

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)
DIREKTOR: PROF. DR. MED. O. ORTMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DES INHIBITORISCHEN EFFEKTES VON
GHRH-ANTAGONISTEN AUF HORMONREZEPTOR-NEGATIVE
MAMMAKARZINOMZELLINIEN IN KOMBINATION MIT DEM
MTOR-INHIBITOR RAPAMYCIN *IN-VITRO*

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
FLORIAN WEBER
AUS
REGENSBURG

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)

DIREKTOR: PROF. DR. MED. O. ORTMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG

UNTERSUCHUNG DES INHIBITORISCHEN EFFEKTES VON
GHRH-ANTAGONISTEN AUF HORMONREZEPTOR-NEGATIVE
MAMMAKARZINOMZELLINIEN IN KOMBINATION MIT DEM
MTOR-INHIBITOR RAPAMYCIN *IN-VITRO*

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
FLORIAN WEBER
AUS
REGENSBURG

2013

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gero Brockhoff
2. Berichterstatter:	PD Dr. Hans-Martin Fritsche
Datum der mündlichen Prüfung:	10.12.2013

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	6
a. Allgemeines (Hormonabhängigkeit des Mammakarzinoms)	6
b. Zielgerichtete Therapien	7
c. Bedeutung von GHRH und GHRH-Rezeptor	7
d. Wirkprinzip der GHRH-Antagonisten	10
e. Wirkung von GHRH-Antagonisten beim Mammakarzinom	13
f. Die Rolle von mTOR im intrazellulären Signalweg	14
g. Wirksamkeit des mTOR-Inhibitors Rapamycin	15
h. Die Idee einer Kombinationsbehandlung mit GHRH-Antagonisten und einem mTOR-Inhibitor	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
a. GHRH-Antagonisten	18
b. Zelllinien	18
c. Materialien und Bezugsquellen	19
d. Methoden	23
i. Zellkultur, Grundlagen	23
ii. Gewinnung von Zelllysaten	24
iii. Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay-Kit	24
iv. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot, Grundlagen	25
v. Western Blot: Rezeptornachweis	27
vi. Western Blot: Signalmoleküle	28
vii. Durchflusszytometrie	30

viii.	DNA-Färbung mit Propidiumiodid und Messung mittels Durchflusszytometrie	32
ix.	Dynamische Zellzyklusmessung mittels BrDU/Hoechst-Quenching	36
x.	Immunhistochemie	39
xi.	Vitalitätsanalyse mittels XTT-Assay	40
3.	ERGEBNISSE	42
a.	Rezeptorbestimmung	42
i.	Östrogen- und Progesteronrezeptor	42
ii.	Epidermal growth factor receptor (EGFR, Her1)	44
iii.	Her2/neu (ErbB2)-Rezeptor	45
iv.	GHRH-Rezeptor	45
v.	Zusammenfassung der Rezeptorexpression	47
b.	Nachweis von mTOR	47
c.	Dosis- und zeitabhängige Wirkung von Rapamycin	48
d.	Vitalitätsanalyse mittels XTT-Assay	50
e.	Effekte von Rapamycin und JMR-132 bei SK-BR-3, HCC1806 und HCC1937	51
f.	Effekte von Rapamycin und MIA-313/MIA-606 bei HCC1806	54
g.	Dynamische Zellzyklusmessung mittels BrDU/Hoechst-Quenching	55
h.	Untersuchung der Auswirkungen auf die intrazelluläre Signalweiterleitung mittels Western Blot	57
i.	Effekte bei MDA-MB-231	58
ii.	Effekte bei HCC1806	59
iii.	Effekte bei SK-BR-3	60
4.	DISKUSSION	61
a.	Rezeptorbestimmung	61
i.	Östrogen- und Progesteronrezeptor, Her2/neu und EGFR	61

ii.	GHRH-Rezeptor	62
b.	Nachweis von mTOR	62
c.	Dosis- und zeitabhängige Wirkung von Rapamycin	62
d.	Vitalitätsanalyse mittels XTT-Assay	64
e.	Synergistischer Effekt von Rapamycin und JMR-132 bei SK-BR-3	64
f.	Dynamische Zellzyklusanalyse: Wirkungsmechanismen und Effekt bei HCC1806	65
g.	Signalwege	66
h.	Resümee	68
5.	ZUSAMMENFASSUNG	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72
7.	SONSTIGES	84
8.	DANKSAGUNG	85

1. EINLEITUNG

a. ALLGEMEINES (HORMONABHÄNGIGKEIT DES MAMMAKARZINOMS)

Das invasive Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau in Deutschland, wie auch weltweit^{88,46}. Entsprechend ist die Pathogenese und die molekularpathologische Charakterisierung dieser Tumorentität Gegenstand intensiver Forschung. In den vergangenen Jahrzehnten konnten einige Hormone ausgemacht werden, die einen nachgewiesenen Einfluss auf das Wachstum der malignen Brusttumoren ausüben. Insbesondere die Überexpression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren¹ auf Brustkrebszellen, sowie eine hoch regulierte Synthese von Wachstumsfaktorrezeptoren wie des *epidermal growth factor receptor* (EGFR, Her1) und *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu, ErbB2) kann sowohl für eine differenziertere Prognosestellung wie auch für eine effektivere Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom herangezogen werden. Andererseits können auf etwa 10-17% aller Mammakarzinome^{18,30,71,95,2,61} weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden, ebenso wenig wie ErbB2. Diese Tumoren werden als *triple*-negativ bezeichnet und zeichnen sich durch aggressiveres Wachstum^{87,64,99}, ein verstärktes Metastasierungsverhalten^{25,37} und paradoxerweise auch durch eine ungünstige Prognose trotz guten Ansprechens auf eine systemische Chemotherapie⁸ aus. Übermäßig häufig treten die *triple*-negativen Mammakarzinome auch bei jüngeren Patientinnen, in der schwarzen Bevölkerung und bei Übergewichtigen auf^{9,107}. Anders als für Patientinnen mit Hormonrezeptorpositiven Karzinomen, die mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) oder ErbB2-Rezeptorantagonisten (z.B. Trastuzumab) behandelt werden können, gibt es für Patientinnen mit diesem Subtyp des invasiven Mammakarzinoms derzeit keine alternative oder ergänzende Behandlungsmöglichkeit zur konventionellen systemischen Chemotherapie^{73,71}.

b. ZIELGERICHTETE THERAPIEN

In den letzten beiden Dekaden wurden in der medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms entscheidende Fortschritte durch die Weiterentwicklung zielgerichteter Therapien (sog. *targeted therapies*) erzielt. Dieses Prinzip ist grundsätzlich nicht neu. Grundlage ist der Nachweis spezifischer biologischer Eigenschaften von Tumorzellen (z. B. Steroidhormonrezeptoren), deren Aktivität durch bestimmte Substanzen (z.B. Antihormone) blockiert werden kann. Tamoxifen ist als selektiver Östrogenrezeptorantagonist der älteste zielgerichtete Wirkstoff, der zur Behandlung von Brustkrebspatientinnen eingesetzt wird. Neuere Substanzen wie beispielsweise Trastuzumab sind monoklonale Antikörper, die gegen den Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 gerichtet sind. Zu den weiteren Entwicklungen gehört Lapatinib, das die Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen (RTK) der ErbB-Rezeptorfamilie blockiert.

Basierend auf der Tatsache, dass Tumorzellen bestimmte Peptidhormonrezeptoren exprimieren, wurde eine Reihe von Peptidhormonantagonisten entwickelt, für die eine deutliche Proliferationshemmung in zahlreichen malignen Tumoren nachgewiesen werden konnte. Außerdem kam es zur Entwicklung von Wirkstoffen, die selektiv die Phosphorylierung einzelner Proteine verhindern und einzelne Proteinkinasen der intrazellulären Signalkaskade hemmen, wie z.B. dem mTOR-Inhibitor Rapamycin.

c. BEDEUTUNG VON GHRH UND GHRH-REZEPTOR

Growth-hormone releasing hormone (GHRH, Syn.: GRH, SRH, Somatokrinin) ist ein hypothalamisches Polypeptid, welches in der Hypophyse zur Ausschüttung von Wachstumshormon (GH, Syn.: Somatotropin, STH) führt und konsekutiv die Sekretion des Wachstumsfaktors *Insulin-like growth factor* (IGF-1) aus der Leber induziert. Das Hormon besteht aus 44 Aminosäuren und entsteht durch proteolytische Spaltung aus einem 108 Aminosäuren messenden Prohormon. Seine

Wirkung entfaltet GHRH am GHRH-Rezeptor, der mit sieben Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert ist (Abb. 1).

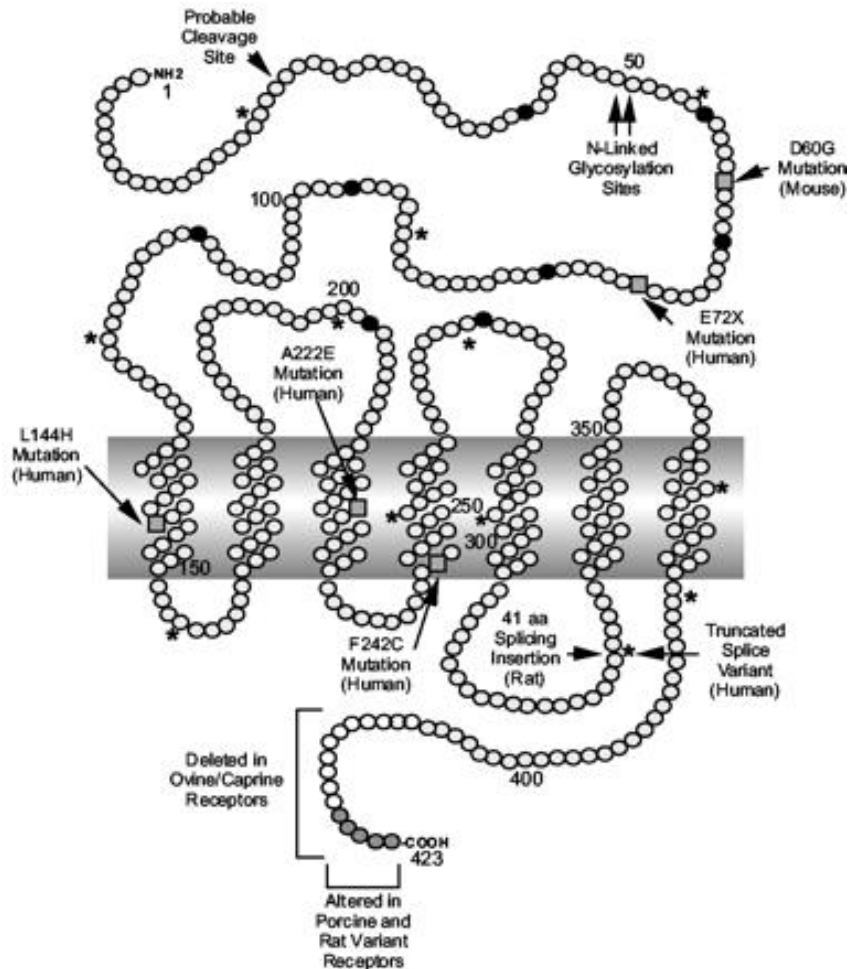


Abb. 1: Schematische Darstellung des GHRH-Rezeptors (aus: Kelly E. Mayo et al. The Glucagon Receptor Family (2003) *Pharm Rev*)

Das codierende Gen für den GHRH-Rezeptor wurde auf dem Chromosom 7 lokalisiert²⁹. Nach Bindung von GHRH an den Rezeptor erfolgt die Signalweiterleitung intrazellulär über verschiedene Signalwege, die in ihrer Gänze jedoch noch nicht eindeutig identifiziert und gesichert sind: einerseits sorgt GHRH-R als klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit seiner $G\alpha$ -Untereinheit offensichtlich für die Aktivierung der Adenylatcyclase und Bildung von cAMP. Der

daraus resultierende Calciumeinstrom erhöht die Syntheseleistung der Zelle und führt zur Proliferation. Mittels der G β - und G γ -Untereinheiten aktiviert der GHRH-Rezeptor wohl zudem die Phospholipase C, die über die Bildung von Inositol-3-Phosphat und Diacylglycerin ebenfalls einen Calciumeinstrom in die Zelle und zusätzlich die Aktivierung der Proteinkinase C bewirkt, durch die die Proliferation der Zelle angeregt wird²⁸. Ein dritter möglicher Signalweg führt über die Aktivierung der Ras/Raf/MEK/Erk-Kaskade zur Zellproliferation⁸⁶. Durch die erhöhte Aktivität der PI3K wird zudem der mTOR-Signalweg angeregt (vgl. 1.f.). Weiterhin wird diskutiert, ob GHRH auch die anti-apoptotische Aktivität von Bcl-2 verstärkt¹¹³ (Abb. 2). Insgesamt führen jedoch alle oben angeführten Signalkaskaden letztlich zu einer verstärkten Zellproliferation und kommen wegen ihrer Rolle in der Tumorentstehung und -progression als wichtige Ziele einer spezifischen Therapie in Frage.

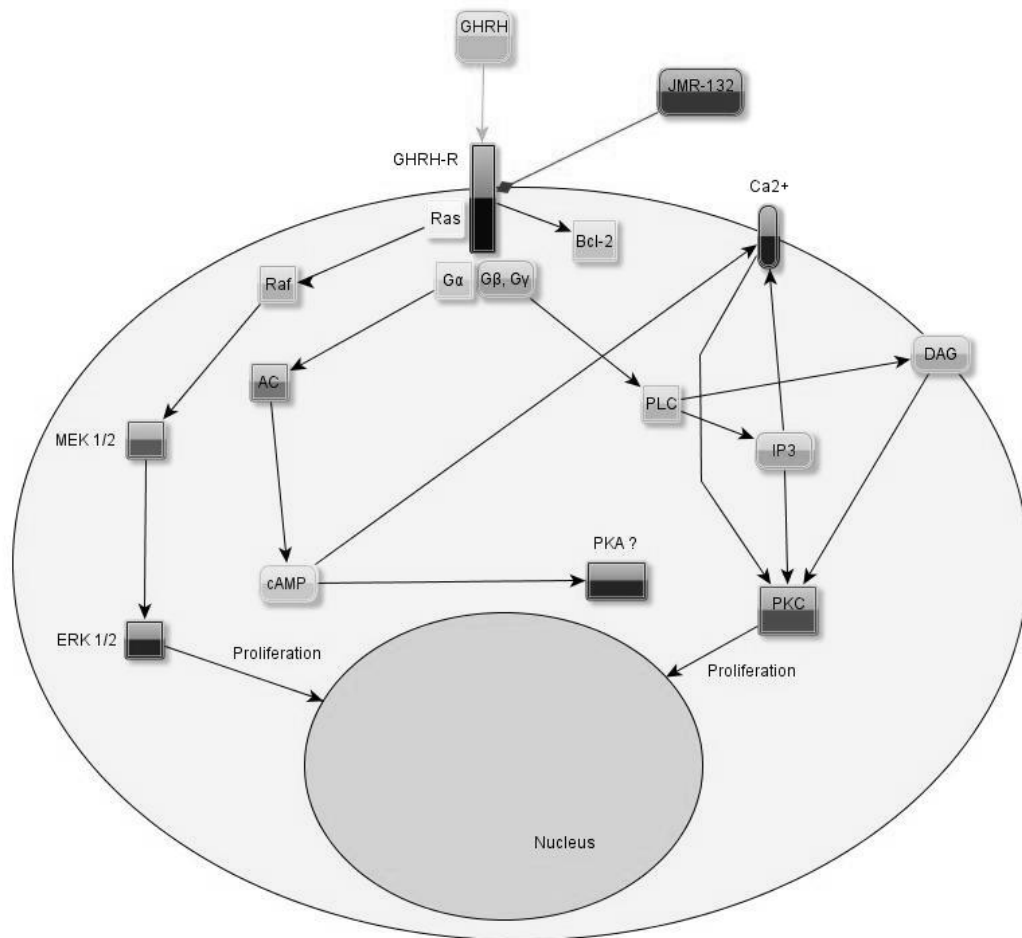


Abb. 2: Darstellung der bislang untersuchten möglichen intrazellulären Signalwege des GHRH-Rezeptors (mit Ausnahme des PI3K/Akt/mTOR-Pathways; siehe unten).

d. WIRKPRINZIP DER GHRH-ANTAGONISTEN

In den vergangenen zehn Jahren wurde eine Reihe von peptidergen Antagonisten von GHRH synthetisiert. Damit wurde das Ziel der Entwicklung neuer proliferationshemmender antitumoraler Wirkstoffe verfolgt^{79,80,100}. In *in-vitro* und *in-vivo*-Modellen zeigten diese Polypeptide antiproliferative Wirksamkeit in einem breiten Spektrum von Tumoren, wie z. B. Pankreas⁹², Kolon⁹¹, Prostata⁵⁶, Mamma⁴⁵, Nierenzell⁴² und Bronchialkarzinomen^{93,49}. Die antitumorale Wirkung der GHRH-Antagonisten basiert dabei sowohl auf direkten als auch auf indirekten

Mechanismen^{79,80}: die endokrine Wirkung beruht auf der Unterdrückung der GH-Ausschüttung aus der Hypophyse und daraus resultierender verminderter Produktion von IGF-1 durch die Leber. Die Inhibition des Wachstums von Osteosarkomen, Prostata-, Nierenzell- und Bronchialkarzinomen im Mausmodell nach hohen Dosen der GHRH-Antagonisten MZ-4-71 und MZ-5-156 war mit einer Reduktion der Spiegel von IGF-1 im Serum und in der Leber vergesellschaftet⁴³. IGF-1 wirkt in verschiedenen Tumoren als Proliferationsfaktor. Somit scheint es plausibel, dass die erniedrigten Serumspiegel von IGF-1 an dem antitumoralen Effekt ursächlich beteiligt waren.

Die Tatsache, dass Tumorzellen jedoch auch selbst zur Bildung und Freisetzung von GHRH befähigt sind, ist bereits seit über 20 Jahren bekannt²⁴. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieses Peptidhormon in einer Vielzahl von Tumoren ein autokriner Wachstumsfaktor ist^{93,49,12,68,7,6,44,28}. Später erfolgte der Nachweis des hypophysären GHRH-Rezeptors und dessen Splicevarianten (SV) in verschiedenen Tumorzelllinien und nativen humanen Tumorpräparaten^{12,68,7,6,28,11,74,31}. Dabei stellte sich heraus, dass besonders die Splicevariante 1 (SV1) des GHRH-Rezeptors eine große Ähnlichkeit mit dem hypophysären Rezeptor aufweist und wahrscheinlich hauptverantwortlich für die Wirkung von GHRH und seiner Antagonisten ist^{48,47}.

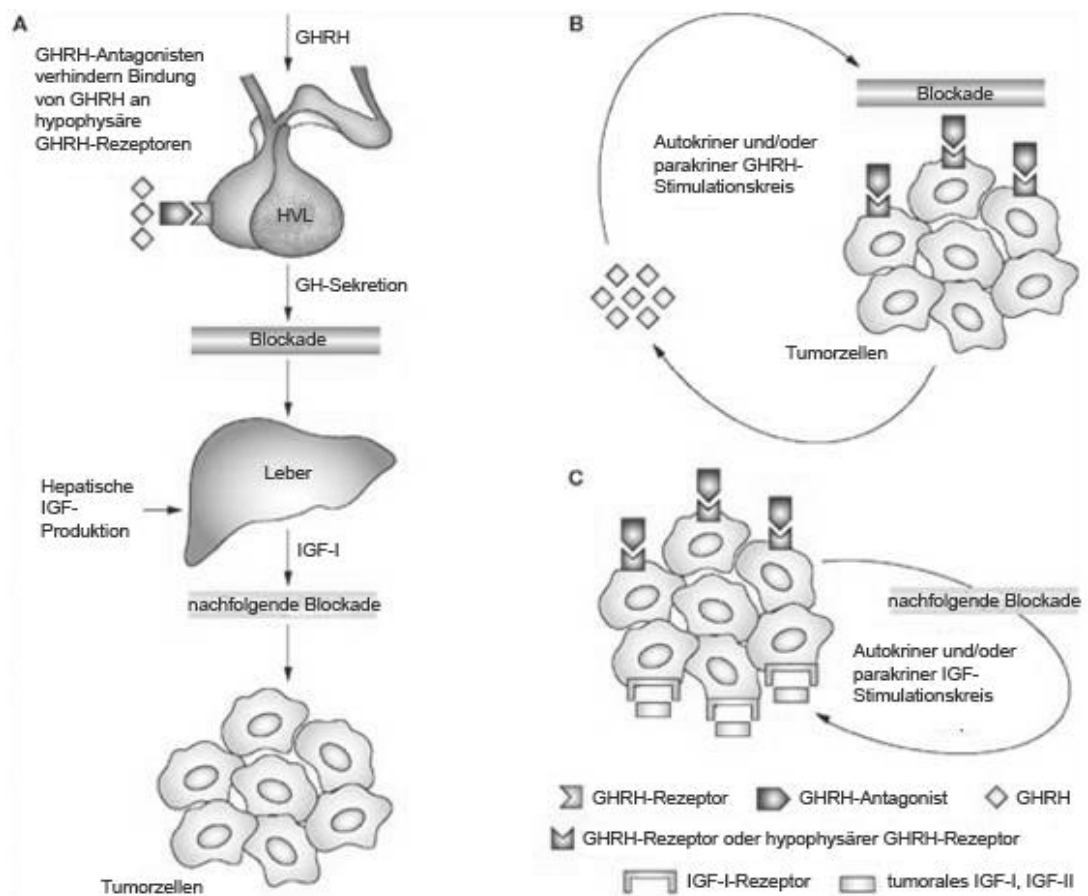


Abb. 3: Endokrine und intratumorale Wirkmechanismen von GHRH-Antagonisten (nach: Schally AV et al. (2008) *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass antiproliferative Effekte der GHRH-Antagonisten durch Unterbrechung eines auto- und/oder parakrinen stimulatorischen Loops der Tumorzellen bedingt sein könnten^{49,68,7,6,28,48,52} (Abb. 3).

