

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie der  
Charité Campus Mitte  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung zur synergistischen Wirkung von Lapatinib (GW 2016),  
einem potenten dualen HER1/HER2 Tyrosinkinaseinhibitor, und  
Fulvestrant, einem Östrogenrezeptorantagonisten, in HER2 und nicht  
HER2 überexprimierenden Brustkrebszellen.**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Kerstin Maslak  
aus Lutherstadt Wittenberg

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. K. Possinger  
                          2. Priv.-Doz. Dr. med. habil. B. Brockmann  
                          3. Prof. Dr. med D. Elling

Datum der Promotion: 30.11.2012

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
I.1.	Mammakarzinom	5
I.2.	Therapie	6
I.2.1.	Antihormonelle Therapie	7
I.2.2.	Anti-HER2-Therapie	7
I.2.3.	Chemotherapie	8
I.3.	Aufgabenstellung	9
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
II.1.	Versuchssubstanzen	12
II.2.	Zellkultur	12
II.3.	MTT-Test	13
II.4.	Western Blot Analyse	13
II.5.	Durchflusszytometrie Analyse	15
II.6.	Morphogenetische Analyse	15
II.7.	PCR-Analyse	16
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>18</b>
III.1.	Synergistische Zellwachstumshemmung durch Lapatinib und Fulvestrant	18
III.1.1.	BT474-Zellen	20
III.1.2.	T47D-Zellen	21
III.1.3.	MCF-7-Zellen	22
III.1.4.	Adriamycin resistente NCI/ADR-Zellen	23
III.2.	Lapatinib und Fulvestrant bewirken G1-Phase Zellzyklusarrest	24
III.3.	Western Blot	26
III.3.1.	Überblick über den Rezeptorstatus	26
III.3.2.	Kombinierte Hemmung von PI3K/AKT und Ras/ERK	27
III.4.	Der Effekt von Lapatinib, Fulvestrant und monoklonalen anti-HER2-Antikörpern auf BT474 Mamma-Zell-Sphäroide	30
III.5.	Fulvestrant reduziert ER $\beta$ mRNA signifikant	32
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>34</b>
IV.1.	Synergistische Zellwachstumshemmung	34
IV.2.	Die Bedeutung des HER2/HER3-Heterodimers	34
IV.3.	Zellzyklusarrest	35
IV.4.	Die Bedeutung von PDK 1	36

IV.5.	Synergistische Herabregulation von phosphoryliertem AKT- Protein	36
IV.6.	Synergistische Herabregulation von phosphoryliertem ERK- Protein	37
IV.7.	Alternative HER2 Hemmung in Kombination mit Fulvestrant	38
IV.8.	Der Effekt auf die Expression der ER $\beta$ mRNA	38
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>42</b>
<b>VII.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>43</b>
 <b>Anhang zu II. Material und Methoden</b>		<b>50</b>
I.	Geräte	50
II.	Verbrauchsmaterialien	51
III.	Chemikalien & Reagenzien	52
IV.	Lösungen und Puffer	54
	IV.1. Zellvitalitätsmessung	54
	IV.2. Proteinpräparation	54
	IV.3. Zellzyklusanalyse	54
	IV.4. Western Blot	55
V.	Antikörper	56
	V.1. Primär Antikörper	56
	V.2. Sekundär Antikörper	57
VI.	Kommerzielle Kits	57
VII.	Nähr-& Versuchsmedien	57
VIII.	Zellen	58
 <b>Danksagung</b>		<b>59</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>		<b>60</b>
<b>Lebenslauf</b>		<b>61</b>
<b>Publikationsliste</b>		<b>63</b>

## **I. Einleitung:**

### **I. 1. Mammakarzinom:**

Brustkrebs ist mit 27,8% die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen. In Deutschland erkranken derzeit jährlich 57.000 Frauen am Mammakarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Als Risikofaktoren gelten ein früher Beginn der Menarche, später Eintritt in das Klimakterium, Kinderlosigkeit oder ein hohes Alter bei der ersten Geburt. Ebenso besteht eine familiäre Belastung [1. Batzler et al. 2008.]. Bisher sind 2 Tumorsuppressorgene bekannt, deren Mutation zu einem erhöhten Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken führt. Das BRCA1- Gen auf Chromosom 17q und das BRCA2-Gen auf Chromosom 13q. Mutationen des BRCA1-Gens werden in bis zu 80% aller Fälle von familiär vererbtem Mammakarzinom gefunden und führen zusätzlich zu einem erhöhten Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [2. Stauber, Weyerstahl 2005].

Studien belegen, dass eine Hormontherapie mit Östrogenen oder insbesondere mit einer Kombination von Östrogenen und Gestagenen in Klimakterium und Postmenopause das Brustkrebsrisiko erhöht [3. Ravdin et al. 2007]. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen betragen derzeit über alle Stadien betrachtet ca. 81% [1. Batzler et al. 2008.] Die frühzeitigen und sensitiven diagnostischen Möglichkeiten haben dazu beigetragen, dass die Brustkrebsinzidenz stetig ansteigt, die Mortalität durch die konsequente Früherkennung jedoch abnimmt.

Für Patientinnen mit frühem Mammakarzinom, unklaren oder suspekten Befunden sowie Präkanzerosen stehen neben der sorgfältigen klinischen Untersuchung, die Mammographie inklusive mammographischer Zusatzaufnahmen, die Mammasonographie mit Hochfrequenzsonden (7,5–10 MHz), die interventionellen Methoden wie Stanzbiopsie und Vakuumbiopsie, die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittelgabe, die Galaktographie, sowie die Feinnadelpunktion zur Verfügung [4. Kreienberg et al. 2008].

85-90% der Mammakarzinome gehen vom Epithel der Duktus oder der terminalen Duktuli aus. 10-15% entwickeln sich aus dem Epithel der Lobuli. Je nach anatomischer Ausbreitung und Infiltration wird zwischen invasiven (85-95%) und nicht invasiven (5-15%) Karzinomen unterschieden. Zu den nicht invasiven Tumoren zählen das duktales Carcinoma in situ (DCIS) und das Carcinoma lobulare in situ (CLIS) [2. Stauber, Weyerstahl 2005].

## **I.2. Therapie:**

Die aktuelle Therapieempfehlung erfolgt anhand der S3 Leitlinie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) von 2008. Dabei werden die bildgebenden und invasiv gewonnenen Befunde, die Tumorhistologie, die Tumordinvasion und -ausdehnung, der immunhistochemisch gewonnene Rezeptorstatus (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor und HER2-Rezeptor), die Tumorklassifikation, Lymphknotenbefall und Metastasierung zur Therapieentscheidung beurteilt. Auch der Therapiewunsch der Patientin fließt in die Entscheidung mit ein.

Für das lokal begrenzte primäre Mammakarzinom stehen die Operation, die postoperative Radiotherapie und die medikamentöse Therapie als Möglichkeiten zur Verfügung. Operative Optionen sind brusterhaltende und ablativ Verfahren, gegebenenfalls in Kombination mit der Sentinellymphknoten-Biopsie und primären oder sekundären plastisch rekonstruktiven Eingriffen. [4. Kreienberg et al. 2008.]

Bei invasivem Karzinom ist eine Bestrahlung der betroffenen Brust nach brusterhaltender Operation immer indiziert [5. Clarke et al. 2005]. Je nach lokalem Rezidivrisiko kann eine Radiotherapie der Brust oder auch der Lymphabflußwege nach Ablatio mammae erfolgen.

Für Patientinnen mit primär inoperablen, lokal fortgeschrittenen Karzinomen (Stadium IIIB) wird eine primäre Systemtherapie, gefolgt von Operation und postoperativer Strahlentherapie empfohlen [6. Kaufmann et al. 2003]. Eine adjuvante systemische Therapie in Form einer Polychemotherapie und/oder einer endokrinen Therapie verbessert sowohl das Rezidiv freie Überleben, als auch das Gesamtüberleben in allen Altersgruppen unabhängig vom Nodalstatus substantiell [7. EBCTCG 2005]. Bei Patientinnen mit Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positiven Tumoren ist eine endokrine Behandlung indiziert. Die adjuvante Tamoxifen-Therapie kann dabei die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives um 40% oder der Sterblichkeit an einem Mammakarzinom um 31% langfristig (über 15 Jahre) deutlich senken [7. EBCTCG 2005; 8. EBCTCG 2006].

Auf der St. Gallen Konsensus Konferenz internationaler Experten für Brustkrebs 2009 wurden folgende Empfehlungen zur Ersttherapie früher Brustkrebsstadien herausgegeben:

### **I.2.1. Antihormonelle Therapie:**

Eine endokrine Therapie sollten alle Patientinnen mit Östrogenrezeptor positiven Tumoren erhalten. Diese erfolgt adjuvant für prämenopausale Patientinnen mit Tamoxifen oder Tamoxifen und Ausschaltung der Ovarialfunktion z.B. durch GnRH Analoga über 5 Jahre [9. Higgins et al. 2009, 10. Davidson 2009]. Für postmenopausale Patientinnen wird eine adjuvante Therapie mit Aromatasehemmern für 2 bis 5 Jahre oder Tamoxifen für 5 Jahre empfohlen. Neoadjuvant kann eine endokrine Therapie bei postmenopausalen Patientinnen mit hoch Rezeptor positiven Tumoren für 5 bis 8 Monate in Erwägung gezogen werden [11. Goldhirsch et al. 2009].

### **I.2.2. Anti-HER2-Therapie:**

Bei HER2-exprimierenden Tumoren ist eine Therapie mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab über 1 Jahr indiziert, wenn immunhistologisch ein Nachweis von HER2 in mehr als 30% der Zellen gelingt, oder die Bestimmung der Genamplifikation in der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) ein Verhältnis von HER2-Genkopien zu Chromosom 17 Zentromeren größer als 2,2 ergibt [11. Goldhirsch et al. 2009].

HER2-Inhibitoren werden in Kombination mit einer Chemotherapie oder als Monotherapie nach Vorbehandlung mit Taxanen und Anthrazyklinen verabreicht [12. Burstein et al. 2001, 13. Seidman et al. 2001, 14. Slamon et al. 2001].

5 Studien haben unabhängig voneinander gezeigt, dass durch die adjuvante Behandlung mit Trastuzumab in Sequenz oder Kombination mit einer Standard-Chemotherapie das relative Rezidivrisiko bei HER2-überexprimierenden Tumoren konsistent um 45% bis 50% und das relative Mortalitätsrisiko um ca. 30% gesenkt werden kann (relative Reduktion des Rezidivrisikos) [15. Joensuu et al. 2006, 16. Piccart-Gebhart et al. 2005, 17. Romond et al. 2005, 18. Slamon et al. 2006].

Der duale Tyrosinkinaseinhibitor an EGFR und HER2, Lapatinib, ist wirksam bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom, welches bereits zuvor mit Trastuzumab und Chemotherapie behandelt worden war. Aufgrund der Liquorgängigkeit von Lapatinib scheinen auch Hirnmetastasen behandelbar [19. Geyer et al. 2006]. Da Trastuzumab, insbesondere in Zusammenhang mit Anthrazyklinen, in bis zu 4,1% klinisch relevante Herzinsuffizienzen (NYHA III/IV) hervorrufen kann [17. Romond et al. 2005, 20. Tan-Chiu et al. 2005] gewinnt Lapatinib als Alternative an Bedeutung.

### I.2.3. Chemotherapie:

Für die Chemotherapie stehen mehrere Schemata zur Auswahl.

**Tabelle 3.**

nach [2. Stauber, Weyerstahl 2005].

Schema	Medikamente
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
AC	Adriamycin, Cyclophosphamid
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EC→CMF	Epirubicin, Cyclophosphamid → Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
A →CMF	Adriamycin → Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluorouracil
FEC	5-Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid
FAC	5-Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid
TAC	Taxotere, Adriamycin, Cyclophosphamid

Chemotherapie ist indiziert bei dreifach negativen Tumoren, die weder den Östrogenrezeptor, noch den Progesteronrezeptor oder HER2 exprimieren. Auch bei HER2 positiven Karzinomen sollte Chemotherapie vor oder mit Trastuzumab gegeben werden. Östrogenrezeptor-positive, HER2-negative Tumore werden abhängig vom jeweiligen Risiko mit Chemotherapie behandelt. Therapie entscheidende Tumorrisikofaktoren sind dabei: geringe Hormonrezeptorexpression, hohe Proliferationsraten, histologischer Tumorgrad 3, mehr als 4 befallene Lymphknoten, peritumorale Gefäßinvasion und eine Tumorgöße von mehr als 5 cm. Unter den verschiedenen Chemotherapieregimen empfehlen die Experten Kombinationen mit Docetaxel und Cyclophosphamid, sowie dosisdichtes Adriamycin und Cyclophosphamid gefolgt von Paclitaxel als Standardtherapien.

Eine neoadjuvante Chemotherapie wird angewendet, um die Möglichkeit zur brusterhaltenden Operation herzustellen. Dabei sollten Taxane und Antracycline, sowie bei HER2-positiven Tumoren, eine Anti-HER2-Therapie zur Anwendung kommen [11. Goldhirsch et al. 2009].

Der Effekt einer Chemotherapie ist bei Hormonrezeptor-negativen Karzinomen am größten [21. Bear et al. 2006; 22. von Minckwitz et al. 2005]. Die durch die Daten des Oxford Overviews (EBCTCG) nachgewiesenen positiven Effekte einer adjuvanten Chemotherapie auf die Rezidiv- und Sterberisiken sind am stärksten bei Frauen unter 50 Jahren ausgeprägt. Ein Nutzen ist jedoch auch für postmenopausale Frauen gegeben [7. EBCTCG 2005; 8. EBCTCG 2006].

### **I.3. Aufgabenstellung:**

Der Östrogenrezeptor  $\alpha$  spielt eine zentrale Rolle in der Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms. Etwa 70 % der Brustkrebsarten sind ER $\alpha$ -positiv und sprechen somit initial auf eine Therapie mit Antiöstrogenen wie Tamoxifen oder Fulvestrant an. Die übrigen 30% sind primär hormonresistent. Jedoch entwickelt ein hoher Prozentsatz der endokrin behandelten Tumore eine sekundäre Resistenz unter der Therapie mit Antiöstrogenen [23. Clarke et al 2003].

Fulvestrant ist ein reines Antiöstrogen, ein steroidales 7-alpha-Alkylsulphanyl Analogon von 17-beta-Östradiol und strukturell verschieden von dem nicht-steroidalen selektiven ER-Modulator (SERM) Tamoxifen. Fulvestrant hemmt kompetitiv die Bindung von Östrogen an den Östrogenrezeptor. Es induziert eine konformative Veränderung innerhalb des Rezeptors, die sich von der durch Tamoxifen oder Östrogen unterscheidet [24. Dowsett et al. 2005]. Durch die Hemmung der Rezeptor-Dimerisierung [25. Parker et al. 1993] und die Reduktion der nukleären Aufnahme des Ligand-Rezeptor-Komplexes [26. Dauvois et al. 1993], wird die Bindung des Östrogenrezeptors an Östrogen-reaktive Gene verhindert [27. Gibson et al. 1991, 28. Osbourne et al. 1995]. Während Tamoxifen als partieller Agonist an AF-1 fungiert und die Rekrutierung von Koaktivatorproteinen sowie teilweise die Transkription aktiviert, ist Fulvestrant ein reiner Antagonist. Dadurch verhindert Fulvestrant die Rekrutierung von Koaktivatorproteinen und die Östrogenrezeptor/Östrogen-responsive Elemente (ER/ERE) vermittelte Transkription [24. Dowsett et al. 2005].

Während der Entwicklung der Resistenz gegen eine endokrine Therapie spielt die Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR-Familie) eine entscheidende Rolle. Diese besteht aus vier verschiedenen Rezeptoren, EGFR (Epidermal growth factor receptor 1), HER2/Neu (erbB2 oder EGFR2), HER3 (erbB3 oder EGFR3), und HER4 (erbB4 oder EGFR4). Diese Rezeptoren beeinflussen, durch ein komplexes Zusammenwirken von Homo- und Heterodimerisation an der Zelloberfläche, zahlreiche Funktionen wie Zellwachstum, Differenzierung, Zellmotilität und Apoptoseregulation [29. Yarden et al. 2001]. Wegen ihrer Überexpression in zahlreichen neoplastischen Geweben wurden EGFR und HER2 als Ziele der Tumorthherapie erforscht. So korreliert die HER2-Überexpression in Brust-, Endometrium-, Cervix-, Lungen-, Pankreas-, Colon- und Ösophaguskarzinomen mit der Tumorgroße, dem Lymphknotenbefall, einem geringen Differenzierungsgrad, einer hohen Prozentzahl an S-Phase-Zellen, Aneuploidie und einem Mangel an Steroidrezeptoren [29. Yarden et al. 2001]. Beim Mammakarzinom findet sich in ca. 25-30% der Tumore eine

Überexpression von HER2. Diese Tumore zeichnen sich durch einen aggressiven Krankheitsverlauf und ein kurzes krankheitsfreies Intervall, sowie durch eine geringere Gesamtüberlebensrate aus [30. Slamon et al. 1987].

EGFR und HER2 stimulieren über den ERK-Signalweg die Mitose [31. Ciardiello et al. 2000], und über den PI3K-Pfad das Zellwachstum, die Zellüberlebenszeit und die maligne Transformation [32. Krasilnikov et al. 2000]. Wegen dieser Effekte stellt die Hemmung von EGFR und HER2 durch den dualen Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib eine therapeutische Möglichkeit dar, für Patienten mit Tumoren, die EGFR exprimieren und HER2 überexprimieren.

