

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung des selektiven GPR-30 Agonisten G-1 im Zellmodell– ein
möglicher neuer Angriffspunkt in der targeted therapy des Mammakarzinoms**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Lubig

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung des selektiven GPR-30 Agonisten G-1 im Zellmodell– ein
möglicher neuer Angriffspunkt in der targeted therapy des Mammakarzinoms**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
Der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Lubig

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Ortmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Die Entstehung des Mammakarzinoms	1
1.2 Personalisierte Therapie – ein multimodales Konzept	3
1.3 Grundidee der targeted therapy	4
1.4 Zielstruktur Östrogenrezeptor	5
1.4.1 Die Bedeutung von Östrogenen in der Entstehung des Mammakarzinoms	5
1.4.2 Antiöstrogene und Hormontherapie	8
1.5 Zielstruktur HER2/neu	9
1.5.1 Bedeutung des HER2/neu Rezeptors bei Tumoren der Brust	9
1.5.2 Herceptin in der Brustkrebstherapie	10
1.6 Zielstruktur GPR-30	11
1.6.1 Vorkommen, Physiologie und Pathophysiologie des Rezeptors	11
1.6.2 G-1 – ein GPR-30 Agonist	13
1.6.3 Die Rolle von GPR-30 in der Tumorentstehung	14
1.7. Fragestellung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Material	17
2.1.1 Zelllinien	17

2.1.2 Chemische Komponenten Zellkultur	18
2.1.3 Zellkultur Assays	20
2.1.4 Chemische Komponenten für molekulargenetische Methoden	20
2.1.5 Technische Komponenten und Geräte	23
2.1.5 Weitere verwendete Materialien	24
2.2. Methoden	26
2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	26
2.2.2 Proliferationsassay cell-titer-blue™	27
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	29
2.2.4. Statistische Auswertung	33
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Expressionsprofil der Zelllinien	34
3.2 Dosisabhängige Wirkung von G-1 auf die Zelllinien	38
3.3 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Trastuzumab	42
3.3.1 Effekte in der Zellkultur	42
3.3.2 Effekte der kombinierten Behandlung auf die Genexpression	47
3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen	54
3.4.1 Effekte in der Zellkultur	54
3.4.2 Effekte der kombinierten Behandlung auf die Genexpression	65
4. DISKUSSION	74
4.1. GPR-30 Agonist G-1 – dosisabhängige antiproliferative Wirkung	74

4.2 Die Kombination G-1 und Trastuzumab	78
4.2.1 Additiver Effekt einer kombinierten Behandlung aus G-1 und Trastuzumab in vitro	78
4.2.2 Molekulare Mechanismen des additiven Effekts von G-1 und Trastuzumab	79
4.3 Die Kombination aus G-1 und Antiöstrogenen	83
4.3.1 Additiver Effekt einer kombinierten Behandlung aus G-1 und den Antiöstrogenen Tamoxifen und Fulvestrant in vitro	833
4.3.2 Molekulare Mechanismen des additiven Effekts von G-1 und Tamoxifen	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	90
6.ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
7.LITERATURVERZEICHNIS	95
8.DANKSAGUNG	103
9. LEBENSLAUF	104

1. EINLEITUNG

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau und der zweithäufigste Grund für Malignom assoziierte Todesfälle. Allein in Deutschland erkranken jährlich geschätzt 58.000 Frauen an Brustkrebs, was 29% aller Krebsneuerkrankungen des weiblichen Geschlechts ausmacht [1]. Andere gynäkologische Malignome wie das Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinom sind zusammengenommen mit knapp 27.000 Neuerkrankungen pro Jahr nur etwa halb so häufig wie Tumoren der weiblichen Brust. Anders formuliert erkrankt etwa jede 9. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt hierbei mit 64 Jahren deutlich unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Krebserkrankungen gesamt. Durch die Einführung des Mammographie-Screenings ist zumindest vorübergehend mit einem Anstieg der Inzidenz zu rechnen, wie dies in Ländern mit bereits länger etabliertem Screening Programm zu beobachten war. Allerdings führt die intensivere Vorsorge und die verbesserten Therapieoptionen zu einer Verbesserung der relativen 5-Jahres Überlebensrate auf über 80% [1].

1.1.2 Die Entstehung des Mammakarzinoms

Die Mehrheit der Mammakarzinome ist sporadischer Natur [2], nur in etwa 5% der Fälle ist eine Keimbahnmutation der Gene BRCA1 (17q21) und BRCA2 (13q12-13) mitverantwortlich. In diesen Fällen allerdings erhöht sich das kumulative Risiko bis zum 70. Lebensjahr an Brustkrebs zu erkranken auf bis zu 80% [2]. Obwohl die Ätiologie des Mammakarzinoms noch in vielen Punkten unklar ist, sprechen eine Reihe von Inzidenzen dafür, dass hormonelle Störungen und exogene Einflüsse eine Rolle spielen.

Folgende mit einem erhöhten Risiko einhergehende Faktoren sind von besonderer Bedeutung: positive Familienanamnese (2-3x erhöht bei betroffenen Verwandten ersten Grades), Adipositas, Alter, frühe (vor 12. LJ) Menarche, bzw. späte Menopause (nach 55. LJ), Nulliparae und späte Erstgebärende (nach 35.LJ). In Anbetracht dieser Risikofaktoren scheint ein immenser Einfluss des weiblichen Hormonhaushalts auf die Genese maligner Erkrankungen der Brust naheliegend. Auch der negative Einfluss von Tabakrauch auf das Risiko der Brustkrebsgenese wird inzwischen anerkannt [3].

Bezüglich der molekularen Entstehung des Mammakarzinoms geht man davon aus, dass es sich um einen mehrstufigen Prozess handelt, bei dem das kaskadenartige Auftreten und die Summe von genetischen Alterationen über die Stadien Hyperplasie und Carcinoma in situ letztlich zum invasiven Karzinom führt. [4-6]. Die dadurch beeinflusste Expression bestimmter Gene verschafft der Tumorzelle den entscheidenden Selektionsvorteil [7]. Das Carcinoma in situ ist als die präinvasive Phase des Mammakarzinoms zu verstehen. Es ist charakterisiert durch eine neoplastische Proliferation epithelialer Zellen bei noch intakter Basalmembran.

Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass es sich bei bösartigen Tumoren der Brust nicht um eine einzelne, immer gleich verlaufende Erkrankung handelt. Vielmehr geht man heute davon aus, dass Brustkrebs eine heterogene Erkrankung mit verschiedenen Subtypen darstellt, die sich sowohl klinisch als auch molekular deutlich voneinander unterscheiden. Einen Erklärungsansatz hierfür liefert das Stammzellkonzept der weiblichen Brustdrüse und die Theorie einer Reifungsblockade, die sog. „maturation arrest theory“ [8]. Man geht hierbei davon aus, dass eine mögliche Entartung an verschiedenen Punkten der Ausreifung von Progenitorzellen auftreten kann, wodurch diese in ihrer weiteren Differenzierung blockiert werden. Abhängig vom spezifischen Differenzierungsgrad der Ausgangszelle entstehen so verschiedenartige Tumortypen mit unterschiedlichen intrinsischen Eigenschaften.

Die Brustdrüse der Frau unterliegt während des Lebens zahlreichen Veränderungen. Unter hormoneller Stimulation kommt es zunächst in der Pubertät zur Aussprossung der Gangsysteme. Zu einer massiven Proliferation kommt es während der Schwangerschaft – ein

Prozess, der sich auch bei jeder nachfolgenden Schwangerschaft wiederholt, weswegen man eine Zellpopulation annimmt, die in der Lage ist, sich nach erfolgter Zellteilung weiter zu differenzieren [9-10]. Clarke und Kollegen konnten im Mausmodell zeigen, dass bereits wenige dieser Zellen mit bestimmtem Phänotyp in der Lage sind einen Tumor zu formieren. [11].

1.2 Personalisierte Therapie – ein multimodales Konzept

Die enorme Heterogenität des Mammakarzinoms und nicht zuletzt die Häufigkeit dieses Tumors schaffen einen hohen Anspruch an die Therapie der Erkrankung. Die hohe Zahl an Subtypen und die multikausale Genese der Erkrankung erklären, warum es für das Mammakarzinom so viele Prognose- (definieren Risiken für Rezidiv und Tod)- und Prädiktivfaktoren (definieren die Aussicht auf Therapieerfolg) gibt. Gängige Faktoren sind Alter, histologisches Grading und TNM-Status (Tumorgröße, Nodalbefall, Fernmetastasen). Immer mehr an Bedeutung gewinnt das „molecular profiling“– also der Versuch, den einzelnen Tumor möglichst genau molekulargenetisch zu charakterisieren. Bisher etabliert haben sich der Hormonrezeptor- (Östrogenrezeptor und Progesteronrezeptor), sowie der Her2neu-Status [12-15].

Bereits im Jahr 2000 konnten Perou *et al.* zeigen, dass das Erstellen eines molekulargenetischen Portraits auf der Basis von Expressionsmustern verschiedenster Gene nicht nur die Diversität der Tumoren aufzeigt, sondern auch eine Erklärung für deren unterschiedliches Verhalten liefern kann [16]. So hilft z.B. die Bestimmung des Proliferationsverhaltens (Ki-67, PCNA), von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (IGFR, pS2) aber auch von Faktoren mit Einfluss auf die Tumordinvasion (Cathepsin B, D, L) bei der exakteren Einschätzung der Aggressivität des Tumors oder dessen Therapieansprechen [14, 16-18]. Ein weiterer Ansatzpunkt um zu einer möglichst individualisierten Therapie zu gelangen, ist die Analyse sogenannter Wirtsfaktoren. Darunter versteht man z.B. Eigenschaften des umgebenden Gewebes (Tumorstroma) oder das Wechselspiel zwischen

Immunsystem und malignen Zellen. Neuere Daten postulieren, dass auch die Infiltration des Tumorgewebes mit B- und T-Lymphozyten prognostische Relevanz besitzt [19].

1.3 Grundidee der targeted therapy

Zwar werden intensive Bemühungen unternommen, die Entwicklung der Chemotherapie für die Behandlung von Krebserkrankungen weiter voranzutreiben, dennoch ist sie durch ihre unspezifische Toxizität nach wie vor mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden.

Das exakte Wissen über die zellulären und molekulargenetischen Eigenschaften eröffnet therapeutisch zahlreiche neue Ansatzpunkte. So versteht man unter zielgerichteter Krebstherapie (engl.: targeted therapy) ein Angreifen von Strukturen und Merkmalen, die nur für das Tumorgewebe, nicht aber für die gesunden Zellen spezifisch sind.

In Tumoren findet sich beispielsweise häufig eine Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren. Zum Teil bewirken diese onkogenen Rezeptorvarianten eine konstitutive Tyrosinkinase-Aktivität und damit auch ohne Bindung eines Liganden eine erhöhte Signaltransduktion. Durch eine spezifische Blockade dieser Rezeptoren ließe sich somit ein übermäßiger Wachstumsstimulus verhindern [20]. Ein weiterer bereits erfolgreich umgesetzter Ansatz richtet sich gegen die Neoangiogenese des Tumors. Durch die Überexpression von Proteinen wie VEGF (vascular endothelial growth factor) wird die Gefäßneubildung gefördert, was die Versorgung des Tumorgewebes für ein schnelles Wachstum sicherstellt. Therapeutisch werden diese Erkenntnisse genutzt, so ist Bevacizumab ein VEGF-Rezeptor-Antikörper, der erstmalig bei der Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen wurde [21]. Aber auch in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms wird Bevacizumab in Kombination mit einem Chemotherapeutikum eingesetzt und führt im Vergleich zu einer alleinigen Chemotherapie zu einem besseren Ansprechen und einer verlängerten Überlebenszeit [22-23].

1.4 Zielstruktur Östrogenrezeptor

1.4.1 Die Bedeutung von Östrogenen in der Entstehung des Mammakarzinoms

Östrogene, mit der aktivsten Form 17 β -Estradiol (E2), gehören zur Familie der lipophilen Steroidhormone. Nach Diffusion in die Zielzelle bindet das Hormon nach dem klassischen Modell an intrazelluläre Rezeptoren der Steroidhormon-Superfamilie, einer Klasse ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren [24]. Im Falle des Östrogenrezeptors (ER) liegt dieser in Abwesenheit eines Liganden zunächst an Heatshock-Proteine (HSP) gebunden vor. Die durch die Östrogenbindung hervorgerufene Konformationsänderung führt zur Dissoziation des HSP-ER-Komplexes und anschließender Homo- bzw. Heterodimerisierung des Rezeptors [24]. Der aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und bindet dort an palindromische DNA-Sequenzen der Zielgene, den sog. „Estrogen responsive Elements“ (ERE). Die Interaktion des Rezeptordimers mit dem ERE reguliert die Transkription des korrespondierenden Gens und führt so zu einer veränderten Expression der von diesem Gen kodierten Proteine [25]. Beeinflusst wird dieser Vorgang von einer Vielzahl modulierender Proteine. Diese fungieren entweder als so genannte Co-Aktivatoren und verstärken über eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor die Transkription des Zielgens, oder als Co-Repressoren und bremsen entsprechend die Transkription [26]. Zu nennen sind hier als wichtige Vertreter der Co-Aktivatoren die Mitglieder der p160-Familie SRC-1 (= steroid receptor coactivator 1), TIF2 (= transcription intermediary factor 1) und AIB1 (= amplified in breast cancer 1) [26]. In ihrer Rolle als Co-Repressoren nehmen NCOR1 (= nuclear receptor corepressor 1) und SMRT/NCOR 2 entscheidende Funktionen ein [26].

Daneben hat in den letzten Jahren ein weiterer- vom Zellkern unabhängiger- Mechanismus an Bedeutung gewonnen, bei dem das Östrogen direkt an Membran-gebundene Rezeptoren bindet und so eine intrazelluläre Signalkaskade anstößt [27-28].

Auch in Abwesenheit von Östradiol können jedoch die Östrogenrezeptoren durch andere Signalwege beeinflusst werden. Dieser so genannte „crosstalk“ erfolgt durch eine Phosphorylierung der AF-1/2 Domäne und führt in Folge zu einer veränderten Dimerisation und Bindung der Cofaktoren. Vermittelt wird dies unter anderem von Signalwegen, die unter

1.4 Zielstruktur Östrogenrezeptor

dem Einfluss diverser Wachstumsfaktoren wie IGF-1 (= Insulin-like growth factor -1), Insulin oder TGF- β (Transforming growth factor- β) stehen [27, 29].

Der erste Östrogenrezeptor wurde 1986 erstmalig kloniert und später als ER α bezeichnet [30]. Erst zehn Jahre später wurde ein zweiter humaner ER, genannt ER β beschrieben [31]. Beide Rezeptoren setzen sich grundsätzlich aus drei unabhängigen, aber interagierenden funktionellen Domänen zusammen: Der N-terminalen oder A/B-Domäne, der DNA-bindenden, oder C-Domäne und der Liganden bindenden, oder D/E/F-Domäne. Die variable Region D wird auch als Scharnierregion („hinge-region“) bezeichnet. Die DNA-bindenden Domänen der beiden Rezeptoren weisen eine 97%ige Homologie auf, während sich der Liganden bindende Anteil nur zu 60% ähnelt [32].

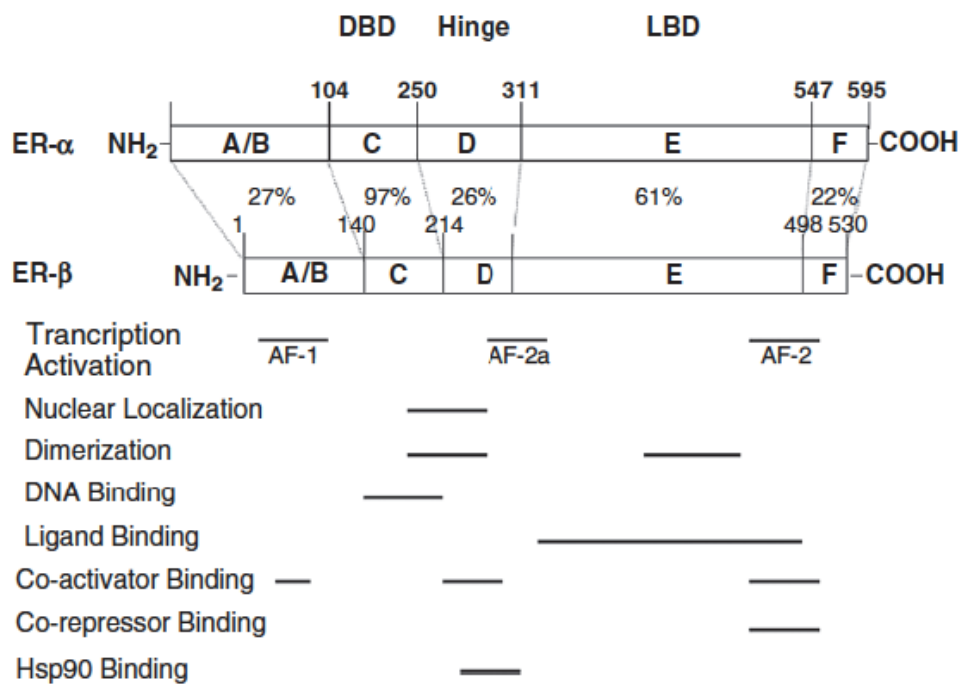


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Steroidhormonrezeptoren ER α und ER β . Prozentual dargestellt ist die Homologie in der Aminosäuresequenz der jeweiligen Untereinheit. Außerdem aufgezeigt wird die jeweilige Funktion der Sequenz [33].

Das Gen für ER α liegt auf Chromosom 6 und besteht wie die Gene aller „klassischen“ Steroidrezeptoren aus 8 Exons [30]. Heute sind mehr als 20 verschiedene ER α Splicevarianten bekannt, von denen viele in alternative ER α -Proteine translatiert werden können, die sich hinsichtlich ihrer Reaktion auf Östrogene, Antiöstrogene oder Östrogenentzug unterscheiden [34].

ER β ist auf Chromosom 14 lokalisiert und kodiert für 7 translatierte Exons und 5 alternative translatierte Exons 8. Auch hier sind mehr als 20 mRNA-Varianten des Gens bekannt, von denen mindestens die Hälfte für alternative ER β -Proteine kodiert [31, 34].

Noch ist über die Funktion der verschiedenen Varianten beider Rezeptoren, das Verteilungsmuster in den verschiedenen endokrinen Geweben, sowie ihr Zusammenspiel im Rahmen der Tumorentstehung vieles unklar. ER α beeinflusst im Brustgewebe als aktivierender Transkriptionsfaktor die Stimulation östrogenabhängiger Zielgene und reguliert so entscheidend die Zellzyklusprogression und das Drüsenwachstum [33].

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression von ER α im Laufe der Tumorgenese zunimmt, was dessen wachstumsfördernden Einfluss auch in der Krebsentstehung nahe legt [33]. Die Rolle von ER β hingegen ist bis dato Bestandteil kontroverser Diskussionen. Es gibt allerdings zunehmende Hinweise darauf, dass ER β als günstiger prognostischer Parameter zu sehen ist [35]. So scheint ER β in der Lage zu sein, die Funktion von ER α negativ zu beeinflussen und somit als Tumorsuppressor zu fungieren [36-37]. Zu dieser Annahme passt auch, dass ER β physiologisch im normalen Brustdrüsenewebe zu finden ist, im Laufe der Tumorgenese jedoch verloren zu gehen scheint [38].

Durch die oben beschriebenen Mechanismen und Signaltransduktionswege sind Östrogene in der Lage, das Proliferationsverhalten der Zelle und deren Differenzierungsgrad zu beeinflussen.

In der normalen Zelle wird der Zellzyklus streng geregelt und schreitet nicht fort, solange die vorangegangene Phase nicht vollständig abgeschlossen ist. Generell ist eine Entscheidung über Proliferation oder Differenzierung immer auch abhängig von äußeren Faktoren wie dem Nährstoffangebot oder den Zell-Zell-Kontakten [39]. Auch Östrogene nehmen Einfluss auf die Vorgänge der Mitose, so konnte gezeigt werden, dass sich ein in der G0/G1-Phase unterbrochener Zellzyklus fortsetzt wenn die Zelle mit Östrogenen stimuliert wird und man

einen Anstieg sowohl des mRNA- als auch des Proteinlevels von Cyclin D1 messen kann [39]. Cyclin D1 ist in fast 50% der Mammakarzinomzellen überexprimiert, aber auch Cyclin A und Cyclin E werden eine wichtige Rolle zugeschrieben [40-42].

Auch Protoonkogene wie c-myc, c-jun und c-fos sind als Zielgene der Östrogenwirkung bekannt. Das nukleäre Phosphoprotein c-myc bewirkt vielfältige Effekte auf den Zellzyklus, unter anderem leitet es den Übergang von G1 zur S-Phase ein [39]. In Brustkrebszelllinien kann der Zellzyklus durch die Induktion von c-myc durch Östrogene wieder in Gang gesetzt werden [43].

1.4.2 Antiöstrogene und Hormontherapie

Antiöstrogene wurden Mitte der 50er Jahre zunächst als Fertilitätsmittel entwickelt, heute sind sie fester Bestandteil in der Brustkrebstherapie. Eingesetzt werden die Antiöstrogene bei positivem Rezeptorstatus, d.h. wenn die Tumorzelle Östrogenrezeptoren und/oder Progesteronrezeptoren exprimiert.

Manche Antiöstrogene zeigen in ihrer physiologischen Wirkung eine ausgeprägte Gewebespezifität. Man bezeichnet sie daher als *Selective Estrogen Receptor Modulators* (SERMs). Tamoxifen (TAM) gehört zur Gruppe der Triphenylethylene und gilt als das am häufigsten eingesetzte Antiöstrogen in der Behandlung des Mammakarzinoms [44]. Während an der Brustdrüse der antiöstrogene Effekt zur Wirkung kommt, zeigt Tamoxifen einen östrogenen Effekt u.a. am Endometrium. Auch aktiviert Tamoxifen im Gegensatz zu Östrogen den ER nicht vollständig. Die sog. AF-2 Aktivierungsfunktion kann nach Tamoxifenbindung nicht mehr phosphoryliert werden und bleibt somit inaktiv. In diesem Fall spricht man von einem sog. partiellen Agonismus mit einer reduzierten Transkriptionsrate [45-46].

Verglichen mit konventioneller Chemotherapie erweisen sich Antiöstrogene als eher nebenwirkungsarm, es können unter Tamoxifentherapie sogar wünschenswerte Effekte wie ein erniedrigtes LDL-Cholesterin [47] oder ein reduziertes Risiko für Koronararterielle Infarkte [48] verzeichnet werden. Als erhebliche Nebenwirkung muss allerdings das erhöhte

Risiko ein Endometriumkarzinom zu entwickeln gesehen werden. Zurückzuführen ist dies auf die agonistische Partialwirkung von Tamoxifen an endometrialem Gewebe [49].

Um die Induktion östrogenabhängiger Folgetumoren zu vermeiden und um besser auf die immer wieder vorkommenden Tamoxifen-resistenten Rezidive reagieren zu können, wurde 1987 erstmalig eine Substanz mit rein antiöstrogener Wirkung publiziert [50]. In der Folge wurde diese zu dem höher potenten Antiöstrogen ICI 182,780 (Handelsname Fulvestrant) weiterentwickelt [51], welches eine starke antagonistische Wirkung sowohl am Brustgewebe als auch am Uterus zeigt. Außerdem bewirkt Fulvestrant den proteasomalen Abbau intrazellulären Rezeptorproteins, weswegen es zur Gruppe der SERDs (*selektive estrogen receptor downregulator*) gezählt werden kann [52]. Aktuell ist Fulvestrant zur Behandlung fortgeschrittener Tumoren bei postmenopausalen Frauen zugelassen [23].

1.5 Zielstruktur HER2/neu

1.5.1 Bedeutung des HER2/neu Rezeptors bei Tumoren der Brust

Das Protoonkogen HER2/neu (= *Human epidermal growth factor receptor 2*; Syn.: erb-B2) befindet sich auf Chromosom 17q21 und kodiert für ein 185 kDalton großes Glykoprotein, das zur „*Epidermal growth factor receptor*“ (EGFR)- Familie gehört [53]. Das Protein hat eine zytoplasmatische Tyrosinkinaseaktivität, eine transmembrane Helix, welche für die Oligomerisierung verantwortlich ist, und eine extrazelluläre Liganden-Bindungsstelle [53].

Es existieren vier bekannte HER-Rezeptoren, HER1 (EGFR) bis HER4 [54], die ein komplexes, interagierendes Netzwerk bilden. Die Aufgabe der EGFR-Familie besteht in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen, die Wachstum, Überleben, Differenzierung und Migration entscheidend beeinflussen [55-56]. Die Hauptfunktion des HER2-Rezeptors, für den im Gegensatz zu den anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren bis dato kein natürlicher Ligand gefunden wurde [55-56], wird in der Heterodimerbildung mit den Rezeptoren der EGFR-Familie gesehen. Die Heterodimere mit HER2 sind anschließend die deutlich potenteren Signaltransduktoren als Homodimere der einzelnen Rezeptoren. Durch die Dimerisierung

kommt es zur Phosphorylierung des Tyrosinrests am C-Terminus der intrazellulären Domäne, die als Andockstelle für die nachgeschalteten Signalwege, z.B. über die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) oder Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase (PI3) dient [55-56]. Die Heterodimerbildung führt also zu einer vielfachen Verstärkung der Signaltransduktion. Zellen, die HER2 überexprimieren, generieren somit einen Wachstumsvorteil [55-56]. Im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren ist HER2 konstitutiv aktiviert, kann also auch ohne Bindung eines Liganden dimerisieren [55-56]. In 20-30% aller malignen Tumoren der Brust findet sich eine Überexpression von HER-2 [57]. Die Überexpression ist vergesellschaftet mit einem aggressiverem und schnellerem Wachstum, höherem Metastasierungspotential und letztlich einer schlechteren Prognose [55, 57-59].

1.5.2 Herceptin in der Brustkrebstherapie

Herceptin ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne (ECD) des HER-2-Rezeptors gerichtet ist. Seine Wirkungsweise ist vielfältig und noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein beschriebener Mechanismus ist die Rekrutierung von Zellen des Immunsystems, vornehmlich natürlichen Killerzellen (NK). Diese erkennen den Fc-Anteil des Antikörpers und lösen so eine Immunantwort gegen die Zielzelle aus. Man nennt diesen Vorgang auch *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) [60]. Daten aus Xenograft Modellen konnten zeigen, dass Trastuzumab eine nachweislich geringere antitumorale Aktivität aufweist wenn es sich um einen modifizierten Antikörper handelt, dem eben diese Fähigkeit NK-Zellen zu aktivieren fehlt [61]. Ein weiterer entscheidender Mechanismus ist die Blockade der intrazellulären Signaltransduktion. So wird unter anderem die PI3-Akt induzierte Expression des Protoonkogens c-Myc über HER2 reguliert [55].

Außerdem konnten präklinische Studien zeigen, dass Trastuzumab zu einem verstärkten Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase führt. Ein Mechanismus der hierzu beiträgt, ist die nachweisliche Induktion von *cyclin-dependent-kinase* Inhibitoren (CDK) [62-63].

Auch die Neoangiogenese ist ein Ansatzpunkt der Behandlung mit Trastuzumab, da die intratumorale VEGF Expression in Brusttumoren eng verknüpft zu sein scheint mit der HER2

Überexpression. So konnten Izumi *et al.* in einem Xenograft Model zeigen, dass Trastuzumab zu einem Rückgang bis hin zur Normalisierung der Vaskularisation führte [64].

Als Voraussetzung für eine Therapie mit Trastuzumab wird Her2-Positivität definiert als eine immunhistochemisch nachgewiesene Protein-Überexpression, oder eine z.B. mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachgewiesene Genamplifikation. Patientinnen mit Her2-positivem Tumor erhalten eine einjährige Behandlung, die simultan oder sequentiell zu einer Chemotherapie durchgeführt werden kann [23].

1.6 Zielstruktur GPR-30

1.6.1 Vorkommen, Physiologie und Pathophysiologie des Rezeptors

Die physiologischen Effekte von Östrogenen werden traditionell durch nukleäre Rezeptoren vermittelt. Allerdings weiß man heute, dass bestimmte Aspekte der Östrogenfunktion über G-Protein vermittelte Signalwege laufen [27-28].

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) umfassen eine Familie von 800-1000 Mitgliedern, deren eigentlicher Ligand oft noch unbekannt ist, weshalb man diese Rezeptoren als „Weisen“ (= engl.: orphans) bezeichnete. Zwischen 1996 und 1998 wurde ein solcher Rezeptor mit geringer Homologie zu den bisher bekannten GPCRs erstmals von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen geklont, und bei bis dato unbekanntem Liganden als GPR-30 bezeichnet [65]. Das Gen für GPR-30 liegt auf Chromosom 7p22 und kodiert für vier alternative Splicevarianten, die alle für das gleiche Protein kodieren. Dieses besteht aus 375 Aminosäuren und enthält, dem klassischen Aufbau eines G-Protein gekoppelten Rezeptors entsprechend, sieben transmembranäre Domänen [66-67].

