Aus dem Institut für Biochemie und Signaltransduktion des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf PD Dr. rer nat. Manfred Jücker Direktor: Prof. Dr. med. Georg W. Mayr

# Untersuchungen zur Funktion des PI3K/Akt-Signalweges für das Wachstum von disseminierten Tumorzelllinien von Patienten mit Malignomen

## DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT HAMBURG

vorgelegt von Katharina Johanna Ingeborg Grupp aus Lüneburg Hamburg 2011 Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 02.11.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr PD Dr. rer. nat. M. Jücker

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. rer. nat. B. Brandt

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Frau PD Dr. D. Seifert

## Inhaltsverzeichnis

Al	okürzungsverzeichnis	1
1	Einleitung	4
	1.1 Theorie zur Tumorentstehung und Metastasierung	4
	1.1.1 Tumorentstehung als Mehrstufenprozess	4
	1.1.2 Metastasierung von disseminierten Tumorzellen (DTCs)	4
	1.2 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg	6
	1.2.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges	6
	1.2.2 Bedeutung von Akt für die Tumorgenese	7
	1.2.3 Negative Regulation der PI3K-Signalwege	9
	1.3 Der Epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	. 11
	1.3.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren	. 11
	1.3.2 Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren	. 12
	1.3.3 Bedeutung der Erb-Rezeptoren für die Tumorgenese	. 14
	1.3.4 EGFR und ErbB2 als Ansatzpunkte in der Tumortherapie	. 15
	1.4 Aufgabenstellung	. 17
2	Materialien und Methoden	. 19
	2.1 Materialien	. 19
	2.1.1 Geräte	. 19
	2.1.2 Verbrauchsmaterialien	. 19
	2.1.3 Chemikalien	. 20
	2.1.4 Puffer und Lösungen	. 20
	2.1.5 Antikörper	. 21
	2.1.6 Zelllinien	. 22
	2.1.7 Vektoren	. 23
	2.2 Bakterienkultur	. 24
	2.2.1 Plasmid Maxi-Präparation	. 24
	2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA	. 24
	2.2.3 Restrinktion von DNA	. 25
	2.3 Zellkultur	. 25
	2.3.1 Stammhaltung der Zelllinien	. 25
	2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	. 25
	2.3.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauerzahlkammer	. 25
	2.3.4 Hemmstoffversuche	. 26
	2.3.5 Zelliyse und Proteinextration	. 20
	2.3.0 Transfektion der Z93-gp-Zeiffinde	. 27
	2.3.7 Italisuuktioli uei Zielzenen	. 27
	2.3.8 Softerung der transduzierten Zenen	. 27
	2.4. Proteinbiochamische Arbeiten	· 21
	2.4 Flotemolochemische Albeiten	. 20
	2.4.1 Ronzentrationsbestimmung der Froteinkonzentration	. 20
	2.4.2 Yonceau S-r aroung	. 20
2		. 20
3		. 30
	3.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für DTC-Zelllinien	. 30
	3.1.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges	. 30

	3.1.2 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Inhibition der PI3K	31
	3.1.3 Abhängigkeit der Proliferation von der PI3K-Aktivität	32
	3.1.4 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Expression von SHIP1	35
	3.1.5 Wachstumsverhalten der Zelllinien MTSV 1.7 und der LC-M1 nach	
	Expression von SHIP1	38
	3.1.6 Einfluss der Expression von SHIP1 unter reduzierten	
	Wachstumsbedingungen auf die Proliferation	43
	3.2 Einfluss der EGFR-Kopienzahl auf die Aktivierung des PI3K/Akt-	
	Signalweges	45
	3.2.1 Abhängigkeit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges von der	
	Anzahl der EGFR-Kopien auf DNA-Ebene	45
	3.2.2 Abhängigkeit der Akt(Ser473)-Aktivierung von der PI3K-Aktivität	46
	3.2.3 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nach Hemmung der EGFR	48
	3.2.4 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Inhibition der EGFR und Her2	49
	3.2.5 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach SHIP1-Expression	51
	3.2.6 Proliferation nach SHIP1-Expression	53
4	Diskussion	57
	4.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für DTC-Zelllinien	57
	4.2 Einfluss der EGFR-Kopienzahl auf die Aktivierung des PI3K/Akt-	
	Signalweges	60
5	Zusammenfassung und Ausblick	66
6	Literaturverzeichnis	68
Da	anksagung	84
Le	ebenslauf	85

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albunim)
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
$CO_2$	Kohlendioxid
DMEM	Dulbeccos Minimalserum (Dulbeccos minimal essential medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFP	verstärkt grün-floureszierendes Protein (enhanced green flourescent pro- tein)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor)
ERK	extrazellulär Signal regulierte Kinase ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
FACS	Floureszenz-aktivierter Zellsortierer (fluorescence activated cell sorter)
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FKHR	forkhead related transcription factor
FOXO	forkhead box o
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
G	Gate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Grb2	Wachstumsfaktor-Rezeptor bindendes Protein 2 (growth factor receptor binding protein 2)		
GSK	Glykogensynthasekinase		
h	Stunde ( <i>hour</i> )		
HC1	Chlorwasserstoff		
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piparzin-ethansulfonsäure		
Her	menschlicher EGF-Rezeptor (human EGF receptor)		
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser		
HRP	horse radish peroxidase		
ΙΚΚα	Inhibitor der NF $\kappa$ B-Kinase $\alpha$ ( <i>inhibitor of NF <math>\kappa</math>B kinase <math>\alpha</math></i> )		
ΙκΒ	NFκB-Inhibitor ( <i>inhibitor of NF</i> $\kappa$ B)		
IRES	internal ribosome entry side		
1	Liter		
IL-3	Interleukin-3		
IL-5	Interleukin-5		
Ins(1,3,4)P <sub>3</sub>	Inositol-1,3,4-trisphosphat		
Ins(1,3,4,5)P <sub>4</sub>	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat		
Kb	Kilobasenpaare		
KCl	Kaliumchlorid		
kD	Kilodalton		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat		
LB	Luria-Bertami		
LTR	long terminal repeat		
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)		
MDM2	murine double minute 2		
mg	Milligramm		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mM	millimolar		
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)		
ng	Nanogramm		
nm	Nanometer		
NaCl	Natriumchlorid		
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen (nuclear factor of activated T-cells)		
NP40	Nonyphenylpolyethlenglykol		

NRG	Neuroregulin	
PAGE	Polyacrylamidgelelektophorese	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)	
PDK Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase ( <i>phosphoinositide depender protein kinase</i> )		
pН	pH-Wert	
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase	
PKB	Proteinkinase B	
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid	
PRE	Posttranskriptionales regulatorisches Element	
РТВ	phosphotyrosine binding	
$PtdIns(3,4)P_2$	Phoshatidylinositol-3,4-bisphosphat	
$PtdIns(4,5)P_2$	Phoshatidylinositol-4,5-bisphosphat	
PtdIns(3,4,5)F	$P_3$ Phoshatidylinositol-3,4,5-trisphosphat	
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten	
RT	Raumtemperatur	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)	
SH2	Src-homology 2	
Shc	SH2-containing collagen-related protein	
SH-Domäne	Scr-Homologie-Domäne (Src homology domain)	
SHIP	SH2-Domäne enthaltende Inositol-5-Phosphatase (SH2-containing Inosi- tol-5`-Phosphatase)	
SHP-2	SH2 domain protein tyrosine phosphatase 2	
TNF-α	Tumornekrosefaktor-a	
Tris	3-N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamino-2-	
	hydroxypropansulfonsäure	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
V	Volt	

### 1 Einleitung

#### 1.1 Theorie zur Tumorentstehung und Metastasierung

#### 1.1.1 Tumorentstehung als Mehrstufenprozess

Die Tumorentstehung ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Stufen abläuft. Die Tumorprogression wird durch aufeinander folgende Mutationen in Genen vorangetrieben, deren Funktionen essentiell sind für das Überleben, die Zellproliferation und die typischen Eigenschaften und Fähigkeiten einer Tumorzelle (Meza *et al.*, 2008) (Abb. 1).



Abb. 1: Tumorentstehung als Mehrstufenprozess Normalen Zellen entwickeln einen neoplastischem Phänotyp In Anlehnung an (Meza et al., 2008).

Infolge des Mehrstufenprozesses entstehen Zellen mit neoplastischem Phänotyp (Meza *et al.*, 2008) (Abb. 1), die durch unkontrolliertes Zellwachstum charakterisiert sind und zunächst einen Primärtumor bilden. Diese Tumoren werden oft erst nach Jahren auf Grund von funktionellen Organausfällen oder -verdrängungen diagnostiziert und sind für ca. 10% der Todesfälle von Tumorpatienten verantwortlich, während der Großteil der Patienten an den Folgen der Metastasierung verstirbt (Weinberg, 2007).

#### 1.1.2 Metastasierung von disseminierten Tumorzellen (DTCs)

Die Metastasierung tritt bei einigen Tumoren wie z.B. dem Mammakarzinom bereits in frühen Stadien auf, wobei einzelne Tumorzellen vom Primärtumor dissoziieren und über das Blut- oder Lymphsystem im Körper verteilt werden (Pantel and Brakenhoff, 2004) (Abb. 2).



Abb. 2: Entstehung von disseminierten Tumorzellen und Metastasen Einzelne Tumorzellen dissoziieren vom Primärtumor und werden über das Blut- oder Lymphsystem im Körper verteilt In Anlehnung an (Weinberg, 2007).

DTCs können in andere Organe des Körpers gelangen und Mikro- bzw. Makrometastasen bilden (Abb. 2). Aus noch ungeklärten Ursachen metastasieren einige Tumorarten in frühen Stadien, während andere nur sporadisch sekundäre Malignome bilden. Während des Prozesses der Metastasierung stellt das Knochenmark ein bedeutendes Reservoir für isolierte Tumorzellen dar (Pantel *et al.*, 1999). Die Zellen können hier in einer Art Ruhezustand über mehrere Jahre als sogenannte "dormant cells" verbleiben (Pantel *et al.*, 1999). Bislang noch unbekannte Mechanismen führen nach Jahren zum erneuten Wachstum der Zellen, zur Angiogenese und Initiierung von sekundären Geschwüsten. Es konnten bei ca. 30% der Patienten mit verschiedenen Karzinomen DTCs im Knochenmark nachgewiesen werden, die weder befallene Lymphknoten noch Fernmetastasen hatten (Pantel and Brakenhoff, 2004). Das *in vitro* Wachstum dieser disseminierten Tumorzellen korrelierte positiv mit dem späteren Auftreten von Metastasen und bedeutete für den Patienten eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit (Solakoglu *et al.*, 2002).

Deshalb ist es in der Zukunft notwendig, neben der lokalen Therapie des Primärtumors, die vereinzelten dissoziierten Tumorzellen zu detektieren und adäquat zu behandeln.

#### 1.2 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg

#### 1.2.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Der PI3K/Akt-Signalweg hat eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation, der Zellgröße, des Überlebens der Zellen und der Invasion und Migration derselben (Cantley *et al.*, 2002) (Abb.3)



Abb. 3: Der PI3K/Akt-Signalweg. Die Bindung von Wachstumsfaktoren (GF) führt zur Aktivierung von Rezeptoren in der Plasmamembran. Die PI3K phosphoryliert nach Rekrutierung an die Plasmamembran PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, das die Serin/Threonin-Kinase Akt bindet. Akt wird daraufhin durch zweifache Phosphorylierung durch die *Phosphoinositide dependent kinase* 1 (PDK1) und mTORC2 aktiviert. Akt phosphoryliert dann verschiedene zytosolische Proteine, die an der Regulation der Apoptose (BAD, FKHR, Caspase 9), Proliferation (GSK3 $\beta$ ) und Translation (mTor) beteiligt sind. Dies führt zu einer Hemmung der Apoptose sowie zur Stimulation der Proliferation und Proteinsynthese. In Anlehnung an (Chang *et al.*, 2003).

Die Bindung von Wachstumsfaktoren wie Cytokine oder EGFR führen zur Aktivierung der Rezeptoren und durch Phosphorylierung der Tyrosinreste mittels Autophosphorylierung oder assistierter Tyrosinkinasen (Gold *et al.*, 1994, Sato *et al.*, 1993; Hu *et al.*, 1992) (Abb. 3). Die PI3K ist ein Heterodimer, das aus einer regulatorischen Untereinheit von 85kD (p85) und einer katalytischen Untereinheit von 110kD (P110) besteht. Die p85-Untereinheit beinhaltet zwei SH2 (*Src homology 2*)-Domänen, die mit Phosphotyrosinreste unterschiedlicher Rezeptoren interagieren kann (Hu *et al.*, 1992). Des

Weiteren werden im Zusammenhang mit der Aktivierung der PI3K verschiedene Adapterproteine aus der Gab-Familie (Wickrema *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000) oder SHP-2 (*SH2 domain protein tyrosine phosphatase 2*) (Welham *et al.*, 1994) diskutiert.

Die PI3K phosphoryliert nach Rekrutierung an die Plasmamembran Phosphoinositide an der Position 3 des Inositolringes. *In vitro* sind Phosphatidylinositolphosphat (PtdIns), PtdIns-4-Phosphat, und PtdIns-4,5-bisphosphat Substrate der PI3K (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). *In vivo* hat die Aktivierung der PI3K einen Anstieg von PtdIns-3,4bisphosphat und PtdIns-3,4,5-trisphosphat zur Folge (Fruman *et al.*, 1998). Die Substrate der PI3K können als *second messenger* dienen und zur Aktivierung verschiedener zytosolischer Proteine und Signalkaskaden führen. PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> veranlasst die Rekrutierung der Serin/Threonin-Proteinkinase Akt an die Zellmembran, die eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese spielt (Lawlor and Alessi, 2001) (Abb. 3). An der Zellmembran kommt es zur Konformationsänderung und Phosphorylierung von Akt am am Threoninrest 308 und Serinrest 473 (Alessi *et al.*, 1997). Der Threoninrest 308 wird durch die Phosphoininositid-abhängige Kinase (PDK1) phosphoryliert, die ebenfalls an PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> binden kann (Alessi *et al.*, 1997) und die Phosphorylierung des Serinrestes 473 erfolgt durch mTORC2.

#### 1.2.2 Bedeutung von Akt für die Tumorgenese

Akt spielt eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese (Toker and Yoeli-Lerner, 2006). Ursprünglich wurde Akt als Produkt des retroviralen Onkogenes *v-akt* identifiziert (Bellacosa *et al.*, 1991). Auf Grund der Homologie mit der Kinasedomäne mit der Proteinkinase A und C wird Akt auch als Proteinkinase B (Coffer and Woodgett, 1991) oder RAC (*related to the A und C kinases*) bezeichnet (Jones *et al.*, 1994). Aktiviertes Akt gilt als Überlebensfaktor (Datta *et al.*, 1997). Akt phosphoryliert die pro-apoptotischen Faktoren BAD (Datta *et al.*, 1997) und die Procaspase 9 (Cardone *et al.*, 1998). Phosphoryliertes BAD ist nicht mehr an den Faktor Bcl-X<sub>L</sub> gebunden, sodass die Apoptose verhindert wird (Datta *et al.*, 1997). Die Procaspase 9 wird an dem Aminosäurerest 196 phosphoryliert und dadurch inhibiert. Die Inhibition der Procaspase 9 verhindert die mitochondriale Cytochrom-C-Freisetzung (Cardone *et al.*, 1998). Durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren FOXO (*forkhead box o*) (Biggs *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 1999) und FKHR-L1 (*forkhead related transcription factor-like 1*) (Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999; Rena *et al.*, 1999) werden diese inaktiviert. Im aktiven Zustand wird durch FOXO die Expression von Genen, wie den Fas-Liganden (Brunet *et al.*, 1999) und Bim (*Bcl-like 11*) (Vivanco and Sawyers, 2002), im Zellkern veranlasst. Phosphorylierter FKHR-L1 verbleibt im Zytosol (Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999; Rena *et al.*, 1999). Ein weiteres Überlebenssignal wird durch die Phosphorylierung der IkB-Kinase IKKa (*inhibitor of NF-\kappa B kinase*) durch Akt erreicht (Kane *et al.*, 1999; Ozes *et al.*, 1999). Die IKK ist ein positiver Regulator von NF- $\kappa B$ , der die Transkription von anti-apoptotischen Genen zur Folge hat (Kane *et al.*, 1999). Zusätzlich führt die Phosphorylierung von MDM 2 (*murine double minute 2*) zu dessen Translokation in den Nukleus und damit zu einer verminderten Expression von p53 (Mayo and Donner, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Weiter phosphoryliert aktiviertes Akt die Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) am Serinrest 9 und erreicht so die Zellzyklusprogression, indem die inaktivierte GSK-3 $\beta$  vermindert Cyclin D1 phosphoryliert (Cross *et al.*, 1995; Diehl *et al.*, 1997).

In der Tumorprogression und der Metastasierung beeinflusst der PI3K/Akt-Signalweg die Zellmobilität und die Zell-Zellkontakte (Friedl et al., 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass Akt die Expression von Metalloproteasen induziert, die die Zellinvasion erleichtern (Kim et al., 2001). Ebenso scheint aktiviertes Akt den Prozess der epithelialenmesenchymalen Transition (EMT) zu beeinflussen (Grille et al., 2003). Im Zuge der EMT erhalten die epithelialen Tumorzellen mesenchymale Züge, indem zelluläre Interaktionsmoleküle reduziert und die Mobilität der Zellen erleichtert wird (Larue and Bellacosa, 2005). In diesem Zusammenhang stellt die verminderte Expression des zellulären Adhäsionsmoleküles E-cadherin ein bedeutendes Ereignis dar (Larue and Bellacosa, 2005). E-cadherin ist ein Tumorsuppressor und soll die Invasion und Metastasierung erschweren (Larue and Bellacosa, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von E-cadherin in vielen Karzinomen reduziert ist und die Reexpression in vitro die Aggressivität des Tumors vermindert (Vleminckx et al., 1991). Zellen, die eine konstitutiv aktive Form von Akt haben, zeigen eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Snail, der zur verminderten Expression von E-cadherin führt (Grille et al., 2003).