Lapatinib (GW 2016) ist ein potenter Inhibitor der HER2 und auch EGFR Typ 1 Tyrosinkinase. Die Behandlung mit Lapatinib bewirkt in Zelllinien eine starke Hemmung des Tumorzellwachstums und einen vermehrten Tumorzelltod. [33. Xia et al. 2002].

Es zeigte sich, dass sich die EGFR-Expression im Umkehrverhältnis („inverse Relationship“) erhöht, wenn der ER-Signalweg gehemmt wird [34. DeFazio et al. 1997]. In Tamoxifen-resistenten Zellen sind sowohl das EGFR- als auch das HER2-Level erhöht. Das Zellwachstum dieser Zellen wird vermutlich durch autokrine Bildung eines EGFR/HER2-Dimers und die Aktivierung des MAPK (Mitogen aktivierte Protein Kinase) Signalweges vermittelt [35. Knowlden et al. 2003]. Die onkogen vermittelte MAPK Aktivierung führt durch die Deregelung von p27 zur Aufhebung des G1-Zellzyklus Arrests und zu Resistenz gegenüber Antiöstrogenen [36. Donovan et al. 2001].

Es konnte gezeigt werden, dass Lapatinib und Tamoxifen in der Hemmung der Zellproliferation und der Östrogen-abhängigen Proteinexpression in Antiöstrogen resistenten Zellen additiv zusammenwirken. Die Kombination erzeugte einen stärkeren Zellzyklusarrest als bei der Monotherapie beobachtet werden konnte [37. Chu et al. 2005].

Zellen mit erworbener Resistenz gegen das reine Antiöstrogen Fulvestrant weisen ebenfalls eine erhöhte Expression von EGFR und seinen Signalwegen auf. Bei diesen Zellen konnte eine verbesserte Sensitivität gegenüber dem EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor ZD1839 (Iressa) nachgewiesen werden [38. McClelland 2001].

Unzweifelhaft zeigt dies eine enge Beziehung zwischen dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  und der EGFR-Familie, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Östrogen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, Brustkrebs durch Effektoren der Wachstumsfaktorrezeptorfamilie, wie Lapatinib, anzugreifen. Zusätzlich könnte die Ausbildung von Resistenzen auf endokrine Therapie durch die kombinierte Behandlung und Hemmung des EGFR/HER2-Heterodimers vermindert werden.

Daher untersuchte diese Arbeit den Effekt der Einzeltherapien und der Kombinationstherapie von Lapatinib, einem dualen Tyrosinkinaseinhibitor am EGFR- und HER2-Rezeptor, und Fulvestrant, einem reinen Östrogenrezeptorantagonisten, an verschiedenen Brustkrebszelllinien bezüglich der Wachstumshemmung, der Zellzyklushemmung und der Proteinexpressionslevel der MAPK- und PI3K/AKT- Signalwege, wie ERK1/2, Akt1 und PDK1. Weiterhin untersuchte unsere Arbeitsgruppe den Effekt alternativer HER2- Hemmer in Kombination mit Fulvestrant an 2D und 3D Zellkulturen.

Es gibt jedoch einen weiteren Östrogenrezeptor. Im Gegensatz zu Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurde Östrogenrezeptor  $\beta$  seit seiner Entdeckung kontrovers, sowohl als positiver als auch negativer prognostischer Marker, diskutiert [39. Speirs et al. 2004].

Derzeit sind 5  $\beta$ -Isoformen bekannt, die unterschiedliche Eigenschaften und Lokalisationen haben [40. Speirs et al. 2007]. ER $\beta$  1 scheint generell ein günstiger prognostischer Faktor zu sein und wird in normalem Brustdrüsengewebe exprimiert [39. Speirs et al. 2004]. ER $\beta$  2 findet sich nur wenig in normalem Brustdrüsengewebe, ist jedoch in Tumoren erhöht [41. Esslimai-Sahla et al. 2005]. Dabei scheint er mit erfolgreichem Ansprechen auf endokrine Therapie zu korrelieren [42. Palmieri et al. 2004]. Die jüngsten Studien von Speirs et al. bezeugen, dass Tumore, die nukleär ER $\beta$  2 und ER $\beta$  5 aufweisen, eine bessere Prognose haben, wohingegen das cytoplasmatische Vorkommen von ER $\beta$  1 und ER $\beta$  2 auf einen schlechten Verlauf hinweisen [40. Speirs et al. 2007]. In dieser Arbeit wurde deshalb zusätzlich auch der Einfluss von Fulvestrant und Lapatinib auf das RNA-Expressionslevel von ER $\beta$  untersucht und verglichen.

## **II. Material und Methoden:**

Die Geräte, Zellen, Nähr- und Versuchsmedien, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Reagenzien, Lösungen und Puffer, Kommerziellen Kits, Primär Antikörper und Sekundär Antikörper für die Zellvitalitätsmessung, Proteinpräparation, Zellzyklusanalyse sowie den Western Blot sind im Anhang tabellarisch angegeben.

Infolge werden die Methoden in ihrer Durchführung beschrieben.

### **II.1. Versuchssubstanzen:**

Lapatinib wurde uns freundlicher Weise von GlaxoSmithKline, Brentford, UK, bereitgestellt. Mit Fulvestrant (ICI 182,780) wurden wir durch Tocris Bioscience, Tocris Cookson Ltd., United Kingdom, ausgestattet. Beide Substanzen wurden in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 0,01nM bis 10µM im Versuchsmedium verwendet.

Trastuzumab erhielten wir von Genentech Inc. (South San Francisco, California). Den monoklonalen Antikörper gegen HER2, mAb-431, bezogen wir von Adar Biotech (Rehovot, Israel).

### **II.2. Zellkultur:**

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten Materialien und steril filtrierte Lösungen durchgeführt. Sämtliche Geräte wurden vor Gebrauch an der Werkbank mit 70 %igem Alkohol desinfiziert.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchte. Zellpassagierungen wurden alle 3 bis 4 Tage durchgeführt.

Alle verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent und wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium kultiviert. Dem Medium wurden 10% fetales Rinderserum und 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben. Dem Medium der Adriamycin resistenten MCF-7 Zellen (NCI/ADR) wurde 0,1µg Adriamycin pro ml Medium zugesetzt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin aus ihrer Haftung am Boden der Kulturflaschen gelöst.

### **II.3. MTT-Test:**

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 3000 Zellen/ml in 96-Well-Platten ausgesät und wuchsen für 24 Stunden adhäsiv an. Die Behandlung erfolgte mit Fulvestrant, Lapatinib oder der Kombination beider Substanzen in den Konzentrationen 0,01nM, 0,1nM, 1nM, 10nM, 0,1µM, 1µM und 10µM über 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Für alle Experimente wurde RPMI 1640, Phenolrot-freies Medium, mit 1% Aktivkohle abgereichertem Kälberserum, und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Dazu wurde Östrogen in einer Endkonzentration von 10nM hinzugefügt.

MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ist ein Tetrazolium Salz und wird für die Quantifizierung vitaler Zellen genutzt, da es in den Mitochondrien lebender Zellen zu violetten Formazanen umgebaut wird. Nach 68 Stunden Inkubationszeit wurden 10µl MTT-1 Lösung zu jedem Ansatz hinzugefügt. Die 96-Well-Platten wurden auf dem Shaker gerüttelt, damit sich die Lösung verteilt. Es erfolgte eine weitere 4-stündige Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die gebildeten Formazankristalle wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit MTT-2 Reagenz (100µl/Ansatz) gelöst und nach weiteren 24 Stunden mittels Extinktionsmessung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550nm quantifiziert.

Für jede Zelllinie wurden mindestens drei unabhängige Experimente, in sechsfachen Ansätzen, mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Student's T-Test überprüft. Mit Hilfe der CalcuSyn Software von BIOSOFT®, Ferguson, USA, wurde bestimmt, ob Lapatinib und Fulvestrant synergistisch zusammen wirken.

### **II.4. Western Blot Analyse:**

Zur Proteinbestimmung wurden  $3 \times 10^4$  Zellen/ml in 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit einem Endvolumen von 5ml Medium, im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI 1640, Phenol-Rot freiem Medium, mit 1% Aktivkohle abgereichertem Kälberserum, und 1% Penicillin/Streptomycin sowie 10nM Östrogen kultiviert. Die unsynchronisierten Zellen wurden mit 0,1µM Lapatinib oder 0,1µM Fulvestrant sowie mit 0,1µM Lapatinib und 1µM Fulvestrant über 72 Stunden behandelt, um die Auswirkung auf das Gesamtprotein nachzuweisen und über 2 Stunden mit jeweils 2µM Lapatinib oder 1µM Fulvestrant sowie mit 2µM Lapatinib und 1µM Fulvestrant behandelt, um das phosphorylierte Protein nachzuweisen.

Danach wurden die Zellen mit Trypsin versetzt und 3x in PBS mit 1mM Natriumorthovanadat gewaschen, bevor sie mit eiskaltem Lysepuffer 1 bis 2 Stunden auf Eis lysiert wurden. Die Ansätze wurden 20 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.

Die Gesamtproteinkonzentration der Proben wurde mit dem BCA Protein Essay Kit von Perbio Science bestimmt, damit eine gleichmäßige Proteinmenge von 30µg pro Probe aufgetragen werden konnte. Das Gesamtprotein wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei die Polyacrylamid-Konzentration des Trenngels 7%-12% betrug, abhängig von der Größe des gesuchten Proteins. Die Proteinproben wurden vor dem Lauf mit 2 x SDS auf 15µl aufgefüllt, mit jeweils 10µl Ladebuffer versetzt und für 5 bis 10 Minuten bei 95°C auf dem Schüttler denaturiert. Die Proben lagerten auf Eis und jeweils 25µl Probe und einmal 10µl Proteinmarker wurden in die Geltaschen beladen. Als Marker für die Molekulargewichte der Proteine wurde der Broad Range Marker von Santa Cruz, mit einer Bandbreite von 200 bis 6 kDa, verwendet.

Für die Elektrophorese wurden 900 ml Elektrophoresebuffer in die Kammern gegeben. Der Elektrophoreselauf fand bei 100V, 25mA und 100W über 2 bis 2,5 Stunden statt. In dieser Zeit wurden das Extra Thick Blot-Papier und die PVDF-Membran in Transferpuffer eingelegt. Die PVDF-Membran wurde zuvor 2 Minuten in reinem Methanol vorbereitet.

Die Proteine wurden in einem Semidry Blotting-Verfahren bei 15V und 2A über 30 bis 45 Minuten auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wurde das Gel auf die Membran gelegt und von beiden Seiten mit Extra Thick Blot Papier gepolstert. Die erfolgreiche Übertragung wurde mit Ponceau-S-Lösung überprüft. Die Färbung wurde mit Aqua destillata abgewaschen.

Störende Hintergrundsignale wurden durch das Blocken in 2:1 PBS mit Superblotto über 12 Stunden bei 4°C vermindert. Die Primär-Antikörper wurden über 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen gründlich mit PBS-Tween (0,1%) gewaschen und mit dem Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper über 90 Minuten inkubiert. Alle Wasch- und Inkubationsvorgänge fanden bei Raumtemperatur statt. Die Signale wurden durch Chemilumineszenz, mit Super Signal West Dura detektiert und in der Dunkelkammer auf Film gebannt. Die gleichmäßige Proteinladung wurde mittels Beta-Actin überprüft.

Mit Hilfe des ReBlot™Plus Strong Stripping Puffers von Millipore konnten die Antikörperkomplexe von der Membran gelöst werden. Dabei wurden die Membranen mit je

5ml Stripping Puffer 15 Minuten, bei Raumtemperatur, inkubiert und anschließend 3x 10 Minuten mit PBST gewaschen

## **II.5. Durchflusszytometrische Analyse:**

Die Durchflusszytometrie wurde zur Zellzyklusanalyse eingesetzt. Es wurden  $3 \times 10^4$  Zellen/ml in Doppelproben mit 0,1 $\mu$ M Lapatinib, 0,1 $\mu$ M Fulvestrant oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Als Versuchsmedium diente RPMI 1640, Phenolrot freies Medium, mit 1% Aktivkohle abgereichertem Kälberserum, und 1% Penicillin/Streptomycin sowie 10nM Östrogen. Die Zellen wurden 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle Zellen wurden zuvor 48 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 1% Aktivkohle abgereichertem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin synchronisiert. Als Kontrolle dienten native Zellen und mit 0,1 $\mu$ M DMSO behandelte Zellen. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, in eiskaltem 70%igen Ethanol fixiert und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit Lösung I behandelt. Dabei erfolgte ein RNA- Verdau zur Verhinderung der Anfärbung von RNA. Danach wurden die Proben lichtgeschützt 2 Stunden bei 4°C mit Lösung II eingefärbt. Lösung II enthielt Propidiumjodid, welches DNA anfärbt, da es in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert.

Vor der Messung am Durchflusszytometer (FACS Calibur) wurde das Gerät mit einem Standard in Form von normalen humanen Leukozyten, sowie CEN und CTN, aus dem Kit für DNA QC Particles, von Beckton Dickinson, für Zellzyklusuntersuchungen, kalibriert. Gemessen wurde nun der DNA-Gehalt der Proben anhand der Fluoreszenz einer Zelle, welche proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist. Es wurden jeweils mindestens 20000 Zellen ausgezählt.

Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden mit der ModFit Software von Verity Softhouse, Topham, ME, USA ausgewertet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Student's T-Test bestimmt.

## **II.6. Morphogenetische Analyse:**

Die Ergebnisse dieser Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten wurden freundlicher Weise von Anna Emde et al. aus dem Weizmann Institute of Science in Rehovot 76100, Israel zur Verfügung gestellt. Hierzu wurden Acht-Well-Platten (BD Biosciences) mit 35 $\mu$ l Matrigel

pro Well bestückt. Die BT474- Zellen wurden zunächst, wie zuvor beschrieben in Zellkulturflaschen gezogen, mit Trypsin versetzt und in Phenolrot-freiem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Matrigel (5%) und Serum (5%) vermischt und ausgesät. Die Zellen wurden in die zelluläre Matrix eingebettet und nach 4 Tagen mit 50nM Lapatinib, 250nM Fulvestrant, 5µg/ml Trastuzumab und 5µg/ml des monoklonalen Antikörpers mAb-431 sowie deren Kombinationen behandelt. Das Medium wurde alle 4 Tage erneuert. Nach 11 Tagen der Behandlung wurden die Sphäroide mit ImageJ ausgezählt (95 Sphäroide pro Messung). Jede Behandlung wurde mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen [43. Emde et al. 2011].

## **II.7. PCR-Analyse:**

Um den Effekt von Lapatinib und Fulvestrant auf die ERβ mRNA von T47D- Zellen darzustellen, wurden  $3 \times 10^4$  Zellen/ml in dreifachen Ansätzen über 24 und 48 Stunden mit 1µM Fulvestrant, 1µM Lapatinib sowie 1µM Fulvestrant und 1µM Lapatinib behandelt, in RPMI 1640 Phenolrot freien Medium, mit 1% Aktivkohle abgereichertem Kälberserum, und 1% Penicillin/Streptomycin sowie 10nM Östrogen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Für die RNA-Extraktion wurde das QIAGEN RNeasy Mini Kit genutzt, sowie die TURBO DNA-free DNase von Ambion, entsprechend den Herstellerempfehlungen für kultivierte Zellen, um die RNA von genomischer DNA zu befreien. Zur cDNA Synthese wurde das SS II System von Invitrogen, nach den Herstellerangaben für Random Hexamer geprimte cDNA-Synthese verwendet. Die cDNA-Synthese wurde an 1µg RNA bei 42°C durchgeführt. Für die quantitative TaqMan PCR wurde die cDNA 1:5 verdünnt. Die PCR wurde in einem Light Cycler 480 von Roche in 96-Well Microtiter-Platten mit einem Endvolumen von 25µl durchgeführt. Optimale Reaktionsbedingungen wurden mit 2,5µl von 10x PCR Puffer (200mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), 4,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0mM dNTP, 0,5U Platinum Taq DNA Polymerase ( Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland ), 200nM specific sense Primer, 200nM specific antisense Primer, 120nM specific Probe und 1µM ROX erreicht. Zum Schluss wurden dem Reaktionsgemisch 2µl Matrizen cDNA hinzugeben. Zu Beginn der Amplifikation wurden die Matrizen 3 Minuten bei 95°C denaturiert, gefolgt von 40 weiteren Denaturierungszyklen von 20 Sekunden bei 95°C und kombinierter Primeranlagerung sowie Primerverlängerung für 30 Sekunden bei 65°C. Der Fluoreszenzanstieg der FAM wurde automatisch während der PCR gemessen.

Die quantitative real-time PCR-Messung von TBP wurde, wie oben beschrieben mit den Primern und der TaqMan Sonde von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland, durchgeführt.

Alle Proben wurden in Zweifachbestimmung gemessen und zur weiteren Berechnung wurden die Mittelwerte bestimmt. CT-Werte ab 40 wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen, da sie keine quantitative Aussage über den RNA Gehalt gaben, sondern lediglich das Ende des PCR-Laufs darstellten.

