

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

**Untersuchungen zu Antigen-spezifischen Behandlungen von Mammakarzinom-  
Zelllinien unter Berücksichtigung der HER4-Rezeptorexpression**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Benedikt Rath



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

**Untersuchungen zu Antigen-spezifischen Behandlungen von Mammakarzinom-  
Zelllinien unter Berücksichtigung der HER4-Rezeptorexpression**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Benedikt Rath

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Karl-Peter Ittner
Tag der mündlichen Prüfung:	12.08.2015

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	5
1 Einleitung .....	7
1.1 Das Mammakarzinom .....	7
1.1.1 Epidemiologie .....	7
1.1.2 Ätiopathogenese .....	7
1.2 Die ErbB-Rezeptorfamilie .....	9
1.2.1 Die Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie .....	10
1.2.2 Die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion .....	11
1.2.3 Die Sonderstellung von HER4 .....	13
1.2.4 Die ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Bedeutung für die Karzinogenese .....	15
1.3 Der Estrogenrezeptor .....	17
1.4 Target-spezifische Therapien .....	18
1.5 Targets der antigen-spezifischen Mammakarzinomtherapie .....	20
1.5.1 ER-targeting: Die endokrine Therapie beim ER-positiven Mammakarzinom .....	20
1.5.2 HER2-targeting: Das HER2/neu überexprimierende Mammakarzinom .....	21
1.5.3 HER4-targeting: Der monoklonale Antikörper Ab1479 .....	23
1.6 Zielsetzung .....	24
2 Material und Methoden .....	26
2.1 Materialien .....	26
2.1.1 Untersuchte Zelllinien .....	26
2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	27
2.1.3 Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren .....	27
2.1.4 DNA-Farbstoffe und Enzyme .....	27
2.1.5 Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (KITs) .....	27
2.1.6 Reagenzien und Chemikalien .....	27
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	28
2.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.9 Geräte .....	29
2.2. Methoden der Zellkultur .....	30
2.2.1 Die Standardzellkultur .....	30
2.2.2 Zellkultur und -Präparation für die Zellzahl- und SPF-Bestimmung .....	31
2.2.3 Zellkultur und -Präparation für die Messungen der Zellvitalität .....	32
2.2.4 Zellkultur und -Präparation für die Annexin-V-FITC-Messungen .....	34
2.3 Durchflusszytometrische Analysen .....	36
2.3.1 Theoretische Grundlagen .....	36

---

2.3.2	Das Durchflusszytometer FACS Canto II.....	37
2.3.3	Verwendete Farbstoffe.....	40
2.3.4	Datendarstellung und Verarbeitung.....	40
2.3.5	Der Zellzyklus.....	42
2.3.6	Die Bestimmung der S-Phase-Fraktion.....	43
2.3.7	Die Annexin-V-FITC-Messung.....	44
2.4	Messungen zur Bestimmung der Zellvitalität.....	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Etablierungsversuche zum Wachstumsverhalten der Zelllinie ZR.75.1 in der Zellkultur.....	49
3.2	Vergleichende Bestimmung der Zellzahlen und der S-Phase-Fractionen der Zelllinien ZR.75.1 und BT474.....	51
3.2.1	Ansprechen auf HER2-spezifische Reagenzien im Vergleich.....	51
3.2.2	Ansprechen auf ER-spezifische Reagenzien im Vergleich.....	56
3.3	XTT Cell Proliferation Assay zur vergleichenden Bestimmung der Zellvitalität unter verschiedenen target-spezifischen Therapien.....	60
3.4	Annexin V-FITC Messungen zum Ansprechen der Zelllinie ZR.75.1 auf HER2-, ER- und HER4-spezifische Reagenzien.....	63
4	Diskussion.....	66
4.1	Ansprechen der Zelllinien ZR.75.1 und BT474 auf target-spezifische Therapien in der statischen Zellzyklusanalyse.....	66
4.1.1	Ansprechen auf die Behandlung mit Lapatinib (Tyverb <sup>®</sup> ).....	66
4.1.2	Ansprechen auf die Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin <sup>®</sup> ).....	67
4.1.3	Ansprechen auf die Behandlung mit Pertuzumab (Perjeta <sup>®</sup> ).....	68
4.1.4	Ansprechen auf die Behandlung mit Tamoxifen.....	68
4.2	Kritische Betrachtung der gewonnenen Daten zur Zellvitalität.....	70
4.2.1	Überblick.....	70
4.2.2	Limitationen des XTT Assays.....	70
4.2.3	Die Rolle des monoklonalen Antikörpers Ab1479.....	71
4.3	Beurteilung der Daten zum Zelltod.....	73
5	Zusammenfassung.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	76
7	Eidesstattliche Erklärung.....	83
8	Danksagung.....	84
9	Anhang.....	85

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom, eine maligne Neoplasie der Brustdrüse, ist mit einem prozentualen Anteil von 32,1% an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland, das mit Abstand häufigste Tumorleiden der Frau. Alleine in Deutschland erkrankten im Jahr 2008 71.660 (123,1 pro 100.000) Frauen neu an Brustkrebs und 17.209 (24,6 pro 100.000) Frauen starben an diesem Leiden. Damit ist das Mammakarzinom auch die häufigste krebsbedingte Todesursache der Frau (siehe auch Abbildung 10.1: Die Epidemiologie des Mammakarzinoms im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen in Deutschland 2008). Eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und etwa jede vierte betroffene Frau ist bei Diagnosestellung noch keine 55 Jahre alt, jede zehnte sogar noch jünger als 45 Jahre. Die ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung überlebten im Jahr 2008 durchschnittlich 78% der Frauen. Während die Inzidenzrate in den letzten Jahren - nicht zuletzt auch aufgrund besserer Vorsorge- und Früherkennungsuntersuchungen - stetig angestiegen ist, ist die Mortalitätsrate, vor allem durch Fortschritte in der Therapie rückläufig. So erkrankten heutzutage zwar doppelt so viele Frauen an Brustkrebs wie noch im Jahr 1980, aber trotz der gestiegenen Erkrankungszahlen sterben heutzutage weniger Frauen an dieser Erkrankung als noch vor 20 Jahren. [1]

### 1.1.2 Ätiopathogenese

Das Mammakarzinom ist eine maligne Neoplasie der Brustdrüse, die entweder vom Epithel der Drüsenlobuli (lobulär, 10 - 15%) oder der Milchgänge (duktal, 85 – 90%) ausgeht. Es ist

#### Risikofaktoren

Fortgeschrittenes Lebensalter Fleisch- und fettreiche Ernährung Adipositas (v.a. postmenopausal) Alkohol (> 20 g Ethanol/Tag) Genetische Disposition (BRCA1/BRCA2) Kontralaterales Mammakarzinom Frühe Menarche, späte Menopause Estrogenbehandlung in der Postmenopause Nulliparität Mastopathie
--

**Tab. 1.1: Die wichtigsten Risikofaktoren für das Mammakarzinom; nach [2]**

zwar eine Reihe verschiedener Risikofaktoren (Tab. 1.1) für die Entstehung eines Mammakarzinoms bekannt, dennoch ist die genaue Ätiologie noch weitgehend ungeklärt [2].

Dem invasiven Mammakarzinom gehen immer intraepitheliale Vorstufen voraus. Diese Präkanzerosen werden je nach Entität als LCIS (lobuläres Carcinoma in

situ) oder DCIS (duktales Carcinoma in situ) bezeichnet und sind vor allem dadurch gekennzeichnet, dass sie auf das Epithel begrenzt sind und die Basalmembran nicht durchbrechen [2,3]. Das LCIS ist mit einem Anteil von 10 - 15% weitaus seltener als das DCIS, es tritt häufig multizentrisch und bilateral auf. Außerdem entartet das LCIS nur selten karzinomatös und mit einer großen Latenzzeit [3].

Das DCIS dagegen stellt eine echte Präkanzerose dar und tritt mit unterschiedlicher Differenzierung auf (papillär-solid, mit/ohne Nekrose), wobei der solide Typ mit zentralen Nekrosen und degenerativen Verkalkungen (Mikrokalk) am häufigsten ist. Die Latenzzeit bis zur Entstehung eines invasiven Karzinoms liegt oft bei unter 10 Jahren [2,3]. Die häufigste Form des Mammakarzinoms ist dementsprechend das invasiv duktales Mammakarzinom. Es findet sich vor allem im oberen äußeren Quadranten (55%) mit leichter Bevorzugung der linken Brust (53% vs. 47%) [2].

Die Metastasierung kann bereits relativ früh erfolgen, wobei die Wahrscheinlichkeit dafür in direktem Zusammenhang zur Größe des Primärtumors steht. Die Tumorzellen breiten sich zunächst entlang der Lymphbahnen aus, so dass die ersten Metastasen vor allem in den axillären, aber auch in den supraklavikulären oder retrosternalen Lymphknoten gefunden werden [3]. Durch hämatogene Streuung kommt es schließlich zur Bildung von Fernmetastasen, die in den folgenden Organen mit absteigender Häufigkeit auftreten: Knochen, Pleura, Lunge, Leber und Gehirn [2,3].

Der Befall axillärer Lymphknoten stellt - neben Alter, Tumorgröße, histologischem Subtyp, Grading und Rezeptorstatus - den wichtigsten prognostischen Faktor des primären Mammakarzinoms dar. Während das Mammakarzinom ohne Fernmetastasen grundsätzlich heilbar ist, kann es nach distaler Metastasierung mit hämatogener Aussaat nicht mehr kurativ behandelt werden. [3]

## 1.2 Die ErbB-Rezeptorfamilie

Für die Regulation von Zellproliferation und Zelltod spielen Tyrosinkinase sowohl in der gesunden, als auch in der entarteten Zelle eine ganz entscheidende Rolle. Sie vermitteln die Signale verschiedenster Wachstumsfaktoren an die Zelle. Dabei wird unterschieden zwischen Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen. Im Gegensatz zu den Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen handelt es sich bei den Rezeptortyrosinkinasen um Transmembranrezeptoren, deren intrazellulärer Teil selbst Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Wenn ein Ligand an die extrazelluläre Domäne einer RTK bindet, kommt es zunächst zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Aktivierung der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase. Dies führt in einem weiteren Schritt der Signaltransduktion zur Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne des Rezeptors, zur Phosphorylierung weiterer Tyrosinreste anderer Targetproteine und damit wiederum zur Aktivierung weiterer, nachgeschalteter Signalkaskaden. [4,5]

Innerhalb der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen werden drei Typen unterschieden, wobei die Familie der ErbB-Rezeptoren zu den Typ-I-RTKs gezählt werden. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Wachstum und Differenzierung menschlicher Mammakarzinom-Zellen [6] und sollen deshalb im Folgenden genauer vorgestellt werden:

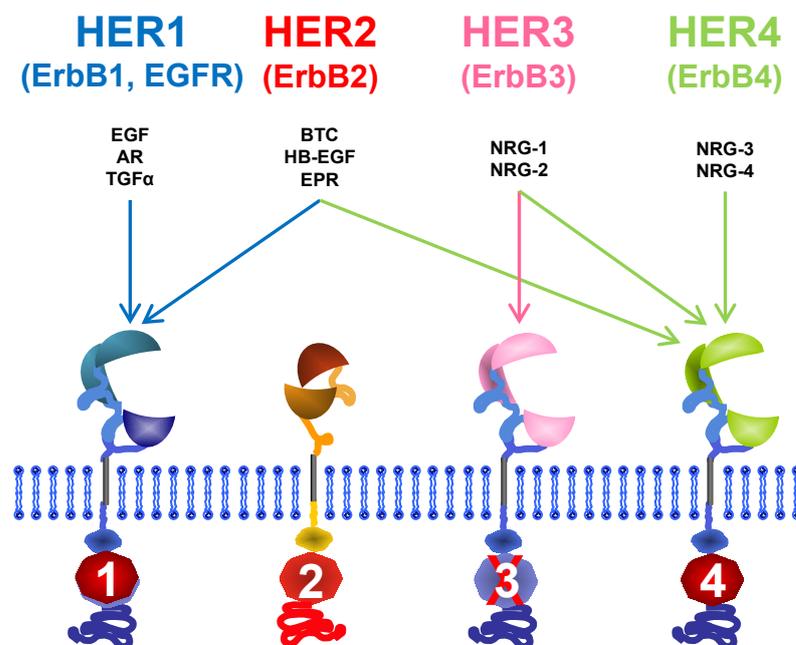


Abb. 1.1: Die Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Liganden; nach [7]

Die Familie der ErbB-Rezeptoren besteht aus den vier Mitgliedern der Humanen Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren 1-4 (HER1-4), wobei HER1 auch unter dem Namen Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bekannt ist. In Abb. 1.1 sind die vier Rezeptoren und ihre jeweiligen Liganden schematisch dargestellt. Sie werden sowohl auf epithelialen, als auch auf mesenchymalen und neuronalen Zellen exprimiert. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung vieler verschiedener Organsysteme [8] und sind beispielsweise auch an den Veränderungen der Brustdrüse während Pubertät und Schwangerschaft beteiligt.

Die ErbB-Rezeptoren bestehen als Typ-I-RTKs aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, die über eine einzelne hydrophobe Transmembrandomäne mit der intrazellulären Tyrosinkinase verbunden ist [7]. Die extrazelluläre Domäne besteht dabei jeweils aus den vier Untereinheiten I-IV. Während die Untereinheiten I und III eine wichtige Rolle für die Bindung des Liganden spielen, vermittelt die Untereinheit II die Homo- beziehungsweise Heterodimerisierung des ligandengebunden und dadurch aktivierten Rezeptors. Im inaktiven Zustand wird diese durch intramolekulare Wechselwirkungen mit der Untereinheit IV blockiert [9].

Besonderheiten ergeben sich innerhalb der ErbB-Rezeptorfamilie für die beiden Vertreter HER2 und HER3. Die Struktur der extrazellulären Domäne von HER2 unterscheidet sich deutlich von den anderen Rezeptoren der ErbB-Familie. Die Konformation von HER2 entspricht - auf Grund einer fehlenden Interaktion zwischen den Untereinheiten II und IV - der Liganden-aktivierten Konformation der anderen Rezeptoren [10,11]. Dies führt zum einen dazu, dass HER2 der bevorzugte Partner für die Heterodimerisierung innerhalb der ErbB-Rezeptorfamilie ist, zum anderen erklärt es auch, warum - wie aus Abb. 1.1 ersichtlich wird - für HER2 kein Ligand bekannt ist [12,13].

Für HER3 sind zwar Liganden bekannt (NRG-1 und NRG-2, siehe Abb. 1.1), aber HER3 besitzt als einziges Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie keine eigene Kinaseaktivität und ist deshalb immer auf einen Partner mit Tyrosinkinaseaktivität zur Heterodimerisierung angewiesen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass gerade durch Heterodimerisierung dieser beiden Rezeptoren - HER2 und HER3 - das stärkste mitogene Signal erzeugt wird [14].

### **1.2.1 Die Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie**

In Abb. 1.1 werden die zehn bekannten Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Spezifität dargestellt. Während der *Epidermal growth factor* (EGF), *Amphiregulin* (AR) und

der *Transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF  $\alpha$ ) spezifisch an EGFR binden, können *Betacellulin* (BTC), *Heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) und *Epirugulin* (EPR) sowohl an EGFR als auch an HER4 binden. Auch die *Neureguline* (NRG) weisen eine unterschiedliche Spezifität zu den Rezeptoren auf: Während NRG-1 und NRG-2 an HER3 und HER4 binden, sind NRG-3 und NRG-4 spezifisch für HER4 [7]. Alle Liganden sind durch eine EGF-ähnliche Domäne, die aus drei durch Disulfidbrücken stabilisierten Schleifen besteht, charakterisiert [15]. Außerdem werden alle Liganden der EGF-Familie zunächst als transmembrane Vorläuferstruktur gebildet und auf der Zelloberfläche exprimiert. Erst in einem weiteren Schritt folgt dann die Freisetzung des Liganden: Durch das sogenannte *Ektodomain-Shedding* wird der lösliche Ligand durch Metalloproteasen von der Zelloberfläche freigesetzt und ins Interstitium entlassen [16].

### 1.2.2 Die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion

Wie oben bereits allgemein für Rezeptortyrosinkinasen beschrieben, kommt es auch bei der ErbB-Rezeptorfamilie durch Ligandenbindung zur Rezeptor Homo- beziehungsweise Heterodimerisierung und anschließend zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten des sogenannten „activation loops“ in Trans-Stellung. Dadurch wird die Tyrosinkinaseaktivität gesteigert und es werden weitere Tyrosinreste in der C-terminalen Kette des Rezeptors phosphoryliert [17].

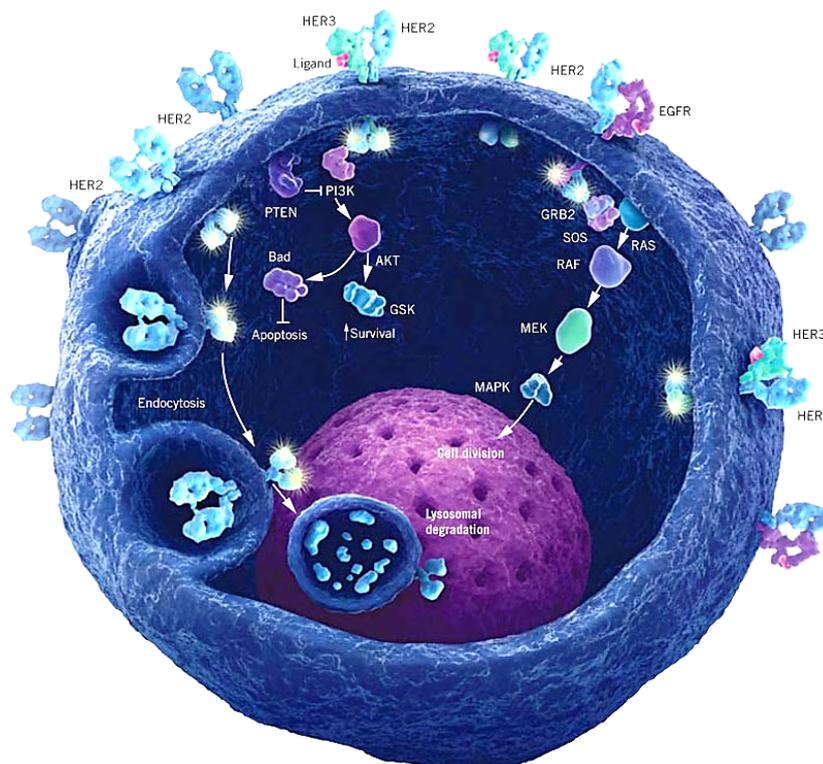


Abb. 1.2: Die Signaltransduktion durch die ErbB-Rezeptorfamilie [18]

Durch Bindung und Aktivierung von Signalmolekülen, die SH2 (Src homology 2) und PTB (Phosphotyrosine-binding) Domänen enthalten, können schließlich verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert werden [19]. Welche Signalkaskaden dabei in welchem Ausmaß aktiviert werden, wird durch eine Reihe von Faktoren bestimmt. Während jeder Rezeptor eine spezifische Auswahl an Signalmolekülen binden kann, spielt auch der jeweilige Dimerisierungspartner eine wichtige Rolle. Unterschiedliche Konstellationen der Rezeptordimerisierung führen auch zu unterschiedlichen Mustern der Transphosphorylierung [20]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Rezeptor-Heterodimerisierung grundsätzlich zu stärkeren Effekten führt, als die Homodimerisierung [21]. Durch die Beeinflussung des Phosphorylierungsmusters entscheidet schließlich auch die Art des gebundenen Liganden darüber, welche Signalmoleküle rekrutiert und welche Signalkaskaden in der Folge aktiviert werden [22]. Die beiden wichtigsten durch die ErbB-Familie induzierten Signalkaskaden, nämlich der *Ras-mitogen-activated proteine kinase* (Ras/MAP-K) Signalweg und der *Phosphatidylinositol-3-Kinase – Proteinkinase B* (PI3-K/Akt) Signalweg sollen nun im Folgenden kurz dargestellt werden:

### **Aktivierung der Ras/MAP-K Singalkaskade**

Es sind eine Reihe verschiedener sogenannter *mitogen-aktivierter-Kinasen* (MAP-Ks) bekannt. Zu ihnen gehören zum Beispiel die *extrazellulär regulierten Kinasen* (Erks) 1 und 2, p38 und Erk 5. Die Aktivierung dieser Serin- und Threonin-Kinasen dient der Signalübertragung von der Zelloberfläche in den Zellkern. Nach der Bindung von GRB2 (Growth factor receptor bound protein 2) an den phosphorylierten Rezeptor, kann mittels dem Faktor SOS das membrangebundene G-Protein Ras aktiviert werden. In einer Kaskade werden dann nacheinander die Proteine Raf, Mek1 und schließlich Erk 1/2 phosphoryliert. Die MAP-Kinasen wiederum aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren die schlussendlich in den Nukleus wandern und dort die Expression verschiedener Gene induzieren und so zum Beispiel zur Zellteilung führen. [23]

### **Aktivierung der PI3-K/Akt Signalkaskade**

Ein weiterer durch die ErbB-Rezeptorfamilie vermittelter Effekt ist die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase, die den second messenger PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> phosphoryliert. HER3 weist sechs Bindungsstellen für PI3-K auf und ist deshalb in der Lage dieses Enzym direkt zu aktivieren [24], während EGFR dafür auf das Adapterprotein Gab1 angewiesen ist. In den weiteren Schritten der Signalkaskade wird die *Proteinkinase B* (PKB oder Akt) durch PDK1

phosphoryliert und aktiviert, die mittels des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und durch Phosphorylierung von Bad antiapoptotische Effekte auf die Zelle hat. [23]

Neben diesen beiden oben beschriebenen gut untersuchten Signalwegen, besitzen die Rezeptoren der ErbB-Familie eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten der Signalübertragung auf die Zelle. Genannt werden sollen in diesem Zusammenhang die Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-src, die direkte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und STAT5, sowie der *Phospholipase C* – *Proteinkinase C* (PLC-PKC) Signalweg. Die dadurch auf die Zelle übertragenen Effekte sind sehr vielfältig und beinhalten unter anderem anti-apoptotische, mitogene und proliferative Signale.

### 1.2.3 Die Sonderstellung von HER4

Im Rahmen der Aktivierung und der Signaltransduktion nimmt HER4 als Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie eine Sonderstellung ein. Zwar können auch durch den ligandengebundenen HER4 die oben bereits beschriebenen Signalkaskaden PI3-K/Akt und Ras/MAP-K aktiviert werden, aber darüber hinaus kann HER4 auch unmittelbar in das Geschehen innerhalb des Nukleus eingreifen.

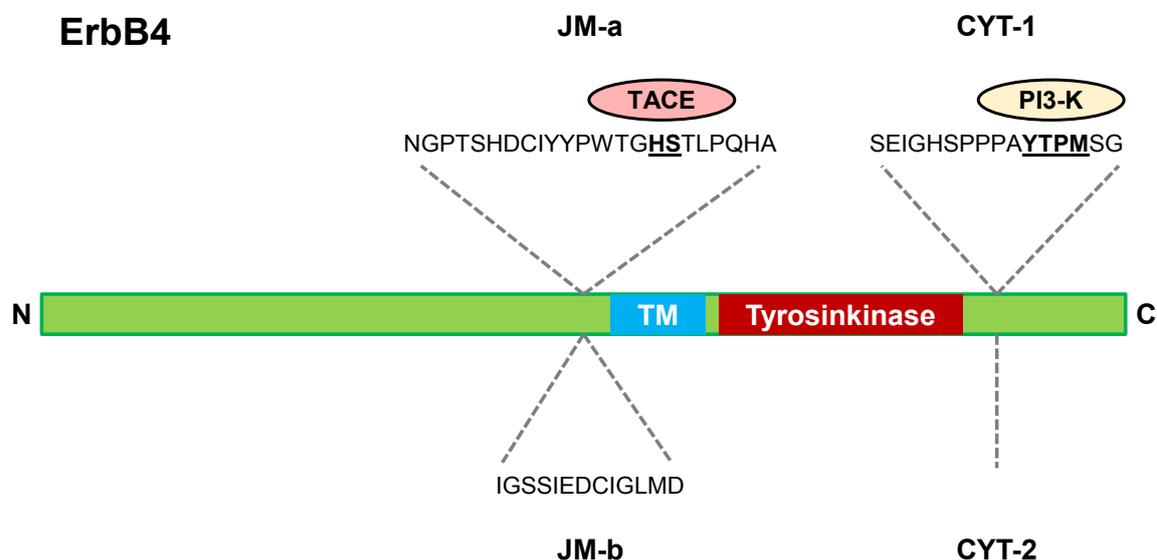


Abb. 1.2: Die vier Isoformen von ErbB4; nach [25]

ErbB4 ist ein 180 kDa großes transmembranöses Glycoprotein, das in vier verschiedenen Isoformen vorliegen kann. Diese entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich entweder in ihrer juxtamembranen (JM) oder in ihrer zytoplasmatischen (CYT) Domäne. So enthält die JM-a Isoform, im Gegensatz zu JM-b, einen Angriffspunkt für das Tumor necrosis

factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE). CYT-1 besitzt im Vergleich zu CYT-2 eine zusätzliche Sequenz aus 16 Aminosäuren, die unter anderem eine Bindungsstelle für PI3-K enthält [25]. Die Sonderstellung von ErbB4 liegt darin begründet, dass dieser Rezeptor als einziges Mitglied der ErbB-Rezeptorfamilie einer regulierten Proteolyse unterliegt, wodurch eine lösliche intrazelluläre Domäne (ICD) freigesetzt wird, die unter anderem in den Nukleus wandern und dort Prozesse in Gang setzen kann, die schließlich zur Proliferation oder Differenzierung der Zelle führen [26].

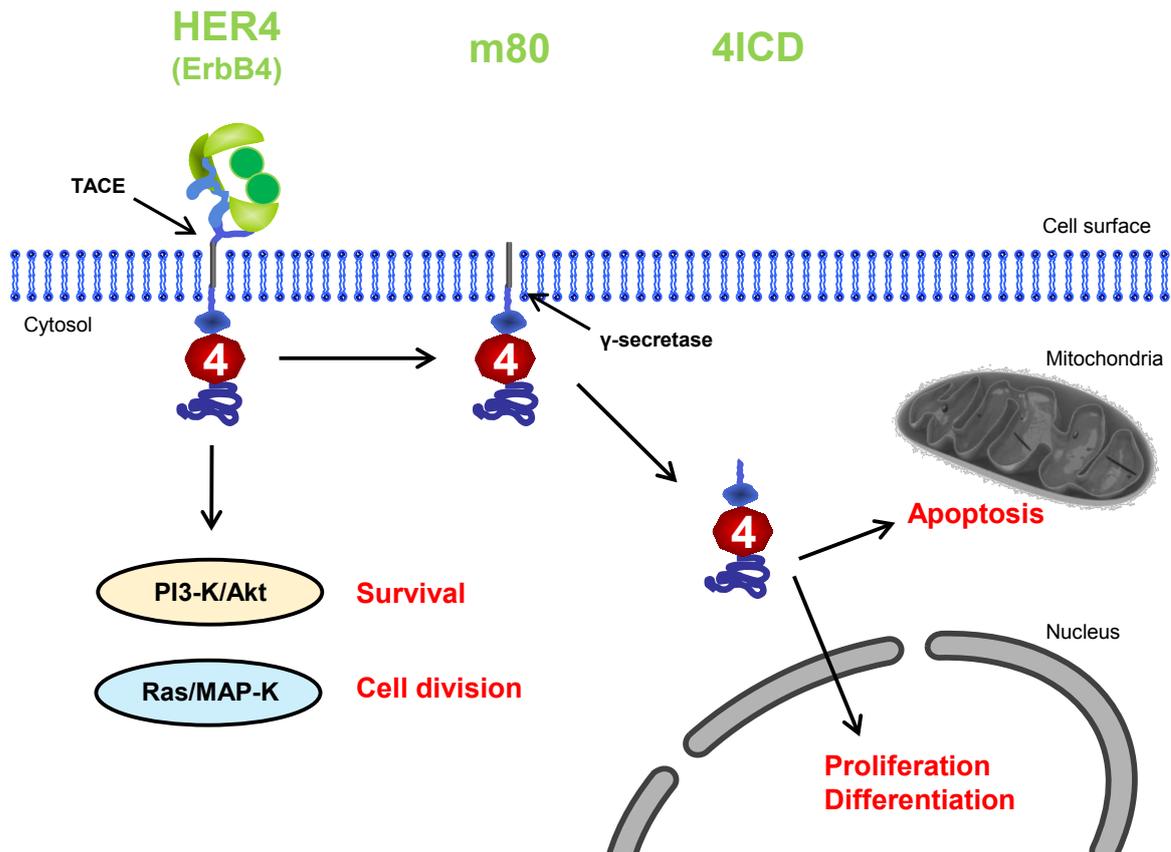


Abb. 1.3: Aktivierung und proteolytische Prozessierung von ErbB4; nach [25-27]

Durch TACE, ein Mitglied der Familie der ADAM Metalloproteasen, wird von HER4 JM-a proteolytisch ein 120 kDa Fragment der extrazellulären Domäne abgespalten und ins Interstitium freigesetzt. Dieser Vorgang wird als Ektodomain-*Shedding* bezeichnet. Das übriggebliebene 80 kDa Spaltprodukt (m80) behält als transmembranes Peptid seine Kinaseaktivität. Dieser Vorgang wird unter anderem durch Neureguline stimuliert, findet aber in geringem Umfang auch unabhängig von stimulierenden Faktoren statt. M80 kann in einem weiteren Schritt durch die Protease  $\gamma$ Secretase weiter aufgespalten werden, wodurch die intrazelluläre Domäne von HER4 (4ICD) freigesetzt und ins Zytosol entlassen wird [28]. Die zellulären Antworten auf 4ICD sind sehr vielfältig und umfassen Aktivierung der

Transkription, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose [26]. So kann 4ICD zum Beispiel über eine BH3-Domäne an den Mitochondrien Apoptose induzieren, oder 4ICD wird in den Nukleus transloziert und kann dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie STAT5 oder dem Estrogen-response-element (ERE) interagieren und so die Zelle zur Differenzierung oder Proliferation anregen [25,27].

