

**Aus dem Institut für Pathologie am Campus Mitte  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**DISSERTATION**

**Transaktivierung des  
Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors durch  
Angiotensin II in humanen Magenkarzinomzelllinien**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Sena S. Kuyumcu  
aus Saarbrücken**



- Gutachter:**
- 1. Prof. Dr. med. Chr. Röcken**
  - 2. Prof. Dr. med. M. Ebert**
  - 3. Prof. Dr. W. Dubiel**

**Datum der Promotion: 29. Januar 2010**



**Omnis cellula a cellula.**

(Rudolf Virchow, 1821-1902)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>ix</b>
<b>Kapitel 1 Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Das Adenokarzinom des Magens</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Pathologie .....	2
1.1.3 Therapie .....	6
<b>1.2 Das lokale Angiotensin II System</b> .....	<b>9</b>
1.2.1 Der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor .....	10
1.2.2 Der Angiotensin II Typ 2 Rezeptor .....	11
1.2.3 Das lokale Angiotensinsystem im Magenkarzinom .....	12
<b>1.3 Der Epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor</b> .....	<b>13</b>
1.3.1 Molekulare Struktur .....	13
1.3.2 Direkte Rezeptoraktivierung, Signaltransduktion und Signaldeaktivierung .....	15
1.3.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors in Tumoren .....	19
1.3.4 Indirekte Aktivierung des EGF-Rezeptors .....	21
<b>1.4 Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren</b> .....	<b>22</b>
1.4.1 Membranverankerte Metalloproteasen .....	23
1.4.2 Triple Membrane Passing Signal .....	23
<b>1.5 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>24</b>
<b>Kapitel 2 Material und Methoden</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>25</b>
2.1.1 Chemikalien, Kits, Primer, Antikörper und Zellstimulantien .....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.3 Geräte und Software .....	27
2.1.4 Lösungen und Puffer .....	27
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>28</b>
2.2.1 Zellkultur .....	28
2.2.2 Analyse der EGF-Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene .....	30
2.2.3 Proteinbiochemie .....	32
2.2.4 Statistische Auswertung .....	38
<b>Kapitel 3 Ergebnis und Diskussion I: Etablierung der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
3.1.1 Etablierung des EGF-Rezeptor mRNA-Nachweises .....	39
3.1.2 Etablierung des EGF-Rezeptorproteinnachweises .....	39
3.1.3 Etablierung der Immunfärbungen .....	40
3.1.4 Etablierung der EGF-Rezeptorimmunpräzipitation .....	46
3.1.5 Etablierung der Inhibierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung mit AG1478 .....	52
3.1.6 Festlegung der statistischen Auswertung .....	52

3.2	<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
3.2.1	Nachweis der EGF-Rezeptor-mRNA .....	54
3.2.2	Nachweis des EGF-Rezeptorproteins .....	54
3.2.3	Zellkultorexperimente .....	57
3.2.4	Immunpräzipitation .....	57
3.2.5	Messung mittels GeneTools-Software .....	59
3.2.6	Statistische Auswertung .....	61
<b>Kapitel 4</b>	<b>Ergebnis und Diskussion II: Nachweis des EGF-Rezeptors und seine Transaktivierung durch Angiotensin II</b> .....	<b>64</b>
4.1	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
4.1.1	EGF-Rezeptorexpression auf mRNA- und Proteinebene, Aktivierung durch EGF und Inhibierung durch AG1478 .....	64
4.1.2	EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II .....	68
4.2	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
4.2.1	Die EGF-Rezeptorexpression und die Reaktion auf Stimulation mit EGF .....	74
4.2.2	EGF-Rezeptortransaktivierung durch Angiotensin II über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor .....	78
4.2.3	Ausblick .....	83
<b>Kapitel 5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>89</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
	<b>Formelverzeichnis</b> .....	<b>104</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>105</b>
	<b>Publikationen</b> .....	<b>106</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	<b>107</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>108</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>109</b>

## Abkürzungen

4G10	Monoklonaler Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10
5-FU	5-Fluorouracil
13G8	Monoklonaler Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACE-DD	Homozygoter Deletionspolymorphismus des ACE-Gens
ACE-ID	Insertions-/Deletionspolymorphismus des ACE-Gens
ACE-II	Homozygoter Insertionspolymorphismus des ACE-Gens
ADAM	Eine Disintegrin- und Metalloproteinase
Aga	Protein A/Plus G-Agarose
Ala	Aminosäure Alanin
AK	Antikörperkonzentration
Akt	Synonym für Proteinkinase B
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Aminosäure Arginin
AS	Aminosäure(n)
AT1R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT2R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca <sup>++</sup>	Kalzium
CAGE	Chymostatin sensitives Angiotensin II generierendes Enzym
Cbl	Casitas B-Lymphom
CIN85	Mit Cbl interagierendes Protein mit dem Molekulargewicht 85 kDa
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	Doppeltdeionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäuredinatriumsalzdihydrat
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor
EGF-Rezeptor	Epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor
Eps15	Substrat 15 des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors
ErbB	Transformierendes Protein des Erythroblastosevirus
ERK	Von extrazellulär aktivierte Kinase
EU	Europäische Union
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G1	Zwischenphase 1 der Zellteilung
GDP	Guanosindiphosphat
Glu	Aminosäure Glutamat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb	Humanes Wachstumsfaktorrezeptor gebundenes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
H. pylori	Helicobacter pylori
HB-EGF	Heparinbindendes EGF
HER	Humaner EGF-Rezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase
IARC	Internationale Behörde für die Krebsforschung
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
Ins(1,4,5)P3	Inositoltriphosphat
IM	Intestinale Metaplasie
IP	Immunpräzipitation
Jak	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
LAS	Lokales Angiotensinsystem

LPA	Lysophosphatsäure
Lys	Aminosäure Lysin
M	Molare Masse
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
Mas	Mas-Rezeptor
Min.	Minute(n)
MKP-1	MAP-Kinasephosphatase
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
Mol. Gew.	Molekulargewicht
mRNA	Botenribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NBT	Nitrotetrazoliumblaulchlorid
NC	Nitrozellulose
Nck	Nichtkatalytische Region des Tyrosinkinaseadapterproteins
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
OS	Olmesartan
PACSIN	PKC- und Kasein-Kinase-Substrat in Neuronen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	PD123,319
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PI(3,4,5)P3	Phosphoinositoltrisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLCγ	Phospholipase C Gamma
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindende Domäne
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf	Schnell wachsendes Fibrosarkom
Ras	Sarkom der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase
S	Synthesephase der Zellteilung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shc	Src Homologie 2 Domäne enthaltendes Protein
SH-Domäne	Src Homologie Domäne
SHP	Src Homologie 2 Domäne enthaltende Phosphotyrosinphosphatase
Sos	Sohn der Siebenlosen
Src	Dem Rous-Sarkomvirus ähnelnde, onkogene Tyrosinkinase
STAT	Signaltransduktor und Aktivierer der Transkription
Std.	Stunde(n)
TGF-α	Transformierender Wachstumsfaktor Alpha
TMPS	Dreifach die Zellmembran passierendes Signal
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha
TNM	Tumor, Lymphknoten, Fernmetastasen
U	Umdrehungen
ÜS	Überstand
UICC	Internationale Union gegen den Krebs
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Val	Aminosäure Valin
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	Vaskulärer epithelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Y	Aminosäure Tyrosin

# Kapitel 1 Einführung

---

## 1.1 Das Adenokarzinom des Magens

Das Adenokarzinom des Magens ist eine multifaktoriell bedingte Tumorerkrankung. Für seine Entstehung ist die Infektion mit dem, von der WHO als Klasse 1 Karzinogen eingestuftem, Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ein entscheidender Risikofaktor<sup>89; 160; 223</sup>. Dieser kann in Zusammenhang mit anderen Risikofaktoren, wie dem sozioökonomischen Status, der Lebensweise und der Zusammensetzung der Nahrung, gesetzt werden<sup>51</sup>. Weitere Risiken für die Entstehung des Magenkarzinoms stellen die Infektion mit dem Epstein-Barr Virus<sup>201</sup>, die chronische Gastritis<sup>207</sup>, die intestinale Metaplasie<sup>65</sup> und der Zustand nach Magenteilresektion<sup>226</sup> dar.

Zu den genetischen Faktoren, die in Verbindung mit dem Magenkarzinom stehen, gehören die Blutgruppe A<sup>34</sup>, Keimbahnmutationen im CDH1 E-Cadherin-Gen<sup>100</sup>, die hereditäre Nonpolyposis Coli<sup>124</sup>, die familiäre adenomatöse Polyposis<sup>96</sup>, und das Peutz-Jeghers-Syndrom<sup>170</sup>.

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom stellt die zweithäufigste Ursache für einen tumorbedingten Tod weltweit dar, obwohl es nur auf dem vierten Platz der weltweit jährlich neu auftretenden Tumorerkrankungen liegt<sup>171</sup>. Zweidrittel der Fälle kommen in den Entwicklungsländern vor, 42% allein in China. Die höchsten Inzidenzraten finden sich in Japan (72 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr), Osteuropa und der Andenregion von Mittel- und Südamerika<sup>171; 183</sup>. In den Industriestaaten, wie Nordamerika oder Westeuropa, lässt sich ein Rückgang der Inzidenzen der nicht im Bereich der Kardialia liegenden Tumoren beobachten. Die Tumore der Kardialia zeigen meist histologische Ähnlichkeiten zu Tumoren des unteren Oesophagus<sup>138</sup>. Hinweise auf einen bestehenden Zusammenhang liefert die Beobachtung, dass die Inzidenzrate dieser Tumoren entsprechend der Inzidenz der distalen Oesophaguskarzinome angestiegen ist<sup>55</sup>. Bei den Kardiakarzinomen wird von einer eigenen Tumorentität ausgegangen, die in dieser Arbeit keine weitere Beachtung finden soll.

Die Zahl der in Deutschland jährlich auftretenden Neuerkrankungen des Adenokarzinoms des Magens lag im Jahr 2004 bei 11.000 Erkrankungen bei Männern und

7.780 Erkrankungen bei Frauen (das entspricht einem Durchschnitt von 13 Fällen pro 100.000 Einwohner)<sup>64</sup>. Die Inzidenz des Magenkarzinoms hat in Deutschland einen Anteil an allen Krebsneuerkrankungen von 4,8 bzw. 3,8 Prozent. Es liegt damit an 5. bzw. 7. Stelle der Tumorerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwa 70 bzw. bei 75 Jahren. Insgesamt ist ein Rückgang der Neuerkrankungen in Deutschland seit über 30 Jahren zu beobachten. Zugleich bleibt die kumulierte relative 5-Jahresüberlebensrate, im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, für Männer, wie für Frauen konstant schlecht (35% bzw. 31%)<sup>16</sup>.

## **1.1.2 Pathologie**

Das Adenokarzinom ist die häufigste Tumorentität des Magens<sup>46</sup>. Es hat einen Anteil von 90% an allen hier vorkommenden Neoplasien. Etwa zu gleichen Teilen liegen dahinter das Plattenepithelkarzinom und das adenosquamöse Karzinom des Magens<sup>31</sup>. 30% der Karzinome entstehen im Pylorusbereich, 20% in den mittleren Magenanteilen, 37% im proximalen Magendrittel und 13% im gesamten Magen<sup>192</sup>.

### **1.1.2.1 Präneoplastische Läsionen**

Präneoplasien sind durch das Vorliegen von zellulären und strukturellen Atypien gekennzeichnet. Persistierende zelluläre Atypien treten bei der intraepithelialen Neoplasie, den Adenomen und den Polypen des Magens auf. Die bereits als Risikofaktoren beschriebene chronische Gastritis und die daraus folgende intestinale Metaplasie (IM) zeigen nicht zwangsläufig zelluläre Atypien, können aber zum Teil als präneoplastische Läsionen angesehen werden<sup>89</sup>.

Um einen international gültigen Standard zur Einteilung der präkanzerösen Läsionen setzen zu können, wurden bereits diverse Versuche unternommen. Zuletzt entstand 2000 die Padova Klassifikation<sup>185</sup>. Hier soll die von der IARC durch Hamilton und Aaltonen veröffentlichte Einteilung beschrieben werden.

#### ***1.1.2.1.1 Intraepitheliale Neoplasie***

In der von multiplen Zwischenstufen ausgehenden Kaskade der Magenkarzinom-entwicklung, liegt die intraepitheliale Neoplasie zwischen der IM und dem invasiven Karzinom<sup>31; 89</sup>. Die Schwierigkeit liegt dabei in der Unterscheidung zwischen einer reaktiven Veränderung aufgrund einer Entzündung und der eines frühen invasiven

Karzinoms<sup>89</sup>. Kann diese Unterscheidung nicht getroffen werden, spricht man von einer *unbestimmten intraepithelialen Neoplasie*.

Handelt es sich um moderate zelluläre Atypien (blasige runde oder ovale Zellkerne), verbunden mit leichten architektonischen Veränderungen (verzweigende Tubuli, verlängerte Krypten), spricht man von der *geringgradigen intraepithelialen Neoplasie*.

Ist die Architektur der Mukosa schwer gestört (stark verzweigende Tubuli) und sind schwere zellulären Atypien (zigarrenförmige, hyperchromatische Zellkerne, amorphe Nukleoli) erkennbar, handelt es sich um eine *hochgradige intraepitheliale Neoplasie*.

Bis zu 80% der intraepithelialen Neoplasien können sich zu einem Karzinom entwickeln. Ein Karzinom liegt dann vor, wenn die atypischen Zellen die Lamina Propria bzw. die Muskularis Mukosae durchbrochen haben<sup>89</sup>.

#### **1.1.2.1.2 Adenome**

Begrenzte tubuläre, villöse oder tubulovillöse Strukturen mit intraepithelialen Neoplasien werden in Europa und den USA als Adenome bezeichnet. In Japan zählen dazu auch die flachen und eingesunkenen Läsionen<sup>89</sup>. Sie befinden sich hauptsächlich im Antrumbereich. Die Tendenz zur malignen Entartung hängt von der Adenomgröße ab: Läsionen < 2 cm entarten nur in 2% der Fälle. Läsionen > 2 cm, zeigen in 40-50% eine Tendenz zur malignen Entartung. Flache Adenome haben dabei ein gesteigertes Entartungsrisiko gegenüber den erhaben wachsenden Adenomen<sup>89</sup>.

#### **1.1.2.1.3 Polypen**

Polypen des Magens treten vor allem im Antrum- oder Fundusbereich auf. Die *hyperplastischen Polypen* des Antrums sind mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert und zeigen eine geringe Entartungstendenz. Die eher in Europa und den USA vorzufindenden *Funduspolypen*, stehen häufig im Zusammenhang mit einer Protonenpumpeninhibitortherapie und haben kein malignes Potential<sup>89</sup>. Bei einem vermehrten Auftreten von Fundus- und Antrumpolypen in Zusammenhang mit einer APC-Genmutation oder dem Peutz-Jeghers-Syndrom besteht eine gesteigerte Entartungstendenz<sup>96; 170</sup>.

#### **1.1.2.2 Makroskopische Klassifikationen**

Die makroskopische Einteilung der frühen Stadien des Magenkarzinoms findet vor allem in der endoskopischen Diagnostik eine Anwendung. Unterschieden werden hier die

*vorgewölbte* (Typ I), *erhabene* (Typ IIa), *ebene* (Typ IIb), *eingesenkte* (Typ IIc) und *exkavierte* (Typ III) Form<sup>89</sup>.

Für die Einteilung der fortgeschrittenen Stadien kommt die Borrmann-Klassifikation zur Anwendung. Es lassen sich vier Typen unterscheiden: Das *polypoide* (Typ I), das *fungiforme* (Typ II), das *ulzerierende* (Typ III) und das *infiltrative* (Typ IV) Wachstumsmuster<sup>25; 89</sup>.

### 1.1.2.3 Mikroskopische Klassifikationen

Die am häufigsten verwendete Klassifikation des Magenkarzinoms ist die *Laurén-Klassifikation*<sup>122</sup>. Sie unterscheidet ein *intestinales* und ein *diffuses* Wachstumsmuster. Sind beide Typen enthalten, oder lässt sich keine Zuordnung vornehmen, spricht man vom *gemischten* bzw. *unbestimmbaren* Typ. Diese Einteilung beruht auf der Entstehung des Karzinoms aus den beschriebenen Vorläuferläsionen<sup>225</sup>.

Die *Goseki-Klassifikation* betrachtet die tubuläre Differenzierung und den Muzingehalt im Zytoplasma<sup>77</sup>. Sie unterscheidet vier Gruppen mit guter oder schlechter Differenzierung und geringem oder hohem Muzingehalt.

Die *Ming-Klassifikation* beruht auf dem Wachstumsmuster und der Invasivität des Karzinoms<sup>149</sup>. Kommt es zur Formierung von expandierend wachsenden Tumormassen oder einzelnen Tumorknoten spricht Ming vom *expandierenden Typ*. Kommt es zur Invasion einzelner Zellen liegt der *infiltrative Typ* vor.

Die *WHO-Klassifikation* teilt die Tumoren nach ihrem dominanten Wachstumsmuster ein<sup>89</sup>. Dabei werden *tubuläre Adenokarzinome*, *papilläre Adenokarzinome*, *muzinöse Adenokarzinome* und *siegelringzellige Karzinome* unterschieden.

### 1.1.2.4 TNM-Klassifikation und UICC-Staging für das Magenkarzinom

Eine Aussage über die Invasionstiefe des Primärtumors (T) und die lymphatische (N) und metastatische (M) Ausbreitung des Tumors gibt die TNM-Klassifikation (Tabelle 1). Die darauf basierende Einteilung der *Union internationale contre le cancer* (UICC-Staging, Tabelle 2) erlaubt prognostische Aussagen und wird für die Therapieplanung herangezogen. Eine eigene Identität besitzt hier das Magenfrühkarzinom, eine auf die Mukosa und/oder Submukosa beschränkte Neoplasie. Der Lymphknotenstatus bleibt dabei unbeachtet. In dieser häufig bei der Nachsorge von dysplastischen Läsionen entdeckten Tumorvariante können alle histologischen Varianten, entsprechend der WHO-Klassifikation, vorkommen<sup>89</sup>.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms.**

<b>Primärtumor (T)</b>	
<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Primärtumor vorhanden
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: Tumor durchbricht nicht die Lamina Propria
<b>T1</b>	Tumor durchbricht die Lamina Propria
<b>T2</b>	Tumor infiltriert die Muskularis Propria oder die Submukosa
<b>T3</b>	Tumor durchbricht die Serosa, ohne die Invasion von Nachbarorganen (Milz, Kolon Transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum)
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Nachbarorgane
<b>Lymphknotenbefall (N)</b>	
<b>Nx</b>	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Keine Metastasen in regionalen Lymphknoten
<b>N1</b>	Metastasen in 1 bis 6 regionalen Lymphknoten
<b>N2</b>	Metastasen in 7 bis 15 regionalen Lymphknoten
<b>N3</b>	Metastasen in über 15 Lymphknoten
<b>Fernmetastasen (M)</b>	
<b>Mx</b>	Fernmetastasen nicht beurteilbar
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

**Tabelle 2: UICC-Staging des Magenkarzinoms.**

<b>Stage</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Nodalstatus</b>	<b>Metastasen</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T1	N1	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
<b>IIIA</b>	T3	N0	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
<b>IIIB</b>	T3	N2	M0
<b>IV</b>	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	N1, N2, N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

### 1.1.2.5 Stromareaktion

Das invasive Karzinom führt in dem umgebenden Bindegewebe im Allgemeinen zu vier Reaktionen: Desmoplasie, lymphatische Infiltration, Eosinophilie des Stromas und Bildung von Granulomen vom sarkoiden Typ<sup>89</sup>.

Die dazu erforderliche Ansammlung von Fibroblasten, Monozyten und Lymphozyten, kann ihrerseits zu Reaktionen führen, die prognostische Relevanz haben können.

### **1.1.2.6 Prognostische Bedeutung**

Die TNM-, Laurén- und Goseki-Klassifikationen konnten mit dem Krankheitsverlauf korreliert werden. Der diffuse Wachstumstyp zeigt eine schlechtere Prognose<sup>114</sup>. Für diesen Wachstumstyp konnte eine Verbindung zu dem onkogenen MET-Rezeptor festgestellt werden, dessen Expression im Magenkarzinom auch mit der T- und N-Kategorie korreliert<sup>158</sup>. Ebenso konnte für den diffusen Wachstumstyp eine Verbindung zu der Cathepsin D-Expression hergestellt werden, die als Prognosemarker für die Länge der krankheitsfreien Überlebenszeit gilt<sup>6</sup>. Die Goseki Gruppe III (schlechte tubuläre Differenzierung und wenig Muzine) konnte von Songun et al.<sup>208</sup> mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht werden, während Mönig et al.<sup>152</sup> keinen Zusammenhang mit dem Überleben feststellen konnten. In einer über 25 Jahre laufenden Studie konnte der Zusammenhang zwischen dem 5-Jahres-Überleben und dem Tumorstadium belegt werden. Die Überlebensraten für das Stadium IA, IB, II, IIIA und IIIB/V waren 91%, 64%, 27%, 18% und 0%<sup>126</sup>. Entscheidend ist dabei die lymphogene Metastasierung, die von Yokota et al.<sup>237</sup> als wichtigster Faktor für die Prognose des Magenkarzinoms identifiziert wurde. Hier scheint vor allem der N-Quotient (metastatische/alle untersuchten Lymphknoten) und nicht so sehr die N-Kategorie der TNM-Klassifikation prognostische Relevanz zu besitzen<sup>133</sup>.

Die Voraussetzung für die bestmögliche Prognose schafft die R0-Resektion in Verbindung mit einer postoperativen Radiochemotherapie<sup>126</sup>. Um den prognostisch bedeutsamen Lymphknotenstatus evaluieren zu können, sollten mindesten 16 lokale Lymphknoten histologisch untersucht werden<sup>10; 133</sup>.

## **1.1.3 Therapie**

Die Therapie des Magenkarzinoms ist zurzeit auf die Chirurgie und verschiedene Chemotherapieschemata mit und ohne Strahlentherapie beschränkt. Die nichtinvasiven Therapieansätze wurden in diversen Studien zur adjuvanten und neoadjuvanten Verabreichung untersucht. Die chirurgische Therapie bleibt jedoch momentan das wichtigste Element in der kurativen Magenkarzinomtherapie.

### **1.1.3.1 Neoadjuvante Therapiemöglichkeiten**

Die neoadjuvante Therapie besitzt im Allgemeinen drei Vorteile: Der Erfolg der Behandlung lässt sich gut monitoren, es bestehen noch intakte Lymph- und Blutgefäße, so dass eine Chemotherapie gut das Zielgebiet erreichen kann und es besteht die Möglichkeit,

den Tumor auf eine resezierbare Größe einzuschmelzen<sup>8</sup>. Der zusätzliche Vorteil einer neoadjuvanten Behandlung beim Magenkarzinom liegt in der besseren Verträglichkeit der Therapie im Vergleich zu einem durch die Gastrektomie geschwächten Zustand<sup>8</sup>.

Zwei Studien konnten die Überlegenheit von einer präoperativen Bestrahlung mit 20 Gy und Hyperthermie<sup>199</sup> bzw. einer präoperativen Bestrahlung mit 40 Gy<sup>242</sup> gegenüber alleiniger operativer Therapie zeigen. Die MAGIC-Studie konnte einen Vorteil von perioperativer Therapie mit Epirubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU) zeigen. Es zeigte sich eine Steigerung der kurativen Resektionsrate, ein verlängertes krankheitsfreies Intervall und ein längeres Überleben<sup>47</sup>.

### **1.1.3.2 Operation**

Die R0-Resektion ist obligatorisch für die kurative Therapie des Magenkarzinoms. Dazu werden, je nach Tumorlokalisierung, die subtotale oder die totale Gastrektomie angewandt. Der Vergleich beider Techniken, unter der Voraussetzung einer R0-Resektion, erbrachte in einer französischen und einer italienischen Studie keine Unterschiede im krankheitsfreien 5-Jahres-Überleben. Mortalität und Morbidität waren vergleichbar<sup>26; 79</sup>.

Für den Heilungserfolg weiterhin notwendig ist die Entfernung der lokalen Lymphknoten<sup>133</sup>. Es gibt 16 für die Metastasierung des Magenkarzinoms bedeutende lokale Lymphknotenstationen. Die Stationen 1, 3, 5 befinden sich entlang der kleinen Kurvatur. Die Stationen 2, 4, 6 liegen entlang der großen Kurvatur. Eine Entfernung dieser Lymphknotengruppen, die zusammenfassend mit N1 bezeichnet werden, wird als D1-Dissektion bezeichnet. Die D2-Dissektion umfasst die Entfernung der Lymphknoten der Gruppe N2, die folgende Lymphknotenstationen umfasst: 7 – A. gastrica sinistra, 8 – A. hepatica communis, 9 – Truncus coeliacus, 10, 11 – A. splenica<sup>8</sup>. In Europa und den USA wird hauptsächlich die D1-Dissektion durchgeführt, während in Japan und Korea der Standard die D2-Dissektion ist. Ein Vorteil dieses radikaleren Operierens konnte außerhalb Ost-Asiens nicht bestätigt werden. Vier randomisierte Studien in den Niederlanden und Großbritannien konnten keine Vorteile im 5-Jahres-Überleben nachweisen<sup>23; 29; 48; 52</sup>. In der D2-Gruppe waren dagegen die postoperative Morbidität (10% vs. 4%) und Mortalität (43% vs. 25%) signifikant erhöht<sup>23</sup>.

### **1.1.3.3 Adjuvante Radiochemotherapie**

Die adjuvante Radiochemotherapie ist obligatorisch für die Behandlung fortgeschrittener Tumorstadien. 2001 wurde in der amerikanischen INT-0116 Studie ein Patientenkollektiv

von 556 Patienten untersucht<sup>132</sup>. Verglichen wurde die alleinige Operation gegen ein Regime mit 5-FU und Leucovorin, gefolgt von 45 Gy mit gleichzeitiger Chemotherapie an den ersten vier und letzten drei Tagen der Bestrahlung. Abgeschlossen wurde die Behandlung mit weiteren zwei Zyklen von 5-FU und Leucovorin. Dieses Regime zeigte einen Vorteil im krankheitsfreien Überleben (30 Monate vs. 19 Monate) und in den Überlebenszeiten (36 Monate vs. 27 Monate). Einzig der diffuse Typ des Magenkarzinoms spricht signifikant ( $p=0,04$ ) weniger gut auf die Therapie an. Heute erfolgt die Behandlung mit 5-FU hauptsächlich in Kombination mit Platinpräparaten<sup>163</sup>. Gute Ergebnisse bringt die Therapie mit 5-FU, Cisplatin und Leucovorin, eine Kombination die in Deutschland häufig verwendet wird<sup>78</sup>.

#### 1.1.3.4 Ausblick

Die Zukunft der Behandlung des Magenkarzinoms könnte in der Kombination unspezifischer Therapien, wie Chemotherapie und Bestrahlung, und gegen onkogenes Potential besitzende Tyrosinkinase gerichtete Medikamente liegen. Zahlreiche klinische Studien untersuchen mögliche Therapieverbesserungen durch monoklonale Antikörper. Der gegen HER2 gerichtete Antikörper Trastuzumab zeigte in Kombination mit platinhaltiger Chemotherapie eine Ansprechrate von 35%<sup>177</sup>. HER2 wird jedoch nur in 20% der Magenkarzinomfälle exprimiert<sup>2</sup>. Der VEGF-Inhibitor Bevacizumab zeigte in Kombination mit unspezifischen Chemotherapeutika in 65% der Fälle ein Ansprechen<sup>198</sup>. Die Inhibierung des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-Rezeptor) spielt hier möglicherweise die größte Rolle, nachdem *in vitro* seine Aktivierung durch das wichtigste Karzinogen des Magenkarzinoms, der *H. pylori*, nachgewiesen werden konnte<sup>115; 116</sup>. Auf die Phase II-Studien mit gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Antikörpern wird gesondert in Kapitel 1.3.3.1 eingegangen.

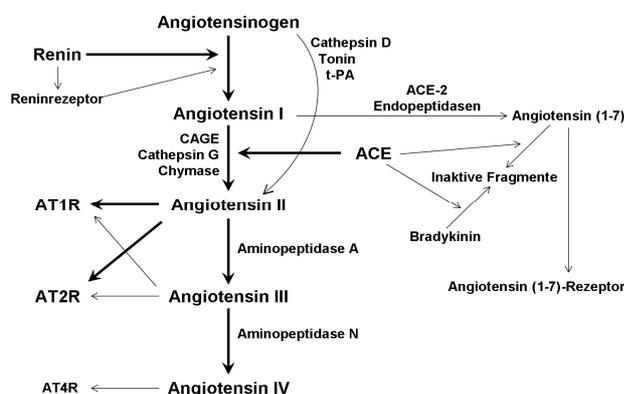
Die zum Teil von den Expressionsraten unabhängig erscheinenden Ansprechraten der spezifischen Therapeutika, sowie die in den Studien eingesetzten Kombinationen der monoklonalen Antikörper mit herkömmlicher Chemotherapie gestatten die Annahme, dass das Magenkarzinom auch in Zukunft durch eine Monotherapie nur schwer zu behandeln sein wird. Durch verschiedene Wirkstoffkombinationen könnte möglicherweise eine Steigerung der Ansprechraten und/oder die Senkung der Nebenwirkungen erreicht werden. Ebenso könnte sich über die Suche nach prognostischen Markern eine neue Therapiemöglichkeit auf tun. Dies könnte beispielsweise für die ACE-Hemmer oder Angiotensinantagonisten zutreffen. Komponenten des lokalen Angiotensinsystems

konnten 2005 im Magenkarzinom identifiziert werden, wobei ein Zusammenhang zwischen dem ACE-Genotyp und dem Nodalstatus des Magenkarzinoms vom intestinalen Typ hergestellt werden konnte (siehe Kapitel 1.2.3)<sup>181</sup>. Die Hoffnung besteht darin, durch neue Prognosemarker die Patienten zu erkennen, die besonders von einer aggressiveren Therapie profitieren könnten. Zudem könnten durch Proteomanalysen identifizierte Biomarker eine Frühdiagnose des Magenkarzinoms bei Risikopatienten ermöglichen.

## 1.2 Das lokale Angiotensin II System

Im Gegensatz zu den physiologischen blutdruckwirksamen Effekten von Angiotensin II im Rahmen des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), spricht man bei lokaler Expression einzelner Komponenten des RAAS vom lokalen Angiotensinsystem (LAS). Eine Rolle spielt hier die lokale Expression des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE), des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (AT1R) und des Angiotensin II Typ 2 Rezeptors (AT2R) in Organsystemen und Tumorgeweben. Das LAS in Tumoren scheint weniger mit Blutdruck- und Elektrolytregulation, als vielmehr mit Tumorwachstum und -ausbreitung in Verbindung zu stehen<sup>53</sup>.

Das Effektorhormon Angiotensin II wurde 1940 unter anderem von Braun-Menendez et al.<sup>27</sup> erstmals beschrieben. Das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) wird durch die Dipeptidylcarboxypeptidase ACE von dem Dekapeptid Angiotensin I (Ang I) abgespalten. Das ACE-Gen hat einen Insertions-/Deletionspolymorphismus. Dabei führt eine homozygote 287-bp Deletion in Intron 16 (ACE-DD) zu doppelten Konzentrationen des mutierten Enzyms in Geweben und im Blut, verglichen mit der homozygoten ACE-II-Form<sup>238</sup>. Außer dem ACE gibt es weitere Enzyme, die aus Ang I das Ang II abspalten. Das ACE affiziert selbst weitere Peptide, wie Abbildung 1 verdeutlicht:



**Abb. 1: Entstehung, Abbau und Effektorrezeptoren von Angiotensin II.**

Ang II entsteht aus Ang I durch das ACE. Desweiteren wurden für diesen Effekt auch CAGE, Cathepsin G und Chymase beschrieben. Diese Enzyme spielen bei der lokalen Angiotensin II-Entstehung eine Rolle (modifiziert nach Hunyady et al.<sup>101</sup>).

Angiotensin II bewirkt seine Effekte über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor und den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor<sup>50</sup>. 1974 wurde der AT1R erstmals als membranständiges Protein mit Sensitivität für Guanylnukleotide von Glossman et al.<sup>76</sup> beschrieben. Der AT1R und der AT2R besitzen jeweils sieben Transmembrandomänen und sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Ein weiterer, in diesem System eine Rolle spielender Rezeptor, ist der G-Protein gekoppelte Mas-Rezeptor (Mas). Er bildet Heterooligomere mit dem AT1R und wirkt als physiologischer Antagonist des AT1R in Hinsicht auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration<sup>119</sup>. Der Mas wird kodiert von einem Onkogen, dem *mas*-Gen<sup>109</sup>.

In *in vitro*-Experimenten konnte das LAS die Tumorbiologie durch Einflüsse auf die Neoangiogenese, durch gesteigerte Tumorzellproliferation und durch Förderung des Umbaus der extrazellulären Matrix beeinflussen<sup>178</sup>. Eine Rolle spielt dabei die Ang II-Produktion und -Wirkung direkt im Tumorgewebe. Ang II entsteht hier nicht nur durch ACE, sondern auch durch aus Makrophagen freigesetzte Chymase und Cathepsin G<sup>101</sup> (siehe Abbildung 1). Eine direkte Tumorigenese durch das LAS konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Beispiele für die Expression des LAS sind bestimmte Formen des Mammakarzinoms<sup>104</sup>, das Pankreas-, Larynx-<sup>137</sup> und das Prostatakarzinom<sup>143</sup>. Auf die Rolle des LAS im Magenkarzinom wird in Kapitel 1.2.3 gesondert eingegangen. Zunächst soll die Funktion der Angiotensin Typ 1 und Typ 2 Rezeptoren beleuchtet werden.

### 1.2.1 Der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor

Der humane AT1R ist für die bekannten Effekte von Angiotensin II auf Blutdruck und Elektrolytbalance verantwortlich. Sein Gen befindet sich auf Chromosom 3. Der AT1R besteht aus 359 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von 40 kDa<sup>144</sup>. In Nagetieren konnten zusätzlich zwei Subtypen, der AT1a und der AT1b, beschrieben werden<sup>82</sup>. Über seine sieben Transmembrandomänen ist der AT1R mit G<sub>q/11</sub>, G<sub>12/13</sub> und G<sub>i/o</sub>-Proteinen verbunden. Seine bekannten Effekte in glatten Muskelzellen werden dabei vor allem über G<sub>q/11</sub> und die Freisetzung von Phosphatidylinositol und Ca<sup>++</sup> und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) vermittelt<sup>101; 215</sup>. Es sind jedoch auch G-Protein unabhängige Aktivierungen von Signalkaskaden beschrieben worden, bei denen der AT1R Effekte auf den Jak/STAT-Signalweg und über β-Arrestine und Src Effekte auf MAP-Kinasen hat<sup>99; 215</sup>. Über die Aktivierung von MAP-Kinasen, wie ERK1/2, JNK und

p38MAPK kann der AT1R auf Proteinsynthese, Genexpression und Zellwachstum Einfluss nehmen<sup>144</sup>.

Der Einfluss von AT1R auf diese Signalwege legt eine Verbindung des Rezeptors zu tumorbiologisch bedeutsamen Signalkaskaden nahe. Für den selektiven AT1R-Antagonisten Candesartan konnte in Mausexperimenten eine Reduktion von Tumorangiogenese, Metastasierung und Tumorwachstum gezeigt werden<sup>53;97</sup>. Desweiteren konnte *in vivo* eine vermehrte AT1R-Expression in tumorassoziierten Makrophagen und Fibroblasten gezeigt werden<sup>60</sup>. Durch eine AT1R-vermittelte Induktion von VEGF in Tumorzellen, führt so eine tumorassoziierte Entzündung zu verstärkter Angiogenese<sup>97</sup>. In Monozyten, Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen induziert Ang II über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Bildung von Zelladhäsionsmolekülen, wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin, die möglicherweise in der Metastasierung eine Rolle spielen können<sup>118;144</sup>. Der Umbau der extrazellulären Matrix und der Abbau von Kollagen IV wird über AT1R und die konsekutive Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen gefördert<sup>128</sup>. Begünstigt wird eine mögliche Zellmigration auch durch die von AT1R ausgelöste Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)<sup>241</sup>. In glatten Gefäßmuskelzellen konnten ROS mit der Angiotensin II vermittelten p38MAPK- und Src-Aktivierung in Zusammenhang gebracht werden<sup>144</sup>. In humanen Krebszellen konnte eine ROS vermittelte Transaktivierung des MET-Rezeptors nachgewiesen werden. Als Protoonkogen steht der MET-Rezeptor mit Tumorinvasion und Metastasierung in Verbindung<sup>67</sup>. Seine Überexpression konnte auch für das Magenkarzinom nachgewiesen werden<sup>158</sup>.

Zahlreiche Arbeiten, auch mit humanen Krebszellen wie beispielsweise Pankreas-<sup>71</sup>, Prostata-<sup>222</sup> oder Brustkrebszellen<sup>81</sup>, konnten bereits eine Verbindung zwischen dem AT1R und dem EGF-Rezeptor belegen. Dafür scheint das YIPP-Motiv innerhalb des AT1R-Proteins von Bedeutung zu sein<sup>215</sup>. Hier binden die Signalmoleküle Phospholipase C Gamma (PLC $\gamma$ ), Jak2 und SHP-2<sup>5;196</sup>. Ein mögliches Resultat dieser Verbindung ist eine gesteigerte Zellproliferation über die Transaktivierung des EGF-Rezeptors mit konsekutiver Aktivierung von ERK, STAT3 und PKC.

## 1.2.2 Der Angiotensin II Typ 2 Rezeptor

Der AT2R kann an glatten Muskelzellen eher für das Gegenteil der Effekte des AT1R verantwortlich gemacht werden: Er wirkt antiproliferativ und proapoptotisch<sup>144</sup>. Das Protein dieses Rezeptors besteht aus 363 AS und hat ein Molekulargewicht von 41 kDa. Seine sieben Transmembrandomänen zeigen eine Verbindung zu G<sub>i</sub>-Proteinen und

Tyrosinphosphatasen<sup>101</sup>. Der AT2R aktiviert die MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1) und kann dadurch die durch AT1R ausgelöste Phosphorylierung von MAP-Kinasen terminieren<sup>219</sup>. Auch eine AT2R vermittelte Aktivierung der SHP-1 Tyrosinphosphatase konnte beobachtet werden<sup>18</sup>. Diese Effekte könnten in Erwachsenen für die durch AT2R vermittelte Inhibierung von Zellwachstum und Apoptose verantwortlich sein.

Der AT2R wird in hohen Mengen während der Fetalentwicklung, nach kardiovaskulären Ereignissen und während der Wundheilung exprimiert. Dies lässt seine Rolle bei der Gewebserneuerung, dem Wachstum und der Entwicklung vermuten<sup>219</sup>. Studien konnten eine proangiogenetische und proapoptotische Wirkung des AT2R zeigen<sup>53</sup>. In Kardiomyozyten führte eine AT2R vermittelte Induktion der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) zu Zellhypertrophie<sup>195</sup>. Die genaue Rolle, die der AT2R in der Entstehung von Tumoren spielt, ist bislang nicht aufgedeckt worden. Verschiedene Arbeiten haben hier gegenteilige Resultate geliefert<sup>144</sup>.

### **1.2.3 Das lokale Angiotensinsystem im Magenkarzinom**

Lever et al.<sup>127</sup> stellten erstmals die Hypothese auf, dass eine Langzeittherapie mit den ACE-Inhibitoren Captopril, Lisinopril und Enalapril die Mortalität von Brust- und Lungentumoren reduziere. Weitere klinische Studien konnten einen positiven Effekt von ACE-Inhibitoren auf die Tumorausbreitung nicht mehr bestätigen. Es gibt jedoch den Verdacht, dass der ACE-Insertions-/Deletionspolymorphismus hier von Bedeutung sein könnte und dass das Angiotensin konvertierende Enzym als Indikator für eine Funktion des LAS in der Tumorausbreitung betrachtet werden kann<sup>53</sup>. So konnten Medeiros et al.<sup>143</sup> eine Verbindung zwischen dem ACE-Polymorphismus und der Mortalität von Prostatakarzinomen herstellen.

