

**Aus dem Lehrstuhl für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität Regensburg
(Schwerpunkt Frauenheilkunde)**

Prof. Dr. med. Olaf Ortman

**der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**Östrogenabhängige Regulation der Expression des Gens
icb-1 in verschiedenen
hormonabhängigen gynäkologischen Malignomen**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Julia Maria Bollmann**

2009

**Aus dem Lehrstuhl für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität Regensburg
(Schwerpunkt Frauenheilkunde)**

Prof. Dr. med. Olaf Ortman

**der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**Östrogenabhängige Regulation der Expression des Gens
icb-1 in verschiedenen
hormonabhängigen gynäkologischen Malignomen**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
Julia Maria Bollmann**

2009

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Oliver Treeck
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Olaf Ortmann
Tag der mündlichen Prüfung:	29.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das <i>icb-1</i> Gen	7
1.2	Östrogenrezeptoren	10
1.3	Effekte von Östrogenen	12
1.3.1	Östrogene und Genregulation	13
1.3.2	Östrogene und Differenzierung	15
1.4	Mammakarzinom	16
1.4.1	Epidemiologie	16
1.4.2	Entstehung	17
1.4.3	Therapie	18
1.4.4	Charakterisierung der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien	19
1.5	Ovarialkarzinom	21
1.5.1	Epidemiologie	21
1.5.2	Entstehung	22
1.5.3	Therapie	22
1.5.4	Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinom-Zelllinien	23
1.6	Fragestellung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Materialien	25
2.1.1	Zelllinien und Human Breast Cancer Rapid-Scan™	25
2.1.2	Zellkultur-Reagenzien	26
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Gefäße und Geräte	29
2.1.5	Weitere verwendete Materialien	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	RNA-Isolierung	30
2.2.2	Messung der RNA-Konzentration	31
2.2.3	c-DNA-Synthese	32

Expression des Gens <i>icb-1</i>	4
2.2.4 Real-time PCR mit LightCycler®	32
2.2.5 Agarosegelelektrophorese	35
3 Ergebnisse	37
3.1 Nachweis einer ERE-ähnlichen Sequenz in der Promotorregion des Gens <i>icb-1</i>	37
3.2 Expression von <i>icb-1α</i>	37
3.3 Expression von <i>icb-1α</i> nach Stimulation der Zelllinien mit 17-β-Östradiol	38
3.3.1 Einfluss der Stimulation mit 17-β-Östradiol auf die Expression in Zelllinien der Mamma	38
3.3.2 Einfluss der Stimulation mit 17-β-Östradiol auf die Expression in Zelllinien des Ovars	40
3.4 Molekulare Mechanismen der E2-induzierten Steigerung der <i>icb-1</i> Expression	41
3.4.1 Zeitabhängige Stimulation von MCF-7 Zellen mit 17-β-Östradiol	41
3.4.2 Stimulation von MCF-7-Zellen mit 17-β-Östradiol bzw. 17-β-Östradiol und Zykloheximid	43
3.5 Expression von <i>icb-1α</i> nach Behandlungen mit dem SERM Tamoxifen und dem Antiöstrogen ICI sowie selektiven ERα- und ERβ-Agonisten	45
3.5.1 Wirkung von Antiöstrogenen auf die <i>icb-1α</i> -Expression	46
3.5.1.1 Expression von <i>icb-1α</i> nach Behandlung mit Antiöstrogenen in den Zelllinien der Mamma	46
3.5.1.2 Expression von <i>icb-1α</i> nach Behandlung mit Antiöstrogenen in den Zelllinien des Ovars	48
3.5.2 Wirkung selektiver Agonisten von ERα und ERβ auf die <i>icb-1α</i> -Expression	50
3.5.2.1 Expression von <i>icb-1α</i> in Zelllinien der Mamma nach Stimulation mit selektiven ER-Agonisten	50
3.5.2.2 Expression von <i>icb-1α</i> in Zelllinien des Ovars nach Stimulation mit selektiven ER-Agonisten	52

Expression des Gens <i>icb-1</i>	5
3.5.3 Expression von <i>icb-1α</i> bei ERβ überexprimierenden Zellen	54
3.5.3.1 <i>Icb-1α</i> -Expression in ERβ1 überexprimierenden Mammakarzinomzellen	54
3.5.3.2 <i>Icb-1α</i> -Expression in ERβ1 überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen	55
3.6 Expression von <i>icb-1α</i> in Mammakarzinom- und Ovarialkarzinom-Gewebe	57
3.6.1 Expression von <i>icb-1α</i> und ERα in Proben des Human Breast Cancer Rapid-Scan™	57
3.6.2 Expression von <i>icb-1α</i> in einem Pool von Ovarialkarzinom-RNAs	59
4 Diskussion	60
4.1 Identifizierung und Funktion des ERE in der Sequenz des Gens <i>icb-1</i>	60
4.2 Expression von <i>icb-1</i> in Human Breast Cancer Rapid-Scan™-Proben und in einem Pool von Ovarialkarzinomproben	61
4.3 Expression von <i>icb-1</i> nach Stimulation mit 17-β-Östradiol	62
4.4 Wirkung der Behandlung mit Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Expression von <i>icb-1</i>	63
4.5 Zusammenhang der <i>icb-1</i> -Expression mit dem Vorkommen von ERα und ERβ	65
4.5.1 Signalübermittlung der Expressionsänderung von <i>icb-1</i> über ERα und ERβ	65
4.5.2 Signalübermittlung der Expressionsänderung von <i>icb-1</i> in den ERβ überexprimierenden Zellen	68
4.5.3 Expression von <i>icb-1</i> und ERα in Human Breast Cancer Rapid-Scan™-Proben	69
5 Zusammenfassung	70

Anhänge

- I Literaturverzeichnis
- II Publikation
- III Eidesstattliche Erklärung
- IV Danksagung
- V Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Das *icb-1* Gen

Das humane Gen *icb-1* (C1Orf38), dessen Funktion in Differenzierungsprozesse involviert ist, liegt auf dem Chromosom 1 und wird in in mindestens drei Spleißvarianten exprimiert [Treeck et al. 1998; Treeck et al. 2002]. Neben dem zuerst beschriebenen 2,4 kb großen *icb-1 α* konnten zwei weitere Transkripte (*icb-1 β* und γ) gefunden werden, die durch alternative Spleißvorgänge entstehen. Eine weitere Variante ist das speziell in der humanen Milz exprimierte *icb-1 δ* , das aber eher einem eng verwandten Gen zuzuordnen ist. Dieses zeigt nämlich keine mit den anderen Formen übereinstimmenden Spleißstellen [Treeck et al. 2002].

Die Sequenzierung von 24 partiellen cDNA-Sequenzen (ESTs) verschiedener Zelllinien und Gewebe zeigte Übereinstimmungen zur 3'-untranslatierten Region des cDNA-Klons von *icb-1*, während in einer DNA-Datenbank keine Homologien zur kodierenden Region nachweisbar waren. Viele dieser ESTs werden in fetalem oder Tumorgewebe exprimiert. Dies könnte ein Anzeichen sein, dass *icb-1* mit der Zellproliferation und Differenzierung in Bezug steht [Treeck et al. 1998].

5'		
GACCACGCGTATCGATGTCGACCCACAGGATTGTACAGAGGGCAGGGTGGTGACTGAGGACCAG		65
CTCCTCATGCTTGAGGCTGTGGTGTACCTCGGGATCCGCTCTGCCCGCTGTGTCTGGGCAT		130
GGAGGGTCAGCAGGTTCATCCTGCACCTGCCCTATCCCAGAAGGGGCCCTTCTGGACATGGGAGC	M	195
E G Q Q V I L H L P L S Q K G P F W T W E		
CTAGTGGCCCTCGAACTCTGCTCCAGGTCTACAGGATCCAGCCCTGAAAGACCTCGTCTCACC		260
P S A P R T L L Q V L Q D P A L K D L V L T		
TGCCCCACCCTGCCCTGGCATTCCCTGATCCTGCGGCCCCAGTATGAGATCCAAGCCATCATGCA		325
C P T L P W H S L I L R P Q Y E I Q A I M H		
CATGCGCAGGACCATTGTCAAGATCCCTTCTACCCCTGGAGGTGACGTGGAGGACGTCAACCGCT		390
M R R T I V K I P S T L E V D V E D V T A		
CCTCCCGGCACGTCCACTTTATCAAACCGCTGCTGCTGAGCGAGGTCTGGCCTGGGAAGGCCCT		455
S S R H V H F I K P L L L S E V L A W E G P		
TCCCCCTGTCCATGGAGATCCTGGAGGTCTGAGGGCCGCCCATCTTCTCAGCCCGTGGGT		520
F P L S M E I L E V P E G R P I F L S P W V		
GGGCTCCTTGCAAAAAGGCCAGAGGCTTTGCGTCTATGGCCTAGCCTCACCACCCTGGCGGGTCC		585
G S L Q K G Q R L C V Y G L A S P P W R V		
TGGCCTCAAGCAAGGGCCGCAAGGTGCCAGGCACTTCTGGTGTGAGGGGGCTACCAAGGCAAG		650
L A S S K G R K V P R H F L V S G G Y Q G K		
CTGCGGCGGCGCCAAAGGGAGTTCCCCACGGCCTATGACTCCTAGGTGCTTTCCAGCCAGGCCG		715
L R R R P R E F P T A Y D L L G A F Q P G R		
GCCACTCCGGGTGGTGGCCACAAGGACTGTGAGGGCGAGAGGGAGGAGAATCCCAGTTACGTF		780
P L R V V A T K D C E G E R E E N P E F T		
CCCTGGCTGTGGGTGACCGGCTGGAGGTGCTGGGGCTGGCCAGGCCATGGGSCCAGGGCAGT		845
S L A V G D R L E V L G P G Q A H G A Q G S		
GACGTGGATGTCTTGGTTTGTGACGGGCTGAGTGACCAGGCTGGGGAAGATGAGGAGGAAGAGTG		910
D V D V L V C Q R L S D Q A G E D E E E E C		
CAAAGAGGAGGCAGAGACCCAGAGCGGGTCTGCTGCCCTTCCACTTCCCTGGCAGTTTCGTGGA		975
K E E A E T Q S G S C C P S T S L A V S W		
GGAGATGAGTGACAGCCGGCGCTACAGCCTGGCAGATCTGACTGCCAGTTTTCAATGCCTTGTG		1040
R R *		
AGGTCAAGGTGGTGGCCAAGGACACCAGCCACCCCAATGACCCTCAGAACCCTCCTTCTGGGCCCT		1105
GCGGCTGGAGGAGAGATCACAGAGCCATTCTTGGTGGTGGAGCCTGGACTCTGAGCTGGGATGTG		1170
CTTTGAGATCCCTCCCGGAGGCTGGACCTGACTGTCTGGAGGCCAAGGGGCAGCCAGACTTGC		1235
CAGAGGGGTCTCTCCCATAGCCACAGTGGAGGAAGCTGGAACAGACACCTTTTATTATTGTCTT		1300
CGGAAGTTACCAGCCTGTGAGATCCAAGCCCCCACCAGGCCCTAATAAATCAGGGCCTCAG		1365
CAAGCAGAGGAGACACAGCAGTGGAGGGAGGCGTCAAGTCTTCTCAAGTCTTAGGATTGCAGCAAC		1430
ACGTTCCGGCTGCCCAAACCCAAAGGCGAAGACCTTGCCAGAGTTTCAAGGATGGCTCCAGTACG		1495
TACAGCAAGATTCTCGCCACAGGAAGGGCCACAGGCCCGCTAAGCCCCAAAGGCAGGATCTAGA		1560
TGATGATGAACATGATTATGAAGAAATACTTGAACAATTTTCAGAAAACCATCTAAGTGTGAGG		1625
AACCACGCTTCTTAAGTCTGCTTCTCAGGGAATCCGACACCAGCCAACCATTTAAGCCTCTAA		1690
AAGACCTCGGGCAAGTCTCACAGAACTGAGCTGCAGACGGGAGTAGCTTTGTGAAAACCTGATT		1755
TGATGGACACTGCACCAGCTTCCCTCAGGTTCTAGATTCTTGTACTTAGGGCGGGCTGGTTTGG		1820
ACCTAACATCTCGCACGTGACTCCCTCAGCCTCAGAGCCTTGGGATGCAGAGCAGCTGGCAGGCT		1885
TCCTCTCAATCCTGCAACCCAGCTGTCCACCAGGTGGATGCAGAGGGGAATCCGAGGCCATCAA		1950
CCTTGGTGACAGCAGCGCAGTGCCAAATGTGATCACACTGCATGGGAGATTTTGTAAACGTCTGC		2015
CACCCCACTCTCACCCCAAGCTTAAGCCCCGGGAGGCTGGACTGTCTTCTCATCTCTGT		2080
AGCACCAAGCCTGATAGATCTGTATATGGTAAACAGGGGTTTAAACCATGTGGTTAACATGGAT		2145
TAAATGGGAAATTTGGCTTCAAGAACAACCTTAGGACCTTGGCCCCAAAAGCTGGTGGTGAA		2210
ATGAGAGGAGCCAAATTTAAGAAGACCTTATGGAGACCTGAGGCTGCAGAACTGGTAGGTTTCA		2275
TCAGGTGGTTAAAGTCGTCAAAGTTGTAAGTACTAACAAGATTATTTCAATTTAAAACACAG		2340
AATAAAAATGACACCTGAGCTTCTCC poly A 3'		

Abb. 1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen cDNA des Gens *icb-1* [Treeck et al. 1998]

Eine basale Transkription von *icb-1* konnte in verschiedenen gesunden und malignen Geweben und in fast allen getesteten Krebszelllinien nachgewiesen werden. Dazu zählten unter anderem die Zelllinien HL-60 und MCF-7, Proben aus fetalem Hirn, der Brustdrüse und dem Dickdarm sowie aus dem Mamma- und dem kolorektalen Karzinom [Treeck et al. 1998; Treeck et al. 2002].

Icb-1 scheint in die Differenzierung von Zellen eingebunden zu sein. Werden HL-60-Zellen zu ihrer Differenzierung in Monozyten oder Granulozyten mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder all-trans-Retinolsäure (ATRA) und Dimethylsulfoxid (DMSO) stimuliert, so erhöht sich das mRNA-Level von *icb-1* [Treeck et al. 1998; Treeck et al. 2002].

In verschiedenen endometrialen Tumorzelllinien konnte eine Expression von *icb-1* nachgewiesen werden. Insbesondere bei den endometrialen Adenokarzinomzellen HEC1B konnte durch die Kultur auf einer Basalmembran das mRNA-Level von *icb-1* außerdem signifikant gesteigert werden [Treeck et al. 1998]. Eine zelluläre Differenzierung konnte auch bei Kontakt von gesunden Brustzellen sowie Endothelzellen zu einer Basalmembran gezeigt werden. Hieran könnten Integrine, die über intrazelluläre Signale eine veränderte Genexpression hervorrufen, durch den Kontakt zur Basalmembran beteiligt sein [Edwards et al. 1995; Grant et al. 1995; Li et al. 1987; Sheppard 1996].

Die basale Expression von *icb-1 α* und *β* konnte durch Behandlung mit IFN γ auf mRNA-Level reguliert werden. IFN γ unterdrückt das Wachstum und induziert die Apoptose von Brust- und Ovarialkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo*. Bei der Behandlung solcher Zelllinien mit IFN γ sank die Zellzahl deutlich, während gleichzeitig ein signifikanter Anstieg der *icb-1* mRNA zu beobachten war. Obwohl auch damit die Genfunktion von *icb-1* nicht geklärt ist, scheint es ein Teil der zellulären Reaktion zu sein, die in die Antwort von gynäkologischen Tumorzellen auf IFN γ involviert ist [Treeck et al. 2005].

Icb-1 könnte in Vorgänge der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose miteingebunden sein. Auch den Östrogenen werden solche Effekte zugeordnet, die dann über die Bindung an Östrogenrezeptoren sowie über nicht-genomische Effekte vermittelt werden.

1.2 Östrogenrezeptoren

Die beiden Typen der Östrogenrezeptoren (ER) α und β sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, die aus sechs funktionellen Domänen (A-F) bestehen. Normalerweise sind sie im Zellkern lokalisiert; sie können aber besonders in Abwesenheit ihrer Liganden auch ins Zytoplasma wandern und dort an die Zellmembran assoziieren [Edwards 2005; Klinge 2001; Löffler & Petrides 2003; Singh & Kumar 2005].

Der klassische ER α besteht aus 595 Aminosäuren mit einer zentralen DNA-Bindenden Domäne (DBD) und einer C-terminalen hormonbindenden Domäne (HBD), der zweite Typ ER β enthält 530 Aminosäuren. Die DBDs beider Typen sind nahezu gleich (95 %ige Homologie), während sich die beiden HBDs bei einer Homologie von 53 % so sehr unterscheiden, dass beide Rezeptoren durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden können [Löffler & Petrides 2003].

Nach Bindung des Liganden findet durch Phosphorylierung eine Konformationsänderung des Rezeptors statt. An der DBD bilden Cystein und Zink Chelatkomplexe, die zwei so genannten Zinkfinger, die die Bindung an die spezifischen DNA-Sequenzen, die „estrogen response elements“ (ERE), ermöglichen [Klinge 2001]. Diese sind meist in der Promotorregion eines Gens lokalisiert und können die Transkription spezifischer Gene direkt oder ggf. nach Wechselwirkung mit Koaktivatoren bzw. –repressoren verändern [Caldon et al. 2006; Edwards 2005; Klinge 2001; Löffler & Petrides 2003; Platet et al. 2004]. Die Östradiol-vermittelte Genaktivierung wird durch zwei unterschiedliche Transaktivierungs-Domänen (A / B = AF-1 und F = AF-2) stimuliert [Löffler & Petrides 2003]. Indirekt werden die

Effekte über die Beeinflussung der Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Aktivatorprotein-1) oder Sp-1 vermittelt, da die ERs diese binden und modulieren können. Diese können dann mit den ihnen zugehörigen „response elements“ an die DNA binden [Singh & Kumar 2005].

Durch Östrogene selbst werden außerdem zytoplasmatische Signalwege (z. B. Src / Ras / Erk) aktiviert und die Zellproliferation im Mammakarzinom gesteigert [Caldon et al. 2006; Edwards 2005; McDonnell & Norris 2002; Platet et al. 2004].

Eine besonders schnelle Wirkung der Steroidhormone kann nicht über Transkription und Proteinsynthese erreicht werden. Man nimmt an, dass nicht-genomische Effekte durch membrangebundene und / oder zytoplasmatische Rezeptoren und dann über Proteinkinase-Kaskaden übertragen werden. Die Signalübermittlung erfolgt dann über die an der Plasmamembran der Zellen angelagerten ERs [Singh & Kumar 2005]. cAMP als „second messenger“ oder der MAPK-Signalweg dienen zur Fortleitung der schnellen Effekte. Außerdem können die ERs an der Membran verschiedener Zelltypen Tyrosinkinaserzeptoren, wie den EGFR (epidermal growth factor receptor) oder IGF-1 (insulin-like growth factor 1) aktivieren [Singh & Kumar 2005].

Die Bindung selektiver Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) kann agonistisch wie auch antagonistisch Einfluss nehmen. Die Wirkung kann sich je nach Zielgewebe ändern [Platet et al. 2004].

Das Expressionsmuster der beiden Typen ist unterschiedlich. Während der ER β vorwiegend in Nieren, Darmmucosa, Lungenparenchym, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und Prostata zu finden ist, kommt der ER α hauptsächlich im Endometrium, im Stroma der Ovarien und im Mammakarzinom vor. Sowohl Östrogenrezeptoren als auch Progesteronrezeptoren spielen in der Entwicklung des Mammakarzinoms eine Rolle [Cordera & Jordan 2006; Löffler & Petrides 2003]. Besonders der ER α , der bei Östrogenbindung als aktivierender Transkriptionsfaktor wirkt und in die Stimulation von östrogenabhängigen Ziel-

genen involviert ist, reguliert die Zellzyklusprogression und das Wachstum der Brustdrüse [Singh & Kumar 2005].

Die beiden ER-Typen können in Zellen des Mammakarzinoms miteinander wechselwirken. Dabei kann der ER β den ER α sowohl positiv wie auch negativ beeinflussen, auch wenn kein Ligand gebunden ist. Je nach Anteil von ER β kann dieser Typ die Genexpression (z. B. von BMP7) modulieren und zur Expression neuer Gene führen, die nicht durch ER α allein reguliert werden. Außerdem wirkt ER β auf einige Zellsignalwege ein (z. B. den Zellzyklus) [Chang et al. 2006]. Umgekehrt kann die ER-Aktivität über Wachstumsfaktoren oder Zytokine unabhängig von der Bindung natürlicher oder synthetisierter Hormone moduliert werden [Platet et al. 2004].

In Zellen des Mammakarzinoms wird die Expression der mRNA von Progesteronrezeptoren (PR), pS2, Cathepsin D, TGF α und c-Myc durch Östrogene reguliert, von denen keines der entsprechenden Gene ein kanonisches ERE zeigt. Obwohl einige nicht vollkommene EREs identifiziert werden konnten, ließ sich nur beim pS2 eine Antwort auf Östrogenstimulation über diesen Mechanismus nachweisen. So muss die Regulation dieser Gene komplexer sein und über Interaktion mit anderen transkriptionsaktivierenden Faktoren ablaufen. Die ERs allein können die erforderlichen Signale vermutlich nicht übermitteln [May & Westley 1995].

Weitere Forschung an Steroidrezeptoren, ihren Liganden und ihren Mechanismen der Signalübertragung ist zum Verständnis biochemischer Vorgänge und in der Folge zur korrekten Behandlung rezeptorpositiver Tumoren notwendig [Cordera & Jordan 2006].