In Pankreas-, Kolon-, Prostata-, Mamma-, Ovarial- und Bronchialkarzinomen wurde eine Wachstumsinhibition beobachtet, ohne dass signifikante Änderungen der IGF-1-Spiegel auftraten^{92,91}. In diesen Experimenten wurden entweder niedrigere Dosen der Antagonisten eingesetzt oder GHRH-Antagonisten, die strukturell unterschiedlich waren (z.B. JV-1-36, JV-1-38 oder MZ-J-7-118). Diese Experimente suggerieren, dass der für die Tumoringhibition verantwortliche Mechanismus ein direkter Effekt des Antagonisten auf das Tumorgewebe sein könnte. Diese Annahme wird durch

Ergebnisse aus *in-vitro*-Experimenten mit den Substanzen unterstützt, die systemische endokrine Effekte ausschliessen^{79,92,91,45,49,12,90,16,67}.

e. WIRKUNG VON GHRH-ANTAGONISTEN BEIM MAMMAKARZINOM

In vorhergehenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass der GHRH-Antagonist JMR-132 in einer NSLC-Zelllinie die Aktivität des für die Proliferation verantwortlichen Signalmoleküls *protein kinase B* (Akt, PKB) deutlich herunterregulierte³⁹. In einer *in-vivo* Studie mit der humanen Mammakarzinomzelllinie MX-1 führte der kombinierte Einsatz von JMR-132 und Docetaxel, einem herkömmlichen systemischen Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Taxane, zu einer deutlichen Steigerung der Wachstumsinhibition des Tumors⁵. Die Applikation von JMR-132 hatte einen Einfluss auf die Expression des EGF-Rezeptors, was die antiproliferative Wirkung möglicherweise verstärkt. In der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 konnten die Daten aus der MX-1-Studie *in-vivo* und *in-vitro* bestätigt werden⁵¹. In einem weiteren Versuch wurde nachgewiesen, dass JMR-132 sowohl bei der ER-positiven Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1, als auch bei der ER-negativen Zelllinie SK-BR-3 einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum *in-vitro* ausübt⁸³.

Basierend auf den vorliegenden Daten aus Experimenten mit JMR-132 und dem Einfluss auf das Signalwegsmolekül Akt werden nun weitere Rezeptor-spezifische Substanzen als Kombinationspartner für die Behandlung *triple*-negativer Mammakarzinomzelllinien in Betracht gezogen. Andere zielgerichtete Substanzen in Kombination mit GHRH-Antagonisten einzusetzen könnte den antitumoralen Effekt im Mammakarzinom durch das Eingreifen in verschiedene für die Proliferation verantwortliche Signalwege verstärken und eine Resistenzentwicklung unter der Therapie verhindern.

f. DIE ROLLE VON mTOR IM INTRAZELLULÄREN SIGNALWEG

Das *mammalian target of Rapamycin* (mTOR, Syn.: RAFT1, RAPT1, and FRAP) wurde erstmals 1994 identifiziert und das entsprechende Gen kloniert^{4,78}. Diese 289 kDa große Serin-Threonin-Kinase stellt einen zentralen Punkt in der Signalweiterleitung innerhalb der menschlichen Zelle dar und ist mitverantwortlich sowohl für die Regulation des Zellwachstums wie auch des Zellzyklus¹⁰¹. Dabei arbeitet mTOR als ein Proteinkomplex, der Signale von Wachstumshormonrezeptoren, Energiespeichern und Hypoxie in die Proteintranslation integriert^{34,77} und letztlich zu einer Progression der Zelle aus dem G1-Zyklus in die S-Phase führt²⁷.

Im Signalweg des GHRH-Rezeptors wird zunächst die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch den GHRH-Rezeptor aktiviert, was zu einer Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) führt. Die daraus resultierende Inaktivierung des *tuberous sclerosis complex 1* und *2* (TSC1,2), die ihrerseits auch über die Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinases 1* und *2* (Erk1/2) durch den GHRH-Rezeptor direkt erfolgt, führt zu einer Reduktion der hemmenden Wirkung der mit Ras verwandten kleinen GTPase *ras-homologue-enriched-in-brain* (Rheb) auf mTOR. Durch diese „Hemmung der Hemmung“ wird mTOR verstärkt aktiviert und bewirkt durch die Aktivierung der ribosomalen *protein70-S6-kinase 1* (p70RS6K) einerseits und des *eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1* (4E-BP1) andererseits eine Stimulation der Zellproliferation²¹. mTOR selbst liegt in zwei unterschiedlich konfigurierten Proteinkomplexen vor: zum einen als Verbund von mTOR, GβL⁵⁰ und *raptor*^{109,32}, im anderen Fall bestehend aus mTOR, GβL und *ricor*. Lediglich für die *raptor*-Variante des mTOR-Komplexes konnte bislang eine Wirksamkeit von Rapamycin nachgewiesen werden⁵⁸ (Abb. 4).

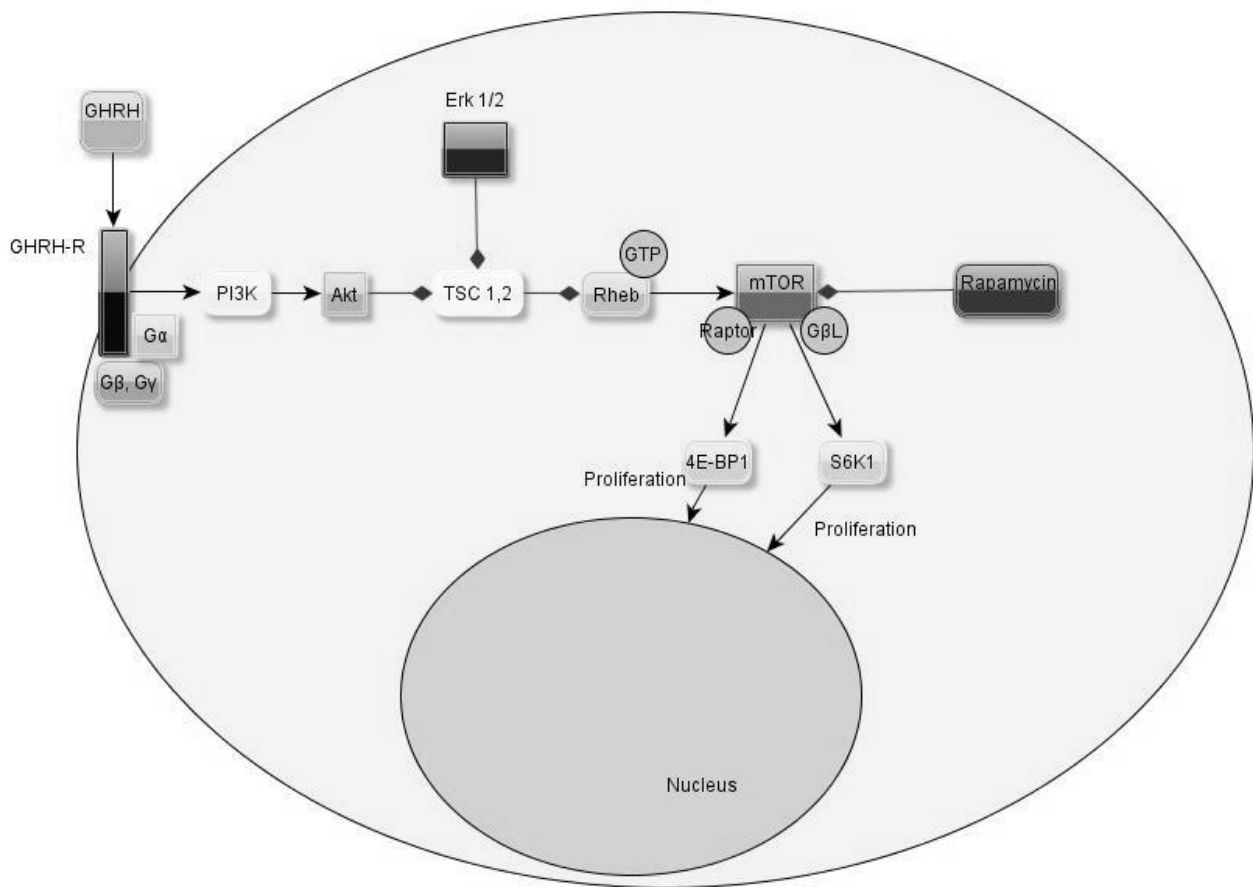


Abb. 4: Rolle von mTOR im Signalweg des GHRH-R.

g. WIRKSAMKEIT DES mTOR-INHIBITORS RAPAMYCIN

Rapamycin, ein aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnenes Makrolidantibiotikum, wurde erstmals zu Beginn der 1970er Jahre isoliert und ursprünglich wegen seiner immunsuppressiven Wirkung klinisch weiterentwickelt. Durch diesen Wirkstoff kann mTOR durch Komplexbildung inaktiviert^{13,15} und eine übermäßige Zellproliferation unterbunden werden.

Derzeit werden diverse klinische Studien der Phase I und II unternommen, die die Anwendung von Rapamycin (Sirolimus bzw. Everolimus) als Mono- oder

Kombinationstherapeutikum zur Behandlung verschiedener maligner Krebserkrankungen, besonders solcher, die mit den bislang vorhandenen Möglichkeiten nur schwer zu therapieren sind, prüfen. Einige aktuelle Studien zeigen bereits ein gutes Ansprechen, z.B. von Patientinnen mit fortgeschrittener Brustkrebserkrankung und vorangegangener Hochdosischemotherapie¹⁰. Rapamycin verstärkt durch seinen Ansatzpunkt an einem zentralen Regulationsprotein, an dem viele Signalwege zusammenlaufen, zudem die Wirksamkeit herkömmlicher Chemotherapeutika, z.B. Cisplatin^{84,59} und kann zusätzlich den unter verschiedenen endokrinen und zytotoxischen Therapien entstehenden Resistenzen entgegenwirken²².

Zugelassen ist das Medikament inzwischen u. a. für Patienten nach Nierentransplantation, mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom⁶², mit fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren des Pankreas⁶⁶ und in der Kardiologie zur Beschichtung von Stents zur Verhinderung von Re-Stenosen. Sollten sich in den laufenden Studien die Vorteile von Rapamycin bestätigen, könnte sich dieser vielseitig einsetzbare Wirkstoff in den kommenden Jahren zu einem neuen Medikament in der Krebstherapie entwickeln.

h. DIE IDEE EINER KOMBINATIONSBEHANDLUNG MIT GHRH-ANTAGONISTEN UND EINEM mTOR-INHIBITOR

Für beide Wirkstoffe – sowohl für den GHRH-Antagonisten JMR-132 wie auch für den mTOR-Inhibitor Rapamycin – konnte bereits eine gute Wirksamkeit bei der Therapie verschiedenster Tumoren nachgewiesen werden. Was spricht also dafür, beide Wirkstoffe zu kombinieren und die Patientin zugleich dem doppelten Spektrum von Wirkungen und unerwünschten Nebenwirkungen auszusetzen?

Zum einen kann durch eine Kombinationstherapie die Dosis der jeweiligen Einzelsubstanzen möglicherweise reduziert werden und dadurch das Auftreten von unerwünschten Wirkungen vermindert werden, ohne dass die Wirksamkeit der

Therapie zu stark eingeschränkt würde. Zum anderen ergibt sich nach längeren Behandlungsdauern mit einzelnen Wirkstoffen oftmals das Problem einer sich entwickelnden Resistenz der Tumorzellen gegen eben jenes Therapeutikum. In den letzten Jahren gab es Untersuchungen, nach denen beispielsweise eine erhöhte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) nach der Behandlung mit Rapamycin zu einer neu auftretenden Resistenz von Bronchialkarzinomen gegen den mTOR-Inhibitor führt^{85,103}. In der Therapie des Mammakarzinoms wird sowohl beim Einsatz der Chemotherapie als auch der endokrinen Therapie ein unterschiedliches Therapieansprechen nicht nur primär, sondern auch im Verlauf der Behandlung beobachtet: Die Arbeitsgruppe um West et al. konnte nachweisen, dass die Applikation zytotoxischer Substanzen zur Entwicklung von Resistenzen durch Aktivierung von Signalmolekülen wie Akt in der Tumorzelle führen kann¹⁰⁴. Auch im Rahmen der endokrinen Therapie entwickeln sich Resistenzen, z. B. nach Gabe von Tamoxifen²³. Die Arbeitsgruppe um Hidalgo et al. konnte dagegen zeigen, dass eine kombinierte Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms mit Tamoxifen und einem mTOR-Inhibitor solche Resistenzen aufheben kann¹⁷. Schließlich wurde durch Walsh et al. gezeigt, dass *triple*-negative Mammakarzinome häufiger mit einer nukleären Expression von phospho-mTOR einhergehen und so durch Rapamycin möglicherweise gezielt therapiert werden können¹⁰².

Dieser neuartige Ansatz zeigt, dass die therapielimitierende Resistenzentwicklung durch eine Kombinationstherapie, die an verschiedenen Punkten im Signalweg der Tumorzelle angreift, unter Umständen vermieden werden kann. Durch die Kombination zweier gut wirksamer Medikamente könnte außerdem nicht nur die zweifache Wirkung, sondern möglicherweise eine Potenzierung deren Effekte erreicht werden. Derartige synergistische Effekte einer Therapie mit verschiedenen Wirkstoffen aufzuzeigen soll die Aufgabe dieser Arbeit sein.

2. MATERIAL UND METHODEN

a. GHRH-ANTAGONISTEN

Die verwendeten GHRH-Antagonisten wurden im Veterans Affairs Medical Center and Departments of Pathology and Medicine, Division of Hematology/Oncology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL 33125, USA hergestellt⁷⁶ und freundlicherweise von Prof. Schally zur Verfügung gestellt:

GHRH-Antagonist	Chemische Zusammensetzung	Anmerkungen
JMR-132	[PhAc0-Tyr1, D-Arg2, Phe(4-Cl)6, Ala8, Har9, Tyr(Me)10, His11, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29] hGH-RH(1-29)NH ₂	Abu: α -Aminobutyric acid Har: Homoarginin Nle: Norleucin PhAc: Phenylacetyl Tyr(Me): o-Methyltyrosin
MIA-313	[(Ac-Amc)0-Tyr1, D-Arg2, Cpa6, Ala8, Har9, Tyr(Me)10, His11, Orn12, Abu15, His20, Nle27, D-Arg28, Har29, Agm30]hGH-RH(1-30)	Ac: Acetyl Amc: 8-Aminocaprylyl Ada: 12-Aminododecanoyl Agm: Agmatin (1-amino-4-guanidino-butan) Cpa: 4-chloro-Phe
MIA-606	<i>Kann aus patentrechtlichen Gründen in dieser Arbeit nicht angegeben werden.</i>	Alle Wirkstoffe wurden in 0,1% DMSO gelöst.

b. ZELLINIEN

Die verwendeten Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurden über LGC Standards GmbH, Wesel von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen. Die Zelllinien SK-BR-3, MDA-MB-231, ZR-75-1 und T-47-D wurden aus dem Bestand der AG Brockhoff zur Verfügung gestellt und stammen ebenfalls von der ATCC.

c. MATERIALIEN UND BEZUGSQUELLEN

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Computer	HPxw4600 Workstation	Hewlett Packard, Böblingen
Betriebssystem	Windows Vista	Microsoft, München
Textverarbeitung	Word 2003	Microsoft, München
Drucker	LaserJet 1100	Hewlett Packard, Böblingen
Sterile Werkbank	LaminAir® HBB 2472 S	Heraeus Sepatech, Osterode
Mikroskop	Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Wasserbad	GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode
Kühlzentrifuge	Varifuge 3.2 RS	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode
Beschallungsgerät	Labsonic U	B. Braun Biotech, Melsungen
Vortex	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserdemineralisationssystem	Milli Q UF Plus	Millipore, Frankreich
Kühlschrank +4°C	KU 1503-5	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank -20°C	E 80-360 T	Colora Messtechnik, Lorch
Gefriertruhe -80°C	E 80-360 T	Colora Messtechnik, Lorch
Waage	R16OP	Sartorius, Göttingen
Zellkultur		
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus Sepatech, Osterode
Neubauer Zählkammer	Blaubrand®	Brand, Wertheim
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Western Blot		
Gelkammer	MiniProtean® TetraCell	BioRad Laboratories, München
Glasplatten/Spacer	MiniProtean® 3 System	BioRad Laboratories, München

Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle	Consort E455	UniEquip, Martinsried
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Blotter	Whatman Fastblot	Biometra, Göttingen
Entwickler	Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, England
Röntgenfilm	Amersham™ Hyperfilm™ ECL™	GE Healthcare, England
Abzug Parafilm	Captair® Filtair® Parafilm “M”	Erlab, Frankreich Pechiney Plastic Packaging, USA
Polyvinylidendifluorid- Membran	PVDF Western Blotting Membranes	Roche Diagnostics, Mannheim

FACS

Flowcytometer	FacsCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Software	FacsDiva™	BD Biosciences, Heidelberg
Multipette	Expo™32 Multipette 478	Beckman Coulter, USA Eppendorf, Hamburg

XTT-Assays

Absorptionsspektrometer	EMax®	Molecular Devices, Biberach
Software	SoftMax Pro™	Molecular Devices, Biberach
Multipette	Expo™32 Multipette 478	Beckman Coulter, USA Eppendorf, Hamburg

Verbrauchsgegenstände

Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht
Multipettenspitzen	PD Tips	Plastibrand
Zellkulturflaschen (100 ml, 250 ml, 600 ml)	Falcon™ Tissue Culture Flasks (T25, T75, T175)	BD Biosciences, Heidelberg
Kryotubes		Greiner, Solingen
Eppendorf Cups		Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen (5 ml)	Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Trägerflüssigkeit	FACSFlow®	BD Biosciences, Heidelberg

Zellschaber		Greiner, Solingen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Cellstar®	Greiner, Solingen
Handschuhe, unsteril	Art. Nr. 112-1526	VVR
Multiwell-Kulturplatten, 96-well	Falcon™	BD Biosciences, Heidelberg
Nährmedien und Reagenzien		
Acrylamid-Stammlösung (40%)		Roth, Karlsruhe
BCA-Protein-Assay-Kit		Pierce, Niederlande
Bromphenolblau		Merck, Darmstadt
BSA (Rinderalbumin 30%)		Biotest, Dreieich
DMEM		PAA Laboratories, Österreich
DMSO		Merck, Darmstadt
FCS		PAN Biotech, Aidenbach
Methanol		Merck, Darmstadt
Milchpulver		
PBS 1x		PAA Laboratories, Österreich
Precision Protein Standard		BioRad Laboratories, München
Propidiumiodid		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail 10x		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640		PAA Laboratories, Österreich
SDS		Merck, Darmstadt
TEMED		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris		Merck, Darmstadt
Trypsin mit EDTA		PAN Biotech, Aidenbach
Tween 20		Sigma-Aldrich, Deisenhofen
XTT-Reagens	Cell Proliferation Kit II	Roche, Mannheim
Zellysepuffer		Cell Signaling, USA
β-Mercaptoethanol		Merck, Darmstadt
CAY10626		Cayman Chemical, USA
Camptothecin		Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Antikörper		
Anti-4E-BP1 (53H11)	# 9644	Cell Signaling, USA
Anti-phospho-4E-BP1 (Ser65)	# 9451	Cell Signaling, USA
Anti-EGFR	# 2232	Cell Signaling, USA
Anti-GHRH-R	sc-54203	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-GHRH-R (SV1)	abcam 28692	Abcam, UK
Anti-goat-IgG peroxidase conjugated	A 4174	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Her2/neu (ErbB2)	# 2242	Cell Signaling, USA
Anti-Östrogenrezeptor	Novocastra™ NCL-L- ER-6F11	Leica Biosystems, Wetzlar
Anti-Phospho-Akt (Ser 473)	# 4060	Cell Signaling, USA
Anti-Progesteronrezeptor	Novocastra™ NCL-L- PGR-312	Leica Biosystems, Wetzlar
Anti-rabbit-HRP	# 7074	Cell Signaling, USA
Anti-β-Aktin	A 2066	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-mTOR	# 2972	Cell Signaling, USA
Anti-phospho-mTOR	# 2971	Cell Signaling, USA
Anti-p70RS6K	# 9202	Cell Signaling, USA
Anti-phospho-p70RS6K	# 9205	Cell Signaling, USA

Puffer und Lösungen

PBS	137 mM	NaCl
	6,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
	2,7 mM	KCl
Blaupuffer 5x	0,225 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	25%	Glycerin
	5%	SDS
	0,05%	Bromphenolblau
	25%	β-Mercaptoethanol
Anodenpuffer 1	300 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20%	Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20%	Methanol

Kathodenpuffer	4 mM	ϵ -Amino-n-Caprinsäure (pH 7,6)
	20%	Methanol
AP-Puffer 10x	1 M	Tris-HCl (pH 7,4)
	1 M	NaCl
	25 mM	MgCl ₂
APT-Puffer 1x	0,1%	Tween 20 in AP-Puffer 1x
Elektrophoresepuffer 5x	125 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	1,28 M	Glycin
	0,05%	SDS

d. METHODEN

i. Zellkultur, Grundlagen

Die Zelllinien MDA-MB-231, SK-BR-3, T-47-D und ZR-75-1 wurden in einem Nährmedium aus DMEM + 5% FCS etwa 5-7 Tage in einem Brutschrank bei 37° C mit 5% CO₂ in T-75-Zellkulturflaschen bebrütet. Die Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurden in einem Nährmedium aus RPMI + 10% FCS ebenfalls je nach Versuchsplanung 5-7 Tage in einem Brutschrank bei 37° C mit 5% CO₂ in T75-Zellkulturflaschen bebrütet. Die Nährmedien wurden alle 48 Stunden gewechselt. Bei Erreichen eines konfluenten Wachstums von ca. 90% wurden die Zellen mit 3-5 ml PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin kurz bei 37° C inkubiert und vom Flaschenboden gelöst. Nach Abzentrifugieren und Resuspendieren wurden die Zellen ausgezählt und wiederum ca. 1 Mio. Zellen / ml in neue T75-Zellkulturflaschen mit frischem Medium passagiert. Sämtliche sensitive Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

ii. Gewinnung von Zelllysaten

1 Mio. Zellen der jeweiligen Zelllinien wurden in T175-Kulturflaschen ausgesät und nach 7-tägigem Wachstum geerntet. Dazu erfolgten mehrere Waschschrirte mit kaltem PBS mit anschließender Zugabe von 300 μ l Lysepuffer, bestehend aus:

10	μ l	PMSF
100	μ l	Lysepuffer 10x
142,85	μ l	Protease-Inhibitor-Cocktail 7x
747,15	μ l	H ₂ O dest.
<hr/>		
1000	μ l	Lysepuffer

Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis zum Aufschließen der Zellmembran wurde das Lysat in ein 15 ml Röhrchen gegeben und zur Fragmentierung der genomischen DNA 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Nach Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß war ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 12000 rpm und 4°C vorgesehen. Das Pellet wurde verworfen und vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 2.d.iii). Nach Aufteilen des Zelllysats in Aliquots erfolgte deren Lagerung bei einer Temperatur von -80°C.

iii. Proteinbestimmung mittels BCA-Protein-Assay-Kit

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce durchgeführt. Die chemische Reaktion zur Quantifizierung der Proteine mit Hilfe dieses Kits beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion). Für die Versuchsdurchführung wurden 10 μ l der in TE-Puffer 1:10 verdünnten Proteinlysate, der Proteinstandardlösung (25 - 2000 μ g/ml BSA in TE-Puffer) und 10 μ l einer Negativkontrolle (TE-Puffer) auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und Lösung B (4% Kupfersulfat) aus dem BCA-Protein-Assay-Kit mussten im Verhältnis 1:50 gemischt und davon je 200 μ l zu jedem Well gegeben werden. Nach kurzem Mischen wurde

30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem ELISA-Reader bei 540 nm die Absorption gegen die Referenz gemessen. Die Proteinkonzentration in den zu analysierenden Proben konnte anhand der Standard-Eichgerade berechnet werden.

iv. SDS-Gelelektrophorese und Western Blot, Grundlagen

Zum Nachweis der Expression der untersuchten Rezeptoren wurden diese semiquantitativ mittels Western Blot nach der von Laemmli beschriebenen Methode dargestellt⁵⁴. Zunächst wurden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Die Gele wurden vor jedem Versuch frisch gegossen. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels erfolgte nach gängigen Western Blot-Protokollen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE.