Bislang konnten drei Isoformen von Akt isoliert werden (Testa and Bellacosa, 2001). Die Isoformen Akt1 (PKB $\alpha$ ), Akt2 (PKB $\beta$ ) und Akt3 (PKB $\gamma$ ) zeigen in ihrer Proteinsequenz 80% Homologie auf. Akt1 und Akt2 werden im Gegensatz zu Akt3 in vielen Gewebearten exprimiert (Altomare *et al.*, 2005). Hinsichtlich der Zellproliferation und Metastasierung scheinen die drei Akt-Isoformen unterschiedliche Funktionen zu haben. Die Aktivierung von Akt1 scheint im Zusammenhang mit der Zellproliferation und Akt2 mit der Metastasierung zu stehen. So konnte gezeigt werden, dass Akt1 zur Limitierung der Metastasierung und Invasion führt, während Akt2 eine gesteigerte Mobilität und Invasion der Zellen zur Folge hat (Toker *et al.*, 2006). Akt1 führt zur Inhibition und Akt2 zur Steigerung der Aktivität des NFAT (*nuklear factor of activated T cells*) und der ERK (*extrazellular signal regulated kinase*) (Testa and Bellacosa 2001). Durch aktiviertes NFAT und ERK wird ein Transkriptionsprogramm zur Steigerung der Mobilität und Invasion veranlasst (Toker *et al.*, 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass eine Akt1-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien die Migration und Invasion *in vitro* hemmt (Yoeli-Lerner *et al.*, 2005).

Für die Zellproliferation hingegen scheint Akt1 essentiell zu sein, während Akt2 zum Zellzyklusarrest führt (Héron-Milhavet *et al.*, 2006). So hatte ein Akt1 knockdown einen Anstieg von Cyclin A und eine Verhinderung des Eintritts der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus zur Folge, während eine Überexpression von Akt2 zu einem Anstieg des Zyklusinhibitors p21 führte (Héron-Milhavet *et al.*, 2006). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Akt1 in Mammakarzinomen zu einem gesteigerten Tumorwachstum (Hutchinson *et al.*, 2004) und eine Überexpression von Akt2 die Metastasierung und Invasion der Zellen führt (Arboleda *et al.*, 2003).

#### **1.2.3** Negative Regulation der PI3K-Signalwege

Zu den wichtigen negativen Regulatoren des PI3K/Akt-Signalweges gehören SHIP1 (*SH2-containing Inositol Phosphatase 1*), SHIP2 und PTEN. SHIP1 uns SHIP2 gehören zur Familie der Inositol-5-Phosphatasen (INPP5) (Damen *et al.*, 1996; Lioubin *et al.*, 1996), die selektiv das Phosphat an der D5 Position von Inositolringen entfernen. Ent-sprechend ihrer Substratspezifität werden die INPP5 in vier Typen unterteilt (Drayer *et al.*, 1996). SHIP1 und SHIP2 gehören zum Typ III der INPP5, die PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> als Substrate verwenden (Damen *et al.*, 1996). Somit wird das PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, das von der PI3K gebildet wird und als *second messenger* zur Rekrutierung von Akt führt, abget (Clement *et al.*, 2001).



Abb. 4: Negative Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs. Zu den wichtigen negativen Regulatoren des PI3K/Akt-Signalweges gehören SHIP1 (*SH2-containing Inositol Phosphatase 1*), SHIP2 und PTEN. SHIP1 und SHIP2 gehören zum Typ III der INPP5, die das PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, das von der PI3K gebildet wird und als *second messenger* zur Rekrutierung von Akt führt, abbauen.
PTEN gehört zur Familie der Proteintyrosin-Phosphatasen, hat aber auch eine Inositol-Phosphatase-Aktivität und wird durch Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zum Gegenspieler der PI3K.

In Anlehnung an (Chang *et al.*, 2003).

SHIP1 und SHIP2 besitzen 50% Homologie in ihrer Aminosäuresequenz (Majerus *et al.*, 1999) und lassen sich in einen aminoterminalen Bereich, eine zentrale katalytische Domäne und ein carboxyterminales Ende unterteilen. Aminoterminal liegt eine SH2-Domäne, die mit Phosphotyrosinresten interagieren kann (Songyang *et al.*, 1993) und an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt ist, die infolge Tyrosinphosphorylierung vermittelt werden. Durch die Konkurrenz der SH2-Domäne von SHIP mit Grb2 um die Bindung an das tyrosinphosphorylierte Shc (*SH containing collagen-related protein*), können SHIP1 und SHIP2 den Ras/Raf/MAPK-Signalweg hemmen (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1999; Rohrschneider *et al.*, 2000). Zentral befindet sich die katalytische Domäne der 5-Phosphatase. Das carboxyterminale Ende ermöglicht nach Tyrosinphosphorylierung die Bindung von PTB (*phosphotyrosine binding*)-Domänen. In diesem Bereich befinden sich zusätzlich mehrere prolinreiche Sequenzen, die potentielle Bindungsstellen für SH3-Domänen darstellen (Rohrschneider *et al.*, 2000). Die

Expression von SHIP1 ist auf hämatopoetische Zellen und Spermatiden beschränkt, während SHIP2 in vielen Geweben anzufinden ist (Liu *et al.*, 1998). Neben den Inositol-5-Phosphatasen gilt PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) als negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges (Maehama and Dixon, 1998). PTEN gehört zur Familie der Proteintyrosin-Phosphatasen (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997) und zusätzlich hat PTEN auch eine Inositol-Phosphatase Aktivität und wird durch Dephosphorylierung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zum Gegenspieler der PI3K. Mutationen von PTEN sind häufig in menschlichen Tumoren anzufinden (Li *et al.*, 1998).

#### **1.3 Der Epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)**

#### 1.3.1 Die Familie der ErbB-Rezeptoren

Die Familie der ErbB-Rezeptoren besteht aus EGFR (ErbB1), Her2 (ErbB2) (Schechter *et al.*, 1985), Her3 (ErbB3) (Kraus *et al.*, 1989) und Her4 (ErbB4) (Plowman *et al.*, 1993) (Abb. 5).



Abb. 5: Familie der ErbB-Rezeptoren. Die Familie der ErbB-Rezeptoren besteht aus EGFR (ErbB1), Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) und Her4 (ErbB4). Nach Ligendenbindung und Aktivierung leiten die Rezeptoren einen externen Stimulus über mehrere Signalwege in das Zellinnere weiter.

In Abhängigkeit von dem Rezeptor, dem Liganden und den Koexpressionen kommt es zur

Aktivierung verschiedener Signalwege, die den Metabolismus, die Transkription, Translation, Entwicklung, Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose beeinflussen. Von Bedeutung sind der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-,

PI3K-, PLCγ (*Phospholipase Cγ*)- und der JAK/STAT (*Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg. In Anlehnung an (Marmor *et al.*, 2004).

Die Rezeptoren der ErbB-Familie sind Glykoproteine, bestehend aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem intrazellulären Bereich (Abb. 5). Die extrazelluläre Domäne dient der Ligandenbindung (Riese and Stern, 1998). EGF (*epidermal growth factor*), AR (*amphiregulin*) und TGF $\alpha$  (*transforming growth factor*  $\alpha$ ) binden an den EGFR. BTC (*betacellulin*), EPR (*epiregulin*), HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*) binden an EGFR und ErB4. Die Neuregline 1 und 2 binden an ErbB3 und ErbB4. Die Neuregline 3 und 4 binden spezifisch an ErbB4, während für Her2 noch kein Ligand identifiziert wurde (Holmes *et al.*, 1992) (Abb. 5). Der transmembranöse Rezeptorenbereich dient der Verankerung in der Zellmembran. Intrazellulär verfügen die Rezeptoren über Tyrosinkinasedomänen, die der Autophosphorylierungen der Carboxyl-Enden dienen (Carpenter and Cohen, 1990).

#### **1.3.2** Die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren

Die Rezeptoren der ErbB-Familie liegen in Abwesenheit von Liganden inaktiv in der Cytoplasmamembran. Nach Ligendenbindung und Aktivierung leiten die Rezeptoren einen externen Stimulus über mehrere Signalwege in das Zellinnere weiter (Garrett et al., 2003). Infolge Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung und Exponierung der Dimerisierungsschleife, die die Interaktion und Dimerbildung der Rezeptoren untereinander vermittelt (Roskoski et al., 1995). Die Dimere bestehen entweder aus Homo- oder Heterodimeren (Alroy and Yarden, 1997). Die Dimerisierungsschleife des Her2 ist konstitutiv exponiert und befähigt den Rezeptor unabhängig von Ligandenbindung mit anderen Rezeptoren zu interagieren oder Homodimere zu bilden (Garrett et al., 2003). Die ErbB-Rezeptoren können des Weiteren über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren aktiviert werden (Fischer et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass der EGFR durch zytoplasmatische Tyrosinkinasen der Src-Familie und die Janus Kinase Jak2 phosphoryliert werden kann (Fischer et al., 2003). Die Dimerisierung der ErbB-Rezeptoren führt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife (Heldin et al., 1995). Mit Ausnahme des ErbB3 haben alle Mitglieder der ErbB-Rezeptoren-Familie zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domänen. Die phosphorylierten Tyrosylreste stellen Bindungsstellen für Proteine, die SH2- oder PTB-Domänen enthalten, dar (Shoelson et al., 1997; Sudol et al., 1998).

Folge ist eine Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden (Luttrell *et al.*, 1994; Egan and Weinberg, 1993). Die Art und Stärke der vom EGFR vermittelten Signale sind von den Liganden, von den gebildeten Homo- oder Heterodimeren und vom Verhältnis der Anzahl der vier Rezeptoren auf der Zelloberfläche abhängig (Crovello *et al.*, 1998). Nach Bindung eines Liganden kommt es v.a. zur Dimerisierung des EGFR mit ErbB2, sofern diese Rezeptoren gemeinsam auf der Zelloberfläche vorliegen (Tzahar *et al.*, 1996). ErbB2 ist der bevorzugte Heterodimerisierungs-Partner von EGFR, ErbB3 und ErbB4 (Graus-Porta *et al.*, 1997; Tzahar *et al.*, 1996). Die EGFR-Homodimere zeigen im Vergleich zu den Heterodimeren, die aus EGFR und ErbB2 bestehen, eine größere Stabilität, ein stärkeres Signal und eine erhöhte Recyclingrate (Graus-Porta *et al.*, 1997).

In Abhängigkeit von dem Rezeptor, dem Liganden und den Koexpressionen kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die den Metabolismus, die Transkription, Translation, Entwicklung, Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose beeinflussen. Von Bedeutung sind der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-, PI3K-, PLC $\gamma$  (*Phospholipase C* $\gamma$ )- und der JAK/STAT (*Janus Kinase/signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg (Marmor *et al.*, 2004). Der MAPK-Signalweg kann durch den EGFR über das Adapterprotein Grb2 aktiviert werden (Robinson *et al.*, 1997).

Der EGFR kann die PI3K indirekt über Adapterproteine, wie Gab-1 (*Grb-2-associated binder-1*), das zur Interaktion von Grb2 mit EGFR führen kann (Holgado-Madruga *et al.*, 1996) oder nach Heterodimerisierung mit Her3 (Soltoff *et al.*, 1994) oder Her4 (Cohen *et al.*, 1995), die sieben bzw. eine Bindungsstelle für die p85-Untereinheit der PI3K besitzen, aktivieren.

Die Stärke der Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren kann durch posttranslationale Mechanismen und Rezeptor-Recycling moduliert werden. Proteinkinasen können durch Phosphorylierung der ErbB-Rezeptoren diese positiv und negativ regulieren (Schlessinger, 2000). Dephosphorylierung führt zur Dämpfung des Signals (Schlessinger, 2001). Infolge eines Rezeptor-Recyclings stehen die Rezeptoren schneller zur erneuten Aktivierung auf der Zelloberfläche bereit und verstärkt die Signalübertragung (Waterman *et al.*, 1998). In Abhängigkeit von dem Liganden kann der Rezeptor entweder nach Liganden-Abdissoziation recycelt und wieder in die Zellmembran eingebaut oder mit dem gebundenen Liganden in Lysosomen ubiquitinyliert und abgebaut werden (Olayioye *et al.*, 2000). Hierbei werden ErbB1-Homodimere schneller in die Zelle aufgenommen und abgebaut als andere ErbB-Rezeptoren (Baulida *et al.*, 1996). ErbB1-Proteine aus ErbB2- und ErbB3-Heterodimeren werden im Gegensatz zu den ErbB1-Homodimeren häufig wieder auf die Zelloberfläche zurückgeführt (Lenferink *et al.*, 1998). Des Weiteren wird der Vorgang des Rezeptor-Recycling davon beeinflusst, ob die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoren noch katalytisch aktiv ist (Waterman *et al.*, 1998). Hierbei gelangen die kinase-defizienten ErbB3-Rezeptoren meist wieder auf die Zelloberfläche (Waterman *et al.*, 1998).

#### 1.3.3 Bedeutung der Erb-Rezeptoren für die Tumorgenese

Die Aktivierung des EGFR hat eine zentrale Rolle in der Tumorgenese und -progression und es konnte eine hohe Korrelation zwischen erhöhter EGFR-Expression und Tumorgenese identifiziert werden (Stern *et al.*, 1987). Die durch EGFR-Aktivierung induzierten Signalkaskaden sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, die das Tumorwachstum kontrollieren und beeinflussen (Sibilia *et al.*, 1995). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der EGFR die Zellproliferation stimuliert, Angiogenese und Metastasierung fördert und die Apoptoserate reduziert (Hunag and Harari, 1999). EGFR- und HER2-Amplifikationen konnten in verschiedenen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden (Muller *et al.*, 1988). Eine EGFR-Überexpression führt in epithelialen Zellen bei Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zur malignen Transformation (Brandt *et al.*, 2000). In diesen Tumoren liegen circa 2 Millionen Rezeptoren vor (Yao *et al.*, 1988; Petrides *et al.*, 1990), während gesunde Zellen zwischen 40000 bis 100000 Rezeptoren exprimieren (Carpenter and Cohen, 1979).

Eine Überexpression von EGFR und ErbB2 korreliert je nach Tumorart mit einem fortgeschrittenen Stadium, einer Chemo- und Hormontherapie-Resistenz, einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Metastasen oder Rezidiven und einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten (Laskin *et al.*, 2004; Slamon *et al.*, 1987).

Neben der EGFR-Überexpression wurden auch Mutationen in EGFR gefunden, die eine gesteigerte EGFR-Aktivierung zur Folge haben können. Die am häufigsten anzutreffende Genmutation des EGFR stellt EGFRvIII dar (Humphrey *et al.*, 1990), die in mehre-

ren Tumoren, einschließlich dem Mammakarzinom, gefunden wurde (Volborg *et al.*, 1997). Der mutierte Rezeptor EGFRvIII zeichnet sich durch eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase aus (Huang *et al.*, 1997). Der mutierte Rezeptor EGFRvIII führt durch die konstante Aktivierung und Anwesenheit auf der Zellmembran zu einer Verlängerung der Signaltransduktions-Dauer (Chu *et al.*, 1997).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der EGFR-Aktivierung in Tumoren stellt die autokrine Stimulation dar, bei der die Tumorzellen eine erhöhte Produktion und Expression des aktivierenden Liganden aufweisen.

Weiter konnte gezeigt werden, dass der EGFR eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielt. Dabei steigert die EGFR-Überexpression die Zellmigration (Verbeek *et al.*, 1998), induziert die Lösung der Zellen von der extrazellulären Matrix (Schulze *et al.*, 2001) und fördert die Produktion der Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, sodass die Zellinvasion erleichtert wird (O-Charoenrat *et al.*, 2000).

#### 1.3.4 EGFR und ErbB2 als Ansatzpunkte in der Tumortherapie

Die EGFR-Signalübertragung ist ein komplexer Prozess, der eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese hat. In der Diagnostik von Tumoren sind v.a. Überexpressionen von EGFR und ErbB2 von Bedeutung und bestimmend für die Therapie. Dabei dienen die Rezeptoren als Angriffspunkte verschiedener Therapie-Strategien, um die Wirkung der Rezeptoren in den Tumoren zu hemmen (Ciardiello and Tortora, 2002).

In Mammakarzinomen ist häufig eine Überexpression von EGFR und Her2 anzufinden. In ca. 27,5% der Mammakarzinomen ist eine ErbB2-Überexpression zu detektieren (Slamon *et al.*, 1987). Bereits seit 1998 befindet sich der monoklonale Her2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin) zur Behandlung des Her2 überexprimierenden metastasierten Mammakarzinoms in klinischer Anwendung (de Bono *et al.*, 2002). Trotz der häufig anzutreffenden Überexpression von Her2, konnten für diesen Rezeptor noch keine Liganden identifiziert werden (Pauletti *et al.*, 2000). Dennoch zeigt Trastuzumab therapeutische Wirkung in Mammakarzinomen und eine Blockierung der Heterodimerisation von Her2 und EGFR könnte die Antitumor-Effekte erklären. In metastasierten Mammakarzinomen konnte eine simultane Phosphorylierung von EGFR und Her2 nachgewiesen werden (Gschwantler-Kaulich *et al.*, 2005). Des Weiteren werden spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren (sog. *small molecules*) eingesetzt, die an die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne binden. Mit diesem Ansatz können sowohl Signale unterbunden werden, die nach Liganden-Bindung, als auch Liganden-unabhängig sind. Die kleinen Moleküle binden kompetetiv zu ATP an die intrazelluläre Domäne der Rezeptoren. Es wurden vier Klassen von Tyrosinkinase-Inhibitoren identifiziert: (1) reversible EGFR-Inhibitoren, wie Gefitinib, (2) irreversible EGFR-Inhibitoren, (3) reversible duale ErbB-Inhibitoren, wie Lapatinib, und (4) irreversible pan-ErbB-Inhibitoren (El-Rayes and LoRusso, 2004).