1.3 Effekte von Östrogenen

Die Entwicklung der Brust in der Pubertät wird durch 17- β -Östradiol (E2) stimuliert, das das vorherrschende zirkulierende ovarielle Steroidhormon und das biologisch

aktivste Hormon im Brustgewebe ist. Allerdings beeinflussen Östrogene nicht nur die Zellproliferation des normalen, sondern auch die des neoplastischen Brustepithels [Russo & Russo 2006; Singh & Kumar 2005]. Sie stimulieren die Zellproliferation durch ihre aktivierende Wirkung auf den Zellzyklus und sind in die Differenzierung und Apoptosevorgänge der Zellen eingebunden [Singh & Kumar 2005].

1.3.1 Östrogene und Genregulation

Durch die Einwirkung von Östrogenen wird die Produktion verschiedenster Proteine der Zelle verändert. Diese Effekte werden hauptsächlich über die Östrogenrezeptoren durch Änderung der Transkription ihrer Zielgene vermittelt [Singh & Kumar 2005].

In den normalen Zellen wird der Zellzyklus streng geregelt und schreitet nicht fort, solange die vorangegangene Phase nicht abgeschlossen und kontrolliert ist [Doisneau-Sixou et al. 2003; Foster et al. 2001; Löffler & Petrides 2003; Sutherland 1998].

Einige Faktoren des Zellzyklus wurden nach Östrogen- und Antiöstrogenbehandlung untersucht. Besonders in der frühen G1-Phase konnte eine Hormongabe direkt Einfluss auf die nachfolgenden Mitosevorgänge nehmen. Bei einer Vorbehandlung von Brustkrebszellen mit Antiöstrogenen setzte sich der in der G0 / G1-Phase unterbrochene Zellzyklus wieder fort, wenn die Zellen mit Östrogenen stimuliert wurden [Foster et al. 2001]. So konnte nach Behandlung mit Östrogen ein Anstieg des mRNA- und Protein-Levels von Zyklin D1 beobachtet werden, das in fast 50 % der Mammakarzinomzellen überexprimiert ist [Barnes & Gillett 1998; Foster et al. 2001]. Da die Zunahme der mRNA der des Proteins vorangeht, werden diese Effekte des Östrogens der genetischen Ebene zugeschrieben [Doisneau-Sixou et al. 2003].

Ein weiteres Ziel der Östrogeneinwirkung ist das Gen, das das nukleäre Phosphoprotein c-Myc kodiert [Doisneau-Sixou et al. 2003; Lerebours & Lidereau 2002]. Die Effekte von c-Myc auf den Zellzyklus sind vielfältig und nicht vollständig aufgeklärt. Es kann den G1-S-Übergang mit und ohne Aktivierung des Zyklin E-Cdk2-Komplexes induzieren [Foster et al. 2001; Shiu et al. 1993].

In Brustkrebszelllinien kommt eine schnelle und direkte Induktion von c-Myc durch Östrogen, wahrscheinlich über ein atypisches ERE, zustande, während andere Steroidhormone keine Effekte zeigen [Doisneau-Sixou et al. 2003; Steeg & Zhou 1998; Sutherland et al. 1998]. Antisense-Oligonukleotide des c-Myc verhindern die durch Östrogen stimulierte Proliferation von Mammakarzinomzellen. Wird der Zellzyklus zunächst durch die Behandlung mit Antiöstrogenen arretiert, kann er durch die Induktion von c-Myc wieder in Gang gesetzt werden [Doisneau-Sixou et al. 2003].

Im normalen Gewebe besteht ein homöostatisches Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose, die den programmierten Tod einzelner, individueller Zellen in einem sonst gesunden Gewebe bezeichnet. Die Apoptose kann über verschiedene Wege ausgelöst werden. Meist sind Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren an der Zelloberfläche oder mitochondriale Dysfunktion die Auslöser, die alle zur Aktivierung von Caspasen führen. Bei den Caspasen handelt es sich um Cysteinproteasen, die viele Proteine spalten, damit deren Funktion verändern und so den Zelltod herbeiführen [Löffler & Petrides 2003].

Nach längerer Behandlung von Zellen mit Antiöstrogenen oder längerem Entzug von Östrogenen kann bei der erneuten Gabe von Östrogen eine Steigerung des Fas-Liganden beobachtet werden. Die Produktion dieses Proteins wird sehr wahrscheinlich über ein ERE vermittelt, das in der Promotorregion des zugehörigen Gens gefunden wurde [Song & Santen 2003].

Obwohl Östrogene sonst die Zellproliferation fördern, konnten so auch Einwirkungen auf apoptotische Vorgänge nachgewiesen werden [Jordan et al. 2005; Song & Santen 2003].

1.3.2 Östrogene und Differenzierung

Differenzierung bezeichnet die strukturelle und funktionelle Spezialisierung von ursprünglich gleichartigen Zellen zu denen spezifischer Gewebe. Steroidhormone sind in die Differenzierungsvorgänge verschiedener Zellen involviert, von denen Östrogen den Hauptanteil an der Induktion der Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen der erwachsenen ruhenden Brust ausmacht [Clarke 2006].

In Anwesenheit von 17- β -Östradiol (E2) kommt es zu einem signifikanten Anstieg der TGF β 1-Expression auf mRNA- und Protein-Level. Dieses verhindert die Konversion von Östronsulfat (E1S) zu Östron und damit zum biologisch aktiven Hormon E2. So wird z. B. die Differenzierung des Zytotrophoblasten zum Synzytiotrophoblasten durch Östrogene stimuliert [Yashwanth et al. 2006].

Die Einwirkung von Östrogen auf den Synzytiotrophoblasten konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Aktivität des Enzyms, das die P-450-Cholesterol-Seitenkette spaltet, die Aufnahme von LDL, das 3 β -HSD (Hydroxykortikosteroid-Dehydrogenase) mRNA-Level und die Progesteronbildung konnten durch Östrogen signifikant stimuliert werden [Pepe & Albrecht 1999].

Das adulte Ovar wird in seiner Funktion ebenfalls durch die Wirkung von Steroidhormonen beeinflusst. Durch sie wird die Expression einiger Gene, wie z. B. der Aromatase, über Sf-1 vermittelt [Britt et al. 2004]. Außerdem konnte nach Stimulation mit Östrogen die Ovulation induziert werden, wobei die Zellen die letzten Reifungsstadien des Follikels durchliefen. Somit wurden durch Hormongabe Gene exprimiert, die direkt oder indirekt an der somatischen Differenzierung beteiligt sind [Britt et al. 2004].

Die Differenzierung der Zellen der gesunden und maligne transformierten Mamma wird ebenfalls durch die Wirkung von Östrogen beeinflusst. Der VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) ist ein potentes Endothelzellmitogen, das eine entscheidende Rolle in der Zellproliferation, Migration und Regulation von Wachstum von Brustkrebszellen über auto- und parakrine Wege spielt. Durch Östrogen wird seine Expression auf mRNA- und Protein-Level in vielen normalen und malignen Zellen induziert [Sengupta et al. 2004].

E2 und seine Metaboliten, insbesondere 2-Hydroxyöstron, üben gegensätzliche Effekte auf das Wachstum Hormon-sensitiver Brustkrebszellen und ihre Differenzierung aus. Mit Hilfe der sezernierten Proteine wie α -Laktalbumin und GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein) konnten diese Einflüsse nachgewiesen werden. Die Sekretion von GCDFP-15 wurde durch Östrogen gesenkt, durch dessen Metaboliten 2-Hydroxyöstron gesteigert. Das Protein wurde außerdem in höheren Konzentrationen in den differenzierteren Brustkrebszellen gefunden [Vandewalle & Lefebvre 1989].

1.4 Mammakarzinom

1.4.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau, sie macht etwa einen Anteil von 26 % aller weiblichen Malignome aus. Nach Schätzungen der WHO erkrankten im Jahr 2000 weltweit eine Million Frauen, etwa 370.000 verstarben. Mit einer Inzidenz von 47.000 pro Jahr in Deutschland ist durchschnittlich jede 8. bis 10. Frau im Laufe ihres Lebens betroffen. Obwohl die Erstdiagnose bei der Hälfte der Frauen im Alter über 60 Jahren gestellt wird (mittleres Erkrankungsalter 63,4 Jahre), sind auch 40 % der Neuerkrankungen bei jüngeren Frauen (30 bis 59 Jahre) zu verzeichnen. Trotz gering rückläufiger Mortalität (etwa 17 %) bleibt das Mammakarzinom die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen [Kiechle et al. 2007; Robert-Koch-Institut 2005].

Auch bei heute günstigerer Prognose muss dies zumindest zum Teil auf die frühzeitigere und genauere Diagnose zurückgeführt werden, durch die Tumoren in kleineren und somit günstigeren Stadien entdeckt und therapiert werden können [Balker et al. 2002; Kiechle et al. 2007; Robert-Koch-Institut 2005].

1.4.2 Entstehung

Das Karzinom der Brust ist eine heterogene Erkrankung, die Unterschiede in pathologischen Entitäten und klinischem Verhalten zeigt. Auch auf molekularem Level sind komplexe genetische Veränderungen nachgewiesen, die zelluläre Prozesse beeinflussen [Simpson et al. 2005]. Das Modell von Vogelstein zur Entstehung von Krebs im Kolon, das einen vielschrittigen Prozess der Transformation von den normalen bis zu den entarteten Zellen beschreibt, kann auch auf die Entwicklung des Brustkrebs übertragen werden [Fearon & Vogelstein 1990; Simpson et al. 2005; Vogelstein et al. 1988]. Nach zunächst benigner Hyperplasie führen weitere Abweichungen der Zellen über prä-maligne Läsionen und Karzinoma-in-situ (CIS) zum invasiven Wachstum und schließlich zu Metastasen [Briand & Lykkesfeldt 2001].

Zu den Risikofaktoren der Brustkrebsentwicklung gehören - neben den Genetischen - chemische Karzinogene, Strahlung und Viren [Harris 1987, Rhim et al. 1993]. Außerdem sind Lebensalter, Zeitpunkt der Menarche und Erstgeburt, Herkunftsland, familiäre Disposition und Ernährung zu berücksichtigen [Beckmann et al. 1997; Djuric et al. 2002; Lahmann et al. 2004; Rock & Denmark-Wahnefried 2002]. Kumulative wie auch exzessive Exposition mit Östrogenen, die die Zellproliferation stimulieren und das Wachstum der Brust fördern, könnten ebenfalls beteiligt sein [Yager & Davidson 2006; Yue et al. 2003]. Dennoch können bei 2/3 der Frauen mit maligner Erkrankung der Brust weder genetische noch andere Umweltfaktoren nachgewiesen werden [Beckmann et al. 1997].

1.4.3 Therapie

Die Standardtherapie des Mammakarzinoms beinhaltet lokale und systemische Maßnahmen, da schon im Frühstadium - ohne den Nachweis von Fernmetastasen - ein potentiell systemischer Befall des Körpers möglich ist. Bei der operativen Therapie können sowohl brusterhaltende Methoden als auch die modifizierte radikale Mastektomie durchgeführt werden. Nach der Einschätzung des Rezidivrisikos (Alter, LK-Status, Grading, Tumorgroße, Steroidhormonrezeptorstatus) und dem Ansprechen auf eine weitere Therapie können bei gleichwertiger Wirksamkeit eine adjuvante lokoregionäre Nachbestrahlung oder eine systemische Therapie geplant werden [Hickey et al. 2006]. Dafür können Chemotherapie, endokrine Therapie und Antikörpertherapie (wenn HER2 positiv) in Frage kommen. In Ausnahmefällen wird auch eine neoadjuvante Chemotherapie eingesetzt.

Die endokrine Therapie des Mammakarzinoms ist die effektivste und eine sehr zielgerichtete Form der systemischen Behandlung. Sie wird bei positivem Rezeptorstatus eingesetzt, d.h. wenn die Tumorzelle Östrogenrezeptoren und / oder Progesteronrezeptoren exprimiert [Pritchard 2005]. Sie beruht darauf das Östrogenlevel zu reduzieren, die Östrogenrezeptorfunktion zu antagonisieren (z. B. durch Tamoxifen) oder das Östrogenrezeptorlevel zu senken (z. B. durch Fulvestrant) [Schiff et al. 2003].

Tamoxifen, ein nicht-steroidaler selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM), ist das Standardtherapeutikum, das kompetitiv an Östrogenrezeptoren auf den Tumorzellen bindet und so das durch Östrogene induzierte Zellwachstum hemmt. Außerdem wirkt es inhibierend auf Östrogen-regulierte Gene, Wachstumsfaktoren und Faktoren der Angiogenese, die der Tumor auto- oder parakrin sezerniert. Sowohl prä- als auch seltener postmenopausale Frauen werden damit behandelt [Kiechle 2007; Moy & Goss 2006; Osborne 1998; Schiff et al. 2003].

Bei postmenopausalen und bei ausgewählten prämenopausalen (der Ovarablation / -suppression folgend) Patientinnen bieten Aromatase-Inhibitoren eine weitere Therapiemöglichkeit. Sie werden anstelle oder nach der Behandlung mit Tamoxifen verwendet. Nach ihrer Struktur werden sie in steroidale und nicht-steroidale Hemmstoffe eingeteilt, die nicht direkt mit den Östrogenrezeptoren in Wechselwirkung treten. Die Aromatase-Inhibitoren blockieren die Enzyme, die Androstendion und Testosteron in Östron und Östradiol überführen [Carpenter & Miller 2005; Kiechle 2007]. Diese zeigen untereinander keine Kreuzresistenzen und können so auch nacheinander genutzt werden [Bertelli 2005; Carpenter & Miller 2005; Howell et al. 2003].

1.4.4 Charakterisierung der verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien

In den Experimenten werden die zwei Mammakarzinomzelllinien MCF-7- und SK-BR-3 eingesetzt. Diese sind Zellen von Adenokarzinomen kaukasischer Frauen, die in Zellkulturflaschen wachsen. Beide Zelllinien haben einen hypertriploiden Chromosomensatz [Fogh et al. 1977].

Die MCF-7 Zellen, die das Onkogen *tx-4* enthalten, weisen einige Charakteristika differenzierter Mammaepithelzellen auf, zu denen die Reaktion auf Stimulation mit Östradiol gehört. Dies erfolgt über die Östrogenrezeptoren, insbesondere den ER α . Die ER α / β -Ratio ist hoch [Brandes et al. 1983; Soule et al. 1973; Umekita et al. 1996; van Dijk et al. 1997]. Außerdem produzieren die Zellen die IGFBNs (insulin-like growth factor binding proteins) BP-2, BP-4 und BP-5 [Takahashi & Suzuki 1993]. Das HER2/*c-erb-2*-Genprodukt wird nicht exprimiert [Bacus et al. 1990]. Insgesamt dominiert die Expression der funktionellen ER α .

Durch Behandlung mit Antiöstrogenen wird die Sekretion der IGFBNs moduliert. Das Wachstum der MCF-7-Zellen (Verdopplungszeit ca. 29 Stunden) kann durch TNF α inhibiert werden [Pratt & Ollak 1993; Sugarman et al. 1985].

Im Gegensatz dazu bilden die SK-BR-3 Zellen in Mäusen nur wenig differenzierte Adenokarzinome. Sie sind nicht E2 responsiv, zeigen jedoch eine Überexpression des HER2/c-erb-2-Genprodukts (HER2⁺⁺⁺) [Hudziak et al. 1997]. Bei der ultrastrukturellen Untersuchung konnten Mikrovilli, Desmosomen, Glykogengranula, große Lysosomen und Bündel zytoplasmatischer Fibrillen identifiziert werden [Fogh et al. 1977]. Verglichen mit den MCF-7 Zellen weisen SK-BR-3 Zellen eine deutlich geringere Östrogenrezeptorexpression auf. Es dominiert die Expression des ER β .

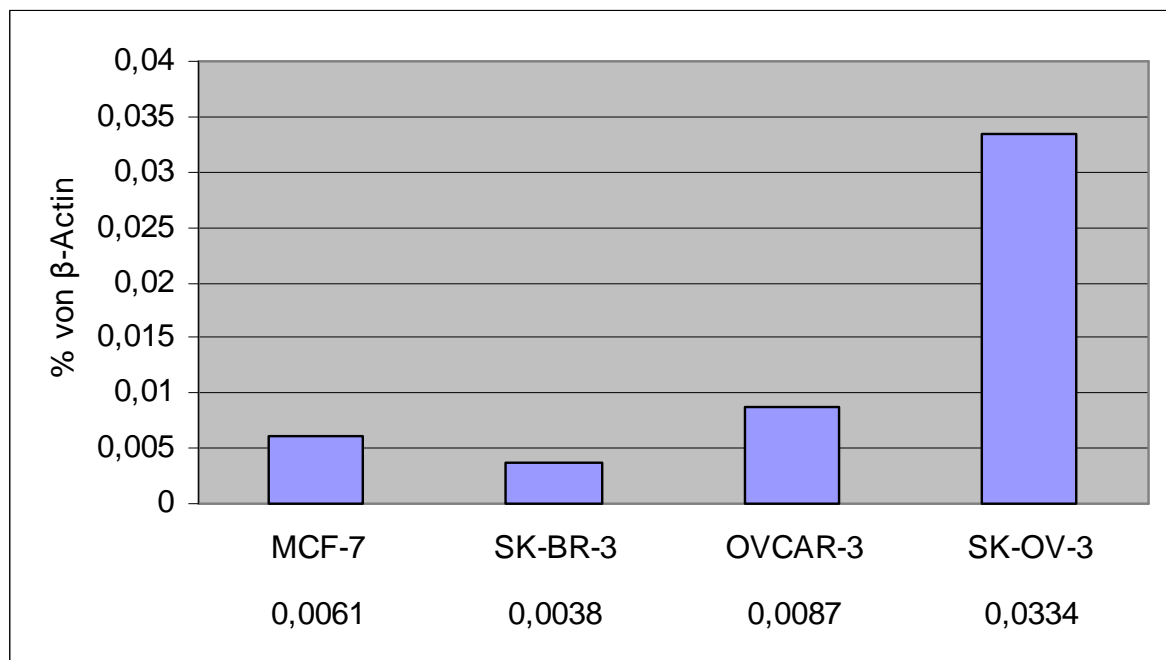


Abb. 2: Expression des ER α in den vier untersuchten Zelllinien im Vergleich untereinander bezogen auf die Expression von β -Actin

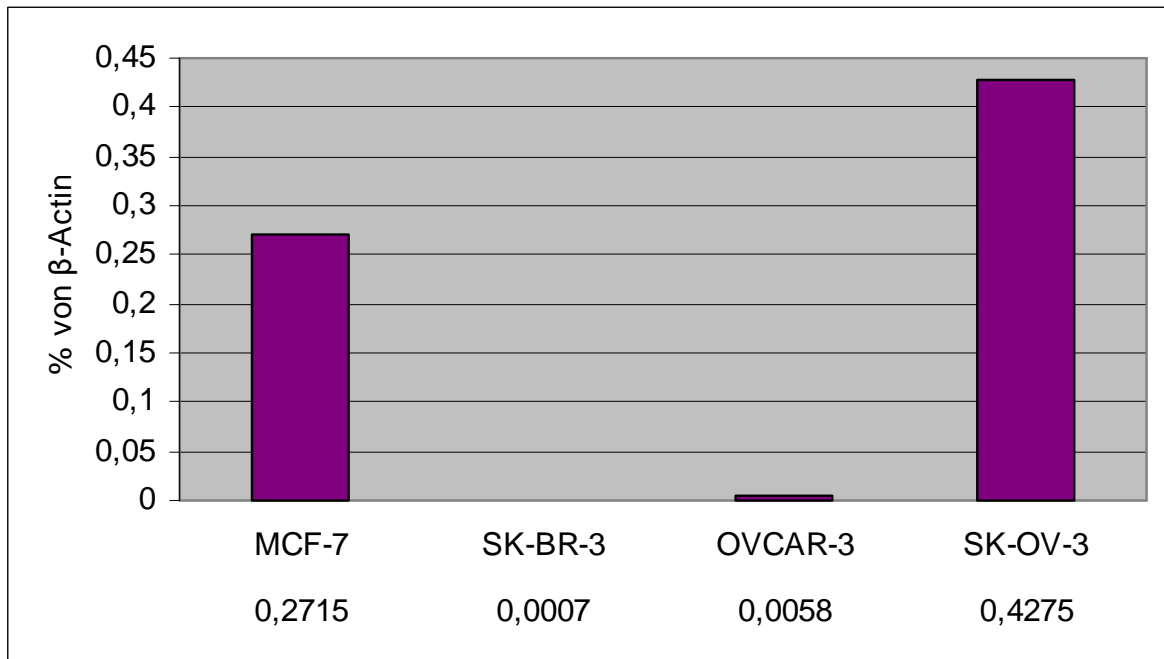


Abb. 3: Expression des ER β in den vier untersuchten Zelllinien im Vergleich untereinander bezogen auf die Expression von β -Actin

1.5 Ovarialkarzinom

1.5.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom ist der zweithäufigste maligne Genitaltumor (Anteil an weiblichen Krebserkrankungen 4,2 %). In Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 8.000 Frauen / Jahr (medianes Erkrankungsalter 62 Jahre), etwa 6.000 Frauen / Jahr versterben [Colombo et al. 2006; Kiechle 2007;]. Damit weist das Ovarialkarzinom die höchste Letalität aller gynäkologischen Malignome auf [Holschneider & Berek 2000].