Trenngel 7,5%: 10 ml für 2 Gele

5,465 ml	A. d.
2,5 ml	1,5M Tris-HCL pH 8.8
0,1 ml	10% SDS
1,875 ml	40% Acryl-Bisacrylamid Lösung 29:1
50 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Sammelgel 4%: 5 ml für 2 Gele

2,97 ml	A. d.
1,25 ml	0,5M Tris-HCL pH 6.8
0,1 ml	10% SDS
0,65 ml	40% Acryl-Bisacrylamid Lösung 29:1
25 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Lysate der zu untersuchenden Zelllinien wurden in β -Mercaptoethanol und Blaupuffer für 5 min bei 95° C inkubiert, nach Abkühlen kurz zentrifugiert und jeweils 10-20 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde eine Kammer

mit einem Proteinstandard beladen. Die Gele wurden in die Gelkammer eingespannt, die Kammer mit Elektrophoresepuffer befüllt und dann eine adäquate Spannung (ca. 60-80 V) zur Sammlung der Proteine angelegt. Nach etwa 20 min wurde die Spannung auf 100-120 V erhöht und die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte über 1,5-2 h. Zur Vorbereitung des Blottings wurde Filterpapier in Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol für 0,5 min, anschließend in Aqua dest. für 2 min und schließlich in Anodenpuffer II für 20 min ausgeglichen. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in Kathodenpuffer überführt und daraufhin der schichtweise Aufbau des Blots begonnen. Auf zwei Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer I wurden zwei weitere getränkt in Anodenpuffer II gelegt, darauf folgte die Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran sowie das Polyacrylamidgel. Schließlich bildeten den oberen Abschluss zwei weitere Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer. Die Blottingapparatur wurde geschlossen und über 1 h ein Strom von 120 mA angelegt.

PVDF-Membranen besitzen eine extrem hohe Bindungskraft für Proteine. Daher muss verhindert werden, dass eine unspezifische Adsorption des primären Antikörpers an die Membran stattfindet. Zu diesem Zweck muss die Membran mit nicht antigenem Protein oder anderen oberflächenaktiven Agenzien abgesättigt werden⁹⁷. In diesem Protokoll wurde nach Beendigung des Blottingvorgangs die PVDF-Membran mit den übertragenen Proteinen einschließlich des Standards zur Blockierung freier Antikörperbindungsstellen in Blockierungspuffer (APT-Puffer mit 2% BSA oder 5% Milchpulver) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Absättigen konnte die erste Immunreaktion durchgeführt werden. Dazu wurde die Membran mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung über Nacht bei 4° C inkubiert. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran 1-2 h mit APT-Puffer gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen. Der in der ersten Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene Immunkomplex wurde dann mit Hilfe eines Enzymkonjugats sichtbar gemacht. Da die Antikörper nicht direkt

markiert zur Verfügung standen, erfolgte die Detektion über Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: *horse radish peroxidase*)-konjugierte Zweitantikörper^{63,40} die gegen den im Immunkomplex gebundenen Erstantikörper gerichtet waren. Dazu wurde die Membran nach dem Waschvorgang für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend erneut gewaschen, um überschüssige Antikörper-Enzym-Komplexe zu entfernen. Zur Detektion wurde ein ECL-Kit verwendet. Dieses Kit basiert auf der Fähigkeit von zyklischen Diacylhydraziden wie Luminol zu chemoluminiszieren (Chemolumineszenz bedeutet Lumineszenz aufgrund einer chemischen Reaktion). Eines der am besten verstandenen und hier zur Anwendung kommenden Systeme stellt die durch Hydrogenperoxidase katalysierte Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen dar. Direkt nach der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand und kehrt über Lichtemission in seinen Grundzustand zurück. Die verstärkte Chemolumineszenz¹⁰⁵ wird durch chemische Verstärker wie Phenole erreicht, was sowohl zu verlängerter wie auch zu etwa 1000fach verstärkter Lichtemission führt. Die Strahlung findet zwischen der 5 und 20. Minute ihr Maximum und verfällt anschließend mit einer Halbwertszeit von 60 Minuten. Das freiwerdende Licht der ECL-Reaktion führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms.

v. Western Blot: Rezeptornachweis

EGFR

Zum Nachweis der Expression von EGFR wurde nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese der eingesetzte primäre Antikörper (anti-EGFR, Cell Signaling (#2232)) nach Blockierung mit APT/2% Milchpulver in einer Verdünnung von 1:1000 in über Nacht bei 4° C auf die PVDF-Membran aufgetragen. Die Entwicklung des Röntgenfilms für 2 min erfolgte nach Waschen und Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären

Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling (#7074)), sowie einem weiteren Waschvorgang in Pufferlösung.

HER2/NEU

Ein weiterer Western Blot diente der Untersuchung der Expression des Her2/neu-Rezeptors: Nach Auftrennen der in den Lysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese, Blockierung in APT/2% Milchpulver und Einsatz des primären Antikörpers (Her2/neu, Cell Signaling (#2242)) in einer Verdünnung von 1:200 über Nacht bei 4° C, Waschen und Inkubation über 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling (#7074)) und erneutem Waschvorgang erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms für 2 min.

GHRH-REZEPTOR

Schließlich wurde die Expression des GHRH-Rezeptors mittels Western Blot untersucht: Die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 erfolgte bei 4° C über Nacht, nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung in APT/2% BSA. Nach einem Waschvorgang wurde die PVDF-Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling; #7074) in einer Verdünnung von 1:2000 in APT inkubiert und anschließend einem weiteren Waschvorgang unterzogen. Die Belichtungszeit in der Sequenziermappe betrug 30 sec.

vi. Western Blot: Signalmoleküle

Zur Darstellung der Effekte auf die intrazelluläre Signalweiterleitung wurden bei den untersuchten Zelllinien nach einer Inkubationszeit von 48 h bei einer Konzentration von 10 µM MIA-606 und 100 nM Rapamycin sowie der beiden Einzelsubstanzen in

gleicher Konzentration Western Blots der Signalwegsmoleküle Akt/phospho-Akt, ERK/phospho-ERK und mTOR/phospho-mTOR angefertigt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 60 ng/ μ l EGF über 7 min kurzstimuliert. Zusätzlich wurden eine unbehandelte Kontrolle sowie eine DMSO-Kontrolle (2%) mitgeführt. Als Kontrollprotein wurde jeweils β -Actin (Antikörper: Sigma #A2066, Verdünnung 1:4000 in APT/3% BSA bei 4°C über Nacht) verwendet.

MTOR/PHOSPHO-MTOR

Als primärer Antikörper gegen Gesamt-mTOR diente ein polyklonaler Antikörper (Cell Signaling #2972), der nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung mit APS/5% BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4°C über Nacht inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit einem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling #7074) gekoppelt wurde.

Als primärer Antikörper gegen die phosphorylierte Form von mTOR (phospho-mTOR) diente ein polyklonaler Antikörper (Cell Signaling #2971), der ebenfalls nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung mit APS/5% BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4°C über Nacht inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling #7074) gekoppelt wurde. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte jeweils über 1-3 min.

AKT/PHOSPHO-AKT

Als primäre Antikörper gegen Akt und die phosphorylierte Form von Akt (phospho-Akt) dienten polyklonale Antikörper (Cell Signaling #9272 und #4060), die nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung mit APS/5% BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4°C über Nacht inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit einem sekundären Antikörper

(anti-rabbit-HRP, Cell Signaling #7074) gekoppelt wurden. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte über 1-3 min.

ERK/PHOSPHO-ERK

Als primäre Antikörper gegen ERK1/2 und die phosphorylierte Form von ERK1/2 (phospho-ERK) dienten polyklonale Antikörper (Cell Signaling #9102 und #4377), die nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung mit APS/5% BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4°C über Nacht inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit einem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling #7074) gekoppelt wurden. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte über 1-3 min.

RS6K/PHOSPHO-RS6K

Als primäre Antikörper gegen die ribosomale p70RS6-Kinase (RS6K) und die phosphorylierte Form der p70RS6-Kinase (phospho-RS6K) dienten polyklonale Antikörper (Cell Signaling #9202 und #9205), die nach Auftrennen der in den Zelllysaten enthaltenen Proteine durch SDS-Gelelektrophorese und Blockierung mit APS/5% BSA in einer Verdünnung von 1:1000 bei 4°C über Nacht inkubiert und nach mehrmaligem Waschen mit einem sekundären Antikörper (anti-rabbit-HRP, Cell Signaling #7074) gekoppelt wurden. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte über 1-3 min.

vii. Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (*fluorescence-activated cell scanning analysis*; FACS) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Das Prinzip der Durchflusszytometrie geht auf Wallace Coulter zurück, der bereits 1949 ein Patent zur Zählung von gelösten Partikeln anmeldete. Die derzeit verwendete Technologie der fluoreszenzbasierten

Durchflusszytometrie wurde in den späten 60er Jahren an der Universität Münster von Göhde entwickelt²⁰. Das weltweit erste kommerziell erhältliche Durchflusszytometer wurde 1971 vom deutschen Entwickler und Hersteller Phawe, Göttingen auf den Markt gebracht.

Eine mögliche Analysemethode ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und deren Photonenemission nach Anregung durch einen Laser gemessen (Abb. 5).

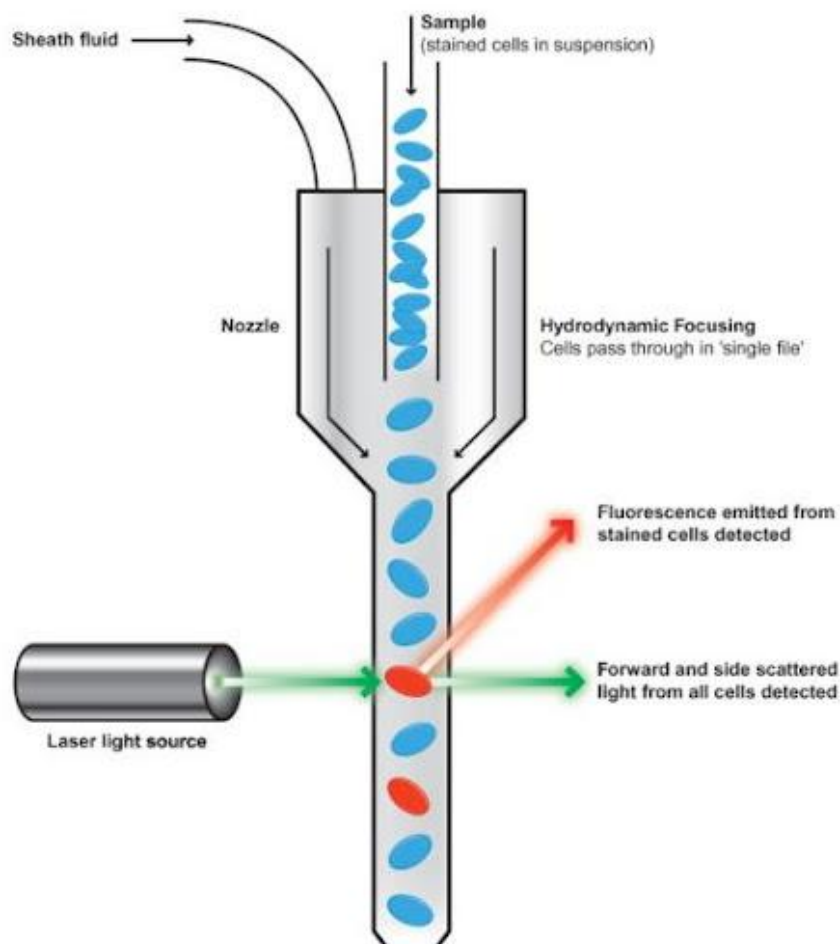


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers (aus: <http://www.thetruthaboutgenetics.com/2011/08/flow-cytometry-in-nutshell.html>)

Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Streulicht entsteht durch Brechung des Laserlichtes an der Zelle. Die größte Streuung bezeichnet man als *forward scatter* (FSC). FSC ist proportional zur Zellgröße. Um die Granularität der Zelle zu erfassen, wird Licht im 90°-Bereich gemessen und *side scatter* (SSC) genannt. SSC ist proportional zur Granularität. Im Punktwolkendiagramm (*dot plot*) können verschiedene Populationen des zu untersuchenden Materials durch Auftragung der Streulichtarten *forward* und *side scatter* oder des SSC zu einem spezifischen Parameter (zum Beispiel einem Zelloberflächenmarker) auf Ordinate und Abszisse dargestellt und voneinander differenziert werden. Ein Histogramm wiederum kann die Verteilung der Fluoreszenz verdeutlichen. Um im Histogramm die Fluoreszenz einer bestimmten Zielpopulation zeigen zu können, muss diese zunächst charakterisiert werden. Dies geschieht durch „Umkreisen“ (*gating*) der gewünschten Population im *dot plot* mittels einer Markierung⁷⁰.

viii. DNA-Färbung mit Propidiumiodid und Messung mittels Durchflusszytometrie

GRUNDLAGEN

Während des Wachstums einer Zelle werden verschiedene Zellzyklusstadien durchlaufen, die sich in zwei Phasen unterteilen lassen (siehe Abb. 6). Die Progression durch diesen Zyklus ist charakterisiert durch die mitotische Teilung (M-Phase) einerseits und der sich anschließenden Interphase andererseits. Die Interphase wiederum gliedert sich in die G1-, S- und G2-Phase. In der G1-Phase (engl.: *gap* = Lücke) beginnt die Zelle ihr Wachstum und es ist ein vollständiger Chromosomensatz im Zellkern vorhanden. In der S-Phase erfolgt die Replikation der DNA (Synthese-Phase), nach deren Abschluss der zweifache Chromosomensatz vorliegt. In der G2-Phase bereitet sich die Zelle auf die mitotische Teilung vor, an

deren Ende wiederum der einfache Chromosomensatz im Zellkern besteht. Zusätzlich zu diesen Phasen kann eine sog. G₀-Phase vorhanden sein. Hier bekommt die Zelle keine Signale, die zu einer Zellteilung führen und bleibt daher in einem Ruhestadium, aus dem sie unter geeigneten Bedingungen wieder in den normalen Zellzyklus eintreten kann.

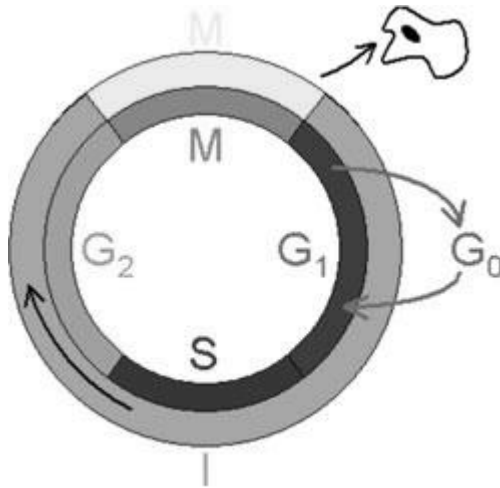


Abb. 6: Schematische Darstellung des Zellzyklus (aus: <http://www.zytologie-online.net/zellzyklus.php>)

In welchem Stadium sich die Zelle befindet, kann nun mittels der Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die nukleäre DNA kann mit speziellen DNA-interkalierenden Farbstoffen, wie z.B. Propidiumiodid, angefärbt werden. Diese Farbstoffe sind fluoreszierend und können mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid liegt bei 550 nm, das Emissionsmaximum bei 650 nm. Da Propidiumiodid stöchiometrisch an Ribonukleinsäuren bindet, verhält sich die Fluoreszenz jeder Zelle proportional zu ihrem DNA-Gehalt, sofern sämtliche RNA durch Zugabe von RNase zuvor entfernt wurde. Somit kann diese Färbung genutzt werden, um den DNA-Gehalt und den Zellzyklusstatus einer einzelnen Zelle oder einer Zellpopulation im Durchflusszytometer zu analysieren³. Diese Methode kann auch verwendet werden, um eine Aneuploidie (z.B. in Tumorzellen) festzustellen.

Für unsere statischen Zellzyklusversuche untersuchten wir an der Gesamtpopulation der Zellen den Anteil, der sich in der S-Phase befindet, um auf daraus auf die Proliferationsaktivität der Tumorzellen unter Behandlung zu schließen. Je höher die S-Phase-Fraktion gemessen wird, umso höher ist der Anteil von Tumorzellen, die im Begriff sind, sich zu teilen und zu vermehren (Abb. 7).



Abb. 7: Beispiele von statischen Zellzyklusmessungen mit unterschiedlich hoher S-Phase-Fraktion.

ZEIT- UND DOSISABHÄNGIGE WIRKUNG VON RAPAMYCIN

Um die Wirksamkeit von Rapamycin in unterschiedlichen Dosierungen zu untersuchen, wurden die Zelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 mit absteigenden Konzentrationen von Rapamycin über festgelegte Zeiträume inkubiert. Dazu wurden jeweils 1 Mio. Zellen der beiden Zelllinien in T25-Zellkulturflaschen in 5-7 ml DMEM + 5% FCS ausgesät und an Tag 3 mit Rapamycin in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM inkubiert. An Tag 5 bzw. Tag 7 wurden die Zellen geerntet, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und über mindestens 2 h in 70% Methanol lysiert. Sämtliche nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Es erfolgten mehrere Waschvorgänge mit jeweils 1 ml PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃. Zwischen den Waschvorgängen wurden die Röhrchen jeweils für 4 min bei 4° C und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach dem Waschen wurden die Zelllysate in jeweils 425 µl PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃ resuspendiert, 50 µl RNase pro Röhrchen hinzugefügt und die Röhrchen im Wasserbad bei 37° C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate

wieder auf Eis gebracht, jeweils 25 µl einer Propidiumiodidlösung (1 mg/ml in PBS) zugegeben und die Ansätze für einige Minuten auf Eis inkubiert.

Nach erfolgter Färbung mit Propidiumiodid wurde die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

EFFEKTE VON RAPAMYCIN UND JMR-132 BEI SK-BR-3, HCC1806 UND HCC1937

Um die Effekte des GHRH-Antagonisten JMR-132 als Einzelsubstanz und in Kombination mit Rapamycin zu untersuchen, wurden die Zelllinien SK-BR-3, HCC1806 und HCC1937 verwendet. An Tag 1 der Versuchsreihe wurden von den Zellen der SK-BR-3-Linie 1 Mio. Zellen in T25-Zellkulturflaschen mit 5-7 ml DMEM + 5% FCS ausgesät. Von den Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurden ebenfalls jeweils 1 Mio. Zellen in T25-Zellkulturflaschen mit 5-7 ml RPMI + 5% FCS ausgesät. Ab Tag 3 wurden die Zellpopulationen dann jeweils über 24 und 48 Stunden mit 100 nM Rapamycin, 10 µM JMR-132 und 10 µM JMR-132 in Kombination mit 100 nM Rapamycin inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. An Tag 5 bzw. Tag 7 wurden die Zellen geerntet, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und über mindestens 2 h in 70% Methanol lysiert. Sämtliche nachfolgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Es erfolgten mehrere Waschvorgänge mit jeweils 1 ml PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃. Zwischen den Waschvorgängen wurden die Röhrchen jeweils für 4 min bei 4° C und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach dem Waschen wurden die Zelllysate in jeweils 425 µl PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN₃ resuspendiert, 50 µl RNase pro Röhrchen hinzugefügt und die Röhrchen im Wasserbad bei 37° C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate wieder auf Eis gebracht, jeweils 25 µl einer Propidiumiodidlösung (1 mg/ml in PBS) zugegeben und die Ansätze für einige Minuten auf Eis inkubiert.

Nach erfolgter Färbung mit Propidiumiodid wurde die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

EFFEKTE VON RAPAMYCIN UND MIA-313/MIA-606 BEI HCC1806

Nachdem der GHRH-Antagonist JMR-132 nicht mehr zur Verfügung stand, wurden die weiteren Versuche mit den neu entwickelten GHRH-Antagonisten MIA-313 und MIA-606 durchgeführt. Versuchsablauf und Wirkstoffkonzentrationen wurden im Vergleich zu den Vorversuchen mit JMR-132 nicht verändert; statt 10 µM JMR-132 wurden jeweils 10 µM MIA-313 bzw. 10 µM MIA-606 eingesetzt.

ix. Dynamische Zellzyklusmessung mittels BrDU/Hoechst-Quenching*GRUNDLAGEN*

Die BrDU/Hoechst-Quenching-Technik ist eine Methode zur Untersuchung der Zellzykluskinetik, also eine dynamische Messtechnik im Gegensatz zur oben erwähnten statischen DNA-Messung. Hierbei werden die zu untersuchenden Zellen kontinuierlich über einen längeren Zeitraum dem Nukleotidanalogen BrDU ausgesetzt, welches während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Durch Verwendung zweier DNA-Farbstoffe (Hoe und PI) kann nun eine Unterscheidung von asynchron proliferierenden Zellpopulationen in bis zu drei aufeinander folgenden Zellzyklen getroffen werden, sowie deren Position im Zellzyklus (G0-, G1-, S- oder G2M-Phase) bestimmt werden⁵³. In Abb. 8 ist schematisch eine derartige Messung dargestellt und die einzelnen Phasen des ersten Zellzyklus sind entsprechend gekennzeichnet. Die korrespondierenden Phasen des zweiten und dritten Zellzyklus sind mit jeweils einem bzw. zwei Apostrophen markiert. Abb. 9 zeigt Beispielmessungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, die die Verteilung auf die verschiedenen Phasen und Zellzyklen darstellen.