Gefitinib ist ein oral verfügbarer selektiver EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor, der in präklinischen und Phase I-Studien Antitumor-Effekte bei EGFR-exprimierenden Tumoren gezeigt hat (Ciardiello *et al.*, 2001; Ranson *et al.*, 2002; Baselga *et al.*, 2002). In zwei großen randomisierten Phase II-Studien "IRESSA Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer" (IDEAL 1 und 2) sprachen Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom klinisch auf eine Therapie mit dem Inhibitor an (Fukuoka *et al.*, 2003; Kris *et al.*, 2003). Es folgten große Phase III-Studien mit Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC. In diesen Studien konnte kein signifikanter Überlebensvorteil der behandelten Patienten gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Giaccone *et al.*, 2004; Thatcher *et al.*, 2005). Da nur ein geringer Prozentsatz von Patienten mit NSCLC auf eine Therapie mit Gefitinib ansprach (Shepherd *et al.*, 2005; Thatcher et al., 2005), ist eine positive Selektion von Patienten, die von einer Therapie profitieren, notwendig.

Lapatinib ist ein dualer Hemmstoff der Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR und Her2 (Rusnak *et al.*, 2001). Der duale Inhibitor zeigt *in vivo* und *in vitro* Aktivität und führt zum Zellzyklus-Arrest und/oder zur Apoptose in EGFR und Her2-abhängigen Tumor-Zelllinien (Xia *et al.*, 2002). Durch die gleichzeitige Inhibition des EGFR und Her2 können die Interaktionen dieser Mitglieder blockiert werden (Xia *et al.*, 2002). Lapatinib reduziert die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und Her2 und die MAPK- und Akt-Aktivierung (Xia *et al.*, 2002). In der Therapie des Mammakarzinomes stellt die Resistenz der Tumoren gegenüber Trastuzumab ein klinisches Problem dar. Hier könnte einer Kombination des Her2-Antikörpers mit Lapatinib oder die alleinige Therapie mit Lapatinib neue therapeutische Strategien aufzeigen. Die Kombination von Lapatinib und anti-Her2-Antikörpern führt zur Apoptose von Her2-Überexprimierneden Mammakarzinomen (Xia *et al.*, 2005).

Weiter konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Mammakarzinom in der second-line Therapie von einer Kombiantionstherapie von Lapatinib mit Capecitabine mehr profitieren, als von einer alleinigen Gabe von Capecitabine (Riera *et al.*, 2009). In Zukunft ist es von grosser Bedeutung die Effektivität einer Monotherapie von Lapatinib in der first-line oder second-line Therapie zu untersuchen (Riera *et al.*, 2009).

#### 1.4 Aufgabenstellung

Maligne Karzinome sind die häufigsten Tumoren des Menschen und sind für den Großteil der Tumor-assoziierten Mortalität in der westlichen Welt verantwortlich.

Eine Metastasierung tritt bei einigen Tumoren bereits in frühen Stadien auf, wobei die Tumorzellen vom Primärtumor dissoziieren und über das Blut- oder Lymphsystem im Körper verteilt werden (Weinberg, 2007). Nach einem derzeitigen Modell stellt das Knochenmark ein bedeutendes Reservoir für die DTCs dar. Hier können die Zellen als sogenannte "dormant cells" in einer Art Ruhezustand über einen längeren Zeitraum verbleiben (Pantel *et al.*, 1999). Bislang noch unbekannte Mechanismen können nach Jahren zur Aktivierung dieser Zellen und Metastasenbildung führen (Pantel *et al.*, 1999).

Der PI3K/Akt Signalweg spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellproliferation und der Metastasierung. Mutationen in der PI3K findet man häufig in menschlichen Karzinomen und es wird angenommen, dass die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges für die Tumorentstehung und Metastasierung wichtig ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten DTC-Zelllinien von Patienten mit Lungen-, Brustund Prostatakarzinom auf eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden.

Weiterhin sollte die Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für das Wachstum der DTCs und das Wachstum der Zelllinien nach Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges durch pharmakologische Inhibitoren und der Expression von SHIP1, einem negativen Regulator des PI3K/Akt-Signalwege, analysiert werden.

Des Weiteren soll der Einfluss der Kopienzahl des EGFR auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges untersucht werden. Hier werden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert verwendet, wobei die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-468 nur noch eine sehr geringe Kopienzahl des EGFR aufweist. Durch Inkubation mit pharmakologische Inhibitoren des EGFR und Her2 und der Expression von SHIP1, einem negativen Regulator des PI3K/Akt-Signalweges, soll die Abhängigkeit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges von EGFR und Her2 und der Expression von SHIP1 analysiert werden.

## 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

## 2.1.1 Geräte

Axiovert 200	Zeiss (Jena)
Feinwaage	Sauter (Ebingen)
Labovert	Leitz (Solms)
Las-3000	Fujifilm (Japan)
Schutron Schnipptherm	MS-Laborgeräte (Heidelberg)
Schüttelinkubator Typ 625	New Brunswick Scientific Co. Inc. (USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Vortexer IKAMAG RH	IKA-Labortechnik (USA)
Waage PM2000	Mettler (Giessen)
Wasserbad 1002/1012/1086	GFL (Hannover)
Zellkulturbrutschränke	Heraeus (Hanau)
Zellkulturwerkbank	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments (Frankreich)
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus (Hanau)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml-Reaktionsgefäße	Biozym (Hess. Oldendorf)
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
10 ml-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
15 ml-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
25 ml-Weißkappenröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
50 ml-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturflaschen T25	Greiner (Frickenhausen)
Gewebekulturflaschen T75	Greiner (Frickenhausen)
10 cm Gewebekulturschalen	Greiner (Frickenhausen)
6-Loch-Platten	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht),
	Biozym (Hess. Oldendorf)

### 2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden die Chemikalien bei der Firma Sigma-Aldrich (Traufkirchen), Roth (Karlsruhe), Merck Eurolab (Darmstadt) und Biomol GmbH (Hamburg) und die Materialien für die Zellkultur bei GibcoBRL (Eggenstein) bestellt.

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

PBS	137 mM Natriumchlorid
	2,7 mM Kaliumchlorid
	4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	1,4 mM Dikaliumhydrogenphosphat
	pH 7,4 mit Salzsäure einstellen
LB-Medium	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakte
	1% Natriumchlorid
	pH 7,0 mit Natronlauge einstellen
1x TBS	1,4 M Natriumchlorid
	0,1 M Tris-Chlorwasserstoff pH 8,0
NP40-Lysispuffer	50 mM Hepes pH 7,5
	150 mM Natriumchlorid
	1% Nonident P 40
	1% Aprotinin
	2 mM EDTA
	50 mM Natriumflourid
	10 mM Natriumpyrophosphat
	10% Glycerol
	1 mM Natriumorthovanadat
	1 mM PMSF
1x Ladepuffer	62,5 mM Tris-Chlorwasserstoff pH 6,8
	3% SDS
	10% Glycerol
	0,01% Bromphenolblau
3x Ladepuffer	180 mM Tris- Chlorwasserstoff pH 6,8

	6% SDS
	30% Glycerol
	0,01% Bromphenolblau
10x Laufpuffer	1,9 M Glycin
	2,5 nM Tris
	$ad \ 1 \ H_2O_{dd}$
Transferpuffer	1x Laufpuffer
	1/5 Volumen Methanol
	1% SDS
EGF-Puffer	10 mM Essigsäure
	0,1% BSA

#### 2.1.5 Antikörper

#### **Primäre Antikörper:**

- Phospho-Akt (Ser473) (193H12) gerichtet gegen phosphoryliertes Serin 473 von Akt monoklonaler Kaninchen-Antikörper Cell Signaling Technology, #4058 Western Blot-Analyse 1:1000
- ERK 1 (K-23) gerichtet gegen Mapkinase monoklonaler Kaninchen-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, sc-94 Western Blot-Analyse 1:400
- GAPDH (6C5) gerichtet gegen humanes GAPDH monoklonaler IgG<sub>1</sub>-Maus-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, sc-32233 Western Blot-Analyse 1:3000
- HSC 70 (B-6) gerichtet gegen HSC 70 monoklonaler Maus-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, sc-7298

Western Blot-Analyse 1:1000

 SHIP1 (P1C1) gerichtet gegen SHIP1 monoklonaler Maus-Antikörper Santa Cruz Biotechnology, sc-8425 Western Blot-Analyse 1:500

#### Sekundäre Antikörper:

- Goat anti-mouse IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology, sc-2055 Western Blot-Analyse 1:5000
- Goat anti-rabbit IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology, sc-2004 Western Blot-Analyse 1:5000

#### 2.1.6 Zelllinien

Die Tumorzelllinien, aus denen die DTC-Zelllinien etabliert wurden, wurden durch eine Knochenmarkspunktion aus dem Beckenkamm von Patienten mit Lungen (LC-M1)-, Prostata (PC-E1)- und Brustkarzinom (BC-M1) gewonnen, deren Tumoren weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen aufwiesen (Putz et al., 1999). Nach der Knochenmarkspunktion wurden die Tumorzellen mittels immunzytochemischen Methoden und PCR detektiert und mit dem SV40 large T-Antigen immortalisiert (Pantel et al., 1999). Als Kontrollzelllinie für die Versuche mit den DTC-Zelllinien wurde die epiteliale Brustdrüsenzelllinie MTSV 1.7 verwendet, die ebenfalls mit dem SV40 large T-Antigen immortalisiert wurde. Sowohl die DTC-Zelllinien als auch die Kontrollzelllinie wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Pantel und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Brandt aus dem Institut für Tumorbiologie des UKE Hamburg zur Verfügung gestellt. Die duktalen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 stammt von einer 51-jährigen Patientin mit metastasiertem Tumor (Brunkley et al., 1980). Die Zelllinie weist ein geringes Maß an Invasivität in vitro auf (Thompson et al., 1992) und führt in Mäusen gewöhnlich nicht zur Metastasierung (Mukhopadhyay et al., 1999). Des Weiteren zeichnet sich die Zelllinie durch eine EGFR-Überexpression aus (Biscardi et al., 1998). Durch die Kultivierung dieser Zelllinie mit 5 nM EGF im Nährmedium entstand die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert. Die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert besitzt nur noch 2 EGFR-Kopien auf DNA-Ebene. Die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Pantel und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Brandt aus dem Institut für Tumorbiologie des UKE Hamburg zur Verfügung gestellt. Für die Produktion von Viren wurde die 293-gp-Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane embryonale Nierenzelllinie, die mit Hilfe des Adenovirus E1A transformiert wurde (Mulligan *et al.*, 1993).

#### 2.1.7 Vektoren

Das Konstrukt SF91iGpre ist ein retroviraler Koexpressions-Vektor, der EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) besitzt. Der Vektor SF91 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Carol Stocking aus dem Heinrich-Pette-Institut des UKE zur Verfügung gestellt.



Abb. 6: Schematische Darstellung des retroviralen Vektors.

In der Reihe A ist der retrovirale Vektor SF91 abgebildet. In diesen Vektor wurde SHIP1 bzw. eine inaktive Form von SHIP1, die SHIP1-Mutante (D672A), eingefügt. Die Konstrukte mit SHIP1 bzw. mit SHIP1-Mutante sind in Zeile B und C zu sehen

In der Reihe A der Abbildung 6 ist der retrovirale Vektor SF91 abgebildet. In diesen Vektor wurde SHIP1 bzw. eine inaktive Form von SHIP1, die SHIP1-Mutante (D672A), eingefügt. Die Konstrukte mit SHIP1 bzw. mit SHIP1-Mutante sind in Zeile B und C zu sehen (Abb. 6). Hinter der Klonierungsstelle liegt die IRES (*internal ribosomal entry side*), die eine Koexpression mit dem EGFP ermöglicht. Des Weiteren besitzen die Konstrukte LTR (*long terminal repeat*). Die Vektoren mit SHIP1 und der enzymatisch inaktiven Form von SHIP1 wurden mir freundlicherweise von Frau Wiebke Wegner aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

#### 2.2 Bakterienkultur

#### 2.2.1 Plasmid Maxi-Präparation

Die Plasmid Maxi-Präparation erfolgte mit dem Kit von Qiagen. Die Plasmide wurden aus Bakterienkulturen, die aus Glycerolstocks angeimpft wurden, gewonnen. Im Folgenden wurden Bakterienkulturen für dem retrovitralen Vektor SF91 und den Konstrukten SHIP1 und SHIP-Mutante und den Pseudotypisierungen gagpol (M57), Ampho und VSV-G (M75) angelegt und bei 37°C 16 h über Nacht bei 300 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Zentrifugation der Kulturen 15 min bei 6000 rpm und 4°C und die Resuspension der Bakterien-Pellets mit 10 ml des P1-Puffers des Kits. Nach Zugabe von 10 ml des P2-Puffers, wurde die Suspension sechsmal invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit erfolgte die Äquilibration der Qiagen-tip 500 mit 10 ml QBT-Puffer. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand durch die Qiagen-tip filtriert. Die Säule wurde daraufhin zweimal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen. Danach wurde ein neues Röhrchen unter die Säulen gestellt und die im Filter haftende DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und 30 min bei 11000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte das Waschen des Pellets mit 5 ml 70% Ethanol und die Zentrifugation 15 min bei 11000 rpm und 4°C. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte das Trocknen des Pellets in der Lyophylle und das Lösen des Pellets in 300 µl TE-Puffer (pH 8.0).

#### 2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch die Messung der Extrinktion in einem Spektralphotometer. Es wurde die Absorption der Proben bei 260 nm und bei 280 nm ermittelt. Aus den Extrinktions-Werten bei 260 nm, dem Lambert-Beerschen-Gesetz und der spezifischen Absorptionskonzentration konnte die Nukleinsäure-Konzentration berechnet werden. Das Verhältnis der Extrinktionen 260 nm/280 nm erlaubte zusätzlich die Beurteilung der Nukleinsäurenproben hinsichtlich der Verunreinigung mit Protein.

#### 2.2.3 Restrinktion von DNA

Die Reaktionsbedingungen, insbesondere die Einstellung der Temperatur, die Dauer der Reaktion und die verwendeten Puffersubstanzen, richteten sich nach dem eingesetzten Reaktionsenzym und den Herstellerangaben. In der Regel wurde 1  $\mu$ l der Plasmid-DNA in einem Ansatz von 20  $\mu$ l mit 1x Puffer und einem 2,5fachen Überschuss an Enzym der Firma Fermentas über Nacht verdaut.

#### 2.3 Zellkultur

#### 2.3.1 Stammhaltung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Die DTC-Zelllinien wurden mit RPMI 1640-Complete Medium mit 5 ml IST (Insulin, Selen und Transferrin), 5 µg/l EGF, 10 µg/l b-FGF, 1 M/l Glutamin und 10% FCS kultiviert. Die Brustdrüsen-Zelllinie MTSV 1.7 wurde in DMEM mit 10% FCS und 5 ml Glutamin kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFRsupprimiert erfolgte in DMEM mit 5% FCS und 1 M/l Glutamin, wobei zu der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR supprimierten Zellen noch 5 nM EGF zugefügt wurde. Die Zelllinie 293-gp wurde in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert.

#### 2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in einer Mischung aus 90% FCS und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Die in dem Stickstofftank gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C fast vollständig aufgetaut. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 10 ml Nährmedium aufgenommen und 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen erneut in 10 ml Nährmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche in den Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gestellt.

#### 2.3.3 Zellzahlbestimmung in der Neubauerzählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Trypanblaufärbung (gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich). Abgestorbene Zellen wurden auf Grund der geschädigten Zellmembran innerhalb von wenigen Sekunden angefärbt, während lebende Zellen erst nach längerer Zeit gefärbt wurden. Zur Zellzählung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen trypsiniert und mit Nährmedium resuspendiert in einer Verdünnung von 1:2 mit der Trypanblaulösung. Nach maximal 1 min Inkubationsdauer erfolgte die Zellzahlbestimmung in einer Neubauerzählkammer.

#### 2.3.4 Hemmstoffversuche

#### 1. PI3K-spezifischer Hemmstoff LY294002

Der PI3K-spezifische Hemmstoff LY294002 (gebrauchsfertig von Calbiochem) wurde bei den DTC-Zelllinien und den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ M eingesetzt. Die Hemmstoffzugabe erfolgte bei 80% Konfluenz der Zellen. Nach 15 h Inkubationszeit erfolgte die Zelllyse mittels NP40-Lysispuffer.

#### 2. EGFR-Tyrosinkinase-Hemmstoff Gefitinib

Der Hemmstoff der EGFR-Tyrosinkinase Gefitinib wurde für Versuche mit den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert eingesetzt. Bei 80% Konfluenz der Zellen erfolgte die Hemmstoffzugabe in einer Endkonzentration von 0  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 50  $\mu$ M und nach 1 h In-kubation erfolgte die Zelllyse mittels NP40-Lysispuffer.

#### 3. EGFR- und Her2-Tyrosinkinase-Hemmstoff Lapatinib

Der duale Hemmstoff der EGFR- und Her2-Tyrosinkinase Lapatinib wurde bei den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert in einer Endkonzentration von 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt. Die Zelllyse mit NP40-Lysispuffer erfolgt nach 1 h.

#### 2.3.5 Zelllyse und Proteinextration

Zur Zelllyse wurden die Zellen mit PBS (4°C) gewaschen und auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis mit NP40-Lysispuffer inkubiert und das Lysat wurde für 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Von dem Überstand wurde jeweils ein geringer Teil für die Proteinkonzentrationsbestimmung abgenommen und bei -20°C gelagert, während das restliche Lysat bei -80°C eingefroren wurde.

#### 2.3.6 Transfektion der 293-gp-Zelllinie

Für die Virusproduktion wurde die 293-gp-Zelllinie in Kultur genommen. Zur Transfektion mit dem retroviralen Vektor SF91 und den Konstrukten SHIP1 und SHIP1-Mutante (D672A) wurden die Lipofektamine Reagenzien von Invitrogen verwendet. Die 293gp-Zelllinie wurden einen Tag vor der Transfektion in 10 cm Schalen ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte bei ca. 70% Konfluenz der Zellen die Transfektion und die Zellen wurden mit 5 ml frischem Nährmedium versehen. Daraufhin wurden 5 µg des jeweiligen Konstruktes, 10 µg M57 (gagpol), 2 µg M75 (VSV-G) und 5 µg Ampho in 750 µl DMEM aufgenommen und mit 20 µl Plus-Reagenz versehen. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde dieser Ansatz mit weiteren 750 µl DMEM und 30 µl Lipofektamin versehen. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit bei RT wurde dieser Ansatz zu den 5 ml in die 10 cm Schalen gegeben. Nach 3 h wurde das Nährmedium auf ein Volumen von 9 ml aufgefüllt. Weitere 6 h später wurde das Nährmedium abgenommen und durch 10 ml frisches Nährmedium ersetzt. Nach 48 h, 72 h und 96 h erfolgte die Gewinnung und Filtrierung (Acrodiskfilter; Pallman) des Virusüberstandes.