#### **1.2.4 Die ErbB-Rezeptorfamilie und ihre Bedeutung für die Karzinogenese**

Eine fehlerhafte Regulierung dieses komplexen Netzwerkes mit seinen vielen, zum Teil über positive und negative Regelkreise gesteuerten Signalkaskaden, können massive Auswirkungen auf den Zellverbund haben und durch Vorgänge wie Proliferation, Migration, Angiogenese und Apoptoseresistenz zur malignen Entartung von Zellen und zur Entstehung von Neoplasien führen [7]. Zu einer solchen Entgleisung kann es einerseits durch ein Überangebot an Liganden - also vor allem durch eine autokrine oder parakrine Überproduktion von Wachstumsfaktoren - kommen, andererseits aber auch durch eine übersteigerte Aktivität der Rezeptoren selbst. Mögliche Ursachen dafür wären eine Rezeptorüberexpression, bedingt zum Beispiel durch eine Genamplifikation, oder die konstitutive Aktivierung eines Rezeptors durch eine Mutation.

EGFR war die erste RTK, die direkt mit der Entstehung menschlicher Malignome in Verbindung gebracht werden konnte [9]. In einer Vielzahl maligner Neoplasien, wie zum Beispiel in Karzinomen der Brust und der Lunge, lässt sich eine ErbB1-Überexpression nachweisen. Eine Mutation von ErbB1 mit konstitutiver Kinaseaktivität (Typ III) kommt vor allem in malignen Gliomen, aber auch in anderen menschlichen Tumoren vor [29].

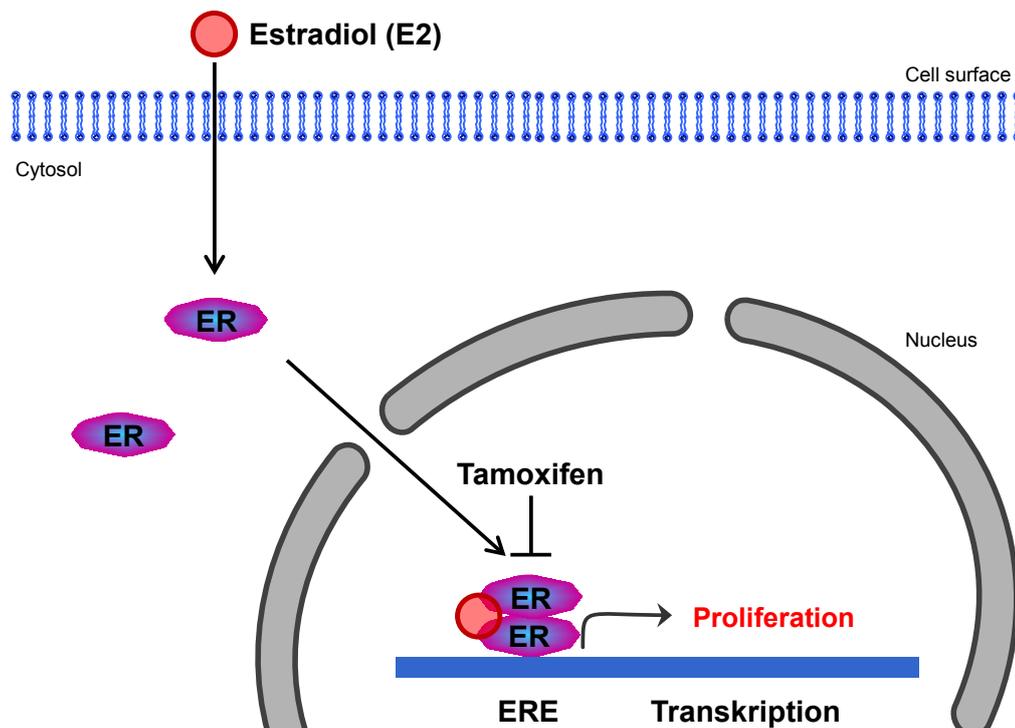
Am besten untersucht ist bisher allerdings die Bedeutung der HER2-Überexpression. Sie ist in den meisten Fällen auf Genamplifikation zurückzuführen und wird in vielen verschiedenen Typen menschlicher Karzinome entdeckt, wie zum Beispiel in 20% - 30% der Mamma- und Ovarialkarzinome [7,29]. Es wird vermutet, dass hohe Konzentrationen dieses Rezeptors - nicht zuletzt auch auf Grund der oben beschriebenen Besonderheiten - zur spontanen Dimerisierung und so zur konstitutiven Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden führen [29]. So konnte für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass eine HER2-Überexpression mit gesteigerter Zellproliferation, gesteigerter Zell-Motilität, höherer Tumordinvasion, regionaler Tumorprogression, distaler Metastasierung, beschleunigter Angiogenese und gehemmter Apoptose assoziiert ist [30].

Neben der gut untersuchten Bedeutung der EGFR und HER2 Überexpression rücken nun auch die beiden Rezeptoren HER3 und HER4 mehr und mehr ins Interesse. Neuere Daten

legen nahe, dass auch sie einen Einfluss auf die Prognose von Krebserkrankung haben und möglicherweise auch eine Rolle bei der Entstehung von Resistenzen gegen verschiedene Anti-Tumor-Therapien spielen [31]. Doch während eine HER2-Überexpression zum Beispiel beim Mammakarzinom eindeutig als negativer prognostischer Faktor identifiziert werden konnte, wird insbesondere die Bedeutung von HER4 weiterhin kontrovers diskutiert [25]. Eine mögliche Erklärung dafür sind die oben bereits vorgestellten unterschiedlichen Isoformen in denen HER4 vorliegen kann. So ist beispielsweise der intrazelluläre Nachweis von HER4 im Nukleus (4ICD aus der Isoform JM-a) mit einer schlechteren Prognose assoziiert als der alleinige Nachweis von HER4 auf der Zelloberfläche [32].

### 1.3 Der Estrogenrezeptor

Der Estrogenrezeptor (ER) wirkt als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört als Steroidhormonrezeptor zur Familie der nuklearen Hormonrezeptoren. Es werden die beiden Subtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  unterschieden, die je nach Gewebe in unterschiedlichem Verhältnis zueinander vorkommen [33].



**Abb. 1.4:** Die Liganden-abhängige Aktivierung des Estrogenrezeptors, nach [34]

Wie bei anderen Steroidhormonrezeptoren kommt es auch beim ER nach Ligandenbindung zunächst zur Aktivierung und Dimerisierung der Rezeptoren. Dieses Dimer wandert dann in den Zellkern und bindet dort spezifisch an distale Promotorelemente (Enhancer oder Silencer) der DNA, ein sogenanntes estrogen response element (ERE). Auf diese Weise wird durch den ER im Zusammenspiel mit verschiedenen Ko-Regulatoren (Ko-Aktivatoren und Ko-Repressoren) die Transkription bestimmter Gene reguliert und die Zelle so zum Beispiel zur Proliferation angeregt [33,34].

Es sind verschiedene Liganden des ER bekannt, die gemeinsam zur Gruppe der Estrogene zusammengefasst werden. Das wirksamste Estrogen ist das 17 $\beta$ -Estradiol (E2), das unter Katalyse der Aromatase aus Testosteron entsteht. Durch Einführung einer weiteren Hydroxylgruppe entsteht das Estratriol (16 $\alpha$ -Hydroxy-Estradiol, E3), das nur 1/10 der Aktivität von Estradiol besitzt und das häufigste Derivat im Urin darstellt. Estron entsteht hingegen aus Androstendion und besitzt 1/3 der Aktivität von Estradiol. [4]

## 1.4 Target-spezifische Therapien

Neben Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den entwickelten Ländern der Welt. Im Jahr 2008 starben alleine in Deutschland 215.440 Menschen an Krebs [1]. Doch während die Inzidenz der Krebserkrankungen in den letzten Jahren kontinuierlich anstieg, blieb die Mortalitätsrate vergleichsweise konstant. Diese Tatsache ist nicht zuletzt auch der intensiven medizinischen und molekularbiologischen Forschung auf diesem Gebiet zu verdanken. Zu den großen medizinischen Errungenschaften der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts gehört auch die Entdeckung und Entwicklung der zytotoxischen Chemotherapie, doch die Möglichkeiten dieser klassischen Krebstherapie sind begrenzt. Der therapeutische Index einer solchen Therapie ist, gerade bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung, leider oft sehr gering: Viele Tumore sprechen nur teilweise oder unbefriedigend kurz darauf an, während die Nebenwirkungen für den Patienten in den meisten Fällen enorm sind. Die möglichen Nebenwirkungen einer solchen zytotoxischen Chemotherapie umfassen neben den klassischen Effekten wie Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall auch eine Schwächung des Immunsystems, Fertilitätsstörungen, Spätfolgen durch die Neuro- und Kardiotoxizität mancher Substanzen, bis hin zu dem Risiko der Entstehung von Zweitmalignomen. Die Ursache für diese vielfältigen unerwünschten Effekte liegt begründet in dem Wirkprinzip der klassischen Chemotherapeutika: Sie wirken nicht gezielt gegen das Krebsgewebe und die entarteten Zellen, sondern sie schädigen und zerstören allgemein sich schnell und häufig teilende Zellen im Körper des Patienten.

Der Trend in der Erforschung von Krebserkrankungen und möglicher Therapiekonzepte geht deshalb heutzutage, wie in vielen anderen Fachbereichen auch, in eine andere Richtung. Ziel ist es, zu verstehen, welche Veränderungen auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zur Karzinogenese führen, welche Besonderheiten die malignen Zellen aufweisen und wie diese zielgerichtet therapiert werden können. Das Ergebnis sind sogenannte target-spezifische Therapien, die direkt und gezielt gegen das entartete Gewebe gerichtet sind und deshalb zu geringeren Nebenwirkungen bei den Patienten führen sollen. Eine große Rolle spielen dabei bisher vor allem Medikamente, die entweder aus monoklonalen Antikörpern (Endung auf -mab) oder aus niedermolekularen synthetischen Molekülen, sogenannten small molecules (Endung auf -nib), bestehen. Während die monoklonalen Antikörper vor allem gegen Rezeptoren auf der Zelloberfläche gerichtet sind, greifen die small molecules, zum Beispiel

als spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren, direkt in unterschiedliche Stoffwechselwege der malignen Zelle ein.

Die Erwartungen an die Entwicklung neuer und die Weiterentwicklung bereits bekannter targeted-therapies gerade in der onkologischen Forschung sind sehr hoch. Doch auch deren Erfolg wird von einer Reihe verschiedener Faktoren limitiert. So ist es zum einen insbesondere bei soliden Tumoren bisher häufig nicht möglich eindeutige molekulare Marker als Ursache für die Karzinogenese und damit auch als Ziel für eine mögliche target-spezifische Therapie zu identifizieren, zum anderen wird zunehmend auch bei den target-spezifischen Therapien die Entwicklung von Resistenzen beobachtet. [35]

Eine wesentliche Ursache für diese Resistenzen liegt im sogenannten „*Cross-signaling*“. Das bedeutet, dass bei gezielter Inhibition eines Signalweges von der betroffenen Zelle alternative Signalwege rekrutiert und die Inhibition so umgangen werden kann. Es werden drei Ebenen des *Cross-signaling* unterschieden: Die Rezeptorebene (z.B. HER 1-4, ER), die Mediatorebene (z.B. Ras/MAP-K, PI3-K/Akt Signalkaskade) und die Effektorebene (z.B. mTOR, FOXO3a) [36].

Aufgrund der Relevanz für die hier vorliegende Arbeit wird an dieser Stelle noch etwas genauer auf das *Cross-signaling* auf Rezeptorebene eingegangen. So wurde beispielsweise für das HER2-positive Mammakarzinom gezeigt, dass u. a. durch Hochregulation von EGFR Resistenzen gegenüber HER2-spezifischen Therapien entstehen können [37,38]. Aber nicht nur innerhalb der HER-Rezeptorfamilie wird *Cross-signaling* beobachtet, sondern auch zwischen den ErbB-Rezeptoren und dem Estrogenrezeptor: Durch HER2-Überexpression können Mammakarzinom-Zellen zu einem Estrogen-unabhängigen Wachstum gebracht werden, die in der Folge sowohl gegen Wachstumsstimulation durch Estrogene als auch Wachstumsinhibition durch Anti-Estrogene resistent sind [39]. Umgekehrt steht den Mammakarzinom-Zellen durch Hochregulation des ER unter HER2-spezifischer Therapie ein weiterer sehr wirksamer Resistenzmechanismus zur Verfügung [40,41]. Eine Sonderrolle bei dieser Form des *Cross-signaling* zwischen den ErbB- und dem ER nimmt dabei HER4 ein: Die lösliche, intrazelluläre Domäne (4ICD) der HER4 JM-a Isoform ist - wie oben bereits beschrieben - in der Lage im Nukleus direkt mit dem ER zu interagieren und über ein sogenanntes *estrogen response element* (ERE) die Transkription und Zellproliferation anzuregen [32].

## 1.5 Targets der antigen-spezifischen Mammakarzinomtherapie

Die primäre Therapie beim Mammakarzinom besteht in der Operation. Für die adjuvante Behandlung stehen neben Bestrahlung und zytotoxischer Mono- oder Polychemotherapie auch verschiedene Möglichkeiten der antigen-spezifischen oder auch target-spezifischen Therapie zur Verfügung. Dazu gehören die bereits zugelassenen Therapieoptionen der endokrinen Therapie mit Tamoxifen, der Immuntherapie mit Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), sowie der Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>). Ein weiterer Antikörper, Trastuzumab (Perjeta<sup>®</sup>) befindet sich noch in der klinischen Testphase. Diese antigen-spezifischen Therapien, ihre Funktion und ihre Einsatzbereiche sollen im Folgenden genauer vorgestellt werden.

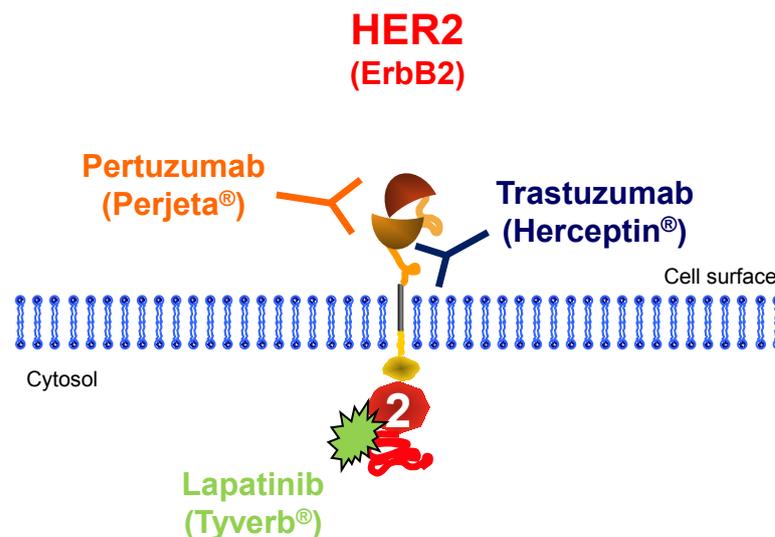
### 1.5.1 ER-targeting: Die endokrine Therapie beim ER-positiven Mammakarzinom

Die Entscheidung über die Notwendigkeit und die Art einer möglichen adjuvanten Therapie beim Mammakarzinom wird auf Grundlage der folgenden Faktoren gestellt: Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Menopausenstatus und Alter der Patientin [42]. Nach den aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinien für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms [43] ist die endokrine Therapie bei allen Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus indiziert. Diese sollte erst nach Abschluss einer möglichen Chemotherapie begonnen werden und über eine Zeitdauer von fünf Jahren oder bis zum Auftreten eines Rezidivs erfolgen. Die Therapie der Wahl ist dabei Tamoxifen, eine Prodrug, die seine Wirkung vor allem über zwei aktive Metaboliten als kompetitiver Antagonist von Estradiol am Estrogen-Rezeptor entfaltet [44] (siehe auch Abb. 1.4). Neuere Studien legen nahe, dass weitere Metaboliten von Tamoxifen in vivo möglicherweise zusätzlich über die Inhibition der Aromatase hemmend auf die Estradiolsynthese wirken [45]. Wie klinische Daten zeigen, können durch diese Therapie bei Mammakarzinom-Patientinnen die Rezidivwahrscheinlichkeit (40% relative Risikoreduktion) und die Sterblichkeit (31% relative Risikoreduktion) über einen Zeitraum von 15 Jahren deutlich gesenkt werden [46]. Ein Nutzen der adjuvanten Tamoxifentherapie konnte für Frauen jeden Alters und außerdem unabhängig von weiteren Faktoren wie Nodalstatus und Menopausenstatus gezeigt werden. Einziges Therapiekriterium ist somit der positive Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms [43].

Weitere Optionen der endokrinen Therapie, die hier nur kurz erwähnt werden sollen, umfassen die Ausschaltung der Ovarialfunktion mit Hilfe von LHRH-Agonisten und die Hemmung der Estrogenproduktion durch Aromataseinhibitoren [43].

### 1.5.2 HER2-targeting: Das HER2/neu überexprimierende Mammakarzinom

Neben dem Hormonrezeptorstatus wird auch der HER2-Status eines Mammakarzinoms standardmäßig mitbestimmt. Die Testung kann dabei entweder am Primärtumor, oder an einer neuen Biopsie durchgeführt werden und sollte in Form einer standardisierten immunhistologischen Bestimmung, zum Beispiel mit Hilfe des Hercep-Tests<sup>®</sup> durchgeführt und ausgewertet werden. Es wird dann zwischen einem negativen (0/1+), schwach positiven (2+) und stark positiven Ergebnis (3+) unterschieden. Bei einem schwach positiven Reaktionsausfall (2+) sollte außerdem eine FISH-Untersuchung (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) durchgeführt werden, um auch die Frage nach einer möglichen Genamplifikation beantworten zu können. [47]



**Abb. 1.5: HER2 als target der antigen-spezifischen Mammakarzinomtherapie**

Eine HER2-Überexpression mit oder ohne Genamplifikation wird bei ca. 20% der Mammakarzinome beobachtet, was mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist [30,48]. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass unter HER2-Überexpression sowohl das gesamte Überleben (Overall survival, OA) als auch die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs (Disease-free survival, DFS) signifikant beeinträchtigt ist [30]. Dementsprechend gilt die HER2-Überexpression als gesicherter negativ prognostischer Marker.

Auf der anderen Seite bietet HER2 auch einen Angriffspunkt für verschiedene target-spezifische Therapieoptionen. Dazu gehört zum einen der rekombinante und humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) gegen die extrazelluläre Domäne von HER2, zum anderen das small molecule Lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>), das seine Wirkung als Tyrosinkinaseinhibitor an HER2 entfaltet.

Der Wirkmechanismus von Trastuzumab ist bisher nur zum Teil verstanden. Diskutiert werden verschiedene Mechanismen, zu denen unter anderem die HER2-Downregulation, die Hemmung der PI3K/Akt- und Ras/MAP-K Signalkaskaden, so wie die Inhibition der Angiogenese gehören [49-51]. Nach den aktuellen Leitlinien ist Trastuzumab für die Behandlung von lokalen und metastasierten Befunden bei HER2-positiven Tumoren (3+, oder FISH positiv) indiziert und kann entweder in Sequenz oder in Kombination mit einer Standard-Chemotherapie über einen Zeitraum von einem Jahr erfolgen [43]. Wie mehrere Studien unabhängig voneinander gezeigt haben, senkt Trastuzumab sowohl die Rezidivrate, als auch die Mortalität beim HER2-positiven Mammakarzinom [52,53].

Das small molecule Lapatinib wirkt als selektiver Inhibitor der EGFR- und der HER2 Tyrosinkinase, indem es kompetitiv mit ATP um die ATP-Bindungsstellen der beiden Rezeptoren konkurriert [54,55]. Lapatinib wird empfohlen für die Therapie bei Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten HER2-positiven Mammakarzinom, das bereits mit Trastuzumab vorbehandelt wurde [43]. Ausreichende klinische Daten zur Wirksamkeit dieser Therapie liegen noch nicht vor.

Ein weiterer monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von HER2, Pertuzumab (Perjeta<sup>®</sup>), befindet sich noch in der Zulassung und wird deshalb bisher nur in klinischen Studien eingesetzt. Pertuzumab verhindert, im Gegensatz zu Trastuzumab, sterisch die Heterodimerisierung von HER2 mit anderen Rezeptoren der HER-Familie, vor allem mit EGFR und HER3 [56]. Da - wie oben bereits beschrieben - HER2 selbst zwar keine Liganden zur Rezeptoraktivierung besitzt, aber gleichzeitig der bevorzugte Heterodimerisierungspartner der ErbB-Rezeptorfamilie ist, kann durch Pertuzumab die laterale Signaltransduktion durch HER2 wirksam unterdrückt werden.

Als möglicher weiterer Effekt der gegen EGFR und HER2 gerichteten Antikörper wird auch die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems wie Makrophagen und Monozyten diskutiert. Gezeigt werden konnte dies bisher in Xenograft-Modellen zumindest für den oben bereits vorgestellten Antikörper Trastuzumab [57]. Durch die Etablierung neuer Mausmodelle soll die Bedeutung dieser Effekte *in vivo* weiter untersucht werden [58].

### 1.5.3 HER4-targeting: Der monoklonale Antikörper Ab1479

Die prognostische Bedeutung der HER4-Expression beim Mammakarzinom wird - wie oben bereits beschrieben - noch ambivalent diskutiert. Gezeigt werden konnte aber, dass vor allem der intrazelluläre Nachweis von HER4 (4ICD nach Proteolyse aus HER4 der Isoform JM-a) mit einem kürzeren Gesamtüberleben und damit einhergehend mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [32]. Außerdem ist in HER4 positivem Mammakarzinom-Gewebe sowohl der Anteil der Isoform JM-a als auch das Enzym TACE im Vergleich zu gesundem Brustgewebe erhöht. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Ektodomain-*Shedding*, was wiederum mit einer gesteigerten Zellproliferation assoziiert ist [59].

Der monoklonale Antikörper Ab1479 ist ein hoch spezifischer Antikörper der gegen die extrazelluläre Domäne von HER4 der Isoform JM-a gerichtet ist. Hollmén et al konnten anhand der Zelllinie MCF-7 *in vitro* zeigen, dass durch Ab1479 sowohl die durch NRG-1 stimulierte Phosphorylierung von HER4 der Isoform JM-a, als auch das Ektodomain-*Shedding* signifikant gehemmt wird. Darüber hinaus führt Ab1479 zu einer HER4-Downregulation und zu einer gesteigerten Ubiquitinierung des Rezeptors. Anhand der beiden Zelllinien T47D und MCF-7 konnten Hollmén et al abschließend zeigen, dass die Applikation von Ab1479 die Zellproliferation *in vitro* signifikant hemmt. [60]

## 1.6 Zielsetzung

Eine HER2-Überexpression wird bei ca. 20% der metastasierten Mammakarzinome beobachtet, was mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist [48]. Auf der anderen Seite bietet HER2 als Zielstruktur target-spezifischer Therapien gleichzeitig aber auch eine wichtige Behandlungsmöglichkeit. Zugelassen sind dafür bisher die beiden oben bereits vorgestellten Medikamente Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) und Lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>). Doch trotz der erwiesenen klinischen Wirksamkeit dieser targeted therapies [61,62], profitieren längst nicht alle dafür in Frage kommenden Patientinnen tatsächlich von einer solchen Behandlung und die erzielten Effekte bleiben oft weit hinter dem zurück, was man aufgrund zahlreicher, positiver Ergebnisse aus präklinischen Vorarbeiten erwarten würde: Erworbene und bestehende Resistenzen führen dazu, dass zum Beispiel die Ansprechrate von metastasierten HER2-positiven Mammakarzinomen auf eine Monotherapie mit Trastuzumab nur zwischen 11 und 26% beträgt [61,63]. Das Zeitintervall in dem diese Karzinome auf eine Mono- oder Kombinationstherapie mit Trastuzumab ansprechen liegt zwischen fünf und neun Monaten. Das heißt die Mehrzahl der Patientinnen mit einem HER2-positiven Mammakarzinom sprechen nicht auf eine Behandlung mit Trastuzumab an, oder entwickelt innerhalb von einem Jahr Resistenzen gegen diese Therapie [64]. Dies zeigt, dass der HER2-Status alleine nicht als prädiktiver Faktor für die Wirksamkeit HER2-spezifischer Therapien ausreichend ist. Deshalb müssen dringend weitere Biomarker erforscht und etabliert werden, um das HER2-positiv Mammakarzinom in Zukunft noch individueller, gezielter und effizienter behandeln zu können.

In der Literatur werden viele Ursachen für Resistenzen gegen target-spezifische Therapien beim HER2-positiven Mammakarzinom diskutiert. Dazu gehört die Aktivierung unterschiedlicher alternativer Signalkaskaden [65,66], aber auch kompensatorische Effekte innerhalb der ErbB-Rezeptorfamilie spielen eine Rolle und rücken mehr und mehr in den Mittelpunkt aktueller Untersuchungen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Zukunft zur Therapieentscheidung nicht der HER2-Status alleine, sondern das gesamte ErbB-Expressionsprofil dienen sollte [38,67].

Besonders kontrovers wird dabei die Rolle von HER4 diskutiert. Einerseits werden diesem Rezeptor onkogene und proliferative Effekte zugeschrieben, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen. Andere Studien bescheinigen diesem im Gegensatz dazu eher eine antiproliferative Wirkung, eine Assoziation mit einem verbesserten Gesamtüberleben und höhere Ansprechraten auf HER2- und ER-spezifische Therapien. [27,68-70]

Die vorliegende Arbeit versucht deshalb einen Beitrag zu der Frage zu leisten, welche Bedeutung die HER4-Koexpression für das Ansprechen von HER2-positiven Mammakarzinomen auf target-spezifische Therapien hat und ob diese als prädiktiver Marker geeignet ist.

Dazu soll in dieser Arbeit das Ansprechen der HER4-negativen Mammakarzinom-Zelllinie BT474 und der HER4-positiven Zelllinie ZR.75.1 auf die oben vorgestellten HER2- und ER-spezifischen Behandlungen untersucht werden. In einem ersten Schritt wird das Proliferationsverhalten (Zellzahl, S-Phase-Fraktion) der beiden Zelllinien unter Applikation von Lapatinib, Trastuzumab, Pertuzumab, Estradiol und Tamoxifen miteinander verglichen. Dabei soll die Frage beantwortet werden, ob die zusätzliche HER4-Koexpression einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit der untersuchten Reagenzien hat.

In einem weiteren Schritt wird die HER4-positive Zelllinie ZR.75.1 mit Hilfe von Messungen zur Zell-Vitalität und Apoptose noch etwas genauer auf ihr Ansprechen auf die HER2- und ER-spezifischen Reagenzien alleine sowie in Kombination mit dem gegen HER4 gerichteten Antikörper Ab1479 untersucht. Dadurch soll gezeigt werden, ob durch das zusätzliche HER4-targeting mögliche negative Effekte auf die Wirksamkeit der untersuchten Behandlungen zumindest teilweise aufgehoben werden können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Untersuchte Zelllinien

Alle Versuche wurden mit den beiden Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und ZR.75.1 durchgeführt. Bei der Zelllinie BT474 handelt es sich um hypertetraploide Zellen, die aus dem Primärtumor einer 60 jährigen Frau mit einem soliden duktalem Mammakarzinom isoliert wurden [71]. Die Zelllinie ZR.75.1 wurde hingegen aus einer peritonealen Metastase einer 63 jährigen Frau mit einem invasiv duktalem Mammakarzinom gewonnen und die Zellen sind hypertriploid [72]. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um epitheliale Zellen, die adhären wachsen.



Die beiden Zelllinien wurden gewählt, da sie sich vor allem in ihrer HER4-Expression unterscheiden. Beide Zelllinien exprimieren zwar HER2 und ER, aber nur die Zelllinie ZR.75.1 trägt zusätzlich HER4 auf ihrer Zelloberfläche. Bei der Zelllinie BT474 liegt außerdem zusätzlich zur HER2-Überexpression auch eine HER2 Gen-Amplifikation vor.

