

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

**EINFLUSS VON ÖSTROGENREZEPTOR- β -MODULATOREN
AUF DIE CHEMOTHERAPEUTIKA-INDUZIERTE APOPTOSE
VON MAMMAKARZINOMZELLEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Maria Dietlmeier

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

**EINFLUSS VON ÖSTROGENREZEPTOR- β -MODULATOREN
AUF DIE CHEMOTHERAPEUTIKA-INDUZIERTE APOPTOSE
VON MAMMAKARZINOMZELLEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Katharina Maria Dietlmeier

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Oliver Treeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Einleitung	6
1.1 Das Mammakarzinom.....	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie.....	7
1.1.3 Klassifikation	8
1.1.4 Therapie.....	10
1.2 Die Östrogenrezeptoren.....	11
1.2.1 Östrogenrezeptor β und α	12
1.2.2 Wirkmechanismen der Östrogenrezeptoren	15
1.2.3 Die Östrogene.....	17
1.2.4 Östrogenrezeptoren im Mammakarzinom.....	19
1.2.5 ER β -Modulatoren und deren Wirkmechanismen.....	23
1.2.6 Rezeptor-Status der verwendeten Zelllinien	26
1.3 Die Apoptose	27
1.3.1 Die Caspase-Kaskade.....	28
1.3.2 Der extrinsische Apoptoseweg.....	28
1.3.3 Der intrinsische Apoptoseweg	30
1.3.4 Die Rolle der Apoptose bei der Karzinogenese	31
1.3.5 Die Rolle von ER β bei der Apoptose	34
1.3.6 Apoptose-Nachweise.....	36
2 Fragestellung und Ziel der Arbeit	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Die Zellkultur	39
3.1.1 Verwendete Zelllinien	39
3.1.2 Die Standardkultur	39
3.2 Apoptose-Assay.....	40
3.2.1 Gewinnung der Zellsuspension	40
3.2.2 Inkubation.....	41
3.2.3 Messung	51
3.3 CellTiter-Blue®-Assay (Proliferations-Assay)	51

3.4	Statistische Auswertung	52
3.5	Materialien.....	52
3.5.1	Apoptose-auslösende Stoffe	54
3.5.2	Verwendete ER β -Modulatoren	55
4	Resultate.....	56
4.1	FERb-033.....	56
4.1.1	FERb-033 ohne Kombination	57
4.1.2	FERb-033 + Staurosporine.....	59
4.1.3	FERb-033 + Etoposid.....	61
4.1.4	FERb-033 + Doxorubicin.....	64
4.1.5	FERb-033 + Docetaxel.....	67
4.2	WAY200070.....	69
4.2.1	WAY200070 ohne Kombination	70
4.2.2	WAY200070 + Staurosporine.....	72
4.2.3	WAY200070 + Etoposid.....	74
4.2.4	WAY200070 + Doxorubicin	77
4.2.5	WAY200070 + Docetaxel.....	79
4.3	3- β -Adiol	82
4.3.1	3- β -Adiol ohne Kombination	82
4.3.2	3- β -Adiol + Staurosporine.....	83
4.3.3	3- β -Adiol + Etoposid.....	83
4.3.4	3- β -Adiol + Doxorubicin.....	84
4.3.5	3- β -Adiol + Docetaxel.....	85
4.4	Liquiritigenin	85
4.4.1	Liquiritigenin ohne Kombination	86
4.4.2	Liquiritigenin + Staurosporine	88
4.4.3	Liquiritigenin + Etoposid	91
4.4.4	Liquiritigenin + Doxorubicin	94
4.4.5	Liquiritigenin + Docetaxel	96
4.5	ErB-041	99
4.5.1	ErB-041 ohne Kombination	99
4.5.2	ErB-041 + Staurosporine.....	101
4.5.3	ErB-041 + Etoposid.....	103

4.5.4	ErB-041 + Doxorubicin.....	106
4.5.5	ErB-041 + Docetaxel.....	108
4.6	PHTPP	111
4.6.1	PHTPP ohne Kombination	111
4.6.2	PHTPP mit Staurosporine	113
4.7	(R,R)-THC	115
4.7.1	(R,R)-THC ohne Kombination.....	115
4.7.2	(R,R)-THC + Staurosporine	117
4.8	MDA-MB-231-Zellen	119
4.9	MCF-7-Zellen	123
4.10	T47D-Zellen	127
4.11	ZR-75-1-Zellen	131
5	Diskussion.....	133
5.1	FERb-033.....	134
5.2	WAY200070.....	137
5.3	3-β-Adiol	140
5.4	Liquiritigenin	142
5.5	ErB-041	145
5.6	PHTPP	147
5.7	(R,R)-THC	148
5.8	MDA-MB-231-Zellen	149
5.9	MCF-7-Zellen	152
5.10	T47D-Zellen	155
5.11	ZR-75-1-Zellen	157
6	Zusammenfassung und Ausblick	160
7	Literaturverzeichnis	162
8	Anhang	180
8.1	Abkürzungsverzeichnis	180
8.2	Tabellenverzeichnis	181
8.3	Abbildungsverzeichnis	181
9	Lebenslauf.....	192
10	Danksagung.....	194
11	Erklärung zur eigenhändigen Anfertigung.....	195

1 Einleitung

Dank intensiver Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Onkologie, insbesondere auf molekularer Ebene, wurden während der letzten Jahrzehnte große Fortschritte in der Therapie des Mammakarzinoms gemacht. Das Behandlungskonzept kann immer besser an spezielle Tumorcharakteristika angepasst werden. Aufgrund der Entdeckung spezifischer Rezeptoren und Proteine auf der Tumorzelloberfläche und in den Tumorzellen gibt es zusätzlich zu Bestrahlung und Chemotherapie Möglichkeiten der endokrinen und Target-spezifischen Therapie, welche für den Patienten oft deutlich verträglicher ist, da sie spezifisch nur an bestimmten Zellen wirkt und nicht alle sich teilenden Zellen angegriffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels in-vitro Versuchen eventuelle neue spezifische Therapiemöglichkeiten im Hinblick auf den Östrogenrezeptor β untersucht.

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist ein maligne entarteter Tumor, der vom Epithel der Drüsenlobuli oder der Milchgänge der weiblichen Brust ausgeht.

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist mit mehr als 1 Million Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In Deutschland ergibt sich eine Inzidenz von 72.000 Neuerkrankungen pro Jahr, somit entwickelt jede 11. Frau in Deutschland im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom. Es ist für 29,3% aller Malignomerkrankungen verantwortlich.¹ Die Häufigkeit steigt mit zunehmendem Lebensalter, wobei ein Gipfel zwischen 60 und 80 Jahren erreicht wird.² Allerdings können Frauen jeden Alters erkranken und in der Alterskategorie zwischen 35 und 59 Jahren handelt es sich mit 40% aller Tumorneuerkrankungen und mit 30% aller tumorbedingten Todesursachen um die

¹ Weyerstahl und Stauber 2013

² Kiechle 2011

häufigste Tumorentität. In der westlichen Welt handelt es sich bei Frauen zwischen 35 und 55 Jahren sogar um die häufigste Todesursache überhaupt.³

Die relative 5-Jahresüberlebensrate nach Diagnose lag 2008 über alle Stadien hinweg bei etwa 83%.⁴

1.1.2 Ätiologie

Die genaue Ätiologie für die Entstehung eines Mammakarzinoms ist bis heute nicht bekannt. Die meisten Fälle (>90%) sind sporadisch und nur circa 5% sind hereditärer Genese. Bei etwa der Hälfte der genetisch bedingten Mammakarzinome liegt eine Mutation im BRCA1- oder BRCA2-Gen vor. Diese Genmutation führt zu einem lebenslangen Risiko von 80-90% an Brustkrebs und von 30-60% an einem Ovarialkarzinom zu erkranken.⁵

Es gibt eine Vielzahl von Risikofaktoren, die neben der genetischen Komponente das Auftreten vor allem des spontan entstehenden Mammakarzinoms begünstigen. Tabelle 1 zeigt die wichtigsten prädisponierenden Faktoren und soweit bekannt den Wert der Risikoerhöhung.

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Mammakarzinom^{6,7}

Risikofaktor	Risikoerhöhung
Langer Östrogeneinfluss (frühe Menarche <12 Jahre, späte Menopause >55Jahre)	1-2
supraphysiologische postmenopausale Östrogensubstitution	1-3
Ovulationshemmer (Einnahme >5 Jahre)	
Nulliparität	1,5-2,3
höheres Alter (>30 Jahre) bei ausgetragener Erstschwangerschaft	~3
fortgeschrittenes Alter	
Adipositas	2-3
fleisch- und fettreiche Ernährung	
Nikotinabusus	
vermehrter Alkoholkonsum	1,5-2

³ Weyerstahl und Stauber 2013

⁴ Alexander Katalinic 2012

⁵ Kiechle 2011

⁶ Weyerstahl und Stauber 2013

⁷ Böcker 2012

Mastopathie (mit Atypien höheres Risiko)	~2
LCIS, DCIS	12
kontralaterales Mammakarzinom	>10
genetische Disposition (BRCA1,-2) oder familiäre Belastung	2-9
ionisierende Strahlen	
ethnische Faktoren	

1.1.3 Klassifikation

Histologisch teilt man das Mammakarzinom in das lobuläre (von den Drüsenläppchen ausgehend) und duktale (von den Milchgängen ausgehend) Karzinom ein. Das invasive duktale Karzinom ist mit circa 60% aller invasiven Mammakarzinome am häufigsten. Das invasive lobuläre Karzinom macht circa 10-20% aller invasiven Mammakarzinome aus. Als Vorläuferläsion der invasiven Karzinome gelten jeweils das lobuläre (5%) und duktale (95%) Carcinoma in situ. Das medulläre Karzinom, das Gallertkarzinom, das tubuläre Karzinom, das papilläre Karzinom und der Morbus Paget der Mamille zählen als seltene Subtypen zum duktalen Karzinom.⁸

Weiterhin spielt auch das Grading, die Einteilung des histologischen Malignitätsgrades und somit die Beurteilung der Aggressivität des Tumors, eine wichtige Rolle bei der Klassifikation und Therapie des Mammakarzinoms. Das Grading gibt Aussage über den Differenzierungsgrad des Tumors (G1 = hoch differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = schlecht differenziert).⁹ Zur Berechnung des Scores werden nach Elston & Ellis die Parameter Tubulusausbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate berücksichtigt.¹⁰

Klinisch teilt man das Mammakarzinom anhand der TNM-Klassifikation ein, wobei die Tumogröße (T), der Lymphknotenbefall (N) und die Fernmetastasierung (M) in die Stadieneinteilung für das Staging mit einbezogen werden.¹¹

Zusätzlich wird bei jedem Mammakarzinom der Hormonrezeptorstatus bestimmt, da dieser nach der St.-Gallen-Konsensus-Konferenz von 2011 für die Therapieentscheidung

⁸ Böcker 2012

⁹ Prof. Dr. Rolf Kreienberg et al. 2012

¹⁰ Elston und Ellis 2002

¹¹ Singletary und Greene 2003

von großer Bedeutung ist.¹² Dazu werden die Steroidhormonrezeptoren Östrogen- und Progesteronrezeptor per Immunhistochemie und der HER2/neu-Rezeptor (human epidermal growth factor receptor 2, ErbB2-Rezeptor) per Immunhistochemie und FISH bestimmt. Diese speziellen Marker sind wichtige prognostische und prädiktive Faktoren. Vor allem das Vorhandensein des Östrogenrezeptors lässt auf ein Ansprechen einer endokrinen Therapie hoffen.¹³ Die Anzahl der Östrogenrezeptoren eines Tumors ist direkt proportional zum Nutzen einer endokrinen Therapie.¹⁴ Im Abschnitt 1.2 werden die Östrogenrezeptoren näher erläutert.

Die Anwesenheit des Progesteronrezeptors korreliert häufig mit der des Östrogenrezeptors. Trotzdem scheint ein positiver Progesteronrezeptorstatus mit einer reduzierten Rezidivrate und einer besseren Überlebensrate unter endokriner Therapie einherzugehen.^{15,16}

Ein erhöhter HER2/neu-Rezeptor-Status ist grundsätzlich mit einem höheren Risiko für das Versagen einer endokrinen Therapie assoziiert.¹⁷ Allerdings hat sich mittlerweile die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab ergeben, welcher an HER2/neu bindet und dessen Signalkaskade unterbricht, wodurch sich die früher eher schlechte Prognose der HER2/neu-überexprimierenden Tumore verbessert.

Aufgrund des Rezeptorstatus ergeben sich derzeit vier verschiedene Kategorien des Mammakarzinoms: ER⁺ (ER⁺/HER2⁻), HER2⁺ (ER⁻/HER2⁺), triple-negative (TN; ER⁻/PR⁻/HER2⁻), und triple-positive (ER⁺/PR⁺/HER2⁺), wobei ER⁺-Tumore die beste Prognose aufweisen und Triple-Negative-Tumore die schlechteste.¹⁸

Bei etwa 70% aller Mammakarzinome lassen sich Östrogen- und Progesteronrezeptoren nachweisen, was mit der allgemein besten Prognose assoziiert ist.¹⁹

¹² Weyerstahl und Stauber 2013

¹³ Bertos und Park 2011

¹⁴ Rastelli und Crispino 2008

¹⁵ Bardou et al. 2003

¹⁶ Stendahl et al. 2006

¹⁷ Rastelli und Crispino 2008

¹⁸ Bertos und Park 2011

¹⁹ Dunnwald et al. 2007

1.1.4 Therapie

In der Therapie des Mammakarzinoms kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz: Operation, Radiatio, Chemotherapie, endokrine Therapie und Antikörpertherapie. Sie richtet sich individuell nach dem Staging, Grading und Rezeptorstatus. Operativ kann eine modifizierte radikale Mastektomie oder eine brusterhaltende Therapie (BET) durchgeführt werden. Je nach Lymphknotenbefall wird entweder nur der Sentinel-Lymphknoten entfernt oder eine komplette Axilla-Dissektion durchgeführt. Nach einer BET ist die adjuvante postoperative Bestrahlung obligat. Nach einer Mastektomie ist bei Patientinnen mit einem ausgedehnten Tumor oder einem ausgeprägten Lymphknotenbefall eine adjuvante Radiatio indiziert. Zur zytostatischen Therapie wird in der Regel eine Kombination von mehreren Substanzen eingesetzt. Dazu gehören die Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin), die Taxane (Paclitaxel, Docetaxel), Cyclophosphamid und 5-Flourouracil. Patienten mit HER2/neu-positivem Tumor bekommen zusätzlich zur Chemotherapie den monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Je nach Rezeptorstatus des Tumors wird eine endokrine Therapie durchgeführt. Dabei ist die wichtigste Methode der Östrogenentzug. Da bei prämenopausalen Frauen Östrogene vor allem im Ovar produziert werden, kommen Therapiemöglichkeiten wie GnRH-Agonisten oder operative ovarielle Ablation zur Hemmung der Östrogenproduktion zum Einsatz. Bei postmenopausalen Frauen findet die Östrogenproduktion hauptsächlich im Fettgewebe statt, wodurch Aromatasehemmer eingesetzt werden können. Der selektive Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen kommt sowohl bei prä- als auch bei postmenopausalen Patientinnen zum Einsatz und ist derzeit das wichtigste Medikament der endokrinen Therapie.²⁰ Tamoxifen bindet kompetitiv an den Östrogenrezeptor und hat je nach Gewebe eine dem Östrogen agonistische oder antagonistische Wirkung. Im Brustgewebe und an ER-positiven Bursttumoren entfaltet es eine antagonistische Wirkung und verhindert das Zellwachstum, wodurch Rezidivrate und Sterblichkeit stark gesenkt werden. Am Knochen- und Endometriumgewebe hat es hingegen eine agonistische Wirkung. Dies erhöht das Risiko für Endometriumhyperplasien und –karzinome. Weitere Nebenwirkungen sind klimakterische Beschwerden und

²⁰ Weyerstahl und Stauber 2013

thrombembolische Ereignisse.²¹ Eine adjuvante Tamoxifentherapie ist - unabhängig vom Lymphknotenstatus, dem Hormonstatus, dem Alter der Frau und dem Einsatz einer möglichen zytostatischen Therapie - bei ER- und PR-positiven Tumoren in der Regel fast immer indiziert.²²

1.2 Die Östrogenrezeptoren

Die Östrogenrezeptoren gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und zur Gruppe der nukleären Rezeptoren. Im Zellkern binden ihre Liganden die Östrogene an die Östrogenrezeptoren und wirken dort als Transkriptionsfaktoren.²³ Es existieren zwei unterschiedliche Östrogenrezeptoren, Estrogenrezeptor α (ERα) und Estrogenrezeptor β (ERβ)²⁴, welche teilweise gleiche und teilweise gegensätzliche biologische Funktionen haben. Ihre Bindung der verschiedenen Liganden und die Wirkung an der DNA funktionieren in ähnlicher Weise. Man kennt diverse physiologische und pharmakologische Liganden, welche teils als Agonisten, teils als Antagonisten und manche auch nur rezeptorspezifisch wirken.²⁵

ERs spielen eine wichtige Rolle bei der sexuellen Entwicklung und Reproduktion sowie auch bei vielen physiologischen Prozessen in verschiedenen Geweben.²⁶ Die beiden Isoformen ERα und ERβ unterscheiden sich auch dadurch, dass sie in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlich exprimiert werden. Die höchste Expression von ERα mRNA wurde im Endometrium gefunden. Die Expression von ERβ mRNA war in Granulosazellen und in Milchdrüsen am größten. Weiterhin wurde berichtet, dass nur ERα (und nicht ERβ) in Leydig-Zellen der Hoden entdeckt wurde²⁷, während nur ERβ (und nicht ERα) in heranreifenden Spermatiden gefunden wurde. Beide Östrogenrezeptoren sind vergleichbar häufig im Ovar sowie in Lunge, Brust, Knochen

²¹ Kiechle 2011

²² Prof. Dr. Rolf Kreienberg et al. 2012

²³ Enmark et al. 1997

²⁴ Katzenellenbogen et al. 2000

²⁵ Fox et al. 2008

²⁶ Kos et al. 2001

²⁷ Fisher et al. 1997

und Urogenitaltrakt vorzufinden.²⁸ Beide Subtypen sind auch in Bereichen des Gehirns vorzufinden, welche mit kognitiven und emotionalen Funktionen assoziiert sind.²⁹

1.2.1 Östrogenrezeptor β und α

ER α und ER β werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert. Ihre jeweilige Expression ist gewebe- und zelltypspezifisch.³⁰ Die Ähnlichkeit der beiden ERs geht auf eine Genduplikation vor circa 450 Milliarden Jahren zurück, welche sich dann durch diverse Mutationen in den jeweiligen Abschnitten unterschiedlich stark verändert hat.³¹

ER β wurde als zweiter Estrogenrezeptor im Jahre 1996 zuerst in Ratten³² und kurz darauf auch im humanen System³³ entdeckt. Das humane ER β -Gen (*ESR2*) liegt auf Chromosom 14q23.2, das Protein besitzt – wie auch die anderen Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie – 5 unterschiedliche Domänen, die mit A/B, C, D, E und F benannt wurden (Abbildung 1). Die A/B-Domäne besitzt eine Liganden-unabhängige aktivierende Funktion (AF-1), während die zentrale C-Domäne eine DNA-bindende Domäne (DBD) ist. Bei der E-Domäne handelt es sich um eine Liganden-bindende-Domäne (LBD), welche über die flexible D-Domäne mit der DBD verbunden ist. Die LBD weist eine weitere aktivierende Funktion (AF-2) auf, welche essentiell für die Bindung von Liganden und die infolgedessen stattfindende Rezeptordimerisierung ist. Die Funktion der F-Domäne ist zurzeit noch ungewiss.