#### 2.3.7 Transduktion der Zielzellen

24 h vor dem Beginn der Transduktion mit den VSV-G pseudotypisierten Viren, wurden  $5 \times 10^5$  Zielzellen in 10 cm Schalen ausgesät. Von dem Virusüberstand, der 48 h, 72 h und 96 h nach der Transfektion gewonnen wurde, wurden jeweils 5 ml auf jede 10 cm Schale zu 5 ml Nährmedium gegeben.

#### 2.3.8 Sortierung der transduzierten Zellen

Die transduzierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend in 350 µl PBS aufgenommen und filtriert (25 µm, Macs). Die Zellen wurden mit einem FACS-Couter am Heinrich-Pette-Institut sortiert. Nach dem Sortieren wurden die EGFP positiven Zellen in Kultur genommen und expandiert.

#### 2.3.9 Proliferationsmessungen

Die Zielzellen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante infiziert und nach der letzten Transduktion mit BrdU-APC behandelt. Es wurde eine Endkonzentration von 10 µM BrdU-APC im Zellkulturmedium verwendet. Nach 16 h Inkubation erfolgte die Fixierung der Zellen und Behandlung mittels Puffer-Lösungen des APC BrdU-Kits entsprechend der Anleitung. Danach wurden die Zellen mit einer DNase behandelt. Anschliessend erfolgte die Zugabe von 20  $\mu$ l von 7-amino-actinomycin D, einem flureszierendem intrazellulär wirkenden Antigen, zu jedem Zellansatz Die Analyse der Zellen, die mittels BrdU-APC behandelt wurden, erfolgte im Heinrich-Pette-Institut.

#### 2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

#### 2.4.1 Konzentrationsbestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach Bradford. Die Proteinbestimmung in den Zelllysaten wurde in einer Mikrotiterplatte mit den Reagenzien des *DC Protein Assay* von Bio-Rad nach Herstellerangaben durchgeführt und erfolgte anhand von Standardverdünnungen des Rinderserumalbumins Fraktion V in einem Bereich von 0 mg/ml bis 1,5 mg/ml. Es wurden jeweils 5 µl der BSA-Lösung in einem Dreifachansatz und 5 µl einer 1:10-Verdünnung des Zelllysats als Dreifachbestimmung in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 25 µl Reagenz A' (20 µl Reagenz S pro 1 ml Reagenz A) und 200 µl Reagenz B versetzt. Nach Entfernung aller Luftblasen und einer Inkubation von 15 min erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Aus den Extinktionswerten des BSA-Standards wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration in den Lysatproben ermittelt wurden.

#### 2.4.2 Ponceau S-Färbung

Direkt nach dem Proteintransfer des Western Blot wurden die Nitrozellulose-Membranen 2 min in destilliertem Wasser equilibriert. Danach wurden diese für 15 min in Ponceau S-Färbung (gebrauchsfertig von Serva) gelegt. Zur Entfernung der unspezifischen Bindungen, wurden die Membranen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und zwischen zwei Plastikfolien in den Entwickler von der Firma Fujifilm gelegt und im Präzisionsmodus Aufnahmen gemacht.

#### 2.4.3 Western Blot

Für die Auftrennung der Proteine werden NuPAGE 10% Bis-Tris Gele und die XCell Sure Lock Apparatur von Invitrogen und für den Transfer der Proteine die Trans-Blot<sup>™</sup> Cell von Bio-Rad verwendet. Die Proteinproben enthielten eine Proteinmenge von 20 µg und wurden mit NP40-Lysispuffer und 3x Lade-Puffer mit 1 M DTT auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Vor dem Auftragen der Proben auf die NuPAGE 10% Bis-Tris Gele wurden die Gele in die Western Blot-Apparatur eingespannt und die Proben 5 min bei 100°C denaturiert. Die Western Blot-Apparatur wurde auf 150 V eingestellt und die Proben innerhalb von 1,5 h aufgetrennt. Daraufhin wurde das Gel mit einer Protran<sup>®</sup> Nitrozellulosemembran (0,45 µm) zwischen zwei Whatman-3MM-Chromatografiepapiere und zwei Scotch-Schwämme gelegt und in die Western-Blot Apparatur (Trans-Blot<sup>™</sup> Cell, Bio-Rad) eingespannt. Die Proteine wurden in 2 h bei 50 V auf die Membran transferiert, die anschließend mit einer Lösung von 1x TBS mit 0,5% Tween 20 sowie 5% Magermilchpulver bei RT für 1 h blockiert wurde. Im Anschluß wurde der primäre Antikörper in einer Lösung aus 1x TBS mit 0,5% Tween 20, 2,5% Magermilchpulver und 0,01% Natriumazid über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Am folgenden Morgen wurde die Membran dreimal für 10 min mit einer Lösung aus 1x TBS mit 0,5% Tween 20 und 2,5% Magermilchpulver gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären Antikörper in einer Lösung aus 1x TBS mit 0,5% Tween 20 und 2,5% Magermilchpulver bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran zweimal mit 1x TBS und wie folgt gewaschen: zweimal für 10 min mit 1x TBS mit 0,5% Tween 20, einmal für 10 min mit 1x TBS mit 3% Tween 20, zweimal für 15 min mit 1x TBS mit 0,5% Tween 20, zweimal für 20 min mit 1x TBS mit 0,5% Tween 20 und zweimal für 30 min mit 1x TBS. Die Membran wurde für 1 min in einer Mischung aus je 3 ml der ECL-Lösungen I und II von Amersham Biosciences inkubiert und zwischen zwei Plastikfolien in den Entwickler von der Firma Fujifilm gelegt. Abhängig von der Stärke des Chemilumineszenzsignals wurden Aufnahmen in dem Präzisions- und Inkrementmodus gemacht. Die Errechnung der Stärke der Western Blot-Lane erfolt nach Abzuges des Leerwertes. Daraufhin wird die Membran in Blockierlösung überführt und wiederum für 1 h bei RT inkubiert. Das Protokoll wurde anschließend wie zuvor beschrieben fortgesetzt.

#### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für DTC-Zelllinien

#### 3.1.1 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges wurde nachgewiesen, indem die Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473 (pAkt S473) in den Zelllinien im Western Blot bestimmt wurde. Die DTC-Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1 und die Kontrollzelllinie MTSV 1.7 wurden bei 80% Konfluenz der Zellen mit NP40-Lysispuffer lysiert. Nach der Proteinkonzentrations-Bestimmung der Lysate nach Bradford fand die Ponceau S-Färbung und die Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473) und MAPK Anwendung.



Abb. 7: Zur Quantifizierung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in den DTC-Zelllinien und der Zellinie MTSV 1.7. Western Blot-Analyse mit Antikörper gegen pAkt(Ser473) in den DTC-Zelllinien LC-M1, BC-M1 und PC-E1 und die Kontrollzellinie MTSV 1.7.

Die im Western-Blot detektierten pAkt(Ser473)-Mengen wurden auf die Ponceau S-Färbung abgeglichen. Das pAkt(Ser473)-Signal der Zelllinie MTSV 1.7 wurde gleich 100% gesetzt (Abb. 8). Die Zelllinie LC-M1 wies einen ca. 23-fach höheren pAkt(Ser473)-Level als die Kontrollzelllinie auf (p=0,016). Die DTC-Zelllinie BC-M1 zeigte einen 1,4-fach höheren und die Zelllinie PC-E1 einen 0,9-fach niedrigeren Level an pAkt(Ser473) als die Zelllinie MTSV 1.7.



Abb. 8: Akt(Ser473)-Phosphorylierung in DTC-Zelllinien und der Zelllinie MTSV 1.7 Mit (\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 gekennzeichnet. Die im Western-Blot detektierten pAkt(Ser473)-Mengen wurden auf die Ponceau S-Färbung abgeglichen und das pAkt(Ser473)-Signal der Zelllinie MTSV 1.7 wurde gleich 100% gesetzt

#### 3.1.2 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Inhibition der PI3K

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Akt(Ser473)-Phosphorylierungen der DTC-Zelllinien PI3K-abhängig waren. Hierfür wurden die Zelllinien mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelt. LY294002 wurde bei 80% Konfluenz der Zellen in einer Endkonzentration von 25 µM bzw. DMSO eingesetzt. Nach 15 Stunden Inkubation erfolgte die Zelllyse. Daraufhin wurde eine Ponceau S-Färbung und Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473) und MAPK durchgeführt.



Abb. 9: Western Blot-Analysen der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in DTC-Zelllinien und in der Zelllinie MTSV 1.7 mit und ohne Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor LY294002

In den linken Abbildungen sind jeweils die pAkt(Ser473)-Signale der ungehemmten Zelllinien und in den rechten Abbildungen die pAkt(Ser473)-Signale nach Zugabe von LY294002 dargestellt. Die Zugabe des PI3K-Inhibitors senkte in den Zelllinien MTSV 1.7, LC-M1 und BC-M1 das pAkt(Ser473)-Niveau um ca. 90% und in der Zelllinie PC-E1 um ca. 70%.



	MTSV 1.7	LC-M1	BC-M1	PC-E1
% Hemmung	90	93	90	71

Abb. 10: Prozentuale Reduktion der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in den DTC-Zelllinien und der Zelllinie MTSV 1.7 durch LY294002. Quantifizierung der im Western-Blot detektierten pAkt(Ser473)-Mengen. (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 und (\*\*) ab einem p<0,01.</p>

Die Abnahme des P-Akt(Ser473)-Niveaus der Zelllinie MTSV 1.7 (p=0,0061) war ebenso statistisch signifikant wie die der Zelllinien LC-M1 (p=0,018) und BC-M1 (p=0,0151). Die Verminderung des Phosphorylierungs-Niveaus der Zelllinie PC-E1 zeigte ein p-Wert von 0,078.

#### 3.1.3 Abhängigkeit der Proliferation von der PI3K-Aktivität

Die Analyse der Abhängigkeit des Wachstums der DTC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie von der PI3K-Aktivität wurde ebenfalls mit Hilfe des PI3K-Inhibiors LY294002 durchgeführt. Die Wachstumskinetik erfolgte über 10 Tage, wobei zu Beginn des Experimentes  $1 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät wurden. Der Hemmstoff LY294002 wurde in einer Endkonzentration von 25  $\mu$ M eingesetzt. Das Nährmedium mit 25  $\mu$ M LY294002 bzw. DMSO wurde jeden zweiten Tag gewechselt und bei 100% Konfluenz
wurden die Zellen subkultiviert. Die Zellzahlen wurden jeden zweiten Tag in Triplikaten mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Mittelwerte in den folgenden Wachstumskurven abgebildet.





Abb. 11: Wachstums-Untersuchungen der Zelllinie MTSV 1.7 (1) und der DTC-Zelllinien LC-M1 (2), PC-E1 (3) und BC-M1 (4) mit und ohne LY294002-Behandlung

Die Graphiken A zeigen die Wachstumskinetiken der Kontroll- und der DTC-Zelllinien. Auf der Ordinate sind die logarithmierten Zellzahlen und auf der Abszisse die Tage abgebildet. Die Graphiken B zeigen die prozentualen Gesamtzellzahlen der mit und ohne LY294002 behandelten Zellen am 10. Tag, wobei die Zellzahl der nicht gehemmten Zellen am Tag 10 als Referenz verwendet wurde. Mit (\*\*\*) sind Unterschiede ab einem p-Wert von p<0,001 gekennzeichnet.

In der Kinetik der Kontrollzelllinie MTSV 1.7 (Abb. 11) war bereits nach zwei Tagen ein Unterschied in den Zellzahlen der gehemmten und ungehemmten Zellen zu sehen. Die Zellzahlen der unbehandelten Zellen nahmen kontinuierlich zu, während die Zellzahlen der mit LY294002 behandelten Zellen annährend konstant blieben. Die Zugabe des LY294002 Hemmstoffes hemmte die Proliferation um 90% (p=0,0002). Das Wachstum der untersuchten DTC-Zelllinien LC-M1 und PC-E1 ließ sich durch LY294002 mit einer ähnlichen Kinetik hemmen wie das Wachstum der Kontrollzelllinie MTSV 1.7 (Abb. 11). Die Zellzahlen der unbehandelten Zellen nahmen kontinuierlich zu, während die Zellzahlen der mit LY294002 behandelten Zellen relativ gleich blieben oder sogar abnahmen. Die DTC-Zelllinie BC-M1 zeigte bereits nach wenigen Tagen eine starke Abnahme der Zellzahl. LY294002 führte in der Zelllinie LC-M1 zu einer Reduktion des Wachstums um 91% (p=0,0005). In den Zelllinien PC-E1 und BC-M1 nahm die Proliferation durch LY294002 um 98% (p=0,0007) und 99,9% (p=0,00002) ab.

#### 3.1.4 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Expression von SHIP1

Die Bestimmung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Expression von SHIP1 erfolgte bei den Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7. Für die Gewinnung der amphotrop und VSV-G pseudotypisierten Retroviren wurde die Helferzelllinie 293-gp in Kultur genommen und mit Hilfe der Lipopofectamine-Reagenzien mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transfiziert. Die Analyse mit einer Durchflusszytometrie (FACS) ergabe folgende prozentuale Werte an EGFP-positiven Zellen: SF91 52,7%, SHIP1 1,3%, SHIP-Mutante 1,1%.



Abb. 12: FACS-Analyse der mit SF91 (B), mit SHIP1 (C) und mit SHIP1-Mutante (D) transfizierten 293-gp-Helferzelllinie. Auf der Ordinate ist die Zellgröße und auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet. Die EGFP-postiven Zellen wurden sortiert und die positiv sortierten Zellen in Kultur genommen.

Auf der Ordinate ist die Zellgröße und auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet. Die EGFP-postiven Zellen wurden sortiert und die positiv sortierten Zellen wurden in Kultur genommen und für die Herstellung von amphotropen und VSV-Gpseudotypisierten Retroviren verwendet. Die Transduktionen der Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 erfolgten jeweils in Triplikaten an drei aufeinander folgenden Tagen. Die FACS-Analyse der tansduzieten LC-M1 Zellen zeigte eine Expression von EGFP nach Transduktion mit dem SF91-Vektor (12,2%), mit dem SHIP1-Vektor (15,7%) und SHIP-Mutante-Vektor (9,6%). Anschließend wurden die Zellen sortiert.



Abb. 13: FACS-Analyse der nicht-transduzierten (A), mit SF91 (B), mit SHIP1 (C) und mit SHIP1-Mutante (D) transduzierten Zelllinie LC-M1. Auf der Ordinate ist die Zellgröße und auf der

Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet. Die EGFP-postiven Zellen wurden sortiert und die positiv sortierten Zellen in Kultur genommen.



Abb. 14: FACS-Analyse der nicht-infizierten (A), mit SF91 (B), mit SHIP1 (C) und mit SHIP-Mutante (D) infizierten Zelllinie MTSV 1.7. Auf der Ordinate ist die Zellgröße und auf der Abszisse die EGFP-Fluoreszenz abgebildet.

Die positiv sortierten Zellen wurden in Kultur genommen und expandiert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen in Triplikaten ausgesät und lysiert. Es folgten Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen pAkt(Ser473), SHIP1 und EGFP.



Abb. 15: Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung und Expression von SHIP1 und EGFP in der Zelllinie LC-M1 in nicht-transduzierten, Vektortransduzierten (SF91), SHIP1-transduzierten und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen. Die transduzierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten kultiviert. In der Abbildung ist in der Reihenfolge von links nach rechts, die nicht-infizierten, SF91-, SHIP1- und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt.



Abb. 16: Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung und Expression von SHIP1 in der Zelllinie MTSV 1.7.. Die transduzierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten kultiviert. In der Abbildung ist in der Reihenfolge von links nach rechts, die nicht-infizierten, SF91-, SHIP1- und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt.

Die transduzierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten aufgetragen (Abb. 15 und 16). In den Abbildungen 15 und 16 sind in der Reihenfolge von links nach rechts, die nichtinfizierten, SF91-, SHIP1- und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt. pAkt(Ser473)-Signale waren in allen Triplikaten der Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 deutlich zu sehen (Abb. 15, 16). Die Expression von SHIP1 führte in den Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 nicht zu signifikanten Verringerungen der pAkt(Ser473)-Level. Dies ist wohl auf die nur schwache Expression von SHIP1 zurückzuführen, die nur 19 % von der Expression der SHIP1-Mutante in LC-M1 Zellen betrug.



Abb. 17: Expession von SHIP1 nach Transduktion von LC-M1-Zellen mit SHIP1- und SHIP1-Mutante-Vektoren. Quantifizierung der SHIP1-Level nach Detektion von SHIP1 im Western Blot in Triplikaten. Mit (\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,01 gekennzeichnet.

Bei der Zelllinie MTSV 1.7 ergab sich ein ähnliches Bild. Auch hier betrug die Expression von SHIP1 nur ca. 10 % der SHIP1-Mutante.



Abb. 18: Expression von SHIP1 nach Transduktion von MTSV 1.7-Zellen mit SHIP1 und SHIP1-Mutante-Vektoren. Quantifizierung der SHIP1-Level nach Detektion von SHIP1 im Western Blot in Triplikaten. Mit (\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 gekennzeichnet.

# 3.1.5 Wachstumsverhalten der Zelllinien MTSV 1.7 und der LC-M1 nach Expression von SHIP1

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens nach SHIP1-Expression erfolgten die Transduktionen der Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 in Triplikaten mit dem Vektor SF91 und dem Konstrukt SHIP1. Im nächsten Schritt wurden die Zellen über 16 Stunden mit Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt.



Abb. 19: Effekte der SHIP1-Expression auf die Proliferation der Zelllinie LC-M1. Auf der Ordinate ist das APC-Signal und auf der Abszisse das EGFP-Signal abgebildet. Die Abbildung A stellt die Kontrolle dar, die wie erwartet kein EGFP exprimiert. In Reihe B und C sind die mit SF91 und SHIP1 transduzierten Zellen zu sehen. In den Quadranten Q1 und Q3 sind die Zellen abgebildet, die kein EGFP exprimieren, in den Quadranten Q2 und Q4 sind jeweils die EGFP-positiven Zellen dargestellt.