Für das Magenkarzinom konnten Carl-McGrath et al.<sup>33</sup> 2004 eine lokale Expression von ACE nachweisen. Röcken et al.<sup>181; 182</sup> fanden heraus, dass der ACE-DD-Genotyp und die Expression von AT1R im Magenkarzinom vom intestinalen Typ mit dem Lymphknotenstatus und dem UICC-Tumorstadium korrelieren. Der AT1R konnte in 26%, der AT2R in 95% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen aller Tumortypen der Laurén-Klassifikation nachgewiesen werden. Alle Tumortypen zeigten bei AT1R<sup>+</sup> eine signifikant verkürzte Überlebenszeit. Bei zusätzlichem Vorliegen des ACE-DD-Genotyps entwickelten 100% der Fälle Lymphknotenmetastasen, die die Überlebenswahrscheinlichkeit des Magenkarzinoms entscheidend beeinflussen<sup>237</sup>. Die Vermutung liegt nahe, dass der AT1R über einen seiner zahlreichen Signalwege die Entstehung

von Lymphknotenmetastasen fördert. Der Verbindung zum potentiell onkogenen EGF-Rezeptor (siehe auch Kapitel 1.2.1) soll in dieser Arbeit besondere Beachtung geschenkt werden.

### **1.3 Der Epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor**

Der Epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor) gehört, als zuerst beschriebenes Mitglied, in die Familie der ErbB-Rezeptoren. Diese Familie besteht aus vier Mitgliedern: EGF-Rezeptor (auch benannt mit ErbB1 oder HER1), ErbB2 (oder HER2/neu), ErbB3 (oder HER3) und ErbB4 (oder HER4).

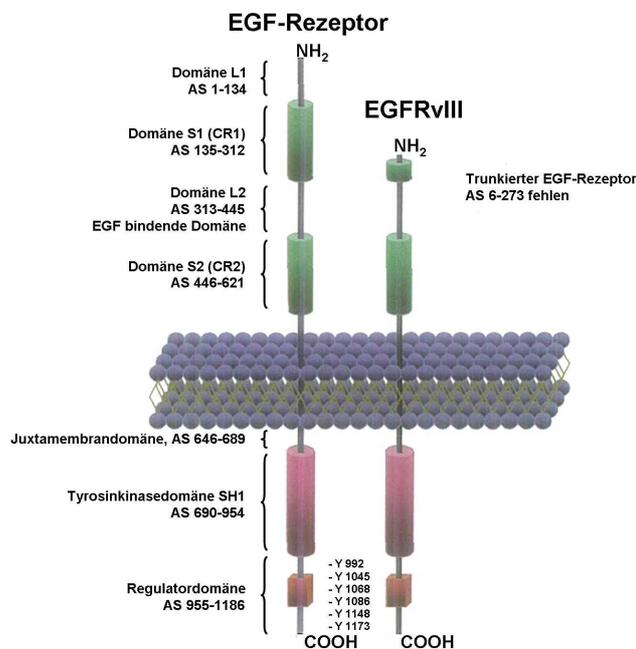
Der EGF-Rezeptor wird in den unterschiedlichsten Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert. Dort spielt er eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung<sup>146</sup> und während der Wundheilung<sup>17</sup>. Mausexperimente konnten zeigen, dass Nullmutationen des EGF-Rezeptors letal sind<sup>205</sup>. Eine deregulierte Expression, besonders des EGF-Rezeptors und von HER2, konnte als ursächlich für die Entwicklung und Malignität von zahlreichen Tumoren identifiziert werden<sup>159</sup>.

#### **1.3.1 Molekulare Struktur**

Bei dem EGF-Rezeptor handelt es sich um ein 1186 Aminosäuren umspannendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 2. Der Ursprung dieses Proteins liegt auf Chromosom 7p11-13. Das Gen hat eine Größe von 110kb und besitzt 26 Exone. 622 AS, kodiert von Exon 1 bis 14, formieren die Extrazellulärregion. Dort befinden sich die Subdomänen I bis IV. Die Ligandenbindungsstellen L1 und L2 (= Subdomäne I und III) besitzen je einen  $\beta$ -Helixanteil, der die Ligandenbindungstasche formt<sup>17; 135; 159</sup>. Die cysteinreichen Domänen S1 (oder CR1, Subdomäne II) und S2 (oder CR2, Subdomäne IV) werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten. Sie sind an der Rezeptordimerisierung beteiligt<sup>3; 17; 135</sup>. Der Transmembranteil, kodiert von Exon 15, besteht aus einer einzigen Alpha-helix. Diese wird von dem 542 AS enthaltenden intrazellulär gelegenen carboxyterminalen Rezeptorteil gefolgt. Dieser Teil enthält die für die EGF-Rezeptorsignalweiterleitung wichtigen Abschnitte: Etwa 50 AS formieren den juxtamembranären Teil, der mit der Proteinkinase C interagiert. 250 AS formieren die SH1-Domäne, die für die Transphosphorylierung der Autophosphorylierungsstellen verantwortlich ist. 229 AS enthalten sechs Tyrosinseitenketten, die nach

Autophosphorylierung mit Adapterproteinen interagieren. Die Adapterproteine besitzen SH2- (src homologie 2) Domänen oder PTB- (phosphotyrosinbindende) Domänen. Der zyttoplasmatische Rezeptorteil enthält außerdem Motive für die Rezeptorinternalisierung und den Rezeptorabbau<sup>17; 173; 229</sup>.

Außerhalb dieser Grundstruktur sind Mutationen des EGF-Rezeptors beschrieben. Die häufigste ist die verstärkt in Glioblastomen und nichtkleinzelligen Lungentumoren vorkommende Mutation EGFRvIII (auch benannt mit  $\Delta 801$  EGFR oder de2-7 EGFR). Durch alternatives Splicing entsteht ein Zusammenschluss der Exone 1 und 8. Es resultiert ein im extrazellulären Rezeptorteil trunzierter 145 kDa-Protein, das trotz Verlust der Aminosäuren 6 bis 273 und damit fehlender Ligandenbindungsstelle, in einem aktivierten Zustand ist<sup>173</sup>. Zum Vergleich mit dem EGF-Rezeptorprotein siehe Abbildung 2.



**Abb. 2: Mutation EGFRvIII im Vergleich zum Wildtyp.**

**Links:** Der EGF-Rezeptorwildtyp mit den Domänen L1 und L2 für die Ligandenbindung, den Domänen S1 und S2 für die Rezeptordimerisierung, der Juxtamembrandomäne, der SH1 Domäne für die Autophosphorylierung und den sechs Tyrosinseitenketten Y 992, Y 1045, Y 1068, Y 1086, Y 1148 und Y 1173. **Rechts:** Die extrazellulär trunzierte Mutation EGFRvIII im Vergleich. Die Abbildung wurde modifiziert nach Pedersen et al.<sup>173</sup>.

Zwei weitere EGF-Rezeptorisoformen konnten in der Plazenta beschrieben werden. Es handelt sich um ein 60 kDa- und ein 110 kDa-Protein, welche im Gegensatz zum Wildtyp des EGF-Rezeptors am carboxyterminalen Ende verkürzt sind<sup>179</sup>.

## 1.3.2 Direkte Rezeptoraktivierung, Signaltransduktion und Signaldeaktivierung

Für die Aktivierung des EGF-Rezeptors und die Fortleitung des erzeugten Signals in das Zellinnere interagieren die extra- und intrazellulär gelegenen Domänen des Proteins. Mit der Ligandenbindung sind konformationelle Änderungen verbunden, die im intrazellulären Rezeptorteil die Signalweiterleitung hervorrufen. Die Intensität des Signals wird durch den Rezeptorabbau bestimmt.

### 1.3.2.1 Liganden des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors

Für die HER-Familie sind zur Zeit insgesamt zwölf Liganden identifiziert<sup>17</sup>. Sieben davon binden an den EGF-Rezeptor (EGF, TGF- $\alpha$ , Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin, heparinbindendes EGF (HB-EGF), Epigen), zwei an den HER3 (Neuroregulin 1 und 2) und acht an den HER4 (Neuroregulin 1 bis 4, Tomoregulin, HB-EGF, Betacellulin, Epiregulin)<sup>159; 211</sup>. HER2 ist konstitutionell aktiv und besitzt keine eigenen Liganden.

Die Liganden des EGF-Rezeptors besitzen ein EGF-Motiv und eine individuelle aminoterminaler Verlängerung. Sie liegen zunächst als carboxyterminal membrangebundenes Vorläuferprotein vor<sup>139</sup>. Einzelheiten zu Isoformen der EGF-Rezeptorliganden sind in der Übersichtsarbeit von Raymond Harris et al.<sup>92</sup> zu finden. Die Proliganden werden durch in der Zellmembran verankerte Metalloproteasen aus ihrer Membranbindung abgespalten. Bei diesen Metalloproteasen handelt es sich um die Gruppe der ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*), auf die in Kapitel 1.4.1 näher eingegangen wird. Für die Spaltung der Vorstufen der EGF-Rezeptorliganden sind ADAM9, -10, -12, -15, -17 und -19 verantwortlich<sup>22; 102</sup>. ADAM17 (auch *TNF- $\alpha$  converting enzyme*, TACE) spaltet beispielsweise Pro-TGF- $\alpha$ , Pro-HB-EGF und Pro-Amphiregulin<sup>22; 28</sup>. Für die Abspaltung von HB-EGF konnten neben ADAM17 auch ADAM9, -10 und -12, sowie die Matrixmetalloproteasen MMP-2, -3, -7 und -9 identifiziert werden<sup>92; 95; 164</sup>. Die proteolytische Spaltung ist ein regulierter Prozess, der von Proteinkinase C, Ca<sup>++</sup>-Einstrom und Phosphataseaktivität beeinflusst werden kann<sup>54; 92; 108</sup>. Für die Spaltung von Pro-EGF und von Pro-Betacellulin konnte bisher keine Metalloprotease identifiziert werden. Beide zeigen jedoch bei *in vitro* Experimenten eine Konzentrationssteigerung durch den Einsatz von Kalziumionophoren<sup>92; 123</sup>. Für Pro-Epiregulin konnte bisher keine Prozessierung beschrieben werden<sup>92</sup>.

Es kann jedoch auch ohne die proteolytische Ligandenfreisetzung zu einer EGF-Rezeptoraktivierung an gegenüberliegenden Zellen kommen. Diese als juxtakrin bezeichnete Aktivierung des EGF-Rezeptors, wurde bisher für TGF- $\alpha$ , Amphiregulin und HB-EGF beschrieben<sup>7; 103</sup>. Es kommt zu einer Komplexbildung des Proliganden mit dem Tetraspannin CD9, der entsprechenden ADAM und anderen Stabilisationsproteinen. Es gibt Hinweise, dass diese Art der Ligandenbindung eine Verlängerung des Signals und Veränderungen im Zellwachstum bewirkt<sup>92; 206</sup>.

### 1.3.2.2 Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion

Nach Ligandenbindung an die L1- und L2-Domäne kommt es zur Ausbildung einer  $\beta$ -Haarnadelstruktur, dem sogenannten Dimerisationsloop in der Subdomäne S1. Dieser fördert die Interaktion mit dem Dimerisationsloop eines anderen Rezeptormonomers<sup>74; 162</sup>. Damit kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren, die die Voraussetzung für die Signaltransduktion darstellt. Ohne Ligandenbindung interagieren der Dimerisationsloop der Domäne S1 und eine  $\beta$ -Haarnadelstruktur der Domäne S2, so dass die Rezeptordimerisierung autoinhibiert ist<sup>17; 135</sup>. Die Konformation im extrazellulären Bereich von HER2 zeigt eine starke Interaktion zwischen L1 und L2, die der Haarnadelstruktur der anderen HER-Rezeptoren nach Ligandenbindung ähnelt<sup>45</sup>. HER2 ist somit in einem nahezu daueraktivierten Zustand und dadurch, auch ohne direkte Ligandenaktivierung, der bevorzugte Dimerisationspartner für die anderen Familienmitglieder<sup>135; 159; 220</sup>.

Bei den entstandenen Rezeptorhomodimeren handelt es sich um Homodimere des EGF-Rezeptors oder von HER4<sup>166</sup>. Heterodimere bilden sich aus der Interaktion des EGF-Rezeptors mit HER2 und HER3, aber nicht mit HER4. Letzteres bildet bevorzugt mit HER2 Heterodimere<sup>206; 229</sup>. HER3 besitzt eine trunkierte Kinasedomäne, weshalb kein HER3/HER3-Homodimer existiert<sup>85</sup>. Alle Heterodimere mit HER2 besitzen eine gesteigerte Potenz, da die für die Internalisierung und Degradation des Ligandrezeptorkomplexes notwendige Bindung von Cbl hier nur schwach ist<sup>17</sup>.

Im Anschluss an die Rezeptordimerisierung kommt es zu Konformationsänderungen, die die Signalabläufe im intrazellulären Rezeptoranteil bewirken.

### 1.3.2.3 Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden

Die Konformationsänderung nach Rezeptordimerisierung begünstigt die ATP abhängige Transphosphorylierung der Tyrosinseitenketten im intrazellulären Rezeptorteil<sup>151</sup>. Das Muster der Tyrosinphosphorylierung, resultierend aus der Komposition des Dimers und des aktivierenden Ligandens, bestimmt die Art der intrazellulär aktivierten Signalkaskade<sup>135; 161; 233</sup>. Proteine mit SH2- oder PTB-Domäne erkennen die fünf bis acht Aminosäuren, die die phosphorylierten Tyrosinseitenketten umgeben, und binden an den aktivierten Rezeptorkomplex<sup>209</sup>. Das können zum Einen Proteine mit eigener Enzymaktivität sein, wie Src, die PLC $\gamma$  und die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)<sup>86</sup>. Die PI3K bindet über ihre p85-Untereinheit an die Phosphotyrosine des EGF-Rezeptors und wird dadurch allosterisch aktiviert<sup>135</sup>. Durch die Rekrutierung der PLC $\gamma$  über ihre SH2-Domäne an die AS 654 des aktivierten EGF-Rezeptors, kommt es zur Translokation des Enzyms an die Zellmembran<sup>63; 135; 229</sup>. Die PLC $\gamma$  kommt dadurch in Kontakt mit ihrem membranverankerten Substrat Phosphatidylinositoltrisphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), was zur Bildung von Inositoltriphosphat (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) und Diacylglycerol führt. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> setzt Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei. Damit werden Kalzium abhängige Kinasen und Phosphatasen, wie beispielsweise Calcineurin aktiviert. Die anschließende Aktivierung der Proteinkinase C führt zu weiteren Effekten<sup>135</sup>.

An den EGF-Rezeptor binden alternativ Mediatorproteine ohne eigene Enzymaktivität, wie Grb2, Shc, Grb7 und Nck<sup>86</sup>. Sie werden durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert und können damit andere Signalproteine aktivieren. Ein Beispiel ist der Adapter Grb2, der Sos rekrutiert und damit den ras/raf/MAP-Kinasepfad einschaltet<sup>134; 142; 172</sup>.

Die MAP-Kinasen und die PI3K/Akt-Kaskade führen zu einer Zunahme von Cyclin D1, welches den Cyclinkinaseinhibitor p27 abbaut und Cdk2 freisetzt<sup>135</sup>. Dieses assoziiert mit Cyclin E und verkürzt somit die Dauer des G1/S-Kontrollpunktes. Damit wird der Zellzyklus beschleunigt und die maligne Transformation gefördert<sup>17</sup>. Gleichzeitig kommt es über EGF-Rezeptor vermittelte Signale zu einer Hemmung der Apoptose. Als wichtiges antiapoptotisches Protein gilt Bcl-2. Die Transkription von Bcl-2 wird von PI3K, MAP-Kinasen und STAT3 gefördert. So kann die Einschaltung dieses Signalweges durch den EGF-Rezeptor bei Dimerisierung mit dem konstitutionell aktiven HER2 im Extremfall in Apoptoseresistenz resultieren und Chemotherapeutika können in ihrer Wirkung geschwächt werden<sup>135</sup>.

Viele dieser Signalkaskaden führen zu einer spezifischen Reaktion, sind aber nur aktiv, wenn auch andere Signalproteine aktiviert sind: Im Sinne einer Signalkonvergenz führt die PLC $\gamma$  zu Mobilisation, aber nur wenn auch der MAP-Kinaseweg eingeschaltet ist<sup>230</sup>. Das Resultat eines einzigen eingeschalteten Prozesses kann zu einer multiplikativen Diversifizierung eines Signals führen, beispielsweise nach MAP-Kinaseaktivierung<sup>86</sup>.

Schlussfolgernd kann das EGF-Rezeptorsignal eingeschränkt werden durch Regulation der Verfügbarkeit des Liganden, durch negative intrazelluläre Rückkoppelungsmechanismen mittels Aktivierung von Phosphatasen und durch Beendung des EGF-Rezeptorsignals mittels Rezeptorinternalisierung und Abbau<sup>206</sup>.

#### **1.3.2.4 Signalmodulierung durch Phosphatasen, Signaldeaktivierung durch Rezeptorinternalisierung und -abbau**

Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors bewirkt seine Aktivierung. Diese kann mithilfe von Phosphotyrosinphosphatasen (PTP) reguliert werden. Die PTP-1B konnte als Regulator für die EGF-Rezeptoraktivität identifiziert werden. Mäuse mit einer dominant negativen PTP-1B-Mutation zeigten überschießende EGF-Rezeptorphosphorylierung<sup>88</sup>. Die PTP-1C, die aufgrund zweier SH2-Domänen auch SHP-1 genannt wird, kann die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors mithilfe von Phosphaten reduzieren<sup>217</sup>. Die SHP-1 wird unter anderem von dem AT2R aktiviert<sup>200</sup>. Es ist denkbar, dass die Aktivität der PTP zu einem Signalende oder zu einer Reduzierung des EGF-Rezeptorsignals führt. Möglicherweise bewirken sie eine Unterbrechung der Effekte durch die vom EGF-Rezeptor aktivierten Kinasen<sup>86</sup>.

Die Internalisierung des Ligandenrezeptorkomplexes wird eingeleitet durch das Binden von Proteinen, die die Endozytose steuern, an Sortierungsmotive innerhalb der AS 970 bis 1186 im carboxyterminalen Ende des EGF-Rezeptors<sup>121</sup>. Für diese Adapter, wie beispielsweise Eps15<sup>135</sup>, AP2<sup>121</sup> oder Cbl, ist die Proteintyrosinkinaseaktivität obligatorisch<sup>40</sup>. Die Internalisierung des Rezeptorkomplexes erfolgt dann über *Clathrin coated pits*, frühe und späte Endosomen<sup>121; 210</sup>. So führt die Assoziation von AP2 und die Src vermittelte Phosphorylierung von Clathrin zur Internalisierung des Komplexes in *Clathrin coated pits*. Cbl bindet an die autophosphorylierte Tyrosinseitenkette Y 1045, wird selbst phosphoryliert und steuert damit die Monoubiquitinylierung des EGF-Rezeptors<sup>121</sup>. Das Binden von Cbl bewirkt die Assoziation von CIN85 und Endophilin, zwei Proteinen, die die Formierung von Endosomen steuern. Eps15 fördert, ebenso wie

Cbl, die Monoubiquitylierung des EGF-Rezeptors in den Endosomen<sup>57</sup> oder über Binden an AP2 die Formierung von *Clathrin coated pits*<sup>218</sup>.

Die Art des Liganden entscheidet über die Terminierung des Signals oder über ein Recycling des EGF-Rezeptors an die Zelloberfläche. Beispielsweise führt die Aktivierung durch TGF- $\alpha$ , zu einer Rückverlagerung des EGF-Rezeptors an die Zelloberfläche<sup>228</sup>. Der Ligand dissoziiert im sauren Milieu der frühen Endosomen von dem Komplex ab. Der Rezeptor wird damit für eine erneute Aktivierung wiederverfügbar. Im Falle von EGF bleibt der Ligand in den Endosomen gebunden und wird zusammen mit dem Rezeptor abgebaut<sup>70; 206</sup>. Damit entscheidet die pH-Stabilität des Ligandrezeptorkomplexes über die Stärke und die Zeitdauer des Signals<sup>166; 229</sup>. Nicht nur der pH-Wert in den Endosomen entscheidet über das Signal, sondern auch die Verfügbarkeit von Enzymsubstraten. Während beispielsweise ras nach Komplexinternalisierung weiter aktiviert werden kann, kann die PLC $\gamma$  nur an der Zellmembran wirken<sup>206</sup>.

Definitiver Abbau geschieht durch die Cbl vermittelte Rekrutierung von Ubiquitin. Diese gilt als Signal für die Lyse des Ligandrezeptorkomplexes<sup>57; 112; 206</sup>.

### 1.3.3 Die Rolle des EGF-Rezeptors in Tumoren

Als Ausgangspunkt pleiotroper biologischer Signale kann die EGF-Rezeptoraktivierung Zellteilung, Migration und Zelldifferenzierung zur Folge haben<sup>229; 230</sup>. Von Hanahan und Weinberg wurden sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie von Tumorzellen beschrieben<sup>90</sup>. Dazu gehören Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Ausschaltung der Apoptose, gesteigertes Potential zur Zellteilung, Gewebeinvasion und Metastasierung. Da der EGF-Rezeptor mit seinen Signalwegen in Verbindung zu Zellfunktionen steht, die bei Deregulation diese Wirkungen haben können, wird ersichtlich, dass Fehlregulationen des EGF-Rezeptors die Tumorentstehung begünstigen. Das wird gestützt von der Erkenntnis, dass der EGF-Rezeptor zu den Rezeptoren gehört, die am meisten in Tumoren hochreguliert sind<sup>1</sup>. Hochregulationen oder Mutationen veranlassen den EGF-Rezeptor bereits bei physiologischen Ligandenkonzentrationen zu gesteigerter Signalgebung<sup>90</sup>.

Überexpression, Genamplifikation oder Mutationen des EGF-Rezeptors werden in vielen humanen Tumorarten gefunden. Darunter sind Tumore in der Brust, Kopf und Hals, den Lungen und in Gliomen<sup>135</sup>. Es gibt einige Versuche die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors zu hemmen. Dazu werden im Wesentlichen monoklonale Antikörper oder Tyrosinkinaseinhibitoren eingesetzt<sup>93</sup>. Im klinischen Einsatz befinden sich bereits die

monoklonalen Antikörper Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) und Panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>). Cetuximab wird in Kombination mit den herkömmlichen Chemotherapeutika und/oder Strahlentherapie für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms und der Kopf-, Hals-Tumore eingesetzt<sup>13; 176; 188</sup>. Panitumumab ist zur palliativen Therapie des Kolonkarzinoms zugelassen, wenn die herkömmlichen Chemotherapeutikakombinationen nicht mehr wirken<sup>12; 75</sup>. Des Weiteren kommen auch Tyrosinkinaseinhibitoren zum Einsatz, die die ATP-Bindung kompetitiv hemmen. Der über diesen Mechanismus die EGF-Rezeptoraktivierung blockierende Inhibitor Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>) konnte in Studien am metastasierten nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) keinen Überlebensvorteil zeigen und ist daher in der EU nicht zugelassen<sup>94</sup>. Weitere Tyrosinkinaseinhibitoren sind Erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>) und Lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>). Erlotinib wird nach erfolgloser Therapie mit den üblichen Chemotherapeutika in der Behandlung des fortgeschrittenen NSCLC und des Pankreaskarzinoms eingesetzt<sup>11; 15</sup>. Lapatinib ist zugleich ein Inhibitor von HER2. In Phase-II-Studien wird er vor allem bei gleichzeitiger Überexpression von HER2 und des EGF-Rezeptors eingesetzt. In der EU ist Lapatinib seit Juni 2008 für die Behandlung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms zugelassen<sup>14; 20</sup>. Präklinische Studien an Mäusen untersuchen die therapeutische Wirkung des Tyrphostins AG1478, eines spezifischen kompetitiven Inhibitors der ATP-Bindungsstelle des EGF-Rezeptors<sup>62</sup>. Andere Therapiestrategien zielen auf die konstitutiv aktive EGFRvIII-Mutation, die vor allem in der Gliomtherapie einen Fortschritt bedeuten sollen<sup>120</sup>.

### **1.3.3.1 Der EGF-Rezeptor im Magenkarzinom**

Immunhistochemische Untersuchungen zur EGF-Rezeptorexpression im Magenkarzinom wurden bereits mehrfach durchgeführt. Eine Expression von 74% wurde von Jang et al.<sup>111</sup> gefunden. Eine neuere Arbeit fand eine EGF-Rezeptorexpression von 63%<sup>140</sup>. Die Wirkung einer gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Therapie wurde für das Magenkarzinom bisher in zwei Phase II-Studien untersucht. Der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib zeigte eine Ansprechrate von 9%, die nicht mit der EGF-Rezeptorexpression korrelierte<sup>59</sup>. Aufgrund der vielfach gefundenen hohen EGF-Rezeptorexpression im Magenkarzinom, könnte Cetuximab, das mit gutem Erfolg in der Therapie von kolorektalen Tumoren eingesetzt wird, auch für den Magenkarzinompatienten von Vorteil sein. Die in der FOLCETUX-Studie untersuchte Kombination von Cetuximab mit 5-FU und dem Platinderivat Irinotecan zeigte eine gute Ansprechrate von 44%, die jedoch von einem therapiebedingten Todesfall begleitet wurde<sup>175</sup>.

### 1.3.4 Indirekte Aktivierung des EGF-Rezeptors

Betrachtet man den EGF-Rezeptor als eine mit der Entstehung von Tumoren in engem Zusammenhang stehende Tyrosinkinase, ist es wichtig, nicht nur seine physiologischen Aktivierungswege zu kennen. Der EGF-Rezeptor kann auch unabhängig von seinen eigenen Liganden phosphoryliert und damit aktiviert werden. Beschrieben wurden nichtphysiologische Stimuli wie Wasserstoffperoxid, Gammastrahlung, osmotischer Schock, Schwermetallionen, Membrandepolarisation und UV-Strahlung<sup>83; 184</sup>. Die EGF-Rezeptoraktivierung durch Membrandepolarisation und Gammastrahlung geschieht über den intrazellulären Anstieg der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und konsekutive Aktivierung der PKC<sup>35; 193</sup>. UV-Strahlung und osmotische Veränderungen führen über Konformationsänderungen der Zellmembran zu EGF-Rezeptordimerisierung und -aktivierung<sup>184</sup>.

Wird der EGF-Rezeptor durch die Vernetzung intrazellulärer Signalkaskaden oder durch die indirekte Freisetzung seiner Liganden aktiviert, spricht man allgemein von der Transaktivierung des EGF-Rezeptors. Ein intrazellulärer Aktivierungsmechanismus über Wachstumshormonrezeptoren wurde 1997 von Yamauchi et al.<sup>234</sup> beschrieben. Dabei aktiviert Jak2 den EGF-Rezeptor über die intrazelluläre Phosphorylierung seiner Tyrosinseitenkette Y 1068. Danach kann Grb2 binden und MAP-Kinasen aktivieren. Die zweite Möglichkeit der EGF-Rezeptortransaktivierung beruht auf einer durch intrazelluläre Signale hervorgerufenen Aktivierung der Metalloproteasen, die die Liganden des EGF-Rezeptors freisetzen. In diesem Zusammenhang konnten EGF-Rezeptortransaktivierungen durch Aktivierung von Zytokin-<sup>168</sup>, Chemokin-<sup>107</sup>, Fibronectin-<sup>156; 243</sup> und G-Protein gekoppelte Rezeptoren<sup>83; 243</sup> identifiziert werden. Der Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch die große Gruppe der GPCRs kommt hier die größte Bedeutung zu. Sie wird seit circa 15 Jahren intensiv untersucht.

## **1.4 Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

G-Protein gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Gruppe von membranständigen Rezeptoren dar. Sie bestehen aus sieben Transmembrandomänen, wobei das carboxyterminale Ende intrazellulär gelegen ist<sup>84</sup>. GPCRs können durch eine Reihe von Stimuli, wie Licht, Duftstoffe, Neurotransmitter, Hormone und vasoaktive Substanzen aktiviert werden. Die Ligandenbindung ruft konformationelle Änderungen hervor, dadurch binden heterotrimere G-Proteine und können aktiviert werden. Die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine aktivieren daraufhin intrazelluläre Adapter- und Effektormoleküle, wie die Adenylatzyklase, PLC $\beta$ , intrazelluläre Kinasen und Phosphatasen<sup>56</sup>. 1996 konnte gezeigt werden, dass GPCRs auch zu einer Aktivierung von ERK/MAP-Kinasesignalwegen führen<sup>41</sup>. Bis dahin stand die Aktivierung dieser mitogen wirkenden Kinasen vor allem mit der Aktivierung des EGF-Rezeptors in Zusammenhang. Mit *in vitro* Experimenten konnte die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch GPCRs in verschiedenen Zelltypen belegt werden. Mithilfe des EGF-Rezeptor spezifischen Inhibitors AG1478 konnte bei Aktivierung der GPCRs mit den Liganden Acetylcholin<sup>43</sup>, Ang II<sup>61</sup>, Endothelin-1<sup>167</sup>, LPA<sup>190</sup> und Thrombin<sup>243</sup> die ERK/MAP-Kinaseaktivierung verhindert werden. Damit wird ersichtlich, dass auch Hormone, die primär nicht mit der Tumorentstehung in Verbindung standen, über diesen Transaktivierungsmechanismus zur Tumorentwicklung über den EGF-Rezeptor beitragen können.

Die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch GPCRs steht mit dem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Konzentration und der Aktivierung der Proteinkinase C in Verbindung. Eguchi et al.<sup>61</sup> und Flannery et al.<sup>69</sup> konnten zeigen, dass durch die Inhibierung des Ca<sup>++</sup>-Anstiegs und der PKC die EGF-Rezeptor vermittelte Aktivierung von ERK reduziert wurde.

Nach Aktivierung der GPCRs kann es auch zu einer Aktivierung von Metalloproteasen kommen, die die Liganden des EGF-Rezeptors freisetzen. Da das ursprüngliche, dem Liganden des GPCRs entsprechende, Signal auf diese Weise dreimal über die Zellmembran geleitet wird, findet sich in der Literatur auch der Begriff *Triple Membrane Passing Signal* (TMPS)<sup>68</sup>.

### 1.4.1 Membranverankerte Metalloproteasen

Bei den ADAMs handelt es sich um membranverankerte Metalloproteasen. Extrazellulär befinden sich aminoterminal eine Metalloproteasedomäne, eine Disintegrindomäne, eine cysteinreiche Region und ein EGF-Motiv. Intrazellulär befinden sich Motive für die Signalverarbeitung und prolinreiche Regionen, die Signalproteine mit SH3-Domänen binden können. Nur die ADAMs, die ein HEXXH-Motiv in ihrer Metalloproteasedomäne enthalten sind katalytisch aktiv<sup>22</sup>. Bislang konnten von den ADAMs 40 Subtypen in Protozoen und Mammaliern beschrieben werden<sup>164</sup>. Viele ADAMs spielen ausschließlich in der Spermatogenese und der männlichen Fertilität eine Rolle<sup>22</sup>. ADAM8, -9, -10, -11, -12, -15, -17, -19, -22, -23, -28 und -33 sind in Mammaliern am häufigsten über alle Organsysteme verteilt<sup>194</sup>. ADAM2 und -3 spielen eine Rolle in der Fertilisation, ADAM23 konnte eine Rolle in der Gehirnentwicklung zugeschrieben werden<sup>125</sup>. Wie bereits erwähnt spielen ADAM9, -10, -12, -15, -17 und -19 eine große Rolle in der Spaltung der EGF-Rezeptorproliganden. Insofern ähneln die Krankheitsbilder von ADAM-Knock-out-Mäusen denen der EGF-Rezeptorliganden-Knock-out-Mäuse<sup>22; 92</sup>.

Über die Regulation und Aktivierung der ADAMs ist bisher wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass die SH3-Domänehaltigen Proteine PACSIN2, PACSIN3 und Eve-1 durch direkte Assoziation an die ADAMs an diesem Prozess beteiligt sind<sup>155; 212</sup>.

### 1.4.2 Triple Membrane Passing Signal

Das Modell des TMPS wurde in den letzten Jahren für diverse Organsysteme untersucht. Dabei führt die Aktivierung eines GPCRs über die Aktivierung von ADAMs zur Freisetzung der Liganden des EGF-Rezeptors (siehe Abbildung 27, Seite 82). Es resultieren die für den EGF-Rezeptor typischen intrazellulären Signalwege. Mit der Freisetzung der Liganden ist auch die Rezeptoraktivierung durch Dimerisierung mit anderen HER-Rezeptoren verbunden, die je nach Heterodimer Signale unterschiedlicher Potenz erzeugen können.

Über welchen Mechanismus die Aktivierung der ADAMs durch G-Proteine geschieht, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Die Inhibierung der an die ADAM bindenden, SH3-Domänehaltigen Proteine Eve-1 und PACSIN3 zeigte eine nach GPCR-Aktivierung ausbleibende EGF-Rezeptortransaktivierung<sup>155; 212</sup>. Indirekt, über die Freisetzung der EGF-Rezeptorliganden, konnte für die GPCR vermittelte Freisetzung von Ca<sup>++</sup>, PLC und ROS eine ADAM-Aktivierung gezeigt werden<sup>22; 147</sup>.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Aus der Darstellung des Kenntnisstandes geht hervor, dass das Magenkarzinom nach wie vor eine schlechte Prognose hat. Besonders das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ist für das Patientenüberleben von entscheidender Bedeutung. Obwohl die Tumorthherapie in den letzten 10 Jahren durch Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonale Antikörper mit Angriffspunkten auf molekularer Ebene, wie beispielsweise Trastuzumab gegen HER2 oder Cetuximab und Panitumumab gegen den EGF-Rezeptor, ergänzt wurde, blieb das Magenkarzinom von diesem Trend bisher nahezu unbeeinflusst.

Auf der Suche nach weiteren Therapiezielen oder Prognosemarkern rückte in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts das Angiotensinsystem in den Fokus. Das LAS konnte in vielen Tumorgeweben, darunter auch das Magenkarzinom, nachgewiesen werden. Im Magenkarzinom konnte es mit der Metastasierung in Lymphknoten und der Prognose in Zusammenhang gebracht werden. In anderen Tumoren konnte eine Angiotensin II vermittelte EGF-Rezeptortransaktivierung nachgewiesen werden.

Die durch den EGF-Rezeptor hervorgerufene Entstehung, Ausbreitung und Förderung des Wachstums von Tumoren führte zu der Annahme, dass die im Magenkarzinom gefundene AT1R-Expression, verbunden mit einem schlechteren Überleben, durch eine Angiotensin II vermittelte EGF-Rezeptortransaktivierung bedingt sein könnte.

Das **Ziel dieser Arbeit** war es, eine mögliche Verbindung zwischen dem LAS und dem EGF-Rezeptor im Magenkarzinom zu prüfen und damit einen möglichen Weg der Beteiligung des LAS an der Kanzerogenese des Magenkarzinoms zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde die Methode der Immunpräzipitation etabliert. Sie sollte die gezielte Untersuchung des EGF-Rezeptors ermöglichen. Die Kontrolle für die EGF-Rezeptorphosphorylierung erfolgte durch Untersuchung der Reaktion des EGF-Rezeptors auf Zellstimulation mit EGF. Der Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors wurde nach Angiotensin II-Zugabe in die Zellkultur untersucht. Über die Hemmung der Aktivierung des EGF-Rezeptors mithilfe des spezifischen Inhibitors AG1478 wurde die Theorie der EGF-Rezeptortransaktivierung untersucht. Eine Antagonisierung der Angiotensin II-Bindung, sowohl an den AT1R mithilfe von Olmesartan, als auch an den AT2R mithilfe von PD123,319, sollte die Verantwortung von Angiotensin II für die EGF-Rezeptorphosphorylierung belegen und den dafür hauptsächlich verantwortlichen Angiotensinrezeptortyp identifizieren.

## Kapitel 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Kits, Primer, Antikörper und Zellstimulantien

Folgende Chemikalien wurden in dieser Arbeit verwendet: Acrylamid Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40 (Roth, Karlsruhe), Agatabs (Eurogentec, Köln), Albumin bovine Fraction V (BSA) (Serva, Heidelberg), Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma-Aldrich, Steinheim),  $\beta$ -Mercaptoethanol und Coomassie-Brilliant blue (Serva, Heidelberg), ColorBurst Elektrophoresemarker (Sigma-Aldrich, Steinheim), Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe), Dulbecco's PBS ohne  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Mg}^{++}$  (PAA Laboratories, Cölbe), Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin), Elektrophoresemarker ColorBurst<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich, Steinheim), Essigsäure (J.T. Baker, Griesheim), Ethidiumbromid (Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz), Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA) (Roth, Karlsruhe), Gewichtsstandard SmartLadder MW 1700 - 10 bp (Eurogentec, Köln), Glycin und Glycerin (Merck, Darmstadt), HepG2-Zelllysate, unbehandelt (Alexis Biochemicals, Lörrach) Isopropanol und Lämmliprobenpuffer (2X) (Sigma-Aldrich, Steinheim), Methanol (J.T. Baker, Griesheim), biotinylierter Molekulargewichtsmarker (Sigma-Aldrich, Steinheim), Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, Steinheim), Protein A/PlusG-Agarose (Calbiochem, Darmstadt), Sodiumdodecylsulfat (SDS) ultra pure (Roth, Karlsruhe), Streptavidin-Peroxidase Polymer, Trizma<sup>®</sup> base (Tris), Trizma<sup>®</sup> hydrochlorid (Tris-HCl) und TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim), Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Cölbe), Tween-20 (Sigma-Aldrich, Steinheim), Zellkulturmedium VLE RPMI 1640 (Biochrom, Berlin), Zelllysepuffer (10X; 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin) (Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.)

Folgende molekularbiologische und biochemische Kits wurden verwendet: Bio-Rad D<sub>c</sub> Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, München), DryEase<sup>™</sup> Gel Drying System (Invitrogen, Karlsruhe), NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren), NBT/BCIP

1-Step™ und SuperSignal® West Pico (Pierce Biotechnology, Bonn), Omniscript RT Kit und Taq PCR Core Kit (Qiagen, Hilden).

In der RT-PCR kamen die folgenden Primer zum Einsatz: EGF-Rezeptor-F (TCT CAG CAA CAT GTC GAT GG,  $T_M$  60,4 °C) und EGF-Rezeptor-R (TCG CAC TTC TTA CAC TTG CG,  $T_M$  60,4 °C) (Operon Biotechnology GmbH, Köln).  $\beta$ -Aktin-F (GCC ATG TAC GTT GCT ATC CA,  $T_M$  62 °C) und  $\beta$ -Aktin-R (CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA,  $T_M$  62 °C) (Qiagen, Hilden).

Folgende Primärantikörper wurden für die Arbeit verwendet: Der polyklonale Kaninchen anti-human EGF-Rezeptorantikörper 1005 (Santa Cruz, Heidelberg), mit den Verdünnungen 1:1000 im Western Blot (WB) und 1:20 in der Immunpräzipitation. Der polyklonale Kaninchen anti-human EGF-Rezeptorantikörper (Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.), mit den Verdünnungen 1:1000 und 1:500 im WB. Der monoklonale Maus anti-human EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (Alexis Biochemicals, Lörrach) mit den Verdünnungen 1:1000 und 1:400 im WB. Der monoklonale Maus anti-human Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 (Upstate Biotech., Schwalbach) mit einer Verdünnung von 1:2000 im WB. Der monoklonale Maus anti-human  $\beta$ -Aktin-Antikörper AC-15 (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit einer Verdünnung von 1:2000 im WB. Folgende polyklonale Sekundärantikörper aus der Ziege (alle Firma DAKO, Hamburg) wurden für die Arbeit verwendet: anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert (WB 1:2000), anti-Kaninchen IgG, AP konjugiert (WB 1:1000) und anti-Maus IgG, HRP konjugiert (WB 1:1000).

Für die Zellkulturexperimente wurden folgende Stimulantien und Inhibitoren verwendet: AG1478 (Calbiochem, Darmstadt), Angiotensin II, EGF, PD123,319 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Olmesartan (Daiichi-Sanyo Deutschland, München).

## **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet: 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg), 5 ml Spritze, 20 Gauge-Nadel (B. Braun, Melsungen), 10 ml und 25 ml Corning® Costar® Stripette® (Sigma-Aldrich, Steinheim), 15 ml-Röhre und 50 ml-Röhre (Sarstedt, Nümbrecht), 25 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen und 100\*20 mm Zellkulturschalen (BD Falcon, Heidelberg), 96 Well Costar® Assay Mikroplatte (Fisher Scientific GmbH, Schwerte). Filtereinheit Puradisc 0,2  $\mu$ m (Whatmann, Dassel), Nitrozellulosemembran Hybond ECL™ (Amersham Biosciences, Freiburg), Papierfilter (Schleicher & Schuell, Dassel), Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Macherey-Nagel, Düren), Zellschaber (TPP, Trasadingen, Schweiz).