Die Expression von GPR-30 beschränkt sich nicht nur auf die Brustdrüse, sondern konnte in verschiedensten Geweben, wie Plazenta, Knochen, Gehirn, Prostata, Leber und dem Gefäßendothel nachgewiesen werden [68-71].

Inzwischen wird angenommen, dass via GPR-30 eine Vielzahl sog. „schneller“ Östrogeneffekte vermittelt wird. So postulierten Filardo *et al.* im Jahr 2000, dass mittels

GPR-30 die Phosphorylierung der „*extracellular-signal-regulated kinases*“ ERK1/2 reguliert wird [72]. Außerdem werden eine Mobilisierung intrazellulären Calciums, ein Anstieg des cAMP (= zyklisches Adenosinmonophosphat), sowie die Synthese von PI3K (=Phosphatidylinositol-3-kinase) als direkte Effekte einer Östrogen-Stimulation von GPR-30 angenommen [68, 73-74]. Alle diese Signalwege deuten auf eine entscheidende Rolle dieses Rezeptors bei der Beeinflussung von Proliferation, Überleben und Zellmorphologie, unabhängig von klassischen Östrogeneffekten hin. Allerdings kann es durch eine Stimulation des ERK1/2-Signalwegs auch zu einer Aktivierung der Transkription von c-fos kommen [75]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es auch über zelluläre Signalwege zu einer Beeinflussung der Genexpression kommen kann und eine enge Verknüpfung zu den über nukleäre Rezeptoren vermittelten Effekten besteht [75]. Thomas *et al.* konnten 2005 zeigen, dass GPR-30 eine hohe Bindungsaffinität zu 17 β -Östradiol besitzt, wohingegen physiologische Östrogen-Varianten wie Östron oder Östriol und andere Steroidhormone wie Progesteron, Cortisol oder Testosteron nicht in der Lage waren an GPR-30 zu binden [76]. Überraschenderweise besitzen auch der SERM Tamoxifen, sowie der reine ER α -Antagonist ICI agonistische Eigenschaften an GPR-30 [68].

1.6.2 G-1 – ein GPR-30 Agonist

2006 gelang es Bologna und Kollegen mittels virtuellen und biomolekularen Screenings eine Substanz zu identifizieren, die als selektiver GPR-30 Agonist fungiert [77].

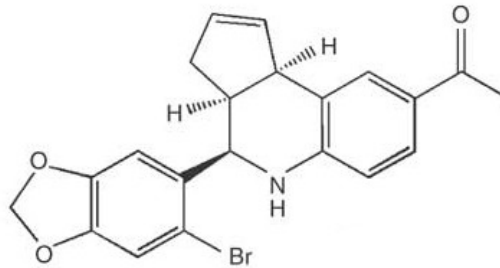


Abbildung 2: Dargestellt ist die chemische Strukturformel des GPR-30 Agonisten G-1; 1-(4-(6-Bromobenzo[1,3ioxol-5-yl]-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopentaquinolin-8-yl)-ethanone. Aus:[77]

Somit konnten Effekte eindeutiger dem Transmembranrezeptor zugeordnet, und sein Beitrag zur Östrogenphysiologie und Tumorentstehung genauer untersucht werden. Bis zu einer Konzentration von 10 μ M zeigte sich keine signifikante Bindungsaffinität von G-1 an den klassischen Östrogenrezeptoren [77]. Zudem testeten Blasko *et al.* die Rezeptorspezifität von G-1, indem sie dessen Bindungsaffinität für insgesamt 25 weitere GPCRs (Somatostatin, Adenosin, Angiotensin, adrenerge Rezeptoren und Weitere) untersuchten. Auch hier wies G-1 bis zu einer Konzentration von 10 μ M zu keinem der Rezeptoren eine substantielle Bindungsaffinität auf [78].

Die funktionelle Charakterisierung der Substanz zeigte, dass G-1 in der Lage ist, intrazelluläres Calcium zu mobilisieren. Während 17 β -Östradiol einen sehr schnellen Calciumanstieg verursacht ($t_{1/2} < 2$ sec) ist der G-1 vermittelte Anstieg langsamer ($t_{1/2} \sim 30$ sec), führt jedoch zu einer letztlich vergleichbaren Maximalkonzentration [77]. Außerdem verursacht G-1 wie Östrogen eine Aktivierung der PI3-Kinase und entsprechend eine

nukleäre Akkumulation von Phosphatidylinositol- 3,4,5-triphosphat (PIP3) in ER negativen SK-BR-3 Zellen [77, 79].

1.6.3 Die Rolle von GPR-30 in der Tumorentstehung

Filardo *et al.* konnten in immunhistochemischen Untersuchungen von über 300 Tumoren der Brust zeigen, dass ungefähr die Hälfte GPR-30 positiv sind [71]. Die Überexpression des Rezeptors korrelierte positiv mit der Tumorgröße, der Anwesenheit von Metastasen, sowie mit der Her2-Expression – und ließ sich somit als Prädiktor für eine aggressive Tumorvariante heranziehen [71]. Folgestudien z.B. von Kuo *et al.* konnten dies jedoch nicht bestätigen, weswegen hier weitere Ergebnisse abgewartet werden müssen [80].

Ein anderer Ansatzpunkt ist die Rolle von GPR-30 in der Resistenzentwicklung gegenüber SERMs und anderen Antiöstrogenen. So fanden Jordan *et al.* GPR-30 überexprimiert in einem Kollektiv aus Tumoren, die sich resistent gegenüber Antöstrogenen zeigten [81].

Die Rolle von GPR-30 in der Entstehung von Brusttumoren bleibt jedoch weiterhin umstritten. Ahola und Kollegen postulierten, dass die Expression von GPR-30 durch Progesteron in MCF-7 Zellen positiv reguliert wird und dass diese Expression wiederum essentiell für die Progesteron-induzierte Wachstumshemmung sei [82-83].

Auch Ariazi *et al.* gehen von einer GPR-30 vermittelten Wachstumshemmung auf ER-positive MCF-7 Zellen aus und sehen eine anhaltende Erhöhung des intrazellulären Calciums als möglichen zugrunde liegenden Mechanismus [84].

Alles in allem deuten viele Studien darauf hin, dass GPR-30 eine entscheidende Rolle in der Regulation zellulärer Funktionen wie Wachstum, Proliferation und Apoptose spielt und somit auch zu einem interessanten neuen therapeutischen Ansatz werden könnte.

1.7. Fragestellung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Dies und die Tatsache, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine Vielzahl molekulargenetisch heterogener Tumoren handelt, schaffen einen hohen Anspruch an die Therapie. Die zielgerichtete Therapie (engl.: targeted therapy) gewinnt zunehmend an Bedeutung, da hierbei tumorspezifische Moleküle angegriffen und Wachstum, Proliferation oder Invasion beeinflusst werden können, ohne die ausgeprägten Nebenwirkungen einer herkömmlichen Chemotherapie in Kauf nehmen zu müssen. Um den Benefit einzelner Substanzen zu verstärken, gibt es bereits einige Ansätze diese miteinander zu kombinieren. Ein möglicher neuer therapeutischer Ansatzpunkt ist der G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR-30, dessen Rolle in der Östrogenphysiologie und Tumorentstehung nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern der GPR-30 Agonist G-1 in der Lage sein würde, die wachstumshemmende Wirkung anderer Substanzen positiv oder negativ zu beeinflussen.

Um der Heterogenität dieser Tumorentität möglichst gerecht zu werden und den Effekt der verschiedenen Ansätze bei molekulargenetisch unterschiedlichen Voraussetzungen zu beobachten, wurden insgesamt fünf verschiedene Zelllinien verwendet.

Zunächst sollte untersucht werden, wie sich unterschiedliche Konzentrationen G-1 zwischen 10nM und 1µM auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien auswirken würden.

Da es Anhaltspunkte dafür gibt, dass GPR-30 positive Tumoren eine höhere HER2-Expression aufweisen [72-73], wurde anschließend die Wirkung einer Kombination aus Trastuzumab und G-1 bezüglich des Wachstumsverhaltens der Zellen untersucht. Hierfür wurden die HER-2-überexprimierenden Zelllinien SK-BR-3 und BT-474, sowie als Negativkontrolle MDA-MB-231 verwendet.

Bestandteil der aktuellen Diskussion ist außerdem, inwiefern GPR-30 die Wirkung antiöstrogener Substanzen beeinflusst, oder gar zu deren Resistenzentwicklung beiträgt. Daher wurden außerdem die Effekte der Kombinationen aus G-1 und dem SERM Tamoxifen,

1.7. Fragestellung

sowie die Kombination aus G-1 und dem reinen Antiöstrogen Fulvestrant auf die Proliferation der Östrogenrezeptor-positiven Zelllinien MCF-7 und T47-D untersucht.

Um die in den vorausgegangenen Proliferationsassays gefundenen Effekte auch molekulargenetisch genauer beschreiben zu können, wurde im Anschluss die Auswirkung der unterschiedlichen Kombinationsbehandlungen auf die Expression verschiedener Gene auf mRNA Ebene genauer untersucht. Hierfür wurde ein Set aus Genen ausgewählt, deren Einfluss auf Proliferation, Wachstum und Differenzierung bekannt ist, oder die im Zusammenhang mit Östrogen-gesteuerten Effekten stehen. Außerdem sollte die Frage untersucht werden, inwiefern sich die Expression der Östrogenrezeptoren ER α und der ER β Splicevarianten 1,2 und 5 unter der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen ändern würde.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Zelllinien

MCF-7	Mammakarzinomzelllinie American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA
BT-474	Mammakarzinomzelllinie American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA
SK-BR-3	Mammakarzinomzelllinie American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA
MDA-MB-231	Mammakarzinomzelllinie American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA
T47-D	Mammakarzinomzelllinie American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA

Im Rahmen der Arbeit wurden insgesamt fünf Mammakarzinomzelllinien verwendet.

Zum einen BT-474 und SK-BR-3, beide Zelllinien weisen eine Überexpression des Her2neu-Rezeptors auf. **BT-474** ist eine hypertetraploide Zelllinie, die aus einem invasiven duktalem

2.1. Material

Karzinom einer 60-jährigen Patientin isoliert wurde. Histopathologisch ist ihr ein Differenzierungsgrad von G2 bis G3 zuzuordnen. Ferner konnten Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden [85].

SK-BR-3 wurde aus einem metastasierten Karzinom einer 43-jährigen Patientin isoliert. Histologisch handelt es sich um eine hypertriploide Zelllinie des Differenzierungsgrad G2-3. Die Zelllinie gilt als Östrogenrezeptor negativ.

Die gut charakterisierte Mammakarzinomzelllinie **MCF-7** ist Östrogen sensibel und exprimiert sowohl ER α als auch ER β . Gewonnen wurde die Zelllinie aus dem malignen Pleuraerguss einer Patientin im metastasierten Tumorstadium [86-88].

Auch **T47-D** Zellen exprimieren sowohl Östrogen-, als auch Progesteronrezeptoren. Zusätzlich weist diese Zelllinie eine mutierte Variante des Protoonkogens p53 auf [89].

MDA-MB-231 Zellen sind aneuploid und nicht sensibel für Östrogene. Auch zeigt sich keine Überexpression des Her2-neu Rezeptors, weswegen sich MDA-MB-231 gut als Negativkontrolle für Stimulationsversuche mit Tamoxifen und Trastuzumab eignet [90].

2.1.2 Chemische Komponenten Zellkultur

DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA
FBS	Fetales Kälberserum PAA, Pasching, AU)
SR2	Serum Replacement -2 Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA

2.1. Material

TAM	4-Hydroxytamoxifen, chem.: (Z)-4-(1-(4-(Dimethylaminoethoxy)phenyl)-2-phenyl-1-butenyl)phenol Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA
E2	17- β -Estradiol, je zu gleichen Teilen gemischt in DMEM, Ethanol und H ₂ O. Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA
ICI 182,780	7 α ,17 β -(9(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5-trien-3,17-diol Tocris bioscience®, Ellisville, MO, USA
Dulbecco's PBS Puffer	PAA, Pasching, AU
Accutase	PAA, Pasching, AU
DMSO	Sigma-Aldrich®, MO, USA
DNase/RNase	Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA
G-1	(\pm)-1-4-(6-Bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro 3H-cyclopentaquinolin-8-yl]- ethanone; Merck Calbiochem, Darmstadt, GER
Trastuzumab (TZ)	Humaner anti-Her2-Antikörper; AG Brockhoff, Regensburg, GER

2.1. Material

2.1.3 Zellkultur Assays

Cell Titer Blue™	Cell-Titer-blue, cell viability assay Promega®, Madison, WI, USA
------------------	---

2.1.4 Chemische Komponenten für molekulargenetische Methoden

RNA-Isolierung:

Ethanol 70%	Baker®, Philipsburg, NJ, USA
RNA-Isolation Kit	Buffer RW1 (wash buffer), Lysis buffer, DNase I/RNase-free; DNA digest buffer, RNase-free water Promega®, Madison, WI, USA

cDNA-Synthese:

M-MLV-Reverse Transkriptase 5x Buffer	Promega®, Madison, WI, USA
RNAasin® plus RNase Inhibitor	Promega®, Madison, WI, USA

2.1. Material

RNAse H-minus, point mutant	Promega [®] , Madison, WI, USA
Random Primer	Invitrogen [®] , Carlsbad, CA, USA
10nM dNTP-Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 10nM) Invitrogen [®] , Carlsbad, CA, USA
SYBR [®] Green PCR Kit	Quiagen [®] , Hilden, GER
RNAse-free water	Quiagen [®] , Hilden, GER

Real-time PCR:

SYBR [®] Green PCR Kit	Quiagen [®] , Hilden, GER
Primer	Metabion [®] , Martinsried, GER

Primer-Sequenzen:

Gen	Primer (5' → 3')	Amplicon (bp)
GPR-30	CAACATCTGGACGGCAGGTA GGTTTGGGTTGGGTTTGTTA	187
ERα	CACATGAGTAACAAAGGCATGG ATGAAGTAGAGCCCGCAGTG	181

2.1. Material

HER2	CATGGTCAAATGTTGGATGATT CCTCATTCTGGATGACCACA	116
p21/WAF-1	GCATGACAGATTTCTACCACTCC AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	134
EGR-1	CTGACCGCAGAGTCTTTTCC CACAAGGTGTTGCCACTGTT	171
Cyclin A2	CTGCTGCTATGCTGTTAGCC TGTTGGAGCAGCTAAGTCAAAA	158
Cyclin D1	CTGGAGGTCTGCGAGGAA GGGGATGGTCTCCTTCATCT	162
c-Fos	AGAATCCGAAGGGAAAGGAA CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG	150
ERβ-1	GGCATGCGAGTAACAAGGGC GGGAGCCCTCTTTGCTTTT	
ERβ-2	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG TTCTGCCCTCGCATGC	
ERβ-5	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG CGTACCTCGCATGCCTGA	
β-actin	CTGTGGCATCCACGAAACTA CGCTCAGGAGGAGCAATG	190

2.1.5 Technische Komponenten und Geräte

Victor3™ Multilabel Counter	Perkin-Elmer®, Waltham, MA, USA
Light cycler PCR device	Roche Diagnostics, Basel, CH
Thermocycler T-Gradient 96	Biometra®, Göttingen, GER
T1Thermocycler	Biometra®, Göttingen, GER
HERACell 150 CO2 Inkubator	Heraeus , Hanau, GER
HERAsafe® Type KS12 Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermomixer compact	Eppendorf®, Hamburg, GER
Multifuge® 1 s-R	Heraeus , Hanau, GER
MS2Minishaker	IKA® ,Staufen, GER
GeneRay UV-Photometer	Biometra®, Göttingen, GER
Präzisionsküvetten Suprasil®	Hellma®, Müllheim, GER

2.1. Material

2.1.5 Weitere verwendete Materialien

Pipetten:

Eppendorf® Reference (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf®, Hamburg, GER
---	--------------------------

Pipettierhilfe : accu-jet® pro	Brand, Wertheim, GER
--------------------------------	----------------------

5ml-, 10ml-, 25ml-Pipetten	Armin Baack ,Schwerin, GER
----------------------------	----------------------------

Combitips® plus (1 und 5ml), Pipettenspitzen für automatische Pipetten	Eppendorf®, Hamburg, GER
--	--------------------------

Biosphere® Filtertips (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl), Pipettenspitzen für manuelle Pipetten	Sarstedt®, Nümbrecht, GER
---	---------------------------

Reaktionsgefäße:

Nalgene Cryoware™ Cryogenic vials	Nalgene® Labware, Rochester, NY, USA
-----------------------------------	--------------------------------------

Eppendorf Cups 1,6ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, GER
----------------------	--

Softstripes 0,2ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, GER
-------------------	--

Zellkulturflaschen T75 und T150	Armin Baack ,Schwerin, GER
---------------------------------	----------------------------

2.1. Material

Versuchsplatten weiß 96-Well

Cornig, Cornig, NY, USA

Zellkulturplatten 6-Well, 96-Well steril

Armin Baack ,Schwerin, GER

2.2. Methoden

2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Kulturbedingungen:

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in 250 und 550 ml Kulturflaschen. Sämtliche Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer kultiviert. Bei allen Zelllinien erfolgte 2-3-mal pro Woche ein Mediumwechsel. Hierfür wurde das alte Medium mit einer Einmalpipette entfernt und nach Waschen mit PBS-Puffer durch frisches, zuvor auf 37° angewärmtes Medium ersetzt.

Kryokonservierung der Zellen:

Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Hierzu musste zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gereinigt werden. Mittels Accutase™ wurden die Zellen von den Kulturflaschen gelöst, abzentrifugiert und das übrige Zellpellet im jeweiligen Medium resuspendiert. Jeweils in 1 ml Aliquots konnten die Zellen in Cryo Vials bei -80°C gelagert, und nach frühestens 24 Stunden in den Stickstofftank überführt werden. Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend konnten die Zellen in die vorbereiteten Zellkulturflaschen mit Medium gegeben werden.

Splitten der Zellen:

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen bei Erreichen von etwa 80% Konfluenz gesplittet. Hierzu wurde zunächst das Medium unter sterilen Bedingungen abgenommen und die Zellen einmalig mit PBS-Puffer gewaschen. Darauf folgte die Gabe von 5 ml Accutase™ pro ZK-Flasche. Das Enzym besitzt proteolytische Eigenschaften und dient dazu, die Zellen von ihrer Unterlage in der Kulturflasche möglichst schonend abzulösen. Nach einigen Minuten Einwirkzeit bei 37° im Brutschrank hatten sich die Zellen weitgehend abgelöst (mikroskopisch zu erkennen an der abgerundeten Form der Zellen und ihrer freien Beweglichkeit). Um das Enzym wieder zu entfernen, wurden die Zellen anschließend in 50 ml Falcons überführt, mit 5 ml Nährmedium versetzt und bei 1000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun verworfen und das Pellet mit der gewünschten

Menge Medium versetzt werden. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie wurde nun ein Teil der Zellen in frische Zellkulturflaschen ausgesät und mit der entsprechenden Menge Medium versetzt.

2.2.2 Proliferationsassay cell-titer-blue™

Aussaat der Zellen:

Waren die Zellen ausreichend konfluent (80-90%), so wurden sie der weiteren Behandlung unterzogen. Durch oben beschriebene Accutase™ - Behandlung wurden die Zellen von der Unterlage gelöst. Das nach abzentrifugieren der korpuskularen Bestandteile entstandene Pellet wurde je nach Zellzahl mit 12-20ml Medium resuspendiert. Um mit einer definierten Zellzahl pro Well arbeiten zu können, wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Konzentration der Suspension ermittelt und eine entsprechende Verdünnung angefertigt. Die Neubauer-Kammer besteht aus neun großen Quadraten, wovon jedes eine Fläche von 1mm^2 aufweist; dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1mm ein Volumen von 0,1 μl .

Folgende Zellzahlen wurden für die Aussaat angestrebt:

MCF-7	1000 Zellen / Well
T47-D	600 Zellen / Well
MDA-MB 231	200 Zellen / Well
SKBR-3	800 Zellen / Well
BT-474	800 Zellen / Well

Für unstimulierte Proliferationsexperimente wurde die benötigte Zellzahl in einem Endvolumen von 100 μl ausgesät, sollte eine Stimulation erfolgen wurden hingegen 70 μl ausgesät um 24 Stunden später eine Zugabe von 30 μl des entsprechenden Agens zu ermöglichen.

Stimulation der Zellen:

24h nach der Aussaat erfolgte die Stimulation der Zellen. Hierzu wurde zu Beginn die gewünschte Konzentration der Substanz durch Verdünnen mit Nährmedium hergestellt. Für

2.2. Methoden

die Behandlung mit Tamoxifen wurde dem Stimulationsansatz zusätzlich Östradiol (10 μ M, zu gleichen Teilen gelöst in H₂O, DMEM und EtOH; jeweils 5 μ l pro 50ml Nährmedium) zugefügt. Um einen Einfluss der im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren und Hormone weitgehend auszuschließen, wurden die Zellen zunächst „heruntergehungert“. Der Serumanteil des Mediums wurde hierbei schrittweise entzogen und die Zellen schließlich in serumfreiem SR2-Medium ausgesät. Auch hier erfolgte die Stimulation anschließend nach 24 h. Es wurden jeweils drei Wells mit 30 μ l des Stimulationsansatzes behandelt. Um einen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen, wurden jeweils Triplets mit 30 μ l des entsprechenden Lösungsmittels versetzt. Außerdem blieben Zellen „unbehandelt“, hier wurden lediglich 30 μ l Nährmedium hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für bis zu 5 Tage.

Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt:

G-1: 10nM, 100nM, 1 μ M

Trastuzumab: 10 μ g/ml

Tamoxifen: 0,2 μ M, 1 μ M, 5 μ M

ICI: 0,1 μ M

Messung der Proliferation:

Zur Erfassung der Proliferation wurde der Cell-Titer-Blue™ viability assay (Promega) verwendet. Bei diesem wird als Indikator der Farbstoff Resazurin verwendet, der von Stoffwechselaktiven Zellen zu Resorufin, einem pinken Fluoreszenzfarbstoff, reduziert wird. Nur lebensfähige Zellen sind zu dieser Reaktion fähig, sterbende Zellen dagegen verlieren innerhalb kurzer Zeit ihre metabolische Aktivität und erzeugen somit kein fluoreszierendes Signal. Bei einer Inkubationszeit zwischen 2 und 4 Stunden ist das Verhältnis zwischen gemessener Fluoreszenz und der Anzahl lebensfähiger Zellen linear und somit direkt proportional. Das Cell-Titer-Blue Reagenz ist für die Zellen nicht toxisch. Pro Well wurden 10 μ l Reagenz verwendet. Nach 2h Inkubation erfolgte die Messung der Fluoreszenz im Viktor3™ Multilabel Counter bei 560/590nm. Die Hintergrundfluoreszenz des Mediums wurde korrigiert, indem Kontroll-Wells (nur Medium, keine Zellen) parallel mit dem Reagenz

versetzt und inkubiert wurden. Der gemessene Wert wurde anschließend von dem des experimentellen Wells subtrahiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolierung aus Zelllinien:

Die RNA-Isolierung aus der Zellkultur wurde mit Hilfe des High-Pure RNA Isolation Kit (Roche®) durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen hierfür in 6-Well Platten ausgesät und wie oben beschrieben mittels Accutase™ geerntet. Um eine möglichst große Zellzahl zu erreichen (empfohlen ist eine Million Zellen pro Säule), wurden folgende Zellzahlen ausgesät:

MCF-7:	600.000 Zellen / Well
T47-D:	600.000 Zellen / Well
SKBR-3:	750.000 Zellen / Well
BT474:	525.000 Zellen / Well

Handelte es sich um stimulierte Ansätze, wurden die Zellen 6, bzw. 24h nach Behandlung geerntet. Jeder Stimulationsansatz war jeweils doppelt vorhanden. Das geerntete Zellpellet wurde in 200µl PBS resuspendiert, mit 400µl Lysis-/Binding Puffer versetzt und anschließend gründlich für 15 Sekunden gevortext. An dieser Stelle wurden die lysierten Zellen entweder bei -80°C eingefroren, um die RNA-Isolation zu einem anderen Zeitpunkt fortzusetzen, oder wurden direkt weiter verarbeitet.

Um RNA zu gewinnen nutzt man die spezifischen Bindeeigenschaften einer Glasfasermembran und die Mikrosäulenzentrifugation. Zunächst wurden maximal 700µl des Lysats auf die Membran der Säule des High Pure Filter Tubes pipettiert und für 15 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. In diesem ersten Schritt erfolgte die Bindung der RNA an das Glasfaservlies durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Um Reste kontaminierender DNA abzubauen, erfolgte anschließend der DNase-Verdau durch Zugabe von 100µl DNaseI (Roche), hergestellt aus

2.2. Methoden

10µl DNase Stocklösung und 90µl DNase I Incubation Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Um den Verdau zu stoppen wurden 500µl Wash Buffer I auf die Säule pipettiert und anschließend für 15 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen. Um die RNA von anderen Begleitsubstanzen und zellulären Bestandteilen zu befreien, wurden 500µl Wash Buffer II hinzugefügt und wiederum für 15 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert. Danach wurden noch einmal 200µl Wash Buffer II zugegeben und diesmal für 2 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert. Beide Male kann die Flüssigkeit im Collection Tube anschließend verworfen werden. Zuletzt folgte das Eluieren der RNA mit 50-100µl RNase freiem Wasser durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000rpm.

Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration:

Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit im Photometer. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die Konzentration der Nukleinsäure aus folgender Formel:

$$c = E \times l / \epsilon \times l / d$$

(c: Konzentration in mg/ml; E: Extinktion bei 260nm; d: Schichtdicke der Küvette = 1cm). Der molare Extinktionskoeffizient ϵ beträgt bei 260nm für RNA $25\text{cm}^2/\text{mg}$, für doppelsträngige DNA $20\text{cm}^2/\text{mg}$.

Bei 260nm Wellenlänge und 1cm Schichtdicke entspricht eine Absorption von 1,0 also einer RNA-Konzentration von $40\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Reinheit wurde über den Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm ermittelt. Die Werte sollten hier zwischen 1,6 und 2,0 liegen um eine Verunreinigung zum Beispiel durch Lösungsmittel oder Proteine ausschließen zu können.

Zur Konzentrationsmessung wurde jeweils eine 1:10 Verdünnung der Probe mit Wasser hergestellt und das Photometer zu Beginn mit Hilfe einer RNase-freien Wasserprobe geeicht.

cDNA-Synthese:

Bei der cDNA-Synthese werden DNA-Kopien aus mRNA hergestellt. Hierzu benötigt man eine reverse Transkriptase. Dieses Enzym ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die mRNA-Moleküle in komplementäre DNA umschreiben kann. Durch den Ribonuklease-Anteil der reversen Transkriptase kann der entstandene RNA-DNA-Hybridstrang hydrolysiert werden und in einer zweiten Reaktion ein vollständiger DNA-Doppelstrang synthetisiert werden.

Zur Herstellung der cDNA wurde jeweils 1µg der gewonnenen RNA eingesetzt. Mit RNase-freiem Wasser wurde anschließend jede Probe auf 12µl Gesamtvolumen aufgefüllt. In einem nächsten Schritt wurden 1µl Random Primers Oligonukleotide und 1µl RNasin® Plus RNase-Inhibitor zugefügt und der Ansatz in dem auf 70° C vorgeheizten Thermocycler für 5 Minuten erwärmt und anschließend auf Eis abgekühlt. Hierdurch wurde eine Startsequenz an das Poly(A)-Ende der mRNA-Moleküle hybridisiert.

In einem zweiten Schritt wurde ein Mastermix bestehend aus 5µl M-MLV RT 5x Buffer, 1,25µl 10mM dNTP Mix, 0,5µl M-MLV RT RNase und 4,25µl RNase-freies Wasser hergestellt, zu jedem Ansatz hinzugegeben und gründlich durchgemischt. Im Thermocycler erfolgte die reverse Transkription in drei Schritten. Die Proben wurden zunächst für 10 Minuten bei 25°C, dann 50 Minuten bei 48°C und anschließend 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die fertige cDNA wurde auf 4°C abgekühlt und 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Gelagert wurden die Proben anschließend bei -20°C und konnten ohne weitere Bearbeitung eingesetzt werden.

Semiquantitative RT-PCR:

Die Polymeraseketten-Reaktion diente zur gezielten Amplifikation spezifischer Gensequenzen. Dazu müssen zumindest Teile der gewünschten Sequenz bekannt sein, um zwei spezifische Primer einsetzen zu können.

Für die RT-PCR mit dem LightCycler® wurde zunächst ein Mastermix bestehend aus 10µl SYBR® Green, 6µl Wasser und 2µl Primermix für jede Probe hergestellt. Der Primermix enthält eine 1:1 Lösung aus den synthetisierten Oligonukleotiden für den Ansatz am 3' bzw. 5'-Ende des zu amplifizierenden Gens. Die Primer, die eine Länge von 15 bis 25 Nukleotiden haben, entscheiden über Spezifität und Sensitivität der Reaktion.

2.2. Methoden

Zur Bestimmung der Genexpression wurden 2µl der cDNA-Probe und 18µl des Mastermixes in eine Glaskapillare überführt, diese verschlossen, zentrifugiert und in die Haltevorrichtung des LigthCyclers® gestellt.

