, P., Zhong, Z.D., Brooks, P.C., Weinberg, K.I., DeClerck, Y.A. (2000)** *Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27KIP1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 10026-10031.

**Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W., Saenger, W. (1994)** *Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance*. Science 264: 418-420.

- Holbro, T., Civenni, G., Hynes, N.E. (2002)** *The ErbB receptors and their role in cancer progression.* Experimental Cell Research 284: 99-110.
- Hou, L., Shi, D., Tu, S.M., Zhang, H.Z., Hung, M.C., Ling, D. (1992)** *Oral cancer progression and c-erbB-2/neu proto-oncogene expression.* Cancer Letters 65: 215-220.
- Howlett, A.R., Carter, V.C., Martin, G.S., Bissell, M.J. (1988)** *pp60v-src tyrosine kinase is expressed and active in sarcoma-free avian embryos microinjected with Rous sarcoma virus.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 7587-7591.
- Hubbard, S.R., Mohammadi, M., Schlessinger, J. (1998)** *Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases.* Journal of Biological Chemistry 273: 11987-11990.
- Hudziak, R.M., Schlessinger, J., Ullrich, A. (1987)** *Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84: 7159-7163.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., Ullrich, A. (1989)** *p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor.* Molecular and Cellular Biology 9: 1165-1172.
- Hujanen, E.S., Vaisanen, A., Zheng, A., Tryggvason K., Turpeenniemi-Hujanen, T. (1994)** *Modulation of M(r) 72,000 and M(r) 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferones alpha and gamma in human melanoma.* International Journal of Cancer 58: 582-586.
- Hynes, N., Stern, D.F. (1994)** *The biology of erbB-2/new/HER-2 and its role in cancer.* Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer 1198: 165-184.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M.D., Okada, Y. (1997)** *Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release.* Biochemical Journal 322: 809-814.
- Iwasa, H., Han, J., Ishikawa, F. (2003)** *Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.* Genes to Cells 8: 131-144.
- Janes, P.W., Daly, R.J., DeFazio, A., Sutherland, R.L. (1994)** *Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2.* Oncogene 9:3601-3608.
- Johansson, N., Airola, K., Grenman, R., Kaineimi, A.L., Saarialho-Kere, U., Kahari, V.M. (1997)** *Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck.* American Journal of Pathology 151: 499-508.
- Johansson, N., Saarialho-Kere, U., Airola, K., Herva, R., Nissinen, L., Westermarck, E., Vuorio, E., Heino, J., Kahari, V.M. (1997)** *Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells and osteoblasts during human fetal bone development.* Developmental Dynamics 208: 387-397.

- Johnson, G.L., Lapadat, R. (2002)** *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases.* Science 298: 1911-1912.
- Jones, F.E., Stern, D.F. (1999)** *Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation.* Oncogene 18: 3481-3490.
- Jones, J.L., Glynn, P., Walker, R.A. (1999)** *Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas.* The Journal of Pathology 189: 161-168.
- Kamiya, M., Nakazato, Y. (2002)** *The expression of p73, p21 and MDM2 proteins in gliomas.* Journal of Neurooncology 59: 143-149.
- Karunagaran, D., Tzahar, E., Beerli, R.R., Chen, X., Graus Porta D., Ratzkin, B.J., Seger, R., Hynes, N.E., Yarden, Y. (1996)** *ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer.* The EMBO Journal 15: 254-264.
- Khoury, H., Dankort, D.L., Sadekova, S., Naujokas, M.A., Muller, W.J., Park, M. (2001)** *Distinct tyrosine autophosphorylation sites mediate induction of epithelial mesenchymal like transition by an activated ErbB-2/Neu receptor.* Oncogene 20: 788-799.
- Kiguchi, K., Bol, D., Carbajal, S., Beltran, L., Moats, S., Chan, K., Jorcano, J., DiGiovanni, J. (2000)** *Constitutive expression of erbB2 in epidermis of transgenic mice results in epidermal hyperproliferation and spontaneous skin tumor development.* Oncogene 19: 4243-4254.
- Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Osaki, A., Toge, T. (2002)** *The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer (review).* Oncology Reports 9: 3-9.
- Kim, S., Bell, K., Mousa, S.A., Varner, J. (2000)** *Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$  with the central cell binding domain of fibronectin.* American Journal of Pathology 156: 1345-1362.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lübbert, H., Bujard, H. (1996)** *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 10933-10938.
- Klappner, L.N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N.E., Andrews, G.C., Sela, M., Yarden, Y. (1999)** *The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96: 4995-5000.
- Knäuper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H. et al. (1996)** *Cellular mechanisms for human collagenase-3 (MMP-13) activation: evidence that MT1-MMP (MMP14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme.* Journal of Biological Chemistry 271: 17124-17131.

- Knäuper, V., Smith, R., Lopez-Otin, C., Murphy, G. (1997)** *Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13)*. *European Journal of Biochemistry* 248: 369-373.
- Kondapaka, S.B., Fridman, R., Reddy, K.B. (1997)** *Epidermal growth factor and Amhpiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells*. *International Journal of Cancer* 70: 722-726.
- Koyama, H., Raines, E.W., Bornfeldt, K.E., Roberts, J.M., Ross, R. (1996)** *Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors*. *Cell* 87: 1069-1078.
- Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C., Aaronson, S.A. (1989)** *Isolation and characterization of ErbB3, a third member of the ErbB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 9193-9197.
- Kuwada, S.K., Li, X. (2000)** *Integrin  $\alpha 5/\beta 1$  mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation*. *Molecular Biology of the Cell* 11: 2485-2496.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E. (1997)** *New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors*. *Genes and Development* 11: 847-862.
- La Rocca, G., Pucci-Minafra, I., Marrazzo, A., Taormina, P., Minafra, S. (2004)** *Zymographic detection and clinical correlation of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer*. *British Journal of Cancer* 90: 1414-1421.
- Lee, G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., Wilson, R.K. (1992)** *DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments*. *Nucleic Acids Research* 20: 2471-2483.
- Lee, J.W., Juliano, R.L. (2000)** *Alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway*. *Molecular Biology of the Cell* 11: 1973-1987.
- Lee, K.-F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M.-C., Hauser, C. (1995)** *Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development*. *Nature* 378: 394-398.
- Lee, R.J., Albanese, C., Fu, M., D'Amico, M., Lin, B., Watanabe, G., Haines, G.K.I., Siegel, P.M., Hung, M.C., Yarden, Y., Horowitz, J.M., Muller, W.J., Pestell, R.G. (2000)** *Cyclin D1 is required for transformation by activated neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway*. *Molecular and Cellular Biology* 20: 672-683.
- Leeman, M.F., McKay, J.A., Murray, G.I. (2002)** *Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer*. *Journal of Clinical Pathology* 55: 758-762.

- Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M., Schlessinger, J. (1997)** *Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer.* The EMBO Journal 16: 281-294.
- Lemoine, N.R., Staddon, S., Dickson, C., Barnes, D.M., Gullick, W.J. (1990)** *Absence of activating transmembrane mutations in the c-erbB-2 proto-oncogene in human breast cancer.* Oncogene 5: 237-239.
- Levi, A.D.O., Bunge, R.P., Lofgren, J.A., Meima, L., Hefti, F., Nikolics, K., Sliwkowski, X.M. (1995)** *The influence of heregulins on human Schwann cell proliferation.* Journal of Neuroscience 15: 1329-1340.
- Lewis, G.D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W.L., Carter, P., Gorman, C., Shepard, H.M. (1993)** *Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185<sup>HER2</sup> monoclonal antibodies.* Cancer Immunology, Immunotherapy 37: 255-263.
- Lewis, G.D., Lofgren, J.A., McMurtrey, A.E., Huijens, A., Fendly, B.M., Bauer, K.D., Sliwkowski, M.X. (1996)** *Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness.* Cancer Research 56: 1457-1465.
- Li, Y., Dowbenko, D., Lasky, L.A. (2002)** *AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes survival.* Journal of Biological Chemistry 276: 11352-11361.
- Loden, M., Perris, F., Nielsen, N.H., Emdin, S.O., Landberg, G. (2003)** *C-erbB2, p27 and G1/S aberrations in human primary breast cancer.* Anticancer Research 23: 2053-2061.
- Margolis, B. (1992)** *Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway.* Cell Growth and Differentiation 3: 73-80.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B., Yarden, Y. (2004)** *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors.* International Journal of Radiation, Oncology, Biology, Physics 58: 903-913.
- Mason, P.J., Enver, T., Wilkinson, D., Williams, D.J. (1993)** *Assay of gene transcription in vivo.* In: Gene Transcription : A practical approach. Oxford University Press.
- Massague, J., Pandiella, A. (1993)** *Membrane anchored growth factors.* Annual Review of Biochemistry 62: 515-541.
- Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C., Lemmon, M.A. (2002)** *The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes.* Journal of Biological Chemistry 277: 4704-4712.
- Meyer, D., Birchmeier, C. (1995)** *Multiple essential functions of neuregulin in development.* Nature 378: 386-390.