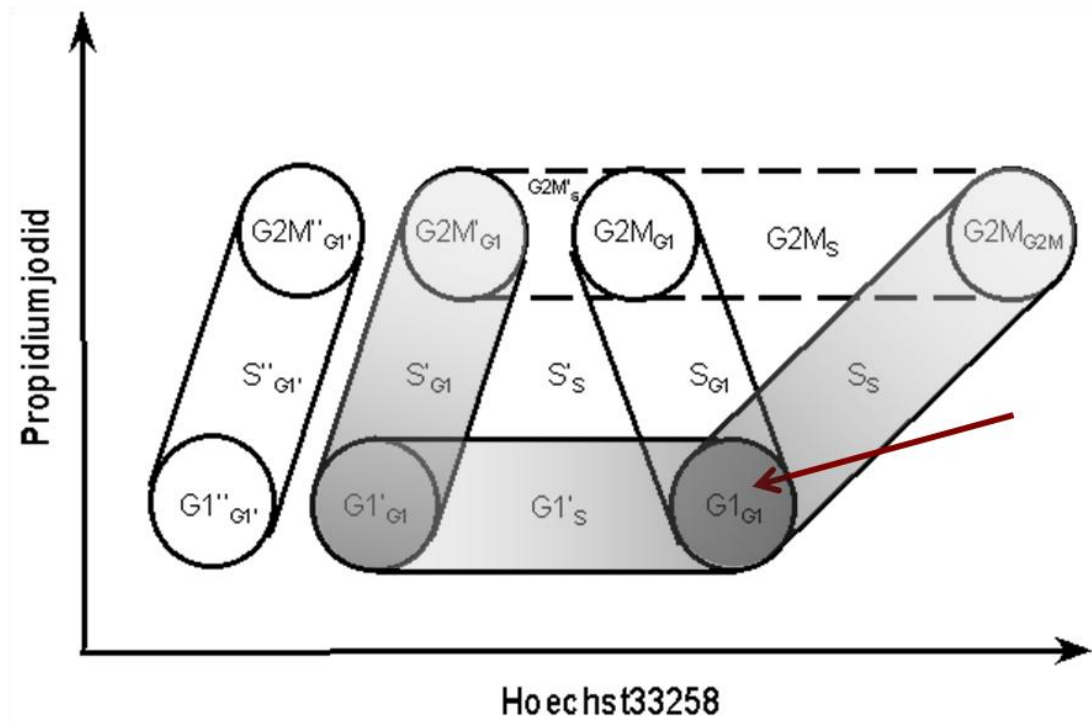


Abb. 8: Einteilung der unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, die durch dynamische Zellzyklusmessung mittels BrDU/Hoechst-Quenching dargestellt werden können (nach: Diermeier S, Brockhoff, G, et al. *Cell Prolif* (2004)¹⁹)

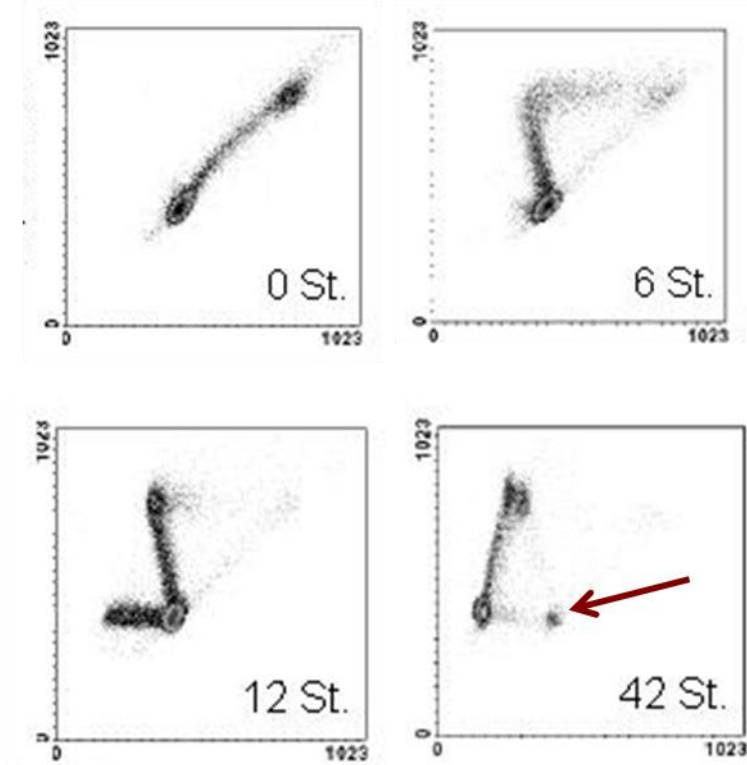


Abb. 9: Dynamische Zellzyklusmessung zu verschiedenen Zeitpunkten, wie unter Abb. 8 dargestellt (Pfeil: G1-Phase) (nach: Brockhoff, G: DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie³).

Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethode kann exakter differenziert werden, welche Effekte verschiedene Noxen oder Therapeutika auf lebende Zellen ausüben: eine Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus deutet auf eine Verlängerung der Replikationsdauer – also eine Verlangsamung der Proliferation – hin. Eine Vermehrung von Zellen in der S-Phase bei der statischen Proliferationsmessung zeigt in der Regel eine erhöhte Proliferationsfraktion an, kann in der dynamischen Zellzyklusmessung jedoch als Arrest in dieser Phase im Zellzyklus interpretiert werden (Abb. 10).

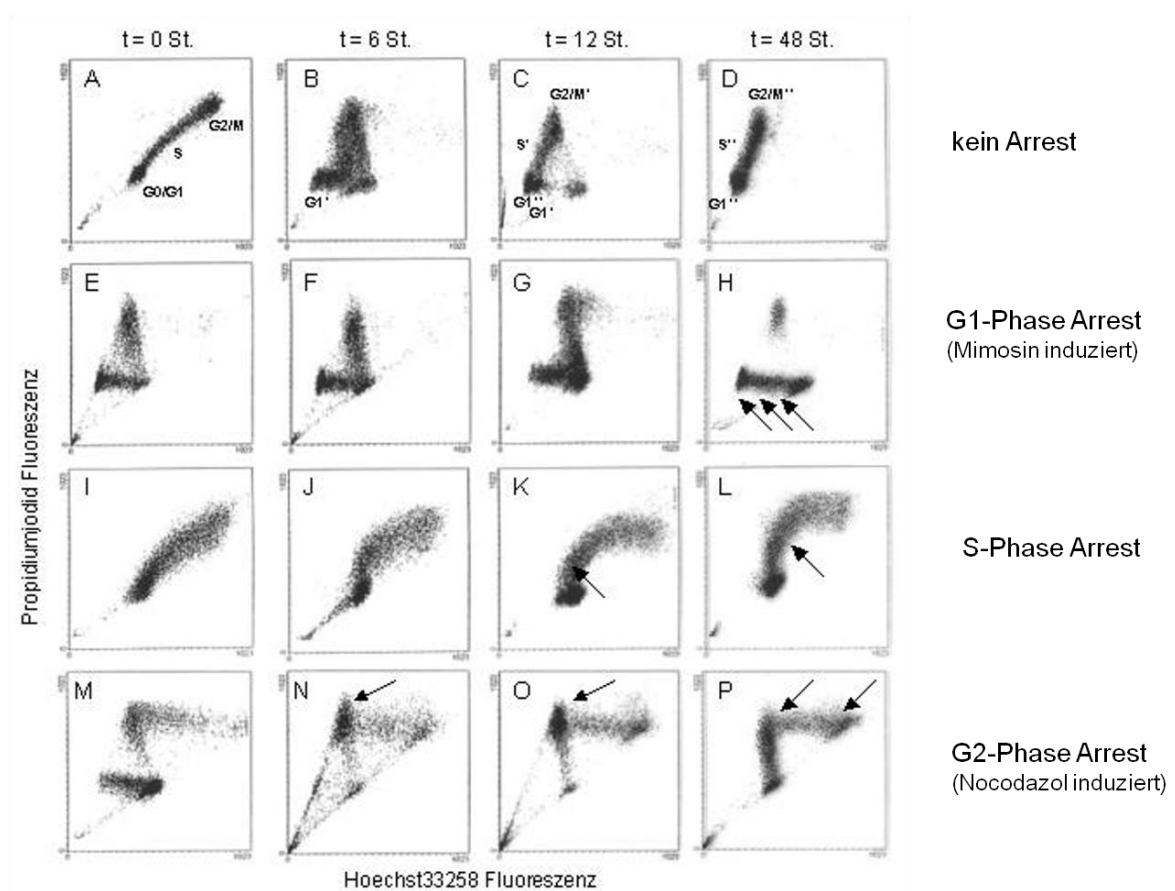


Abb. 10: Unterschiedliche *dot plots* bei normaler Zellzykluskinetik und bei Arrest in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (nach: Brockhoff, G: DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie³).

DYNAMISCHE ZELLYKLUSMESSUNG VON HCC1806

Wie bereits in den statischen Zellzyklusmessungen wurde die *triple*-negative Mammakarzinomzelllinie HCC1806 mit unveränderten Wirkstoffkonzentrationen von Rapamycin, MIA-606 und der Kombination der beiden über maximal 72 h behandelt. Allerdings wurde jeweils 72 h und 48 h vor Ernte BrdU in einer Konzentration von 60 μ M. Alle Ansätze wurden zeitgleich geerntet. Für die nicht mit BrdU behandelten Kontrollproben erfolgte die Aussaat ebenfalls am Tag 1 und die Ernte zeitgleich mit den mit BrdU inkubierten Zellen.

Für die Färbung wurden 1 Mio Zellen einmal mit DNA-Puffer gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung in 960 μ l DNA-Puffer mit 0,1% Igepal als Detergenz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1,2 μ l Hoe einer Stammlösung von 1 mg/ml und 40 μ l RNase A (Stammlösung 1 mg/ml, 50 - 100 Units/mg; Endkonz. 40 μ g/ml, 2 - 4 Units/ml) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Es schloss sich die Zugabe von 1,5 μ l PI (Stammlösung 1 mg/ml; Endkonz. 1,5 μ g/ml) und eine 15-minütige Inkubationsphase an. Die Zellsuspension wurde schließlich am FACS CantoTM II bei einer mittleren Durchflussrate gemessen.

x. Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie und Immunzytochemie basiert auf dem Prinzip, dass in Paraffin eingebettete Gewebeproben oder einzelne Zellen ebenfalls durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion angefärbt werden können. Ähnlich wie beim Western Blot erfolgt erst die Bindung eines spezifischen primären Antikörpers an das zu bestimmende Antigen, in unserer Versuchsreihe in der Form von verschiedenen Rezeptoren. Im zweiten Schritt werden die einzelnen Komponenten eines Detektionssystems dem Präparat zugeführt. Dadurch werden die Antigen-Antikörper-Komplexe durch Farbstoffe sichtbar gemacht und können unter dem Mikroskop bewertet werden. Für die Bestimmung der vorhandenen Rezeptoren auf den untersuchten Mammakarzinomzelllinien wurden von diesen Zellpellets angefertigt, von denen mehrere Stenzen auf einem Paraffinblock simultan der

Immunzytochemie über das Routinelabor des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg unter Mitnahme einer validierten Positivkontrolle zugeführt wurden.

xi. Vitalitätsanalyse mittels XTT-Assay

In einer weiteren Untersuchungsmethode wurden die bereits verwendeten Zelllinien einer Vitalitätsanalyse mit Hilfe eines XTT-Assays unterzogen.

XTT ist ein Tetrazolderivat (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-Tetrazolhydroxid), welches ähnlich wie MTT die Zellvitalität basierend auf der Aktivität von Mitochondrienenzymen in vitalen Zellen messen lässt, die XTT reduzieren und kurz nach dem Zelltod inaktiviert werden. Als Reaktionsprodukt ergibt sich ein wasserlöslicher oranger Farbstoff, der durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 475 nm in seiner Konzentration bestimmt werden kann und proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist⁸².

Tumorzellen wurden dazu in verschiedenen Ausgangszahlen (500, 1000 und 2000 Zellen) in 200 µl Nährmedium in 96-well Platten ausgesät (Abb. 11). Nach drei Tagen wurde das Nährmedium entfernt und die Stimulation mit den entsprechenden Reagenzien, gelöst in Nährmedium, durchgeführt. Messungen erfolgten jeweils nach 48, 72 und 96 h. Nach Absaugen von 100 µl Nährmedium/well und Zugabe von jeweils 50 µl des XTT-Reagens und Inkubation bei 37°C wurden die einzelnen photometrischen Messungen nach 1, 2, 3, 4 und 6 h vorgenommen, um eine ausreichende Anzahl valider Messwerte zu erreichen. Als Kontrolle wurde der Apoptose induzierende Stoff Camptothecin⁵⁷ verwendet, der auf Grund seiner hohen Zytotoxizität erst 20 h vor Beginn der ersten Messung zugegeben wurde. Von den im automatisierten Photometer gemessenen Werten wurde zunächst der Leerwert (ermittelt durch Messung von Nährmedium ohne Zellen) subtrahiert und dann der Mittelwert berechnet.

Un-behandelt	Un-behandelt	Un-behandelt	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Medium + XTT	2000 Zellen
Un-behandelt	Un-behandelt	Un-behandelt	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Medium + XTT	1000 Zellen
Un-behandelt	Un-behandelt	Un-behandelt	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	DMSO Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Camptothecin Kontrolle	Medium + XTT	500 Zellen
MIA 606	MIA 606	MIA 606	Rapamycin	Rapamycin	Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	Medium + XTT	2000 Zellen
MIA 606	MIA 606	MIA 606	Rapamycin	Rapamycin	Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	Medium + XTT	1000 Zellen
MIA 606	MIA 606	MIA 606	Rapamycin	Rapamycin	Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	MIA 606 + Rapamycin	Medium + XTT	500 Zellen

Abb. 11: Pipettierschema für XTT-Assays.

Bei allen Versuchen wurde Rapamycin in einer Konzentration von 100 nM, MIA-606 in einer Konzentration von 10 μ M und Camptothecin ebenfalls in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

3. ERGEBNISSE

a. REZEPTORBESTIMMUNG

i. Östrogen- und Progesteronrezeptor

Die Darstellung der Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren für alle Zelllinien erfolgte an Paraffinblöcken von Zellpellets mittels Immunzytochemie über

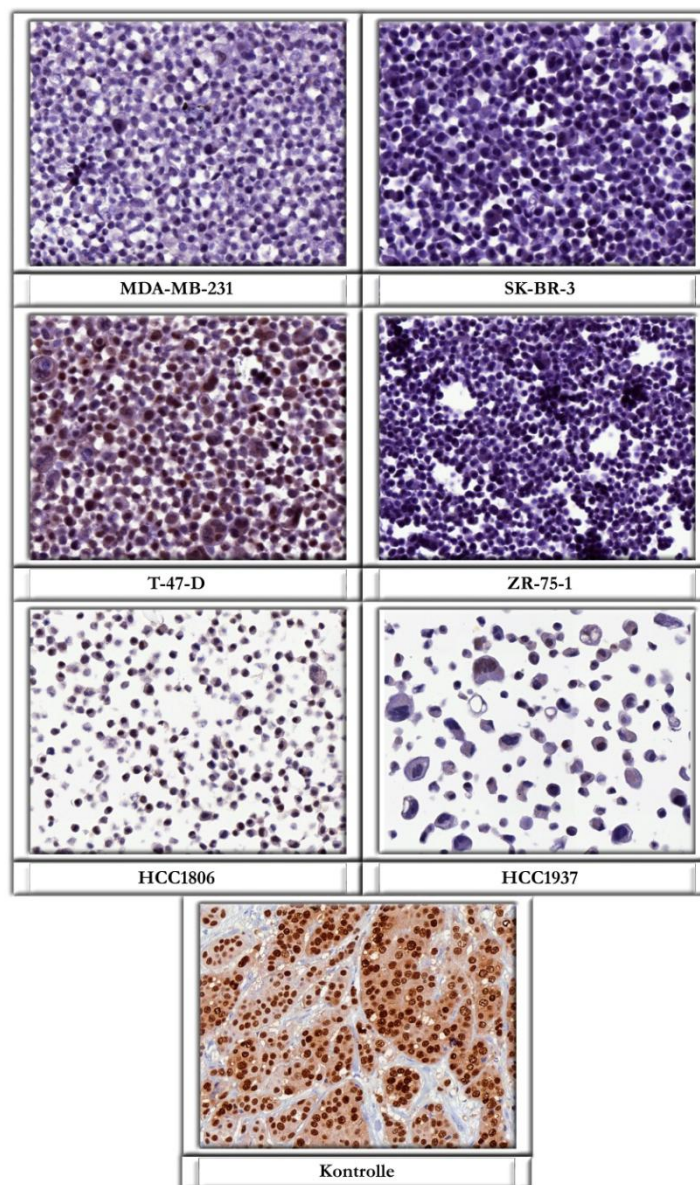


Abb. 12: Immunzytochemische Darstellung des Östrogenrezeptors bei den untersuchten Mammakarzinomzelllinien (Kontrolle: Östrogenrezeptor-positives Mammakarzinom).

die Routinediagnostik des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg. Dabei zeigte sich, dass von den untersuchten Mammakarzinomzelllinien bei T-47-D der Östrogenrezeptor auf der Zelloberfläche stark, bei ZR-75-1 schwach nachgewiesen werden konnte. Die übrigen Zelllinien zeigten eine vollständig negative Färbereaktion (Abb. 12).

In den immunzytochemischen Färbungen zum Nachweis der Expression des Progesteronrezeptors zeigte sich ebenfalls nur bei den Zellen der Linien T-47-D

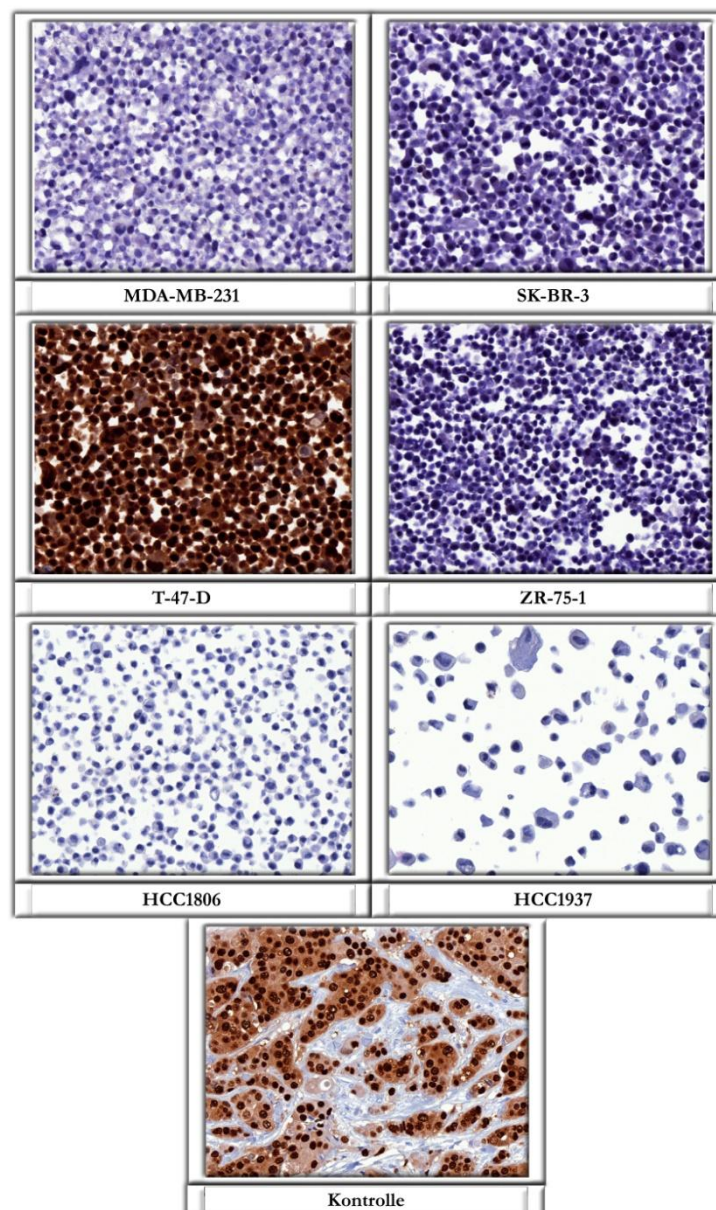


Abb. 13: Immunzytochemische Darstellung des Progesteronrezeptors bei den untersuchten Mammakarzinomzelllinien (Kontrolle: Progesteronrezeptor-positives Mammakarzinom).

(stark) und ZR-75-1 (schwach) eine positive Farbreaktion (Abb. 13).

ii. Epidermal growth factor receptor (EGFR, Her1)

Mittels Western Blot wurde die Expression des EGF-Rezeptors (Her1) bei den zu untersuchenden Zelllinien nachgewiesen. Hierbei fanden sich bei allen untersuchten Zelllinien – mit der Ausnahme von ZR-75-1 – deutliche Banden bei 180 kDa, die der Größe des EGF-Rezeptors entsprechen (Abb. 14).

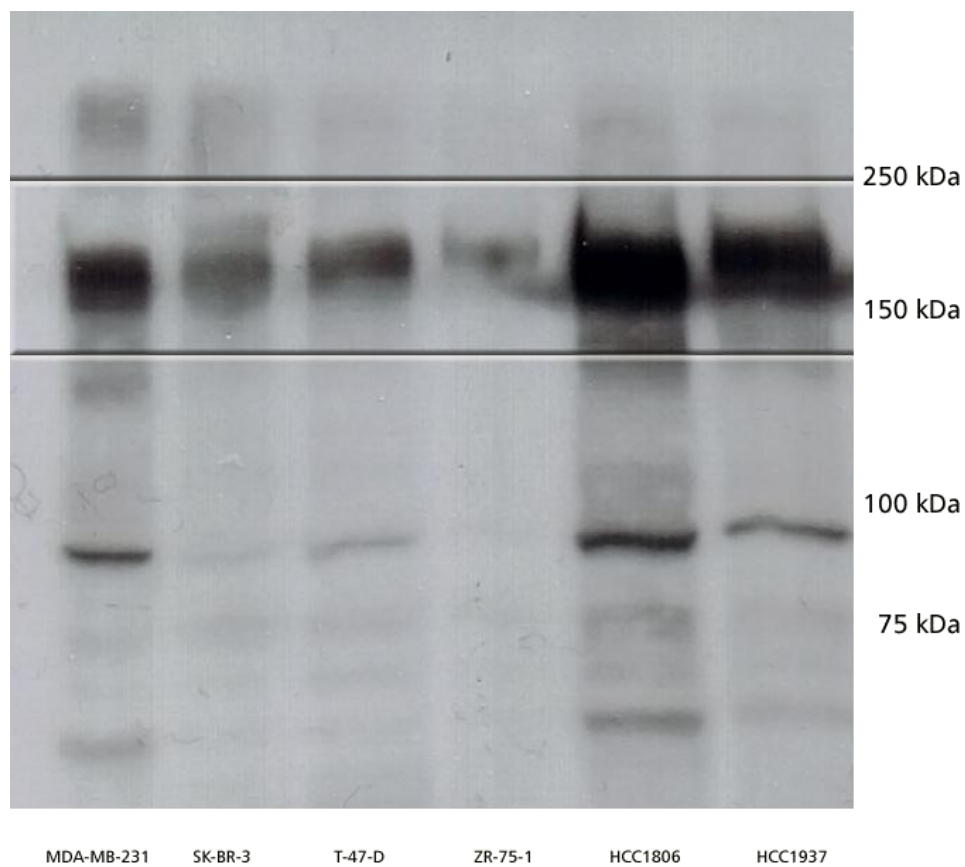


Abb. 14: Western Blot zur Ermittlung des EGF-Rezeptorstatus der sechs Mammakarzinomzelllinien.

iii. Her2/neu (ErbB2)-Rezeptor

Ebenfalls mittels Western Blot erfolgte die Bestimmung der Rezeptorexpression von Her2/neu (ErbB2). Hier konnte lediglich für die Zelllinie SK-BR-3 eine Überexpression des Rezeptors nachgewiesen werden. Für die Zelllinie ZR-75-1 zeigte sich eine geringe Expressionsdichte des Her2/neu, für alle weiteren Zelllinien konnte keine Rezeptorexpression ermittelt werden (Abb. 15).