Zunächst erfolgte die Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten. Anschließend fanden 38 Zyklen der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) statt. Ein einzelner Zyklus gliederte sich in folgende Abschnitte:

Denaturierung für 10 sec bei 95°C

Primerhybridisierung für 30 sec bei 56°C (Annealing)

DNA-Synthese für 30 sec bei 72°C (Elongation)

Abschließend wurde eine Schmelzkurve ermittelt, indem die Proben auf 95°C erhitzt und sofort wieder auf 40°C abgekühlt wurden.

Um die exponentielle Zunahme der DNA-Kopien in Echtzeit darstellen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green eingesetzt, der sich interkalierend in den DNA-Doppelstrang einlagern kann. Das emittierte Licht kann nun am Ende der Elongationsphase gemessen und graphisch dargestellt werden. Während der Denaturierung löst sich der Farbstoff wieder. Der freie Farbstoff hingegen sendet kein Signal aus.

Die Expression des jeweiligen Zielgens wurde mit der Expression eines sogenannten Housekeeping-Gens (HKG) normalisiert. Diese Referenzgene zeichnen sich durch ihr ubiquitäres Vorkommen und ihre homogene Expression, die keiner Regulation unterliegt, aus. Die Varianz der Expressionsergebnisse kann so reduziert werden, da Fehler in der reversen Transkription oder unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 190bp großes β-actin Fragment (Primer actin-2573 und actin-2876) als HKG verwendet.

Der relative RNA-Gehalt der Probe wurde anhand der manuell festgelegten threshold cycles (CT-Wert) bestimmt. Dieser gibt an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz einer Probe erstmalig deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

2.2. Methoden

Entsprechend der von Livak und Schmittgen beschriebenen $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wurde in einem ersten Schritt vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens der CT-Wert des Referenzgens des gleichen Templates abgezogen [91].

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wurde vom jeweiligen ΔCT einer behandelten Probe der ΔCT der unbehandelten Kontrolle abgezogen.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{behandelt}} - \Delta\text{CT}_{\text{unbehandelt}}$$

Somit ergibt sich der relative Expressionsunterschied einer behandelten Probe zu ihrer unbehandelten Kontrolle aus der Formel:

$$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Diese Berechnung setzt eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus voraus. Routinemäßig wurden die Schmelzkurven des PCR-Produkts analysiert, um Fehlerquellen wie die Bildung von Primer-Dimeren auszuschließen, die das Ergebnis verfälschen würden.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Proliferationsassays erfolgte mittels two-way ANOVA Analyse mit Bonferroni Nachtestung. Hierzu wurde Graph Pad Prism Version 5.0 verwendet (Graph Pad, San Diego, USA). Eine Signifikanz wurde angenommen bei $p < 0,05$.

Mit den per rtPCR gewonnenen Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2003 studentische T-Tests durchgeführt, auch hier wurde statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Expressionsprofil der Zelllinien

In den Experimenten wurden insgesamt fünf verschiedene Mammakarzinomzelllinien verwendet. Diese sollten zunächst hinsichtlich ihres Expressionsmusters verschiedener Rezeptoren genauer betrachtet werden. Hierzu wurde die Expression auf Ebene der mRNA mittels real-time- RT-PCR ermittelt.

Untersucht werden sollte zum einen die **ER α** -Expression. Hierfür wurde ein Primer verwendet, der in der Lage ist, alle Splicevarianten des Rezeptors zu erfassen.

Der höchste mRNA-Gehalt konnte in MCF-7 Zellen gemessen werden. T47-D und BT-474 Zellen weisen eine ähnliche und im Vergleich zu MCF-7 deutlich schwächere ER α -Expression auf. Auch in den als ER-negativ geltenden Zelllinien MDA-MB-231 und SK-BR-3 ließ sich, wenn auch minimal, ER α -mRNA nachweisen.

Bezüglich **ER β** wurde die Expression der Splicevarianten 1,2 und 5 mit jeweils spezifischen Primern untersucht. Insgesamt konnten wir feststellen, dass alle drei Rezeptorvarianten in allen untersuchten Zellen nachweisbar waren. Über das genaue Verteilungsmuster und die Expressionsstärke der einzelnen Rezeptoren kann an dieser Stelle keine endgültige Aussage getroffen werden.

3.1. Expressionsprofil der Zelllinien

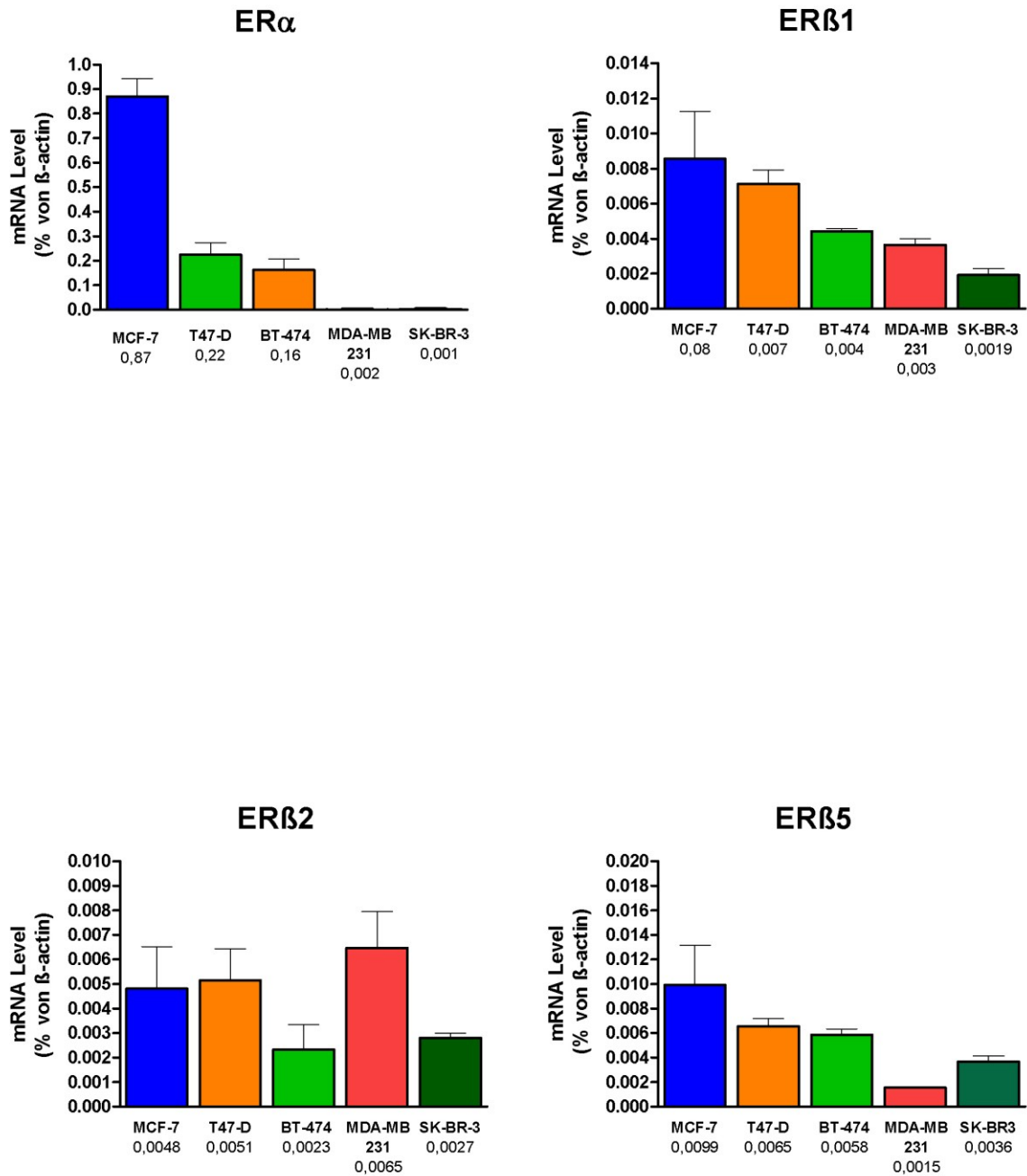


Abbildung 3: Dargestellt ist die Expression der Östrogenrezeptoren auf Ebene der mRNA in allen untersuchten Zelllinien. Alle Zellen wurden in serumhaltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Nachweis mittels real-time-RT-PCR. Aufgetragen ist die Expression in Prozent der Expression des house-keeping Gens β -actin. (n=2).

3.1. Expressionsprofil der Zelllinien

Auch im Hinblick auf **GPR-30** wurde die Expression untersucht. Hier zeigte sich, dass in allen untersuchten Zelllinien Rezeptor mRNA nachweisbar war. Bezüglich der Expressionsstärke fanden sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Das höchste mRNA Level konnte in MCF-7 Zellen gemessen werden.

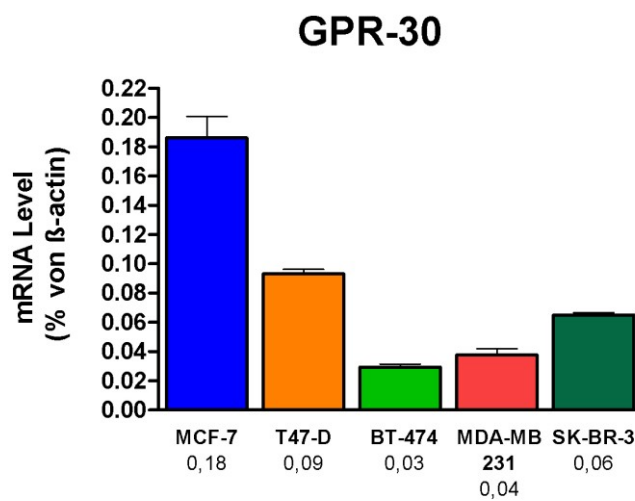


Abbildung 4: Dargestellt ist die Expression von GPR-30 auf Ebene der mRNA in allen untersuchten Zelllinien. Alle Zellen wurden in serumhaltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Nachweis mittels real-time-RT-PCR. Aufgetragen ist die Expression in Prozent der Expression des house-keeping Gens β -actin. (n=2)

3.1. Expressionsprofil der Zelllinien

Bezüglich der Her2neu Expression bestätigte sich der hohe Gehalt an mRNA in BT-474 und SK-BR-3 Zellen. Beide Zelllinien werden klassischerweise als Modell für Her2-überexprimierende Tumoren herangezogen.

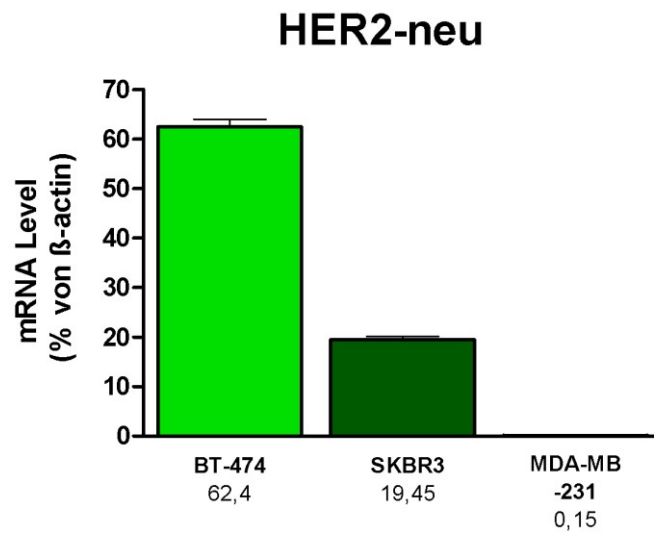


Abbildung 5: Dargestellt ist die Expression von HER2-neu auf Ebene der mRNA in BT-474, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen. Alle Zellen wurden in serumhaltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Nachweis mittels real-time-RT-PCR. Aufgetragen ist die Expression in Prozent der Expression des house-keeping Gens β -actin. (n=2)

3.2 Dosisabhängige Wirkung von G-1 auf die Zelllinien

Zunächst sollte der Effekt einer alleinigen Behandlung mit dem GPR-30 Agonisten G-1 auf die unterschiedlichen Zelllinien untersucht werden. Hierzu wurden drei unterschiedliche Konzentrationen, nämlich 10nM, 100nM und 1µM eingesetzt. Die Anzahl proliferationsfähiger Zellen wurde jeweils an den Tagen 3, 4 und 5 gemessen. Die stimulierten Ansätze wurden dann mit dem Proliferationsverhalten unbehandelter Zellen verglichen. Alle im Folgenden beschriebenen Stimulationsversuche wurden sowohl in Standard Kulturmedium DMEM/F12 mit 10% FBS, als auch in serumfreiem Medium mit Serum replacement (1xSR2) durchgeführt. Da sich jedoch im Reaktionsverhalten der Zelllinien und im Ausmaß der erzielten Effekte kein Unterschied zwischen den beiden Ansätzen feststellen ließ, sollen im Folgenden jeweils nur die Ergebnissen aus den Versuchen in Medium mit 10% FBS dargestellt werden.

Die niedrigste Konzentration von **10nM** schien die Proliferation der **SK-BR-3** Zellen nach 3, bzw. 4 Tagen nicht zu beeinflussen, an Tag 5 ließ sich eine um 13% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle höhere Anzahl vermehrungsfähiger Zellen nachweisen. Der Effekt erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

In allen anderen Zelllinien jedoch blieb dieser Effekt aus. G-1 (10nM) war hier nicht in der Lage das Wachstum der Zellen zu beeinflussen.

Im Gegensatz dazu konnten wir mit einer Konzentration von **100nM** G-1 deutlichere Effekte beobachten.

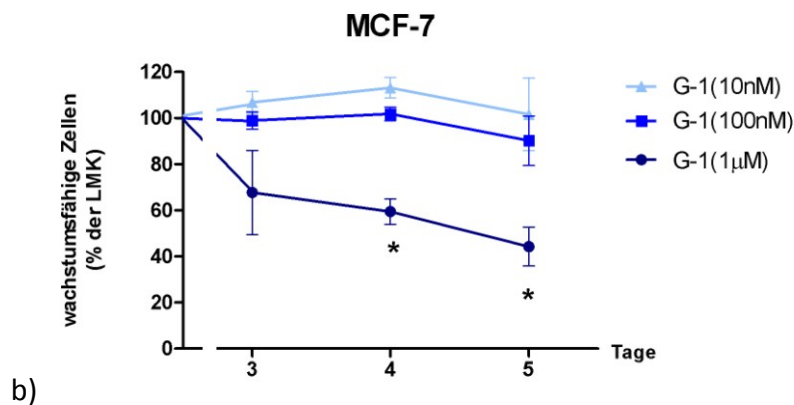
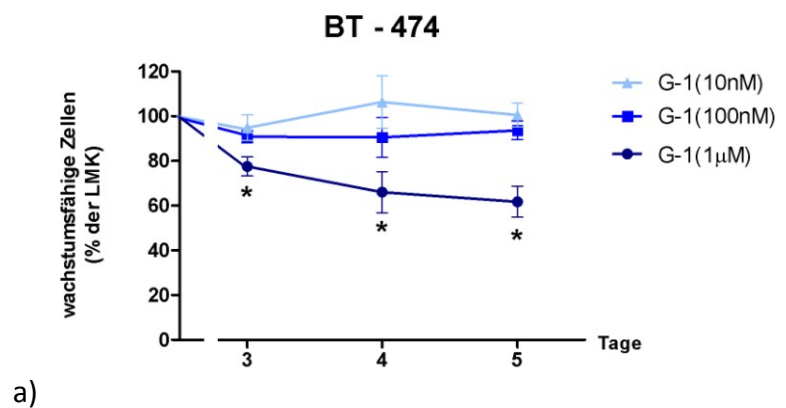
Die ER α -negativen **SK-BR-3** Zellen zeigten bereits an Tag 3 der Behandlung eine signifikante Reduktion des Wachstums um 30% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,01$; SD 5,8), die sich auf 36% ($p < 0,001$; SD 7,8) an Tag 5 steigerte.

Auch auf **MDA-MB-231** Zellen hatten 100nM G-1 einen antiproliferativen Effekt, jedoch ließ sich hier eine um 20% signifikant verminderte Zahl vermehrungsfähiger Zellen ($p < 0,05$, SD 5,7) erst an Tag 5 messen, an den Tagen 3 und 4 blieb das Wachstum unbeeinflusst.

3.2 Dosisabhängige Wirkung von G-1 auf die Zelllinien

Keinen signifikanten Effekt dagegen konnten wir durch 100nM G-1 bei den ausgeprägt ER α -positiven Zelllinien **MCF-7** und **T47-D**, sowie bei der schwach ER α -positiven, PR-positiven Zelllinie **BT-474** feststellen. Hier verhielt sich die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen nahezu gleich wie in der Lösungsmittelkontrolle.

Den stärksten Effekt auf die Zellproliferation konnten wir jedoch durch die hohe Dosis G-1 von **1 μ M** in allen verwendeten Zelllinien beobachten. Den maximalen Effekt erzielten wir jeweils an Tag 5 der Behandlung. Hier war eine Reduktion der Proliferation um 71,5% bei **SK-BR-3** ($p < 0,001$; SD 1,1), um 43% bei **MDA-MB-231** ($p < 0,001$; SD 3,6), 39% bei **BT-474** ($p < 0,001$; SD 6,9), 31% bei **T-47-D** ($p < 0,001$; SD 5,7) und 55% bei **MCF-7** ($p < 0,001$; SD 8,4) zu messen. Außer bei T47-D Zellen, die eine signifikante Reduktion erst an Tag 5 zeigten, ließ sich in allen anderen Zelllinien mit **1 μ M** G-1 bereits an Tag 3 ein deutlicher Effekt feststellen.



3.2 Dosisabhängige Wirkung von G-1 auf die Zelllinien

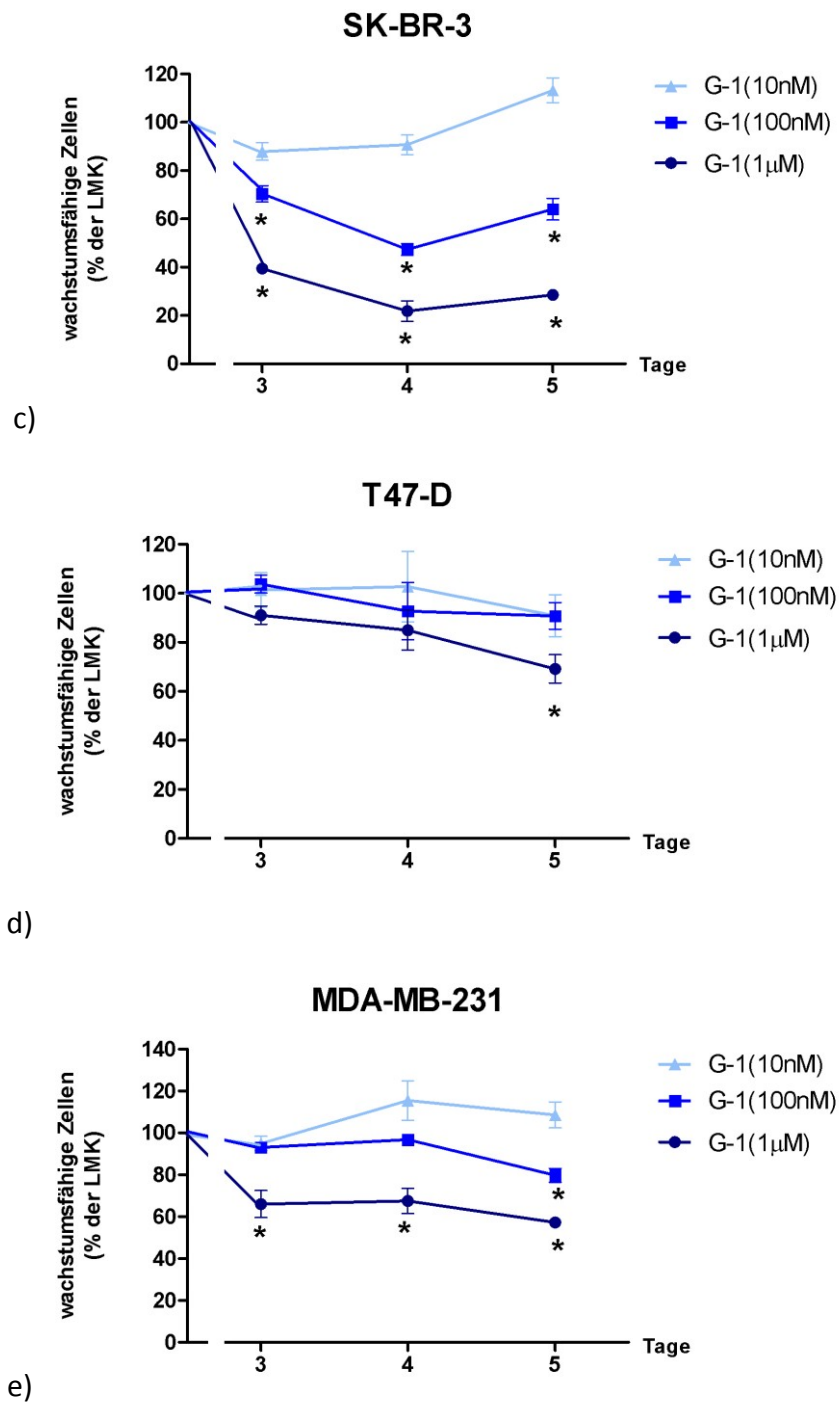


Abbildung 6: Dargestellt ist die Wirkung des GPR-30 Agonisten G-1 in den Konzentrationen 10nM, 100nM und 1µM auf die untersuchten Zelllinien. Das Wachstum wird angegeben in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittelkontrolle (n=3)

a) BT-474: Kein signifikanter Effekt bei 10nM und 100nM G-1. **1µM G-1:** 77% d. LMK ($p < 0,01$, SD 4,8) Tag (d)3; 66% d. LMK ($p < 0,001$; SD 9,2) d4; 61% d. LMK ($p < 0,001$; SD 6,9) d5

3.2 Dosisabhängige Wirkung von G-1 auf die Zelllinien

b) MCF-7: Kein signifikanter Effekt bei 10nM und 100nM. **1µM G-1:** 68% d. LMK ($p < 0,01$, SD 18,3) d3; 59% d. LMK ($p < 0,001$, SD 5,6) d4; 44% ($p < 0,001$, SD 8,4) d5

c) SK-BR-3: Kein signifikanter Effekt bei 10nM G-1. **100nM G-1:** 70% d. LMK ($p < 0,05$, SD 5,8) d3, 47% d. LMK ($p < 0,001$, SD 4,3) d4; 64% d. LMK ($p < 0,001$, SD 7,8) d5; **1µM G-1:** 39% d. LMK ($p < 0,001$; SD 1) d3; 21% d. LMK ($p < 0,001$; SD 7,4) d4; 29% d. LMK ($p < 0,001$; SD 1) d5

d) T-47D: Kein signifikanter Effekt bei 10nM und 100nM G-1. **1µM G-1:** 91% d. LMK (ns; SD3,7) d3; 85% d. LMK (ns; SD 8,4) d4; 69% d. LMK ($p < 0,01$; SD 7,4) d5.

e) MDA-MB-231: Kein signifikanter Effekt bei 10nM G-1. **100nM G-1:** 93% d. LMK (ns; SD 3, 4) d3; 97% d. LMK (ns; SD 4) d4; 79 % d. LMK ($p < 0,05$; SD 5,7)d5. **1µM G-1:** 66% d. LMK ($p < 0,01$, SD 11) d3, 68% d. LMK ($p < 0,01$; SD 10) d4; 57% d. LMK ($p < 0,001$; SD 3,5) d5.

3.3 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Trastuzumab

3.3.1 Effekte in der Zellkultur

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob und wenn ja in welchem Ausmaß der GPR-30 Agonist G-1 in der Lage sein würde, den antiproliferativen Effekt des HER2-Antikörpers Trastuzumab (TZ) zu beeinflussen. Hierfür wurden die HER2-überexprimierenden Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 mit einer Kombination aus TZ(10µg/ml) und unterschiedlichen Konzentrationen G-1 behandelt. Als Negativkontrolle wurde die gleiche Behandlung mit der HER2-negativen Zelllinie MDA-MB-231 durchgeführt.

Zunächst sollte die alleinige Wirkung von TZ auf die Zelllinien dargestellt werden.

Wie zu erwarten, reagierten beide Zelllinien mit HER2neu-Amplifikation mit einer Wachstumshemmung. Wie in *Abb.7* zu sehen, reduziert sich die Zahl proliferationsfähiger Zellen maximal um durchschnittlich 58% in BT-474 ($p<0,01$; SD 4,1), bzw. 46% in SK-BR-3 Zellen ($p<0,01$; SD 10,3) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. MDA-MB-231 dagegen blieb erwartungsgemäß unbeeinflusst durch Trastuzumab.

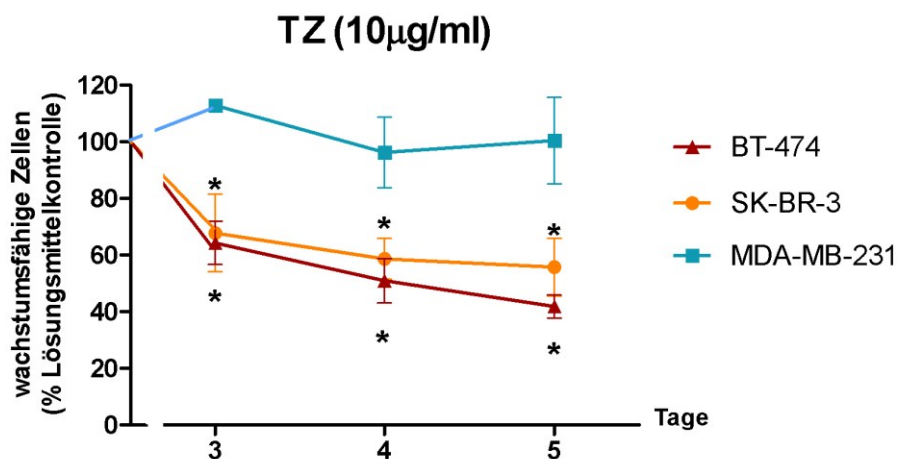


Abbildung 7: Wirkung von Trastuzumab (10µg/ml) auf die HER2-überexprimierenden Zelllinien BT-474 und SK-BR-3, sowie auf die HER2-negative Zelllinie MDA-MB231. Dargestellt ist die Anzahl proliferationsfähiger Zellen in Prozent der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Diese wurde als 100 % definiert. * $p<0,05$ vs. Lösungsmittelkontrolle. (n=4)

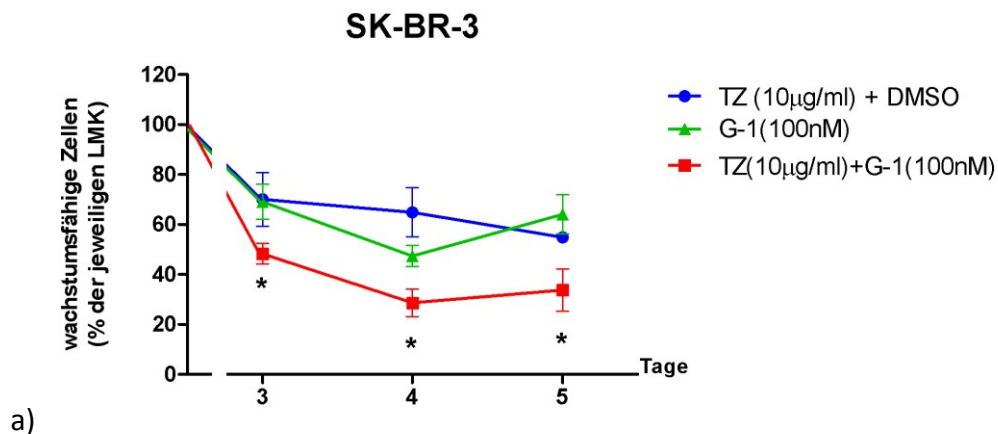
Als nächstes sollte der Effekt einer kombinierten Behandlung aus TZ und unterschiedlichen Konzentrationen G-1 auf das Proliferationsverhalten untersucht werden.

Die Kombination aus TZ(10µg/ml) und G-1(10nM) zeigte in keiner der untersuchten Zelllinien eine signifikante Änderung der Zellzahl verglichen mit einer alleinigen Behandlung mit TZ.

Erst eine Zugabe von **100nM G-1** war in der Lage den antiproliferativen Effekt von TZ auf SK-BR-3 Zellen signifikant zu steigern und zeigte sich der jeweiligen Einzelsubstanz überlegen. An Tag 5 konnten wir eine Reduktion um 66% wachstumsfähiger Zellen unter kombinierter Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle verzeichnen, ein signifikant ($p < 0,01$ vs. TZ; SD 8,6) stärkerer Effekt als die alleinige Behandlung mit TZ (54% d. LMK, Tag 5).

In BT-474 Zellen dagegen ließ sich mit einer Zugabe von 100nM G-1 kein signifikanter Unterschied zur alleinigen TZ Behandlung verzeichnen.

In den als Negativkontrolle dienenden MDA-MB-231 Zellen wurde der Effekt der Kombinationsbehandlung bezogen auf die alleinige Wirkung von G-1 ausgewertet. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied.