*Abb. 2.1: ErbB-Rezeptor Expression der beiden Zelllinien ZR.75.1 und BT474 im Vergleich*

### 2.1.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
Einfriermedium	DMEM mit 10% FKS und 10% DMSO
FKS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS	Biochrom AG, Berlin
Phenolrot	Biochrom AG, Berlin
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin mit EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

### 2.1.3 Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren

Annexin-V FITC (Kat. Nr. 556419)	BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA
Pertuzumab (Perjeta®) (Stocklsg. 10mg/ml H <sub>2</sub> O + 1,1% Benzylalkohol)	Genentech, South San Francisco, CA, USA
Trastuzumab (Herceptin®) (Stocklsg. 10mg/ml H <sub>2</sub> O + 1,1% Benzylalkohol)	Genentech, South San Francisco, CA, USA
Ab1479 (Stocklsg. 2,32 mg/ml in PBS)	Genentech, South San Francisco, CA, USA
Lapatinib GW 570216 (Stocklsg. 25mg/ml in 0,1% DMSO)	GlaxoSmithKline, München

### 2.1.4 DNA-Farbstoffe und Enzyme

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
RNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### 2.1.5 Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (KITs)

Cell Proliferation Kit II (XTT) (Kat. Nr. 11 465 015 001)	Roche Diagnostics, Mannheim
--	-----------------------------

### 2.1.6 Reagenzien und Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
2'-Desoxycytidin (Stocklsg. 5mM in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
5-Bromo-2'-desoxyuridin (Stocklsg. 50mM in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Stammlösung (40%)	Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Biotest AG, Dreieich
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Camptothecin (2mM)	MBL International Corporation
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Lysepuffer 10x	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Page Ruler Prestained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Protein Standard	Biorad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Annexin-V-Bindungspuffer	100 nM HEPES (pH 7,4) 1,4 M NaCl 25 mM CaCl <sub>2</sub>
Annexin-Lösung	409 µl Annexin-V-Bindungspuffer 41 µl Annexin-V-FITC
DNA-Wasch-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,9% NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2% BSA (kurz vor Gebrauch zugeben)
DNA-Permeabilisierungspuffer	0,1% Igepal in DNA-Wasch-Puffer
DNA-Färbepuffer	477 µl DNA-Permeabilisierungspuffer 20 µl RNase A (Stock 1 mg/ml, 50-100 Units/mg, EK.: 40 µg/ml) 2,4 µl Hoechst 33258 (Stock 1mg/ml in H <sub>2</sub> O, EK.: 1,2 µg/ml)
PBS	137 mM NaCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl
TE-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow: Trägerflüssigkeit	BD Biosciences, Heidelberg
FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACSShutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACSWash	BD Biosciences, Heidelberg
Glaspipetten (2ml, 5ml, 10ml, 20ml)	Brand GmbH + Co, Wertheim
Gewebe-Kulturflasche T25 (50ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebe-Kulturflasche T75 (250ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebe-Kulturflasche T175 (600ml)	BD Biosciences, Heidelberg

Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech, England
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Mikrotiterplatten	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Pasteurpipetten	VWR international GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5ml	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml	Eppendorf, Hamburg
96-well-Platten	Falcon-BD, Heidelberg
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zellschaber	Greiner, Solingen
Zentrifugenröhrchen (15ml & 50ml)	Greiner, Solingen

### 2.1.9 Geräte

Blot-Apparatur Perfect Blue™ Semi-Dry' Electro Blotter Sedec™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Brutschrank BD 6220	Heraeus Sepatech, Osterode
Consort E455	Fröbel Labortechnik, Lindau
Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer: Mini-Protean tetra cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Emax precision microtiter reader	Molecular Devices, Ismaning
Eppendorf-Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
Glas-Platten (1mm & short plates)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gieß-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Membran-Vakuum-Pumpe	Vacuumbrand GmbH + Co, Wertheim
Milli Q Water Systems	Millipore S.S., Molsheim, Frankreich
Neubauer-Zählkammer 0,100nm	Brand GmbH + Co, Wertheim
Pipetus	Hirschmann, Laborgeräte, Eberstadt
37°C-Schrank	Heraeus Sepatech, Osterode
Sterilbank LaminAir	Heraeus Sepatech, Osterode
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage Sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Western-Blot Kammer	Biometra, Göttingen
Zellzähler	BaumerIVO, Villingen-Schwenningen
Mikroskope: Lichtmikroskop Leitz, labovert FS	American Instrument Exchange, Haverhill, MA, USA
AxioCam MRc	Zeiss, Göttingen
Zentrifugen: Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode
Centrifuge 5415R	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
Megafuge 1,0	Heraeus Sepatech, Osterode
Varifuge 3.2 RS	Heraeus Sepatech, Osterode

## **2.2. Methoden der Zellkultur**

### **2.2.1 Die Standardzellkultur**

Die beiden Mammakarzinomzelllinien BT474 und ZR.75.1 wurden als adhärent wachsende Monolayer in Gewebe-Kulturflaschen oder 96-well-Platten kultiviert und im Brutschrank bei 37°C, 0,5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 20% O<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. BT474 Zellen wurden mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), versetzt mit 5% fetalem Kälberserum (FKS) und 0,2% Phenolrot, kultiviert; ZR.75.1-Zellen mit RPMI 1640 ohne Phenolrot, aber ebenfalls mit 5% FKS. Das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt.

### **Ernten von Zellen und Bestimmung der Zellzahl**

Um steriles Arbeiten ohne Kontamination der Kulturen zu gewährleisten, wurden alle zellbiologischen Arbeitsschritte unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Zellernte wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend einmal mit vorher erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Nach Entfernung des „Wasch-PBS“ konnten die adhären Zellen dann mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Um optimale Bedingungen für diese enzymatische Reaktion durch Trypsin zu gewährleisten, wurden die Flaschen dazu für weitere 2 min zurück in den 37°C warmen Kulturschrank gestellt und die Reaktion anschließend durch die zweifache Menge an FKS-haltigem Medium abgestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Zellen bei 1200 rpm für drei Minuten abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das so gewonnene Zellelett in frischem Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und einem Zellzählgerät bestimmt.

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

Zellen, die längerfristig eingefroren werden sollten, wurden nach der Ernte mit 0,25% Trypsin bei 1200 rpm für drei Minuten pelletiert, in kaltem Einfriermedium (DMEM mit je 10% FKS und Dimethylsulfoxid) resuspendiert und mit der Endkonzentration 1 Mio Zellen / 1 ml Medium in Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe des Einfriergeräts „Qualifreeze“ konnte man die Zellen langsam über vier Stunden auf -100°C abkühlen und in einen Tank mit flüssigem Stickstoff einlagern. Eingefrorene Zellen konnten wieder zurück in Kultur genommen werden, indem sie rasch in 37°C warmem Wasserbad erwärmt und in ein 15 ml Röhrchen mit Medium überführt wurden. Nach Abzentrifugation bei 1200 rpm für drei Minuten und

Resuspension des Pellets in frischem Medium konnte die Aussaat in T25 Kulturflaschen erfolgen. Am nächsten Tag wurde dann ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellkultur wie oben beschrieben fortgeführt.

### 2.2.2 Zellkultur und -Präparation für die Zellzahl- und SPF-Bestimmung

Den Versuchen zur Bestimmung der Zellzahl und der S-Phase-Fractionen (SPF) lag folgendes Zellkulturprotokoll zugrunde: Die Aussaat erfolgte am Tag null, die Behandlungen an den Tagen drei (72h-Behandlung) und vier (48h-Behandlung). Nach einem Mediumwechsel wurden stets alle Behandlungen nachgelegt. Die Zellernte sowie die Bestimmung der Zellzahl und der SPF fanden schließlich am Tag sechs der Zellkultur statt.

#### Behandlungsschema zum Ansprechen auf HER2-spezifische Reagenzien

Tag 0	Aussaat			
Tag 3	Mediumwechsel, 72h-Behandlung			
Tag 4	48h- Behandlung			
Tag 5	Mediumwechsel, Nachlegen der Behandlungen			
Tag 6	Zellernte, Zellzahlbestimmung, Fixierung der Zellen in 70% MOH			
Ansatz	Lapatinib 1 $\mu$ M	DMSO 0,1%	Pertuzumab 10 $\mu$ g/ml	Trastuzumab 10 $\mu$ g/ml
1				
2	48h			
3		48h		
4			48h	
5				48h
6	72h			
7		72h		
8			72h	
9				72h

#### Behandlungsschema zum Ansprechen auf ER-spezifische Reagenzien

Tag 0	Aussaat		
Tag 2	Umstellen der Kulturflaschen 6 und 7 auf 1% FKS		
Tag 3	Mediumwechsel, 72h-Behandlung, Umstellen der Kulturflaschen 4 und 5 auf 1% FKS		
Tag 4	48h-Behandlung		
Tag 6	Zellernte, Zellzahlbestimmung, Fixierung der Zellen in 70% MOH		
Ansatz	Tamoxifen 5 $\mu$ M	Estradiol 2,5 nM	1% FKS
1			
2	48h		
3	72h		
4			72h
5		48h	72h
6			96h
7		72h	96h

Die Zellkultur erfolgte jeweils in Gewebe-Kulturflaschen der Größe T-25. Zur Aussaat kamen dabei pro Kulturflasche 250.000 Zellen der Zelllinie ZR.75.1, beziehungsweise 200.000 Zellen der Zelllinie BT474.

Um einen möglichen stimulierenden Effekt durch die Behandlung mit Estradiol nachzuweisen, sollten die entsprechenden Zellen in einem möglichst Estradiol-freien Medium kultiviert werden. Nach mehreren frustrierten Versuchen mit unterschiedlichen hormonfreien chemisch definierten Zusätzen und Aktivkohle-filtriertem FKS, wurde schließlich folgendes Vorgehen festgelegt: Die entsprechenden Kulturflaschen (Ansätze 5 und 7) wurden jeweils 24 Stunden vor der Behandlung mit Estradiol von 5% FKS auf 1% FKS umgestellt. Außerdem wurden zum Vergleich entsprechende Kontrollen mit 1% FKS ohne Estradiolbehandlung (Ansätze 4 und 6) mitgeführt.

Die Zellernte wurde am Tag sechs, wie unter 2.2.1 beschrieben, durchgeführt und die Zellen direkt im Anschluss unter der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in je 1 ml 70% MOH für mindestens eine Stunde bei 4° C fixiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit kaltem PBS + 0,2% BSA wurden die Zellen mit 425µl PBS + 0,2% BSA und 50µl RNase A (Stammlösung 1 mg/ml, 50-100 Units/mg) versetzt und bei 37° C im Wasserbad für 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 25µl PI (Stammlösung 1mg/ml; Endkonzentration 50 µg/ml) konnten die Proben nach kurzem Vortexen bei einer Durchflussrate von ca. 300 events/s am FACSCanto II gemessen werden.

### 2.2.3 Zellkultur und –Präparation für die Messungen der Zellvitalität

Für die Bestimmung der Zellvitalität kam das Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche zum Einsatz. Dazu wurden pro Versuchsdurchlauf vier 96-Well-Platten ausgesät.

XTT Assay - ZR.75.1 - Her2- und ER-targeting, 07.01.2011

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	Lap2 (2400)	Lap2	Lap2	Ko	Ko	Ko	Tam	Tam	Tam		PBS
C	PBS	Lap2 (3000)	Lap2	Lap2	Ko	Ko	Ko	Tam	Tam	Tam		PBS
D	PBS	Lap2 (6000)	Lap2	Lap2	Ko	Ko	Ko	Tam	Tam	Tam		PBS
E	PBS	Lap1 (2400)	Lap1	Lap1	Pertuz	Pertuz	Pertuz	Trast	Trast	Trast	Ab 1479	PBS
F	PBS	Lap1 (3000)	Lap1	Lap1	Pertuz	Pertuz	Pertuz	Trast	Trast	Trast	Ab 1479	PBS
G	PBS	Lap1 (6000)	Lap1	Lap1	Pertuz	Pertuz	Pertuz	Trast	Trast	Trast	Ab 1479	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

**Abb. 2.2:** Beispielhafte Bestückung einer 96-Well-Platte für eine XTT-Messung

Es wurden jeweils 2.400, 3.000 und 6.000 Zellen der Zelllinie ZR.75.1 in 200 µl RPMI mit 5% FKS pro Well ausgesät, wobei die Wells am Rand mit 200 µl PBS gefüllt und im weiteren Versuchsverlauf nicht weiter berücksichtigt wurden. Zur Bestimmung des Leerwerts, wurden außerdem drei Wells nur mit 200 µl RPMI / 5% FKS befüllt. Am Tag 4 nach der Aussaat fand die Behandlung der Zellen in den unterschiedlichen, unten aufgeführten Ansätzen statt. Dabei wurden pro Ansatz jeweils drei Wells mit der gleichen Zellzahl behandelt. So lagen am Ende eines Versuchsdurchgangs alle Ergebnisse als Triplets vor. Wie auch in den vorherigen Versuchen wurden die mit Estradiol behandelten Zellen 24 Stunden vor der Behandlung auf Medium mit 1% FKS umgestellt und eine entsprechende Kontrolle mitgeführt. Die Platten 1a und 1b wurden jeweils am Tag 5 der Behandlung gemessen, die Platten 2a und 2b dann am Tag 8 der Behandlung. Dazu wurden morgens zunächst 100 µl aus jedem Well entnommen und anschließend 50 µl des Reaktionsgemisches aus XTT und ECR (electron-coupling reagent) hinzu pipettiert. Die Messung im ELISA-Reader (Molecular Devices, Ismaning) fand dann nach einer, zwei, drei, vier und sechs Stunden statt. Gemessen wurde die Absorption bei 492 nm, als Referenzwellenlänge wurden 690 nm gewählt. Das Prinzip der XTT-Messung wird unter 2.4 genauer beschrieben.

### Behandlungsschema zur Bestimmung der Zellvitalität mittels XTT-Messung

Freitag	Aussaat von vier 96-Well-Platten (1a, 1b, 2a, 2b)								
Samstag									
Sonntag	Umstellen der Ansätze 13-16 auf 1% FKS								
Montag (Tag 1)	Mediumwechsel und Behandlung								
Dienstag (Tag 2)									
Mittwoch (Tag 3)									
Donnerstag (Tag 4)									
Freitag (Tag 5)	Messung der Platten 1a und 1b, Mediumwechsel der Platten 2a und 2b								
Samstag (Tag 6)									
Sonntag (Tag 7)									
Montag (Tag 8)	Messung der Platten 2a und 2b								
Ansatz	DMSO 0,1%	Ab1479 10 µg/ml	Lapatinib 0,1 µM	Lapatinib 1 µM	Pertuzumab 10 µg/ml	Trastuzumab 10 µg/ml	Tamoxifen 5 µM	Estradiol 2,5 nM	1% FKS
1									
2	+								
3		+							
4			+						
5				+					
6		+		+					
7					+				
8		+			+				
9						+			
10		+				+			
11							+		
12		+					+		
13									+
14		+							+
15								+	+
16		+						+	+

### 2.2.4 Zellkultur und –Präparation für die Annexin-V-FITC-Messungen

Den Annexin-V-FITC-Messungen lag folgendes Zellkulturprotokoll zugrunde: Nach der Aussaat von 20 x T25 mit jeweils 250.000 ZR.75.1 in RPMI / 5% FKS am Tag 0, fand am Tag 3 ein Mediumwechsel und die Behandlung der Zellen statt. Die verschiedenen Ansätze können der unten stehenden Tabelle entnommen werden. Wie in den vorhergehenden Versuchen auch, wurden die Estradiol-behandelten Zellen (Ansätze 10 und 20) 24h vor der Behandlung auf 1% FKS umgestellt, sowie eine entsprechende Kontrolle (Ansätze 9 und 19) mitgeführt. Um mögliche apoptotische oder nekrotische Zellen nicht zu entfernen wurde auf einen weiteren Mediumwechsel am Tag 5 verzichtet.

#### Behandlungsschema zur Apoptose-Bestimmung mittels Annexin-V-FITC-Messungen

Tag	Beschreibung								
Tag 0	Aussaat								
Tag 2	Umstellen der Ansätze 9, 10, 19 und 20 auf 1% FKS								
Tag 3	Mediumwechsel, Behandlung								
Tag 5	Kein Mediumwechsel!								
Tag 6	72h-Assay								
Tag 7	96h-Assay								

Ansatz	Tamoxifen 5 µM	Lapatinib 1 µM	DMSO 0,1%	Pertuzumab 10 µg/ml	Trastuzumab 10 µg/ml	Ab1479 10 µg/ml	Estradiol 2,5 nM	1% FKS
1								
2	72h							
3		72h						
4			72h					
5				72h				
6					72h			
7						72h		
8					72h	72h		
9								96h
10							72h	96h
11								
12	96h							
13		96h						
14			96h					
15				96h				
16					96h			
17						96h		
18					96h	96h		
19								120h
20							96h	120h

Die durchflusszytometrischen Messungen fanden schließlich am Tag 6 (72h-Assay) bzw. Tag 7 (96h-Assay) statt. Dazu wurde zunächst der Überstand jeder Kulturflasche in ein eigenes 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, die Zellen geerntet und ebenfalls in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 20 ml PBS wurden die Zellen dann bei 4°C und 1200 rpm drei Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde das so gewonnene Zellpellet in 45 µl Annexin-Lösung resuspendiert und 20 Minuten lang im Dunkeln und auf Eis

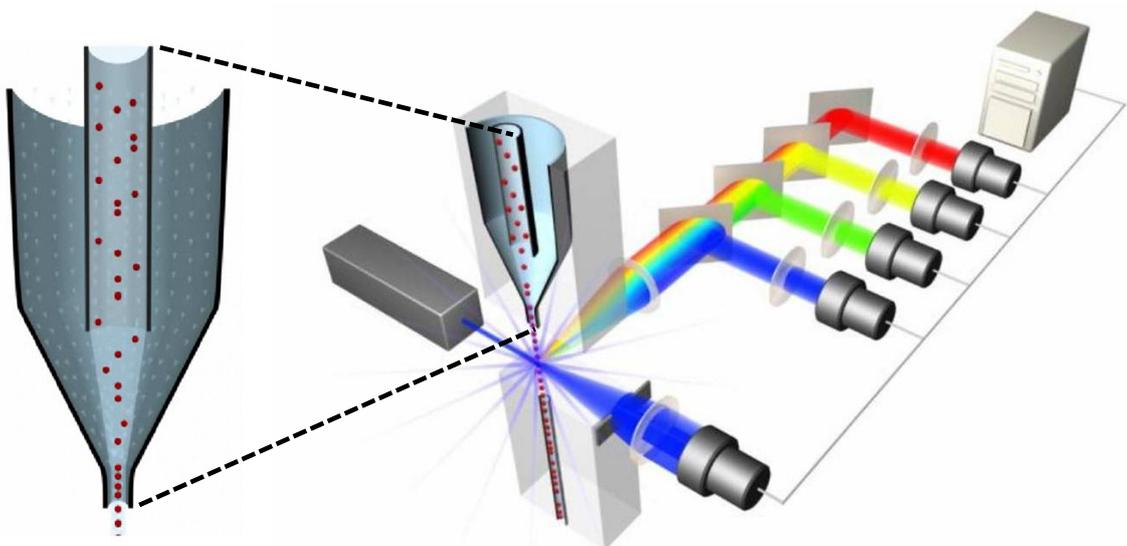
inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,2 ml Bindungspuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen übertragen. Jeweils genau eine Minute vor der Messung im Durchflusszytometer wurden zu jeder Probe 3 µl PI pipettiert und das Probengefäß kurz mit dem Vortexer gemischt. Das Prinzip der Annexin-V-FITC Messung wird unter 2.3.7 genauer erklärt.

## 2.3 Durchflusszytometrische Analysen

### 2.3.1 Theoretische Grundlagen

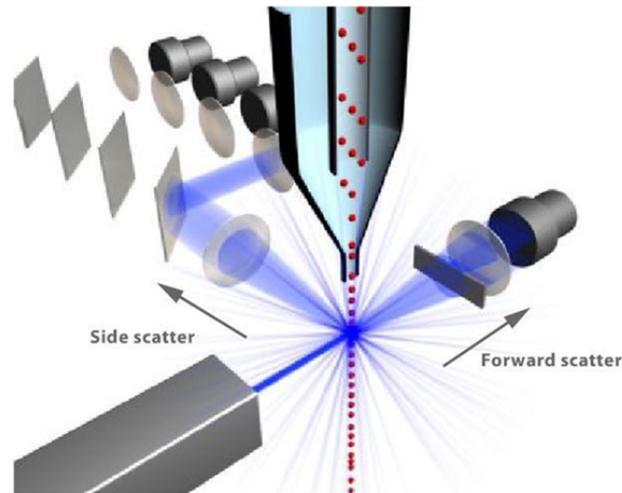
Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgt die Analyse biologischer, chemischer, physikalischer und biophysikalischer Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Diese Technik kommt hauptsächlich dann zum Einsatz, wenn bestimmte Zellen und Zellpopulationen hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften, wie z.B. der Antigenexpression oder dem DNA-Gehalt, unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern, phänotypisiert werden sollen [73]. Der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometers FACS Canto II gliedert sich in ein Flüssigkeitssystem, ein optisches System und eine Detektionseinheit. Durch die anschließende Elektronik können die so generierten optischen Signale in elektrische Signale umgewandelt und so der weiteren Datenverarbeitung durch einen Computer zugeführt werden.

Ziel der durchflusszytometrischen Analysen ist es, jeweils genau eine Zelle an einem gebündelten Laserstrahl zu einem bestimmten Zeitpunkt vorbeizuführen. Dieser Aufgabe wird das Flüssigkeitssystem des FACS Canto II gerecht, indem es jede Zelle in einer Einzelzellsuspension perlschnurartig an den auf verschiedenen Ebenen eintreffenden Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen vorbeileitet. Durch laminare Strömungseigenschaften verhindert die so genannte „hydrodynamische Fokussierung“ eine Durchmischung von Proben- und Trägerflüssigkeit.



*Abb. 2.3: Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung und eine Übersicht über die Schlüsselkomponenten eines Durchflusszytometers [74]*

Wenn Zellen oder Partikel durch einen gebündelten Laserstrahl hindurch treten, wird Licht in alle Richtungen gestreut. Neben der Fluoreszenz werden dabei das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) in einem Winkel von  $1,5^\circ$  und  $10^\circ$  zur Strahlenrichtung des Anregungslasers und das Seitwärtsstreulicht (side scatter SSC) in einem Winkel von ca.  $90^\circ$  zur Darstellung bestimmter physikalischer Eigenschaften erfasst. Während das FSC-Signal Aufschluss über relative Unterschiede in der Zellgröße liefert, bringt das SSC-Signal Unterschiede bezüglich intrazellulärer Komplexität und Granularität zur Darstellung.



**Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Durchflusszytometer [74]**

Das stärkere FSC wird direkt durch eine Fotodiode digitalisiert und zur Datenerfassung an einen Computer weitergeleitet. Die Erfassung des schwächeren SSC-Signals hingegen erfolgt über einen Fotodetektor, wie es für Fluoreszenzen üblich ist.

### 2.3.2 Das Durchflusszytometer FACS Canto II

Zur Anregung von Zellen besitzt das FACSCanto II einen blauen (488 nm), einen roten (633 nm) und einen violetten (405 nm) Laser. Wenn die mit Fluorochromen gefärbten Zellen die Ansaugvorrichtung passieren und durch den Laserstrahl hindurch treten, können die Farbstoffe Photonen absorbieren und so in einen angeregten Zustand überführt werden. Die bei der Rückkehr in den Grundzustand frei werdende Energie wird dabei als Fluoreszenz bezeichnet und ist durch weitaus längere Wellen charakterisiert als solche, die zur Anregung erforderlich waren. Die Detektion unterschiedlicher Farbstoffe durch nur drei Laser beruht also auf der Tatsache, dass sich verschiedene Farbstoffe zwar bei der gleichen Wellenlänge anregen lassen, jedoch aufgrund ihrer individuellen Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen zu detektieren und damit zu unterscheiden sind. Die optischen Signale des SSC

und der Fluoreszenzen werden nun durch eine Sammellinse gebündelt und gelangen zu optischen Filtern. Diese haben die Aufgabe, die Spektralverteilung der zu den Detektoren geleiteten SSC- und Fluoreszenzsignale zu modifizieren. So können optische Filter je nach Beschaffenheit Photonen absorbieren, reflektieren oder passieren lassen, wobei grundsätzlich zwischen zweierlei Filtersystemen unterschieden wird:

**Langpassfilter** lassen nur Wellenlängen passieren, die die Filtrrate überschreiten. Kürzere Wellenlängen werden absorbiert oder reflektiert. **Bandpassfilter** hingegen lassen nur einen definierten Wellenlängenbereich hindurch und sind durch zwei Zahlenangaben charakterisiert. Die erste Zahl kennzeichnet dabei das Zentrum des umschriebenen Bereichs, während die zweite Zahl die Bandweite angibt, die der Filter umfasst. Somit lässt also zum Beispiel ein 500/50 nm Bandpassfilter nur Licht mit einer Wellenlänge zwischen 475 und 525 nm passieren.

Nun werden die Lichtsignale über Detektoren in elektronische Signale - auch Pulse genannt - umgewandelt, die letztendlich von der FACS Diva Software in einem Plot veranschaulicht werden können. Wie bereits erwähnt, wird dabei das stärkere FSC über eine Fotodiode, schwächere Signale wie das SSC und sämtliche Fluoreszenzen jedoch über sogenannte photomultiplier tubes (PMTs) abgegriffen. Im FACSCanto II findet sich eine Anordnung von fünf PMTs zu einem Octagon und von jeweils zwei PMTs zu zwei Trigonon.

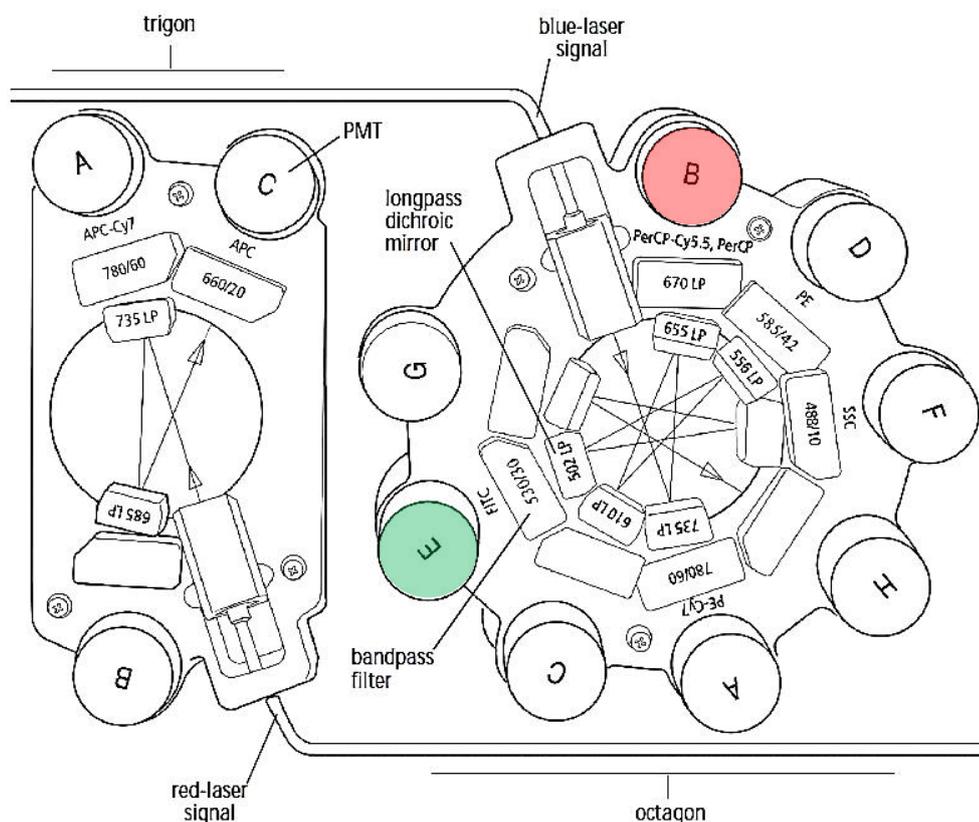
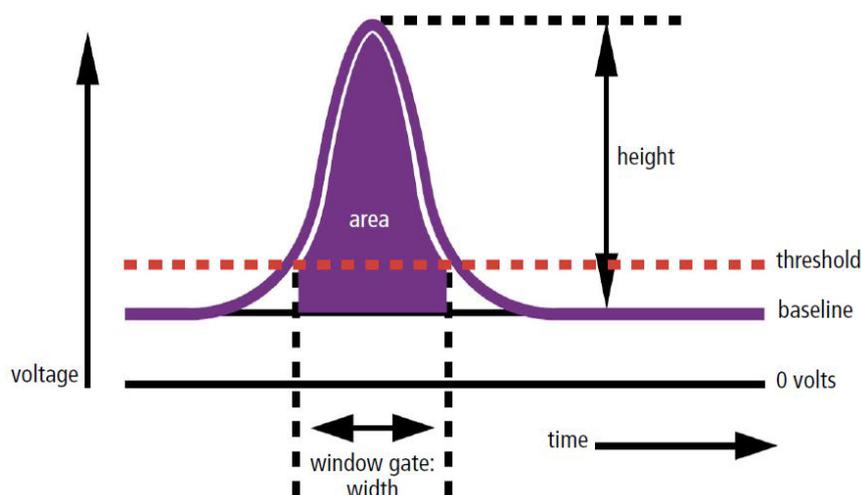


Abb. 2.5: Strahlengang in einem Octagon und den Trigonon des FACSCanto II [75]

Wenn nun das Licht aus dem Glasfaserkabel in das Octagon gelangt, trifft es zunächst auf einen 735 nm Langpassfilter, der kürzere Wellenlängen automatisch zum nächsten PMT reflektiert. Direkt nachgeschaltet findet sich ein 780/60 nm Bandpassfilter, so dass nur Wellenlängen im Bereich von 750 bis 810 nm PMT A erreichen und somit dem Emissionsspektrum des Farbstoffs PE-Cy7 entsprechen. Wellen mit einer Länge von weniger als 735 nm gelangen nun zu PMT B usw. Auf diese Weise gelangt der Lichtstrahl nacheinander entlang der Anordnung zu den jeweiligen Detektoren, wobei jede Station unterschiedliche Bereiche der Emissionsspektren erfasst. Das SSC wird bei PMT F gesammelt. Durch die Anordnung im Octagon ist die Messung von bis zu acht Fluorochromen möglich, die alle vom blauen Laser angeregt werden. Analog verhält es sich mit den beiden Trigonon, in denen vom roten bzw. violetten Laser angeregte Farbstoffemissionen ermittelt werden [75].

Innerhalb der PMTs wird nun aus dem optischen- ein elektrisches Signal, also ein Puls, erstellt, aus dem die Software FACSDiva 6.1.1 für jede einzelne Zelle für deren Verweildauer im Laser ein Profil über die Gestalt des Pulses erstellt. Dabei ermitteln Pulsprozessoren Merkmale anhand der folgenden drei Charakteristika:

- Die Höhe (=height) beschreibt die während des Pulses ermittelte maximale Intensität
- Die Fläche (=area) entspricht dem Integral des gemessenen Pulssignals über die Zeit, wovon sich der in der Zelle gebundene Fluoreszenzgehalt ableiten lässt [76]
- Die Weite (=width) errechnet sich aus der Formel  $\text{area}/\text{height} \times 64000$  und erlaubt Rückschlüsse auf die Partikelgröße [76].



**Abb. 2.6: Pulssignalgenerierung anhand der Merkmale height, area und width [76]**

Der Schwellenwert (threshold) markiert die Grenze, an der das Gerät anfängt, Signalimpulse zu messen, die Baseline stellt das Grundlevel dar. Die eingebaute Elektronik wird ebenfalls

der räumlichen Versetzung der eintreffenden Laserstrahlen gerecht, indem sie die Pulserfassung um die zeitliche Verzögerung korrigiert [76].