- Michishita, E., Nakabayashi, K., Ogino, H., Suzuki, T., Fujii, M., Ayusawa, D. (1998)** *DNA topoisomerase inhibitors induce reversible senescence in normal human fibroblasts.* Biochemical and Biophysical Research Communication 253: 667-671.
- Mineo, J.-F., Bordron, A., Quintin-Roue, I., Loisel, K.S., Ster, K.L., Buhe, V., Lagarde, N., Berthou, C. (2004)** *Recombinant humanized anti-HER2/neu antibody (Herceptin<sup>R</sup>) induces cellular death of glioblastomas.* British Journal of Cancer 91: 1195-1199.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S., Yamada, K.M. (1996)** *Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors.* Journal of Cell Biology 135: 1633-1642.
- Moody, S.E., Sarkisian, C.J., Hahn, K.T., Gunther, E.J., Pickup, S., Dugan, K.D., Innocent, N., Cardiff, R.D., Schnall, M.D., Chodosh, L.A. (2002)** *Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis.* Cancer Cell 2: 451-461.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., Shay, J.W. (1999)** *Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase.* Nature Genetics 21: 115-118.
- Morgenstern J.P., Land, H. (1990)** *Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line.* Nucleic Acids Research 18: 3587-3596.
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altrude, F., Beguinot, L., Tarone, G., Defilippi, P. (1998)** *Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival.* The EMBO Journal 17:6622-6632.
- Morris., J.K., Lin, W., Hauser, C., Marchuk, Y., Getman, D., Lee, K.F. (1999)** *Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development.* Neuron 23: 273-283.
- Muller, W.J., Sinn, E., Pattengale, P.K., Wallace, R., Pattengale, P.K., Leder, P. (1988)** *Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene.* Cell 54: 105-115.
- Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M.I., Atkinson, S.J., Allan, J.A., Knight, C.G., Willenbrock, F., Docherty, A.J. (1994)** *Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant.* Journal of Biological Chemistry 269: 6632-6636.
- Niculescu III, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., Reed, S.I. (1998)** *Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRB is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.* Molecular and Cellular Biology 18:629-643.
- Nip, J., Shibata, H., Loskutoff, D.J., Cheresh, D.A., Brodt, P. (1992)** *Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 3 to adhere to lymph node vitronectin.* Journal of Clinical Investigation 90: 1406-1413.

- No, D., Yao, T.P., Evans, R.M. (1996)** *Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 3346-3351.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R. (1994)** *Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen*. Experimental Cell Research 211: 90-98.
- O'Brien, V., Frisch, S.M., Juliano, R.L. (1996)** *Expression of the integrin  $\alpha 5$  subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation*. Experimental Cell Research 224: 208-213.
- O-charoenrat, P. Rhys-Evans, P.H., Archer, D.J., Eccles, S.A. (2002)** *C-erbB receptors in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinical significance and correlation with matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factors*. Oral Oncology 38: 73-80.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2002)** *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell 110: 775-787.
- O'Hanlon, D.M., Kiely, M., MacConmara, M., Al-Azzawi, R., Connolly, Y., Jeffers, M., Keane, F.B. (2002)** *An immunohistochemical study of p21 and p53 expression in primary node-positive breast carcinoma*. European Journal of Surgical Oncology 28: 103-107.
- Okada, H., Mak, T.W. (2004)** *Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells*. Nature Reviews Cancer 4: 592-603.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E. (2000)** *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. The EMBO Journal 19: 3159-3167.
- Ozcelik, C., Erdmann, B., Pilz, B., Wettschureck, N., Britsch, S., Hubner, N., Chien, K.R., Birchmeier, C., Garratt, A.N. (2002)** *Conditional mutation of ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99: 8880-8885.
- Park, S.K., Miller, R., Krane, I., Vartanian, T. (2001)** *The erbB2 gene is required for the development of terminally differentiated spinal cord oligodendrocytes*. Journal of Cell Biology 154: 1245-1258.
- Pegram, M.D., Lipton, A., Hayes, D.F., Weber, B.L., Baselga, J.M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S.A., Twaddell, T., Glaspy, J.A., Slamon, D.J. (1998)** *Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment*. Journal of Clinical Oncology 16: 2659-2671.
- Pegram, M., Hsu, S., Lewis, G., Pietras, R., Beryt, M., Sliwkowski, M., Coombs, D., Baly, D., Kabbinnavar, F., Slamon, D. (1999)** *Inhibitory effects of combinations of Her-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers*. Oncogene 18: 2241-2251.



- Pegram, M.D., Lopez, A., Konecny, G., Slamon, D.J. (2000)** *Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies*. *Seminars in Oncology* 27: 21-25.
- Perez-Tenorio, G., Stal, O. (2002)** *Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients*. *British Journal of Cancer* 86: 540-545.
- Perl, A.K., Tichelaar, J.W., Whitsett, J.A. (2002)** *Conditional gene expression in the respiratory epithelium of the mouse*. *Transgenic Research* 11: 21-29.
- Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Brown, P.O., Botstein, D. (1999)** *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 9212-9217.
- Plantefaber, L.C., Hynes, R.O. (1989)** *Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells*. *Cell* 56: 281-290.
- Plowman, G.D., Whitney, G.S., Neubauer, M.G., Green, J.M., McDonald, V.L., Todaro, G.J., Shoyab, M. (1990)** *Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 87: 4905-4909.
- Plowman, G.D., Culouscou, J.-M., Whitney, G.S., Green, J.M., Carlton, G.W., Foy, L., Neubauer, M.G., Shoyab, M. (1993)** *Ligand-specific activation of HER4/p180<sup>erbB4</sup>, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 1746-1750.
- Potts, W., Tucker, D., Wood, H., Martin, C. (2000)** *Chicken beta-globin 5'HS4 insulators function to reduce variability in transgenic founder mice*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 273: 1015-1018.
- Prigent, S.A., Gullick, W. (1994)** *Identification of c-erbB-3 binding sites for phosphatidylinositol 3'-kinase and SHC using an EGF receptor/c-erbB-3 chimera*. *The EMBO Journal* 13: 2831-2841.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., Lopez-Otin, C. (2003)** *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. *Nature Reviews Genetics* 4: 544-558.
- Rao, J.S., Steck, P.A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Sawaya, R. (1993)** *Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors*. *Cancer Research* 53: 2208-2211.
- Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J. (1996)** *The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes: a role in osteoarthritis*. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2011-2019.
- Reddy, K.V.R., Mangale, S.S. (2003)** *Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function*. *Tissue and Cell* 35: 260-273.

- Reinmuth, N., Liu, W., Ahmad, S.A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Bucana, C.D., Gallick, G.E., Nickols, M.A., Westlin, W.F., Ellis, L.M. (2003)** *Alphav beta3 integrin antagonist s247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice.* Cancer Research 63: 2079-2087.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B., Schwartz, M.A. (1999)** *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton.* The EMBO Journal 18: 578-585.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S.I. (1994)** *Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system.* Molecular and Cellular Biology 14: 1669-1679.
- Riese, D.J.II, van Raaij, T.M., Plowman, G.D., Andrews, G.C., Stern, D.F. (1995)** *The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family.* Molecular and Cellular Biology 15: 5770-5776.
- Rival-Gervier, S., Pantano, T., Viglietta, C., Maeder, C., Prince, S., Attal, J., Jolivet, G., Houdebine, L.M. (2003)** *The insulator effect of the 5'HS4 region from the beta-globin chicken locus on the rabbit WAP gene promotor activity in transgenic mice.* Transgenic Research 12: 723-730.
- Robles, S.J., Adami, G.R. (1998)** *Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts.* Oncogene 16: 1113-1123.
- Rodriguez-Vilarrupla, A., Diaz, C., Canela, N., Rahn, H.-P., Bachs, O., Agell, N. (2002)** *Identification of the nuclear localization signal of p21/Cip1 and consequences of its mutation on cell proliferation.* FEBS Letters 531: 319-323.
- Roninson, I.B. (2000)** *Effects of p21Waf1/Cip1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence and age-related diseases.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 4291-4296.
- Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J. N., Botstein, D., Brown, P.O. (2000)** *Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines.* Nature Genetics 24: 227-235.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A. (1999)** *HER-2/neu (c-erbB2) gene and protein in breast cancer.* American Journal of Clinical Pathology 112: S53-67.
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2001)** *Akt-dependent phosphorylation of p21 (Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells.* Molecular and Cellular Biology 21: 5644-5657.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, D., Rommens, C., Beug, H., Graf, T., Stehelin, D. (1979)** *Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation.* Nature 281: 452-455.