3.3 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Trastuzumab

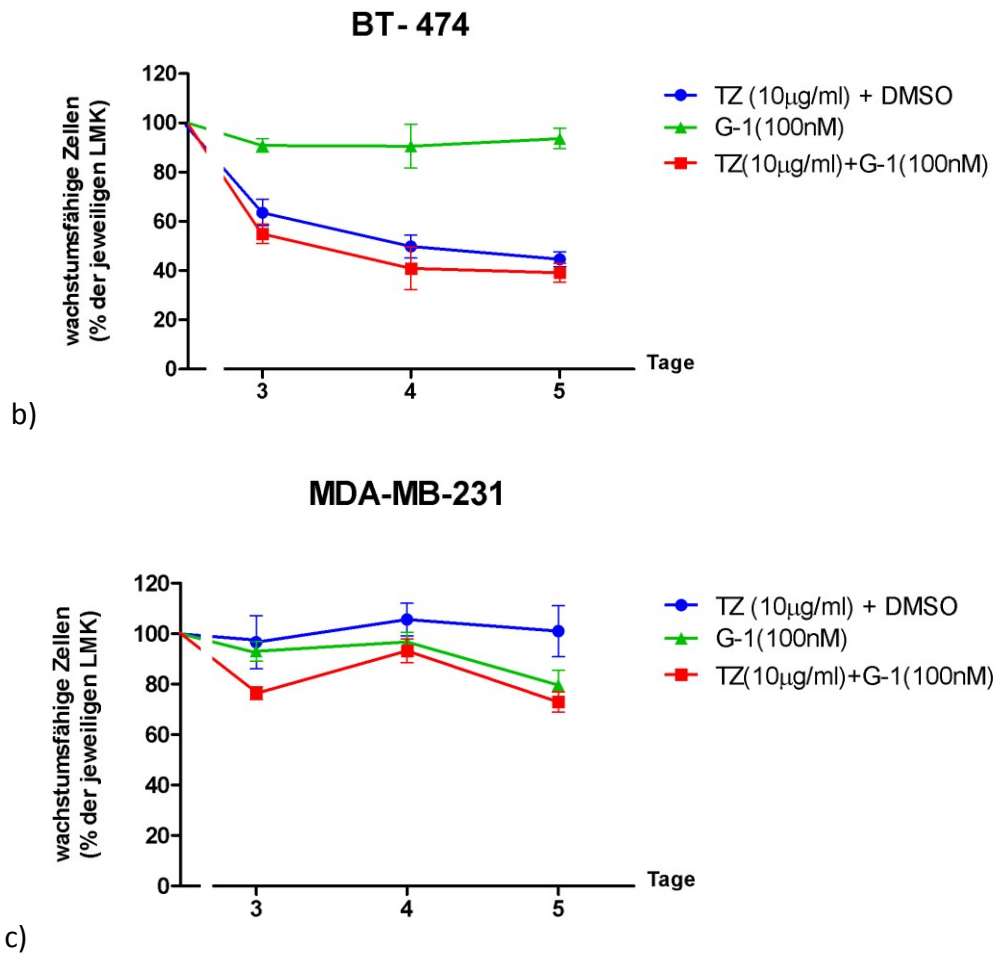


Abbildung 8: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus TZ(10µg/ml) + G-1(100nM) auf die Proliferation der Zellen unter Standardkulturbedingungen in Medium mit 10% FBS. Im Vergleich dazu dargestellt der Effekt von TZ(10µg/ml) allein, sowie G-1(100nM) allein. Angabe in % der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle, die als 100% definiert wurde. *p<0,05 bezogen auf den Effekt von TZ(10µg/ml). †p<0,05 bezogen auf den Effekt von G1(100nM); (n=3).

a) SK-BR-3: 48% d. LMK (p<0,001; SD 4,0) d3; 28% d. LMK (p<0,001; SD 5,5) d4; 34% d. LMK (p<0,01; SD 8,5) d5

b) BT-474: Kein signifikant stärkerer Effekt durch die Kombination mit 100nM G-1.

c) MDA-MB-231: Kein signifikant stärkerer Effekt durch die Kombination, verglichen mit G-1 allein.

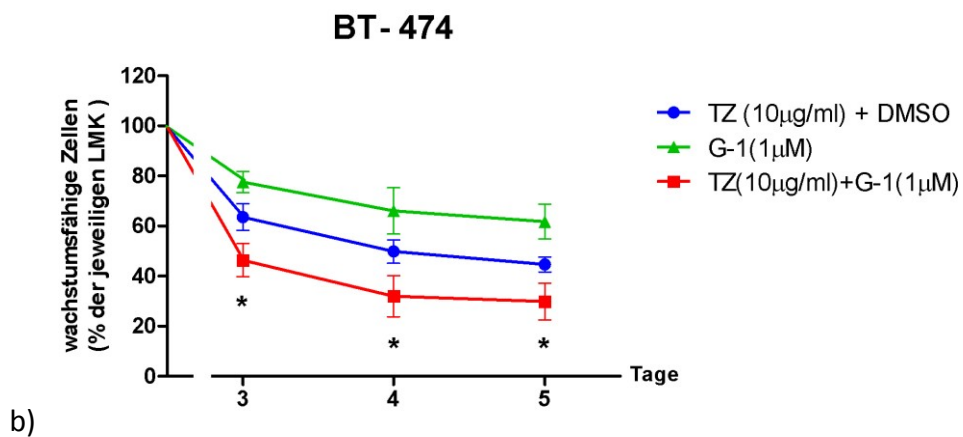
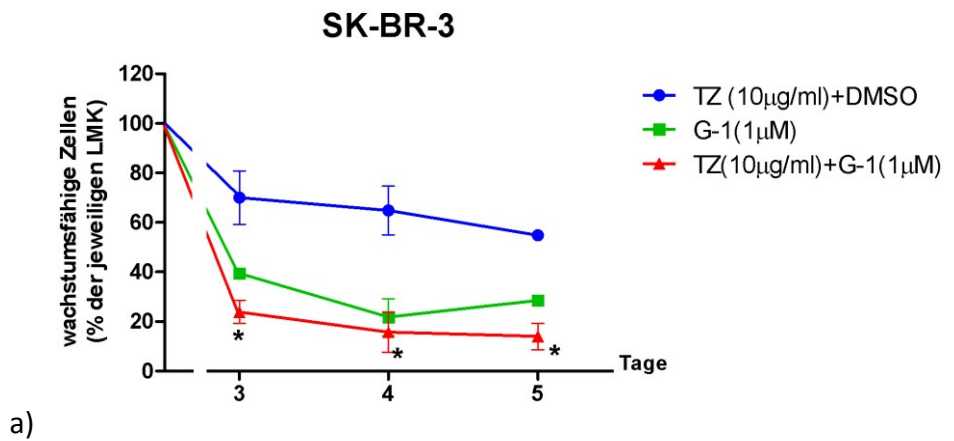
Den stärksten Effekt auf die Proliferation der Zellen konnten wir unter der Kombination aus TZ und 1µM G-1 beobachten. Hiermit ließ sich eine maximale Reduktion der SK-BR-3 Zellen auf 14% der Lösungsmittelkontrolle (p<0,001 vs. TZ; SD 5,3) an Tag fünf erzielen. Damit

3.3 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Trastuzumab

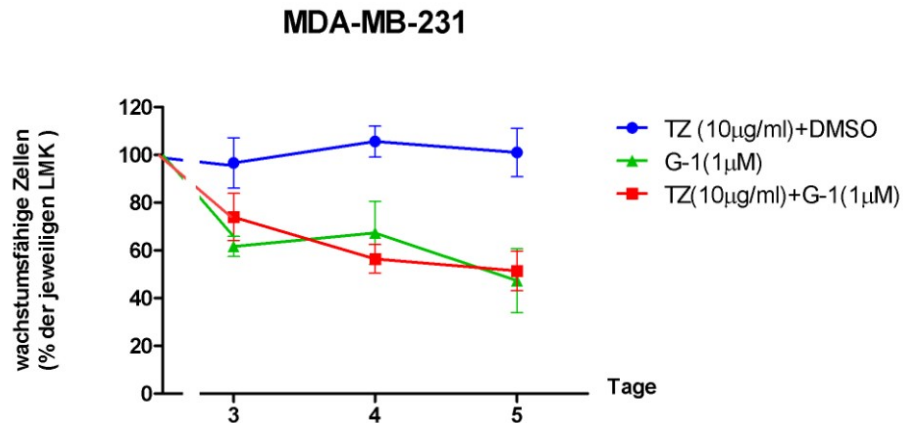
bewirkten beide Substanzen gemeinsam eine signifikant stärkere Hemmung des Wachstums als Trastuzumab allein.

Auch mit BT-474 Zellen konnten wir eine ausgeprägte Reduktion der vermehrungsfähigen Zellen unter kombinierter Behandlung erzielen. So fanden sich an Tag 5 lediglich 30% der Zellen verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Ein signifikant stärkerer Effekt als wir ihn durch TZ allein erreichen konnten ($p < 0,05$ vs. TZ, SD 7,3).

Wie zu erwarten zeigten MDA-MB231 kein Ansprechen auf Trastuzumab, somit entsprach der Effekt der Kombination weitgehend dem Effekt den wir durch die entsprechende Dosis G-1 erzielen konnten.



3.3 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Trastuzumab



c)

Abbildung 9: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus TZ(10µg/ml) + G-1(1µM) auf die Proliferation der Zellen in Medium mit 10% FBS. Im Vergleich dazu dargestellt der Effekt von TZ(10µg/ml) allein, sowie G-1(1µM) allein. Angabe in % der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle, die als 100% definiert wurde. *p<0,05 bezogen auf den Effekt von TZ(10µg/ml). †p<0,05 bezogen auf den Effekt von G1(1µM); (n=3).

a) SK-BR-3: 24% d. LMK (p<0,001; SD 4,6) d3; 16% d. LMK (p<0,001; SD 8) d4; 14% d. LMK (p<0,001; SD 5,3) d5

b) BT-474: 46% d. LMK (p<0,01; SD 6,6) d3; 32% d. LMK (p<0,01; SD 8,2) d4; 30% d. LMK (p<0,05; SD 7,2) d5

c) MDA-MB-231: Kein signifikanter Effekt der Kombination gegenüber G-1 allein.

3.3.2 Effekte der kombinierten Behandlung auf die Genexpression

Da die Kombination aus G-1 und Trastuzumab in der Lage war, die zelluläre Proliferation signifikant stärker zu beeinflussen als die Einzelsubstanzen sollte nun untersucht werden, wie sich dieses Ergebnis auf molekularer Ebene widerspiegeln würde.

Hierzu wurde die Expression verschiedener Gene auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR untersucht. Zum einen waren dies die Regulatoren des Zellzyklus **Cyclin D1**, **Cyclin A2** und **p21/WAF-1**, der Tumorsuppressor **EGR1** und das Onkogen **c-fos**. Bei allen ausgewählten Genen kann davon ausgegangen werden, dass sie unter dem regulierenden Einfluss von TZ und/oder G-1 stehen [79, 92-93].

Außerdem sollte eine mögliche Auswirkung der Behandlung auf die HER2neu-Expression untersucht werden.

Für diesen Zweck wurden die auch in den vorigen Experimenten verwendeten Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) sowie der Kombination aus beiden Substanzen unter Standardkulturbedingungen in Medium mit 10% FBS für 24 Stunden behandelt. Im Anschluss untersuchten wir das Expressionslevel der ausgewählten Gene auf Ebene der mRNA und verglichen das Ergebnis nach kombinierter Behandlung mit dem Effekt durch TZ allein. Da sich in mehreren Ansätzen wiederholt gezeigt hatte, dass die geringe Konzentration der Lösungsmittel (G-1 ist gelöst in DMSO) keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen hatte, konnten wir die Expression nach Stimulation in % der unbehandelten Kontrolle angeben.

In beiden Zelllinien zeigte sich, dass eine kombinierte Behandlung aus TZ und G-1 zu einer ausgeprägten Verminderung der Transkription des an der Regulation des Zellzyklus beteiligten **Cyclin A2** führt. In SK-BR-3 Zellen war das mRNA Level auf 45,8% verglichen mit den unbehandelten Zellen reduziert ($p < 0,01$ vs. TZ; SD 21), BT-474 Zellen zeigten sogar eine Reduktion auf 39% ($p < 0,01$ vs. TZ; SD 10). Weder TZ noch G-1 waren dagegen als Einzelsubstanz verwendet in der Lage, die Expression des Cyclin A2 zu beeinflussen.

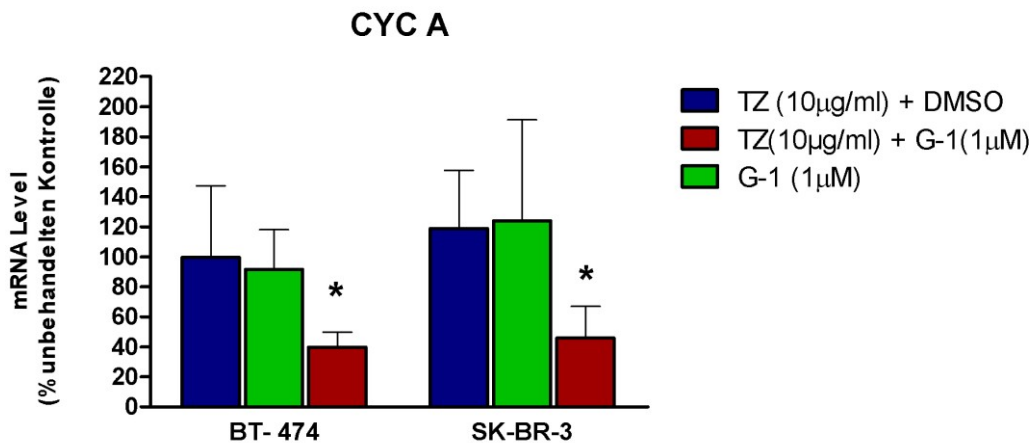


Abbildung 10: Dargestellt ist die Änderung der Expression von Cyclin A nach 24h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

Gegensätzliche Ergebnisse ergaben sich bezüglich der **Cyclin D1** Expression.

In BT-474 Zellen konnten wir durch die Kombination aus TZ und G-1(1µM) eine Verminderung des mRNA Gehalts auf 54% der unbehandelten Kontrolle beobachten. Somit ein signifikant stärkerer Effekt auf die Expression des Gens, als dies TZ alleine bewirkte ($p < 0,05$ vs. TZ; SD 12,2).

Im Gegensatz dazu zeigte sich in SK-BR-3 Zellen ein Anstieg des mRNA-Levels um etwa 50% sowohl unter Behandlung mit TZ allein, als auch mit der Kombination der Substanzen (ns vs.TZ).

G-1 allein schien jedoch in keiner der beiden Zelllinien einen signifikanten Effekt zu erzielen.

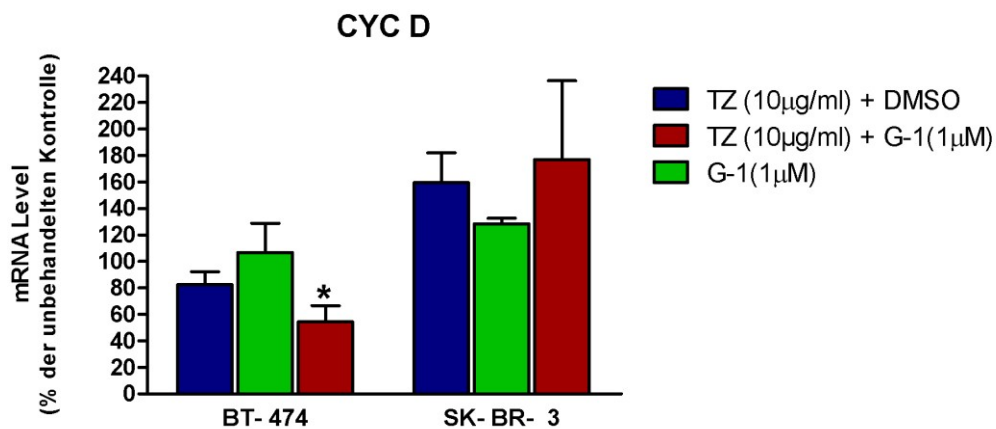


Abbildung 11: Dargestellt ist die Änderung der Expression von Cyclin D nach 24h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

Als nächstes soll die Expression des Zellzyklusproteins und potentiellen Tumorsuppressors **p21/WAF1** betrachtet werden.

In BT-474 Zellen bewirkten beide Substanzen zusammen nur einen minimalen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Expression. Weder TZ noch G-1 allein bewirkten eine signifikante Veränderung des mRNA Levels dieses Gens. In SK-BR-3 Zellen dagegen ließ sich ein Anstieg

des mRNA Gehalts nach Kombinationsbehandlung um mehr als das 4-Fache verglichen mit der Expression nach Zugabe von TZ allein verzeichnen ($p < 0,009$ vs. TZ, SD 305).

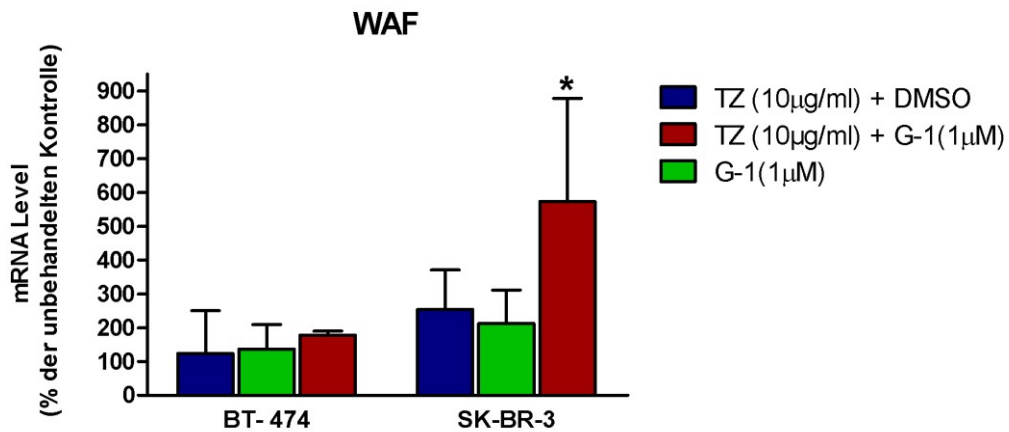


Abbildung 12: Dargestellt ist die Änderung der Expression von p21/Waf nach 24h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

Ein weiteres Gen dessen Expression untersucht werden sollte, ist das **early growth response 1 (EGR-1)** Gen, ein Zink-Finger Protein dem eine Rolle als möglicher Tumor-Suppressor zugeschrieben wird.

In BT-474 Zellen zeigte sich ein Anstieg des mRNA Gehalts sowohl nach Behandlung mit G-1 als auch nach Behandlung mit TZ. Die Kombination der beiden Substanzen war sogar in der Lage, einen etwa 3-fach stärkeren Anstieg zu bewirken ($p < 0,006$ vs. TZ; SD 107).

Die SK-BR-3 Zellen dagegen reagierten nicht auf eine Zugabe von G-1. Das EGR-1 Level wurde hier zwar durch TZ erhöht, die Kombination mit G-1 erbrachte jedoch keinen zusätzlichen Effekt.

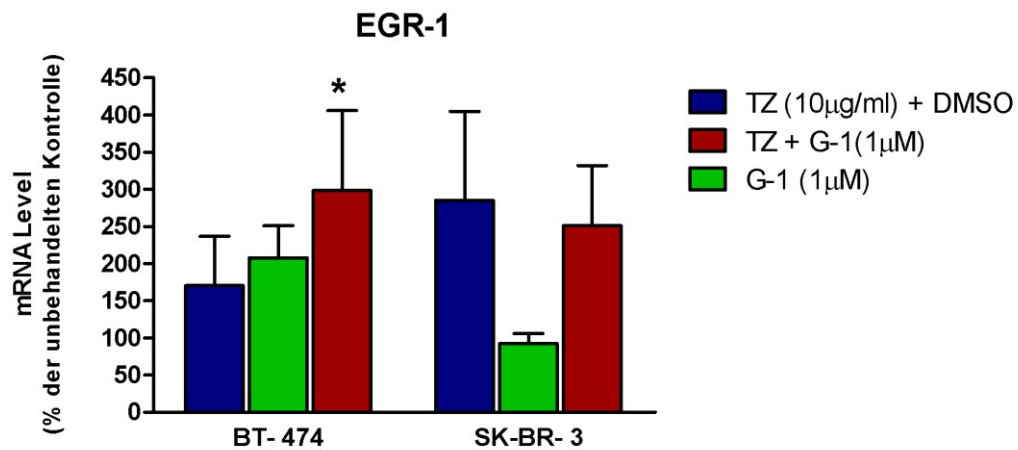


Abbildung 13: Dargestellt ist die Änderung der Expression von EGR-1 nach 24h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

Interessante Ergebnisse zeigten sich auch für das Onkogen *c-fos*. Die Behandlung mit TZ allein führte in beiden Zelllinien zu einem etwa 3-fachen Anstieg des Transkriptionslevels. Eine Zugabe von G-1 jedoch war in der Lage, den TZ getriggerten Anstieg völlig zu blockieren und führte sogar zu einer Reduktion der Transkription auf 59% der unbehandelten Kontrolle bei BT-474 ($p < 0,01$ vs. TZ; SD 7,3), bzw. 49% bei SK-BR-3 ($p < 0,01$ vs. TZ; SD 25).

Dieser Effekt konnte nach einem Behandlungszeitraum von 24 Stunden beobachtet werden. Da aber *c-fos* ein bekanntes „early response“ Gen ist, das heißt die Antwort auf den Stimulus schnell und prompt erfolgt, sollte zusätzlich die Expression nach 6 Stunden Behandlung

untersucht werden. Auch hier führte die alleinige Behandlung mit TZ zu einem Anstieg des Transkriptionslevels. Bei der kombinierten Behandlung mit G-1 und TZ war nach 6 Stunden ein ausgeprägter Effekt zu beobachten. Bei BT-474 kam es zu einer Reduktion auf 29% der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,04$ vs. TZ; SD 12), SK-BR-3 zeigten einen noch stärkeren Abfall des mRNA Gehalts auf 10% der Kontrolle ($p < 0,002$ vs. TZ; SD 2,7).

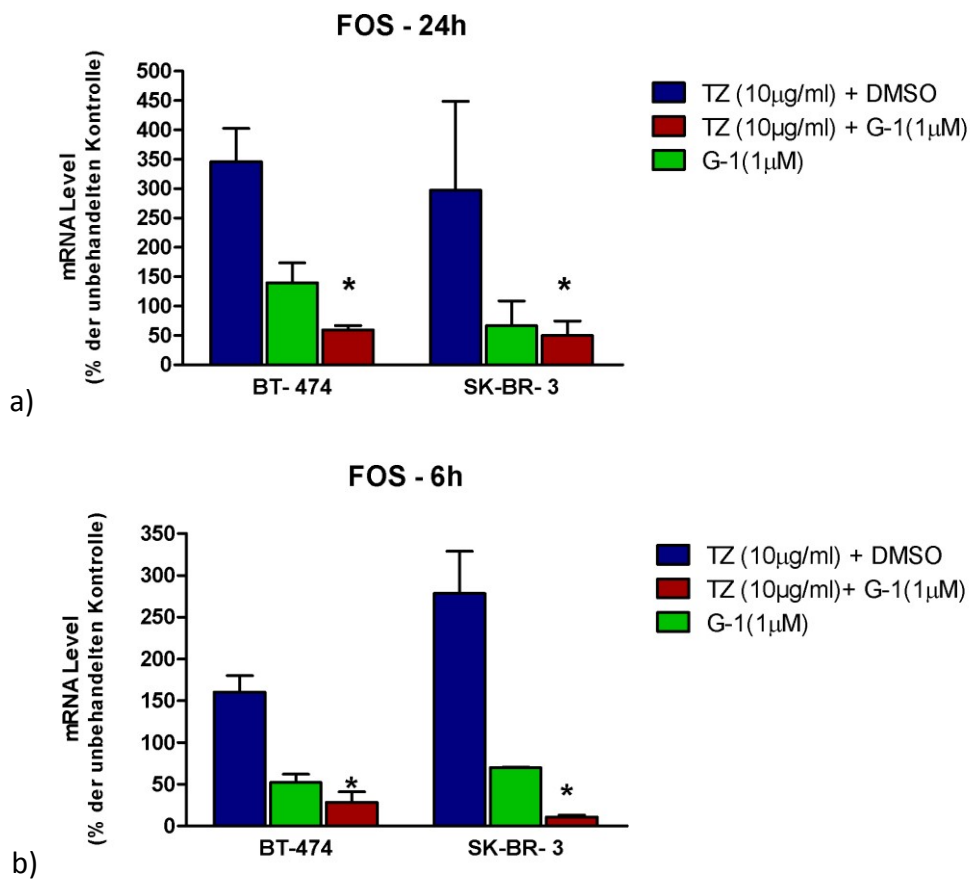


Abbildung 14: Dargestellt ist die Änderung der Expression von Fos nach Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

a) mRNA Gehalt nach 24 Stunden

b) mRNA Gehalt nach 6 Stunden

Zuletzt sollten die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen auf die Expression des HER2neu Rezeptors untersucht werden.

Hier zeigte sich allerdings, dass weder Trastuzumab noch G-1 allein, noch eine Kombination der beiden Substanzen einen signifikanten Effekt auf die Transkription des HER2neu Gens bewirkten.

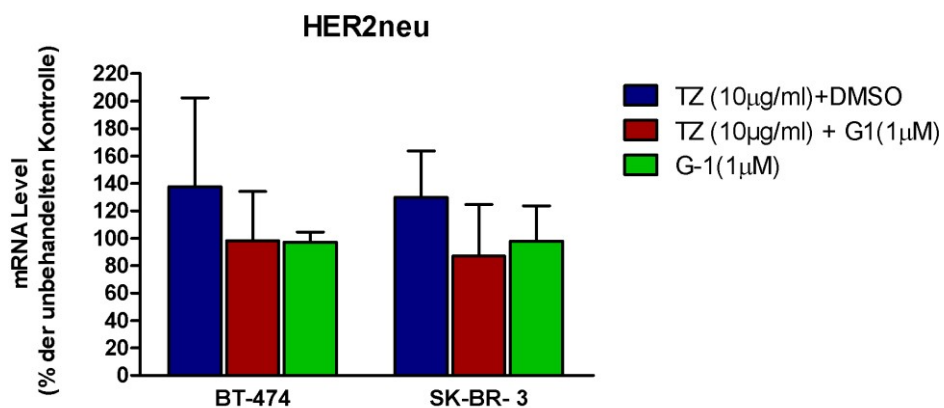


Abbildung 15: Dargestellt ist die Änderung der Expression von HER2neu nach 24h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript-Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. TZ; (n=3).

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

3.4.1 Effekte in der Zellkultur

Als Nächstes sollte untersucht werden, ob der GPR-30 Agonist G-1 auch in der Lage sein würde, den antiproliferativen Effekt des selektiven Östrogen-Rezeptor Modulators (SERM) Tamoxifen (Tam) und des reinen Antiöstrogens Fulvestrant (ICI) zu beeinflussen. Hierfür wurden die Östrogenrezeptor positiven Zelllinien **T47-D** und **MCF-7** verwendet. Als Negativkontrolle diente wieder die ER-negative Zelllinie **MDA-MB-231**. Behandelt wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen Tam (0,2µM, 1µM und 5µM), sowie 0,1µM ICI, jeweils in Kombination mit drei verschiedenen Konzentrationen G-1 (10nM, 100nM und 1µM).

Auch hier wurden die Versuche unter Standardkulturbedingungen mit 10% FBS durchgeführt. Die Zellen wurden vor Behandlung mit Tamoxifen oder G-1 in diesem Fall zusätzlich mit Östradiol (10µM, zu gleichen Teilen gelöst in H₂O, DMEM und EtOH) stimuliert.

Um herauszufinden, ob im FBS enthaltene Hormone oder Wachstumsfaktoren die Effekte beeinflussen würden, wurden alle Versuche in serumfreiem SR2 Medium durchgeführt. Auch hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede, so dass im Folgenden nur die Ergebnisse mit 10% FBS-haltigem Medium dargestellt werden.

Zunächst sollte die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen Tamoxifen auf die einzelnen Zelllinien betrachtet werden.

Wie zu erwarten bewirkte Tamoxifen einen dosisabhängigen antiproliferativen Effekt in beiden ER-positiven Zelllinien. Während **0,2µM** eine maximale Hemmung der Proliferation in beiden Zelllinien um etwa 25% verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle an Tag fünf bewirkte (MCF-7: 75,2% d. LMK, p<0,05, SD 4,7; T-47D: 74% d. LMK, p<0,05, SD 12), wurde die Zahl der proliferationsfähigen Zellen durch **5µM** Tam um knapp 50% reduziert (MCF-7: 48,5% d. LMK, p<0,001, SD 7,4; T-47D: 52% d. LMK, p<0,001, SD 6,7).