### 2.3.3 Verwendete Farbstoffe

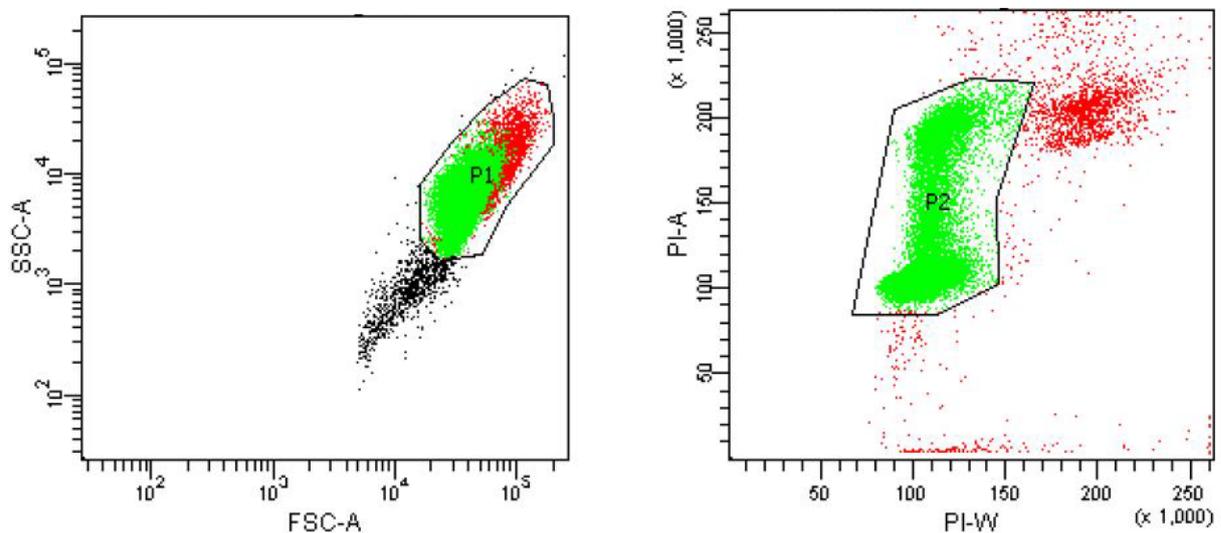
Die nachfolgende Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe mit den zugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima, ihren Anregungswellenlängen sowie ihre PMT-Position und die zugehörigen Filter im FACSCanto II. Ebenso wird gezeigt, zu welchem Zweck die Untersuchung durchgeführt wurde.

Farbstoff	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Anregungs- wellenlänge [nm]	Untersuchung	PMT-Position	Filter
PI	536	617	488	SPF Apoptose	B	LP 655 LP 670
FITC	495	519	488	Apoptose	E	LP 502 BP 530/30

### 2.3.4 Datendarstellung und Verarbeitung

Durchflusszytometrische Messungen können ein- oder mehrparametrisch zum Beispiel zur bloßen DNA-Färbung bzw. zur Identifikation weiterer Subpopulationen - zum Beispiel über Phänotypisierung mittels Antikörperfärbungen - erfolgen. Fluoreszenzsignale können linear oder logarithmisch verstärkt werden. Die graphische Darstellung zweier gemessener Parameter bringt der so genannte Dot- oder Density-Plot zum Ausdruck (siehe Abb. 2.5). Bei dieser zweidimensionalen Graphik wird das SSC bzw. die Intensität eines Farbstoffs auf der Ordinate gegen das FSC bzw. die Intensität eines zweiten Farbstoffs auf der Abszisse aufgetragen. Hiermit gelingt nicht nur die Identifikation intakter, vitaler und gefärbter Zellen, sondern auch ihre Unterscheidung sowohl von Zelltrümmern und Farbstoffaggregaten (Debris) als auch von Zellaggregaten, den Dubletten. Der so genannte Debris besitzt ein schwächeres FSC- und SSC-Signal, während Zelldubletten größer und granulärer als Einzelzellen sind und sich somit durch ein stärkeres FSC und SSC charakterisieren. Da bei DNA-Analysen die Diskrimination von Einzelzellen besonders wichtig ist, können auf der Basis der Pulsprozessortechnologie zeitabhängige Fluoreszenzsignale bei Laseranregung ermittelt werden, die die schon erwähnten Höhen-, Flächen- und Weitensignale umfassen. Zellaggregate, die einen größeren Durchmesser besitzen als der Querschnitt des Laserstrahls, können nicht maximal angeregt werden, was sich in einem geringeren Höhensignal widerspiegelt. Zudem erhöht sich ihr Weitensignal, da Dubletten längere Zeit benötigen als Einzelzellen, um den Illuminationspunkt zu durchschreiten. Durch diese Technologie wird gewährleistet, dass aggregierte Zellen aufgrund ihres erhöhten Fluoreszenzgehaltes nicht

einfach G2-Phase oder tetraploide Zellen imitieren, sondern eindeutig von singulären Ereignissen unterschieden werden können. Zu diesem Zweck wurde bei der Datenverarbeitung das Weiten- gegen das Flächensignal aufgetragen. Durch ein adäquates „Gating“, d.h. der Definition einer bestimmten Zielpopulation als Region, kann nun die Betrachtung weiterer Merkmale unter Ausschluss von nicht vereinzelt Zellen und Zelltrümmern erfolgen. Dabei kommen entweder Histogramme oder weitere Dot-Plots, wie zum Beispiel zur Bestimmung von apoptotischen Zellen, zum Einsatz. Unter einem Histogramm versteht man die Auftragung nur eines Parameters auf der x-Achse gegen die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse und damit die Beschreibung der einzelnen Zellzyklusphasen.

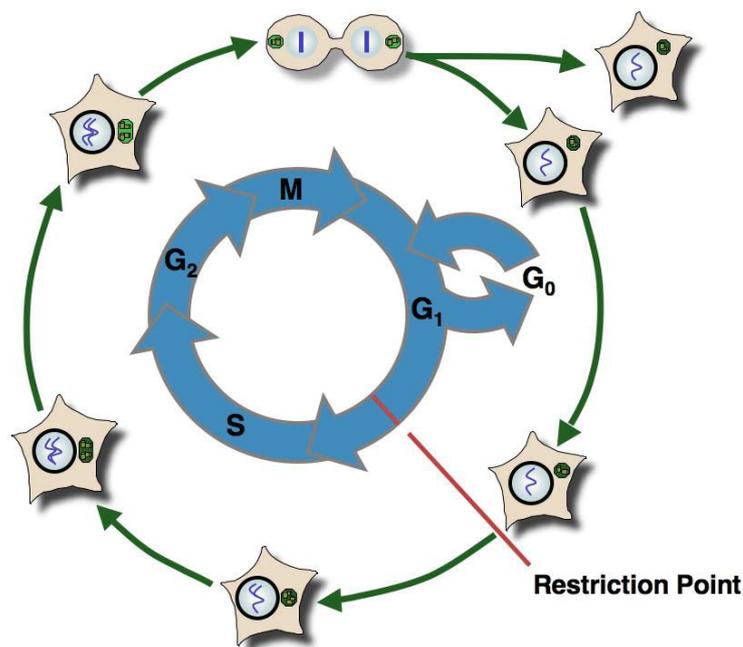


**Abb. 2.7: Dot Plots zur Diskriminierung von Zelltrümmern (FSC gegen SSC) und Zell-Dubletten (PI-Weite gegen PI-Fläche)**

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit Hilfe der Software FACSDiva 6.1.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) an einem PC mit dem Betriebssystem Windows XP durchgeführt. Die Daten wurden sowohl als list-mode Datenfile FCS 2.0 als auch als FCS 3.0 (Flow Cytometry Standard 2.0 bzw. 3.0) gespeichert und an einem Standardcomputer weiter bearbeitet. Die zweiparametrischen Messungen zur Apoptosebestimmung wurden anschließend mit der Software FlowJo Version 7.6.1. (Tree Star Inc.) ausgewertet. Die Auswertung der Histogramme zur Zellzyklusverteilung erfolgte mit Hilfe der Software Expo 32 ADC Analysis Version 1.2 (Beckman Coulter Inc.) und WinCycle Version 11.05.02 beta (Phoenix Flow Systems Inc.).

### 2.3.5 Der Zellzyklus

1953 postulierten Howard und Pelc das bis heute gültige Konzept von der eukaryontischen Zellteilung, die sich demnach in die vier aufeinander folgenden Phasen G<sub>1</sub>-, Synthese-, G<sub>2</sub>- und Metaphase gliedert. Die Zellteilung (Zytokinese) selbst erfolgt in der lichtmikroskopisch sichtbaren Metaphase, nachdem eine vollständige Verdopplung des Genoms in der Synthesephase stattgefunden hat. G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase, die der M- bzw. der S-Phase vorgeschaltet sind, dienen dabei als Vorbereitung auf die nachstehenden Aufgaben im Zellzyklus und werden zusammen mit der S-Phase zur Interphase zusammengefasst [5].



*Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen [77]*

Die strenge Regulation der Mitoseaktivität über externe und interne Kontrollmechanismen ist für multizelluläre Organismen und komplexe Gewebe von entscheidender Bedeutung. An diskreten Punkten des Zellzyklus - den sogenannten Restriktionspunkten - erfolgt so unter Berücksichtigung aktivierender und inhibierender Signale die Entscheidung über das Fortschreiten im Teilungsprozess. Ein wichtiger Kontrollpunkt ist beispielsweise in der frühen G<sub>1</sub>-Phase lokalisiert und wird beeinflusst durch mitogene und anti-mitogene Signale (TGF- $\beta$ , Zellschädigung) [4]. In Gegenwart von Wachstumsfaktoren wird die Zellvermehrung von Säugerzellen gewährleistet. Fehlende Stimuli oder ein Mangel an Nährstoffen hingegen versetzen Zellen in einen Ruhezustand - die sogenannte G<sub>0</sub>-Phase - in der keine Beteiligung an den Stationen der Zellteilung mehr vorliegt und die metabolische Aktivität deutlich reduziert wird [78]. Nicht nur der Übertritt in die G<sub>0</sub>-Phase, sondern auch

Gewebisdifferenzierung kann zur Quieszenz und einem irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit führen. Manche ruhenden Zellen jedoch können mit Hilfe von Wachstumsfaktoren, die als Kompetenzfaktoren wirken, wieder in das zyklische Geschehen der Zellteilung eingebracht werden [78]. Um Fehler bei der Zellteilung zu minimieren unterliegen die Zellen in der G2-Phase einer weiteren Kontrolle. Hier wird geprüft, ob die S-Phase vollständig abgeschlossen worden ist. Aufgrund ihrer Kürze wird die G2-Phase mit der Metaphase häufig zur G2/M-Phase zusammengefasst. Während der Mitose ist ein weiterer Kontrollpunkt von zentraler Bedeutung, der die korrekte Anlagerung der Chromosomen an die Mitosespindel und ihre korrekte Verteilung auf die Tochterzellen gewährleisten soll [78].

### 2.3.6 Die Bestimmung der S-Phase-Fraktion

Zur Bestimmung der S-Phase-Fraktion (SPF) wird in einem Histogramm PI-Area gegen die entsprechende Anzahl an gemessenen Ereignissen aufgetragen. Da sich PI-Area direkt proportional zu dem in der Zelle gebundenen Fluoreszenzgehalt verhält, erlaubt es auch direkten Rückschluss auf den DNA-Gehalt der Zelle. Nach Diskriminierung der Einzelzellen von Zelldetritus und Zellklumpen ergeben sich in dieser Auftragung zwei Peaks: Der G1-Peak, mit allen Zellen die einen einfachen Chromosomensatz aufweisen auf der linken Seite, und der G2-Peak auf der rechten Seite, mit den Zellen, die die S-Phase bereits vollständig durchlaufen haben und deshalb einen doppelten Chromosomensatz besitzen.

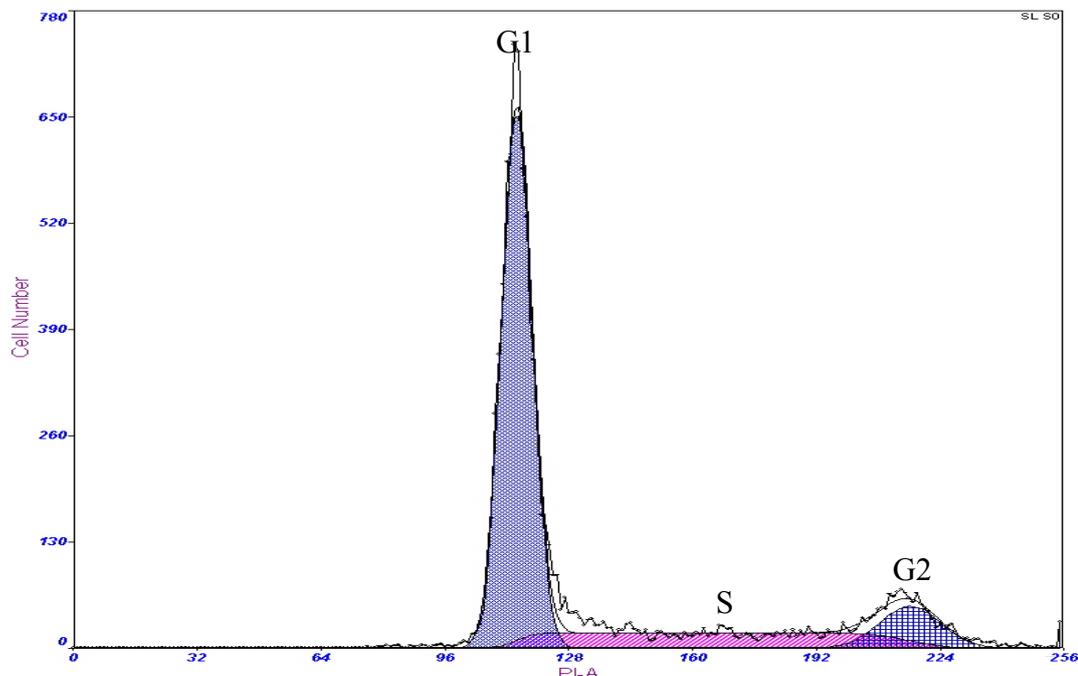
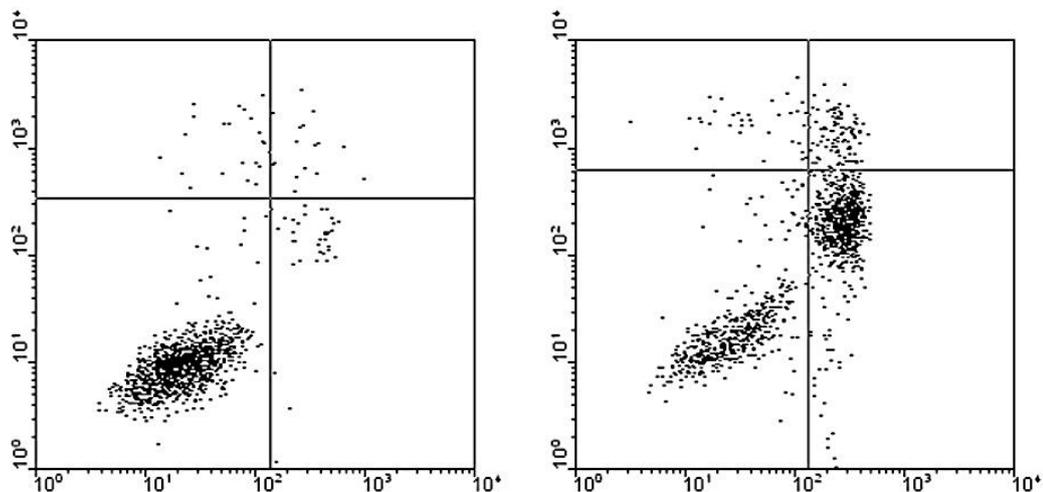


Abb. 2.9: DNA-Histogramm durch Auftragung von PI-Area gegen die Anzahl der entsprechenden Ereignisse

Alle Zellen zwischen dem G1- und dem G2-Peak befinden sich dementsprechend gerade in der Synthesephase, da sie zwar einerseits nicht mehr den einfachen Chromosomensatz besitzen, sich der DNA-Gehalt aber auch noch nicht vollständig verdoppelt hat. Der Anteil dieser Zellen an der gemessenen Gesamtzellzahl wird als S-Phase-Fraktion bezeichnet und ist ein Ausdruck für das Ausmaß der Zellproliferation.

### 2.3.7 Die Annexin-V-FITC-Messung

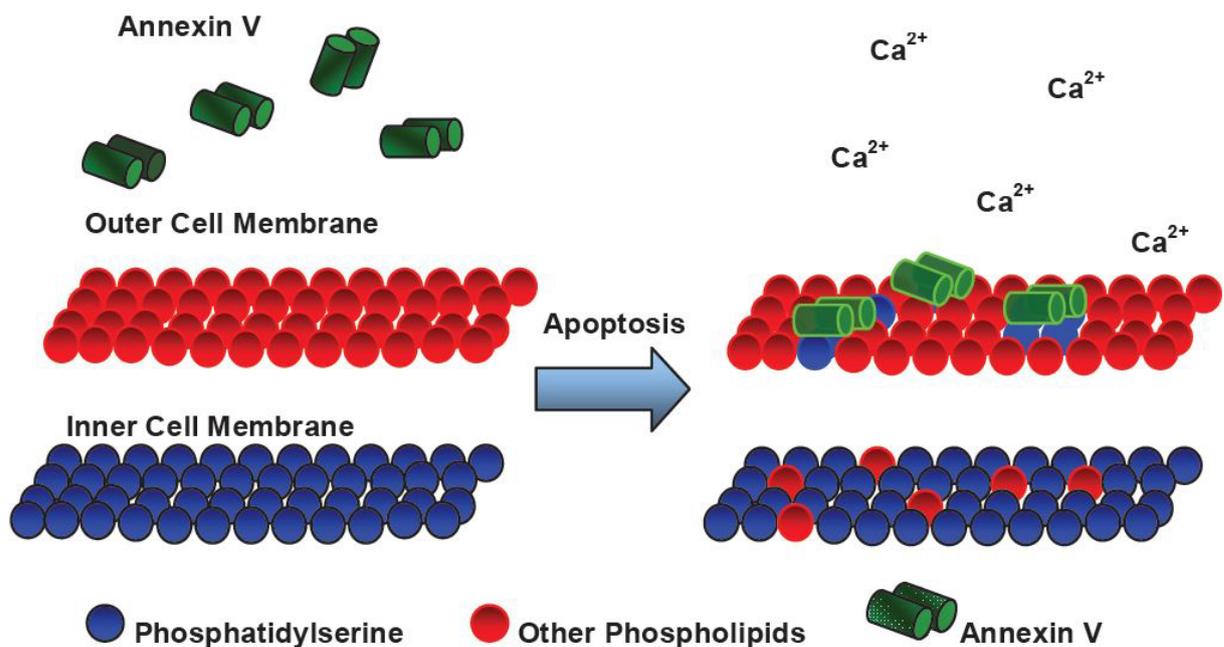
Untersuchungen zum programmierten Zelltod bei den mit unterschiedlichen target-spezifischen Therapien behandelten Zellen wurden durchflusszytometrisch mit Hilfe einer PI/Annexin-V-FITC Färbung durchgeführt (siehe Ergebnisse Kap. 3.4). Die beispielhaften Density-Plots einer unbehandelten und einer mit Camptothecin behandelten Probe der Zelllinie SK-BR-3 in Abb. 2.10 zeigt eine Auftragung der Fluoreszenzintensität von PI auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität von FITC auf der x-Achse sowie eine Unterteilung der Abbildung in vier Quadranten.



**Abb. 2.10: Annexin-V-FITC Messung einer unbehandelten (links) und einer mit Camptothecin behandelten (rechts) SK-BR-3 Probe; entnommen aus [79]**

Im frühen Stadium der Apoptose brechen Zellen die asymmetrische Verteilung der Phospholipide ihrer Zellmembran auf und verlagern das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) von der dem Zytosol zugewandten Seite auf die Membranaußenseite. Dadurch werden vermutlich Makrophagen zur schnellen Phagozytose angelockt, um eine Gewebsschädigung durch Zellyse zu vermeiden [80]. Annexin-V weist eine hohe Affinität zu Phospholipidspezies wie z.B. PS auf und bindet es Calcium-abhängig. Bei nekrotischen Zellen hingegen geht die Intaktheit der Zellmembran verloren und Bestandteile des

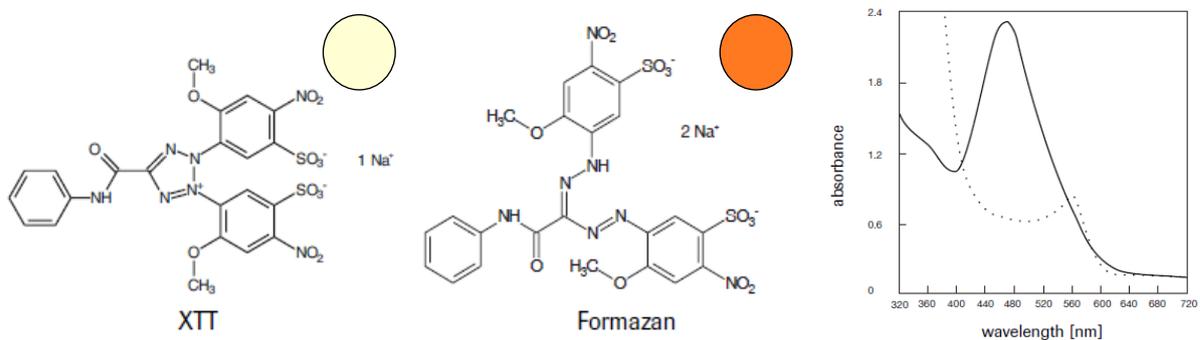
Zellinneren treten aus. Die Diskriminierung apoptotischer von nekrotischen Zellen gelingt durch die gleichzeitige Anwendung von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertem Annexin-V und einem weiteren Farbstoff, in diesem Fall PI, zum Ausschluss eines Lecks in der Zellmembran. Vitale, intakte Zellen sind negativ in Bezug auf beide Fluoreszenzen und finden sich im linken unteren Quadranten (vgl. Abb. 2.10). Zellen im frühen Stadium der Apoptose werden aufgrund der Bindung von Annexin-V an PS auf der Membranaußenseite FITC positiv, ohne dass PI durch die Zellmembran hindurch an die DNA binden kann. Somit kommen sie im rechten unteren Quadranten zu liegen (vgl. Abb. 2.10). Rechts oben befinden sich Zellen in der späten Apoptose mit einer positiven Fluoreszenz für beide Farbstoffe, da ihre Zellmembran permeabel für PI geworden ist (vgl. Abb. 2.10) [80]. Bei Zellen die direkt PI aufnehmen und so im linken oberen Quadranten zur Darstellung kommen, handelt es sich am ehesten um nekrotische Zellen, weil bei diesen der Farbstoff PI die zugrunde gehende Zellmembran ungehindert passieren kann.



**Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Annexin-V-Bindung durch Phospholipid-switch während der Apoptose [81]**

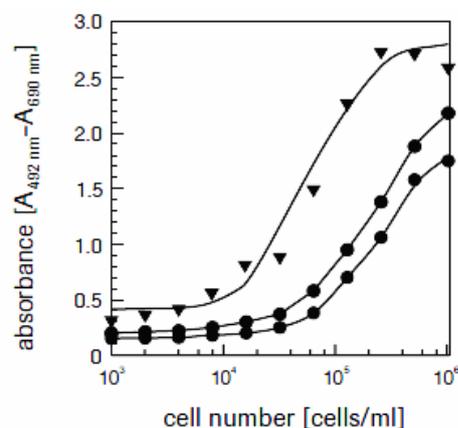
## 2.4 Messungen zur Bestimmung der Zellvitalität

Das Prinzip des XTT-Assays zur Messung von Zellproliferation und -vitalität wurde bereits 1988 von Scudiero et al. [82] beschrieben und in den folgenden Jahren immer weiter verbessert. Es beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffs XTT zum orangenen Farbstoff Formazan und der Tatsache, dass dieser Vorgang nur in metabolisch aktiven Zellen stattfindet. Das Ausmaß des Farbstoffumsatzes - und damit indirekt auch die Anzahl vitaler Zellen - kann nach einer mehrstündigen Inkubationszeit mit Hilfe eines ELISA Readers photometrisch bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche verwendet.



**Abb. 2.12: Vergleichende Darstellung der Strukturformeln und der Absorptionsspektren der beiden Farbstoffe XTT (gestrichelte Linie) und Formazan (durchgezogene Linie), nach [83]**

Dazu werden die Zellen in 96-Well-Platten kultiviert und behandelt, bevor sie dann für 4 – 24 Stunden mit dem gelben Farbstoff XTT (Endkonzentration 0,3 mg/ml) inkubiert werden. Während dieser Inkubationszeit wird XTT sukzessiv durch mitochondriale Dehydrogenasen zum orangenen Farbstoff Formazan reduziert, was schließlich mit Hilfe eines ELISA-Readers photometrisch quantifiziert werden kann. Eine Zunahme an vitalen, metabolisch aktiven Zellen, führt zu einer gesteigerten Aktivität mitochondrialer Reduktasen, was wiederum direkt mit der gebildeten Menge an Formazan korreliert:



**Abb. 2.13: Der Effekt unterschiedlicher Zellzahlen auf die Absorbanz, gemessen anhand der Zelllinie Ag8 nach 2-, 4- und 6 Stunden [83]**

Das Absorptionsmaximum des gebildeten Farbstoffs Formazan liegt zwischen 450 und 500 nm (siehe auch Abb. 2.11), die gewählte Referenzwellenlänge sollte über 650 nm liegen. [83] Höhere Absorptionswerte sprechen dementsprechend für eine größere Anzahl metabolisch aktiver Zellen und umgekehrt. So ist mit diesem Test eine indirekte Bestimmung der Stoffwechselaktivität und damit einhergehend auch der Vitalität einer Zellpopulation relativ einfach möglich. Die Limitationen des Assays werden unter 4.2.2 unter Berücksichtigung der damit gewonnenen Daten diskutiert.

### 3 Ergebnisse

Zur target-spezifischen Therapie beim Mammakarzinom stehen bereits verschiedene Therapeutika zur Verfügung, andere befinden sich in der klinischen Erprobung. In dieser Arbeit kamen die HER2-spezifischen Reagenzien Lapatinib, Pertuzumab und Trastuzumab, sowie der ER-Antagonist Tamoxifen zur Anwendung. Um die Estrogen-Sensitivität der beiden Zelllinien zu untersuchen, wurde außerdem versucht, die Zellproliferation mit Hilfe von Estradiol zu stimulieren.

Neben dem HER2- und dem Estrogenrezeptorstatus spielen eine Reihe weiterer, bisher nur zum Teil untersuchter Faktoren eine Rolle für das Ansprechen von Mammakarzinomen auf die target-spezifischen Therapeutika. Einer dieser möglichen Faktoren ist auch die Expression von HER4. In der vorliegenden Arbeit soll das Ansprechen HER2-positiver Mammakarzinom-Zellen auf antigen-spezifische Therapien in Abhängigkeit der HER4-Expression untersucht werden.

Dazu wurden die beiden Zelllinien BT474 und ZR.75.1 herangezogen, die sich - wie oben bereits beschrieben - vor allem in der Expression von HER4 unterscheiden. Während beide Zelllinien HER2 und ER exprimieren, trägt nur die Zelllinie ZR.75.1 zusätzlich HER4 auf ihrer Zelloberfläche. Deshalb lag der Schwerpunkt der Arbeit darauf, das Verhalten der Zelllinie ZR.75.1 in Anwesenheit unterschiedlicher target-spezifischer Behandlungen zu untersuchen und mit dem der Zelllinie BT474 zu vergleichen.

Diese Untersuchungen wurden anhand unterschiedlicher Parameter durchgeführt. Nach der Etablierung der Zelllinie ZR.75.1 in der Zellkultur, wurden zunächst Versuche zum Proliferationsverhalten in An- und Abwesenheit der beschriebenen Behandlungen auf Ebene der Zellzahl- und S-Phase-Fraktion (SPF) -Bestimmung durchgeführt. In einem weiteren Schritt folgten dann Versuche zur Ermittlung der „Zellvitalität“ unter den verschiedenen Bedingungen mit Hilfe eines XTT-Assays. Ergänzt wurden diese Ergebnisse dann schließlich durch Messungen zum Zelltot, um ein möglichst umfassendes Bild von möglichen Effekten durch die entsprechenden Reagenzien zu bekommen. In dieser Reihenfolge sollen im Folgenden nun auch die gewonnen Ergebnisse vorgestellt werden.

### 3.1 Etablierungsversuche zum Wachstumsverhalten der Zelllinie ZR.75.1 in der Zellkultur

In einem ersten Teil der Arbeit wurde eine Wachstumskurve der Zelllinie ZR.75.1 erstellt, um diese in der Zellkultur zu etablieren und den optimalen Zeitpunkt für die Behandlungen - nämlich den Zeitraum des exponentiellen Wachstums - zu ermitteln. Dazu kamen zunächst unterschiedliche Zellzahlen zur Aussaat, bis schließlich das in Kapitel 2.2.2 beschriebene Zellkulturprotokoll festgelegt wurde. Nachdem am Tag 0 jeweils 500.000 Zellen ausgesät wurden, wurde an den Tagen 2, 4, 7, 9 und 11 jeweils eine Kulturflasche geerntet und sowohl die Zellzahl, als auch die S-Phase-Fraktion bestimmt. Dargestellt werden im Folgenden die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen, die aus den Fehlerbalken ersichtlich sind. Die Zellzahlen wurden logarithmisch aufgetragen:

Zellzahl ZR.75.1, T-25, RPMI / 5% FKS

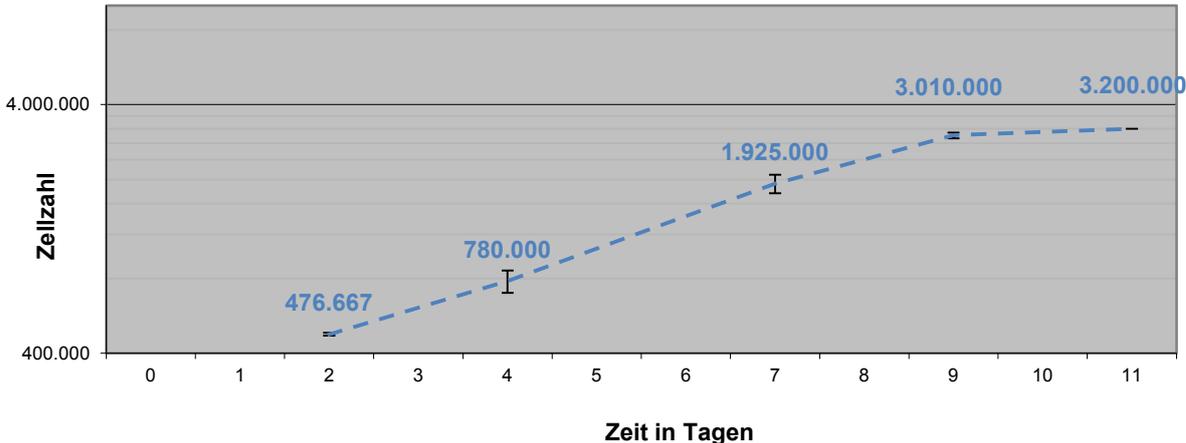


Diagramm 3.1: Wachstumskurve ZR.75.1, Zellzahl im zeitlichen Verlauf

SPF ZR.75.1, T-25, RPMI / 5% FKS

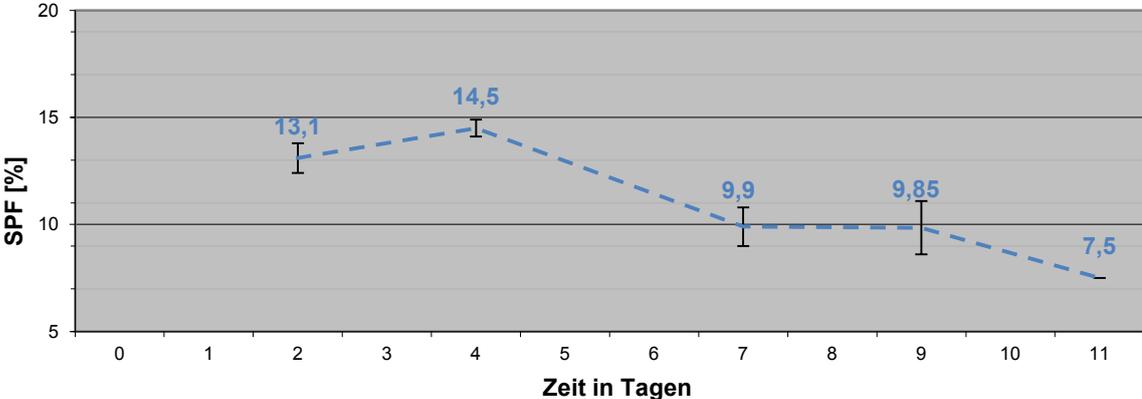


Diagramm 3.2: Wachstumskurve ZR.75.1, SPF im zeitlichen Verlauf

Wie aus Diagramm 3.1 ersichtlich wird, nimmt die Zellzahl zwischen Tag 2 und Tag 7 am deutlichsten zu. Während sie sich in diesen ersten sieben Tagen von 500.000 auf 1.925.000 nahezu vervierfacht, steigt sie dann bis zum Tag 11 nur noch weiter auf 3.200.000, wobei der Verlauf der Kurve deutlich abflacht.