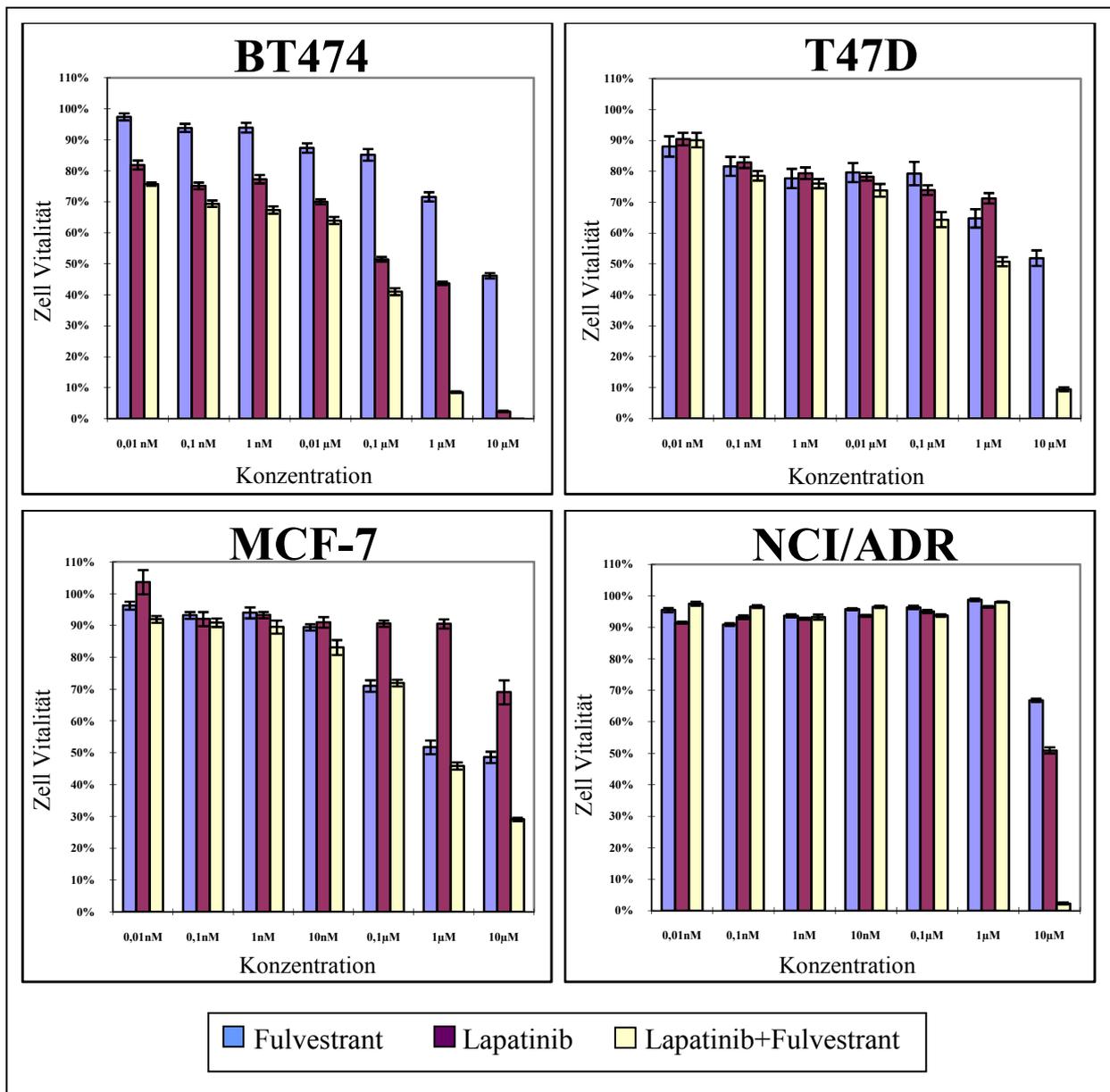
Wir benutzten die spezifischen ER $\beta$  Primer ESR2 S (5'-ATTgACCACCCCggCAA, Exon 7 1460-1476) und ESR2 A (5'-TgCCAggAgCATgTCAAAGATT, Exon 7 1564-1543) hergestellt durch TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland.

Die statistischen Analysen wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode [44. Livak, Schmittgen 2001] und dem gepaarten t-Test mit der GraphPad Prism 4 Software von GraphPad Software, Inc, PlayaLa Jolla, USA, durchgeführt.

### III. Ergebnisse:

#### III.1 Synergistische Zellwachstumshemmung durch Lapatinib und Fulvestrant:

Im Zellüberlebensassay (MTT) konnte für alle getesteten Zelllinien eine Dosis abhängige Wirksamkeitssteigerung durch die Kombinationstherapie von Lapatinib und Fulvestrant erreicht werden.



#### Abbildung1:

Für den Zellvitalitätsassay wurden BT474-, T47D-, MCF-7 und NCI/ADR-Zellen 72 Stunden mit Fulvestrant, Lapatinib, sowie Lapatinib und Fulvestrant in zunehmender Konzentration von 0,01nM bis 10µM behandelt. Dabei konnte ab einer Konzentration von 0,1µM bis 10µM durch die Kombinationsbehandlung eine stärkere Zellwachstumshemmung als durch die Monotherapie erreicht werden. Die Abbildung zeigt jeweils ein repräsentatives Experiment für jede Zelllinie.

Es wurde, mit Hilfe des MTT-Tests, die Zellvitalität in BT474-, T47D-, MCF-7- und Adriamycin resistenten MCF-7-Zellen nach einer Behandlung durch Lapatinib, Fulvestrant und die Kombination beider Wirkstoffe in zunehmenden Konzentrationen von 0,01nM bis 10 $\mu$ M über 72 Stunden untersucht. Dabei wurde das Zellwachstum ab einer Konzentration von 0,1 $\mu$ M bis 10 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant effektiver gehemmt als durch die Behandlung mit nur einer der beiden Substanzen. Es wurde anhand von drei unabhängigen, repräsentativen Experimenten der Median der prozentualen Wachstumshemmung berechnet und die inhibitorische Konzentration bestimmt, bei der 50 % Wachstumshemmung erzielt wurde (IC<sub>50</sub>). Mit Hilfe der CalcuSyn Software wurde der Combination-Index (CI) errechnet. Dieser gibt Aussage darüber, ob eine additive Wirkung beider Substanzen (CI=1), eine antagonistische Wirkung (CI>1), oder ein synergistisches Zusammenwirken von Lapatinib und Fulvestrant (CI<1) besteht. Anhand der Wachstumshemmung wurde der Combination-Index für die IC<sub>90</sub>, bei der 90% der Zellen am Wachstum gehindert werden, die IC<sub>75</sub> und die IC<sub>50</sub> berechnet.

Lapatinib und Fulvestrant agieren in drei der getesteten Zelllinien synergistisch. In BT474- und T47D-Zellen erzielten Lapatinib und Fulvestrant in den drei berechneten inhibitorischen Konzentrationen IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> und IC<sub>90</sub> eine synergistische Wachstumshemmung.

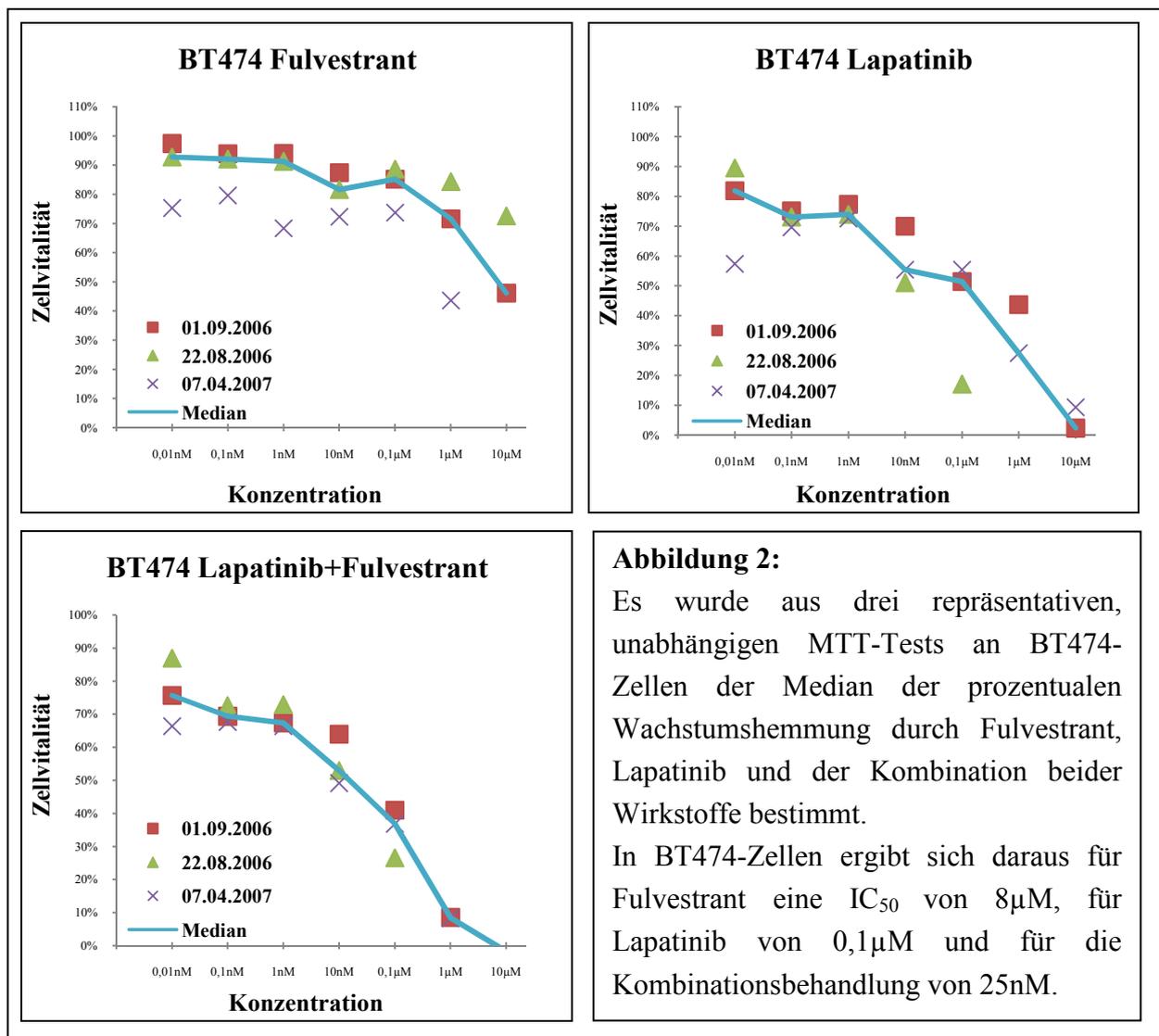
Für die MCF-7-Zelllinie ließ sich nur eine additive Wirkung der beiden Substanzen nachweisen. Die Kombination führte dort zu einer maximalen Zellwachstumshemmung von 73%. In der Adriamycin resistenten MCF-7-Zelllinie, NCI/ADR konnte durch die Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant hingegen eine synergistische Wirkung bei der IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> und IC<sub>90</sub> erzielt werden.

### III.1.1. BT474-Zellen:

Bei den BT474 Zellen erzielte die Kombination von Fulvestrant und Lapatinib für die  $IC_{50}$  ( $CI=0,108$ ), die  $IC_{75}$  ( $CI=0,009$ ) und die  $IC_{90}$  ( $CI=0,0008$ ) eine synergistische Wirkung.

Durch die Kombination konnte ab einer Konzentration von 0,1nM und höher eine signifikant stärkere Wachstumshemmung als durch die Einzelsubstanzen erreicht werden (im t-Test 0,1nM Fulvestrant vs. 0,1nM Lapatinib und Fulvestrant: p-Wert=0,016).

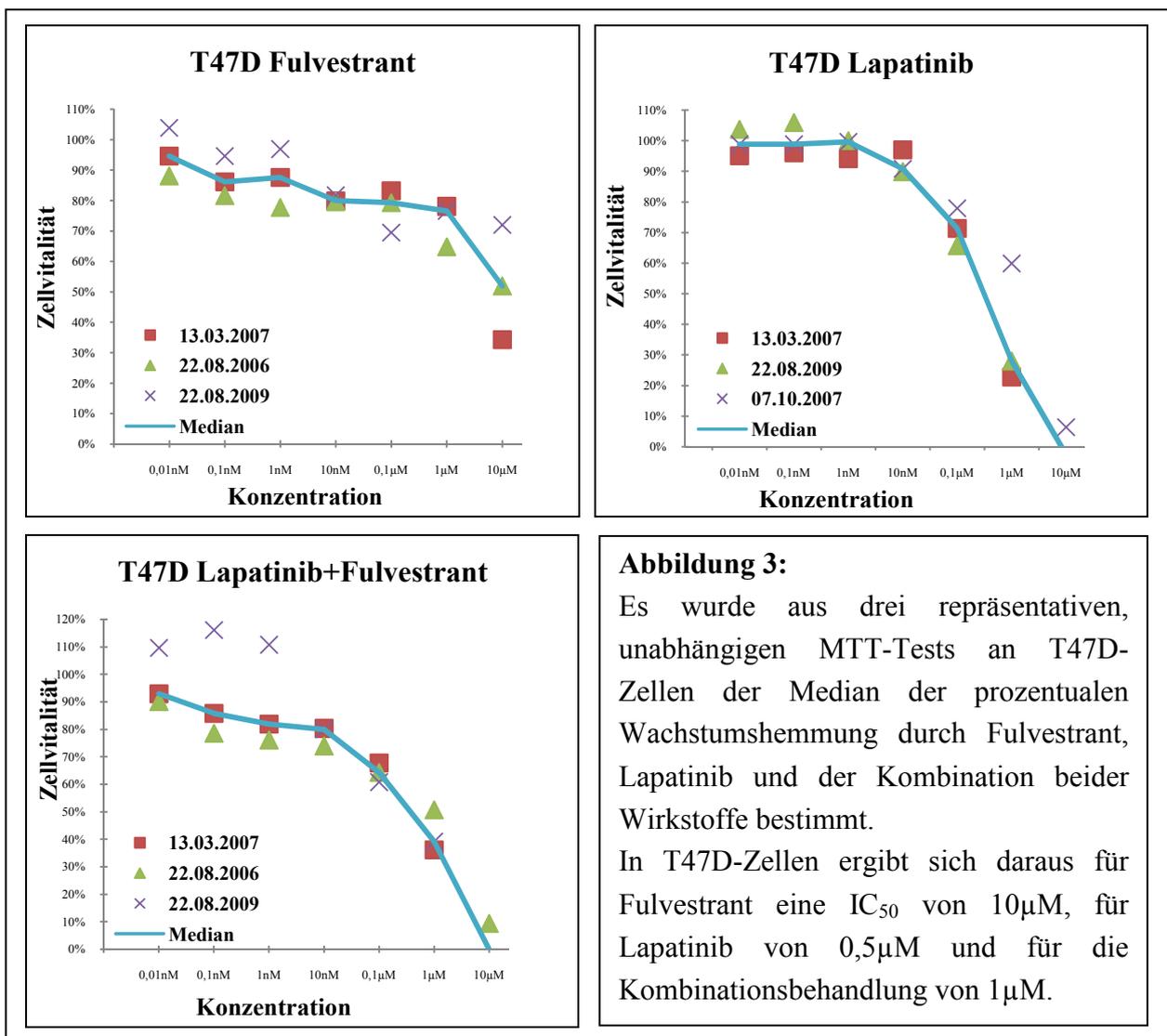
Die  $IC_{50}$  für Lapatinib lag bei 0,1 $\mu$ M. Fulvestrant hemmte bei einer Konzentration von 8 $\mu$ M, 50% des Zellwachstums der BT474-Zellen. Durch 10 $\mu$ M Fulvestrant waren im Mittel 64% der Zellen avital. Die Kombination beider Wirkstoffe hemmte bereits durch 25nM Lapatinib und Fulvestrant 50% aller Zellen in ihrem Wachstum. Bei 10 $\mu$ M Lapatinib sowie 10 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant konnten im MTT-Test keine vitalen BT474-Zellen mehr nachgewiesen werden.



### III.1.2. T47D-Zellen:

Bei der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie T47D zeigten Lapatinib und Fulvestrant für die IC<sub>50</sub> (CI=0,299), die IC<sub>75</sub> (CI=0,351) und die IC<sub>90</sub> (CI=0,412) eine synergistische Wirkung.