²⁸ Enmark et al. 1997

²⁹ Sundermann et al. 2010

³⁰ Matthews und Gustafsson 2003

³¹ Kelley und Thackray 1999

³² Kuiper et al. 1996

³³ Mosselman et al. 1996

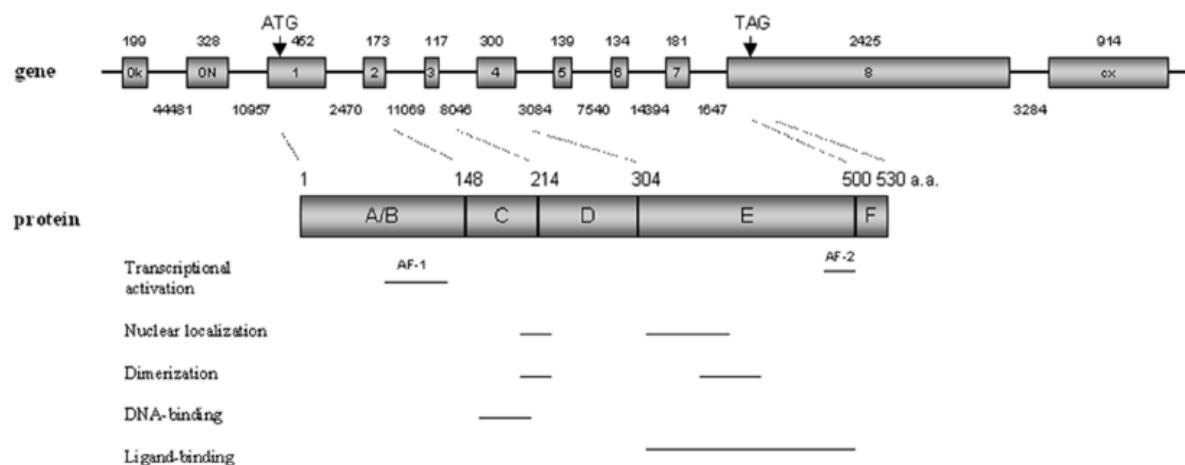


Abbildung 1: Struktur des humanen ER β -Gens sowie des Proteins mit funktionalen Domänen³⁴

Es existiert eine große Anzahl an verschiedenen ER β -Isoformen, die auch in unterschiedlichen Säugetierarten stark variieren und durch alternatives Splicen und Deletionen entstehen.³⁵ Im Menschen fanden sich bisher 5 verschiedene Transkripte von ER β mit voller Länge. Sie unterscheiden sich hauptsächlich am C-Terminus bzw. in Exon 8. Je nach Gewebe werden die verschiedenen Isoformen in unterschiedlicher Ausprägung exprimiert.³⁶ Sie können Homodimere und Heterodimere untereinander und mit ER α bilden.³⁷ Die verschiedenen ER β -Splicevarianten sind in Zellen an unterschiedlichen Orten lokalisiert, was vor allem durch Veränderungen der DBD entsteht. Ihre Lokalisationsmuster können auch durch Agonisten und Antagonisten beeinflusst werden.³⁸ Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass sich während der Karzinogenese von Brustkrebs die in den Zellen vorkommenden Isoformen verändern und es auch abhängig vom Karzinomtyp ist, welches Expressionsmuster an Isoformen vorhanden ist.^{39,40} ER β 1 als Wildtyp besteht aus 8 Exons mit 530 AS.⁴¹ ER β 2, oder auch genannt ER β cx, ist eine der am besten erforschten Isoformen von ER β . Er ist am C-Terminus

³⁴ Zhao et al. 2008

³⁵ Lewandowski et al. 2002

³⁶ Moore et al. 1998

³⁷ Ogawa et al. 1998a

³⁸ Price et al. 2001

³⁹ Poola et al. 2002

⁴⁰ Tong et al. 2002

⁴¹ Moore et al. 1998

verkürzt und besteht nur aus 495 AS; Exon 8 enthält als Folge von alternativem Splicing 26 andere AS. Aufgrund dieser Veränderung besteht eine deutlich verringerte Affinität zu Östradiol und ERE. Durch die Bildung von Heterodimeren mit ER α vermutet man so eine Hemmung der ER α -Transkriptionsaktivität.⁴²



Abbildung 2: ER β -Isoformen⁴³

ER β 2 wird in vielen Brustkrebsgeweben stark exprimiert.^{44,45} ER β 1 kommt zwar in gesundem Brustgewebe häufig vor, ist jedoch im Mammakarzinom oft nicht mehr nachweisbar. Ein Nachweis von ER β 1 im Mamma-Tumor korreliert aber mit einem

⁴² Ogawa et al. 1998b

⁴³ Mitter et al. 2005

⁴⁴ Palmieri et al. 2002

⁴⁵ Iwao et al. 2000

verbesserten Outcome bei einer adjuvanten Tamoxifentherapie im Vergleich zu ER β 1-negativen Tumoren.⁴⁶

ER α wurde in den späten 1950ern als erster Östrogenrezeptor entdeckt und charakterisiert.^{47,48} Das ER α Gen *ESR1* liegt auf Chromosom 6q25.1. Das ER α Protein weist die gleichen Domänen wie auch ER β auf: eine DBD, eine LBD und zwei aktivierende Domänen (AF-1 am N-Terminus und AF-2 am C-Terminus). Die Domänen DBD und AF-2 von ER α und β weisen einen sehr hohen Grad an Konservierung auf (96%), wohingegen N-terminale Domänen und AF-1 eine geringe Aminosäure-Ähnlichkeit zeigen (30%).⁴⁹ ER α ist der bisher deutlich eingehender erforschte Östrogenrezeptor und alle endokrinen Therapien beziehen sich bisher nur auf ER α .

Es gibt diverse Hinweise darauf, dass ER β bei verschiedenen Krebsarten (z.B. Brust-, Eierstock-, Prostatakrebs usw.) eine Rolle spielt sowie eine Östrogenantwort in verschiedenen Geweben und Organen wie dem kardiovaskulären System, ZNS, Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt, Muskel-, Skelett- und Immunsystem vermittelt.^{50,51}

Häufig bilden beide Rezeptoren zusammen, wenn sie koexprimiert sind, funktionelle Heterodimere. Die beiden Rezeptoren haben überlappende, aber jeweils auch eigene Aufgaben, da sie in bestimmten Zellen auch einzeln vorkommen. Es gibt Hinweise darauf, dass ER β in vielen Fällen, wenn beide Rezeptoren koexprimiert sind, die ER α -Wirkung antagonisiert oder moduliert.^{52,53} Auch wird vermutet, dass ER β eine wichtige Rolle bei der terminalen Differenzierung des Brustdrüsengewebes spielt.⁵⁴

1.2.2 Wirkmechanismen der Östrogenrezeptoren

Östrogene (siehe 1.2.3) interagieren mit den Estrogenrezeptoren α und β und haben durch verschiedene Signalwege einen gewebespezifischen Effekt. Nach der Bindung von

⁴⁶ Reese et al. 2014

⁴⁷ JENSEN 1962

⁴⁸ Heldring et al. 2007

⁴⁹ Deroo und Buensuceso 2010

⁵⁰ Deroo und Buensuceso 2010

⁵¹ Mitter et al. 2005

⁵² Matthews und Gustafsson 2003

⁵³ Weihua et al. 2000

⁵⁴ Förster et al. 2002

Östrogenen an deren Rezeptoren werden biologische Prozesse durch vier unterschiedliche Signalwege reguliert. Beim klassischen, direkten Signalweg binden nukleäre ER Hetero- oder Homodimere an ERE (Estrogen-responsive elements), wodurch weitere Ko-Regulatoren zum Transkriptions-Startpunkt rekrutiert werden (Abbildung 3 und Abbildung 1 oben links). Dies führt zu einer Veränderung des mRNA-Levels, zur Produktion von assoziierten Proteinen und letztendlich zu einer physiologischen Zellantwort.

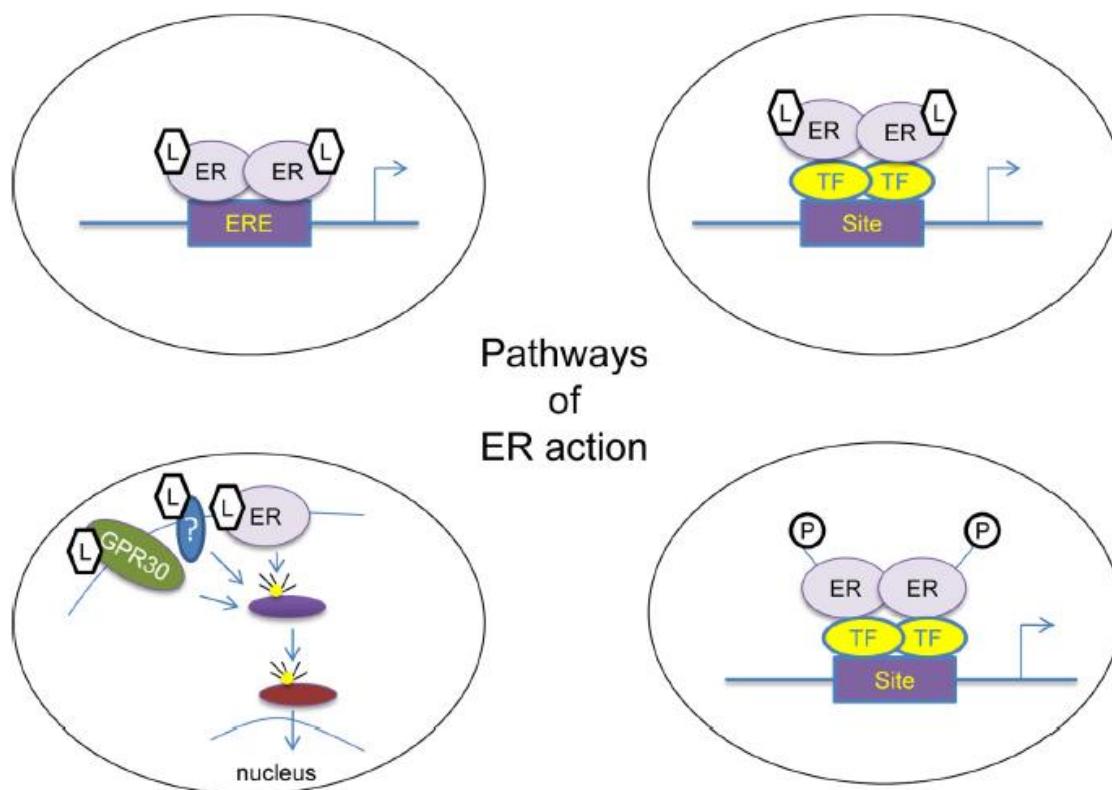


Abbildung 3: Vier verschiedene Signalwege der ER Aktivität⁵⁵

In einem zweiten Mechanismus (Abbildung 3, oben rechts) interagieren ERs mit weiteren Transkriptionsfaktoren (Protein-Protein-Interaktion⁵⁶), dem sogenannten Transkriptionsfaktor-Crosstalk. Im dritten nicht-genomischen Signalweg werden durch Aktivierung von Zellmembran-lokalisierten ERs weitere nachgeschaltete Signalkaskaden

⁵⁵ Zhao et al. 2010

⁵⁶ Heldring et al. 2007

aktiviert (Abbildung 3, unten links), wodurch extrem schnelle physiologische Antworten ohne Involvierung von Genregulation induziert werden. Im letzten Mechanismus werden ERs in Abwesenheit von Liganden durch extrazelluläre Stimuli aktiviert (Abbildung 3, unten rechts). Wachstumsfaktorsignalwege oder die Stimulation von anderen Signalwegen kann zu aktiven Kinasen und somit zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERs und/oder Ko-Regulatoren führen. Die Aktivierung beinhaltet eine Dimerisierung von ERs mit nachgeschalteter Bindung an DNA und letztendlicher Genregulation.^{57,58,59}

1.2.3 Die Östrogene

Die Östrogene wirken durch ihre Bindung an die Östrogenrezeptoren. Die Effekte der Östrogene werden durch ER α und ER β vermittelt, welche beide große Homologien aufweisen, sich aber in der N-terminalen und der Liganden-bindenden Domäne unterscheiden.⁶⁰ Östrogene zählen zu den weiblichen Geschlechtshormonen und gehören zur Gruppe der Steroidhormone. Sie werden bei prämenopausalen Frauen hauptsächlich in den Granulosazellen des Ovars aus den Androgenen der Theka-Zellen unter dem Einfluss von FSH und LH aus der Hypophyse gebildet. Bei postmenopausalen Frauen findet die Produktion der Östrogene vor allem in den Adipozyten statt. Es gibt verschiedene Östrogene. Zu den wichtigsten natürlichen Östrogenen (Estrogenen) gehören 17 β -Östradiol (Estradiol, E2), Östron (E1) und Östriol (E3), wobei E2 das mit der stärksten biologischen Aktivität ist.⁶¹ Es ist das wirksamste und bei prämenopausalen Frauen das häufigste Östrogen mit der größten Estrogenrezeptoraffinität.⁶² Zu den Wirkungen der Östrogene zählen Steuerung von Wachstum und Differenzierung der primären und während der Pubertät auch der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale (Uterus, Zervix, Vagina, Brustdrüse), Förderung der Eizellreifung und Vorbereitung der Gebärmutterhaut in der ersten Hälfte des Menstruationszyklus, Proliferation des Vaginalepithel, Öffnung des Muttermundes,

⁵⁷ Zhao et al. 2010

⁵⁸ Chen et al. 2008

⁵⁹ Heldring et al. 2007

⁶⁰ Kuiper et al. 1996

⁶¹ Behrends et al. 2012

⁶² Chen et al. 2008

Zunahme der Menge und Abnahme der Viskosität des Zervixschleimes kurz vor der Ovulation, Veränderungen an Uterus und Mamma und Stimulierung der Progesteronsynthese in der Plazenta während einer Schwangerschaft. Weiterhin hat es viele extragenitale Effekte an Haut/Schleimhäuten (regenerative Wirkung: Anregung der Hauterneuerung, Förderung der Durchblutung, Beeinflussung des Kollagengehaltes im Bindegewebe), Muskulatur/Knochen (anabole Wirkung: Stimulation der Osteoblasten und Knochenaufbau), Fettstoffwechsel (Abnahme von Gesamt- und LDL-Cholesterin, Zunahme des HDL-Cholesterins, positiver Einfluss hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos) und Gehirn/Psyche (Stimmungsaufhellung und Aktivitätssteigerung).⁶³

Auch in der Entstehung und im Wachstum von Brustkrebs spielen sie eine wichtige Rolle.⁶⁴ Es ist bekannt, dass Östrogene eine mitogene, Tumor-unterstützende Funktion bei Hormon-abhängigen Krebsarten wie dem Mammakarzinom einnehmen, da diese durch Bindung an den Östrogenrezeptoren die Zellproliferation fördern können.^{65, 66} Deshalb werden Antiöstrogene, wie Tamoxifen oder Aromatase-Inhibitoren, zur Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt.⁶⁷