1.5.2 Entstehung

Aufgrund des histologischen Aufbaus des Ovars aus unterschiedlichen Keimblättern und verschiedenen Zellarten lassen sich verschiedene Tumore ableiten. Die Neoplasien sind, ähnlich wie beim Mammakarzinom, Folgen der Akkumulation von genetischen Veränderungen durch Einwirkung von Karzinogenen, die zur Aktivierung von Onkogenen und dem Verlust von Tumorsuppressorgenen führen [Holschneider & Berek 2000].

Als Risikofaktoren für die Entstehung des Ovarialkarzinoms gelten zunehmendes Lebensalter, dauerhafte ovulatorische Zyklen, Infertilität, Nulliparität, medikamentöse Ovulationsauslösung, ein HNPCC und ein Mammakarzinom in der Anamnese [Colombo et al. 2006; Holschneider & Berek 2000; Lukanova & Kaaks 2005].

Annähernd 90 % der Ovarialkarzinome sind epithelialen Ursprungs, die sich in 75 % bis 80 % seröse, 10 % muköse und 10 % endometrioiden Tumore einteilen lassen [Colombo et al. 2006; Holschneider & Berek 2000; Kiechle 2007; Lukanova & Kaaks 2005].

1.5.3 Therapie

Die Therapie der Wahl ist operativ mit totaler Hysterektomie, bilateraler Salpingoophorektomie (Entfernung der Eileiter und Eierstöcke), Omentektomie (Entfernung des großen Netzes) und peritonealer Zytodiagnostik (Mortalität 1 bis 3 %) [Colombo et al. 2006]. Ziel ist die möglichst vollständige Resektion des Tumors; der verbleibende Resttumor ist für die weitere Prognose entscheidend. Adjuvant können Chemotherapie oder Strahlentherapie eingesetzt werden. Meist wird wegen geringerer Nebenwirkungen und Hinweisen auf beste Wirksamkeit auf die Chemotherapie mit Cisplatin (und Paclitaxel) zurückgegriffen [Colombo et al. 2006; Kiechle 2007].

1.5.4 Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinom-Zelllinien

OVCAR-3- und SK-OV-3-Zellen, die Adenokarzinomen ovariellen Ursprungs kaukasischer Frauen entstammen, können für Versuche in Kulturflaschen gezüchtet werden. In Mäusen sind beide Zelllinien karzinogen: Die SK-OV-3-Zellen bilden gut differenzierte Adenokarzinome übereinstimmend mit einem ovariellen Primum; nach subkutaner Inokulation von 10^7 OVCAR-3-Zellen entwickeln sich nach 21 Tagen Tumore (100 % Frequenz) [Fogh et al. 1977; Hamilton et al. 1983]. Gegenüber klinisch relevanten Konzentrationen der Chemotherapeutika Adriamycin, Melphalan und Cisplatin sind OVCAR-3-Zellen *in vitro* resistent [Caffrey & Frenkel 1992; Omelyanenko et al. 1998; Rogan et al. 1984]. Auch die SK-OV-3-Zellen zeigen Resistenzen gegenüber Cis-Platin und Adriamycin. Außerdem können auch Diphtherie-Toxin und TNF nicht auf ihr Wachstum und Überleben einwirken [Morimoto et al. 1991; Morimoto et al. 1993; Zhang et al. 1997].

Die OVCAR-3-Zellen weisen eine Aneuploidie bei nahezu triploidem Chromosomensatz auf. Sie sind androgen-, progesteron- und östrogenrezeptorpositiv. Sie sind ebenfalls in der Lage nicht-steroidale Östrogene und Antiöstrogene zu binden.

Durch Behandlung mit E2 wird die Expression der Progesteronrezeptoren dieser Zellen induziert [Hamilton et al. 1983; Hamilton et al. 1984].

Die hypoploide Zelllinie SK-OV-3 überexprimiert den HER2/c-erb-2, aber keinen normalen ER α . Dieser enthält eine Mutation, wodurch die Zellen nicht E2 responsiv sind [Fogh et al. 1977; Yu et al. 1993].

Im Vergleich der beiden Zelllinien fallen deutlich erhöhte Expressionsraten sowohl des ER α als auch des ER β bei den SK-OV-3 Zellen auf. Insbesondere zeigt sich eine deutliche Überexpression des ER α . Dennoch sind diese Rezeptoren nicht funktional; es dominiert das HER2/c-erb-2-System. In der Zelllinie OVCAR-3 dominiert die ER β -Expression [siehe auch Abb. 2 und Abb. 3].

1.6 Fragestellung

Die bei prämenopausalen Frauen hauptsächlich im Ovar synthetisierten Östrogene üben verschiedene Wirkungen auf normale und maligne Zellen der Brust aus, wobei viele Effekte über die Regulation der Transkription von Genen vermittelt werden. Darin involviert sind der Zellzyklus, die Differenzierung und die Apoptose. Auch *icb-1* scheint bei der Differenzierung eine Rolle zu spielen, wie bisherige Studien zeigen. Da dieses Gen auch in Mamma- und Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert wird, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich seine Expression nach Östrogenstimulation verändert. Die Expression von *icb-1 α* sollte zu diesem Zweck in Östrogenrezeptor (ER) α -positiven und -negativen Karzinom-Zelllinien der Brust und des Ovars in Abhängigkeit von einer Östrogenstimulation untersucht werden. Zur Verifizierung einer eventuell beobachteten Östrogen-Abhängigkeit der *icb-1* Expression sollte zudem eine Kombinations-Behandlung mit Antiöstrogenen durchgeführt werden. ER α und β vermitteln viele genomische und nicht-genomische Effekte des Östrogens, wobei diese Rezeptoren synergistisch und antagonistisch wirken können. Es sollte daher außerdem durch den Einsatz spezifischer Agonisten geklärt werden, welcher ER-Typ für eine mögliche *icb-1*-Regulation verantwortlich sein könnte.

Viele Transkriptionsänderungen von östrogenabhängigen Genen werden durch EREs vermittelt. Auch die Sequenz der regulatorischen Region des Gens *icb-1* soll auf das Vorhandensein eines EREs oder einer ERE-ähnlichen Sequenz untersucht werden.

Die Genexpression gesunder und maligne transformierter Gewebe unterscheiden sich häufig. Daher sollte die *icb-1* Expression in Proben gesunder und am Mammakarzinom erkrankter Frauen ebenso untersucht werden wie seine Expression im Ovarialkarzinom.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien und Human Breast Cancer Rapid-Scan™

- Zelllinien

MCF-7 [ATCC®, Teddington, UK]

Sugarman BJ et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230:943-945, 1985. Pubmed: 3933111

SK-OV-3 [ATCC®, Teddington, UK]

Fogh J, editor. Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press; 1975, pp.115-159

SK-BR-3 [ATCC®, Teddington, UK]

Fogh J, editor. Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press; 1975, pp.115-159

OVCAR-3 [ATCC®, Teddington, UK]

Hamilton TC et al. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. Cancer Res. 43: 5379-5389, 1983. Pubmed: 6604576

- Human Breast Cancer Rapid-Scan™ [Rockville, MD, USA]

Probe	Tumortyp	Grading
1 - 12	Gesund	-
13	Invasiv gemischt-tubuläres Karzinom	5
14	Invasiv duktales Karzinom	9
15	Invasiv lobuläres Karzinom	6
16	Invasiv duktales Karzinom	7
17	Invasiv duktales Karzinom	?

Probe	Tumortyp	Grading
18	Invasiv duktales Karzinom	6
19	Invasiv duktales Karzinom	5
20	Invasiv duktales Karzinom	6
21	Adenoid zystisches Karzinom	-
22	Invasiv duktales Karzinom	5
23	Duktales Karzinoma-in-situ	-
24	Invasiv duktales Karzinom	8

- Proben des Ovariakarzinoms

Pool neun verschiedener Gewebeproben von am Ovariakarzinom erkrankten Patientinnen der Universitätsfrauenklinik in Regensburg

2.1.2 Zellkultur-Reagenzien

E2 = β -Estradiol

Gemisch aus

1,3,5-Estratriene-3,17 β -diol (Puder, γ -bestrahlt, Zellkultur getestet) [Sigma-Aldrich Corporation[®], St. Louis, MO, USA]

1,3,5-Estratriene-3,17 β -diol (≥ 98 % Puder, Zellkultur getestet) [Sigma-Aldrich Corporation[®], St. Louis, MO, USA]

Cyclodextrin-encapsulated 17 β -estradiol (Zellkultur getestet) [Sigma-Aldrich Corporation[®], St. Louis, MO, USA]

PPT = 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol [Tocris Bioscience[®], Ellisville, MO, USA]

DPN = 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile [Tocris Bioscience[®], Ellisville, MO, USA]

TAM = 4-Hydroxytamoxifen =
(Z)-4-(1-[4-(Dimethylamino-ethoxy)phenyl]-2-phenyl-1-

butenyl)phenol [Sigma-Aldrich Corporation[®], St. Louis, MO, USA]

ICI 182,780 = 7 α ,17 β -[9[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol [Tocris Bioscience[®], Ellisville, MO, USA]

Zykloheximid = 4-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxo-cyclohexyl)-2-hydroxyethyl]-2, 6-piperidinedion [Tocris Bioscience[®], Ellisville, MO, USA]

2.1.3 Chemikalien

RNA-Isolierung: 70 % iger Ethanol [Baker[®], Phillipsburg, NJ, USA]
 Buffer RW 1 (Wash buffer) [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 Buffer RLT (Lysis buffer) [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 DNase I, RNase-free (lyophilized) [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 Buffer RDD (DNA Digest Buffer) [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 Buffer RPE (concentrate) (Wash buffer) [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 RNase-freies Wasser [Qiagen[®], Hilden, Germany]

cDNA-Synthese: Random Primers 3 μ g/ μ l [invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA]
 RNasin[®] Plus (RNase Inhibitor) 40 U/ μ l [Promega[®], Madison, WI, USA]
 M-MLV RT¹ 5x Buffer [Promega[®], Madison, WI, USA]
 10 mM dNTP Mix (PCR Grade) [invitrogen[®] (Carlsbad, CA, USA)]
 M-MLV RT RNase H(-) Point Mutant 200 U/ μ l [Promega[®], Madison, WI, USA]
 RNase-freies Wasser [Qiagen[®], Hilden, Germany]

Real-time PCR: QuantiTect[™] SYBR[®] Green PCR Master Mix [Qiagen[®], Hilden, Germany]
 Primer [metabion[®], Martinsried, Germany]:

¹ M-MLV = moloney murine leukoblasosis virus = Enzym eines Affen befallenden Virus

Primer	Nukleotidsequenz
icb alpha2 neu	5'-GGA ACC TCC AGG ATC TCC AT-3'
icb multi 1	5'-TGA AAG ACC TCG TCC TCA CC-3'
β -Actin 2573	5'-CTG TGG CAT CCA CGA AAC TA-3'
β -Actin 2876	5'-CGC TCA GGA GGA GCA ATG-3'
ERAL1	5'-TGA TGA AAG GTG GGA TAC GA-3'
ERAL2	5'-AAG GTT GGC AGC TCT CAT GT-3'

RNase-freies Wasser [Qiagen[®], Hilden, Germany]

Gelelektrophorese: SeaKem[®] LE Agarose [Biozym[®], Hessisch Oldendorf, Germany]

10 x TBE-Puffer:

121,1 g 1,00 M TRIS Ultra Qualität [Roth[®], Karlsruhe, Germany]
 55,6 g 0,90 M Borsäure [Roth[®], Karlsruhe, Germany]
 3,7 g 0,01 M EDTA, Disodium Salt, Dihydrate, Molecular Biology Grade [Calbiochem[®], San Diego, CA, USA]
 bis zu 1 l H₂O

Ethidiumbromidlösung 1 % (10 mg/ml) [Roth[®], Karlsruhe, Germany]

10 x Ladepuffer [Biometra[®], Göttingen, Germany]:

5,00 ml 50 % Glycerol
 0,37 g 0,1 M Na₂EDTAx2H₂O
 0,10 g 1 % Natriumdodecylsulfat
 0,01 g 0,1 % Bromphenol Blau
 bis zu 10 ml H₂O

50 bp DNA Ladder (1,0 µg/µl) [invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA]

1 Kb Plus DNA Ladder (1,0 µg/µl) [invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA]

2.1.4 Gefäße und Geräte

RNA-Isolierung: Thermomixer compact [Eppendorf[®], Hamburg, Germany]

RNeasy[®] Mini Kit 250 [Qiagen[®], Hilden, Germany]:

- RNeasy Mini Spin Columns
- Collection Tubes (1,5 ml)
- Collection Tubes (2 ml)

RNA-Konzentrationsbestimmung:

GeneRay UV-Photometer [Biometra[®], Göttingen, Germany]

Präzisionsküvetten Suprasil[®] [Hellma[®], Müllheim, Germany]

cDNA-Synthese: Thermocycler T-Gradient 96 [Biometra[®], Göttingen, Germany]

Real-time PCR: LightCycler [Roche[®], Basel, Switzerland]

LightCycler Cappilaries (20µl) [Roche[®], Basel, Switzerland]

Gelelektrophorese: Multigel-Long [Biometra[®], Göttingen, Germany]

Standard Power Pack P25 [Biometra[®], Göttingen, Germany]

2.1.5 Weitere verwendete Materialien

Pipetten [Eppendorf[®], Hamburg, Germany]:

Eppendorf[®] Reference 10

Eppendorf[®] Reference 20

Eppendorf[®] Reference 100

Eppendorf[®] Reference 1000

Pipettenspitzen [Sarstedt[®], Nümbrecht, Germany]:

Pipettenspitze 10 µl

Pipettenspitze 200 µl

Pipettenspitze 1000 µl

Biosphere[®] Filter Tips 10 µl type Gilson/Biohit
Biosphere[®] Filter Tips 20 µl type Eppendorf
Biosphere[®] Filter Tips 100 µl type Eppendorf/Gilson
Biosphere[®] Filter Tips 200 µl type Biohit/Labsystems
100 Biosphere[®] Filter Tips

Reaktionsgefäße 1,5 ml [Biozym[®], Hessisch Oldendorf, Germany]

Zentrifuge Biofuge pico [Heraeus[®], Waltham, MA, USA]

Mikrozentrifuge [Qualitron[®], Karachi, Pakistan]

MS 2 Minishaker [IKA[®], Wilmington, NC, USA]

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus den Zellen mittels RNeasy[®] Mini Kit 250 (Fa. Qiagen[®]) isoliert. Die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikagel-Membran und die Mikrosäulenzentrifugation werden bei dieser Vorgehensweise genutzt.

Die in Mercaptoethanol und Lysepuffer bei -80°C gelagerten Zellen wurden eine halbe Stunde bei 37°C im Thermomixer compact (800 rpm) aufgetaut. Der Guanidin-Thiocyanat-enthaltende Puffer führt zu Lyse und Homogenisierung der Zellen. Außerdem wurden zu jedem Ansatz 350 µl gekühlter 70-prozentiger Ethanol hinzugegeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde die Probe gemischt. Dann wurde der Inhalt auf RNeasy Mini Spin Columns übertragen. Zwischen deren Silikagel-Membran und der RNA können sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Das zugegebene Ethanol schafft dafür die günstigsten Bedingungen. In einem weiteren Schritt wurde 350 µl Buffer RW 1 hinzugefügt. Nach jedem Schritt wurde kurz bei 13000 U/min zentrifugiert.

10 µl DNase und 70 µl Buffer RDD pro Ansatz wurden vorsichtig vermischt und mit den Proben versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit wurde wiederum 350 µl Buffer RW 1 hinzugegeben, dann wurde durch Zentrifugation die DNA ausgefällt. Danach wurden zweimal je 500 µl Buffer RPE zugefügt. Hier wurde jeweils 2 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Somit wurden andere zelluläre Bestandteile, wie Proteine und Salze beseitigt. Die Zentrifugation wurde in einem letzten Schritt zur Entfernung des übrigen Ethanol noch einmal ohne Zugabe einer weiteren Reagenz wiederholt. Um nun die RNA zu eluieren wurden 40 µl RNase freies Wasser zu den Proben gegeben und ausgefällt.

Die RNA-Isolierung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, die isolierte RNA sofort auf Eis gekühlt und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.2.2 Messung der RNA-Konzentration

Mittels Photometer wurde über die Absorptionsmessung der RNA-Gehalt der Proben bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotient A_{260}/A_{280} bestimmt. Diese Ratio sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, um eine Verunreinigung der isolierten RNA durch zum Beispiel Lösungsmittel oder Proteine ausschließen zu können.

Zur Konzentrationsmessung wurden je 9 µl Wasser vorgelegt, zu denen 1 µl RNA zugemischt wurde. Nach Eichung des Photometers mit Hilfe einer RNase-freien Wasserprobe wurde die Konzentration der RNA jeder einzelnen Probe ermittelt.

2.2.3 c-DNA-Synthese

Bei der c-DNA-Synthese werden DNA-Kopien aus mRNA hergestellt. Dazu wird eine Reverse Transkriptase benötigt. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die vorhandene mRNA-Moleküle *in vitro* in komplementäre DNA umschreiben kann. Außerdem enthält die Reverse Transkriptase eine Ribonuklease. So kann der RNA-Teil des entstandenen RNA-DNA-Hybridstranges hydrolysiert werden und in einem zweiten Durchgang ein vollständiger DNA-Doppelstrang synthetisiert werden.

Zur Herstellung von c-DNA wurde jeweils 1 µg der gewonnenen Gesamt-RNA eingesetzt. Mit RNase-freiem Wasser wurde jede Probe auf 12 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Hinzugefügt wurden dann 1 µl Random Primers und 1 µl RNasin® Plus. Im auf 70°C vorgeheizten Thermocycler wurden die Proben 5 min erwärmt, dann ebenfalls 5 min auf Eis wieder abgekühlt. Damit wurde eine Startsequenz an das Poly(A)-Ende der mRNA-Moleküle hybridisiert. Dann wurde ein Mastermix vorbereitet. Für jede Probe wurden 5 µl M-MLV RT 5x Buffer, 1,25 µl 10 mM dNTP Mix, 0,5 µl M-MLV RT RNase H(-) Point Mutant und 4,25 µl RNase-freies Wasser eingesetzt. 11 µl dieses Mastermix wurden zu jedem Ansatz hinzugegeben und gründlich durchmischt. Erneut wurde der Thermocycler vorgeheizt. In drei Schritten wurde die reverse Transkription durchgeführt. Dazu wurden die Proben 10 min bei 25°C, 50 min bei 48°C und schließlich 15 min bei 70°C inkubiert. Die c-DNA wurde dann auf 4°C abgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung wurde sie bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Real-time PCR mit LightCycler®

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) können kleine, definierte DNA-Abschnitte selektiv amplifiziert werden. Dazu müssen zumindest Teile der zu vermehrenden Sequenz bekannt sein, um die zwei spezifischen Primer für das interessierende Gen einsetzen zu können. Bei der In-vitro-Reaktion kann eine millionenfache Ver-

vielfältigung einer Zielsequenz erreicht werden, da die c-DNA-Menge bei jeder Wiederholung exponentiell ansteigt. Dennoch erfolgt keine unbegrenzte Vermehrung der Sequenz. Neben der begrenzten Enzymmenge nimmt auch dessen Aktivität während des Reaktionsverlaufs durch Denaturierung ab. Durch den molaren Überschuss des entstehenden PCR-Produktes wird die Reaktion limitiert (entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik). Außerdem hybridisieren mit steigender Zahl die Einzelstränge untereinander, so dass die Primer sich nicht mehr im gleichen Ausmaß anlagern können.

Um die Zunahme der DNA-Kopien in Echtzeit darstellen zu können, werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Diese schieben sich interkalierend in DNA-Doppelstränge ein. Nur dann kann das emittierte Licht gemessen werden. Der freie Farbstoff, der nicht in die DNA eingelagert ist, sendet keine Signale aus.

Die Amplifikation und die Detektion von PCR-Produkten kann so während des Reaktionsverlaufs in Echtzeit gezeigt werden.

Für die RT-PCR mit dem LightCycler[®] wurde zunächst ein Mastermix hergestellt. Dieser enthielt für jede Probe 10 µl SYBR[®] Green, 6 µl Wasser und 2 µl Primermix. Der Primermix ist eine im Verhältnis 1:1 gemischte Lösung aus den synthetisierten Oligonukleotiden für den Ansatz an 3' bzw. 5'-Ende des zu amplifizierenden Gens. Die Primer, die eine Länge von 15 bis 25 Nukleotiden haben, sind für die Spezifität und Sensitivität der PCR verantwortlich.

Zur Bestimmung der Genexpression mit dem LightCycler[®] wurden die Reagenzien bestehend aus 18 µl des Mastermix und je 2 µl der cDNA-Probe in Glaskapillaren gefüllt.

Die cDNA wurde bis zur Zugabe bei -20°C aufbewahrt. Bei jedem Versuch wurden auch Negativkontrollen eingesetzt. Nach Verschluss und Zentrifugation wurden die Kapillaren in die Haltevorrichtung (Kapillarenkarussell) des LightCyclers[®] gestellt. Durch das besonders günstige Verhältnis von Volumen und Oberfläche der Glas-

kapillaren sind sehr schnelle Temperaturänderungen möglich. Diese werden durch unterschiedlich temperierte Luftströme erreicht.

Zunächst erfolgte eine 15 min dauernde Denaturierung bei 95°C. Dann wurde in 38 Zyklen die PCR durchgeführt. Die einzelnen Zyklen gliederten sich in folgende Abschnitte:

1. Denaturierung für 10 s bei 95°C
2. Primerhybridisierung für 30 s bei 56°C (Annealing)
3. Synthese weiterer c-DNA bei 72°C für ebenfalls 30 s (Elongation)

Zum Abschluss wurde eine Schmelzkurve ermittelt. Dazu wurden die Proben noch einmal kurz auf 95°C erhitzt und sofort wieder auf 40°C abgekühlt.