Für die SPF ergibt sich mit 14,5% der höchste bestimmte Wert am Tag 4 nach Aussaat, der dann bis zum nächsten Messzeitpunkt am Tag 7 bereits auf 9,9% abfällt, um dann noch weiter, auf nur noch 7,5% am Tag 11 zu sinken.

Die Phase des logarithmischen Wachstums befindet sich dementsprechend unter den oben beschriebenen Bedingungen am ehesten im Zeitraum zwischen den Tagen 2 und 7, woraufhin die SPF im weiteren Verlauf absinkt und die Zellkultur in die stationäre Phase übergeht.

Diese Ergebnisse wurden für das Erstellen der Zellkultur- und Behandlungsschemata für alle weiteren Versuche berücksichtigt. Als Tag der Behandlung wurden die Tage 3 (72 h Behandlung) und 4 (48 h Behandlung) gewählt. Die Zellernte fand jeweils am Tag 6 statt. Da sich für eine Aussaat von 250.000 ZR.75.1 am Tag null ein ähnliches Verhalten der Zellkultur fand, die S-Phase-Fractionen aber insgesamt etwas höher waren, wurden die weiteren Versuche dann alle mit 250.000 Zellen pro T-25 durchgeführt.

### **3.2 Vergleichende Bestimmung der Zellzahlen und der S-Phase-Fractionen der Zelllinien ZR.75.1 und BT474**

Die folgenden Daten zeigen jeweils die Zellzahlen und die S-Phase-Fractionen (SPF) am Tag der Zellernte. Dabei sollen die Ergebnisse der beiden in diesen Versuchsreihen behandelten Zelllinien, ZR.75.1 und BT474, miteinander verglichen werden. Alle Werte beziehen sich auf die bei jedem Versuch mitgeführte unbehandelte Kontrolle und werden in Form von relativen Zahlen dargestellt. Für die Dauer der verschiedenen Behandlungen wurden jeweils 48 – und 72 Stunden gewählt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle sind mit einem ★ markiert. Berechnet wurden die Signifikanzen mit Hilfe des student's t-tests und der Software IBM® SPSS® Statistics, Version 19. Die Standardabweichungen können den Graphen anhand der Fehlerbalken entnommen werden.

#### **3.2.1 Ansprechen auf HER2-spezifische Reagenzien im Vergleich**

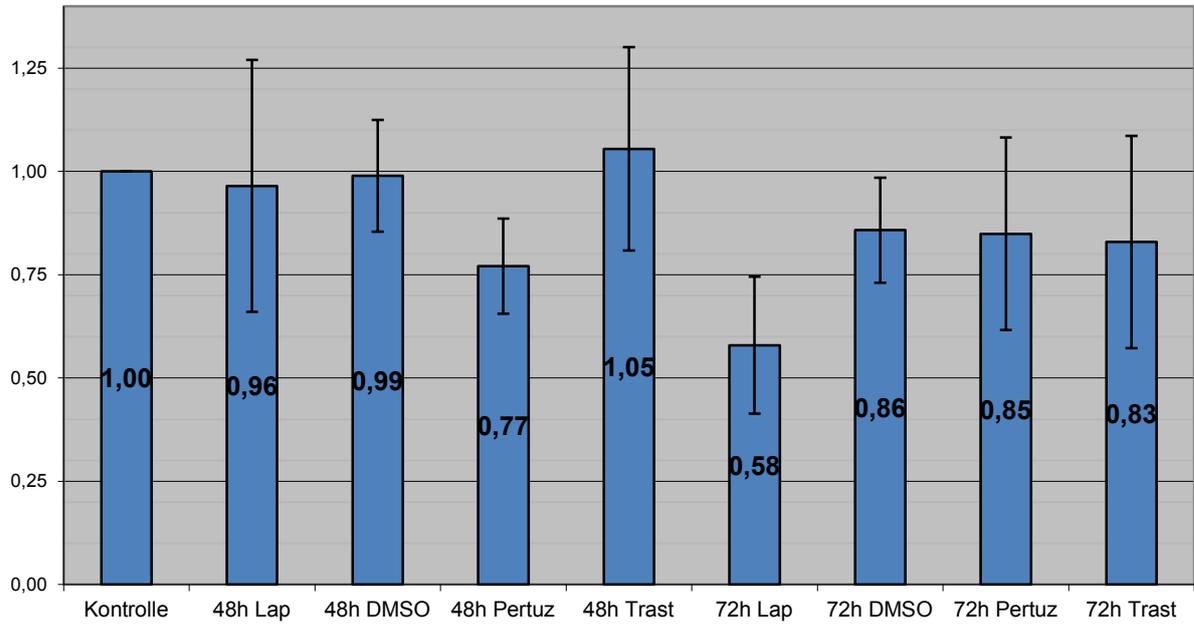
Die beiden Zelllinien ZR.75.1 und BT474 wurden jeweils für 48 – und 72 Stunden mit den HER2-spezifischen Reagenzien Lapatinib (Tyverb®), Pertuzumab (Perjeta®) und Trastuzumab (Herceptin®) behandelt.

Bei Pertuzumab und Trastuzumab handelt es sich um rekombinante monoklonale humanisierte Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des HER2-Tyrosinkinase-Rezeptors, für die gezeigt werden konnte, dass sie über Apoptoseinduktion das Überleben HER2-überexprimierender Mammakarzinom-Zellen inhibieren [63,84]. Für die Behandlungen mit Trastuzumab und Pertuzumab wurde jeweils eine Endkonzentration von 10 µg/ml gewählt.

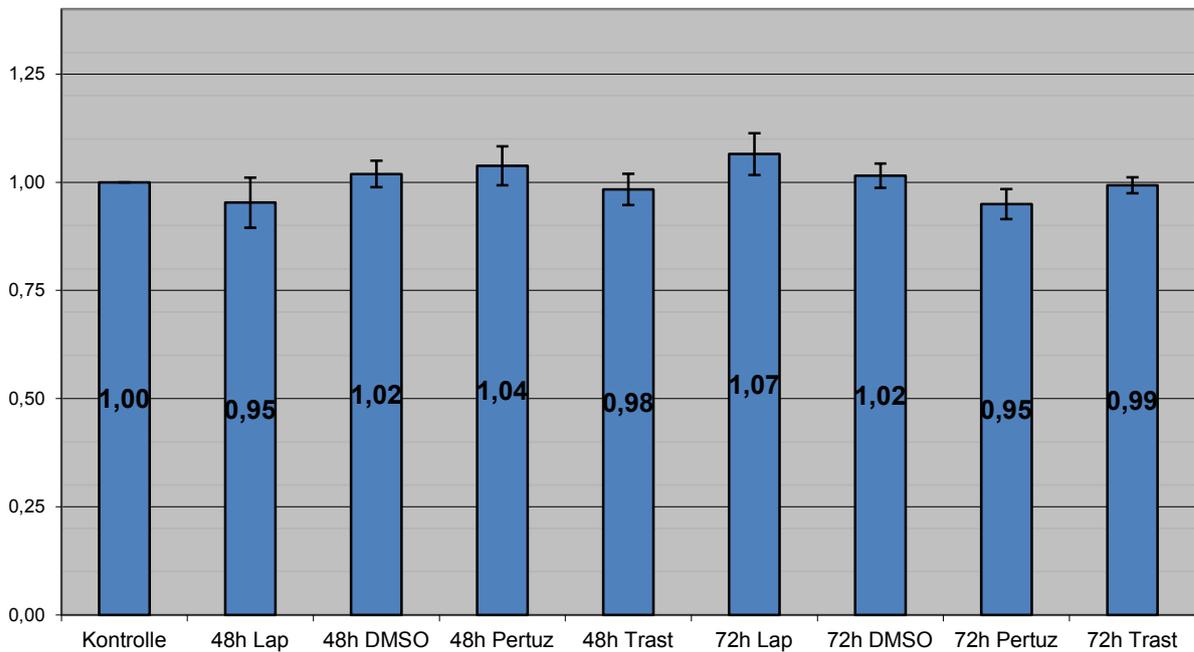
Lapatinib ist im Gegensatz dazu ein sogenanntes „small molecule“, das seine Wirkung als Tyrosinkinase-Inhibitor an den beiden Typ I Rezeptortyrosinkinasen EGFR (ErbB1) und HER2 (ErbB2) entfaltet [85]. Die  $IC_{50}$  von Lapatinib schwankt für unterschiedliche Mammakarzinom-Zelllinien sehr stark, wie zum Beispiel in einer Publikation von Konecny et al. beschrieben, zwischen 0,010-18,6 µmol/l [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde Lapatinib in zwei unterschiedlichen Endkonzentrationen verwendet, nämlich 0,1 µM und 1 µM. Da Lapatinib in DMSO gelöst vorlag, wurde auch eine 48- und 72-Stunden Kontrolle für DMSO mitgeführt, um mögliche Effekte durch dieses Lösungsmittel auszuschließen.

Die Zellkulturprotokolle, sowie das Färbeschema können dem Kapitel 2.2.2 entnommen werden. Die Daten beruhen mit Ausnahme der DMSO-Kontrollen auf jeweils mindestens drei Messreihen.

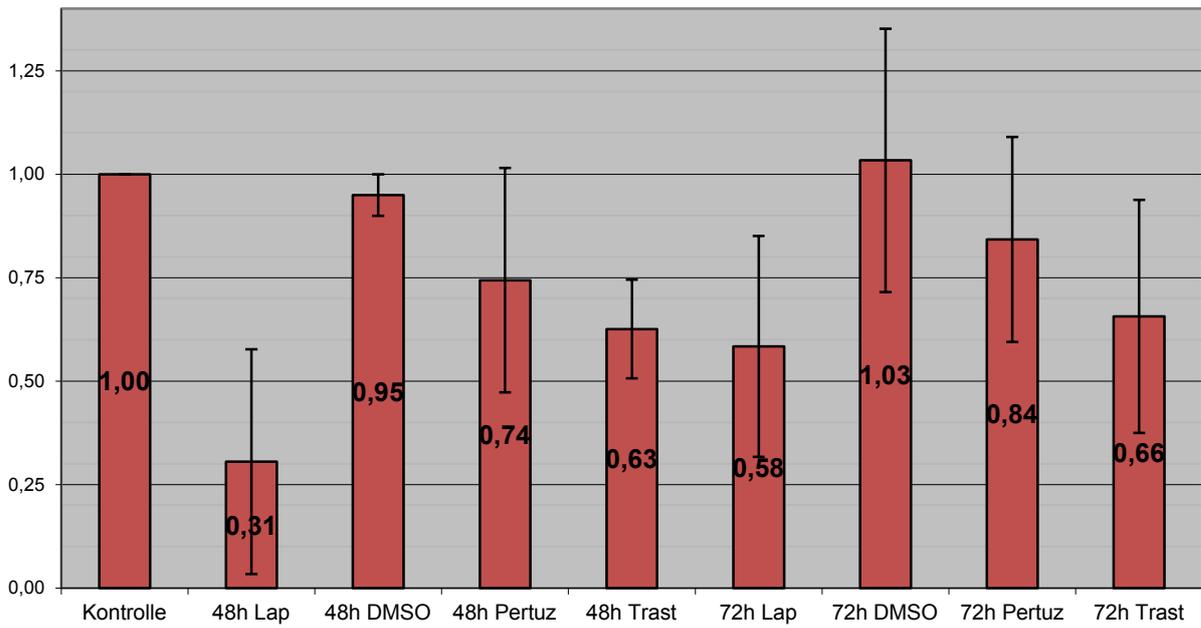
## Her2-targeting, Zellzahl ZR.75.1, relative Zahlen

*Diagramm 3.3: Her2-targeting ZR.75.1, Zellzahl*

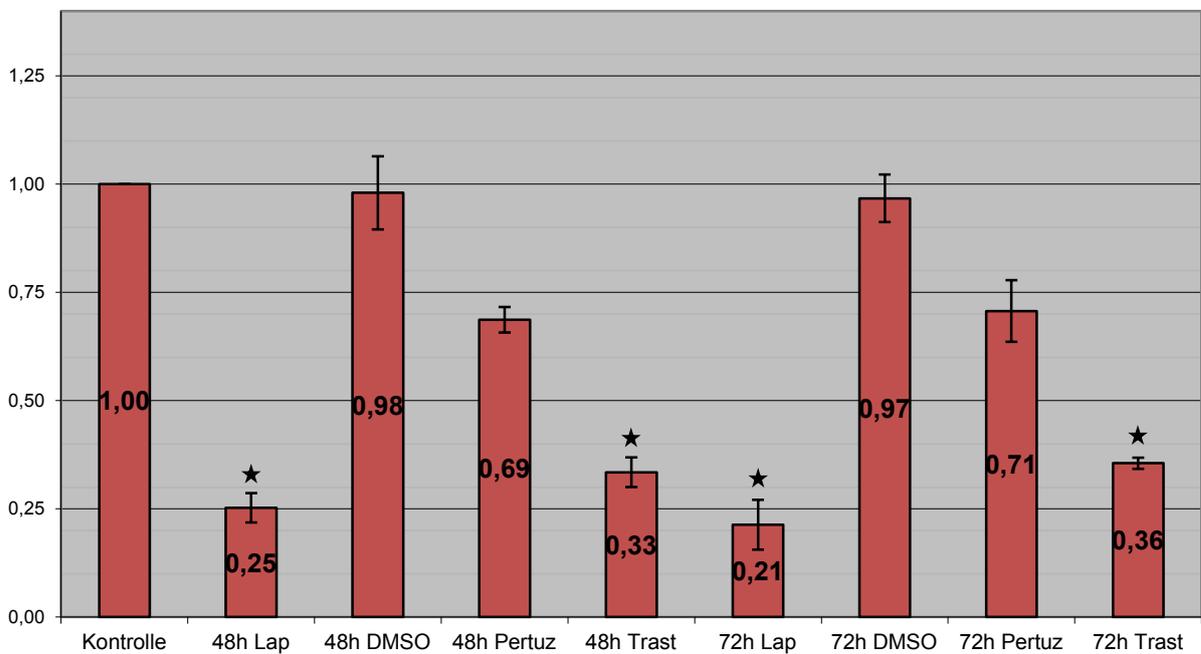
## Her2-targeting, SPF ZR.75.1, relative Zahlen

*Diagramm 3.4: Her2-targeting ZR.75.1, SPF*

## Her2-targeting, Zellzahl BT474, relative Zahlen

*Diagramm 3.5: Her2-targeting BT474, Zellzahl*

## Her2-targeting, SPF BT474, relative Zahlen

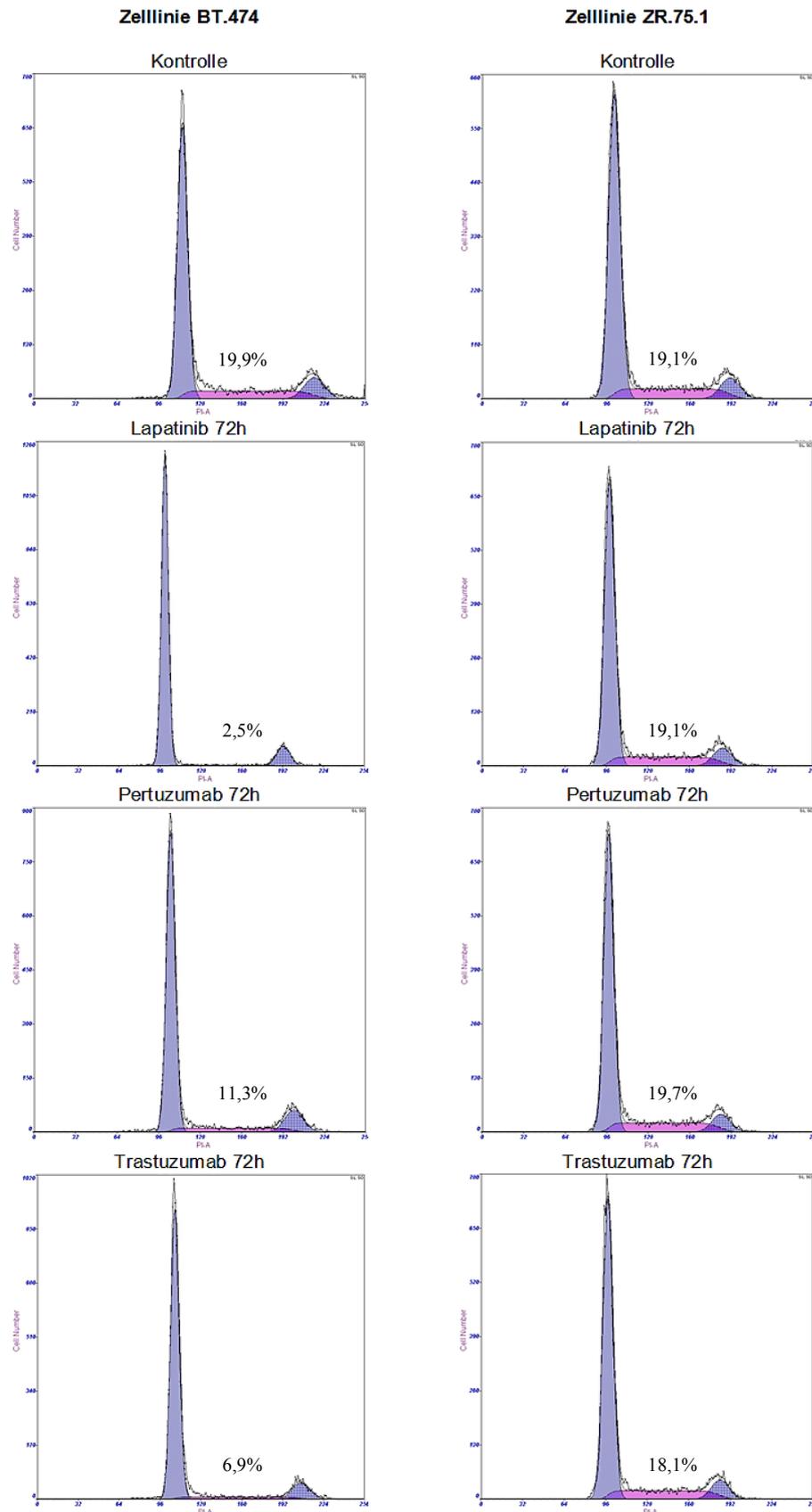
*Diagramm 3.6: Her2-targeting BT474, SPF*

Für die Zelllinie ZR.75.1 zeigen sich bei den gewählten Behandlungen insgesamt nur sehr geringe und statistisch nicht signifikante Effekte. Alle S-Phase-Fractionen liegen zwischen minimal 95% (Lapatinib 48h, Pertuzumab 72h) und maximal 107% (Lapatinib 72h).

Bei den Zellzahlen ergeben sich für die 48h-Behandlung mit Pertuzumab und die 72h-Behandlung mit Lapatinib die deutlichsten Effekte mit einer Abnahme um 23% bzw. 42% im Vergleich zur Kontrolle. Aufgrund hoher Standardabweichungen sind jedoch beide Effekte statistisch nicht signifikant. Auffällig ist, dass die Abnahme der Zellzahlen in beiden Fällen nicht durch die jeweiligen S-Phase-Fractionen von 104% und 107% erklärbar ist.

Die Effekte für die Zelllinie BT474 fallen wesentlich deutlicher aus, während sich der größte Effekt durch die Behandlung mit Lapatinib erzielen ließ. Unter den Behandlungen mit Lapatinib und Trastuzumab kam es zu einem statistisch signifikanten Abfall der S-Phase-Fractionen. Unter Lapatinib sank die SPF nach 48 Stunden (72 Stunden) auf 25% (21%), während sie von DMSO mit 98% (97%) nahezu unbeeinflusst blieb. Der zweitgrößte Effekt entstand durch die Behandlung mit Trastuzumab und führte zu einer Abnahme der SPF auf 33% (36%). Unter Pertuzumab sank die SPF zwar ebenfalls deutlich auf einen Wert von 69% (71%) ab, dieser Effekt ergab sich allerdings als statistisch nicht signifikant. Die Zellzahlen verhalten sich dabei entsprechend den jeweiligen S-Phase-Fractionen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Zelllinie ZR.75.1 von den HER2-targetspezifischen Agenzien Lapatinib, Pertuzumab und Trastuzumab weitgehend unbeeinflusst bleibt, während die Zelllinie BT474 sowohl auf der Ebene der Zellzahlen, als auch auf der, der S-Phase-Fractionen empfindlich auf die entsprechenden Behandlungen reagiert. Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Zelllinien, wird auch beim Betrachten der im Folgenden gezeigten DNA-Histogramme deutlich:



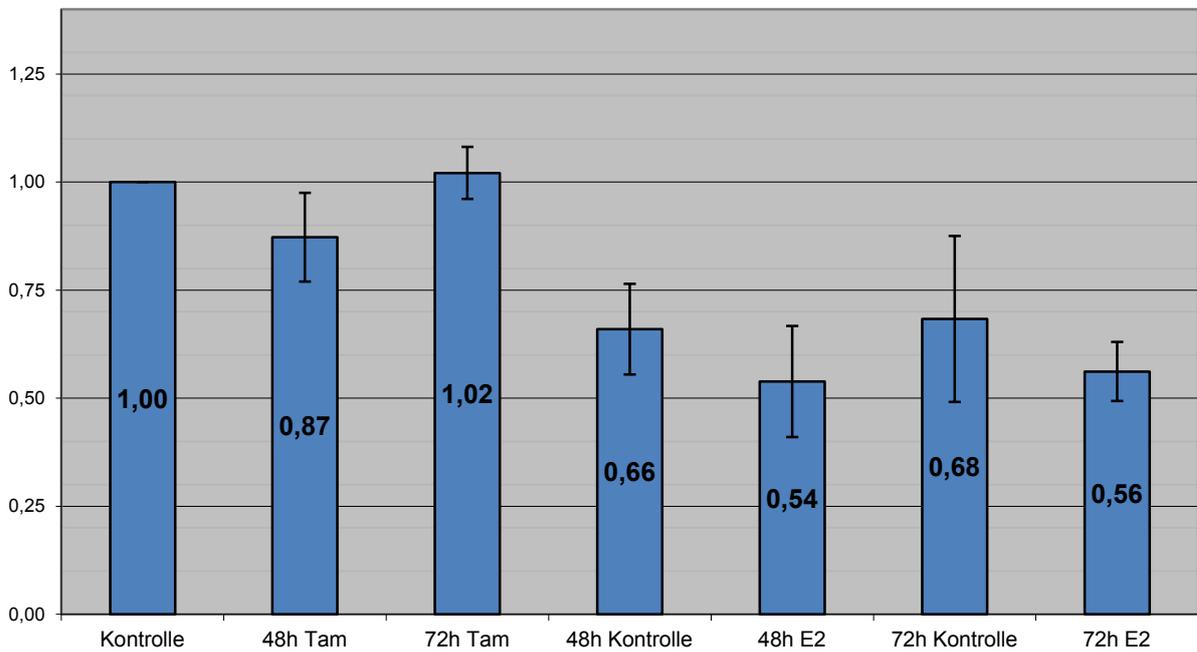
**Abb. 3.2:** DNA-Histogramme und SPF der Zelllinien BT474 und ZR.75.1 unter Her2-targetspezifischer Therapien im Vergleich

### 3.2.2 Ansprechen auf ER-spezifische Reagenzien im Vergleich

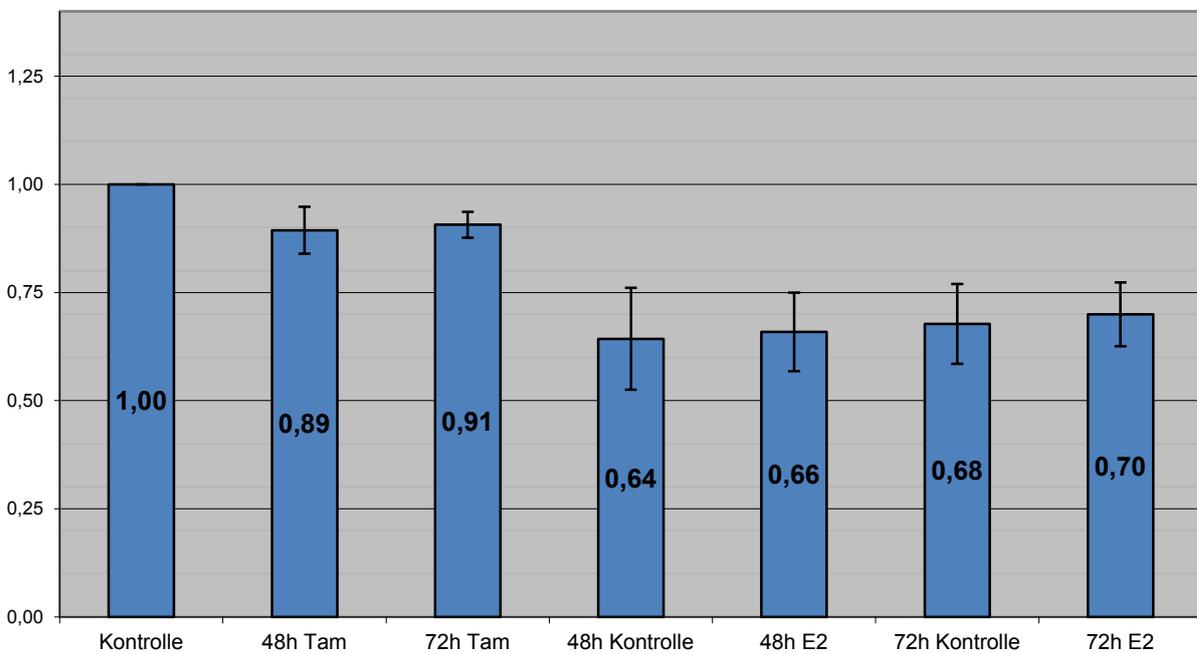
In einem weiteren Versuchsteil wurden die beiden Zelllinien ZR.75.1 und BT474 mit den ER-spezifischen Reagenzien Tamoxifen und Estradiol behandelt. Das Prodrug Tamoxifen wirkt über zwei aktive Metaboliten als kompetitiver Antagonist von Estradiol am Estrogen-Rezeptor (ER) [44]. Neuere Studien legen nahe, dass weitere Metaboliten *in vivo* möglicherweise auch über die Inhibition der Aromatase wirken, indem sie die Estradiolsynthese hemmen [45]. In dieser Arbeit wurde für Tamoxifen eine Endkonzentration in Höhe von 5  $\mu\text{M}$ , und für Estradiol in Höhe von 2,5 nM verwendet.

Bestimmt wurden, wie im vorhergehenden Versuch, die Zellzahlen und S-Phase-Fractionen 48 und 72 Stunden nach der entsprechenden Behandlung. Die Zellkulturprotokolle, die Endkonzentrationen der entsprechenden Behandlungen, sowie das Färbeschema können dem Kapitel 2.2.2 entnommen werden. Die unten dargestellten Daten beruhen jeweils auf mindestens vier Versuchsdurchgängen. Zur Berechnung von Signifikanzen wurden die Tamoxifen-Behandlungen mit der 5%-FKS-Kontrolle verglichen, für die beiden Estradiol-Behandlungen wurden dafür jeweils eigene Kontrollen mit 1%-FKS-mitgeführt.