Einige Studien implizieren, dass Östrogene auch an der Regulierung von Apoptose in Krebszelllinien beteiligt sind. Bereits 1991 untersuchten Kyprianou et al. die Wirkung von 17 β -Estradiol an Brustkrebszellen und fanden im Mausversuch heraus, dass ein Estrogenentzug den Tumorrückgang fördert, am ehesten über eine Steigerung der apoptotischen Aktivität sowie über den Rückgang der Proliferation.⁶⁸ Woraufhin Perillo et al. an MCF-7-Brustkrebszellen herausfand, dass 17 β -Estradiol den programmierten Zelltod hemmt, indem es die Genexpression des antiapoptotischen bcl-2 (siehe Kapitel 1.3) steigert.⁶⁹ Choi et al. konnten ähnliches an Ovarialkarzinomzellen zeigen.⁷⁰

⁶³ Behrends et al. 2012

⁶⁴ Yager und Davidson 2006

⁶⁵ Henderson et al. 1988

⁶⁶ Chen et al. 2008

⁶⁷ Clarke et al. 2003

⁶⁸ Kyprianou et al. 1991

⁶⁹ Perillo et al. 2000

⁷⁰ Choi et al. 2001

1.2.4 Östrogenrezeptoren im Mammakarzinom

Östrogene und deren Rezeptoren spielen sowohl in der normalen Entwicklung der Brust als auch in der Progression von Brustkrebs eine entscheidende Rolle. In gesunden Geweben wird das Hormon-stimulierte Wachstum kontrolliert. Kommt es zu hormonbedingtem unkontrollierten Wachstum, so ist dies entweder auf eine Überaktivität der Wachstums-induzierenden Signale oder auf eine Unteraktivität der Signale, die normalerweise die Proliferation inhibieren/stoppen, zurückzuführen.⁷¹ Der karzinogene Effekt von Östrogen und dessen Rezeptoren wird über drei verschiedene Wege ausgeübt. Die erste Möglichkeit ist, dass Östrogene über ER-vermittelte genomische und nicht-genomische Wege die Zellproliferation fördern. Beispielsweise könnte 17 β -Östradiol den Level an Wnt11 in Mammakarzinomen ER-vermittelt hochregulieren, wodurch Tumorzellen resistenter gegenüber Apoptose werden. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass Östrogene über Zellmembran-abhängige und ER-unabhängige Phosphorylierung von Zielmolekülen die Zellproliferation fördern. Zuletzt könnte ein karzinogener Effekt durch einen direkten toxischen Effekt von Östrogenmetaboliten auf DNA-Schädigungen, Mutationen und Zelltransformationen ausgeübt werden.⁷²

ER α wird in 50-80% aller Mammakarzinome exprimiert.⁷³ ER-positive Tumore weisen eine bessere Ansprechraten für Hormontherapien und eine geringere Mortalität auf.⁷⁴ Mitunter weil sich aus dem Rezeptorstatus eine weitere Möglichkeit der Therapie – die Hormontherapie, welche entweder die Östrogenproduktion einschränkt oder kompetitiv am Östrogenrezeptor wirkt – ergibt.⁷⁵ Die bisherigen Hormontherapien beziehen sich jedoch nur auf ER α .

ER β im Mammakarzinom

Es ist nachgewiesen, dass ER β , ebenso wie ER α und der Progesteronrezeptor (PR), im Mammakarzinom vorkommt, jedoch in unterschiedlichster Ausprägung, Häufigkeit und

⁷¹ Palmieri et al. 2002

⁷² Chen et al. 2008

⁷³ Osborne 1998

⁷⁴ Dunnwald et al. 2007

⁷⁵ Ali und Coombes 2002

Korrelation.^{76,77} Schon seit längerem gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von ER β mRNA und Protein in unterschiedlichen Tumoren, u.a. auch im Mammakarzinom, deutlich geringer ausfällt verglichen mit anderen Geweben.^{78,79,80}

Weiter konnte gezeigt werden, dass während der Tumogenese des Mammakarzinoms, sich das Verhältnis von ER α zu ER β verändert und der ER β -Status sich verringert im Vergleich zu gesundem Brustgewebe.^{81,82} Wohingegen andere Forschungsgruppen bei Tamoxifen-resistenten Zellen eine erhöhte ER β /ER α -Ratio vermuteten.^{83,84}

Man geht davon aus, dass die Östrogen-abhängige Zellproliferation ein grundlegender Schritt der Karzinogenese bei vielen gynäkologischen Karzinomen ist, da mitogene Effekte von Östrogenen zum Beispiel im Brustkrebs sowie auch im Endometrium-, Ovarial- und vermutlich auch im Prostata- und Kolonkarzinom nachgewiesen sind. Überall lässt sich jedoch eine verminderte ER β -Expression im Karzinom nachweisen. Der Verlust von ER β in Krebszellen könnte ein Zeichen der Entdifferenzierung im Tumor sein oder auch, was wahrscheinlicher erscheint, eine wichtiger Funktionsverlust, der die Östrogen-abhängige Tumorprogression bzw. die Entstehung eines Mamma-Karzinoms erst zulässt.^{85,86,87,88}

Auch Lindberg et al. konnten zeigen, dass ER β im Mammakarzinom weniger häufig exprimiert wird als in gesundem Brustdrüsengewebe und es eine direkte Korrelation der ER β -Expression mit Zelladhäsionsmolekülen, wie Integrin, gibt. Dadurch ergibt sich die Vermutung, dass ER β auch die Migration von Brustkrebszellen moduliert und somit eine Rolle bei der Metastasierung spielen könnte.⁸⁹

⁷⁶ Järvinen et al. 2000

⁷⁷ Dotzlaw et al. 1999

⁷⁸ Brandenberger et al. 1998

⁷⁹ Pujol et al. 1998

⁸⁰ Foley et al. 2000

⁸¹ Leygue et al. 1998

⁸² Roger et al. 2001

⁸³ Speirs et al. 1999

⁸⁴ Shaw et al. 2006

⁸⁵ Bardin et al. 2004

⁸⁶ Chen et al. 2008

⁸⁷ Lazennec et al. 2001

⁸⁸ Skliris et al. 2003

⁸⁹ Lindberg et al. 2010

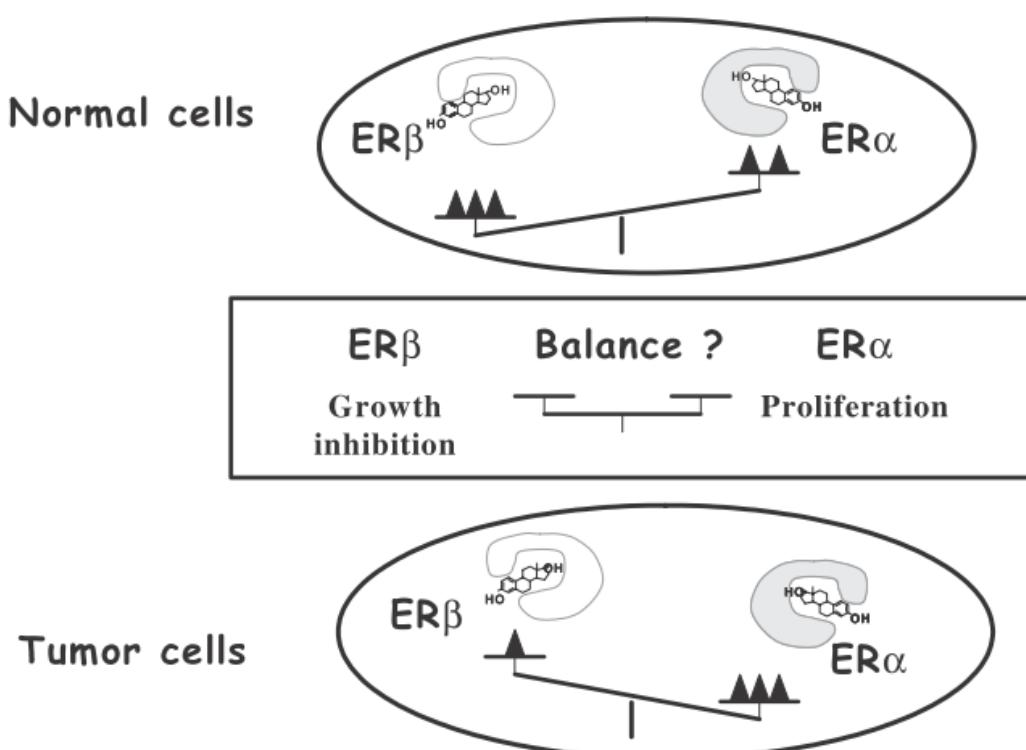


Abbildung 4: Schema des ER α und ER β Ungleichgewichts bei der Östrogen-abhängigen Tumor Progression.⁹⁰

Ebenso fanden Palmieri et. al Hinweise darauf, dass, obwohl ER β als Rezeptor in verschiedenen Brustkrebsproben nachweisbar war, keine Bindung an den Rezeptor erfolgen konnte. Durch weitere Untersuchungen konnten sie in diesen Proben die Splicevariante ER β cx nachweisen, die in noch unklarer Form eine Ligandenbindung verhinderte.⁹¹

Aus der bisherigen, teilweise sehr kontrovers diskutierten Forschung ergaben sich Hinweise darauf, dass die erhöhte Expression von ER β in Zusammenhang mit einer erfolgreicheren Hormontherapie steht sowie mit einer besseren Prognose korreliert.^{92,93,94} Der Rezeptorstatus von ER β in Korrelation mit ER α und PR wird als prognostischer

⁹⁰ Bardin et al. 2004

⁹¹ Palmieri et al. 2002

⁹² Herynk und Fuqua 2004

⁹³ Chen et al. 2008

⁹⁴ Wu et al. 2011

Indikator der Hormontherapie des Mammakarzinoms diskutiert.⁹⁵ Hinweise darauf fanden auch Gruvberger-Saal et al., welche bei Patientinnen mit negativem ER α -Status und positivem ER β -Status ein verlängertes krankheitsfreies Intervall nachweisen konnten.⁹⁶ In menschlichem Brustkrebs unterscheidet man zwei Formen von ER β -positivem Mammakarzinom: ER α ist vorhanden (ER α +) und ER α ist nicht zusätzlich vorhanden (ER α -), wobei ER α + circa 59% und ER α - circa 17% der ER β -positiven Mammakarzinomfälle ausmachen.^{97,98}

Durch umfangreiche Untersuchungen in seiner Arbeitsgruppe konnte Prof. Treeck zeigen, dass es von der jeweiligen ER β -Isoform abhängt, welche Rolle ER β in Mammakarzinomzellen spielt. So kann eine Überexpression des ER β -Wildtyps sowohl in ER α -negativen als auch ER α -positiven Brustkrebszellen die Proliferation senken und die Apoptoserate erhöhen im Gegensatz zur Überexpression von bestimmten Splicevarianten mit fehlenden Exons, welche in verschiedenen Brustkrebszellen entdeckt worden waren. Bei der Überexpression der Splicevarianten zeigten sich keine Effekte in Bezug auf Proliferation und Apoptose.⁹⁹

Ebenso konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Treeck gezeigt werden, dass MCF-10A-Mammaepithelzellen und MCF-7-Brustkrebszellen, in welchen ER β ausgeknockt wurde, Liganden-unabhängig ein stärkeres Zellwachstum haben. Ob durch verminderte Apoptose oder verstärkte Proliferation wurde jedoch bisher nicht untersucht. Die Regression von Tumorzellen *in vitro* wie auch *in vivo* ist auf eine verringerte Zellproliferation und/oder auf eine erhöhte Zelltodrate zurückzuführen. Die Daten wiesen darauf hin, dass der antiproliferative Effekt von ER β auf MCF-10A und MDF-7 Zellen durch die Expression von p21/WAF und Cyclin A2 reguliert wird. Zudem führte der Knockdown von ER β in MCF-10A Zellen zur verringerten Expression des epithelialen Zellmarkers Cytokeratin 8. Die Ergebnisse sprachen erneut dafür, dass ER β als Tumorsuppressor in Brustepithelien dient.¹⁰⁰ Diese Erkenntnisse waren mitunter wichtige Grundlage für die Idee dieser

⁹⁵ Mitter et al. 2005

⁹⁶ Gruvberger-Saal et al. 2007

⁹⁷ Saji et al. 2005

⁹⁸ Murphy et al. 2003

⁹⁹ Treeck et al. 2008

¹⁰⁰ Treeck et al. 2010

Arbeit. Auch Saji et al. vermuteten den Zusammenhang von ER β entweder mit antiproliferativen oder proapoptotischen Eigenschaften.¹⁰¹

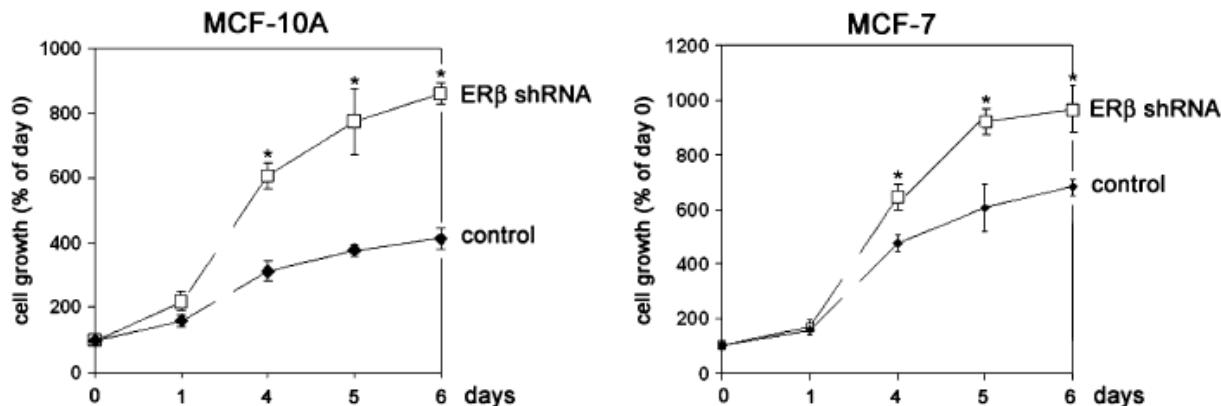


Abbildung 5: Proliferation von MCF-10A- und MCF-7-Zellen transfiziert mit ER β shRNA plasmid.¹⁰²

Insgesamt ist die Rolle von ER β im Mammakarzinom trotz aller interessanten und vielversprechenden Ergebnisse immer noch sehr unklar. Gerade in Anbetracht der vermuteten Funktion von ER β als Modulator der Proliferation besteht jedoch Hoffnung auf ER β oder seine Splicevarianten als neue Ziele Target-spezifischer Therapien des Mammakarzinoms.

1.2.5 ER β -Modulatoren und deren Wirkmechanismen

ER β -Agonisten:

Als Agonisten bezeichnet man Stoffe, die zur Auslösung einer bestimmten Zellantwort führen, indem sie an die Rezeptoren bestimmter Zielzellen binden und diese aktivieren.¹⁰³ Zum Beispiel konnten ER β -Agonisten (andere als in dieser Arbeit verwendet) in vitro an malignen Mesotheliomzellen wie in vivo an Mäusen mit malignem Mesotheliom die mitochondriale ATP-Produktion reduzieren und die Zellproliferation beeinträchtigen und somit als Tumorsuppressor wirken.¹⁰⁴

¹⁰¹ Saji et al. 2005

¹⁰² Treeck et al. 2010

¹⁰³ Alzheimer 2009

¹⁰⁴ Manente et al. 2013

In dieser Arbeit wurden folgende ER β -Agonisten verwendet:

Liquiritigenin

(S)-2,3-Dihydro-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one ist ein natürlicher, selektiver Estrogenrezeptor- β -Agonist, der aus der Wurzel der *Glycyrrhiza uralensis* isoliert werden kann und somit zur Gruppe der Phytoöstrogene gehört. Es ist ebenfalls Bestandteil eines bestimmten Gemisches (MF101) aus verschiedenen Pflanzen und Kräutern, welches in der Traditionellen Chinesischen Medizin zur Behandlung von perimenopausalen Symptomen eingesetzt wird. Es aktiviert keine anderen nukleären Rezeptoren, wie Androgen-, Progesteron- oder Glukokortikoidrezeptoren, bindet mit einer 20-fach höheren Affinität an ER- β statt ER- α und führt nur zur Induktion von ER β -abhängigen Steuerungselementen der DNA. Der EC50-Wert von Liquiritigenin liegt bei 36,5nM.¹⁰⁵ Flavonoiden, zu denen auch Liquiritigenin gehört, wird nachgesagt, dass sie sowohl in der Prävention als auch möglicherweise in der Behandlung von Krebs eine wichtige Rolle spielen sollen.¹⁰⁶

ErB-041

7-Ethenyl-2-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-5-benzoxazolol ist ein effektiver Estrogenrezeptor- β -Agonist mit mehr als 200-facher Selektivität gegenüber ER- α . Der EC50-Wert von ErB-041 liegt bei 5nM.¹⁰⁷

FERb-033

2-Chloro-3'-fluoro-3,4'-dihydroxy-[1,1-biphenyl]-4-carboxaldehyde-oxime ist ein starker und selektiver Estrogenrezeptor- β -Agonist mit 62-facher Selektivität gegenüber ER- α . Der EC50-Wert liegt bei 4,8nM.^{108,109}