### 2.1.3 Geräte und Software

Unter Verwendung folgender Geräte wurde gearbeitet: Abzug für die Proteinbiochemie (Köttermann, Ütze-Hänigsen), Analysewaage (Ohaus® Scout™, Pine Brook, USA), CO<sub>2</sub>-Inkubator (Sanyo Biomedical, Bad Nenndorf), DryEase™ Gel Drying System (Invitrogen, Karlsruhe), Excel (Microsoft, Berlin), Faserfilter (Bio-Rad Laboratories, München), GeneSnap-Software und GeneTools-Software (Syngene, Langenfeld), Gel-Dokumentationssystem G-Box (Syngene, Langenfeld), Gelelektrophoresekammer und Heizblock Digital Heatblock (VWR International GmbH, Darmstadt), Mikroplattenphotometer Multiskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), Mikroskop Eclipse ST100 (Nikon, Düsseldorf), Mikrowelle GRILL (Panasonic, Hamburg), pH-Meter HI221 Calibration Check Microprocessor (HANNA Instruments, Kehl am Rhein), Spektralphotometer Genesys 10 UV und PCR SPRINT Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), PowerPac 200 Power Supply (Bio-Rad Laboratories, München), Rotator Dynal MX1 (Invitrogen, Karlsruhe), Rüttler PMS-1000 und Schwenker PMR-30 (Grant Instruments, Cambridge, Großbritannien), SDS-PAGE-System, Mini-Protean3 (Bio-Rad Laboratories, München), Sterilbank Microflow Biological Safety Cabinet für die Zellkultur (PEA GmbH, Koblenz), Sterilbank für die RNA-Isolation (Clean Air Deutschland GmbH, Hilden), Sterilbank Hersa Safe Type HS9 für die RT-PCR (Haraeus Instruments, Hanau), Thermocycler PX2 ThermoHybaid (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold), Ultrazentrifuge Universal 320R (Andreas Hettich, Tuttlingen), Wasserbad Typ 1003 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel), Western-Blot-System Mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, München), Zellzähler Z1 Coulter (Beckmann Coulter, Krefeld), Zentrifuge MLW T54 für die Zellkultur (Medizintechnik, Leipzig).

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Arbeit verwendet: Blockierungslösung (3% BSA in 1X TBS), Blottingpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol in dH<sub>2</sub>O, pH 8,3), Coomassie-Färbelösung (0,75% Coomassie-Brilliant blue, 30% Methanol, 10% Essigsäure in dH<sub>2</sub>O), 10X Elektrodenpuffer (0,25 M Tris-HCl, 1,92 M Glycin, 1% SDS in dH<sub>2</sub>O, pH 8,3), Entfärbelösung (30% Methanol, 10% Essigsäure in dH<sub>2</sub>O), Gelrockenpuffer (5% Ethanol, 5% Glycerin in dH<sub>2</sub>O), Probenpuffer (0,01% Bromphenolblau, 50% Glycerol in 1X TAE), SDS-Gelpuffer (0,75 M Tris, 3,33% SDS in

dH<sub>2</sub>O, pH 8,45), Stripping-Puffer (2 M Glycin, 0,1% SDS, 1,0% Tween-20 in dH<sub>2</sub>O, pH 2,2), 10X TAE-Puffer (0,5 M EDTA, 0,4 M Tris, 1,142% Essigsäure in dH<sub>2</sub>O, pH 8,0), 10X TBS (0,075 M Tris, 0,4 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl in dH<sub>2</sub>O) und TBST-Waschpuffer (0,05% Tween-20 in 1X TBS).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Zelllinien und Kultivierung**

MKN28 wurde von der Japan Health Science Foundation (Osaka, Japan) bezogen. Diese Zelllinie entspricht einem moderat differenzierten tubulären Magenadenokarzinom und besitzt eine Verdoppelungszeit von 32 Std.<sup>204</sup>.

MKN45 wurde von der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen. Diese Zelllinie entspricht einem schlecht differenzierten Adenokarzinom des Magens und besitzt eine Verdoppelungszeit von 26 Std.<sup>204</sup>. Die Zellen wuchsen halbaderent.

AGS wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen. Diese Zelllinie entspricht einem Adenokarzinom des Magens und besitzt eine Verdoppelungszeit von 20 Std.

NCI-N87 wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen. Diese Zelllinie wurde 1976 aus der Lebermetastase eines gut differenzierten Magenkarzinoms eines männlichen Patienten isoliert und besitzt eine Verdoppelungszeit von 47 Std.<sup>169</sup>.

Die untersuchten Zelllinien wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bei 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>-haltiger Atmosphäre kultiviert. Für MKN28, AGS und NCI-N87 wurde RPMI-Medium mit 10% FCS, für MKN45 RPMI-Medium mit 20% FCS verwendet. Mediumwechsel erfolgte alle 48 Std. Zellkulturassays, Zelllyse zur Proteinanalyse und RNA-Extraktion wurden durchgeführt, sobald die Zellen in Einzelzellschicht auf dem Boden der Zellkulturflasche größtmögliche Konfluenz zeigten: MKN28 und MKN45 ca. 90%, AGS 100% und N87 70%. Zum Passagieren der Zellen wurden diese zuerst mit 10 ml PBS dreimal gespült, anschließend mit 5 ml Trypsin maximal 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 37 °C warmem Medium beendet. Konnte ein vollständiges Ablösen der Zellen mithilfe des Trypsins nicht erreicht werden, wurden

noch adherente Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig vom Flaschenboden gelöst und die gesamten Zellen in einem 50 ml Tube pelletiert (1000 U/Minute, 5 Minuten). Um die Kultur fortzuführen, wurde das durch Zentrifugation entstandene Pellet in 5 ml 37 °C warmem frischem Medium resuspendiert und nach Messen der Zellzahl eine Menge von  $1 \times 10^6$  Zellen in die neue Flasche eingefüllt.

### **2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Konservierung der Zellen bei -80 °C erfolgte nach Zellzählung durch Aliquotierung der jeweiligen Zellsuspension in 1000 µl Medium ( $1 \times 10^6$  Zellen, 10% DMSO). Die Inkulturnahme der Zellen erfolgte durch Auftauen eines Aliquots bei 37 °C und Überführung der Suspension in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 10 ml des jeweiligen Mediums. Nach Anwachsen der ersten Zellen erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach vollständiger Konfluenz durch Ernte mit Trypsin in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt.

### **2.2.1.3 Zellkulturexperimente**

Für die Zellkulturexperimente erfolgte die Aussaat gleicher Zellzahlen in 10 cm-Zellkulturschalen. Nach Erreichen größtmöglicher Konfluenz erfolgte zunächst eine 24-stündige Inkubation der Zellen in FCS freiem Medium. Unmittelbar vor Experimentbeginn wurde jede Schale dreimal mit 4 ml PBS gespült. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Zugabe des jeweiligen Stimulans in 5 ml PBS mit 0,1% DMSO. Die Zugabe von EGF erfolgte in den Konzentrationen 25, 50, 100 und 200 ng/ml für 5 Minuten. Für eine Konzentration von 100 ng/ml erfolgte eine Stimulation für 2,5, 5, 8 und 10 Minuten. Angiotensin II wurde in den Konzentrationen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  M für 8 Minuten eingesetzt. Bei gleicher Angiotensin II-Konzentration (MKN45:  $10^{-7}$  M, MKN28:  $10^{-8}$  M, AGS:  $10^{-7}$  M, N87:  $10^{-6}$  M) erfolgte eine Stimulation für 0, 2,5, 5, 8, 10, 15, 20 und 30 Minuten. Die Vorinkubation mit den Angiotensinrezeptorantagonisten Olmesartan und PD123,319 erfolgte für 45 Minuten, mit dem EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 für 30 Minuten. Die anschließende Zugabe von 100 ng/ml EGF bzw. Angiotensin II in entsprechender Konzentration erfolgte in die den Inhibitor enthaltende Lösung für 5 Minuten (EGF für alle Zelllinien,  $10^{-6}$  M Angiotensin II für N87) bzw. 8 Minuten ( $10^{-7}$  M Angiotensin II für MKN45 und AGS,  $10^{-8}$  M für MKN28). Die Stimulation wurde durch dreimaliges Spülen mit und gründliches Entfernen von eiskaltem PBS beendet.

## **2.2.2 Analyse der EGF-Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene**

### **2.2.2.1 RNA-Extraktion aus Magenkarzinomzelllinien**

Für die Extraktion von RNA aus den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und NCI-N87 wurde der NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II-Kit nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Dazu wurden die Zellen nach der Ernte und Bestimmung der Zellzahl pelletiert. Um die Ausbeute bei gleichzeitig hoher Extraktionsqualität durch den Kit möglichst hoch zu halten, wurden  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen wie folgt verarbeitet: Lysierung des Pellets durch Zugabe von 350  $\mu$ l RA1-Puffer und 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol, Homogenisierung des Lysates mit einer 20 G-Nadel, Filtration des Lysates durch einen mitgelieferten Filter (violetter Ring) und Zentrifugation bei 11000Xg für 1 Minute. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350  $\mu$ l 70-prozentigem Ethanol und das Binden der RNA an eine NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II-Säule (blauer Ring) durch Zentrifugation bei 11000Xg für 30 Sekunden. Es erfolgte das Befreien der RNA von DNA, Membranteilen und anderen festen Bestandteilen durch Entsalzung der Membran mit 350  $\mu$ l Membranentsalzungspuffer und Zentrifugation bei 11000Xg für 1 Minute, DNA-Verdau mit 95  $\mu$ l einer aus 90  $\mu$ l Reaktionspuffer für rDNase und 10  $\mu$ l rDNase hergestellten Lösung und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend erfolgten die erste Waschung der Membran mit 200  $\mu$ l RA2-Puffer und 11000Xg für 30 Sekunden, die zweite Waschung mit 600  $\mu$ l RA3-Puffer und 11000Xg für 30 Sekunden und die dritte Waschung mit 250  $\mu$ l RA3-Puffer und 11000Xg für 2 Minuten. Zuletzt wurde die RNA durch 60  $\mu$ l RNasefreies Wasser bei 11000Xg für 1 Minute eluiert. Alle Schritte wurden auf Eis bzw. in der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge durchgeführt.

### **2.2.2.2 Messung der RNA-Konzentration**

Um zu beurteilen, ob die Extraktion der RNA aus den Zellpellets der Magenkarzinomzellen für die Auswertung mittels RT-PCR geeignet war, wurde die Reinheit der extrahierten RNA im Hinblick auf Verunreinigung mit Proteinen mit Hilfe des Photometers bestimmt.

Dazu wurde die gewonnene RNA 1:40 in RNA-/DNA-/RNasefreiem Wasser verdünnt. Der Leerwert für die Messung bestand aus reinem RNA-/DNA-/RNasefreiem Wasser. Die

Konzentration der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und anhand folgender Formel ermittelt (hier mit Konversionsfaktor = Verdünnungsfaktor = 40):

$$[\text{RNA}] = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} \times \text{Konversionsfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Gleichzeitig wurde die Menge an Verunreinigung durch Proteine mit der Wellenlänge 280 nm gemessen. Die Reinheit der extrahierten RNA war akzeptabel, wenn der Quotient der Absorptionen  $A_{260}/A_{280}$  über 1,40 lag. Das Optimum lag bei 1,80.

Die Qualität der RNA hinsichtlich Verunreinigungen mit DNA wurde mithilfe eines 2 µl-Aliquots in einem 1,5-prozentigen Agarosegel bestimmt. Die reine RNA stellte sich mit zwei Banden bei 18S und 28S dar. Eine Verunreinigung mit DNA oder eine schlechte Qualität der extrahierten RNA ließ sich an zu starkem Hintergrund der Probe bzw. am deutlichen Zurückbleiben von Probenmaterial in der Geltasche erkennen.

### **2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese**

Für die Herstellung eines Agarosegels wurden die Agatabs (0,5 g/Tab) in entsprechender Menge in 100 ml 1X TAE-Puffer quellen gelassen und mit 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt, anschließend in der Mikrowelle stufenweise aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte und letztlich gleichmäßig in eine Gelkammer gegossen. Nach einer Aushärtungszeit des Gels von 30 Minuten, wurde es in eine Gelelektrophoresekammer mit 0,5X TAE Laufpuffer gelegt und mit der jeweils mit 2X Probenpuffer im Verhältnis 1:2 versetzten RNA-Probe bzw. dem PCR-Produkt beladen (100 V (konst), 30 Minuten, Raumtemperatur). Die ethidiumbromidgefärbten Nukleinsäurebanden wurden über UV-Licht in der G-Box fotografiert und ausgewertet.

### **2.2.2.4 Umschreibung der RNA in cDNA**

Das Umschreiben der RNA in einzelsträngige cDNA erfolgte mit dem Omiscript RT Kit. Für das Vorliegen der cDNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde 1 µg der RNA in einem Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt, anschließend 5 Minuten bei 63 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die 15 µl mit 10 µl Mastermix (2,5 µl 10X RT-Puffer, 2,5 µl dNTP-Mix, 0,3125 µl Oligo-(dT)-Primer, 0,3125 µl RNaseinhibitor, 1,25 µl Omiscript Reverse Transkriptase, 3,125 µl RNasefreies Wasser) versetzt (Endkonzentrationen der Bestandteile: 1X RT-Puffer, 0,5 mM je dNTP, 1 µM Oligo-(dT)-Primer, 0,16 Units/µl RNaseinhibitor, 0,25 Units/µl Omiscript Reverse Transkriptase), 1 Std. bei 37 °C inkubiert, danach 5 Minuten bei 93 °C inkubiert, abschließend auf Eis abgekühlt und bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.2.5 Qualitative RT-PCR**

Die qualitative RT-PCR wurde mit dem Taq PCR Core Kit auf dem PCR SPRINT Thermal Cycler nach Herstellerangaben durchgeführt. Für ein Gesamtvolumen je Probe von 20 µl wurden 2,0 µl der cDNA mit 4,5 µl Mastermix (2 µl 10 x CoralLoad PCR Puffer (enthält 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,4 µl dNTP-Mix (0,2 mM je dNTP), je 1,0 µl Primer, 0,1 µl Taq DNA Polymerase) und 13,5 µl RNasefreiem Wasser versetzt (Endkonzentrationen der Bestandteile: 1X CoralLoad PCR Puffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM je dNTP, 0,5 µM je Primer, 0,5 Units Taq DNA Polymerase).

Der Thermal Cycler durchlief folgendes Programm (nach Sayed-Ahmad et al.<sup>189</sup>): Initialdenaturierung (94 °C, 5 Minuten), Denaturierung (94 °C, 30 Sekunden), 5X Annealing (60 °C, 45 Sekunden), DNA-Synthese (72 °C, 45 Sekunden), Denaturierung (94 °C, 30 Sekunden), 25X Annealing (55 °C, 45 Sekunden), DNA-Synthese (72 °C, 45 Sekunden), finale Extension (72 °C, 5 Minuten) und Abkühlung auf 4 °C.

Das Produkt der RT-PCR wurde mit einem zweiprozentigen Agarosegel gegen den Größenstandard SmartLadder überprüft. Für eine Sicherung des Produktes erfolgte einmalig eine Sequenzierung durch die Firma Invitek GmbH (Robert-Rössle-Str.10, 13125 Berlin-Buch).

## **2.2.3 Proteinbiochemie**

### **2.2.3.1 Proteinextraktion**

Die Proteinextraktion aus den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und NCI-N87 wurde im Anschluss an dreimaliges Spülen mit eiskalten, jeweils frischen PBS<sup>\*</sup> durchgeführt. Das Lysieren der Zellen erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Zellysepuffers, der kurz vor der Anwendung 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O und 1 mM PMSF versetzt wurde. Eine ausreichende Puffermenge, um die Zellschicht zu bedecken, war bei in Zellkulturflaschen gewachsenen Zellen 800 µl, bei in Zellkulturschalen gewachsenen Zellen 350 µl. Nach der Inkubation (15 Minuten, 4 °C) wurde das Lysat in ein 2,0 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt und durch zehnmaliges Durchziehen durch eine 20 G-Nadel die Lysierung verfeinert. Im Anschluss an eine Zentrifugation (10000Xg, 10 Minuten) wurde der Überstand in ein neues 2,0 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt und eine Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. in auf 4 °C gekühlter Umgebung durchgeführt.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

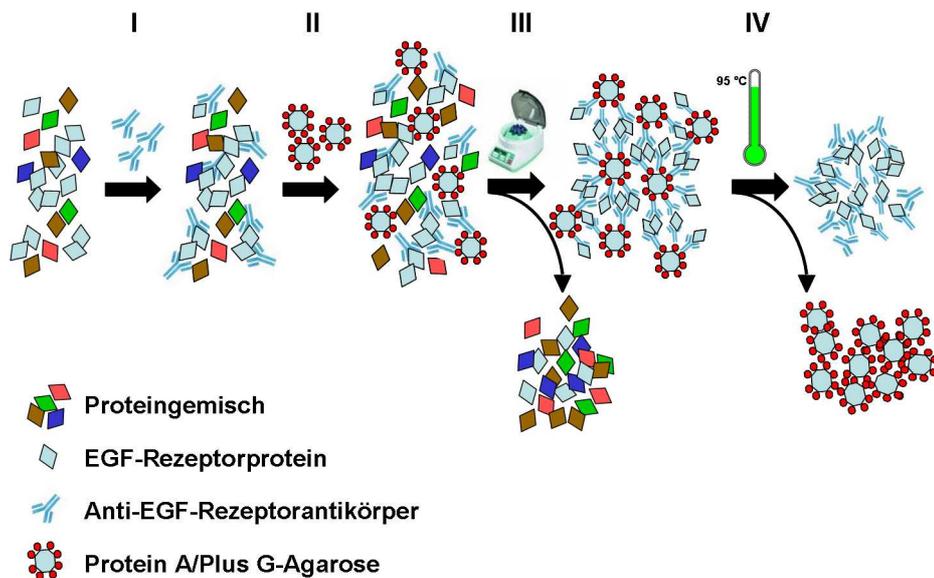
Die Proteinbestimmung aus den Zelllysaten folgte der Methode von Lowry<sup>130</sup>. Hierzu wurde der kommerziell erhältliche D<sub>c</sub> Protein Assay Kit wie folgt verwendet: 5 µl eines aus BSA hergestellten Proteinstandards mit den Konzentrationen 0,00, 0,25, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00, 3,00 und 4,00 mg/ml, sowie 5 µl der Zelllysate wurden als Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte mit rundem Boden gegeben. 1000 µl Reagenz A wurden mit 20 µl Reagenz S versetzt und je 25 µl dieser Mischung zu den Proteinproben gegeben. Abschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Reagenz B gegeben. Die Platte inkubierte 15 Minuten auf dem Rüttler. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Mikroplattenphotometer bestimmt. Gemessen wurde gegen den Proteinstandard (Messwellenlänge: 630 nm; Referenzwellenlänge: 450 nm). Nach der Proteinbestimmung erfolgte die Weiterbearbeitung des Lysates in der Immunpräzipitation oder eine Aliquotierung der Lysate in 50 µg-Aliquote zur Analyse des Gesamtproteins. Die Aliquote wurden bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.3 Immunpräzipitation

Für die Untersuchung der Transaktivierung des EGF-Rezeptors wurde die Methode der Immunpräzipitation (IP) etabliert. Zum besseren Verständnis der im Ergebnisteil in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Etablierungsschritte, wird hier kurz auf die Theorie der IP eingegangen. Die IP wurde hier eingesetzt, um aus den heterogenen Zelllysaten, das EGF-Rezeptorprotein abzutrennen und gezielt zu analysieren<sup>91</sup>. Eine schematische Darstellung dazu zeigt Abbildung 3.

Der Arbeitsablauf der IP gestaltete sich, entsprechend der zugrunde liegenden Theorie, folgendermaßen: Die Abtrennung des zu analysierenden EGF-Rezeptorproteins erfolgte mithilfe der Bindung an einen spezifischen Antikörper (siehe Abbildung 3, I und Kapitel 3.1.4.2). Für diese Bindung war die Stöchiometrie zwischen Antigen und Antikörper zu beachten, die durch eine Verdünnung des Zelllysates mit PBS verändert werden konnte (siehe Kapitel 3.1.4.3). Die Zugabe von Protein G gekoppelter Agarose in die Suspension (siehe Abbildung 3, II und Kapitel 3.1.4.4) ermöglichte, über die Interaktion des F<sub>c</sub>-Teils der zur Präzipitation eingesetzten Immunglobuline mit dem Protein G, das Abzentrifugieren des zu analysierenden Proteins (siehe Abbildung 3, III und Kapitel 3.1.4.5). Um unspezifische Bindungen der Immunglobuline zu reduzieren, war es möglich, eine Vorreinigung des zu präzipitierenden Lysates vorzunehmen (siehe Kapitel 3.1.4.2). Dazu wurde zunächst nur Protein A/Plus G-Agarose zu dem Lysat gegeben. Nach einer

gewissen Inkubationszeit wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand wie oben beschrieben mit Immunglobulinen versetzt. Abschließend erfolgt das dreimalige Spülen mit PBS zur Reinigung des Präzipitates. Das zu analysierende Protein wurde aus der Antigen-Antikörper-Protein A/Plus G-Agarose-Bindung freigesetzt, indem die Probe mit Lämmliprobenpuffer versetzt und gekocht wurde (siehe Abbildung 3, IV und Kapitel 3.1.4.6). Die Analyse des präzipitierten Proteins erfolgte nach SDS-PAGE, WB, Immunfärbung und Chemolumineszenz.



**Abb. 3: Schema der EGF-Rezeptorimmunpräzipitation**

In das heterogene Proteinlysate wird der spezifische polyklonale Antikörper (I) und Protein A/Plus G-Agarose (Aga) (II) hinzugegeben. Die Bindung des Antikörpers an das EGF-Rezeptorprotein und die Bindung der Aga an den Antikörper ermöglicht durch Spülen mit PBS und Zentrifugation (III) die Abtrennung des EGF-Rezeptors. Durch Zugabe von Lämmliprobenpuffer und das Erhitzen der Suspension auf 95 °C werden Aga und EGF-Rezeptorprotein getrennt (IV). Danach kann das EGF-Rezeptorprotein im WB untersucht werden.

Bei dem hier dargestellten Protokoll handelt es sich um die Endfassung der Methode: Im Anschluss an Zellkulturassays, Proteinextraktion und Proteinbestimmung wurden 1000 µg Proteinlysate eingesetzt, um daraus den EGF-Rezeptor zu präzipitieren. Dazu wurde zu dem entsprechenden Lysatvolumen der polyklonale anti-human EGF-Rezeptorantikörper 1005 in einer Verdünnung von 1:20 gegeben. Nach Inkubation auf dem Rotator (4 °C, 2 Std.) wurde eine dem zweifachen des Antikörpervolumens entsprechende Menge Protein A/Plus G-Agarose hinzugegeben und auf dem Rotator inkubiert (4 °C, über Nacht). Am Folgetag erfolgte die Abtrennung des Präzipitates durch Zentrifugation (3000 U/Minute, 4 °C, 30 Sek.) und Spülung mit eiskaltem PBS (dreimal, je 1000 µl). Der

erste Überstand wurde zum Teil für Analysezwecke aufbewahrt. Nach der dritten Spülung wurde das Präzipitat mit 41 µl kommerziell erworbenem 2X Lämmliprobenpuffer versetzt und gekocht (95 °C, 10 Minuten). Anschließend wurden 40 µl des Präzipitats in ein neues 0,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt. Nach Durchmischung der Probe mithilfe der Pipette wurden je 18,5 µl in 2 Gelen gleichzeitig durch SDS-PAGE, Western Blot, Immunfärbung und Chemolumineszenz analysiert. Einige der Gele wurden nach dem Western Blot coomassiegefärbt und konserviert.

#### 2.2.3.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

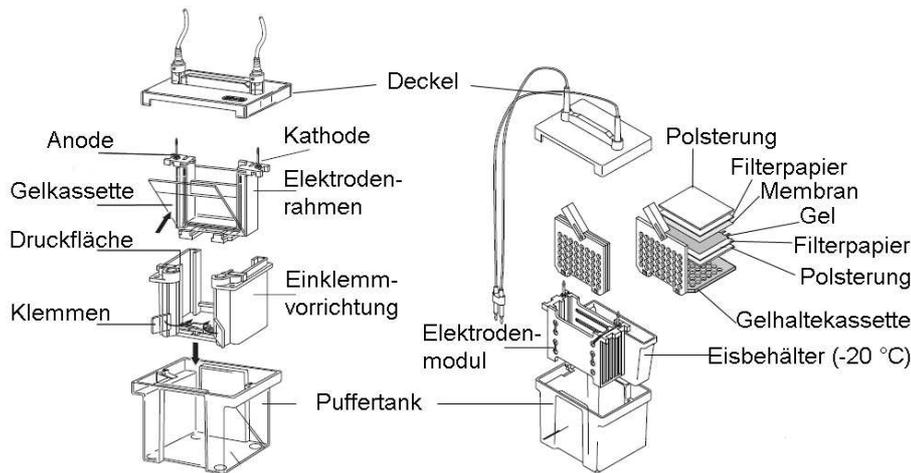
Tabelle 3 zeigt die Gelzusammensetzungen bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen für jeweils ein Gesamtvolumen von 12 ml, das für 2 Gele der Dicke 0,75 mm ausreichte.

**Tabelle 3: Acrylamidgele verschiedener Konzentrationen, Gesamtvolumen jeweils 12 ml.**

<b>Zusatzstoff</b>	<b>Sammelgel, 4%</b>	<b>Trenngel, 6%</b>	<b>Trenngel, 8%</b>	<b>Trenngel, 10%</b>	<b>Trenngel, 16,5%</b>
40% Acrylamid	1,2 ml	1,8 ml	2,4 ml	3 ml	4,95 ml
SDS-Gelpuffer	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Glycerol	-	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
dH <sub>2</sub> O	6,8 ml	4,2 ml	3,6 ml	3 ml	1,05 ml
10% APS	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl	120 µl
Temed	9 µl	8 µl	7 µl	6 µl	3 µl

Für die Denaturierende Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein Gel der Stärke 0,75 mm verwendet, das sich aus einem vierprozentigen Sammelgel und einem zehnprozentigen Laufgel zusammensetzte. Zum Teil wurden auch Laufgele von 6%, 8% und 10 bis 16,5% (nach Schägger et al.<sup>191</sup>) mit dem vierprozentigen Sammelgel kombiniert.

Die Proteinproben wurden 1:2 mit kommerziell erworbenem 2X Lämmliprobenpuffer versetzt und gekocht (95 °C, 10 Minuten). Nach dem Beladen der Geltaschen mit jeweils 50 µg Protein wurde die Elektrophoresekammer bis an die Oberkante der Gele mit 1X Elektrophoresepuffer befüllt. Die Zusammensetzung der Kammer erfolgte analog zu Abbildung 4. Bei jeweils konstanter Spannung wurden verschiedene Laufzeiten ausprobiert, bis das Endprotokoll etabliert war (100 V (konst) 45 Minuten; 180 V (konst) 100 Minuten).



**Abb. 4: Zusammensetzung der Elektrophoresekammer für SDS-PAGE & Western Blot**

Die Abbildung wurde adaptiert nach den Bedienungsanleitungen des Mini-Protean3 SDS-PAGE-Systems und des Trans-Blot-Systems (Bio-Rad Laboratories, München).

### 2.2.3.5 Western Blot

Der Western Blot wurde nach der Tank-Blot-Methode durchgeführt. Um die Proteine nach der Immunfärbung in sichtbarem Licht darstellen zu können, wurde eine PVDF-Membran verwendet, welche zur Aktivierung für einige Sekunden in Methanol gespült wurde. Die für die Chemolumineszenz verwendete NC-Membran wurde einige Sekunden in ddH<sub>2</sub>O gespült, bevor die zum Blotten verwendeten Filter, Papierfilter, die jeweilige Membran und das die Proteine enthaltende SDS-Gel zur Äquilibration für 10 bis 30 Minuten bei 4 °C in Blottingpuffer eingelegt wurden. Zum Blotten mit dem Mini Trans-Blot-System wurden die Bestandteile wie auf Abbildung 4 zusammengefügt. Geblottet wurde bei 4 °C und 100 V (konst) für 70 Minuten. Anschließend wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht in Blockierungslösung inkubiert.

### 2.2.3.6 Coomassiebrilliantblaufärbung

Nach abgelaufener Elektrophorese wurde das SDS-Gel über Nacht auf einem Schwenker bei Raumtemperatur unter einem Abzug mit Coomassiefärbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte unter stündlichem Wechsel der Entfärbelösung über einen Zeitraum von 5 Stunden. Zur Konservierung des coomassiegefärbten SDS-Gels wurde dieses mit Hilfe des DryEase™ Gel Drying Systems getrocknet. Dazu wurde das Gel mithilfe des Geltrockenpuffers zwischen zwei Cellophanfolien in einen Halterahmen gespannt.

### **2.2.3.7 Immunfärbung**

Für die Immunfärbung der Membranen wurde der Primärantikörper in Blockierungslösung in entsprechender Konzentration verdünnt. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde in TBST-Waschpuffer verdünnt. Mit den Antikörperlösungen inkubierte die Membran jeweils lichtgeschützt 1 Stunde bei Raumtemperatur (18 bis 20 °C). Zuletzt erfolgte das Auftragen des jeweiligen Farbstoffes. Vor jedem dieser Schritte wurde die Membran dreimal 10 Minuten in TBST gespült.

Für die Färbung der PVDF-Membran mit dem sich im sichtbaren Lichtspektrum darstellenden Chromogen NBT/BCIP, wurde der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper gewählt. Das Chromogen inkubierte für maximal 7 Minuten, die Farbreaktion wurde durch kurzes Spülen der Membran in dH<sub>2</sub>O beendet.

Für die Färbung der NC-Membran mit Chemolumineszenz (ECL) wurde der mit Meerrettichperoxidase gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Der biotinylierte Molekulargewichtsmarker wurde getrennt von den Proteinen mit der Streptavidin-Peroxidase (1:30000 in PBS mit 0,1% BSA) inkubiert. Die Darstellung der Protein- und Markerbanden erfolgte durch Inkubation mit dem Chemolumineszenzreagenz SuperSignal<sup>®</sup> West Pico in der Dunkelkammer der G-Box. Nach Inkubationszeiten von 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 Minuten wurde die Membran, unterstützt durch die GeneSnap-Software, digital fotografiert. Die anschließende Quantifizierung der Bilder erfolgte mit der GeneTools-Software.

### **2.2.3.8 Antikörperentfernung von der NC-Membran**

Die NC-Membran wurde 90 Minuten mit dem Strippingpuffer auf dem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reste des Puffers durch Spülung mit dH<sub>2</sub>O entfernt und die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungslösung blockiert. Am Folgetag wurde eine erneute Immunfärbung und ECL durchgeführt.

## 2.2.4 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der ECL-Aufnahmen wurden die Bilder mithilfe der GeneTools-Software analysiert und in Excel verarbeitet.

### 2.2.4.1 Bildanalyse

Die Analyse der ECL-Aufnahmen erfolgte mit der GeneTools-Software. Zunächst wurden die mithilfe der GeneSnap-Software aufgenommenen Bilder in GeneSnap auf Übersättigung geprüft. Anschließend wurden die Aufnahmen, die gerade noch nicht übersättigt waren, in GeneTools vermessen. Die Vermessung der durch den 4G10-Antikörper und durch den 13G8-Antikörper erzeugten ECL-Aufnahmen erfolgte für MKN28 und MKN45 an jeweils gleichen Belichtungszeiten. Für N87 und AGS wurden die gerade noch unübersättigten 4G10-Aufnahmen mit den 13G8-Aufnahmen nach 50 Minuten verglichen. Die Messung der Intensität der Lichtbanden erfolgte mit der „Rolling Disk“-Einstellung für die Basislinie. Der Radius wurde für alle Messungen auf 30 Pixel festgelegt. Das Programm erzeugte Dezimalzahlen, die von ihm als „Raw Volume“ bezeichnet wurden.

### 2.2.4.2 Auswertung der Daten

Die Auswertung der „Raw Volume“ erfolgte in Excel. Die Daten aus der 4G10-Aufnahme und der 13G8-Aufnahme wurden für jeden Messtag und jede Proteinbande durch Division normiert (siehe Formel (1) in Kapitel 3.1.6). Für die Zeitverlauf-Experimente mit Angiotensin II erfolgte eine zusätzliche Normierung aller Zeitpunkte eines Messtages auf den Zeitpunkt 2,5 Minuten (siehe Formel (4) in Kapitel 3.1.6), die Experimente mit EGF wurden analog auf den Zeitpunkt 0,5 Minuten normiert. Die Darstellung der Experimente erfolgte unter Beachtung aller Messtage durch die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile enthaltende Boxplots. Die Signifikanztestung erfolgte durch den Wilcoxon-Test.

## **Kapitel 3 Ergebnis und Diskussion I:**

### **Etablierung der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden**

---

### **3.1 Ergebnisse**

#### **3.1.1 Etablierung des EGF-Rezeptor mRNA-Nachweises**

Die Primerauswahl für den molekularbiologischen Nachweis des EGF-Rezeptors erfolgte auf der Grundlage einer Literaturrecherche. Die Primer, sowie das Protokoll der RT-PCR, wurden aus der Literatur<sup>189</sup> übernommen. Die Auswahl erfolgte hinsichtlich zweierlei Gesichtspunkten: Das PCR-Produkt sollte eine sicher nachweisbare Größe besitzen (hier: 473 bp) und zudem exonüberspannend sein (hier: Exon 4 bis Exon 8).

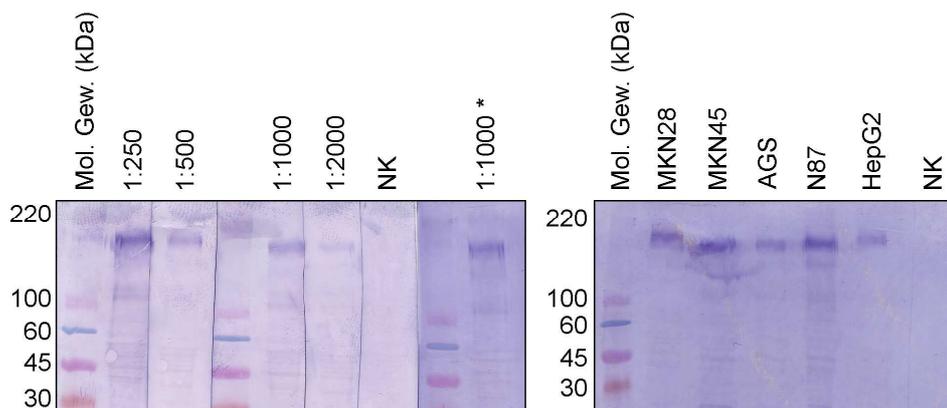
#### **3.1.2 Etablierung des EGF-Rezeptorproteinnachweises**

Das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte SDS-PAGE-Protokoll verwendete ein sogenanntes Schägger-Gel<sup>191</sup>, welches aus einem vierprozentigen Sammelgel und einem zweischichtigen (10%/16,5%) Trenngel besteht (150 V 30 Min, 170 V 120 Min). Dies führte nicht zu einer zufriedenstellenden Darstellung des EGF-Rezeptorproteins. Zunächst erfolgte eine Umstellung von angelegter Spannung und Dauer (150 V 30 Min + 140 V 180 Min/130 V 180 Min vs. 100 V 45 Min + 130 V 200 Min/ 140 V 180 Min/150 V 180 Min/160 V 180 Min) ohne nennenswerte Besserung des Ergebnisses. Das Ausprobieren unterschiedlicher Gelzusammensetzungen (Sammelgel 4%/Trenngel 10% bzw. 4%/8% und 4%/6%) in Kombination mit Veränderungen der angelegten Spannung und der Gellaufzeit führten schließlich zu einer zufriedenstellend scharfen Darstellung der EGF-Rezeptorbanden nach SDS-PAGE in einem 4%/10% Gel (100 V 45 Min, 180 V 100 Min).

### 3.1.3 Etablierung der Immunfärbungen

#### 3.1.3.1 Etablierung der EGF-Rezeptorimmunfärbung mit einfachen Chromogenen

Die Etablierung der EGF-Rezeptorimmunfärbung erfolgte auf einer PVDF-Membran und mit dem im sichtbaren Licht darstellbaren Chromogen NBT/BCIP. Verwendung fand zuerst der polyklonale Anti-EGF-Rezeptorantikörper der Firma Cell Signaling (siehe Abbildung 5). Den Empfehlungen des Herstellers folgend wurde der Antikörper in der Blockierungslösung der Membran verdünnt. Zunächst wurde eine Verdünnung von 1:1000 in 5% Milchpulverlösung mit 0,1% Tween-20 und eine Inkubation von 1 Std. bei Raumtemperatur gewählt. Bis zu einem zufriedenstellenden Ergebnis erfolgte die Optimierung von Blockierungslösungen (3% und 5% BSA bzw. 3% und 5% Milchpulver in 1X TBS, jeweils mit und ohne Zugabe von 0,1% Tween-20), Antikörperinkubationsbedingungen (1 Std. bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C), Primärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:500, 1:250) und Verdünnungen des AP gekoppelten Sekundärantikörpers (1:1000, 1:500). Das beste Ergebnis auf der PVDF-Membran wurde nach einer Blockierung mit 5% Milchpulver in 1X TBS mit 0,1% Tween-20 bei 4 °C über Nacht erzielt. Die anschließende Immunfärbung erfolgte mit der Kombination Primärantikörperverdünnung 1:1000, Sekundärantikörperverdünnung 1:1000 und jeweils 1 Std. Inkubation bei Raumtemperatur.

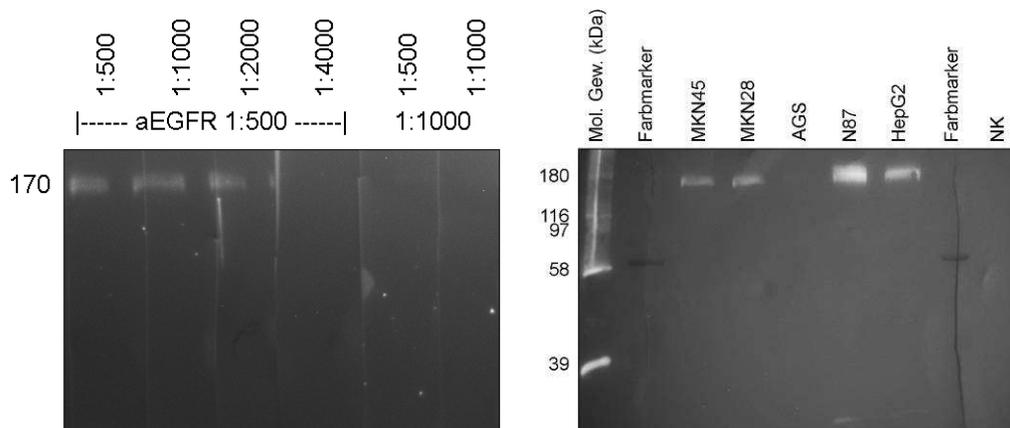


**Abb. 5: Chromogene Immunfärbung mit dem Antikörper von Cell Signaling.**

Die Färbungen erfolgten auf PVDF-Membran mit einer Sekundärantikörperverdünnung von 1:1000 in 1X TBST. **Links:** Die Etablierung der Primärantikörperverdünnung in den angegebenen Konzentrationen an 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie MKN45. Die Inkubation erfolgte in 5% Milchpulver in 1X TBS über 1 Std. bei Raumtemperatur. Die mit (\*) gekennzeichnete Färbung inkubierte über Nacht bei 4 °C. **Rechts:** Immunfärbung von 50 µg Gesamtprotein aller Zelllinien (HepG2 diente als Positivkontrolle) mit einer Primärantikörperverdünnung von 1:1000 in 5% Milchpulver in 1X TBS über 1 Std. bei RT.

### 3.1.3.2 Etablierung der Immunfärbung mit Chemolumineszenz

Für die Etablierung der ECL wurde der Antikörper von Cell Signalling nach dem Western Blot auf einer NC-Membran in Verbindung mit einem HRP gekoppelten Sekundärantikörper eingesetzt. Nachdem die Übernahme des Protokolls der Immunfärbung laut 3.1.3.1 ein nicht zufriedenstellendes Bild erzeugte, wurden auch in diesem Fall für die Immunfärbung verschiedene Kombinationen von Blockierungslösungen, Primär- (1:100, 1:500, 1:1000) und Sekundärantikörperverdünnungen (1:40000, 1:20000, 1:10000, 1:5000, 1:2000, 1:1000, 1:500, 1:250) überprüft. Die Erfolgskontrolle erfolgte über Bildaufnahmen nach verschiedenen Belichtungszeiten. Unter optimalen Bedingungen (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:500, Sekundärantikörper 1:500, Inkubationszeit je 1 Std.) zeigten sich nach 10 Minuten Belichtungszeit gut sichtbare Banden (siehe Abbildung 6).