Zur graphischen Darstellung des Reaktionsverlaufes dienten die im Mastermix enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe. Das hier verwendete SYBR[®] Green fñgt sich interkalierend in die Doppelhelix ein. Werden die Proben über eine Leuchtdiode angestrahlt, emittiert der angeregte Farbstoff Licht. Dieses Fluoreszenzsignal wird am Ende der Elongationsphase gemessen, wenn in jedem Zyklus die maximale amplifizierte Menge an doppelsträngiger DNA vorliegt. Während der Denaturierung löst sich der SYBR Green-Farbstoff wieder aus der doppelsträngigen DNA heraus.

Das Kapillarenkarussell, in dem die Glaskapillaren nebeneinander stehen, rotiert während der PCR-Zyklen schrittweise, so dass das emittierte Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Probe dargestellt werden kann. In elektrische Signale umgewandelt werden die Ergebnisse in Echtzeit am Computer graphisch dargestellt. Die Daten der real-time RT-PCR wurden in jedem Zyklus bei der Annealing Temperatur aufgenommen. Auch bei der Schmelzkurvenanalyse wurde die Emission aufgezeichnet.

Aus einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz über der Zeit (in PCR Zyklen) aufgetragen ist, lässt sich der Threshold-Zyklus (CT) bestimmen. Der CT-Wert gibt

an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz einer Probe erstmalig deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Es gilt: Je mehr Ziel-Gen in der Ausgangsprobe vorhanden ist, desto kleiner ist der CT-Wert.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Moleküle aufgetrennt, die aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld wandern. Bei Nukleinsäuren sind die Hauptladungsträger Phosphat-Gruppen, so dass jede Base den gleichen pK-Wert aufweist. Mittels Agarose als Trägermatrix können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dieses pflanzliche Polysaccharid bildet beim Erhitzen doppelhelikale Abschnitte aus, so dass innerhalb des Gels eine „netzartige“ Struktur durch Wasserstoffbrückenbindungen entsteht. Die Größe der Poren, die abhängig von der Agarosekonzentration ist, bestimmt die ihrer Größe entsprechenden Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle, wobei sich kleinere Fragmente schneller als größere bewegen. Die im Gel durchlaufene Strecke variiert annähernd zum Molekulargewicht. Mit Hilfe verschiedener DNA-Fragmentlängenstandards bekannter Größe kann die Größe der DNA-Segmente bestimmt werden.

Um die einzelnen Banden sichtbar zu machen, werden dem Gel interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid hinzugefügt. Diese lagern sich zwischen den Basen der DNA ein, wodurch das Fluoreszenzsignal an diesen Stellen im Vergleich zum freien Farbstoff intensiviert wird.

Zur Herstellung des 1,5-prozentigen Agarosegels wurden zunächst 2,7 g (bzw. 0,9 g für eine kleinere Gelkammer) LE-Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen. Dazu wurden 180 ml (bzw. 60 ml) 10x TBE-Puffer gegeben und erneut gewogen. Die Suspension wurde etwa 3 min erhitzt bis sich das Pulver gelöst hatte und eine klare Flüssigkeit entstanden war. Der verdampfte Teil des 10x TBE-Puffers wurde hinzugefügt und die Menge damit wieder auf das Ursprungsgewicht aufgefüllt. Unter Rühren wurde die Lösung etwas abgekühlt, bevor dann 9 µl (bzw.

3 µl) Ethidiumbromid beigemischt wurden. Dann wurde die Flüssigkeit in eine Gelkammer gegossen und Kämme eingesetzt. Nach dem Erkalten und Erstarren des Gels wurde es in das Multigel-Long eingelegt, mit 10x TBE-Puffer überschichtet und die Kämme entfernt.

Zu den Proben, die aus den Glaskapillaren vollständig in Eppendorf®-Gefäße überführt wurden, wurden je 2 µl des 10x Ladepuffers zugefügt. Durch die Wechselwirkung des Puffers mit der DNA änderte sich deren Dichte, so dass sie leichter in die Geltaschen sinken konnte. Durch den blauen Farbstoff ist das Auftragen erleichtert, und es kann außerdem die Wanderung der Fragmente im Verlauf beobachtet werden.

Nach sorgfältigem Mischen und Zentrifugieren der Proben konnten die Geltaschen befüllt werden. An den Anfang und das Ende jeder Versuchsreihe wurden je 20 µl 50 bp oder 1 kb DNA Ladder gegeben, um die Größe der entstehenden Bande ermitteln zu können. Dann wurden die übrigen Gelkammern mit je 20 µl der Probe und Negativkontrolle befüllt.

Eine Stromstärke von 180 mA wurde angelegt und etwa 60 min (bzw. 50 min) belassen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde unter Bestrahlung mit UV-Licht das Ergebnis direkt per Foto festgehalten. Die DNA-Banden leuchten durch das Ethidiumbromid auf.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis einer ERE-ähnlichen Sequenz in der Promotorregion des Gens *icb-1*

In der Promotorregion des Gens *icb-1* konnte beim Vergleich mit den ERE der Gene für Vitellogenin, pS2 und Calbindin eine stark ERE-ähnliche Sequenz gefunden werden. Diese weicht nur an zwei Positionen von der Konsensussequenz ab und unterscheidet sich nur an einer von der des Calbindin. Im Vergleich mit der bekannten Konsensussequenz ließ sich bei der Suche mit Hilfe spezieller Software zunächst kein Ergebnis erzielen. Erst durch die manuelle Suche wurde eine ERE-ähnliche Sequenz in der Promotorregion des Gens *icb-1* nachgewiesen.

Gen	ERE-Sequenz
Vitellogenin (Konsensussequenz) [Burch et al. 1988; Klein-Hitpass et al. 1988]	GGTCANNNTGACC
pS2 [Berry et al. 1989]	GGTCANNNTGGCC
Calbindin [Darwish et al. 1991]	GGTCANNNTGATC
<i>icb-1</i>	GGTCANNNTGGTC

Tab. 1: Übereinstimmung der Sequenzen ERE-enhaltender Gene mit der in der Promotorregion des Gens *icb-1* gefundenen Sequenz

3.2 Expression von *icb-1 α*

In einer Reihe von Versuchen wurden die dem Gewebe der Mamma entstammenden Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 sowie die dem des Ovars entstammenden Zelllinien OVCAR-3 und SK-OV-3 auf die Expression der Spleißvariante *icb-1 α* des Gens *icb-1* überprüft. Aus jeder Zelllinie wurde zunächst RNA isoliert, aus der dann cDNA hergestellt wurde. Mit Hilfe der Primer *icb-1 alpha2 neu* und *icb-1*

multi 1 wurde eine PCR durchgeführt. Anschließend konnte durch Agarosegelelektrophorese in den Proben der vier Zelllinien *icb-1α* nachgewiesen werden.

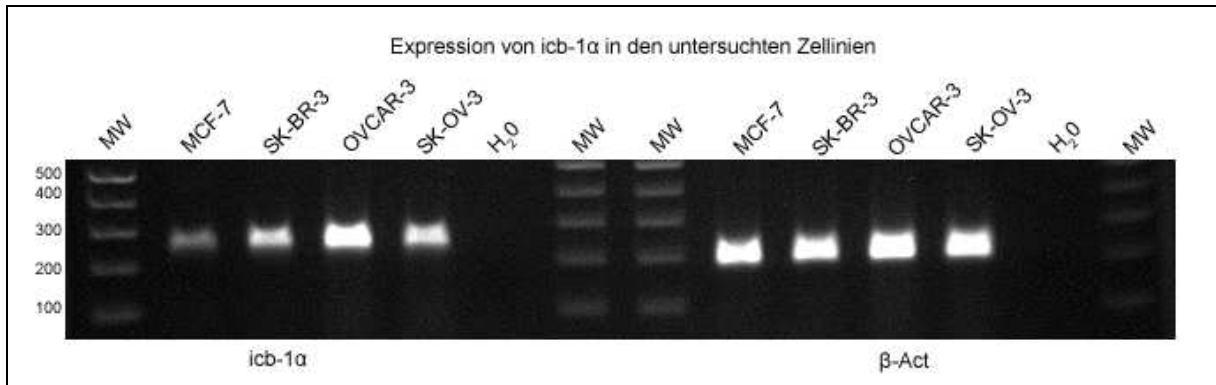


Abb. 4: *Icb-1α* spezifische RT-PCR der isolierten RNA aus verschiedenen Zelllinien. Als Positivkontrolle wurde ein β -Actin-Fragment genutzt, als Negativkontrolle dienten Wasserproben

3.3 Expression von *icb-1α* nach Stimulation der Zelllinien mit 17- β -Östradiol

Die malignen Tumoren der Frau zeigen oft ein hormonabhängiges Wachstum [Kiechle 2007]. Außerdem konnte in der Promotorregion von *icb-1* eine ERE-ähnliche Sequenz nachgewiesen werden. So sollten nun die je zwei Zelllinien aus Mamma und Ovar daraufhin untersucht werden, ob sich durch Stimulation mit E2 die Expression des Gens *icb-1* verändert. Die Zellen wurden in der Kultur über 24 Stunden mit 3 nM E2 inkubiert. Danach wurde ihre *icb-1* Expression mit der nicht-stimulierten Zellen mittels real-time RT-PCR verglichen.

3.3.1 Einfluss der Stimulation mit 17- β -Östradiol auf die Expression in Zelllinien der Mamma

Beim Wildtyp der nicht E2-responsiven aber HER 2 positiven (HER 2⁺⁺⁺) SK-BR-3 Zellen erhöhte sich die Expression von *icb-1α* der mit 3 nM E2 stimulierten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen (100 %). Nach der Stimulation steigerte sich das relative mRNA-Level auf immerhin 139,1 % (n=13; p<0,01).

Die E2-responsive und ER α -exprimierende MCF-7 Zelllinie wurde ebenfalls untersucht. Hier zeigte der Wildtyp nach Stimulation mit 3 nM E2 den eindrucksvollsten Anstieg aller vier untersuchten Zelllinien. Das relative mRNA-Level von *icb-1 α* erhöhte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100 %) auf über das Doppelte 223,0 % (n=9; p<0,01).

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-BR-3 WT	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	139,1	44,3
MCF-7 WT	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	223,0	55,9

Tab. 2: Effekt der E2-Stimulation auf die *icb-1 α* -Expression in den Zelllinien der Mamma im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

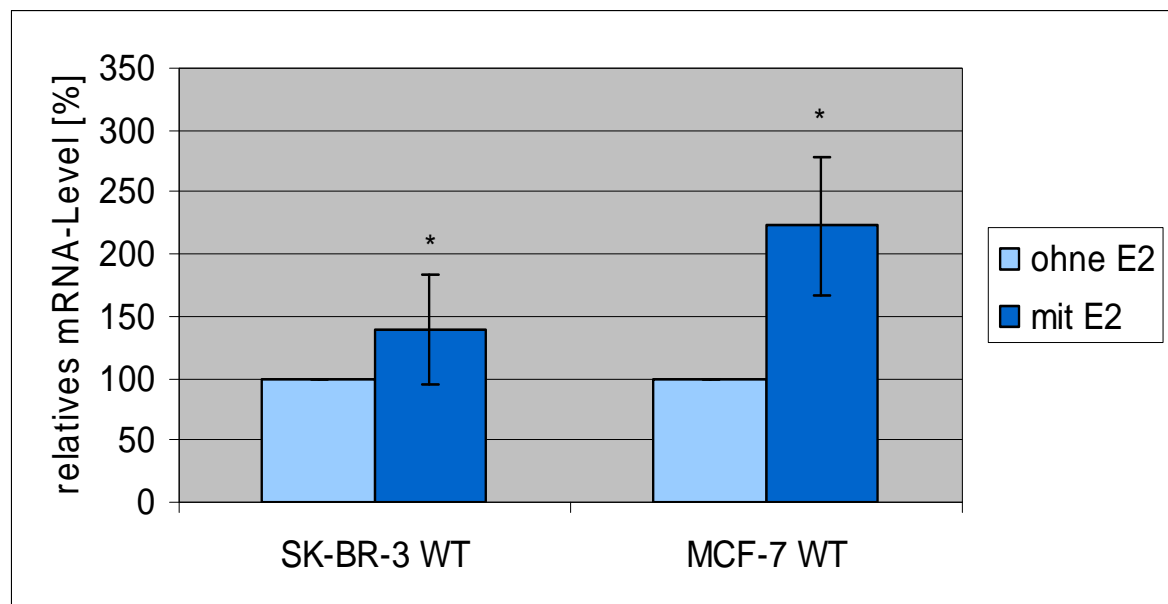


Abb. 5: Expression von *icb-1 α* in SK-BR-3 und MCF-7 Wildtypzellen nach Stimulation mit E2 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * p<0,01 vs. unstimulierte Kontrolle)

3.3.2 Einfluss der Stimulation mit 17- β -Östradiol auf die Expression in Zelllinien des Ovars

Die SK-OV-3 Zellen sind HER 2 positiv (HER 2⁺⁺⁺), aber weder E2-responsiv noch exprimieren sie einen funktionsfähigen ER α . Bei dem Wildtyp dieser Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation mit E2 die Expression von *icb-1- α* steigert. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100 %) erhöhte sich die Expression bei Hinzufügen von 3 nM E2 auf etwa 160 % (n=12; p<0,01).

Als weitere Zelllinie des Ovars wurde OVCAR-3 untersucht, die im Gegensatz zu den SK-OV-3 Zellen E2-responsiv ist. Außerdem exprimieren diese Zellen den ER α . Bei den mit E2 inkubierten Wildtypzellen erhöhte sich die Expression von *icb-1 α* deutlich auf das Doppelte (n=11; p<0,01).

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-OV-3 WT	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	164,1	52,8
OVCAR-3 WT	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	200,7	44,1

Tab. 3: *icb-1 α* -Expression der Zelllinien des Ovars nach 17- β -Östradiolstimulation und in den unbehandelten Kontrollen

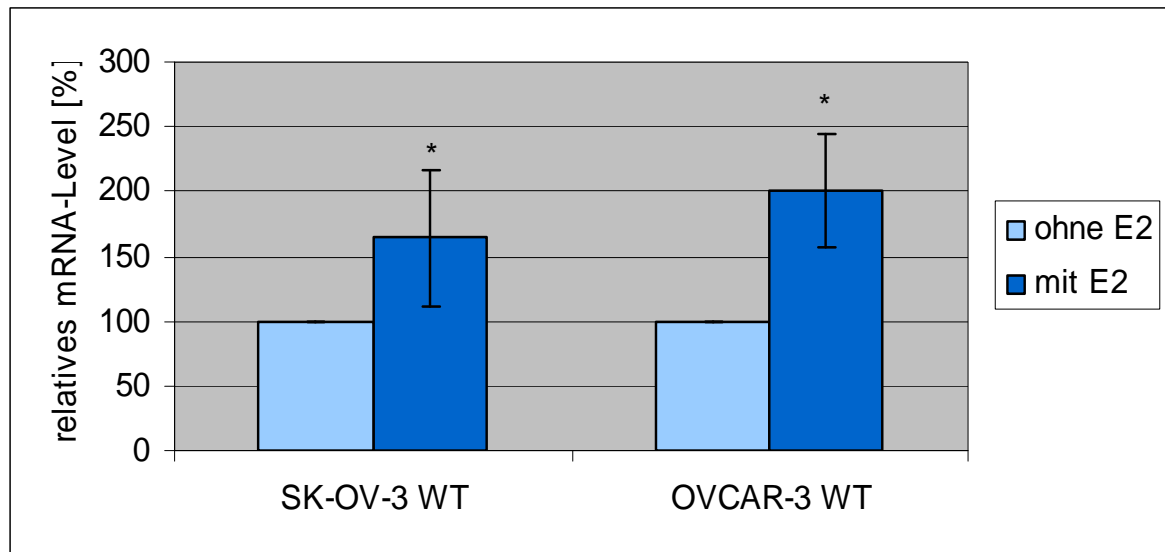


Abb. 6: Expression von *icb-1 α* in SK-OV-3 und OVCAR-3 Wildtypzellen nach Stimulation mit E2 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. unstimulierte Kontrolle)

3.4 Molekulare Mechanismen der E2-induzierten Steigerung der *icb-1*-Expression

3.4.1 Zeitabhängige Stimulation von MCF-7 Zellen mit 17- β -Östradiol

Die Steigerung der Expression von *icb-1 α* in den vier untersuchten Zelllinien könnte über die ERE-ähnliche Sequenz vermittelt werden. Die Effekte auf die Transkription, die direkt über das ERE zustande kommen, wirken sich sehr schnell aus (immediate response). Muss jedoch erst ein weiteres Protein synthetisiert werden, dauert der Anstieg der Expression entsprechend länger (secondary response).

In vier Versuchen wurde das *icb-1 α* -Level nach Stimulation mit 17- β -Östradiol über einen Zeitraum von 6, 12, 24 und 48 Stunden jeweils im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle (100 %) überprüft. In den ersten 6 h verminderte sich die Expression deutlich auf 68,1 % ($n=12$; $p < 0,01$), während nach 12 h weder Abfall noch Anstieg festgestellt werden konnte ($n=12$; nicht signifikant). Erst nach der Stimulation über einen Tag erhöhte sich das cDNA-Level von *icb-1 α* außer-

ordentlich auf 223,0 % (n=9; p<0,01), der sich dann nach 48 h mit 206,6 % auf diesem hohen Level kaum mehr veränderte (n=14; p<0,01).

Zelltyp	Stimulation			Mittelwert	Standardabweichung
MCF-7 WT	6 h	ohne	E2	100,0	0,0
	6 h	mit	E2	68,1	32,0
	12 h	ohne	E2	100,0	0,0
	12 h	mit	E2	92,1	35,7
	24 h	ohne	E2	100,0	0,0
	24 h	mit	E2	223,0	55,9
	48 h	ohne	E2	100,0	0,0
48 h	mit	E2	206,6	54,8	

Tab. 4: Veränderung der Expression von *icb-1 α* in MCF-7 WT-Zellen nach Stimulation mit 17- β -Östradiol über verschiedene Zeiträume

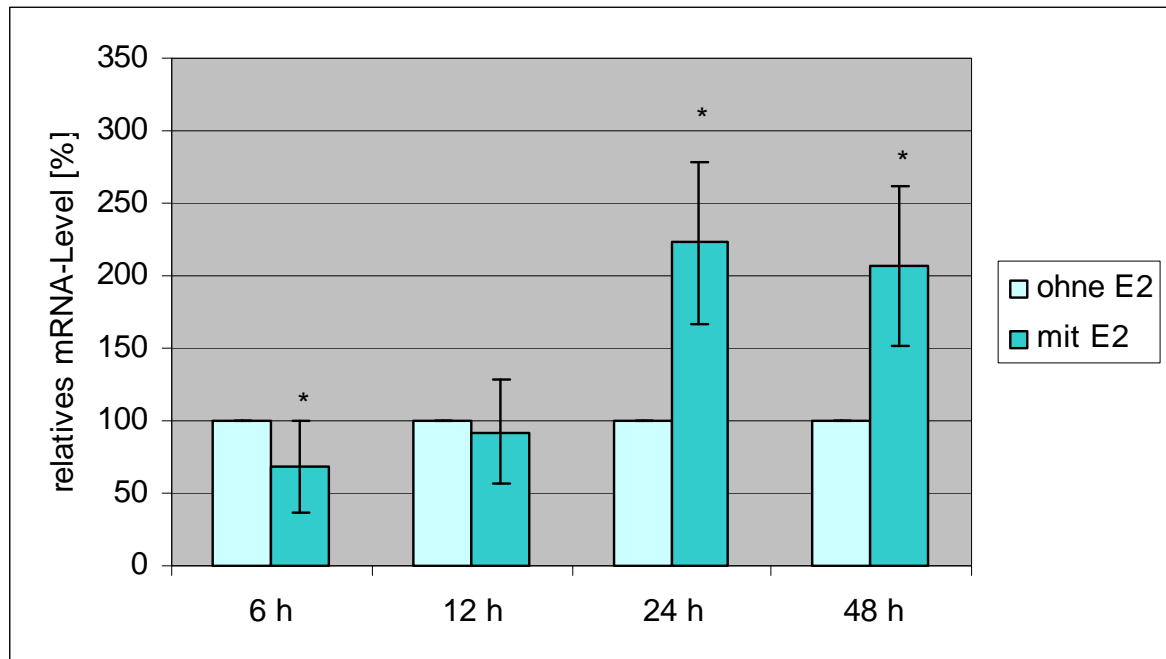


Abb. 7: Expression von *icb-1 α* in MCF-7 Wildtypzellen nach Stimulation mit E2 über verschiedene Zeiträume (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. unstimulierte Kontrolle)

3.4.2 Stimulation von MCF-7-Zellen mit 17- β -Östradiol bzw. 17- β -Östradiol und Zykloheximid

Zeigte die zeitabhängige Stimulation den stärksten Expressionsanstieg nach 24 h, so soll dieser nun als über die ERE-ähnliche Sequenz vermittelt verifiziert werden. Über eine Blockade der Translation soll nachgewiesen werden, ob eine Regulation der *icb-1 α* -Expression nach E2-Stimulation direkt über das ERE vermittelt wird, oder ob vorher die Expression eines weiteren Proteins notwendig ist. Dazu wird eine zeitabhängige Stimulation mit Zykloheximid durchgeführt, das sich auf die Bindung, die Transfer-Enzym 2-abhängige Bewegung und Lösung der tRNA von den Ribosomen auswirkt und damit die gesamte Proteinsynthese der Zelle verhindert [Obrig et al. 1971].