Auf der Ordinate ist das APC-Signal und auf der Abszisse das EGFP-Signal abgebildet. In den Quadranten Q1 und Q3 sind die Zellen abgebildet, die kein EGFP exprimieren. In den Quadranten Q2 und Q4 sind jeweils die EGFP-positiven Zellen dargestellt. Im Quadranten Q2 sind die EGFP-positiven Zellen, die zusätzlich APC-positiv sind. Für die Auswertung wurden jeweils die Quotienten G0=Q1/(Q1+Q3) und G1-G3=Q2/(Q2+Q4) berechnet. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. Die Mittelwerte der Triplikate der Zellen sind in der folgenden Auswertung zu sehen. Die Expression von SHIP1 hatte in der Zelllinie LC-M1 nur einen geringen, nicht signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellen.



	Gate 0	Gate 1-3
SF91	100%	113%
SHIP1	100%	109%

Abb. 20: APC BrdU-Auswertung des ersten Versuches mit der Zelllinie LC-M1. Es erfolgte die Tansduktion der Zelllinie LC-M1 in Triplikaten mit dem Vektor SF91 und dem Konstrukt SHIP1. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. Die Mittelwerte der Triplikate der Zellen sind in der folgenden Auswertung zu sehen.

Von den SF91-transduzierten Zellen waren 113%  $\pm$  2,2% und von den SHIP1transduzierten Zellen 109%  $\pm$  14,6% APC-positiv.

Werden die Gates G1-G3 der mit SF91 und SHIP1 tansduzierten Zellen verglichen, so führte die Transduktion von SHIP1 zu einer Reduktion der Prolieration von 4%.

Im zweiten APC BrdU-Versuch mit der Zellinie LC-M1 wurden die Zellen zusätzlich mit SHIP1-Mutante transduziert und die EGFP-positiven Zellen (Q2+Q4) weiter unterteilt in schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positive Zellen.



Abb. 21: APC BrdU Facs-Daten der nicht-transduzierten (A), der SF91 (B), der SHIP1 (C) und der SHIP1-Mutante (D) transduzierten Zelllinie LC-M1. Auf der Ordinate ist das APC-Signal und auf der Abszisse das EGFP-Signal abgebildet. Die Abbildung A stellt die Kontrolle dar, die wie erwartet kein EGFP exprimiert. In Reihe B, C und D sind die mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transduzierten Zellen zu sehen. Die EGFP-positiven Zellen (Q2+Q4) weiter unterteilt in schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positive Zellen.

Auf der Ordinate ist das APC-Signal abgebildet. Für die Auswertung wurden die Proliferationen der Zellen in den jeweiligen Gates berechnet, indem der Quotient aus Zellen, die EGFP- und APC-positiv sind und allen EGFP-positiven Zellen, gebildet wurde. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (G0) wurde gleich 100% gesetzt.



	Gate 0	Gate 1	Gate 2	Gate 3
SF91	100%	115%	128%	150%
SHIP1	100%	114%	116%	127%
SHIP1-Mu	100%	117%	119%	132%

Abb. 22: APC BrdU-Auswertung des zweiten Versuches der Zelllinie LC-M1. Für die Auswertung wurden die Proliferationen der schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positiven Zellen berechnet, indem der Quotient aus Zellen, die EGFP- und APC-positiv sind und allen EGFP-positiven Zellen, gebildet wurde. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (Gate 0) wurde gleich 100% gesetzt. In der Abbildung sind signifikante Unterschiede ab p<0,05 mit (\*), p<0,01 mit (\*\*) und p<0,001mit (\*\*\*) gekennzeichnet. In der Tabelle sind die % Proliferationen der Zellen abgebildet.

Die Proliferation der dem EGFP-Kontrollvektor (SF91) transduzierten Zellen war signifikant gesteigert. Ebenso zeigten die mit SHIP1 und SHIP1-Mutante transduzierten Zellen ein signifikant gesteigertes Wachstum (Abb. 23). Im Gate 3 wuchsen von den SF91-positive Zellen 150%  $\pm$  3% (p=0,0074) von den SHIP1-positiven Zellen 127%  $\pm$  2,6% (p=0,00057) und von den SHIP-Mutante-positiven Zellen 132%  $\pm$  2,5% (p=0,00012).

Im Gate 2 zeigten die mit SHIP1 transduzierten Zellen im Vergleich zu den Vektortransduzierten Zellen ein signifikant reduziertes Wachstum (p=0,0059) (Abb.22). Im Gate 3 führte die Transduktion von SHIP1 und SHIP-Mutante verglichen mit den Vektor-transduzierten Zellen zu einem signifikant reduzierten Wachstum.

In der Kontrollzelllinie MTSV 1.7 zeigte die Expression des Vektors, SHIP1 und SHIP-Mutante einen wachstumssteigernden Effekt.



**Abb. 23:** Auswertung des APC BrdU-Versuches der Zelllinie MTSV 1.7. Für die Auswertung wurden die Proliferationen der schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positiven Zellen berechnet, indem der Quotient aus Zellen, die EGFP- und APC-positiv sind und allen EGFP-positiven Zellen, gebildet wurde. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (Gate 0) wurde gleich 100% gesetzt. Signifikante Unterschiede ab p<0,05 sind mit (\*), p<0,01 mit (\*\*) und p<0,001 mit (\*\*\*) gekennzeichnet. In der Tabelle sind die % Proliferationen der Zellen abgebildet.

In diesem Experiment liegt eine EGFP-konzentrationsabhängige Steigerung des Wachstums der mit SF91, SHIP1- und SHIP1-Mutante-infizierten Zellen vor. In Gate 3 liegt das Wachstum der SF91-tranduzierten Zellen bei 219%  $\pm$  2,7% (p=0,00000039), der SHIP1-tranduzierten Zellen bei 205%  $\pm$  5,5% (p=0,000061) und der SHIP-Mutantetranduzierten Zellen bei 210%  $\pm$  9,7% (p=0,00011).

Wird das Wachstum der Zellen der Gates 3 verglichen, so führt die Transduktion von SHIP1 zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (p=0,015).

## 3.1.6 Einfluss der Expression von SHIP1 unter reduzierten Wachstumsbedingungen auf die Proliferation

Im Weiteren stellte sich die Frage, welchen Einfluss die SHIP1-Expression unter reduzierten Wachstumsbedingungen auf die Proliferation der Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 hat.

Die Zelllinien wurden nach den Transduktionen mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP-Mutante über 24 Stunden im zusatzfreien Nährmedium kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinie LC-M1 erfolgte in RPMI 1640 ohne Glutamin, FCS, EGF, b-FGF und die der Zelllinie MTSV 1.7 in DMEM ohne Glutamin und FCS. Im Anschluss erfolgte die 16-stündige Inkubation der Zelllinien mit BrdU in zusatzfreiem Nährmedium.

Die EGFP-positiven Zellen wurden erneut in schwach- (G1), mittel- (G2) und stark-(G3) positive Zellen untergeteilt. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen wurde als Referenz verwendet. Die Expression von SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante steigerte das Wachstum der beiden Zelllinien EGFP-konzentrationsabhängig (Abb.24).



	Gate 0	Gate 1	Gate 2	Gate 3
SF91	100%	111%	110%	123%
SHIP1	100%	111%	111%	119%
SHIP1-Mu	100%	117%	118%	127%

Abb. 24: Auswertung des APC BrdU-Versuches der Zelllinie LC-M1. In der Tabelle sind die % Proliferationen der infizierten Zellen dargestellt. Für die Auswertung wurden die Proliferationen der schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positiven Zellen berechnet, indem der Quotient aus Zellen, die EGFP- und APC-positiv sind und allen EGFP-positiven Zellen, gebildet wurde. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (Gate 0) wurde gleich 100% gesetzt.

Im Gate 3 führte die Transduktion mit dem Kontrollvektor (SF91) zu einer Steigerung des Wachstum um 23% (p=0,00089), SHIP1 zu einer Zunahme des Wachstums von 19% (p=0,00064) und SHIP-Mutante zu 27% (p=0,00027) gesteigertem Wachstum. Im Gate 3 hatte die Expression von SHIP1 verglichen mit den Vektor-transduzierten Zellen eine Reduktion der Proliferation von 4 % zur Folge. Die Kontrollzelllinie zeigte eben-falls eine signifikante EGFP-konzentrationsabhängige Zunahme der Proliferation nach Tansduktion mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante (Abb.25).



	Gate 0	Gate 1	Gate 2	Gate 3
SF91	100%	87%	104%	163%
SHIP1	100%	101%	111%	141%
SHIP1-Mu	100%	92%	94%	124%

Abb. 25: APC BrdU-Auswertung der Zelllinie MTSV 1.7. Für die Auswertung wurden die Proliferationen der schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positiven Zellen berechnet, indem der Quotient aus Zellen, die EGFP- und APC-positiv sind und allen EGFP-positiven Zellen, gebildet wurde. Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (Gate 0) wurde gleich 100% gesetzt. (\*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 und (\*\*\*) ab einem p<0,001. In der Tabelle sind die % Proliferationen der infizierten Zellen dargestellt.</p>

In der Kontrollzelllinie führte die Transduktion mit dem Kontrollvektor (SF91) im Gate 3 zu 63% gesteigertem Wachstum (p=0,000006), die SHIP1 zu 41% (p=0,04) und die SHIP1-Mutante zu 24% (p=0,0002) zu gesteigertem Wachstum.

Werden die Gates 3 verglichen, so führte die Transduktion der mit SHIP1 transduzierten Zellen zu einer Reduktion des Wachstums und die SHIP1-Mutante transduzierten Zellen zu eine signifikanten Reduktion des Wachstums verglichen mit den SF91-transduzierten Zellen (p=0,0004) (Abb.25).

# 3.2 Einfluss der EGFR-Kopienzahl auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

# 3.2.1 Abhängigkeit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges von der Anzahl der EGFR-Kopien auf DNA-Ebene

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges von der Anzahl der EGFR-Kopien auf DNA-Ebene wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert in Kultur genommen. Die Zelllinie MDA-MB-468 besitzt ca. 35 EGFR-Kopien auf DNA-Ebene. Durch Kultivierung dieser Zelllinie mit 5 nM EGF entstand die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit nur noch 2 EGFR-Kopien auf DNA-Ebene.

Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der EGFR-Expression und der Mengen an pAkt(Ser473) und MAPK in Triplikaten (Abb.26).



 Abb. 26: Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der Expression des EGF-Rezeptors (EGFR), der MAP-Kinase (MAPK) sowie der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert. Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der EGFR-Expression und der Mengen an P-Akt(Ser473) und MAPK in Triplikaten.

In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert konnte im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-468 eine sehr stark erniedrigte Expression des EGFR nachgewiesen werden (p=0,00005) (Abb. 26 und 27).



Abb. 27: Quantifizierung der Expression des EGF-Rezeptors in den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert. Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der EGFR-Expression in Triplikaten. Mit (\*\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,001 gekennzeichnet.

In den Mammakarzinom-Zelllinien lag eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der EGFR-Kopien auf der DNA-Ebene und der Menge an pAkt(Ser473) vor. So zeigte die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert einen ca. zweimal so hohen pAkt(Ser473)-Level (190%) wie die Zelllinie MDA-MB-468 (p=0,0048) (Abb. 28).



Abb. 28: Quantifizierung der Expression von pAkt(Ser473)-Level in den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR supprimiert. Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der Mengen an pAkt(Ser473) in Triplikaten. Mit (\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,01 gekennzeichnet.

#### 3.2.2 Abhängigkeit der Akt(Ser473)-Aktivierung von der PI3K-Aktivität

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Akt(Ser473)-Aktivierung von der Aktivität der PI3K abhängig ist. Hierfür wurden die Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 bei 80% Konfluenz mit 25  $\mu$ M LY294002 bzw. DMSO behandelt. Nach 15-stündiger Inkubation erfolgte die Zelllyse mit NP40-Lysispuffer und eine Western Blot-Analyse.

In beiden Zelllinien wurden die P-Akt(Ser473)-Mengen durch die Behandlung mit LY294002 signifikant vermindert (Abb. 29 und 30).



Abb. 29: Quantifizierung der pAkt(Ser473)-Level ohne und mit LY294002 der Zelllinie MDA-MB-468. Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der Mengen an pAkt(Ser473) in Triplikaten. Mit (\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 gekennzeichnet.</li>



Abb. 30: pAkt(Ser473)-Level ohne und mit LY294002 der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert. Im Western Blot erfolgte die Bestimmung der Mengen an pAkt(Ser473) in Triplikaten. Mit (\*\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,001 gekennzeichnet.

Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die pAkt(Ser473)-Level der mit und ohne LY294002 behandelten Zelllinien, wobei die pAkt(Ser473)-Signale der unbehandelten Zellen gleich 100% gesetzt wurde.

In der Zelllinie MDA-MB-468 führte LY294002 zu einer Verringerung des pAkt(Ser473)-Levels um 84,1% (p=0,0199) und in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert um 81,6% (p=0,00029) (Abb. 29 und 30).

#### 3.2.3 Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nach Hemmung der EGFR

Um den Einfluss der EGFR auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu untersuchen, wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib behandelt. Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 50  $\mu$ M in Triplikaten eingesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation wurden die Zellen mit NP40-Lysispuffer lysiert und eine Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473) und MAPK sowie eine Ponceau S-Färbung durchgeführt (Abb. 31).



**Abb. 31:** Western Blot zur Quantifizieung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in der Zelllinie MDA-MB-468. Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0 μM, 0,05 μM, 0,5 μM, 5 μM und 50 μM in Triplikaten eingesetzt.

Die Zugaben von 0,05  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M Gefitinib führten zu keinen deutlichen Verringerungen der pAkt(Ser473)-Level. Die Akt(Ser473)-Signale nahmen infolge der Zugaben von 0,05  $\mu$ M Gefitinib um 23,7%, von 5  $\mu$ M Gefitinib um 18,5% ab und von 50  $\mu$ M Gefitinib um 38,3% ab. Die Inkubation mit 0,5 $\mu$ M Gefitinib führte zu keiner Minderung der pAkt(Ser473)-Level (Abb 32).



**Abb. 32:** Quantifizieung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in der Zelllinie MDA-MB-468. Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0 μM, 0,05 μM, 0,5 μM und 50 μM in Triplikaten eingesetzt.

Die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert wurde mit den gleichen Konzentrationen von Gefitinib behandelt wie die Zelllinie MDA-MB-468 und die Phosphorylierung von Akt(Ser473) mittels Western Blot analysiert (Abb.33).



**Abb. 33:** Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473) in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert. Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0 μM, 0,05 μM, 0,5 μM, 5 μM und 50 μM in Triplikaten eingesetzt.

In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert führte bereits die Behandlung mit 0,05  $\mu$ M Gefitinib zu einer Verriingerung des pAkt(Ser473)-Levels um 63%. Die Zugaben von 0,5  $\mu$ M Gefitinib senkten das pAkt(Ser473)-Niveau um 80,1%, 5  $\mu$ M Gefitinib um 77,4% und 50  $\mu$ M Gefitinib um 95,4% (Abb. 33 und 34).



**Abb. 34:** Quantifizieung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert. Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0 μM, 0,05 μM, 0,5 μM, 5 μM und 50 μM in Triplikaten eingesetzt. Mit (\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,05 gekennzeichnet.

#### 3.2.4 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach Inhibition der EGFR und Her2

Um die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nach Hemmung des EGFR und Her2 zu messen, wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit Lapatinib inkubiert. Lapatinib ist ein dualer EGFR- und Her2-Tyrosinkinase-Inhibitor, der in den Endkonzentrationen 0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt

wurde. Nach 1 Stunde Behandlung erfolgte die Zelllyse mit NP40-Lysispuffer und die Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473), MAPK und Ponceau S-Färbung.



Abb. 35: Western Blot-Analyse mit pAkt(Ser473) der Zelllinie MDA-MB-468. Lapatinib, ein dualer EGFR- und Her2-Tyrosinkinase-Inhibitor, wurde in den Endkonzentrationen 0 μM, 1 μM, 5 μM und 10 μM eingesetzt.

Steigende Lapatinib-Konzentrationen führten zu einer zunehmenden Reduktion des pAkt(Ser473)-Niveaus (Abb. 35 und 36).



**Abb. 36:** Quantifizieung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in der Zelllinie MDA-MB-468. Lapatinib wurde in den Endkonzentrationen 0 μM, 1 μM, 5 μM und 10 μM eingesetzt.

Mit der geringsten eingesetzten Lapatinib-Konzentration von 1  $\mu$ M wurde das pAkt(Ser473)-Niveau um 78,5% gesenkt. Die Inkubation mit 5  $\mu$ M Lapatinib senkten das pAkt(Ser473)-Niveau um 91,4% und die Inkubation mit 10  $\mu$ M Lapatinib um 97,2%. Für die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert ergab sich folgender Western Blot:



**Abb. 37:** Western Blot mit pAkt(Ser473) der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert. Lapatinib wurde in den Endkonzentrationen 0 μM, 1 μM, 5 μM und 10 μM eingesetzt.



**Abb. 38:** Quantifizieung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert. Lapatinib wurde in den Endkonzentrationen 0 μM, 1 μM, 5 μM und 10 μM eingesetzt.

In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert hatte Lapatinib erst in der Konzentrationen von 5  $\mu$ M eine Verminderung des pAkt(Ser473)-Signals um 61,4% zur Folge. Die Zugabe von 10  $\mu$ M Lapatinib reduzierte das pAkt(Ser473)-Niveau um 64,6%.

#### 3.2.5 Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach SHIP1-Expression

Zur Untersuchung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung nach SHIP1-Expression wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit den Kostrukten SF91, SHIP-Mutante und SHIP1 transduziert und sortiert.