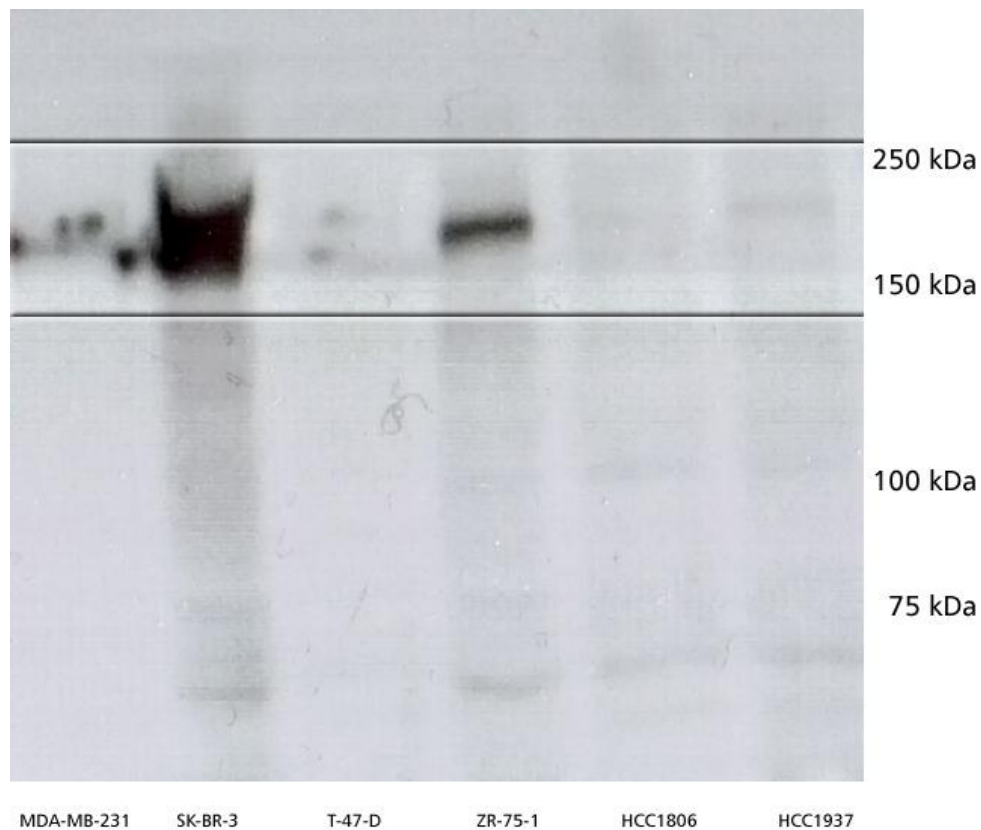


Abb. 15: Western Blot zur Ermittlung des Her2/neu-Status der sechs Mammakarzinomzelllinien.

iv. GHRH-Rezeptor

Eine besondere Herausforderung stellte bei der Bestimmung der Rezeptoren mittels Western Blot der GHRH-Rezeptor dar. Weil auf Tumorzellen meist nicht der hypophysäre Rezeptor, sondern dessen Splicevariante 1 (SV1) exprimiert wird,

konnte mit herkömmlichen Antikörpern gegen GHRH-R (z.B. Santa Cruz; #54203) kein Nachweis des Rezeptors auf den untersuchten Zelllinien erfolgen. Erst mit einem speziell gegen SV1 gerichteten primären Antikörper⁸¹ (Abcam; #28692) gelang der Nachweis des GHRH-Rezeptors in unterschiedlich starker Ausprägung auf verschiedenen Zelllinien.



Abb. 16: Nachweis des GHRH-Rezeptors (SV1) mittels Western Blot.

Deutlich zu erkennen sind zwei Banden bei 40 kDa und 47 kDa, die den Angaben auf dem Datasheet des Herstellers entsprechen und mit der molekularen Größe der SV1 des GHRH-Rezeptors übereinstimmen (Abb. 16). Die stärkste Expression zeigt sich bei den Zelllinien SK-BR-3, T-47-D und HCC1806. Ebenfalls stark exprimiert wird der Rezeptor auf den Zellen der Linien MDA-MB-231 und ZR-75-1. Die Zellen

der HCC1937-Zelllinie weisen nur eine sehr gering ausgeprägte Expression der SV1 des GHRH-Rezeptors auf.

v. Zusammenfassung der Rezeptorexpression

Durch die Kombination von Western Blot und Immunzytochemie konnte von den in der Studie verwendeten Mammakarzinomzelllinien ein komplettes Profil der für die weitere Arbeit wichtigen Rezeptoren erstellt werden (Tabelle 2). Die beiden Zelllinien T-47-D und ZR-75-1 dienten bei der Rezeptorbestimmung lediglich als Positiv- bzw. Negativkontrollen und wurden als nicht *triple*-negative Zelllinien in den weiteren Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Rezeptorexpressionsprofile der untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	ER	PR	Her2/neu (ErbB2)	Her1 EGFR	GHRH-R
MDA-MB-231	-	-	-	++	+
SK-BR-3	-	-	+++	+	++
T-47-D	++	++	-	+	++
ZR-75-1	+	+	+	-	+
HCC 1806	-	-	-	++	++
HCC 1937	-	-	-	++	-
	Immunzytochemie		Western Blot		

b. NACHWEIS VON MTOR

In einem weiteren Western Blot erfolgte der Nachweis von mTOR als Mitglied der intrazellulären Signalwegskette in den Mammakarzinomzelllinien HCC1806, HCC1937, MDA-MB-231 und SK-BR-3. Hierbei zeigte sich für alle untersuchten Zelllinien eine spezifische Bande bei 289 kDa, die bei der Zelllinie MDA-MB-231 sehr stark ausgeprägt war (Abb. 17).

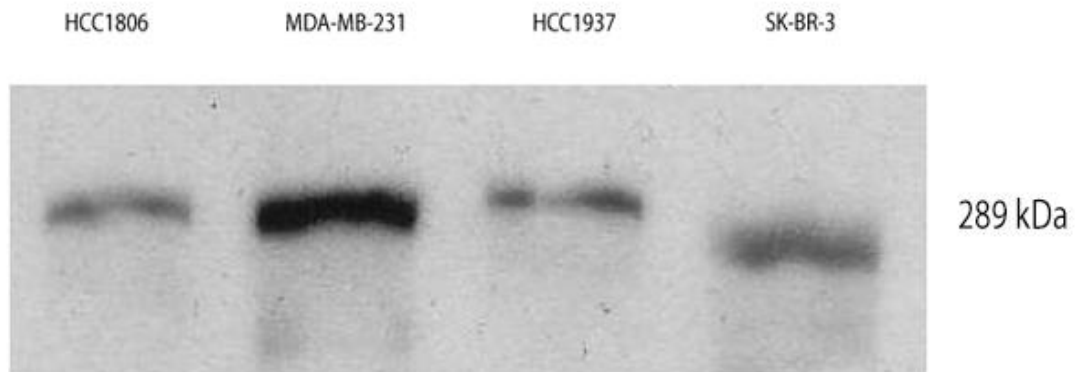


Abb. 17: Nachweis von mTOR (gesamt) mittels Western Blot.

c. DOSIS- UND ZEITABHÄNGIGE WIRKUNG VON RAPAMYCIN

Um die Wirksamkeit von Rapamycin in unterschiedlichen Dosierungen zu untersuchen, wurden die Zelllinien SK-BR-3 und MDA-MB-231 mit absteigenden Konzentrationen von Rapamycin über festgelegte Zeiträume behandelt und die Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus mittels

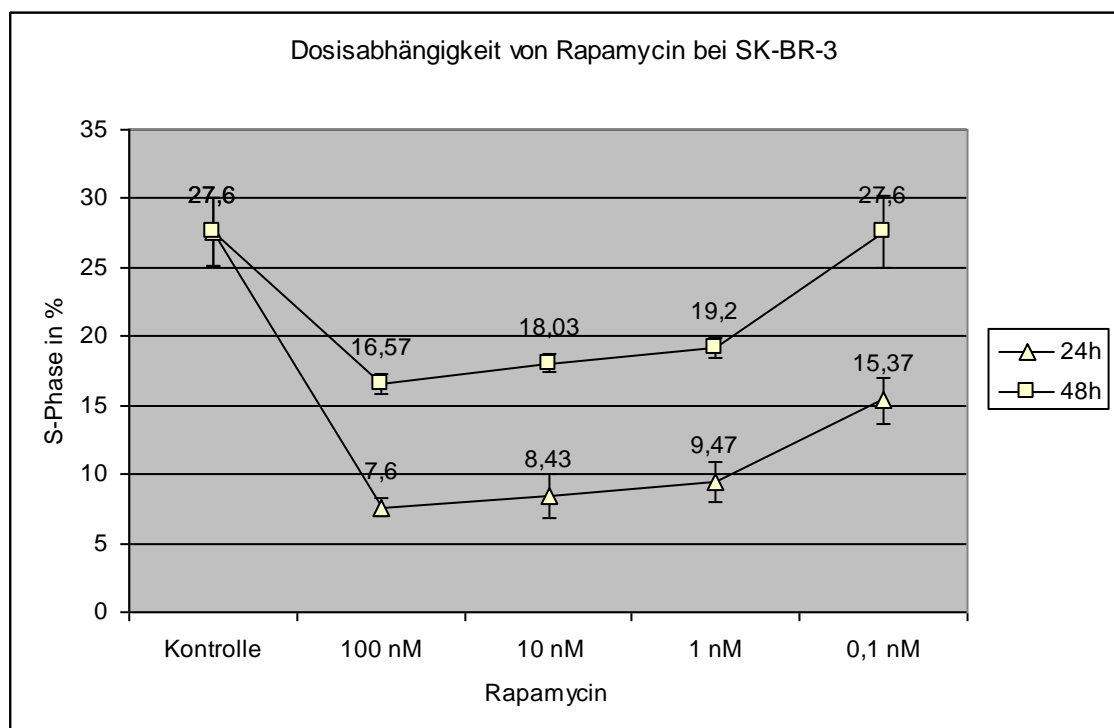


Abb. 18: Darstellung der Dosisabhängigkeit der Behandlung mit Rapamycin nach 24 h und 48 h für die Zelllinie SK-BR-3. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden ist gegen die absteigende Dosierung von Rapamycin aufgetragen.

Durchflusszytometrie bestimmt. Hier zeigte sich für die SK-BR-3-Zellen eine deutliche Reduktion des S-Phase-Anteils in der Gesamtzellpopulation ab einer Konzentration von 0,1 nM Rapamycin bei einer Inkubationszeit von 24 h. Mit zunehmender Konzentration bis zu einem Maximum von 100 nM Rapamycin sank die S-Phase-Fraktion bis auf 7,6% der Zellen ab. Bei längerer Inkubation bis 48 h verringerte sich der hemmende Effekt von Rapamycin in allen Konzentrationen, bei einer Konzentration von 0,1 nM Rapamycin konnte nach 48 h kein Effekt mehr nachgewiesen werden (Abb. 18).

Für die Zelllinie MDA-MB-231 konnte kein hemmender Effekt von Rapamycin auf die Zellproliferation nachgewiesen werden. Hier zeigte sich bei allen eingesetzten Konzentrationen ein eher unverändertes Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 19).

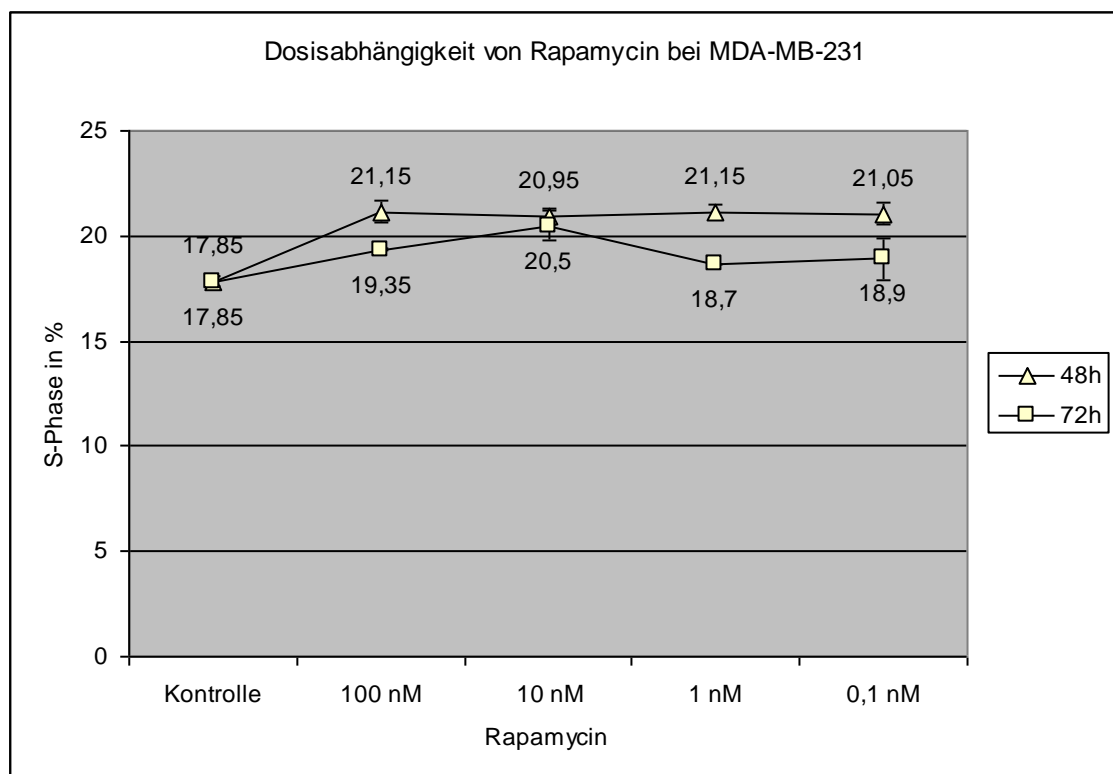


Abb. 19: Darstellung der Dosisabhängigkeit der Behandlung mit Rapamycin nach 24 h und 48 h für die Zelllinie MDA-MB-231. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden ist gegen die absteigende Dosierung von Rapamycin aufgetragen.

d. VITALITÄTSANALYSE MITTELS XTT-ASSAY

An den verschiedenen Zelllinien konnte durch die Anwendung der XTT-Messmethode der unterschiedliche Effekt der einzelnen Substanzen und deren Kombination gezeigt werden.

Wie in Abb. 20 dargestellt fand sich, dass der GHRH-Antagonist MIA-606 bei der Zelllinie SK-BR-3 zu einer Reduktion der Zellvitalität bis zu 4,25% der DMSO-Kontrolle führt, die diejenige von Camptothecin als Apoptose induzierendem Wirkstoff mit maximal 18,07% übertrifft. Auch die Applikation von Rapamycin zeigte eine antiproliferative Wirkung mit einer Reduktion der Zellvitalität auf maximal 73,40%, die über einen längeren Zeitraum wieder abnahm. An Tag 3 und 4 war die kombinierte Wirkung von MIA-606 und Rapamycin mit 7,34% bzw. 5,52% Zellvitalität größer als die der jeweiligen Einzelsubstanzen, war aber an Tag 5 mit 7,26% wieder rückläufig.

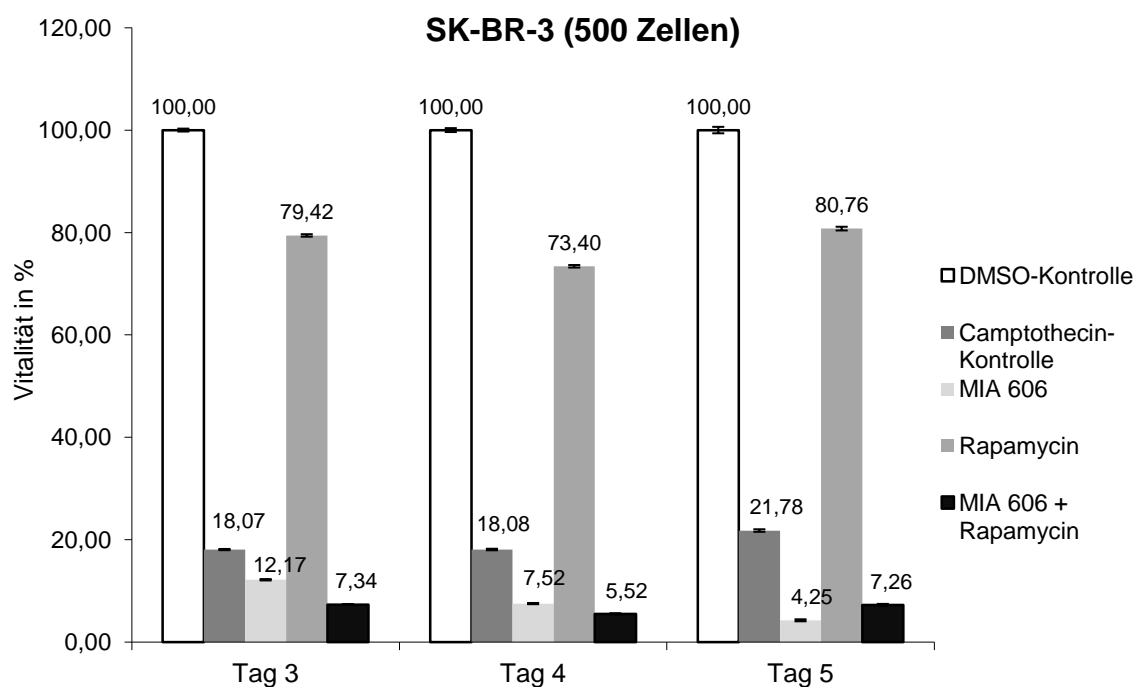


Abb. 20: Zellvitalität von SK-BR-3 (Aussaat: 500 Zellen/well) an Tag 3, 4 und 5 nach Inkubation mit den verschiedenen Wirkstoffen und Kombinationen, bezogen auf die DMSO-Kontrolle (2%).

Für die übrigen Zelllinien zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, wobei bei der Rapamycin-resistenten Zelllinie MDA-MB-231 ein Effekt durch Rapamycin erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 21).

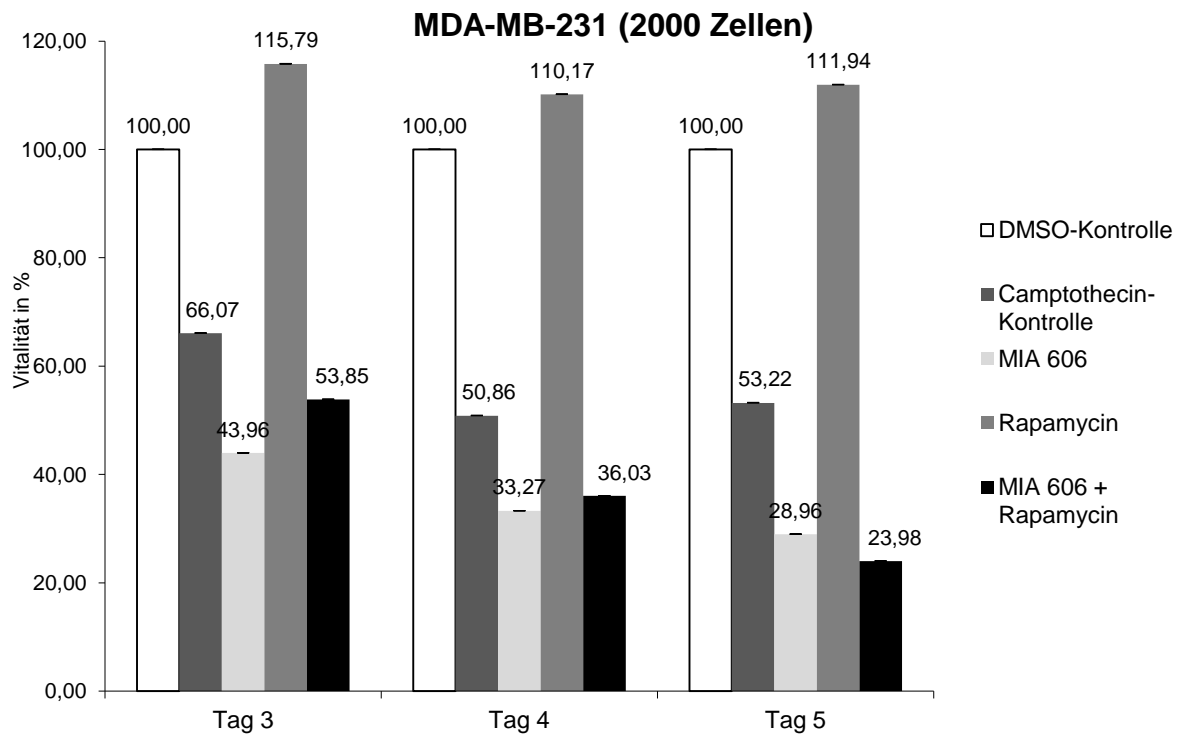


Abb. 21: Zellvitalität von MDA-M-231 (Aussaat: 2000 Zellen/well) an Tag 3, 4 und 5 nach Inkubation mit den verschiedenen Wirkstoffen und Kombinationen, bezogen auf die DMSO-Kontrolle (2%).

e. EFFEKTE VON RAPAMYCIN UND JMR-132 BEI SK-BR-3, HCC1806 UND HCC1937

Zur Darstellung des potentiell additiven Effekts der beiden Wirkstoffe Rapamycin und JMR-132 wurden die Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3, HCC1806 und HCC1937 mit den beiden Einzelsubstanzen und der Kombination der beiden Wirkstoffe behandelt.

Hier zeigte sich für die Zelllinie SK-BR-3 ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation durch die Behandlung mit 100 nM Rapamycin, wie durch die Vorversuche zur Dosisfindung bereits erwartet (Abb. 22). Der S-Phase-Anteil der Zellen sank nach 24 h auf 7,3% der Gesamtzellpopulation, nach 48 h betrug diese Fraktion immerhin noch 16,07%. Im Vergleich dazu betrug der Anteil der Zellen in der S-Phase bei der Kontrolle 27,5%. Durch die Behandlung mit 10 μ M JMR-132 konnte der S-Phasen-Anteil nach 24 h auf 18,7% gesenkt werden, nach 48 h lag diese Fraktion mit 22,2% ebenfalls noch signifikant unter der Kontrollgruppe. Für die Kombination der beiden Wirkstoffe fand sich nach 24 h mit 6,25% der geringste Anteil an Zellen in der S-Phase, nach 48 h stieg dieser Wert zwar auf 10,55% an, lag aber immer noch weit unter den Werten für die jeweiligen Einzelsubstanzen.