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

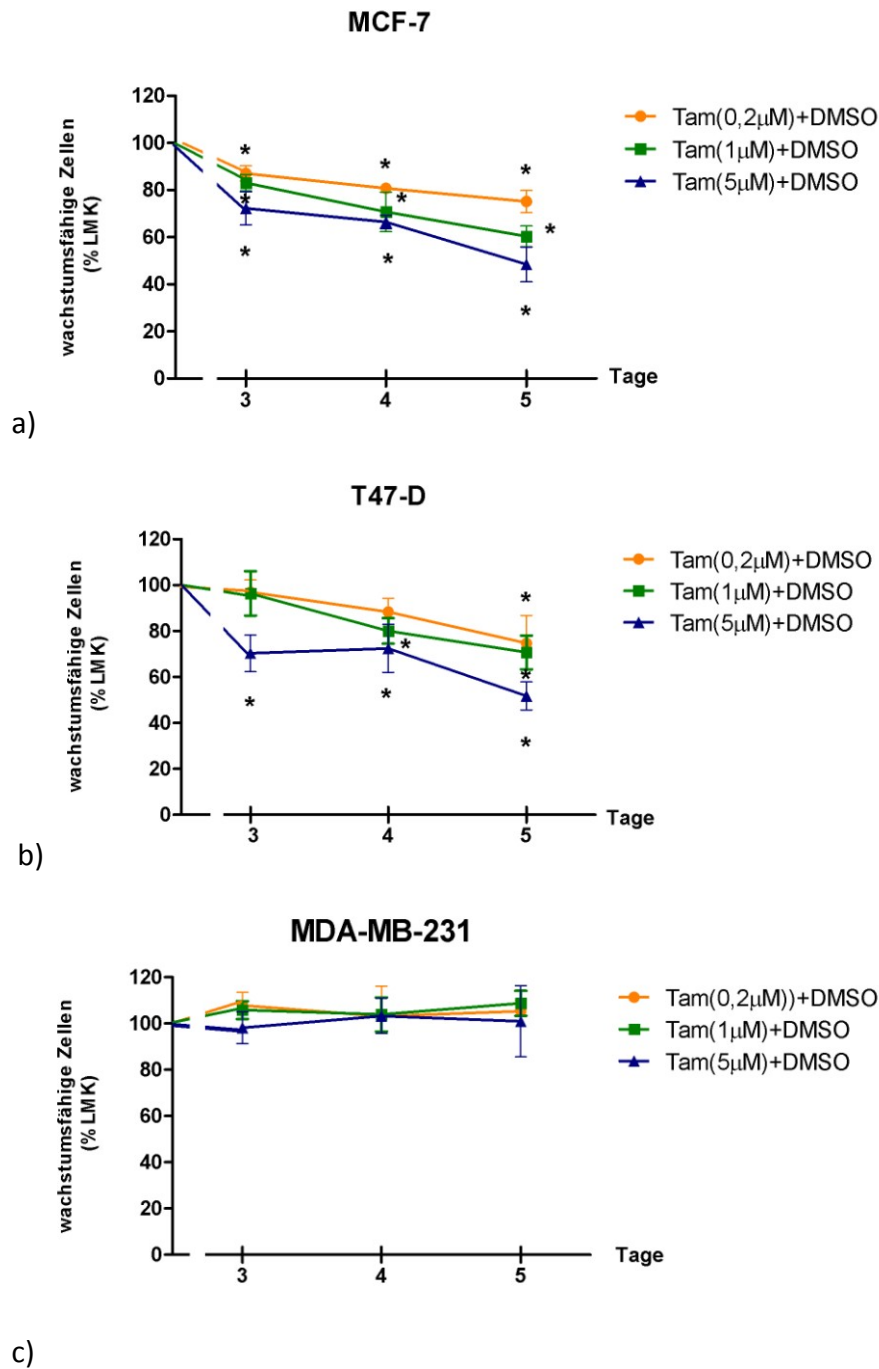


Abbildung 16: Wirkung von Tamoxifen (0,2μM; 1μM; 5μM) auf die ER positiven Zelllinien MCF-7 und T47-D, sowie auf die ER negative Zelllinie MDA-MB231. Dargestellt ist die Anzahl proliferationsfähiger Zellen in Prozent der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle. Diese wurde als 100 % definiert. *p<0,05 vs. Lösungsmittelkontrolle; (n=4).

a) **MCF-7: 0,2μM Tam:** 87% d. LMK (p<0,05, SD 3) Tag (d) 3; 80% d. LMK (p<0,01, SD 1) d4; 75% (p<0,05, SD 4,7)d5. **1μM Tam:** 83% d. LMK (p<0,05, SD 3,5) d3; 71% d. LMK (p<0,01, SD 8,4) d4; 60% (p<0,01, SD 4,5)d5. **5μM Tam:** 73% d. LMK (p<0,01, SD 7) d3; 66% d. LMK (p<0,001, SD 2,8) d4; 48,7% (p<0,001, SD 7,4)d5.

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

b) T-47D: **0,2µM Tam**: 97% d. LMK (ns, SD 5,3) d3; 88% d. LMK ($p < 0,05$, SD 5,9) d4; 74% ($p < 0,05$, SD 12)d5. **1µM Tam**: 96% d. LMK (ns, SD 10) d3; 80% d. LMK ($p < 0,05$, SD 5,5) d4; 71% ($p < 0,01$, SD 7,3)d5. **5µM Tam**: 70% d. LMK ($p < 0,05$, SD 8) d3; 72,5% d. LMK ($p < 0,05$, SD 10,5) d4; 52% ($p < 0,001$, SD 6,7)d5.

c) MDA-MB-231: Kein Effekt durch 3 verschiedene Dosierungen Tamoxifen auf die ER-negative Zelllinie.

Auch mit dem reinen Antiöstrogen ICI konnten vergleichbare Effekte erzielt werden. Hier bewirkten **0,1µM** der Substanz eine maximale Wachstumshemmung an Tag 5 um 56% bei MCF-7 ($p < 0,001$; SD 5,4), bzw. 42% bei T47-D ($p < 0,001$; SD 4,6) verglichen mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle.

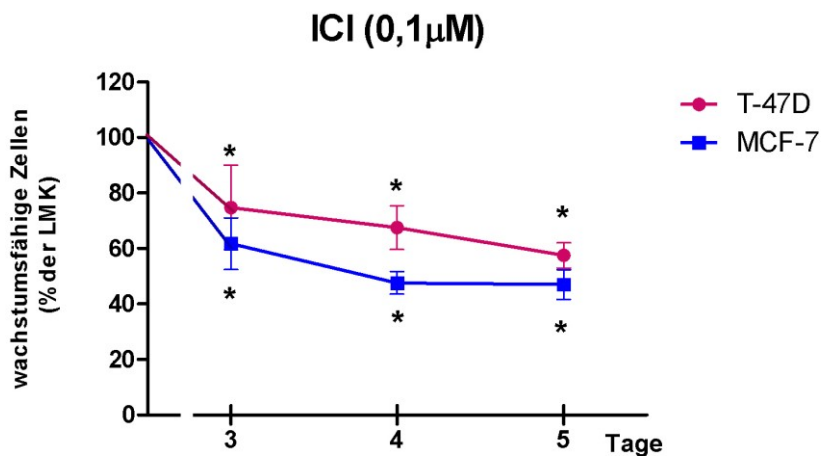


Abbildung 17: Dargestellt ist der Effekt des reinen Antiöstrogens ICI (0,1µM) in Medium mit 10% FBS über einen Zeitraum von 5 Tagen auf die beiden östrogensensiblen Zelllinien T-47D und MCF-7. Angaben in % der Lösungsmittelkontrolle, die als 100% definiert wurde. * $p < 0,05$ vs. LMK; (n=4).

T-47D: 75% d. LMK ($p < 0,05$, SD 15,3) d3; 66% d. LMK ($p < 0,01$, SD 10) d4; 58% ($p < 0,001$, SD 4,6)d5.

MCF-7: 62% d. LMK ($p < 0,01$, SD 9,3) d3; 48% d. LMK ($p < 0,001$, SD 4) d4; 47% ($p < 0,001$, SD 5,4)d5.

Im nächsten Schritt sollte die Wirkung der Zugabe von verschiedenen Dosierungen G-1 zu Tamoxifen untersucht, und mit dem Effekt der alleinigen Tamoxifenbehandlung verglichen werden. In der Kontrollzelllinie MDA-MB-231 wurde die Kombinationsbehandlung mit dem Effekt durch G-1 allein verglichen, da Tamoxifen keine Auswirkungen auf diese Zellen zeigt.

Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit G-1 und Tam führte bei beiden ER-positiven Zelllinien zu einer Verstärkung der antiproliferativen Wirkung verglichen mit Tam allein. Der Effekt zeigte sich allerdings abhängig von der zugegebenen Dosis G-1, so konnte weder mit einer Zugabe von **10nM** noch mit **100nM** ein additiver Effekt erreicht werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Eine Kombination von **Tam(0,2µM)** und **G-1(1µM)** hatte auf T-47D Zellen an Tag 3 einen signifikant stärkeren Effekt auf die Proliferation der Zellen als Tamoxifen allein zu diesem Zeitpunkt. Während nach kombinierter Behandlung nur noch 71% wachstumsfähige Zellen verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle gemessen wurden, waren es nach alleinigem Einwirken von Tamoxifen noch 90% ($p < 0,05$ vs. Tam; SD 9,1). Nach fünf Tagen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr.

Mit MCF-7 Zellen konnten wir zu allen drei Zeitpunkten einen signifikant stärkeren Effekt auf das Proliferationsverhalten nach Zugabe von 1µM G-1 zu Tam(0,2µM) verzeichnen. Maximal reduzierte sich die Anzahl wachstumsfähiger Zellen an Tag 5 auf 44% der Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,001$ vs. Tam; SD 8,1).

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

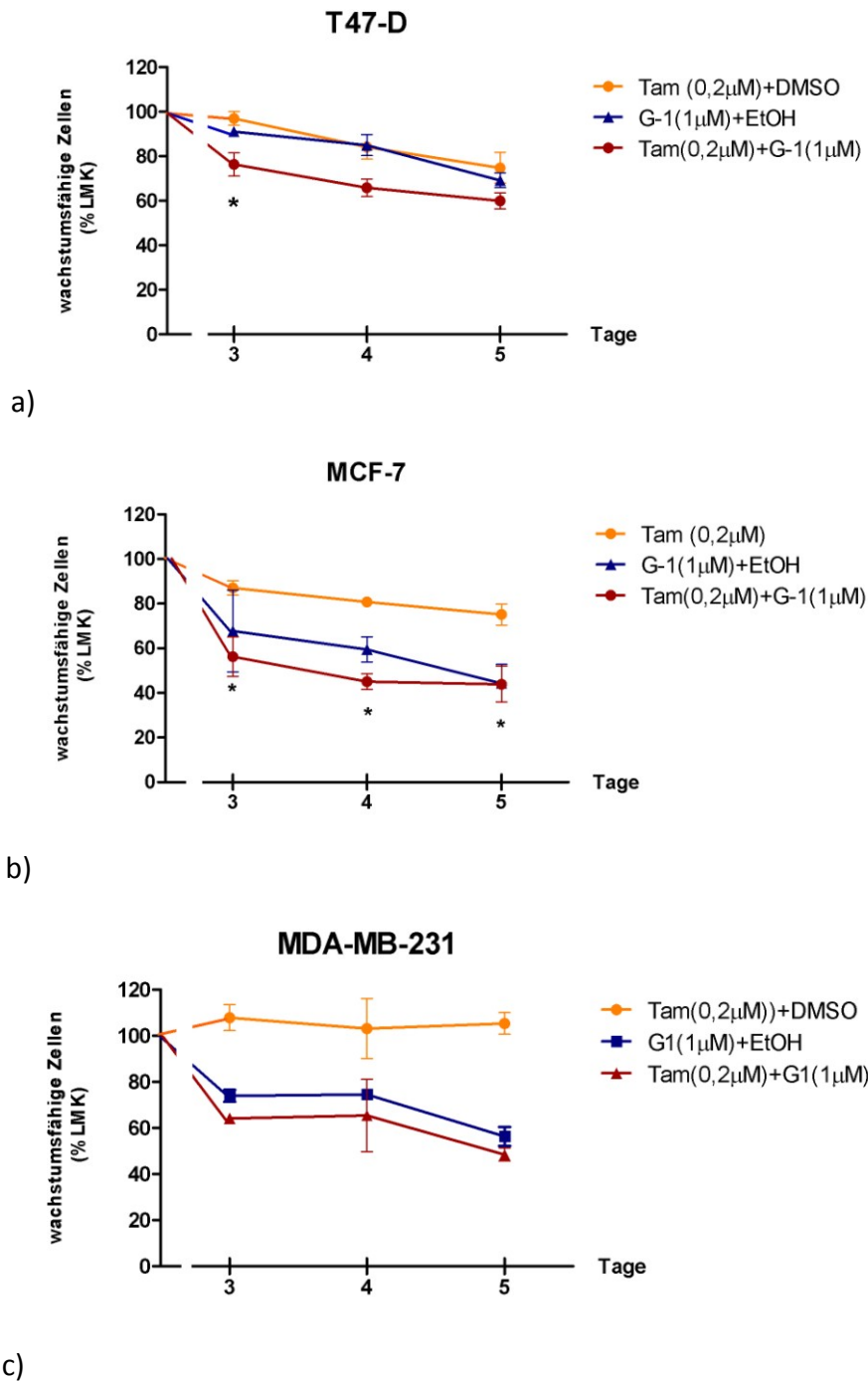


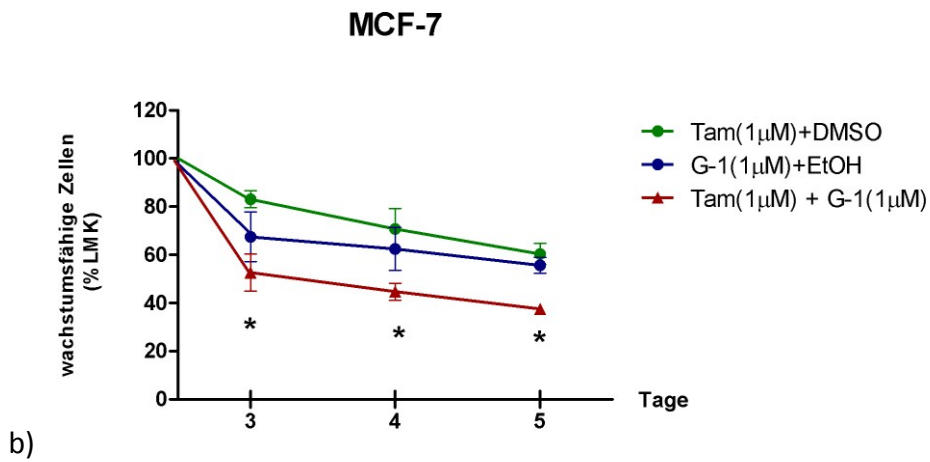
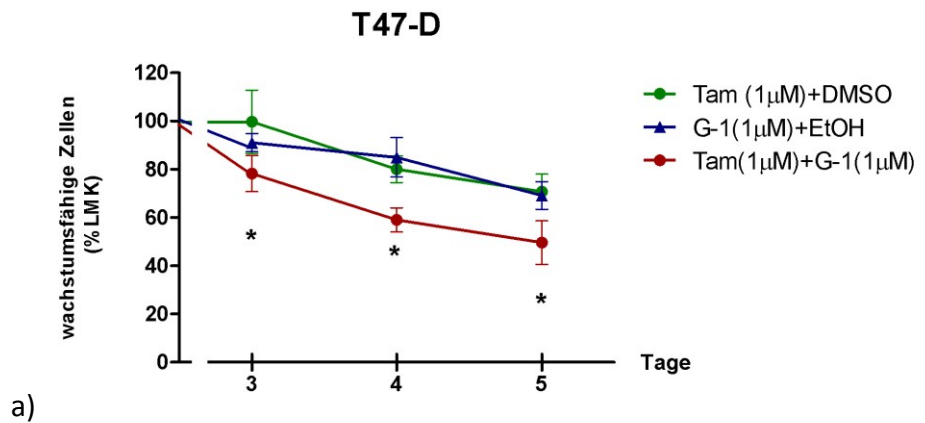
Abbildung 18: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus Tam(0,2µM)+G-1(1µM) in 10% FBS-haltigem Medium, verglichen mit der jeweiligen Substanz allein. Angaben in % der LMK, dabei wurde die LMK als 100% definiert. * $p < 0,05$ vs. Tamoxifen(0,2µM). MDA-MB-231 † $p < 0,05$ vs. G-1; (n=3).

a) T-47D: 76% d. LMK (ns, SD 9,3) Tag (d)3; 66% d. LMK ($p < 0,01$, SD 10) d4; 58% ($p < 0,001$, SD 4,6)d5.

b) MCF-7: 62% d. LMK ($p < 0,01$, SD 9,3) d3; 48% d. LMK ($p < 0,001$, SD 4) d4; 47% ($p < 0,001$, SD 5,4)d5.

c) MDA-MB-231: Kein signifikanter Unterschied zwischen G-1+Tam und G-1 allein.

Auch die Kombination aus **Tam(1 μ M)** und **G-1(1 μ M)** bewirkte eine stärkere antiproliferative Wirkung als der SERM allein. Der Effekt ließ sich in beiden Zelllinien an allen drei Tagen beobachten. Maximal konnte eine Reduktion der wachstumsfähigen Zellen um 50% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle bei T47-D ($p < 0,05$ vs. Tam; SD 9), um 63% bei MCF-7 ($p < 0,001$ vs. Tam; SD 1,3) gemessen werden.



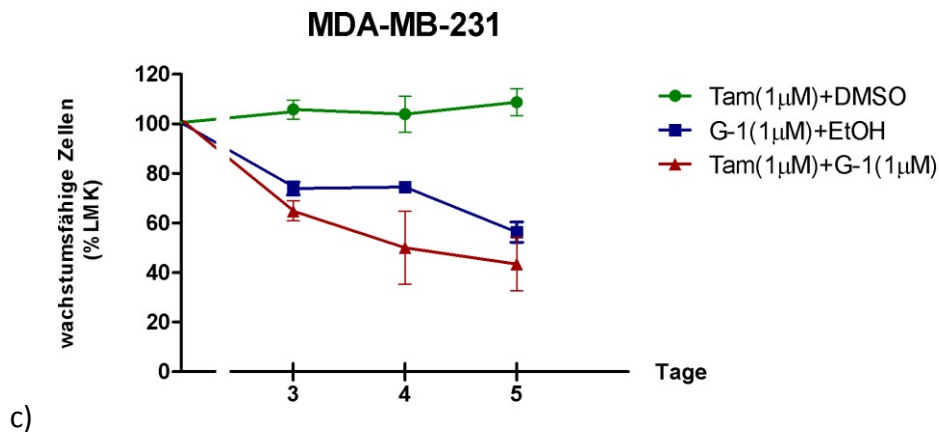


Abbildung 19: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus Tam(1µM)+G-1(1µM) in 10% FBS-haltigem Medium, verglichen mit der jeweiligen Substanz allein. Angaben in % der LMK, dabei wurde die LMK als 100% definiert. * $p < 0,05$ vs. Tamoxifen(1µM). MDA-MB-231; † $p < 0,05$ vs. G-1; (n=3).

a) T-47D: 78% d. LMK ($p < 0,05$, SD 7,5) Tag (d)3; 59% d. LMK ($p < 0,05$, SD 5) d4; 50% ($p < 0,05$, SD 9)d5.

b) MCF-7: 54% d. LMK ($p < 0,01$, SD 6,1) d3; 45% d. LMK ($p < 0,001$, SD 3,6) d4; 37% ($p < 0,001$, SD 1,3)d5.

c) MDA-MB-231: Kein signifikanter Unterschied zwischen G-1+Tam und G-1 allein.

Den deutlichsten Effekt in beiden Zelllinien konnten wir mit der Kombination aus **Tam(5µM)** und **G-1(1µM)** erzielen. 5 µM Tamoxifen allein bewirken bereits einen starken antiproliferativen Effekt (T47-D: 54% der unbehandelten Kontrolle; MCF-7: 51% der unbehandelten Kontrolle), der sich durch Zugabe von 1µM G-1 noch steigern ließ. In T47-D Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied erst an Tag 5, hier waren nach kombinierter Behandlung noch 34% proliferationsfähige Zellen verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle vorhanden ($p < 0,05$ vs. Tam, SD 2,9).

Ein signifikant stärkerer antiproliferativer Effekt nach Zugabe von G-1 ließ sich bei MCF-7 bereits an Tag 3 feststellen. Auch hier verzeichneten wir die maximale Reduktion der Zellzahl an Tag 5 mit 32% der Lösungsmittelkontrolle ($p < 0,01$ vs. Tam, SD 3,1).

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

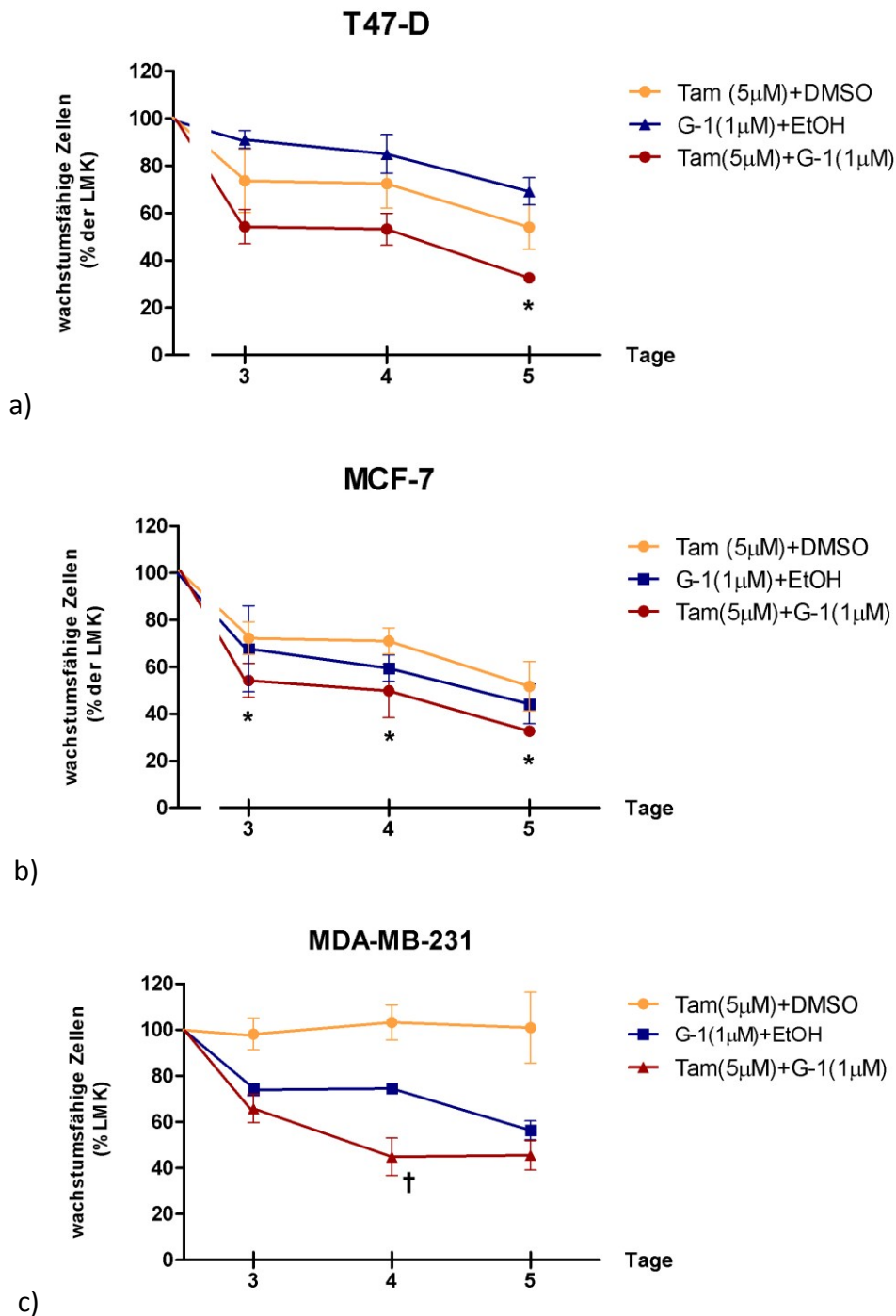


Abbildung 20: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus Tam(5µM)+G-1(1µM) in 10% FBS-haltigem Medium, verglichen mit der jeweiligen Substanz allein. Angaben in % der LMK, dabei wurde die LMK als 100% definiert. *p<0,05 vs. Tamoxifen(5µM). MDA-MB-231; †p<0,05 vs. G-1; (n=3).

a) T-47D: 78% d. LMK (p<0,05, SD 7,5) Tag(d)3; 59% d. LMK (p<0,05, SD 5) d4; 50% (p<0,05, SD 9)d5.

b) MCF-7: 54% d. LMK (p<0,01, SD 6,1) d3; 45% d. LMK (p<0,001, SD 3,6) d4; 37% (p<0,001, SD 1,3)d5.

c) MDA-MB-231: Kein signifikanter Unterschied zwischen G-1+Tam und G-1 allein.

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

Ein weiterer Effekt, der sich in der Zellkultur beobachten ließ, ist dass die Zugabe von G-1 es ermöglicht mit einer geringeren Dosis Tamoxifen die gleiche Wachstumshemmung zu erzielen wie mit entsprechend höherer Tamoxifen Dosierung. So bewirkte die Zugabe von 100nM G-1 zu 0,2µM Tamoxifen eine maximale Reduktion der T47-D Zellen auf 66% der Lösungsmittelkontrolle, mit 1µM Tamoxifen konnten vergleichbare 70% erzielt werden. 1µM G-1 in Kombination mit 0,2µM Tam verringerte die Zellzahl an Tag 3 sogar signifikant stärker als 1µM Tamoxifen.

Einen entsprechenden Effekt konnten wir durch die Zugabe von 100nM bzw. 1µM G-1 zu 1µM Tamoxifen verglichen mit 5µM Tamoxifen verzeichnen.

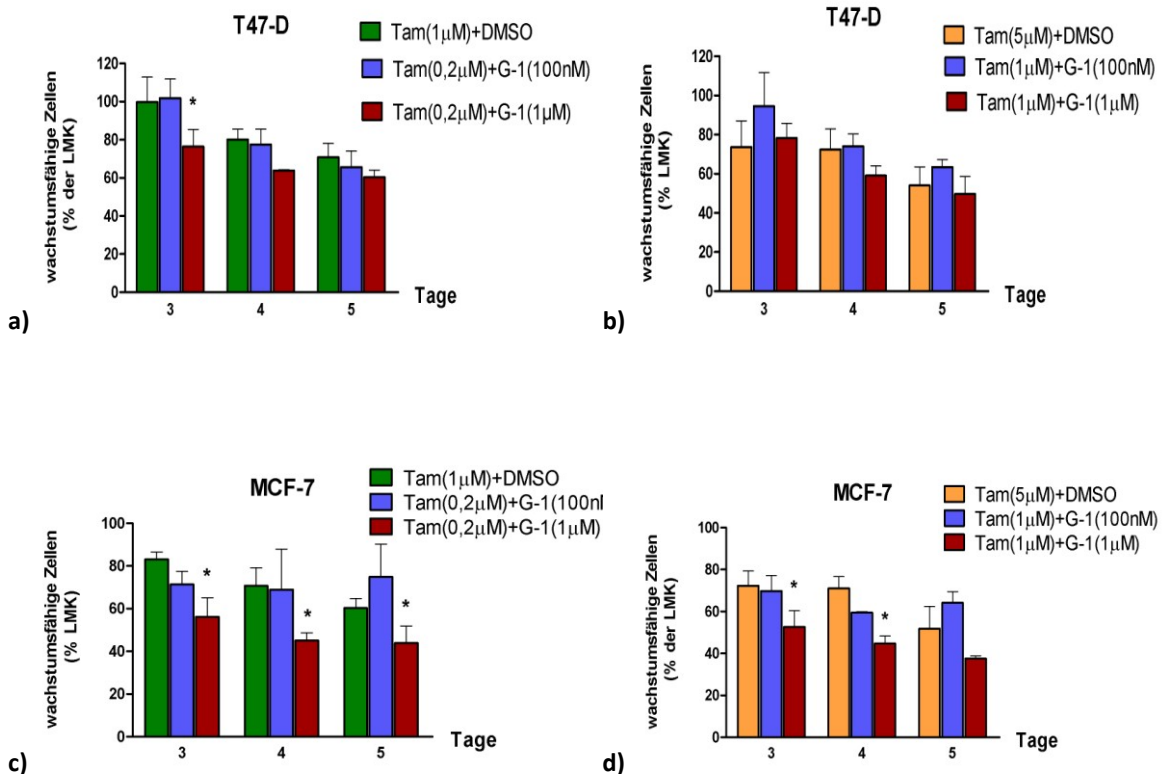
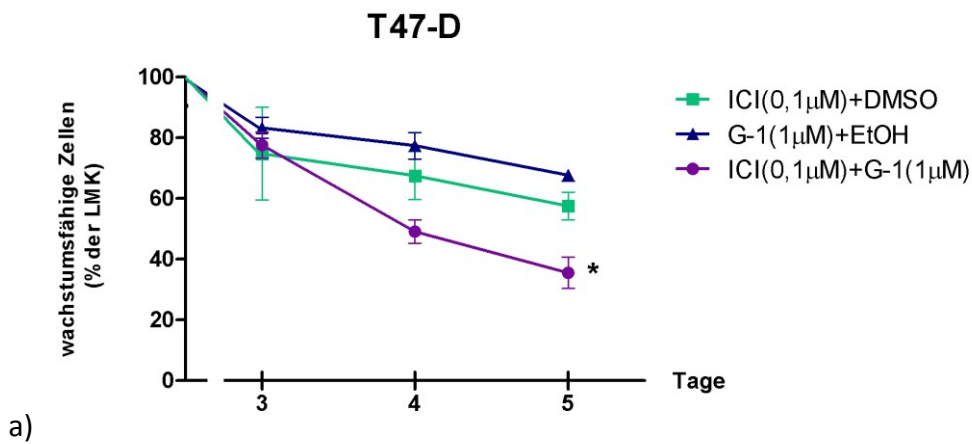


Abbildung 21: Dargestellt ist der Effekt einer Zugabe von 100nM und 1µM G-1 zu Tamoxifen, im Vergleich mit einer höheren Dosierung Tamoxifen alleine. Durchgeführt in 10% FBS-haltigem Medium. Angaben in % der LMK, dabei wurde die LMK als 100% definiert. *p<0,05 vs. Tamoxifen alleine; (n=3).