Abb. 39: FACS-Analyse der nicht-transduzierten Zellen (A), mit SF91 (24,1% positive Zellen) (B), mit SHIP1 (19,9% positive Zellen) (C) und mit SHIP-Mutante (13,3% positive Zellen) (D) transduzierten Zelllinie MDA-MB-468

	A)	B)	C)	D)	
--	----	----	----	----	--



Abb. 40: FACS-Analyse der nicht-transduzierten Zellen (A), mit SF91 (17,4% positive Zellen) (B), mit SHIP1 (18,4% positive Zellen) (C) und mit SHIP-Mutante (11,7% positive Zellen) (D) transduzierten Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert

Daraufhin wurden die positiv sortierten Zellen in Kultur genommen und expandiert. Nach zwei Wochen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt:



Abb. 41: Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung und Expression von SHIP1 und EGFP in der Zelllinie MDA-MB-468 in nicht-transduzierten, Vektortransduzierten (SF91), SHIP1-transduzierten und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen. Die transduzierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten kultiviert. In der Abbildung ist in der Reihenfolge von links nach rechts, die nicht-infizierten, SF91-, SHIP1- und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt.



Abb. 42: Western Blot-Analyse zur Quantifizierung der Akt(Ser473)-Phosphorylierung und Expression von SHIP1 und EGFP in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert in nichttransduzierten, Vektor-transduzierten (SF91), SHIP1-transduzierten und SHIP1-Mutantetransduzierten Zellen. Die transduzierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten kultiviert. In der Abbildung ist in der Reihenfolge von links nach rechts, die nicht-infizierten, SF91-, SHIP1- und SHIP1-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt.

Die infizierten Zellen wurden jeweils in Triplikaten aufgetragen (Abb. 42 und 43). In den Abbildungen sind von links nach rechts, die nicht-infizierten Zellen, die mit SF91, die mit SHIP1 und die mit SHIP-Mutante transduzierten Zellen abgebildet. In den Triplikaten wurden deutliche pAkt(Ser473)-Signale nachgewiesen (Abb. 41, 42).

Die SHIP1-Signale der SHIP1-infizierten Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert konnten im Vergleich zu den SHIP1-Signalen der SHIP-Mutantetransduzierten Zellen nur schwach nachgewiesen werden (p=0,006 und p=0,0026) (Abb. 41, 42 und 43).



Abb. 43: SHIP1-Signale bezogen auf die Ponceau S-Intensitäten der SHIP1- und SHIP-Mutante-transduzierten Zelllinie MDA-MB-468

Mit (\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,01 gekennzeichnet



Abb. 44: SHIP1-Level der SHIP1- und SHIP-Mutante-infizierten Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert

Mit (\*\*) sind signifikante Unterschiede ab einem p<0,01 gekennzeichnet.

## 3.2.6 Proliferation nach SHIP1-Expression

Zur Untersuchung des Wachstums nach SHIP1-Expression wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert an drei aufeinander folgenden Tagen mit dem Vektor SF91 und den Konstrukten SHIP1 und SHIP-Mutante in Triplikaten infiziert. Am folgenden Abend wurden die Zellen über 16 Stunden mit BrdU behandelt. In der Zelllinie MDA-MB-468 führte die Expression von SHIP1 und SHIP-Mutante in zwei Versuchen zu signifikant reduziertem Wachstum.



Abb. 45: APC BrdU Facs-Daten der nicht-transduzierten (A), der SF91 (B), der SHIP1 (C) und der SHIP1-Mutante (D) transduzierten Zelllinie MDA-MB-468. Auf der Ordinate ist das APC-Signal und auf der Abszisse das EGFP-Signal abgebildet. Die Abbildung A stellt die Kontrolle dar, die wie erwartet kein EGFP exprimiert. In Reihe B, C und D sind die mit SF91, SHIP1 und SHIP1-Mutante transduzierten Zellen zu sehen. Die EGFP-positiven Zellen (Q2+Q4) weiter unterteilt in schwach- (Gate 1), mittel- (Gate 2) und stark- (Gate 3) EGFP-positive Zellen.

Auf der Abszisse ist das EGFP- und auf der Ordinate das APC-Signal abgebildet. In den Quadranten Q2 und Q4 sind die EGFP-positiven Zellen zu sehen. Im Quadranten Q2 sind die EGFP-positiven Zellen, die zusätzlich APC-positiv sind. Für die Auswertung wurden jeweils die Quotienten G0=Q1/(Q1+Q3) und G1-G3=Q2/(Q2+Q4) gebildet. Das Wachstum der nicht-infizierten Zellen wurde als Referenz verwendet. Sowohl die Expression von SF91, als auch von SHIP1 und SHIP-Mutante führten zu einer Steigerung der Proliferation.



	Gate 0	Gate 1-3
SF91	100%	118%
SHIP1	100%	105%
SHIP-Mu	100%	128%

Abb. 46: APC BrdU-Auswertung der Zelllinie MDA-MB-468 In der Tabelle sind die % Proliferationen der SF91, SHIP1- und SHIP-Mutanteinfizierten Zellen dargestellt.

Im Gate G1-G3 zeigten die mit SF91-infizierten Zellen 118%, die mit SHIP1-infizierten Zellen 105% und die mit SHIP-Mutante-infizierten Zellen eine Proliferation von 128%.

Das Wachstum der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert ließ sich in einem Versuchen signifikant durch SHIP1 hemmen. Für die Auswertung wurden jeweils die Quotienten Q1/(Q1+Q3) und Q2/(Q2+Q4) gebildet.



Abb. 49: Auswertung des APC BrdU-Versuches der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert. In der Tabelle sind die % Proliferationen der SF91, SHIP1- und SHIP-Mutante-transduzierten Zellen dargestellt.

Das Wachstum der nicht-transduzierten Zellen (Gate 0) wurde gleich 100% gesetzt. Mit (\*\*) sind p-Werte p<0,01 gekennzeichnet.

Die Expression der SHIP1 führte zu 30% (p=0,0012) Wachstumshemmung.

#### 4 Diskussion

#### 4.1 Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für DTC-Zelllinien

Der PI3K/Akt-Signalweg hat eine grosse Bedeutung für die Proliferation, das Überlebens, die Mobilität und Angiogenese von Tumozellen (Pecorari et al., 2009). In der Tumorprogression beeinflusst aktiviertes Akt die Zell-Zellkontakte und die Zellmobilität (Friedl et al., 2003). Es gibt Hinweise dafür, dass pAkt die Expression von Metalloproteasen induziert, die eine Zellmigration und Invasion begünstigen (Kim et al., 2001) und den Prozess der EMT beeinflusst (Wallerand et al., 2010). In einer Reihe von soliden Tumoren wie z.B. Ovarial- und Mammatumoren konnte bereits eine vermehrte Menge an pAkt identifiziert werden (Altomare at al., 2005) und aktivierende Mutationen in der katalytischen Untereinheit p110α der PI3K gefunden werden (Samuels et al., 2004; Lee et al., 2005). Welche Bedeutung der PI3K/Akt-Signalweg für DTCs hat, wurde in Kapitel 3.1.1. untersucht. In den drei untersuchten DTC-Zelllinien BC-M1, PC-E1 und LC-M1 konnte eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges identifiziert werden. Die DTCs aus den Patienten mit Brust- und Prostatakarzinomen wiesen einen vergleichbar hohen Level an pAkt(Ser473) wie die Kontollzelllinie auf. Die Zelllinie PC-E1 zeigte einen 0,9-fach niedrigeren Level an P-Akt(Ser473) und die Zelllinie BC-M1 einen 1,4-fach höheren pAkt(Ser473)-Level als die Zelllinie MTSV 1.7. Interessanterweise hatte die Zelllinie LC-M1 aus einem Patienten mit Lungenkarzinom ein 23fach höheres pAkt(Ser473)-Niveau als die Kontrollzelllinie (p=0,016). Eine Arbeitsgruppe von Shan wies eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der pAkt-Menge in Lungenkarzinomen nach. Hohe pAkt-Level korrelierten mit einem einem hohen Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen (Shan et al., 2005).

Die starke Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges der Zelllinie LC-M1 kann verschiedene Ursachen haben. Einer möglichen Dysregulation des PI3K/Akt-Signalweges könnte z.B. Mutationen in der regulatorischen Untereinheit der PI3K, Verluste von negativen Regulatoren des PI3K/Akt-Signalweges, PI3K-Amplifikation oder Akt-Überexpressionen zu Grunde liegen. Genetische Abberationen des PI3K/Akt-Signalweg wurden bereits in diversen Tumoren nachgewiesen (Kang *et al.*, 2005). Nachgewiesen wurde die PI3-Kinase- Amplifikation und -Überexpession in Ovarialkarzinomen (Shayesten *et al.*, 1999) und einer Reihe weiterer Tumoren (Bellacosa *et al.*, 1995, Ringel *et al.*, 2001). Mutationen in der regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase wurden in Ovarial- und Colonkarzinomen identifiziert (Philp *et al.*, 2001).

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Akt(Ser473)-Aktivierungen der DTC-Zelllinien PI3K-abhängig waren. Die Zugabe von PI3-Kinase Hemmstoff LY294002 (Kapitel 3.1.2) führte in den behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu Verminderungen der pAkt(Ser473)-Signale. In den DTC-Zelllinien LC-M1 und BC-M1 und der Kontrollzelllinie wurden die pAkt(Ser473)-Signale signifiant um ca. 90% verringert. Das pAkt(Ser473)-Niveau der DTC-Zelllinie PC-E1 wurde um ca. 70% erniedrigt. Infolge der Zugabe von LY294002 lassen sich keine präzisen Aussagen über die Gründe der Verringerungen der pAkt(Ser473)-Niveaus treffen. Diese können sowohl Ausdruck einer Hemmung der PI3K als auch PI3K ähnlicher Kinasen sein. In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass LY294002 neben der PI3K noch weitere Kinasen wie die PDK2 hemmen kann (Sarbassov *et al.*, 2004; Hresko *et al.*, 2005).

Darüber hinaus wurde die Abhängigkeit der Proliferation der DTC-Zelllinien von der Aktivität der PI3K untersucht (Kapitel 3.1.3). In den DTC-Zelllinien LC-M1 und PC-E1 wurde das Wachstum mit einer ählichen Kinetik gehemmt wie in der Kontrollzelllinie MTSV 1.7. Die Gesamtzellzahlen der gehemmten Zellen wurden im Vergleich zu den Zellzahlen der unbehandelten Zellen nach 10 Tagen statistisch signifikant erniedrigt. Der anti-proliferative Effekt durch LY294002 könnte durch die Inhibition der PI3K erklärt werden. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass der PI3K-Inhibitor neben der PI3K noch weitere Kinasen in den Zelllinien gehemmt hat, die Einfluss auf die Proliferation hatten. Die Zellinie BC-M1 wies am 10. Tag der Proliferationsuntersuchung eine Reduktion der Zellzahl auf. Unter Umständen scheint eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs neben einer entscheidenden Bedeutung für das Wachstum, auch für das Überleben der Zellen notwendig zu sein.

Um den Einfluss der Expression von SHIP1 auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und die Proliferation zu untersuchen, erfolgte die spezifische Hemmung des Signalweges mit der Inositol-5-Phosphatase SHIP1. SHIP1 gilt als wichtiger negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges (Liu *et al.*, 1999; Hashimoto *et al.*, 1999; Aman *et al.*, 1998), da die Inositol-5-Phosphatase das von der PI3K gebildeten PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, den *second messenger* zur Rekrutierung von Akt, abbaut (Clement *et*  *al.*, 2001). Die DTC-Zelllinie LC-M1 und die Zelllinie MTSV 1.7 wurden mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP-Mutante transduziert, sortiert und über zwei Wochen expandiert. Im Anschluß erfolgten Western Blot-Analysen mit pAkt(Ser473), SHIP1 und EGFP. Interessanterweise wurden die pAkt(Ser473)-Level der SHIP1-transduzierten Zelllinien nicht signifikant verringert verglichen mit den pAkt(Ser473)-Leveln der SF91- und SHIP-Mutante-transduzierten Zellen. Ferner konnten die SHIP1-Signale in den SHIP1-transduzierten Zellen im Vergleich zu den SHIP1-Signalen der SHIP-Mutante-transduzierten Zellen nur in schwach nachgewiesen werden. Die Expression von SHIP1 könnte durch den Abbau von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zu einer Verminderung der Aktivierung von Akt geführt haben. Der Wachstumsnachteil durch die SHIP1-Expression könnte zu einer Selektion von Zellen geführt haben, die durch posttranskriptionelle Modifizierungen oder posttranslationale Modifikation in der Lage waren, die Bildung des SHIP1-Proteins zu reduzieren bzw. abzuschalten. Hier könnten Regulationsmechanismen wie Tyrosinphosphorylierungen und Ubiquitinylierungen eine Rolle spielen.

Um den Einfluss der Expression von SHIP1 auf das Wachstum der Zellen näher zu untersuchen, erfolgten Proliferationsuntersuchungen mittels APC BrdU. Die Expression von SHIP1 führte in der Zelllinie LC-M1 in zwei Versuchen zu einer EGFP-abängigen Steigerung des Wachstums. Sowohl die mit SF91, als die mit SHIP1 und SHIP-Mutante transfizierten Zellen zeigten eine Steigerung des Wachstums bei zunehmender EGFP Expression. Im Gate G1-G3 des ersten Versuches führte die Transduktion mit SHIP1 verglichen mit den Vektor-transduzierten Zellen zu einer Reduktion der Proliferation von 4%. Im zweiten Versuch der Zellinie LC-M1 zeigten die mit SHIP1 transduzierten Zellen im Gate 2 im Vergleich zu den Vektor-transduzierten Zellen ein reduziertes Wachtum auf. Im Gate 3 führte die Transduktion von SHIP1 und SHIP-Mutante verglichen mit den Vektor-transduzierten Zellen zu einem signifikant reduzierten Wachstum. In der Kontrollzelllinie MTSV 1.7 konnte ebenfalls eine EGFP-abhängige Steigerung der Proliferation nachgewiesen weden. Wird das Wachstum der Zellen der Gates 3 verglichen, so führte die Transduktion von SHIP1 zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. In der Literatur ist eine EGFP-abhängige Proliferation bisher nicht beschrieben. Das grün fluoreszierende Protein ist ein erstmals 1961 von Osmu Shimomura beschriebenes Protein aus der Qualle Aequorea victoria, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Die Primärstruktur besteht aus 238 Aminosäuren. Der eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich offenbar autokatlytisch aus der Tripeptidsequenz Ser<sub>65</sub>–Tyr<sub>66</sub>–Gly<sub>67</sub> innerhalb der Polypeptidkette. Diese intrinsische Fluoreszenz basiert nicht auf einem Umbau durch ein externes Enzym oder nachträglich integrierte Substanzen (Shimomura *et al.*, 1962). Unter Umständen führt die virale Transdution der Zellen zu einem wachstumsfördernden Effekt. Hier müsste Versuchsansätze folgen, um einen wachstumsfördernden Effekt durch den Vorgang der viralen Transduktion auszuschliessen. Möglich ist weiterhin, dass dieses Phänom in Zusammenhang mit der largeT-Immortalisierung steht. Ein Experiment zur Analyse des Wachstum von Zelllinien mit und ohne largeT-Immortalisierung könnte diese Fragestellung klären.

In den folgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der SHIP1-Expression auf das Wachstum der Zelllinien LC-M1 und MTSV 1.7 unter reduzierten Wachstumsbedingungen analysiert. In beiden Zelllinien führte die Expression von SF91, SHIP1 und SHIP-Muatant zu einer EGFP-konzentrationsabhängigen Steigerungen der Proliferation. Im Gate 3 hatte die Expression von SHIP1 in der Zellinie LC-M1 verglichen mit den Vektor-transduzierten Zellen eine Reduktion der Proliferation von 4 % zur Folge. In der Zelllinie MTSV 1.7 zeigten die Zellen des Bereichs mit der stärksten EGFP-Expression von SHIP1 und SHIP-Mutante interessanterweise in Vergleich mit der Proliferation der mit SF91-transduzierten Zellen ein Reduktion der Proliferation, die für die SHIP-Mutante signifikant war.

## 4.2 Einfluss der EGFR-Kopienzahl auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges

Der EGFR hat eine zentrale Rolle in der Tumorgenese einer Vielzahl von Tumoren (Nolan-Stevaux *et al.*, 2010). Die EGFR-Aktivierung induzierte eine Reihe von Signalkaskaden, einschließlich des PI3K/Akt-Signalweges, die das Wachstum, das Überleben, die Angiogenese, Invasion und Metastasierung beeinflussen (Normanno *et al.*, 2006, Joyce *et al.*, 2009).