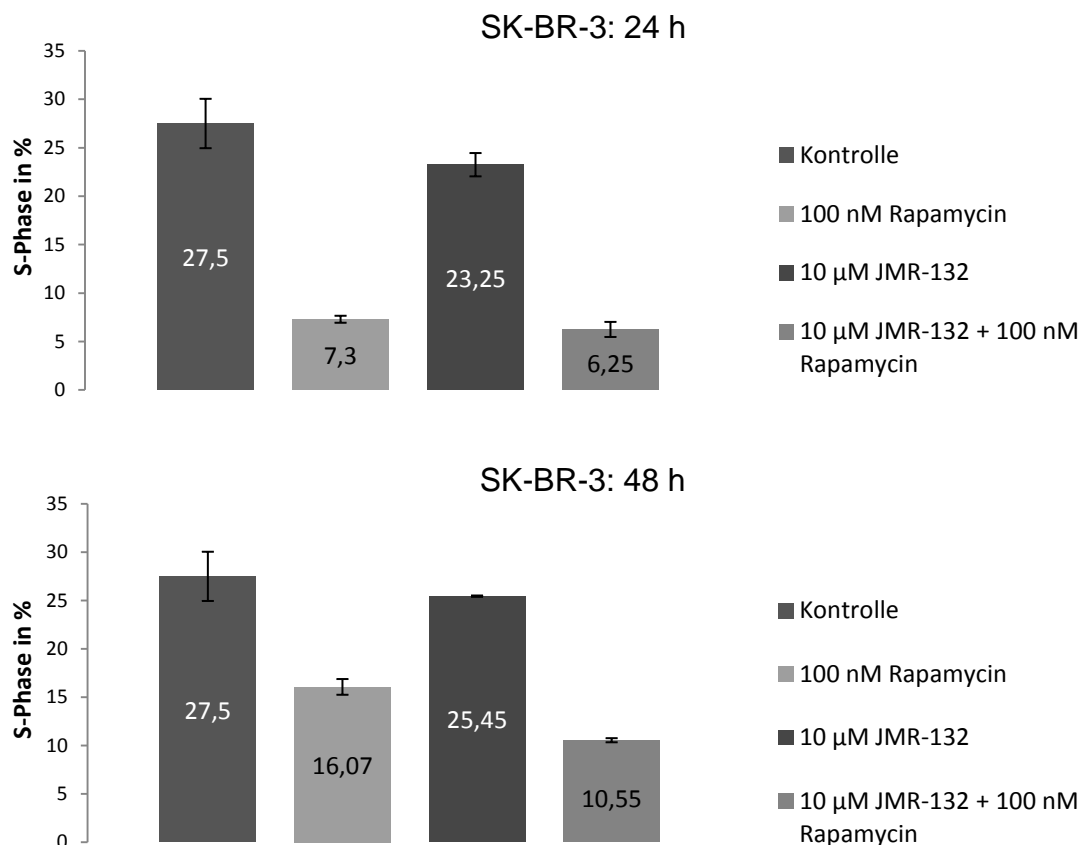


Abb. 22: S-Phase-Fraktion bei Behandlung der Zelllinie SK-BR-3 mit unterschiedlichen Wirkstoffen nach 24 h und 48 h Inkubationszeit.

Bei der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie HCC1806 konnte ein derartiger Effekt von JMR-132 durch statische Zellzyklusmessung nicht nachgewiesen werden, da sich hier eine Erhöhung des Anteils von Zellen in der S-Phase zeigte, eine Beobachtung, die mit der Hoechst/BrDU-Quenching-Methode genauer untersucht wurde (vgl. 3.g)

Für die als GHRH-R-negative Kontrollzelllinie HCC1937 fand sich ein deutlicher Effekt der Behandlung mit Rapamycin, während die Behandlung mit dem GHRH-Antagonisten JMR-132 sogar zu einem leichten Anstieg der S-Phase-Fraktion führte (Abb. 23). Die Kombination der beiden Wirkstoffe zeigte einen schwach ausgeprägten inhibitorischen Effekt, der nach 48 h vollständig aufgehoben war.

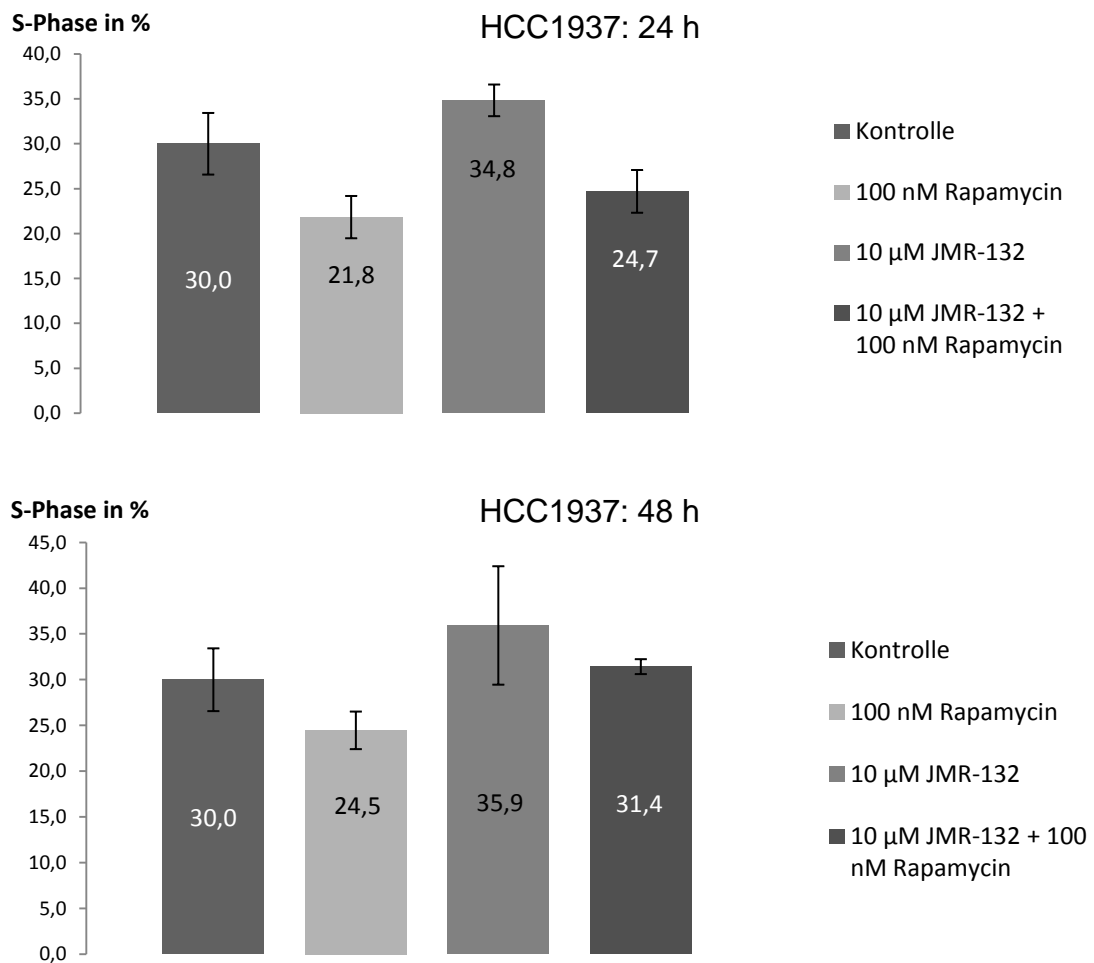


Abb. 23: S-Phase-Fraktion bei Behandlung der Zelllinie HCC1937 mit unterschiedlichen Wirkstoffen nach 24 h und 48 h Inkubationszeit.

f. EFFEKTE VON RAPAMYCIN UND MIA-313/MIA-606 BEI HCC1806

Da der experimentell entwickelte GHRH-Antagonist JMR-132 nach zahlreichen durchgeführten Tests nicht mehr zur Verfügung stand, wurden die nächsten Versuche mit den weiterentwickelten Wirkstoffen MIA-313 und MIA-606 durchgeführt, um die Effekte von GHRH-Antagonisten auf die *triple-negative* Mammakarzinomzelllinie HCC1806 näher zu untersuchen. Nach Bestimmung der S-Phase-Fraktion durch statische Zellzyklusmessung zeigte sich wie bereits in den

vorangegangenen Versuchen (vgl. 3.e) eine Erhöhung des Anteils in der S-Phase befindlicher Zellen (Abb. 24), die im Anschluss mittels dynamischer Zellzyklusmessung genauer untersucht wurde.

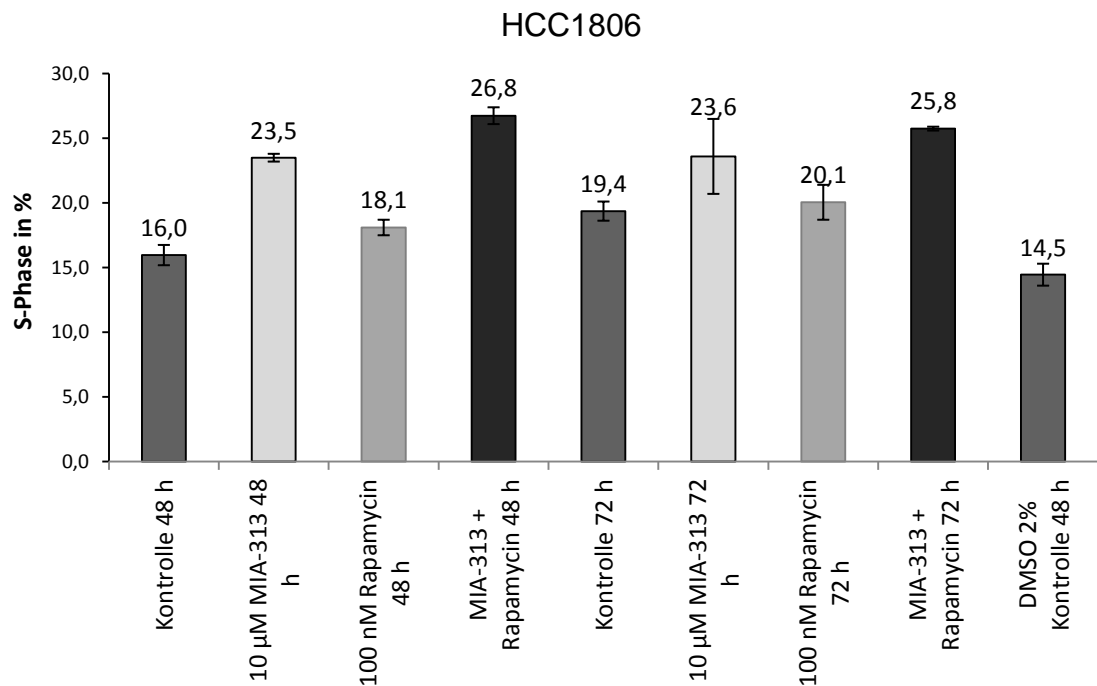


Abb. 24: Anteil der Zellpopulation in der S-Phase-Fraktion unter Behandlung mit den Einzelsubstanzen MIA-313 und Rapamycin, sowie deren Kombination bei der Mammakarzinomzelllinie HCC1806.

g. DYNAMISCHE ZELLYKLUSMESSUNG MITTELS BRDU/HOECHST-QUENCHING

Da in der statischen Zellzyklusanalyse mit Bestimmung der S-Phase-Fraktion eine unerwartete Erhöhung unter der Behandlung mit den verwendeten GHRH-Antagonisten in zahlreichen Versuchen nachgewiesen werden konnte, wurden dynamische Zellzyklusmessungen mit Hilfe des BrDU/Hoechst-Quenching-Verfahrens angeschlossen, um eine genauere Untersuchung der Verteilung der Zellen in den unterschiedlichen Phasen über mehrere Zellzyklen vorzunehmen. Wie bereits

in den vorangegangenen Versuchen wurde die *triple-negative* Mammakarzinomzelllinie HCC1806 mit unveränderten Wirkstoffkonzentrationen von Rapamycin, MIA-606 und der Kombination der beiden über maximal 72 h behandelt.

Hierbei zeigte sich, dass durch die Behandlung mit MIA-606 als Einzelsubstanz und in Kombination mit Rapamycin zwar die in der G₀-Phase befindliche Zellpopulation transient erhöht ist (Abb. 25), sich aber kein Langzeiteffekt im Sinne einer Proliferationshemmung einstellt: während nach Inkubation über 48 h die G₀-Phase-Fraktion geringfügig erhöht ist, fallen die Werte nach 72 h wieder stark ab (Abb. 26).

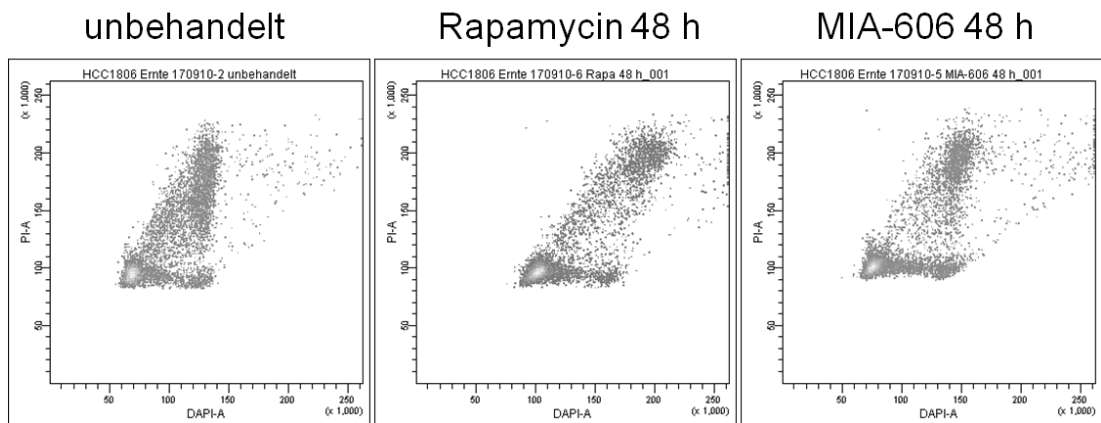


Abb. 25: Beispielmessungen der dynamischen Zellzyklusanalyse mittels BrDU/Hoechst-Quenching der Zelllinie HCC1806.

Insbesondere konnte auch durch die dynamische Zellzyklusmessung ein Arrest der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus nicht nachgewiesen werden.

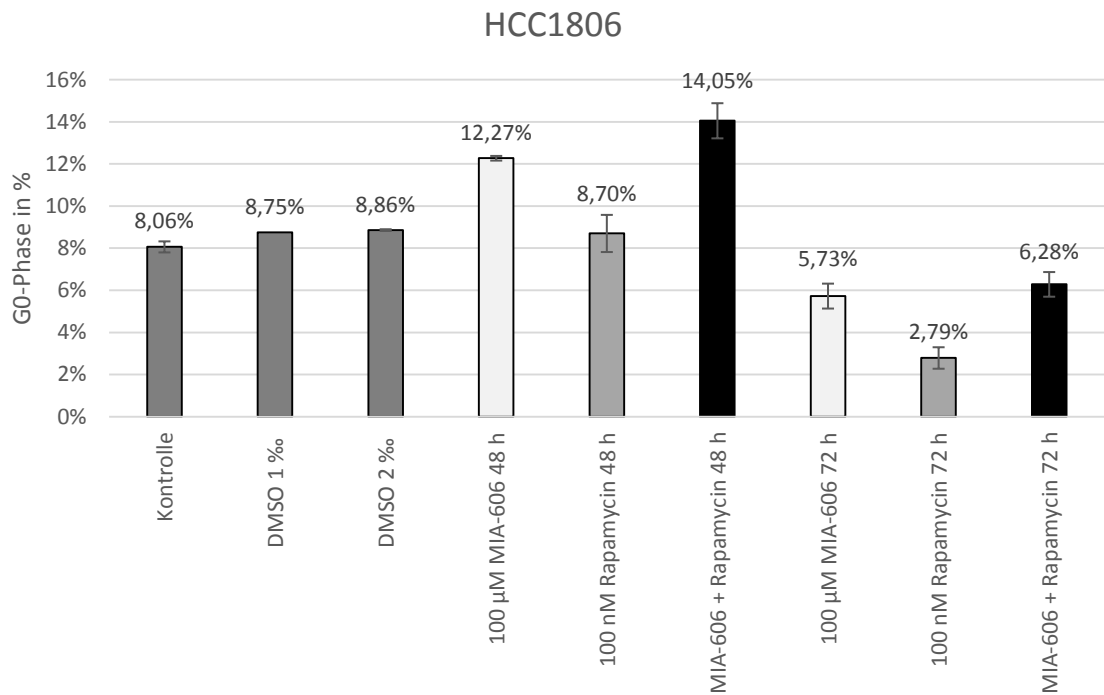


Abb. 26: Anteil der G0-Phase an der Gesamtpopulation, ermittelt durch dynamische Zellzyklusmessung mittels BrDU/Hoechst-Quenching, nach Behandlung über 48 h und 72 h.

h. UNTERSUCHUNG DER AUSWIRKUNGEN AUF DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALWEITERLEITUNG MITTELS WESTERN BLOT

Um die Effekte der einzelnen Wirkstoffe und ihrer Kombinationen auf die intrazelluläre Signalweiterleitung zu untersuchen, wurden schließlich nach Behandlung der verschiedenen Mammakarzinomzelllinien mit den beiden Wirkstoffen und deren Kombination Western Blots von wichtigen Signalwegsmolekülen im GHRH/Akt/mTOR-Signalweg angefertigt. Beobachtet wurden die Effekte der beiden Wirkstoffe auf die MAP-Kinasen ERK1/2, auf die Proteinkinase B (Akt), auf mTOR und das Downstream-Target von mTOR, die p70RS6-Kinase sowie deren jeweilige phosphorylierte (phospho-) – und damit aktivierte – Formen.

i. Effekte bei MDA-MB-231

Bei der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurden die Signalwegsmoleküle Akt/phospho-Akt, ERK/phospho-ERK und mTOR/phospho-mTOR untersucht.

Hierbei zeigte sich für die behandelten Zellen sowohl bei MIA-606 als auch bei Rapamycin und deren Kombination ein deutlicher Anstieg von phosphoryliertem Akt im Vergleich zu den beiden Kontrollen, bei vergleichbaren Mengen von Gesamt-Akt. Für die Positivkontrolle mit EGF konnte ebenfalls ein Anstieg von phospho-Akt nachgewiesen werden (Abb. 27).

Für die beiden anderen untersuchten Signalmoleküle ERK1/2 und mTOR bzw. deren phosphorylierte Formen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Karzinomzellen gezeigt werden.

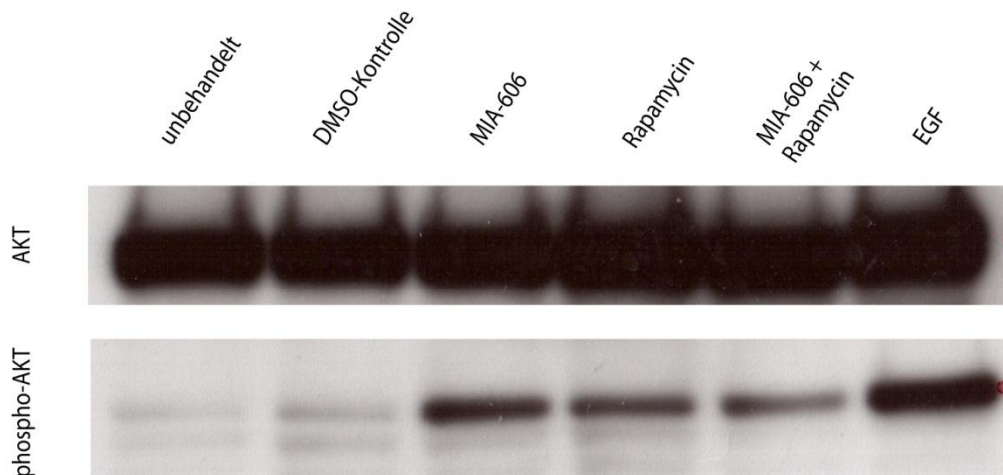


Abb. 27: Western Blot zur Darstellung von Akt/phospho-Akt bei MDA-MB-231 nach Stimulation über 48 h (MIA-606, Rapamycin) bzw. 7 min (EGF).

ii. Effekte bei HCC1806

Für die zweite *triple*-negative Mammakarzinomzelllinie HCC1806 wurden ebenfalls die Signalwegsmoleküle Akt/phospho-Akt, ERK/phospho-ERK und mTOR/phospho-mTOR untersucht.

Hierbei zeigten sich für die behandelten Zellen für die Signalmoleküle ERK1/2 und Akt bzw. deren phosphorylierte Formen keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Karzinomzellen.

Für mTOR/phospho-mTOR fand sich ein etwas erhöhter Anteil an phosphoryliertem mTOR nach Behandlung mit MIA-606 als Einzelsubstanz, sowie geringgradig auch in der Kombination mit Rapamycin. Auch die Positivkontrolle mit EGF zeigte einen Anstieg von phospho-mTOR. Die Behandlung mit Rapamycin als Einzelsubstanz dagegen führte zu einer leichten relativen Abnahme von phosphoryliertem mTOR im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 28).

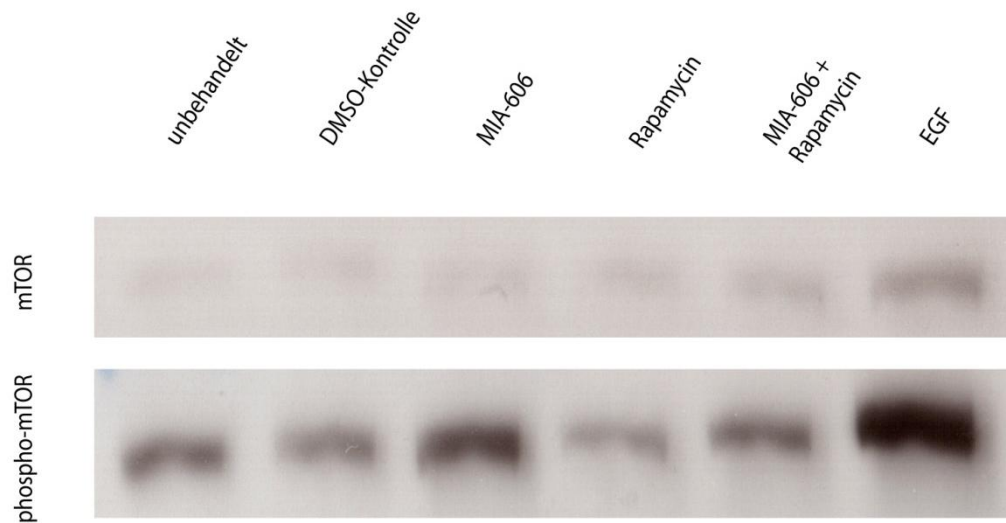


Abb. 28: Western Blot zur Darstellung von mTOR/phospho-mTOR bei HCC1806 nach Stimulation über 48 h (MIA-606, Rapamycin) bzw. 7 min (EGF).

iii. Effekte bei SK-BR-3

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Effekte der unterschiedlichen Behandlungen auf das Downstream-Zielmolekül p70RS6-Kinase im mTOR-Signalweg der Zelllinie SK-BR-3 untersucht. Hier konnte eine deutliche Abnahme der Phosphorylierung der p70RS6-Kinase bei der Behandlung mit Rapamycin wie auch bei der Kombination von Rapamycin mit MIA-606 gezeigt werden. Als Positivkontrolle diente hierzu die Stimulation mit EGF, außerdem wurde zusätzlich der kombinierte PI3-Kinase/mTOR-Inhibitor CAY10626^{72,14} in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt, der nach 48 h ebenfalls eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung von mTOR bewirkte, sowohl im Vergleich zur Kontrolle mit EGF als auch in Relation zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 29).