- Ruoslahti, E. (1994-95)** *Fibronectin and its alpha5 beta1 integrin receptor in malignancy. Invasion and Metastasis* 14: 87-97.
- Saam, J.R., Gordon, J.I. (1999)** *Inducible gene knockouts in the small intestinal and colonic epithelium. The Journal of Biological Chemistry* 274: 38071-38082.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74: 5463-5467.
- Sastry, S.K., Lakonishok, M., Thomas, D.A., Muschler, J., Horwitz, A.F. (1996)** *Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. Journal of Cell Biology* 133: 169-184.
- Schaefer, G., Akita, R.W., Sliwkowski, M.X. (1999)** *A discrete three-amino acid segment (LVI) at the C-terminal end of kinase-impaired ErbB3 is required for transactivation of ErbB2. Journal of Biological Chemistry* 274: 859-866.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., Weinberg, R.A. (1984)** *The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. Nature* 312: 513-516.
- Schneider, P.M., Hung, M.C., Chiocca, S.M., Manning, J., Zhao, X.Y., Fang, K., Roth, J.A. (1989)** *Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. Cancer Research* 49: 4968-4971.
- Schneller, M., Vuori, K., Ruoslahti, E. (1997)**  *$\alpha\beta 3$  integrins associate with activated insulin and PDGF $\beta$  receptors and potentiate the biological activity of PDGF. The EMBO Journal* 16: 5600-5607.
- Scott, M.T., Morrice, N., Ball, K.L. (2000)** *Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21 (Waf1/Cip1) modulates proliferating cell nuclear antigen binding. Journal of Biological Chemistry* 275: 11529-11537.
- Sehgal, I., Baley, P.A., Thompson, T.C. (1996)** *Transforming growth factor beta1 stimulates contrasting responses in metastatic versus primary mouse prostate cancer-derived cell lines in vitro. Cancer Research* 56: 3359-3365.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., Yamamoto, T. (1985)** *A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82: 6497-6501.
- Senior, K. (2004)** *ERBB2 kinase mutations in lung-cancer tumours. Lancet Oncology* 5: 647.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997)** *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell* 88: 593-602.

- Shachaf, C.M., Kopelman, A.M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M.H., Borowsky, A.D., Ruebner, B., Cardiff, R.D., Yang, Q., Bishop, J.M., Contag, C.H., Felsher, D.W. (2004)** *MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumor dormancy in hepatocellular cancer.* Nature 431: 1112-1117.
- Sharpe, S., Barber, K.R., Grant, C.W. (2002)** *Interaction between ErbB1 and ErbB2 transmembrane domains in bilayer membranes.* FEBS Letters 519: 103-107.
- Sherr C.J., Matsushine, H., Roussel, M.F. (1992)** *Regulation of CYL/cyclin D genes by colony-stimulating factor 1.* Ciba Foundation Symposium 170: 209-219.
- Shih, C., Padhy, L.C., Murray, M., Weinberg, R.A. (1981)** *Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts.* Nature 290: 261-264.
- Siegel, P.M., Dankort, D.L., Hardy, W.R., Muller, W.J. (1994)** *Novel activating mutations in the neu proto-oncogene involved in induction of mammary tumors.* Molecular and Cellular Biology 14: 7068-7077.
- Siegel, P.M., Muller, W.J. (1996)** *Mutations affecting conserved cysteine residues within the extracellular domain of Neu promote receptor dimerization and activation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 8878-8883.
- Siegel, P.M., Ryan, E.D., Cardiff, R.D., Muller, W.J. (1999)** *Elevated expression of activated forms of Neu/ErbB-2 and ErbB-3 are involved in the induction of mammary tumors in transgenic mice: implications for human breast cancer.* The EMBO Journal 18: 2149-2164.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L. (1987)** *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.* Science 235: 177-182.
- Slamon, D.J., Clark, G.M. (1988)** *Amplification of c-erbB-2 and aggressive human breast tumors ?* Science 240: 1795-1798.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. (1989)** *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.* Science 244: 707-712.
- Sliwkowski, M.X., Schaefer, G., Akita, R.W., Lofgren, J.A., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerione, R.A., Vandlen, R.L., Carraway, K.L. (1994)** *Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin.* Journal of Biological Chemistry 269: 14661-14665.
- Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P., Medema, R.H. (2000)** *P21 inhibits thr161 phosphorylation of cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint.* Journal of Biological Chemistry 275: 30638-30643.
- Soulier, S., Stinnakre, M.-G., Lepourry, L., Mercier, J.-C., Vilotte, J.-L. (1999)** *Use of doxycycline-controlled gene expression to reversibly alter milk-protein composition in transgenic mice.* European Journal of Biochemistry 260: 533-539.

- Southern, E.M. (1975)** *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* Journal of Molecular Biology 98: 503-517.
- Stetler-Stevenson, W.G. (1990)** *Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis.* Cancer and Metastasis Reviews 9: 289-303.
- Spencer, K.S.R., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N.E., Klemke, R.L. (2000)** *ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by erbB family receptor tyrosine kinases.* Journal of Cell Biology 148: 285-397.
- Stephens, P., Hunter, C., Bignell, G., Edkins, S., Davies, H., Teague, J., Stevens, C., O'Meara, S., Smith, R., Parker, A., Barthorpe, A., Blow, M., Brackenbury, L., Butler, A., Clarke, O., et al. (2004)** *Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours.* Nature 431: 525-526.
- Stoeltzing, O., Liu, W., Reinmuth, N., Fan, F., Parry, G.C., Parikh, A.A., McCarty, M.F., Bucana, C.D., Mazar, A.P., Ellis, L.M. (2003)** *Inhibition of integrin alpha5beta1 function with a small peptide (ATN-161) plus continuous 5-FU infusions reduces colorectal liver metastases and improves survival in mice.* International Journal of Cancer 104: 496-503.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., Miura, M. (1998)** *Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP.* Oncogene 17: 931-939.
- Suzuki, A., Kawano, H., Hayashida, M., Hayashida, Y., Tsutomi, Y., Akahane, K. (2000)** *Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A.* Cell Death and Differentiation 7: 721-728.
- Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S., Watanabe, M. (2001)** *Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening.* Radiation Research 155: 248-253.
- Sweeney, C., Carraway III, K.L. (2000)** *Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage.* Oncogene 19: 5568-5573.
- Symington, B.E. (1995)** *Growth signalling through the alpha5 beta1 fibronectin receptor.* Biochemical and Biophysical Research Communication 208: 126-134.
- Talbot, D., Descombes, P., Schibler, U. (1994)** *The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBPb) gene can direct high-level, position-dependent, copy number-dependent expression in multiple tissues in transgenic mice.* Nucleic Acids Research 22: 756-766.
- Tan, M., Yao, J., Yu, D. (1997)** *Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities.* Cancer Research 57: 1199-1205.
- Temann, U.-A., Ray, P., Flavell, R.A. (2002)** *Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology.* Journal of Clinical Investigation 109: 29-39.

- Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Morimoto, S. (1997)** *Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family.* Biochemical Journal 326: 69-75.
- Tremblay, P., Meiner, Z., Galou, M., Heinrich, C., Petromilli, C., Lisse, T., Cayetano, J., Torchia, M., Mobley, W., Bujard, H., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1998)** *Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 12580-12585.
- Troyer, K.L., Lee, D.C. (2001)** *Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network.* Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 6: 7-21.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B.J., Yarden, Y. (1996)** *A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor.* Molecular and Cellular Biology 16: 5276-5287.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J.D., Klappner, L.N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B.J., Sela, M., Andrews, G.C., Yarden, Y. (1997)** *Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network.* The EMBO Journal 16: 4938-4950.
- Tzahar, E., Moyer, J.D., Waterman, H., Barbacci, E.G., Bao, J., Levkowitz, G., Shelly, M., Strano, S., Pinkas-Kramarski, R., Pierce, J.H., Andrews, G.C., Yarden, Y. (1998)** *Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network.* The EMBO Journal 17: 5948-5963.
- Uria, J.A., Balbin, M., Lopez, J.M., Alvarez, J., Vizoso, F., Takigawa, M., Lopez-Otin, C. (1998)** *Collagenase-3 (MMP-13) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck.* American Journal of Pathology 153: 91-101.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Mazahir, T.H., Bujard, H., Hillen, W. (2000)** *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 7963-7968.
- Utomo, A.R.H., Nikitin, A.Y., Lee, H.-W. (1999)** *Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice.* Nature Biotechnology 17: 1091-1096.
- Van der Geer, P., Pawson, T. (1995)** *The PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction.* Trends in Biochemical Sciences. 20: 277-280.
- Van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.H. (2002)** *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.* Nature 415: 530-536.