¹⁰⁵ Mersereau et al. 2008

¹⁰⁶ Clere et al. 2011

¹⁰⁷ Malamas et al. 2004

¹⁰⁸ Minutolo et al. 2009

¹⁰⁹ Tocris 2016

WAY 200070

7-Bromo-2-(4-hydroxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-ol ist ein selektiver Estrogenrezeptor- β -Agonist mit 68-facher stärkerer Selektivität für ER β gegenüber ER- α . Der EC50-Wert liegt bei 2nM.¹¹⁰

3- β -Adiol

5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol entsteht aus dem potenten Androgen 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) und kommt auch im Blut gesunder Frauen vor. Jedoch bindet es nicht an den Androgenrezeptor. Es wirkt agonistisch an ER- α und ER- β mit 30- und 14-fach geringerer Affinität als 17 β -Estradiol (E2).^{111,112,113}

ER β -Antagonisten:

Bei Antagonisten handelt es sich um zu den eigentlich an den Rezeptor bindenden Stoffen strukturähnliche Moleküle. Sie lösen jedoch keine spezifische Zellantwort aus, weil sie zwar an den Rezeptor binden, ihn jedoch nicht aktivieren können. Durch ihre Bindung an den Rezeptor verdrängen sie die Agonisten und verhindern damit eine spezifische Zellantwort.¹¹⁴

In dieser Arbeit wurden folgende ER β -Antagonisten verwendet:

PHTPP

4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol ist ein selektiver Estrogenrezeptor- β -Antagonist mit 36-facher Selektivität gegenüber ER- α .¹¹⁵

¹¹⁰ Malamas et al. 2004

¹¹¹ Kuiper et al. 1997

¹¹² Sikora et al. 2009

¹¹³ Guerini et al. 2005

¹¹⁴ Alzheimer 2009

¹¹⁵ Compton et al. 2004

(R,R)-THC

(*R,R*)-5,11-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydro-2,8-chrysenediol ist ein nichtsteroidal er, selektiver Estrogenrezeptorligand. Es wirkt als Agonist am ER- α und als Antagonist am ER- β .¹¹⁶

1.2.6 Rezeptor-Status der verwendeten Zelllinien

MDA-MB-231-Zellen gelten als Estrogenrezeptor negativ.¹¹⁷ Dies bezieht sich jedoch nur auf ER α . Denn ER β -mRNA konnte sehr wohl nachgewiesen werden.¹¹⁸ Al-Bader et. al konnten ER β 1 (Wildtyp), ER β 2 und ER β 5 in den MDA-MB-231-Zellen nachweisen. Sie konnten jedoch auch die Splicevarianten Δ 5 und Δ 7 von ER α -mRNA in dieser vermeintlich Estrogenrezeptor-negativen Zelllinie nachweisen.¹¹⁹

Die übrigen verwendeten Zelllinien MCF-7, T47D und ZR-75-1 gelten als Estrogenrezeptor positiv (bezogen auf ER α). Ebenso ist in allen ER α -positiven Zelllinien sowohl ER β 1 (Wildtyp) als auch ER β 2 und ER β 5 vorhanden, wobei ER β 1 in den ZR-75-1-Zellen und ER β 5 in den T47D-Zellen jeweils nur schwach exprimiert ist.¹²⁰ Die T47D-Zellen besitzen sowohl ER α und β als auch Progesteronrezeptoren¹²¹, wobei das Verhältnis von ER α : β ungefähr 9:1 sein soll.¹²²

Leygue et. al konnten ebenfalls bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (MDA-MB-231, MCF-7, T47D und ZR-75-1) die mRNA der Isoformen ER β 1, ER β 2 und ER β 5 nachweisen, jedoch in unterschiedlichem Verhältnis bei jeder Zelllinie. Auffällig ist zusätzlich, dass bei allen Zelllinien größere Expressionsraten für mRNA von ER β 2 und/oder ER β 5 auftraten als für ER β 1.¹²³

¹¹⁶ Sun et al. 1999

¹¹⁷ LGC Standards

¹¹⁸ Dotzlaw et al. 1997

¹¹⁹ Al-Bader et al. 2011

¹²⁰ Al-Bader et al. 2011

¹²¹ Dotzlaw et al. 1999

¹²² Ström et al. 2004

¹²³ Leygue et al. 1999

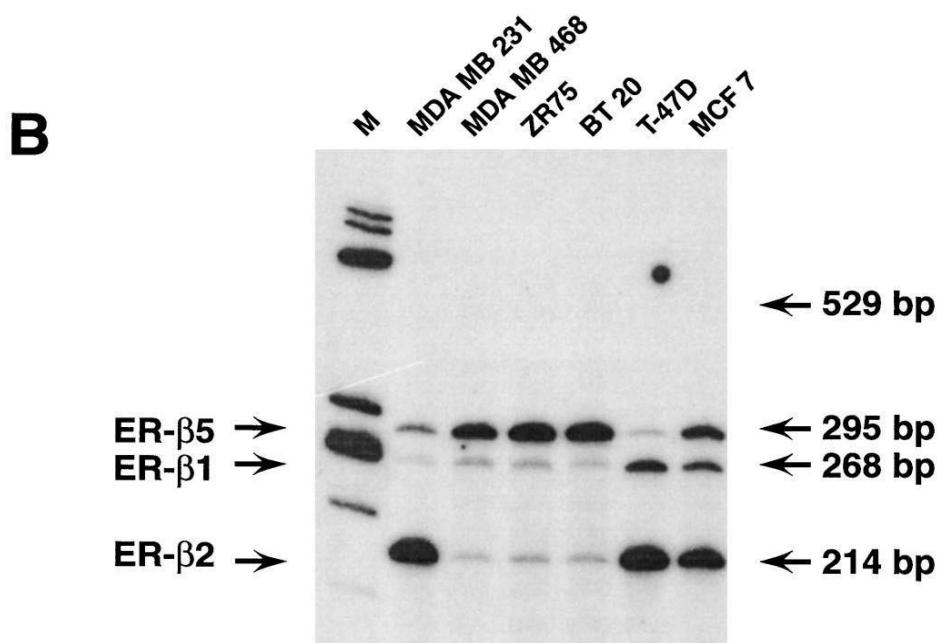


Abbildung 6: Nachweis von mRNA unterschiedlicher ER β -Isoformen in verschiedenen Brustkrebszelllinien¹²⁴

1.3 Die Apoptose

Es gibt zwei Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose. Unter Apoptose versteht man den genetisch programmierten Zelltod. Dieser löst keine immunologische Antwort des Organismus aus. Apoptose gewährleistet das natürliche Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination, zum Beispiel bei der Embryonalentwicklung, im Immunsystem bei der Reifung der T- und B-Lymphozyten und bei Involutionsprozessen. Pathologisch spielt sie eine Rolle bei der Elimination infizierter Zellen, bei autoimmunen und degenerativen Erkrankungen, bei ischämischer Gewebeschädigung und vor allem auch in der Karzinogenese. Störungen und Hemmung der Apoptose sind häufiger Bestandteil bei der Entstehung von Malignomen.¹²⁵

¹²⁴ Leygue et al. 1999

¹²⁵ Böcker 2012

Der Zelltod durch Nekrose entsteht aufgrund von Verletzungen oder mangelnder Blutversorgung. Die Zellen schwollen an, bis sie platzen, und entleeren dann ihren Inhalt ins Gewebe, dabei rufen sie eine Entzündungsreaktion hervor.¹²⁶

1.3.1 Die Caspase-Kaskade

Caspasen sind Proteasen, die ein Cystein im aktiven Zentrum haben und ihre Zielproteine nach Aspartatresten schneiden. Die meisten Caspasen sind in der Zelle für den programmierten Zelltod verantwortlich. Sie werden als Procaspasen synthetisiert und werden von bereits aktivierten Caspasen gespalten und somit aktiviert. Es entsteht eine proteolytische Kaskade, welche sich selbst verstärkt und ab einem gewissen Punkt unumkehrbar ist. Dabei gibt es Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7). Die Effektor-Caspasen werden von den Initiator-Caspasen aktiviert und spalten daraufhin gewisse Zielproteine, wie die Kernlamina, ein die Endonuclease hemmendes Protein, das Zytoskelett und Zell-Zell-Adhäsionsproteine. Dies führt zu den typischen Veränderungen der Apoptose. Die Zelle rundet sich ab und löst sich aus ihrem Zellverbund, so dass sie leichter eliminiert werden kann. Die Kernlamina wird zerstört und die DNA wird durch die aktivierte Endonucleasen abgebaut. Die Initiator-Procaspasen besitzen Caspase-Rekrutierungsdomänen, an die Adapterproteine binden können, so dass Aktivierungskomplexe entstehen, in denen die Initiator-Procaspasen sich gegenseitig selbstständig aktivieren und somit die gesamte Kaskade in Gang setzen. Es gibt zwei bekannte Signalwege, die die Caspase-Kaskade auslösen: den extrinsischen und den intrinsischen Apoptoseweg.^{127,128}

1.3.2 Der extrinsische Apoptoseweg

Der extrinsische Signalweg wird über extrazelluläre Signalproteine, die an die Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche binden, ausgelöst. Todesrezeptoren sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer

¹²⁶ Alberts 2011

¹²⁷ Alberts 2011

¹²⁸ Riedl und Shi 2004

einzelnen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Todesdomäne. Ein bekanntes Beispiel für einen Todesrezeptor ist der Fas-Rezeptor, der vom Fas-Liganden, einem Oberflächenmolekül von Killerlymphozyten, aktiviert wird. Durch Bindung des Fas-Liganden kommt es zur Aktivierung der Todesdomäne. Diese rekrutiert daraufhin intrazelluläre Adapterproteine, welche wiederum Initiator-Procaspasen (Procaspsase-8, -10) binden. Dadurch entsteht ein todinduzierender Signalkomplex, welcher die Initiatorcaspasen aktiviert und somit die Kaskade der Apoptose in Gang setzt.

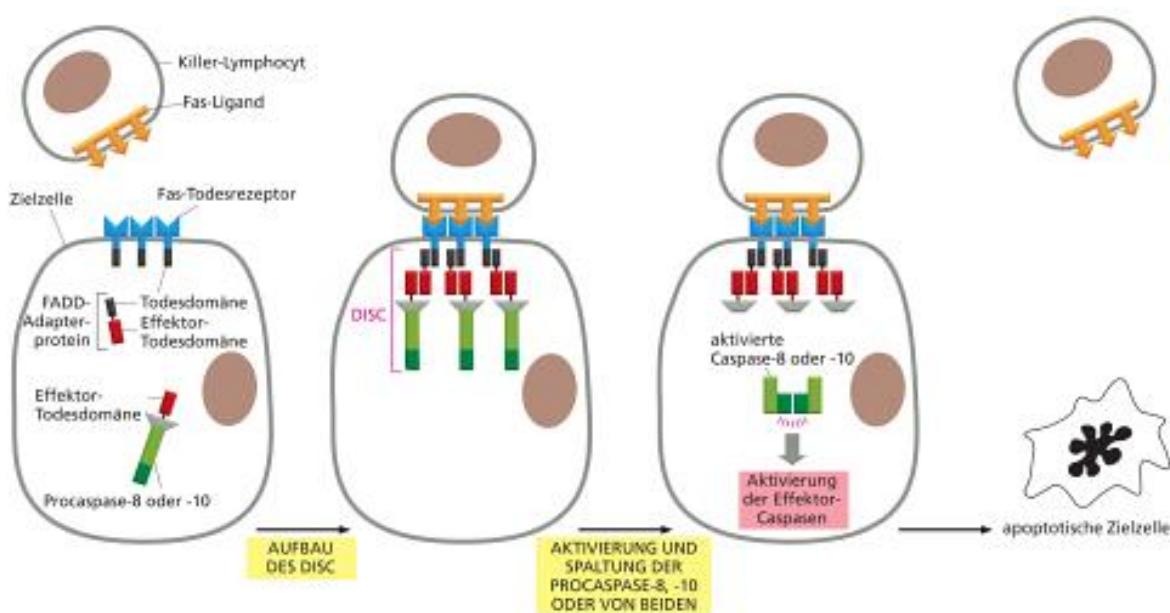


Abbildung 7: Aktivierung des extrinsischen Wegs der Apoptose durch Fas-Todesrezeptoren.¹²⁹

Antagonistisch wirken extrazelluläre Überlebensfaktoren, indem sie die Apoptose zum Beispiel durch Induktion der antiapoptotischen Bcl2-Proteine hemmen. Es handelt sich um Signale von anderen Zellen, die meistens kontinuierlich gebraucht werden, um die Apoptose zu vermeiden. Werden die Überlebensfaktoren entzogen, töten sich die Zellen selbst.¹³⁰

¹²⁹ Alberts 2011

¹³⁰ Alberts 2011

1.3.3 Der intrinsische Apoptoseweg

Der intrinsische Apoptoseweg wird durch Verletzungen oder Stress, wie DNA-Schäden, Sauerstoff-, Nährstoffmangel oder Mangel an extrazellulären Überlebenssignalen, aktiviert. Dabei kommt es zur Freisetzung von Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol, wodurch die zur Apoptose führende Caspase-Kaskade gestartet wird. Zu diesen Mitochondrienproteinen gehören Cytochrom C, SMAC (second mitochondria-derived activator of Caspases)/DIABLO (direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI), AIF (apoptosis-inducing factor), EndoG (endonuclease G) und OMI/HTRA2 (high-temperature-requirement protein A2). Am bekanntesten ist der Mechanismus von Cytochrom C. Im Cytosol bindet es an Apaf1, einem Adapterprotein, das Procaspsen aktiviert. Apaf1 oligomerisiert zu einem radartigen Heptamer, dem Apoptosom, welches die Initiator-Procaspsase-9 aktiviert.¹³¹

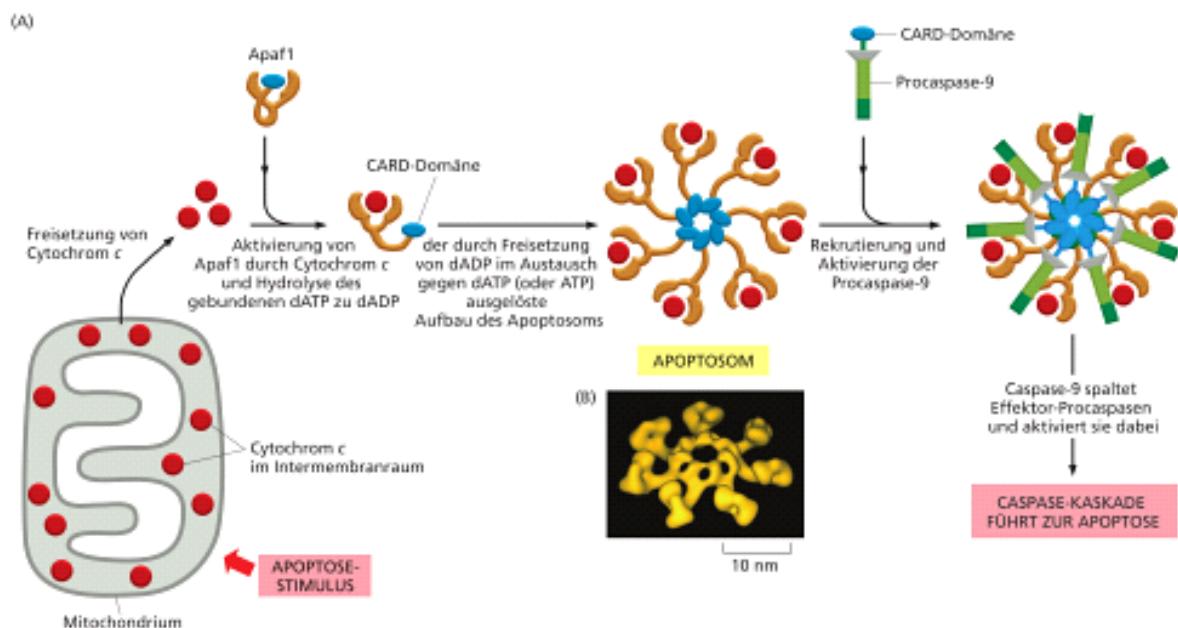


Abbildung 8: Der intrinsische Weg der Apoptose.¹³²

Der intrinsische Weg der Apoptose muss streng kontrolliert sein, um eine unnötige Selbsttötung der Zellen zu vermeiden. Dies wird durch die Bcl2-Proteine gewährleistet.

¹³¹ Riedl und Shi 2004

¹³² Alberts 2011

Dabei gibt es die antiapoptotischen Bcl2-Proteine (Bcl2, Bcl-X_L) und die proapoptotischen BH123-Proteine, wie Bax und Bak, und BH3-only-Proteine (Bad, Bim, Bid, Puma, Noxa). Das Gleichgewicht zwischen diesen Proteinen bestimmt, ob eine Zelle lebt oder stirbt. Die BH123-Proteine destabilisieren die Mitochondrienmembran, indem sie oligomerisieren, sodass es zu einer Freisetzung von Cytochrom C und anderen Intermembranproteinen und somit zum Zelltod kommt. Die antiapoptotischen Bcl2-Proteine und die proapoptotischen BH3-only-Proteine verhindern bzw. fördern eine Oligomerisierung der BH123-Proteine in der Mitochondrienmembran. Über das BH3-only-Protein Bid besteht eine Verbindung zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg. Die Initiator-Caspase 8 schneidet Bid in tBid, welches an der Mitochondrienmembran die antiapoptotischen Bcl2-Proteine hemmt und die Aggregation der BH123-Proteine in der Mitochondrienmembran begünstigt und somit zusätzlich den intrinsischen Apoptoseweg aktiviert.