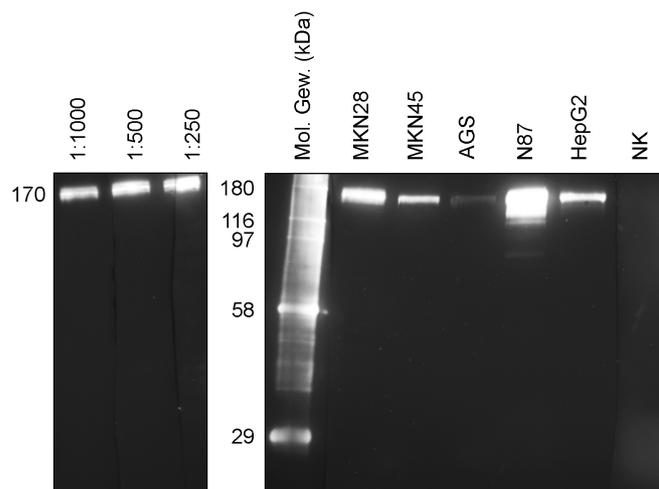


**Abb. 6: ECL-Immunfärbung mit dem Antikörper der Firma Cell Signaling.**

Dargestellt sind die Aufnahmen nach 50 Minuten Belichtungszeit. **Links:** Die Etablierung der Primär- und Sekundärantikörperverdünnung in den angegebenen Konzentrationen an 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie MKN45. **Rechts:** Primärantikörperverdünnung 1:500 in 3% BSA und 1X TBS, Sekundärantikörperverdünnung 1:500 in 1X TBS mit 0,1% Tween-20. 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dienen als Positivkontrolle.

### 3.1.3.3 Etablierung der EGF-Rezeptorimmunfärbung mit dem polyklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005

Im Laufe der Optimierungsversuche der Immunpräzipitation wurde vermutet, dass der Anti-EGF-Rezeptorantikörper von Cell Signalling nur eine schwache Antigenbindung aufweist. Daraufhin wurde ein anderer Antikörper von der Firma Santa Cruz bezogen und zunächst in der Immunfärbung etabliert. Die Optimierung der Färbung mit dem polyklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005 erfolgte nach SDS-PAGE von je 50 µg Protein aus Gesamtzelllysaten und Western Blot, gefolgt von ECL. Die Optimierung der Blockierungslösungen (3% Milchpulver/3% BSA in 1X TBS) und der Primärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:500, 1:250) erfolgte jeweils in Kombination mit verschiedenen Sekundärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:500). Unter optimalen Bedingungen (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:1000, Sekundärantikörper 1:1000, Inkubationszeit je 1 Std.) zeigten sich nach 10 Minuten Belichtungszeit gut sichtbare Banden (siehe Abbildung 7).

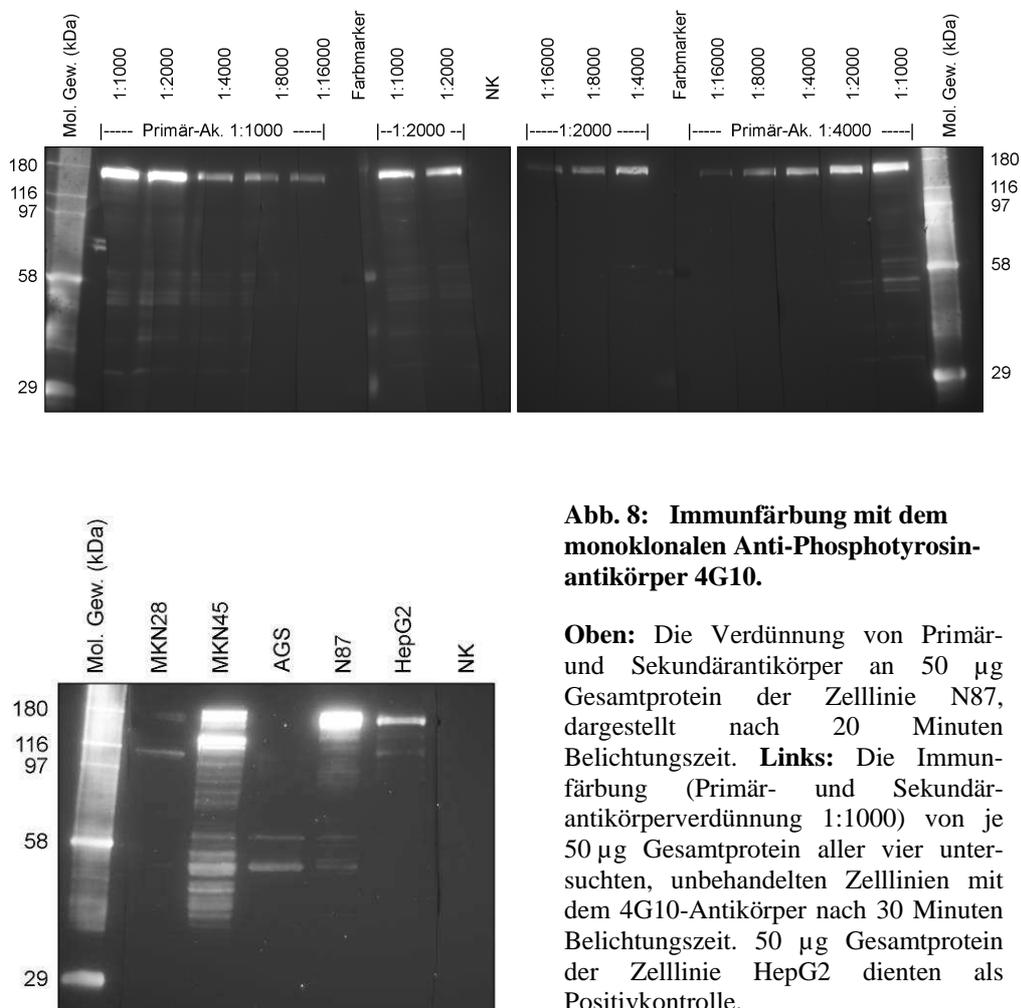


**Abb. 7: Immunfärbung mit dem polyklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005.**

**Links:** Die Primärantikörperaustestung in den angegebenen Verdünnungen an 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie MKN28 nach 20 Minuten Belichtungszeit. Sekundärantikörperverdünnung 1:500. **Rechts:** Die Immunfärbung (Primär- und Sekundärantikörperverdünnung 1:1000) von je 50 µg Gesamtprotein aller vier untersuchten Zelllinien nach 40 Minuten Belichtungszeit. 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dienen als Positivkontrolle.

### 3.1.3.4 Etablierung der Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10

Die Etablierung des Anti-Phosphotyrosinantikörpers 4G10 erfolgte mit ECL nach SDS-PAGE von je 50 µg Protein aus Gesamtzelllysaten und Western Blot. Es erfolgte die Optimierung der Blockierungslösungen (3% Milchpulver/3% BSA in 1X TBS) und der Primärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:2000, 1:4000) jeweils in Kombination mit verschiedenen Sekundärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000). Unter optimalen Bedingungen (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:2000, Sekundärantikörper 1:2000, Inkubationszeit je 1 Std.) zeigten sich nach 10 Minuten Belichtungszeit gut sichtbare Banden (siehe Abbildung 8).

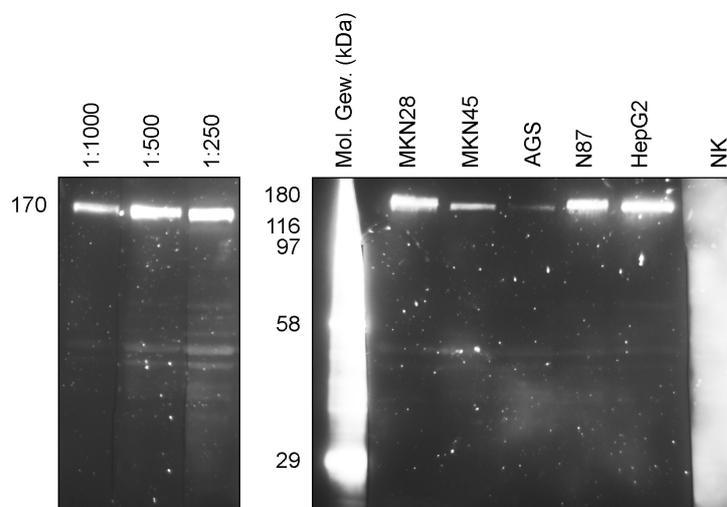


**Abb. 8: Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10.**

**Oben:** Die Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörper an 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie N87, dargestellt nach 20 Minuten Belichtungszeit. **Links:** Die Immunfärbung (Primär- und Sekundärantikörperverdünnung 1:1000) von je 50 µg Gesamtprotein aller vier untersuchten, unbehandelten Zelllinien mit dem 4G10-Antikörper nach 30 Minuten Belichtungszeit. 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dienen als Positivkontrolle.

### 3.1.3.5 Etablierung der EGF-Rezeptorimmunfärbung mit dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8

Die Etablierung des monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörpers 13G8 erfolgte mit ECL nach SDS-PAGE von je 50 µg Protein aus Gesamtzelllysaten und Western Blot. Es erfolgte die Optimierung der Primärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:500, 1:250) und der Sekundärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:500). Unter optimalen Bedingungen (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:1000, Sekundärantikörper 1:1000, Inkubationszeit je 1 Std.) zeigten sich nach 10 Minuten Belichtungszeit gut sichtbare Banden (siehe Abbildung 9).



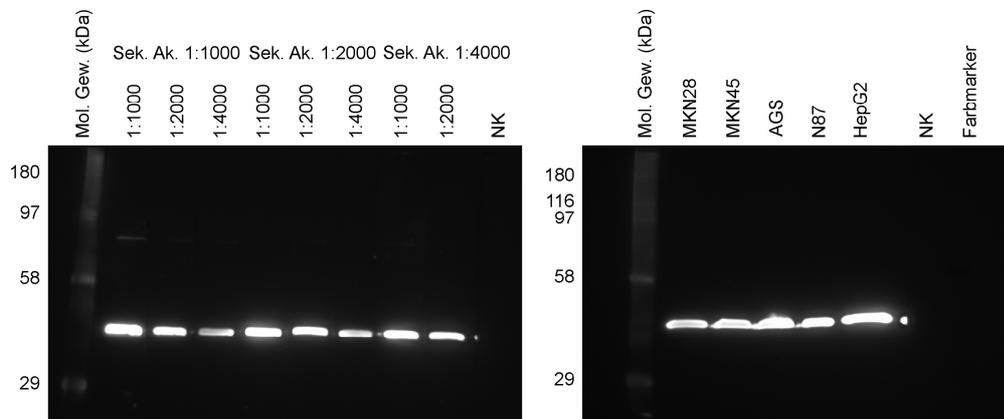
**Abb. 9: Immunfärbung mit dem Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8.**

**Links:** Die Primärantikörperaustestung in den angegebenen Verdünnungen an 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie MKN28 nach 40 Minuten Belichtungszeit. Sekundärantikörperverdünnung 1:500. **Rechts:** Die Immunfärbung (Primär- und Sekundärantikörperverdünnung 1:1000) von je 50 µg Gesamtprotein aller vier untersuchten Zelllinien mit dem 13G8-Antikörper nach 30 Minuten Belichtungszeit. 50 µg Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dienten als Positivkontrolle.

Aufgrund der geringeren EGF-Rezeptorkonzentration nach der Immunpräzipitation, erfolgte während der Etablierung der IP die Optimierung der Immunfärbung mit 13G8 an Western Blots mit dem präzipitierten EGF-Rezeptorprotein. Gut sichtbare Banden nach einer Belichtungszeit von 10 Minuten konnten unter gleichen Bedingungen für MKN45, MKN28 und N87 (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:400, Sekundärantikörper 1:2000, je 1 Std. Inkubationszeit) erreicht werden. Die bereits im Gesamtzelllysat bei AGS aufgefallene geringere EGF-Rezeptorkonzentration erforderte eine stärkere 13G8-Konzentration nach der IP (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:300, Sekundärantikörper 1:2000, je 1 Std. Inkubationszeit).

### 3.1.3.6 Etablierung der Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti- $\beta$ -Aktinantikörper AC-15

Die Etablierung des monoklonalen Anti- $\beta$ -Aktinantikörpers AC-15 erfolgte mit ECL nach SDS-PAGE von je 50  $\mu$ g Protein aus Gesamtzelllysaten, gefolgt von Western Blot. Es erfolgte die Optimierung der Primärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:2000, 1:4000) und der Sekundärantikörperverdünnungen (1:1000, 1:2000, 1:4000). Unter optimalen Bedingungen (Blockierung mit 3% BSA in 1X TBS, Primärantikörper 1:4000, Sekundärantikörper 1:2000, je 1 Std. Inkubationszeit) zeigten sich nach 10 Minuten Belichtungszeit gut sichtbare Banden (siehe Abbildung 10).



**Abb. 10: Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti- $\beta$ -Aktinantikörper AC-15.**

**Links:** Die Verdünnung von Primär- und Sekundärantikörper an 50  $\mu$ g Gesamtprotein der Zelllinie MKN45 nach 10 Minuten Belichtungszeit. **Rechts:** Die Immunfärbung (Primärantikörperverdünnung 1:4000, Sekundärantikörperverdünnung 1:2000) aller vier untersuchten Zelllinien mit dem AC-15-Antikörper nach 10 Minuten Belichtungszeit. 50  $\mu$ g Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dient als Positivkontrolle.

### 3.1.3.7 Etablierung des Strippings der immungefärbten NC-Membranen

Für die spätere Auswertung der Experimente mit der Immunpräzipitation wurde versucht eine Strippingmethode für NC-Membranen zu etablieren. Dafür wurde die Membran zum Entfärben 90 Minuten in dem Strippingpuffer geschwenkt und nach einer erneuten Blockierung, über Nacht bei 4°C, am Folgetag mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern eingefärbt. Ein probeweises Nachfärben der gestrippten Membranen nur mit dem Sekundärantikörper, ließ ein Verbleiben des Primärantikörpers trotz Strippings auf der Membran beobachten. Dem Beispiel von Casalino-Matsuda et al.<sup>38</sup> folgend, wurde daraufhin auf das Membranstripping verzichtet.

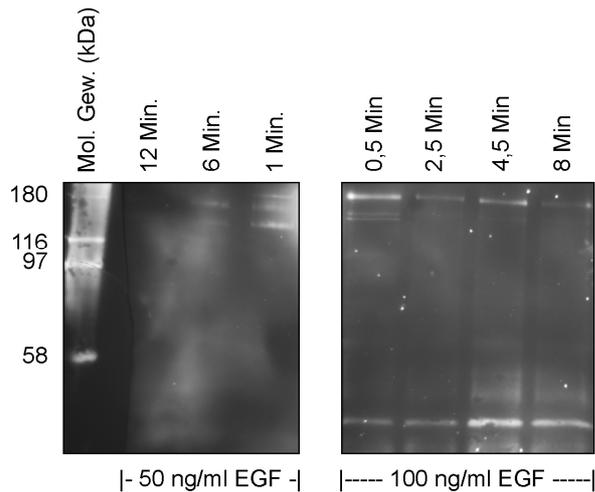
### **3.1.4 Etablierung der EGF-Rezeptorimmunpräzipitation**

Für die Etablierung der IP wurden die Zellen der Zelllinie MKN45 nach einer Literaturrecherche (siehe Anhang) mit EGF für 5 Minuten stimuliert (siehe Kapitel 3.1.4.1). Die daraus resultierende Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde in der Immunfärbung mit dem Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 detektiert und zum Nachweis der Rezeptoraktivierung verwendet. Zur Theorie der Methode siehe Kapitel 2.2.3.3.

Zur Präzipitation des EGF-Rezeptors aus dem Proteinlysate wurde zunächst der polyklonale EGF-Rezeptorantikörper der Firma Cell Signalling nach den Empfehlungen des Herstellers in einer Verdünnung von 1:50 in 200 µl Zelllysate eingesetzt. Um den Verbleib des EGF-Rezeptorproteins nachverfolgen zu können, wurde der vor der ersten Waschung des Präzipitates entnommene Überstand mithilfe von SDS-PAGE, Immunfärbung und Chemolumineszenz analysiert. Die Analyse des Präzipitates führte zunächst zu keinem erfolgreichen Nachweis einer EGF-Rezeptorphosphorylierung. Es erfolgte daraufhin die Erhöhung der zur Zellstimulation eingesetzten EGF-Menge und die Optimierung der zur Präzipitation eingesetzten Antikörper, Zelllysatkonzentration und Protein A/Plus G-Agarosemenge, sowie der Durchführungsbedingungen.

#### **3.1.4.1 Erhöhung der EGF-Konzentration zur Zellstimulation**

Die Literaturrecherche ergab bei einer durchschnittlichen Stimulationszeit von 5 Minuten Konzentrationen von 1 bis 100 ng/ml EGF für die Zellstimulation. Hier wurde zunächst mit einer Konzentration von 10 ng/ml begonnen, die über 20 ng/ml und 30 ng/ml auf 50 ng/ml gesteigert wurde. Bei 50 ng/ml EGF kam es, bei gleichzeitiger Veränderung der übrigen Parameter, zu einem schwachen Signalnachweis. Ein verbesserter Nachweis der EGF-Rezeptorphosphorylierung konnte nach Zellstimulation mit 100 ng/ml EGF erreicht werden (siehe Abbildung 11).



**Abb. 11: Vergleich der zur IP-Etablierung eingesetzten EGF-Konzentrationen.**

Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 in der Verdünnung 1:1000 nach 40 Min. Belichtungszeit. Sekundärantikörper links 1:750, rechts 1:500. Die Stimulierung mit 100 ng/ml EGF führte zu stärker hervortretenden Banden.

### 3.1.4.2 Ermittlung geeigneter Antikörper und Festlegung der eingesetzten Menge

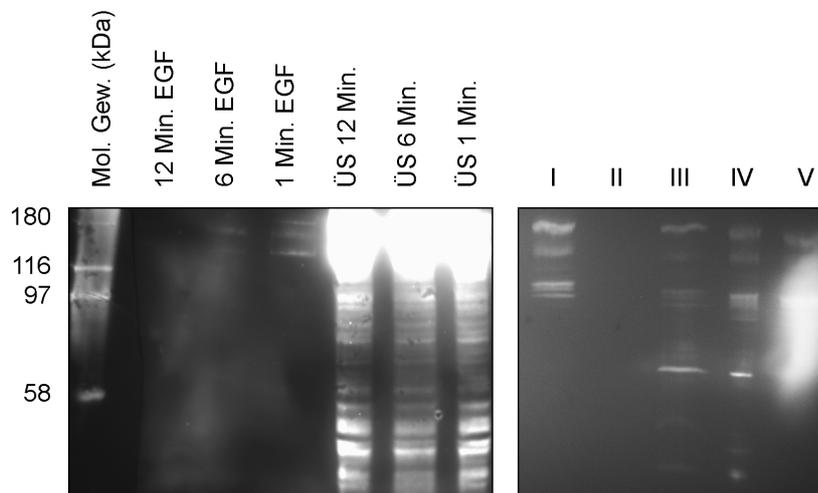
Um das durch die Steigerung der EGF-Konzentration erzielte Ergebnis weiter zu verbessern, wurde die Länge der Antikörperinkubation verändert. Es erfolgte eine Variation der Antikörperinkubationszeiten (1 Std., 2 Std., 3 Std., über Nacht) vor Agarosezugabe, sowie der Inkubationszeiten nach Agarosezugabe (2 Std. nach nächtlicher Antikörperinkubation, über Nacht). Diese Maßnahmen führten nur zu geringgradig verbesserter Relation von EGF-Rezeptorprotein im Präzipitat verglichen mit der zurückbleibenden Menge im Überstand. Eine Vorreinigung des Lysates mit Agarose (90 Minuten Inkubation), sowie die in Kapitel 3.1.4.3 beschriebene Lysatverdünnung mit PBS, zeigten kein verbessertes Ergebnis.

Zur genaueren Ursachenanalyse erfolgte die gestufte Untersuchung eines einzigen Ursprungslysates (siehe Abbildung 12, rechts). Die Analyse der IP ohne Spülung mit PBS (siehe Abbildung 12, III) und des Überstandes (siehe Abbildung 12, IV) zeigten nahezu identische Ergebnisse, während nach der Spülung des Präzipitates (siehe Abbildung. 12, II) kein Signal durch die ECL sichtbar wurde. Letzteres deutete darauf hin, dass kein EGF-Rezeptorprotein in der Probe vorhanden zu sein schien. Es wurde auf eine nicht ausreichend starke Bindung von Antikörper und Epitop geschlossen. Um eine stärkere Bindung von

Antikörper und Epitop zu begünstigen, wurde darauf geachtet, die Proben schonender zu verarbeiten, insbesondere während der Waschschritte.

Um auszuschließen, dass der zum Präzipitieren eingesetzte Antikörper für die schwache Bindung verantwortlich war, erfolgte zudem der Wechsel auf den polyklonalen EGF-Rezeptorantikörper 1005 der Firma Santa Cruz. Die Funktion des Antikörpers wurde zunächst in SDS-PAGE, Western Blot und Chemolumineszenz von Gesamtzelllysaten überprüft (siehe Kapitel 3.1.3.3). Bereits hier deutete sich eine Überlegenheit gegenüber dem Produkt von Cell Signaling an, da der Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 eine starke Detektion des EGF-Rezeptorproteins zuließ (vergleiche dazu Abbildung 6 und Abbildung 7).

Santa Cruz empfahl den Einsatz von 1 bis 2  $\mu\text{g}$  Antikörper für die IP aus 1000  $\mu\text{g}$  Protein. 2  $\mu\text{g}$  entsprachen bei der gelieferten Konzentration einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$ . Um Verbrauch und Kosten für die Methode einzuschränken, wurde zunächst entsprechend dem vorherigen Protokoll eine Verdünnung von 1:50 auf das 1000  $\mu\text{g}$  enthaltende Proteinvolumen eingesetzt. Es ergab sich ein sicher nachweisbares EGF-Rezeptorsignal im Präzipitat, welches jedoch weiterhin stark unter den Verlusten im Überstand lag (siehe Abbildung 12, links).



**Abb. 12: Proteinverluste im Überstand und Untersuchung der IP-Zwischenschritte.**

**Links:** IP mit einer Antikörperverdünnung von 1:50 auf das 1000  $\mu\text{g}$  enthaltende Proteinvolumen. Stimuliert wurde mit 50 ng/ml EGF. Im Vergleich zu dem präzipitierten Proteinen, ist die im Überstand (ÜS) zurückbleibende Menge um ein Vielfaches erhöht.

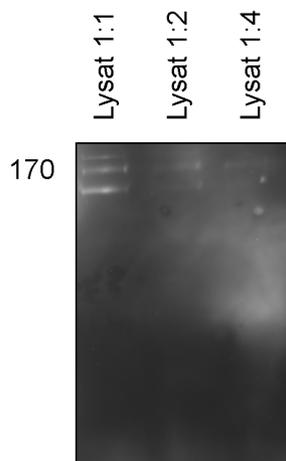
**Rechts:** Innerhalb einer SDS-PAGE wurde unbehandeltes Lysat (V), Lysat nach Antikörperzugabe (I), Lysat nach Antikörper- und Agarosezugabe ohne Spülung mit PBS (III), Lysat nach Antikörper- und Agarosezugabe mit Spülung mit PBS (II) und der Überstand vor der ersten Spülung (IV) miteinander verglichen. Alle Immunfärbungen erfolgten mit dem Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 in der Verdünnung 1:1000, Sekundäantikörper 1:500.

Die in Kapitel 2.2.3.3 und 3.1.4.3 beschriebene Verdünnung des Lysates mit PBS führte auch nicht zu einer gesteigerten Antigenmenge im Präzipitat verglichen mit dem Überstand (siehe Abbildung 13).

Diesem brachte schließlich eine Konzentrationssteigerung des Antikörpers (1:50, 1:40, 1:30, 1:20), präzipitiert mit jeweils dem 2,5- und 4-fachen Agarosevolumen des Antikörpervolumens (siehe Abbildung 14). Eine Antikörperkonzentration von 1:20, bezogen auf das 1000 µg enthaltende Gesamtproteinlysatsvolumen, führte schließlich zu einem wesentlich stärkeren EGF-Rezeptorsignal im Präzipitat, verglichen mit dem EGF-Rezeptorsignal im Überstand.

### 3.1.4.3 Festlegung von eingesetzter Proteinlysatsmenge und Antigenkonzentration

Das Ergebnis der Präzipitation kann auch durch ein Antigenüberangebot verschlechtert sein. Um die Stöchiometrie zwischen Antikörper und Antigen zu verbessern, erfolgte der Versuch der Verdünnung des Proteinlysates mit PBS um den Faktor 1:2 und 1:4<sup>24</sup>. Bei gleichbleibender Antikörpermenge zeigte sich ein eher verschlechtertes Ergebnis mit zunehmender Antigenverdünnung (siehe Abbildung 13). Daraufhin wurde die Etablierung mit unverdünntem Proteinlysate fortgesetzt.



**Abb. 13: Verdünnung des Proteinlysates mit PBS zur Ermittlung geeigneter Antigenmengen.**

Verdünnung des zur IP eingesetzten Proteinlysates mit PBS in den angegebenen Konzentrationen. Die Immunfärbung erfolgte mit dem Anti-Phosphotyrosin-antikörper 4G10 in der Verdünnung 1:1000, Sekundärantikörper 1:500.

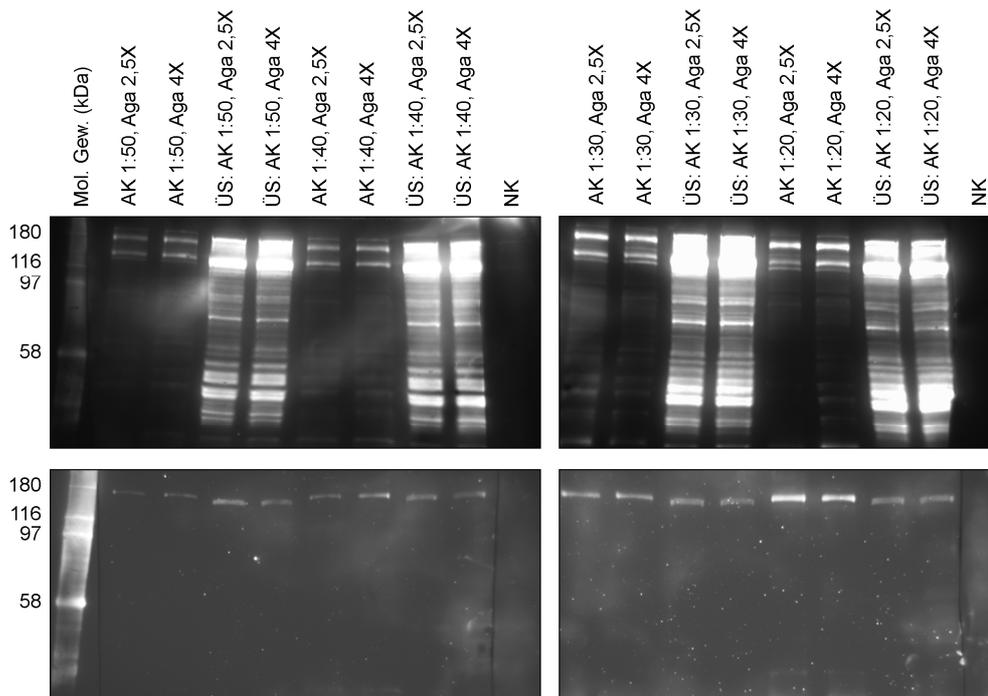
Cell Signaling empfahl für die IP 200 µl Gesamtzelllysate zu verwenden. Nach dem Wechsel auf das Produkt von Santa Cruz wurde, den Herstellerempfehlungen folgend, zur Durchführung der IP eine Proteinmenge im Lysat von 1000 µg verwendet. Als zusätzlicher Arbeitsschritt erfolgte daraufhin die Aufnahme der Proteinbestimmung nach Lowry<sup>130</sup> für

die Analyse eines jeden Proteinlysates in das IP-Protokoll. Die Mindestkonzentration zur Durchführung der Präzipitation wurde auf 3,0 µg/µl festgelegt.

### 3.1.4.4 Ermittlung der eingesetzten Menge der Protein A/Plus G-Agarosesuspension

Das Protokoll von Cell Signaling sah die Zugabe einer dem 0,1-fachen des Lysatvolumens entsprechenden Menge einer 50-prozentigen Agarosesuspension vor. Die nach Literaturrecherche ausgewählte Protein A/Plus G-Agarosesuspension (Aga) der Firma Calbiochem lag in 33-prozentiger Suspension vor. Dementsprechend wurde die für die Präzipitation eingesetzte Menge der Agarosesuspension um den Faktor 1,52 (=0,5/0,33) erhöht.

Um den Aga-Verbrauch zu optimieren, wurde die Bezugsgröße zur Berechnung der Aga-Menge umgestellt. Die eingesetzte Menge wurde auf das Antikörpervolumen bezogen. Ein Vergleich der Aga-Volumina entsprechend dem 2-, 2,5- und 4-fachen des Antikörpervolumens brachte keinen Unterschied im Ergebnis (siehe Abbildung 14).



**Abb. 14: IP mit verschiedenen Antikörper- und Agarosekonzentrationen.**

Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 (obere Bildreihe, 10 Minuten Belichtungszeit) und dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (untere Bildreihe, 40 Minuten Belichtungszeit). Deutlich zu erkennen in der 13G8-Färbung: Die stärksten Banden des EGF-Rezeptors und damit die höchste IP-Ausbeute gegenüber dem Überstand (ÜS), ergab sich nach Präzipitation mit einer Antikörperkonzentration (AK) von 1:20. Die Agarosemenge (Aga) scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Da ein Unterschied in der für die IP eingesetzten Agarosemenge nicht festzustellen war, wurde im Folgenden das dem zweifachen des Antikörpervolumens entsprechende Agarosevolumen eingesetzt.

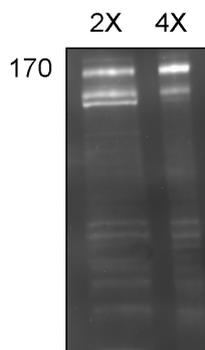
### 3.1.4.5 Festlegung eingesetzter Geräte und Durchführungsbedingungen

Es wurde vermutet, dass die Zentrifugationsschritte ein sensibler Punkt in dieser störanfälligen Methode sein könnten. Die Zentrifugation zwischen den Spülschritten des Präzipitats erfolgte zunächst, in Anlehnung an das Protokoll von Cell Signaling, in einer im Kühlschrank (4 °C) aufgestellten Mikrozentrifuge. Diese rotierte nach Herstellerangaben mit 6000 U/Minute ( $\approx 1610Xg$ ).

Nach dem Vorschlag von Santa Cruz, die Zentrifugation mit 3000 U/Minute (ca. 1000Xg) durchzuführen, erfolgte der Wechsel auf eine Tischkühlzentrifuge. Diese bot die Vorteile eines festen Untergrundes, programmierbarer Rotationsdauer und -geschwindigkeit und die Möglichkeit eines beliebig abbremsbaren Rotationsendes. Die Zentrifugation zwischen den Waschungen erfolgte daraufhin bei 3000 U/Minute ( $\approx 855Xg$ ) für 30 Sekunden bei 4 °C.

### 3.1.4.6 Konzentration des Lämmli-puffers

Zuletzt wurde die Konzentration des Lämmli-puffers nach dem Beispiel von Caruso et al.<sup>37</sup> (nach Emailkorrespondenz mit dem Erstautor) verändert (2X, 3X, 4X, 5X). Eine stärkere Konzentrierung führte zu einer unvorteilhaften Konzentrierung der Banden in der ECL. Die Banden wurden schmaler und höher (siehe Abbildung 15). Diese Veränderung führte zu einer schlechteren Auswertbarkeit der ECL-Aufnahmen, weshalb der 2X-Lämmli-puffer beibehalten wurde. Damit ergab sich das endgültige Protokoll für die Immunpräzipitation, wie in Kapitel 3.1.4.7 beschrieben.



**Abb. 15: Vergleich der Lämmli-pufferkonzentrationen**

Direkter Vergleich von 2X- und 4X-Lämmli-puffer. Die Bande des nach der IP mit 4X-Lämmli-puffer behandelten Präzipitates ist durch eine geringere Breite konzentrierter. Dadurch kam es früher zu einer Sättigung der Bilder, was sich nachteilig auf die Bildauswertung ausgewirkt hätte.

### **3.1.4.7 Optimale Bedingungen**

Für die in Kapitel 4 beschriebenen Analysen wurde die IP des EGF-Rezeptors nach folgendem Protokoll durchgeführt: Das Gesamtzelllysate wurde nach der Methode zur Proteinbestimmung nach Lowry<sup>130</sup> analysiert. Zu dem 1000 µg Gesamtprotein enthaltenden Lysatvolumen wurde der EGF-Rezeptorantikörper 1005 der Firma Santa Cruz im Verhältnis 1:20 hinzugegeben. Nach einer Vorinkubationszeit von 2 Std. auf dem Drehrad bei 4 °C, wurde ein dem Doppelten des Antikörpervolumens entsprechendes Volumen der Protein A/Plus G-Agarosesuspension hinzugegeben. Die Suspension inkubierte bei 4 °C über Nacht auf dem Drehrad. Am Folgetag wurde das Präzipitat dreimal mit je 1000 µl eiskaltem PBS gewaschen (855Xg, 30 Sekunden). Anschließend erfolgte zur Freisetzung des EGF-Rezeptorproteins die Zugabe von 41 µl 2X-Lämmliprobenpuffer und das Kochen der Probe (95 °C, 10 Minuten). Die Analyse der EGF-Rezeptorphosphorylierung erfolgte nach SDS-PAGE (4%/10%-Gel), Western Blot, Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 und dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 und ECL.

### **3.1.5 Etablierung der Inhibierung der EGF-Rezeptor-phosphorylierung mit AG1478**

Die Etablierung der Inhibierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung mit dem EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 erfolgte zunächst nach Zugabe von EGF (100 ng/ml, 5 Minuten) in die Zellkultur. Die EGF-Rezeptorphosphorylierung sollte bei Vorinkubation mit AG1478 nach EGF-Zugabe abgeschwächt bzw. vollständig aufgehoben werden. Nach Literaturrecherche wurde mit Inhibitorkonzentrationen von 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 µM und einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten begonnen. Eine eindeutige Signalunterbrechung konnte mit diesen Konzentrationen nicht erreicht werden. Es erfolgte eine Steigerung der AG1478-Konzentration auf 2,5, 5, 10 und 20 µM, wobei eine effektive EGF-Rezeptorinhibierung bei 10 bis 20 µM AG1478 auftrat.

### **3.1.6 Festlegung der statistischen Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurden zunächst die Messwerte normiert. Dazu erfolgte die Division der Messdaten aus der Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 durch die Messdaten aus der Immunfärbung mit dem

monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8. Im Folgenden wird dieser Quotient bezeichnet mit:

$$\frac{(4G10)}{(13G8)} \quad (1)$$

Das Finden signifikanter Unterschiede sollte in den Zeitverlaufexperimenten mit Angiotensin II vor allem der Festlegung des Zeitpunktes der maximalen EGF-Rezeptorphosphorylierung im Vergleich zum Ausgangszustand dienen. Allein durch die Quotientenbildung der Messdaten konnten aufgrund von Unterschieden in den interexperimentellen Ausgangsniveaus keine Signifikanzen beobachtet werden. Um die Ausgangsniveaus anzugleichen, erfolgte der Versuch der Korrektur der Messdaten durch Subtraktion des Medianes des jeweiligen Messtages von allen Messdaten dieses Tages:

$$\left[ \left( \frac{(4G10)}{(13G8)} \right)_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}} \right] - \left[ \text{Median} \left( \frac{(4G10)}{(13G8)} \right)_{\text{aller Zeitpunkte des Tages Y}} \right] \quad (2)$$

Eine weitere Möglichkeit der Korrektur war die Division der Messwerte durch den arithmetischen Mittelwert von allen Tagen für die jeweilige Stimulationsdauer:

$$\frac{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}}}{\text{Mittelwert} \left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{aller Tage zum Zeitpunkt X Minuten}}} \quad (3)$$

Sowohl die Medianwertkorrektur (2), als auch die Mittelwertkorrektur (3) führten nicht zu einer Verringerung der interexperimentellen Schwankungen. Die Durchführung des Wilcoxon-Testes zeigte keine Signifikanzen. Die Auswertung für die Zeitverlaufexperimente mit Angiotensin II wurde schließlich auf die Normierung zum Zeitpunkt 2,5 Minuten festgelegt:

$$\frac{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}}}{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt 2,5 Minuten am Tag Y}}} \quad (4)$$

Der Zeitpunkt 2,5 Minuten wurde für alle Zeitverlaufexperimente mit Angiotensin II gewählt, nachdem in Vergleichsexperimenten eine Gleichwertigkeit gegenüber den unstimulierten Zellen zum Zeitpunkt 0 Minuten gezeigt werden konnte. Für die

Experimente mit Zellstimulation durch EGF wurde entsprechend der Zeitpunkt 0,5 Minuten gewählt.

Für die Experimente mit EGF, den verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II und die Experimente mit den Angiotensinrezeptorantagonisten wurden die Aussagen durch die Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus je drei Experimenten getroffen. Für die Experimente zum Zeitverlauf der Angiotensin II vermittelten EGF-Rezeptorphosphorylierung wurden je nach Zelllinie sechs bis acht Wiederholungen durchgeführt. Da es sich bei den Experimenten mit AG1478 um eine eindeutige Ja-/Nein-Antwort der EGF-Rezeptorphosphorylierung handelte, wurden hier für AGS und N87 lediglich ein bis zwei Wiederholungen durchgeführt.

## **3.2 Diskussion**

### **3.2.1 Nachweis der EGF-Rezeptor-mRNA**

Die in der Literatur<sup>189</sup> angegebene Größe des PCR-Produktes von 344 bp musste nach einem Vergleich der Primerbindungsstellen mit der mRNA-Sequenz des EGF-Rezeptors, in Verbindung mit der Lage der Banden nach der Elektrophorese, auf 473 bp korrigiert werden.

Die exongrenzenüberschreitende Lage des Primerproduktes führte zu einer sicheren Unterscheidbarkeit von mRNA und DNA. Die verwechslungsfreie Detektion von mRNA war damit auch bei eventueller Probenkontamination mit DNA möglich. Eine Detektion des EGF-Rezeptors aus DNA wäre kein Beweis der für diese Arbeit notwendigen Transkription des Gens gewesen.

### **3.2.2 Nachweis des EGF-Rezeptorproteins**

#### **3.2.2.1 EGF-Rezeptor-SDS-PAGE**

Der Wechsel der Gelzusammensetzung von einem Schägger-Gel (4%/10%/16,5%) zu einem zweischichtigen Gel (4%/10%) erfolgte unter der Überlegung, dass das EGF-Rezeptorprotein aufgrund seiner Größe zu leicht an dem Übergang zu einem hochprozentigen Gel aufgehalten werden könnte. Die klare Trennung der Schichten im Trenngel nach Schägger<sup>191</sup> (10%/16,5%) konnte bei eigener Gelherstellung nicht sicher gewährleistet werden. Ein Vermischen der Schichten und damit ein abrupter Übergang der

vierprozentigen Schicht zu einem Trenngel von 16,5- bis 10-prozentiger Konzentration musste in Erwägung gezogen werden.

Die Gellaufzeiten und die angelegte Spannung wurden verändert, um die Banden deutlicher hervortreten zu lassen. Die anfängliche niedrige Spannung (100 V 45 Min) sollte die scharfe Zeichnung der Banden bewirken. Das Durchlaufen der Proteine konnte danach mit höherer Spannung (180 V 100 Min) beschleunigt werden.

### **3.2.2.2 EGF-Rezeptorimmunfärbung**

Um die Handhabung der Immunfärbung zu optimieren, erfolgte die Etablierung der EGF-Rezeptorimmunfärbung zunächst auf PVDF-Membran und mit dem im sichtbaren Licht darstellbaren Chromogen NBT/BCIP. Erst nach Erreichen eines reproduzierbaren Ergebnisses wurde auf die ECL gewechselt.