- Varner, J.A., Emerson, D.A., Juliano, R.L. (1995)** *Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin.* *Molecular Biology of the Cell* 6: 725-740.
- Vennstrom, B., Bishop, J.M. (1982)** *Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of avian erythroblastosis virus.* *Cell* 28: 135-143.
- Venter, D.J., Tuzi, N.L., Kumar, S., Gullick, W.J. (1987)** *Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification.* *Lancet* 2: 69-72.
- Visse, R., Nagase, H. (2003)** *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.* *Circulation Research* 92: 827-839.
- Vu, T.H., Werb, Z. (2000)** *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology.* *Genes and Development* 14: 2123-2133.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994)** *The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.* *Nature* 369: 574-578.
- Wang, F., Weaver, V.M., Peterson, O.W., Larabell, C.A., Dedhar, S., Briand, P., Lupu, R., Bissell, M.J. (1998)** *Reciprocal interactions between  $\beta 1$ -integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 14821-14826.
- Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., Sun, P. (2002)** *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence.* *Molecular and Cellular Biology* 22: 3389-3403.
- Wang, Y., O'Malley, B.W. Jr, Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. (1994)** *A regulatory system for use in gene transfer.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 8180-8184.
- Wang, Y., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. (1999)** *Antiprogestin regulable gene switch for induction of gene expression in vivo.* *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 306: 281-294.
- Wang, Z., Bhattacharya, N., Mixter, P.F., Wei, W., Sedivy, J., Magnuson, N.S. (2002)** *Phosphorylation of the cell cycle inhibitor p21Cip1/WAF1 by Pim-1 kinase.* *Biochimica et Biophysica Acta* 1593: 45-55.
- Ware, J.L., Maygarden, S.J., Koontz, W.W. Jr., Strom, S.C. (1991)** *Immunohistochemical detection of c-erbB-2 protein in human benign and neoplastic prostate.* *Human Pathology* 22: 254-258.
- Wassermann, J.D., Freeman, M. (1997)** *Control of EGF receptor activation in Drosophila.* *Trends in Cell Biology* 7: 431-436.

- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., Yarden, Y. (1998)** *Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency.* Journal of Biological Chemistry 273: 13819-13827.
- Waterman, H., Alroy, I., Strano, S., Seger, R., Yarden, Y. (1999)** *The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing.* The EMBO Journal 18: 3348-3358.
- Weiner, D.B., Liu, J., Greene, M.I. (1989)** *A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation.* Nature 339: 230-231.
- Weiner, D.B., Nordberg, J., Robinson, R., Nowell, P.C., Gazdar, A., Greene, M.I., Williams, W.V., Cohen, J.A., Kern, J.A. (1990)** *Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung.* Cancer Research 50: 421-425.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H., Gatz, C. (1994)** *A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants.* The Plant Journal 5: 559-569.
- Weis, R.H. (2003)** *P21Waf1/Cip1 as a therapeutic target in breast and other cancers.* Cancer Cell 4: 425-429.
- Wernicke, D., Seyfert, C., Hinzmann, B., Gromnica-Ihle, E. (1996)** *Cloning of collagenase-3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis.* The Journal of Rheumatology 26: 590-595.
- Westbrook, T.F., Nguyen, D.X., Thrash, B.R., McCance, D.J. (2002)** *E7 abolishes Raf-induced arrest via mislocalization of P21/Cip1.* Molecular and Cellular Biology 22: 7041-7052.
- Williams, T.M., Weiner, D.B., Greene, M.I., Maguire, H.C.Jr (1991)** *Expression of c-erbB-2 in human pancreatic adenocarcinomas.* Pathobiology 59: 46-52.
- Winters, Z.E., Leek, R.D., Bradburn, M.J., Norbury, C.J., Harris, A.L. (2003)** *Cytoplasmic p21WAF1/CIP1 expression is correlated with HER-2/neu in breast cancer and is an independent predictor of prognosis.* Breast Cancer Research 5: R242-249.
- Woodard, A.S., Garcia-Cardena, G., Leong, M., Madri, J.A., Sessa, W.C., Languino, L.R. (1998)** *The synergistic activity of  $\alpha_4\beta_3$  integrin and PDGF receptor increases cell migration.* Journal of Cell Science 111: 469-478.
- Wright, C., Mellon, K., Neal, D.E., Johnson, P., Corbett, I.P., Horne, C.H. (1990)** *Expression of c-erbB-2 protein product in bladder cancer.* British Journal of Cancer 62: 764-765.
- Xia, W., Lau, Y.K., Zhang, H.Z., Liu, A.R., Li, L., Kiyokawa, N., Clayman, G.L., Katz, R.L., Hung, M.C. (1997)** *Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma.* Clinical Cancer Research 3: 3-9.
- Xia, W., Chen, J.-S., Zhou, X., Sun, P.-R., Lee, D.-F., Liao, Y., Zhou, B.P., Hung, M.-C. (2004)** *Phosphorylation/cytoplasmic localization of p21<sup>CIP1/WAF1</sup> is associated with HER2/neu*



*overexpression and provides a novel combination predictor for poor prognosis in breast cancer patients.* Clinical Cancer Research 10: 3815-3824.

**Xie, W., Wu, X., Chow, L.T., Chin, E., Paterson, A.J., Kudlow, J.E. (1998)** *Targeted expression of activated erbB-2 to the epidermis of transgenic mice elicits striking developmental abnormalities in the epidermis and hair follicles.* Cell Growth and Differentiation 9: 313-325.

**Xie, W., Chow, L.T., Paterson, A.J., Chin, E., Kudlow, J.E. (1999)** *Conditional expression of the ErbB2 oncogene elicits reversible hyperplasia in stratified epithelia and up-regulation of TGF $\alpha$  expression in transgenic mice.* Oncogene 18: 3593-3607.

**Yang, H.Y., Zhou, B.P., Hung, M.H., Lee, M.H. (2000)** *Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.* The Journal of Biological Chemistry 275: 24735-24739.

**Yang, J.T., Rayburn, H., Hynes, R.O. (1993)** *Embryonic mesodermal defects in  $\alpha 5$  integrin-deficient mice.* Development 119: 1093-1105.

**Yao, J., Xiong, S., Klos, K., Nguyen, N., Grijalva, R., Li, P., Yu, D. (2001)** *Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin- $\beta 1$  in human breast cancer cells.* Oncogene 20: 8066-8074.

**Yarden, Y., Sliwkowski, M.X. (2001)** *Untangling the ErbB signalling network.* Nature Reviews Molecular Cell Biology 2: 127-137.

**Yokota, J., Yamamoto, T., Miyajima, N., Toyoshima, K., Nomura, N., Sakamoto, H., Yoshida, T., Terada, M., Sugimura, T. (1988)** *Genetic alterations of the c-erbB-2 oncogene occur frequently in tubular adenocarcinoma of the stomach and are often accompanied by amplification of the v-erbA homologue.* Oncogene 2: 283-287.

**Yoshida, K., Tsuda, T., Matsumura, T., Tsujino, T., Hattori, T., Ito, H., Thara, E. (1989)** *Amplification of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene and oncogenes in human gastric carcinomas.* Virchows Archiv B, Cell Pathology Including Molecular Pathology 57: 285-290.

**Yu, D., Jing, T., Liu, B., Yao, J., Tan, M., McDonnell, T.J., Hung, M.C. (1998)** *Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21CIP1, which inhibits p34Cdc2 kinase.* Molecular Cell 2: 581-591.

**Yu, D., Hung, M.C. (2000)** *Role of erbB2 in breast cancer chemosensitivity.* Bioassays 22: 673-680.

**Zajchowski, D.A., Kauser, K., Zhu, D., Webster, L., Aberle, S., White, F.A.III, Liu, H.L., Humm, R., MacRobbie, J., Ponte, P., Hegele-Hartung, C., Knauthe, R., Fritzemeier, K.H., Vergona, R., Rubanyi, G.M. (2000)** *Identification of selective estrogen receptor modulators by their gene expression fingerprints.* Journal of Biological Chemistry 275: 15885-15894.

**Zajchowski, D.A., Bartholdi, M.F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H.-L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S.P., Johnson, P.H. (2001)** *Identification of gene*

*expression profiles that predict the aggressive behaviour of breast cancer cells.* Cancer Research 61: 5168-5178.

**Zhang, D., Sliwkowski, M.X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., Godowski, P.J. (1997)** *Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94: 9562-9567.

**Zhang, X., Silva, E., Gershenson, D., Hung, M.C. (1989)** *Amplification and rearrangement of c-erb B proto-oncogenes in cancer of human female genital tract.* Oncogene 4: 985-989.