Weiterhin gibt es andere Apoptosehemmer (IAPs), die an aktivierte Caspasen binden und sie so hemmen oder sie für Proteasomen ubiquitinieren.¹³³ Während der Apoptose werden die IAPs von Intermembranproteinen aus den Mitochondrien, wie SMAC/DIABLO und HTRA2/OMI, gebunden und somit wird ihre Apoptose-hemmende Wirkung aufgehoben.¹³⁴

1.3.4 Die Rolle der Apoptose bei der Karzinogenese

Als Grundlage einer jeden Karzinogenese gibt es bestimmte „critical events“, welche zur Entstehung einer Tumorzelle und zu unkontrollierter Expansion und Invasion führen. Dazu gehören eine entregulierte Zellproliferation und die Hemmung der Apoptose.¹³⁵

¹³³ Alberts 2011

¹³⁴ Riedl und Shi 2004

¹³⁵ Evan und Vousden 2001

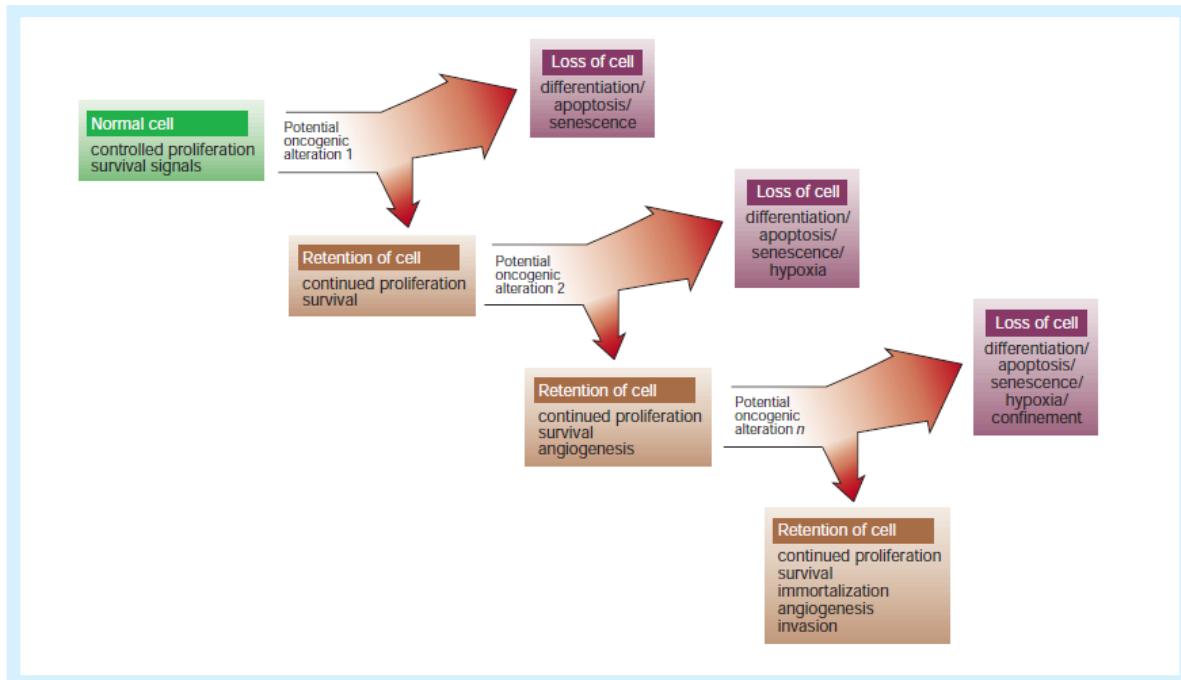


Figure 1 Evolution of cancer is more complex than the straightforward linear accumulation of oncogenic mutations. Potentially oncogenic proliferative signals are coupled to a variety of growth-inhibitory processes, such as the induction of apoptosis, differentiation or senescence, each of which restricts subsequent clonal expansion and neoplastic evolution. Tumour progression occurs only in the very rare instances where these growth-inhibitory mechanisms are thwarted by compensatory mutations.

Abbildung 9: Schritte in der Karzinogenese¹³⁶

Am Anfang einer jeden Tumorentstehung steht immer eine Mutation oder Läsion in einem die Zellproliferation auslösenden oder unterstützenden Mechanismus.¹³⁷ Eine häufige Läsion ist dabei unter vielen anderen die unkontrollierte Expression von Myc-Proteinen oder Mutationen in myc-kodierenden Genen.¹³⁸ Myc-Proteine kontrollieren die Zellproliferation und Transformation.^{139,140,141}

Somatoforme Zellen benötigen, um Apoptose zu unterdrücken, normalerweise kontinuierlich Überlebens- und Wachstumssignale. Diese können lösliche Signal-Stoffe sein oder sie können auch durch direkte Interaktion mit Nachbarzellen und der Extrazellulärmatrix entstehen. Fallen diese weg, beginnt in der Regel die Apoptose, so

¹³⁶ Evan und Vousden 2001

¹³⁷ Evan und Vousden 2001

¹³⁸ Baudino und Cleveland 2001

¹³⁹ Facchini und Penn 1998

¹⁴⁰ Dang 1999

¹⁴¹ Mateyak et al. 1997

dass eine Hemmung oder Umgehung des programmierten Zelltodes meist an zweiter Stelle der Karzinogenese steht.¹⁴²

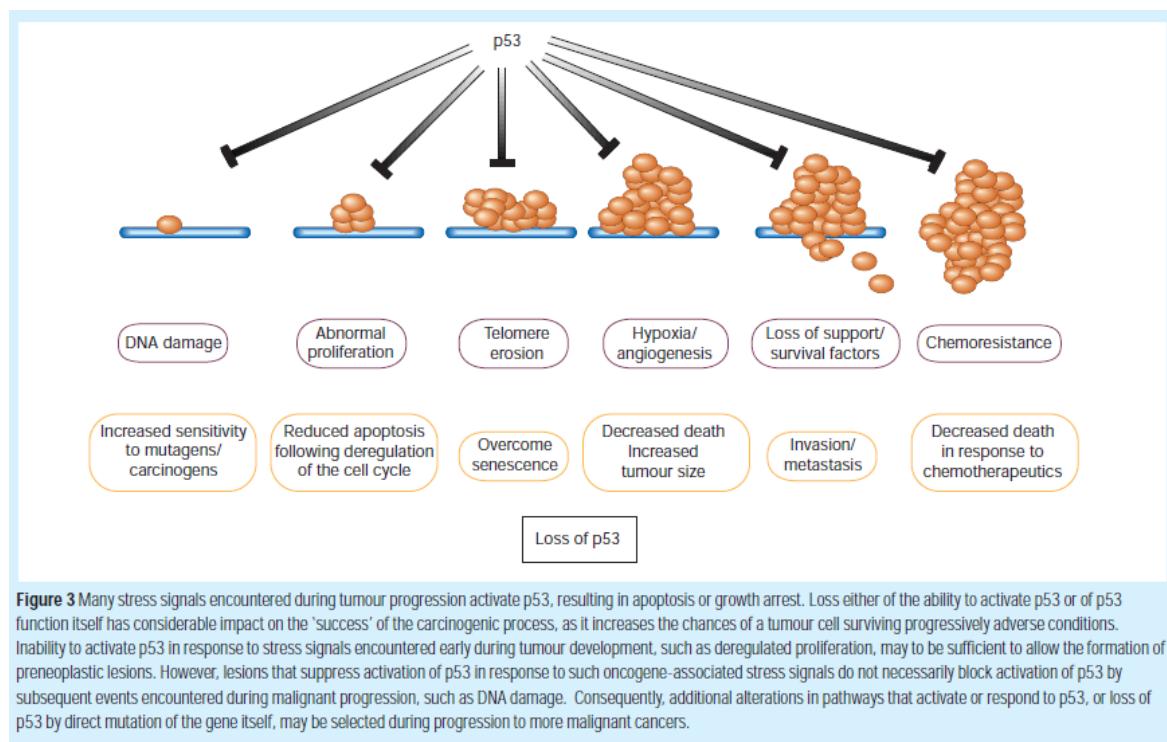


Abbildung 10: Möglicher Ablauf einer Karzinogenese¹⁴³

Dies gelingt zum Beispiel über eine enthemmte Expression von Wachstumsfaktoren wie IGF-I und -II¹⁴⁴ oder aktivierende Mutationen an den Proteinen Akt oder PKB, einer Serin/Threonin-Kinase, welche Zellen effektiv zum Überleben stimuliert.^{145,146} Aber auch direkte Störungen der Apoptose treten häufig auf. So kommt es im malignen Melanom oft zum Verlust von Apaf-1.¹⁴⁷ Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L sind in vielen Tumoren deutlich überexprimiert oder p53 hat seine Wirkung verloren.¹⁴⁸

¹⁴² Evan und Vousden 2001

¹⁴³ Evan und Vousden 2001

¹⁴⁴ Yu und Rohan 2000

¹⁴⁵ Datta et al. 1999

¹⁴⁶ Kandel und Hay 1999

¹⁴⁷ Soengas et al. 2001

¹⁴⁸ Harrington et al. 1994

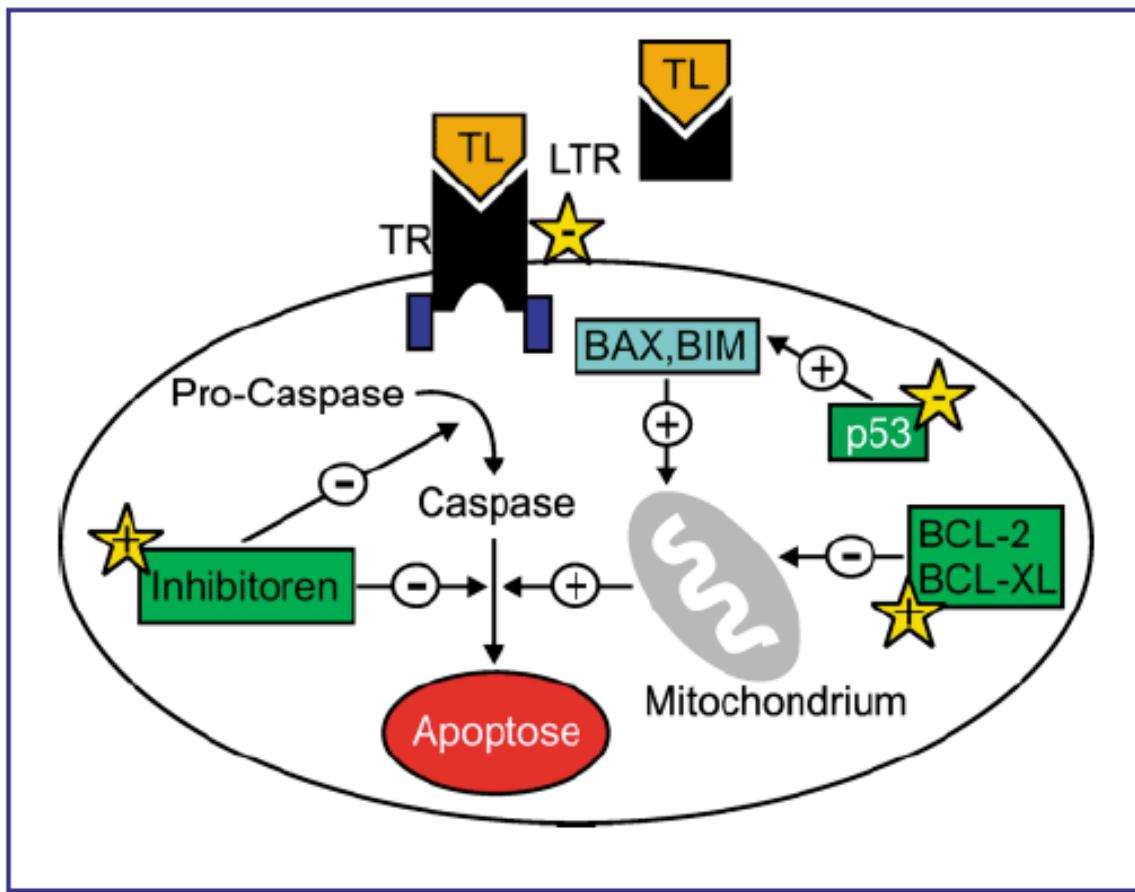


Abbildung 11: Möglichkeiten der Apoptose-Fehlregulation¹⁴⁹

1.3.5 Die Rolle von ER β bei der Apoptose

Verschiedene Veröffentlichungen geben Hinweise darauf, dass ER β Einfluss auf die Apoptose, nicht nur in Brustdrüs en- oder Brustkrebszellen, sondern auch in anderen Geweben, in unterschiedlichster Art und Weise nehmen kann.

So konnten Das et al. nachweisen, dass ER β -Agonisten VSC4.1-Motoneurone vor durch TNF- α -induzierter Apoptose schützen können. Zum Beispiel bei ALS und Rückenmarksverletzungen wird in Motoneuronen mitunter durch TNF- α Apoptose ausgelöst. Die Behandlung mit dem ER β -Agonisten DPN führte zur Überexpression von

¹⁴⁹ Pfützner 2003

ER β auf diesen Zellen und zu einer Hochregulierung der Expression anti-apoptotischer Proteine wie p-AKT, p-CREB, Bcl-2 und p-Src.¹⁵⁰

Kolonkarzinomzellen, welche nur ER β besaßen, reagierten auf eine Behandlung mit 17 β -Estradiol dosisabhängig mit einer erhöhten Apoptoserate.¹⁵¹

Auch in Prostatazellen - sowohl bei benigner Prostatahyperplasie als auch im Prostatakarzinom - spielt ER β eine Rolle bei der Apoptose. Der ER β -Agonist 8 β -VE2 löste ebenfalls TNF- α -abhängig in diesen Zellen Apoptose aus.¹⁵² Zuvor konnten bereits Cheng et al. nachweisen, dass ein durch Virusübertragung erhöhter ER β -Level in Prostatakarzinomzellen zu vermindertem Zellwachstum führt und sogar die Apoptoserate erhöht. Sie stellten einen antiproliferativen, antiinvasiven und proapoptotischen Effekt an Prostatakarzinomzellen durch einen erhöhten ER β -Level fest und stuften deshalb ER β als Tumorsuppressor ein.¹⁵³

Mendoza et al. stellten die Hypothese auf, dass ein durch einen IGF-I-Rezeptor-Mangel ausgelöstes verkleinertes ER α /ER β -Verhältnis an MCF-7-Brustkrebszellen zu einer erhöhten Apoptoserate bei fast gleich bleibender Proliferationsrate führt, indem es die p38-MAP-Kinase und somit im Anschluss das Tumorsuppressorprotein p53 phosphoryliert.¹⁵⁴

Andere Untersuchungen an MCF-7-Brustkrebszellen ließen vermuten, dass die gesteigerte Anwesenheit von ER β zu einer besseren Wirksamkeit einer antiestrogenen Therapie, z.B. mit Tamoxifen, führt, indem Apoptose gefördert und der Zellzyklus blockiert wird.¹⁵⁵

In der Arbeitsgruppe von Prof. Treeck deutete jahrelange Forschung darauf hin, dass ER β und seine diversen Isoformen in unterschiedlichster Weise Einfluss auf Zellzyklus, Proliferation und Apoptose nehmen.¹⁵⁶ So führte ein Knockdown von ER β bei menschlichen MCF-10A-Brustepithel- und MCF-7-Brustkrebszellen zu einem signifikanten, Liganden-unabhängigen Anstieg der Zellzahl. Die Ergebnisse ließen

¹⁵⁰ Das et al. 2011

¹⁵¹ Qiu et al. 2002

¹⁵² McPherson et al. 2010

¹⁵³ Cheng et al. 2004

¹⁵⁴ Mendoza et al. 2010

¹⁵⁵ Hodges-Gallagher et al. 2008

¹⁵⁶ Treeck et al. 2007

vermuten, dass ER β in beiden Zelllinien Liganden- und ER α - unabhängig antiproliferative oder pro-apoptotische Effekte verursacht, in dem es die Genexpression von p21/WAF und Cyclin A2 reguliert. Dadurch wurde die Hypothese von ER β als Tumorsuppressor im Brutgewebe wiederholt bestärkt.^{157,158} In der folgenden Arbeit wurde deshalb die Apoptoserate von verschiedenen Brustkrebszelllinien nach der Behandlung mit diversen ER β -Modulatoren gemessen.

1.3.6 Apoptose-Nachweise

Der Nachweis von Apoptose gelingt mittels verschiedener Möglichkeiten: mittels HE-Färbung, mittels Bindung von fluoreszenzmarkiertem Annexin V an Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, mittels der bei Apoptose aktivierten Caspasen und mittels charakteristischen durch Caspasen gespaltenen DNA-Fragmenten.¹⁵⁹ Im Rahmen dieser Arbeit sollte die stattfindende Apoptose anhand eines Apoptose-Assays, welcher aktivierte Caspasen identifiziert, gemessen werden.