Der zum Teil stark angefärbte Hintergrund war während der Etablierungsphase immer wieder der Anlass, um Blockierungslösungen durch Zugabe oder Weglassen von Tween-20 und den Wechsel zwischen 3% oder 5% Milchpulver/BSA zu verändern.

Letztlich konnte die Anfärbung des Hintergrundes insbesondere mit der Raumtemperatur in Zusammenhang gebracht werden. Nach dem Wechsel der Immunfärbung in einen klimatisierten Laborraum mit 18 °C wurde eine starke Hintergrundfärbung nicht mehr beobachtet.

### **3.2.2.3 Immunfärbung mit den polyklonalen Anti-EGF-Rezeptor-antikörpern 1005 und dem Antikörper von Cell Signaling**

Die Grundlage für die Antikörperauswahl zum Nachweis des EGF-Rezeptors in Gesamtzelllysaten und für die Anwendung in der IP bildete eine Literaturrecherche (siehe Anhang). Der Antikörper sollte in ähnlichen Arbeiten Anwendung gefunden haben. Die von der Arbeitsgruppe für andere Projekte verwendeten Antikörper von Santa Cruz hatten in der Vergangenheit zu unzufriedenstellenden Ergebnissen geführt. Daher wurde für diese Arbeit zunächst ein Antikörper einer anderen Firma verwendet. Die Wahl fiel zunächst auf das Produkt von Cell Signaling. Erst nachdem der Einsatz des Antikörpers während der Etablierung der IP zu einem sehr schwachen Signal führte, erfolgte der Wechsel zu dem Produkt von Santa Cruz. Dieser Antikörper wurde zunächst im WB und mit ECL überprüft, bevor es zur Anwendung in der IP kam.

### 3.2.2.4 Stripping der NC-Membran

Die Etablierung einer Strippingmethode für NC-Membranen diente der späteren Auswertung der Experimente mithilfe der IP. Die Immunfärbungen für die EGF-Rezeptorphosphorylierung mit dem 4G10-Antikörper sollten an derselben Membran durchgeführt werden, wie die Immunfärbung zur Ladekontrolle der Gele mit dem 13G8-Antikörper.

Nachdem das Nachfärben der gestrippten Membranen nur mit dem Sekundärantikörper zu einem der vorherigen Färbung entsprechenden Bild führte, musste trotz Strippings von einem Verbleiben des Primärantikörpers auf der Membran ausgegangen werden. Dem Beispiel von Casalino-Matsuda et al.<sup>38</sup> folgend wurde daraufhin auf ein Membranstripping verzichtet. Das in Lämmli-puffer befindliche Präzipitat wurde zu gleichen Teilen in zwei Gele geladen, die parallel unter denselben Bedingungen durch SDS-PAGE und Western Blot getrennt und anschließend mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt wurden. Dieses Vorgehen erfolgte unter der Annahme, dass das Strippen in gleicher Weise einen eventuell nicht gleich verteilten Antigenverlust auf der Membran und damit Unsicherheiten bei der Vergleichbarkeit der Färbungen bedeutet haben könnte.

### 3.2.2.5 Chemolumineszenz

Die Chemolumineszenz ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Proteinen. Im Vergleich zur Sichtbarmachung von Proteinen mittels NBT/BCIP, werden bei der ECL die Signale im Wesentlichen durch zwei Umstände potenziert:

- a) Die an Antikörper gebundene HRP besitzt eine hohe katalytische Effizienz und kann daher selbst in minimalen Mengen, entsprechend einer starken Sekundärantikörperverdünnung oder einer geringen Antigenmenge, ein Lichtsignal erzeugen.
- b) Durch die Möglichkeit einer Filmbelichtung mit beliebiger Dauer ist selbst ein schwaches Lichtsignal noch detektierbar. Eingeschränkt wird dieses einzig durch die nach Ansetzen begrenzte Haltbarkeit des ECL-Substrates. In diesem Fall gab der Hersteller (Pierce Biotechnology, Bonn) eine Zeitdauer von 2 Std. an.

Den Angaben der Hersteller des Sekundärantikörpers (DAKO, Hamburg) und des ECL-Substrates folgend, wurde mit einer starken Verdünnung des HRP gekoppelten Sekundärantikörpers begonnen (1:40000). Die endgültige Verwendung des Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 bei der Immunfärbung im Anschluss an die IP lässt mit den Angaben von Dako und Pierce auf eine geringe Menge des EGF-Rezeptorantigens schließen.

### **3.2.3 Zellkulturexperimente**

Für die Durchführung der Zellkulturexperimente wurde versucht, die Umgebungsbedingungen interexperimentell möglichst konstant zu halten. Die Experimente wurden an aufeinander folgenden Tagen, möglichst zu den gleichen Tageszeiten durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen größtmögliche Konfluenz erreichten (siehe Kapitel 2.2.1.1). Trotz weitestgehend standardisierter Handgriffe konnte das Wachstum und die Durchführung der Experimente ein Grund für die variierenden Ergebnisse der IP sein.

### **3.2.4 Immunpräzipitation**

#### **3.2.4.1 Gründe für die Auswahl und die Art der Methodenetablierung**

Die Immunpräzipitation wird oft eingesetzt, um aus einem heterogenen Zelllysat ein bestimmtes Antigen abzutrennen und gezielt zu analysieren<sup>24; 66; 91</sup>. Die IP wurde hier ausgewählt, um die Phosphorylierung spezifisch des EGF-Rezeptors zu untersuchen. Der EGF-Rezeptor besitzt sechs Tyrosinseitenketten, die bei seiner Aktivierung phosphoryliert werden können. Die jeweilige Seitenkette ist dabei je nach EGF-Rezeptor aktivierendem Liganden unterschiedlich<sup>233</sup>. Da bei einer, der Theorie des TMPS folgenden EGF-Rezeptoraktivierung der aktivierende EGF-Rezeptorligand unbekannt war, führte diese Überlegung zum Einsatz der als unkompliziert und günstig erachteten Methode der IP. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde als Äquivalent für die EGF-Rezeptoraktivierung genommen.

Zunächst wurde der für die Präzipitation eingesetzte Antikörper mit einem festen Volumenanteil von 1:50 für ein festes Lysatvolumen von 200 µl eingesetzt (siehe Kapitel 3.1.4.3). Später wurde die Bezugsgröße der Antikörpermasse auf das 1000 µg Protein enthaltende variable Lysatvolumen festgelegt. Es wurde ein Antikörpervolumenanteil von 1:20 festgelegt. Dies geschah unter folgenden Überlegungen: Santa Cruz schlug den festen Einsatz von 1000 µg Protein für die IP vor. Obwohl immer ein festes Zellysepuffer-volumen eingesetzt wurde und auf das vollständige Entfernen von PBS nach dem letzten Waschschrift der Zellkulturschalen geachtet wurde, befanden sich 1000 µg Protein bei jeder lysierten Zellkulturschale in einem variierenden Volumen. Es ist davon auszugehen, dass der Anteil von EGF-Rezeptorprotein an 1000 µg Gesamtprotein gleich bleibt. Damit hätte bei höheren in der IP eingesetzten Lysatvolumen eine gleich bleibende Antikörper-

masse dem Ansatz mit Verdünnung des Lysates mit PBS entsprochen. Dieser Ansatz führte jedoch zu einem verschlechterten Präzipitationsergebnis (siehe Kapitel 3.1.4.3).

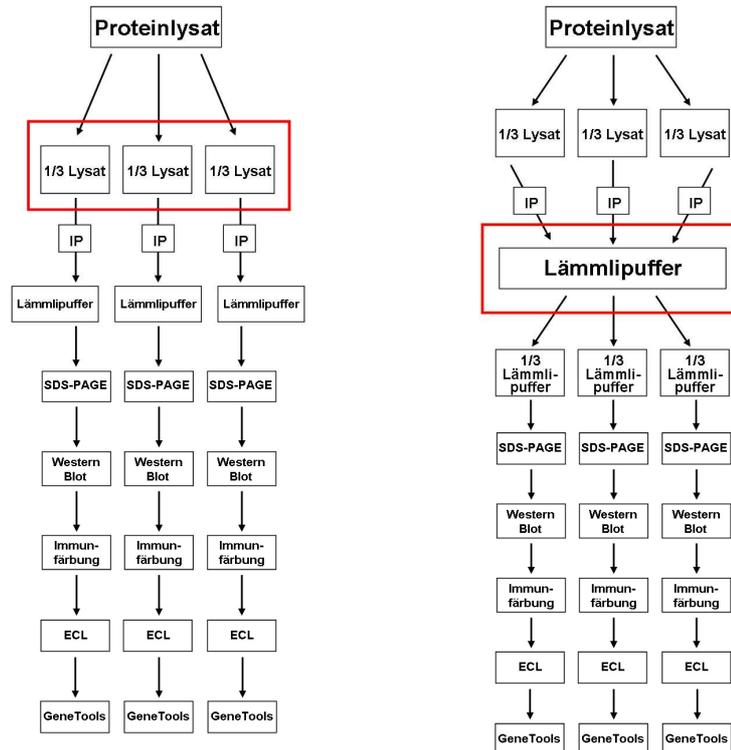
Wird zudem zu einem höheren Lysatvolumen eine im Vergleich zwar gleiche Masse Antikörper, die jedoch einem geringeren Volumenanteil entspricht, hinzu gegeben, entspricht dies einem verdünnten Volumenanteil des Antikörpers. Diese Kombination wurde in dem Versuch der IP mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1:20, 1:30, 1:40, 1:50, siehe Kapitel 3.1.4.4) modellhaft durchgespielt. Ein Zahlenbeispiel zur Verdeutlichung: Die gelieferte Antikörperkonzentration betrug  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Für den fixen Einsatz von  $2 \mu\text{g}$  Antikörpermasse mussten somit  $10 \mu\text{l}$  Antikörperlösung verwendet werden. Das bedeutet, dass  $1000 \mu\text{g}$  Protein in einem Lysatvolumen von  $200 \mu\text{l}$ , präzipitiert mit  $2 \mu\text{g}$  Antikörper einer Antikörperverdünnung von 1:20 entsprochen hätten. Bei einem Lysatvolumen von  $300 \mu\text{l}$  mit  $1000 \mu\text{g}$  Protein ergäbe sich eine Antikörperverdünnung von 1:30 bei  $10 \mu\text{l}$  eingesetztem Antikörpervolumen. Dies bringt, wie im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3.1.4.4) beschrieben, ein schlechteres und damit nicht vergleichbares Ergebnis.

### 3.2.4.2 Sensitivität der Methode

Die Durchführung der IP war, trotz der leicht verständlichen Theorie hinter der Methode, von einigen Schwierigkeiten begleitet. Etwa 20 Einzelschritte auf dem Weg von der Durchführung der Zellkulturexperimente bis zur Immunfärbung und ECL nach SDS-PAGE und Western Blot konnten weitere Gründe für die in Kapitel 3.1.6 beschriebenen variierenden Ergebnisse sein. Hinweis hierfür war die gleichzeitige und gleichartige Verarbeitung von drei aus 1 Proteinlysate stammenden Immunpräzipitationen (siehe Abbildung 16, links). Obwohl der Ursprung aus demselben Lysat ein nahezu identisches Ergebnis nach IP, SDS-PAGE, Immunfärbung und ECL erwarten ließ, wurden drei unterschiedliche Messwerte erzielt. Als Gründe hierfür wurden natürliche Unterschiede in der Antikörperbindungskapazität, in der Protein A/Plus G-Agarose oder kleinste Unterschiede in der Verarbeitung der Proben während der Waschschrte vermutet.

Zur weiteren Fehlereingrenzung wurden wieder drei IPs aus 1 Ursprungslysat getrennt voneinander präzipitiert. Jedoch wurden direkt vor der SDS-PAGE die in Lämmli-puffer gelösten Präzipitate wieder gepoolt, um aus der nun vorliegenden dreifachen Lämmli-puffermenge drei Geltaschen für die SDS-PAGE zu füllen (siehe Abbildung 16, rechts). Auch bei diesem Ansatz wurden unterschiedliche Messwerte nach Immunfärbung und ECL erzielt. Dadurch musste angenommen werden, dass zusätzlich zu den oben

bereits beschriebenen Unterschieden in der Bearbeitung der IP-Proben, weitere Faktoren für die Variation der Messwerte verantwortlich waren. Denkbar wären: Kleinste Unterschiede beim Pipettieren, Unterschiede in der Bindung der für die Immunfärbung eingesetzten Antikörper, Unterschiede in der durch HRP hervorgerufenen Lichtemission oder denkbar auch Unterschiede in der Vermessung der Banden mithilfe der GeneTools-Software von Syngene. Letzteres stellte sich als auf kleine Veränderungen im Messbereich sehr sensibel reagierendes Programm heraus.

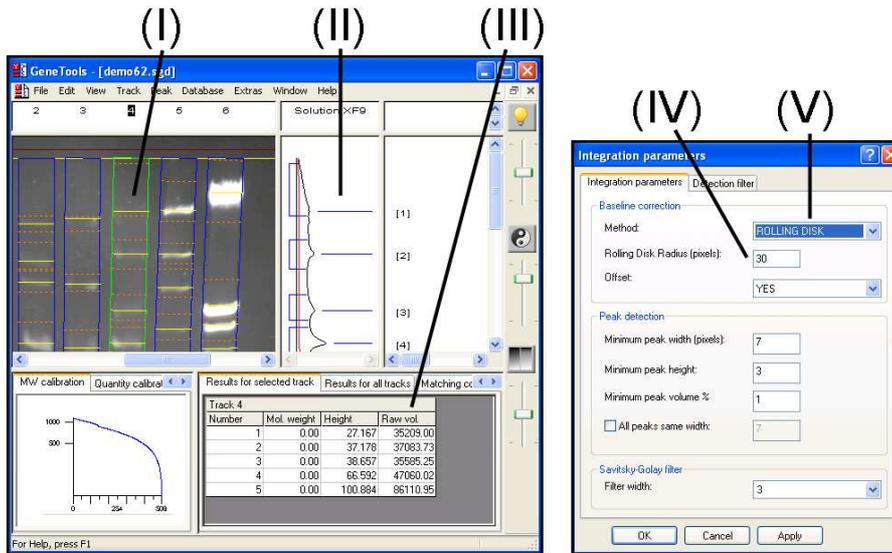


**Abb. 16:** Vergleich der Verarbeitungsschritte desselben Proteinlysates.

Die dreifache Wiederholung der IP aus demselben Proteinlysate. **Links:** Die getrennte IP-Auswertung. **Rechts:** Zusammenführung der Präzipitate vor der Auswertung.

### 3.2.5 Messung mittels GeneTools-Software

Die GeneTools-Software der Firma Syngene bietet die Möglichkeit, die in der ECL erzeugten Lichtsignale als Histogramm darzustellen. Dazu werden die Lichtbanden durch von dem Programm erzeugte Bahnen eingegrenzt. Das Generieren der Bahnen geschieht automatisch. In einigen Fällen kann das Programm die Spuren zur Bahngenerierung nicht selbst finden. Hier ist es auch möglich die Bahnen manuell zu erzeugen und auf die Weite der Lichtbanden einzustellen. Zum Verständnis der Funktionsweise des Programms siehe Abbildung 17.



**Abb. 17: Darstellung der Datenverarbeitung in GeneTools.**

Die dargestellten Fenster zeigen die in dem Programm erzeugbaren Bahnen (I), die die Grenzen für die Vermessung der Lichtsignale darstellen. Die Signale werden als Histogramm, mit einem Ausschlag entsprechend der Lichtintensität, dargestellt (II). Die *Baseline* (rote Linie in II) legt die Nulllinie für die Errechnung der *Raw Volume*-Werte durch Integration fest (III). Für den Verlauf der *Baseline* bietet das Programm Voreinstellungen an (V). In diesem Fall wurde der Modus *Rolling Disk* gewählt und der Radius auf 30 Pixel festgelegt (IV).

Das Programm zeigte sich sehr sensibel für die Messung selbst minimaler Lichtmengen. So kann ein zu großer schwarzer Rand um die hell leuchtenden Banden dazu führen, dass eine schwache Bande einen größeren Messwert erhält, als eine mit knapper Begrenzung ausgemessene stärker leuchtende Bande. In der manuellen Generierung der Banden und der Einstellung ihrer Weite könnte eine weitere Fehlerquelle gelegen haben.

Wenn eine automatische Generierung der Banden durch das Programm nicht möglich war, erfolgte die Vermessung der zu einem Versuchstag gehörenden ECL-Aufnahmen der 4G10- und der 13G8-Immundefärbung direkt nacheinander. Damit sollte die subjektive Komponente bei der Einstellung der Bandenweite möglichst konstant gehalten werden.

Bei den für die Auswertung der IP notwendigen Vermessungen einer durch den Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 erzeugten und einer durch den Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 erzeugten Aufnahme wurden jeweils gleiche Belichtungszeiten vermessen. Aufgrund des schwachen EGF-Rezeptorsignals nach der IP, wurde für AGS und N87 immer die 13G8-Aufnahme nach 50 Minuten ausgewertet. Nach dieser langen Belichtungszeit stellten sich die Banden am deutlichsten dar. Gleichzeitig veränderten sich die Proportionen der Lichtsignale der einzelnen Banden nicht durch die Länge der Belichtungszeit.

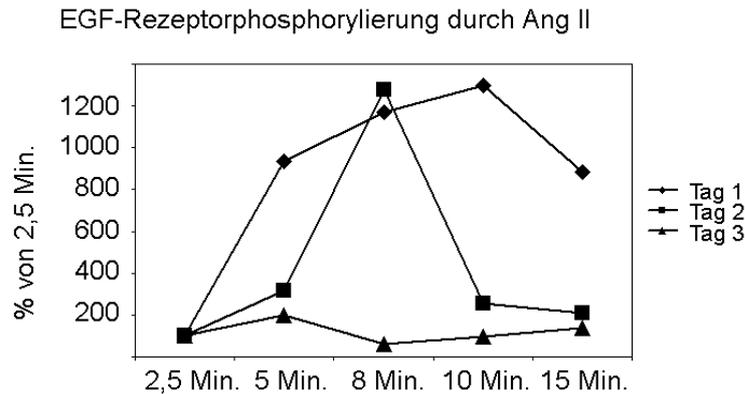
### 3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung diente zwei Zielen: Erstens sollten interexperimentelle Schwankungen verringert werden, zweitens sollten mögliche Signifikanzen gegenüber dem Ausgangszustand erkannt werden. Die interexperimentell schwankenden Messwerte stellten hohe Herausforderungen an die statistische Auswertung. Über Normierungen auf der Ebene der Immunfärbung mithilfe einer Ladekontrolle, und auf der Ebene der Auswertung mithilfe der Formeln (1) und (4) von Seite 53 sollte die statistische Auswertung mithilfe des T-Testes bzw. des Wilcoxon-Testes vorbereitet werden.

Ein starkes Signal der ECL nach Immunfärbung mit dem 4G10-Antikörper konnte zum einen durch eine starke EGF-Rezeptorphosphorylierung hervorgerufen sein. Andererseits konnte ein starkes Signal auch durch eine höhere Lademenge in der SDS-PAGE bedingt sein. Um darauf beruhende Schwierigkeiten der Auswertung ausschließen zu können, wurde die zusätzliche Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 durchgeführt. Dieser sollte Unterschiede in der Lademenge detektieren und Signalunterschiede durch eventuelle transkriptionelle Veränderungen ausschließen. Die Verrechnung bzw. Normierung erfolgte daraufhin gemäß Formel (1).

In den ersten Experimenten wurde als Negativkontrolle PBS und 0,1% DMSO zu den Zellen gegeben. Der Vergleich mit der später zusätzlich hinzugenommenen Negativkontrolle (NK), bei der die Zellen direkt nach der serumfreien Inkubation lysiert wurden, zeigte, dass das Niveau dieser NK relativ konstant auf dem Niveau der Stimulation nach 2,5 Minuten Angiotensin II bzw. 0,5 Minuten EGF lag, während die NK mit PBS und DMSO auf unterschiedlichen Niveaus lag. Es kam auch vor, dass die EGF-Rezeptorphosphorylierung dieser NK oberhalb der EGF-Rezeptorphosphorylierung nach 2,5 bzw. 0,5 Minuten lag. Dies könnte auf dem Effekt von DMSO beruhen, die Membranpermeabilisation anderer Substanzen zu begünstigen<sup>239</sup>. Diesen Effekt löst DMSO durch eine Umstrukturierung der Lipiddoppelschicht der Zellmembran aus<sup>110; 187; 240</sup>. Es ist möglich, dass sich dadurch auch die Zellosmolarität ändert, oder es zu einer Änderung der Membranpolarisation kommt. Beide Mechanismen wurden als ligandenunabhängige Aktivatoren des EGF-Rezeptors beschrieben<sup>83</sup>. Um alle Experimente auf die gleiche Art auswerten zu können, erfolgte daraufhin die Normierung der Daten nach Formel (4) auf den Zeitpunkt 2,5 Minuten bzw. 0,5 Minuten für die EGF-Experimente.

Diese Darstellung der Messwerte zeigte ein Maximum der EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II, welches je nach Messtag bei 5, 8 oder 10 Minuten lag (siehe Abbildung 18). Dies wurde als Grund dafür angesehen, dass bei Bildung des arithmetischen Mittelwertes aus allen Messtagen sowohl mithilfe des T-Testes für gepaarte Stichproben als auch mit der Anwendung des Wilcoxon-Testes keine Signifikanzen für einen Messzeitpunkt nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 18:** Darstellung der Messwerte als Vielfaches des Zeitpunktes 2,5 Minuten.

Gezeigt sind exemplarisch die Verläufe von drei Experimenten für die Zelllinie MKN28. In der Darstellung als Vielfaches des Zeitpunktes 2,5 Minuten wird deutlich, dass das Maximum der EGF-Rezeptorphosphorylierung zwischen 5 und 10 Minuten liegt. Für dieses Experiment erfolgten insgesamt acht Wiederholungen.

Die Normierung nach Formel (4) und das Ausbleiben von Signifikanzen in den angewendeten statistischen Tests lassen vermuten, dass die interexperimentellen Schwankungen auf die Methode der IP zurückzuführen sein müssen. Verdeutlicht wird dies durch das in Kapitel 3.2.4.2 (Abbildung 16) aufgeführte Experiment.

Um die Daten statistisch auswerten zu können, wurde der Versuch einer Fehlerkorrektur unternommen. Damit sollte die Amplitude der interexperimentellen Schwankungen verringert werden. Die Formeln (2) und (3) auf der Seite 53 zeigen zwei unternommene Versuche der Fehlerbegrenzung durch Verrechnung der Messwerte mit dem Median eines Messtages bzw. dem arithmetischen Mittelwert eines Messzeitpunktes.

Desweiteren existiert die Möglichkeit der Fehlerkorrektur durch einen Faktor, der sich aus den Wichtungen der Einzelschritte eines Experimentes und ihren Unsicherheiten zusammensetzt. Ein auf die Immunpräzipitation bezogener Korrekturfaktor stellte sich insofern als nicht realisierbar dar, da zufällige Fehler in der Antikörperbindung, der Raumtemperatur, der Genauigkeit der Waschschrte, der Pipettierung, der Gelzusammensetzung in der SDS-PAGE und viele weitere mögliche Ursachen für die

Ergebnisschwankungen hätten eingerechnet werden müssen. Eine Objektivierung der jeweiligen Fehler und ihre Gewichtung an den einzelnen Versuchstagen blieben jedoch verborgen, so dass die Möglichkeit eines Korrekturfaktors nicht realisiert werden konnte. Es erfolgte einzig die Fehlerbegrenzung durch sorgfältigstes Arbeiten mit weitgehend standardisierten Handgriffen.

Ein Ausgleich von zufälligen Fehlern in der Statistik kann auch über eine Erhöhung der Anzahl der Experimente erreicht werden. Für diese Arbeit wurden je Messansatz mindestens drei Wiederholungen durchgeführt. Für die Bestimmung des Zeitverlaufs der EGF-Rezeptoraktivierung durch Angiotensin II wurden je nach Zelllinie sogar sechs bis acht Wiederholungen durchgeführt. Selbst diese hohe Anzahl an Wiederholungen führte nicht zu normalverteilten Messwerten bzw. Signifikanzen gegenüber dem Ausgangszustand. Um dieses zu erreichen, sollte die Anzahl der IP-Experimente möglicherweise weiter gesteigert werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Immunpräzipitation, wie sie hier durchgeführt wurde, nicht für die Quantifizierung kleinster Zustandsunterschiede von Proteinen geeignet zu sein scheint. Die Quellen für die Schwierigkeiten der Quantifizierung liegen mutmaßlich besonders in den interexperimentellen Schwankungen, beruhend auf den zahlreichen Verarbeitungsschritten der Präzipitate. Die Schwankungen durch eine allgemeingültige Rechenformel oder einen Korrekturfaktor zu umgehen ist nicht gelungen. Trotzdem ist die Auswertung der Experimente auf einer qualitativen Ebene möglich. Die Abbildung 18 zeigt eine gleichartige Reaktion der Zellen, die eine qualitative Aussage zuließ, sich aus den dargelegten Gründen jedoch quantitativ nicht erfassen ließ.

Die Immunpräzipitation könnte durch Kenntnis der genauen Phosphotyrosinseitenkette, die durch Angiotensin II am EGF-Rezeptor aktiviert wird, umgangen werden. In diesem Fall kann ein monoklonaler Antikörper gegen diese Seitenkette für die Immunfärbung nach SDS-PAGE und Western Blot von Gesamtzelllysaten eingesetzt werden. Die Ungenauigkeiten, die durch die zahlreichen Verarbeitungsschritte des Präzipitates entstanden sein könnten, werden auf diese Weise ausgeschlossen.

## **Kapitel 4 Ergebnis und Diskussion II:**

### **Nachweis des EGF-Rezeptors und seine Transaktivierung durch Angiotensin II**

---

#### **4.1 Ergebnisse**

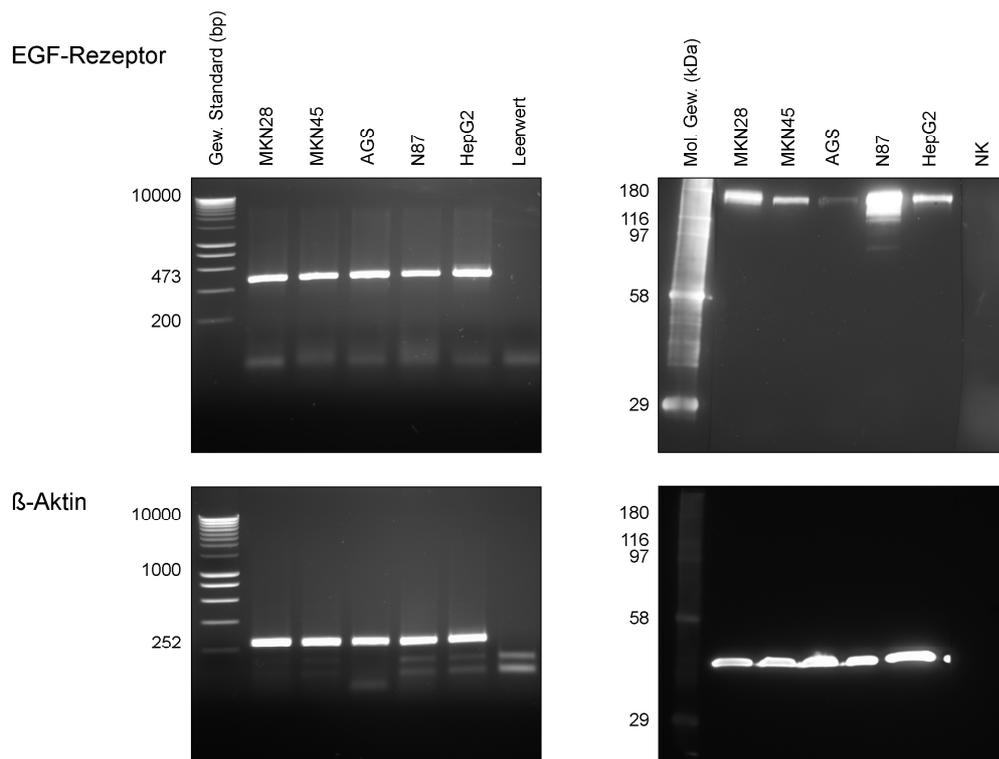
##### **4.1.1 EGF-Rezeptorexpression auf mRNA- und Proteinebene, Aktivierung durch EGF und Inhibierung durch AG1478**

Nach erfolgreicher Optimierung der experimentellen Bedingungen, wurde zunächst das Vorhandensein des EGF-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene in den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87 untersucht. Anschließend erfolgte die Untersuchung der EGF-Rezeptorphosphorylierung nach Zellstimulation mit EGF, sowie die Inhibierung der Phosphorylierung durch den EGF-Rezeptorinhibitor AG1478.

###### **4.1.1.1 Der EGF-Rezeptor wird auf mRNA- und Proteinebene exprimiert**

Die RT-PCR und Proteinanalyse mittels Proteinextraktion, SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung aus den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87 bestätigten die Expression des EGF-Rezeptors in allen Zelllinien (siehe Abbildung 19).

Das Produkt der RT-PCR wurde durch eine Sequenzierung gesichert. In jeweils 50 µg Gesamtzelllysat wurde der EGF-Rezeptor in abnehmender Stärke in N87, MKN28, MKN45 und AGS exprimiert.



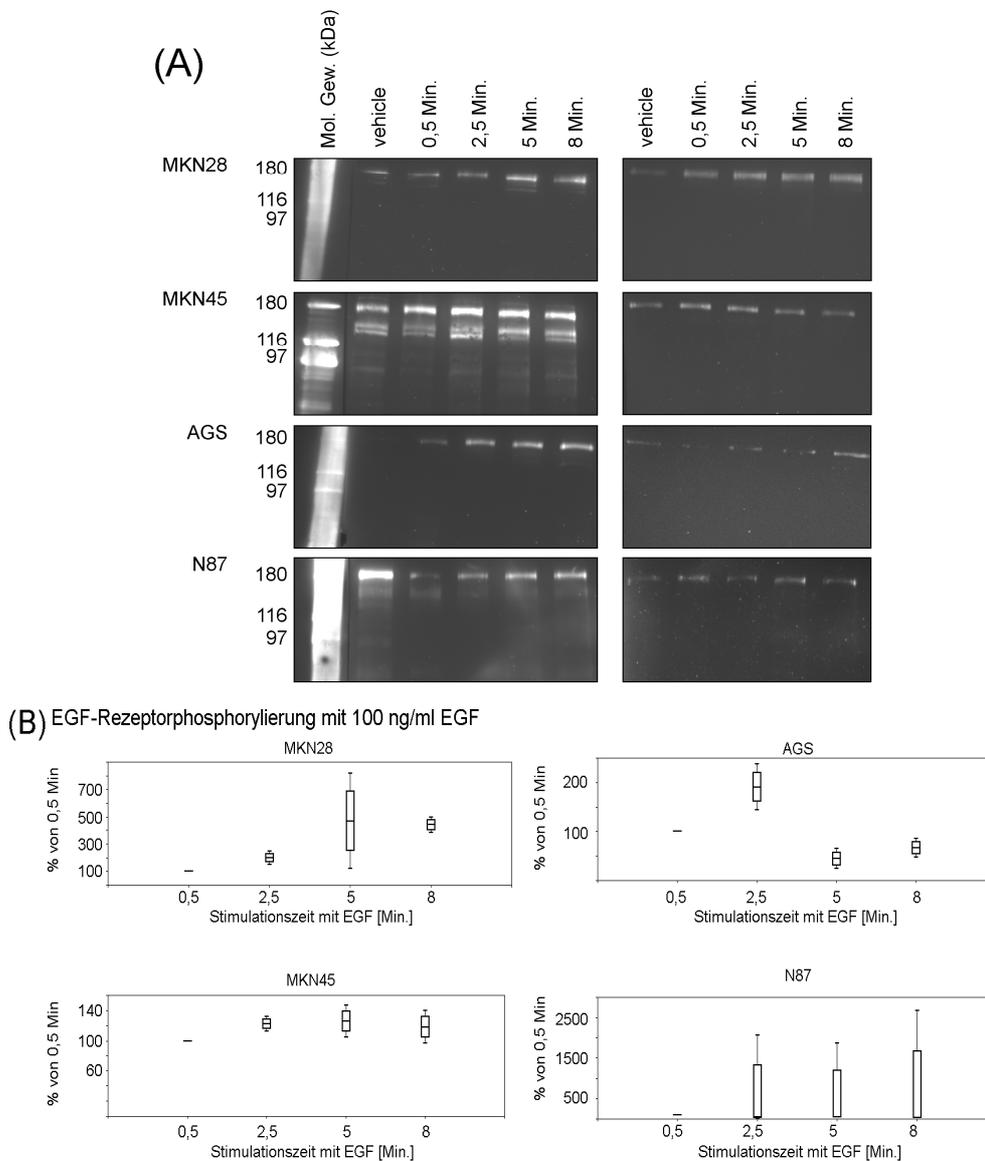
**Abb. 19: Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene.**

**Links:** Die RT-PCR aus cDNA der vier Magenkarzinomzelllinien und HepG2 als Positivkontrolle mit Nachweis der EGF-Rezeptor-mRNA und der  $\beta$ -Aktin-mRNA im Vergleich. **Rechts:** Die Immunfärbung mit dem polyklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005 von je 50  $\mu$ g Gesamtprotein aller vier untersuchten Zelllinien nach 40 Minuten Belichtungszeit. 50  $\mu$ g Gesamtprotein der Zelllinie HepG2 dienen als Positivkontrolle. Darunter: Die Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti- $\beta$ -Aktinantikörper AC-15 an je 50  $\mu$ g Gesamtprotein bei einer Belichtungszeit von 15 Minuten.

#### 4.1.1.2 Der EGF-Rezeptor wird durch Stimulation mit EGF nach 2,5 bis 8 Minuten maximal phosphoryliert

Untersucht wurden die EGF-Rezeptorphosphorylierungsstärken nach 0,5, 2,5, 5 und 8 Minuten Stimulation mit EGF. Die Zugabe von 100 ng/ml EGF in die Zellkultur der vier untersuchten Zelllinien führte bei MKN28 und MKN45 nach einer Stimulationszeit von 5 Minuten, bei AGS nach 2,5 Minuten und bei N87 nach 8 Minuten zu einer maximalen EGF-Rezeptorphosphorylierung (siehe Abbildung 20). Für die Folgeexperimente zu den EGF-Konzentrationen und mit dem Inhibitor AG1478 sollte das Zeitintervall für die EGF-Rezeptorstimulation nicht zu kurz sein, damit die Versuchsabläufe gut eingehalten werden konnten. Da die EGF-Rezeptorphosphorylierung bei MKN45 nahezu konstant verlief und N87 und MKN28 bei 5 Minuten eine über dem Ausgangswert liegende

Phosphorylierung zeigten, wurden die Folgeexperimente für alle Zelllinien mit einer EGF-Stimulationszeit von 5 Minuten durchgeführt.

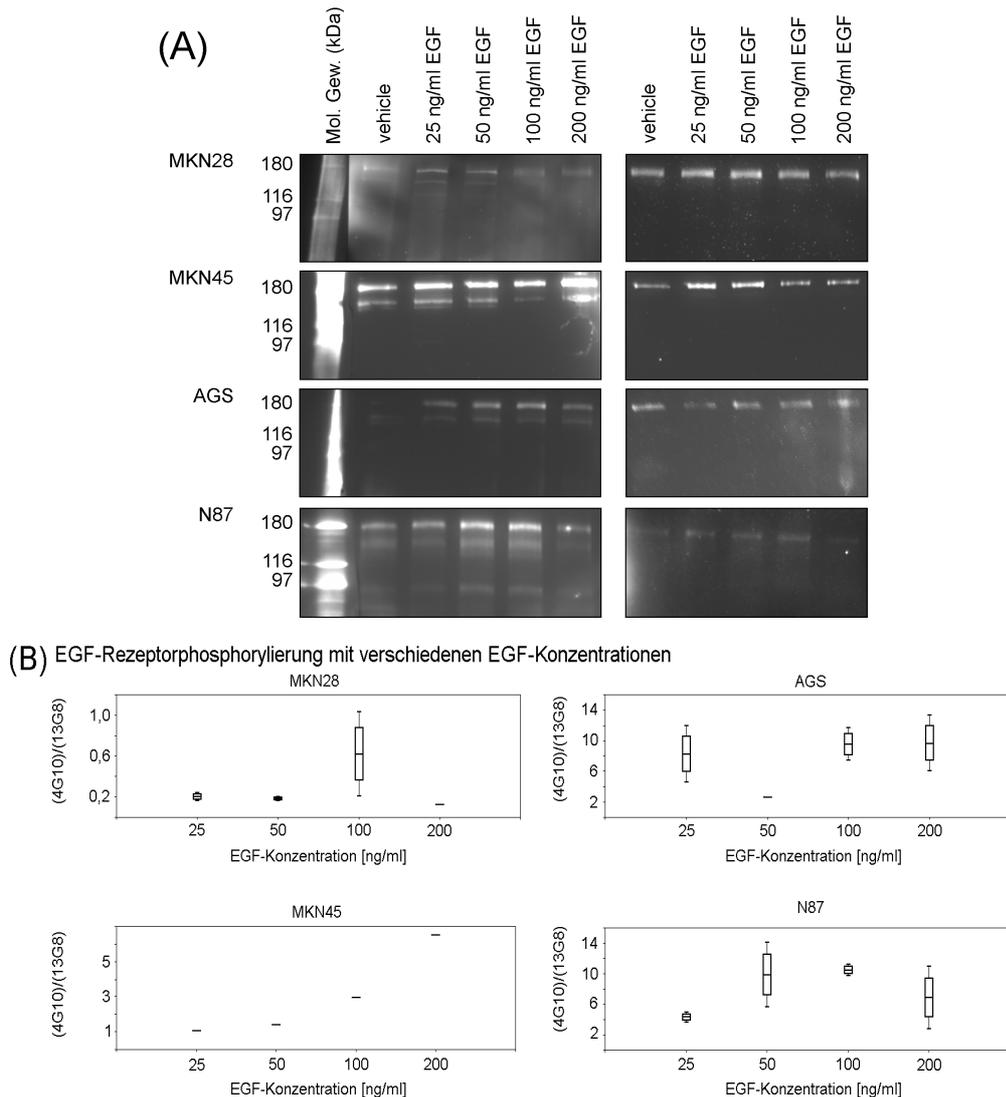


**Abb. 20: Zeitverlauf der Stimulation mit 100 ng/ml EGF.**

(A) zeigt den Zeitverlauf der EGF-Rezeptorphosphorylierung zu den Zeitpunkten 0,5, 2,5, 5 und 8 Min. (vehicle = Kontrolle mit PBS + 0,1% DMSO ohne EGF). Die Zellen wurden mit 100 ng/ml EGF stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Aufnahmen nach 50 Min. Belichtungszeit nach Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 (linke Bildhälfte) und nach den zur Ladekontrolle durchgeführten Färbungen mit dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (rechte Bildhälfte). Die Auswertung in Excel (B) zeigt den Verlauf der EGF-Rezeptorphosphorylierung aller vier Zelllinien nach Normierung auf den Zeitpunkt 0,5 Minuten. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile.

### 4.1.1.3 Der EGF-Rezeptor wird durch Stimulation mit 100 ng/ml EGF phosphoryliert

Bei einer Stimulationszeit von 5 Minuten ergab die Zugabe von 25, 50, 100 und 200 ng/ml EGF in die Zellkultur eine maximale EGF-Rezeptorphosphorylierung von MKN28, AGS und N87 bei Stimulation mit 100 ng/ml EGF (siehe Abbildung 21). Die Stimulation von MKN45 zeigte ein Maximum bei 200 ng/ml EGF.



**Abb. 21: Stimulation mit verschiedenen EGF-Konzentrationen.**

(A) zeigt die EGF-Rezeptorphosphorylierung zum Zeitpunkt 5 Min. mit verschiedenen EGF-Konzentrationen. Die Stimulation erfolgte mit PBS + 0,1% DMSO (vehicle) und mit Zugabe von 25, 50, 100 und 200 ng/ml EGF in die Zellkultur. Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem 4G10-Antikörper (linke Bildhälfte) und dem 13G8-Antikörper (rechte Bildhälfte). Gezeigt werden die Beispielaufnahmen nach 40 Min. (MKN28) bzw. 50 Min. Belichtungszeit (MKN45, AGS, N87). Die Auswertung in Excel (B) zeigt die EGF-Rezeptorphosphorylierung in Abhängigkeit von der EGF-Konzentration. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Für MKN45 erfolgte aufgrund der Verwendung der Zelllinie in der Etablierung der IP hier nur 1 Experiment.