Auch mit dem reinen Antiöstrogen Fulvestrant (ICI) ließ sich durch Zugabe des GPR-30 Agonisten die antiproliferative Wirkung steigern. Der erzielte Effekt war allerdings auch hier abhängig von der zugegebenen Dosis G-1 so bewirkten weder **10nM** noch **100nM** eine signifikante additive Proliferationshemmung. Erst mit der Kombination aus **ICI(0,1µM)** und **G-1(1µM)** konnten wir eine signifikant stärkere Reduktion der wachstumsfähigen MCF-7 Zellen auf maximal 26% der Lösungsmittelkontrolle an Tag 5 erzielen ($p < 0,01$ vs. ICI, SD 2). Auch auf T47-D erwies sich die antiproliferative Wirkung beider Substanzen signifikant stärker als ICI allein, hier lag die Anzahl vermehrungsfähiger Zellen bei 36% der Kontrolle ($p < 0,05$ vs. ICI, SD 5,7).



3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

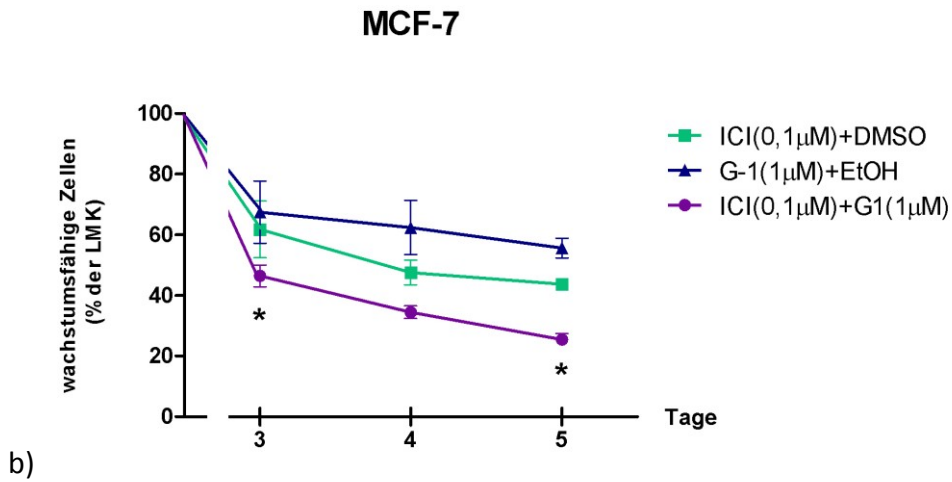


Abbildung 22: Dargestellt ist der Effekt einer Kombination aus ICI(0,1µM)+G-1(1µM) unter Standardkulturbedingungen in 10% FBS-haltigem Medium, verglichen mit ICI(0,1µM) allein. Angaben in % der LMK, dabei wurde die LMK als 100% definiert. * $p < 0,05$ vs. ICI (0,1µM); (n=3).

a) T-47D: 78% d. LMK (ns, SD 7,3) Tag (d)3; 49% d. LMK (ns, SD 4) d4; 36% ($p < 0,05$, SD 5,2) d5.

b) MCF-7: 47% d. LMK ($p < 0,05$, SD 3,6) d3; 34,5% d. LMK (ns, SD 2) d4; 25,5% ($p < 0,01$, SD 2) d5.

3.4.2 Effekte der kombinierten Behandlung auf die Genexpression

Es sollte nun untersucht werden, inwiefern sich der in der Zellkultur beobachtete additive Effekt des GPR-30 Agonisten G-1 auf die Wirkung des Antiöstrogens Tamoxifen molekular widerspiegelt.

Hierzu wurde die Expression verschiedener Gene auf Ebene der mRNA unter dem Einfluss der einzelnen Substanzen, sowie der Kombination untersucht. Zum einen waren dies **Cyclin D1**, **Cyclin A2** und **p21/WAF-1**, Gene, deren regulierender Einfluss auf den Zellzyklus bekannt ist, sowie das Onkogen **c-fos**. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss auf die Expression der Östrogenrezeptoren **ER α** und **ER β** untersucht werden.

Die auch zuvor verwendeten ER positiven Zelllinien MCF-7 und T47-D wurden hierfür mit Tam(5 μ M), G-1(1 μ M), sowie mit der Kombination aus beiden Substanzen für 24 Stunden behandelt und im Anschluss mittels real-time-RT-PCR der mRNA Gehalt der ausgewählten Gene untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse auch hier mit dem Expressionslevel in unbehandelten Zellen.

In beiden untersuchten Zelllinien zeigte sich die Expression des Zellzyklusregulators **Cyclin A2** sowohl nach Behandlung mit Tam, als auch nach Behandlung mit G-1 herabgesetzt. Eine signifikant stärkere Reduktion bewirkte jedoch die Kombination der beiden Substanzen, so war das mRNA Level in MCF-7 Zellen auf 40% der unbehandelten Kontrolle reduziert ($p < 0,02$ vs. Tam, SD 16,2), im Vergleich zu 66% unter Tam allein. Ein ähnliches Bild ergab sich bei T47-D Zellen, deren Cyclin A2-Expression nach Behandlung mit der Kombination auf 27% der unbehandelten Kontrolle reduziert war, ein signifikant niedrigerer Wert als nach alleiniger Tamoxifenbehandlung ($p < 0,03$ vs. Tam, SD 15).

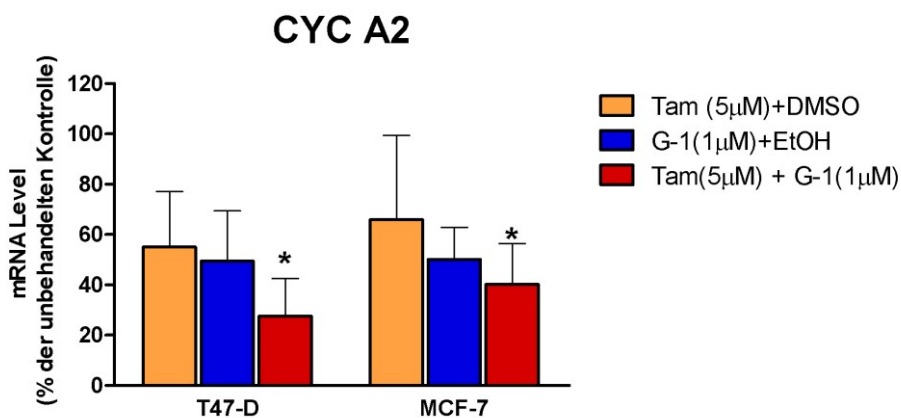


Abbildung 23: Dargestellt ist die Änderung der Expression von CycA2 nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Auch die Expression des **Cyclin D1** zeigte sich gegenüber der unbehandelten Kontrolle verändert. Während Tamoxifen alleine allenfalls eine geringe Veränderung des mRNA-Gehalts bewirkte (MCF-7: 81% der unbehandelten Kontrolle; T47-D: 95% der unbehandelten Kontrolle), zeigte sich nach kombinierter Behandlung mit dem GPR-30 Agonist eine signifikant stärkere Reduktion des mRNA Gehalts auf 42% der Kontrolle in MCF-7 ($p < 0,03$ vs. Tam, SD 23) und 60% in T47-D ($p < 0,04$ vs. Tam, SD 20). Interessanterweise schien G-1 allein die Expression des Cyclin nicht zu beeinflussen.

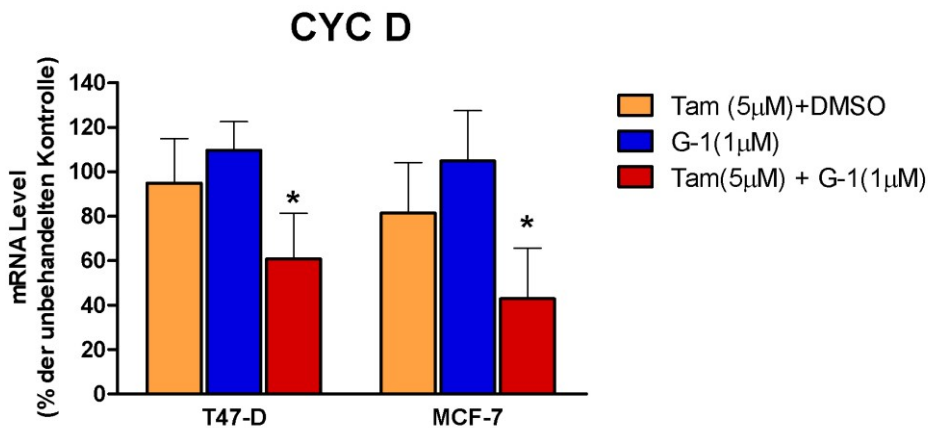


Abbildung 24: Dargestellt ist die Änderung der Expression von Cyc D nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Interessante Ergebnisse ergaben sich auch für das Onkogen **c-fos**. Die Behandlung mit Tam alleine führte in MCF-7 Zellen zu einer verminderten Expression von 74% der unbehandelten Kontrolle. Eine Zugabe von G-1 jedoch war in der Lage, den mRNA Gehalt noch weiter auf 36% der unbehandelten Kontrolle zu reduzieren ($p < 0,05$ vs. Tam, SD 11). Bei T47-D dagegen führte Tamoxifen zu keiner signifikanten Änderung der Expression bei im

Mittel 92% der Kontrolle. Die kombinierte Behandlung dagegen war in der Lage, das mRNA Level des Onkogens auf annähernd ein Drittel verglichen mit der unbehandelten Kontrolle zu reduzieren ($p < 0,03$ vs. Tam, SD 9).

G-1 allein bewirkte in beiden Zelllinien eine Verringerung der Transkription. In MCF-7 Zellen entsprach der Effekt dem der kombinierten Behandlung mit 34% der unbehandelten Kontrolle, in T47-D allerdings war der Effekt mit 55% der Kontrolle weniger ausgeprägt als nach kombinierter Behandlung.

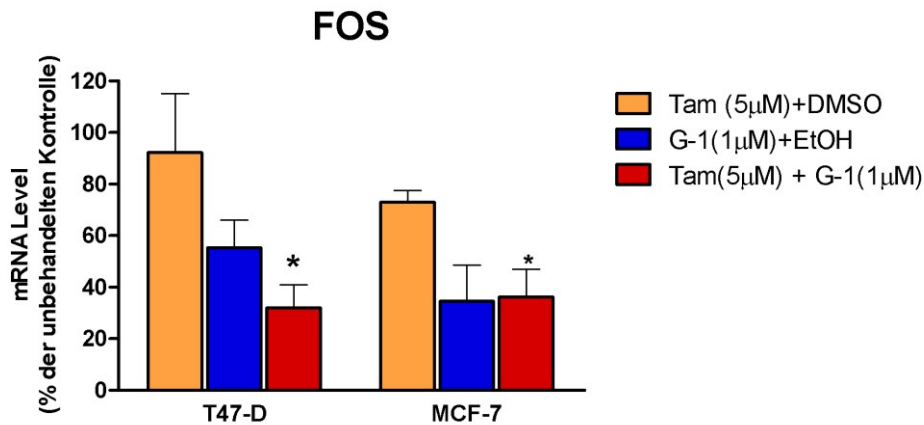


Abbildung 25: Dargestellt ist die Änderung der Expression von FOS nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Des Weiteren sollte die Expression des Zellzyklus Protein und potentiellen Tumorsuppressor **p21/WAF1** betrachtet werden.

Hier zeigte sich, dass beide Substanzen die Expression des Gens verstärken. So verdoppelte Tamoxifen den mRNA Gehalt in beiden Zelllinien etwa (MCF-7: 230% der Kontrolle; T47-D: 183% der Kontrolle), G-1 bewirkte in MCF-7 Zellen einen Anstieg auf 220%, in T47-D sogar

auf mehr als das Dreifache (357% der Kontrolle). Eine Kombination der beiden Substanzen ergab keinen zusätzlichen Effekt in MCF-7 Zellen, in T47-D Zellen jedoch stieg der mRNA Gehalt im Mittel auf mehr als das Sechsfache an (668% der unbehandelten Kontrolle, $p < 0,02$ vs. Tam, SD 360).

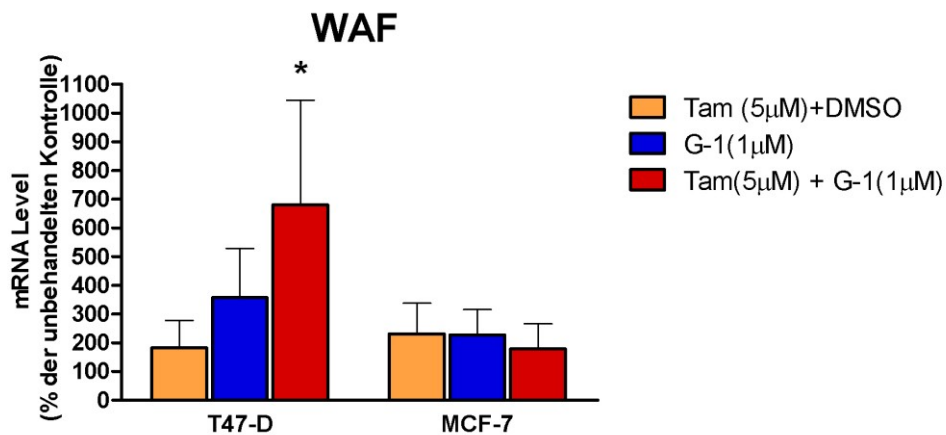


Abbildung 26: Dargestellt ist die Änderung der Expression von p21/waf nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Als Nächstes sollte die Auswirkung der Behandlung auf die Expression der Östrogen-Rezeptoren untersucht werden.

Bezüglich der **ER α** Expression wurde ein Primer verwendet, der einmal im Übergang von Exon 7 zu Exon 8 bindet und ein zweites Mal in Exon 8. Da in dieser Region keine Deletionen beschrieben sind, sollte der Primer alle ER α Varianten erfassen.

Tamoxifen bewirkte in T47-D Zellen eine Stimulation der ER α -Expression auf 137% der unbehandelten Kontrolle. Auch in MCF-7 Zellen ließ sich durch Tamoxifen ein leichter

Anstieg beobachten (120% der unbehandelten Kontrolle). Die Zugabe von G-1 zu Tamoxifen bewirkte in den Zelllinien einen unterschiedlichen Effekt. Während sich in T47-D Zellen keine weitere Änderung der ER α mRNA zeigte, kam es in MCF-7 Zellen zu einem deutlichen Abfall des mRNA Gehalts auf 44% der unbehandelten Kontrolle ($p < 0,04$ vs. Tam, SD 14).

Ebenso unterschiedlich wirkte sich G-1 allein aus. Während es in T47-D zu einem Anstieg der Expression auf 178% kam, fiel der mRNA-Gehalt in MCF-7 Zellen auf 65% der unbehandelten Kontrolle ab.

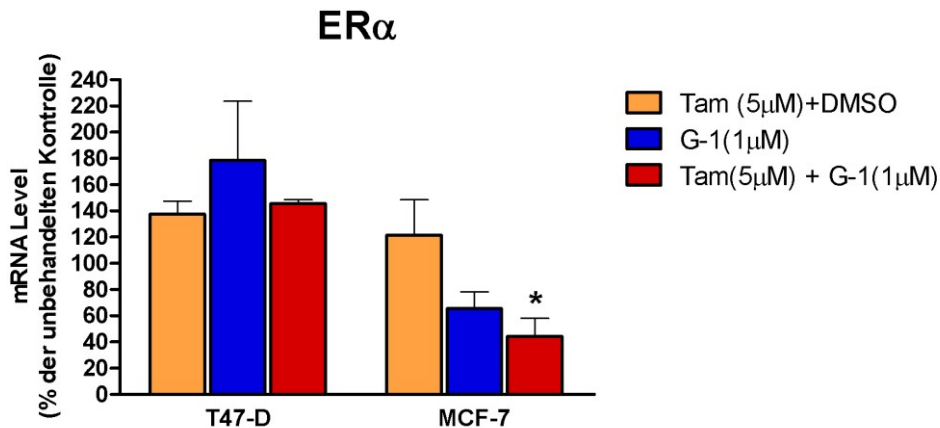


Abbildung 27: Dargestellt ist die Änderung der Expression von ER α nach Behandlung mit Tam(5 μ M), G-1(1 μ M) und Tam(5 μ M)+G-1(1 μ M) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Bezüglich der Expression des potentiellen Tumorsuppressors ER β wurden dessen Splicevarianten 1,2 und 5 untersucht.

Für die Splicevariante **ER β 1** ergaben sich gegensätzliche Ergebnisse.

In T47-D Zellen bewirkte die Kombination aus Tamoxifen und G-1 eine Reduktion der mRNA auf 25% der unbehandelten Kontrolle. Ein Effekt, der allerdings nicht signifikant stärker war als durch Tamoxifen alleine zu beobachten (40% der Kontrolle).

In MCF-7 Zellen dagegen hatte Tamoxifen scheinbar keinen Einfluss auf ER β 1 (91% der unbehandelten Kontrolle). Die Zugabe von G-1 zu Tamoxifen jedoch ließ den mRNA-Gehalt auf das Fünffache der unbehandelten Kontrolle ansteigen ($p < 0,04$ vs. Tam, SD 209).

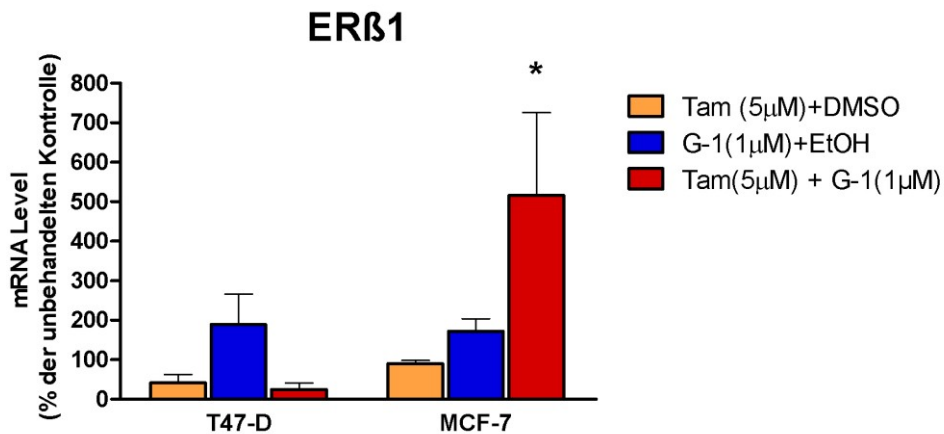


Abbildung 28: Dargestellt ist die Änderung der Expression von ER β 1 nach Behandlung mit Tam(5 μ M), G-1(1 μ M) und Tam(5 μ M)+G-1(1 μ M) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * $p < 0,05$ vs. Tam; (n=3).

Kein additiver Effekt ließ sich auf die Rezeptorvariante **ER β 2** erzielen. Tamoxifen übte in beiden Zelllinien nur einen geringfügigen Effekt auf die Expression dieser Isoform aus (MCF-7: 75% der Kontrolle, NS; T47-D: 88% der Kontrolle). Die Kombination der Substanzen verstärkte die Reduktion des mRNA Gehalts zwar in T47-D auf 49% (ns vs. Tam, SD 23) und in

MCF-7 auf 38% der unbehandelten Kontrolle (ns vs. Tam, SD 18), der Effekt blieb gegenüber Tamoxifen jedoch nicht signifikant.

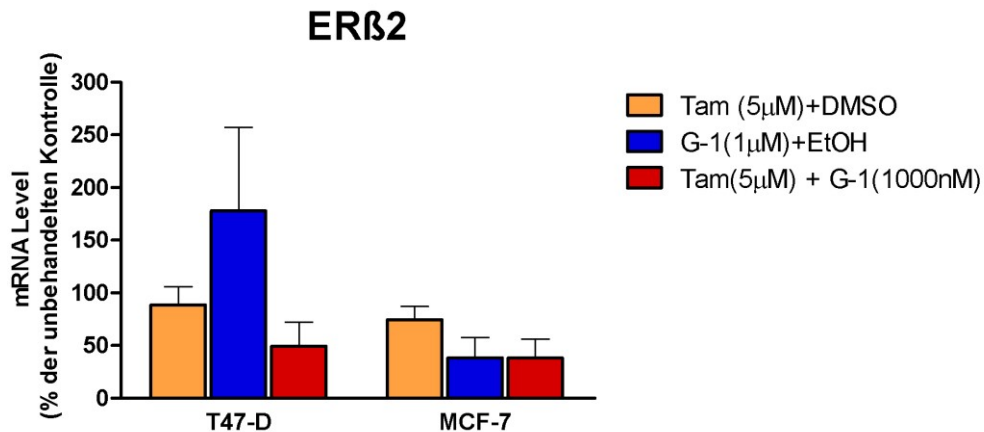


Abbildung 29: Dargestellt ist die Änderung der Expression von ERβ2 nach Behandlung mit Tam(5μM), G-1(1μM) und Tam(5μM)+G-1(1μM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * p<0,05 vs. Tam; (n=3).

Eine Auswirkung auf die Transkription der Splicevariante **ERβ5** fand sich vor allem in T47-D Zellen. Hier bewirkte Tamoxifen einen Anstieg der Expression auf 238% der unbehandelten Kontrolle. Die Kombination beider Substanzen allerdings vermochte den mRNA-Gehalt noch einmal verglichen mit Tamoxifen alleine zu steigern (336%, p<0,03 vs. Tam, SD 43). In MCF-7 Zellen dagegen schien Tamoxifen geringen Einfluss auf die Transkriptionsrate von ERβ5 zu haben (119% der Kontrolle) und auch die Kombination mit G-1 veränderte das mRNA Level nicht (104% der Kontrolle, ns vs. Tam, SD 31).

3.4 Kombinierte Behandlung mit G-1 und Antiöstrogenen

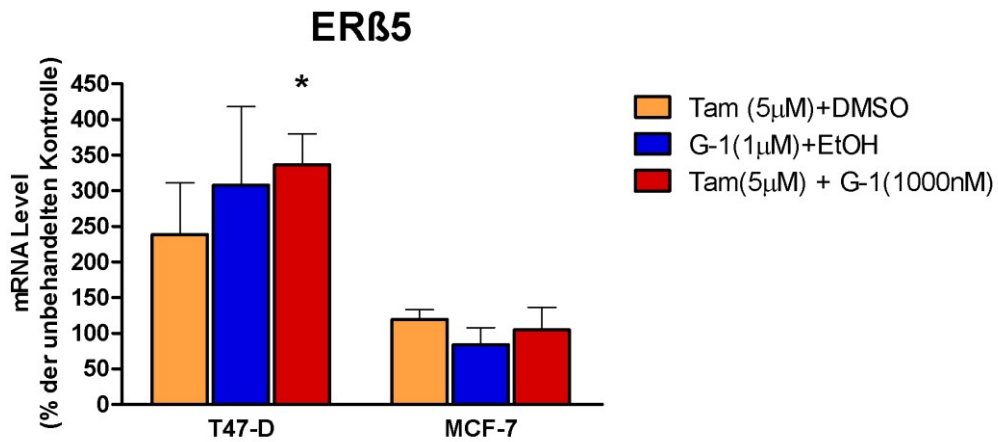


Abbildung 30: Dargestellt ist die Änderung der Expression von ERβ5 nach Behandlung mit Tam(5μM), G-1(1μM) und Tam(5μM)+G-1(1μM) auf Ebene der mRNA mittels real-time-RT-PCR. Alle Zellen wurden in 10% FBS-haltigem Medium unter Standardbedingungen kultiviert. Das Transkript Level wird dargestellt in % der unbehandelten Kontrolle, die als 100% definiert wird. * p<0,05 vs. Tam; (n=3).

4. Diskussion

4.1. GPR-30 Agonist G-1 – dosisabhängige antiproliferative Wirkung

GPR-30 wird in vielen endokrinen Geweben exprimiert und die Rolle des Rezeptors bei der Regulierung von Proliferation und Wachstum ist Gegenstand aktueller Diskussionen [66, 79, 94].

Zurzeit gibt es jedoch noch einige grundlegende Unklarheiten bezüglich der definitiven Funktion des Rezeptors. Diese beginnen bereits bei dessen Lokalisation. Während einige Arbeitsgruppen das Endoplasmatische Retikulum als den Hauptsitz des Rezeptors postulierten, gelang anderen Gruppen der Nachweis in der Plasmamembran der Zelle [68, 95-96].

Auch gibt es weiterhin Zweifel am spezifischen Liganden des ehemaligen „orphan receptors“, da einige Arbeitsgruppen keine sättigbare Bindung von Östradiol an GPR-30 nachweisen konnten und so die GPR-30 vermittelten Effekte als unabhängig von der Anwesenheit des Östrogens sehen [96-97].

Andere Gruppen jedoch konnten eine spezifische Bindung von Östradiol an GPR-30 demonstrieren, so dass mehrheitlich davon ausgegangen wird, dass es sich bei GPR-30 um einen weiteren Östrogenrezeptor handelt [66, 74, 76]. In der Nomenklatur ist GPR-30 daher auch bereits unter dem Namen GPER-1 (G-protein coupled estrogen receptor 1) zu finden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass G-1 in der Lage ist, das Wachstum verschiedener Mammakarzinomzelllinien zu hemmen. Dieser Effekt ist allerdings abhängig von der verwendeten Dosis der Substanz.

Mit der höchsten verwendeten Dosis G-1 (1 μ M) ließ sich in allen untersuchten Zelllinien eine ausgeprägte Hemmung des Wachstums induzieren, wohingegen 10nM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation in einem Zeitraum von 5 Tagen zeigten. Grundsätzlich ist von einer hoch selektiven Bindung von G-1 an GPR30 auszugehen, verglichen mit der Bindung an die klassischen ERs [77]. So konnten auch Bologna *et al.* mit G-1 Konzentrationen bis 10 μ M

keine wesentliche Bindung an ER α oder ER β nachweisen [77]. Um auszuschließen, dass Wechselwirkungen mit dem ER α -Signalweg hier ebenfalls eine Rolle spielen, wurden die Versuche zusätzlich in E2-freiem Medium durchgeführt. Hierbei konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden wie in E2-haltigem Medium, weswegen wir davon ausgehen konnten, dass es sich hier um einen GPR-30 getriggerten Effekt handelt, der primär unabhängig von den Signalwegen der klassischen Östrogenrezeptoren ist.

Das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien auf die verschiedenen Konzentrationen legt jedoch nahe, dass zusätzliche modulierende Einflüsse auf die zelluläre Antwort auf G-1 eine Rolle spielen. Hier muss letztlich das gesamte Rezeptorprofil der Zelle und das Zusammenspiel der einzelnen Rezeptoren bedacht werden. So sind beispielsweise die teils dominant negativen Effekte einiger ER β -Varianten auf die Transaktivierung von ER α zu bedenken [98-99]. Welche Rolle GPR-30 in diesem Zusammenspiel einnimmt muss noch weitgehend geklärt werden.

Teils stehen die Ergebnisse der Arbeit in Kontrast zu einigen bisherigen Arbeiten, die G-1 eine wachstumsfördernde Wirkung zuschreiben. So postuliert eine aktuelle Studie eine stimulierende Wirkung von G-1 auf das Wachstum ER α negativer SK-BR-3 Zellen. [84].

Allerdings konnten auch andere Arbeitsgruppen hemmende Einflüsse auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen, getriggert über GPR-30 und seinen Liganden G-1, feststellen. Ariazi und Kollegen beschrieben diesen Effekt allerdings vornehmlich für ER α positive MCF-7 Zellen [84].

Auch in anderen endokrinen Geweben konnten antiproliferative Effekte dem Membranrezeptor zugeschrieben werden, so z.B. in Urothelzellen [100] oder Prostatakrebszellen [101]. Erst kürzlich konnten Holm und Kollegen eine ausgeprägte Reduktion der Endothelproliferation durch G-1 zeigen [102].