¹⁵⁷ Treeck et al. 2010

¹⁵⁸ Treeck et al. 2008

¹⁵⁹ Böcker 2012

2 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Mit der Entdeckung von ER β ist einerseits ein weiterer Faktor in der multifaktoriellen und bisher längst nicht komplett verstandenen Pathogenese des Mammakarzinoms gefunden worden, aber andererseits auch ein möglicher Therapieansatz. ER β ist ein Steroidhormonrezeptor, der aktuell als Tumorsuppressor diskutiert wird. In unterschiedlichen Voruntersuchungen fanden sich Hinweise darauf, dass ER β auch Einfluss auf die Apoptose nehmen und diese begünstigen kann. In der Therapie des Mammakarzinoms werden seit Jahrzehnten Apoptose-auslösende Chemotherapeutika, wie Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel, Cyclophosphamid und 5-Fluorouracil eingesetzt.¹⁶⁰ Ebenso wird bei positivem Hormonrezeptorstatus eine anti-östrogene Therapie mit dadurch verbesserter Prognose begonnen; diese Therapie bezieht sich jedoch in aktuellen Behandlungsregimes nur auf ER α und den PR. ER β wird im klinischen Alltag noch außer Acht gelassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die gezielte Aktivierung von ER β zu einer Apoptose von Mammakarzinomzellen führt. Bereits erhobene Daten in der Arbeitsgruppe von Prof. Treeck zeigten, dass MCF-10A Mammaepithelzellen und MCF-7-Brustkrebszellen, in welchen ER β ausgeknockt wurde, Liganden-unabhängig eine stärkeres Zellwachstum (stärkere Proliferationsrate oder schwächere Apoptoserate) aufweisen.¹⁶¹

Ebenso konnte - wie bereits in der Einleitung erwähnt - in Prof. Treecks Arbeitsgruppe an MCF-7- und SK-BR-3-Zellen mittels ER β -Splicevarianten gezeigt werden, dass der ER β -Wildtyp im Vergleich zu verschiedenen ER β -Splice-Varianten mit fehlenden Exons sowohl die basale Apoptoserate als auch die durch Tamoxifen verstärkte Apoptoserate erhöhen kann.¹⁶²

Nun stellte sich aufgrund dieser Ergebnisse die Frage, ob durch gezieltes Ansprechen von ER β mittels verschiedener ER β -Agonisten eine Liganden-abhängige Apoptose-Induktion

¹⁶⁰ Weyerstahl und Stauber 2013

¹⁶¹ Treeck et al. 2010

¹⁶² Treeck et al. 2008

möglich ist. Gleichzeitig stellte sich im Umkehrschluss die Frage, ob die vermutete Apoptose-Induktion durch ER β -Antagonisten verhindert oder reduziert werden könnte bzw. ob ein gegensätzlicher Effekt auslösbar ist.

Im Promotionsprojekt wurden vier verschiedene Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, MDA-MB-231, T47D und ZR-75-1) untersucht, welche mit verschiedenen ER β -Agonisten/Antagonisten (Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070, 3 β -Adiol, PHTPP, (R,R)-THC) behandelt wurden. Zusätzlich erfolgte die Kombination der ER β -Modulatoren mit Apoptose-auslösenden Chemotherapeutika (Staurosporine, Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel), um mögliche neue Therapiekombinationen für die Zukunft genauer zu beleuchten und zu testen, ob die durch Chemotherapeutika ausgelöste Apoptoserate gegebenenfalls verstärkt werden könnte. Mit Ausnahme von Staurosporine werden alle Chemotherapeutika, wie oben erwähnt, in der Therapie am Menschen eingesetzt. Staurosporine wurde zusätzlich verwendet, weil es gerade in-vitro als Apoptose-auslösendes Substrat gut erforscht und getestet ist.

Es sollte nun in der folgenden Arbeit in-vitro getestet werden, ob eine Therapie mit ER β -Modulatoren am Mammakarzinom grundsätzlich eine Wirkung erzielen könnte sowie ob die Ergänzung der Standardtherapie des Mammakarzinoms (Chemotherapeutika) um ER β -Agonisten für die Zukunft einen therapeutischen Nutzen haben könnte. Also einerseits ob durch ER β -Agonisten/Antagonisten alleine oder andererseits durch deren Kombination mit Chemotherapeutika im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Chemotherapeutika die Apoptoserate verändert werden kann. Das Ausmaß der Apoptose wurde mithilfe eines Apoptose-Assays im 96-Well Format analysiert und mithilfe eines einseitigen T-Tests ausgewertet.

Ziel der Arbeit war ER β als vielversprechendes neues Target in der endokrinen Mammakarzinomtherapie näher zu erforschen und eventuell mögliche Therapieideen für die Zukunft zu entwickeln. Explizit sollte getestet werden, ob der Einsatz von ER β -Agonisten Liganden-abhängige Veränderungen der Apoptoseraten von Brustkrebszellen bewirken kann.

3 Material und Methoden

Im Folgenden wird das Vorgehen beim Durchführen der Experimente dargestellt. Es werden alle verwendeten Methoden und deren Funktionsweise näher erläutert. Die verwendeten Materialien werden mit ihren Bezugsquellen aufgelistet und, falls nötig, ihre Wirkmechanismen dargestellt.

3.1 Die Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit wurden die Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MCF-7, T47D und ZR-75-1 der Firma ATCC verwendet. Bei der Zelllinie MDA-MB-231 handelt es sich um epitheliale Tumorzellen mit einem aneuploiden Chromosomensatz, die aus Pleurametastasen eines metastasierten Mamma-Carcinoms bei einer 51-jährigen, weißen Frau gewonnen wurden. Die Zelllinie MCF-7 stammt aus Pleurametastasen mit hypertriploidem bis hypotetraploidem Chromosomensatz eines invasiven Mamma-Carcinoms einer 69-jährigen, weißen Patientin. Die T47D-Zellen wurden aus Pleurametastasen eines invasiven duktalen Mamma-Carcinoms einer 54-jährigen Patientin isoliert und enthalten einen hypotriploiden Chromosomensatz. Bei den ZF-75-1-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie mit hypertriploidem Chromosomensatz, welche aus Aszites-Metastasen eines invasiven duktalen Mamma-Carcinoms einer 63-jährigen, weißen Frau gewonnen wurden.¹⁶³

Nach den Produktangaben der Firma ATCC enthalten alle Zelllinien außer MDA-MB-231 Estrogenrezeptoren.

3.1.2 Die Standardkultur

Die verschiedenen Brustkrebszelllinien wurden in Gewebekulturflaschen kultiviert. Im Brutschrank herrschte eine Temperatur von 37°C und ein Kohlenstoffdioxidgehalt von

¹⁶³ LGC Standards

5%. Das verwendete Nährmedium, namens DMEM/HamsF12 mit 10% fetalem bovinen Serum (FBS), wurde drei Mal wöchentlich gewechselt. Für die Zelllinien MCF-7 und T47D wurde das Nährmedium neben 10% FBS mit 1% Sodiumpyruvat und 0,1% Insulin versetzt. Bei Erreichen einer gewissen Anzahl an Zellen in der Kulturflasche wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 3 ml Accutase für circa 10 min im Brutschrank inkubiert, um sie vom Flaschenboden zu lösen. Nach dem Abzentrifugieren, Splitten und Resuspendieren wurden die Zellen mit frischem Medium in neue Zellkulturflaschen passagiert. Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter steriler Werkbank.

3.2 Apoptose-Assay

Zur Durchführung des Apoptose-Assays wurde am Tag 1 die jeweilige Zelllinie auf 96-Well-Platten ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erfolgte in der Regel die erste Stimulation mit den ER β -Modulatoren. Nach einer Einwirkzeit von 18-20 h erfolgte die zweite Stimulation mit Apoptose-auslösenden Stoffen, woraufhin je nach Zelllinie und Stoff für weitere 3-40 h inkubiert wurde. Im Anschluss erfolgte die Messung.

3.2.1 Gewinnung der Zellsuspension

Zur Durchführung des Apoptose-Assay wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit 5 ml PBS gewaschen und danach mit 3 ml Accutase für 3-10 min im Brutschrank inkubiert. Die Lösung wurde mit 5 ml Nährmedium versetzt und in 15- oder 50-ml Flakons umgefüllt. Darin wurde die Zellsuspension für 5 min bei 770 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellet in Medium wurden 12 μ l der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Dementsprechend wurde eine Suspension mit 5000 Zellen pro 70 μ l hergestellt, wovon jeweils 70 μ l pro Well auf 96-Well-Platten ausgesät und zum Anwachsen 24 h im Brutschrank inkubiert wurden.

3.2.2 Inkubation

In verschiedensten Vorversuchen an allen Zellreihen wurde die jeweils geeignete Konzentration und ideale Einwirkdauer der getesteten Chemotherapeutika herausgefunden. Die ER β -Modulatoren wurden in den ersten Versuchen zeitgleich mit den Apoptose-auslösenden Stoffen zu den Zellen gegeben. Später wurde eine Vorinkubation mit den ER β -Modulatoren für circa 18-20 h durchgeführt und erst im Anschluss wurden die Apoptose-auslösenden Stoffe hinzugefügt und abhängig von der Zellreihe für eine bestimmte Zeit inkubiert.

Nach dem Anwachsen der Zellen im Brutschrank für 24 h wurden immer zwei Wells mit der jeweiligen Lösung behandelt, wobei bei der Auswertung der Messergebnisse aus den zwei mit gleicher Lösung behandelten Wells ein Mittelwert gebildet wurde. Pro Well wurden 30 μ l Behandlungslösung hinzugegeben, welche bei zweizeitiger Inkubation auf 16 μ l bei der ersten und 14 μ l bei der zweiten Behandlung aufgeteilt wurde. Bei dieser zweiten Behandlung wurde der Stoff der Vorbehandlung jeweils noch mal in geringer Menge zugemischt, sodass die Zielkonzentration dieses Stoffes im Well trotz Zufügen weiterer 14 μ l erhalten blieb. Der Einfachheit halber ist dies in den folgenden Tabellen nicht angegeben. Weiterhin sind darin nur die Zielkonzentrationen pro Well angegeben und nicht die Konzentrationen der jeweiligen Inkubationslösungen.

Den Pipettievorgang werde ich anhand eines Beispiels erklären.

Pipettierbeispiel:

Ziellösung im Well: Liquiritigenin 10 nM + Doxorubicin 1 μ M

Vorbehandlung: 600 μ l Medium in ein Eppendorf-Cup pipettieren, davon 1,61 μ l verwerfen und mit 1,61 μ l Liqui (Stocklösung 20 μ M, gelöst in DMSO) auffüllen
=> von der Lösung 16 μ l in zwei Wells geben und für die Dauer der Vorbehandlung im Brutschrank inkubieren

2. Behandlung: 300 μ l Medium, davon 2,75 μ l verwerfen und mit 2,15 μ l Doxo (Stocklösung 1 mM, gelöst in DMSO) + 0,6 μ l Liqui (Stocklösung 20 μ M, bereits 1:4 mit Medium verdünnt) auffüllen

=> von dieser Lösung 14 μ l in zwei Wells geben und für die restliche Dauer bis zur Messung im Brutschrank inkubieren.

Zellreihe MDA-MB-2311. Ansatz**Tabelle 2: Zellreihe MDA-MB-231 1. Ansatz**

Gleichzeitige Behandlung und Messung nach 24h mit ERβ-Agonisten und Staurosporine				
	1. Behandlung		2. Behandlung	
	Dauer: 24h	Menge	Dauer: 0h	Menge
FBS 10%	=	30µl	-	-
DMSO 0,2%	=	30µl	-	-
EtOH 0,1%	=	30µl	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,1%	=	30µl	-	-
Stauro 0,01µM	=	30µl	-	-
Stauro 0,1µM	=	30µl	-	-
Stauro 1µM	=	30µl	-	-
Liquiritigenin 1µM	=	30µl	-	-
ErB-041 1µM	=	30µl	-	-
ErB-041 1µM + DMSO 0,2%	=	30µl	-	-
Liqui 1µM + Stauro 0,01µM	=	30µl	-	-
Liqui 1µM + Stauro 0,1µM	=	30µl	-	-
Liqui 1µM + Stauro 1µM	=	30µl	-	-
ErB-041 1µM + Stauro 0,01µM	=	30µl	-	-
ErB-041 1µM + Stauro 0,1µM	=	30µl	-	-
ErB-041 1µM + Stauro 1µM	=	30µl	-	-

2. Ansatz**Tabelle 3: Zellreihe MDA-MB-231 2. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 21h mit ER β -Modulatoren + Staurosporine				
	Vorbehandlung		2. Behandlung	
	Dauer: 18h	Menge	Dauer: 3h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
Stauro 0,1 μ M	DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Stauro 0,1 μ M + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Liquiritigenin 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
THC 10nM	THC 10nM	30 μ l	-	-
PHTPP 10nM	PHTPP 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
Stauro 0,1 μ M + Liqui 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Stauro 0,1 μ M + THC 10nM	THC 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Stauro 0,1 μ M + PHTPP 10nM	PHTPP 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Stauro 0,1 μ M + FERb033 10nM	FERb033 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l
Stauro 0,1 μ M + WAY 10nM	WAY 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,1 μ M	14 μ l

3. Ansatz**Tabelle 4: Zellreihe MDA-MB-231 3. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 40h mit ER β -Agonisten + Chemotherapeutika				
	Vorbehandlung		2. Behandlung	
	Dauer: 20h	Menge	Dauer: 20h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
DMSO 0,05%	DMSO 0,05%	30 μ l	-	-
Doxorubicin 20 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
Etoposid 1 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM	DMSO 0,02%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Doxorubicin 20 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
Etoposid 1 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Liquiritigenin 10nM	Liqui 10nM	30 μ l	-	-
ErB-041 10nM	ErB-041 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-
Liqui 10nM + Doxorubicin 20 μ M	Liqui 10nM	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
Liqui 10nM + Etoposid 1 μ M	Liqui 10nM	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
Liqui 10nM + Docetaxel 200nM	Liqui 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
ErB-041 10nM + Doxorubicin 20 μ M	ErB-041 10nM	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
ErB-041 10nM + Etoposid 1 μ M	ErB-041 10nM	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
ErB-041 10nM + Docetaxel 200nM	ErB-041 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
WAY 200070 10nM + Doxorubicin 20 μ M	WAY 10nM	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
WAY 200070 10nM + Etoposid 1 μ M	WAY 10nM	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
WAY 200070 10nM + Docetaxel 200nM	WAY 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
FERb033 10nM + Doxorubicin 20 μ M	FERb033 10nM	16 μ l	Doxorubicin 20 μ M	14 μ l
FERb033 10nM + Etoposid 1 μ M	FERb033 10nM	16 μ l	Etoposid 1 μ M	14 μ l
FERb033 10nM + Docetaxel 200nM	FERb033 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l

Zellreihe MCF-71. Ansatz**Tabelle 5: Zellreihe MCF-7 1. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 24h mit ER β -Modulatoren + Staurosporine				
	Vorbehandlung	2. Behandlung		
	Dauer: 18h	Menge	Dauer: 6h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
Stauro 1 μ M	DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Stauro 1 μ M + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Liquiritigenin 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
THC 10nM	THC 10nM	30 μ l	-	-
PHTPP 10nM	PHTPP 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
Stauro 1 μ M + Liqui 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Stauro 1 μ M + THC 10nM	THC 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Stauro 1 μ M + PHTPP 10nM	PHTPP 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Stauro 1 μ M + FERb033 10nM	FERb033 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l
Stauro 1 μ M + WAY 10nM	WAY 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 1 μ M	14 μ l

2. Ansatz**Tabelle 6: Zellreihe MCF-7 2. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 60h mit ERβ-Agonisten + Chemotherapeutika				
	Vorbehandlung		2. Behandlung	
	Dauer: 20h	Menge	Dauer: 40h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30µl	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16µl	DMSO 0,2%	14µl
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30µl	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16µl	DMSO 0,2%	14µl
DMSO 0,05%	DMSO 0,05%	30µl	-	-
Doxorubicin 5µM	DMSO 0,02%	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
Etoposid 10µM	DMSO 0,02%	16µl	Etoposid 10µM	14µl
Docetaxel 200nM	DMSO 0,02%	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
Doxorubicin 5µM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
Etoposid 10µM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16µl	Etoposid 10µM	14µl
Docetaxel 200nM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
Liquiritigenin 10nM	Liqui 10nM	30µl	-	-
ErB-041 10nM	ErB-041 10nM	30µl	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30µl	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30µl	-	-
Liqui 10nM + Doxorubicin 5µM	Liqui 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
Liqui 10nM + Etoposid 10µM	Liqui 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
Liqui 10nM + Docetaxel 200nM	Liqui 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
ErB-041 10nM + Doxorubicin 5µM	ErB-041 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
ErB-041 10nM + Etoposid 10µM	ErB-041 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
ErB-041 10nM + Docetaxel 200nM	ErB-041 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
WAY 200070 10nM + Doxorubicin 5µM	WAY 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
WAY 200070 10nM + Etoposid 10µM	WAY 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
WAY 200070 10nM + Docetaxel 200nM	WAY 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
FERb033 10nM + Doxorubicin 5µM	FERb033 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
FERb033 10nM + Etoposid 10µM	FERb033 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
FERb033 10nM + Docetaxel 200nM	FERb033 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl

Zellreihe T47D1. Ansatz**Tabelle 7: Zellreihe T47D 1. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 24h mit ER β -Modulatoren + Staurosporine				
	Vorbehandlung	2. Behandlung		
	Dauer: 18h	Menge	Dauer: 6h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
Stauro 0,5 μ M	DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + EtOH 0,05%	DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Liquiritigenin 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
THC 10nM	THC 10nM	30 μ l	-	-
PHTPP 10nM	PHTPP 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
Stauro 0,5 μ M + Liqui 1 μ M	Liqui 1 μ M	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + THC 10nM	THC 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + PHTPP 10nM	PHTPP 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + FERb033 10nM	FERb033 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + WAY 10nM	WAY 10nM + DMSO 0,2%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l