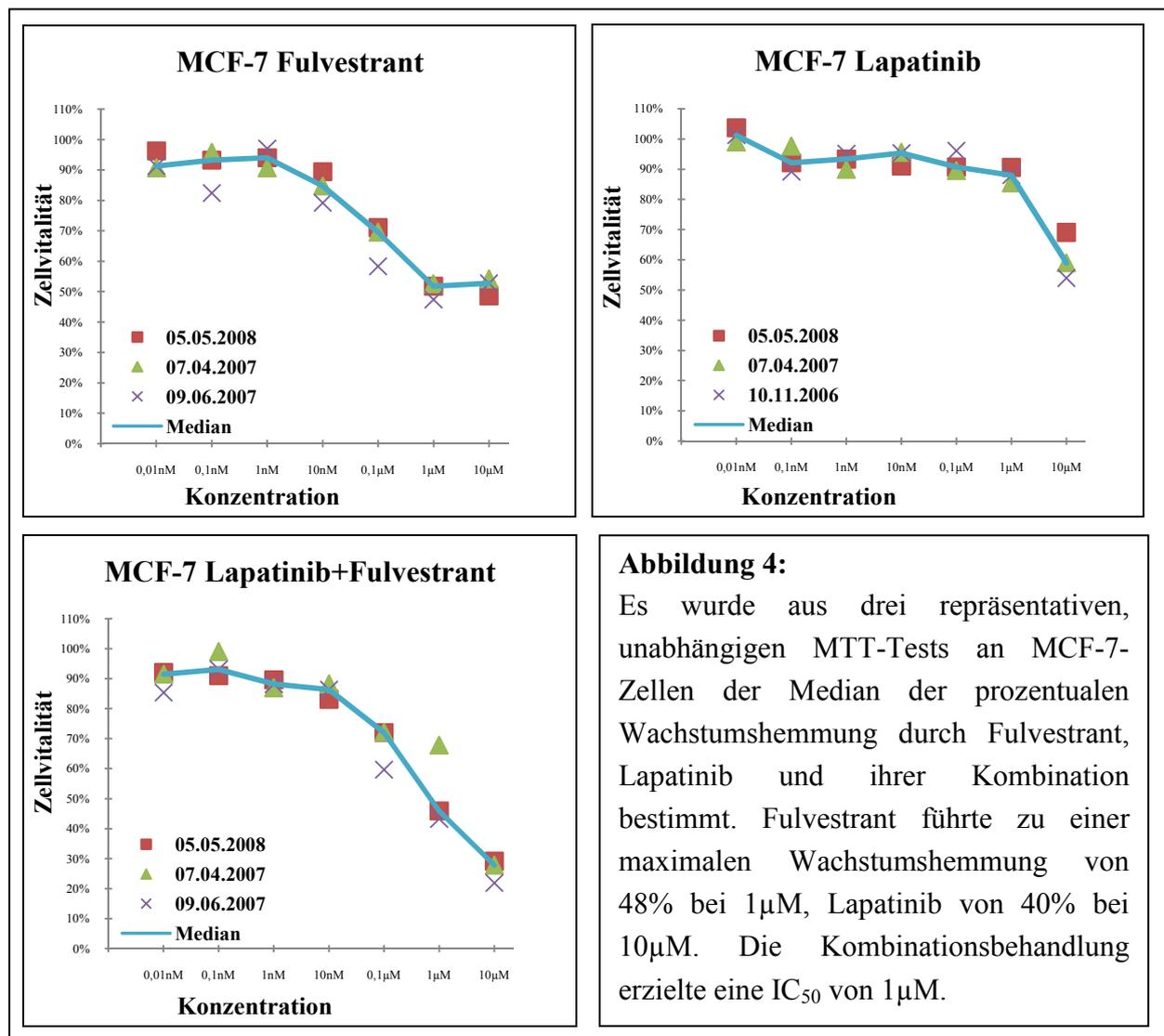
Das Zellwachstum konnte durch die Kombination ab einer Konzentration von 0,1 $\mu$ M signifikant stärker gehemmt werden als mit Fulvestrant allein (t-Test für 0,1 $\mu$ M Fulvestrant vs. 0,1 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant: p-Wert= 0,046; 1 $\mu$ M Fulvestrant vs. 1 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant: p-Wert= 0,007; 10 $\mu$ M Fulvestrant vs. 10 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant: p-Wert= 0,023). Wurden die Zellen über 72 Stunden mit Fulvestrant allein behandelt, so waren bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M im Medium noch 50% der Zellen vital. Die stärkste Wachstumshemmung konnte durch Lapatinib erreicht werden. Lapatinib führte bereits bei 0,5 $\mu$ M zu einer Zellwachstumshemmung von 50%. Dieser Effekt wurde durch die Kombination im Mittel bei 1 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant erreicht. Bei einer Dosierung von 10 $\mu$ M Lapatinib sowie 10 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant konnte im MTT-Test kaum noch Zellwachstum nachgewiesen werden.



### III.1.3. MCF-7-Zellen:

Bei der ER $\alpha$ - positiven Zelllinie MCF-7 erzielten Lapatinib und Fulvestrant bei der IC<sub>50</sub> eine additive Wachstumshemmung, der Combination-Index war mit 0,98 nahezu 1.

Fulvestrant bewirkte bei einer Dosierung von 1 $\mu$ M im Medium eine Wachstumshemmung von 48%. Diese konnte jedoch auch durch höhere Dosierung nicht verstärkt werden. Lapatinib hatte bei der höchsten Dosierung von 10 $\mu$ M einen maximalen Effekt von 40% Zellwachstumshemmung. Die Kombination beider Wirkstoffe hatte, in den Konzentrationen von 0,01nM bis 1 $\mu$ M, den gleichen Einfluss auf das Zellwachstum wie die Monotherapie mit Fulvestrant. Ab einer Dosierung von 10 $\mu$ M Lapatinib und 10 $\mu$ M Fulvestrant, überwog die Wachstumshemmung durch die Kombinationstherapie, die Wirkung beider Monosubstanzen (t-Test: 10 $\mu$ M Fulvestrant vs. 10 $\mu$ M Lapatinib und Fulvestrant p-Wert=0,0008). Die Behandlung der MCF-7-Zellen mit 10 $\mu$ M Lapatinib und 10 $\mu$ M Fulvestrant verringerte das Zellwachstum, von 50% bei 1 $\mu$ M, um weitere 20%. Die maximale Zellwachstumshemmung erreichte nur 73%, weshalb sich keine IC<sub>75</sub> oder IC<sub>90</sub> bestimmen ließen.

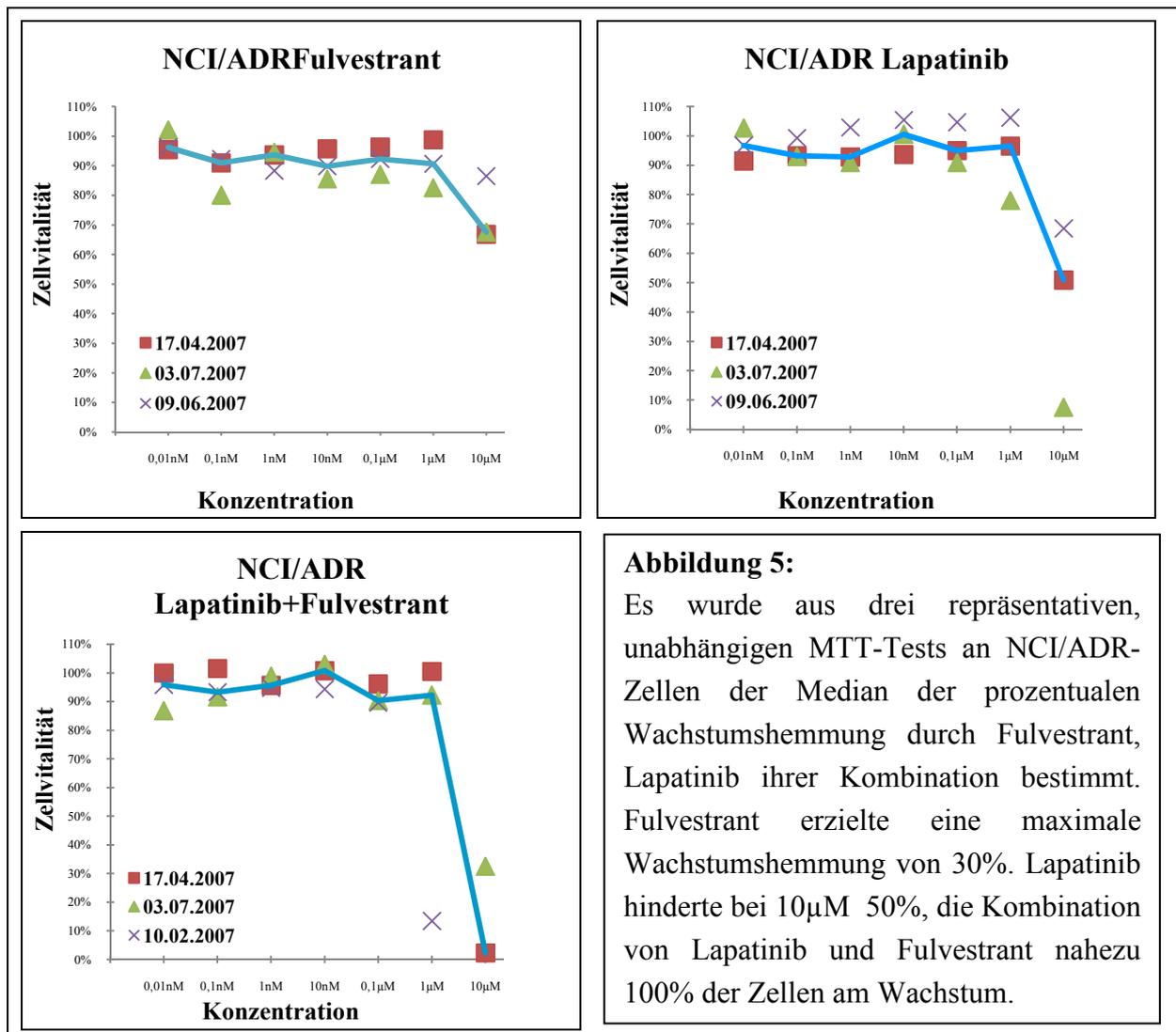


### III.1.4. Adriamycin resistente NCI/ADR-Zellen:

Bei der Adriamycin resistenten MCF-7 Zelllinie NCI/ADR besteht eine synergistische Wirkung für die  $IC_{50}$  ( $CI=0,001$ ), die  $IC_{75}$  ( $CI=3,014 \times 10^{-6}$ ) und die  $IC_{90}$  ( $CI=8,656 \times 10^{-9}$ ), welche jedoch erst ab einer Konzentration von mehr als  $1 \mu M$  erreicht werden.

Die effektivste Wachstumshemmung konnte durch die Kombination von  $10 \mu M$  Lapatinib und Fulvestrant erreicht werden (t-Test:  $10 \mu M$  Fulvestrant vs.  $10 \mu M$  Lapatinib und Fulvestrant p-Wert=0,016).

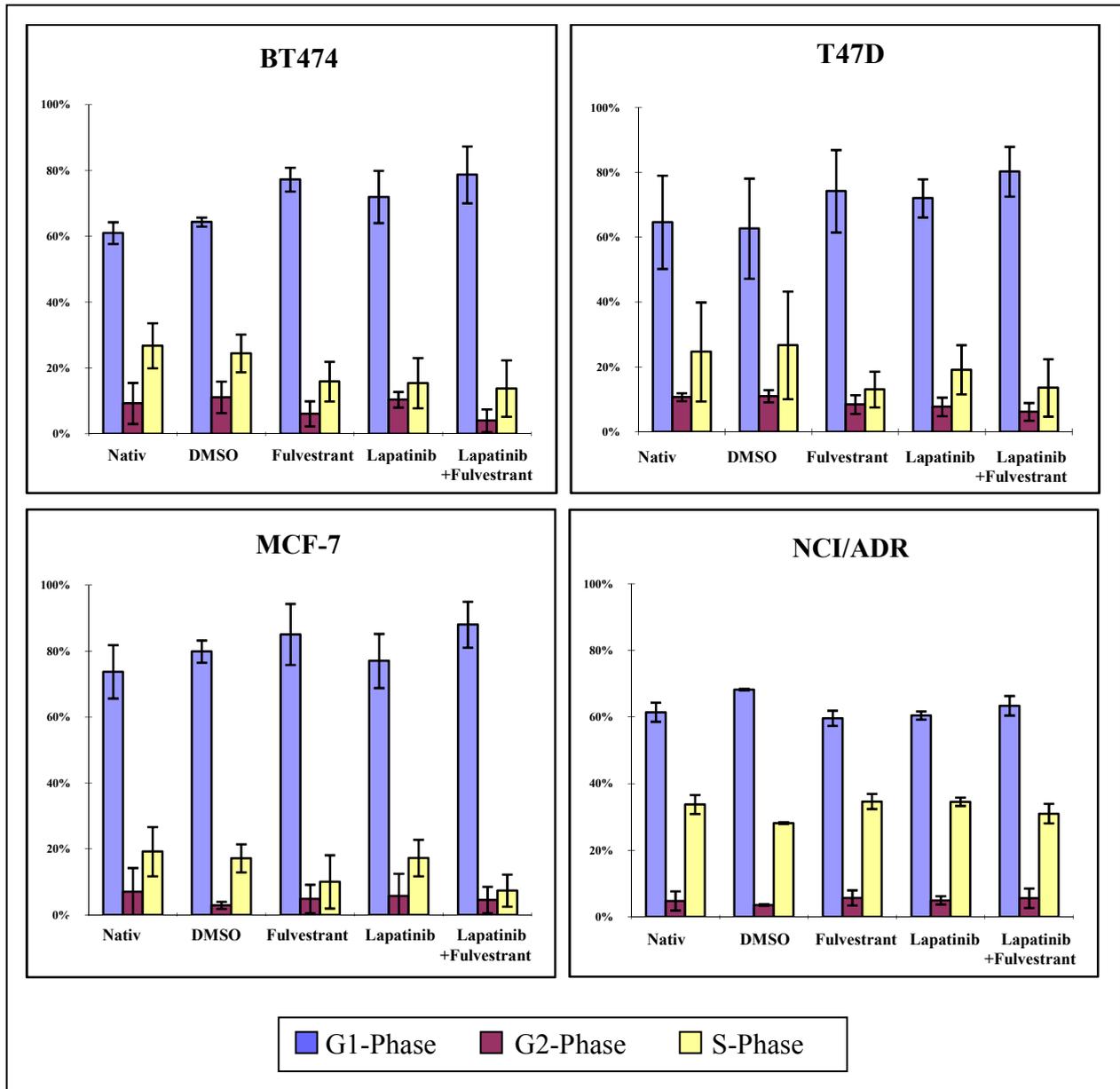
Die Zellen reagierten insgesamt wenig auf die Einzelsubstanzen. Erst durch die höchste verwendete Dosierung,  $10 \mu M$ , erzielte Fulvestrant eine Wachstumshemmung der NCI/ADR-Zellen von 30%. Lapatinib reduzierte das Zellwachstum um 50% bei einer Konzentration von  $10 \mu M$  im Medium. Die Behandlung der Zellen mit Lapatinib und Fulvestrant zeigte in den Konzentrationen von  $0,01 nM$  bis  $1 \mu M$  keine signifikante Wirkung. Nach 72 Stunden Inkubation mit  $10 mM$  Lapatinib und Fulvestrant waren jedoch nur noch 3% vitale Zellen im MTT-Test nachweisbar.



**Abbildung 5:**

Es wurde aus drei repräsentativen, unabhängigen MTT-Tests an NCI/ADR-Zellen der Median der prozentualen Wachstumshemmung durch Fulvestrant, Lapatinib ihrer Kombination bestimmt. Fulvestrant erzielte eine maximale Wachstumshemmung von 30%. Lapatinib hinderte bei  $10 \mu M$  50%, die Kombination von Lapatinib und Fulvestrant nahezu 100% der Zellen am Wachstum.

### III.2. Lapatinib und Fulvestrant bewirken G1-Phase Zellzyklusarrest:



**Abbildung 6:**

Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen 48 Stunden synchronisiert, danach 48 Stunden mit 0,1µM Fulvestrant, 0,1µM Lapatinib, 0,1µM Lapatinib und Fulvestrant sowie als Kontrolle mit 0,1µM DMSO behandelt. Es zeigte sich eine deutliche Verschiebung des Zellzyklus zur G1-Phase, durch die Behandlung mit Fulvestrant, Lapatinib und der Kombination beider Wirkstoffe in BT474-Zellen. In MCF-7-Zellen konnte durch Fulvestrant und die Kombinationstherapie die Synthesephase signifikant gehemmt werden, sowie durch die Kombinationsbehandlung der Anteil an Zellen in der G1-Phase signifikant erhöht werden.

Der Zellzyklus gliedert sich in die G1-Phase, in der sich die Zelle auf die nachfolgende DNA-Synthese vorbereitet, die Synthese-Phase (S-Phase), die G2-Phase, in welcher die DNA-Verdopplung überprüft wird, und die Mitose-Phase. Eine Hemmung der Zellproliferation

stellt sich als Zellzyklusstop in der G1-Phase oder als Abnahme der S-Phase dar [45. Aktories et al. 2005].

Durch die Kombination des Antiöstrogens Fulvestrant mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib konnte sowohl in ER $\alpha$ -positiven als auch in ER $\alpha$ -negativen HER2-überexprimierenden Zellen ein signifikanter G1-Phase Arrest herbeigeführt werden.

Die Zellen wurden mit Lapatinib, Fulvestrant oder der Kombination beider Substanzen in einer Konzentration von 0,1 $\mu$ M über 48 Stunden behandelt. Zuvor wurden sie 48h synchronisiert.

In der Zellzyklusanalyse ergab sich eine signifikante Wirkung auf die G1-Phase. So konnte bei den BT474-Zellen der Anteil der Zellen in der G1-Phase erhöht werden. Befanden sich ohne Behandlung 61% der Zellen in der G1-Phase, so konnten durch die Behandlung mit Fulvestrant 77,3% der Zellen in der G1-Phase verzeichnet werden (p-Wert <0,0001). Dies stellte eine Steigerung um 16,3% dar. Durch die Behandlung mit Lapatinib stieg der Prozentsatz um 11% auf 72% der BT474-Zellen in der G1-Phase (p-Wert=0,0214). Der größte Effekt auf die G1-Phase konnte durch die Kombination beider Substanzen erzielt werden. Der Anteil an BT474-Zellen in der G1-Phase stieg signifikant um 17,7% auf 78,7% (p-Wert=0,0027) durch die Behandlung mit 1 $\mu$ M Lapatinib und 1 $\mu$ M Fulvestrant.