Die Diskrepanz der bisherigen Studienlage lässt sich möglicherweise zumindest teilweise durch die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen erklären. So hatten alle Arbeitsgruppen, die einen antiproliferativen Effekt nachweisen konnten ähnlich hohe oder gar höhere Konzentrationen verwendet wie in der vorliegenden Arbeit. Während Bologna *et*

al. für die physiologische Calcium-Ausschüttung eine mittlere effektive Konzentration (EC50) von 2nM G-1 annahmen [77], postulierten Chan und Kollegen eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) auf das Wachstum von Prostatakarzinomzellen von $1,02 \times 10^{-6} \text{M}$ – $3,2 \times 10^{-6} \text{M}$ abhängig von der verwendeten Zelllinie [101].

Auch muss in Betracht gezogen werden, dass die verschiedenen Zelltypen unterschiedlich sensitiv für G-1 sind. Das wiederum legt nahe, dass hier verschiedene Wirkmechanismen, abhängig von Zelltyp eine Rolle spielen.

Sicherlich ist ebenfalls zu bedenken, dass über einen Rezeptor abweichende Reaktionen auf Stimulation ausgelöst werden können, je nachdem welche „Rahmenbedingungen“ für die Zelle herrschen. Konträre Ergebnisse könnten somit mitunter auch durch unterschiedliche Versuchsbedingungen und Zellvoraussetzungen bedingt sein.

Zudem stellt sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen der G-1 verursachten Wachstumshemmung. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Cell-Titer Blue® assay ist lediglich in der Lage, die Anzahl der metabolisch aktiven und somit lebensfähigen Zellen zu erfassen, eine Aussage über Apoptoserate oder Zytotoxizität ist hiermit nicht möglich.

Eine denkbare Option, die antiproliferative Wirkung zu erklären, ist über die kontinuierliche Induktion von Ca^{2+} im Zytosol, ein Effekt der GPR-30 getriggert auftritt [77].

Calcium in seiner Funktion als ubiquitär vorkommender second messenger ist in der Kontrolle einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. Auch ist schon lange bekannt, dass eine Überladung der Zelle mit Calcium hoch zytotoxisch wirkt [103-104]. Der daraufhin folgende Zelltod tritt entweder in Form einer Nekrose, also dem Verlust der Integrität der Zelle und deren Hydrolyse, oder im Rahmen des programmierten Zelltods, der Apoptose auf [104].

In einer aktuellen Studie wurde die antiproliferative Wirkung von G-1 auf Urothelzellen diesbezüglich genauer spezifiziert. Ten *et al.* kamen hier allerdings zu dem Schluss, dass die G-1 Wirkung nicht auf eine gesteigerte Apoptoserate zurückzuführen sei, da unter Behandlung mit G-1 keine erhöhte Caspase 3/7 Aktivität nachgewiesen werden konnte [100].

Ein entscheidender Mechanismus könnte auch die Aktivierung des ERK 1/2- Signalwegs sein, die GPR-30 zugeschrieben wird. Man nimmt an, dass die Signaldauer der ERK 1/2-Aktivierung über den weiteren Weg der Zelle entscheidet. Eine transiente Aktivierung führt zu einem Anstoßen der Proliferation, während eine kontinuierliche Aktivierung zu einer nuklearen Akkumulation von ERK1/2 und in Folge zur Übermittlung antiproliferativer Signale führt [105].

Einen interessanten Ansatzpunkt liefern Holm *et al.*, die durch G-1 eine ausgeprägte Hemmung der Mikrotubuli in Endothelzellen fanden. Auch hier wurde eine hohe Konzentration G-1 von bis zu 3µM verwendet. Da sich der Effekt in gleichem Maße auch in GPR-30 knock-out Zellen fand, wurde hier von einem Rezeptor unabhängigen Effekt ausgegangen [106].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir einen ausgeprägten und dosisabhängigen antiproliferativen Effekt von G-1 auf verschiedene Brustkrebszelllinien beobachten konnten. Die genauen, der Wachstumshemmung zugrunde liegenden Mechanismen, sowie der Einfluss diverser Rahmenbedingungen und der Unterschied zwischen den verschiedenen Zelltypen muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

4.2 Die Kombination G-1 und Trastuzumab

4.2.1 Additiver Effekt einer kombinierten Behandlung aus G-1 und Trastuzumab *in vitro*

Via GPR30 kommt es zu einer Freisetzung Membran gebundenen *epithelial growth factors* (EGF), welcher im Gegenzug an unbesetzte EGF-Rezeptoren bindet. Dies wiederum führt zur Aktivierung der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) ERK-1 und ERK-2 [72]. Unterbindet man die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors oder neutralisiert das Heparan gebundene EGF mittels Antikörpern, lässt sich die durch Östrogen induzierte ERK-1/-2 Aktivierung unterbinden. Dies legt nahe, dass dieser Östrogeneffekt über eine Transaktivierung der EGF-Rezeptoren funktioniert.

Interessanterweise erreicht das ERK-1/-2 Level normalerweise bereits kurz nach Östrogen induzierter Aktivierung wieder sein basales Niveau, was einen streng regulierten Mechanismus impliziert. Über eine Stimulation der Adenylatcyclase via GPR30 kommt es zu einer vermehrten cAMP Bildung. Es ist bekannt, dass cAMP unter bestimmten Voraussetzungen als Inhibitor des ERK-1/-2 Signalwegs fungieren kann [82]. Filardo und Kollegen postulierten deshalb einen Regulationskreislauf bestehend aus gegensätzlichen Signalen über den via GPR 30 ein Gleichgewicht des EGF-ERK1-1/-2 Signalwegs hergestellt wird [73, 107].

Liegt eine HER2 Überexpression vor, kommt es zu einer verstärkten und verlängerten Aktivierung des ERK-1/-2 Signalwegs [69, 108].

Inwiefern dieser Zusammenhang eine Rolle in der Tumorentstehung *in vivo* spielt muss anhand weiterer Studien geklärt werden.

Umgekehrt demonstrierten Vivacqua und Kollegen, dass die GPR30 Expression in ER α positiven Zelllinien über EGF hochreguliert wird [109]. Eine enge Verknüpfung zwischen GPR30 und den Signalwegen der Familie der Wachstumsfaktorrezeptoren liegt somit nahe.

Tatsächlich konnten Filardo und Kollegen darlegen, dass GPR30 positive Tumoren eine höhere HER2 Expression aufweisen [71, 73].

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob und wenn ja in welchem Ausmaß der GPR30 Agonist G-1 in der Lage sein würde, die antitumorale Wirkung des HER2neu-Rezeptor Antikörpers Trastuzumab auf die HER2neu überexprimierenden Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 zu beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich mit einer kombinierten Behandlung aus G-1 und Trastuzumab *in vitro* verglichen mit Trastuzumab allein eine signifikant stärkere wachstumshemmende Wirkung erzielen ließ. Die Interaktion der beiden Substanzen führte zu einem additiven, jedoch nicht synergistischen Effekt.

Falls sich die Ergebnisse auch im Tiermodell bestätigen, stellt das gezielte gemeinsame Angreifen beider targets – GPR30 und HER2neu - einen erfolversprechenden neuen therapeutischen Ansatzpunkt dar, der sich als Benefit für das bisher mit Herceptin behandelte Patientenkollektiv erweisen könnte.

4.2.2 Molekulare Mechanismen des additiven Effekts von G-1 und Trastuzumab

Im nächsten Teil der Arbeit ging es darum, etwas über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen herauszufinden. Hierfür untersuchten wir den Einfluss einer kombinierten Behandlung aus G-1 und TZ auf die Expression verschiedener Gene auf Ebene der mRNA.

Interessanterweise zeigte sich **Cyclin A2** in beiden Zelllinien signifikant vermindert unter kombinierter Behandlung verglichen mit Herceptin. Cyclin A2 besitzt die Aufgabe, die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK-2) zu binden und somit deren katalytische Komponente zu aktivieren. Durch diesen Prozess wird das Fortschreiten des Zellzyklus sowohl am Übergang von G-1 zu S, als auch von G-2 zu M gefördert [110].

Auch **Cyclin D1**, Regulator der CDK 4/6 Kinasen und somit Verantwortlich für den G-1/S Übergang [111], zeigte nach kombinierter G-1/TZ- Behandlung ein erniedrigtes mRNA Level in BT-474 Zellen. In SK-BR-3 Zellen konnten wir diesen Effekt jedoch nicht verzeichnen.

Der negative Einfluss von G-1 und TZ auf die Expression der für das Voranschreiten des Zellzyklus so wichtigen Cycline impliziert einen additiven Effekt der kombinierten Behandlung auf den Zellzyklusarrest. Unsere Beobachtungen gehen in diesem Punkt

konform mit einer aktuellen Studie, die eine verminderte Cyclin A2 Expression für den ausgeprägten antiproliferativen Effekt von G-1 auf Prostatakrebszellen mitverantwortlich macht [101]. Eine andere Arbeitsgruppe führte einen GPR-30 getriggerten wachstumshemmenden Effekt auf Urothelzellen auf eine Verminderung der Cyclin D1 Expression zurück [100].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus könnte die gesteigerte Expression von **p21/waf-1** darstellen. Diese konnten wir allerdings nur in SK-BR-3 Zellen beobachten.

P21/waf-1 ist ein sogenannter *Cyclin-dependent kinase inhibitor* (CKI), der direkt an die CyclinE/CDK2 und CyclinD/CDK4- Komplexe bindet und so deren Aktivität hemmt [112]. Damit ist p21 ein wichtiger Bestandteil was die Regulation des Zellzyklus am Übergang zur S-Phase angeht. P21 ist in der Lage, die Proliferation zu bremsen und gleichzeitig die Differenzierung der Zellen zu fördern und gilt somit als potentieller Tumorsuppressor [112]. Induziert wird p21/waf-1 primär via p53. Hier wiederum könnte der über GPR-30 vermittelte Calcium-Anstieg eine Rolle spielen, da bekannt ist, dass es über Calcium-vermittelte Signalwege zu einer p53 Induktion kommen kann [113].

Auch Ariazi und Kollegen sahen in dem p21-vermittelten Zellzyklusarrest eine Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete G-1 induzierte Wachstumshemmung in MCF-7 Zellen [84].

Unsere Beobachtungen, dass G-1 alleine die Transkription von **c-fos** nicht zu beeinflussen scheint, aber in der Lage war, den unerwarteten TZ getriggerten Anstieg der c-fos mRNA in beiden Zelllinien zu verhindern, ist ein weiterer interessanter Ansatzpunkt.

Dem Protoonkogen c-fos wird eine zentrale Rolle in der Regulation des normalen Zellwachstums und der Differenzierung zugesprochen. Außerdem ist c-fos ein bekanntes „early-response“ Gen, dessen Expression auf verschiedene Stimuli sehr schnell induziert wird. Die Proteine der Fos-Familie interagieren mit denen der Jun-Familie und bilden gemeinsam den heterodimeren *activating-protein 1* (AP-1) Komplex. Dieser gilt als Transkriptionsfaktor und bindet an entsprechende DNA-Abschnitte innerhalb der Promotor-Regionen verschiedener Gene und reguliert so deren Expression [114].

Bezüglich der Pathogenese von Tumoren der Brust wird c-fos eine wichtige Rolle zugeschrieben und als molekularer Marker für Proliferation diskutiert [115-117].

Die Tatsache allerdings, dass wir einen deutlichen Anstieg der c-fos Expression 6 und 24 Stunden nach Stimulation mit TZ beobachten konnten, steht in deutlichem Gegensatz zu vorangegangenen Studien. Hier wird eine verminderte Expression von c-fos nach Behandlung mit TZ beschrieben [93]. Eine zufriedenstellende Erklärung kann an dieser Stelle nicht geliefert werden, einzig mögliche Unterschiede in den Versuchsbedingungen z.B. die Benutzung verschiedener Zellklone könnten hier eine Rolle spielen.

Auch publizierten Maggiolini und Kollegen 2004, dass es via GPR-30 in ER-negativen SK-BR-3 Zellen zu einem Anstieg des c-fos Level kommt [75]. Ein Unterschied zur den vorliegenden Ergebnissen besteht allerdings darin, dass 1µM E2 zur Stimulation der Zellen verwendet wurde und nicht der GPR-30 Agonist G-1.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der hinter den additiven Effekten der beiden untersuchten Substanzen stehen könnte, ist eine gesteigerte Expression des potentiellen Tumorsuppressors **EGR-1**. So zeigte sich in BT-474 Zellen sowohl nach Stimulation mit TZ oder G-1 allein ein erhöhter mRNA Gehalt, die Kombination der beiden Substanzen bewirkte jedoch einen signifikant stärkeren Anstieg. EGR-1 gilt als ein sog. *early growth response* Gen und kodiert für ein nukleäres Zink-Finger-Protein, das an der Regulation der Transkription verschiedener Zielgene beteiligt ist. Diese wiederum beeinflussen die Differenzierung und Mitogenese der Zelle [118]. Eine verminderte Expression von EGR-1 ist assoziiert mit der Entstehung von Malignomen. Gar ein kompletter Verlust der Expression konnte in Tumoren der Brust beobachtet werden [119-120]. Umgekehrt führte die Überexpression in Brustkrebszellen zur Wiederherstellung normaler Proliferationsmuster [119].

Ein direkter Zusammenhang zwischen der HER2-Blockade und der EGR-1 Expression ist derzeit nicht beschrieben. Ronski und Kollegen konnten im untersuchten Kollektiv keine Korrelation zwischen einer HER2neu-Amplifikation und einer verminderten EGR-1 Expression finden [120]. Auch muss genauer geklärt werden, ob und wenn ja über welche Mechanismen GPR-30 die EGR-1 Expression zu beeinflussen vermag, da es hier bis dato keine ausreichende Datenlage gibt.

Unbeeinflusst scheint dagegen die Expression von HER2neu in beiden Zelllinien zu bleiben. Weder die Einzelsubstanzen, noch die Kombination vermochte hier eine Veränderung der Transkription zu bewirken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige interessante Ansatzpunkte gefunden werden konnten, die die signifikant stärkere Wirkung einer Kombination aus TZ mit hohen Dosen G-1 gegenüber der alleinigen Behandlung mit TZ erklären könnten. Um die genauen Zusammenhänge zu erfassen und die gefundenen Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien zu erklären bedarf es weiterführender Studien.

4.3 Die Kombination aus G-1 und Antiöstrogenen

4.3.1 Additiver Effekt einer kombinierten Behandlung aus G-1 und den Antiöstrogenen Tamoxifen und Fulvestrant *in vitro*

Filardo und Kollegen konnten zeigen, dass 43% aller untersuchten invasiven Tumoren der Brust eine Coexpression der klassischen Östrogenrezeptoren und GPR-30 aufweisen [71]. Interessant ist allerdings, dass sich auch bei der Hälfte aller ER negativen, und somit bisher immer für Östrogen unabhängig gehaltenen Tumoren, GPR-30 nachweisen lässt [71]. Somit könnte diesen Tumoren eine gewisse Empfindlichkeit für Östrogene erhalten bleiben, was sich *in vitro* mit ER-negativen Zelllinien bestätigt hat [68, 76].

Die Entdeckung der Östrogenrezeptoren bot den ersten Angriffspunkt für eine *targeted* Therapie von Tumoren der Brust. Tamoxifen ist hierbei das am häufigsten verwendete Antiöstrogen bei der Behandlung von Frauen mit Hormon sensitiven Tumoren und hat zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität von Brustkrebspatientinnen geführt [121]. Allerdings reagieren nicht alle Patientinnen auf eine endokrine Therapie (*de novo resistance*), und von denen die primär ein gutes Ansprechen zeigen, entwickelt ein Teil eine sekundäre Resistenz gegenüber Tamoxifen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sowohl Tamoxifen als auch der SERD Fulvestrant agonistische Eigenschaften an GPR-30 aufweisen. So postulierten Ignatov und Kollegen 2009, dass eine Langzeitbehandlung mit Tamoxifen zu einer E2-vermittelten Hochregulation von GPR-30 führt. Die Überexpression wiederum führe dazu, dass Tamoxifen aufgrund seiner agonistischen Eigenschaften an diesem Rezeptor letztlich die Proliferation fördere [122].

Darüber hinaus wird vermutet, dass eine Resistenz gegenüber Tamoxifen unter anderem mit einer Überexpression von EGFR und Her2neu assoziiert ist [123]. Wie bereits erwähnt ist GPR-30 beteiligt an einer Freisetzung von EGF und konsekutiv einer Aktivierung des ERK-1/-2 Signalwegs. Also scheint es denkbar, dass ein *crossstalk* zwischen Östrogen- und Wachstumsfaktorsignalwegen über GPR-30 ein wichtiger Mechanismus für den Langzeiterfolg einer antiöstrogenen Therapie sein könnte [124].

All dies legt nahe, dass ein gezieltes Angreifen beider Strukturen einen möglichen neuen Ansatzpunkt darstellt. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass G-1 in der Lage ist, die antiöstrogene Wirkung von Tamoxifen und auch des SERD Fulvestrant signifikant zu verstärken. Allerdings gelang dieser Effekt nur mit einer hohen Dosis G-1 von 1 μ M.

Auch hier scheint die Konzentration des GPR-30 Agonisten also eine entscheidende Rolle zu spielen.

Die Ergebnisse stehen im Kontrast zu der bereits erwähnten Studie von Ignatov und Kollegen, die durch Langzeitbehandlung mit G-1 den antiproliferativen Effekt von Tamoxifen deutlich reduzieren konnten. Allerdings wurden hier MCF-7 Zellen zunächst mit lediglich 1nM G-1 für einen Zeitraum von sechs Monaten behandelt und anschließend die Wirkung von Tamoxifen untersucht [122].

Als ein zusätzlicher Nebeneffekt der kombinierten Behandlung erwies sich außerdem die Tatsache, dass es durch die Zugabe von G-1 möglich war, die Dosis von Tamoxifen zu reduzieren um den gleichen oder sogar einen stärkeren Effekt zu erzielen wie mit der höheren Dosis Tamoxifen. Bedenkt man, dass auch die Nebenwirkungen von Tamoxifen abhängig von der verabreichten Dosis sind [125-126], könnte die Möglichkeit durch den additiven Effekt der zwei Substanzen mit einer geringeren Dosis die Toxizität zu reduzieren und dabei die gleiche gewünschte Wirkung zu erzielen ein interessanter Aspekt sein.

Falls sich die Ergebnisse im Tiermodell bestätigen, stellt ein simultanes Angreifen der klassischen Östrogenrezeptoren und GPR-30 einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar. Auch auf das Langzeitoutcome einer antiöstrogenen Therapie könnten sich so positive Auswirkungen ergeben.

4.3.2 Molekulare Mechanismen des additiven Effekts von G-1 und Tamoxifen

Um etwas über die zugrunde liegenden Mechanismen der additiven Wirkung beider Substanzen in der Zellkultur herauszufinden, sollte in einem nächsten Schritt der Einfluss der kombinierten Behandlung auf verschiedene Gene auf Ebene der mRNA untersucht werden.

Auch hier zeigten sowohl **Cyclin A2**, als auch **Cyclin D1** in beiden Zelllinien ein signifikant niedrigeres mRNA Level nach Behandlung mit Tamoxifen plus G-1 als unter Tamoxifen allein. Es ist bekannt, dass die Aktivität der ER nicht nur über Bindung des Liganden reguliert wird, sondern auch Hormon unabhängig durch Phosphorylierung moduliert werden kann. So kann die Aktivität des Östrogenrezeptor α mittels Phosphorylierung von Serinresten an der AF-1 Domäne des Rezeptors durch den CyclinA-cdk-Komplex erhöht werden [127]. Interessanterweise ist Tamoxifen nicht in der Lage AF-1 zu hemmen, weswegen die Transaktivierung über den CyclinA-cdk-Komplex Bedeutung für das Ansprechen der antiöstrogenen Therapie haben könnte. Tatsächlich konnte eine erhöhte CycA-Expression mit einem schlechteren Outcome unter Tamoxifen Therapie assoziiert werden [128].

Eine zusätzliche Hemmung der CycA Expression unter kombinierter Behandlung mit Tamoxifen und G-1 könnte also einen wichtigen Mechanismus der verstärkten antiproliferativen Wirkung darstellen.

Auch Cyclin D kommt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellzyklus durch Östrogene bzw. Antiöstrogene zu. So konnte man zeigen, dass der Cyclin D Gehalt unter antiöstrogener Therapie abnimmt [129-130]. Auch wird durch Antiöstrogene eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Retinoblastom Proteins (pRB) verhindert [129]. RB stoppt den Zellzyklusprogress von G1 zu S und ist das wichtigste Substrat des CyclinD-cdk-Komplexes, der es über eine Phosphorylierung hemmt.

Zur Annahme, dass die Verstärkung des Zellzyklusarrests ein entscheidender Mechanismus hinter dem beobachteten additiven Effekt ist, passt auch die signifikant höhere Expression von **p21/waf** unter kombinierter Behandlung, verglichen mit Tamoxifen allein. Der Anstieg der Expression des Cdk-Inhibitors p21/waf ist ein bekannter Effekt unter antiöstrogener Behandlung [43]. Wie erwartet, führte Tamoxifen in beiden Zelllinien bereits etwa zu einer Verdoppelung des mRNA Gehalts. Auch G-1 alleine vermochte in beiden Zelllinien die Expression von p21 signifikant zu steigern. Dies geht konform mit der Annahme von Ariazi und Kollegen, die dem p21-vermittelten Zellzyklusarrest eine entscheidende Rolle bei der G-1-induzierten Wachstumshemmung in MCF-7 Zellen zuschrieben [84].

In T47-D Zellen ließ sich die Expression des Tumorsuppressors nach kombinierter Behandlung mit beiden Substanzen sogar auf das Sechsfache verglichen mit der unbehandelten Kontrolle steigern.

Auf MCF-7 Zellen zeigten zwar beide Substanzen einzeln betrachtet einen Effekt hinsichtlich der p21 Expression, die Kombination vermochte in diesem Falle jedoch keinen signifikant stärkeren Effekt zu erzielen. Wie es zu diesem Unterschied zwischen den beiden Zelllinien kommt, lässt sich an dieser Stelle nicht ausreichend klären und bedarf weiterer Untersuchungen.

Interessante Ergebnisse ergaben sich auch für das Onkogen *c-fos*. Als Bestandteil des AP-1 Komplexes ist es in der Lage, Signalkaskaden anzustoßen, deren Endpunkte entscheidenden Einfluss haben auf Wachstum, Überleben oder Apoptose der Zelle [43, 114]. So vermag auch der Tamoxifen-ER-Komplex an AP-1 zu binden und je nach Gewebetyp und dem Einfluss diverser Coregulatoren an den AP-1 gesteuerten Promotor-Regionen agonistisch oder antagonistisch zu wirken [131]. In ER-positiven MCF-7 Zellen konnte eine verstärkte AP-1 Aktivität assoziiert werden mit einer verminderten Wirkung von Antiöstrogenen, und auch *in vivo* gibt es Anzeichen, dass eine erhöhte *c-fos* Expression mit einem schlechteren Ansprechen auf endokrine Therapie einhergeht und einen potentiellen Marker für eine schlechtere Prognose darstellt [132-133]. Tatsächlich konnten Zhou und Kollegen umgekehrt mit einer Hemmung der AP-1 Aktivität das Ansprechen von zuvor nicht Tamoxifen sensitiven Zellen wieder erhöhen [134].

In unseren Ergebnissen vermochte 1µM G-1 die Expression von *c-fos* in beiden Zelllinien deutlich zu reduzieren. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, stehen unsere Ergebnisse hier in Kontrast zu Daten von Maggiolini *et al.*, die eine GPR-30 induzierte Steigerung der *c-fos* Expression in ER negativen Zellen postulierten. Allerdings wurde hier nicht G-1, sondern 1µM E2 verwendet [75].

In beiden Zelllinien ließ sich das mRNA Level durch die Kombination der zwei Substanzen im Vergleich mit Tamoxifen allein signifikant stärker senken.

Eine Reduktion der *fos* Expression und damit der AP-1 Aktivität könnte somit ein wichtiger Mechanismus hinter der additiven Wirkung der beiden Substanzen *in vitro* sein.

Eine weitere Frage war außerdem, ob die kombinierte Behandlung Auswirkungen auf die Expression der nukleären Östrogenrezeptoren haben würde.

Die Expression von **ER α** und die darüber vermittelte wachstumsfördernde Wirkung von Östrogenen stehen in engem Zusammenhang mit der Entwicklung von Malignomen der Brust. So ist die Überexpression von ER α oft ein initialer Schritt in der Tumorgenese [135]. ER α -knockout Mäuse dagegen zeigten sich resistenter gegenüber der Entwicklung von malignen Transformationen nach Transfektion mit verschiedenen Onkogenen [136]. Andererseits bietet das Vorhandensein der Östrogenrezeptoren einen der wichtigsten Angriffspunkte in der Therapie des Mammakarzinoms.

G-1 und Tamoxifen vermochten zusammen in MCF-7 Zellen die Expression von ER α um mehr als die Hälfte zu reduzieren. Ein Effekt, der primär durch G-1 vermittelt zu sein scheint, da Tamoxifen alleine die Expression nur wenig beeinflussen konnte. Auch hier zeigt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den untersuchten Zelllinien. Warum die ER α Expression in T47-D Zellen unbeeinflusst blieb, kann an dieser Stelle nicht ausreichend geklärt werden. Insgesamt ist in einer verminderten ER α Expression, und damit verbunden einem reduziertem Östrogen-abhängigem Zellwachstum ein möglicher interessanter Ansatzpunkt zu sehen.

Bezüglich ER β sollte zum einen die Wildtyp-Variante **ER β -1**, als auch die Splicevarianten **ER β -2** und **ER β -5** betrachtet werden.

Die Rolle von ER β im Rahmen der Tumorentstehung ist komplex und nach wie vor Gegenstand aktueller Diskussionen. Im Gegensatz zu ER α nimmt seine Expression im Laufe der Tumorigenese ab, was eine Funktion als Tumorsuppressor vermuten lässt [137-138]. Dieses Konzept wird durch die Tatsache unterstützt, dass eine Überexpression von ER β in diversen Brustkrebszelllinien zu einer verminderten Proliferation und erhöhten Apoptoseraten führt [139].

Bezüglich der Wildtyp-Variante **ER β -1** ergaben sich deutlich Unterschiede zwischen den untersuchten Zelllinien. Während in T47-D nach Zugabe von G-1 die Tamoxifen-vermittelte Abnahme der Expression noch leicht verstärkt wurde, führte die kombinierte Behandlung in MCF-7 Zellen zu einem ausgeprägten Anstieg des mRNA-Gehalts. In MCF-7 Zellen ist die Expression von ER α verglichen mit ER β sehr hoch, eine niedrigere ER α /ER β Ratio könnte somit mitverantwortlich für eine reduzierte Zellproliferation sein. Zudem konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass eine erhöhte ER β -Expression in MCF-7 Zellen via Hemmung der PI3K/Akt-Kaskade zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Tamoxifen führt [140].

ER β -2 und **ER β -5** kodieren beide für ein alternatives Exon 8 und weisen eine Abweichung in der AF2-Domäne auf. Dies verändert gegenüber der Wildtypvariante ihre Fähigkeit, Liganden zu binden und Co-Faktoren zu rekrutieren [141].

ER β -2 zeigte in beiden Zelllinien unter Tamoxifen eine reduzierte Expression. Der Effekt ließ sich durch Zugabe von G-1 zu Tamoxifen allerdings nicht signifikant steigern. Die Expression der Isoform ER β -5 zeigte sich in MCF-7 Zellen unbeeinflusst von den Einzelsubstanzen und der kombinierten Therapie, in T47-D Zellen dagegen bewirkte Tamoxifen bereits eine Verdopplung des ER β -5 mRNA-Gehalts, zusammen mit G-1 ließ sich sogar mehr als eine Verdreifachung erzielen.

Die Rolle der einzelnen Isoformen ist nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen. Bei ER β -2 geht man davon aus, dass er in der Lage ist Heterodimere mit ER α zu bilden, was zu einem dominant negativen Effekt auf dessen Funktionen führt [99]. Ähnliche Effekte konnten auch für ER β 5 verzeichnet werden [99].

Letztlich ist die Studienlage über die Bedeutung von ER β für die Wirksamkeit endokriner Therapien noch unklar und es wurden widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Die Anwesenheit der Isoformen 2 und 5 konnte mit einem gesteigerten Gesamtüberleben korreliert werden [142]. Andererseits wurde auch ein schlechteres Ansprechen auf endokrine Therapie bei höherer ER β Expression postuliert [143].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Tamoxifen allein, als auch in Kombination mit dem GPR-30 Agonisten Einfluss auf die Transkription des ER β -Wildtyps und seiner Isoformen ER β -2 und -5 zu haben scheint. Die Effekte unterscheiden sich allerdings in den verwendeten Zelllinien, was auf zusätzliche Einflussfaktoren hindeutet. Nach heutigem Kenntnisstand ist auf jeden Fall davon auszugehen, dass das Zusammenspiel der ER β -Varianten und ihre Coexpression mit ER α Einfluss auf die Proliferation des Tumors, das Ansprechen auf Antiöstrogene und somit letztlich auch auf Prognose und Überleben hat.