Nach 6 h waren die Ergebnisse nach E2- bzw. E2- und Zykloheximidstimulation sehr ähnlich. Das relative mRNA-Level von *icb-1 α* verminderte sich bei der E2-

und Zykloheximidstimulation auf etwa 73,8 % (n=7; p<0,01). Ein extremer Unterschied ergab sich nach 24 h. Während sich bei der Stimulation mit E2 der erhebliche Anstieg auf das etwa Doppelte zeigte, sank die Expression von *icb-1 α* bei der zusätzlichen Behandlung mit Zykloheximid im Vergleich nicht nur zu den mit E2-stimulierten Zellen sondern auch im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100 %) mit 53,3 % auf nur noch knapp die Hälfte des Vergleichswertes (n=8; p<0,01).

Zelltyp	Stimulation			Mittelwert	Standardabweichung
MCF-7 WT	6 h	ohne	E2	100,0	0,0
	6 h	mit	E2	68,1	32,0
	6 h	mit	E2 & Zykloheximid	73,8	22,7
	24 h	ohne	E2	100,0	0,0
	24 h	mit	E2	223,0	55,9
	24 h	mit	E2 & Zykloheximid	53,3	29,6

Tab. 5: Darstellung der MCF-7 Wildtypzellen im Vergleich der Stimulation ohne E2, mit E2 bzw. mit E2 und Zykloheximid

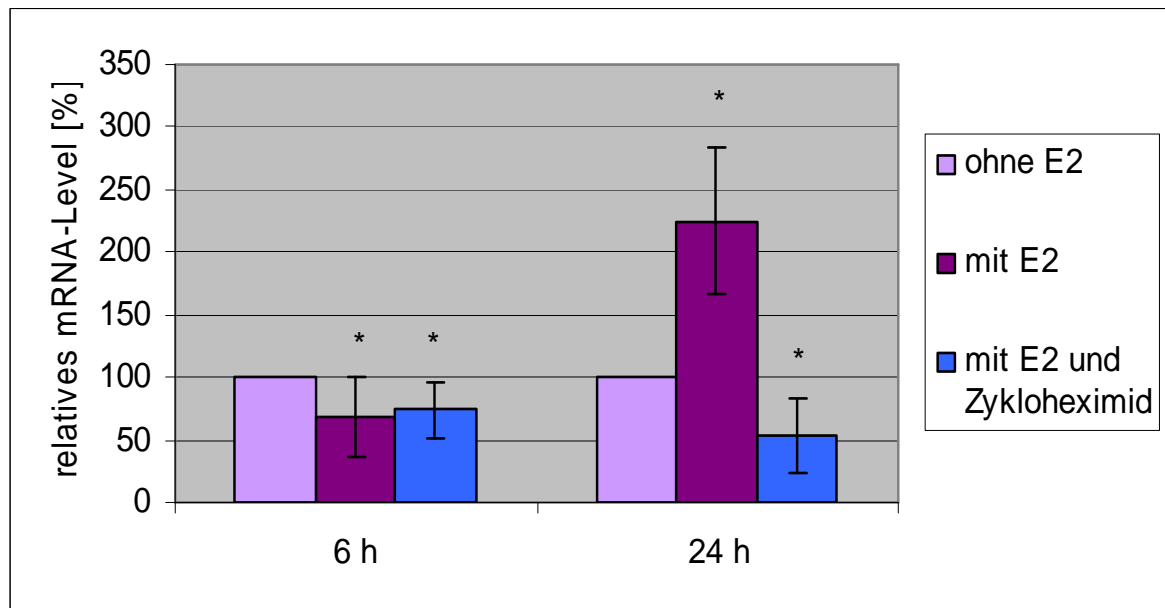


Abb. 8: Relatives mRNA-Level von *icb-1 α* in MCF-7-Zellen nach 17- β -Östradiol und Zykloheximidstimulation (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. unstimulierte Kontrolle)

3.5 Expression von *icb-1 α* nach Behandlungen mit dem SERM Tamoxifen und dem Antiöstrogen ICI sowie selektiven ER α - und ER β -Agonisten

Um die Spezifität des E2-Effektes zu bestätigen, wurden weitere Behandlungen durchgeführt. Hierbei wurden insbesondere 17- β -Östradiol, 17- β -Östradiol und Tamoxifen (TAM) oder ICI 182,780, PPT und DPN eingesetzt. Alle Zellen wurden in der Kultur über 24 h mit dem jeweiligen Stoff stimuliert.

Hierbei sollte durch Tamoxifen und ICI 182,780 als Antagonisten am Östrogenrezeptor die Stimulation nach E2-Gabe unterdrückt werden.

Mit Hilfe von PPT und DPN sollte durch die spezifische Aktivierung des ER α bzw. ER β überprüft werden, über welchen Rezeptortyp mögliche Expressionsänderungen vermittelt werden.

3.5.1 Wirkung von Antiöstrogenen auf die *icb-1 α* -Expression

Tamoxifen ist als SERM ein partieller Antagonist am Östrogenrezeptor, dessen Effekte direkt über die ERs vermittelt werden. Es verhindert die Steroidbiosynthese durch Blockade der Sterolisomerase in der Mamma [Paul et al. 1998; Wakeling et al. 1984].

Signifikant stärkere antiöstrogene Effekte als bei TAM wurden durch den Einsatz von ICI 182,780 erreicht [de Cupis et al. 1995; Wakeling et al. 1991]. Im Vergleich zu TAM verhindert dieses reine Antiöstrogen die Proliferation von ER-positiven Brustkrebszellen mit 1,5- bis 5,5-facher Potenz [de Cupis et al. 1995; Howell et al. 2000]. Durch den Einsatz dieser beiden Stoffe soll der Einfluss von Antiöstrogenen unterschiedlicher Potenz auf die Expression von *icb-1 α* geklärt werden.

3.5.1.1 Expression von *icb-1 α* nach Behandlung mit Antiöstrogenen in den Zelllinien der Mamma

Die Versuche wurden wieder mit den Zelllinien SK-BR-3 und MCF-7 durchgeführt.

Zunächst wurden die SK-BR-3 Zellen untersucht; verglichen wurden mit 3 nM E2 bzw. 3 nM E2 und 1 μ M Tamoxifen oder 1 μ M ICI behandelten Zellen. Bei der Behandlung mit TAM konnte nur eine minimale Veränderung (auf 115,1 %) der Expression von *icb-1 α* im Vergleich zur Kontrolle - nur mit E2 stimuliert - festgestellt werden ($n=13$; $p<0,05$). Nach ICI-Zugabe war eine geringe Steigerung der Expression von *icb-1 α* auf 123,0 % zu erkennen ($n=14$; $p<0,05$). Zwischen der TAM- und ICI-Stimulaion zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Die mit E2 und Tamoxifen bzw. ICI (in der Kontrolle nur mit E2) stimulierten MCF-7 WT-Zellen zeigten gegensätzliche Veränderungen. Nach Behandlung der Zellen mit TAM stieg wie bei der Zelllinie SK-BR-3 die Expression von *icb-1 α* auf

131,3 % an (n=10; p<0,01). Bei der Behandlung mit ICI sank sie dagegen sogar auf die Hälfte (45,8 %) des ursprünglichen Wertes (n=14; p<0,01).

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert	Standardabweichung
SK-BR-3 WT	mit E2 in Lösungsmittel	100,0	0,0
	mit E2 & Tamoxifen	115,1	27,4
	mit E2 & ICI	123,0	29,9

Tab. 6: Darstellung der Expression von *icb-1 α* in SK-BR-3 Wildtypzellen nach Zusatz von E2 bzw. E2 und Tamoxifen bzw. E2 und ICI

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert	Standardabweichung
MCF-7 WT	mit E2 in Lösungsmittel	100,0	0,0
	mit E2 & Tamoxifen	131,3	48,8
	mit E2 & ICI	45,8	15,7

Tab. 7: Expression von *icb-1 α* in mit E2 bzw. mit E2 und Tamoxifen bzw. mit E2 und ICI versetzten MCF-7 Wildtypzellen

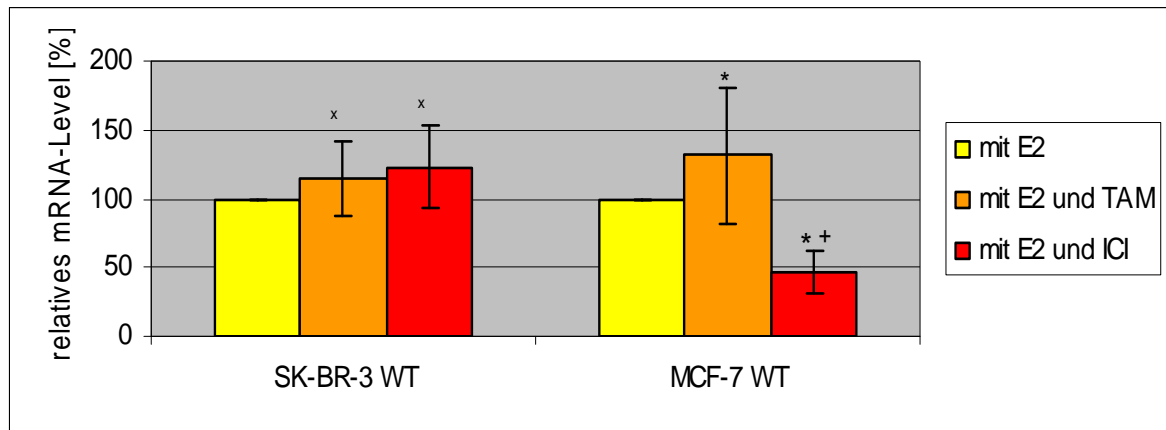


Abb. 9: Expression von *icb-1α* in SK-BR-3 und MCF-7 Wildtypzellen nach Behandlung mit E2 und Tamoxifen bzw. ICI 182,780 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; ^x $p < 0,05$ vs. mit E2 stimulierte Kontrollen; ^{*} $p < 0,01$ vs. mit E2 stimulierte Kontrollen; ⁺ $p < 0,01$ vs. mit E2 und TAM)

3.5.1.2 Expression von *icb-1α* nach Behandlung mit Antiöstrogenen in den Zelllinien des Ovars

Bei der Zelllinie SK-OV-3 wurde die Expression von *icb-1α* nur durch Behandlung mit E2 und ICI, aber nicht durch die mit E2 und TAM verändert. Als Grundlage dienten hier nicht die unstimulierte Kontrolle, sondern mit 3 nM E2 behandelte Zellen (100 %). Die Behandlung mit 3 nM E2 und 1 μ M TAM blieb mit 109,6 % ohne Effekt ($n=18$; nicht signifikant). Ganz im Gegensatz dazu stieg das relative mRNA-Level bei 3 nM E2 und 1 μ M ICI eindrucksvoll auf etwa 170 % ($n=11$; $p < 0,01$).

Als weitere Zelllinie des Ovars wurden die E2-responsiven und den ER α -exprimierenden OVCAR-3 WT-Zellen untersucht. Auch hier änderte sich die Expression von *icb-1α* bei den mit E2 und TAM behandelten Zellen nicht ($n=25$; nicht signifikant). Bei Behandlung mit E2 und ICI erhöhte sich die Expression auf immerhin 136,8 % ($n=20$; $p < 0,01$).

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert	Standardabweichung
SK-OV-3 WT	mit E2 in Lösungsmittel	100,0	0,0
	mit E2 & Tamoxifen	109,6	44,9
	mit E2 & ICI	171,7	46,7

Tab. 8: Darstellung der Expression von *icb-1 α* in der Zelllinie SK-OV-3 nach Zusatz von E2 bzw. von E2 und Tamoxifen bzw. von E2 und ICI

Zelltyp	Behandlung	Mittelwert	Standardabweichung
OVCAR-3 WT	mit E2 in Lösungsmittel	100,0	0,0
	mit E2 & Tamoxifen	96,3	40,6
	mit E2 & ICI	136,8	31,4

Tab. 9: Expression von *icb-1 α* in OVCAR-3 Wildtypzellen nach Behandlung mit E2 bzw. mit E2 und Tamoxifen bzw. mit E2 und ICI

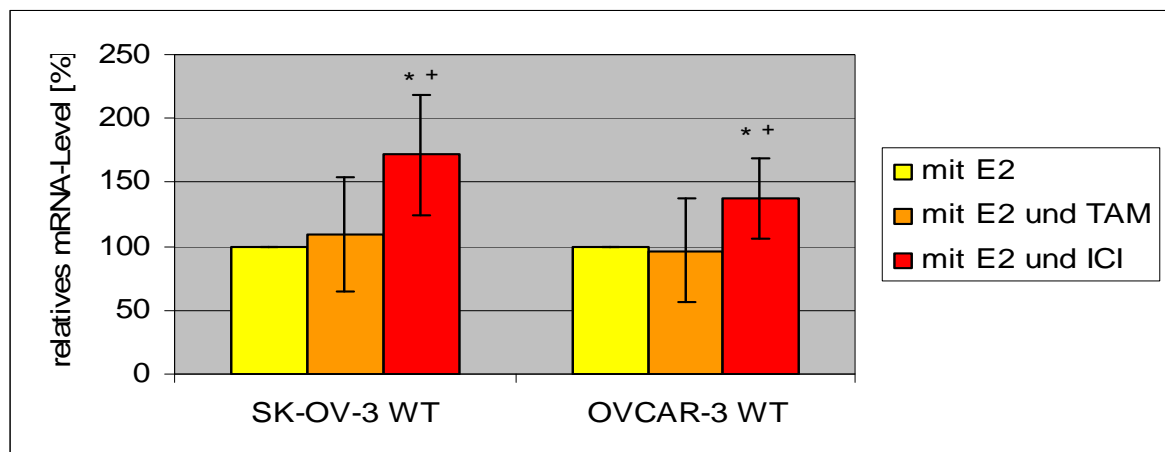


Abb. 10: Expression von *icb-1 α* in SK-OV-3 und OVCAR-3 Wildtypzellen nach Behandlung mit E2 und Tamoxifen bzw. ICI 182,780 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. mit E2 stimulierte Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. E2 und TAM)

3.5.2 Wirkung selektiver Agonisten von ER α und ER β auf die *icb-1\alpha*-Expression

PPT ist ein selektiver Agonist am ER α , der im Vergleich zum ER β mit 410-facher Affinität an den ER α bindet. Außerdem aktiviert er die Transkription nur durch diesen Rezeptortyp [Stauffer et al. 2000; Kraichely et al. 2000]. Seine Wirkung konnte in verschiedenen biologischen Geweben nachgewiesen werden [Harris et al. 2002].

Im Gegensatz dazu zeigt DPN eine 70-fach höhere Affinität für den ER β [Meyers et al. 2001]. Auch wenn sowohl PPT als auch DPN eine jeweils starke Präferenz in der Bindung an einen Rezeptortyp zeigen, ist nicht ausgeschlossen, dass auch der jeweils andere Typ an der Signalübertragung beteiligt sein könnte. In Versuchen mit den beiden Stoffen soll aber festgestellt werden, welche Rezeptorstimulation sich besonders auf die Expression von *icb-1\alpha* auswirkt.

3.5.2.1 Expression von *icb-1\alpha* in Zelllinien der Mamma nach Stimulation mit selektiven ER-Agonisten

Bei der Untersuchung des relativen mRNA-Levels der SK-BR-3 Zellen nach Stimulation mit 100 nM PPT und 100 nM DPN wurden die Ergebnisse mit der unstimulierten Kontrolle (100 %) mit Ethanol verglichen. Durch Stimulation mit DPN erhöhte sich die *icb-1\alpha*-Expression auf ansehnliche 158,0 % (n=14; p<0,01). Wurde die entsprechende Menge PPT hinzugefügt, konnte ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden. Nach der Stimulation verringerte sich das mRNA-Level auf lediglich 62,5 % (n=16; p<0,01).

Bei den Versuchen mit MCF-7 Zellen ließ sich bei Stimulation mit PPT wie auch mit DPN eine immens erhöhte Expression auf je etwa das Doppelte im Vergleich zur Ethanol-behandelten Kontrolle beobachten. Mit PPT erhöhte sich das relative mRNA-Level von *icb-1\alpha* auf imponierende 193,5 % (n=17; p<0,01), mit DPN

ebenfalls auf 204,9 % (n=14; $p < 0,01$). Zwischen den beiden Stimulationen bestand kein signifikanter Unterschied.

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-BR-3 WT	mit EtOH	100,0	0,0
	mit PPT	62,5	19,9
	mit DPN	158,0	33,4

Tab. 10: Gegenüberstellung der Expression von *icb-1 α* in mit selektiven ER-Agonisten stimulierten und nicht-stimulierten SK-BR-3-Zellen

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
MCF-7 WT	mit EtOH	100,0	0,0
	mit PPT	193,5	55,4
	mit DPN	204,9	36,1

Tab. 11: Vergleich der Expression von *icb-1 α* in MCF-7 WT-Zellen ohne Stimulation bzw. nach Stimulation mit selektiven ER-Agonisten

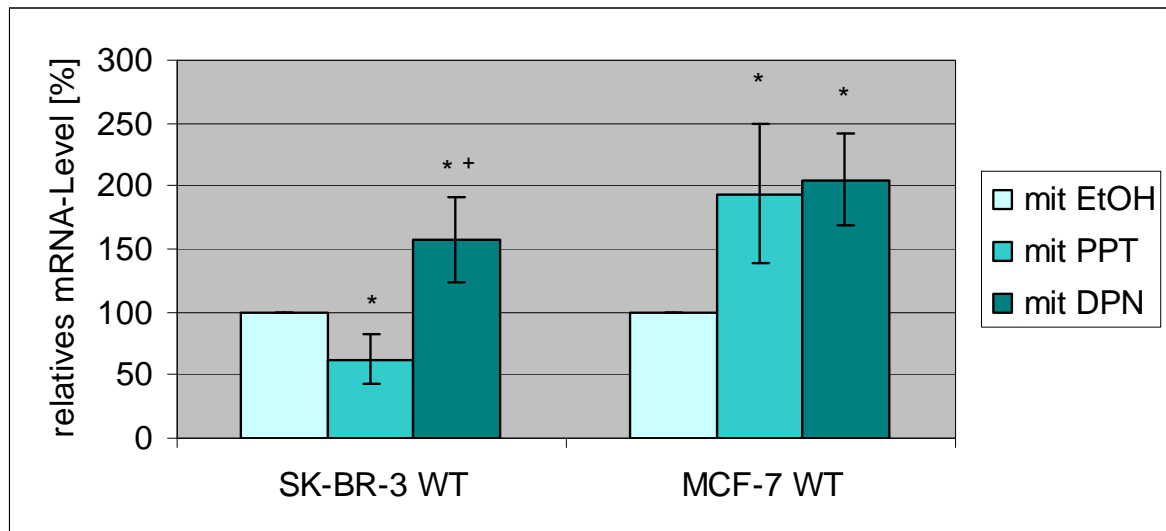


Abb. 11: Expression von *icb-1 α* in SK-BR-3 und MCF-7 Wildtypzellen nach Stimulation mit PPT bzw. DPN (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. unstimulierte Kontrolle; + $p < 0,01$ vs. PPT stimulierte Kontrolle)

3.5.2.2 Expression von *icb-1 α* in Zelllinien des Ovars nach Stimulation mit selektiven ER-Agonisten

Wie auch die Zelllinien der Mamma wurden die des Ovars mit 100 nM PPT bzw. 100 nM DPN stimuliert. Die SK-OV-3 WT-Zellen steigerte sich die Expression von *icb-1 α* enorm bis fast auf das Dreifache ($n=8$; $p < 0,01$) und zeigte damit den stärksten Effekt aller Versuche. Bei der Stimulation mit 100 nM DPN war mit 146,2 % eine nicht so ausgeprägte Zunahme zu beobachten ($n=10$; $p < 0,01$).

Die Zelllinie OVCAR-3 zeigte nach der gleichen Stimulation gegenteilige Effekte. Gegenüber der unstimulierten Kontrolle (mit Ethanol) fiel die Expression nach Zugabe von PPT auf geringe 73,6 % ($n=30$; $p < 0,01$), nach der von DPN auf 68,6 % ($n=31$; $p < 0,01$). Das mRNA-Level nach PPT- bzw. DPN-Stimulation zeigte hier keinerlei Unterschiede.