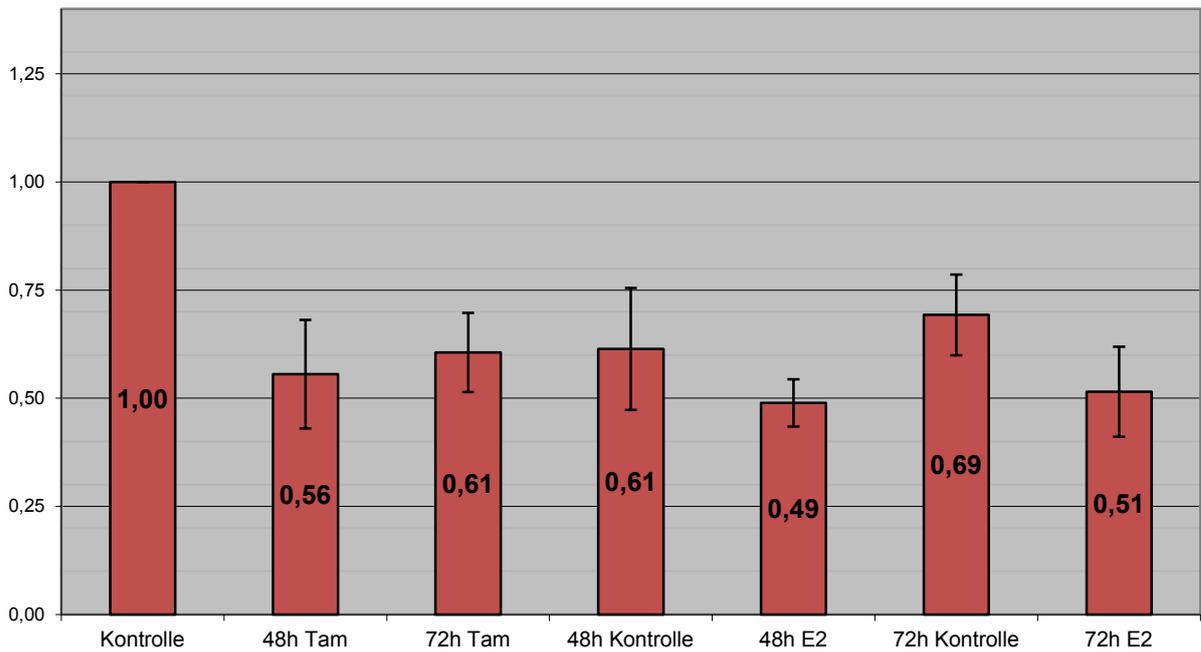
## ER-targeting, Zellzahl ZR.75.1, relative Zahlen

*Diagramm 3.7: ER-targeting, ZR.75.1, Zellzahl*

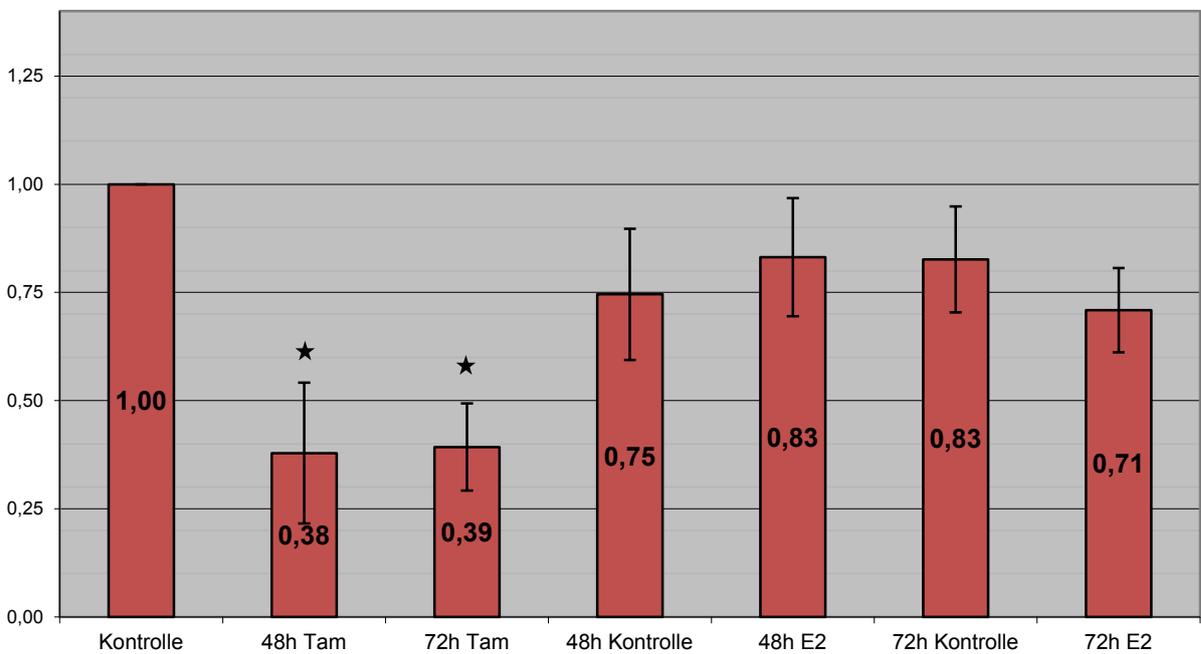
## ER-targeting, SPF ZR.75.1, relative Zahlen

*Diagramm 3.8: ER-targeting, ZR.75.1, SPF*

## ER-targeting, Zellzahl BT474, relative Zahlen

*Diagramm 3.9: ER-targeting, BT474, Zellzahl*

## ER-targeting, SPF BT474, relative Zahlen

*Diagramm 3.10: ER-targeting, BT474, SPF*

Bei der Zelllinie ZR.75.1 ergeben sich für die Behandlung mit Tamoxifen keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrolle. Die SPF sinkt nach der 48h (72h) -Behandlung auf 89% (91%) und auch die Zellzahlen sinken nach der 48h-Behandlung leicht ab auf 87%. Die Behandlungen mit Estradiol zeigen ebenfalls keine signifikanten Effekte und lassen auch keine Tendenz erkennen.

Im Vergleich zur Zelllinie ZR.75.1 führt Tamoxifen bei BT474 zu einer deutlicheren Inhibition der Zellproliferation. Die SPF sinkt nach 48h (72h) auf 38% (39%) und die Zellzahl nimmt ebenfalls ab, auf dann nur noch 56% (61%). Auffällig ist, dass sich auch bei der Zelllinie BT474 unter den gewählten Bedingungen keine eindeutigen Effekte durch Estradiol nachweisen lassen.

### Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zellzahl- und SPF-Bestimmung:

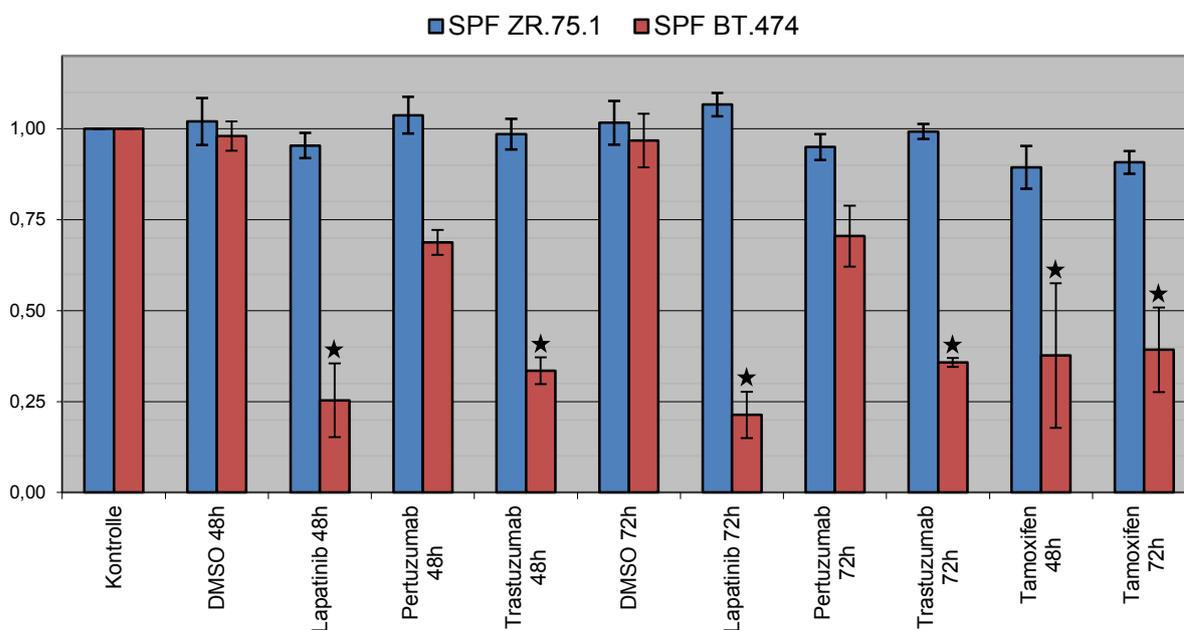


Diagramm 3.11: Vergleich der S-Phase-Fractionen der beiden Zelllinien ZR. 75. 1 und BT474

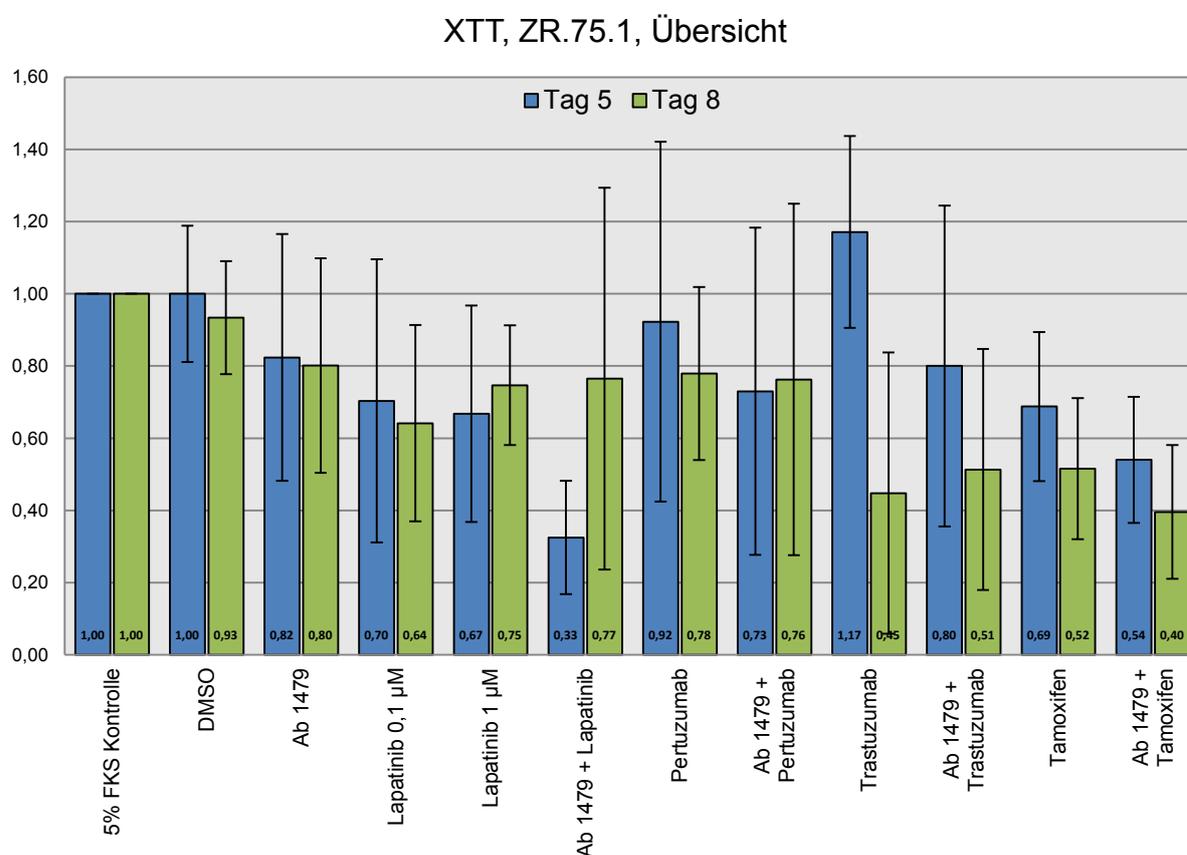
Behandlung	ZR.75.1	BT474
Lapatinib	-	++
Pertuzumab	-	+
Trastuzumab	-	++
Tamoxifen	-	++
Estradiol	-	-

- kein Effekt nachweisbar, + Effekt nachweisbar, statistisch aber nicht signifikant, ++ statistisch signifikanter Effekt nachweisbar

Tab. 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zellzahl- und SPF-Bestimmung

### 3.3 XTT Cell Proliferation Assay zur vergleichenden Bestimmung der Zellvitalität unter verschiedenen target-spezifischen Therapien

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Messungen zur Zellproliferation durch die Bestimmung der absoluten Zellzahl und der S-Phase-Fraktion, wurden in einem nächsten Schritt ergänzt, durch Versuche zur Bestimmung der „Zellvitalität“. Dazu wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) von Roche ® verwendet, das ermöglicht, über den Farbstoffumsatz von XTT zu Formazan auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen zu schließen. Der Versuchsablauf und das Cell Proliferation Kit II werden in den Kapiteln 2.2.3 und 2.4 genauer beschrieben.



**Diagramm 3.12: XTT Cell Proliferation Assay, ZR.75.1, 5% FKS**

Die in Diagramm 3.11 dargestellten Daten zeigen die gewonnenen Ergebnisse für die Behandlungen, die im Medium RPMI mit 5% FKS durchgeführt wurden. Gezeigt werden die Mittelwerte der gemessenen Absorbanzen bei einem Licht der Wellenlänge von 492 nm, im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Die Standardabweichungen sind aus den Fehlerbalken ersichtlich. Auf die Darstellung statistischer Signifikanzen wurde auf Grund der großen Standardabweichungen verzichtet.

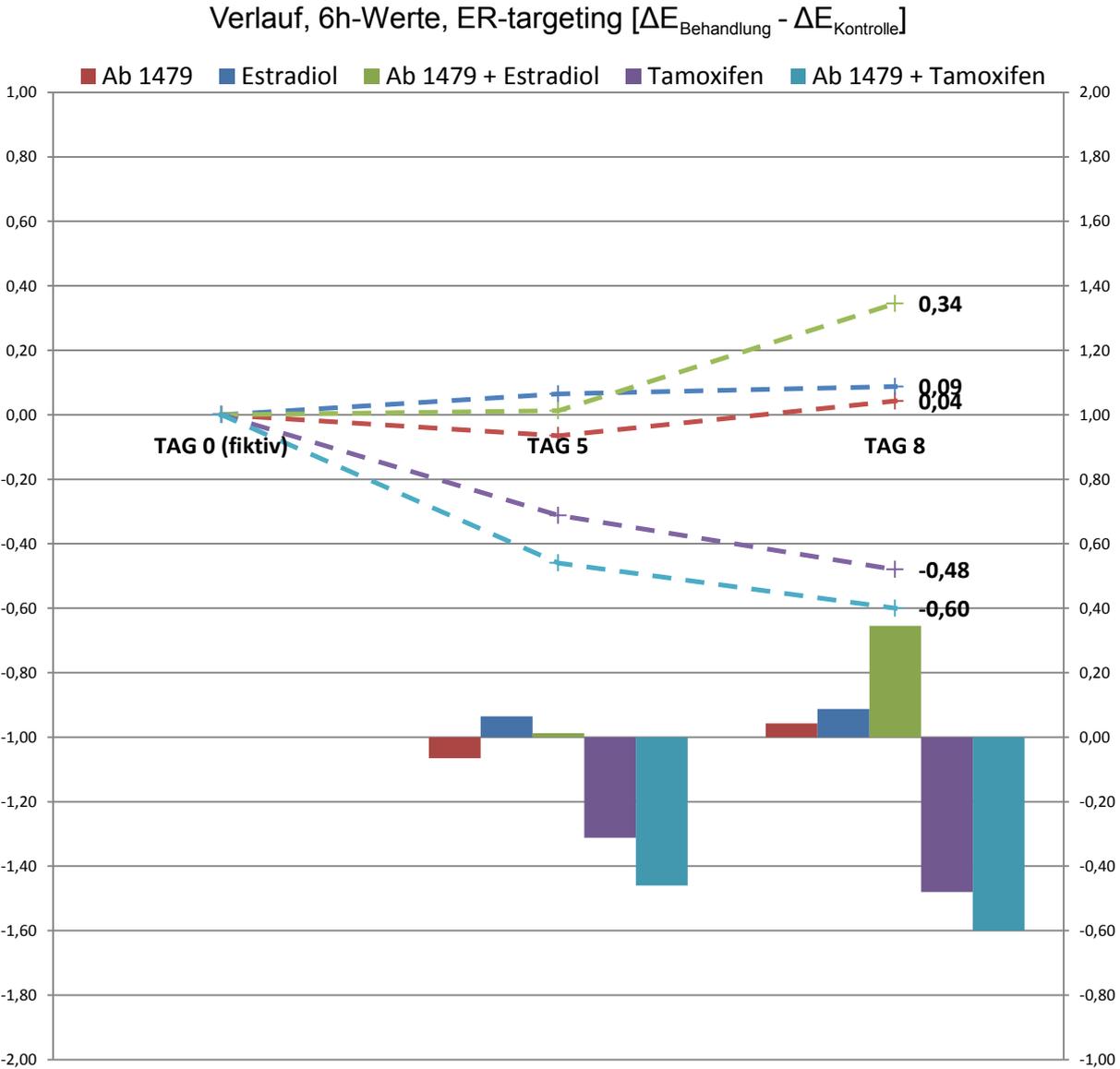
Die Zelllinie ZR.75.1 wurde in diesem Versuch mit den aus den vorherigen Versuchen bekannten HER2- und ER-spezifischen Reagenzien alleine und in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Ab1479 gegen die extrazelluläre Domäne von HER4 [60] behandelt. Aus dem Diagramm können die Ergebnisse an Tag fünf und Tag acht der Behandlung abgelesen werden.

Zunächst fällt auf, dass die Zellen der Zelllinie ZR.75.1 von 0,1% DMSO weitgehend unbeeinflusst bleiben, so dass mögliche Effekte durch Lapatinib nicht auf das Lösungsmittel DMSO zurückgeführt werden können.

Die deutlichste Abnahme der Absorbanz wird durch die Behandlungen mit Lapatinib sowie mit Tamoxifen alleine und in Kombination mit Ab1479 erzielt. Dabei sinken die Werte im Vergleich zur Kontrolle unter der Behandlung mit 1  $\mu$ M Lapatinib am Tag 5 (Tag 8) auf 67% (75%), unter Tamoxifen alleine auf 69% (52%) und unter Tamoxifen in Kombination mit Ab1479 sogar auf 54% (40%) ab.

Durch die Behandlung mit Ab1479 alleine ergeben sich zwar ebenfalls keine statistisch signifikanten Effekte, aber die Absorbanz bei 492 nm nimmt darunter dennoch deutlich ab, und zwar auf 82% vom Ausgangswert am Tag 5 und auf 80% am Tag 8. Auch durch die Kombination der Einzelbehandlungen mit Ab1479 lassen sich keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Behandlung ohne Ab1479 erzielen, es ist aber trotzdem zumindest die Tendenz erkennbar, dass die Effekte durch die Kombinationsbehandlungen insgesamt etwas stärker ausfallen, als durch die HER2- und ER-spezifischen Reagenzien alleine. Ein Wert der dabei besonders auffällt, ist die Kombination von 1  $\mu$ M Lapatinib mit Ab1479 am Tag 5: Hierdurch ergibt sich eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Abnahme der Absorbanz um 77%, während sie unter der Behandlung von 1  $\mu$ M Lapatinib alleine nur um 33% abnahm. Allerdings war dieser Effekt für den Tag 8 der Behandlung nicht reproduzierbar.

Wie in den vorhergehenden Versuchen, wurden die Zellen auch in dieser Versuchsreihe mit Estradiol behandelt. Dazu wurden die entsprechenden Zellen auf das Medium RPMI mit nur 1% FKS umgestellt. Zum Vergleich wurde eine eigene Kontrolle für dieses Medium mitgeführt. Die Ergebnisse dieser Behandlungen sind in Diagramm 3.12 dargestellt:



**Diagramm 3.13: XTT Cell Proliferation Assay, ZR.75.1, ER-targeting**

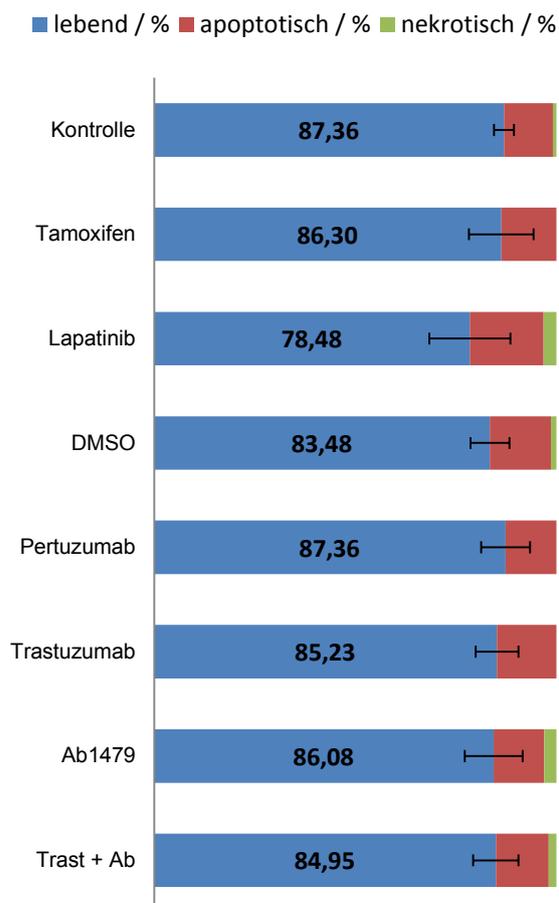
Zur besseren Veranschaulichung werden hier die Differenzbeträge zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle dargestellt. Da Tamoxifen, wie oben bereits beschrieben, alleine und in Kombination mit Ab1479 zu einer deutlichen Abnahme metabolisch aktiver Zellen führt, sind die Werte in dieser Abbildung dementsprechend negativ. Im Gegensatz dazu kommt es durch das Estradiol-Treatment zu einem positiven Ausschlag, also zu einer Zunahme metabolisch aktiver Zellen. Am Tag 8 ergibt sich für die Behandlung mit Estradiol alleine eine Wert von +9%, für die Kombination von Estradiol mit Ab1479 sogar von +34%. Auf Grund hoher Standardabweichungen sind diese Werte zwar statistisch nicht signifikant, aber eine Tendenz ist erkennbar.

### **3.4 Annexin V-FITC Messungen zum Ansprechen der Zelllinie ZR.75.1 auf HER2-, ER- und HER4-spezifische Reagenzien**

Um nachzuweisen, ob und in welchem Ausmaß die unterschiedlichen Therapiekonzepte bei der untersuchten Zelllinie ZR.75.1 zum Zelluntergang durch Apoptose oder Nekrose führen, wurden in einem letzten Versuchsteil Annexin V-FITC Messungen durchgeführt. Behandelt wurden die Zellen dafür mit den aus den vorherigen Versuchen bekannten Reagenzien über einen Zeitraum von jeweils 72 und 96 Stunden. Das Prinzip der Annexin V-FITC Messung, sowie das genaue Versuchsprotokoll, werden in den Kapiteln 2.2.4 und 2.3.4 beschrieben.

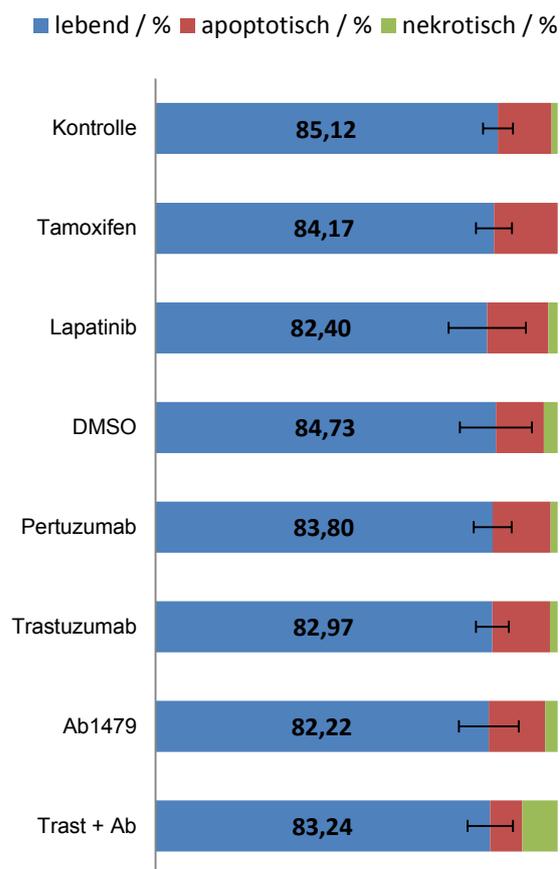
Dargestellt werden im Folgenden die Mittelwerte der absoluten Zahlen mit den entsprechenden Standardabweichungen, die den Graphen anhand der Fehlerbalken entnommen werden können. Es wird dabei zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden. Sowohl für die 72h- als auch für die 96h-Behandlung wurde eine eigene Kontrolle mitgeführt.

ZR.75.1, 5% FKS, 72 h



**Diagramm 3.14: Annexin V-FITC, ZR.75.1, 5% FKS, 72 h**

ZR.75.1, 5% FKS, 96 h



**Diagramm 3.15: Annexin V-FITC, ZR.75.1, 5% FKS, 96 h**

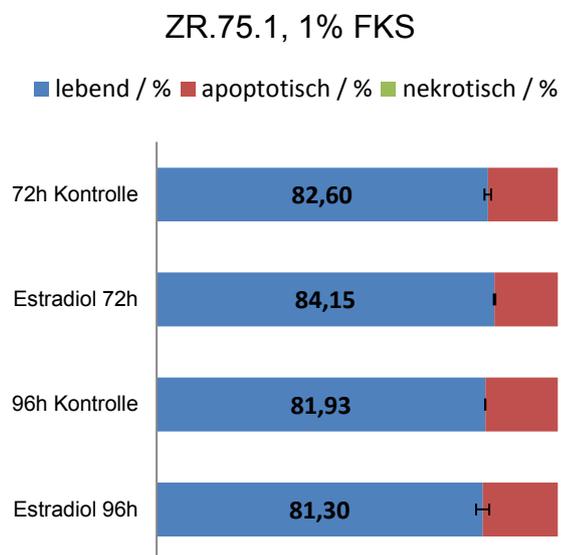
Insgesamt ergaben sich für die Annexin-V-FITC-Messungen keine signifikanten Effekte durch die untersuchten Behandlungen für die Zelllinie ZR.75.1. Für die unbehandelten Zellen im Medium RMPI mit 5% FKS ergab sich für die lebenden Zellen ein Anteil von 87,36% in der 72h-Kontrolle und von 85,12% in der 96h-Kontrolle.

Die deutlichsten Effekte wurden unter der Behandlung mit Lapatinib beobachtet, worunter der Anteil lebender Zellen zugunsten apoptotischer und nekrotischer Zellen auf 78,48% beziehungsweise 82,40% abnahm. Zwar nahmen die lebenden Zellen auch unter 0,1% DMSO ab, dieser Effekt war jedoch jeweils geringer, als der durch die Lapatinib-Behandlung.

Unter den Behandlungen mit Tamoxifen, Pertuzumab und Trastuzumab wurden keine wesentlichen Effekte beobachtet.

Zwar nahm auch unter den Behandlungen Ab1479 und Trastuzumab kombiniert mit Ab1479 der Anteil lebender Zellen ab, allerdings sind auch diese Effekte statistisch nicht signifikant. Auffallend ist noch der Anteil nekrotischer Zellen unter der Therapie mit Trastuzumab in

Kombination mit Ab1479 nach 96 Stunden: Dieser ist mit 8,76% deutlicher höher als alle anderen ermittelten Werte. Allerdings ergab sich auch dieser Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als statistisch nicht signifikant.



**Diagramm 3.16: Annexin V-FITC, ZR.75.1, 1% FKS**

In Diagramm 3.15 sind die Ergebnisse zur Behandlung mit Estradiol im Medium RPMI mit 1% FKS dargestellt. Sowohl für die 72h- als auch für die 96h-Behandlung wurde eine eigene Kontrolle mitgeführt. Für die 72h-Behandlung konnte ein leichter Anstieg der lebenden Zellen von 82,60% auf 84,15% beobachtet werden. Dieser Effekt war für die 96h-Behandlung nicht reproduzierbar, unter der der Anteil lebender Zellen von 81,93% sogar leicht abnahm auf 81,30%. Beide Effekte sind statistisch im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle nicht signifikant.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ansprechen der Zelllinien ZR.75.1 und BT474 auf target-spezifische Therapien in der statischen Zellzyklusanalyse

Eine ganze Reihe von Studien schreibt dem HER4-Rezeptor antiproliferative Effekte zu. Es gibt Hinweise, dass Mammakarzinom-Patientinnen mit einer HER2/HER4-Koexpression ein verbessertes Gesamtüberleben und höhere Ansprechraten auf target-spezifische Therapien zeigen, als Patientinnen mit HER2-positiven, aber HER4-negativen Tumoren [68-70]. Beim Betrachten der in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus der statischen Zellzyklusanalyse (Abschnitt 3.2) fällt jedoch auf, dass die HER4-positive Zelllinie ZR.75.1 im Vergleich zur HER4-negativen Zelllinie BT474 gegenüber den gewählten Behandlungen nahezu vollständig resistent ist. Dies ist insofern bemerkenswert, als BT474 eine sehr ausgeprägte HER2-Überexpression mit zugrundeliegender HER2-Genamplifikation aufweist, während ZR.75.1 im Vergleich dazu kaum onkogene Alterationen besitzt. Bei der Zelllinie BT474 scheint eine sogenannte HER2-Onkogen-Abhängigkeit (*onkogene addiction*) vorzuliegen. Wird dieser Signalweg durch gezielte Behandlungen inhibiert, nehmen Zellzahl und SPF deutlich ab. Die Zelllinie ZR.75.1 muss dagegen über bisher unbekannte molekulare Mechanismen verfügen, die sie gegen diese Behandlungen resistent macht. Im Folgenden sollen nun - unter besonderer Berücksichtigung der HER4-Expression - mögliche Ursachen für diese Beobachtung diskutiert werden.

#### 4.1.1 Ansprechen auf die Behandlung mit Lapatinib (Tyverb®)

Die Behandlung mit dem dualen Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib mit der Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$  führt bei der Zelllinie BT474 zu einer signifikanten Abnahme der S-Phase-Fraktion auf ein Viertel des Ausgangswertes und damit zu den stärksten Effekten unter den in dieser Arbeit untersuchten Behandlungen. Die Zellen der Zelllinie ZR.75.1 hingegen bleiben davon weitgehend unbeeinflusst. Dies steht im Einklang mit den Daten von Konecny et al., die die Lapatinib Konzentration zum Erreichen der  $\text{IC}_{50}$  für BT474 mit 0,02  $\mu\text{M}$  und für ZR.75.1 mit 9,9  $\mu\text{M}$  angeben [54]. In einer Studie mit insgesamt 31 Mammakarzinom-Zelllinien konnten sie zeigen, dass eine direkte lineare Korrelation zwischen dem Ausmaß der HER2-Überexpression und der Sensitivität gegenüber Lapatinib besteht [54]. Demnach wäre das unterschiedliche Ansprechen der beiden in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien auch alleine durch die HER2-Expression zu erklären. Wie unter 2.1.1 beschrieben liegt bei BT474 neben

einer hohen HER2-Überexpression zusätzlich eine HER2-Gen-Amplifikation vor, während die Zelllinie ZR.75.1 eine im Vergleich dazu verhältnismäßig niedrige HER2-Expression aufweist. Ob die HER4-Expression ebenfalls einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber einer Therapie mit Lapatinib hat, lässt sich aus den vorliegenden Daten also nicht zweifelsfrei ableiten.