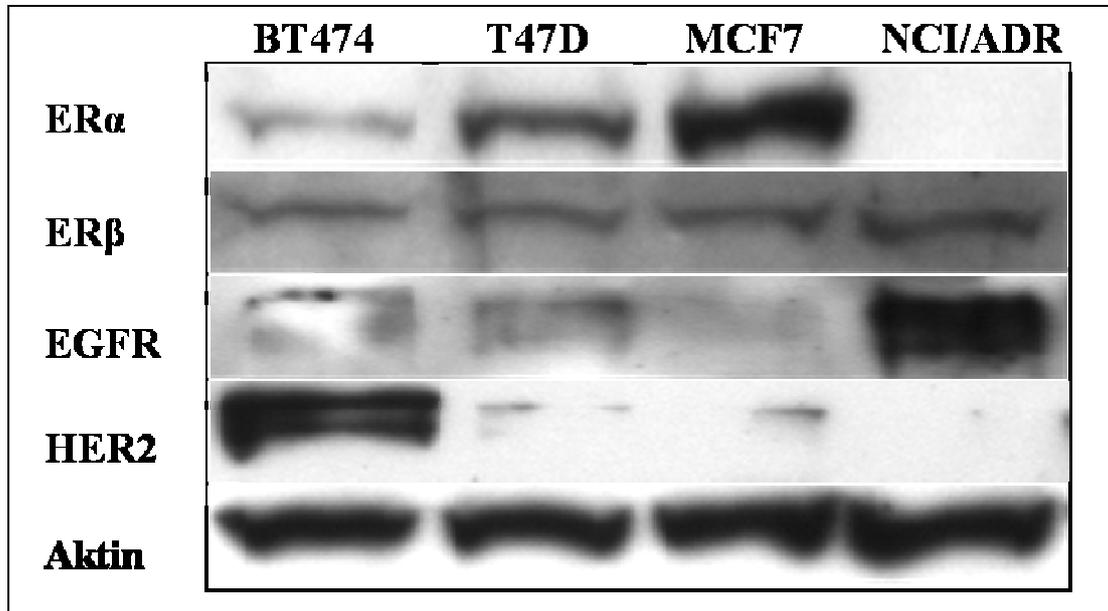
In der MCF-7-Zelllinie verblieben 14,3% mehr Zellen in der G1-Phase durch die Kombinationsbehandlung mit Lapatinib und Fulvestrant (p-Wert=0,0172). Im Vergleich zu 73,7% nativer MCF-7-Zellen, befanden sich nach der Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant 88% der Zellen in der G1-Phase.

In MCF-7-Zellen zeigte sich auch eine signifikante Hemmung der S-Phase durch die Behandlung mit Fulvestrant allein, sowie durch Lapatinib und Fulvestrant. So konnte der Anteil an Zellen in der Synthese Phase von 19,2% bei unbehandelten MCF-7-Zellen, durch Fulvestrant um 9,1% auf 10,1% (p-Wert=0,0157) gesenkt werden. Die Kombinationsbehandlung reduzierte den Anteil der Zellen in der S-Phase um 11,8% auf 7,4% (p-Wert=0,012). Lapatinib allein hatte keine signifikante Wirkung auf die S-Phase der getesteten Zelllinien.

Der Liganden-gebundene Östrogenrezeptor beeinflusst die Zellzyklusprogression [46. Sutherland et al. 1983b]. Analog dazu bewirkte Fulvestrant in der ER $\alpha$ -positiven MCF-7-Zelllinie die stärkste Hemmung der S-Phase.

### III.3. Western Blot:

#### III.3.1. Überblick über den Rezeptorstatus:



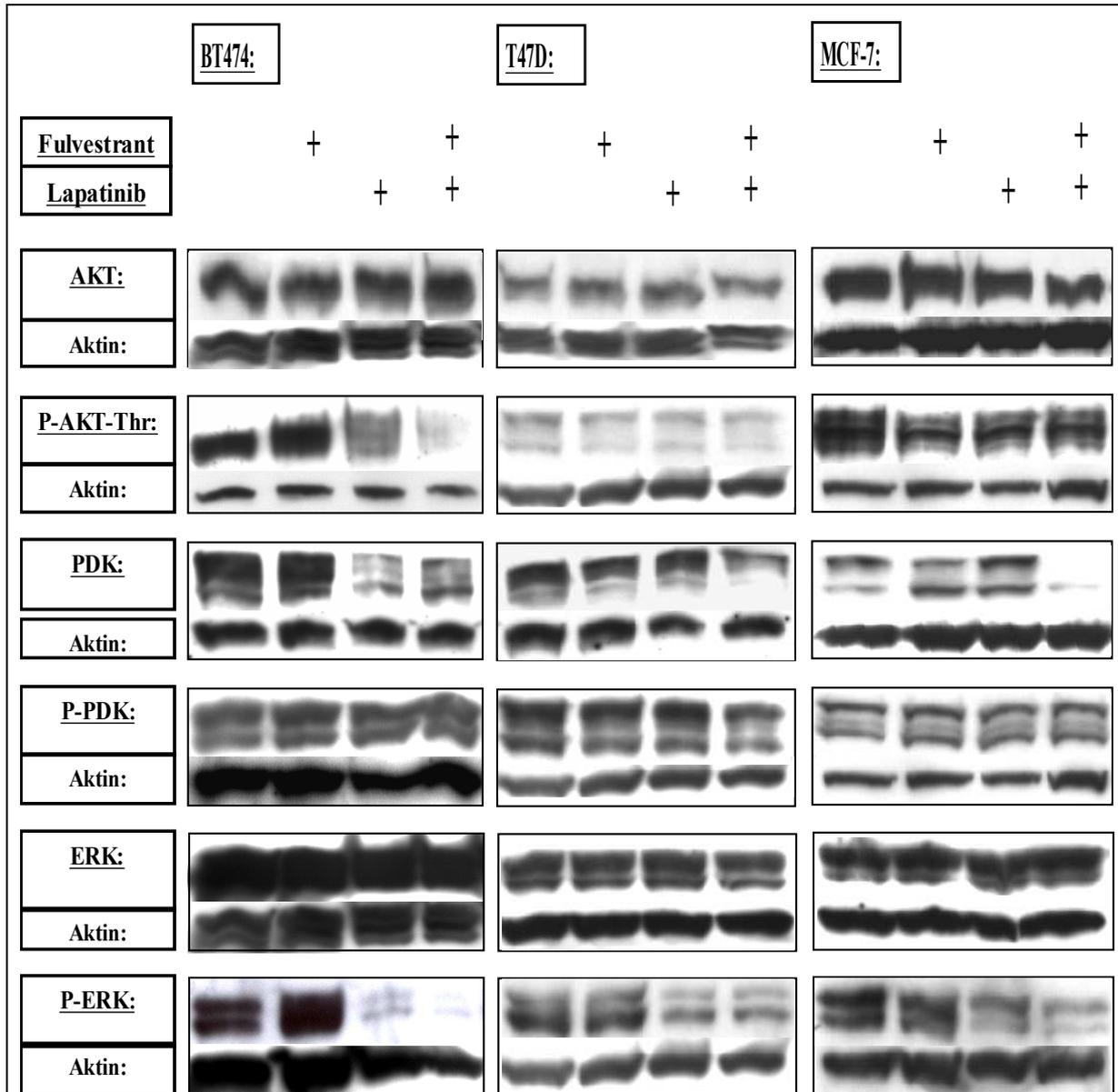
**Abbildung 7:**

Eine Übersicht der Rezeptorexpression in der Western Blot Analyse von unbehandelten BT474-, T47D-, MCF-7 und NCI/ADR-Zellen, welche 72 Stunden in Nährmedium inkubiert wurden. Dabei sind T47D und MCF-7 stark ER $\alpha$ -positiv, NCI/ADR-Zellen enthalten die meisten HER1-Rezeptoren und BT474 sind HER2-überexprimierend. Alle Zellen enthalten nahezu gleiche Level an ER $\beta$ .

Um eine Übersicht der Rezeptorexpression von ER $\alpha$ , ER $\beta$ , EGFR und HER2 in den vier verwendeten Zelllinien zu erhalten, wurden unbehandelte Zellen in Nährmedium gezogen und nach 72h geerntet. Der Nachweis der Rezeptorproteine erfolgte semi-quantitativ mittels Western Blot Analyse.

Es zeigte sich, dass MCF-7 Zellen den größten ER $\alpha$ -Gehalt besitzen, gefolgt von T47D-Zellen. BT474 exprimieren ER $\alpha$  nur gering. In NCI/ADR-Zellen ließ sich ER $\alpha$  hingegen nicht nachweisen. Alle Zelllinien wiesen nahezu gleiche Mengen ER $\beta$  auf. EGFR wird von BT474 und T47D nur gering exprimiert. Das schwächste Rezeptorproteinsignal fand sich bei MCF-7-Zellen. NCI/ADR hingegen wiesen den größten Gehalt an EGFR auf. Die BT474 Zelllinie ist nachgewiesen HER2-überexprimierend, was sich auch im Western Blot bestätigen ließ. T47D und MCF-7 besitzen kaum HER2, bei NCI/ADR ließ sich der Rezeptor mittels Western Blot nicht nachweisen.

### III.3.2. Kombinierte Hemmung von PI3K/AKT und Ras/ERK:



**Abbildung 8:**

Western Blot Analyse von BT474-, T47D- und MCF-7-Zellen nach 2 Stunden Behandlung mit 1 $\mu$ M Fulvestrant, 2 $\mu$ M Lapatinib und der Kombination mit 1 $\mu$ M Fulvestrant und 2 $\mu$ M Lapatinib, um den Effekt auf phosphorylierte Proteine nachzuweisen, und nach 72 Stunden Behandlung mit jeweils 1 $\mu$ M Fulvestrant, 1 $\mu$ M Lapatinib und der Kombination beider Substanzen, um den Effekt auf das Normalprotein zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass die Kombination zu einer größeren Hemmung von p AKT-Thr in BT474-Zellen, von PDK-1 in MCF-7-Zellen und von p-ERK, in BT474- und MCF-7-Zellen, als Lapatinib oder Fulvestrant allein führt.

Die ERK- und PI3K/AKT-Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Entartung und Medikamentenresistenz [47. McCubrey et al. 2006].

Die aktivierte PI3K konvertiert das membrangebundene Phosphatidylinositol 4,5 Phosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol 3,4,5 Phosphat (PIP<sub>3</sub>), welches die Anlagerung der Proteinkinase B und ihre Phosphorylierung durch die Phosphoinositol abhängige Kinase-1 (PDK-1) ermöglicht. Durch diesen Mechanismus werden zahlreiche wachstumsrelevante Prozesse reguliert [48. Aktories et al. 2005]. PDK-1 phosphoryliert unter anderem auch AKT an seinem Threonin 308 und Serine 473 Rest. AKT ist ein elementarer Mediator des PI3K-vermittelten Signalweges und hat zahlreiche nachgeschaltete Substrate, die jeweils an der Entstehung von Krebs mitwirken können [47. Mc Cubrey et al. 2006].

Um den Effekt von Lapatinib, Fulvestrant und der Kombination beider Wirkstoffe auf diese Signalwege zu untersuchen, wurden sowohl das Gesamtprotein als auch die aktivierten Signaltransduktoren in BT474-, T47D- und MCF-7-Zellen untersucht. Dazu erhielten die Zellen eine Behandlung mit jeweils 0,1µM Lapatinib oder 0,1µM Fulvestrant sowie mit 0,1µM Lapatinib und 0,1µM Fulvestrant über 72 Stunden um die Auswirkung auf das Gesamtprotein nachzuweisen.

Um den Effekt der Wirkstoffe auf die phosphorylierten Proteine darzustellen, wurde eine kurze Inkubationszeit gewählt. Die Zelllinien wurden für 2 Stunden mit jeweils 2µM Lapatinib oder 1µM Fulvestrant sowie mit 2µM Lapatinib und 1µM Fulvestrant behandelt. Dabei wurde die IC<sub>50</sub> der Substanzen in den MTT-Assays berücksichtigt.

In der Western-Blot Analyse fand sich eine Reduktion von PDK-1 nach der Behandlung von BT474-Zellen durch Lapatinib, sowie Lapatinib und Fulvestrant. Dabei gab es jedoch keine Wirksamkeitssteigerung durch die Kombination im Vergleich zu Lapatinib allein. Bei MCF-7 Zellen sorgte die Kombination beider Wirkstoffe für eine Reduktion des nachweisbaren Gesamtproteins von PDK-1. In T47D-Zellen ließen sich keine signifikanten Veränderungen feststellen. P-PDK jedoch konnte in keiner der getesteten Zelllinien durch Lapatinib oder Fulvestrant signifikant beeinflusst werden.

Die AKT-Gesamtproteinexpression blieb durch die Behandlung von BT474-, T47D- und MCF-7 Zellen mit Lapatinib, Fulvestrant und der Kombination über 72 Stunden unverändert. Das aktivierte Protein p-AKT-Thr konnte bei BT474-Zellen durch die Behandlung mit Lapatinib als Monosubstanz und in der Kombination mit Fulvestrant über 2 Stunden vermindert nachgewiesen werden. Durch die Monotherapie mit Fulvestrant wurde die Signalstärke von p-AKT sogar leicht erhöht. Bei T47D- und MCF-7-Zellen zeigten sich keine Veränderungen.

Die extrazellulär regulierte Kinase (ERK) spielt eine Rolle bei der malignen Transformation. Durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwegen wird die Zellteilung stimuliert. Die Wachstumsfaktoren aktivieren über ihre Rezeptortyrosinkinasen das Ras-Protein, welches über die RAF-Kinase und die mitogenaktivierten Protein Kinasen MEK und ERK zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Fos führt. ERK induziert gleichzeitig den Transkriptionsfaktor Elk1, der die Transkription des c-fos-Gens stimuliert. Erhöhte Mengen von c-Fos sowie dessen Phosphorylierung bewirken eine verstärkte Transkription von Genen, die für die Proliferation essentiell sind [49. Aktories 2005].

Durch die Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant über 2 Stunden konnte das phosphorylierte ERK in BT474-Zellen, T47D-Zellen und in MCF-7-Zellen durch Lapatinib und die Kombination von Lapatinib und Fulvestrant reduziert werden. Dabei konnte in BT474- Zellen und in MCF-7 Zellen nach der Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant das Proteinsignal, im Vergleich zur Behandlung mit Lapatinib alleine, noch vermindert werden. In T47D-Zellen ließ sich der Effekt der Lapatinib Monotherapie durch die Kombination mit Fulvestrant nicht steigern. Das Gesamtprotein von ERK wurde durch die Behandlung in allen Zelllinien nicht verändert. Interessanterweise zeigte sich jedoch ein verstärktes Signal an p-ERK unter alleiniger Behandlung mit Fulvestrant in BT474-Zellen. Dies könnte auf einen kompensatorischen ERK-Signalweg im Falle einer HER2-Überexpression hinweisen. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit Lapatinib vollständig aufgehoben werden. Zudem zeigen BT474-Zellen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber der Kombinationsbehandlung im Vergleich mit den anderen getesteten Zelllinien. Bereits in den MTT-Tests zeigte sich der größte synergistische Effekt durch Lapatinib und Fulvestrant in den BT474-Zellen.

Eine kompensatorische Aktivierung von EGFR und begleitende Aktivierung von ERK-Signalwegen wurde bereits nach Behandlung von Mamma-Zellen mit Tamoxifen beschrieben [50. Gee et al 2003].

Da Fulvestrant ein kompletter Inhibitor am Östrogenrezeptor  $\alpha$  ist, im Gegensatz zu dem nicht steroidal selektiven ER-Modulator (SERM) Tamoxifen, könnte die beobachtete Aktivierung von ERK in den mit Fulvestrant behandelten Zellen einem gemeinsamen Kompensationsmechanismus zu Grunde liegen. Dieser ist vermutlich EGFR oder HER2 vermittelt, da Lapatinib die ERK-Aktivierung in den mit Fulvestrant behandelten Zellen vollständig hemmte.

#### **II.4. Der Effekt von Lapatinib, Fulvestrant und monoklonalen anti-HER2-Antikörpern auf BT474 Mamma-Zell-Sphäroide:**

Die Ergebnisse dieser Experimente wurden von dem Mitglied unserer Arbeitsgruppe Dr. Anna Emde im Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel erstellt und mir freundlicher Weise zur Verfügung gestellt [43. Emde et al. 2011].