2. Ansatz**Tabelle 8: Zellreihe T47D 2. Ansatz**

Zweizeitige Behandlung und Messung nach 60h mit ER β -Agonisten + Chemotherapeutika				
	Vorbehandlung		2. Behandlung	
	Dauer: 20h	Menge	Dauer: 40h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
DMSO 0,05%	DMSO 0,05%	30 μ l	-	-
Doxorubicin 5 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
Etoposid 2 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM	DMSO 0,02%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Doxorubicin 5 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
Etoposid 2 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Liquiritigenin 10nM	Liqui 10nM	30 μ l	-	-
ErB-041 10nM	ErB-041 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-
Liqui 10nM + Doxorubicin 5 μ M	Liqui 10nM	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
Liqui 10nM + Etoposid 2 μ M	Liqui 10nM	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
Liqui 10nM + Docetaxel 200nM	Liqui 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
ErB-041 10nM + Doxorubicin 5 μ M	ErB-041 10nM	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
ErB-041 10nM + Etoposid 2 μ M	ErB-041 10nM	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
ErB-041 10nM + Docetaxel 200nM	ErB-041 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
WAY 200070 10nM + Doxo 5 μ M	WAY 10nM	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
WAY 200070 10nM + Etoposid 2 μ M	WAY 10nM	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
WAY 200070 10nM + Docetaxel 200nM	WAY 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
FERb033 10nM + Doxorubicin 5 μ M	FERb033 10nM	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
FERb033 10nM + Etoposid 2 μ M	FERb033 10nM	16 μ l	Etoposid 2 μ M	14 μ l
FERb033 10nM + Docetaxel 200nM	FERb033 10nM	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l

Zellreihe ZR-75-11. Ansatz**Tabelle 9: Zellreihe ZR-75-1 1. Ansatz**

<u>Zweizeitige Behandlung und Messung nach 44h</u> mit ER β -Agonisten + Chemotherapeutika + Staurosporine				
	Vorbehandlung	2. Behandlung		
	Dauer: 20h	Menge	Dauer: 24h	Menge
FBS 10%	FBS 10%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2%	DMSO 0,2%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	30 μ l	-	-
DMSO 0,2% + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	DMSO 0,2%	14 μ l
DMSO 0,05%	DMSO 0,05%	30 μ l	-	-
Doxorubicin 1 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Doxorubicin 1 μ M	14 μ l
Doxorubicin 5 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
Etoposid 5 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Etoposid 5 μ M	14 μ l
Etoposid 10 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Etoposid 10 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM	DMSO 0,02%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Docetaxel 1 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Docetaxel 1 μ M	14 μ l
Stauro 0,2 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Stauro 0,2 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M	DMSO 0,02%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Doxorubicin 1 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Doxorubicin 1 μ M	14 μ l
Doxorubicin 5 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Doxorubicin 5 μ M	14 μ l
Etoposid 5 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Etoposid 5 μ M	14 μ l
Etoposid 10 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Etoposid 10 μ M	14 μ l
Docetaxel 200nM + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Docetaxel 200nM	14 μ l
Docetaxel 1 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Docetaxel 1 μ M	14 μ l
Stauro 0,2 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Stauro 0,2 μ M	14 μ l
Stauro 0,5 μ M + EtOH 0,05%	EtOH 0,05%	16 μ l	Stauro 0,5 μ M	14 μ l
Liquiritigenin 10nM	Liqui 10nM	30 μ l	-	-
ErB-041 10nM	ErB-041 10nM	30 μ l	-	-
3 β diol 10nM	3 β diol 10nM	30 μ l	-	-
WAY 200070 10nM	WAY 10nM	30 μ l	-	-
FERb033 10nM	FERb033 10nM	30 μ l	-	-

Liqui 10nM + Doxorubicin 1µM	Liqui 10nM	16µl	Doxorubicin 1µM	14µl
Liqui 10nM + Doxorubicin 5µM	Liqui 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
Liqui 10nM + Etoposid 5µM	Liqui 10nM	16µl	Etoposid 5µM	14µl
Liqui 10nM + Etoposid 10µM	Liqui 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
Liqui 10nM + Docetaxel 200nM	Liqui 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
Liqui 10nM + Docetaxel 1µM	Liqui 10nM	16µl	Docetaxel 1µM	14µl
Liqui 10nM + Stauro 0,2µM	Liqui 10nM	16µl	Stauro 0,2µM	14µl
Liqui 10nM + Stauro 0,5µM	Liqui 10nM	16µl	Stauro 0,5µM	14µl
ErB-041 10nM + Doxorubicin 1µM	ErB-041 10nM	16µl	Doxorubicin 1µM	14µl
ErB-041 10nM + Doxorubicin 5µM	ErB-041 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
ErB-041 10nM + Etoposid 5µM	ErB-041 10nM	16µl	Etoposid 5µM	14µl
ErB-041 10nM + Etoposid 10µM	ErB-041 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
ErB-041 10nM + Docetaxel 200nM	ErB-041 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
ErB-041 10nM + Docetaxel 1µM	ErB-041 10nM	16µl	Docetaxel 1µM	14µl
ErB-041 10nM + Stauro 0,2µM	ErB-041 10nM	16µl	Stauro 0,2µM	14µl
ErB-041 10nM + Stauro 0,5µM	ErB-041 10nM	16µl	Stauro 0,5µM	14µl
3βdiol 10nM + Doxorubicin 1µM	3βdiol 10nM	16µl	Doxorubicin 1µM	14µl
3βdiol 10nM + Doxorubicin 5µM	3βdiol 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
3βdiol 10nM + Etoposid 5µM	3βdiol 10nM	16µl	Etoposid 5µM	14µl
3βdiol 10nM + Etoposid 10µM	3βdiol 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
3βdiol 10nM + Docetaxel 200nM	3βdiol 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
3βdiol 10nM + Docetaxel 1µM	3βdiol 10nM	16µl	Docetaxel 1µM	14µl
3βdiol 10nM + Stauro 0,2µM	3βdiol 10nM	16µl	Stauro 0,2µM	14µl
3βdiol 10nM + Stauro 0,5µM	3βdiol 10nM	16µl	Stauro 0,5µM	14µl
WAY 200070 10nM + Doxorubicin 1µM	WAY 10nM	16µl	Doxorubicin 1µM	14µl
WAY 200070 10nM + Doxorubicin 5µM	WAY 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl
WAY 200070 10nM + Etoposid 5µM	WAY 10nM	16µl	Etoposid 5µM	14µl
WAY 200070 10nM + Etoposid 10µM	WAY 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
WAY 200070 10nM + Docetaxel 200nM	WAY 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
WAY 200070 10nM + Docetaxel 1µM	WAY 10nM	16µl	Docetaxel 1µM	14µl
WAY 200070 10nM + Stauro 0,2µM	WAY 10nM	16µl	Stauro 0,2µM	14µl
WAY 200070 10nM + Stauro 0,5µM	WAY 10nM	16µl	Stauro 0,5µM	14µl
FERb033 10nM + Doxorubicin 1µM	FERb033 10nM	16µl	Doxorubicin 1µM	14µl
FERb033 10nM + Doxorubicin 5µM	FERb033 10nM	16µl	Doxorubicin 5µM	14µl

FERb033 10nM + Etoposid 5µM	FERb033 10nM	16µl	Etoposid 5µM	14µl
FERb033 10nM + Etoposid 10µM	FERb033 10nM	16µl	Etoposid 10µM	14µl
FERb033 10nM + Docetaxel 200nM	FERb033 10nM	16µl	Docetaxel 200nM	14µl
FERb033 10nM + Docetaxel 1µM	FERb033 10nM	16µl	Docetaxel 1µM	14µl
FERb033 10nM + Stauro 0,2µM	FERb033 10nM	16µl	Stauro 0,2µM	14µl
FERb033 10nM + Stauro 0,5µM	FERb033 10nM	16µl	Stauro 0,5µM	14µl

3.2.3 Messung

Zum Zeitpunkt der Messung wurde in jedes zu messende Well 30 µl der Caspase-Glo®3/7-Reagenz gegeben und die Platte für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Zur Messung wurden von jedem Well 80 µl auf eine weiße 96-Well-Platte umpipettiert. Anschließend wurde die Lumineszenz mittels Wallac Victor 3 und zugehörigem Programm gemessen. Der Caspase-Glo®3/7 Assay ermöglicht die Messung der Aktivität der Caspasen 3 und 7, welche Schlüsselrollen bei der Apoptose von Säugetierzellen spielen. Das Reagenz führt zur Zelllyse und enthält ein Substrat, welches das Tetrapeptid DEVD beinhaltet und von den Caspasen gespalten wird. Aus dem dabei entstehenden Aminoluciferin wird mittels der in dem Reagenz enthaltenen Luciferase ein lumineszierendes Signal erzeugt. Die gemessene Lumineszenz ist direkt proportional zur Aktivität der Caspasen.¹⁶⁴

3.3 CellTiter-Blue®-Assay (Proliferations-Assay)

Der CTB-Assay diente zur Berechnung der normalisierten Werte (Zahlenwert des Apoptose-Assays (Mittelwert der zwei gemessenen Wells pro Stimulationslösung) dividiert durch Mittelwert des CTB-Assays) und zur Überprüfung des regulären Zellwachstums. Aus der Zellsuspension für den Apoptose-Assay wurden zur gleichen Zeit jeweils mehrere Wells auf einer anderen 96-Well-Platte mit 70 µl befüllt und am Tag der Stimulation mit 30 µl 10%-FBS-Medium aufgefüllt. Am Tag der Messung des Apoptose-Assays wurde jedem Well 10 µl CellTiter-Blue®-Reagenz hinzugefügt und

¹⁶⁴ Promega Corporation

nach ein- bis zweistündiger Inkubation im Brutschrank wurde mittels Fluoreszenz-Messung mit Wallac Victor 3 ein Zahlenwert für die Zellproliferation ermittelt.

Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay misst die Stoffwechselkapazität der Zellen als Indikator für lebendige Zellen. Dies funktioniert aufgrund einer Reduktion des in dem Reagenz enthaltenen, kaum fluoreszierenden Resazurin zum stark fluoreszierenden Resorufin (bei 590 nm). Diese Reduktion kann nur von lebensfähigen Zellen durchgeführt werden. Die Zunahme der Fluoreszenz ist somit meist direkt proportional zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.¹⁶⁵

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten und Datenverwaltung erfolgte bei allen Versuchen mit Microsoft Office Excel 2007. Aus jeweils drei bis fünf Versuchsreihen pro Ansatz wurden anhand der normalisierten Werte Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen ermittelt sowie Diagramme erstellt. Anschließend wurde ein studentischer, einseitiger, ungepaarter T-Test aus Vergleichen der einzelnen Behandlungen mit der jeweiligen Kontrollgruppe auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ durchgeführt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse in der Arbeit erfolgte mit GraphPad Prism 7.03.

3.5 Materialien

In der folgenden Tabelle werden alle benutzten Geräte, Materialen, Stoffe, Reagenzien und Stimulantien aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Reagenzien, Materialien und Geräte

Reagenzien	Hersteller, Ort
DMEM/HamsF12	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sodiumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Insulinlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

¹⁶⁵ Promega Corporation

DMSO 99,9%	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol min. 99,8 % p.a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dulbecco´s PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Accutase®	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<u>Chemotherapeutika</u>	
Doxorubicin (in DMSO gelöst)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Etoposid (in DMSO gelöst)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Docetaxel (in DMSO gelöst)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
5-FU (in DMSO/DMF gelöst)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<u>ERβ-Agonisten</u>	
Liquiritigenin (in DMSO gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
ErB-041 (in EtOH oder DMSO gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
FERb-033 (in EtOH gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
WAY 200070 (in EtOH gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
3-β-Adiol (in EtOH gelöst)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<u>ERβ-Antagonisten</u>	
PHTPP (in EtOH gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
(R,R)-THC (in EtOH gelöst)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
<u>Gebrauchsfertige Kits</u>	
CellTiter-Blue®	Promega Corporation, Madison, USA
Caspase-Glo® 3/7	
Staurosporine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Desinfektion 2-Propanol 70%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
<u>Verbrauchsmaterial</u>	
Biosphere®Filterspitzen 1000µl, 100µl, 20µl, 10µl	Sarstedt, Nürmbrecht, D
Glaspipetten 2ml, 25ml	Greiner Bio-one GmbH, Solingen, D
Eppendorf biopur Pipetten 1ml, 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Gewebe-Kulturflaschen 50ml, 250ml, 550ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Eppendorf Cups	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugenrörchen Cellstar® Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-one GmbH, Solingen, D
96-well-Kulturplatten Cellstar®	Greiner Bio-one GmbH, Solingen, D
Handschuhe Gentle Skin sensitive	Medi Trade GmbH, Kiefersfelden, D
<u>Geräte</u>	
Sterile Werkbank Hera Safe	Kendro, Langenselbold, D
Pipetten 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Eppendorf Multipette® pro	Eppendorf AG, Hamburg, D
Accu-jet® pro	Brand GmbH, Wertheim, D

Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Kendro, Osterode, D
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus Kendro, Osterode, D
Sauger HLC	Ditabis Chemie, Pforzheim, D
Vortexer MS2 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & CO KG, Staufen, D
Brutschrank HERAcell® 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen, D
Wasserbad	Shellab, Cornelius, USA
Wallac Victor 3 Wallac 1420 Manager	Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau, D
Windows 7 Windows 2000 Professionel	Microsoft, Unterschleißheim, D
Word 2007, Excel 2007	Microsoft, Unterschleißheim, D
Kühlschrank +4°C	Liebherr, D
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, D

3.5.1 Apoptose-auslösende Stoffe

Staurosporine

Staurosporine hemmt die Phospholipid/Ca²⁺-abhängige Proteinkinase (PKC, Proteinkinase C)¹⁶⁶ und ist bekannt als Apoptose-Auslöser in diversen Zelltypen.¹⁶⁷

Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Zytostatikum, welches in der Chemotherapie des Mammakarzinoms in Kombination mit anderen Zytostatika verwendet wird. Seine zytotoxische Wirkung beruht hauptsächlich auf einer Interkalation in die DNA, was zur Hemmung der Nucleinsäuresynthese führt, und auf einer Hemmung der Topoisomerase II, wodurch es zur Induktion von Doppelstrangbrüchen kommt. Weiterhin wird es zu freien Radikalen, die Doppelstrangbrüche hervorrufen, biotransformiert und bindet an Bestandteile der Zellmembran, sodass die Membranfluidität und -permeabilität erhöht wird.^{168,169}

¹⁶⁶ Tamaoki et al. 1986

¹⁶⁷ Kruman et al. 1998

¹⁶⁸ Mutschler et al. 2013

¹⁶⁹ Tacar et al. 2013

Etoposid

Bei Etoposid handelt es sich um ein weit verbreitetes Zytostatikum, welches die Topoisomerase II hemmt. Topoisomerase II bindet kovalent an beide DNA-Stränge und führt einen temporären Doppelstrangbruch herbei, um die Replikation der DNA zu ermöglichen. Nach erfolgter Replikation dissoziiert die Topoisomerase grundsätzlich wieder von der DNA und die Bruchstelle wird wieder verschlossen. Etoposid blockiert dabei die Dissoziation der Topoisomerase von der DNA, so dass dauerhafte Doppelstrangbrüche entstehen, was zum Absterben der Zellen führt.¹⁷⁰

Docetaxel

Docetaxel ist ein sehr bedeutendes Zytostatikum in der Therapie des Mammakarzinoms. Es blockiert den Zellzyklus in der G²- bzw. M-Phase und führt zum Absterben der Zellen, indem es erst die Bildung der Mikrotubuli beschleunigt, dann an die β-Tubulin-Untereinheit bindet und so die Desaggregation des Spindelapparates verhindert. Dadurch dass die Spindeln nicht mehr umgebaut werden können, wird die Mitose gestört.¹⁷¹

3.5.2 Verwendete ERβ-Modulatoren

ERβ-Agonisten:

- Liquiritigenin
- ErB-041
- FERb-033
- WAY 200070
- 3-β-Adiol

ERβ-Antagonisten:

- PHTPP
- (R,R)-THC

¹⁷⁰ Mutschler et al. 2013

¹⁷¹ Mutschler et al. 2013

4 Resultate

Zunächst wurden jeweils in zahlreichen Vorversuchen die effektivsten Konzentrationen der verwendeten Chemotherapeutika und Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Docetaxel und Doxorubicin sowie die beste Behandlungsdauer für die jeweilige Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7, T47D und ZR-75-1 ermittelt.

Aufgrund der Fragestellung der Arbeit nach der Wirksamkeit der ER β -Modulatoren werden im Folgenden die Ergebnisse aus den oben aufgeführten Ansätzen nach dem jeweiligen Östrogenrezeptor- β -Modulator, der Kombination mit Chemotherapeutikum und der Zelllinie dargestellt. Aufgrund der vielen Kombinationen und Messergebnisse wurden die jeweiligen Ergebnisse aus den einzelnen Ansätzen (siehe 3.2.2. Inkubation) zugunsten der Übersicht auf viele einzelne Abbildungen aufgeteilt.

Es wurden aufgrund verschiedener Voruntersuchungen und Erkenntnisse im Laufe der Arbeit in jedem Versuchsansatz bei jeder Zelllinie Anpassungen durchgeführt, so dass nicht jeder Versuchsansatz an jeder Zelllinie gleich ist und sich Konzentrationen, Einwirkzeiten aber auch getestete Stoffe unterscheiden. So wurden zum Beispiel die ER β -Antagonisten an der letzten Zellreihe ZR-75-1 gar nicht mehr getestet.