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-OV-3 WT	mit EtOH	100,0	0,0
	mit PPT	292,4	50,7
	mit DPN	146,2	44,7

Tab. 12: *icb-1 α* -Expression von mit selektiven Agonisten der ER-Rezeptoren stimulierten SK-OV-3 WT Zellen im Vergleich zu der nicht-stimulierten Kontrolle

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
OVCAR-3 WT	mit EtOH	100,0	0,0
	mit PPT	73,6	37,4
	mit DPN	68,6	32,4

Tab. 13: Die Expression von *icb-1 α* in der Zelllinie OVCAR-3 nach Stimulationen mit selektiven ER-Agonisten im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle

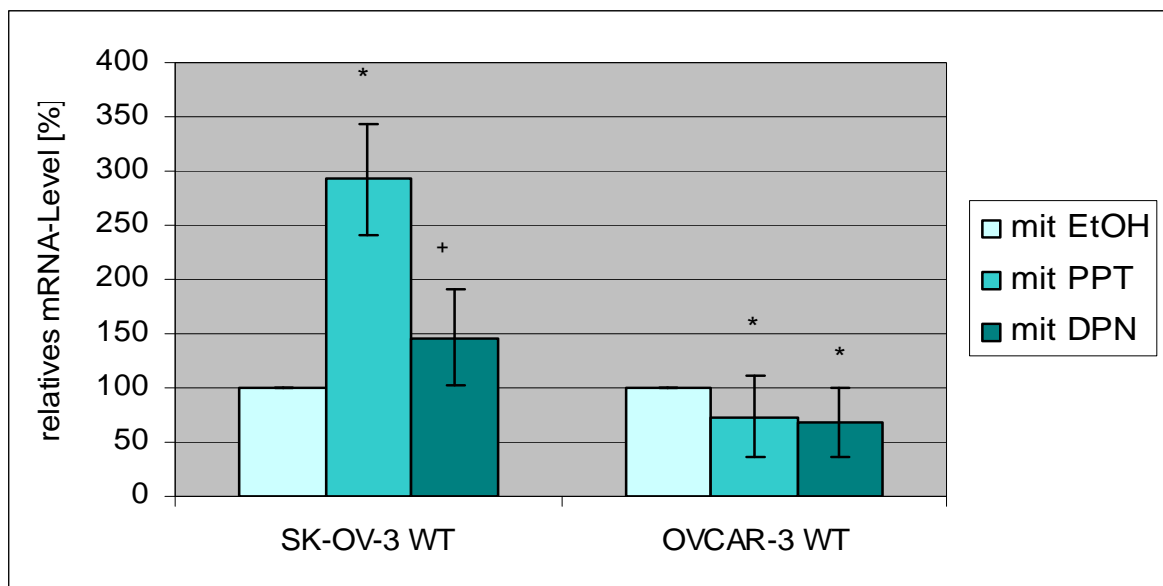


Abb. 12: Expression von *icb-1 α* in SK-OV-3 und OVCAR-3 Wildtypzellen nach Stimulation mit PPT bzw. DPN (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; * $p < 0,01$ vs. unstimulierte Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. PPT stimulierte Kontrolle)

3.5.3 Expression von *icb-1 α* bei ER β überexprimierenden Zellen

Der Einfluss der Östrogenstimulation bei vermehrtem Vorhandensein des ER β auf die Expression von *icb-1 α* sollte noch weiter geklärt werden. Dazu diente eine Untersuchung von Klonen der vier Zelllinien. Diese zeigen alle eine Überexpression des ER β (ER β^{+++}).

3.5.3.1 *icb-1 α* -Expression in ER β 1 überexprimierenden Mammakarzinomzellen

In diesen Experimenten wurden die verschiedenen den ER β überexprimierende Zellen aus den Zelllinien der Mamma untersucht (SK-BR-3 40/1, 40/4 und 40/7; MCF-7 40/2 und 40/8), die in der Auswertung zusammengefasst wurden. Die Stimulation mit 3 nM E2 über 24 Stunden wurde jeweils der unstimulierten Kontrolle (100 %) gegenübergestellt. Bei den drei SK-BR-3 Zellen ergab sich nach Stimulation mit E2 kein Unterschied (86,8 %) zur Kontrolle ohne E2 (n=54; nicht signifikant). Gleiche Ergebnisse zeigten sich bei den beiden MCF-7/ER β^{+++} . Es gab keine signifikante Veränderung der *icb-1 α* -Expression (n=50).

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-BR-3 40/1, 40/4 & 40/7	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	86,8	41,6

Tab. 14: Expression von *icb-1 α* in den ER β überexprimierenden Zellen der Zelllinie SK-BR-3 nach Stimulation mit 17- β -Östradiol, verglichen mit der in nicht-stimulierten Zellen

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
MCF-7 40/2 & 40/8	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	113,4	45,4

Tab. 15: Expression von *icb-1 α* in MCF-7/ER β ⁺⁺⁺ nach Stimulation mit 17- β -Östradiol im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

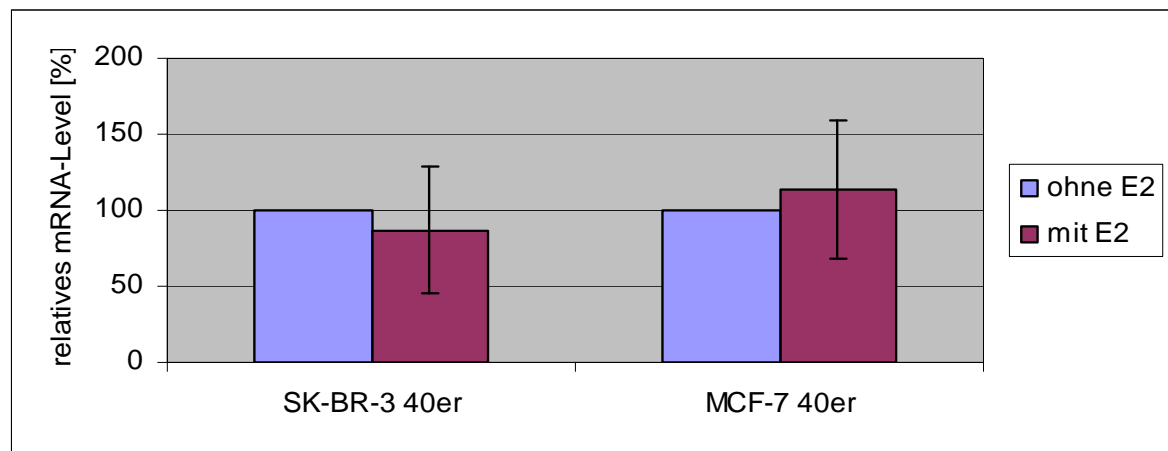


Abb. 13: Expression von *icb-1 α* in SK-BR-3 und MCF-7 den ER β überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit E2 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; nicht signifikant)

3.5.3.2 *icb-1 α* -Expression in ER β 1 überexprimierenden Ovarialkarzinomzellen

Neben den Wildtypzellen wurden von SK-OV-3 zwei – in der Auswertung zusammengefasste – und von OVCAR-3 eine ER β überexprimierende Zelllinie untersucht. Auch hier wurde die Expression von *icb-1 α* in mit 3 nM E2 über 24 Stunden stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Allerdings waren keine Effekte festzustellen, denn sowohl bei der Zelllinie SK-OV-3 (n=43) als auch bei der Zelllinie OVCAR-3 (n=21) konnte kein signifikanter Unterschied zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden.

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
SK-OV-3 40/1 & 40/2	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	110,2	46,7

Tab. 16: Expression von *icb-1 α* in SK-OV-3/ER β^{+++} nach 17- β -Östradiolstimulation, verglichen mit der nicht-stimulierten Zellen

Zelltyp	Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung
OVCAR-3 40/1	ohne E2	100,0	0,0
	mit E2	97,1	31,3

Tab. 17: *Icb-1 α* -Expression der ER β überexprimierenden Zellen der Zelllinien OVCAR-3 nach 17- β -Östradiolstimulation und in den unbehandelten Kontrollen

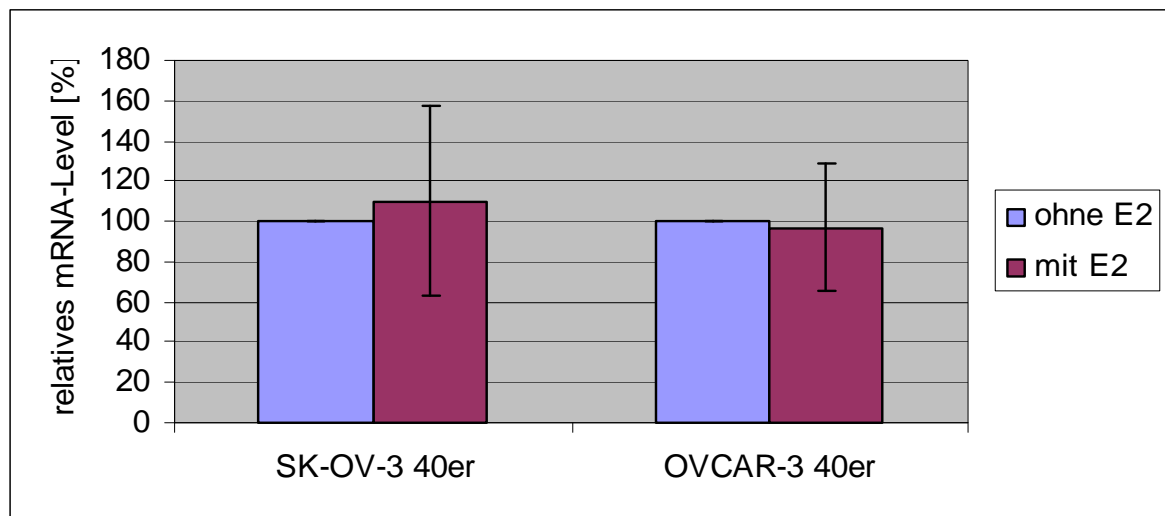


Abb. 14: Expression von *icb-1 α* in SK-OV-3 und OVCAR-3 ER β überexprimierenden Zellen nach Stimulation mit E2 (dargestellt Mittelwert \pm Standardabweichung; nicht signifikant)

- 3.6 Expression von *icb-1 α* in Mammakarzinom- und Ovarialkarzinom-Gewebe
- 3.6.1 Expression von *icb-1 α* und ER α in Proben des Human Breast Cancer Rapid-Scan™

Nach dem Nachweis der Expression von *icb-1 α* in den Zelllinien der Mamma sollte diese nun auch in Gewebeproben der gesunden und maligne transformierten Mamma untersucht werden. Außerdem sollte im Vergleich zwischen der *icb-1 α* - und der ER α -Expression ein Zusammenhang der beiden überprüft werden. Zunächst wurde dazu die Expression von *icb-1 α* mit Hilfe eines Human Breast Cancer Rapid-Scan™ in je 12 Proben gesunder und erkrankter Brust ermittelt. Sie konnte in 5 gesunden und einem maligne transformierten Gewebe nachgewiesen werden. Außerdem wurde die ER α -Expression in 4 gesunden Proben festgestellt. Diese stimmte allerdings nur in einem Fall mit der *icb-1 α* Expression überein. Der einzige Nachweis von *icb-1 α* in malignem Gewebe war mit der von ER α vergesellschaftet. Letzteres konnte noch in 5 weiteren Proben aufgezeigt werden.

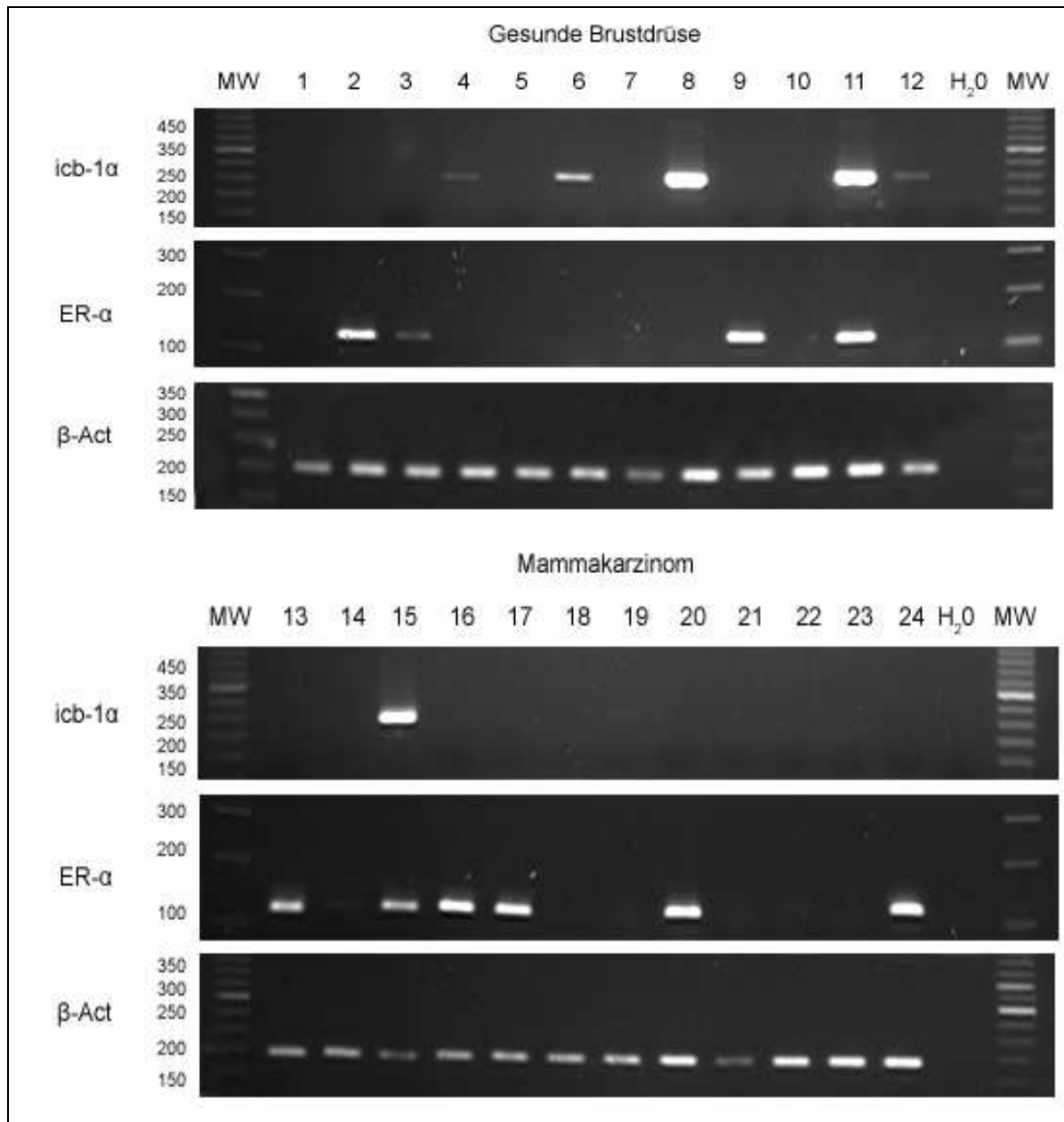


Abb. 15: Nachweis der *icb-1 α* - und ER α -Expression mittels spezifischer RT-PCR in je 12 gesunden und maligne transformierten c-DNA-Proben der Brust. Als Positivkontrolle wurde ein β -Actin-Fragment genutzt, als Negativkontrolle dienten Wasserproben

3.6.2 Expression von *icb-1 α* in einem Pool von Ovarialkarzinom-RNAs

Nachdem der Expressionsnachweis von *icb-1 α* in den beiden Zelllinien des Ovars erfolgreich gewesen war, sollte dieser auch im Ovarialkarzinomgewebe erbracht werden. Das Vorkommen der Expression von *icb-1 α* wurde untersucht, in dem aus neun mRNAs von Ovarialkarzinomzellen ein Pool hergestellt wurde. In diesem Pool konnte nach real-time PCR die Expression von *icb-1 α* aufgezeigt werden.

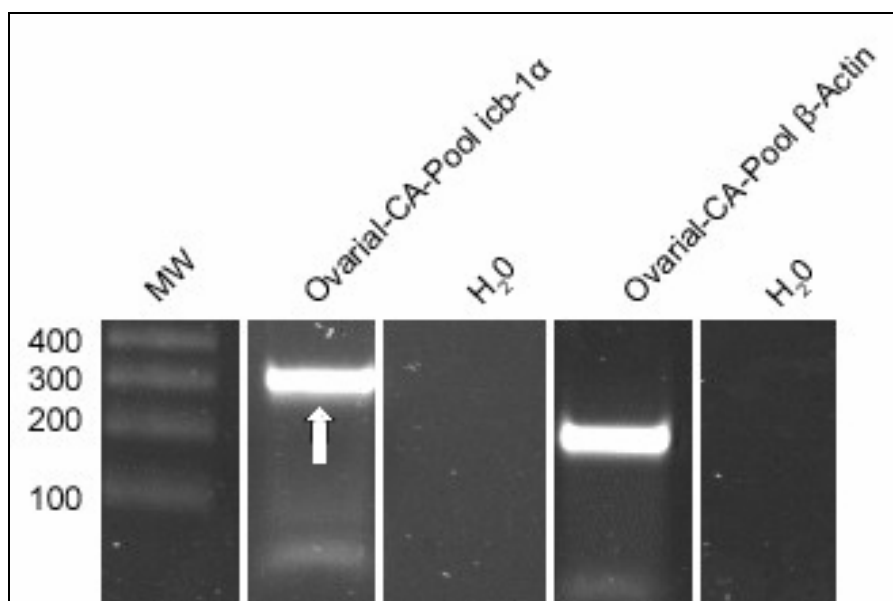


Abb. 16: *Icb-1 α* spezifische RT-PCR der isolierten RNA aus einem Pool von 9 Ovarialkarzinomproben. Als Positivkontrolle wurde ein β -Actin-Fragment genutzt, als Negativkontrolle dienten Wasserproben

4 Diskussion

4.1 Identifizierung und Funktion des ERE in der Sequenz des Gens *icb-1*

In der Sequenz des Gens *icb-1* konnte eine ERE-ähnliche Basenfolge nachgewiesen werden, deren Bedeutung und deren dadurch veränderten Effekte der Östrogenwirkung auf dessen Expression untersucht wurden. Auch die Gene von Oxytocin, Angiotensinogen, Cathepsin D, GFAP (Glial fibrillary acidic protein), Komplement C3, VEGF (Vascular endothelial growth factor) und einigen weiteren Proteinen enthalten EREs, die nur in wenigen Basenpaaren von der Konsensussequenz des Vitellogenin-Gens abweichen [Gruber et al. 2004]. Auch in der Promotorregion des Gens *icb-1* war ein ERE zu finden, das sich nur in zwei Positionen von der Sequenz des Vitellogenin-Gens unterscheidet und nur in einer von der des pS2-Gens verschieden ist [Berry et al. 1989; Burch et al. 1988; Gruber et al. 2004; Klein-Hitpass et al. 1988]. Je mehr Nukleotide sich dabei im Vergleich zur Konsensussequenz verändern, desto geringer ist die Affinität für die ER-Bindung und die Aktivierung der mRNA-Synthese [Klinge et al. 2004]. Außerdem können multiple Kopien des EREs sowie deren Nähe zu anderen regulatorischen Elementen bei Östrogenstimulation miteinander in Wechselwirkung treten und die Transkription der Zielgene beeinflussen [Stokes et al. 2004].

Mit Hilfe einer Reihe von Stimulationen über unterschiedliche Zeiträume wurde die Expression von *icb-1 α* nach Stimulation mit E2 untersucht. Dabei konnte aber weder nach 6 noch nach 12 Stunden eine positive Wirkung festgestellt werden. Der klassische Weg der Transkriptionsänderung über ein ERE erfolgt über die Bindung des Liganden, die Dimerisierung der Rezeptoren und die Translokation der Komplexe in den Zellkern, so dass die direkt über das ERE vermittelte veränderte Transkription spezifischer Proteine innerhalb kurzer Zeit erkennbar wird (immediate response) [Glidewell-Kenney et al. 2005, Klinge 2001, Wozel et al. 2006]. Die primär über EREs vermittelten Effekte, die über die Wechselwirkung von 17- β -Östradiol, Rezeptoren und EREs zu veränderter Transkription führen, müssten also schon in diesem Zeitraum greifen.

Aber selbst wenn ein ERE in der Promotorregion eines Gens nachgewiesen ist, muss dessen Aktivierung nicht auf dem klassischen Weg erfolgen. [Glidewell-Kenney et al. 2005; Gruber et al. 2004] Dies konnte für das Cathepsin D kodierende Gen gezeigt werden, dessen Transkription über den östrogenabhängigen Anstieg von USF-1 und -2 (upstream stimulatory factors) verstärkt wird. [Gruber et al. 2004; Klinge 2001] Auch die Expression von *icb-1 α* wird sehr wahrscheinlich über diesen sekundären Weg reguliert werden. Darauf wies ein deutlicher Anstieg des mRNA-Level nach einer 24-stündigen Östrogenstimulation hin. Dieser längere Zeitraum bis zum Erkennen eines signifikanten Effektes lässt eine Veränderung der Transkription vermuten, die über die Biosynthese eines zusätzlichen Proteins aktiviert wird. Dies bestätigte sich nach einer Stimulation von MCF-7-Zellen mit E2 und Zykloheximid, das die Proteinbiosynthese der Zelle verhindert. Nach 24 Stunden ließ sich kein Effekt zeigen, während auch hier die alleinige Behandlung mit Östrogenen deutlich positive Wirkung zeigte.

Somit muss es sich bei dem nach 24 Stunden extremen Anstieg des mRNA-Levels von *icb-1*, der durch zusätzliche Stimulation mit Zykloheximid zu unterdrücken war, um eine secondary response handeln.

4.2 Expression von *icb-1* in Human Breast Cancer Rapid-Scan™-Proben und in einem Pool von Ovarialkarzinomproben

Das Vorkommen von *icb-1* und mögliche Unterschiede zwischen den Proben des gesunden und erkrankten Mamma- und Ovarialgewebes sollte überprüft werden, nachdem die Expression von *icb-1* bereits in verschiedenen Geweben aufgezeigt werden konnte. Dazu zählte das gesunde Brustdrüsengewebe wie auch das maligne transformierte. [Treeck et al. 1998; Treeck et al. 2002] Bei der Untersuchung der Expression in der Brustdrüse konnte *icb-1* auch nachgewiesen werden, konnte aber nicht in jedem Ansatz detektiert werden. So war es nur in fünf der gesunden und einer der maligne transformierten Proben zu zeigen. In dem untersuchten Ovarialkarzinom-Pool konnte es ebenfalls nachgewiesen werden.