Im Kapitel 3.2.1. wurde die Korrelation zwischen der Anzahl der EGFR-Kopien auf DNA-Ebene und der Stärke der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges untersucht. Die Zelllinie MDA-MB-468 besitzt ca. 35 EGFR-Kopien auf der DNA-Ebene und durch

Kultivierung dieser Zelllinie mit 5 nM EGF entstand die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit ca. 2 EGFR-Kopien. Die Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert hatte im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-468 einen deutlich niedrigeren Level an EGFR-Protein (p=0,00005). Erstaunlicherweise zeigte die Zellinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert aber ein deutlich höheres Niveau an pAkt(Ser473) als die Zelllinie MDA-MB-468 (p=0,0048). Folglich lag eine negative Korrelation zwischen der Höhe der EGFR-Kopienzahl auf der DNA-Ebene und dem Level an pAkt(Ser473) vor. Diese starke Akt-Aktivierung der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert verglichen mit der Zelllinie MDA-MB-468 könnte dadurch erklärt werden, dass die lange Kultivierung der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit 5 nM EGF zur Aktivierung weiterer die PI3K stimulierenden Signalwege geführt haben könnte. Hier könnten Wachstumsfaktorrezeptoren eine Rolle spielen, die mit den Phosphotyrosinreste mit der SH2-Domänen der p85-Untereinheit der PI3K interagieren (Hu et al., 1992) und zur Aktivierung der PI3K geführt haben könnten. Die starke Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert könnte ferner durch ein verändertes Verhältnis der Anzahl von Rezeptoren auf der Zelloberfläche und eine veränderte Dimerisierungs-Situation erklärt werden. In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert könnten sich entweder vermehrt Heterodimere zwischen EGFR und Her3 oder Her4, wobei Her3 und Her4 direkte Bindungsstellen für die p85-Untereinheit der PI3K besitzen, oder Her3- und Her4-Homodimere gebildet haben. Möglich wäre auch die verstärkte Akt(Ser473)-Aktivierung durch eine veränderte Modulation der Aktivierungen der ErbB-Rezeptoren zu erklären. Hier könnten Mechanismen wie posttranslationale Modifikationen oder Rezeptor-Recycling eine Rolle spielen. Die ErbB-Rezeptoren können durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen positiv und negativ reguliert werden (Schlessinger, 2000; Jorissen et al., 2003; Keilhack et al., 1998). Im Zusammenhang mit dem Rezeptor-Recycling ist bekannt, dass EGFR-Homodimere nach Ligandenbindung schneller in die Zelle aufgenommen und abgebaut werden als andere ErbB-Rezeptoren (Baulida et al., 1996). Heterodimere bestehend aus EGFR und Her2 werden häufig wieder auf die Zelloberfläche zurückgeführt (Lenferink et al., 1998) und könnten zu einer stärkeren Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges geführt haben. Darüber hinaus hängt der Vorgang des Rezeptor-Recyclings davon ab, ob die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoren noch katalytisch aktiv ist (Waterman et al., 1998; Felder et al., 1990). Die kinase-defizienten ErbB3-Rezeptoren gelangen

meist wieder auf die Zellmembran und könnten die Ursache für eine stärkere Aktivierung der PI3K sein.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Phosphorylierungen von Akt(Ser473) in den beiden Mammakarzinom-Zelllinien von der Aktivität der PI3K abhängig waren (Kapitel 3.2.2.). Die Zugabe von LY294002 führte in der Zelllinie MDA-MB-468 zu 84,09% (p=0,0199) und in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert zu 81,64% (p=0,00029) verminderter Aktivierung von Akt(Ser473). LY294002 könnte, unabhängig von der Anzahl der ErbB-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die PI3K inhibiert und zu einer Verminderung der Rekrutierung und Aktivierung von Akt geführt haben. In verschiedenen Arbeitsgruppen wurde in der Zelllinie MDA-MB-468 nach LY294002-Behandlung Verringerungen der pAkt(Ser473)-Level beobachteten (O'Reilly *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2000). Nicht auszuschließen ist, dass LY294002 neben der PI3K noch PI3K ähnliche Kinasen gehemmt haben könnte, die einen Einfluss auf die Aktivierung von Akt hatten.

Um den Einfluss der EGFR auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu analysieren, wurden die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert mit steigenden Konzentrationen Gefitinib und Lapatinib behandelt (Kapitel 3.2.3. und 3.2.4.). Der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib führte in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert bereits in der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,05 µM zu einer deutliche Abnahme des pAkt(Ser473)-Signals. In der Zelllinie MDA-MB-468 hingegen verringerten erst Konzentration von 50 µM Gefitinib das pAkt(Ser473)-Niveau um ca. 38%. Die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert zeigte im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB-468 einen ca. zweimal höheren pAkt(Ser473)-Level und die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFRsupprimiert wurde durch die Zugabe geringerer Gefitinib-Konzentrationen gehemmt. Folglich war in den Mammakarzinom-Zelllinien die Sensitivität gegenüber Gefitinib positiv mit der Menge an pAkt(Ser473) korreliert. Diese Beobachtungen stimmen mit Daten von Cappuzzo et al. überein, die bei Patienten mit NSCLC eine positive Korrelation zwischen dem Ansprechen auf eine Therapie mit Gefitinib und der Stärke der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg beobachteten (Cappuzzo et al., 2005).

Zusätzlich war in den Mammakarzinom-Zelllinien die Stärke der Reduktion der Akt-Aktivierung nach Zugabe mit Gefitinib negativ mit der Höhe der EGFR-Expression korreliert. In Hinblick auf die Assoziation zwischen hoher EGFR-Expression und der Sensitivität gegenüber Gefitinib, identifizierten einige Studien keinen Zusammenhang (Cappuzzo *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 2004), während andere Arbeitsgruppen von einer signifikanten Korrelation berichteten (Cappuzzo *et al.*, 2005; Tsao *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2005). Über die Gründe der Abnahmen der pAkt(Ser473)-Level lassen sich infolge dieses Versuches keine präzisen Aussagen machen. Eventuell reagierte die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert sensitiver auf Gefitinib als die Zelllinie MDA-MB-468, da die wenigen Rezeptoren auf der Zelloberfläche effektiver durch den Hemmstoff gehemmt werden konnten. Die EGFR-Überexpression in der Zelllinie MDA-MB-468 könnte zu einer relativen Toleranz der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges gegenüber Gefitinib geführt haben.

Im Folgenden wurden die beiden Mammakarzinom-Zelllinien mit Lapatinib behandelt. Lapatinib gilt als potenter Tyrosinkinase-Inhibitor des EGFR und Her2 (Rusnak et al., 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Lapatinib die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und Her2 reduziert und die MAPK- und Akt-Aktivierung inhibiert (Xia et al., 2002; Rusnak et al., 2001). Weiter ist die Effektivität des dualen Inhibitors in Mammakarzinomen mit der Abnahme der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges assoziiert (Hedge et al., 2007). Da die Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFRsupprimiert HER2-negativ sind, müsste dieser Hemmstoff einen ähnlichen Effekt zeigen wie der EGFR-Inhibitor Gefitinib. Überrachenderweise war dies nicht der Fall. Lapatinib führte in der Zelllinie MDA-MB-468, die den EGFR überexprimiert, bereits in der niedrigsten Konzentration von 1 µM zu einer deutlichen Verringerung des pAkt(Ser473)-Levels. In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert hingegen nahm der pAkt(Ser473)-Level erst ab der Konzentration von 5 µM Lapatinib ab. Es wurden bereits Ergebnisse zur Inhibition der Zelllinie MDA-MB-468 durch Lapatinib veröffentlicht. Hegde berichtete von zunehmenden Verringerungen der pAkt(Ser473)-Level nach 6 Stunden Inkubation mit steigenden Lapatinib-Konzentrationen bis 3 μM (Hegde et al., 2007). Darüber hinaus beschrieben Arbeitsgruppen Abnahmen der P-Akt(Ser473)-Level nach 1 Stunde Inkubation mit 5 µM Lapatinib (Konecny et al., 2006) sowie nach 72 Stunden mit 0,5 µM Lapatinib (Xia et al., 2007).

Die Gründe für die geringere Abnahme der Akt-Aktivierung in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert im Vergleich zur MDA-MB-468 blieben ungeklärt. Man kann spekulieren, dass der PI3K/Akt-Signalweg in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR- supprimiert durch andere Signaltransduktionswege als die ErbB-Rezeptoren aktiviert wurde. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass Lapatinib in der Zelllinie MDA-MB-468 noch weitere Kinasen gehemmt hat, die einen Einfluss auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg hatten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Lapatinib neben den ErbB-Rezeptoren auch andere Kinasen wie s-Scr hemmen kann (Rusnak *et al.*, 2001).

Im Kapitel 3.2.5. wurde die Bedeutung der Expression von SHIP1 für die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und die Proliferation untersucht. Hier wurden die Akt(Ser473)-Phosphorylierungen in den Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR-supprimiert nach der Expression von SHIP1 untersucht. Zwei Wochen nach den Transduktionen mit den Konstrukten SF91, SHIP1 und SHIP-Mutante wurden in allen transduzierten Zellen deutliche EGFP-Signale nachgewiesen. Überraschenderweise konnten in den SHIP1-transduzierten Zellen deutliche pAkt(Ser473)-Signale und signifikant reduzierte SHIP1-Level im Vergleich zu den SHIP-Mutante-transduzierten Zellen detektiert werden. Unter Umständen konnte die Expression von SHIP1 einen Wachstumsnachteil für die Zellen und eine Selektion derselben zur Folge gehabt haben, die durch posttranskriptionelle Modifizierungen oder posttranslationale Modifikation in der Lage waren, die Bildung des SHIP1-Proteins zu reduzieren.

Es folgten APC BrdU-Versuche, um den Einfluss der SHIP1-Expression auf das Wachstum der Zelllinien zu untersuchen. In den Zelllinien MDA-MB-468 hatte die Expression von SF91, SHIP1 und SHIP-Mutante einen wachstumssteigernden Effekt auf die Zellen. Dieser Effekt ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. In der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert hingegen führte die Expression von SHIP1 zu signifikanten Reduktionen der Proliferation. Interessanterweise zeigte die Expression von SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert verglichen zur Zelllinie MDA-MB-468 zu einem wachstumshemmenden Effekt. Man kann vermuten, dass die Expression von SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert den aktivierten PI3K/Akt-Signalweg in einem stärkeren Maße hemmen konnte als in der Zelllinie MDA-MB-468. Unter Umständen hemmt der negative Regulator in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert verstäkt die Nachlieferung von PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> vor. Folglich hätte die Expression von SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert in dieVegleich zu Zelllinie MDA-MB-468 einen antiproliferativen Effekt. Man könnte ebenfalls annehmen, dass SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert durch die geringere Anzahl an EGFR besser binden kann und somit einen negativ regulierenden Effekt auf das Wachstum der Zellen ausüben kann.

### Zusammenfassung und Ausblick

Die Dissemination von einzelnen Tumorzellen hat eine entscheidende Bedeutung im Prozess der Tumorgenese. In der Tumorbiologie des UKE wurden vereinzelte disseminierte Tumorzellen (DTC) aus dem Knochenmark von Tumorpatienten gewonnen und die DTC-Zelllinien PC-E1, BC-M1 und LC-M1 etabliert.

Diese drei Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht und es konnte die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges für die DTC-Zelllinie LC-M1 nachgewiesen werden, die ein ca. 23-fach höheres Phosphorylierungsniveau von Akt(Ser473) im Vergleich zu der Kontrollzelllinie aufwies.

Die vorliegenden Daten zeigen weiter, dass der PI3K/Akt-Signalweg eine bedeutende Rolle für die Proliferation der DTC-Zelllinien spielt. So führte die Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs mittels des PI3K-Inhibitor LY294002 in den DTC-Zelllinien zu deutlichen Verringerungen der Phosphorylierung von Akt am Serinrest 473. Das Wachstum der DTC-Zelllinien PC-E1 und LC-M1 ließ sich durch LY294002 mit einer ähnlichen Kinetik hemmen wie die Kontrollzelllinie MTSV 1.7, während sich das Wachstum der DTC-Zelllinie BC-M1 durch die LY294002-Behandlung deutlich stärker hemmen ließ.

Neben diesem pharmokologischen Ansatz wurde auch die Asuwirkung der Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs durch Expression von SHIP1, einem negativen Regulator dieses Signalwegs, untersucht. SHIP1 ist eine Inositol-5-Phosphatase, die das von der PI3K gebildete PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, das als *second messenger* zur Rekrutierung von Akt führt, abbaut. Hierbei zeigte sich, dass die mit SHIP1 transduzierte und selektionierte DTC-Zelllinie LC-M1 nur eine sehr geringe SHIP1-Expression aufwies, während das auf dem Co-Expressionsvektor gelegene EGFP stark exprimiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte in den LC-M1-Zellen eine starke Expression der enzymatisch inaktiven SHIP1-Mutante (D672A) zusammen mit EGFP nach Transduktion und Selektion erzielt werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass LC-M1-Zellen, die enzymatisch aktives SHIP1 exprimieren, einer negativen Selektion unterliegen. Im Weiteren wurde daher der Einfluss von SHIP1 auf das Wachstum der LC-M1-Zellen in nichtselektionierten Zellen direkt nach Transduktion analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der LC-M1-Zellen sowohl bei Kultivierung in serumhaltigem wie auch in serumfreien Medium gehemmt wurde. In weiterführenden Experimenten könnte nun untersucht werden, welche der drei Akt-Isoformen in den DTC-Zelllinien an der Weiterleitung der wachstumsvermittelnden Signale *downstream* der PI3-Kinase beteiligt ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) für die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Amplifikationen des EGFR sind in einer Reihe von Malignomen inklusive des Mammakarzinoms nachgewiesen worden. Um den Einfluss der Kopienzahl des EGFR auf die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu untersuchen, wurde als Modellsystem die Mammakarzinomlinie MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFRsupprimiert verwendet. Während die parentale Zelllinie MDA-MB-468 eine starke Amplifikation des EGFR aufweist, die mit einer starken EGFR-Überexpression verbunden ist, besitzt die Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert nur noch 2 Kopien des EGFR und zeigt nur noch eine sehr geringe EGFR-Expression. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung zur EGFR-abhängigen Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs in diesen beiden Zelllinien mit stark unterschiedlicher EGFR-Kopienzahl zeigte, dass überraschenderweise eine hohe Anzahl der EGFR-Kopien nicht mit einer starken Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges korrelierte. Auch konnte der PI3K/Akt-Signalweg in beiden Mammakarzionom-Linien ohne bzw. mit EGFR-Amplifikation durch den PI3K Inhibitor LY294002 in gleicher Weise signifikant gehemmt werden. Um die Bedeutung der Rezeptoren der EGFR-Familie für die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges zu analysieren, erfolgte die Inkubation der Zelllinien MDA-MB-468 und MDA-MB-468 EGFR supprimiert mit dem EGFR-Tyrosinkinase Hemmstoff Gefitinib und dem dualen EGFR- und Her2-Tyrosinkinase-Hemmstoff Lapatinib.

Der EGFR-Tyrosinkinase Hemmstoff Gefitinib konnte in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR supprimiert die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges schon in deutlich geringeren Konzentrationen hemmen als in der Zelllinie MDA-MB-468. Unter Umständen konnten die wenigen EGFR-Rezeptoren in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR supprimiert wesentlich effektiver durch den EGFR-Tyrosinkinase Hemmstoff gehemmt werden. Erstaunlicherweise konnte der duale EGFR- und Her2-Tyrosinkinase-Hemmstoff Lapatinib die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges effektiver in der Zelllinie MDA-MB-468 hemmen, als in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR supprimiert. Abschliessend erfolgte auch hier die Untersuchung des Einflusses von SHIP1 auf das Wachstum der beiden Mammakarzinom-Linien mit unterschiedlicher EGFR-Kopienzahl. Während die Expression von SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 zu einer geringen aber nicht signifikanten Abnahme der Proliferation führte, hatte die expression von SHIP1 in der Zelllinie MDA-MB-468 EGFR-supprimiert eine deutlich stärkere und signifikante Abnahme der Proliferation zur Folge. Dieser Effekt von SHIP1 war abhängig von der enzymatischen Aktivität, da die Expression einer enzymatisch inaktiven SHIP-1-Mutante in keiner der beiden Linien zu einer Wachstumshemmung führte.

Die in der vorliegenden Arbeit erworbenen Ergebnisse zeigen eine funktionelle Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges für das Wachstum von DTC- und Mammakarzinom-Linien und weisen auf eine mögliche Verwendung von SHIP1 für einen gentherapeutischen Ansatz zur Hemmung des Wachstums von DTCs und Mammakarzinomen hin.

### 5 Literaturverzeichnis

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J 1996;15(23):6541-6551.
Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney P, Reece C, Cohen P. Purification and characterisation of a Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate dependent protein kinase (PDK 1) that phosphoylates and activates protein kinase B $\alpha$ . Curr Biol 1997;7:261-269.

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor minteractions. FEBS Lett 1997;410:83-86.

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. Oncogene 2005;24:7455-7464.

Aman MJ, Lamkin TD, Okada H, Kurosaki T, Ravichandran KS. The inositol phosphatase SHIP inhibits Akt/PKB activation in B cells. J Biol Chem 1998;273:33922-33928.

Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase B $\beta$  leads to upregulation of  $\beta$ 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. Cancer Res 2003;63:196-206.

Baselga J, Rischin D, Ranson M, Calvert H, Raymond E, Kieback DG, Kaye SB, Gianni L, Harris A, Bjork T, Averbruch SD, Feyereislova A, Swaisland H, Rojo F, Alabanell J. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. J Clin Oncol 2002;20:4292-4302.

Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. J Biol Chem 1996;271(9):5251-5257.

Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, Sgroi DC, Muir B, Riemenschneider MJ, Iacona RB, Krebs AD, Johnson DH, Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Fukuoka M, Kris MJ, Baselga J, Ochs JS, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: molecular analysis of the IDEAL/INTACT Gefitinib Trials. J Clin Oncol 2005;23:8081-8092.

Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serin-threonine kinase containing an SH2-like region. Science 1991;254:274-277.

Biggs WH, Meisenheldr J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC. Protein kinase B/Akt mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:7421-7426.

Biscardi JS, Belsches AP, Parsons SJ. Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. Mol Carcinog 1998;21(4):261-272.

Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, Zschiesche W, Binas B, Juergensen C, Theuring F. Mammary gland specific hEGF receptor transgen expression induces neaoplasia and inhibits differentiation. Oncogene 2000;19(17):2129-2137.

Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. N Engl J Med 2000;342:525-533.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylation and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell 1999;96:857-868.

Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. Science 2002;296:1655-1657.

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2005;97:643-655.

Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E, Cancellieri A, Magrini E, Paties CT, Ceresoli G, Lombardo L, Bartolini S, Calandri C, De Rosa M, Villa E, Crinò L. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. J Clin Oncol 2003;21:2658-2663.

Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Damiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Tonato M, Crinò L. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small cell lung cancer. J Natl Cancer Inst 2005;96:1133-1141.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvase GS, Franke TF, Stanbrige E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. Science 1998;282:1318-1321.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem Rev 1979;48:193-216.

Carter TA, Wodicka LM, Shah NP, Velasco AM, Fabian MA, Treiber DK, Milanov ZV, Atteridge CE, Biggs WH, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Mehta SA, Patel HK, Pao W, Sawyers CL, Zarrinkar HV, Lockhart DJ. Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. Proc Natl Acad Sci USA 2006;102(31):11011-11016.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell progression, apoptosis and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapie. Leukemia 2003;17:590-603.

Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, Cuccato S, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Inhibition of growth factor production and angiogenesis in hu-

man cancer cells by ZD1839 ("Iressa"), a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Clin Cancer Res 2001;7:1459-1465.

Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmann S. The lipid phosphatise SHIP2 controls insulin sensitivity. Nature 2001;409:92-97.

Cohen BD, Green JM, Foy L, Fell HP. HER4-mediated Biological and Biochamical Properties in NIH 3TT Cells. J Biol Chem 1996;271(9):4813-4818.

Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. Oncol 2003;8:303-306.