**Zhang, Z.K., Vuori, K., Reed, J.C., Ruoslahti, E. (1995)** *The  $\alpha 5 \beta 1$  integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates BCL-2 expression.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 6161-6165.

**Zhau, H.E., Zhang, X., von Eschenbach, A.C., Scorsone, K., Babaian, R.J., Ro, J.Y., Hung, M.C. (1990)** *Amplification and expression of the c-erb-B2/neu proto-oncogene in human bladder cancer.* Molecular Carcinogenesis 3: 254-257.

**Zhau, H.E., Wan, D.S., Zhou, J., Miller, G.J., von Eschenbach, A.C. (1992)** *Expression of c-erb B-2/neu proto-oncogene in human prostatic cancer tissues and cell lines.* Molecular Carcinogenesis 5: 320-327.

**Zhou, B.P., Hu, M.C., Miller, S.A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S.Y., Hung, M.C. (2000)** *Her-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway.* Journal of Biological Chemistry 275: 8027-8031.

**Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.C., Hung, M.C. (2001)** *Cytoplasmic localization of p21/Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells.* Nature Cell Biology 3: 245-252.

**Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., Bishop, J.M. (1998)** *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf.* Genes and Development 12: 2997-3007.

## 7 Anhang

### 7.1 Tabelle zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

<u>Sammelgel</u>	1 ml	2 ml	3 ml	5 ml	8 ml	
Aqua bidest	0,68	1,4	2,1	3,4	5,5	ml
30 % Acrylamid	0,17	0,35	0,5	0,83	1,3	ml
1 M Tris pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,63	1,0	ml
10 % SDS	10	20	30	50	80	µl
10 % APS	10	20	30	50	80	µl
TEMED	1	2	3	5	8	µl

<u>Laufgel</u>	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	
Aqua bidest	2,6	2,3	1,9	1,6	1,1	ml
30 % Acrylamid	1,0	1,3	1,7	2,0	2,5	ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	ml
10 % SDS	50	50	50	50	50	µl
10 % APS	50	50	50	50	50	µl
TEMED	4	3	2	2	2	µl

Gel (%)	Protein (kDa)	Überschichten der Gele:
15	12-43	bis 8 % mit 0,1 % SDS
10	16-68	ab 10% mit Isobutanol
7,5	36-94	
5	57-212	

### 7.2 Tabelle der Microarray-Ergebnisse

Gen	48h dox	UniGene
FRA1: FOS-RELATED ANTIGEN 1.	7.24 / 37 %	Hs.283565
TIMP1: METALLOPROTEINASE INHIBITOR 1 PRECURSOR	4.95 / 9 %	Hs.5831
CYLN2: CYTOPLASMIC LINKER 2	4.57 / 9 %	Hs.104717
MMP9: 92 KDA TYPE IV COLLAGENASE PRECURSOR	4.14 / 9 %	Hs.151738
BMP1: BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 1 PRECURSOR	4.06 / 9 %	Hs.1274
ITGB1: FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR (INTEGRIN BETA-1)	3.58 / 5 %	Hs.202661
IKBE: NF-KAPPAB INHIBITOR EPSILON	3.30 / 8 %	Hs.91640
CD44_EX10-12_HUMAN: CD44 ANTIGEN PRECURSOR	3.14 / 15 %	Hs.169610
FIBRONECTIN: FIBRONECTIN PRECURSOR	2.96 / 20 %	Hs.118162
PTPN12: PROTEIN-TYROSINE PHOSPHATASE G1	2.84 / 4 %	Hs.62
MST1R: MACROPHAGE-STIMULATING PROTEIN RECEPTOR PRECURSOR	2.84 / - %	Hs.2942
VEGC: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C PRECURSOR (VEGF-C)	2.84 / - %	Hs.79141
ITGA5: INTEGRIN ALPHA-5 PRECURSOR	2.79 / 13 %	Hs.149609
GDF15_2: GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 15 PRECURSOR	2.78 / 5 %	Hs.116577
MRP3A: CANALICULAR MULTISPECIFIC ORGANIC ANION TRANSPORTER 2	2.77 / 14 %	Hs.90786
FKHR: FORKHEAD PROTEIN O1A	2.68 / - %	Hs.170133
LYN: TYROSINE-PROTEIN KINASE LYN	2.66 / 3 %	Hs.80887
ENIGMA: ENIGMA PROTEIN	2.65 / 17 %	Hs.102948
MCL1: INDUCED MYELOID LEUKEMIA CELL DIFFERENTIATION PROTEIN MCL-1.	2.59 / 10 %	Hs.86386
NFKB1: NUCLEAR FACTOR NF-KAPPA-B P105 SUBUNIT	2.57 / 5 %	Hs.83428
MATRILIN2: MATRILIN-2 (FRAGMENT).	2.53 / 72 %	Hs.19368

BMX: CYTOPLASMIC TYROSINE-PROTEIN KINASE BMX	2.46 / 15 %	Hs.27372
CYR61: CYR61 PROTEIN PRECURSOR	2.43 / 12 %	Hs.8867
HSP105: HEAT-SHOCK PROTEIN 105 KDA	2.37 / 3 %	Hs.36927
SYCL: SYNTENIN. MELANOMA DIFFERENTIATION ASSOCIATED PROTEIN-9	2.37 / 26 %	Hs.8180
TRAILR1_HUMAN: TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10A PRECURSOR	2.37 / 24 %	Hs.249190
LAMG1: LAMININ GAMMA-1 CHAIN PRECURSOR	2.36 / 9 %	Hs.214982
BIP: 78 KDA GLUCOSE-REGULATED PROTEIN PRECURSOR	2.35 / 5 %	Hs.75410
ANXA2: ANNEXIN II	2.30 / 6 %	Hs.217493
NFKB2: NUCLEAR FACTOR NF-KAPPA-B P100 SUBUNIT	2.26 / 14 %	Hs.73090
MDC9: CELLULAR DISINTEGRIN-RELATED PROTEIN PRECURSOR	2.18 / 10 %	Hs.2442
PNAS-5: APOPTOSIS-RELATED PROTEIN PNAS-5 (FRAGMENT)	2.17 / 8 %	Hs.71040
GADD45: GROWTH ARREST AND DNA-DAMAGE-INDUCIBLE PROTEIN GADD45 ALPHA	2.15 / 4 %	Hs.80409
CTGF: CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR PRECURSOR	2.12 / 11 %	Hs.75511
LIM: LIM PROTEIN	2.11 / 11 %	Hs.154103
TGF1: TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 PRECURSOR	2.10 / 15 %	Hs.1103
ITCH: UBIQUITIN LIGASE ITCH	2.08 / 13 %	Hs.98074
GSPT1: G1 TO S PHASE TRANSITION PROTEIN 1 HOMOLOG	2.06 / 21 %	Hs.2707
TP53BP1: TUMOR SUPPRESSOR P53-BINDING PROTEIN 1	2.06 / - %	Hs.170263
PRKCH: PROTEIN KINASE C, ETA TYPE	2.04 / 14 %	Hs.1880
IFNGR1: INTERFERON-GAMMA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR	2.01 / 6 %	Hs.180866
IFNGR2: INTERFERON-GAMMA RECEPTOR BETA CHAIN PRECURSOR	2.01 / 16 %	Hs.177559