Folglich scheint *icb-1* durchaus in gesundem und erkranktem Brustdrüsengewebe und in erkranktem Ovargewebe vorzukommen. Dennoch kann hier noch keine Aussage über den Zusammenhang der Expression von *icb-1* und der malignen Transformation eines Gewebes getroffen werden.

4.3 Expression von *icb-1* nach Stimulation mit 17- β -Östradiol

Anhand der Stimulation der verschiedenen Zelllinien mit 17- β -Östradiol sollte die Östrogen-Abhängigkeit der Expression von *icb-1* untersucht werden.

Die Spleißvariante *icb-1 α* des Gens *icb-1* konnte in den beiden Zelllinien SK-OV-3 und OVCAR-3 des Ovars und auch in den beiden Zelllinien SK-BR-3 und MCF-7 der Mamma nachgewiesen werden. Seine relative Expression steigerte sich bei Behandlung mit IFN γ bei allen Zelllinien. [Treeck et al. 2005] Auch bei der jetzt durchgeführten Stimulation mit 17- β -Östradiol erhöhte sich das *icb-1 α* -Level bei allen vier Zelllinien deutlich. Somit ist die Expression von *icb-1* durch Östrogen zu induzieren. Die im Vergleich der vier Zelllinien den ER α am stärksten exprimierenden MCF-7 Zellen zeigten den höchsten Anstieg. Da es sich um einen funktionsfähigen Rezeptor handelt, kann die Induktion über diesen Rezeptor wohl am besten vermittelt werden. Da allerdings auch in den Zellen bei deutlich geringerem prozentuaalem Anteil an oder auch nicht funktionsfähigem ER α eine deutliche Steigerung der *icb-1* Expression zu erkennen war, ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht ausschließlich der ER α für den Anstieg des mRNA-Levels von *icb-1* aktiviert wird.

Östrogenabhängige Gene sind häufig in Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen involviert. Zu diesen gehören auch Fibulin-1, Cap43 / NDRG1 und VEGF-A, die eine Rolle in der Differenzierung spielen könnten. [Bardin et al. 2005; Fotovati et al. 2006; Sengupta et al. 2004] Auch *icb-1* könnte folglich in diese Prozesse involviert sein.

In hormonabhängigen Zellen kann 17- β -Östradiol die Expression von Genen aktivieren, die direkt oder indirekt mit einem differenzierten zellulären Phänotyp wie dem Progesteronrezeptor oder Occludin, einem Protein der tight junctions, einhergehen [Horwitz et al. 1978; Kang et al. 2006]. Die Steigerung der Expression von *icb-1* bekräftigt hier die wahrscheinliche Rolle dieses Gens in der Differenzierung von Zellen.

4.4 Wirkung der Behandlung mit Tamoxifen und ICI 182,780 auf die Expression von *icb-1*

Nach der initialen Beobachtung einer Östrogen-Abhängigkeit der *icb-1* Expression sollte dieser Effekt durch eine Behandlung mit Tamoxifen und ICI 182,780 verifiziert werden.

Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren gehören zu den Liganden der ERs, die abhängig von der Zelle und dem Gewebe als Agonisten und Antagonisten wirken können. Zu diesen gehört auch Tamoxifen, das im Mammakarzinom als Inhibitor der Östrogenfunktion wirkt, im Uterus aber gleiche Effekte wie Östrogen übermittelt. Allerdings können sich *in vivo* im Verlauf einer endokrinen Therapie Resistenzen bilden. Diese Entwicklung braucht aber meist einige Jahre und muss deshalb in der durchgeführten 24-stündigen Stimulation *in vitro* nicht berücksichtigt werden [McDonnell et al. 2002]. In verschiedenen Experimenten konnte die Transkription von Genen, die durch ein klassisches ERE reguliert werden, durch Tamoxifen verhindert werden. Steht die Expressionsänderung unter der Kontrolle eines AP-1-Elementes war bei Behandlung mit Östrogen und Tamoxifen wie bei der mit natürlichem Östrogen eine Aktivierung der Transkription zu erkennen [Nilsson et al. 2001; Paech et al. 1997].

ICI 182,780 ist aufgrund seiner Wirkung als totales Antiöstrogen mit hoher Affinität zum ER in der negativen Regulation östrogenabhängiger Gene effektiver als Tamoxifen. In den ER-positiven MCF-7-Zellen verhinderte es das Wachstum,

während in ER-negativen BT-20-Zellen keine Veränderungen zu beobachten waren [Robertson 2001; Wakeling et al. 1991]. Allerdings konnte in einer ER-negativen Ovarialkarzinomzelllinie eine Verminderung des Wachstums nach partieller und totaler Antiöstrogenbehandlung erzielt werden [Ercoli et al. 1998].

Die Antwort auf die Stimulation mit Antiöstrogenen (Tamoxifen, Raloxifen und ICI 164,384) ist auch vom Vorhandensein der beiden Östrogenrezeptortypen abhängig; die nach einer Stimulation gegensätzliche Effekte bewirken können. So wirkten diese Liganden bei einem ERE-enthaltenden Gen am ER α als partielle Agonisten, am ER β hingegen als reine Antagonisten [Nilsson et al. 2001].

In den durchgeführten Versuchen wurde durch Behandlung der Mammazelllinien mit 17- β -Östradiol und Tamoxifen im Gegensatz zu der erwarteten antiöstrogenen Wirkung eine Steigerung der *icb-1*-Expression erreicht, während sie bei den Zelllinien des Ovars unverändert blieb. Dies passt ebenfalls nicht zu der Beschreibung, dass durch ein ERE regulierte Gene nach Tamoxifenbehandlung vermindert exprimiert werden. Erstaunlicherweise konnte auch durch das totale Antiöstrogen ICI nur in den MCF-7-Zellen eine deutliche Reduktion der Transkriptionsrate von *icb-1* erreicht werden. Dies passt zu der unten beschriebenen Induktion der Transkription durch den selektiven ER α -Agonisten und verdeutlicht noch einmal die Abhängigkeit der Expression von *icb-1* von der Aktivierung dieses Rezeptors. Hier fällt auch die trotz Zusatz von ICI weiterhin deutlich erhöhte Expression bei der Zelllinie SK-OV-3 auf. Diese legt die Vermutung nahe, dass hier der Signalweg auf noch unbekannte Weise oder möglicherweise auch über die Überexpression des HER2/c-erb-2-Genproduktes beeinflusst wird.

Bei Behandlung mit E2 und ICI 182,780 waren bei den SK-BR-3-Zellen, der anderen Zelllinie der Mamma, keine Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen. Da diese Zelllinie nicht E2-responsiv ist und keine ERs exprimiert, blieb auch der Zusatz von Antiöstrogenen wirkungslos. Dennoch muss bei diesen Ergebnissen

berücksichtigt werden, dass die Östrogenbehandlung die Transkriptionsrate von *icb-1 α* verglichen mit unstimulierten Zellen steigert.

In den beiden Zelllinien des Ovars war das mRNA-Level von *icb-1 α* nach Zugabe des totalen Antiöstrogens sogar noch gesteigert. Dies ist besonders interessant bei der den ER α exprimierenden Zelllinie OVCAR-3, bei der - im Gegensatz zu der Zelllinie MCF-7 des Mammakarzinoms - die Blockade der Rezeptoren nicht inhibierend wirkt. Möglicherweise müssen die OVCAR-3-Zellen besonders betrachtet werden, da sie trotz vorhandener Rezeptoren auch bei der Behandlung mit selektiven ER-Agonisten nicht die erwarteten Ergebnisse zeigten.

Grundsätzlich lässt der Zusatz von Tamoxifen bzw. ICI modulierende Effekte auf die Expression des Gens *icb-1* erkennen. Diese weisen jedoch nicht eindeutig auf einen bestimmten Weg zur Verminderung der Expression von *icb-1* hin.

4.5 Zusammenhang der *icb-1*-Expression mit dem Vorkommen von ER α und ER β

4.5.1 Signalübermittlung der Expressionsänderung von *icb-1* über ER α und ER β

In diesem Teil meiner Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Steigerung der Expression von *icb-1* eher über ER α oder über ER β vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde eine Stimulation mit den selektiven Östrogenrezeptoragonisten PPT und DPN durchgeführt.

Die Effekte der Östrogene werden über die Rezeptortypen ER α und ER β vermittelt, die sich in ihrer DNA-bindenden Domäne sehr ähnlich sind, aber in der Liganden-bindenden Domäne divergieren. Diese Unterschiede der beiden Steroidhormonrezeptoren weisen darauf hin, dass sie hinsichtlich der Genregulation und der biologischen Antworten auf Östrogenstimulation in

verschiedenen Geweben voneinander abweichen können [Bardin et al. 2004; Edwards et al. 2005; Löffler & Petrides 2003].

Der ER α gilt als der effizientere Aktivator der Transkription als der ER β , der während der Entwicklung der Brustdrüse die wichtigen biologischen Funktionen vermittelt. In der gesunden Brustdrüse können den ER β exprimierende Zellen proliferieren, aber die Mehrzahl der Wachstumsfaktoren kommt in Zellen vor, die keine ERs enthalten. Dies steht im Gegensatz zu den Tumorzellen des Malignoms, bei denen ER α -positive Zellen nach Östrogenzugabe proliferieren. Beim Mammakarzinom wird das Vorkommen des ER α als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit endokriner Therapie genutzt [Hayashi et al. 2006; McDonnell et al. 2002; Palmieri et al. 2002; Stokes et al. 2004].

Normalerweise werden die beiden ERs in der gleichen Zelle exprimiert, wobei nicht geklärt ist, wie die Anwesenheit der Rezeptoren und ihre relativen Level zueinander die zelluläre Antwort auf eine Östrogenstimulation beeinflussen [Chang et al. 2006; Stokes et al. 2004]. ER α und ER β werden dabei häufig als Gegenspieler angesehen, auch wenn sie an der gleichen Bindungsstelle an der DNA wirken. Bei der Aktivierung einer Liganden-induzierten Antwort durch das natürliche Hormon konnte über den ER β bei einigen Genen, deren Transkription über eine AP-1 Site reguliert wird, ein Abfall des mRNA-Levels beobachtet werden, während bei Antiöstrogenbehandlung mit Tamoxifen, Raloxifen oder ICI ein Anstieg erkennbar war [Paech et al. 1997].

Eine verminderte Expression des ER β auf mRNA- und Proteinlevel bzw. eine erhöhte ER α / ER β -Ratio wurde in einigen maligne transformierten Geweben wie Brust, Ovar und Kolon verglichen mit dem normalen Gewebe gefunden. Diese Ratio scheint während des Prozesses der Karzinogenese anzusteigen, was darauf hinweisen könnte, dass die beiden Rezeptoren auch in der Entwicklung eines Tumors über spezifische Signalwege unterschiedliche Rollen spielen [Löffler & Petrides 2003.]

Um die Aufgaben der beiden Rezeptoren in den untersuchten Zelllinien zu überprüfen wurden selektive Agonisten eingesetzt. PPT bindet mit einer 410-fach höheren Bindungsaffinität an den ER α als an den ER β , DPN umgekehrt 70-fach besser an den ER β und aktiviert diesen mit 170-fach höherer relativer Potenz in Transkriptionsassays [Montgomery et al. 2003].

In den Experimenten waren die jeweils stärksten steigernden Effekte der Östrogenstimulation bis auf über das Doppelte bei den den ER α exprimierenden MCF-7- und den SK-OV-3-Zellen nach PPT-Stimulation zu beobachten. Bemerkenswert ist dabei, dass die Zelllinie SK-OV-3 nur einen funktionslosen ER α exprimiert. Es stellt sich hier die Frage, ob es zu weiteren Effekten auf die Expression des HER2/c-erb-2-Genproduktes oder eines anderen Kofaktors kommt. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden anderen Zelllinien (SK-BR-3 und OVCAR-3) hier einen Abfall des relativen mRNA-Levels von *icb-1*. Dies ist besonders auffällig bei den OVCAR-3 Zellen, die den ER α exprimieren. Dort wäre ebenfalls ein signifikanter Anstieg zu erwarten gewesen. Folglich scheint der ER α in die Signalübermittlung eingebunden zu sein, ist aber wohl nicht allein für die Expressionsänderung von *icb-1* verantwortlich.

Für den ER β konnte ebenfalls eine Wirkung auf die *icb-1*-Expression nachgewiesen werden, da beide Zelllinien der Mamma (SK-BR-3 und MCF-7) nach Stimulation mit dem selektiven ER β stimulierenden Agens DPN eine deutliche Erhöhung des mRNA-Levels von *icb-1 α* zeigten. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass der ER β in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht in dem Maße wie in der Zelllinie OVCAR-3 exprimiert wird [Kuiper et al. 1997]. Gleiche Effekte zeigten sich bei SK-OV-3 Zellen des Ovars, auch wenn der Anstieg bei dieser Zelllinie nicht so ausgeprägt war. Auch hier war ein Absinken der *icb-1*-Expression bei den OVCAR-3-Zellen zu beobachten. So ergibt sich auch für den ER β kein eindeutiges Ergebnis. Er muss aber ebenfalls eine Auswirkung auf die Expression haben.

Die Signalübermittlung, die zu Veränderung des mRNA-Levels von *icb-1* führt, kann somit keiner der beiden ER-Typen zugeordnet werden. Dennoch ist

bemerkenswert, dass bei den ER α -exprimierenden MCF-7-Zellen der Mamma die Stimulation mit PPT wie auch mit DPN zu einem eindrucksvollen Anstieg des mRNA-Levels von *icb-1* führt, der sich genau entgegengesetzt bei den ER α -exprimierenden OVCAR-3-Zellen des Ovars zeigt. Dies lässt sich vielleicht mit der unterschiedlichen Gewebeherkunft begründen.

Bei allen Experimenten ist zu berücksichtigen, dass PPT bzw. DPN zwar an einem Typ des Rezeptors als selektive Agonisten wirken, der jeweilige andere Typ jedoch nicht antagonisiert ist. Es können auch sowohl ER α als auch ER β gemeinsam in die Signalübermittlung involviert sein, da sie Heterodimere bilden können [Chang et al. 2006]. Auch ist die Beteiligung unbekannter weiterer Faktoren nicht auszuschließen.

4.5.2 Signalübermittlung der Expressionsänderung von *icb-1* in den ER β überexprimierenden Zellen

Selektive Effekte am ER β sollten mit Hilfe von den ER β überexprimierenden Zellen noch einmal näher beleuchtet werden. Dazu dienten weitere Versuche mit Zellen der untersuchten Zelllinien, die dann jeweils den ER β überexprimieren, aber keine veränderten Resultate brachten. Bei Stimulation mit 17- β -Östradiol konnte in keinem der Experimente eine signifikante Abweichung des relativen mRNA-Levels von *icb-1* zu den jeweiligen nicht-stimulierten Kontrollen nachgewiesen werden. Dies gilt insbesondere auch für die Zellen der Mamma, bei denen die Stimulation mit DPN zu einer Steigerung der Expression von *icb-1* geführt hatte. Dennoch steht damit fest, dass eine alleinige Überexpression des ER β nicht zu einer Veränderung des relativen mRNA-Levels von *icb-1* führt. Auch die bei allen Wildtypzellen beobachtete Steigerung seiner Expression ist dann trotz Stimulation mit 17- β -Östradiol nicht mehr nachzuweisen. So muss zumindest ein Einfluss der ER β -Anzahl einer Zelle auf die Expressionsänderung von *icb-1* nach Stimulation mit 17- β -Östradiol bedacht werden.

4.5.3 Expression von *icb-1* und ER α in Human Breast Cancer Rapid-Scan™-Proben

Nachdem ein Anstieg der Expression nach Stimulation mit 17- β -Östradiol belegt werden konnte, sollte nun in den Proben aus der Mamma ein Zusammenhang des Vorkommens des ER α und der Expression von *icb-1* untersucht werden.

In den 24 untersuchten cDNA-Proben der Brustdrüse konnte weder bei den gesunden noch bei den maligne transformierten ein Zusammenhang zwischen der Expression von *icb-1* und dem ER α festgestellt werden. Zwar war in der einzigen maligne transformierten Probe, in der *icb-1* aufgezeigt werden konnte, auch der ER α vorhanden, doch konnte dieser auch noch in 5 weiteren Proben dargestellt werden. Bei der gesunden Brustdrüse gab es ein Experiment, in dem sowohl der ER α als auch *icb-1* exprimiert wurden, bei den anderen Ansätzen konnte jedoch immer nur eine der beiden cDNAs nachgewiesen werden. Das Vorkommen von *icb-1* ist also zumindest in der gesunden Brustdrüse von dem von ER α unabhängig, schließt es jedoch nicht aus. Für das maligne Gewebe kann man gleiches jedoch nicht voraussetzen. Da überhaupt nur in einer Probe *icb-1* zu zeigen war - dies dann gleichzeitig mit dem ER α - kann es durchaus sein, dass in malignem Gewebe der Nachweis von ER α eine Voraussetzung für die *icb-1*-Expression ist. Eine Entdifferenzierung des Gewebes mit fehlenden Östrogenrezeptoren könnte dann mit einer geringeren bzw. nicht mehr existenten Expression von *icb-1* einhergehen.

5 Zusammenfassung

Das humane Gen *icb-1* wird in verschiedenen gesunden und maligne entarteten Geweben exprimiert. Die Expression von *icb-1* wird bei *in vitro* induzierten Differenzierungsvorgängen von endometrialen Tumorzellen sowie von Leukämiezellen aktiviert. Daher ist davon auszugehen, dass *icb-1* eine Rolle bei Differenzierungsprozessen spielt. Nachdem *icb-1* auch in Karzinomzellen der Brust und des Ovars nachgewiesen worden war, war es Ziel dieser Arbeit, die Zusammenhänge zwischen *icb-1* und der Wirkung von Östrogenen zu untersuchen, da diese an Differenzierungsprozessen dieser Gewebe beteiligt sind.

In dieser Arbeit gelang es, als möglichen zugrunde liegenden molekularen Mechanismus ein putatives *estrogen response element* (ERE) in der Promotorregion des *icb-1* Gens zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von *icb-1* in je zwei Karzinom-Zelllinien der Brust (MCF-7 und SK-BR-3) und des Ovars (OVCAR-3 und SK-OV-3) nach Stimulation mit 17- β -Östradiol deutlich steigern lässt. Dafür ist insbesondere aber nicht allein das Vorhandensein des ER α verantwortlich. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Östrogen-induzierte Aktivierung der *icb-1* Transkription sekundär über die Synthese eines weiteren Proteins erreicht werden, wie eine zeitabhängige Stimulation mit 17- β -Östradiol zeigte. Um die Spezifität dieses Östrogen-Effektes auf die *icb-1* Expression zu bestätigen, wurden Kombinationsversuche mit dem selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen und dem totalen Antiöstrogen ICI 182,780 durchgeführt, die zeigten, dass beide Einfluss ausüben, die Expression von *icb-1* jedoch nicht in jeder der untersuchten Zelllinien hemmen.

Die Wirkungen des Östrogens werden über die beiden Rezeptortypen ER α und ER β vermittelt, die sowohl parallele als auch entgegengesetzte Effekte vermitteln können. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur gezielten Aktivierung von ER α bzw. ER β zeigten eine Beeinflussung der Expression von *icb-1* sowohl durch den ER α als auch den ER β . Dabei zeigte sich, dass das Vorkommen des ER α wohl den meisten positiven Einfluss ausübt. Jedoch sind jeweils weitere noch

ungeklärte Faktoren an der Änderung des mRNA-Levels von *icb-1* beteiligt. So lässt sich auch ein besonderer Einfluss des in der Zelllinie SK-OV-3 überexprimierten HER2/c-erb-2-Genproduktes vermuten. Denn in dieser Zelllinie konnte trotz nicht funktionsfähigem ER α eine deutliche Steigerung der Expression von *icb-1* aufgezeigt werden. Weiterhin konnten die den ER β überexprimierenden Zellen keine eindeutigen Ergebnisse liefern.

Die Expression des Differenzierungs-assoziierten Gens *icb-1* wird nach den Ergebnissen dieser Arbeit also durch die Stimulation mit E2 deutlich gesteigert. Diese Effekte werden auf noch nicht vollständig geklärte Weise durch die Östrogenrezeptortypen vermittelt. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern damit die Hypothese, dass *icb-1* an der Vermittlung differenzierender Effekte von Östrogen-Stimuli beteiligt sein könnte.

Literaturverzeichnis

Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM. *Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis*. Environ Health Perspect. 1992 Nov;98:13-24. Review

Bacus SS, Kiguchi K, Chin D, King CR, Huberman E. *Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen*. Mol Carcinog. 1990;3(6):350-62.

Balker J, Meerpohl H-G, Bahnsen J [Hrsg.] *Praxis der gynäkologischen Onkologie: Konzepte für das differenzierte Vorgehen in Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 2. aktualisierte Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2002)

Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. *Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression*. Endocr Relat Cancer. 2004 Sep;11(3):537-51. Review

Bardin A, Moll F, Margueron R, Delfour C, Chu ML, Maudelonde T, Cavailles V, Pujol P. *Transcriptional and posttranscriptional regulation of fibulin-1 by estrogens leads to differential induction of messenger ribonucleic acid variants in ovarian and breast cancer cells*. Endocrinology. 2005 Feb;146(2):760-8. Epub 2004 Nov 4.

Barnes DM, Gillett CE. *Cyclin D1 in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1-3):1-15. Review

Beckmann MW, Niederacher D, Schnurch HG, Gusterson BA, Bender HG. *Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity*. J Mol Med. 1997 Jun;75(6):429-39. Review

Bender HG [Hrsg.] *Spezielle gynäkologische Onkologie II*. 4. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München (2003)

Berry M, Nunez AM, Chambon P. *Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence*. Proc Natl Acad Sci USA. 1989 Feb;86(4):1218-22.