Wang et al. konnten jedoch zeigen, dass bei der Resistenzentwicklung gegen Lapatinib - neben kompensatorischen Effekten innerhalb der HER-Familie - auch der Estrogen-Rezeptor als alternativer Signalweg eine Rolle spielt [86]. Da 4ICD - die lösliche intrazelluläre Domäne von HER4 JM-a - als potenter Ko-Aktivator von ER $\alpha$  fungieren kann [87], ist deshalb durchaus denkbar, dass diese Form des *Cross-signaling* zwischen HER4/4ICD und dem ER für die Entstehung von Resistenzen gegen Lapatinib zusätzlich von Bedeutung ist.

#### **4.1.2 Ansprechen auf die Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)**

Bei der Zelllinie BT474 kann durch Trastuzumab die SPF ebenfalls signifikant gesenkt werden und zeigt nach Lapatinib die zweitdeutlichsten Effekte. Die Zelllinie ZR.75.1 erweist sich hingegen auch für diese Behandlung als resistent.

Auf der Suche nach geeigneten prädiktiven Biomarkern für die Therapie mit Herceptin<sup>®</sup> wurden in einer Studie aus dem Jahr 2009 retrospektiv die ErbB-Expressionsprofile von 48 HER2-positiven, metastasierten und mit Herceptin<sup>®</sup> behandelten Mammakarzinomen bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass die Patientinnen mit HER4-Koexpression ein signifikant höheres Gesamtüberleben aufwiesen als jene mit HER4-negativem Rezeptorstatus. Diese Beobachtung wurde dahingehend interpretiert, dass die HER4-Koexpression möglicherweise einen positiven Effekt auf die HER2-spezifische Therapie mit Trastuzumab hat [70]. Die hier aus den vergleichenden *in-vitro*-Messungen erhobenen Daten mit den beiden Zelllinien ZR.75.1 und BT474 können diese Vermutung jedoch nicht untermauern. Eine mögliche Erklärung für diese scheinbar gegensätzlichen Beobachtungen ist, dass HER2/HER4 doppelt positive Patientinnen zwar insgesamt eine bessere Prognose aufweisen als HER4 negative Patientinnen, die HER4-Koexpression aber keinen direkten positiven Effekt auf die Therapie mit Trastuzumab hat. Demnach wäre die HER4-Koexpression zwar als positiver prognostischer Marker, nicht aber als positiver prädiktiver Marker für eine Behandlung mit Herceptin<sup>®</sup> bei HER2-positiven metastasierten Mammakarzinomen anzusehen. Für diesen Erklärungsansatz spricht ebenfalls die Beobachtung, dass in der o. g. Studie HER2/HER4 doppelt positive Patientinnen auch unter konventioneller Therapie ein höheres Gesamtüberleben aufwiesen als HER4-negative Patientinnen. Dies steht im Einklang mit

einer ganzen Reihe von Publikationen die zeigen, dass HER4-positive Mammakarzinome therapieunabhängig mit einer geringeren Malignität und damit einhergehend mit einer besseren Prognose assoziiert sind [69,88,89].

#### **4.1.3 Ansprechen auf die Behandlung mit Pertuzumab (Perjeta®)**

Während die Zelllinie ZR.75.1 nicht auf die Behandlung mit Pertuzumab anspricht, kommt es bei den Zellen der Zelllinie BT474 zu einer Abnahme der SPF, die allerdings im Vergleich zu den Effekten unter Trastuzumab und Lapatinib deutlich geringer ausfällt. Dies steht im Einklang zu einer Reihe von Studien in denen gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Trastuzumab alleine zwar wirkungsvoller ist als mit Pertuzumab alleine, dass durch eine Kombination beider Wirkstoffe aber ein synergistischer Effekt erzielt werden kann [79,84,90]. Die Autoren führen dies auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen dieser beiden Therapien zurück. Wie unter 1.5.2 beschrieben, hemmt Pertuzumab - im Gegensatz zu Trastuzumab - die laterale Signaltransduktion, indem es die Dimerisierung von HER2 mit weiteren Rezeptoren der HER-Familie verhindert. Es wird deshalb vermutet, dass nicht die HER2-Überexpression alleine, sondern auch das Expressionsmuster der anderen Rezeptoren der HER-Familie für das Ansprechen auf Pertuzumab von Bedeutung ist [91]. Eine besondere Rolle wird dabei der HER3-Expression zugeschrieben. Demnach soll eine geringe HER3-Expression mit einem besseren Ansprechen auf Pertuzumab assoziiert sein und umgekehrt [91].

Führt man die unterschiedliche Sensitivität der beiden Zelllinien BT474 und ZR.75.1 alleine auf deren HER4-Expression zurück, so gilt für HER4 das gleiche: Hohe Expressions-Spiegel führen zu einem schlechteren Ansprechen auf Pertuzumab. Da sich die beiden Zelllinien aber auch in ihrer HER3-Expression unterscheiden ist diese Schlussfolgerung nicht ohne weiteres möglich.

#### **4.1.4 Ansprechen auf die Behandlung mit Tamoxifen**

Auch die Bedeutung von HER4 für die endokrine Therapie bei ER-positiven Mammakarzinomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Naresh et al. beschreiben, dass über 40% der ER $\alpha$ -positiven Patientinnen nicht auf eine Therapie mit Tamoxifen ansprechen und führen dies unter anderem auf eine fehlende Expression von HER4 zurück. Sie konnten zeigen, dass die Suppression von HER4 in den beiden Zelllinien MCF-7 und T47D *in vitro* zu einer Tamoxifen-Resistenz führt [92]. Eine gegensätzliche Bedeutung wird der HER4-Expression von Sutherland und Hutcheson et al. zugeschrieben. Sie haben gezeigt, dass es

unter der Therapie mit Fulvestrant zu einer gesteigerten Expression von HER3 und HER4 kommt. Dadurch steht den Karzinomzellen ein möglicher Resistenz-Mechanismus gegen die endokrinen Therapien zur Verfügung, indem es zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber den HER3/HER4-spezifischen Wachstumsfaktor Heregulin- $\beta$ 1 kommt [93,94]. Zu dieser Beobachtung passen auch die Ergebnisse dieser Arbeit, da die Zelllinie ZR.75.1 kaum auf die Behandlung mit Tamoxifen anspricht, während es bei der Zelllinie BT474 unter dieser Therapie zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation kommt.

Ursächlich für diese scheinbar unvereinbar entgegengesetzten Beobachtungen sind möglicherweise die unter 1.3.3 beschriebenen komplexen und teilweise gegensätzlichen Effekte von HER4 und 4ICD - der löslichen intrazellulären Domäne von HER4 JM-a. Thor et al. plädieren deshalb dafür, die Expression von HER4 auf der Zelloberfläche und von 4ICD im Zytosol / Nukleus gesondert voneinander zu betrachten [27,95]. Da in der vorliegenden Arbeit nur die HER4-, nicht aber die 4ICD-Expression berücksichtigt wurde, ist die Aussagekraft der hier gewonnenen Daten begrenzt. In einer großen retrospektiven Studie konnten Thor et al. zeigen, dass die Expression von 4ICD als unabhängiger positiver prognostischer Faktor und als positiver prädiktiver Faktor für die endokrine Therapie bei ER-positiven Mammakarzinom-Patientinnen anzusehen ist [27]. Als Konsequenz daraus sollte bei diesem speziellen Patientenkollektiv auf den Einsatz von pan-ErbB-Inhibitoren und HER4-Inhibitoren im Speziellen verzichtet werden, da die Prognose der Patienten dadurch verschlechtert werden könnte [27].

Ferner konnte gezeigt werden, dass in maligne entartetem Mammagewebe überwiegend die Isoform JM-a exprimiert wird und es in diesen Geweben zu einem vermehrten Ektodomain-*Shedding* kommt [32,60,96]. Deshalb ist bei einer hohen HER4-Expression auch ein hoher 4ICD-Spiegel zu erwarten, so dass insgesamt vieles dafür spricht, dass bei ER-positiven Patientinnen die positiven Effekte von HER4 (4ICD) überwiegen und HER4 (4ICD) deshalb als positiver prognostischer Marker anzusehen ist, auch wenn dessen Expression möglicherweise nicht als prädiktiver Marker geeignet ist.

## 4.2 Kritische Betrachtung der gewonnenen Daten zur Zellvitalität

### 4.2.1 Überblick

Die Daten der statischen Zellzyklusanalyse haben gezeigt, dass die Zelllinie ZR.75.1 gegen alle gewählten Behandlungen äußerst resistent ist und durch diese keine Effekte auf die Zellproliferation erreicht werden können. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob sich Effekte auf die Zellvitalität nachweisen lassen und ob diese durch den Einsatz des Antikörpers Ab1479 beeinflussbar sind. Wie unter 2.4 beschrieben beruht das Prinzip des XTT Assays auf der von mitochondrialen Enzymen katalysierten Reduktion des gelben Farbstoffs XTT zum orangenen Farbstoff Formazan in metabolisch aktiven Zellen. Das Ausmaß dieses Farbstoffumsatzes soll dementsprechend direkt proportional zur Anzahl vitaler, metabolisch aktiver Zellen sein. Doch trotz großer Versuchszahlen in der vorliegenden Arbeit (n=6 bis n=21), sind die Standardabweichungen der gewonnenen Ergebnisse extrem groß, weshalb eine Aussage aufgrund dieser Daten nur beschränkt möglich ist und allenfalls Tendenzen daraus abgeleitet werden können.

### 4.2.2 Limitationen des XTT Assays

Im Folgenden sollen nun Limitationen des XTT Assays und mögliche Fehlerquellen im Versuchsaufbau diskutiert werden. Triviale Fehlerquellen sind, wie in jedem Experiment, Ungenauigkeiten bei der Versuchsdurchführung, insbesondere beim Pipettieren. Wie unter 2.4 beschrieben wurden die XTT-Assays in 96-Well-Platten durchgeführt und viele Arbeitsschritte mit einer Mehrkanalpipette vorgenommen. Neben dem zufälligen Fehler von Pipettier-Ungenauigkeiten wurde auch immer wieder das Problem beobachtet, dass sich durch das Pipettieren in manchen Wells Luftblasen bilden, was zu großen Messabweichungen bei der Bestimmung der Absorbanz im ELISA-Reader führen kann. So ergaben sich teilweise für mehrere direkt hintereinander durchgeführte Messungen derselben 96-Well-Platte große Unterschiede.

Die wichtigste Limitation dieses Assays zur Beurteilung der Sensitivität unterschiedlicher Zelllinien gegenüber verschiedenen targeted therapies liegt aber sicherlich im Testdesign selbst begründet. Zwar konnte von Scudiero et al. gezeigt werden, dass der Farbstoffumsatz von XTT zu Formazan direkt proportional zur Zellzahl ist, die bestimmten Absorptionsunterschiede erlauben aber tatsächlich nur einen Rückschluss auf die gesamte Reduktive-Kapazität in dem entsprechenden Well. Diese ist aber neben der Zellzahl auch von einer Reihe anderer Faktoren abhängig, wie zum Beispiel von Enzymregulationen, dem pH-

Wert, den zellulären Ionenkonzentrationen, und einer Vielzahl weiterer Umgebungsbedingungen. Jede Änderung dieser Faktoren führt zu einer Veränderung der Reduktiven-Kapazität und beeinflusst so die abschließende Absorptionsmessung [82]. Eine Abnahme der Absorbanz unter einer bestimmten Therapie ist zunächst also nur Ausdruck einer Verminderung der gesamten Reduktiven-Kapazität durch diese Behandlung und kann nicht ohne weiteres auf eine eingeschränkte Zellvitalität oder gar einen Zelluntergang zurückgeführt werden. Eine solche Schlussfolgerung wäre nur unter der Annahme möglich, dass die zelluläre Reduktive-Kapazität über den gesamten Versuchszeitraum - auch unter dem Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen - konstant bleibt.

Scudiero et al. beschreibt außerdem, dass durch den Zusatz einer ECR die Komplexität der zellulären reduktiven Umgebung noch gesteigert wird, was zu einer weiteren Zunahme der Variabilität und damit zu einem Mangel an Reproduzierbarkeit der gewonnenen Daten führen kann [82].

Ein weiterer Nachteil des XTT-Assays besteht darin, dass es sich um ein Verfahren mit einer Endpunktbestimmung handelt. Die Wahl des richtigen Endpunktes erfordert eine aufwändige Etablierung des Assays für die entsprechende Zelllinie und Fragestellung. Andere Verfahren, wie zum Beispiel das „xCELLigence“ System von Roche ermöglichen hingegen eine Real-Time-Erfassung von Zellzahl und Zellvitalität ohne den Zusatz spezieller Lösungen, und erlauben so den unmittelbaren Vergleich der unterschiedlichen Behandlungseffekte.

Unter Berücksichtigung dieser Limitationen sollen im Folgenden nun die gewonnenen Daten interpretiert und diskutiert werden.

### **4.2.3 Die Rolle des monoklonalen Antikörpers Ab1479**

Der monoklonale Antikörper Ab1479 ist selektiv gegen die extrazelluläre Domäne von HER4 der Isoform JM-a gerichtet und hemmt sowohl die Aktivität der Rezeptortyrosinkinase als auch das Ektodomain-*Shedding* und führt zur Ubiquitinierung und damit zum Abbau von HER4. Hollmen et al. haben gezeigt, dass die Proliferation von MCF-7 und T-47D Zellen *in vitro* durch eine Behandlung mit Ab1479 über diesen Mechanismus gehemmt wird. [60]

Die vorliegenden Daten zur Zellvitalität sprechen dafür, dass Ab1479 auch einen hemmenden Effekt auf die Zellen der Zelllinie ZR.75.1 hat. Unter Berücksichtigung aller oben beschriebenen Limitationen kann außerdem die Tendenz abgeleitet werden, dass durch die Kombination mit Ab1479 die Effektivität der gegen HER2 gerichteten target-spezifischen Behandlungen möglicherweise gesteigert werden kann. Interessanterweise gilt dies jedoch

fast ausschließlich für die am Tag 5 erhobenen Werte, da sich die Effekte am Tag 8 offensichtlich nivellieren.

Ebenfalls auffällig ist die Beobachtung, dass eine Kombinationsbehandlung mit Tamoxifen und Ab1479 einen deutlicheren, inhibitorischen Effekt zeigt, als die Behandlung mit Tamoxifen alleine. Dies steht damit im Widerspruch zu der Schlussfolgerung von Thor et al., dass eine Kombinationsbehandlung mit HER4-spezifischen Wirkstoffen das Ansprechen auf eine endokrine Therapie verschlechtern könnte [27].

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Zelllinie ZR.75.1 - wie aus den bisherigen Daten zu erwarten war - insgesamt zwar nur sehr schlecht auf die untersuchten Behandlungen anspricht, dass sich die erzielten Effekte aber durch eine Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Ab1479 etwas steigern lassen. Dies kann als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass die zusätzliche HER4-Expression zu einem schlechteren Ansprechen auf die target-spezifischen Therapien führt.

### 4.3 Beurteilung der Daten zum Zelltod

Durch die target-spezifischen Behandlungen konnten in einigen der Versuche zwar teilweise die Zellzahlen und die Zellvitalität der Zelllinie ZR.75.1 leicht gesenkt werden, die SPF blieb jedoch unter allen Behandlungen sehr stabil. Um keine Effekte auf die Zellen der Zelllinie ZR.75.1 zu übersehen wurden in einem letzten Schritt deshalb zusätzlich ergänzende Messungen zum Zelltod unter den entsprechenden Behandlungen durchgeführt.

Wie unter 3.4 beschrieben wurde, konnten allerdings auch bei dieser Versuchsreihe keine signifikanten Effekte durch die HER2- und ER-spezifischen Therapien, sowie durch den gegen HER4 gerichteten Antikörper Ab1479 erzielt werden. Es kommt weder zu einer Apoptoseinduktion, noch zu einer anderen Art des Zelluntergangs. So belegen auch diese Daten, dass die Zelllinie ZR.75.1 gegen die untersuchten Behandlungen äußerst resistent ist.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit belegt, dass sich die beiden untersuchten Zelllinien BT474 und ZR.75.1 *in vitro* deutlich im Ansprechen auf target-spezifische Therapien unterscheiden. Während die Zellen der Zelllinie BT474 sehr sensibel auf die Behandlungen mit Lapatinib, Pertuzumab, Trastuzumab und Tamoxifen reagieren erweist sich die Zelllinie ZR.75.1 gegenüber diesen Behandlungen als äußerst resistent. Führt man diese Unterschiede auf die zusätzliche HER4-Expression der Zelllinie ZR.75.1 zurück, spricht dies dafür, dass HER4 bei der Entstehung von Resistenzen gegen diese target-spezifischen Therapien eine Rolle spielt. Demnach wäre die zusätzliche HER4-Expression bei HER2- und ER-positiven Mammakarzinomen als negativer prädiktiver Faktor für das Ansprechen dieser Karzinome auf die in dieser Arbeit untersuchten target-spezifischen Therapien anzusehen.

Auf Grund der gewählten Methodik können die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien allerdings nicht alleine auf die HER4-Expression zurückgeführt werden, da sich - wie oben beschrieben - die beiden untersuchten Zelllinien in einer Reihe weiterer Eigenschaften unterscheiden.

Um diese Einflussgrößen zu minimieren könnten in einem nächsten Schritt weitere Untersuchungen zur Bedeutung der HER4-Expression als möglichen prädiktiven Faktor für target-spezifische Therapien beim Mammakarzinom folgen. Ein Ansatz hierfür wäre zum Beispiel ein Vergleich des Ansprechens der Zelllinie ZR.75.1 auf die gewählten Behandlungen vor und nach HER4-Knockdown, sowie der Zelllinie BT474 vor und nach HER4-Transfektion. Erste Ergebnisse dazu liegen in der Arbeitsgruppe bereits vor und unterstützen die These, dass HER4 auf der Suche nach Ursachen für die Entstehung von Resistenzen gegenüber target-spezifischen Therapien beim Mammakarzinom eine Rolle spielen könnte.

Demgegenüber haben andere Studien ergeben, dass die HER4-Expression insgesamt eher als positiver prognostischer Faktor zu werten ist und dass auch HER4-positive Patientinnen von target-spezifischen Therapien profitieren.

Trotz aller Limitationen und nicht zuletzt auch aufgrund der Tatsache, dass bei der vorliegenden Arbeit nur rein zelluläre Effekte - nicht aber zum Beispiel immunologische Effekte - berücksichtigt wurden, wird deutlich, dass die gezielte Therapie des Mammakarzinoms äußerst komplex ist. Die alleinige Bestimmung einzelner Rezeptor-Expressionen bzw. der target-Moleküle scheint nicht ausreichend, um eine effektive Behandlung zu gewährleisten. Vielmehr sollte in der Therapieplanung ein deutlich

umfassenderes Rezeptorexpressionsprofil inklusive HER4 berücksichtigt werden. Dies wird neuerdings verstärkt durch die Entwicklung sogenannter begleitender (multiplexer), bzw. ergänzender, diagnostischer Verfahren („companion diagnostics“) berücksichtigt. Ziel ist es, durch eine individuelle Kombination der bereits zur Verfügung stehenden target-spezifischen Reagenzien (Antikörper, Inhibitoren, Multikinase-Inhibitoren, Tamoxifen, ...) für jede(n) Patientin/-en eine personalisierte Therapie bereitzustellen. Um zu zeigen, ob dadurch die Effektivität der target-spezifischen Therapien möglicherweise gesteigert und die Prognose des Mammakarzinoms damit weiter verbessert werden kann, sollten weitere Untersuchungen zur Beantwortung dieser Frage folgen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S.** Krebs in Deutschland: 2007/2008; Häufigkeiten und Trends; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; 8. Ausgabe. 2012.
2. **Stauber M, Weyerstahl T.** Gynäkologie und Geburtshilfe : 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio] / Manfred Stauber ; Thomas Weyerstahl. [MLP]. Unter Mitarb. von Alexander Beham. Stuttgart : Thieme; 2007.
3. **Diedrich K.** Gynäkologie und Geburtshilfe : mit 97 Tabellen ; [völlig neu mit Fallquiz] / [Deutsche Ärzte-Versicherung]. Klaus Diedrich ... (Hrsg.). Heidelberg : Springer; 2007.
4. **Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K.** Duale Reihe Biochemie. Stuttgart : Thieme; 2012.
5. **Schmidt RF, Lang F.** Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Heidelberg: Springer Medizin; 2007.
6. **Yarden Y, Sliwkowski MX.** Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2001; 2: 127-37.
7. **Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y.** Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2004; 58: 903-13.
8. **Burden S, Yarden Y.** Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis. *Neuron.* 1997; 18: 847-55.
9. **Hynes NE, Lane HA.** ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature reviews Cancer.* 2005; 5: 341-54.
10. **Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW.** The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Molecular cell.* 2003; 11: 495-505.
11. **Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., Leahy DJ.** Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 2003; 421: 756-60.
12. **Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE.** ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *The EMBO journal.* 1997; 16: 1647-55.
13. **Brennan PJ, Kumagai T, Berezov A, Murali R, Greene MI.** HER2/Neu: mechanisms of dimerization/oligomerization. *Oncogene.* 2002; 21: 328.
14. **Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP, Kraus MH.** Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene.* 1995; 10: 1813-21.
15. **Groenen LC, Nice EC, Burgess AW.** Structure-function relationships for the EGF/TGF-alpha family of mitogens. *Growth Factors.* 1994; 11: 235-57.
16. **Higashiyama S, Iwabuki H, Morimoto C, Hieda M, Inoue H, Matsushita N.** Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer science.* 2008; 99: 214-20.
17. **Heldin CH.** Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.* 1995; 80: 213-23.
18. **Biooncology.com;** Her signaling; <http://www.biooncology.com/images/biological-pathways/her-main-lg.jpg>. 2012.

19. **Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, et al.** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*. 1993; 72: 767-78.
20. **Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE.** ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Molecular and cellular biology*. 1998; 18: 5042-51.
21. **Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, Waterman H, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y.** Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *The EMBO journal*. 1998; 17: 3385-97.
22. **Sweeney C, Carraway KL, 3rd.** Ligand discrimination by ErbB receptors: differential signaling through differential phosphorylation site usage. *Oncogene*. 2000; 19: 5568-73.
23. **Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A.** The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer*. 2001; 8: 11-31.
24. **Soltoff SP, Carraway KL, 3rd, Prigent SA, Gullick WG, Cantley LC.** ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Molecular and cellular biology*. 1994; 14: 3550-8.
25. **Sundvall M, Iljin K, Kilpinen S, Sara H, Kallioniemi OP, Elenius K.** Role of ErbB4 in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2008; 13: 259-68.
26. **Jones FE.** HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2008; 13: 247-58.
27. **Thor AD, Edgerton SM, Jones FE.** Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients. *The American journal of pathology*. 2009; 175: 1802-9.
28. **Carpenter G.** ErbB-4: mechanism of action and biology. *Experimental cell research*. 2003; 284: 66-77.
29. **Holbro T, Civenni G, Hynes NE.** The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental cell research*. 2003; 284: 99-110.
30. **Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN.** The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The oncologist*. 2009; 14: 320-68.
31. **Koutras AK, Fountzilas G, Kalogeras KT, Starakis I, Iconomou G, Kalofonos HP.** The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2010; 74: 73-8.
32. **Junttila TT, Sundvall M, Lundin M, Lundin J, Tanner M, Harkonen P, Joensuu H, Isola J, Elenius K.** Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer research*. 2005; 65: 1384-93.
33. **Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA.** International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacological reviews*. 2006; 58: 773-81.
34. **Klinge CM.** Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000; 65: 227-51.
35. **Green MR.** Targeting targeted therapy. *The New England journal of medicine*. 2004; 350: 2191-3.

36. **Yamaguchi H, Chang SS, Hsu JL, Hung MC.** Signaling cross-talk in the resistance to HER family receptor targeted therapy. *Oncogene*. 2014; 33: 1073-81.
37. **Narayan M, Wilken JA, Harris LN, Baron AT, Kimbler KD, Maihle NJ.** Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2009; 69: 2191-4.
38. **Diermeier S, Horvath G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szollosi J, Brockhoff G.** Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Experimental cell research*. 2005; 304: 604-19.
39. **Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ.** HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*. 1995; 10: 2435-46.
40. **Fizman GL, Jasnis MA.** Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer. *International journal of breast cancer*. 2011; 2011: 352182.
41. **Ocana A, Cruz JJ, Pandiella A.** Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *American journal of clinical oncology*. 2006; 29: 90-5.
42. **Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ.** Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001; 19: 3817-27.
43. **Kreienberg R.** Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms / Koordination: Informationszentrum für Standards in der Onkologie (ISTO), Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Autoren: R. Kreienberg. <http://d-nbinfo/972230297>. 2008.
44. **Furr BJ, Jordan VC.** The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacology & therapeutics*. 1984; 25: 127-205.
45. **Lu WJ, Desta Z, Flockhart DA.** Tamoxifen metabolites as active inhibitors of aromatase in the treatment of breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2012; 131: 473-81.
46. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G.** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365: 1687-717.
47. **Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF, American Society of Clinical Oncology/College of American P.** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007; 131: 18-43.
48. **Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235: 177-82.
49. **Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P.** Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Advances in experimental medicine and biology*. 2003; 532: 253-68.

50. **Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA.** Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Seminars in oncology*. 1999; 26: 60-70.
51. **Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M.** Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2007; 18: 977-84.
52. **Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD, Herceptin Adjuvant Trial Study T.** Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005; 353: 1659-72.
53. **Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N.** Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005; 353: 1673-84.
54. **Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, Untch M, Rusnak DW, Spehar G, Mullin RJ, Keith BR, Gilmer TM, Berger M, Podratz KC, Slamon DJ.** Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer research*. 2006; 66: 1630-9.
55. **Rana P, Sridhar SS.** Efficacy and tolerability of lapatinib in the management of breast cancer. *Breast cancer : basic and clinical research*. 2012; 6: 67-77.
56. **Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, Lofgren JA, Tindell C, Evans DP, Maiese K, Scher HI, Sliwkowski MX.** Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer cell*. 2002; 2: 127-37.
57. **Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV.** Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine*. 2000; 6: 443-6.
58. **Wege AK, Ernst W, Eckl J, Frankenberger B, Vollmann-Zwerenz A, Mannel DN, Ortmann O, Kroemer A, Brockhoff G.** Humanized tumor mice-A new model to study and manipulate the immune response in advanced cancer therapy. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011.
59. **Maatta JA, Sundvall M, Junttila TT, Peri L, Laine VJ, Isola J, Egeblad M, Elenius K.** Proteolytic cleavage and phosphorylation of a tumor-associated ErbB4 isoform promote ligand-independent survival and cancer cell growth. *Molecular biology of the cell*. 2006; 17: 67-79.
60. **Hollmen M, Maatta JA, Bald L, Sliwkowski MX, Elenius K.** Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms. *Oncogene*. 2009; 28: 1309-19.
61. **Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ.** Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999; 17: 2639-48.

62. **Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, Jagiello-Gruszfeld A, Crown J, Chan A, Kaufman B, Skarlos D, Campone M, Davidson N, Berger M, Oliva C, Rubin SD, Stein S, Cameron D.** Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006; 355: 2733-43.
63. **Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M.** Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002; 20: 719-26.
64. **Kruser TJ, Wheeler DL.** Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Experimental cell research*. 2010; 316: 1083-100.
65. **Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, Halsey W, Sathe GM, Martin AM, Gilmer TM.** Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer research*. 2009; 69: 6871-8.
66. **Xia W, Bacus S, Hegde P, Husain I, Strum J, Liu L, Paulazzo G, Lyass L, Trusk P, Hill J, Harris J, Spector NL.** A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 7795-800.
67. **Garrett JT, Olivares MG, Rinehart C, Granja-Ingram ND, Sanchez V, Chakrabarty A, Dave B, Cook RS, Pao W, McKinely E, Manning HC, Chang J, Arteaga CL.** Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108: 5021-6.
68. **Gullick WJ.** c-erbB-4/HER4: friend or foe? *The Journal of pathology*. 2003; 200: 279-81.
69. **Sartor CI, Zhou H, Kozłowska E, Guttridge K, Kawata E, Caskey L, Harrelson J, Hynes N, Ethier S, Calvo B, Earp HS, 3rd.** Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21: 4265-75.
70. **Sassen A, Diermeier-Daucher S, Sieben M, Ortmann O, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G.** Presence of HER4 associates with increased sensitivity to Herceptin in patients with metastatic breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2009; 11: R50.
71. **Lasfargues EY, Coutinho WG, Redfield ES.** Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1978; 61: 967-78.
72. **Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ.** Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer research*. 1978; 38: 3352-64.
73. **Melamed MR.** A brief history of flow cytometry and sorting. *Methods in cell biology*. 2001; 63: 3-17.
74. **Hexley P, Elliott J.** Flow Cytometry, Basic principles. MRC Clinical Sciences Centre 2012.
75. **BD Biosciences.** BD FACSCanto II, Flow Cytometer Reference Manual. BD Biosciences, 2006.
76. **BD Biosciences.** BD LSR II User's Guide. BD Biosciences, 2007.
77. **Hengst L.** Cell Cycle and Cell Proliferation. Innsbruck: Medizinische Universität Innsbruck, 2012.