Gen	48h dox	UniGene
GCN5: HGCN5 HISTONE ACETYLTRANSFERASE	0.08 / 40 %	Hs.101067
FANCA: FANCONI ANEMIA GROUP A PROTEIN	0.11 / - %	Hs.284153
PDGA: PDGA PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR, A CHAIN PRECURSOR	0.12 / - %	Hs.37040
BAT3: LARGE PROLINE-RICH PROTEIN BAT3	0.12 / 19 %	Hs.274348
SMRTE: SILENCING MEDIATOR OF RETINOIC ACID AND THYROID HORMONE	0.12 / 29 %	Hs.120980
CREB-RP: CAMP RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN-LIKE 1	0.13 / 19 %	Hs.42853
PLCG1: 1-PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE GAMMA 1	0.14 / 38 %	Hs.268177
FOSB: FOSB PROTEIN	0.14 / 43 %	Hs.75678
SIP1_1: TYROSINE KINASE ACTIVATOR PROTEIN 1	0.15 / 25 %	Hs.101813
ANXA11: ANNEXIN XI	0.16 / 20 %	Hs.75510
SRCAP: TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR SRCAP.	0.17 / - %	Hs.87908
KIF1C: KINESIN-LIKE MOTOR PROTEIN KIF1C	0.17 / 27 %	Hs.278290
LTBP3: LATENT TGF BETA BINDING PROTEIN 3	0.18 / 106 %	Hs.238839
SYNDECAN1: SYNDECAN-1 PRECURSOR	0.18 / 8 %	Hs.82109
MBD3: METHYL-CPG BINDING PROTEIN MBD3.	0.18 / 9 %	Hs.178728
2900018K03RIK: 2900018K03RIK PROTEIN.	0.19 / - %	Hs.250474
LAMP1: LYSOSOME-ASSOCIATED MEMBRANE GLYCOPROTEIN 1 PRECURSOR	0.19 / 17 %	Hs.150101
CCNG2: CYCLIN G2.	0.19 / 25 %	Hs.79069
SIP1_2: TYROSINE KINASE ACTIVATOR PROTEIN 1	0.20 / 15 %	-
LZ16: NASOPHARYNGEAL CARCINOMA SUSCEPTIBILITY PROTEIN LZ16.	0.20 / 25 %	Hs.78225
NCAML1: NEURAL CELL ADHESION MOLECULE L1 PRECURSOR	0.21 / 21 %	Hs.1757
FLJ11198: FIS, CLONE PLACE1007697, WEAKLY SIMILAR TO GCN20 PROTEIN.	0.22 / 34 %	Hs.91251
HDAC3: HISTONE DEACETYLASE 3	0.23 / 15 %	Hs.279789
LIMK1: LIM DOMAIN KINASE 1	0.23 / 18 %	Hs.36566
OGFR: OPIOID GROWTH FACTOR RECEPTOR.	0.23 / 19 %	Hs.67896
BAIAP3: BAI ASSOCIATED PROTEIN 3	0.23 / 25 %	-
FKHL16: FORKHEAD PROTEIN M1	0.24 / 11 %	Hs.239
MAPK3: MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3 ( P44-ERK1)	0.24 / 13 %	Hs.861
COL18A1_2: COLLAGEN ALPHA 1(XVIII) CHAIN	0.24 / 22 %	Hs.78409

FLJ12808: FIS, CLONE NT2RP2002373, HYPOTHETICAL 59.7 KDA PROTEIN.	0.24 / 30 %	Hs.7393
VAV2: VAV2 PROTEIN.	0.24 / 43 %	Hs.4248
MAF1: MAFB/KREISLER BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTOR.	0.25 / 10 %	Hs.169487
BCL2L1: APOPTOSIS REGULATOR BCL-X.	0.26 / 29 %	Hs.305890
ACTR1A: ALPHA-CENTRACTIN	0.27 / 13 %	Hs.153961
TAPBP: TAPASIN PRECURSOR	0.27 / 17 %	Hs.179600
CDKN1B: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1B	0.27 / 21 %	Hs.238990
ABCC1: MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 1.	0.27 / 28 %	Hs.89433
FZD7_1: FRIZZLED-7	0.28 / - %	Hs.173859
M-ABC1: ATP-BINDING CASSETTE PROTEIN M-ABC1.	0.28 / 21 %	Hs.118634
P53: CELLULAR TUMOR ANTIGEN P53	0.28 / 26 %	Hs.1846
NRF1: NUCLEAR FACTOR ERYTHROID 2 RELATED FACTOR 1	0.29 / 14 %	Hs.83469
ABCA3: ATP-BINDING CASSETTE, SUB-FAMILY A, MEMBER 3	0.29 / 30 %	Hs.26630
ATF5: CYCLIC-AMP-DEPENDENT TRANSCRIPTION FACTOR ATF-5	0.30 / 11 %	Hs.9754
THBD:THROMBOMODULIN PRECURSOR	0.30 / 22 %	Hs.2030
TRAP150: THYROID HORMONE RECEPTOR-ASSOCIATED PROTEIN COMPLEX COMPONENT	0.30 / 25 %	Hs.108319
WWP2: NEDD-4-LIKE UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE	0.31 / 15 %	Hs.166119
FLJ10709: HYPOTHETICAL 66.3 KDA PROTEIN	0.32 / 10 %	Hs.273357
DKFZP566J153: HYPOTHETICAL 55.4 KDA PROTEIN (PRP31).	0.32 / 20 %	Hs.183438
AGRIN: AGRIN PRECURSOR.	0.33 / 1 %	Hs.273330
CCNF_2: G2/MITOTIC-SPECIFIC CYCLIN F.	0.33 / 13 %	Hs.1973
TGFBI: (TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA INDUCED PROTEIN IG-H3 PRECURSOR	0.33 / 13 %	Hs.118787
MAZ: MYC-ASSOCIATED ZINC FINGER PROTEIN	0.33 / 17 %	Hs.7647
TUBB1-TUBB5_HUMAN: TUBULIN BETA-1 CHAIN.TUBULIN BETA-5 CHAIN.	0.33 / 19 %	Hs.356729 Hs.179661
FLJ12470: RING FINGER PROTEIN 20.	0.33 / 20 %	Hs.168095
ORP150: 150 KDA OXYGEN REGULATED HSP70 FAMILY PROTEIN	0.34 / 15 %	Hs.277704
DKFZP434L0117: HYPOTHETICAL 50.2 KDA PROTEIN (FRAGMENT).	0.34 / 18 %	Hs.63795
DSP: DESMOPLAKIN	0.34 / 20 %	Hs.74316
BTAK: SERINE/THREONINE KINASE	0.35 / 12 %	Hs.250822
TAX40: TAX INTERACTION PROTEIN 40 (FRAGMENT) PAR-6.	0.35 / 15 %	Hs.112933
PESCADILLO: PESCADILLO PROTEIN.	0.35 / 5 %	Hs.13501
KIAA1002: KIAA1002 PROTEIN.	0.36 / 11 %	Hs.156110
DJ477O4.2: CGI-54 PROTEIN	0.36 / 13 %	Hs.169992
MNF: FORKHEAD BOX PROTEIN K1	0.36 / 19 %	Hs.105125
IKKG: NF-KAPPAB ESSENTIAL MODULATOR	0.36 / 26 %	Hs.43505
DKFZP434L0827: HYPOTHETICAL 75.6 KD ABC-TRANSPORTER (FRAGMENT)	0.37 / - %	Hs.55879
RELB: TRANSCRIPTION FACTOR RELB	0.37 / 12 %	Hs.858
BSG: BASIGIN PRECURSOR	0.37 / 14 %	Hs.74631
CA12: CARBONIC ANHYDRASE XII PRECURSOR	0.37 / 28 %	Hs.5338
NFKB3: TRANSCRIPTION FACTOR P65	0.37 / 31 %	Hs.75569
PROTEIN KINASE C, DELTA TYPE	0.37 / 4 %	Hs.155342
GNAZ: GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN G(Z)	0.38 / - %	Hs.92002
POLR2E: DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE II 23 KDA POLYPEPTIDE	0.38 / 12 %	Hs.24301
LAT: TYROSINE KINASE SUBSTRATE LAT LINKER FOR ACTIVATION OF T CELLS	0.39 / - %	Hs.83496
CEP250: CEP250 CENTROSOME ASSOCIATED PROTEIN	0.39 / 16 %	Hs.27910
HOP: STRESS-INDUCED-PHOSPHOPROTEIN 1	0.39 / 17 %	Hs.75612
NP220: NUCLEAR PROTEIN	0.39 / 20 %	Hs.169984
SSB2: SIMILAR TO C. ELEGANS SEQUENCE ENCODED BY GENBANK ACCESSION NUMBER U13875	0.39 / 27 %	-
BAX: APOPTOSIS REGULATOR BAX	0.40 / 10 %	Hs.159428
KIAA0538: KIAA0538 PROTEIN. PUTATIVE RASGAP-ACTIVATING-LIKE PROTEIN.	0.40 / 14 %	Hs.184367
XRCC: DNA-REPAIR PROTEIN XRCC1.	0.40 / 5 %	Hs.98493