#### **4.1.1.4 Die EGF-Rezeptorphosphorylierung wird durch AG1478 aufgehoben**

Für die Experimente mit dem Inhibitor AG1478 sollte das Zeitintervall für die EGF-Rezeptorstimulation nicht zu kurz sein, um die Versuchsabläufe gut einhalten zu können. Da die EGF-Rezeptorphosphorylierung durch EGF bei MKN45 nahezu konstant verlief und N87 und MKN28 bei 5 Minuten eine über dem Ausgangswert liegende Phosphorylierung zeigten (siehe Abbildung 20), wurde für alle Zelllinien eine Stimulationszeit mit EGF von 5 Minuten gewählt. Die EGF-Konzentration sollte gleichzeitig eine deutliche EGF-Rezeptorphosphorylierung bewirken. Nach Auswertung der Vorexperimente konnte ein entsprechender Effekt für alle Zelllinien bei 100 ng/ml beobachtet werden (siehe Abbildung 21).

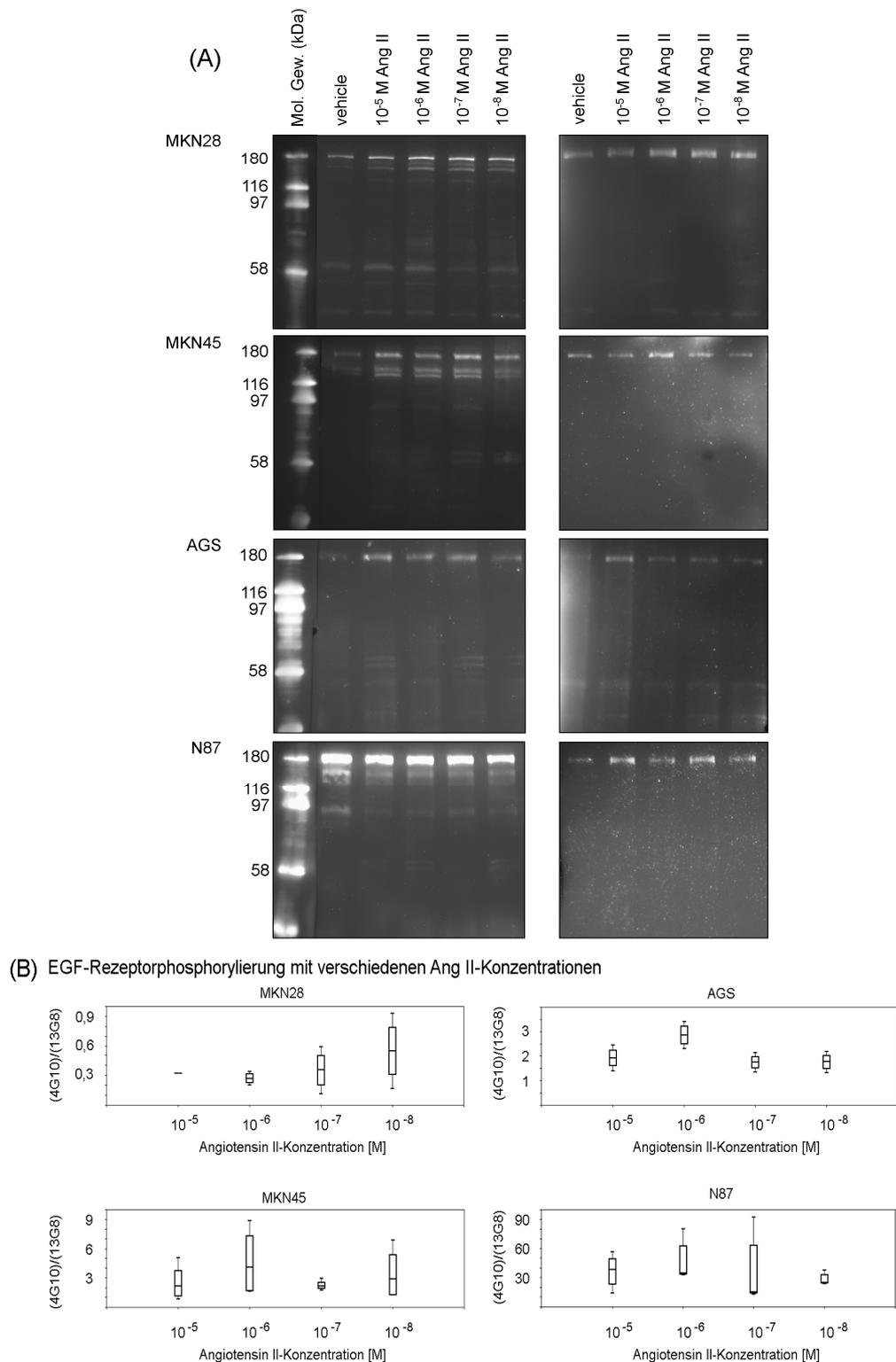
Die durch 100 ng/ml EGF hervorgerufene EGF-Rezeptorphosphorylierung konnte nach 30 Minuten Vorinkubation mit 10  $\mu$ M AG1478 für die Zelllinien MKN28 und AGS vollständig aufgehoben werden (95-99% Signalabschwächung). Für N87 wurde eine Reduzierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung um ca. 90% mit 20  $\mu$ M AG1478 erreicht. Für MKN45 konnte selbst nach einer Steigerung der AG1478-Konzentration auf 25, 50, 100 und 200  $\mu$ M weder eine Aufhebung der EGF-Rezeptorphosphorylierung, noch eine Abschwächung dieser erreicht werden (siehe Darstellung mit Ang II in Kapitel 4.1.2.3, Abbildung 24).

### **4.1.2 EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II**

Nachdem das Ansprechen des EGF-Rezeptors auf EGF und den Inhibitor AG1478 gesichert war, wurde die Reaktion des EGF-Rezeptors nach Angiotensin II-Zugabe und nach Zugabe des Angiotensin II Typ 1 Rezeptorantagonisten Olmesartan und des Angiotensin II Typ 2 Rezeptorantagonisten PD123,319 in die Zellkultur untersucht.

#### **4.1.2.1 EGF-Rezeptorphosphorylierung nach Zellstimulation mit verschiedenen Angiotensin II-Konzentrationen**

Eine Veränderung der Phosphorylierungsstärke des EGF-Rezeptors konnte für alle untersuchten Zelllinien gezeigt werden. Angiotensin II wurde in den Konzentrationen  $10^{-5}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-7}$  M und  $10^{-8}$  M zugesetzt. Die einheitliche Inkubationszeit betrug 8 Minuten. Es resultierte die stärkste EGF-Rezeptorphosphorylierung für MKN45, AGS und N87 bei  $10^{-6}$  M Ang II und für MKN28 bei  $10^{-8}$  M Ang II (siehe Abbildung 22).



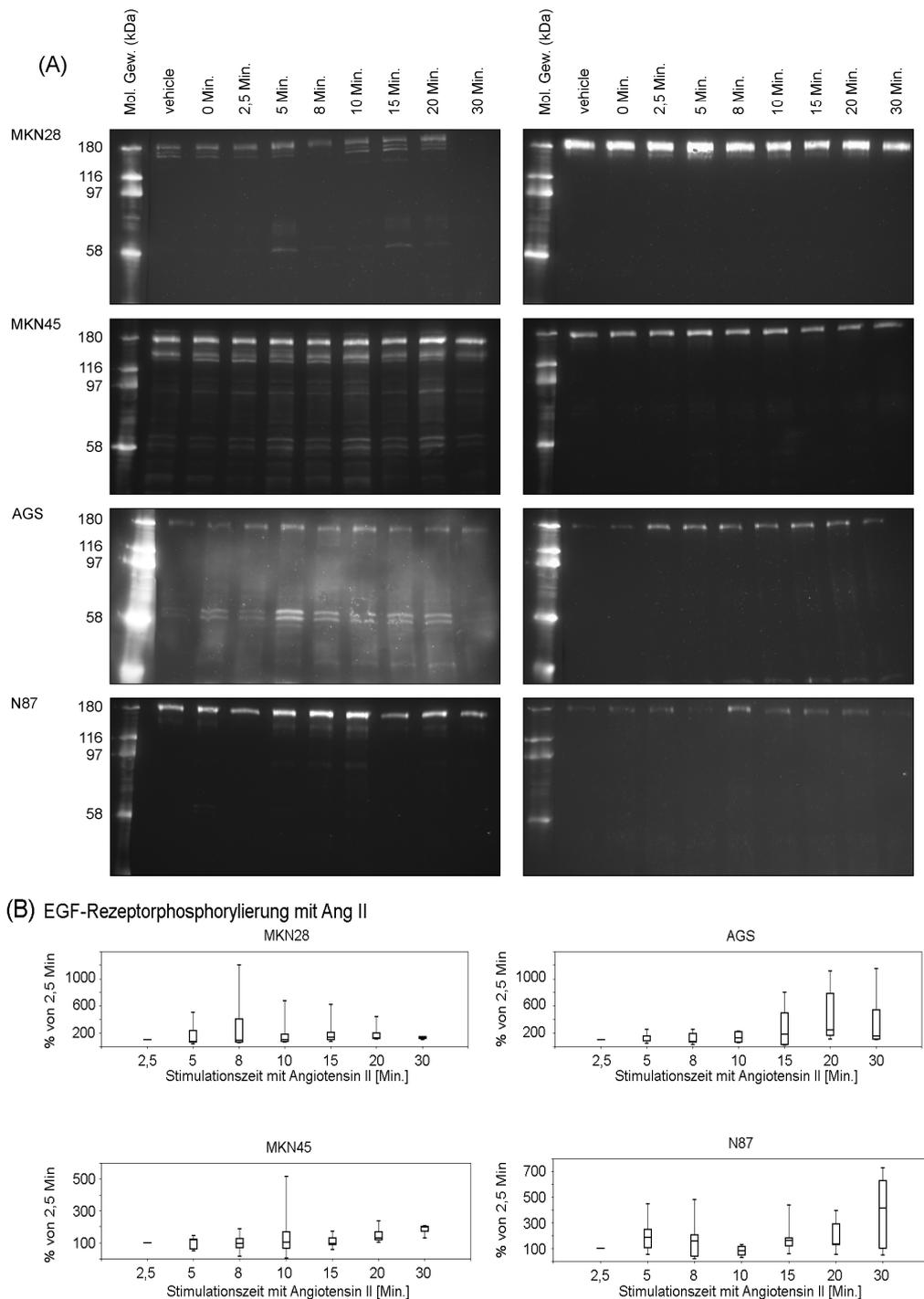
**Abb. 22: Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II.**

(A) zeigt die EGF-Rezeptorphosphorylierung zum Zeitpunkt 8 Min. mit verschiedenen Ang II-Konzentrationen. Die Stimulation erfolgte ohne Zugabe von Ang II (vehicle) und mit Zugabe von Ang II von  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  M Ang II in die Zellkultur. Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem 4G10-Antikörper (links) und dem 13G8-Antikörper (rechts). Gezeigt werden die Beispielaufnahmen nach 50 Min. Belichtungszeit. (B) zeigt die EGF-Rezeptorphosphorylierung aller vier Zelllinien. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile.

#### **4.1.2.2 EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II nach verschiedenen Inkubationszeiten**

Die Stimulation von N87 erfolgte mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II. MKN45 und AGS wurden mit  $10^{-7}$  M Angiotensin II und MKN28 mit  $10^{-8}$  M Angiotensin II stimuliert. Diese Konzentrationen wurden nach dem optischen Vergleich der Immunfärbungen mit dem Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 ausgewählt. Die Auswertung mit GeneTools und Excel nach Formel (1), die zu den Ergebnissen von 4.1.2.1 führte, erfolgte erst, nachdem schon einige Versuche mit verschiedenen Inkubationszeiten von Angiotensin II durchgeführt worden waren. Da sich trotzdem Effekte zeigten, wurden die Angiotensin II-Konzentrationen beibehalten.

Als Vergleichsstärke diente die Phosphorylierungsstärke nach 2,5 Minuten. Die maximalen Unterschiede zum Vergleichswert wurden nach 8-minütiger Stimulation von MKN28 mit  $10^{-8}$  M Angiotensin II, nach 10-minütiger Stimulation von AGS und MKN45 mit  $10^{-7}$  M Angiotensin II und nach 5-minütiger Stimulation von N87 mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II beobachtet (siehe Abbildung 23).

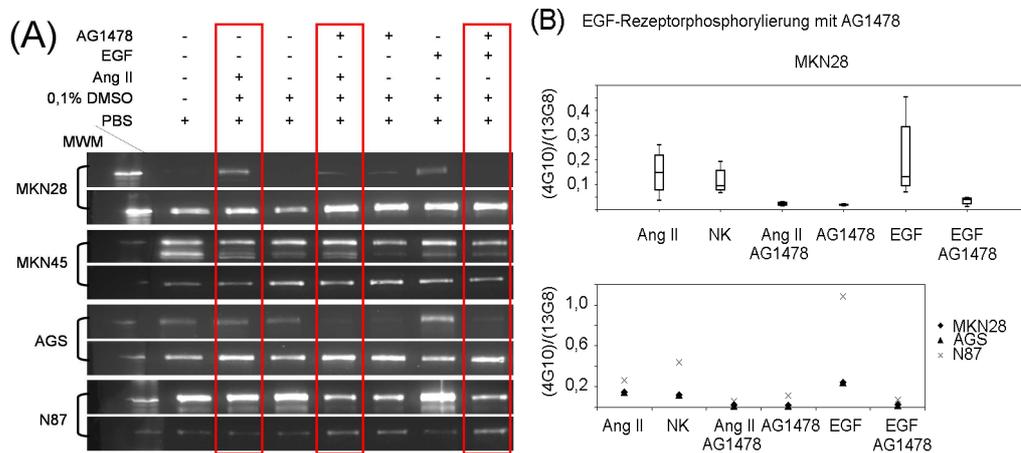


**Abb. 23: Zeitverlauf der EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II.**

(A) Die Stimulation von MKN28, MKN45, AGS und N87 erfolgte ohne Zugabe von Ang II (vehicle und 0 Min.) und mit Zugabe von  $10^{-6}$  M (N87),  $10^{-7}$  M (MKN45, AGS) bzw.  $10^{-8}$  M (MKN28) Angiotensin II in die Zellkultur. Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 (linke Bildhälfte) und dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (rechte Bildhälfte). Gezeigt werden die Aufnahmen nach 20 Min. (MKN45) bzw. 35 Min. Belichtungszeit (MKN28, AGS). Bei N87 wurde die Tyrosinphosphorylierung nach 20 Min., die EGF-Rezeptorladekontrolle nach 50 Min. Belichtungszeit dargestellt. (B) zeigt die Auswertung der Experimente als Vielfaches zum Zeitpunkt 2,5 Min. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile.

### 4.1.2.3 Die EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II lässt sich durch AG1478 deutlich einschränken

Die EGF-Rezeptorphosphorylierung konnte nach Angiotensin II-Zugabe entsprechend den Resultaten der Etablierungsexperimente mit EGF deutlich abgeschwächt bzw. vollständig aufgehoben werden (siehe Abbildung 24). Durch eine 30-minütige Vorinkubation mit je 10  $\mu$ M AG1478 führte eine 8-minütige Stimulierung von MKN28 mit  $10^{-8}$  M Angiotensin II bzw. von AGS mit  $10^{-7}$  M Angiotensin II zu einer um 88% (MKN28) bzw. 92% (AGS) reduzierten EGF-Rezeptorphosphorylierung. Eine 5-minütige Stimulierung von N87 mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II wurde durch 20  $\mu$ M AG1478 deutlich eingeschränkt (um 75%). Die Effekte waren jeweils mit den Ergebnissen der von AG1478 aufgehobenen EGF-Rezeptorphosphorylierung nach Stimulation mit EGF vergleichbar.



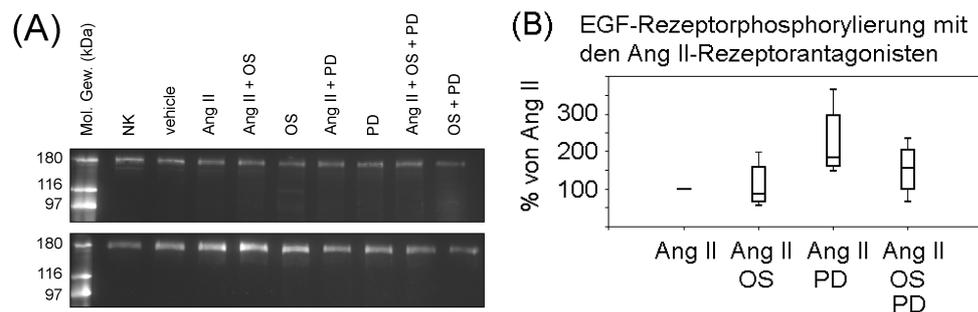
**Abb. 24: Tyrosinphosphorylierung nach AG1478-Vorinkubation.**

(A) Dargestellt sind die Immunfärbungen mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-antikörper 4G10 (obere Zeilen) und dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (untere Zeilen). Die Stimulation erfolgte mit Ang II und EGF mit und ohne Vorinkubation mit AG1478. Die NK entspricht hier der Stimulation allein mit PBS. Für MKN45 zeigt sich eine nahezu unveränderte EGF-Rezeptorphosphorylierung nach AG1478-Vorinkubation. (B) Dargestellt ist die Auswertung für MKN28 von drei gleichwertigen Experimenten in Form von Boxplots mit der 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile. Darunter der Verlauf der Mittelwerte für MKN28, AGS und N87. Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse wurde das Experiment für die Stimulation mit EGF und Ang II für AGS und N87 lediglich ein- bis zweimal wiederholt.

#### 4.1.2.4 Die EGF-Rezeptorphosphorylierung in MKN28 ist nach Antagonisierung des Angiotensin II Typ 2 Rezeptors erhöht

Für diese Experimente wurden der Angiotensin II Typ 1 Rezeptorantagonist Olmesartan (OS) und der Angiotensin II Typ 2 Rezeptorantagonist PD123,319 (PD) verwendet. Die Angiotensinrezeptorantagonisten wurden jeweils in den Konzentrationen 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M und 40  $\mu$ M mit 45-minütiger Vorinkubation eingesetzt. Eine eindeutige Veränderung in der EGF-Rezeptorphosphorylierung wurde bei Konzentrationen von je 40  $\mu$ M erreicht.

Im Vergleich zu einer Stimulation von MKN28 allein mit  $10^{-8}$  M Angiotensin II, zeigte die Zugabe von Olmesartan keine Veränderung in der EGF-Rezeptorphosphorylierung, genau wie die gleichzeitige Zugabe von Olmesartan und PD123,319 (siehe Abbildung 25). Die Zugabe von PD123,319 führte zu einem starken Anstieg in der EGF-Rezeptorphosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Für die Zelllinien AGS und N87 konnten nach je drei Wiederholungsexperimenten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.



**Abb. 25:** Tyrosinphosphorylierung nach Vorinkubation mit den Antagonisten der Angiotensinrezeptoren in MKN28.

(A) Dargestellt sind exemplarisch die Immunfärbungen mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosinantikörper 4G10 (obere Zeile) und dem monoklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 (untere Zeile) für 1 Experiment jeweils nach 50 Min. Belichtungszeit. (B) Dargestellt ist die Auswertung von drei gleichwertigen Experimenten als Vielfaches der von Ang II nach acht Minuten hervorgerufenen EGF-Rezeptorphosphorylierung. Die Boxplots zeigen die 10., 25., 50., 75. und 90. Perzentile.

## **4.2 Diskussion**

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Verbindung zwischen dem LAS und dem EGF-Rezeptor im Magenkarzinom zu prüfen und damit einen möglichen Weg der Beteiligung des LAS an der Kanzerogenese des Magenkarzinoms zu untersuchen.

Nachdem die dafür notwendigen Methoden etabliert waren, erfolgte zunächst die Untersuchung der EGF-Rezeptorexpression in den hier verwendeten Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87. Die Expression war Voraussetzung für die Durchführung der Transaktivierungsexperimente mit Angiotensin II.

Zur Kontrolle der EGF-Rezeptorphosphorylierung erfolgte die Stimulation des EGF-Rezeptors mit EGF. Nach Angiotensin II-Zugabe in die Zellkultur wurde der Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors alleine durch Angiotensin II und in Kombination mit dem EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 sowie den Angiotensinrezeptorantagonisten Olmesartan und PD123,319 untersucht.

### **4.2.1 Die EGF-Rezeptorexpression und die Reaktion auf Stimulation mit EGF**

Die EGF-Rezeptorexpression auf Proteinebene und die Zellkulturexperimente mit EGF und dem EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 ergaben Unterschiede zwischen den Zelllinien. Am auffälligsten waren die Unterschiede zwischen den aus sehr unterschiedlichen Tumortypen gewonnenen Zelllinien N87 und MKN45.

#### **4.2.1.1 Die zelluläre Lokalisation und der Dimerisationspartner könnten für die Reaktion des EGF-Rezeptors auf EGF verantwortlich sein**

Der Vergleich zwischen der unterschiedlichen Bandenstärke nach Immunfärbung der Western Blots und der gleichmäßigen Bandenstärke in der RT-PCR lässt auf unterschiedlich starke EGF-Rezeptorexpression auf Proteinebene in den untersuchten Zelllinien schließen. Auffällig ist die unterschiedliche EGF-Rezeptorproteinexpression in MKN45 und N87 (siehe Abbildung 19). Betrachtet man die Formen der Adenokarzinome aus denen die Zelllinien ursprünglich gewonnen wurden, könnte der EGF-Rezeptor in N87 (gut differenzierter Tumortyp) eher mit der Differenzierung in Verbindung stehen. In Magenkarzinomproben konnte von Matsubara et al.<sup>140</sup> eine Verbindung zwischen der Höhe der EGF-Rezeptorexpression und der Höhe des UICC-Tumorstadiums gefunden werden<sup>140</sup>.

Eine Erklärung für diesen scheinbaren Gegensatz könnte in der zellulären Lokalisation des EGF-Rezeptors liegen, die hier und von Matsubara et al.<sup>140</sup> nicht differenziert untersucht wurde. Es wäre möglich, dass die Mehrzahl der Rezeptormoleküle in N87 sich in Caveolae oder an der Oberfläche von Endosomen befindet, die sich erst bei höheren Ligandenkonzentrationen mit der Zellmembran verbinden und so für eine Aktivierung zugänglich werden<sup>36</sup>. Auf diese Weise wäre eine hohe EGF-Rezeptorexpression mit einer geringen Proliferationsrate vereinbar. Hier könnten immunzytochemische Färbungen an N87 weiteren Aufschluss liefern.

Nach der Inhibierung mit AG1478 zeigte sich bei N87 eine starke Abnahme der Phosphorylierung, die sich jedoch nicht vollständig unterdrücken ließ. Es wäre möglich, dass in N87 der EGF-Rezeptor in geringem Maße auch mit HER2 ein Dimer bildet. Letzterer gilt als bevorzugter Dimerisationspartner des EGF-Rezeptors, von HER3 und HER4. Zudem besitzt dieser eine konstitutiv aktive Konformation, was die fortgesetzte Phosphorylierung nach AG1478-Zugabe erklären würde<sup>45; 80</sup>. Durch die Dimerisierung mit dem HER2 ist die Cbl-Bindung inhibiert, was den Abbau des Rezeptorkomplexes verlangsamt<sup>17</sup>. Eine Degradation der Rezeptorheterodimere kann trotzdem stattfinden, wenn der EGF-Rezeptorlevel oberhalb dem von HER2 liegt<sup>231</sup>. Das ist hier zu erwarten, da AG1478 in einer den EGF-Rezeptor hemmenden Konzentration einen eindeutigen Effekt gezeigt hat. Die Vorinkubation mit einer AG1478-Konzentration von 100 µM, die laut Herstellerangaben auch den HER2 hemmt, wurde bei N87 nicht durchgeführt, da der beobachtete Effekt für das Ziel dieser Arbeit ausreichend war.

#### **4.2.1.2 In N87 wird möglicherweise hauptsächlich EGF freigesetzt**

Zusätzlich zu der in N87 durch AG1478 nicht komplett hemmbaren EGF-Rezeptorphosphorylierung wurde bei den mit AG1478 vorbehandelten Zellen eine Zunahme der EGF-Rezeptormenge beobachtet (siehe Abbildung 24). Möglicherweise wird in N87 hauptsächlich EGF für die auto- oder parakrine Grundstimulation des EGF-Rezeptors freigesetzt<sup>206</sup>. Nach der Bindung von EGF an seinen Rezeptor, kommt es bei Dimerisierung über die Bindung von Cbl, CIN85 und Ubiquitin zur Degradation des Ligandenrezeptorkomplexes<sup>30; 57; 231</sup>. Die Menge des EGF-Rezeptors verringert sich dadurch innerhalb der Zelle nach 20 bis 30 Minuten<sup>30; 87</sup>. Dieser Effekt könnte in den mit AG1478 nicht vorbehandelten Zellen zu einer geringeren EGF-Rezeptorkonzentration führen. Es wäre möglich, dass durch die 30-minütige Vorinkubation AG1478 nach einer Hypothese von Gan et al.<sup>73</sup> zur Formierung von inaktiven Dimeren geführt hat. Die

Autoren beobachteten bereits nach einer Inkubation mit AG1478 von 20 Minuten konformationelle Änderungen am EGF-Rezeptorprotein. Dadurch unterbleibt möglicherweise die Degradation des EGF-Rezeptors, was zu einer größeren präzipitierten Proteinmenge führt.

Eine Zunahme der Proteinmenge durch AG1478 wurde in den anderen Zelllinien nicht beobachtet. Möglicherweise wird in diesen Zelllinien hauptsächlich TGF- $\alpha$  für die Grundstimulation des EGF-Rezeptors freigesetzt, was im Gegensatz zu der Rezeptordegradation nach EGF-Bindung zu einer Rückverlagerung des EGF-Rezeptors an die Zelloberfläche führt<sup>228</sup>.

#### **4.2.1.3 Die fehlende Inhibierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung durch AG1478 in MKN45 kann verschiedene Ursachen haben**

Bei der Zelllinie MKN45 zeigte sich im Vergleich zu der eher geringen EGF-Rezeptorproteinkonzentration eine starke Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (vergleiche hierzu die Abbildungen 8 und 9). Es war zudem auffällig, dass diese sich nicht durch AG1478 hemmen ließ. Die Steigerung der AG1478-Konzentration bis auf 200  $\mu$ M blieb ebenfalls ohne Effekt (siehe Kapitel 4.1.1.4), so dass die Heterodimerisierung mit HER2 als Ursache für den fehlenden Effekt durch AG1478 ausscheidet.

Die Wirkungsweise des 4-(3-Chloroanilino)-6,7-Dimethoxyquinazolins AG1478 beruht auf einer kompetitiven Hemmung der ATP-Bindung an die Bindungstasche bei AS 721. Es gibt Hinweise dafür, dass es durch die Wirkung von AG1478 zu einer Dimerisierung der inhibierten Rezeptormonomere kommt<sup>9; 73</sup>. Die Formierung inaktiver Rezeptordimere durch Quinazoline nimmt sogar in Anwesenheit von Liganden zu, wie Lichtner et al.<sup>129</sup> für das Quinazolin PD153035 herausgefunden haben. Sie nehmen an, dass sich dadurch die Effekte dieser Tyrosinkinaseinhibitoren potenzieren, da nicht nur der Rezeptor gehemmt wird, sondern die freien Liganden durch ihre Bindung in den Komplex weggefangen werden. Möglicherweise bewirkt AG1478 eine Fixierung der durch die Ligandenbindung hervorgerufenen Dimerisierung. Diese fixierten Dimere könnten dann die Signalweiterleitung in das Zellinnere verhindern.

Da es bei MKN45 keine Unterschiede in der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors mit oder ohne AG1478-Vorinkubation gab, sollte der fehlende Effekt durch den Inhibitor auf andere Ursachen zurückzuführen sein:

- a) Es sind Mutationen des EGF-Rezeptors beschrieben, bei denen die Ligandenbindungsstelle durch alternatives Splicing nicht vorhanden ist<sup>227</sup>. Die EGFRvIII-Mutation mit

einem Molekulargewicht von 145 kDa könnte eine Erklärung für die ausgeprägte Doppelbande in der 4G10-Färbung bei MKN45 sein (siehe beispielsweise Abbildung 21)<sup>173</sup>. Der zur Immunpräzipitation verwendete polyklonale Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005 bindet carboxyterminal an das EGF-Rezeptorprotein. Damit sollte auch EGFRvIII mitpräzipitiert werden können. Diese Möglichkeit scheint jedoch auszuschließen: Der zur Ladekontrolle verwendete monoklonale Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8 bindet auch carboxyterminal an die AS 1165 bis 1186. Damit müsste, wenn EGFRvIII beispielsweise nach Dimerisierung mit dem EGF-Rezeptor oder mit HER2 zusammen präzipitiert wird, in der 13G8-Färbung mindestens eine Bande bei 145 kDa zu sehen sein.

- b) Es könnte sich um eine Mutation der ATP-Bindungsstelle handeln. Die Mutation Lys721Ala verhindert die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors<sup>153</sup>. Die Mutation Lys721Arg verhindert bei Inkubation mit AG1478 die Bildung von inaktiven Rezeptordimeren<sup>9</sup>. Wird die Dimerisierung als Zeichen für die Wirkung von AG1478 gedeutet, wäre der Inhibitor möglicherweise bei Mutationen an der ATP-Bindungsstelle wirkungslos. Es scheint sich jedoch um artifiziell erzeugte Mutationen zu handeln, da sie in den vorliegenden Arbeiten experimentell erzeugt wurden und bisher keine Beschreibung in Mutationsanalysen von Geweben existiert.

Die Untersuchung von 77 Tumorproben von Moutinho et al.<sup>157</sup> zeigte, dass Mutationen des EGF-Rezeptors im Magenkarzinom sehr selten sind. Aber sie fanden einen Zusammenhang mit dem diffusen Wachstumstyp, den auch MKN45 zeigt. Kimura et al.<sup>117</sup> untersuchten Mutationen des EGF-Rezeptors in sechs Magenkarzinomzelllinien, darunter auch MKN45. Sie fanden die *Missense*-Mutation Ala1048Val innerhalb der carboxyterminalen Autophosphorylierungsdomäne. Die biologischen Auswirkungen wurden von Kimura et al. nicht beschrieben. Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit könnte Ala1048Val möglicherweise zu einer auf konformationeller Änderung beruhenden, durch AG1478 nicht hemmbaren, Aktivierung des EGF-Rezeptors führen. Ein solcher Effekt wurde von Miloso et al.<sup>148</sup> für die Punktmutation Glu627Val beobachtet. Es ist auch ein allosterischer Effekt durch die Mutation denkbar, die die ATP-Bindungsstelle für AG1478 unzugänglich macht.

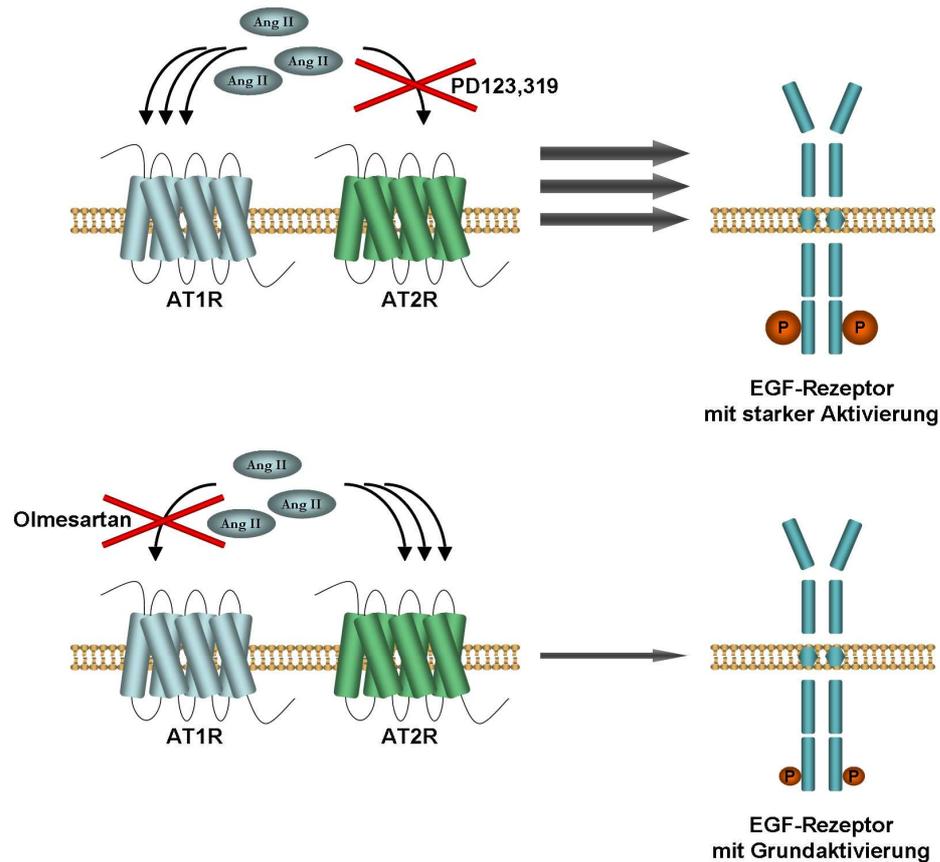
- c) Alternativ könnte eine gesteigerte Transkriptionsrate zu einem solchen Anstieg von EGF-Rezeptorprotein oder seiner Liganden führen, dass eine Inhibierung nicht mehr nachweisbar wäre. Keates et al.<sup>115</sup> beobachteten, dass eine *H. pylori* induzierte Hochregulation des EGF-Rezeptors in AGS-Zellen nach vier bis sechs Stunden eintritt.

Huang et al.<sup>98</sup> konnten die durch Angiotensin II gesteigerte Translation von MMP2 und -9, zwei Metalloproteinasen, die Pro-HB-EGF spalten können, in MKN28 nach etwa 12 Stunden zeigen. Die Erklärung der fortgesetzten EGF-Rezeptorphosphorylierung durch gesteigerte Transkriptionsraten erscheint, gestützt durch diese beiden Beispiele, bei der hier verwendeten 30-minütigen Vorinkubation von AG1478 eher unwahrscheinlich.

Nachdem die Inhibierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung in MKN45 nicht unterbrochen werden konnte, wurde im Folgenden nur eine eventuelle Steigerung der EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II untersucht. Für den Fall, dass in MKN45 eine Mutation oder eine Heterodimerisierung mit HER2 vorliegt, sollten jedoch die Ergebnisse aus den Stimulationsexperimenten mit Angiotensin II für diese Zelllinie mit Vorsicht betrachtet werden. Auf die Untersuchung der EGF-Rezeptorphosphorylierung nach Zugabe der AT1R- und AT2R-Antagonisten wurde wegen der unsicheren Deutbarkeit der Ergebnisse verzichtet.

#### **4.2.2 EGF-Rezeptortransaktivierung durch Angiotensin II über den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor**

Die Ergebnisse zeigen, dass der EGF-Rezeptor in den Magenkarzinomzelllinien MKN28, AGS und N87 durch Angiotensin II transaktiviert wird. In den Experimenten mit verschiedenen Angiotensin II-Konzentrationen und verschiedenen Stimulationszeiten lässt sich eine Veränderung in der EGF-Rezeptorphosphorylierung nachweisen (siehe Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2). Die Experimente mit dem spezifischen EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 zeigen, dass eine durch Angiotensin II hervorgerufene, oberhalb des Ausgangsniveaus liegende Phosphorylierung am EGF-Rezeptor unterbrochen werden kann. Zusätzlich konnte für MKN28 gezeigt werden, dass Angiotensin II den EGF-Rezeptor über die Aktivierung des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors transaktiviert (siehe Kapitel 4.1.2.4). Die Antagonisierung der Angiotensin II-Bindung an den AT1R mit Olmesartan führte eher zu einer Verminderung der EGF-Rezeptorphosphorylierung. Bei Inhibition der AT2R-Aktivierung durch PD123,319 war dagegen eine deutliche Steigerung der über den AT1R vermittelten EGF-Rezeptorphosphorylierung zu beobachten. Abbildung 26 verdeutlicht schematisch die Antagonisierung der Angiotensinrezeptoren und die daraus resultierenden Effekte am EGF-Rezeptor.



**Abb. 26:** Die EGF-Rezeptoraktivierung durch Ang II erfolgt über den AT1R.

**Oben:** Bei Antagonisierung der Angiotensin II-Bindung an den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor mit PD123,319 wird das Signal über den AT1R geleitet. Es kommt im Anschluss zu einer starken EGF-Rezeptoraktivierung verglichen mit dem Ausgangszustand. **Unten:** Die Antagonisierung der Angiotensin II-Bindung an den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor mit Olmesartan führt nur zu einer der Grundaktivierung des EGF-Rezeptors entsprechenden EGF-Rezeptoraktivierung. Verantwortlich sind hier vermutlich die über den AT2R aktivierten Phosphotyrosinphosphatasen.

Wie in anderen Organsystemen anhand von *in vitro* Experimenten bereits gezeigt wurde, ist die Transaktivierung des EGF-Rezeptors ein Signalweg, über den Angiotensin II auf den Zellstoffwechsel wirken kann. In glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) verursachte Angiotensin II über die Freisetzung von HB-EGF Zellhypertrophie<sup>165</sup>, Zellproliferation und -migration<sup>235</sup>. Über den Anstieg der intrazellulären  $Ca^{++}$ -Konzentration führte eine AT1R vermittelte EGF-Rezeptoraktivierung in VSMC der Ratte zu einer Aktivierung von MAP-Kinasen<sup>61</sup>.

Die unkontrollierte Zellproliferation und die Fähigkeit von Zellen zur unkontrollierten Migration sind zwei von sechs essentiellen Eigenschaften, die laut Hanahan und Weinberg<sup>90</sup> eine Tumorzelle charakterisieren. Dass Angiotensin II über seine Transaktivierung des EGF-Rezeptors entsprechende Effekte im Magenkarzinom

hervorrufen kann, lassen die Ergebnisse von Röcken et al.<sup>181</sup> vermuten. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen dem ACE-Genotyp und dem Nodalstatus des Magenkarzinoms vom intestinalen Typ herstellen. Der ACE-DD-Genotyp war dabei mit einem höheren UICC-Tumorstadium und einer höheren Anzahl von Lymphknotenmetastasen verbunden. Röcken et al.<sup>182</sup> untersuchten weiterhin die AT1R- und AT2R-Expression im Magenkarzinom vom intestinalen, diffusen, gemischten und unbestimmten Typ. Der AT1R konnte in 26%, der AT2R in 95% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen aller Tumortypen nachgewiesen werden. Im Magenkarzinom vom intestinalen Typ korrelierte die AT1R-Expression mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen, der N-Kategorie und dem UICC-Tumorstadium<sup>182</sup>. Unabhängig vom ACE-Genotyp lag das relative Risiko für Lymphknotenmetastasen in allen Tumortypen, ausgenommen dem diffus wachsenden Typ, bei AT1R<sup>+</sup>-Status bei 4,40. Bei gleichzeitigem Vorliegen des ACE-ID- oder ACE-DD-Genotyps, stieg das relative Risiko, verglichen mit dem Vorliegen des ACE-II-Genotyps, sogar auf 13,00 bzw. 19,00<sup>182</sup>. Bei Vorliegen der beiden erstgenannten ACE-Genotypen besitzt das ACE eine höhere Plasmakonzentration. Möglicherweise wird dadurch mehr Angiotensin II bereitgestellt.

In anderen Tumorzelllinien konnte die Angiotensin II vermittelte EGF-Rezeptortransaktivierung bereits nachgewiesen werden. Greco et al.<sup>81</sup> konnten die Transaktivierung in Brustkrebszellen nachweisen. In diesem Fall löste Angiotensin II die EGF-Rezeptor vermittelte Aktivierung von ERK1/2 und eine gesteigerte Tumorzellproliferation aus. In humanen Leberkarzinomzelllinien wurde die Aktivierung von ERK1/2, STAT3 und Akt durch Inhibierung der Ang II vermittelten EGF-Rezeptortransaktivierung gehemmt<sup>106</sup>.

Letztlich muss davon ausgegangen werden, dass der EGF-Rezeptor über die von Angiotensin II ausgelösten Signalwege direkt affektiert wird. Durch die Funktionsweise des EGF-Rezeptors kommen dafür drei mögliche Wege in Frage: (1) Angiotensin II aktiviert intrazelluläre Tyrosinkinasen, die den EGF-Rezeptor phosphorylieren. (2) Angiotensin II inhibiert intrazelluläre Phosphotyrosinphosphatasen. (3) Angiotensin II setzt über die Aktivierung von Metalloproteasen die Liganden des EGF-Rezeptors frei. Durch die Hemmung der ATP-Bindungsstelle mithilfe von AG1478 konnten in dieser Arbeit sowohl der intra- als auch der extrazelluläre Aktivierungsweg des EGF-Rezeptors inhibiert werden.