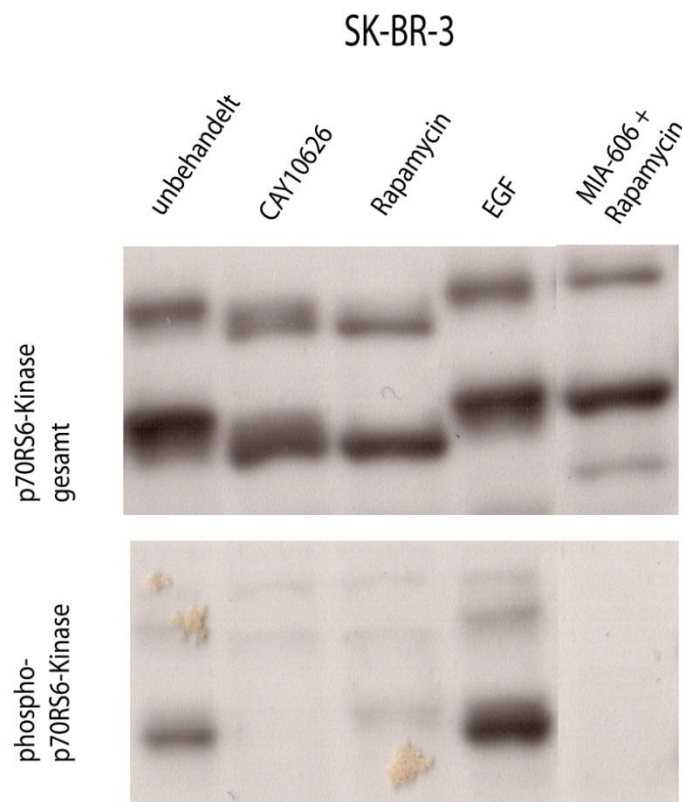


Abb. 29: Western Blot zur Darstellung des Effektes von Rapamycin und MIA-606 auf das Downstream-Target p70RS6-Kinase im mTOR-Signalweg bei SK-BR-3.

4. DISKUSSION

a. REZEPTORBESTIMMUNG

i. Östrogen- und Progesteronrezeptor, Her2/neu und EGFR

Die Bestimmung der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Mammakarzinom mittels Immunhistochemie ist eine Routineuntersuchung sowohl im Bereich der Grundlagenforschung als auch in der täglichen Diagnostik in der Pathologie zur Subtypisierung verschiedener Arten des Brustkrebses und zur Planung der Therapie sowie der Abschätzungen der individuellen Prognose. Gleiches gilt für die Bestimmung der (Über-)Expression des Her2/neu (erbB2)-Rezeptors⁵⁵. Um geeignete Zelllinien für die nachfolgenden Versuche zu bestimmen, wurde daher mit Routinemethoden der jeweilige Rezeptorstatus definiert und diejenigen Zelllinien ausgewählt, die eine fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren aufwiesen: SK-BR-3, MDA-MB-231, HCC1806 und HCC1937. Von diesen vier Zelllinien zeichnet sich lediglich SK-BR-3 durch eine Überexpression von Her2/neu aus, die übrigen drei Mammakarzinomzelllinien sind als *triple-negative* Zelllinien definiert.

Die Bestimmung der Expression des EGF-Rezeptors hat zwar keinen Eingang in die Routinediagnostik gefunden, dennoch zeigen verschiedene Mammakarzinomtypen unterschiedliche Ausprägungen in seiner Wirkung^{41,96,98}. In unseren Untersuchungen konnte eine hohe Expression von EGFR für MDA-MB-231, HCC1806 und HCC1937 nachgewiesen werden, wohingegen die Expression bei SK-BR-3 deutlich schwächer ausgeprägt war. Dies mag eine zusätzliche Ursache für das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien in den nachfolgenden Versuchen sein^{94,65}.

ii. GHRH-Rezeptor

Der GHRH-Rezeptor ist auf nahezu allen Körperzellen in unterschiedlicher Menge aufzufinden³³. Dennoch ist der Nachweis mittels Western Blot eine Herausforderung, da nur wenige Antikörper den humanen Rezeptor spezifisch erkennen und detektieren. In zahlreichen Versuchen konnten daher meist nur unspezifische oder schwache Rezeptornachweise erzielt werden. Erst mit Hilfe eines speziell gegen die humane Splice-Variante 1 gerichteten Antikörpers war es möglich, den GHRH-R auf mehreren Mammakarzinomzelllinien nachzuweisen⁸¹. Lediglich bei der als GHRH-R-negativ beschriebenen Zelllinie HCC1937 war der Rezeptor nur in sehr schwacher Ausprägung vorhanden, so dass diese Zelllinie als negativ gewertet und für einige Versuche als Negativkontrolle verwendet wurde. Die im weiteren Verlauf untersuchten Zelllinien MDA-MB-231, SK-BR-3 und HCC1806 wiesen jeweils eine deutliche Expression des GHRH-R auf.

b. NACHWEIS VON mTOR

Der Nachweis von mTOR im Western Blot als semiquantitativer Untersuchungsmethode zeigte eine stark unterschiedliche Menge an vorhandenem mTOR in den verschiedenen Zelllinien. Während die Zelllinien HCC1806, SK-BR-3 und HCC1937 nur wenig an gesamtem mTOR nachweisen ließen, fand sich bei MDA-MB-231 eine hohe Menge an intrinsischem mTOR, was möglicherweise das fehlende Ansprechen dieser Zelllinie auf die Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin erklären kann (vgl. 4. c).

c. DOSIS- UND ZEITABHÄNGIGE WIRKUNG VON RAPAMYCIN

Zur Vorbereitung auf die späteren Kombinationsversuche wurden die optimale Wirkstoffkonzentration und Inkubationszeit des mTOR-Inhibitors Rapamycin

bestimmt. Die Wirkstoffkonzentrationen der verwendeten GHRH-Antagonisten richteten sich nach bereits vorliegenden Ergebnissen der Arbeitsgruppe.

Während sich für SK-BR-3 eine auch zeitabhängige Dosis-/Wirkungskurve bestimmen lassen konnte, fand sich für MDA-MB-231 kein signifikanter Effekt von Rapamycin auf die Zellproliferation. Dies entspricht den Ergebnissen zahlreicher anderer Arbeitsgruppen, die eine Resistenz von MDA-MB-231 gegen Rapamycin bereits beschrieben haben¹¹⁰.

Als Ursache hierfür müssen Feedbackmechanismen in Betracht gezogen werden, die bei einer Inhibition von mTOR über eine Hochregulierung von Akt und anderen Signalwegsmolekülen zu einer Kompensation des Hemmeffekts führen^{85,26}. Außerdem konnte mit Western Blots nachgewiesen werden, dass die verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche hohe intrinsische Menge an mTOR besitzen, was das uneinheitliche Ansprechen auf die Behandlung mit dem selektiven mTOR-Inhibitor Rapamycin erklären kann. In anderen Studien wird zudem von einer mTOR-unabhängigen Phosphorylierung des Downstream-Effektormoleküls 4E-BP1 berichtet, die für eine Resistenz gegen mTOR-Inhibitoren verantwortlich sein kann¹¹². Da die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Western Blots zur Untersuchung von 4E-BP1 auch nach mehrmaligen Wiederholungen keine auswertbaren Ergebnisse lieferten, konnte dies hier nicht bestätigt werden.

Um die Konzentration von Rapamycin nicht weiter als therapeutisch nötig zu erhöhen¹¹¹, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen eine Konzentration von 100 nM Rapamycin festgelegt. Der inhibitorische Effekt von Rapamycin nahm bereits nach 48 h wieder ab, weshalb für die Monotherapie eine maximale Inkubationsdauer von 72 h für die weitere Versuchsplanung festgelegt wurde.

d. VITALITÄTSANALYSE MITTELS XTT-ASSAY

In den XTT-Assays zur Bestimmung der Zellvitalität unter Behandlung ließ sich bei den GHRH-R-positiven Mammakarzinomzelllinien für den GHRH-Antagonisten MIA-606 eine vergleichbar hohe inhibitorische Potenz wie für das Vorgängermolekül MIA-602⁶⁹ sowohl als Einzelsubstanz als auch in der Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin bestätigen, der als Monotherapie eine wesentliche schwächere wachstumshemmende Wirkung aufwies. MIA-606 bewirkte eine Abnahme der Zellvitalität um fast 100% gegenüber der Kontrolle und zeigte außerdem eine zunehmende Wirkung bei längerer Inkubationsdauer. In seiner Reduktion der Zellvitalität übertraf MIA-606 hierbei auch deutlich den Apoptose induzierenden Wirkstoff Camptothecin. Die GHRH-R-negative Zelllinie HCC1937 zeigte erwartungsgemäß keinen inhibitorischen Effekt von MIA-606.

e. SYNERGISTISCHER EFFEKT VON RAPAMYCIN UND JMR-132 BEI SK-BR-3

In weiteren Versuchen zeigte sich für die Hormonrezeptor-negative, Her2/neu-überexprimierende Zelllinie SK-BR-3 eine deutliche Reduktion der S-Phase-Fraktion vor allem bei der Behandlung mit Rapamycin, die nach 24 h am stärksten ausgeprägt war und nach 48 h bereits wieder nachließ. Der GHRH-Antagonist JMR-132 hatte eine deutlich schwächer ausgeprägte wachstumshemmende Wirkung, die ebenfalls nach 48 h wieder rückläufig war. Bemerkenswert ist jedoch der synergistische Effekt der beiden Wirkstoffe, der besonders nach 48 h zu einer im Vergleich zu den Einzelsubstanzen länger anhaltenden und ausgeprägteren Reduktion der S-Phase-Fraktion führte. Dadurch konnte nicht nur die inhibitorische Potenz von Rapamycin und JMR-132 – die auf eine pro-apoptotische Komponenten und einen S-Phase-Arrest zurückgeführt werden kann³⁸ – bestätigt werden, sondern auch ein synergistischer Effekt der beiden Wirkstoffe bei gemeinsamem Einsatz über einen

längeren Zeitraum bei der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 nachgewiesen werden.

Die als Kontrolle untersuchte GHRH-R-negative Mammakarzinomzelllinie HCC1937 zeigte zwar einen Abfall der S-Phase-Fraktion bei Behandlung mit Rapamycin, der GHRH-Antagonist JMR-132 hatte hier erwartungsgemäß aber keine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation, sondern führte sogar zu einem geringen Anstieg der S-Phase-Fraktion und einer Abschwächung der Wirkung von Rapamycin, möglicherweise über andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte intrazelluläre Signalwege oder Rezeptoren.

Für die *triple*-negative, GHRH-R-positive Zelllinie HCC1806 fand sich in den statischen Zellzyklusmessungen ein zunächst paradox erscheinender Anstieg der S-Phase-Fraktion, obwohl in mikroskopischen Zellzahlmessungen sowohl eine deutliche Reduktion der Gesamtzellzahl als auch eine morphologisch schwere Schädigung der Tumorzellen in Kultur unter der Behandlung festgestellt werden konnte. Zwischenzeitlich durchgeführte Apoptosemessungen mittels Annexin-V-FITC zeigten außerdem keine erhöhte Apoptoserate, die in anderen Arbeiten beim Einsatz von GHRH-Antagonisten beschrieben wurde^{106,113}.

Aus diesem Grund wurden zur näheren Untersuchung des Effektes der eingesetzten Wirkstoffe dynamische Zellzyklusanalysen angeschlossen. Da der experimentell hergestellte GHRH-Antagonist JMR-132 nicht mehr zur Verfügung stand, wurden für diese Versuche die weiterentwickelten, aber in ihrer Wirkweise identischen Peptidhormonantagonisten MIA-313 und MIA-606 verwendet.

f. DYNAMISCHE ZELLZYKLUSANALYSE: WIRKUNGSMECHANISMEN UND EFFEKT BEI HCC1806

Die in den statischen Zellzyklusmessungen festgestellte Erhöhung der S-Phase-Fraktion unter Behandlung der Zelllinie HCC1806 sollte durch dynamische Zellzyklusanalyse mittels BrDU/Hoechst-Quenching näher untersucht werden.

In den flowzytometrischen Untersuchungen zeigten sich keine reproduzierbaren Veränderungen in der prozentualen Verteilung der Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, die den in der statischen Messung beobachteten Anstieg der S-Phase-Fraktion erklären konnten. Lediglich eine transiente Erhöhung der G0-Phase konnte beobachtet werden, entsprechend einem transienten Austritt aus dem Zellzyklus. Ein Langzeiteffekt war jedoch nicht nachzuweisen.

Insgesamt sind die inhibitorischen Effekte auf die *triple-negative* Zelllinie HCC1806 deutlich geringer als auf die Her2/neu-überexprimierende Zelllinie SK-BR-3. Dies mag zum einen an einer Interaktion mit dem Her2/neu-Signalweg liegen, der durch Rapamycin mit mTOR als Downstream-Target ebenfalls beeinflusst wird⁸⁹, zum anderen könnte die unterschiedlich hohe Expression von Her1 (EGFR) ein schwächeres Ansprechen von HCC1806-Zellen erklären^{75,60} (Abb. 30).

g. SIGNALWEGE

Um nach den nicht richtungweisenden Zellzyklusmessungen die Effekte der eingesetzten Wirkstoffe auf die Signalweiterleitung im Zellinneren näher zu

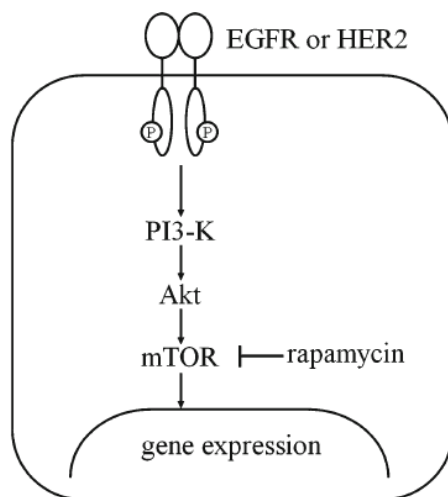


Abb. 30: Schematische Darstellung des Signalwegs von Her/neu und EGFR mit mTOR als Downstream-Molekül und Inhibition durch Rapamycin (nach: Suzuki S et al. (2012) *Virchows Arch*).

charakterisieren, wurden Western Blots von Proteinlysaten nach Kurzstimulation angefertigt.

So konnte für die *triple*-negative Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Rapamycin ebenso wie mit dem GHRH-Antagonisten MIA-606 zu einem Anstieg von phosphoryliertem mTOR führt. Dies erklärt die in den Proliferationsversuchen nachgewiesene Resistenz dieser Zelllinie gegen Rapamycin, die weitgehend auf einem Feedbackmechanismus über den Akt-Signalweg beruht³⁵. Außerdem ist es ein Indiz dafür, dass auch in der GHRH-R-Signalweiterleitung – die ja letztlich ebenfalls in die mTOR-Kaskade mündet – ein derartiger Feedbackmechanismus vorhanden sein könnte.

Auch bei der gegenüber GHRH-Antagonisten sensitiven *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie HCC1806 kam es zu einem Anstieg von phospho-mTOR nach Behandlung mit MIA-606, so dass auch bei dieser Zelllinie von einer Aktivierung des mTOR-Signalwegs durch GHRH-R-vermittelte Effekte ausgegangen werden muss und eine Wachstumshemmung über andere Signalwege nahelegt. Allerdings zeigte sich eine inhibitorische Wirkung von Rapamycin durch einen Abfall von phosphoryliertem mTOR, wodurch die Ergebnisse der Proliferationsversuche auch auf Ebene der Signaltransduktion bestätigt wurden.

Für die Hormonrezeptor-negative, Her2/neu-positive Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 wurde zusätzlich ein Downstream-Zielmolekül von mTOR, die ribosomale S6-Kinase untersucht. Diese zeigte für die Behandlung mit Rapamycin, auch in Kombination mit MIA-606, eine fast vollständige Reduktion von phospho-p70RS6K im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Positivkontrolle mit EGF-Stimulation. Dies bestätigt den inhibitorischen Effekt von Rapamycin auf die nachgeschalteten Zielmoleküle³⁶ und erklärt die in den Proliferationsversuchen nachgewiesene Wachstumshemmung durch Rapamycin als Einzelsubstanz und in Kombination mit GHRH-Antagonisten.

Voraussetzung für einen inhibitorischen und somit therapeutischen Effekt auf dieser Ebene kann möglicherweise eine hohe intrinsische Aktivität der RS6K in ihrer

phosphorylierten Form sein, die nicht in allen Zelllinien gleich stark ausgeprägt ist und für das unterschiedlich gute Ansprechen verantwortlich sein könnte.

h. RESÜMEE

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer wirksamen und zugleich nebenwirkungsarmen zielgerichteten Therapie für Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativen oder *triple*-negativen Mammakarzinomen auf der Grundlage von GHRH-Antagonisten ein interessanter Ansatz, der momentan jedoch noch weit von einer klinischen Anwendung entfernt ist: der GHRH-Rezeptor ist auf einer Vielzahl menschlicher Zellen zu finden³³ und somit nur bei einer starken Expression oder großen Tumormasse als spezifische Zielstruktur auf Brustkrebszellen relevant. Zudem sind die genauen Wirkmechanismen noch unzureichend untersucht, um mögliche unerwünschte Effekte auf andere Organe zu verhindern. Die Wirksamkeit von GHRH-Antagonisten, die bereits von anderen Arbeitsgruppen dargestellt wurde^{69,67,80}, konnte auf *in-vitro*-Ebene durch die beschriebenen Untersuchungen teilweise bestätigt werden und war für manche Zelllinien in Bezug auf die Zellvitalität sehr stark ausgeprägt. Allerdings fanden sich Diskrepanzen zu den an anderer Stelle beschriebenen Wirkmechanismen, insbesondere konnten ein pro-apoptotischer Effekt sowie ein S-Phase-Arrest mit den angewendeten Methoden nicht verifiziert werden^{38,106,113}. Die Ergebnisse aus *in-vivo*-Studien wurden hier nicht überprüft, scheinen jedoch durch weitaus komplexere hormonelle Interaktionen nur unter optimalen Bedingungen erzielbar zu sein.

Die Kombination mit Rapamcyin als einem zweiten Wirkstoff, der tiefer in der intrazellulären Kaskade ansetzt, scheint für manche Karzinomzelllinien ebenfalls vielversprechend. Andererseits scheinen andere Zelllinien Resistenz- oder Feedbackmechanismen zu besitzen, die trotz vorhandener Zielstruktur einen therapeutischen Einsatz nicht zulassen.

Die sehr stark zelllinienspezifischen Untersuchungsergebnisse in dieser Arbeit lassen sich auf die unterschiedliche Kinetik und intrinsische Aktivität von mTOR und seiner Downstream-Targets ebenso zurückführen wie auf individuelle Feedbackmechanismen und Querverbindungen zwischen den verschiedenen molekularen Signalwegen in der Zelle. Diese Interaktionen zwischen den unterschiedlichen Rezeptorsignalwegen und in der intrazellulären Signalweiterleitung müssen weiter untersucht werden, um die Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und spezifischen Angriffspunkte an Rezeptoren und im Zellinneren genauer charakterisieren zu können. Insbesondere die (Über-)Expression von Rezeptoren der Her-Familie (Her2/neu, Her1, Her3 und Her4) könnte eine große Rolle bei der Wirksamkeit von GHRH-Antagonisten und Rapamycin spielen. Möglicherweise können in Zukunft durch die Kombination mit anderen zielgerichteten therapeutischen Wirkstoffen, z. B. mit EGFR- oder Akt-Inhibitoren¹⁰⁸, noch bessere und länger anhaltende Effekte auf die Zellproliferation und -vitalität maligner Tumoren erzielt werden, so dass später individuell auf Patientinnen zugeschnittene und nebenwirkungsarme zielgerichtete Therapien entwickelt werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die proliferationshemmende Wirkung verschiedener GHRH-Antagonisten und des mTOR-Inhibitors Rapamycin sowie eine mögliche synergistische oder gar potenzierende Wirkung des kombinierten Einsatzes beider Wirkstoffe auf Hormonrezeptor-negative Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. Da für *triple*-negative Mammakarzinome – also Karzinome ohne Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptor und außerdem ohne Überexpression von Her2/neu – bislang keine zielgerichteten Therapien als Alternative zur konventionellen systemischen Chemotherapie existieren, wurden auch solche Zelllinien identifiziert und auf ihr Ansprechen hin untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass Rapamycin eine sehr stark unterschiedlich ausgeprägte inhibitorische Wirkung bei verschiedenen Zelllinien aufweist. So konnte für die Hormonrezeptor-negative, Her2/neu-positive Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 und die *triple*-negative Zelllinie HCC1806 eine sowohl dosis- als auch zeitabhängige Wachstumshemmung durch Rapamycin nachgewiesen werden, während bei der *triple*-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 ein antiproliferativer Effekt fehlte und es durch Rapamycin sogar über Feedbackmechanismen im Akt/mTOR-Signalweg zur erhöhten Zellproliferation kam.

Der GHRH-Antagonist MIA-606 zeigte in Vitalitätsassays für die GHRH-R-positiven Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, SK-BR-3 und HCC1806 jeweils eine Hemmung des Zellwachstums bei einer Konzentration von 10 μ M, die teilweise die Wachstumshemmung durch das Apoptose induzierende Camptothecin in der gleichen Konzentration sogar übertraf.

In statischen Zellzyklusmessungen ließen sich die Ergebnisse aus den Vitalitätsassays bestätigen und für die Zelllinie SK-BR-3 bei längerer Inkubationszeit auch ein synergistischer Effekt der beiden Wirkstoffe JMR-132 und Rapamycin festgestellt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Wirksamkeit von Rapamycin und verschiedener GHRH-Antagonisten auf mehrere Hormonrezeptor-negative und *triple*-negative Mammakarzinomzelllinien, sofern diese den GHRH-Rezeptor exprimieren und keine Resistenz gegen die eingesetzten Substanzen aufweisen. Bei längerer Wirkdauer findet sich außerdem ein schwacher synergistischer Effekt von GHRH-Antagonisten in der Kombination mit Rapamycin für einzelne Zelllinien.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB and Brawley OW. **Estrogen receptor breast cancer phenotypes in surveillance, epidemiology, and end results database.** *Breast Cancer Res Treat.* 2002; 76: 27-36.
- ² Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. **Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry.** *Cancer.* 2007; 109: 1721–1728.
- ³ Brockhoff G. **DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie.** In: Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg). **Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie.** Karger, Basel. 2007, pp 604-646
- ⁴ Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. **A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex.** *Nature.* 1994;369(6483):756-758.
- ⁵ Buchholz S, Schally AV, Engel JB, et al. **Potential of mammary cancer inhibition by combination of antagonists of growth hormone-releasing hormone with docetaxel.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(6):1943-1946.
- ⁶ Busto R, Schally AV, Braczkowski R, et al. **Expression of mRNA for growth hormone-releasing hormone and splice variants of GHRH receptors in human malignant bone tumors.** *Regul Pept.* 2002; 108(2-3):47-53.
- ⁷ Busto R, Schally AV, Varga JL, et al. **The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(18):11866-11871.
- ⁸ Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. **The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes.** *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 2329–2334
- ⁹ Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al. **Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.** *JAMA.* 2006; 295(21): 2492-2502.