78. **Sack U, Tarnok A, Rothe G.** Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel: Karger; 2006.
79. **Brockhoff G, Heckel B, Schmidt-Bruecken E, Plander M, Hofstaedter F, Vollmann A, Diermeier S.** Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation. *Cell proliferation.* 2007; 40: 488-507.
80. **Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994; 84: 1415-20.
81. **Trevigen Inc.** TACS Annexin V-FITC, Apoptosis Detection by Flow Cytometry or in Situ labeling. Gaithersburg: Trevigen Inc., 2010.
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 research.* 1988; 48: 4827-33.
83. **Roche Applied Science.** Cell Proliferation Kit II (XTT). Mannheim, 2005.
84. **Nahta R, Hung MC, Esteva FJ.** The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer research.* 2004; 64: 2343-6.
85. **Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM.** The Effects of the Novel, Reversible Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB-2 Tyrosine Kinase Inhibitor, GW2016, on the Growth of Human Normal and Tumor-derived Cell Lines in Vitro and in Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2001; 1: 85-94.
86. **Wang YC, Morrison G, Gillihan R, Guo J, Ward RM, Fu X, Botero MF, Healy NA, Hilsenbeck SG, Phillips GL, Chamness GC, Rimawi MF, Osborne CK, Schiff R.** Different mechanisms for resistance to trastuzumab versus lapatinib in HER2-positive breast cancers - role of estrogen receptor and HER2 reactivation. *Breast cancer research : BCR.* 2011; 13: R121.
87. **Zhu Y, Sullivan LL, Nair SS, Williams CC, Pandey AK, Marrero L, Vadlamudi RK, Jones FE.** Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells. *Cancer research.* 2006; 66: 7991-8.
88. **Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, Brockhoff G.** Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR.* 2008; 10: R2.
89. **Barnes NL, Khavari S, Boland GP, Cramer A, Knox WF, Bundred NJ.** Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005; 11: 2163-8.
90. **Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM, Group CS.** Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2012; 366: 109-19.
91. **Sendur MA, Aksoy S, Yaman S, Ozdemir NY, Zengin N.** Is HER2 overexpression sufficient for optimal response to Pertuzumab? *Med Oncol.* 2012.
92. **Naresh A, Thor AD, Edgerton SM, Torkko KC, Kumar R, Jones FE.** The HER4/4ICD estrogen receptor coactivator and BH3-only protein is an effector of tamoxifen-induced apoptosis. *Cancer research.* 2008; 68: 6387-95.

93. **Sutherland RL.** Endocrine resistance in breast cancer: new roles for ErbB3 and ErbB4. *Breast cancer research : BCR.* 2011; 13: 106.
94. **Hutcheson IR, Goddard L, Barrow D, McClelland RA, Francies HE, Knowlden JM, Nicholson RI, Gee JM.** Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin beta1. *Breast cancer research : BCR.* 2011; 13: R29.
95. **Junttila TT, Sundvall M, Maatta JA, Elenius K.** Erbb4 and its isoforms: selective regulation of growth factor responses by naturally occurring receptor variants. *Trends in cardiovascular medicine.* 2000; 10: 304-10.
96. **Machleidt A, Buchholz S, Diermeier-Daucher S, Zeman F, Ortman O, Brockhoff G.** The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients. *BMC cancer.* 2013; 13: 437.

## **7 Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff angeregt und deren Ausarbeitung durch ihn selbst, sowie durch Frau PD Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher aus der Arbeitsgruppe „Zytometrische und zelluläre Onkologie“ des Lehrstuhls für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums der Universität Regensburg (Leiter: Prof. Dr. med. Olav Ortmann) überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## 8 Danksagung

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff für die interessante Themenstellung und die stets hervorragende Betreuung und Unterstützung sowohl in der Phase der praktischen Laborarbeit als schließlich auch bei deren schriftlicher Ausarbeitung.

Ebenfalls für die tolle Betreuung dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher, die jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für alle Ermutigungen und die überaus freundliche und unermüdliche Unterstützung.

Mein Dank gilt außerdem Frau Rosi Kromas für die qualifizierte und geduldige Anleitung in den Techniken der Zellkultur sowie für ihre Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen und Problemen aller Art.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Marietta Bock und Herrn Gerhard Piendl für ihre freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Brockhoff für stets gewinnbringende Diskussionen in den regelmäßigen AG-Meetings und vor allem für die tolle Stimmung und den großen Zusammenhalt im Team. Nicht zuletzt deshalb bin ich immer gerne ins Labor gegangen.

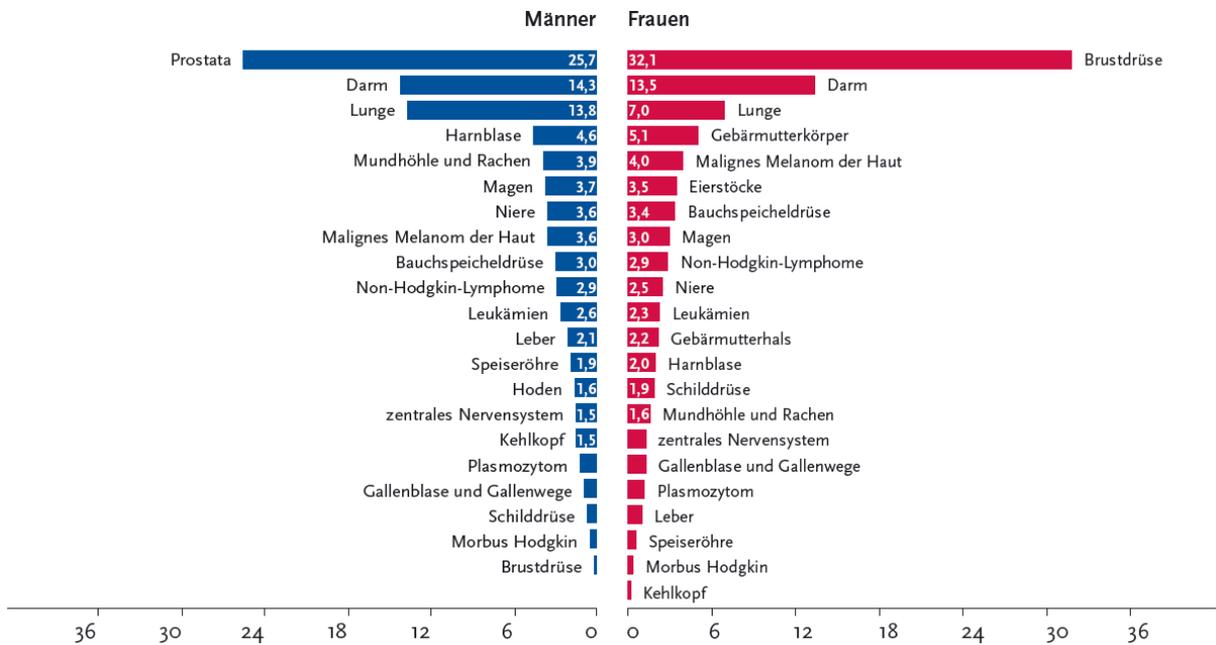
Abschließend ist es mir ein großes Anliegen mich auch bei meiner Familie mit meinen Eltern Christina und Eduard Rath sowie meinen Geschwistern Veronika, Andreas und Sebastian zu bedanken. Durch ihren Rückhalt und ihre Unterstützung haben sie mir das Medizinstudium ermöglicht und mich durch die gesamte Studienzeit begleitet. Außerdem bedanke ich mich bei meiner Freundin Johanna, die mich immer wieder neu motiviert hat und mir stets unterstützend zur Seite stand.

## 9 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis:

4ICD	Soluble intracellular Domain of HER4
Akt	Proteinkinase B
AR	Amphiregulin
BTC	Betacellulin
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DFS	Disease-free survival
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E2	Estradiol
ECR	Electron-coupling reagent
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPR	Epiregulin
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen-response-element
Erk	Extrazellulär regulierte Kinase
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward scatter
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HB-EGF	Heparin binding EGF-like growth factor
HER1-4	Human epidermal growth factor receptor 1-4
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
MAP-K	Mitogen-activated proteine kinase
MOH	Methanol (CH <sub>4</sub> O)
NRG	Neuregulin
OA	Overall survival
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidium-Iodide
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMT	Photomultiplier tube
PS	Phosphatidylserin
PTB	Phosphotyrosine-binding
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SH2	Src-homology 2
SPF	S-Phase-Fraktion
SSC	Side scatter
STAT	Signal transducer and transactivator
TACE	Tumor necrosis factor- $\alpha$ converting enzyme
TGF $\alpha$	Transforming growth factor alpha

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2008 (ohne nicht melanotischen Hautkrebs)



Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2008  
Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

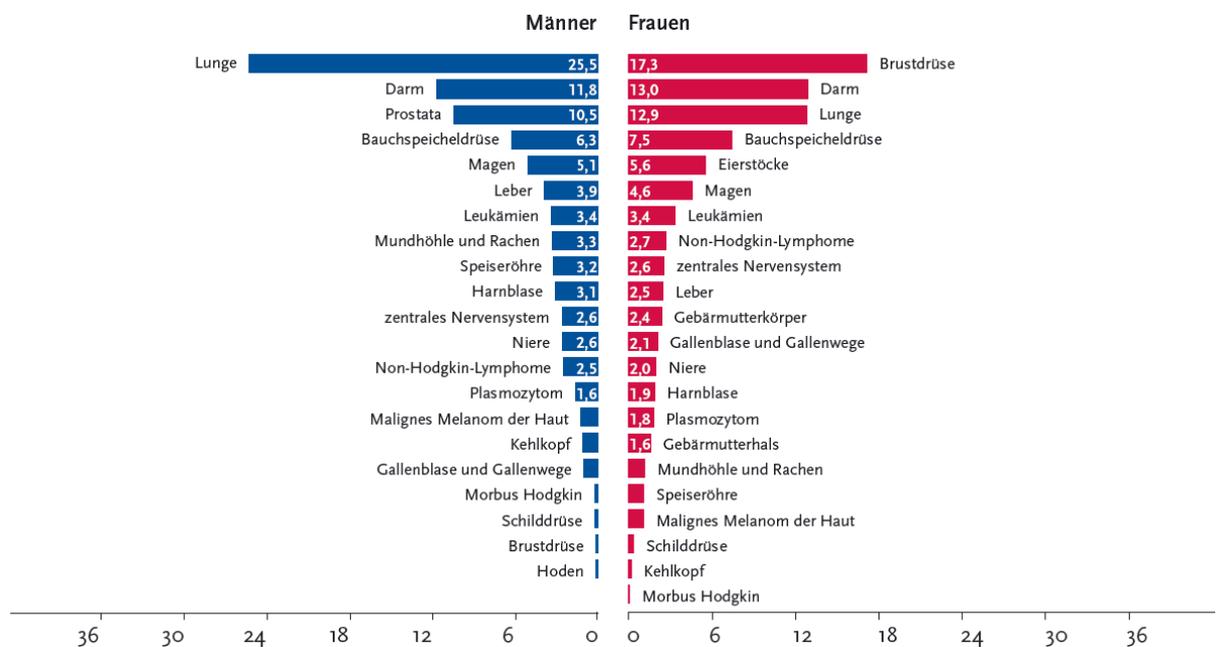


Abb. 10.1: Die Epidemiologie des Mammakarzinoms im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen in Deutschland 2008 [1]

Wachstumskurve, ZR.75.1, 500 000 Zellen, T25, RPMI 5% FKS					
Behandlung	Ergebnisse				
		Zellzahl	SPF / %	G1PF / %	G2PF / %
Tag 02	Mittelwert	476.667	13,10	80,05	6,90
	Standardabweichung	6.667	0,70	0,35	0,30
Tag 04	Mittelwert	780.000	14,50	79,20	6,25
	Standardabweichung	80.000	0,40	1,50	1,05
Tag 07	Mittelwert	1.925.000	9,90	84,35	5,75
	Standardabweichung	165.000	0,90	0,05	0,95
Tag 09	Mittelwert	3.010.000	9,85	84,60	5,55
	Standardabweichung	80.000	1,25	1,10	0,15
Tag 11	Mittelwert	3.200.000	7,50	86,70	5,70
	Standardabweichung				

Tab. 10.1: Wachstumskurve ZR. 75.1

Her2-targeting, ZR.75.1, 5% FKS, absolute Zahlen					
Behandlung	Ergebnisse				
		Zellzahl	SPF / %	G1PF / %	G2PF / %
Kontrolle	Mittelwert	1.703.000	16,82	72,84	10,38
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	689.244	3,09	4,62	2,17
	Signifikanz				
Lapatinib 1 µM 48h	Mittelwert	1.627.500	15,88	73,92	10,18
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	601.592	1,93	3,01	1,73
	Signifikanz	0,858	0,580		
DMSO 0,1% 48h	Mittelwert	1.961.667	16,00	73,10	10,97
	N	3	3	3	3
	Standardabweichung	730.143	3,32	5,37	2,34
	Signifikanz	0,632	0,735		
Pertuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	1.473.125	17,13	72,35	10,70
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	570.042	2,82	3,39	0,61
	Signifikanz	0,609	0,883		
Trastuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	1.931.250	16,33	73,25	10,40
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	539.326	3,25	3,79	1,12
	Signifikanz	0,606	0,822		
Lapatinib 1 µM 72h	Mittelwert	1.150.625	16,53	73,80	9,70
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	723.356	2,42	2,94	0,67
	Signifikanz	0,280	0,880		
DMSO 0,1% 72h	Mittelwert	1.851.667	16,97	72,77	10,30
	N	3	3	3	3
	Standardabweichung	518.660	3,81	4,86	1,14
	Signifikanz	0,760	0,954		
Pertuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	1.626.250	15,70	73,73	10,58
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	768.889	2,85	3,53	1,94
	Signifikanz	0,879	0,594		
Trastuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	1.485.250	16,48	72,83	10,75
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	427.248	3,27	4,17	1,47
	Signifikanz	0,600	0,876		

Tab 10.2: HER2-targeting ZR. 75.1, absolute Zahlen

Her2-targeting, ZR.75.1, 5% FKS, relative Zahlen			
Behandlung	Ergebnisse		
		Zellzahl	SPF / %
Kontrolle	Mittelwert	1,00	1,00
	N	5	5
	Standardabweichung	0,00	0,00
	Signifikanz		
Lapatinib 1 µM 48h	Mittelwert	0,97	0,95
	N	5	5
	Standardabweichung	0,34	0,06
	Signifikanz	0,931	0,160
DMSO 0,1% 48h	Mittelwert	0,99	1,02
	N	2	3
	Standardabweichung	0,20	0,03
	Signifikanz	0,898	0,220
Pertuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	0,77	1,04
	N	4	4
	Standardabweichung	0,13	0,05
	Signifikanz	<b>0,005</b>	0,135
Trastuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	1,05	0,99
	N	4	4
	Standardabweichung	0,29	0,04
	Signifikanz	0,689	0,443
Lapatinib 1 µM 72h	Mittelwert	0,58	1,07
	N	4	3
	Standardabweichung	0,19	0,06
	Signifikanz	0,098	0,274
DMSO 0,1% 72h	Mittelwert	0,86	1,02
	N	3	3
	Standardabweichung	0,16	0,03
	Signifikanz	0,730	0,265
Pertuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	0,85	0,95
	N	4	4
	Standardabweichung	0,27	0,04
	Signifikanz	0,243	<b>0,015</b>
Trastuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	0,83	0,99
	N	4	4
	Standardabweichung	0,30	0,02
	Signifikanz	0,231	0,435

*Tab. 10.3: HER2-targeting ZR.75.1, relative Zahlen*

Her2-targeting, BT.474, 5% FKS, absolute Zahlen					
Behandlung		Ergebnisse			
		Zellzahl	SPF / %	G1PF / %	G2PF / %
Kontrolle	Mittelwert	335.000	22,06	64,00	13,94
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	174.329	5,55	6,00	2,07
	Signifikanz				
Lapatinib 1 µM 48h	Mittelwert	148.750	5,87	77,87	16,27
	N	4	3	3	3
	Standardabweichung	177.488	2,39	6,70	4,48
	Signifikanz	0,158	<b>0,003</b>		
DMSO 0,1% 48h	Mittelwert	341.667	24,93	60,77	14,67
	N	3	3	3	3
	Standardabweichung	180.526	4,27	6,14	2,64
	Signifikanz	0,960	0,474		
Pertuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	294.375	14,78	73,38	11,85
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	247.120	3,76	4,13	1,22
	Signifikanz	0,780	0,061		
Trastuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert	223.750	7,23	81,23	11,68
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	178.098	2,19	3,91	1,79
	Signifikanz	0,377	<b>0,002</b>		
Lapatinib 1 µM 72h	Mittelwert	168.375	4,53	75,80	19,63
	N	4	3	3	3
	Standardabweichung	198.567	0,84	3,48	2,71
	Signifikanz	0,222	<b>0,002</b>		
DMSO 0,1% 72h	Mittelwert	326.875	22,75	63,60	13,65
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	236.118	3,27	4,00	1,63
	Signifikanz	0,954	0,833		
Pertuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	281.250	15,40	71,35	13,25
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	216.473	5,09	6,03	1,11
	Signifikanz	0,691	0,106		
Trastuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert	229.375	7,65	79,43	12,90
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	224.633	1,95	5,95	4,18
	Signifikanz	0,451	<b>0,002</b>		

**Tab. 10.4: HER2-targeting BT474, absolute Zahlen**

<b>Her2-targeting, BT.474, 5% FKS, relative Zahlen</b>			
<b>Behandlung</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Zellzahl</b>	<b>SPF / %</b>
		Kontrolle	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz
Lapatinib 1 µM 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,31 3 0,33 0,082	0,25 3 0,04 <b>&lt; 0,0001</b>
DMSO 0,1% 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,95 2 0,07 0,117	0,98 3 0,10 0,657
Pertuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,74 3 0,33 0,117	0,69 4 0,03 <b>&lt; 0,0001</b>
Trastuzumab 10 µg/ml 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,63 4 0,14 <b>&lt; 0,0001</b>	0,34 4 0,04 <b>&lt; 0,0001</b>
Lapatinib 1 µM 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,58 3 0,32 0,155	0,21 3 0,07 <b>&lt; 0,0001</b>
DMSO 0,1% 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	1,03 4 0,37 0,846	0,97 4 0,06 0,285
Pertuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,84 4 0,28 0,248	0,71 4 0,08 <b>&lt; 0,0001</b>
Trastuzumab 10 µg/ml 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,66 4 0,32 <b>0,046</b>	0,36 4 0,01 <b>&lt; 0,0001</b>

*Tab. 10.5: HER2-targeting BT474, relative Zahlen*

ER-targeting, ZR.75.1, absolute Zahlen					
Behandlung		Ergebnisse			
		Zellzahl	SPF / %	G1PF / %	G2PF / %
5% FKS Kontrolle	Mittelwert	1.610.833	15,78	72,90	11,37
	N	6	6	6	6
	Standardabweichung	1.089.456	1,82	3,98	2,39
	Signifikanz				
Tamoxifen 5 µM 48h	Mittelwert	1.315.000	13,72	75,04	10,86
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	858.378	1,12	4,79	3,56
	Signifikanz	0,358	0,293		
Tamoxifen 5 µM 72h	Mittelwert	1.685.000	13,98	75,44	9,08
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	1.120.948	1,69	4,87	5,65
	Signifikanz	0,935	0,885		
1% FKS Kontrolle 48h	Mittelwert	1.079.500	9,63	80,55	9,80
	N	5	4	4	4
	Standardabweichung	664.663	2,75	7,43	4,72
	Signifikanz	0,118	0,533		
Estradiol 2,5 nM 48h	Mittelwert	881.000	10,20	79,96	9,84
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	537.266	2,17	5,50	3,34
	Signifikanz	0,352	0,790		
1% FKS Kontrolle 72h	Mittelwert	1.116.667	10,73	78,60	10,83
	N	6	6	6	6
	Standardabweichung	1.076.366	2,24	5,29	3,32
	Signifikanz	0,141	0,657		
Estradiol 2,5 nM 72h	Mittelwert	949.000	10,86	79,44	9,68
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	641.019	2,23	5,35	3,16
	Signifikanz	0,369	0,908		

**Tab. 10.6: ER-targeting ZR.75.1, absolute Zahlen**

ER-targeting, ZR.75.1, relative Zahlen			
Behandlung	Ergebnisse		
		Zellzahl	SPF / %
5% FKS Kontrolle	Mittelwert	1,00	1,00
	N	6	6
	Standardabweichung	0,00	0,00
	Signifikanz		
Tamoxifen 5 µM 48h	Mittelwert	0,88	0,89
	N	4	5
	Standardabweichung	0,12	0,06
	Signifikanz	<b>0,026</b>	<b>0,002</b>
Tamoxifen 5 µM 72h	Mittelwert	1,02	0,91
	N	4	5
	Standardabweichung	0,07	0,03
	Signifikanz	0,489	<b>&lt; 0,0001</b>
1% FKS Kontrolle 48h	Mittelwert	0,66	0,64
	N	5	4
	Standardabweichung	0,12	0,14
	Signifikanz		
Estradiol 2,5 nM 48h	Mittelwert	0,54	0,66
	N	5	5
	Standardabweichung	0,14	0,10
	Signifikanz	0,179	0,807
1% FKS Kontrolle 72h	Mittelwert	0,68	0,68
	N	5	6
	Standardabweichung	0,22	0,10
	Signifikanz		
Estradiol 2,5 nM 72h	Mittelwert	0,56	0,70
	N	5	5
	Standardabweichung	0,08	0,08
	Signifikanz	0,284	0,708

**Tab. 10.7: ER-targeting ZR.75.1, relative Zahlen**

ER-targeting, BT.474, absolute Zahlen					
Behandlung		Ergebnisse			
		Zellzahl	SPF / %	G1PF / %	G2PF / %
5% FKS Kontrolle	Mittelwert	341.500	25,22	61,64	13,16
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	228.429	3,39	4,12	3,16
	Signifikanz				
Tamoxifen 5 µM 48h	Mittelwert	200.139	9,63	80,87	9,43
	N	4	3	3	3
	Standardabweichung	76.194	4,82	6,01	1,36
	Signifikanz	0,279	<b>0,002</b>		
Tamoxifen 5 µM 72h	Mittelwert	251.500	10,20	79,60	10,23
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	183.073	3,62	6,57	3,04
	Signifikanz	0,544	<b>&lt; 0,0001</b>		
1% FKS Kontrolle 48h	Mittelwert	218.750	18,78	66,43	12,15
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	73.329	3,16	4,39	2,61
	Signifikanz	0,341	<b>0,022</b>		
Estradiol 2,5 nM 48h	Mittelwert	253.875	20,93	69,18	12,25
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	154.801	2,47	4,68	1,20
	Signifikanz	0,696	0,325		
1% FKS Kontrolle 72h	Mittelwert	267.500	20,54	66,80	12,84
	N	5	5	5	5
	Standardabweichung	146.095	2,14	3,88	2,93
	Signifikanz	0,559	<b>0,031</b>		
Estradiol 2,5 nM 72h	Mittelwert	223.375	17,88	70,28	11,83
	N	4	4	4	4
	Standardabweichung	185.864	1,18	1,13	1,81
	Signifikanz	0,701	0,062		

**Tab. 10.8: ER-targeting BT474, absolute Zahlen**

ER-targeting, BT.474, relative Zahlen			
Behandlung	Ergebnisse	Zellzahl	SPF / %
		5% FKS Kontrolle	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz
Tamoxifen 5 µM 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,56 4 0,15 <b>&lt; 0,0001</b>	0,38 3 0,20 <b>&lt; 0,0001</b>
Tamoxifen 5 µM 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,61 4 0,10 <b>&lt; 0,0001</b>	0,39 4 0,12 <b>&lt; 0,0001</b>
1% FKS Kontrolle 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,61 4 0,16	0,75 4 0,18
Estradiol 2,5 nM 48h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,49 4 0,06 0,208	0,83 4 0,16 0,510
1% FKS Kontrolle 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,69 5 0,10	0,83 5 0,14
Estradiol 2,5 nM 72h	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	0,52 4 0,12 <b>0,046</b>	0,71 4 0,11 0,216

*Tab. 10.9: ER-targeting BT474, relative Zahlen*

<b>XTT-Assays, ZR.75.1, 5% FKS, relative Zahlen</b> [ $\Delta E_{490} = E_{\text{Behandlung}} - E_{\text{Leerwert}}$ ]			
<b>Behandlung</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>
		5% FKS Kontrolle	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz
DMSO 0,1%	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	1,00 50 0,19 0,998	0,93 51 0,16 0,911
Ab 1479 10 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,82 14 0,34 0,229	0,80 15 0,30 0,123
Lapatinib 0,1 $\mu\text{M}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,70 15 0,39 <b>&lt; 0,0001</b>	0,64 15 0,27 <b>&lt; 0,0001</b>
Lapatinib 1 $\mu\text{M}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,67 15 0,30 <b>&lt; 0,0001</b>	0,75 15 0,17 <b>&lt; 0,0001</b>
Ab 1479 10 $\mu\text{g/ml}$ Lapatinib 1 $\mu\text{M}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,33 6 0,16 <b>&lt; 0,0001</b>	0,77 6 0,53 0,078
Pertuzumab 10 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,92 15 0,50 0,712	0,78 15 0,24 <b>0,039</b>
Ab 1479 10 $\mu\text{g/ml}$ Pertuzumab 10 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,73 15 0,45 0,167	0,76 15 0,49 0,254
Trastuzumab 10 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	1,17 9 0,27 0,143	0,45 9 0,39 <b>0,004</b>
Ab 1479 10 $\mu\text{g/ml}$ Trastuzumab 10 $\mu\text{g/ml}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,80 9 0,44 0,296	0,51 9 0,33 <b>0,004</b>
Tamoxifen 5 $\mu\text{M}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,69 9 0,21 <b>0,003</b>	0,52 9 0,20 <b>&lt; 0,0001</b>
Ab 1479 10 $\mu\text{g/ml}$ Tamoxifen 5 $\mu\text{M}$	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,54 9 0,17 <b>&lt; 0,0001</b>	0,40 9 0,19 <b>&lt; 0,0001</b>

**Tab. 10.10: XTT-Assay ZR.75.1, 5% FKS**

<b>XTT-Assays, ZR.75.1, 1% FKS, absolute Zahlen</b> [ $\Delta E_{490} = E_{\text{Behandlung}} - E_{\text{Leerwert}}$ ]			
<b>Behandlung</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>
		1% FKS Kontrolle	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz
Ab 1479 10 µg/ml	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,56 6 0,59 0,668	0,83 6 0,77 0,989
Estradiol 2,5 nM	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,85 6 0,83 0,812	0,82 6 0,62 0,964
Ab 1479 10 µg/ml Estradiol 2,5 nM	Mittelwert ( $\Delta E_{490}$ ) N Standardabweichung Signifikanz	0,73 6 0,72 0,979	1,35 6 1,19 0,413

**Tab. 10.11: XTT-Assay ZR.75.1, 1% FKS**

<b>Annexin-Assays, ZR.75.1, 5% FKS, 72h-Werte</b>					
<b>Behandlung</b>		<b>Ergebnisse / %</b>			
		<b>lebend</b>	<b>apoptotisch</b>	<b>nekrotisch</b>	<b>tot</b>
5% FKS Kontrolle	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	87,36 5 2,50	12,19 5 3,27	0,89 5 1,33	13,07
Tamoxifen 5 µM	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	86,30 3 8,07 0,785	13,70 3 8,10	0,00 3 0,00	13,70
Lapatinib 1 µM	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	78,48 5 10,10 0,093	18,31 5 11,07 0,270	3,21 5 5,22	21,52
DMSO 0,1%	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	83,48 4 4,87 0,162	15,17 4 6,30	1,34 4 1,54	16,51
Pertuzumab 10 µg/ml	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	87,36 3 6,07 0,999	12,61 3 6,11	0,00 3 0,00	12,61
Trastuzumab 10 µg/ml	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	85,23 3 5,33 0,460	14,75 3 5,33	0,00 3 0,00	14,75
Ab 1479 10 µg/ml	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	86,08 5 7,33 0,721	12,81 5 5,64	3,11 5 2,98	15,92
Ab 1479 10 µg/ml Trastuzumab 10 µg/ml	Mittelwert N Standardabweichung Signifikanz	84,95 4 5,62 0,414	13,16 4 6,30	1,88 4 1,82	15,04

**Tab. 10.12: Annexin-Assay ZR.75.1, 5% FKS, 72 h**

Annexin-Assays, ZR.75.1, 5% FKS, 96h-Werte					
Behandlung		Ergebnisse / %			
		lebend	apoptotisch	nekrotisch	tot
5% FKS Kontrolle	Mittelwert	85,12	13,36	1,48	14,85
	N	5	5	5	
	Standardabweichung	3,73	3,53	2,25	
	Signifikanz				
Tamoxifen 5 µM	Mittelwert	84,17	15,83	0,00	15,83
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	4,48	4,50	0,00	
	Signifikanz	0,755			
Lapatinib 1 µM	Mittelwert	82,40	15,15	2,33	17,48
	N	5	5	5	
	Standardabweichung	9,61	10,66	2,66	
	Signifikanz	0,571			
DMSO 0,1%	Mittelwert	84,73	11,95	3,40	15,35
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	8,95	12,02	3,97	
	Signifikanz	0,933			
Pertuzumab 10 µg/ml	Mittelwert	83,80	14,41	1,71	16,12
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	4,73	7,04	2,96	
	Signifikanz	0,674			
Trastuzumab 10 µg/ml	Mittelwert	82,97	14,13	1,92	16,05
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	4,04	4,98	3,33	
	Signifikanz	0,471			
Ab 1479 10 µg/ml	Mittelwert	82,22	13,84	3,09	16,93
	N	5	5	5	
	Standardabweichung	7,38	7,79	1,99	
	Signifikanz	0,455			
Ab 1479 10 µg/ml Trastuzumab 10 µg/ml	Mittelwert	83,24	8,01	8,76	16,77
	N	5	5	5	
	Standardabweichung	5,64	4,24	6,56	
	Signifikanz	0,551			

Tab. 10.13: Annexin-Assay ZR.75.1, 5% FKS, 96 h

Annexin-Assays, ZR.75.1, 1% FKS					
Behandlung		Ergebnisse / %			
		lebend	apoptotisch	nekrotisch	tot
1% FKS Kontrolle 72h	Mittelwert	82,60	17,43	0,00	17,43
	N	2	2	2	
	Standardabweichung	0,85	0,84	0,00	
	Signifikanz	0,054			
Estradiol 2,5 nM 72h	Mittelwert	84,15	15,74	0,00	15,74
	N	2	2	2	
	Standardabweichung	0,21	0,07	0,00	
	Signifikanz	0,129			
1% FKS Kontrolle 96h	Mittelwert	81,93	18,07	0,00	18,07
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	0,06	0,05	0,00	
	Signifikanz	0,201			
Estradiol 2,5 nM 96h	Mittelwert	81,30	18,71	0,00	18,71
	N	3	3	3	
	Standardabweichung	1,65	1,61	0,00	
	Signifikanz	0,542			

Tab. 10.14: Annexin-Assay ZR.75.1, 1% FKS