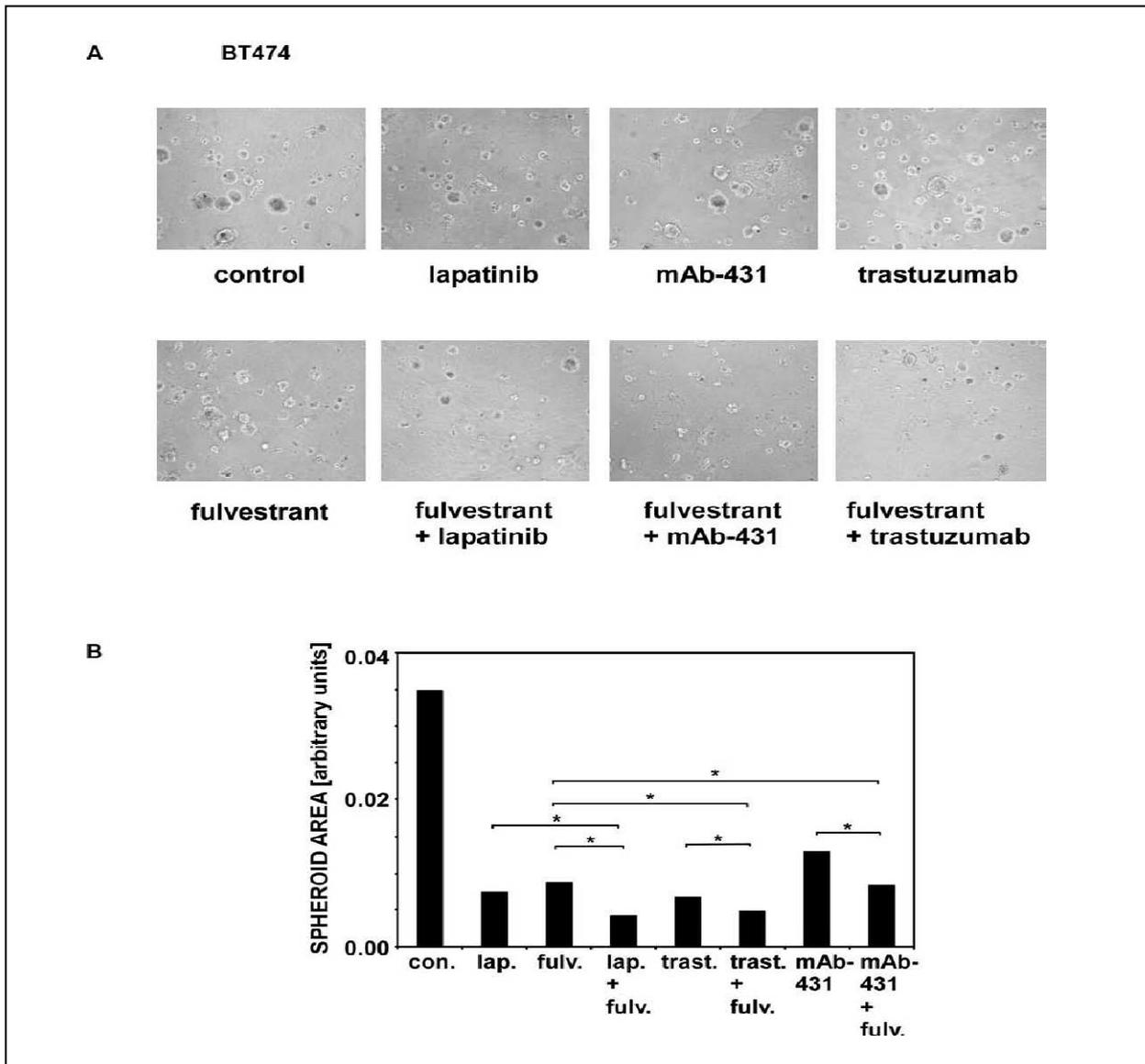
In Zellvitalitätsassays wurde zunächst getestet, ob der Effekt der Kombinationstherapie von Lapatinib und Fulvestrant durch andere HER2-Hemmer übertroffen wird. Hierfür wurden Trastuzumab, ein bereits klinisch genutzter monoklonaler Antikörper gegen HER2 [51. Cobleigh et al. 1999] und mAb-431, ein muriner Antikörper spezifisch für humanes HER2 [52. Klapper et al. 1997] genutzt. Alle getesteten Kombinationen waren der Monotherapie an BT474-Zellen überlegen. In T47D-Zellen zeigte sich ein deutlich schwächerer Effekt, aufgrund der geringeren HER2-Expression. So kann schlussgefolgert werden, dass die Hemmung von HER2 durch einen Kinaseinhibitor oder einen monoklonalen Antikörper synergistisch mit einem Östrogenrezeptorantagonisten fungiert, speziell in HER2-überexprimierenden Brustkrebszelllinien.

Um die Ergebnisse der Zellvitalitätsassays auszuweiten, wurden BT474 Sphäroide 4 Tage in Matrigel gezüchtet und dann mit 50nM Lapatinib, 5µg/ml Trastuzumab, 5µg/ml mAb-431 und 250nM Fulvestrant, sowie der Kombination aus Fulvestrant und Lapatinib, Fulvestrant und Trastuzumab oder Fulvestrant und mAb-431 behandelt. Am Tag 11 nach Behandlungsbeginn wurden mittels ImageJ die 15 Tage alten Sphäroide in Querschnittsfeldern ausgezählt. Die Monotherapie zeigte bereits eine deutliche Wachstumshemmung gegenüber der Nativzelllinie. Die drei Kombinationsbehandlungen jedoch bewirkten eine statistisch überlegene Zellwachstumshemmung gegenüber der Monotherapie.

Wie bereits im Zellvitalitätsassay, erzielten auch hier Fulvestrant und Lapatinib, sowie Fulvestrant und Trastuzumab die stärkste Zellwachstumshemmung.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Kombination von Fulvestrant und Lapatinib zu einer ausgeprägten Hemmung des Zellwachstums in ER $\alpha$ -positiven, HER2-überexprimierenden BT474- Zellen führt, sowohl als Monolayer als auch in Sphäroiden. Diese Wirkung ist dem inhibitorischen Effekt der Wirkstoffkombination an zwei Kinasekaskaden, AKT und ERK zuzuschreiben. Wie auch Lapatinib verstärken die spezifischen monoklonalen Antikörper an HER2 den Effekt des Östrogenrezeptor-

Antagonisten und bestätigen damit die molekularen Mechanismen, wodurch sich Möglichkeiten für die klinische Anwendung ergeben.



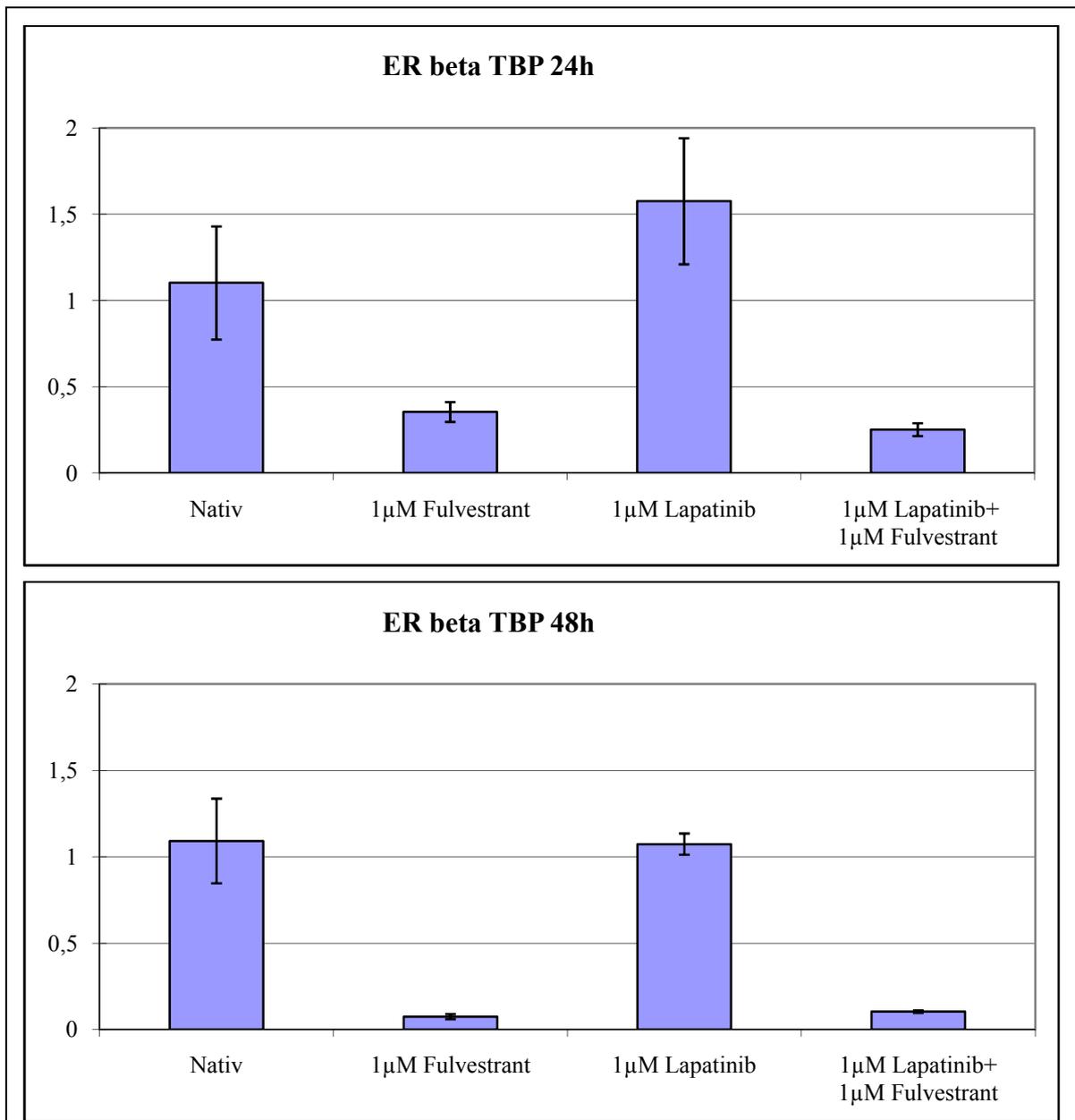
**Abbildung 9:** [45. Emde et al. 2011]

Der Effekt von Lapatinib, Trastuzumab, mAb-431 und Fulvestrant sowie deren Kombinationen auf BT474 Sphäroide:

(A) BT474-Zellen wurden in Matrigel ausgesät um Sphäroide zu bilden. Nach 4 Tagen wurden sie mit Lapatinib (50nM), Fulvestrant (250nM), Trastuzumab (5µg/ml), mAb-431 (5 µg/ml) und den entsprechenden Kombinationen behandelt. Am Tag 15 wurden die oben gezeigten Bilder aufgenommen.

(B) Jeweils 95 Sphäroide wurden ausgezählt. Es zeigt sich eine deutliche Überlegenheit der Kombinationstherapien. Besonders Lapatinib und Fulvestrant, sowie Trastuzumab und Fulvestrant haben eine starke Wachstumshemmung zur Folge.

### III.5. Fulvestrant reduziert ER $\beta$ mRNA signifikant:



**Abbildung 10:**

Bei der PCR Analyse der ER $\beta$  mRNA in T47D-Zellen reduzierte 1  $\mu$ M Fulvestrant, sowie die Kombination von 1  $\mu$ M Lapatinib und 1  $\mu$ M Fulvestrant nach 24 und 48 Stunden Behandlung signifikant die Expression von ER $\beta$ . Lapatinib hatte keinen signifikanten Effekt.

Es ist unlängst bekannt, dass Fulvestrant den ER $\alpha$  bindet, blockiert und zu einer Herabregulation des zellulären ER $\alpha$ -Levels führt [24. Dowsett et al. 2005]. Diese Arbeit untersuchte den Einfluss von Fulvestrant und Lapatinib auf den Östrogenrezeptor  $\beta$ .

In den meisten Brustkrebstumoren ist die ER $\beta$ -Expression geringer als die Expression von ER $\alpha$  [53. Lazennec et al. 2001]. In der für die PCR- Versuche verwendeten Zelllinie T47D ist das Verhältnis von ER $\alpha$  zu ER $\beta$  9:1 [54. Ström et al. 2004].

Die quantitative PCR-Analyse der ER $\beta$ -Expression wurde an unbehandelten T47D-Zellen sowie nach 24 und 48 stündiger Inkubation mit 1 $\mu$ M Fulvestrant, 1 $\mu$ M Lapatinib und der Kombination von jeweils 1 $\mu$ M Fulvestrant und 1 $\mu$ M Lapatinib durchgeführt. Dazu wurde der Light Cycler 480 von Roche verwendet. Die Daten wurden mit dem Referenzgen TBP abgeglichen.

Fulvestrant führte zu einer deutlichen Reduktion der ER $\beta$  mRNA-Expression. Im Vergleich zu unbehandelten T47D-Zellen senkte die Monotherapie mit 1 $\mu$ M Fulvestrant nach 24 Stunden (p-Wert=0,002) und nach 48 Stunden (p-Wert=0,0025) signifikant das Expressionslevel der ER $\beta$  mRNA. Durch die Kombinationsbehandlung mit 1 $\mu$ M Lapatinib und 1 $\mu$ M Fulvestrant konnte nach 24 (p=0,0037) und 48 Stunden (p=0,003) die ER $\beta$  mRNA-Expression ebenfalls signifikant verringert werden. Die Kombination beider Substanzen hatte, im Vergleich mit der Behandlung mit Fulvestrant allein, jedoch keinen additiven Effekt zur Folge.

Lapatinib konnte den ER $\beta$  nicht signifikant beeinflussen. Nach einer Behandlung von 24 Stunden mit 1 $\mu$ M Lapatinib war jedoch eine leichte Erhöhung der ER $\beta$  mRNA-Expression zu verzeichnen.

## **IV. Diskussion:**

Diese Arbeit belegt, dass es einen synergistischen Effekt der Kombination von Lapatinib und Fulvestrant in der Wachstumshemmung von Brustkrebszellen, sowie im G1-Phase Zellzyklus Arrest, gibt. Ebenso besteht ein Kombinationseffekt in der Hemmung der P13K/AKT und Ras/ERK Signalwege.

### **IV.1. Synergistische Zellwachstumshemmung:**

Lapatinib und Fulvestrant führten in allen getesteten Zelllinien zu einer Zellwachstumshemmung. In BT474-Zellen, MCF-7-Zellen und Adriamycin resistenten NCI/ADR-Zellen konnte dieser Effekt durch die Kombination beider Wirkstoffe noch verstärkt werden. Bei der ER $\alpha$ -positiven T47D-Zelllinie erzielte Lapatinib die stärkste Wachstumshemmung im Vergleich mit Fulvestrant und der Kombination von Lapatinib mit Fulvestrant. Dies ist vermutlich auf die HER3-Expression in dieser Zelllinie zurück zu führen.

### **IV.2. Die Bedeutung des HER2/HER3-Heterodimers:**

Es konnte gezeigt werden, dass selbst Zellen mit geringer HER2-Expression besser auf Lapatinib ansprechen, als Zellen mit hohem Level an EGFR.

Der beste Effekt der Kombinationstherapie im Zellvitalitätsassay (MTT-Test) wurde bei BT474-Zellen erreicht. Diese Zellen exprimieren hohe Raten an HER2 und HER3, jedoch wenig EGFR und ER $\alpha$ . Auch bei den ER $\alpha$ -positiven T47D- und MCF-7-Zellen, welche nur geringfügig HER2 exprimieren, erzielte Lapatinib eine deutlich Wachstumshemmung im Zellvitalitätstest. Bei der EGFR-exprimierenden, ER $\alpha$ -negativen MDA MB 231-Zelllinie war bei den Untersuchungen von Konecny et al. die IC<sub>50</sub> für Lapatinib mit 18,6 $\mu$ M die höchste IC<sub>50</sub> aller getesteten Zelllinien [55. Konecny et al. 2006], obwohl MDA MB 231-Zellen relativ hohe Mengen an EGFR aufweisen. MDA MB 231-Zellen exprimieren jedoch HER2 und HER3 nur in sehr geringen Maße [56. DeFazio et al. 2000]. Betrachtet man also diese und unsere Ergebnisse, so liegt der Schluss nahe, dass die Hauptaktivität von Lapatinib bei ER $\alpha$ -positiven Zellen im Vergleich zu ER $\alpha$ -negativen, EGFR-überexprimierenden Zellen auf die funktionelle Aktivität des HER2/HER3-Heterodimers zurückzuführen ist.

Da T47D- und MCF-7-Zellen nur niedrige Level an EGFR und HER2 haben, dafür aber relativ hohe Level an HER3 [56. DeFazio et al. 2000], liegt die Vermutung nahe, dass die

Hemmung des HER2/HER3-Dimers eine gravierende Wirkung auf das Wachstum dieser Zellen hat.

Von den ErbB-Rezeptoren enthält HER3 die meisten PI3K-Bindungsstellen, dabei ist es jedoch Kinase defizient und wird hauptsächlich über Heterodimerisierung mit anderen HER-Mitgliedern aktiviert. Das HER2/HER3-Heterodimer ist der potenteste Rezeptorkomplex der ErbB-Familie. HER3 kann dabei von EGFR und HER2 phosphoryliert werden [29. Yarden et al. 2001]. Holbro et al. untersuchten die Rolle des HER2/HER3-Heterodimers bei der Zellentartung und entdeckten, dass es als onkogene Einheit bei der Brustkrebsproliferation fungiert. Die Rolle des HER3 besteht dort in der Bindung des aktivierten HER2 an den Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase B-Signalpfad [57. Holbro et al. 2003]. Es ist also möglich, dass Brustkrebszellen, auch wenn sie HER2 nur gering exprimieren, in der Lage sind, potente HER2/HER3-Heterodimere zu bilden, oder dass HER2 phosphoryliert wird, in dem es durch Liganden gebundenes EGFR, HER3 oder HER4 transaktiviert wird [58. Artaega 2006]. In Fulvestrant resistenten Zelllinien wurde eine erhöhte Aktivität von EGFR und HER3 beobachtet. Ein gezielter Angriff auf EGFR, HER2 und HER3 könnte auch in Fulvestrant resistenten Zellen zu vollständiger Wachstumshemmung führen [59. Frogne et al. 2009]. Lapatinib erzielte sogar in der ER $\alpha$ -positiven, Fulvestrant-sensitiven, T47D-Zelllinie eine größere Wachstumshemmung als Fulvestrant allein, es könnte daher ein geeigneter Kombinationspartner in der Resistenztherapie sein.

#### **IV.3. Zellzyklusarrest:**

Durch den ligandengebundenen Östrogenrezeptor wird die Zellzyklusprogression gefördert [46. Sutherland et al. 1983b]. So sahen wir eine signifikante Verminderung der Zellen in der Synthesephase durch die Behandlung mit dem Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant. Die Zellzyklushemmung durch Lapatinib alleine war deutlich geringer als die durch Fulvestrant in der Monotherapie. Hier erfolgte die stärkste Hemmung der ER $\alpha$ -Signalkaskade und des Zellzyklusprogress in MCF-7-Zellen, welche ER $\alpha$  stark exprimieren. Dies geht mit den Beobachtungen für Antiöstrogene wie Tamoxifen einher, welche die östrogeninduzierte Zellzyklusprogression effektiv blockieren [60. Sutherland et al., 1983a; 46. Sutherland et al., 1983b]. Antiöstrogene hemmen das Brustkrebswachstum durch die Induktion des Zellzyklusarrests. Dies erfordert die Wirkung des Zellzyklusinhibitors p27(Kip1), um den G1-Arrest in Östrogenrezeptor positiven Zellen zu vermitteln. Onkogen vermittelte MAPK-Aktivierung führt zu Resistenz gegenüber Antiöstrogenen durch die Deregulation von p27.