- 10 Chan S, Scheulen ME, Johnston S, et al. **Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2005; 23(23):5314-5322.
- 11 Chatzistamou I, Schally AV, Varga JL, et al. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone and somatostatin analog RC-160 inhibit the growth of the OV-1063 human epithelial ovarian cancer cell line xenografted into nude mice.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(5):2144-2152.
- 12 Chatzistamou I, Schally AV, Varga JL, et al. **Inhibition of growth and reduction in tumorigenicity of UCI-107 ovarian cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide.** *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001; 127(11):645-652.
- 13 Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL. **Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(11):4947-4951.
- 14 Chen Z., Venkatesan, A. M., Dehnhardt, C. M., et al. **Synthesis and SAR of novel 4-morpholinopyrrolopyrimidine derivatives as potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors.** *J Med Chem.* 2010 Apr 22; 53(8):3169-82.
- 15 Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. **Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP.** *Science.* 1996; 273(5272):239-242.
- 16 Csernus VJ, Schally AV, Kiaris H, Armatis P. **Inhibition of growth, production of insulin-like growth factor-II (IGF-II), and expression of IGF-II mRNA of human cancer cell lines by antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(6):3098-3103.
- 17 de Graffenried LA, Friedrichs WE, Russell DH, Donzis EJ, Middleton AK, Silva JM, et al. **Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt activity.** *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (23):8059–67
- 18 Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. **Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence.** *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4429–4434.
- 19 Diermeier S, Schmidt-Bruecken E, Kubbies M, Kunz-Schughart LA, Brockhoff G. **Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines.** *Cell Prolif.* 2004; 37(2):195-206.

- ²⁰ Dittrich W, Göhde W. **Impulse fluorometry of single cells in suspension.** *Z Naturforsch B.* 1969 Mar; 24(3):360-1.
- ²¹ Ekim B, Magnuson B, Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Feener EP, Fingar DC. **mTOR kinase domain phosphorylation promotes mTORC1 signaling, cell growth, and cell cycle progression.** *Mol Cell Biol.* 2011 Jul; 31(14):2787-801. Epub 2011 May 16.
- ²² Fedele P, Calvani N, Marino A, Orlando L, Schiavone P, Quaranta A, Cinieri S. **Targeted agents to reverse resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancer: Where are we now and where are we going?** *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 Nov; 84(2):243-51. Epub 2012 Apr 10.
- ²³ Frankel LB, Lykkesfeldt AE, Hansen JB, Stenvang J. **Protein Kinase C alpha is a marker for antiestrogen resistance and is involved in the growth of tamoxifen resistant human breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 104(2):165-179.
- ²⁴ Frohman LA, Szabo M. **Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly.** *Prog Clin Biol Res.* 1981; 74:259-71.
- ²⁵ Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K et al. **Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival.** *Breast Cancer Res.* 2007; 9: R4.
- ²⁶ Galoian K, Temple HT, Galoyan A. **mTORC1 inhibition and ECM-cell adhesion-independent drug resistance via PI3K-AKT and PI3K-RAS-MAPK feedback loops.** *Tumour Biol.* 2012 Jun; 33(3):885-90. Epub 2012 Jan 14.
- ²⁷ Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. **G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells.** *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2004; 287(2):C281-291.
- ²⁸ Garcia-Fernandez MO, Schally AV, Varga JL, Groot K, Busto R. **The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and its receptor splice variants in human breast cancer lines; the evaluation of signaling mechanisms in the stimulation of cell proliferation.** *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 77(1): 15-26.
- ²⁹ Gaylinn BD, von Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO. **Assignment of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene (GHRHR) to 7p14 by in situ hybridization.** *Genomics.* 1994; 19(1): 193-195.

- ³⁰ Haffty BG, Yang Q, Reiss M et al. **Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer.** *J Clin Oncol.* 2006; 24: 5652–5657.
- ³¹ Halmos G, Schally AV, Varga JL, et al. **Human renal cell carcinoma expresses distinct binding sites for growth hormone-releasing hormone.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(19):10555-10560.
- ³² Hara K, Maruki Y, Long X, et al. **Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action.** *Cell.* 2002; 110(2):177-189.
- ³³ Havt A, Schally AV, Halmos G, Varga JL, Toller GL, Horvath JE, Szepeshazi K, Köster F, Kovitz K, Groot K, Zarandi M, Kanashiro CA. **The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 29; 102(48):17424-9. Epub 2005 Nov 18.
- ³⁴ Hay N, Sonenberg N. **Upstream and downstream of mTOR.** *Genes Dev.* 2004; 18(16):1926-1945.
- ³⁵ He X, Wang Y, Zhu J, Orloff M, Eng C. **Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling.** *Cancer Lett.* 2011 Feb 28; 301(2):168-76. Epub 2010 Dec 17.
- ³⁶ Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. **Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer.** *Oncologist.* 2011; 16(4):404-14. Epub 2011 Mar 15.
- ³⁷ Hicks DG, Short SM, Prescott NL et al. **Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR.** *Am J Surg Pathol.* 2006; 30: 1097–1104.
- ³⁸ Hohla F, Buchholz S, Schally AV, Seitz S, Rick FG, Szalontay L, Varga JL, Zarandi M, Halmos G, Vidaurre I, Krishan A, Kurtoglu M, Chandna S, Aigner E, Datz C. **GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells.** *Cell Cycle.* 2009 Oct 1; 8(19):3149-56. Epub 2009 Oct 3.
- ³⁹ Hohla F, Schally AV, Szepeshazi K, et al. **Synergistic inhibition of growth of lung carcinomas by antagonists of growth hormone-releasing hormone in combination with docetaxel.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(39):14513-14518.

- ⁴⁰ Hsu SM, Soban E. **Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry.** *J Histochem Cytochem.* 1982; 30(10); 1079-82.
- ⁴¹ Hwangbo W, Lee JH, Ahn S, Kim S, Park KH, Kim CH, Kim I. **EGFR Gene Amplification and Protein Expression in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast.** *Korean J Pathol.* 2013 Apr; 47(2):107-15..
- ⁴² Jungwirth A, Schally AV, Pinski J, Groot K, Armatis P, Halmos G. **Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits in vivo proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 27; 94(11):5810-3.
- ⁴³ Jungwirth A, Schally AV, Pinski J, Halmos G, Groot K, Armatis P, Vadillo-Buenfil M. **Inhibition of in vivo proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone.** *Br J Cancer.* 1997; 75(11):1585-92.
- ⁴⁴ Kahán Z, Arencibia JM, Csernus VJ, et al. **Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(2):582-589.
- ⁴⁵ Kahán Z, Varga JL, Schally AV, Rékási Z, Armatis P, Chatzistamou L, Czömpöly T, Halmos G. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice.** *Breast Cancer Res Treat.* 2000 Mar; 60(1):71-9.
- ⁴⁶ Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. **Epidemiology of breast cancer.** *Lancet Oncol.* 2001; 2(3): 133-40.
- ⁴⁷ Kiaris H, Chatzistamou I, Schally AV, et al. **Ligand-dependent and -independent effects of splice variant 1 of growth hormone-releasing hormone receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(16):9512-9517.
- ⁴⁸ Kiaris H, Schally AV, Busto R, et al. **Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(1):196-200.
- ⁴⁹ Kiaris H, Schally AV, Varga JL, Groot K, Armatis P. **Growth hormone-releasing hormone: an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21; 96(26):14894-8.

- ⁵⁰ Kim D, Sarbassov DD, Ali SM, et al. **GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR.** *Mol Cell.* 2003; 11(4):895-904.
- ⁵¹ Köster F, Engel JB, Schally AV, et al. **Triple-negative breast cancers express receptors for growth hormone-releasing hormone (GHRH) and respond to GHRH antagonists with growth inhibition.** *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 116(2):273-279.
- ⁵² Kovacs M, Kineman RD, Schally AV, Flerko B, Frohman LA. **Increase in mRNA concentrations of pituitary receptors for growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues after neonatal monosodium glutamate treatment.** *J Neuroendocrinol.* 2000; 12(4):335-341.
- ⁵³ Kubbies M, Hoehn H, Schindler D, Chen Y, Rabinovitch PS. **Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry: principles and applications.** In: **Flow Cytometry: Advanced Research and Clinical Application.** Volume II, Yen A (ed.), CRS-Press, Florida. p. 5-28, 1989.
- ⁵⁴ Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature.* 1970; 227; 680-685.
- ⁵⁵ Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.: **Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms;** Langversion 3.0, Aktualisierung 2012, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL
- ⁵⁶ Letsch M, Schally AV, Busto R, Bajo AM, Varga JL. **Growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonists inhibit the proliferation of androgen-dependent and -independent prostate cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4; 100(3):1250-5. Epub 2003 Jan 21.
- ⁵⁷ Liu LF, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP. **Mechanism of action of camptothecin.** *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 922:1-10.
- ⁵⁸ Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, et al. **Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control.** *Mol Cell.* 2002; 10(3):457-468.
- ⁵⁹ Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, et al. **RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model.** *Clin Cancer Res.* 2007; 13(14):4261-4270.

- ⁶⁰ Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. **Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Nov; 136(2):331-45. Epub 2012 Oct 17.
- ⁶¹ Morris GJ, Naidu S, Topham AK et al. **Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and end results database.** *Cancer.* 2007; 110: 876–884.
- ⁶² Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. **Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial.** *Lancet.* 2008; 372: 449–56.
- ⁶³ Nakane PK. **Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat.** *J Histochem Cytochem.* 1968; 16(9); 557-60.
- ⁶⁴ Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.** *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 5367–5374.
- ⁶⁵ Olsen DA, Bechmann T, Ostergaard B, Wamberg PA, Jakobsen EH, Brandslund I. **Increased concentrations of growth factors and activation of the EGFR system in breast cancer.** *Clin Chem Lab Med.* 2012 Oct 1; 50(10):1809-18.
- ⁶⁶ Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, et al. **Everolimus plus octreotide longacting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebocontrolled, phase 3 study.** *Lancet.* 2011; 378: 2005–12.
- ⁶⁷ Plonowski A, Schally AV, Letsch M, et al. **Inhibition of proliferation of PC-3 human prostate cancer by antagonists of growth hormone-releasing hormone: lack of correlation with the levels of serum IGF-I and expression of tumoral IGF-II and vascular endothelial growth factor.** *Prostate.* 2002; 52(3):173-182.
- ⁶⁸ Plonowski A, Schally AV, Busto R, Krupa M, Varga JL, Halmos G. **Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of GHRH receptors in human experimental prostate cancers.** *Peptides.* 2002; 23(6): 1127-1133.
- ⁶⁹ Pozsgai E, Schally AV, Hocsak E, Zarandi M, Rick F, Bellyei S. **The effect of a novel antagonist of growth hormone releasing hormone on cell proliferation**

- and on the key cell signaling pathways in nine different breast cancer cell lines.** *Int J Oncol.* 2011 Oct; 39(4):1025-32. Epub 2011 Jun 23.
- ⁷⁰ Radbruch A. (Hrsg.). **Flow cytometry and Cell Sorting.** Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York. 1. Aufl , 1997, Kap. I, S.7-27
- ⁷¹ Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. **Prognostic markers in triple-negative breast cancer.** *Cancer.* 2007; 109: 25-32.
- ⁷² Rameh, L. E. and Cantley, L. C. **The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function.** *J Biol Chem.* 1999 Mar 26; 274(13):8347-50.
- ⁷³ Reis-Filho JS, Tutt AN. **Triple negative tumours: a critical review.** *Histopathology.* 2008; 52(1): 108-18.
- ⁷⁴ Rekasi Z, Czompoly T, Schally AV, Halmos G. **Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(19):10561-10566.
- ⁷⁵ Révillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonnetterre J, Peyrat JP. **ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the biochemical features and prognosis.** *Ann Oncol.* 2008 Jan; 19(1):73-80. Epub 2007 Oct 24.
- ⁷⁶ Rick FG, Schally AV, Block NL, Nadji M, Szepeshazi K, Zarandi M, Vidaurre I, Perez R, Halmos G, Szalontay L. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) reduce prostate size in experimental benign prostatic hyperplasia.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 1; 108(9):3755-60. Epub 2011 Feb 14.
- ⁷⁷ Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A, Hengstschläger M. **Functional interaction of mTOR complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle.** *Hum Mol Genet.* 2009 Sep 1; 18(17):3298-310. Epub 2009 Jun 8.
- ⁷⁸ Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. **RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs.** *Cell.* 1994; 78(1):35-43.
- ⁷⁹ Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, Halmos G. **Front Hypothalamic hormones and cancer.** *Neuroendocrinol.* 2001 Oct; 22(4):248-91

- ⁸⁰ Schally AV, Varga JL. **Antagonistic Analogs of Growth Hormone-releasing Hormone: New Potential Antitumor Agents.** *Trends Endocrinol Metab.* 1999 Dec; 10(10):383-391.
- ⁸¹ Schulz S, Röcken C, Schulz S. **Immunocytochemical localisation of plasma membrane GHRH receptors in human tumours using a novel anti-peptide antibody.** *Eur J Cancer.* 2006 Sep; 42(14):2390-6. Epub 2006 Aug 14.
- ⁸² Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. **Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.** *Cancer Res.* 1988 Sep 1; 48(17):4827-33.
- ⁸³ Seitz S, Hohla F, Schally AV, et al. **Inhibition of estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines with a growth hormone-releasing hormone antagonist.** *Oncol Rep.* 2008; 20(5):1289-1294.
- ⁸⁴ Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, et al. **Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro.** *Cancer Res.* 1995; 55(9):1982-1988.
- ⁸⁵ Sun SY, Rosenberg LM, Wang X, Zhou Z, Yue P, Fu H, Khuri FR. **Activation of Akt and eIF4E Survival Pathways by Rapamycin-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Inhibition.** *Cancer Res.* 2005; 65(16):7052-8.
- ⁸⁶ Siriwardana G, Bradford A, Coy D, Zeitler P. **Autocrine/paracrine regulation of breast cancer cell proliferation by growth hormone releasing hormone via Ras, Raf, and mitogen-activated protein kinase.** *Mol Endocrinol.* 2006; 20(9): 2010-2019.
- ⁸⁷ Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 10869–10874.
- ⁸⁸ Statistisches Bundesamt/Robert-Koch-Institut: **Brustkrebs** Kapitel 1.2.6.3 [Gesundheit in Deutschland, 2006] http://www.hs-coburg.de/fileadmin/FB_S/Hammer/1_Gesundheitsbericht_2006_RKI.pdf
- ⁸⁹ Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A. **EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas.** *Virchows Arch.* 2012 Sep; 461(3):271-82. Epub 2012 Jul 25.
- ⁹⁰ Szepeshazi K, Schally AV, Armatas P, et al. **Antagonists of GHRH decrease production of GH and IGF-I in MXT mouse mammary cancers and inhibit tumor growth.** *Endocrinology.* 2001; 142(10):4371-4378.

- ⁹¹ Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, Armatis P, Halmos G, Herbert F, Szende B, Varga JL, Zarandi M. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit IGF-II production and growth of HT-29 human colon cancers.** *Br J Cancer*. 2000 May; 82(10):1724-31.
- ⁹² Szepeshazi K, Schally AV, Groot K, Armatis P, Hebert F, Halmos G. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) inhibit in vivo proliferation of experimental pancreatic cancers and decrease IGF-II levels in tumours.** *Eur J Cancer*. 2000 Jan; 36(1):128-36.
- ⁹³ Szereday Z, Schally AV, Varga JL, Kanashiro CA, Hebert F, Armatis P, Groot K, Szepeshazi K, Halmos G, Busto R. **Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the proliferation of experimental non-small cell lung carcinoma.** *Cancer Res*. 2003 Nov 15; 63(22):7913-9.
- ⁹⁴ Tang Y, Zhu L, Li Y, Ji J, Li J, Yuan F, Wang D, Chen W, Huang O, Chen X, Wu J, Shen K, Loo WT, Chow LW. **Overexpression of epithelial growth factor receptor (EGFR) predicts better response to neo-adjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer.** *J Transl Med*. 2012 Sep 19; 10 Suppl 1:S4. Epub 2012 Sep 19.
- ⁹⁵ Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR et al. **Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer.** *BMC Cancer*. 2007; 7: 134.
- ⁹⁶ Toi M, Tominaga T, Osaki A, Toge T. **Role of epidermal growth factor receptor expression in primary breast cancer: results of a biochemical study and an immunocytochemical study.** *Breast Cancer Res Treat*. 1994 Jan; 29(1):51-8.
- ⁹⁷ Towbin H, Gordon J. **Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook.** *J Immunol Methods*. 1984 Sep 4; 72(2):313-40.
- ⁹⁸ Tsutsui S, Kataoka A, Ohno S, Murakami S, Kinoshita J, Hachitanda Y. **Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer.** *Clin Cancer Res*. 2002 Nov; 8(11):3454-60.
- ⁹⁹ van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R et al. **Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.** *Am J Pathol* 2002; 161: 1991–1996.
- ¹⁰⁰ Varga JL, Schally AV, Csernus VJ, Zarándi M, Halmos G, Groot K, Rékási Z. **Synthesis and biological evaluation of antagonists of growth hormone-releasing hormone with high and protracted in vivo activities.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 19; 96(2):692-7.

- ¹⁰¹ Vivanco I, Sawyers CL. **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(7):489-501.
- ¹⁰² Walsh S, Flanagan L, Quinn C, Evoy D, McDermott EW, Pierce A, Duffy MJ. **mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors.** *Breast.* 2012 Apr; 21(2):178-82.
- ¹⁰³ Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. **Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism.** *Oncogene.* 2007; 26:1932-40.
- ¹⁰⁴ West KA, Castillo SS, Dennis PA. **Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance.** *Drug Resist Updat.* 2002 Dec; 5(6):234-48.
- ¹⁰⁵ Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. **Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory.** *Clin Chem.* 1979 Sep; 25(9):1531-46.
- ¹⁰⁶ Wu HM, Schally AV, Cheng JC, Zarandi M, Varga J, Leung PC. **Growth hormone-releasing hormone antagonist induces apoptosis of human endometrial cancer cells through PKC δ -mediated activation of p53/p21.** *Cancer Lett.* 2010 Dec 1; 298(1):16-25. Epub 2010 Jul 13.
- ¹⁰⁷ Yang XR, Sherman ME, Rimm DL et al. **Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(3): 439-443.
- ¹⁰⁸ Yi YW, Hong W, Kang HJ, Kim HJ, Zhao W, Wang A, Seong YS, Bae I. **Inhibition of the PI3K/AKT pathway potentiates cytotoxicity of EGFR kinase inhibitors in triple-negative breast cancer cells.** *J Cell Mol Med.* 2013 May; 17(5):648-56.
- ¹⁰⁹ Yonezawa K, Tokunaga C, Oshiro N, Yoshino K. **Raptor, a binding partner of target of rapamycin.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 313(2):437-441.
- ¹¹⁰ Yu K, Toral-Barza L, Discafani C, Zhang WG, Skotnicki J, Frost P, Gibbons JJ. **mTOR, a novel target in breast cancer: the effect of CCI-779, an mTOR inhibitor, in preclinical models of breast cancer.** *Endocr Relat Cancer.* 2001 Sep; 8(3):249-58.
- ¹¹¹ Yunokawa M, Koizumi F, Kitamura Y, Katanasaka Y, Okamoto N, Kodaira M, Yonemori K, Shimizu C, Ando M, Masutomi K, Yoshida T, Fujiwara Y, Tamura K. **Efficacy of everolimus, a novel mTOR inhibitor, against basal-like triple-negative breast cancer cells.** *Cancer Sci.* 2012 Sep; 103(9):1665-71. Epub 2012 Aug 1.

- ¹¹² Zhang Y, Zheng XF. **mTOR-independent 4E-BP1 phosphorylation is associated with cancer resistance to mTOR kinase inhibitors.** *Cell Cycle.* 2012 Feb 1; 11(3):594-603. Epub 2012 Feb 1.
- ¹¹³ Zhao L, Yano T, Osuga Y, Nakagawa S, Oishi H, Wada-Hiraike O, Tang X, Yano N, Kugu K, Schally AV, Taketani Y. **Cellular mechanisms of growth inhibition of human endometrial cancer cell line by an antagonist of growth hormone-releasing hormone.** *Int J Oncol.* 2008 Mar; 32(3):593-601.

7. SONSTIGES

Aus dieser Arbeit hervorgegangen:

F. Weber, S. Seitz, G. Brockhoff, O. Ortmann, S. Buchholz

Potenzierung der Wachstumsinhibition von Hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und SKBr3 durch Behandlung mit GHRH-Antagonist JMR-132 in Kombination mit mTOR-Inhibitor Rapamycin.

Posterbeitrag, 29. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie (2009)
(*nominiert für Posterpreis*)

8. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Olaf Ortmann für die freundliche Überlassung des Themas, welches in der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurde und die stets konstruktive Kritik und Unterstützung während der Umsetzung.

Ebenfalls zu tiefem Dank verpflichtet bin ich Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff, der mich in besonderem Maße sowohl in der Konzeption als auch in der methodischen und wissenschaftlichen Bewältigung der Aufgabe in äußerst kollegialer und freundschaftlicher Weise ge- und begleitet hat, zusammen mit seiner gesamten Arbeitsgruppe; hervorzuheben sind hier Elisabeth Schmidt-Brücken für die Einführung in die FACS-Analyse, Marietta Bock für die Unterstützung in Sachen Western Blot und Gerhard Piendl für sein kameradschaftliches Engagement in der Zellkultur und bei den XTT-Assays, sowie PD Dr. rer. nat. Simone Diermaier-Daucher für die Hilfe bei Auswertungen und inhaltlichen Fragestellungen.

Außerdem danke ich PD Dr. med. Stefan Buchholz und Dr. med. Stephan Seitz, die nicht nur die in dieser Arbeit verwendeten GHRH-Antagonisten akquiriert und in ihren Vorarbeiten die Grundlage für die vorliegenden Untersuchungen gelegt haben, sondern immer auch als Impulsgeber wichtig waren.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei Prof. Dr. med. Ferdinand Hofstädter und dem gesamten Team des Instituts für Pathologie, ohne dessen Räumlichkeiten und Unterstützung dieses Projekt nicht umzusetzen gewesen wäre.

Schließlich danke ich meiner Familie, die in allem stets Rückhalt und Motivation war, verständnisvoll und ehrlich interessiert.