#### 4.2.2.1 Intrazelluläre EGF-Rezeptortransaktivierung

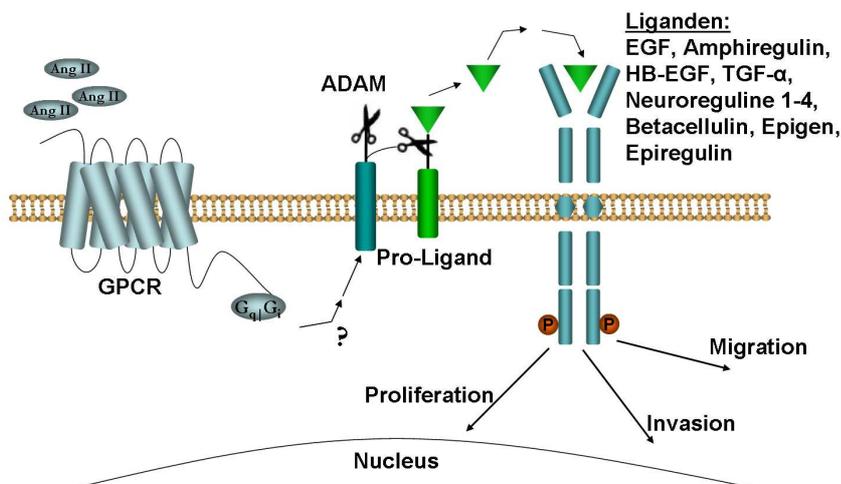
Für die Nichtrezeptortyrosinkinasen Jak2 und Src konnte die intrazelluläre EGF-Rezeptorphosphorylierung gezeigt werden<sup>21; 216; 234</sup>. Beide Tyrosinkinasen werden auch von AT1R aktiviert<sup>105; 131; 136</sup>. Ali et al.<sup>5</sup> konnten die Assoziation von Jak2 an das YIPP-Motiv nachweisen. Biscardi et al.<sup>21</sup> fanden in Brustkrebszellen einen Zusammenhang zwischen der Src abhängigen EGF-Rezeptorphosphorylierung und der damit zusammenhängenden DNA-Synthese. Seta et al.<sup>196</sup> konnten in COS7-Zellen, einer aus afrikanischen Affen gewonnenen Nierenfibroblastenzelllinie, nachweisen, dass dafür die Tyrosinseitenkette an Position 319 innerhalb des YIPP-Motivs nötig ist. Sie bindet das SH2-Domänehaltige Adapterprotein SHP-2, das wiederum die Bindung an den EGF-Rezeptor vermittelt. Die dadurch erfolgte ERK1/2-Aktivierung konnte durch AG1478 verhindert werden. Shah et al.<sup>197</sup> konnten 2004, auch an COS7-Zellen, zeigen, dass es bei einer inhibierenden Mutation an Tyrosin 319 trotzdem zur Aktivierung von ERK1/2 kam, die sich durch den Metalloproteaseinhibitor GM6001 hemmen ließ. Das bedeutete, dass die Transaktivierung des EGF-Rezeptors den Alternativweg über die Freisetzung der EGF-Rezeptorliganden genommen hatte. Allerdings existieren hier widersprüchliche Ergebnisse. Diegleiche Nullmutation führte bei Seta et al.<sup>196</sup> zu einer durch AG1478 nicht hemmbaren ERK1/2-Aktivierung, während Shah et al. die ERK1/2-Aktivierung durch AG1478 hemmen konnten. Die Ergebnisse von Seta et al. lassen auf einen alternativen intrazellulären EGF-Rezeptortransaktivierungsweg schließen.

Die den EGF-Rezeptor bezüglich seiner Aktivierung negativ effektierenden Phosphotyrosinphosphatasen sind die PTP-1B und die SHP-1<sup>88; 234</sup>. In VSMC von Mäusen führte die selektive AT2R-Aktivierung zu einer gesteigerten SHP-1-Aktivität<sup>200</sup>. Das führte im Anschluss zu einer verminderten EGF-Rezeptorphosphorylierung und einer verminderten ERK-Aktivität. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Angiotensin II über den AT2R eine inhibierende Wirkung am EGF-Rezeptor auch in den Magenkarzinomzelllinien ausübt (siehe Kapitel 4.1.2.4). In MKN28 scheint die durch die Aktivierung des AT2R gesteigerte Phosphataseaktivität die EGF-Rezeptorphosphorylierung nahezu vollständig zu verhindern (zur Verdeutlichung siehe Abbildung 26).

#### 4.2.2.2 EGF-Rezeptortransaktivierung durch Freisetzung von Liganden des EGF-Rezeptors

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Möglichkeit einer dem Modell des TMPS (siehe dazu Abbildung 27) folgenden EGF-Rezeptortransaktivierung im Magenkarzinom zu. Obwohl der Gebrauch von AG1478 hier sowohl den intra-, als auch den extrazellulären EGF-Rezeptortransaktivierungsweg zulässt, liegt der Verdacht einer über die Freisetzung der EGF-Rezeptorliganden vermittelten EGF-Rezeptortransaktivierung aus verschiedenen Gründen nahe. Die beschriebenen unterschiedlichen Ergebnisse von Shah et al.<sup>197</sup> und Seta et al.<sup>196</sup> lassen den intrazellulären EGF-Rezeptoraktivierungsweg nicht zuletzt eher unwahrscheinlich erscheinen.

Der extrazelluläre Transaktivierungsweg wird durch die Ergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen gestützt. Carl-McGrath et al.<sup>32</sup> konnten eine Überexpression von ADAM9, -12 und -15 im Magenkarzinom nachweisen. Zusätzlich fanden sie in den hier untersuchten Magenkarzinomzelllinien eine hohe Expression dieser Metalloproteasen. Dadurch kann angenommen werden, dass die Transaktivierung des EGF-Rezeptors über die Freisetzung seiner Liganden geschieht. ADAM9, -12 und -15 sind an der Spaltung von Pro-HB-EGF beteiligt. Ein weiteres Indiz liefert die Arbeit von Huang et al.<sup>98</sup>. Sie konnten in MKN28 die von Angiotensin II induzierte, gesteigerte Transkription von MMP2 und -9 nachweisen. Zudem konnte die HB-EGF vermittelte Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch Angiotensin II bereits in glomerulären Podozyten<sup>69</sup>, Mesangialzellen<sup>221</sup>, VSMC<sup>165; 235</sup>, intestinalen Epithelzellen<sup>44</sup> und COS7-Zellen<sup>147</sup> gezeigt werden.



**Abb. 27: Das Triple Membrane Passing Signal.**

Die EGF-Rezeptortransaktivierung nach GPCR-Aktivierung geschieht unter Einbeziehung der ADAMs, die die EGF-Rezeptorliganden aus ihrer Membranverankerung freilassen.

Wie es nach AT1R-Aktivierung zu einer Aktivierung der ADAMs kommt, konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. In COS7-Zellen konnte nach einem AT1R vermittelten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration und einer konsekutiven Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies die HB-EGF-Freisetzung belegt werden. Der AT1R könnte hier über das  $G_q$ -Protein auf die ADAMs gewirkt haben. Durch eine dominant negative  $G_q$ -Mutation blieb die AT1R vermittelte HB-EGF-Freisetzung aus<sup>147</sup>. Möglicherweise ist auch das Protein Eve-1 an diesem Prozess beteiligt<sup>212</sup>. Dieses Protein besitzt SH3-Domänen und bindet an ADAM9, -10, -12, -15 und ADAM17. Nach dem Hemmen der Expression von Eve-1 mithilfe von siRNA reduzierte sich die Freisetzung von HB-EGF in mit Angiotensin II stimulierten humanen Fibrosarkomzelllinien. Für ein weiteres Protein mit einer SH3-Domäne, das PACSIN3, konnte die Assoziation mit ADAM9, -10, -12, -15 und -19 in humanen Sarkomzellen nachgewiesen werden. Eine Inhibierung dieses Proteins mittels siRNA führte zu einer Verminderung der durch Angiotensin II freigesetzten HB-EGF-Menge<sup>155</sup>.

### 4.2.3 Ausblick

Um weitere Aufschlüsse über den Weg der EGF-Rezeptortransaktivierung zu erhalten, sollte die EGF-Rezeptorphosphorylierung nach Inhibierung der ADAMs, beispielsweise mit dem Breitspektrummetalloproteaseinhibitor GM6001, untersucht werden. Ebenso könnte der von den ADAMs freigesetzte EGF-Rezeptorligand bestimmt werden. Der Ligand kann Hinweise auf das vom EGF-Rezeptor ausgelöste Signal geben<sup>180</sup>. Ligandenspezifisch wird eine der Tyrosinseitenketten phosphoryliert. Je nach aktivierter Seitenkette wird eine spezifische Signalkaskade aktiviert<sup>135</sup>.

Die eingeschaltete Signalkaskade kann dann Aufschlüsse über die von Angiotensin II auf molekularer Ebene ausgelösten Effekte geben. Die Einschaltung der PI3K könnte beispielsweise einen erhöhten Zellstoffwechsel bedeuten<sup>135; 145</sup>. Die PI3K wird auch von dem MET-Onkogen eingeschaltet, das im Magenkarzinom mit der Prognose korreliert und auch von AT1R über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eingeschaltet werden kann<sup>67; 158</sup>. Die Rekrutierung der  $\text{PLC}\gamma$  könnte für die durch Angiotensin II ausgelöste Invasion und Metastasierung mitverantwortlich sein<sup>214; 229</sup>. Das wäre möglicherweise ursächlich für den von Röcken et al.<sup>182</sup> beschriebenen Zusammenhang von  $\text{AT1R}^+$  und dem UICC-Tumorstadium. Die Aktivierung der ERK und MAP-Kinasen würde Hinweise für eine durch Ang II gesteigerte Tumorzellproliferation und -hypertrophie liefern<sup>142</sup>.

Gleichzeitig könnte über die Kenntnis des freigesetzten EGF-Rezeptorliganden möglicherweise eine Aussage über die Potenz des in diesem Fall erzeugten EGF-Rezeptorsignals gemacht werden. Die Freisetzung von TGF- $\alpha$  würde zu einem Signalende in den Endosomen führen, während nach Freisetzung von EGF die Rezeptorinternalisierung keinen Einfluss auf das Signal hätte<sup>70; 228</sup>.

Durch das Finden des Zusammenhangs von AT1R-Aktivierung und EGF-Rezeptortransaktivierung könnte die Inhibierung der Angiotensin II-Wirkung mit den bereits bekannten und eingesetzten Therapeutika zu einer hoffnungsvollen Ergänzung der aktuellen Magenkarzinomtherapie werden. Die durch AT1R-Antagonisten ergänzte Therapie des Magenkarzinoms könnte dabei besonders sinnvoll sein:

Bei der hohen Expressionsrate von AT2R im Magenkarzinom (95%)<sup>182</sup> wäre eine diesen Rezeptor ausnutzende Therapie nach den Ergebnissen dieser Arbeit von Vorteil. Die im Vergleich dazu relativ geringe AT1R-Expression (26%)<sup>182</sup> würde eine Evaluation des AT1R-Status nötig machen. Es kann angenommen werden, dass vor allem bei gleichzeitiger Expression von AT1R und AT2R die Blockade der AT1R-Aktivierung durch die Wirkstoffgruppe der Sartane eine potenzierte Wirksamkeit besitzt. Mithilfe der AT1R-Antagonisten würde einerseits die mitogene Wirkung des EGF-Rezeptors, ausgelöst durch AT1R, antagonisiert werden. Gleichzeitig würde die auf diese Weise verstärkte Signalauslösung über den AT2R zu einer gesteigerten Phosphataseaktivität führen, die im Verlauf nicht nur den EGF-Rezeptor hemmt, sondern auch Einfluss auf nachgeschaltete intrazelluläre Signalkinasen, wie ERK und MAP-Kinasen haben könnte. Dieser Mechanismus könnte die antiproliferativen und proapoptischen Effekte des AT2R für die Therapie des Magenkarzinoms ausnutzen. Hinweise dazu liefert auch die Arbeit von Huang et al.<sup>97</sup>. Sie fanden in den in Mäusen mit MKN28 induzierten Tumoren eine Reduktion der Tumorgöße um 70% bei Behandlung mit dem AT1R-Antagonist TCV-116 (Candesartan cilexetil) mit einer Konzentration von 5 mg/kg/Tag.

Auch der Einsatz von ACE-Inhibitoren kann möglicherweise die Therapie des Magenkarzinoms unterstützen. Kommt es zu einer EGF-Rezeptortransaktivierung über die Freisetzung von HB-EGF, lässt diese sich durch Inhibition von ACE möglicherweise reduzieren: Williams et al.<sup>232</sup> untersuchten die Wirkung des ACE-Inhibitors Captopril auf das Magenkarzinomwachstum im Mausmodell. Sie stellten zunächst eine durch Captopril verringerte Aktivität von MMP2 und -9 fest. Die aus der Magenkarzinomzelllinie MGLVA-1 entstandenen Tumore in der Maus zeigten eine Reduktion der Tumorgöße um 40 bis 50%, die durch die Kombination mit Cisplatin bis zu 71% erreichte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die Studien zu neuen Therapiemöglichkeiten des Magenkarzinoms mit monoklonalen Antikörpern gegen HER2<sup>177</sup>, VEGF<sup>198</sup> und den EGF-Rezeptor<sup>175</sup> zeigen, dass das Magenkarzinom höchstwahrscheinlich auch in Zukunft nur durch eine multimodale Therapie zu behandeln ist. Die unterschiedliche EGF-Rezeptorexpression in der dem schlecht differenzierten Magenkarzinom entsprechenden Zelllinie MKN45, im Gegensatz zu der dem gut differenzierten Magenkarzinom entsprechenden Zelllinie N87, erlaubt womöglich die Aussage, dass die Höhe der EGF-Rezeptorexpression im Magenkarzinom alleine nur geringe prognostische Aussagekraft besitzt. Möglicherweise ist dafür die Kenntnis, ob der Rezeptor vor allem intrazellulär, in Caveolae oder Endosomen, oder an der Zelloberfläche liegt, von Bedeutung. Hier könnten immunzytochemische Färbungen an MKN45 und N87 und immunhistochemische Färbungen an Tumorproben unter dieser Fragestellung weiteren Aufschluss liefern.

Möglicherweise muss für das Magenkarzinom das Expressionsmuster verschiedener Onkogene und Prognosemarker im Zusammenhang betrachtet werden. Die EGF-Rezeptortransaktivierung durch Angiotensin II lässt auf eine neue Möglichkeit der Beeinflussung der Prognose der Magenkarzinomerkrankung schließen. Die Inhibierung der Komponenten des LAS mit den bereits für die Behandlung der arteriellen Hypertonie zugelassenen AT1R-Antagonisten und ACE-Inhibitoren könnte nach den Ergebnissen dieser Arbeit, sowie von Röcken et al.<sup>182</sup>, Huang et al.<sup>97</sup> und Williams et al.<sup>232</sup>, eine hoffnungsvolle Ergänzung der bereits eingesetzten Chemotherapeutika sein.

## Kapitel 5 Zusammenfassung

---

Das Magenkarzinom liegt an zweiter Stelle der weltweit durch Tumorerkrankungen bedingten Todesfälle<sup>171</sup>. Neue Kombinationen der bisherigen Chemotherapieformen konnten das Überleben nicht wesentlich steigern. Die Wissenschaft der letzten Jahre konzentriert sich daher auf die Suche nach, den Verlauf der Erkrankung vorhersagenden, Prognosemarkern. Diese können möglicherweise auch einen Angriffspunkt für neue Therapieformen darstellen.

Der Epitheliale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-Rezeptor) spielt eine Schlüsselrolle in der Zellproliferation, der Zellinvasion und der Zellmigration. Seine Expression beträgt im Magenkarzinom bis zu 74%<sup>111</sup>. Das Verständnis der Aktivierungsmechanismen des EGF-Rezeptors ist für das Verständnis von Tumorbiologie und den daraus resultierenden Therapiemöglichkeiten von großer Bedeutung, besonders in Verbindung mit möglichen Prognosemarkern. Die EGF-Rezeptoraktivierung verhindernde Tyrosinkinaseinhibitoren oder monoklonale Antikörper, wie beispielsweise Cetuximab und Panitumumab, ergänzen zunehmend die Tumorthherapie. Auch für das Magenkarzinom wurden hier erste klinische Studien durchgeführt<sup>59; 175</sup>.

In den letzten Jahren ist die lokale Expression des Angiotensinsystems (LAS) zunehmend prognostisch interessant geworden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Angiotensin II Typ 1 Rezeptors (AT1R) mit dem Nodalstatus und dem UICC-Tumorstadium im Magenkarzinom vom intestinalen Typ korreliert<sup>182</sup>.

Der AT1R ist ein wichtiger G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR). Die Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch GPCRs wurde bisher in verschiedenen Geweben untersucht<sup>165; 235</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass an der EGF-Rezeptortransaktivierung membrangebundene Metalloproteasen, die sog. ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*), beteiligt sein können. Sie spalten die Vorstufen der EGF-Rezeptorliganden. Wird der EGF-Rezeptor unter Aktivierung der ADAMs transaktiviert, wird das als *Triple Membrane Passing Signal* (TMPS) bezeichnet<sup>95; 243</sup>.

Im Magenkarzinom konnte eine Überexpression von ADAM9, -12 und -15 nachgewiesen werden<sup>32</sup>. Zusätzlich wurde in den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87 eine hohe Expression dieser Metalloproteasen gefunden<sup>32</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Hypothese einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch Angiotensin II (Ang II) in den humanen Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87 untersucht. Damit sollte ein möglicher Weg der Beteiligung des LAS an der Kanzerogenese des Magenkarzinoms geprüft werden.

Um das EGF-Rezeptorprotein gezielt analysieren zu können, wurde die Methode der EGF-Rezeptorimmunpräzipitation (IP) etabliert. Die Expression des EGF-Rezeptors wurde mittels RT-PCR und Western Blot in den Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und N87 überprüft. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors nach EGF- (25 bis 200 ng/ml) bzw. Ang II-Zugabe ( $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  M) wurde alleine und in Kombination mit den Antagonisten AG1478, Olmesartan und PD123,319 in Zellkulturexperimenten untersucht. Die Auswertung erfolgte mithilfe von IP, SDS-PAGE, Western Blot, Immunfärbung und Chemolumineszenz. Die Bildauswertung erfolgte mit der G-Box, der GeneSnap-Software und der GeneTools-Software. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

Eine starke Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA-Ebene und seine Expression auf Proteinebene konnten für alle untersuchten Zelllinien gezeigt werden. Die für den Nachweis der EGF-Rezeptorphosphorylierung etablierte Methode der IP war aufgrund zahlreicher Verarbeitungsschritte eine in der Praxis aufwendige und mit interexperimentellen Schwankungen behaftete Methode. Mit der IP konnten im Rahmen dieser Arbeit folgende qualitative Aussagen gewonnen werden: Es konnte die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF für alle Zelllinien gezeigt werden. Die EGF-Rezeptortransaktivierung durch Ang II konnte für die Zelllinien MKN28, AGS und N87 sicher belegt werden. In den Experimenten mit dem spezifischen EGF-Rezeptorinhibitor AG1478 konnte eine durch Ang II hervorgerufene Phosphorylierung am EGF-Rezeptor unterbrochen werden. Zusätzlich konnte für MKN28 mithilfe von Olmesartan und PD123,319 gezeigt werden, dass die EGF-Rezeptortransaktivierung hauptsächlich über den AT1R erfolgt.

Aufgrund der hohen Expression von ADAM9, -12 und -15 in den hier untersuchten Magenkarzinomzelllinien<sup>32</sup>, ist eine EGF-Rezeptortransaktivierung durch Ang II über den Weg des TMPS sehr wahrscheinlich. Zur letztlichen Klärung sollten weitere Experimente, beispielsweise mit Metalloproteaseinhibitoren, durchgeführt werden.

Die von AT1R ausgehende Ang II vermittelte EGF-Rezeptortransaktivierung stützt die bereits bestätigte Verbindung zwischen einer erhöhten AT1R-Expression und einer

schlechteren Prognose im Magenkarzinom<sup>182</sup>. Die von AT2R aktivierten Phosphatasen scheinen einen inhibierenden Effekt auf den EGF-Rezeptor auszuüben<sup>18; 200</sup>.

Durch das Finden des Zusammenhangs von AT1R-Aktivierung und EGF-Rezeptor-transaktivierung könnte die Inhibierung der Angiotensin II-Wirkung mit den bereits bekannten und eingesetzten Therapeutika zu einer hoffnungsvollen Ergänzung der aktuellen Magenkarzinomtherapie werden. Die Blockade der AT1R-Aktivierung durch direkte Rezeptorantagonisten oder ACE-Inhibitoren könnte damit in Kombination mit EGF-Rezeptorinhibitoren die bestehenden Therapieformen des Magenkarzinoms effektiv ergänzen.

**Literaturverzeichnis**

1. Aaronson SA. Growth factors and cancer. *Science* 1991; **254** (5035):1146-53.
2. Abad A. New drugs in the treatment of gastric tumors. *Clin Transl Oncol* 2008; **10** (5):256-61.
3. Abe Y, Odaka M, Inagaki F, *et al.* Disulfide bond structure of human epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1998; **273** (18):11150-7.
4. Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie. Biochemisches Anfängerpraktikum für Chemiker und Biologen. Von: Fachbereich Chemie, Universität Hamburg, 2007, erhoben am: 10-12-2007 [www.chemie.uni-hamburg.de/bc/BC\\_Praktikum\\_Proteinchemie\\_III.pdf](http://www.chemie.uni-hamburg.de/bc/BC_Praktikum_Proteinchemie_III.pdf)
5. Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, *et al.* Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem* 1997; **272** (37):23382-8.
6. Allgayer H, Babic R, Grutzner KU, *et al.* An immunohistochemical assessment of cathepsin D in gastric carcinoma: its impact on clinical prognosis. *Cancer* 1997; **80** (2):179-87.
7. Anklesaria P, Teixido J, Laiho M, *et al.* Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor alpha to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; **87** (9):3289-93.
8. Archie V, Kauh J, Jones DV, Jr., *et al.* Gastric cancer: standards for the 21st century. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; **57** (2):123-31.
9. Arteaga CL, Ramsey TT, Shawver LK, Guyer CA. Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. *J Biol Chem* 1997; **272** (37):23247-54.
10. Aurello P, D'Angelo F, Rossi S, *et al.* Classification of lymph node metastases from gastric cancer: comparison between N-site and N-number systems. Our experience and review of the literature. *Am Surg* 2007; **73** (4):359-66.
11. Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP). Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Tarveca. Von: European Medicine Agency, 2007, erhoben am: 7-1-2009. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/tarceva/tarceva.htm>.
12. Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP). Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Vectibix. Von: European Medicine Agency, 2007, erhoben am: 7-1-2009. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/vectibix/vectibix.htm>.
13. Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP). Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Erbitux. Von: European Medicine Agency, 2008, erhoben am: 7-1-2009. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/erbitux/erbitux.htm>.
14. Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP). Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) Tyverb. Von: European Medicine Agency, 2008, erhoben am: 7-1-2009. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/tyverb/tyverb.htm>.
15. Bareschino MA, Schettino C, Troiani T, *et al.* Erlotinib in cancer treatment. *Ann Oncol* 2007; **18 Suppl 6**:vi35-vi41.
16. Batzler W.U., Giersiepen K, Hentschel S, *et al.* Krebs in Deutschland 2003-2004. "Häufigkeiten und Trends". Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.), 2008.

17. Bazley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 2005; **12 Suppl 1**:S17-S27.
18. Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, *et al.* Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 1997; **325** (Pt 2):449-54.
19. Bertelsen LS, Barrett KE, Keely SJ. Gs protein-coupled receptor agonists induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in T84 cells: implications for epithelial secretory responses. *J Biol Chem* 2004; **279** (8):6271-9.
20. Bilancia D, Rosati G, Dinota A, *et al.* Lapatinib in breast cancer. *Ann Oncol* 2007; **18 Suppl 6**:vi26-vi30.
21. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA, *et al.* c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem* 1999; **274** (12):8335-43.
22. Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6** (1):32-43.
23. Bonenkamp JJ, Songun I, Hermans J, *et al.* Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients. *Lancet* 1995; **345** (8952):745-8.
24. Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Springer TA. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Mol Biol* 2001; **Chapter 10.16 Suppl 48**:1-29.
25. Borrmann R. Geschwülste des Magens und Duodenums. In: Henke F, Lubarsch O, Eds. *Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie*. Auflage. Berlin: Springer Verlag, 1926.
26. Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, *et al.* Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg* 1999; **230** (2):170-8.
27. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 1940; **98** (3):283-98.
28. Brown CL, Meise KS, Plowman GD, Coffey RJ, Dempsey PJ. Cell surface ectodomain cleavage of human amphiregulin precursor is sensitive to a metalloprotease inhibitor. Release of a predominant N-glycosylated 43-kDa soluble form. *J Biol Chem* 1998; **273** (27):17258-68.
29. Bunt AM, Hermans J, Boon MC, *et al.* Evaluation of the extent of lymphadenectomy in a randomized trial of Western- versus Japanese-type surgery in gastric cancer. *J Clin Oncol* 1994; **12** (2):417-22.
30. Burke P, Schooler K, Wiley HS. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 2001; **12** (6):1897-910.
31. Carl-McGrath S, Ebert M, Röcken C. Gastric adenocarcinoma: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Cancer Therapy* 2007; **5**:877-93.
32. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Roessner A, Röcken C. The disintegrin-metalloproteinases ADAM9, ADAM12, and ADAM15 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2005; **26** (1):17-24.
33. Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, *et al.* The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol* 2004; **25** (5):1223-32.

34. Carneiro F, Amado M, Lago P, *et al.* Helicobacter pylori infection and blood groups. *Am J Gastroenterol* 1996; **91** (12):2646-7.
35. Carpenter G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. *J Cell Biol* 1999; **146** (4):697-702.
36. Carpenter G. The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 2000; **22** (8):697-707.
37. Caruso R, Pallone F, Fina D, *et al.* Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol* 2006; **169** (1):268-78.
38. Casalino-Matsuda SM, Monzon ME, Forteza RM. Epidermal growth factor receptor activation by epidermal growth factor mediates oxidant-induced goblet cell metaplasia in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; **34** (5):581-91.
39. Chen J, Chen JK, Neilson EG, Harris RC. Role of EGF receptor activation in angiotensin II-induced renal epithelial cell hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17** (6):1615-23.
40. Chen WS, Lazar CS, Poenie M, *et al.* Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor. *Nature* 1987; **328** (6133):820-3.
41. Chen Y, Grall D, Salcini AE, *et al.* Shc adaptor proteins are key transducers of mitogenic signaling mediated by the G protein-coupled thrombin receptor. *EMBO J* 1996; **15** (5):1037-44.
42. Cheng K, Raufman JP. Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors. *Biochem Pharmacol* 2005; **70** (7):1035-47.
43. Cheng K, Zimniak P, Raufman JP. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of H508 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003; **63** (20):6744-50.
44. Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E. EGF receptor transactivation mediates ANG II-stimulated mitogenesis in intestinal epithelial cells through the PI3-kinase/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; **288** (2):G182-G194.
45. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 2003; **421** (6924):756-60.
46. Correa P, Piazuelo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg* 2006; **95** (4):218-24.
47. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006; **355** (1):11-20.
48. Cuschieri A, Fayers P, Fielding J, *et al.* Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group. *Lancet* 1996; **347** (9007):995-9.
49. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res* 2004; **2** (9):514-22.
50. De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; **52** (3):415-72.
51. De Stefani E, Correa P, Boffetta P, *et al.* Dietary patterns and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Gastric Cancer* 2004; **7** (4):211-20.

52. Dent DM, Madden MV, Price SK. Randomized comparison of R1 and R2 gastrectomy for gastric carcinoma. *Br J Surg* 1988; **75** (2):110-2.
53. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005; **16** (7):293-9.
54. Dethlefsen SM, Raab G, Moses MA, *et al.* Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C. *J Cell Biochem* 1998; **69** (2):143-53.
55. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; **83** (10):2049-53.
56. Dhanasekaran N, Prasad MV. G protein subunits and cell proliferation. *Biol Signals Recept* 1998; **7** (2):109-17.
57. Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem Soc Trans* 2003; **31** (Pt 6):1178-81.
58. Ding YB, Shi RH, Tong JD, *et al.* PGE2 up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cells via epidermal growth factor receptor signaling system. *Exp Oncol* 2005; **27** (2):108-13.
59. Dragovich T, McCoy S, Fenoglio-Preiser CM, *et al.* Phase II trial of erlotinib in gastroesophageal junction and gastric adenocarcinomas: SWOG 0127. *J Clin Oncol* 2006; **20** (24):4922-7.
60. Egami K, Murohara T, Shimada T, *et al.* Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest* 2003; **112** (1):67-75.
61. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, *et al.* Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; **273** (15):8890-6.
62. Ellis AG, Doherty MM, Walker F, *et al.* Preclinical analysis of the anilinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. *Biochem Pharmacol* 2006; **71** (10):1422-34.
63. Fedi P, Pierce JH, di Fiore PP, Kraus MH. Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 1994; **14** (1):492-500.
64. Ferlay J, Autier P, Boniol M, *et al.* Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; **18** (3):581-92.
65. Filipe MI, Munoz N, Matko I, *et al.* Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 1994; **57** (3):324-9.
66. Firestone GL, Winguth SD. Immunoprecipitation of proteins. *Methods Enzymol* 1990; **182**:688-700.
67. Fischer OM, Giordano S, Comoglio PM, Ullrich A. Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; **279** (28):28970-8.
68. Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 2003; **31** (Pt 6):1203-8.
69. Flannery PJ, Spurney RF. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by angiotensin II in glomerular podocytes. *Nephron Exp Nephrol* 2006; **103** (3):e109-e118.

70. French AR, Tadaki DK, Niyogi SK, Lauffenburger DA. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J Biol Chem* 1995; **270** (9):4334-40.
71. Fujimoto Y, Sasaki T, Tsuchida A, Chayama K. Angiotensin II type 1 receptor expression in human pancreatic cancer and growth inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist. *FEBS Lett* 2001; **495** (3):197-200.
72. Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, *et al.* Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res* 2001; **88**:22-9.
73. Gan HK, Walker F, Burgess AW, *et al.* The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806. *J Biol Chem* 2007; **282** (5):2840-50.
74. Garrett TP, McKern NM, Lou M, *et al.* Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; **110** (6):763-73.
75. Giusti RM, Shastri KA, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologist* 2007; **12** (5):577-83.
76. Glossmann H, Baukal A, Catt KJ. Angiotensin II receptors in bovine adrenal cortex. Modification of angiotensin II binding by guanyl nucleotides. *J Biol Chem* 1974; **249** (2):664-6.
77. Goseki N, Takizawa T, Koike M. Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut* 1992; **33** (5):606-12.
78. Götze T, Schutte K, Rocken C, Malfertheiner P, Ebert MP. Recent developments in chemotherapy of advanced gastric cancer. *Dig Dis* 2004; **22** (4):360-5.
79. Gouzi JL, Huguier M, Fagniez PL, *et al.* Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. A French prospective controlled study. *Ann Surg* 1989; **209** (2):162-6.
80. 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** (7):1647-55.
81. Greco S, Muscella A, Elia MG, *et al.* Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinases via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2003; **196** (2):370-7.
82. Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; **36**:281-306.
83. Gschwind A, Zwick E, Prenzel N, Leserer M, Ullrich A. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 2001; **20** (13):1594-600.
84. Gutkind JS. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene* 1998; **17** (11 Reviews):1331-42.
85. Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL, III. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91** (17):8132-6.

86. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **11** (2):184-9.
87. Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99** (19):12191-6.
88. Haj FG, Markova B, Klamann LD, Bohmer FD, Neel BG. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* 2003; **278** (2):739-44.
89. Hamilton SR, Aaltonen L. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. Lyon: IARC Press, 2000.
90. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100** (1):57-70.
91. Harlow E, Lane D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Springs, USA: Harbor Laboratory, 1988.
92. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003; **284** (1):2-13.
93. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **59** (2 Suppl):21-6.
94. Herbst RS, Fukuoka M, Baselga J. Gefitinib--a novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; **4** (12):956-65.
95. Higashiyama S, Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1751** (1):110-7.
96. Hofgärtner WT, Thorp M, Ramus MW, *et al.* Gastric adenocarcinoma associated with fundic gland polyps in a patient with attenuated familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 1999; **94** (8):2275-81.
97. Huang W, Wu YL, Zhong J, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor antagonist suppress angiogenesis and growth of gastric cancer xenografts. *Dig Dis Sci* 2008; **53** (5):1206-10.
98. Huang W, Yu LF, Zhong J, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor expression in human gastric cancer and induces MMP2 and MMP9 expression in MKN-28 cells. *Dig Dis Sci* 2008; **53** (1):163-8.
99. Hunton DL, Barnes WG, Kim J, *et al.* Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis. *Mol Pharmacol* 2005; **67** (4):1229-36.
100. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, *et al.* Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med* 2001; **344** (25):1904-9.
101. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006; **20** (5):953-70.
102. Huovila AP, Turner AJ, Pelto-Huikko M, Karkkainen I, Ortiz RM. Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends Biochem Sci* 2005; **30** (7):413-22.
103. Inui S, Higashiyama S, Hashimoto K, *et al.* Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol* 1997; **171** (3):291-8.
104. Inwang ER, Puddefoot JR, Brown CL, *et al.* Angiotensin II type 1 receptor expression in human breast tissues. *Br J Cancer* 1997; **75** (9):1279-83.
105. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, *et al.* Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995; **77** (6):1053-9.

106. Itabashi H, Maesawa C, Oikawa H, *et al.* Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol Res* 2008; **38** (6):601-13.
107. Itoh Y, Joh T, Tanida S, *et al.* IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine* 2005; **29** (6):275-82.
108. Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, *et al.* A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J* 1998; **17** (24):7260-72.
109. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988; **335** (6189):437-40.
110. Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology* 1986; **23** (1):14-27.
111. Jang WI, Yang WI, Lee CI, *et al.* Immunohistochemical detection of p53 protein, c-erbB-2 protein, epidermal growth factor receptor protein and proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci* 1993; **8** (4):293-304.
112. Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, *et al.* The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999; **286** (5438):309-12.
113. Joh T, Kataoka H, Tanida S, *et al.* Helicobacter pylori-stimulated interleukin-8 (IL-8) promotes cell proliferation through transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by disintegrin and metalloproteinase (ADAM) activation. *Dig Dis Sci* 2005; **50** (11):2081-9.
114. Joo YE, Park CS, Kim HS, *et al.* Prognostic significance of E-cadherin/catenin complex expression in gastric cancer. *J Korean Med Sci* 2000; **15** (6):655-66.
115. Keates S, Keates AC, Katchar K, Peek RM, Jr., Kelly CP. Helicobacter pylori induces up-regulation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Infect Dis* 2007; **196** (1):95-103.
116. Keates S, Sougioultzis S, Keates AC, *et al.* cag+ Helicobacter pylori induce transactivation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; **276** (51):48127-34.
117. Kimura T, Maesawa C, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in gastrointestinal tract tumor cell lines. *Oncol Rep* 2006; **15** (5):1205-10.
118. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* 2007; **14** (4):377-86.
119. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, *et al.* G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 2005; **111** (14):1806-13.
120. Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy. *Brain Tumor Pathol* 2000; **17** (2):71-8.
121. Kurten RC. Sorting motifs in receptor trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; **55** (11):1405-19.
122. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; **64**:31-49.

123. Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P. Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J Biol Chem* 2003; **278** (46):45255-68.
124. Lee FI. Carcinoma of the gastric antrum in identical twins. *Postgrad Med J* 1971; **47** (551):622-4.
125. Leighton PA, Mitchell KJ, Goodrich LV, *et al.* Defining brain wiring patterns and mechanisms through gene trapping in mice. *Nature* 2001; **410** (6825):174-9.
126. Lello E, Furnes B, Edna TH. Short and long-term survival from gastric cancer. A population-based study from a county hospital during 25 years. *Acta Oncol* 2007; **46** (3):308-15.
127. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, *et al.* Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; **352** (9123):179-84.
128. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000; **102** (16):1874-6.
129. Lichtner RB, Menrad A, Sommer A, Klar U, Schneider MR. Signaling-inactive epidermal growth factor receptor/ligand complexes in intact carcinoma cells by quinazoline tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res* 2001; **61** (15):5790-5.
130. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193** (1):265-75.
131. Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B. Role of G beta-subunit in angiotensin II-type 1 receptor signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **280** (3):756-60.
132. Macdonald JS. Role of post-operative chemoradiation in resected gastric cancer. *J Surg Oncol* 2005; **90** (3):166-70.
133. Marchet A, Mocellin S, Ambrosi A, *et al.* The prognostic value of N-ratio in patients with gastric cancer: validation in a large, multicenter series. *Eur J Surg Oncol* 2008; **34** (2):159-65.
134. Margolis B, Skolnik EY. Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5** (6):1288-99.
135. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; **58** (3):903-13.
136. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, *et al.* Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995; **375** (6528):247-50.
137. Marsigliante S, Resta L, Muscella A, *et al.* AT1 angiotensin II receptor subtype in the human larynx and squamous laryngeal carcinoma. *Cancer Lett* 1996; **110** (1-2):19-27.
138. Marsman WA, Tytgat GN, ten Kate FJ, van Lanschot JJ. Differences and similarities of adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction. *J Surg Oncol* 2005; **92** (3):160-8.
139. Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**:515-41.
140. Matsubara J, Yamada Y, Hirashima Y, *et al.* Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor, and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2008; **14** (10):3022-9.
141. McCole DF, Keely SJ, Coffey RJ, Barrett KE. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in colonic epithelial cells by carbachol requires extracellular release of transforming growth factor-alpha. *J Biol Chem* 2002; **277** (45):42603-12.

142. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, *et al.* Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1773** (8):1263-84.
143. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, *et al.* Linkage of angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism to the progression of human prostate cancer. *J Pathol* 2004; **202** (3):330-5.
144. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292** (1):C82-C97.
145. Michl P, Downward J. Mechanisms of disease: PI3K/AKT signaling in gastrointestinal cancers. *Z Gastroenterol* 2005; **43** (10):1133-9.
146. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, *et al.* Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 1995; **376** (6538):337-41.
147. Mifune M, Ohtsu H, Suzuki H, *et al.* G protein coupling and second messenger generation are indispensable for metalloprotease-dependent, heparin-binding epidermal growth factor shedding through angiotensin II type-1 receptor. *J Biol Chem* 2005; **280** (28):26592-9.
148. Miloso M, Mazzotti M, Vass WC, Beguinot L. SHC and GRB-2 are constitutively by an epidermal growth factor receptor with a point mutation in the transmembrane domain. *J Biol Chem* 1995; **270** (33):19557-62.
149. Ming SC. Gastric carcinoma. A pathobiological classification. *Cancer* 1977; **39** (6):2475-85.
150. Misra S, Toole BP, Ghatak S. Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells. *J Biol Chem* 2006; **281** (46):34936-41.
151. Mohammadi M, Honegger A, Sorokin A, *et al.* Aggregation-induced activation of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *Biochemistry* 1993; **32** (34):8742-8.
152. Monig S, Baldus SE, Collet PH, *et al.* Histological grading in gastric cancer by Goseki classification: correlation with histopathological subtypes and prognosis. *Anticancer Res* 2001; **21** (1B):617-20.
153. Moolenaar WH, Bierman AJ, Tilly BC, *et al.* A point mutation at the ATP-binding site of the EGF-receptor abolishes signal transduction. *EMBO J* 1988; **7** (3):707-10.
154. Mori K, Kitayama J, Shida D, *et al.* Lysophosphatidic acid-induced effects in human colon carcinoma DLD1 cells are partially dependent on transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Surg Res* 2006; **132** (1):56-61.
155. Mori S, Tanaka M, Nanba D, *et al.* PACSIN3 binds ADAM12/meltrin alpha and up-regulates ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor. *J Biol Chem* 2003; **278** (46):46029-34.
156. Moro L, Venturino M, Bozzo C, *et al.* Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J* 1998; **17** (22):6622-32.
157. Moutinho C, Mateus AR, Milanezi F, *et al.* Epidermal growth factor receptor structural alterations in gastric cancer. *BMC Cancer* 2008; **8** (10):1-6.
158. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, *et al.* The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999; **85** (9):1894-902.
159. Normanno N, De LA, Bianco C, *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; **366** (1):2-16.