HSP84-5PRIME: HEAT SHOCK PROTEIN HSP 90-BETA	0.40 / 9 %	Hs.74335
ABR: ACTIVE BREAKPOINT CLUSTER REGION-RELATED PROTEIN.	0.41 / - %	Hs.118021
COL6A1: COLLAGEN (VI) ALPHA-1 CHAIN	0.41 / 33 %	Hs.108885
HSPC195: HSPC195.	0.42 / 11 %	Hs.15093
RRAS: RAS-RELATED PROTEIN R-RAS	0.42 / 17 %	Hs.9651
CRHSP-24: CALCIUM-REGULATED HEAT STABLE PROTEIN CRHSP-24	0.42 / 6 %	Hs.92198
ABCA7:MACROPHAGE ABC TRANSPORTER.	0.43 / 12 %	Hs.134514
ACTN4: ALPHA-ACTININ 4	0.43 / 20 %	Hs.182485
SYNDECAN3: SYNDECAN-3	0.43 / 27 %	Hs.158287
FLJ22315: FIS, CLONE HRC05256.	0.44 / 13 %	Hs.224179
ATF3: CYCLIC-AMP-DEPENDENT TRANSCRIPTION FACTOR ATF-3	0.44 / 5 %	Hs.460
EF1D: ELONGATION FACTOR 1-DELTA	0.45 / 10 %	Hs.223241
PDGB: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR, B CHAIN PRECURSOR	0.45 / 16 %	Hs.1976
KIAA0170: KIAA0170 PROTEIN.	0.45 / 24 %	Hs.277585
PSMD3: 26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S3	0.45 / 7 %	Hs.9736
CTTN: SRC SUBSTRATE CORTACTIN	0.45 / 9 %	Hs.347529
ZNF258: ZNF258.	0.46 / - %	Hs.301637
COL6A2: COLLAGEN ALPHA 2(VI) CHAIN PRECURSOR	0.46 / 19 %	Hs.4217
NEK2: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE NEK2	0.46 / 20 %	Hs.153704
LAMA5: KIAA0533 PROTEIN (LAMININ ALPHA 5 CHAIN) (FRAGMENT).	0.46 / 7 %	Hs.11669
PSMD4: 26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S5A	0.47 / 15 %	Hs.148495
KIAA1760: KIAA1760 PROTEIN (FRAGMENT).	0.47 / 15 %	Hs.132792
TNFR1: TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR 1 PRECURSOR	0.47 / 24 %	Hs.159
FRA2: FOS-RELATED ANTIGEN 2.	0.48 / 14 %	Hs.155210
AARS: ALANYL-TRNA SYNTHETASE	0.48 / 15 %	Hs.75102
SBP2: SECIS-BINDING PROTEIN 2	0.48 / 8 %	Hs.288141
GOLGA1: GOLGI COMPLEX AUTOANTIGEN GOLGIN-97	0.49 / - %	Hs.172647
NRIP1: NUCLEAR FACTOR RIP140	0.49 / 1 %	Hs.155017
MNK1: MAP KINASE INTERACTING KINASE	0.49 / 12 %	Hs.5591
TAX2: GAIP C-TERMINUS INTERACTING PROTEIN GIPC	0.49 / 14 %	Hs.6454
HSPC117: HYPOTHETICAL 55.2 KDA PROTEIN, RELATED TO E.COLI RTCB.	0.49 / 24 %	Hs.10729
BAD: BAD PROTEIN (BCL 2 BINDING COMPONENT 6)	0.49 / 9 %	Hs.76366
CGI-52: CGI-52 PROTEIN	0.50 / 13 %	Hs.84700
HSPG2: BASEMENT MEMBRANE-SPECIFIC HEPARAN SULFATE PROTEOGLYCAN	0.50 / 16 %	Hs.211573

Gen	8 h dox	UniGene
CALB2: CART CALRETININ	457.76 / - %	Hs.106857
BIGLYCAN: BONE/CARTILAGE PROTEOGLYCAN I PRECURSOR	53.95 / - %	Hs.284264
CD52: CAMPATH-1 ANTIGEN PRECURSOR	22.76 / - %	Hs.276770
ITGA5: INTEGRIN ALPHA-5 PRECURSOR	12.11 / 13 %	Hs.149609
FRA1:FOS-RELATED ANTIGEN 1.	9.27 / 20 %	Hs.283565
EMP1: EPITHELIAL MEMBRANE PROTEIN-1	8.22 / - %	Hs.79368
TIMP1: METALLOPROTEINASE INHIBITOR 1 PRECURSOR	7.60 / 5 %	Hs.5831
CEA: CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN PRECURSOR	6.72 / 7 %	Hs.220529
CD44_EX10-12_HUMAN: CD44 ANTIGEN PRECURSOR	6.11 / 16 %	Hs.169610
PROCR: ENDOTHELIAL PROTEIN C RECEPTOR PRECURSOR	5.40 / 25 %	Hs.82353
LAMB3: LAMININ BETA-3 CHAIN PRECURSOR	5.31 / 16 %	Hs.75517
PAI1: PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 PRECURSOR	5.21 / 47 %	Hs.82085
IL6: INTERLEUKIN-6 PRECURSOR	4.54 / 27 %	Hs.93913
ITGB1: FIBRONECTIN RECEPTOR BETA SUBUNIT PRECURSOR	3.97 / 10 %	Hs.202661
ABCC3: CANALICULAR MULTISPECIFIC ORGANIC ANION TRANSPORTER 2	3.87 / 15 %	Hs.90786
CD59_HUMAN: CD59 GLYCOPROTEIN PRECURSOR	3.72 / 6 %	Hs.119663

ABCC4: MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 4	3.72 / 29 %	Hs.139336
ITGA2: PLATELET MEMBRANE GLYCOPROTEIN IA PRECURSOR	3.69 / 74 %	Hs.271986
MRP3A: CANALICULAR MULTISPECIFIC ORGANIC ANION TRANSPORTER 2	3.63 / 19 %	Hs.90786
MST1R: MACROPHAGE-STIMULATING PROTEIN RECEPTOR PRECURSOR	3.56 / 39 %	Hs.2942
PAR2: PROTEINASE ACTIVATED RECEPTOR 2 PRECURSOR	3.40 / 36 %	Hs.154299
CASP9: CASPASE 9 PRECURSOR	3.32 / 20 %	Hs.100641
BMP1: BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 1 PRECURSOR	3.15 / 22 %	Hs.1274
ITGA6: INTEGRIN ALPHA-6 PRECURSOR	3.12 / 26 %	Hs.227730
INTEGRINB5: INTEGRIN BETA-5 PRECURSOR.	3.05 / 6 %	Hs.149846
LAMA3: LAMININ ALPHA-3 CHAIN PRECURSOR	2.97 / 15 %	Hs.83450
CD97: LEUCOCYTE ANTIGEN CD97 PRECURSOR.	2.84 / 19 %	Hs.3107
ENIGMA: ENIGMA PROTEIN	2.78 / 7 %	Hs.102948
TRAILR1_HUMAN: TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR SUPERFAMILY MEMBER 10A PRECURSOR	2.76 / 14 %	Hs.249190
INTEGRINB6:INTEGRIN BETA-6 PRECURSOR.	2.62 / 10 %	Hs.123125
COL1A1: COLLAGEN ALPHA 1(I) CHAIN PRECURSOR.	2.61 / 29 %	Hs.172928
ITGA3: INTEGRIN ALPHA-3 PRECURSOR	2.60 / 3 %	Hs.265829
PRKCH: PROTEIN KINASE C, ETA TYPE	2.52 / 7 %	Hs.1880
KIAA0610: KIAA0610 PROTEIN (FRAGMENT).	2.50 / 7 %	Hs.118087
ITGAV: VITRONECTIN RECEPTOR ALPHA SUBUNIT PRECURSOR	2.49 / 5 %	Hs.118512
IFNGR1: INTERFERON-GAMMA RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR	2.45 / 7 %	Hs.180866
LAMG1: LAMININ GAMMA-1 CHAIN PRECURSOR	2.36 / 10 %	Hs.214982
TIMP2: METALLOPROTEINASE INHIBITOR 2 PRECURSOR	2.31 / 13 %	Hs.6441
BPGF1-Q6: BONE-DERIVED GROWTH FACTOR	2.30 / 7 %	Hs.77266
BCRP: BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN	2.29 / 19 %	Hs.194720
IL18: INTERLEUKIN-18 PRECURSOR	2.28 / 14 %	Hs.83077
CD68: MACROSIALIN PRECURSOR	2.27 / 13 %	Hs.246381
COL4A5: COLLAGEN ALPHA 5(IV) CHAIN PRECURSOR.	2.25 / 19 %	Hs.169825
CDKN1A: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1	2.17 / 20 %	Hs.179665
TGFA55: TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALPHA PRECURSOR	2.17 / 14 %	Hs.170009
BACH1: TRANSCRIPTION REGULATOR PROTEIN BACH1	2.14 / - %	Hs.154276
TIMP3: METALLOPROTEINASE INHIBITOR 3 PRECURSOR	2.11 / 20 %	Hs.245188
IL4R: INTERLEUKIN-4 RECEPTOR ALPHA CHAIN PRECURSOR	2.07 / 12 %	Hs.75545
TGF1: TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 PRECURSOR	2.06 / 6 %	Hs.1103
VEGF_1: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PRECURSOR	2.05 / 7 %	Hs.73793
FAT: CADHERIN-RELATED TUMOR SUPPRESSOR HOMOLOG PRECURSOR	2.02 / - %	Hs.166994