Insgesamt konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass G-1 allein und im Zusammenspiel mit Tamoxifen auch die Expression der Östrogenrezeptoren beeinflusst. Die beobachteten Effekte unterschieden sich jedoch in den untersuchten Zelllinien, weswegen davon ausgegangen werden muss, dass hier das zugrunde liegende molekulare Profil eine Rolle spielt. Weiterführenden Studien müssen hier Klärung schaffen. Es scheint jedoch, dass gewisse Subtypen von Tumoren positiv von einer Verschiebung des Östrogenrezeptorgleichgewichts zugunsten von ER β profitieren könnten.

5. Zusammenfassung

Das Gen für GPR-30 auf Chromosom 7p22 kodiert für einen klassischen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der in einer Vielzahl von endokrinen Geweben, so auch der Brustdrüse, exprimiert wird. Der ehemals „orphan“ Rezeptor wird inzwischen mehrheitlich als ein weiterer Östrogenrezeptor angesehen. Seine exakte physiologische Funktion, ebenso wie seine Bedeutung im Rahmen der Tumorentstehung, sind derzeit jedoch noch weitgehend unklar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen des selektiven GPR-30 Agonisten G-1 von 1 μ M das Proliferationsverhalten aller untersuchten Zelllinien nachhaltig hemmte. Der Effekt war primär unabhängig vom ER α - oder HER2-Status der Zellen. Auch änderte sich durch die Durchführung der Stimulationsversuche in Medium mit 10% Serum nichts am antiproliferativen Effekt von G-1 gegenüber der Durchführung in serumfreiem Medium.

Geringere Konzentrationen von 100nM G-1 bewirkten allerdings nur in der ER α -negativen, HER2 positiven Zelllinie SK-BR-3 einen wachstumshemmenden Effekt. Ein möglicher modulierender Einfluss von ER α könnte somit eine Rolle spielen.

Die Arbeit konnte zudem zeigen, dass G-1 ein potentieller Kandidat für eine kombinierte Therapie mit bereits etablierten Substanzen ist. Sowohl zusammen mit dem HER2-Antikörper Trastuzumab, als auch mit dem SERM Tamoxifen und dem SERD Fulvestrant ließ sich ein additiver Effekt erzielen. Auch hier zeigte sich die gleiche Abhängigkeit von der verwendeten Dosis G-1. Die Kombinationen mit 1 μ M G-1 waren in allen untersuchten Zelllinien der jeweiligen Einzelsubstanz überlegen. Eine Kombination mit 100nM G-1 und Trastuzumab hatte erneut nur auf die ER α negative Zelllinie SK-BR-3 einen signifikant stärkeren Effekt als TZ alleine.

Weiterhin war es möglich, durch die Zugabe von G-1 die Dosis von Tamoxifen um das Fünffache zu reduzieren, um einen vergleichbaren wachstumshemmenden Effekt zu

erzielen. Dies ist im Hinblick auf das dosisabhängige Auftreten von Nebenwirkungen durch Tamoxifen ein interessanter Aspekt.

Auf Ebene der mRNA scheint vor allem ein verstärkter Zellzyklusarrest durch die Kombinationen aus G-1 mit Trastuzumab, bzw. Tamoxifen eine entscheidende Rolle zu spielen. So zeigte sich in allen untersuchten Zelllinien eine verminderte **Cyclin A2** Expression, **Cyclin D1** fand sich in allen Zelllinien bis auf SK-BR-3 deutlich reduziert. SK-BR-3 dagegen zeigten ebenso wie T47-D Zellen einen signifikanten Anstieg des Zellzyklusregulators und potentiellen Tumorsuppressors **p21/waf**.

Ein Rolle scheint auch der Transkriptionsfaktor **EGR-1** zu spielen, dessen Expression in BT-474 Zellen unter kombinierter Behandlung deutlich zunahm.

Auch das Onkogen **c-fos**, dem bereits eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Tumoren der Brust zugeschrieben wird, scheint hier ein wichtiger Angriffspunkt für die verstärkte antiproliferative Wirkung der Kombinationen mit G-1 *in vitro* zu sein. So war die Kombination mit 1µM G-1 und Trastuzumab in der Lage, den unerwarteten Anstieg von c-fos durch Trastuzumab allein zu verhindern und das mRNA Level sogar deutlich zu reduzieren. Auch die Kombination aus 1µM G-1 und Tamoxifen bewirkte eine deutlich verminderte c-fos Expression.

Interessanterweise scheint auch die Expression der nukleären **Östrogenrezeptoren** durch die gemeinsame Behandlung mit Tam und G-1 beeinflusst zu werden. In MCF-7 Zellen zeigte sich ein verminderter Gehalt an **ERα** mRNA und zugleich eine verstärkte Expression von **ERβ1**. Inwiefern hier eine Reduktion der ERα Expression bzw. Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten ERβ eine Rolle spielen könnte, muss anhand weiterer Studien geklärt werden.

Insgesamt könnte GPR30 somit ein vielversprechender neuer Angriffspunkt für eine *targeted* Therapie werden, und sowohl Frauen mit HER2-überexprimierenden Tumoren, als auch mit ER-positiven Tumoren einen Benefit bringen. Ebenso wäre denkbar, dass ein zusätzliches Angreifen von GPR30 im Setting des Tamoxifen-resistenten Tumors eine Rolle spielen könnte.

Somit erscheint es lohnenswert, die Ergebnisse dieser Arbeit auf ihre Bedeutung *in vivo* zu prüfen und weiter auszubauen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Steroidhormonrezeptoren ER α und ER β [33].	6
Abbildung 2: Chemische Strukturformel des GPR-30 Agonisten G-1; 1-(4-(6-Bromobenzo[1,3ioxol-5-yl]-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopentaquinolin-8-yl)-ethanone. Aus:[77]	13
Abbildung 3: Expression der Östrogenrezeptoren auf Ebene der mRNA in MDA-MB-231, BT-474, SK-BR-3, MCF-7 und T47-D. In DMEM/F12+10%FBS. Real-time-RT-PCR. % von β -actin.	35
Abbildung 4: Expression von GPR-30 auf Ebene der mRNA in MDA-MB-231, BT-474, SK-BR-3, MCF-7 und T47-D. In DMEM/F12+10%FBS. Real-time-RT-PCR. % von β -actin.	36
Abbildung 5: Expression von HER2-neu auf Ebene der mRNA in BT-474, SK-BR-3 und MDA-MB-231 Zellen. In DMEM/F12+10%FBS. Real-time-RT-PCR. % von β -actin.	37
Abbildung 6: Wirkung des GPR-30 Agonisten G-1 in den Konzentrationen 10nM, 100nM und 1000nM auf die untersuchten Zelllinien. DMEM/F12+10% FBS. Wachstum in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittelkontrolle. CTB-Assay	40
Abbildung 7: Wirkung von Trastuzumab (10 μ g/ml) auf die HER2-überexprimierenden Zelllinien BT-474 und SK-BR-3, sowie auf die HER2-negative Zelllinie MDA-MB231. DMEM/F12+10% FBS. Anzahl proliferationsfähiger Zellen in Prozent der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100 %). * $p < 0,05$ vs. Lösungsmittelkontrolle. CTB-Assay	42
Abbildung 8: Effekt einer Kombination aus TZ(10 μ g/ml) + G-1(100nM) auf BT-474, SK-BR-3 und MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angabe in % der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ bezogen auf den Effekt von TZ(10 μ g/ml). † $p < 0,05$ bezogen auf den Effekt von G1(100nM). CTB-Assay	44
Abbildung 9: Effekt einer Kombination aus TZ(10 μ g/ml) + G-1(1 μ M) auf BT-474, SK-BR-3, MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angabe in % der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ bezogen auf den Effekt von TZ(10 μ g/ml). † $p < 0,05$ bezogen auf den Effekt von G1(1 μ M). CTB-Assay.	46
Abbildung 10: Expression von Cyclin A nach 24-h Behandlung mit TZ(10 μ g/ml), G-1(1 μ M) und TZ(10 μ g/ml)+G-1(1 μ M) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ. Real-time-RT-PCR.	48
Abbildung 11: Expression von Cyclin D nach 24-h Behandlung mit TZ(10 μ g/ml), G-1(1 μ M) und TZ(10 μ g/ml)+G-1(1 μ M) auf Ebene der mRNA. mittels real-time-RT-PCR. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ. Real-time-RT-PCR.	49

Abbildung 12: Expression von p21/Waf nach 24-h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * p<0,05 vs. TZ.Real-time-RT-PCR.	50
Abbildung 13: Expression von EGR-1 nach 24-h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * p<0,05 vs. TZ.Real-time-RT-PCR.	51
Abbildung 14: Expression von Fos nach Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * p<0,05 vs. TZ.Real-time-RT-PCR.	52
a) mRNA Gehalt nach 24 Stunden	52
b) mRNA Gehalt nach 6 Stunden	52
Abbildung 15: Expression von HER2neu nach 24-h Behandlung mit TZ(10µg/ml), G-1(1µM) und TZ(10µg/ml)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * p<0,05 vs. TZ.Real-time-RT-PCR.	53
Abbildung 16: Wirkung von Tamoxifen (0,2µM; 1µM; 5µM) auf die ER positiven Zelllinien MCF-7 und T47-D, sowie auf die ER negative Zelllinie MDA-MB231. DMEM/F12+10% FBS. Anzahl proliferationsfähiger Zellen in Prozent der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). *p<0,05 vs. LMK. CTB-Assay.	55
Abbildung 17: Effekt des reinen Antiöstrogens ICI (0,1µM) auf die Zelllinien T-47D und MCF-7. DMEM/F12+10% FBS. Angaben in % der Lösungsmittelkontrolle (definiert als 100%). *p<0,05 vs. LMK. CTB-Assay.	56
Abbildung 18: Effekt einer Kombination aus Tam(0,2µM)+G-1(1µM) auf die Zelllinien MCF-7, T47-D und MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angaben in % der LMK (definiert als 100%). *p<0,05 vs. Tamoxifen(0,2µM). MDA-MB-231 †p<0,05 vs. G-1. CTB-Assay.	58
Abbildung 19: Effekt einer Kombination aus Tam(1µM)+G-1(1µM) auf die Zelllinien MCF-7, T47-D und MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angaben in % der LMK (definiert als 100%). *p<0,05 vs. Tamoxifen(1µM). MDA-MB-231 †p<0,05 vs. G-1. CTB-Assay.	60
Abbildung 20: Effekt einer Kombination aus Tam(5µM)+G-1(1µM) auf die Zelllinien MCF-7, T47-D und MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angaben in % der LMK (definiert als 100%). *p<0,05 vs. Tamoxifen(0,2µM). MDA-MB-231 †p<0,05 vs. G-1. CTB-Assay.	61

- Abbildung 21:** Effekt einer Zugabe von 100nM und 1µM G-1 zu Tamoxifen, im Vergleich mit einer höheren Dosierung Tamoxifen allein. DEMEM/F12 +10% FBS. Angaben in % der LMK (definiert als 100%), * $p < 0,05$ vs. Tamoxifen allein. CTB-Assay. 62
- Abbildung 22:** Effekt einer Kombination aus ICI(0,1µM)+G-1(1µM) auf die Zelllinien MCF-7, T47-D und MDA-MB-231. DMEM/F12+10% FBS. Angaben in % der LMK (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. ICI. MDA-MB-231 † $p < 0,05$ vs. G-1. CTB-Assay. 64
- Abbildung 23:** Expression von CycA2 nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 66
- Abbildung 24:** Expression von Cyc D nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 67
- Abbildung 25:** Expression von FOS nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 68
- Abbildung 26:** Expression von p21/waf nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 69
- Abbildung 27:** Expression von ERα nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 70
- Abbildung 28:** Expression von ERβ1 nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 71
- Abbildung 29:** Expression von ERβ2 nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 72
- Abbildung 30:** Expression von ERβ5 nach Behandlung mit Tam(5µM), G-1(1µM) und Tam(5µM)+G-1(1µM) auf Ebene der mRNA. DMEM/F12+10%. % der unbehandelten Kontrolle (definiert als 100%). * $p < 0,05$ vs. TZ.Real-time-RT-PCR. 73

7.Literaturverzeichnis

1. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., K., *Bericht 2010*. 2010.
2. Beckmann, M.W., et al., *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. J Mol Med (Berl), 1997. **75**(6): p. 429-39.
3. Johnson, K.C., et al., *Active smoking and secondhand smoke increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk (2009)*. Tob Control, 2011. **20**(1): p. e2.
4. Balmain, A., J. Gray, and B. Ponder, *The genetics and genomics of cancer*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 238-44.
5. Lengauer, C., K.W. Kinzler, and B. Vogelstein, *Genetic instabilities in human cancers*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 643-9.
6. Lerebours, F. and R. Lidereau, *Molecular alterations in sporadic breast cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **44**(2): p. 121-41.
7. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications*. Oncologist, 2004. **9**(4): p. 361-77.
8. Rody, A., et al., *Differentially expressed genes of reprogrammed human pluripotent stem cells in breast cancer*. Eur J Cancer, 2008. **44**(13): p. 1789-92.
9. Lindeman, G.J. and J.E. Visvader, *Insights into the cell of origin in breast cancer and breast cancer stem cells*. Asia Pac J Clin Oncol, 2010. **6**(2): p. 89-97.
10. Oliveira, L.R., S.S. Jeffrey, and A. Ribeiro-Silva, *Stem cells in human breast cancer*. Histol Histopathol, 2010. **25**(3): p. 371-85.
11. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
12. Bertos, N.R. and M. Park, *Breast cancer - one term, many entities?* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3789-96.
13. Klijn, J.G., et al., *The prognostic value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer: results of a 10 year follow-up study*. Breast Cancer Res Treat, 1994. **29**(1): p. 73-83.
14. Reis-Filho, J.S. and L. Pusztai, *Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction*. Lancet, 2011. **378**(9805): p. 1812-23.
15. Wesolowski, R. and B. Ramaswamy, *Gene expression profiling: changing face of breast cancer classification and management*. Gene Expr, 2011. **15**(3): p. 105-15.
16. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
17. Galanina, N., V. Bossuyt, and L.N. Harris, *Molecular predictors of response to therapy for breast cancer*. Cancer J, 2011. **17**(2): p. 96-103.
18. Werner, H. and I. Bruchim, *The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene*. Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(2): p. 58-71.
19. Rody, A., et al., *T-cell metagene predicts a favorable prognosis in estrogen receptor-negative and HER2-positive breast cancers*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(2): p. R15.

20. Alvarez, R.H., V. Valero, and G.N. Hortobagyi, *Emerging targeted therapies for breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(20): p. 3366-79.
21. Hurwitz, H., *Update on anti-VEGF strategies in colorectal cancer*. Annals of Oncology, 2004. **15**: p. 3-3.
22. Croom, K.F. and S. Dhillon, *Bevacizumab: a review of its use in combination with paclitaxel or capecitabine as first-line therapy for HER2-negative metastatic breast cancer*. Drugs, 2011. **71**(16): p. 2213-29.
23. R. Kreienberg, I.K., U. Albert, H. H. Bartsch,, et al., *Internationale S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammkarzinoms* Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2008.
24. Beato, M. and J. Klug, *Steroid hormone receptors: an update*. Human Reproduction Update, 2000. **6**(3): p. 225-236.
25. Osborne, C.K., et al., *Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(12): p. 4338s-4342s.
26. Edwards, D.P., *The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 307-24.
27. Kleuser B, M.D., Gust R, Petz HH & Potteck H, *17- β -estradiol inhibits transforming growth factor- β signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30*. Molecular Pharmacology, 2008. **74**: p. 1533-1543.
28. MD, R.J.J., *What does an orphan G-protein coupled receptor have to do with estrogen?* Breast Cancer Research, 2005. **7**: p. 243-244.
29. Krauss, *Signaling by Nuclear Receptors*. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation 2003, 3.Auflage: p. 151-177.
30. Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A, *Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA*. Science, 1986. **231**: p. 1150-1154.
31. Mosselman, S., Polman, J. and Dijkeman, R, *ERbeta: identification and characteration of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 1996. **392**: p. 49-53.
32. Petrides, L., 2003.
33. Bronchud, *Principles of molecular oncology*. 2008. **3**.
34. Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., Hoshi, K, *Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans*. Trends Endocrinol Metab, 2008. **14**: p. 124-129.
35. Speirs, V., *Role of ER β in Clinical Breast Cancer*. Cancer Treatment and Research, 2009. **147**: p. 1-20.
36. Cheng, J., et al., *Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis*. FEBS Lett, 2004. **566**(1-3): p. 169-72.
37. Treeck, O., et al., *Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **120**(3): p. 557-65.
38. Bardin, A., et al., *Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression*. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(3): p. 537-51.
39. Foster, J.S., et al., *Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(7): p. 320-7.
40. Lopez-Beltran, A., G.T. MacLennan, and R. Montironi, *Cyclin E as molecular marker in the management of breast cancer: a review*. Anal Quant Cytol Histol, 2006. **28**(2): p. 111-4.

41. Roy, P.G. and A.M. Thompson, *Cyclin D1 and breast cancer*. Breast, 2006. **15**(6): p. 718-27.
42. Sutherland, R.L., C.K. Watts, and E.A. Musgrove, *Cyclin gene expression and growth control in normal and neoplastic human breast epithelium*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **47**(1-6): p. 99-106.
43. Doisneau-Sixou, S.F., et al., *Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(2): p. 179-86.
44. Heel, R.C., et al., *Tamoxifen: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in the treatment of breast cancer*. Drugs, 1978. **16**(1): p. 1-24.
45. McDonnell, D.P., et al., *Elucidation of the molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulators*. Am J Cardiol, 2002. **90**(1A): p. 35F-43F.
46. McDonnell, D.P. and S.E. Wardell, *The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications for new drug discovery in breast cancer*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(6): p. 620-8.
47. Bagdade, J.D., et al., *Effects of tamoxifen treatment on plasma lipids and lipoprotein lipid composition*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **70**(4): p. 1132-5.
48. Christodoulakos, G.E., I.V. Lambrinoudaki, and D.C. Botsis, *The cardiovascular effects of selective estrogen receptor modulators*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1092**: p. 374-84.
49. Barakat, R.R., *Tamoxifen and endometrial neoplasia*. Clin Obstet Gynecol, 1996. **39**(3): p. 629-40.
50. Wakeling, A.E. and J. Bowler, *Steroidal pure antioestrogens*. J Endocrinol, 1987. **112**(3): p. R7-10.
51. Wakeling, A.E., M. Dukes, and J. Bowler, *A potent specific pure antiestrogen with clinical potential*. Cancer Res, 1991. **51**(15): p. 3867-73.
52. Howell, S.J., S.R. Johnston, and A. Howell, *The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2004. **18**(1): p. 47-66.
53. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
54. Alroy, I. and Y. Yarden, *The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions*. FEBS Lett, 1997. **410**(1): p. 83-6.
55. Yarden, Y., *Biology of HER2 and its importance in breast cancer*. Oncology, 2001. **61 Suppl 2**: p. 1-13.
56. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
57. Zidan, J., et al., *Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease*. British Journal of Cancer, 2005. **93**(5): p. 552-556.
58. Kaptain, S., L.K. Tan, and B.Y. Chen, *Her-2/neu and breast cancer*. Diagnostic Molecular Pathology, 2001. **10**(3): p. 139-152.
59. Hasan, M., et al., *The Effect of Disease Progression on Patient Reported Outcomes in HER-2 Negative Metastatic Breast Cancer Patients*. Cancer Research, 2009. **69**(24): p. 781s-782s.

60. Spector, N.L. and K.L. Blackwell, *Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(34): p. 5838-47.
61. Cooley, S., et al., *Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu*. Exp Hematol, 1999. **27**(10): p. 1533-41.
62. Le, X.F., F. Pruefer, and R.C. Bast, Jr., *HER2-targeting antibodies modulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 via multiple signaling pathways*. Cell Cycle, 2005. **4**(1): p. 87-95.
63. Le, X.F., et al., *Genes affecting the cell cycle, growth, maintenance, and drug sensitivity are preferentially regulated by anti-HER2 antibody through phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2092-104.
64. Izumi, Y., et al., *Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 279-80.
65. Carmeci, C., et al., *Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer*. Genomics, 1997. **45**(3): p. 607-17.
66. Mizukami, Y., *In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo*. Endocr J, 2010. **57**(2): p. 101-7.
67. Maggiolini, M. and D. Picard, *The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor*. J Endocrinol, 2010. **204**(2): p. 105-14.
68. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
69. Langer, G., et al., *A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research*. Steroids, 2010. **75**(8-9): p. 603-10.
70. Filardo, E.J. and P. Thomas, *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(8): p. 362-7.
71. Filardo, E.J., et al., *Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6359-66.
72. Filardo, E.J., et al., *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
73. Filardo, E.J., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002. **80**(2): p. 231-8.
74. Filardo, E., et al., *Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane*. Endocrinology, 2007. **148**(7): p. 3236-45.
75. Maggiolini, M., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27008-16.
76. Thomas, P., et al., *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-32.
77. Bologna, C.G., et al., *Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(4): p. 207-12.

78. Blasko, E., et al., *Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2009. **214**(1-2): p. 67-77.
79. Prossnitz, E.R. and M. Maggiolini, *Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **308**(1-2): p. 32-8.
80. Kuo, W.H., et al., *The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2007. **46**(2): p. 135-45.
81. Jordan, V.C., et al., *New hypotheses and opportunities in endocrine therapy: amplification of oestrogen-induced apoptosis*. Breast, 2009. **18 Suppl 3**: p. S10-7.
82. Ahola, T.M., et al., *Progestin and G protein-coupled receptor 30 inhibit mitogen-activated protein kinase activity in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4620-6.
83. Ahola, T.M., et al., *Progestin upregulates G-protein-coupled receptor 30 in breast cancer cells*. Eur J Biochem, 2002. **269**(10): p. 2485-90.
84. Ariazi, E.A., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(3): p. 1184-94.
85. Lasfargues, E.Y., W.G. Coutinho, and E.S. Redfield, *Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas*. J Natl Cancer Inst, 1978. **61**(4): p. 967-78.
86. Brooks, S.C., E.R. Locke, and H.D. Soule, *Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma*. J Biol Chem, 1973. **248**(17): p. 6251-3.
87. Macaluso, M., et al., *Nuclear and cytoplasmic interaction of pRb2/p130 and ER-beta in MCF-7 breast cancer cells*. Ann Oncol, 2006. **17 Suppl 7**: p. vii27-9.
88. Trempe, G.L., *Human breast cancer in culture*. Recent Results Cancer Res, 1976(57): p. 33-41.
89. Keydar, I., et al., *Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin*. Eur J Cancer, 1979. **15**(5): p. 659-70.
90. Cailleau, R., et al., *Morphological, Biochemical and Chromosomal Characterization of Breast Tumor Lines from Pleural Effusions*. In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association, 1976. **12**(4): p. 331-331.
91. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
92. Albanito, L., et al., *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1859-66.
93. Kauraniemi, P., et al., *Effects of Herceptin treatment on global gene expression patterns in HER2-amplified and nonamplified breast cancer cell lines*. Oncogene, 2004. **23**(4): p. 1010-3.
94. Prossnitz, E.R., et al., *The ins and outs of GPR30: a transmembrane estrogen receptor*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **109**(3-5): p. 350-3.
95. Funakoshi, T., et al., *G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(3): p. 904-10.
96. Otto, C., et al., *G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol*. Endocrinology, 2008. **149**(10): p. 4846-56.
97. Pedram, A., M. Razandi, and E.R. Levin, *Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(9): p. 1996-2009.

98. Peng, B., et al., *Putative functional characteristics of human estrogen receptor-beta isoforms*. J Mol Endocrinol, 2003. **30**(1): p. 13-29.
99. Pettersson, K., F. Delaunay, and J.A. Gustafsson, *Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling*. Oncogene, 2000. **19**(43): p. 4970-8.
100. Teng, J., et al., *The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits human urothelial cell proliferation*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 4024-34.
101. Chan, Q.K., et al., *Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest*. Cell Death Differ, 2010. **17**(9): p. 1511-23.
102. Holm, A., et al., *The GPER1 agonist G-1 attenuates endothelial cell proliferation by inhibiting DNA synthesis and accumulating cells in the S and G2 phases of the cell cycle*. J Vasc Res, 2011. **48**(4): p. 327-35.
103. Pinton, P., et al., *Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis*. Oncogene, 2008. **27**(50): p. 6407-18.
104. Rimessi, A., et al., *The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 808-16.
105. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. Cell, 1995. **80**(2): p. 179-85.
106. Holm, A., et al., *The G protein-coupled oestrogen receptor 1 agonist G-1 disrupts endothelial cell microtubule structure in a receptor-independent manner*. Mol Cell Biochem, 2012. **366**(1-2): p. 239-49.
107. Filardo, E.J., et al., *Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 70-84.
108. Graus-Porta, D., R.R. Beerli, and N.E. Hynes, *Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(3): p. 1182-91.
109. Vivacqua, A., et al., *G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(11): p. 1815-26.
110. Pagano, M., et al., *Cyclin A is required at two points in the human cell cycle*. EMBO J, 1992. **11**(3): p. 961-71.
111. Fu, M., et al., *Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions*. Endocrinology, 2004. **145**(12): p. 5439-47.
112. Gartel, A.L. and S.K. Radhakrishnan, *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 3980-5.
113. Lipskaia, L. and A.M. Lompre, *Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation*. Biol Cell, 2004. **96**(1): p. 55-68.
114. Durchdewald, M., P. Angel, and J. Hess, *The transcription factor Fos: a Janus-type regulator in health and disease*. Histology and Histopathology, 2009. **24**(11): p. 14451-1461.
115. Milde-Langosch, K., *The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(16): p. 2449-2461.

116. Milde-Langosch, K., et al., *The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas*. Breast Cancer Research and Treatment, 2004. **86**(2): p. 139-152.
117. Wilding, G., M.E. Lippman, and E.P. Gelmann, *Effects of Steroid-Hormones and Peptide Growth-Factors on Protooncogene-C-Fos Expression in Human-Breast Cancer-Cells*. Cancer Research, 1988. **48**(4): p. 802-805.
118. Thiel, G. and G. Cibelli, *Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1*. J Cell Physiol, 2002. **193**(3): p. 287-92.
119. Huang, R.P., et al., *Decreased EGR-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation*. International Journal of Cancer, 1997. **72**(1): p. 102-109.
120. Ronski, K., et al., *Early growth response gene 1 (EGR1) is deleted in estrogen receptor-negative human breast carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(5): p. 925-930.
121. Davies, C., et al., *Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 771-84.
122. Ignatov, A., et al., *Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(1): p. 87-96.
123. Nicholson, S., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1990. **37**(6): p. 811-4.
124. Levin, E.R., *Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(3): p. 309-17.
125. Berglund, G., et al., *Effect of endocrine treatment on sexuality in premenopausal breast cancer patients: a prospective randomized study*. J Clin Oncol, 2001. **19**(11): p. 2788-96.
126. Li, D., et al., *Effects of chronic administration of tamoxifen and toremifene on DNA adducts in rat liver, kidney, and uterus*. Cancer Res, 1997. **57**(8): p. 1438-41.
127. Rogatsky, I., J.M. Trowbridge, and M.J. Garabedian, *Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22296-302.
128. Michalides, R., et al., *Cyclin A is a prognostic indicator in early stage breast cancer with and without tamoxifen treatment*. Br J Cancer, 2002. **86**(3): p. 402-8.
129. Watts, C.K., et al., *Anti-estrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(12): p. 1804-13.
130. Musgrove, E.A., et al., *Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(6): p. 3577-87.
131. Kushner, P.J., et al., *Estrogen receptor pathways to AP-1*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 311-7.
132. Gee, J.M., et al., *Immunocytochemical localization of Fos protein in human breast cancers and its relationship to a series of prognostic markers and response to endocrine therapy*. Int J Cancer, 1995. **64**(4): p. 269-73.
133. Milde-Langosch, K., *The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2449-61.

134. Zhou, Y., et al., *Enhanced NF kappa B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 59.
135. Anderson, E., *The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis*. Breast Cancer Res, 2002. **4**(5): p. 197-201.
136. Bocchinfuso, W.P. and K.S. Korach, *Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1997. **2**(4): p. 323-34.
137. Murphy, L.C., et al., *The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **65**(1-6): p. 175-80.
138. Roger, P., et al., *Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2537-41.
139. Skliris, G.P., et al., *Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 213-20.
140. Lindberg, K., et al., *Estrogen receptor beta represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(2): p. R43.
141. Speirs, V., et al., *Clinical importance of estrogen receptor beta isoforms in breast cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5825; author reply 5825-6.
142. Thomas, C. and J.A. Gustafsson, *The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 597-608.
143. O'Neill, P.A., et al., *Wild-type estrogen receptor beta (ERbeta1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers*. Br J Cancer, 2004. **91**(9): p. 1694-702.

8.Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortmann möchte ich danken für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller erforderlichen Materialien.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich von der Planung der Arbeit, über die praktische Ausführung und Auswertung, bis zur schriftlichen Fertigstellung stets begleitet und unterstützt hat. Zu jeder Zeit stand er mir mit fachkundigem Rat zur Seite und hat so einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern meines Laborteams bedanken, die mich nicht nur in allen verwendeten Methoden angelernt haben, sondern mir auch jederzeit unterstützend zur Seite standen. Es hat mir große Freude bereitet, ein Teil dieser Arbeitsgruppe zu sein.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mir diese Ausbildung überhaupt ermöglicht hat, und auf deren liebevolle Unterstützung ich mich immer verlassen kann.