160. O'Connor F, Buckley M, O'Morain C. Helicobacter pylori: the cancer link. J R Soc Med 1996; **89** (12):674-8.
161. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. Mol Syst Biol 2005; **Epub May 25 2005**.
162. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, *et al*. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell 2002; **110** (6):775-87.
163. Ohtsu A. Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future. J Gastroenterol 2008; **43** (4):256-64.
164. Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. Am J Physiol Cell Physiol 2006; **291** (1):C1-10.
165. Ohtsu H, Dempsey PJ, Frank GD, *et al*. ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; **26** (9):e133-e137.
166. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J 2000; **19** (13):3159-67.
167. Olivares-Reyes JA, Shah BH, Hernandez-Aranda J, *et al*. Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors. Mol Pharmacol 2005; **68** (2):356-64.
168. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, *et al*. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. Nat Med 2002; **8** (3):289-93.
169. Park JG, Frucht H, LaRocca RV, *et al*. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. Cancer Res 1990; **50** (9):2773-80.
170. Park WS, Moon YW, Yang YM, *et al*. Mutations of the STK11 gene in sporadic gastric carcinoma. Int J Oncol 1998; **13** (3):601-4.
171. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; **55** (2):74-108.
172. Pawson T. Protein modules and signalling networks. Nature 1995; **373** (6515):573-80.
173. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. Ann Oncol 2001; **12** (6):745-60.
174. Pino MS, Shrader M, Baker CH, *et al*. Transforming growth factor alpha expression drives constitutive epidermal growth factor receptor pathway activation and sensitivity to gefitinib (Iressa) in human pancreatic cancer cell lines. Cancer Res 2006; **66** (7):3802-12.
175. Pinto C, Di FF, Siena S, *et al*. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). Ann Oncol 2007; **18** (3):510-7.
176. Ponz-Sarvisé M, Rodríguez J, Viudez A, *et al*. Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new? World J Gastroenterol 2007; **13** (44):5877-87.
177. Rebischung C, Barnoud R, Stefani L, Faucheron JL, Mousseau M. The effectiveness of trastuzumab (Herceptin) combined with chemotherapy for gastric carcinoma with overexpression of the c-erbB-2 protein. Gastric Cancer 2005; **8** (4):249-52.

178. Reddy MK, Baskaran K, Molteni A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme modulate mitosis and gene expression in pancreatic cancer cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; **210** (3):221-6.
179. Reiter JL, Maihle NJ. Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **995**:39-47.
180. Riese DJ, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; **20** (1):41-8.
181. Röcken C, Lendeckel U, Dierkes J, *et al.* The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin Cancer Res* 2005; **11** (7):2526-30.
182. Röcken C, Rohl FW, Diebler E, *et al.* The angiotensin II/angiotensin II receptor system correlates with nodal spread in intestinal type gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16** (6):1206-12.
183. Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002; **5 Suppl 1**:5-11.
184. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 1996; **274** (5290):1194-7.
185. Rugge M, Correa P, Dixon MF, *et al.* Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; **24** (2):167-76.
186. Santiskulvong C, Rozengurt E. Protein kinase Calpha mediates feedback inhibition of EGF receptor transactivation induced by Gq-coupled receptor agonists. *Cell Signal* 2007; **19** (6):1348-57.
187. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003; **65** (7):1035-41.
188. Sattler M, Abidoye O, Salgia R. EGFR-targeted therapeutics: focus on SCCHN and NSCLC. *Scientific World Journal* 2008; **8**:909-19.
189. Sayed-Ahmad MM, Mohamad MA. Contribution of nitric oxide and epidermal growth factor receptor in anti-metastatic potential of paclitaxel in human liver cancer cell (HebG2). *J Egypt Natl Canc Inst* 2005; **17** (1):35-41.
190. Schäfer B, Marg B, Gschwind A, Ullrich A. Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. *J Biol Chem* 2004; **279** (46):47929-38.
191. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 1987; **166** (2):368-79.
192. Scherübl H. Maligne Tumoren des Gastrointestinaltraktes. In: Dietel M, Suttrop N, Zeitz M, Eds. *Harrisons Innere Medizin*, 16. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2005:554-64.
193. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, *et al.* Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997; **15** (10):1191-7.
194. Seals DF, Courtneidge SA. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 2003; **17** (1):7-30.

195. Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, *et al.* A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J* 2003; **22** (24):6471-82.
196. Seta K, Sadoshima J. Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2003; **278** (11):9019-26.
197. Shah BH, Yesilkaya A, Olivares-Reyes JA, *et al.* Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol Endocrinol* 2004; **18** (8):2035-48.
198. Shah MA, Ramanathan RK, Ison DH, *et al.* Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; **24** (22):5201-6.
199. Shchepotin IB, Evans SR, Chorny V, *et al.* Intensive preoperative radiotherapy with local hyperthermia for the treatment of gastric carcinoma. *Surg Oncol* 1994; **3** (1):37-44.
200. Shibasaki Y, Matsubara H, Nozawa Y, *et al.* Angiotensin II type 2 receptor inhibits epidermal growth factor receptor transactivation by increasing association of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Hypertension* 2001; **38** (3):367-72.
201. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992; **140** (4):769-74.
202. Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, *et al.* Lysophosphatidic acid transactivates both c-Met and epidermal growth factor receptor, and induces cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer LoVo cells. *World J Gastroenterol* 2005; **11** (36):5638-43.
203. Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, *et al.* Sphingosine 1-phosphate transactivates c-Met as well as epidermal growth factor receptor (EGFR) in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 2004; **577** (3):333-8.
204. Shiozaki A, Miyazaki H, Niisato N, *et al.* Furosemide, a blocker of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G0/G1 state. *J Physiol Sci* 2006; **56** (6):401-6.
205. Sibilina M, Wagner EF. Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science* 1995; **269** (5221):234-8.
206. Singh AB, Harris RC. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005; **17** (10):1183-93.
207. Sipponen P, Kimura K. Intestinal metaplasia, atrophic gastritis and stomach cancer: trends over time. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; **6 Suppl 1**:S79-S83.
208. Songun I, van d, V, Arends JW, *et al.* Classification of gastric carcinoma using the Goseki system provides prognostic information additional to TNM staging. *Cancer* 1999; **85** (10):2114-8.
209. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, *et al.* SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; **72** (5):767-78.
210. Sorkin A, McKinsey T, Shih W, Kirchhausen T, Carpenter G. Stoichiometric interaction of the epidermal growth factor receptor with the clathrin-associated protein complex AP-2. *J Biol Chem* 1995; **270** (2):619-25.
211. Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, *et al.* Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* 2001; **276** (21):18265-71.

212. Tanaka M, Nanba D, Mori S, *et al.* ADAM binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *J Biol Chem* 2004; **279** (40): 41950-9.
213. Tanida S, Joh T, Itoh K, *et al.* The mechanism of cleavage of EGFR ligands induced by inflammatory cytokines in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 2004; **127** (2):559-69.
214. Thomas SM, Coppelli FM, Wells A, *et al.* Epidermal growth factor receptor-stimulated activation of phospholipase Cgamma-1 promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; **63** (17):5629-35.
215. Thomas WG, Qian H, Smith NJ. When 6 is 9: 'uncoupled' AT1 receptors turn signalling on its head. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61** (21):2687-94.
216. Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96** (4):1415-20.
217. Tomic S, Greiser U, Lammers R, *et al.* Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C. *J Biol Chem* 1995; **270** (36):21277-84.
218. Torrisi MR, Lotti LV, Belleudi F, *et al.* Eps15 is recruited to the plasma membrane upon epidermal growth factor receptor activation and localizes to components of the endocytic pathway during receptor internalization. *Mol Biol Cell* 1999; **10** (2):417-34.
219. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002; **35** (9):1001-15.
220. Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, *et al.* Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 1997; **16** (16):4938-50.
221. Uchiyama-Tanaka Y, Matsubara H, Nozawa Y, *et al.* Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 2001; **60** (6):2153-63.
222. Uemura H, Ishiguro H, Nakaigawa N, *et al.* Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol Cancer Ther* 2003; **2** (11):1139-47.
223. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, *et al.* Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; **345** (11):784-9.
224. Ukegawa JI, Takeuchi Y, Kusayanagi S, Mitamura K. Growth-promoting effect of muscarinic acetylcholine receptors in colon cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; **129** (5):272-8.
225. Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; **20** (4):651-74.
226. Viste A, Bjornestad E, Opheim P, *et al.* Risk of carcinoma following gastric operations for benign disease. A historical cohort study of 3470 patients. *Lancet* 1986; **2** (8505):502-5.
227. 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** (12):1197-206.
228. Waterman H, Sabanai I, Geiger B, Yarden Y. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 1998; **273** (22):13819-27.
229. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; **31** (6):637-43.

230. Wells A, Gupta K, Chang P, *et al.* Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. *Microsc Res Tech* 1998; **43** (5):395-411.
231. Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res* 2003; **284** (1):78-88.
232. Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol* 2005; **31** (9):1042-50.
233. Wong L, Deb TB, Thompson SA, Wells A, Johnson GR. A differential requirement for the COOH-terminal region of the epidermal growth factor (EGF) receptor in amphiregulin and EGF mitogenic signaling. *J Biol Chem* 1999; **274** (13):8900-9.
234. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, *et al.* Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 1997; **390** (6655):91-6.
235. Yang X, Zhu MJ, Sreejayan N, Ren J, Du M. Angiotensin II promotes smooth muscle cell proliferation and migration through release of heparin-binding epidermal growth factor and activation of EGF-receptor pathway. *Mol Cells* 2005; **20** (2):263-70.
236. Yano N, Suzuki D, Endoh M, *et al.* A novel phosphoinositide 3-kinase-dependent pathway for angiotensin II/AT-1 receptor-mediated induction of collagen synthesis in MES-13 mesangial cells. *J Biol Chem* 2007; **282** (26):18819-30.
237. Yokota T, Ishiyama S, Saito T, *et al.* Lymph node metastasis as a significant prognostic factor in gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Scand J Gastroenterol* 2004; **39** (4):380-4.
238. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, *et al.* Role of the deletion of polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 1995; **96** (5):2162-9.
239. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: a review of its applications in cell biology. *Biosci Rep* 1994; **14** (6):259-81.
240. Yu ZW, Quinn PJ. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (review). *Mol Membr Biol* 1998; **15** (2):59-68.
241. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, *et al.* Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 1998; **32** (3):488-95.
242. Zhang ZX, Gu XZ, Yin WB, *et al.* Randomized clinical trial on the combination of preoperative irradiation and surgery in the treatment of adenocarcinoma of gastric cardia (AGC)--report on 370 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; **42** (5):929-34.
243. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20** (10):408-12.

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Entstehung, Abbau und Effektorrezeptoren von Angiotensin II. ....	9
Abb. 2: Mutation EGFRvIII im Vergleich zum Wildtyp.....	14
Abb. 3: Schema der EGF-Rezeptorimmunpräzipitation.....	34
Abb. 4: Zusammensetzung der Elektrophoresekammer für SDS-PAGE & Western Blot	36
Abb. 5: Chromogene Immunfärbung mit dem Antikörper von Cell Signaling. ....	40
Abb. 6: ECL-Immunfärbung mit dem Antikörper der Firma Cell Signaling. ....	41
Abb. 7: Immunfärbung mit dem polyklonalen Anti-EGF-Rezeptorantikörper 1005. ....	42
Abb. 8: Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-antikörper 4G10. .	43
Abb. 9: Immunfärbung mit dem Anti-EGF-Rezeptorantikörper 13G8. ....	44
Abb. 10: Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti- $\beta$ -Aktinantikörper AC-15. ....	45
Abb. 11: Vergleich der zur IP-Etablierung eingesetzten EGF-Konzentrationen.....	47
Abb. 12: Proteinverluste im Überstand und Untersuchung der IP-Zwischenschritte.....	48
Abb. 13: Verdünnung des Proteinlysates mit PBS zur Ermittlung geeigneter Antigenmengen. ....	49
Abb. 14: IP mit verschiedenen Antikörper- und Agarosekonzentrationen.....	50
Abb. 15: Vergleich der Lämmli-pufferkonzentrationen .....	51
Abb. 16: Vergleich der Verarbeitungsschritte desselben Proteinlysates. ....	59
Abb. 17: Darstellung der Datenverarbeitung in GeneTools. ....	60
Abb. 18: Darstellung der Messwerte als Vielfaches des Zeitpunktes 2,5 Minuten. ....	62
Abb. 19: Expression des EGF-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene.....	65
Abb. 20: Zeitverlauf der Stimulation mit 100 ng/ml EGF.....	66
Abb. 21: Stimulation mit verschiedenen EGF-Konzentrationen. ....	67
Abb. 22: Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Angiotensin II.....	69
Abb. 23: Zeitverlauf der EGF-Rezeptorphosphorylierung durch Angiotensin II.....	71
Abb. 24: Tyrosinphosphorylierung nach AG1478-Vorinkubation.....	72
Abb. 25: Tyrosinphosphorylierung nach Vorinkubation mit den Antagonisten der Angiotensinrezeptoren in MKN28.....	73
Abb. 26: Die EGF-Rezeptortransaktivierung durch Ang II erfolgt über den AT1R. ....	79
Abb. 27: Das Triple Membrane Passing Signal.....	82

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms.....5  
 Tabelle 2: UICC-Staging des Magenkarzinoms. ....5  
 Tabelle 3: Acrylamidgele verschiedener Konzentrationen, Gesamtvolumen je 12 ml....35

## Formelverzeichnis

$$\frac{(4G10)}{(13G8)} \tag{1}$$

$$\left[ \left( \frac{(4G10)}{(13G8)} \right)_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}} \right] - \left[ \text{Median} \left( \frac{(4G10)}{(13G8)} \right)_{\text{aller Zeitpunkte des Tages Y}} \right] \tag{2}$$

$$\frac{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}}}{\text{Mittelwert} \left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{aller Tage zum Zeitpunkt X Minuten}}} \tag{3}$$

$$\frac{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt X Minuten am Tag Y}}}{\left[ \frac{(4G10)}{(13G8)} \right]_{\text{zum Zeitpunkt 2,5 Minuten am Tag Y}}} \tag{4}$$

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

- Kuyumcu S, Carl-McGrath S, Röcken C. Transaktivierung des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors durch Angiotensin II in humanen Magenkarzinomzelllinien. [Poster: 92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), Berlin, 2008]
- Kuyumcu S, Carl-McGrath S, Ebert MPA, Röcken C. Transaktivierung des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors durch Angiotensin II in humanen Magenkarzinomzelllinien. [Poster: 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Berlin, 2008]
- Carl-McGrath S, Kuyumcu S, Wass M, Bosse T, Boas-Knoop S, Neumann U, Ebert MPA, Röcken C. The *in vitro* and *in vivo* local Angiotensin II system in gastric cancer. [In Vorbereitung]

## **Selbständigkeitserklärung**

„Ich, Sena Kuyumcu, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ‚Transaktivierung des Epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors durch Angiotensin II in humanen Magenkarzinomzelllinien‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

Für die Anregung zu dieser Arbeit, die wohlwollende Unterstützung und für die stets interessierte und motivierende Betreuung danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Christoph Röcken.

Für wertvolle Hinweise und Diskussionen gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. Stacy Carl-McGrath.

Herrn Dr. rer. nat. Konrad Neumann aus dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité danke ich für die Beratung zu den Möglichkeiten der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Für ihre Geduld, die freundliche Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen danke ich ganz herzlich Frau Dipl.-Biotechnol. Saniye Yumlu, Frau M.Sc. Magdalena Eriksson, Frau Dipl. human. biol. Eva Simon und den stets hilfsbereiten Laborantinnen Sandra Krüger und Antje Jarmuske.

Herrn Dr. Atilla Géczi von der Firma VWR International danke ich für sein Engagement und seine Erläuterungen zu der Software und den Geräten von Syngene.

Mein Dank richtet sich auch an die Wilhelm Sander-Stiftung, mit deren finanzieller Unterstützung die Experimente dieser Arbeit durchgeführt werden konnten.

Für viele hilfreiche Diskussionen in der Zeit meiner Dissertation danke ich meinem Bruder Dipl. Wirt.-Ing. Arif Kuyumcu und Herrn Dipl.-Inf., MBA Christian Blümel.

Meinen Eltern Annemarie und Professor Dr.-Ing. Halit Kuyumcu danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie mich durch ihre Motivation unterstützt und mir durch ihren Rückhalt den nötigen Freiraum für meine Arbeit gegeben haben.

## **Anhang**

---

Im Anhang befindet sich eine Literaturrecherche, die vor dem Beginn der Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurde. Anhand dieser Recherche wurden die für die Experimente benötigten Antikörper und Materialien ausgewählt. Sie diente auch dazu, einen Eindruck über die eingesetzten Konzentrationen der einzelnen Stimulantien und die Durchführungsbedingungen in Arbeiten mit ähnlichem Thema zu erhalten. Für einen besseren Überblick wurden die relevanten Informationen tabellarisch zusammengefasst.

ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS in Magen- und Kolonkarzinomzelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR-Blockade	Anti-Phospho-Tyr-AK	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Tanida et al.	GPCR, IL-8	KatoIII	6 cm dish with 2x10E06cells/dish, starved 16 h, KB-R7785/a-EGFR-ligand-neutralizing Ab 30 min prior, 14C10 60 min prior stimulation	cell-lyzation, 15000 rpm for 10 min, 1 µg a-EGFR for 2 h at 4 °C, 20 µl protein G-sepharose (50% suspension, Amersham) for 2 h at 4 °C, wash 3X in lysis buffer	boil 3 min, 6% SDS, block: 5% milk 2 h at RT, a-phospho-Tyr-Ab 4G10 2 h at RT, 2nd Ab 1 h at RT, ABC reagent	a-EGFR (Upstate Biotech)		a-EGFR neutralizing monoclonal Ab 14C10 (IBL Co., Ltd)	a-phospho-Tyr 4G10 (Upstate Biotech)	HB-EGF neutralizing Ab #197 as a gift (Scios Inc.)	KB-R7785, 10µmol/l (Nippon Organon K.K.)	
Keates et al.	H. pylori	AGS	12 cm dish with monolayer, starved 24 h, wash in ice-cold PBS, lysed 45 min on ice with 1 ml buffer, inhibitors 30 min prior, EGF for 10 min	1 mg of lysate protein, 2 µg monoclonal a-EGFR for 1 h at 4 °C, 50 µl ProteinGPlus-agarose (Santa Cruz) overnight at 4 °C	boil 5 min, 6% SDS, block: 5% milk for 1 h, monoclonal PY99 1:1000 overnight, reprobed with polyclonal a-EGFR for receptor levels	polyclonal a-EGFR (Santa Cruz); monoclonal a-EGFR (Santa Cruz)	0,25/0,5/1,0 µM (Calbiochem)		a-phospho-Tyr PY99 (Santa Cruz)	HB-EGF neutralizing Ab (R&D Systems)	Batimastat, 5µg/ml (British Biotech)	EGF, 10 ng/ml (R&D Systems)
Shida et al.	GPCR, Sphingosine-1-Phosphate	MKN28, MKN74	90% confluency, 10 cm dish starved 24 h, 5-50 µM GM 6001 or AG1478 30 min prior stimulation, 1 ng/ml EGF for 2 min as positiv control	1 ml lysate/dish/tube, 20 µl a-EGFR/tube, protein A-sepharose	7.5% SDS, 35 min 200 V, block: 5% milk, mouse monoclonal a-phospho-Tyr, hrp-labeled IgG, reprobed with a-EGFR	rabbit polyclonal a-EGFR (Santa Cruz)	250 ng/ml (Biomol.)		mouse monoclonal a-phospho-Tyr PY20 (Santa Cruz)		GM6001, 0/10/25/50 µM (Calbiochem)	EGF, 1 ng/ml
Ding et al.	GPCR, PGE2	MKN28	starved 48 h, AG1478 20 min prior stimulation, control: DMSO		wash in ice-cold PBS, lyse, SDS-PAGE, blot stained with Ponceau Red for equal protein amount, prim Ab, hrp-Ab, ECL-detection (Amersham)	a-EGFR (Santa Cruz)	250 nM (Calbiochem)		a-phospho-EGFR (Tyr 1173) (Upstate Biotech)			
Cheng et al.	GPCR (M3-receptor), Acetylcholine	H508, CHO-rM3	6-well plate, 10E06/well, starved 24 h, PBS 1 h 37 °C, 10 min incubation, lysis-buffer, inhibitors 30 min prior test-agent		10% SDS, equal protein: reprobed with anti-p42		0,1 µM (Alexis)	PD168393, 1 µM (Calbiochem)	rabbit polyklonal a-phospho-EGFR (Cell Signaling)			

Referenzen: Tanida et al.<sup>213</sup>, Keates et al.<sup>116</sup>, Shida et al.<sup>203</sup>, Ding et al.<sup>58</sup>, Cheng et al.<sup>43</sup>.

ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS in Magen- und Kolonkarzinomzelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR-Blockade	Phospho-Tyr-Ak	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Keates et al.	H. pylori	AGS	confluent monolayer, 24 h starved, wash 3X in PBS, pretreated with 10 µg/ml EGFR-neutralizing-Ab for 1 h		6% SDS	a-EGFR (Santa Cruz)	1 µmol/l (Calbiochem)	neutralizing mouse monoclonal a-EGFR (Upstate Cell Signaling)				EGF 10 ng/ml, HB-EGF 10 ng/ml
Bertelsen et al.	GPCR, VIP	T84-Colon Epithel	10E06 cells on 30 mm Millicell-HA Transwells, AG1478 20 min prior	3X wash in Ringer, equilib. 30 min in 37 °C, incubations stopped with ice-cold PBS, lysis-buffer 4 °C for 45 min, 12000 rpm 10 min, 5 µl a-EGFR-Ab 4 °C 60 Min, 40 µl A-Sepharose 4 °C overnight	3 min boiled, blotted overnight 4 °C, 1% block 30 min, 1st 1 h, 2nd 30 min	human a-EGFR (Upstate Biotech)	1 µM (Calbiochem)		monoclonal PY20 (BD Transduction Lab.)			
Itoh et al.	GPCR, IL-8	Caco2, ColonCA	6 cm dish with 5x10E04cells/dish, 96er well with 10E05cells/ml for 24 h, starved for 12 h, #197 and KB-R7785 30 min prior stimulation	cell-lyzation, 15000 rpm for 10 min, 1 µg a-EGFR for 2 h at 4 °C, 20 µl protein G-sepharose (50% suspension for 2 h at 4 °C), wash 3X in lysis-buffer	3 min boiled, 6% SDS, block in 5% milk for 2 h at RT, incubate with 4G10 for 2 h, 2nd Ab for 1 h at RT	human a-EGFR (Upstate Biotech)	100 nM (Calbiochem)		a-phospho-Tyr 4G10 (Upstate Biotech)	HB-EGF neutralizing Ab #197 as a gift (Scios Inc.),	KB-R7785, 10 µM (Nippon Organon K.K.)	
Darmoul et al.	PAR1-receptor, Thrombin	HT-29, ColonCA	100 mm dishes, 70% confluency, starved for 48 h, inhibitors: a-TGFα 2 h prior, a-EGFR 2 h prior, Batimastat 30 min prior, stimulation for 5 min at 37 °C, wash with cold PBS	lyzation: 45 min on ice, 12000Xg for 10 min, polyclonal a-EGFR coupled to protein G-Sepharose overnight at 4 °C	7,5% SDS, anti-phospho-Tyr 4G10, total EGFR detected with polyclonal a-EGFR	polyclonal rabbit a-EGFR (Neo Markers)	3 µmol/l (Calbiochem)	monoclonal a-EGFR, 10 µg/ml (Upstate Biotech), PD168393, 2 µmol/l (Calbiochem)	a-phospho-Tyr 4G10 (Upstate Biotech)	monoclonal a-TGF-α (Oncogene)	Batimastat (BB94), 5 µmol/l (British Biotech)	EGF 6 nmol/l (Interchim)
Mori et al.	GPCR, LPA	DLD1, ColonCa	starved for 24 h, AG1478 or GM6001 30 min prior, stimulation with EGF for 5 min	incubation with a-EGFR, protein A-agarose	7,5% SDS, 35 min 200 V, block: 5% milk, mouse a-phospho-Tyr-Ab	rabbit polyclonal a-EGFR (Santa Cruz)	250 ng/ml (Biomol)		mouse monoclonal a-phospho-Tyr PY20 (Santa Cruz)		GM6001, 25 µM (Calbiochem)	EGF 10 ng/ml (Peprotech EC)

Referenzen: Keates et al.<sup>115</sup>, Bertelsen et al.<sup>19</sup>, Itoh et al.<sup>107</sup>, Darmoul et al.<sup>49</sup>, Mori et al.<sup>154</sup>.



ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS in Magen- und Kolonkarzinomzelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR-Blockade	Phospho-Tyr-Ak	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Shida et al.	GPCR, LPA	LoVo, human ColonCA	starved for 24 h, PTX 24 h prior or GM6001 30 min prior stimulation	incubation with a-EGFR, protein A-agarose	7,5% SDS, 35 min 200 V, block: 5% milk, rabbit polyclonal a-phospho-Tyr-Ab	rabbit polyclonal a-EGFR (Santa Cruz)			mouse monoclonal a-phospho-Tyr PY20 (Santa Cruz)		GM6001, 10/25/50 µM (Calbiochem)	EGF (PeproTech EC)
Ukegawa et al.	GPCR (M3-receptor), Carbachol	T84, colonCA		1000 µg lysate incubated with 4 µl a-EGFR overnight at 4 °C, protein G-agarose (Santa Cruz) for 1 h, wash pellets 2X in lysis buffer	boil 5 min, 10% SDS, block: 5%BSA for 1 h, incubate in TBST with a-phospho-Tyr Ab directly conjugated with hrp, 1:2500	a-EGFR (Upstate Biotech)	10 µM for 15 min	EGFR neutralizing Ab LA-1, 10 mg/ml for 20 min	a-phospho-Tyr-Ab directly conjugated with hrp RC20, 1:2500 (Tranduction Laboratories)		GM6001, 50 µM for 18 h	EGF 1 nM
Pai et al.	GPCR, PGE2	RGM1 gastric epithel; CaCO2, LoVo, HT-29 colon CA	PD 135035 and GM6001 16 h prior, AG1478 20 min prior, neutralizing Abs 2 h prior	specific Ab immobilized onto protein A-sepharose 2 h at 4 °C, wash in lysis-buffer	a-phospho-Tyr, reprobe with a-EGFR		250 nM (Calbiochem)	EGFR neutralizing Ab LA-1, 10µg/ml for 2 h (Upstate Biotech); PD135035, 1 µM (Calbiochem)		a-TGFα neutralizing Ab (Calbiochem); HB-EGF neutralizing Ab (R&D Systems); EGF neutralizing Ab (R&D Systems); each 10 µg/ml for 2 h	GM6001, 25/50 µM	
McCole et al.	GPCR (M3-receptor), Carbachol	T84	10E06 cells/30 mm Millicell-HA polycarbonate filters, cultures 10-15 d before use, neutralizing a-EGFR / WAY171318 / a-TGF-α 30 min prior, stimulation with EGF for 5 min	wash 3X in Ringers Solution, equilibrate 30 min at 37 °C, reaction stopped with ice-cold PBS, lysed 45 min, 12000 rpm for 10 min, 1 h at 4 °C, protein A-sepharose 1 h at 4 °C, 15000 rpm for 3 min, wash pellets in ice-cold PBS	boil 2 min, PVDF membrane, block: 1% Upstate blocking buffer for 30 min, 1st Ab for 1 h, hrp-Ab for 30 min (both in blocking buffer)	rabbit polyclonal a-EGFR 1005 (Santa Cruz)	Calbiochem	EGFR neutralizing Ab LA-1, 10µg/ml (Upstate Biotech)	mouse a-phospho-Tyr (Upstate Biotech)	a-TGF-α-Ab, 5 µg/ml (Calbiochem); a-AR (R&D Systems)	WAY171318, 10 µM (provided by Dr. Phil Frost, Wyeth Ayerst (inhibits ADAM17))	EGF 100 ng/ml (Genzyme); AR (R&D Systems), TGF-α 100 ng/ml
Pino et al.		Pancreas CA	10 cm dishes, 1 µmol/l Gefitinib 2 h prior EGF for 15 min	lysed 1 h at 4 °C, a-cdk2-Ab for 2 h, protein G-Sepharose (Santa Cruz) overnight at 4 °C, wash 2X in lysis-buffer	boil 5 min, 10% SDS, block: 5% milk for 2 h at 4 °C, Ab-incubation overnight	a-EGFR (Cell Signaling)			a-phospho-Tyr1068-EGFR (Cell Signaling)			EGF 20 ng/ml

Referenzen: Shida et al.<sup>202</sup>, Ukegawa et al.<sup>224</sup>, Pai et al.<sup>168</sup>, McCole et al.<sup>141</sup>, Pino et al.<sup>174</sup>.



ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS in Magen- und Kolonkarzinomzelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR-Blockade	Phospho-Tyr-Ak	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Cheng et al.	GPCR (M3-receptor), Acetylcholine	H508, SNU-C4, human colon CA	10E07 cells/10 cm plate, 24 h incubation, 24 h starved, washed with PBS, recover in PBS 30 min 37 °C, Inhibitors 30 min prior, Ab 2 h prior, test agent 10 min 37 °C, 10 min on ice, lyzation 10 min on ice	mouse monoclonal a-EGFR overnight at 4 °C, protein G-sepharose 2 h, pellets washed 2X in lysis-buffer	10& SDS, a-EGFR or phosphospecific a-EGFR	mouse monoclonal a-EGFR, 4 µg/ml (Upstate Biotech)	0,1/0,02 µM for 5 days (Alexis)	PD168393, 1 µM (p-MAPK); 2 µM (pTyr992) (Calbiochem); a-EGFR, 0,1 µg/ml	phospho-specific Ab's Tyr992, Tyr1068, Tyr1045, Tyr845 (Cell Signaling); a-phospho-Tyr1173 (Biocourcure)			EGF 10 ng/ml (Sigma or Fisher) 10 min 37 °C
Misra et al.	CD44, Hyaluronan	HCA7, HT29 human colon CA		all at 4 °C 500 µl lysates, 5 µg a-EGFR for 2 h, 80 µl of 1:1 (v/v) protein A-sepharose 4B suspension for 1 h, washes 3X in ice-cold lysis-buffer	nuPAGE Novex BisTris gel, 40 min 200 V, blot 110 V for 40 min, Block :5% milk 1 h, ab-dilution in 5% BSA (polyclonal)/5% milk (monoclonal), 2nd Ab 1:5000 1 h RT						GM6001 (EMD Biosciences)	EGF (Invitrogen)
Joh et al.	H. pylori, IL-8	KatoIII	5x10E04 cells/6 cm dish, when subconfluent starved for 12 h, inhibitor 30 min prior stimulation	1 ml lysis-buffer, a-EGFR+20 µl protein G sepharose (50% Suspension, Amersham) incubated 2 h at 4 °C, wash with lysis-buffer	6% SDS, blot with a phospho-Tyr	a-EGFR (Upstate Biotech)	Genzyme		a-phospho-Tyr (Upstate Biotech)		KB-R7785, 10 µM (Nippon Organon)	

Referenzen: Cheng et al.<sup>42</sup>, Misra et al.<sup>150</sup>, Joh et al.<sup>113</sup>.



ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS durch GPCR-Aktivierung durch Angiotensin II in verschiedenen Zelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR- Blockade	Phospho-Tyr-Ak	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Eguchi et al.	Ang II, 100 nM (Peninsula Lab)	VSMC	AG1478 30 min prior, Ang II / EGF for 10 min or Ang II for 0, 1, 2, 5 min	icecold lysis-buffer, 14000Xg for 5 min, Ab at 4 °C for 2-16 h, Protein A/G-sepharose (Santa Cruz) for 2 h-overnight, wash 3X in lysis-buffer	blot on NC-membrane, block: 5% milk, stripping buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7, 2% SDS, 0.1 β-Mercaptoethanol for 30-45 min at 50 °C	polyclonal a-EGFR 1005 (Santa Cruz)	0.025, 0.25, 2.5 μM (Calbiochem)		monoclonal a-phospho Tyr 4G10 (Upstate Biotech)			EGF, 10-100 ng/ml (Upstate Biotech)
Seta et al.	Ang II, 10 nM	COS7, transfected with AT1-Y319F or AT1-Y319E	3x10E05/6well-plate, starved 12 h, AG1478 36 h prior, Ang II for 1, 3, 5, 10 min	lysed in CHAPS-buffer for IP 10 min on ice, centrifuge 30 min, 500 μg of lysates with 1 mg/ml incubated with 4 μg of m-a-EGFR for 1 h, protein G agarose (30 μl slurry) for 45 min, wash 3X in lysis-buffer	PVDF-membrane	monoclonal a-EGFR (Transduction Labs); polyclonal a-EGFR (Upstate Biotech)	250 nM (Biomol)					
Chen et al.	Ang II, 100 nM (bis 0,01 nM) (Sigma)	porcine prox tubulus cells LLCPKc14	starved 24 h, losartan (1 μM) / PD123319 (1 μM) 5 min prior / BB94 or phenantroline / CRM197 30 min prior, Ang II / EGF for 8 min,			a-EGFR (Santa Cruz)	EMD Bioscience		monoclonal a-phospho-Tyr PY20 (Zymed Labs)	HB-EGF-Inhibitor CRM197, 10 μg/ml (Sigma)	Batimastat BB94, 5 μM (British Biotech); phenanthroline, 300 μM	EGF, 30 nM (Collaborative Research)
Ohtsu et al.	Ang II, 0.1 μM (Sigma)	VSMC	passage 6-12, starved 2-3 days, Ang II 2 min, EGF 1 min			a-EGFR (Santa Cruz)			a-phospho-Tyr1068-EGFR (Biosource International)			EGF, 20 ng/ml (Upstate Biotech)
Santiskulvong et al.	AngII, 50 nM (Sigma)	T84, Panc-1, COS7, Rat-1 fibroblasts	starved 1-24 h, 10 cm dishes, AG 1478 / GM6001 1 h prior, Ang II peak at 2 min	lyse 20 min at 4 °C, 15000 rpm for 10 min, 5 μg/ml polyclonal a-EGFR overnight at 4 °C, 50 μl protein-A-agarose (Boehringer Mannheim) for 1 h, 0,5min at 14000 rpm, wash in ice-cold RIPA buffer	boil 15 min, 10% SDS, block: 5% BSA 1 h at RT, immunoblot with a-phospho-Tyr 4G10 overnight	polyclonal a-EGFR (Santa Cruz)	250nM (Sigma)		monoclonal a-phospho Tyr 4G10, rat a-EGFR (Upstate Biotech)		GM6001, 10 μM	
Fujiyama et al.	Ang II, 0,1 μM	VSMC	starved 12 h, PD 123319 (1 μmol/l) / CS866 (1 μmol/l) / AG1478 / heparin / batimastat 30 min prior Ang II 1,5 min			a-EGFR (New England Biolabs)	250 nmol/l		monoclonal a-phospho Tyr 4G10 (Upstate Biotech)	heparin, 10 μg/ml	Batimastat, 5 μmol/l (British Biotech)	HB-EGF, 20 ng/ml

Referenzen: Eguchi et al.<sup>61</sup>, Seta et al.<sup>196</sup>, Chen et al.<sup>39</sup>, Ohtsu et al.<sup>165</sup>, Santiskulvong et al.<sup>186</sup>, Fujiyama et al.<sup>72</sup>.



ANHANG: Literaturrecherche für die Etablierung der Immunpräzipitation und die Auswahl geeigneter Substanzen

TMPS durch GPCR-Aktivierung durch Angiotensin II in verschiedenen Zelllinien												
Autor	Stimulation	Zellen	Zellkultur	IP	Western Blot	EGFR-Ak	AG1478	EGFR-Blockade	Phospho-Tyr-Ak	EGFR-Ligand-Shedding Inhibitor	MMP-Inhibitor	EGFR-Liganden
Yano et al.	Ang II, 0,1 µM (Sigma)	mouse mesangium MES13	losartan (1 µM, Merck) / PD123319 (1 µM) 1 h prior, 1,10-PTL / heparin 30 min prior, AG1478 15 min prior, Ang II 1-30 min, peak at 2 min	0,5 mg protein-lysates, protein G-sepharose (GE Healthcare) 2 h at 4 °C, supernatant with a-EGFR 4 h at 4 °C, 20 µl protein G-sepharose added, at 4 °C overnight	boil 5 min, ice 2 min, 20 µl supernatant on 7.5% SDS, immunoblot a-phospho-Tyr, reblotted with a-EGFR as loading-control	a-EGFR 1005 (Santa Cruz)	5 µg/ml (Calbiochem)		a-phospho-Tyr (Santa Cruz)	heparin, 10-100 µg/ml (Sigma)	1,10-phenanthroline (1,10-PTL), 300 µM (Sigma)	
Shah et al.	Ang II, 0,1 µM (Peninsula Lab)	C9, Hek293	starved 24 h, ice-cold PBS, AG1478 / CRM / HB-EGF-Ab 20 min prior, increasing [GM6001] 15 min prior, EGF peaked at 5 min	lysates precleared at 8000Xg for 10 min, precleared with agarose, Ab, G&A agarose	95 °C for 5 min, 8-16% SDS, primAb overnight, hrp 1 h at RT	a-EGFR (Santa Cruz)	0,001, 0,01, 0,1, 1 µM, 200 nM, 250 nM (Calbiochem)		PY20 (Transduction Labs); a-phospho-Tyr1068&1173 (Santa Cruz)	CRM, 10 µg/ml (Calbiochem); HB-EGF-Ab, 10 µg/ml (R&D Systems)	GM6001, 0,02, 0,2, 2, 20 µM (Calbiochem)	EGF, 20 ng/ml (Invitrogen) HB-EGF, 20 ng/ml (R&D Systems)
Yang et al.	Ang II 0,1 µM	rat VSMC	starved with 0,2% FCS for 24 h, control: DMSO, Ang II+0,1% DMSO, 20 mM GM6001+0,1% DMSO (final concentr. 20 µM), 10 mM AG1478+0,1% DMSO (10 µM), GM6001+100 nM Ang II; GM6001(0.1% 20 mM)+ AG1478(0.1% 10 mM) +100 nM Ang II, 1 µg/ml a-HB-EGF+100 nM Ang II, all treatments for 8 min		lyzation in RIPA buffer with NaV, PMSF, ..., 14000Xg for 15 min at 4 °C, boil at 95 °C for 5 min, 5-20% SDS, block: 5% milk for 1 h, a-Tyr1173-EGFR at 4 °C overnight, stripping: 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-Cl, pH 6.7, at 50 °C for 30 min	a-EGFR (Cell Signaling)	10 mM (EMD Biosiences)		a-phospho-Tyr1173-EGFR (Cell Signaling)	a-HB-EGF-Ab, 6 µg/ml (R&D Systems)	GM6001, 20 µM (EMD Biosiences)	
Flannery et al.	Ang II, 0,1 µM (Sigma); losartan, 10 µM (Merck); PD123319, 10 µM (Sigma)	immortalized mouse podocytes, HEK293	podocytes differentiated 7-10 days prior study, starved 24 h with 0.1% FBS, stimulation with Ang II peaked at 5 min, wash in ice-cold PBS	0,6 ml ice-cold lysis-buffer rocked 30 min at 4 °C, 10000Xg for 4 min, 0,5 ml supernatant+a-EGFR (1:100) rocked overnight at 4 °C, 70 µl protein Aplus/G agarose (Calbiochem) for 1 h at 4 °C, wash 3X with lysis-buffer	boil 10 min, 4-12% Bis-Tris polyacrylamide gel (Invitrogen), immunoblotting with 0,5 µg/ml a-phospho-Tyr-Ab or a-EGFR, ERK-lotting: store supernatants after removing insoluble material with 2000Xg at -70 °C, block: 1 h in 5% milk, hrp (Amersham) 1:2000 for 1 h at 4 °C, ECL (Amersham)	a-EGFR, 1:1000 (Cell Signaling)	2.5 µM (Calbiochem)	Genistein (tyrosine kinase inhibitor), 50µM (Calbiochem)	a-phospho-Tyr-Ab, 0,5 µg/ml (Upstate Biotech)	CRM197, 10 µg/ml (Calbiochem); Heparin, 100 µg/ml	MMP2/9-Inhibitor BsPS, 10 µM (Calbiochem)	EGF, 10nM (Sigma)

Referenzen: Yano et al.<sup>236</sup>, Shah et al.<sup>197</sup>, Yang et al.<sup>235</sup>, Flannery et al.<sup>69</sup>.