Bertelli G. *Sequencing of aromatase inhibitors*. Br J Cancer. 2005 Aug;93 Suppl 1:S6-9. Review

- Brandes LJ, Hermonat MW. *Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol*. Cancer Res. 1983 Jun;43(6):2831-5.
- Briand P, Lykkesfeldt AE. *An in vitro model of human breast carcinogenesis: epigenetic aspects*. Breast Cancer Res Treat. 2001 Jan;65(2):179-87. Review
- Britt KL, Stanton PG, Misso M, Simpson ER, Findlay JK. *The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad*. Endocrinology. 2004 Aug;145(8):3950-60. Epub 2004 May 13.
- Brosens JJ, de Souza NM, Barker FG. *Steroid hormone-dependent myometrial zonal differentiation in the non-pregnant human uterus*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1998 Dec;81(2):247-51. Review
- Burch JBE, Evans MI, Friedman TM, O'Malley BJ. *Two functional estrogen response elements are located upstream of the major chicken vitellogenin gene*. Mol Cell Biol. 1988 Mar;8(3):1123-31.
- Caffrey PB, Frenkel GD. *Selenite cytotoxicity in drug resistant and nonresistant human ovarian tumor cells*. Cancer Res. 1992 Sep 1;52(17):4812-6.
- Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. *Cell cycle control in breast cancer cells*. J Cell Biochem. 2006 Feb 1;97(2):261-74. Review
- Carpenter R, Miller WR. *Role of aromatase inhibitors in breast cancer*. Br J Cancer. 2005 Aug;93 Suppl 1:S1-5. Review
- Chang EC, Frasor J, Komm B, Katzenellenbogen BS. *Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells*. Endocrinology. 2006 Oct;147(10):4831-42. Epub 2006 Jun 29.
- Clarke RB. *Ovarian steroids and the human breast: regulation of stem cells and cell proliferation*. Maturitas. 2006 Jul 20;54(4):327-34. Epub 2006 Jun 30. Review
- Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, Vergote I. *Ovarian cancer*. Crit Rev Oncol Hematol. 2006 Nov;60(2):159-79. Epub 2006 Oct 2. Review
- Cordera F, Jordan VC. *Steroid receptors and their role in the biology and control of breast cancer growth*. Semin Oncol. 2006 Dec;33(6):631-41. Review

- Darwish H, Krisinger J, Furlow JD, Smith C, Murdoch FE, DeLuca HF. *An estrogen-responsive element mediates the transcriptional regulation of calbindin D-9K gene in rat uterus*. J Biol Chem. 1991 Jan 5;266(1):551-8.
- de Cupis A, Noonan D, Pirani P, Ferrera A, Clerico L, Favoni RE. *Comparison between novel steroid-like and conventional nonsteroidal antioestrogens in inhibiting oestradiol- and IGF-I-induced proliferation of human breast cancer-derived cells*. Br J Pharmacol. 1995 Nov;116(5):2391-400.
- Djuric Z, Poore KM, Depper JB, Uhley VE, Lababidi S, Covington C, Klurfeld DM, Simon MS, Kucuk O, Heilbrun LK. *Methods to increase fruit and vegetable intake with and without a decrease in fat intake: compliance and effects on body weight in the nutrition and breast health study*. Nutr Cancer. 2002;43(2):141-51.
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. *Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells*. Endocr Relat Cancer. 2003 Jun;10(2):179-86. Review
- Edwards DP. *Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone*. Annu Rev Physiol. 2005;67:335-76. Review
- Ercoli A, Scambia G, Fattorossi A, Raspaglio G, Battaglia A, Cicchillitti L, Malorni W, Rainaldi G, Benedetti Panici P, Mancuso S. *Comparative study on the induction of cytostasis and apoptosis by ICI 182,780 and tamoxifen in an estrogen receptor-negative ovarian cancer cell line*. Int J Cancer. 1998 Mar 30;76(1):47-54.
- Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell. 1990 Jun 1;61(5):759-67. Review
- Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst. 1977 Jul;59(1):221-6. Review
- Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. *Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer*. Trends Endocrinol Metab. 2001 Sep;12(7):320-7. Review
- Fotovati A, Fujii T, Yamaguchi M, Kage M, Shirouzu K, Oie S, Basaki Y, Ono M, Yamana H, Kuwano M. *17Beta-estradiol induces down-regulation of Cap43/NDRG1/Drg-1, a putative differentiation-related and metastasis suppressor gene, in human breast cancer cells*. Clin Cancer Res. 2006 May 15;12(10):3010-8.

Glidewell-Kenney C, Weiss J, Lee EJ, Pillai S, Ishikawa T, Ariazi EA, Jameson JL. *ERE-independent ERalpha target genes differentially expressed in human breast tumors*. Mol Cell Endocrinol. 2005 Dec 21;245(1-2):53-9. Epub 2005 Nov 17.

Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC. *Anatomy of the estrogen response element*. Trends Endocrinol Metab. 2004 Mar;15(2):73-8. Review

Hamilton TC, Behrens BC, Louie KG, Ozols RF. *Induction of progesterone receptor with 17 beta-estradiol in human ovarian cancer*. J Clin Endocrinol Metab. 1984 Sep;59(3):561-3.

Hamilton TC, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR, Ozols RF. *Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors*. Cancer Res. 1983 Nov;43(11):5379-89.

Harris CC. *Human tissues and cells in carcinogenesis research*. Cancer Res. 1987 Jan 1;47(1):1-10. Review

Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand*. Endocrinology. 2002 Nov;143(11):4172-7.

Hayashi S, Yamaguchi Y. *Basic research for hormone-sensitivity of breast cancer*. Breast Cancer. 2006;13(2):123-8. Review

Hickey BE, Francis D, Lehman MH. *Sequencing of chemotherapy and radiation therapy for early breast cancer*. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Oct 18;(4):CD005212. Review

Holschneider CH, Berek JS. *Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors*. Semin Surg Oncol. 2000 Jul-Aug;19(1):3-10. Review

Horwitz KB, Koseki Y, McGuire WL. *Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen*. Endocrinology. 1978 Nov;103(5):1742-51.

Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. *ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen*. Cancer. 2000 Aug 15;89(4):817-25.

Howell A, Robertson JF, Vergote I. *A review of the efficacy of anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer with visceral metastases.* Breast Cancer Res Treat. 2003 Dec;82(3):215-22. Review

Hudziak RM, Shepard HM, Ullrich A, Fendly BM. *Monoclonal antibodies directed to the Her2 receptor.* US Patent 5,677,171 dated Oct 14 1997

Jordan VC, Lewis JS, Osipo C, Cheng D. *The apoptotic action of estrogen following exhaustive antihormonal therapy: a new clinical treatment strategy.* Breast. 2005 Dec;14(6):624-30. Epub 2005 Oct 3. Review

Kang HS, Ahn HS, Kang HJ, Gye MC. *Effect of estrogen on the expression of occludin in ovariectomized mouse brain.* Neurosci Lett. 2006 Jul 10;402(1-2):30-4. Epub 2006 Apr 24.

Kiechle M [Hrsg.] *Gynäkologie und Geburtshilfe.* 1. Aufl., Elsevier GmbH, München (2007)

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato ACB. *A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor.* Nucleic Acids Res. 1988 Jan 25;16(2):647-63.

Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. *Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors.* J Mol Endocrinol. 2004 Oct;33(2):387-410.

Klinge CM. *Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.* Nucleic Acids Res. 2001 Jul 15;29(14):2905-19. Review

Kraichely DM, Sun J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta: correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members.* Endocrinology. 2000 Oct;141(10):3534-45.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.* Endocrinology. 1997 Mar;138(3):863-70.

Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, Berrino F, Tjonneland A, Bigaard J, Olsen A, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Nagel G, Boeing H, Trichopoulos D, Economou G, Bellos G, Palli D, Tumino R, Panico S, Sacerdote C, Krogh V, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Ardanaz E, Amiano P, Pera G, Quiros JR, Martinez C, Tormo MJ, Wirfalt E, Berglund G, Hallmans G, Key TJ, Reeves G, Bingham S, Norat T, Biessy C, Kaaks R, Riboli E. *Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer. 2004 Sep 20;111(5):762-71.

Lerebours F, Lidereau R. *Molecular alterations in sporadic breast cancer*. Crit Rev Oncol Hematol. 2002 Nov;44(2):121-41. Review

Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie. 7. völlig neu bearbeitete Aufl., Springer-Verlag, Berlin (2003)

Lukanova A, Kaaks R. *Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Jan;14(1):98-107. Review

May FE, Westley BR. *Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells*. Biomed Pharmacother. 1995;49(9):400-14. Review

McDonnell DP, Connor CE, Wijayarathne A, Chang CY, Norris JD. *Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators*. Recent Prog Horm Res. 2002;57:295-316. Review

McDonnell DP, Norris JD. *Connections and regulation of the human estrogen receptor*. Science. 2002 May 31;296(5573):1642-4. Review

Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. *Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues*. J Med Chem. 2001 Nov 22;44(24):4230-51.

Meza-Junco J, Montano-Loza A, Aguayo-Gonzalez A. *Molecular basis of cancer*. Rev Invest Clin. 2006 Jan-Feb;58(1):56-70. Review

Montgomery S, Shaw L, Pantelides N, Taggart M, Austin C. *Acute effects of oestrogen receptor subtype-specific agonists on vascular contractility*. Br J Pharmacol. 2003 Aug;139(7):1249-53.

Morimoto H, Safrit JT, Bonavida B. *Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha- and diphtheria toxin-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant human ovarian tumor cell lines.* J Immunol. 1991 Oct 15;147(8):2609-16.

Morimoto H, Yonehara S, Bonavida B. *Overcoming tumor necrosis factor and drug resistance of human tumor cell lines by combination treatment with anti-Fas antibody and drugs or toxins.* Cancer Res. 1993 Jun 1;53(11):2591-6.

Moy B, Goss PE. *Estrogen receptor pathway: resistance to endocrine therapy and new therapeutic approaches.* Clin Cancer Res. 2006 Aug 15;12(16):4790-3.
Review

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. *Mechanisms of estrogen action.* Physiol Rev. 2001 Oct;81(4):1535-65. Review

Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. *The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.* J Biol Chem. 1971 Jan 10;246(1):174-81.

Omelyanenko V, Gentry C, Kopecková P, Kopecek J. *HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro.* Int J Cancer. 1998 Feb 9;75(4):600-8.

Osborne CK. *Tamoxifen in the treatment of breast cancer.* N Engl J Med. 1998 Nov 26;339(22):1609-18. Review

Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. *Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites.* Science. 1997 Sep 5;277(5331):1508-10.

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptor beta in breast cancer.* Endocr Relat Cancer. 2002 Mar;9(1):1-13. Review

Paul R, Silve S, De Nys N, Dupuy PH, Bouteiller CL, Rosenfeld J, Ferrara P, Le Fur G, Casellas P, Loison G. *Both the immunosuppressant SR31747 and the antiestrogen tamoxifen bind to an emopamil-insensitive site of mammalian Delta8-Delta7 sterol isomerase.* J Pharmacol Exp Ther. 1998 Jun;285(3):1296-302.

Pepe GJ, Albrecht ED. *Regulation of functional differentiation of the placental villous syncytiotrophoblast by estrogen during primate pregnancy.* Steroids. 1999 Sep;64(9):624-7. Review

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. *Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion*. Crit Rev Oncol Hematol. 2004 Jul;51(1):55-67. Review

Pratt SE, Pollak MN. *Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media*. Cancer Res. 1993 Nov 1;53(21):5193-8.

Pritchard K. *Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: endocrine therapy in premenopausal women*. Breast Cancer Res. 2005;7(2):70-6. Epub 2005 Feb 11. Review

Rhim JS, Thraves P, Dritschilo A, Kuettel MR, Lee MS. *Radiation-induced neoplastic transformation of human cells*. Scanning Microsc. 1993 Mar;7(1):209-15; discussion 215-6. Review

Robert Koch-Institut [Hrsg.], *Brustkrebs – Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Heft 25*. 1. Aufl., Statistisches Bundesamt, Zweigstelle Bonn, Informations- und Dokumentationszentrum, Bonn (2005)

Robertson JF. *Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator--future possibilities in breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2001 Dec;79(1-5):209-12. Review

Rock CL, Demark-Wahnefried W. *Can lifestyle modification increase survival in women diagnosed with breast cancer?* J Nutr. 2002 Nov;132(11 Suppl):3504S-3507S. Review

Rogan AM, Hamilton TC, Young RC, Klecker RW Jr, Ozols RF. *Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer*. Science. 1984 Jun 1;224(4652):994-6.

Russo J, Russo IH. *The role of estrogen in the initiation of breast cancer*. J Steroid Biochem Mol Biol. 2006 Dec;102(1-5):89-96. Review

Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK. *Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response*. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1 Pt 2):447S-54S. Review

Sengupta K, Banerjee S, Saxena NK, Jonathan NB, Campbell DR, Banerjee SK. *Differential expression of VEGF-A mRNA by 17beta-estradiol in breast tumor cells lacking classical ER-alpha may be mediated through a variant form of ER-alpha.* Mol Cell Biochem. 2004 Jul;262(1-2):215-24.

Sheppard D. *Epithelial integrins.* Bioessays. 1996 Aug;18(8):655-60. Review

Shiu RP, Watson PH, Dubik D. *c-myc oncogene expression in estrogen-dependent and -independent breast cancer.* Clin Chem. 1993 Feb;39(2):353-5. Review

Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. *Molecular evolution of breast cancer.* J Pathol. 2005 Jan;205(2):248-54. Review

Singh RR, Kumar R. *Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis.* J Cell Biochem. 2005 Oct 15;96(3):490-505. Review

Song RX, Santen RJ. *Apoptotic action of estrogen.* Apoptosis. 2003 Jan;8(1):55-60. Review

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst. 1973 Nov;51(5):1409-16.

Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson K, Sun J, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. *Pyrazole ligands: structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor-alpha-selective agonists.* J Med Chem. 2000 Dec 28;43(26):4934-47.

Steeg PS, Zhou Q. *Cyclins and breast cancer.* Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1-3):17-28. Review

Stokes K, Alston-Mills B, Teng C. *Estrogen response element and the promoter context of the human and mouse lactoferrin genes influence estrogen receptor alpha-mediated transactivation activity in mammary gland cells.* J Mol Endocrinol. 2004 Oct;33(2):315-34.

Stoler AB. *Genes and cancer.* Br Med Bull. 1991 Jan;47(1):64-75. Review

Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. *Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.* Science. 1985 Nov 22;230(4728):943-5.

Sutherland RL, Prall OW, Watts CK, Musgrove EA. *Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1998 Jan;3(1):63-72. Review

Takahashi K, Suzuki K. *Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells*. Int J Cancer. 1993 Sep 30;55(3):453-8.

Treack O, Kindzorra I, Pauser K, Treack L, Ortmann O. *Expression of icb-1 gene is interferon-gamma inducible in breast and ovarian cancer cell lines and affects the IFN gamma-response of SK-OV-3 ovarian cancer cells*. Cytokine. 2005 Nov 3;32(3-4):137-42. Epub 2005 Oct 10.

Treack O, Odani T, Itoh N, Imai H, Fujita S, Kohroki J, Nakanishi T, Diedrich K, Ortmann O, Tanaka K, Vollmer G. *Detection of increased icb-1 transcript levels in maturing HL-60 cells: a novel marker for granulocytic and monocytic in vitro differentiation*. Leuk Res. 2002 Aug;26(8):765-9.

Treack O, Strunck E, Vollmer G. *A novel basement membrane-induced gene identified in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC1B*. FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):426-30.

Umekita Y, Hiipakka RA, Kokontis JM, Liao S. *Human prostate tumor growth in athymic mice: inhibition by androgens and stimulation by finasteride*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11802-7.

van Dijk MA, Floore AN, Kloppenborg KI, van't Veer LJ. *A functional assay in yeast for the human estrogen receptor displays wild-type and variant estrogen receptor messenger RNAs present in breast carcinoma*. Cancer Res. 1997 Aug 15;57(16):3478-85.

Vandewalle B, Lefebvre J. *Opposite effects of estrogen and catecholesterogen on hormone-sensitive breast cancer cell growth and differentiation*. Mol Cell Endocrinol. 1989 Feb;61(2):239-46.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med. 1988 Sep 1;319(9):525-32.

Vogt PK. *Cancer genes*. West J Med. 1993 Mar;158(3):273-8.

Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. *A potent specific pure antiestrogen with clinical potential*. Cancer Res. 1991 Aug 1;51(15):3867-73.

Wakeling AE, Valcaccia B, Newbould E, Green LR. *Non-steroidal antioestrogens--receptor binding and biological response in rat uterus, rat mammary carcinoma and human breast cancer cells.* J Steroid Biochem. 1984 Jan;20(1):111-20.

Wozei E, Hermanowicz SW, Holman HY. *Developing a biosensor for estrogens in water samples: study of the real-time response of live cells of the estrogen-sensitive yeast strain RMY/ER-ERE using fluorescence microscopy .* Biosens Bioelectron. 2006 Feb 15;21(8):1654-8. Epub 2005 Sep 6.

Yager JD, Davidson NE. *Estrogen carcinogenesis in breast cancer.* N Engl J Med. 2006 Jan 19;354(3):270-82. Review

Yashwanth R, Rama S, Anbalagan M, Rao AJ. *Role of estrogen in regulation of cellular differentiation: a study using human placental and rat Leydig cells.* Mol Cell Endocrinol. 2006 Feb 26;246(1-2):114-20. Epub 2006 Jan 18. Review

Yu D, Wolf JK, Scanlon M, Price JE, Hung MC. *Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A.* Cancer Res. 1993 Feb 15;53(4):891-8.

Yue W, Santen RJ, Wang JP, Li Y, Verderame MF, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan P, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL. *Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis.* J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Sep;86(3-5):477-86. Review

Zhang X, Minale L, Zampella A, Smith CD. *Microfilament depletion and circumvention of multiple drug resistance by sphinxolides.* Cancer Res. 1997 Sep 1;57(17):3751-8.

Publikation

Bollmann J, Ortmann O, Treeck O.

Expression of differentiation-associated gene icb-1 is estrogen-responsive in ovarian and breast cancer cell lines.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2008 Mar;109(1-2):16-21. Epub 2007 Dec 7.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

20.11.2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. O. Ortmann danke ich ganz herzlich für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ich verdanke ihm darüber hinaus jede erdenkliche hilfreiche Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. nat. O. Treeck. Jede Phase dieser Arbeit hat er intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Sein kompetenter Rat und seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute. Bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit gewährte er mir jederzeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ohne sein Wissen, ohne seine Ideen und seine konstruktive Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen.

Vielen Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für die außerordentlich gute Zusammenarbeit. Dem Forschungsteam, insbesondere Frau A. Vollmer und Frau H. Houlihan, danke ich für die professionelle und sehr geduldige Einführung in die Laborarbeit. Von allen Mitgliedern des Teams habe ich stets freundliche und uneingeschränkte Unterstützung erfahren.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch bei Frau K. Lückemeyer, die mir mit zahlreichen Tipps die statistische Auswertung am Computer und damit die Fertigstellung der Dissertation wesentlich erleichtert hat.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite gestanden haben.

Lebenslauf

Name: Julia Maria Bollmann

Anschrift: An der Kreuzbreite 5a
48231 Warendorf

Telefon: 02581 / 8769
0171 / 1520425

Geburtsdatum: 09.09.1983

Geburtsort: Telgte

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung: 1990-1994 Josef-Grundschule, Warendorf
1994-2003 Gymnasium Laurentianum, Warendorf
(Abiturnote 1,3)

Praktika: Februar 1999 Schulpraktikum im Josephs-Hospital
Warendorf

Sommer 2002 Ferienpraktikum in der gynäkologischen
Praxis Dr. Freischem und Kollegen Münster

Sommer 2003 Pflegepraktikum in der Raphaelsklinik
Münster

Sommer 2004 Pflegepraktikum im Clemenshospital Münster

- Studium:** 10/2003 - 09/2005 vorklinischer Abschnitt des
Medizinstudiums an der Universität Magdeburg
(Note des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung 2,0;
Wahlfach Einführung in die Molekulare Medizin – Note
sehr gut)
- 10/2005 – 11/2009 klinischer Abschnitt des Medizinstudiums
an der Universität Regensburg
- Wahlfächer:** WS 2005/2006 Strahlentherapie
- WS 2006/2007 Forensische Psychiatrie
- SS 2007 Sportmedizin
- WS 2007/2008 Gynäkologie und Geburtshilfe
- SS 2007 und WS 2007/2008 Propädeutik der Akupunktur
Teil I und II
- Famulaturen:** Februar 2006 Josephs-Hospital Warendorf,
Abteilung für Allgemein- und Gefäßchirurgie
- August 2006 Kardiologische Praxis,
Frau Dr. med. K. Laschinger-Oestreicher
- August 2007 Allgemeines Krankenhaus Wien,
Abteilung für Innere Medizin (Schwerpunkt Onkologie)
- September 2007 Clemenshospital Münster,
Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
- Februar 2008 Universitätsklinik Münster,
Abteilung für Dermatologie

Praktisches Jahr: 08/2008 – 10/2008 Chirurgie im Mayo General Hospital
in Castlebar, Irland
10/2008 – 12/2008 Chirurgie im Universitätsklinikum
Regensburg

12/2008 Gynäkologie und Geburtshilfe im
Universitätsklinikum Regensburg (Krankenhaus St. Josef)
12/2008 – 04/2009 Gynäkologie und Geburtshilfe im
Kantonsspital Winterthur, Schweiz

04/2009 – 07/2009 Innere Medizin im Universitätsklinikum
Regensburg