Gen	8 h dox	UniGene
FOSB: FOSB PROTEIN	0.09 / 28 %	Hs.75678
LAP18: STATHMIN	0.15 / 10 %	Hs.81915
FKHL16: FORKHEAD PROTEIN M1	0.18 / 7 %	Hs.239
BMP5: BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 5 PRECURSOR	0.20 / 4 %	Hs.1104
NASP: NUCLEAR AUTOANTIGENIC SPERM PROTEIN	0.21 / - %	Hs.243886
CA12: CARBONIC ANHYDRASE XII PRECURSOR	0.21 / 12 %	Hs.5338
KI67: ANTIGEN KI-67.	0.22 / 17 %	Hs.80976
BARD1: BRCA1-ASSOCIATED RING DOMAIN PROTEIN.	0.23 / 18 %	Hs.54089
MAF1: MAFB/KREISLER BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER TRANSCRIPTION FACTOR.	0.23 / 18 %	Hs.169487
NEK2: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE NEK2	0.25 / - %	Hs.153704
FANCA: FANCONI ANEMIA GROUP A PROTEIN	0.25 / 13 %	Hs.284153
CCNB2: CYCLIN B2 G2/MITOTIC SPECIFIC CYCLIN B2.	0.27 / 13 %	Hs.194698
HMG17: NONHISTONE CHROMOSOMAL PROTEIN HMG-17.	0.27 / 21 %	Hs.181163
CDK1: CELL DIVISION CONTROL PROTEIN 2 HOMOLOG	0.27 / 21 %	Hs.184572
MUC1: MUCIN 1 PRECURSOR	0.29 / 19 %	Hs.89603

PCNA: PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN	0.29 / 4 %	Hs.78996
MAGP1: MICROFIBRIL-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN PRECURSOR	0.30 / 12 %	Hs.83551
PRAME_HUMAN: MELANOMA ANTIGEN PREFERENTIALLY EXPRESSED IN TUMORS	0.32 / - %	Hs.30743
CTGF: CONNECTIVE TISSUE GROWTH FACTOR PRECURSOR	0.32 / 10 %	Hs.75511
IL8RA-IL8RB_HUMAN: HIGH AFFINITY INTERLEUKIN-8 RECEPTOR A	0.32 / 24 %	Hs.846 Hs.194778
NY-BR-85: SEROLOGICALLY DEFINED BREAST CANCER ANTIGEN NY-BR-85 (FRAGMENT).	0.32 / 3 %	Hs.105153
GNAZ: GUANINE NUCLEOTIDE BINDING PROTEIN G(Z)	0.34 / - %	Hs.92002
P53: CELLULAR TUMOR ANTIGEN P53	0.34 / 15 %	Hs.1846
TAX40: TAX INTERACTION PROTEIN 40	0.35 / 53 %	Hs.112933
CDKN1B: CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 1B	0.36 / 13 %	Hs.238990
XRCC: DNA-REPAIR PROTEIN XRCC1.	0.36 / 14 %	Hs.98493
COL18A1_2: COLLAGEN ALPHA 1(XVIII) CHAIN	0.36 / 15 %	Hs.78409
CRHSP-24: CALCIUM-REGULATED HEAT STABLE PROTEIN CRHSP-24	0.38 / 10 %	Hs.92198
CGI-52: CGI-52 PROTEIN	0.39 / 14 %	Hs.84700
CCNF_2: G2/MITOTIC-SPECIFIC CYCLIN F.	0.39 / 7 %	Hs.1973
MBD3: METHYL-CPG BINDING PROTEIN MBD3.	0.40 / 27 %	Hs.178728
XBP1: X BOX BINDING PROTEIN-1	0.40 / 4 %	Hs.149923
PLCG1: 1-PHOSPHATIDYLINOSITOL-4,5-BISPHOSPHATE PHOSPHODIESTERASE GAMMA 1	0.40 / 9 %	Hs.268177
ABCP2: ANTIGEN PEPTIDE TRANSPORTER 1	0.41 / - %	Hs.158164
DKFZP434L0117: HYPOTHETICAL 50.2 KDA PROTEIN (FRAGMENT).	0.41 / 3 %	Hs.63795
BTAK: SERINE/THREONINE KINASE	0.41 / 7 %	Hs.250822
MCM3: DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MCM3	0.42 / 1 %	Hs.179565
COL18A1_1: COLLAGEN ALPHA 1(XVIII) CHAIN	0.42 / 11 %	Hs.78409
PIK3R1: PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE REGULATORY ALPHA SUBUNIT	0.42 / 21 %	Hs.6241
KIAA0708: KIAA0708 PROTEIN (FRAGMENT).	0.43 / - %	Hs.117177
SRCAP: TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR SRCAP.	0.43 / 19 %	Hs.87908
VRK1: SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 51PK	0.43 / 6 %	Hs.48269
GCN5: HGCN5 HISTONE ACETYLTRANSFERASE	0.44 / 10 %	Hs.101067
COL11A2: COLLAGEN ALPHA 2(XI) CHAIN PRECURSOR.	0.45 / - %	Hs.121509
CDK2: CELL DIVISION PROTEIN KINASE 2	0.45 / 5 %	Hs.19192
KIAA0259: DNA TOPOISOMERASE II BINDING PROTEIN	0.46 / 22 %	Hs.91417
CCNG2: CYCLIN G2.	0.47 / 16 %	Hs.79069
AP1: TRANSCRIPTION FACTOR AP-1	0.48 / 17 %	Hs.78465
PSME1: 11S PROTEASOME REGULATOR PA28 ALPHA SUBUNIT	0.48 / 5 %	Hs.75348
HSPC150: UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2	0.48 / 8 %	Hs.5199
RAR: RAR GTP BINDING PROTEIN.	0.49 / - %	Hs.75270
BAIAP3: BAI ASSOCIATED PROTEIN 3	0.49 / 56 %	-
HSPC195: HSPC195.	0.49 / 7 %	Hs.15093
THBD: THROMBOMODULIN PRECURSOR	0.50 / 10 %	Hs.2030



### **7.3 Lebenslauf**

## 7.4 Publikationen und Kongressteilnahmen

**Trost**, T.M., Lausch, E.U., Fees, S.A., Schmitt, S., Enklaar, T., Reutzel, D., Brixel, L.R., Schmidtke, P., Maringer, M., Schiffer, I.B., Heimerdinger, C.K., Hengstler, J.G., Fritz, G., Bockamp, E.O., Prawitt, D., Zabel, B.U., Spangenberg, C.

***Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells.***

Cancer Research 2005, 65:840-849.

Eger, K., Hermes, M., Uhlemann, K., Rodewald, S., Ortwein, J., Brulport, M., Bauer, A.W., Schormann, W., Lupatsch, F., Schiffer, I.B., Heimerdinger, C.K., 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, E.O., Beckers, T., Hengstler, J.G.

***4-Epidoxycycline: an alternative to doxycycline to control gene expression in conditional mouse models.***

Biochemical and Biophysical Research Communications 2004, 323: 979-986.

Schiffer, I.B., Gebhard, S., Heimerdinger, C.K., Heling, A., Hast, J., Wollscheid, U., Seliger, B., Tanner, B., Gilbert, T., Beckers, T., Baasner, S., Brenner, W., Spangenberg, C., Prawitt, D., **Trost**, T., Schreiber, G., Zabel, B., Thelen, M., Lehr, H.A., Oesch, F., Hengstler, J.G.

***Switching off her-2/neu in a tetracycline-controlled mouse tumor model leads to apoptosis and tumor-size-dependent remission.***

Cancer Research 2003, 63: 7221-7231.

Spangenberg, C., Fees, S.A., **Trost**, T.M., Enklaar, T., Reutzel, D., Klemm, G., Blattner, S., Langer, A., Lausch, E., Prawitt, D., Zabel, B.U.

***Molecular refinement of the breakpoints in a Wilms' Tumor cell line with a translocation t(7;12)(p22;q22).***

European Human Genetics Conference 2004 (München).

**Trost**, T.M., Lausch, E., Fees, S.A., Prawitt, D., Hengstler, J.G., Türeci, Ö., Sahin, U., Schmidtke, P., Zabel, B.U., Spangenberg, C.

***Consequences of reversible ERBB2-expression in breast carcinoma cells: Molecular analyses of intracellular signaling cascades and regulated target genes.***

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik 2003 (Marburg).

Spangenberg, C., **Trost**, T., Fees, S., Lausch, E., Prawitt, D., Trübenbach, J., Wildhardt, G., Zepp, F., Spranger, J., Zabel, B.

***Genetic factors studied in a family with autosomal dominant autoimmune disease.***

Conference of the American Society of Human Genetics 2002 (Baltimore, USA).

## **7.5 Danksagung**

### Erklärung

**Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.**

Tatjana Trost