Coffer PJ and Woodgett JR. Molecular cloning and characterization of a novel proteinserin kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur J Biochem 1991;201(2):475-481.

Coffer PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. Biochem J 1998;335:1-13.

Cross DAE, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthetase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 1995;378:785-789.

Damen JE, Lin L, Ware MD, Ermolaeva M, Majerus PW, Krystal G. The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetraphosphate and Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:1689-1693.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Grennberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 1997;91:231-241.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 1999;13:2905-2927.

Davidson NE, Gelmann EP, Lippman ME, Dickson RB. Epidermal growth factor receptor gene expression in estrogen receptor-positive and negative human breast cancer cell lines. Mol Endocrinol 1987;1:216-223.

De Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. Trends Mol Med 2002;8:19-26.

Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibiton of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents rapid degration via the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev 1997;11:957-972.

Di Marco E, Pierce JH, Fleming TP, Kraus MH, Molloy CJ, Aaronson SA, Di Fiore PP. Autocrine interaction between TGF alpha and the EGF-receptor: quantitative requirements for induction of the malignant phenotype. Oncogene 1989;4(7):831-838.

Drayer AL, Pesesse X, De Smedt F, Communi D, Moreau C, Erneux C. The family of inositol and phosphatidylinositol polyphosphate 5-phosphatase. Biochem Soc Trans 1996;24:1001-1005.

Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, Hudson LG. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factorstimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. Cancer Res 2001;61:1855-1861.

El-Rayes BF, Lorusso PM. Targeting the epidermal growth factor receptor. Br J Cancer 2004;91:418-424.

Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. Cancer Invest Rev 1991;9:553-562.

Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. Dev Cell 2005;9:389-402.

Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J, Hopkins CR. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. Cell 1990;61(4):623-634.

Fischer OM, Hart S, Gscheind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem Soc Trans 2003;31(6):1203-1208.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. Nat Rev Cancer 2003;3:362-374.

Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem 1998;67:481-507.

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). J Clin Oncol 2003;21:2237-2246.

Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jonson RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. The crystal strucure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. Mol Cell 2003;11(2):495-505.

Giaccone G Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. J Clin Oncol 2004;22(5):777-784.

Gold MR, Duronio V, Safena SP, Schrader JW, Aebersold R. Multiple cytokines activate the Phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells. Association of the enzyme with various tyrosine-phosphorylated proteins. J Biol Chem 1994;269:5403-5412.

Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. EMBO J 1997;16:1647-1655.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, Van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. Cancer Res 2003;63:2172-2178.

Gschwandler-Kaulich D, Hudelist G, Koestler WJ, Czerwenka K, Mueller R, Helmy S, Ruecklinger E, Kubista E, Singer CF. EGFR activity in HER-2 over-expressing metastatic breast cancer: evidence for simultaneous phosphorylation of Her-2/neu and EGFR. Oncol Rep 2005;14(2):305-311.

Gu H, Maeda H, Moon JJ, Lord JD, Yoakim M, Nelson BH, Neel BG. New role for Shc in activation of the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Mol Cell Biol 2000;20:7109-7120.

Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, Oh DY, Kim JH, Kim DW, Chung DH, Im SA, Kim YT, Lee JS, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. J Clin Oncol 2005;23:2493-2501.

Hashimoto A, Hirose K, Okada H, Kurosaki T, Iino M. Inhibitory modulation of B cell receptor-mediated Ca2+ mobilization by Src homology 2 domaincontaining inositol 5-phosphatase (SHIP). J Biol Chem 1999;274:11203-11208.

Hegde PS, Rusnak D, Bertiaux M, Alligood K, Strum J, Gagnon R, Gilmer TM. Delineation of molecular mechanisms of sensitivity to lapatinib in breast cancer cell lines using global gene expression profiles. Mol Cancer Ther 2007;6:1629-1640.

Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. Cell 1995;80:213-223.

Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, Kris MG, , Klein P, Li X, Ramies D, Johnson DH, Miller VA. TRIBUTE: A phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2005;23:5892-5899.

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. J Clin Oncol 2004;22(5):785-794.

Héron-Milhavet L, Franckhauser C, Rana V, Berthenet C, Fisher D, Hemmings BA, Fernandez A, Lamb NJ. Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. Mol Cell Biol 2006;26(22):8267-8280.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn Jr PA, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. Molecular Predictors of Outcome With Gefitinib in a Phase III Placebo-Controlled Study in Advanced Non– Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol 2006;24:5034-5042.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn PA, Franklin WA, Crowley J, Gandara DR. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: A Southwest Oncology Group study. J Clin Oncol 2005;23:6838-6845.

Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. Nature 1996;379(6565):560-564.

Holmes WE, Sliwkowski MX, Akita RW, Henzel WJ, Lee J, Park JW, Yansura D, Abadi N, Raab H, Lewis GD. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. Science 1992;256:1205-1210.

Hresko RC, Mueckler M. mTOR/RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/PKB in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem 2005;280:40406-40416.

Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Lammers R, Ullrich A, Schlessinger J. Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with the epidermal growth factor and plated-derived growth factor receptors. Mol Cell Biol 1992;12(3):981-990.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J Biol Chem 1997;272:2927-2935.

Huang SM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. Invest New Drugs 1999;17:259-269.

Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84(20):7159-7163.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4207-4211.

Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. Cancer Res 2004;64:3171-3178.

Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serin/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:4171-4175.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epithelial growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Exp Cell Res 2003;284(1):31-35.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-κB by the Akt/PKB kinase. Curr Biol 1999;9:601-604.

Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. Mol Cell Biol 2001;21:893-901.

Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. EMBO J 1996;15(2):254-264.

Kim D, Kim S, Koh H, Yoon S-O, Chun A-S, Cho K-S, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. FASEB J 2001;15:1953-1962.

Kokai Y, Myers JN, Wada T, Brown VI, Le Vea CM, Davis JG, Dobashi K, Greene MI. Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. Cell 1989;58:287-292.

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 Res 2006;66:1630-1639.

Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. JAMA 2003;290:2149-2158.

Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL. Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. J Neurosci 1997;17(21):8293-8299.

Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. Oncogene 2005;24(50):7443-7454.

Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. Cancer Treat Rev 2004;30(1):1-17.

Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J Cell Sci 2001;114:2903-2910.

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. EMBO J 1998;17(12):3385-3397.

Li B, Yuan M, Kim IA, Chang CM, Bernhard EJ, Shu HK. Mutant epidermal growth factor Receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. Oncogene 2004;23:4594-4602.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina k, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain,breast, and prostate cancer. Science 1997;275:1943-1947.

Lioubin MN; Algate PA, Schickwann T, Carlberg K, Aebersold R, Rohrschneider LR. P150SHIP, a signal transduction molecule with inositol polyphosphate-5-phosphatase activity. Genes Dev 1996;10:1084-1095.

Liu D, Aguirre Ghiso J, Estrada Y, Ossowski L. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. Cancer Cell 2002;1:445-457.

Liu Q, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. SHIP is a negative regulator of growth factor receptormediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. Genes Dev 1999;13:786-791.

Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 1998;273(22):13375-13378.

Majerus PW, Kisseleva MV, Norris FA. The role of phosphatses in inositol signalingreactions. J Biol Chem 1999;274:10669-10672.

Mao M, Fang X, Lu Y, Lapushin R, Bast RC, Mills GB. Inhibition of growth-factorinduced phosphorylation and activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells. Biochem J 2000;352:475-482.

Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/Her receptors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004;58(3):903-913.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. Proc Natl Acad Sci USA 2001;10.1073/pnas.181181198v1

Mueller C, Gershenfeld HK, Lobe CG, Okada CY, Bleackley RC, Weissman IL. A high proportion of T lymphocytes that infiltrate H-2-incompatible heart allografts in vivo express genes encoding cytotoxic cell-specific serine proteases, but do not express the MEL-14-defined lymph node homing receptor. J Exp Med 1988;167:1124-1136.

Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidlinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. Exp Hematology 2002;30(9):990-1000.

Nolan-Stevaux O. Differential contribution to neuroendocrine tumorigenesis of parallel Egfr signaling in cancer cells and pericytes. Genes Cancer. 2010;1:125–141.

O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H, Court W, Box G, Eccles S. Overexpression of epidermal growth factor receptor in human head and neck squamous carcinoma cell lines correlates with matrix metalloproteinase-9 expression and in vitro invasion. Int J Cancer 2000;86:307-317.

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. Mol Cell Biol 1998;18(9):5042-5051.

Osamu Shimomura, F. H. Johnson und Y. Saiga: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. In: Journal of Cellular and Comparative Physiology. 1962, Band 59, 223-239.

O'Reilly KE, Rojo F, She Q-B, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. Cancer Res 2006;66(3):1500-1508.

Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-κB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. Nature 1999;401:82-85.

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer 2004;4:448-456.

Pantel K, Cote R, Fodstad O. Detection and clinical significance of micrometastatic desease. J Natl Cancer Inst 1999;91:1113-1124.

Pantel K, Izbicki J, Passlick B, Angstwurm M, Haussinger K, Thetter O, Riethmüller G. Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. Lancet 1996;347:649-653.

Pantel K, Muller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. Clin Cancer Res 2003;9:6326-6334.

Parra HS, Cavina R, Latteri F, Zucali PA, Campagnoli E, Morenghi E, Grimaldi GC, Roncalli M, Santoro A. Analysis of epidermal growth factor receptor expression as a predictive factor for response to gefitinib (Iressa, ZD 1839) in non-small cell lung cancer. Br J Cancer 2004;91:208-212.

Pauletti D, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Sashadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER2/neu alteration in human breast

cancer: a direct comparison of flourescence in situ hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol 2000;18(21):3652-3664.

Petrides PE, Bock S, Bovens J, Hofmann R, Jakse G. Modulation of pro-epidermal growth factor, pro-transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor gene expression in human renal carcinomas. Cancer Res 1990;50:3934-3949.

Pecorari L, Marin O, Silvestri C, Candini o, Rossi E, Guerzoni C, Cattelani S, Mariani S, Corradini F, Amorotti GF, Cortes L, Bussolari R, Raschellà G, Federico MR, Calabretta B. Elongation Factor 1 alpha interacts with phospho-Akt in breast cancer cells and regulates their proliferation, survival and motility. Mol Cancer 2009;8;58.

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:1746-1750.

Putz E, Witter K, Offner S, Stosiek P, Zippelius A, Johnson J, Zahn R, Riethmüller G, Pantel K. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: Establishment of working models for human micrometastases. Cancer Res 1999;59:241-248.

Rafael Meza, Jihyoun Jeon, Suresh H. Moolgavkar, and E. Georg Luebeck. Agespecific incidence of cancer: Phases, transitions, and biological implications Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105(42): 16284–16289.

Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H, Rowinski EK. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid malignant tumors: results of a phase I trial. J Clin Oncol 2002;20:2240-2250.

Rena G, Guo S, Cichy S, Unterman TG, Cohen P. Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. J Biol Chem 1999;274:17179-17183.

Riera R, Coelho de Soárez P, Santos Puga MD, Ferraz MB. Lapatinib for treatment of advanced or metastasized breast cancer: systematic review. Sao Paulo Med. J. 2009.127 no.5.

Riese DJ 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. Bioessays Rev 1998;20:41-48.

Rohrschneider LR, Fuller JF, Wolf I, Lin Y, Lucas DM. Structure, function, and biology of SHIP proteins. Genes Dev 2000;14:505-520.

Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol 1997;9(2):180-186.

Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. Biochem Biophys Res Commun 2004;319(1):1-11.

Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Kneight 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. Mol Cancer Ther 2001;1:85-94.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 1995;19:183-232.

Samuels Y, Wang ZH, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. Science 2004;304:554.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 2005;307:1098-1101.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycininsensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol 2004;14:1296-1302.

Sato N, Samakaki K, Terada N, Arai K-I, Miyajima A. Signal transduction by the highaffinity GM-CSF receptortinct cytoplasmatic regions of the common beta subunit responsible for different signalling. EMBO J 1993;12:4181-4189.

Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L, Weinberg RA, Yang-Feng TL, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. Science 1985;229:976-978.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosin kinases. Cell 2000;103(2):211-225.

Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M, Downward J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. Genes Dev 2001;15:981-994.

Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the a6h4 integrin promotes carcinoma invasion. Cell 1997;91:949-960.

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabárbara P, Seymour L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2005;353:123-132.

Shoelson SE. SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. Curr Opin Chem Biol Rev 1997;1:227-234.

Sibilia M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. Science 1995;269(5221):234-238.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her2/neu oncogene. Science 1987;235(4785):177-182.

Stern DF, Hare DL, Cecchini MA, Weinberg RA. Construction of a novel oncogene based on synthetic sequences encoding epidermal growth factor. Science 1987;235:321-324.

Solakoglu O, Maierhofer C, Lahr G, Breit E, Scheunemann P, Heumos I, Pichelmeier U, Schlimok G, Oberneder R, Köllermann MW, Köllermann J, Speicher MR, Pantel K. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. Proc Natl Acad Sci 2002;99:2246-2251.

Soltoff SP, CarrawayKL 3rd, Prigent AS, Gullick WG, Cantley LC. ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol-3-kinase by epidermal growth factor. Mol Cell Biol 1994;14(6):3550-3558.

Soltoff SP, Cantley LC. P120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. J Biol Chem 1996;271(1):563-567.

Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. Cell 1003;72(5):767-778.

Stern DF, Hare DL, Cecchini MA, Weinberg RA. Construction of a novel oncogene based on synthetic sequences encoding epidermal growth factor. Science 1987;235:321-324.

Sudol M. From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. Oncogene Rev 1998;17:1469-1474.

Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, Tsuta K, Matsuno Y, Tateishi U, Yamamoto S, Nokihara H, Noboru Yamamoto N, Sekine I, Kunitoh H, Shibata T, Sakiyama T, Yoshida T, Tamura T. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2005;23:6829-6837.

Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL. Negative regulation of the Forkhead transcription factor FKHR by Akt. J Biol Chem 1999;271:35368-35374.

Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. Cancer Res 2001;61:589-593.

Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumorgenesis. Proc Natl Acad Sci 2001;98(20):10983-10985.

Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, Thongprasert S, Tan EH, Pemberton K, Archer V, Carroll K. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small cell lung cancer:results from a randomized, placebo-controlled, multicenter study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). Lancet 2005;366:1527-1537.

Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R, Shima TB, Torri J, Donahue S, Lippman ME. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. J Cell Physiol 1992;150:534-544.

Toker A, Newton AC. Akt/Protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 side. J Biol Chem 2000;275:8271-8274.

Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On. Cancer Res 2006;66(8):3963-3966.

Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, Ichimura K, Tsuda T, Yano M, Tsukuda K, Tabata M, Ueoka H, Tanimoto M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res 2005;11:1167-1173.

Tsao M-S, Sakurada A, Cutz J-D, Zhu C-Q, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshm M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. Erlotinib in lung cancermolecular and clinical predictors of outcome. N Engl J Med 2005;353:133-144.

Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol 1996;16:5276-5287.

Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Kasto R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem 2001;70:535-602.

Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, Beckers T, Rijksen G. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. FEBS Lett 1998;425:145-150.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. Nature Rev Cancer 2002;2:489-501.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of Ecadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. Cell 1991;66:107-119.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. Ann Oncol 1997;8:1197-1206.

Wallerand H, M.D., Ying Cai, Wainberg, Garraway I, Lascombe I, Nicolle G. Thiery J, Bittard H, Radvanyi F, Reiter R. Phospho-Akt pathway activation and inhibition de-

pends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer cell lines. Urologic oncology 2010; 8; 2; 180-188.

Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. J Biol Chem 1998;273(22):13819-13827.

Weinberg RA. The Biology of Cancer. Garland Science 2007.

Welham MJ, Dechert U, Leslie KB, Jirik F, Schrader JW. Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation and association of SHPTP2 with Grb2 and Phosphatidylinositol 3kinase. J Biol Chem 1994;269:23764-23768.

Wells A. EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol Rev 1999;31:637-643.

Wickrema A, Uddin S, Sharma A, Chen F, Alsayed Y, Ahmad S, Sawyer ST, Krystal G, Yi T, Nishada K, Hibi M, Hirano T, Platanias LC. Engagement of Gab1 and Gab2 in erythropoietin signalling. J Biol Chem 1999;274:24469-24474.

Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:6899-6903.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2965-2969.

Worthylake R, Opresko LK, Wiley HS. ErbB-2 amplification inhibits down regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. J Biol Chem 1999;274:8865-8874.

Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. Oncogene 2002;21:6255-6263.

Xia W, Gerard CM, Liu L, Baudson NM, Ory TL, Spector NL. Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2-overexpressing breast cancer cells. Oncogene 2005;24:6213-6221.

Xia W, Husain I, Liu L, Bacus S, Saini S, Spohn J, Pry K, Westlund R, Stein SH, Spector NL. Lapatinib Antitumor Activity Is Not Dependent upon Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10 in ErbB2-Overexpressing Breast Cancers. Cancer Res 2007;67:1170-1175.

Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986;319:230-234. Yao M, Shuin T, Misaki H, Kubota Y. Enhanced expression of c-myc and epidermal growth factor receptor (C-erbB-1) genes in primary human renal cancer. Cancer Res 1988;48:6753-6757.

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. Mol Cell 2005;20:539-550.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung M-C. Her2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphoylation. Nature Cell Biol 2001;3:971-982.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Manfred Jücker für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung und den vielen richtungweisenden Ratschlägen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Georg W. Mayr für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I in der Abteilung der Zellulären Signaltransduktion durchführen zu können, und die stetige Unterstützung zur Fort- und Weiterbildung in Bezug auf mein Projekt.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Burkhart Brandt aus dem Institut für Tumorbiologie möchte ich danken für die freundliche Unterstützung.

Mein allgemeiner Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie I für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

## Lebenslauf

Name:	Katharina Johanna Ingeborg Grupp
Geburtsdatum:	10.01.1984
Geburtsort:	Lüneburg
Schulbesuche:	1990 –2003 Gymnasium Winsen
	24.06.2003 Abitur am Gymnasium Winsen
Universitätsbesuc	ch: 2003 – 2009 UKE
	28.10.2009 Staatsexamen
	12/2009: Approbation als Arzt
Beruf:	seit 02/2010 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein,-
	Viszeral- und Thoraxchirurgie

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.