Der MAPK-Signalweg behindert die p27-Phosphorylierung, reduziert die p27-Proteinlevel, vermindert die inhibitorischen Eigenschaften des verbleibenden p27 und ist an der Resistenzbildung gegen Antiöstrogene beteiligt [36. Donovan et al. 2001]. Der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib hemmt die MAPKinase [37. Chu et al. 2005]. Durch die Kombination des Antiöstrogens Fulvestrant mit Lapatinib konnte sowohl in ER $\alpha$ -positiven als auch in HER2-überexprimierenden Zellen ein signifikanter G1-Phase Arrest herbeigeführt werden.

#### **IV.4. Die Bedeutung von PDK-1:**

Phosphoinositol abhängige Kinase-1 (PDK-1) und AKT-1 (AKT) sind beide mit dem Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) Signalpfad verknüpft, welcher in Brustkrebszellen dereguliert ist. Auch HER2/HER3 beeinflusst diesen Signalweg. Liang et al. konnten zeigen, dass die Überexpression von PDK-1 und AKT-1 zu Resistenz gegenüber der Behandlung mit den Chemotherapeutika Paclitaxel und Adriamycin führt. Sie fanden heraus, dass die Expression und Aktivierung von phosphoryliertem PDK-1 und AKT-1 mit dem zytotoxischen Erfolg von Paclitaxel, Adriamycin und Gemcitabine korrelierten. So waren Zellen mit hohem Level an phosphoryliertem PDK-1 resistenter gegen Gemcitabine, als Zellen mit hohem Level an phosphoryliertem AKT-1. Daher schätzen Liang et al. PDK-1 als eine bessere Alternative zu AKT-1, als Ziel in der Resistenzminderung von Brustkrebszellen gegenüber chemotherapeutischen Wirkstoffen, speziell Gemcitabine, ein [61. Liang et al. 2006].

Wir konnten eine Herabregulation von PDK-1 durch Lapatinib und die Kombination von Lapatinib und Fulvestrant in BT474-Zellen beobachten, sowie eine Reduktion der Proteinexpression von PDK-1 durch die Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant als Kombination in MCF-7-Zellen.

#### **IV.5. Synergistische Herabregulation von phosphoryliertem AKT-Protein:**

An membranständigen ER $\alpha$  gebundenes Östrogen interagiert mit einem HER2-Dimer, welches die Aktivierung von PI3K/AKT induziert [62. Stoica et al. 2003]. Campbell et al. wiesen nach, dass PI3K und AKT den ER $\alpha$  auch in Abwesenheit von Östrogen aktivieren können. Dabei erhöht PI-3-Kinase die Aktivität sowohl der Östrogen unabhängigen Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) als auch der Östrogen abhängigen Aktivierungsfunktion-2 (AF-2) des Östrogenrezeptors. AKT erhöht nur die Aktivität der AF-1. Desweiteren zeigten

sie, dass die AKT- Überexpression zu einer Hochregulation von Bcl-2 führt, welche die Tumorzellen scheinbar vor Tamoxifen induzierter Apoptose schützt [63. Campbell et al. 2001]. Diese Beobachtungen bekräftigen die synergistische Wirksamkeit von Lapatinib und Fulvestrant in Hinblick auf AKT, denn der AKT-Signalweg ist in HER2-positiven Brustkrebsarten begleitend hoch reguliert, wo er das Zellüberleben und Therapieresistenzen beeinflusst [64. Modi et al. 2005; 65. Lin et al. 2005].

In unseren Western Blot-Assays führte die Kombinationsbehandlung von Lapatinib und Fulvestrant bei BT474-Zellen zu einer synergistischen Herabregulation der Proteinexpression von phosphoryliertem AKT (p-AKT-Thr 308).

#### **IV.6. Synergistische Herabregulation von phosphoryliertem ERK-Protein:**

Der Raf/MEK/ERK-Pfad hat eine bedeutende Wirkung auf die Regulation der Apoptose und der Zellzyklus Progression. Durch die Raf/MEK/ERK-Kaskade wird unter anderem der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert. Dabei wird die antiapoptotische Wirkung dem PI3K/AKT-Pfad zugesprochen. Über Raf/MEK/ERK werden Zellwachstum und Zellproliferation vermittelt [66. Shelton et al. 2004]. Yarden et al. beschreiben in ihrer Arbeit über das ErbB Signalnetzwerk, das sowohl das EGFR/EGFR-Homodimer als auch das HER2/HER3-Heterodimer den Ras/Raf/Mek/MAPK(ERK)-Signalweg aktivieren können [29. Yarden et al. 2001].

Durch Lapatinib sowie die Kombination von Lapatinib und Fulvestrant konnte die Herabregulation von phosphoryliertem ERK in allen getesteten Zellreihen erreicht werden. Da BT474-, T47D- und MCF-7 -Zellen EGFR nur gering exprimieren, ist die Hauptwirkung von ERK in diesen Zelllinien vermutlich durch das HER2/HER3-Heterodimer vermittelt.

Yang et al. beschreiben, dass HER2-Überexpression und die HER2-Signalwege zu Umverteilung des ER $\alpha$  in die cytoplasmatische Lokalisation fördert. Hier spielt ERK1/2 eine wichtige Rolle. In den Versuchen von Yang et al. führte die Hemmung von HER2 durch den monoklonalen HER2-Antikörper, Herceptin, zur Unterdrückung der ERK1/2-Stimulation, sowie zur Rückverlagerung des ER $\alpha$  in den Nukleus. Hierdurch potenzierte sich die Wachstumshemmung durch Tamoxifen [67. Yang et al 2004].

In unseren Experimenten zeigte sich unter Monotherapie mit Fulvestrant in HER2-überexprimierenden BT474 ein Anstieg an phosphoryliertem ERK. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit Lapatinib und Fulvestrant vollkommen aufgehoben werden. Hier zeigen sich erneut eine Signalpfadverknüpfung und die Bedeutung der komplementären

Mechanismen durch den Einsatz eines HER2-Hemmers und eines Östrogenrezeptorantagonisten.

#### **IV.7. Alternative HER2- Hemmung in Kombination mit Fulvestrant:**

In einer jüngeren klinischen Studie von Kaufmann et al. wurde die Kombination von einem Aromatasehemmer, Anastrozole und dem monoklonalen HER2- Antikörper, Trastuzumab ohne Chemotherapie an postmenopausalen Patientinnen mit HER2/ER-positivem metastasiertem Mammakarzinom getestet. Trastuzumab und Anastrozole verbesserten, im Vergleich zu Anastrozole allein, das mittlere progressionsfreien Überleben um 2,4 Monate (PFS: 4,8 vs. 2,4 Monate) [68. Kaufmann et al. 2009]. Eine weitere klinische Studie von Johnston et al. untersuchte die Wirkung von Lapatinib und dem Aromatasehemmer Letrozole ebenfalls bei postmenopausalen Patientinnen mit metastasiertem HER2/ER-positivem Mammakarzinom. Im Vergleich zu Letrozole allein verbesserte sich das progressionsfreie Überleben um 5,2 Monate durch die Kombinationstherapie (8,2 vs. 3,0 Monate) [69. Johnston et al 2009].

Es gibt bereits zahlreiche experimentelle Beweise für die klinische Überlegenheit der Kombinationstherapie von HER2-Hemmern und antihormoneller Therapie. Auch unsere Ergebnisse bestätigen dies. Die Kombination von Fulvestrant mit Lapatinib, Trastuzumab und dem monoklonalen murinen HER2 Antikörper Ab-431 waren der Monotherapie jeweils signifikant überlegen.

#### **IV.8. Der Effekt auf die Expression der ER $\beta$ mRNA:**

Heute kennt man 5 Isoformen des ER $\beta$ . Shaaban et al. fanden heraus, dass der ER $\beta$  2 ein aussagekräftiger prognostischer Indikator für Brustkrebs ist, jedoch die nukleäre oder zytoplasmatische Expression ganz unterschiedliche Aussagen über den Verlauf machen können. Dabei korrelieren der nukleäre ER $\beta$  2 und ER $\beta$  5 signifikant mit dem Gesamtüberleben und der ER $\beta$  2 zusätzlich mit dem krankheitsfreien Überleben. Die Expression von ER $\beta$  2 spricht ebenfalls für ein Ansprechen auf Hormontherapie und steht in positiver Beziehung zu ER $\alpha$ , dem Progesteronrezeptor, dem Androgenrezeptor sowie BRCA1. Eine inverse Beziehung von ER $\beta$  2 besteht zu Metastasierung und Gefäßinvasion. In der Arbeit von Shaaban et al. hatten Tumore mit einer Koexpression von ER $\beta$  2 und ER $\alpha$  ein besseres Gesamtüberleben sowie ein längeres krankheitsfreies Überleben. Die zytoplasmatische ER $\beta$  2-Expression, allein oder kombiniert mit nukleärem Nachweis von

ER $\beta$  2, korrelierte jedoch mit einem signifikant schlechteren Krankheitsverlauf [70. Shabaan et al. 2008].

Diese Arbeit untersuchte den Effekt des Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant auf die ER $\beta$  mRNA Regulation der ER $\alpha$  und ER $\beta$  exprimierenden Zelllinie T47D, und ob es eine zusätzliche Wirkung über die EGFR/HER2-Hemmung durch den Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib gibt. Dabei bewirkte die Behandlung mit Fulvestrant, sowie mit der Kombination aus Lapatinib und Fulvestrant, eine Herabregulation von ER $\beta$  mRNA nach 24 und 48 Stunden. Die Wirkung von Fulvestrant konnte durch die Kombination beider Wirkstoffe jedoch nicht gesteigert werden. Lapatinib hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die ER $\beta$  mRNA.

DeFazio et al. beschreiben eine quantitative inverse Beziehung zwischen dem Level der Östrogenrezeptor mRNA und der EGFR mRNA in menschlichen Brustkrebszelllinien [34. DeFazio et al. 1997]. Wir konnten dies für ER $\beta$  mRNA und die Hemmung von EGFR/HER2 durch Lapatinib nicht nachweisen.

Fulvestrant führte jedoch zu einer signifikanten Herabregulation der ER $\beta$  mRNA in T47D-Zellen.

## V. Zusammenfassung:

In der Diagnose und Therapie des Brustkrebses spielt der Östrogenrezeptor eine führende Rolle. Dabei kann sich während der Zellentartung und der Entwicklung therapeutischer Resistenz die Rezeptorexpression verändern. Die Kombinationstherapie bewirkt eine synergistische Wachstumshemmung und Herabregulation der Proteinexpression von Hauptsignalwegen der Wachstumsfaktorrezeptorfamilie bei ER $\alpha$ -positiven, HER2-überexprimierenden und auch bei ER $\alpha$ -positiven, gering HER2-exprimierenden Zelllinien. Wir konnten einen synergistischen Effekt von Lapatinib und Fulvestrant bei der Hemmung der Signalwege von P13K/AKT und Ras/ERK nachweisen. Dabei liegt die Hauptwirkung wahrscheinlich in der Hemmung des HER2/HER3-Heterodimers durch Lapatinib. Da in den getesteten Zelllinien kaum eine Hemmung von EGFR durch Lapatinib zu beobachten war, konnten wir auch keine inverse Beziehung zwischen der Östrogenrezeptor Hemmung und EGFR Expression nachweisen, wie dies DeFazio et al. gelungen ist [34. DeFazio et al.1997]. Auf Zellzyklusebene konnte ein signifikanter G1-Phase Arrest, sowie eine Hemmung der Synthesephase erreicht werden. Die Kombination beider Wirkstoffe erzielte jedoch keinen signifikant stärkeren Effekt.

Der bislang für die Therapie von Brustkrebs ungenutzte und strittige ER $\beta$  wurde in unseren Untersuchungen, der mRNA Expression, ausschließlich durch Fulvestrant beeinflusst.

Unsere Arbeit liefert weitere Argumente für die Kombination von Lapatinib und Fulvestrant in der Tumorthherapie. Entlang dieser Linie gibt es bereits Studien über die wechselseitige Beziehung zwischen dem Östrogenrezeptor und dem HER2-Signalweg, welche belegen, dass jeder als Resistenzmechanismus für den anderen fungieren kann [71. Arpino et al. 2008; 72. Osborne et al. 2009]. Xia et al. fanden heraus, dass die Hemmung der HER2-Kinase sowie die Hemmung des AKT-Signalweges in Lapatinib behandelten BT474-Zellen den Transkriptionsfaktor, FOXO3a, enthemmt, welcher die Östrogenrezeptor Signalwirkung aktiviert. Die Lapatinib Resistenz ist daher nicht durch verminderte HER2-Expression oder ein vermindertes Ansprechen des HER2-Signalweges auf Lapatinib verursacht, sondern durch eine gesteigerte Östrogenrezeptor Signalwirkung. So konnte bei Fulvestrant insensitiven Brustkrebszellen Apoptose ausgelöst werden, nachdem sie mit Lapatinib und Fulvestrant behandelt wurden [73. Xia W et al. 2006].

Frogne et al. beschrieben, dass Liganden aktivierte EGFR, HER3 sowie ERK- Signalwege in Fulvestrant resistenten Zelllinien eine bedeutende Rolle spielen [59. Frogne T et al. 2009].

Daher könnte die kombinierte Hemmung der ER- und HER2-Signalwege neben der verbesserten Antitumorwirkung der Monosubstanzen sowohl einer Lapatinib- als auch einer Fulvestrantresistenz vorbeugen. Die Besonderheit unserer Arbeit im Vergleich zu bisherigen Kombinationsstudien liegt in der Einbeziehung von Tumorzelllinien, die den HER2-Rezeptor nicht oder nur schwach exprimieren. Durch diesen Ansatz wurde es möglich, die Rolle des HER2/HER3-Heterodimers für die medikamentöse Kombinationstherapie herauszuarbeiten. In welchem Umfang dieser Ansatz eine klinische Relevanz besitzt, müssen zukünftige Studien beweisen.

## VI. Abkürzungsverzeichnis:

AF 1/2	Activation Function 1/2
AKT	Protein Kinase B, PKB
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninic acid
BRCA1/2	Breast Cancer-Gen 1/2
BSA	Bovines Serum Albumin
CEN	Chicken erythrocyte nuclei (Hühnererythrozytenkerne)
CTN	Calf thymocyte nuclei (Kälberthymozytenkerne)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR/HER1	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen- responsives Element
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ERK1/ MAPK1	extracellular receptor stimulated-kinase/Mitogen aktivierte Protein Kinase 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung
FKS	fetales Kälberserum
GnRH	Gonadotrophin Releasing Hormon
HER2/ErbB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog, avian
HER3/ErbB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3, avian
HER4/ErbB4	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4, avian
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
kDa	Kilodalton
Mek	MAP/ERK-phosphorylierende Kinase
MTT	1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositol-abhängige Protein Kinase 1
PDK-1	Phosphoinositol abhängig Kinase-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Ras	von Ratten Sarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	1640 Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin

## Literaturverzeichnis:

1. Batzler W U, Giersiepen K, Hentschel S, et al. Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. *Robert Koch-Institut Berlin/Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland* 2008;6:54
2. Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe. *Thieme* 2005;2:371-395
3. Ravdin PM., Cronin KA., Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA, The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States *N Engl J Med* 2007; April 19, 356:1670-1674
4. Kreienberg R, Kopp I, Albert U, et al. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *W. Zuckschwerdt Verlag GmbH* 2008; 1
5. Clarke M, Collins R, Darby S, et al. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 366 (9503):2087-2106.
6. Kaufmann M, von Minckwitz G, Smith R, et al. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J Clin Oncol* 2003; 21 (13):2600-2608.
7. EBCTCG. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 2005; 365(9472):1687-1717.
8. EBCTCG. Metaanalysis, unpublished. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. 2006.
9. Higgins MJ, Davidson NE. What is the current status of ovarian suppression/ablation in women with premenopausal early-stage breast cancer? *Curr Oncol Rep* 2009; 11: 45–50.
10. Davidson NE. Adjuvant therapies for premenopausal women with endocrine responsive disease. *Breast* 2009; 18 (Suppl 1): S15 (Abstr S35).
11. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009 *Annals of Oncology* August 2009; 20: 1319 - 1329.
12. Burstein HJ, Kuter I, Campos SM, et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(10):2722-2730.

13. Seidman AD, Fornier MN, Esteva FJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 2001; 19 (10):2587-2595.
14. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344:783-792.
15. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(8):809-820.
16. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16):1659-1672.
17. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005; 353 (16):1673-1684.
18. Slamon DJ, Romond EH, Perez EA. Advances in adjuvant therapy for breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2006; 4 (3): (suppl-9).
19. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355 (26):2733-2743.
20. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005; 23 (31):7811-7819.
21. Bear HD, Anderson S, Smith RE, Geyer CE et al. Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 2006; 24 (13):2019-2027.
22. von Minckwitz G, Blohmer JU, Raab G, et al. In vivo chemosensitivity-adapted preoperative chemotherapy in patients with early-stage breast cancer: the GEPARTRIO pilot study. *Ann Oncol* 2005; 16 (1):56-63.
23. Clarke R, Liu MC, Bouker KB et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*. 2003 Oct 20; 22(47):7316-39.

24. Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ. Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer research and Treatment* 2005; 93: 11-18.
25. Parker MG. Action of “pure” antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast cancer Res Treat* 1993; 26: 131-137.
26. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmatic shuttling. *J Cell Sci* 1993; 106: 1377-1388.
27. Gibson MK, Nemmers LA, Beckmann WC Jr, Davies VL, Curtis SW, Korach KS. The mechanism of ICI 164,348 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. *Endocrinology* 1991; 129: 2000-2010.
28. Osbourne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, et al. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 746-750.
29. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB Signalling Network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
30. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-2/*neu* oncogene. *Science* 1987; 235: 177-82.
31. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res* 2000; 6: 2053-2063.
32. Krasilnikov MA. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry (Mosc.)* 2000; 65: 59-67.
33. Xia W, Mullin RJ, Keith BR, et al. Anti-tumour activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/ErbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 2002; 21: 6255-6263.
34. DeFazio A, Chiew YE, McEvoy M, Watts CK, Sutherland RL. Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 903-911.
35. Knowlden JM, Hutcheson IR, Jones HE, et al. Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 2003; 144: 1032-44.

36. Donovan JC, Milic A, Slingerland JM. Constitutive MEK/MAPK activation leads to p27(Kip1) deregulation and antiestrogen resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(44):40888-95.
37. Chu I, Blackwell K, Chen S, Slingerland J. The Dual ErbB1/ErbB2 Inhibitor lapatinib (GW572016), Cooperates with Tamoxifen to Inhibit Both Cell Proliferation- and Estrogen-Dependent Gene Expression in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer. *Cancer Research* 2005; 65: 18-25.
38. McClelland RA, Barrow D, Madden T, et al. Enhanced epidermal growth factor receptor signalling in MCF7 breast cancer cells following long-term culture in the presence of the pure antioestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* 2001;142:2776–2788
39. Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MR, Hanby AM. Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncology.* 2004; 5:174-81.
40. Speirs V, Shaaban AM. Hormone receptors in defining breast cancer prognosis-time for a rethink? *Nat Clin Pract Oncol.* 2007; 4 :204-205
41. Esslimai-Sahala M et al. Increased estrogen receptor  $\beta$ cx expression during mammary carcinogenesis. *Clinical Cancer Research.* 2005; 11: 3170-3174
42. Palmieri C, Lam EW, Mansi J, et al. The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clinical Cancer Research.* 2004; Apr 10: 2421-2428
43. Emde A, Mahlknecht G, Maslak K, et al. Simultaneous inhibition of estrogen receptor and the HER2 pathway in breast cancer: effects of HER2 abundance *Transl Oncol.* 2011; October; 4(5): 293–300.
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. Elsevier Science (USA) 2001;402-408
45. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier.* 2005; 9: 925
46. Sutherland R, Reddel R, and Green M. Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983b;19, 307-318.
47. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advan. Enzyme Regul.* 2006; 46: 249-279.

48. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier*. 2005; 9: 23
49. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevier*. 2005; 9: 986-989
50. Gee J, Harper M, Hutcheson I et al. The anti-epidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves anti-hormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology*. 2003; 144, 5105-5117.
51. Cobleigh M, Vogel C, Tripathy D et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17, 2639-2648.
52. Klapper L, Vaisman N, Hurwitz E et al. A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors. *Oncogene* 1997; 14, 2099-2109.
53. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*. 2001; 139: 4120-4130
54. Ström A, Hartmann J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 2004; 101: 1566-1571
55. Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, et al. Activity of the Dual Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016) against HER-2-Over-expressing and Trastuzumab-Treated Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 2006; 66: 1630-1639.
56. deFazio A, Chiew YE, Sini RL, Janes PW, Sutherland RL. Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. *Int J Cancer*. 2000 Aug 15;87(4):487-98.
57. Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF III, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci (U S A)* 2003; 100: 8933-8938.
58. Artaega CL. Can Trastuzumab be effective against Tumors with low HER2/Neu (ErbB2) Receptors? *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24: 3722-3725.

59. Frogne T, Benjaminsen RV, Sonne-Hansen K, et al. Activation of ErbB3, EGFR and Erk is essential for growth of human breast cancer cell lines with acquired resistance to fulvestrant. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Mar; 114(2):263-75.
60. Sutherland R, Green M, Hall R, Reddel R et al. Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983a;19, 615-621.
61. Liang K, Lu Y, Li X, et al. Differential Roles of Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 and AKT-1 Expression and Phosphorylation in Breast Cancer Cell Resistance to Paclitaxel, Doxorubicin, and Gemcitabine. *Molecular Pharmacology* 2006; 70: 1045-1052.
62. Stoica GE, Franke TF, Wellstein A, et al. Estradiol Rapidly Activates AKT via the ErbB2 Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology* 2003; 17: 818-830.
63. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 9817-9824.
64. Modi S, DiGiovanna MP, Lu Z, et al. Phosphorylated/activated HER2 as a marker of clinical resistance to single agent taxane chemotherapy for metastatic Breast Cancer. *Cancer Invest* 2005; 23: 483-7.
65. Lin HJ, Hsieh FC, Song H, Lin J. Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *BrJCancer* 2005; 93: 1372-81.
66. Shelton JG, Steelman LS, White ER, McCubrey JA. Synergy between PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK pathways in IGF-1R mediated cell cycle progression and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Cell Cycle.* 2004 Mar; 3(3):372-9.
67. Yang Z, Barnes C and Kumar R. Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10, 3621-3628.
68. Kaufman B, Mackey J, Clemens M et al. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol* 2009;27, 5529-5537.
69. Johnston S, Pippen J Jr, Pivot X et al. Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27, 5538-5546.

70. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(16): 5228-35
71. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK et al. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev* 2008; 29: 217–233.
72. Osborne K, Schiff R. Combined ER and HER-targeted therapy in breast cancer treatment. *Breast* 2009; 18 (Suppl 1): S8 (Abstr S20).
73. Xia W, Bacus S, Hegde P, et al. A model of acquired autoresistance to a potent ErbB2 tyrosine kinase inhibitor and a therapeutic strategy to prevent its onset in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(20): 7795-800.

## Anhang zu II Material und Methoden:

### I. Geräte:

Bei den Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller
Autoklav S75	H + P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, DE
CO <sub>2</sub> -Brutschrank Co <sub>2</sub> Unitherm 150	Uniequip, Leipzig, DE
CO <sub>2</sub> -Brutschrank HERA cell 240	Heraeus, Wiesloch, DE
Destilliermaschine Reservoir 75l	ELGA LabWater, Celle, DE
Eismaschine AF10	SCOTSMAN Ice Systems, USA
Elektrophorese Power Pac 200	Bio Rad, München, DE
ELISA READER anthos ht2	Anthos Mikrosysteme GmbH, Kreefeld, DE
Eppendorf Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Multikanalpipette: Transferpette®- 8, 20-200µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Mehrkanalpipette 10-100µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, DE
FACS Calibur- Fluorescence Activated Cell Sorting; mit ModFit-Software	Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Heidelberg, DE
Feinwaage Sartorius Basic	Sartorius AG Göttingen, DE
Heizplatte/Magnetrührer Ikamaq RH	IKA Works, Wilmington, USA
Kühlschrank profiline	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Light Cycler 480	Roche Deutschland Holding GmbH, DE
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Pipetten Eppendorf Research; 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Shaker KS 130 basic	IKA Works, Wilmington, USA
Sterile Werkbank antair BSK	W. H. Mahl, Kaarst, DE
Sterile Werkbank Tecnoflow 3F120-II GS	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Stickstofftank Cryo 200	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
TaqMan ABI Prism 7700 Sequence detector	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, USA

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio Rad, München, DE
Vortexer IKA MS1	Roth, Karlsruhe, DE
Wasserbad 1225 PC	Unitherm, Würzburg, DE
Protein-Elektrophoresekammer Mini Protean Elektrophoresis System	Bio Rad, München, DE
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Wiesloch, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Wiesloch, DE
Hyperkassette	Amersham Life Science, Amersham, UK

## II. Verbrauchsmaterialien:

Bei den Untersuchungen wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

Material	Hersteller
Combitips 0,5-5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Extra dickes Blot Papier	Bio Rad, München, DE
Film Kodak Bio Max	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Kryoröhrchen 1,8 ml Cryo Pure	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S. 10µl, 100µl, 1000µl, 2000µl	Eppendorf, Hamburg, DE
PVDF-Membran	BIO-RAD, München, DE
Rundbodenröhrchen 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Serologische Einmal-Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Einmal-Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Sterile Einmal Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen 25, 75, 150 cm <sup>2</sup>	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zellkulturplatten mit 6, 12 und 96 Vertiefungen; Flachboden	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, DE

### III. Chemikalien & Reagenzien:

Bei den Untersuchungen wurden folgende Chemikalien & Reagenzien verwendet:

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Adriamycin	Charité-Apotheke, Berlin, DE
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Bovine Serum Albumin (BSA)	Pierce, Rockford, USA
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
BSA V	PAA Laboratorien GmbH, Parsching, DE
Carcoal depleted fetal calf serum	PERBIO Science, Fischer GmbH u. Co. KG, Bonn, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Dulbecco's PBS	PAA Laboratorien GmbH, Parsching, DE
EDTA	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Entwickler und Fixierer Kodak CAT 1901859	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogene, Karlsruhe, DE
Fulvestrant (ICI 182,780)	Tocris Bioscience, Tocris Cookson Ltd., UK
Glycerol	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Glycin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
Igepal CA-630	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Lapatinib	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
Magnesiumchlorid (MgCL)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Matrigel	BD Biosciences Caesarea, IL
Methanol	Merck, Darmstadt, DE
MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE

diphenyl tetraolium bromide)	
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH Karlsruhe, DE
PCR Nucleotide Mix (dNTPs)	Roche Applied Science, Mannheim, DE
Penicillin (1000U/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
Ponceau-Rot	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Propidiumiodid	Serva, Heidelberg, DE
Protease Inhibitor Complex	Roche Diagnostik, Mannheim, DE
Protein-Marker Broad Range Markers (sc-2361)	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
RNAase A	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Salzsäure HCL 2M	Merck, Darmstadt, DE
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Sodiumorthovanadat	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Sperminetetrahydrochlorid	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE
Streptomycin(1000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
Stripping Solution ReBlot™ Plus Strong 10x	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Merck, Darmstadt, DE
Trisodiumcitrat-2H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, DE
Triton x- 100	Ferak Laborant GmbH, Berlin, DE
Trockenmilchpulver Carnation	Nestle, Vevey, CH
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin	PAA Laboratorien GmbH, Parsching, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
17β-Östradiol	SIGMA-Aldrich-Chemie GmbH, München, DE

#### IV. Lösungen und Puffer:

##### IV.1. Zellvitalitätsmessung:

MTT 1-Reagenz	5mg/ml	3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid in PBS lösen
MTT 2-Reagenz solubilization solution	50g 2,5ml 497,5ml	SDS HCL 2M Aqua dest

##### IV.2. Proteinpräparation:

Lysepuffer	1ml 400mg 5ml 0,5ml 1ml 5ml auf 50ml	1M Tris pH 8 137 mM NaCl 10% Glycerol 1% Triton x-100 100 mM EDTA 10 mM Sodiumorthovanadat 1 Tablette complete Protease Inhibitor Complex mit Aqua dest auffüllen
------------	--	---

##### IV.3. Zellzyklusanalyse:

Lösung I (pH 7,6)	1g 1% 522mg 61mg 100mg 1000ml	Trisodiumcitrat-2H <sub>2</sub> O Igepal Sperminhydrochlorid Tris(Hydromethyl)aminomethan RNase A Aqua dest
Lösung II (pH 7,6)	1g 1% 522mg 61mg 208mg 1000ml	Trisodiumcitrat-2H <sub>2</sub> O Igepal Sperminhydrochlorid Tris(Hydromethyl)aminomethan Propidiumjodid Aqua dest

#### IV.4. Westernblot:

Sammelgel (4%) 5 ml für 2 Gele	3,2ml 0,5ml 1,25ml 50µl 50µl 10µl	Aqua dest 40% Acrylamid 0,5 M Tris-HCL (pH 6,8) 10% SDS 10% APS TEMED
Trenngel (8%) 10 ml für 2 Gele	5,3ml 2ml 2,5ml 100µl 50µl 5µl	Aqua dest 40% Acrylamid 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) 10% SDS 10% APS TEMED
Ladepuffer (4x)	1,25ml 2,5ml 5ml 1,25ml 1:4 Anteile	0,5M Tris-HCL (pH 6,8) Glycerol 20% SDS 1% Bromphenolblau β-Mercaptoethanol kurz vor Gebrauch dazugeben
Laufpuffer (10x) pH auf 8,3-8,4 einstellen	125mM 960mM 4mM	Tris-Base Glycin SDS
Transferpuffer (10x) pH auf 8,3 einstellen	30,3g 144g 800ml 10%	Tris Base Glycine Aqua dest Methanol kurz vor Gebrauch dazu geben
Waschpuffer (0,1% Tween)	10x 1ml 9999ml	PBS Tween 20 Aqua dest
Ponceau-Rot-Lösung	0,5% 1%	Ponceau-Rot Essigsäure
Super Blotto	10mM 150mM 0,1% 0,5%	Tris -HCL (pH 8,0) NaCl Tween 20 Igepal

	0,5%	BSA V
	2,5%	Trockenmilchpulver
Stripping Lösung 10ml für 2 Membranen	1ml	ReBlot™ Plus Strong Stripping Solution 10x
	9ml	Aqua dest

## V. Antikörper:

### V.1. Primär Antikörper:

Antikörper	Spezies	Konzentration	Herkunft
PDK 1	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technology Inc, Boston, USA
pPDK 1	Kaninchen	1:500	Cell Signalling Technology Inc, Boston, USA
AKT 1	Maus	1:1000	Cell Signalling Technology Inc, Boston, USA
pAKT(Thr308)	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technology Inc, Boston, USA
ERK 1	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
p44/42MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling Technology Inc, Boston, USA
EGRF (1005)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
Neu(C-18)/HER2	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
ER $\alpha$	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
ER $\beta$	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE
Anti- $\beta$ -Actin (I-19)	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, DE

## V.2. Sekundär Antikörper:

Antikörper	Konzentration	Herkunft
Anti-Mouse IgG HRP	1:4000-1:25000	GE Healthcare, Freiburg, DE
Anti-Rabbit IgG HRP	1:4000-1:8000	Cell Signalling Technology Inc., Boston, USA
Anti-Goat IgG HRP	1:20000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, DE

## VI. Kommerzielle Kits:

DNA QC Particles Kit für Zellzyklus: CTN (calf thymocyte nuclei) / CEN (chicken erythrocyte nuclei)	Becton Dickinson, Heidelberg, DE
Protein Assay Standard Set: Bovines Serum Albumin (BSA) BCA™ Protein Assay Reagent A BCA™ Protein Assay Reagent B	Pierce, Rockford, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
TURBO DNA-free DNase	Ambion, Austin, USA,
SS II System	Invitrogen, Karlsruhe, DE

## VII. Nähr-und Versuchsmedien:

Medium		Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 3,7g/L NaHCO <sub>3</sub> , 4,5g/L D-Glucose stabilem Glutamin	supplementiert mit 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, DE
RPMI 1640	Supplementiert mit 1% CDFCS, 1% Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, München, DE

**VIII. Zellen:**

<b>Zellen</b>	<b>Herkunft</b>
<b><i>BT474</i></b> HER2++(überexprinierend), EGFR+, ER $\alpha$ +, ER $\beta$ +	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
<b><i>T47D</i></b> HER2+, EGFR+, ER $\alpha$ +, ER $\beta$ +	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
<b><i>MCF-7</i></b> HER2+, EGFR schwach+, ER $\alpha$ +, ER $\beta$ +	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
<b><i>Adriamycin resistente MCF-7</i></b> <b>(NCI/ADR)</b> HER2-, EGFR stark+, ER $\alpha$ -, ER $\beta$ +	Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin Buch, Germany

## **Danksagung**

Als Erstes möchte ich Professor Dr. Kurt Possinger und Frau Dr. Anna Maria Emde für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie Ihre ausdauernde Unterstützung und Betreuung danken.

Auch die weiteren Mitglieder der Mamma- Arbeitsgruppe wie Dr. Jan Eucker und besonders Frau Hongyu Liu verdienen ein Dankeschön für die Hilfestellung bei der praktischen Umsetzung und theoretischen Ausarbeitung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des hämatologisch-onkologischen Forschungslabors insbesondere Frau Elena Elsner für das herzliche Arbeitsklima und die konstruktive Hilfestellung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Maren Mieth für ihre freundliche und geduldige Anteilnahme sowie ihre ständige Unterstützung bei allen anfallenden Problemen.

Selbstverständlich wäre ich nie an diesen Punkt gelangt, hätte ich nicht die kontinuierliche und absolute Unterstützung meiner Familie und meines Freundes erhalten. Ihnen gilt mein herzlichster Dank.

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Kerstin Maslak, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Untersuchung zur synergistischen Wirkung von Lapatinib (GW 2016), einem potenten dualen HER1/HER2 Tyrosinkinaseinhibitor, und Fulvestrant, einem Östrogenrezeptorantagonisten, in HER2 und nicht HER2 überexprimierenden Brustkrebszellen.*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter erstellt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

**Lebenslauf:**

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

## **Publikationsliste:**

Emde AM, Maslak K, Liu H, Reles AE, Possinger K and Eucker J. Combination of fulvestrant and lapatinib in non-HER2-overexpressing and adriamycin-resistant breast cancer cell lines. *Journal of Clinical Oncology*, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 25, No 18S (June 20 Supplement), 2007: 14050 © 2007 American Society of Clinical Oncology

Emde AM, Mahlkecht G, Maslak K, Ribba B, Sela M, Possinger K, Yarden Y. Simultaneous Inhibition of Estrogen Receptor and the HER2 Pathway in Breast Cancer: Effects of HER2 Abundance. *Translational Oncology* 2011 Oct; 4(5):293-300. Epub 2011 Oct 1.