4.1 FERb-033

FERb-033 wurde mit einer Konzentration von 10 nM an allen Zelllinien getestet. Aufgrund der in Vorversuchen getesteten notwendigen Einwirkzeit der Chemotherapeutika (in dieser Arbeit nicht dargestellt) und der erwünschten Vorinkubation mit ER β -Modulatoren für circa 20 h ergab sich in den Versuchen mit Chemotherapeutika eine Gesamteinwirkzeit für FERb-033 von 40 - 60 h je nach Zelllinie. An den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D wurde in den Ansätzen mit Staurosporine eine Vorbehandlung über 18 h für FERb-033 gewählt sowie je nach Zelllinie eine anschließende Inkubation mit Staurosporine für 3 bis 6 h. Hierdurch ergaben sich Gesamteinwirkzeiten für FERb-033 von 21 bis 24 h (siehe Kapitel 3.2.2).

4.1.1 FERb-033 ohne Kombination

Die alleinige Behandlung von MDA-MB-231-Zellen mit FERb-033 führte zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate (Abbildung 12).

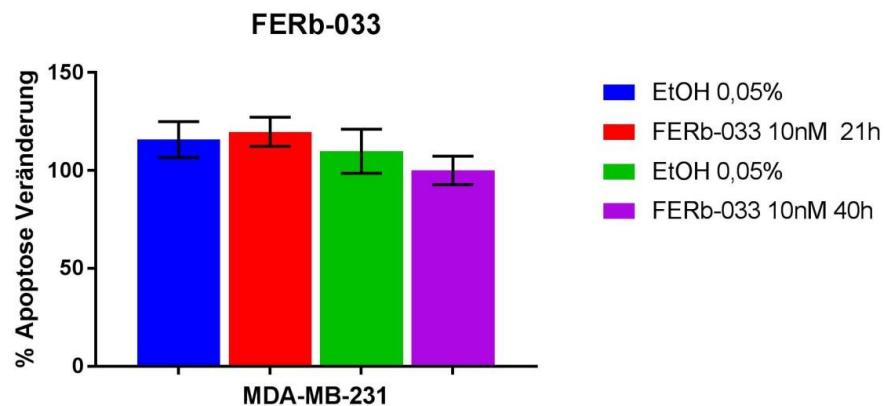


Abbildung 12: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den MCF-7-Zellen führte die Behandlung mit 10 nM FERb-033 nach 24 h zu einer Apoptose-Steigerung, verglichen mit dem Lösemittel Ethanol als Referenzmedium (P-Wert 0,017), nach 60 h jedoch ließ sich kein Effekt nachweisen (Abbildung 13).

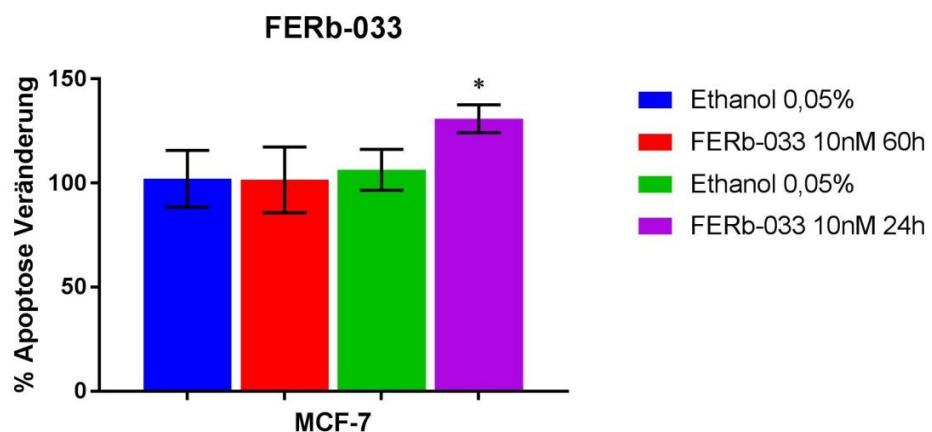


Abbildung 13: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Genauso, wie die MCF-7-Zellen, verhielten sich die T47D-Zellen (Abbildung 14). Nach 24 h kam es zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate bei den T47D-Zellen gegenüber dem Lösemittel Ethanol (P -Wert 0,010). Nach 60 h jedoch war kein Effekt nachzuweisen.

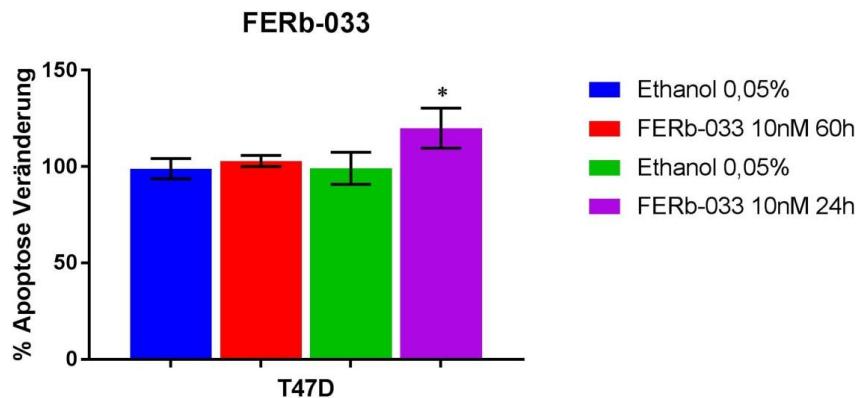


Abbildung 14: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die ZR-75-1-Zellen zeigten nach Inkubation mit 10 nM FERb-033 über 44 h keine Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel EtOH als Referenzmedium (Abbildung 15).

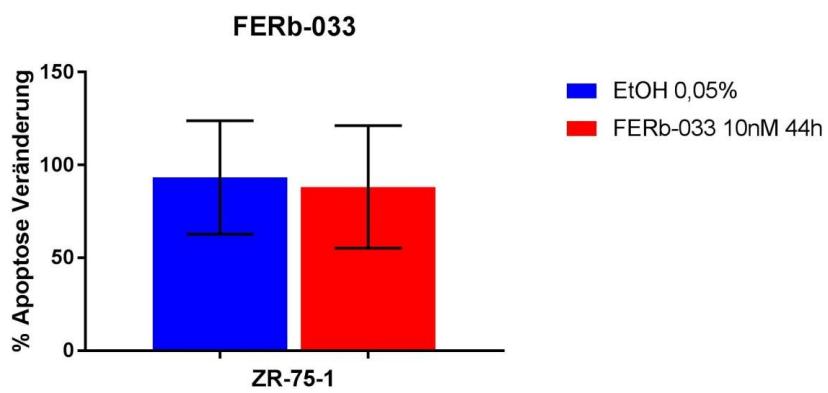


Abbildung 15: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich über die alleinige Anwendung von FERb-033 sagen, dass sowohl die MCF-7- als auch die T47D-Zellen nach 24 h mit einer Apoptose-Steigerung, verglichen mit der Apoptoserate unter dem Lösemittel Ethanol reagierten. ZR-75-1- und MDA-MB-231-Zellen zeigten keine veränderte Apoptoserate.

4.1.2 FERb-033 + Staurosporine

Wie oben bereits erwähnt, erfolgte die Testung von MDA-MB-231-, MCF-7- und T47D-Zellen nach Vorinkubation mit 10 nM FERb-033 über 18 h und anschließender Inkubation mit Staurosporine in von der Zelllinie abhängiger Konzentration und Einwirkzeit. An den ZR-75-1-Zellen wurden zwei Staurosporine-Konzentrationen getestet und die Vorinkubationszeit von FERb-033 betrug in diesem Versuchsansatz 20 h. An allen Zelllinien ließ sich durch die Behandlung mit Staurosporine eine signifikante Apoptose-Induktion auslösen.

Bei den MDA-MB-231-Zellen konnte durch die Kombination Staurosporine und FERb-033 kein zusätzlicher Effekt im Vergleich zur Behandlung mit Staurosporine und dem Lösemittel EtOH dargestellt werden (Abbildung 16).

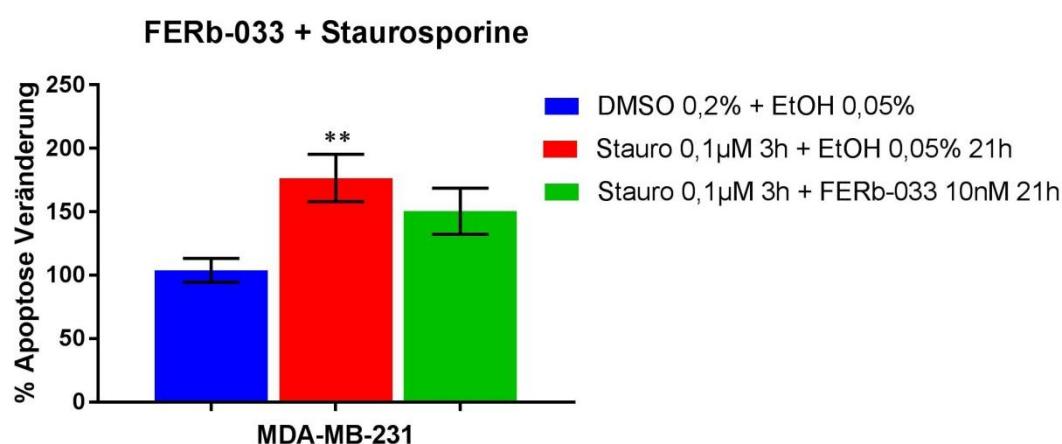


Abbildung 16: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die MCF-7-Zellen zeigten auf eine Vorinkubation mit 10 nM FERb-033 über 18 h und anschließender Behandlung mit 1 μ M Staurosporine über 6 h im Vergleich zu einer Vorinkubation mit EtOH (Lösemittel von FERb-033) und anschließender Staurosporine-Behandlung ebenfalls keine signifikante Veränderung der Apoptoserate (Abbildung 17).

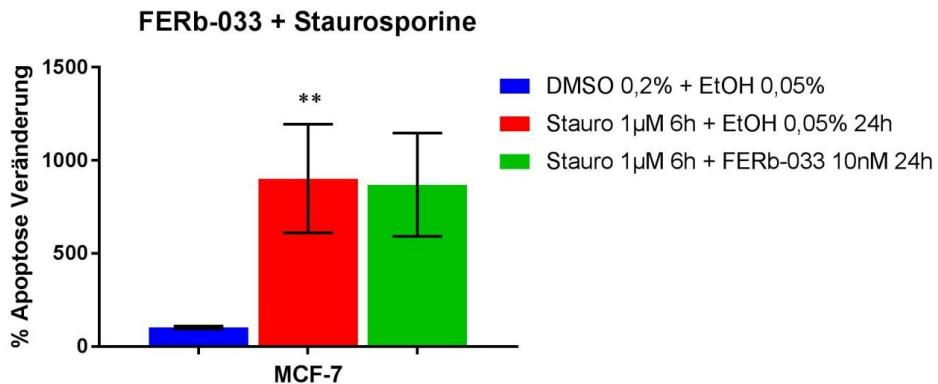


Abbildung 17: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch die T47D-Zellen reagierten auf die Kombination FERb-033 und Staurosporine nicht mit einem zusätzlichen Effekt im Vergleich zur alleinigen Staurosporine/EtOH-Behandlung (Abbildung 18).

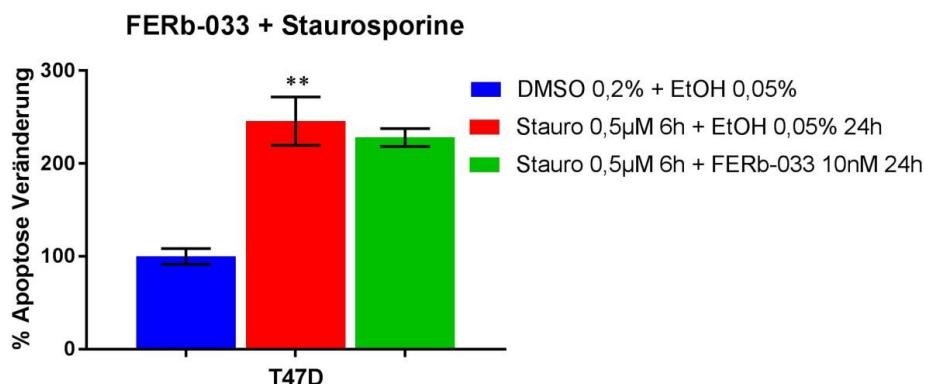


Abbildung 18: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den ZR-75-1-Zellen ließen sich bei beiden Staurosporine-Konzentrationen deutliche Senkungen der Apoptoserate durch eine Vorinkubation mit FERb-033 im Vergleich zur Behandlung mit Staurosporine und dem Lösemittel EtOH darstellen (für 0,2 µM Staurosporine P-Wert von 0,028 und für 0,5 µM Staurosporine P-Wert von 0,0004; Abbildung 19).

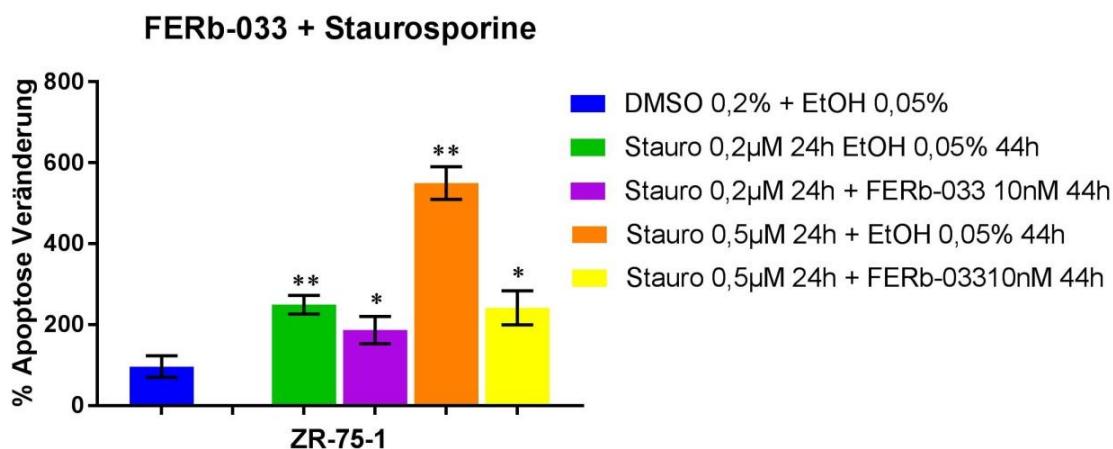


Abbildung 19: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend führte die Kombination FERb-033 + Staurosporine lediglich an den ZR-75-1-Zellen zur signifikanten Senkung der Apoptoserate, verglichen mit der alleinigen Staurosporine-Behandlung.

4.1.3 FERb-033 + Etoposid

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM FERb-033 Etoposid in durch Vorversuche ermittelten, verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden sogar zwei unterschiedliche Konzentrationen von Etoposid getestet.

Etoposid führte bei allen Zelllinien außer MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. An den MCF-7-Zellen konnte selbst

in den Vorversuchen durch kein einziges Chemotherapeutikum in verschiedensten Konzentrationen nach verschiedenen Einwirkzeiten Apoptose ausgelöst werden. Die Kombination mit FERb-033 erfolgte trotzdem.

Bei den MDA-MB-231-Zellen ließ sich keine signifikante Veränderung der Apoptoserate durch Vorinkubation mit 10 nM FERb-033 über 20 h und anschließender Behandlung mit Etoposid, verglichen mit alleiniger Etoposid/EtOH-Behandlung verzeichnen (Abbildung 20).

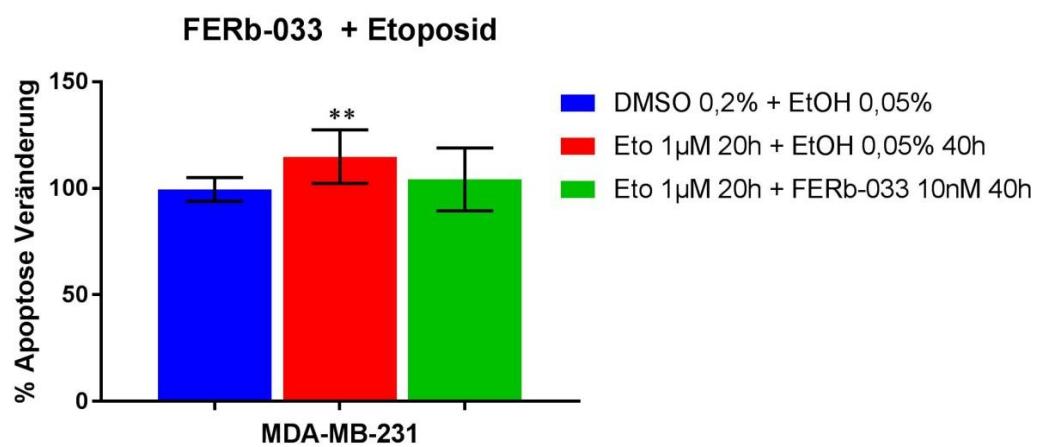


Abbildung 20: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Dahingegen ließ sich bei den MCF-7-Zellen eine deutliche Senkung der Apoptoserate durch Vorinkubation mit FERb-033 und anschließender Behandlung mit Etoposid im Vergleich zu Etoposid und Vorinkubation mit dem Lösemittel EtOH darstellen (P -Wert 0,008; Abbildung 21).

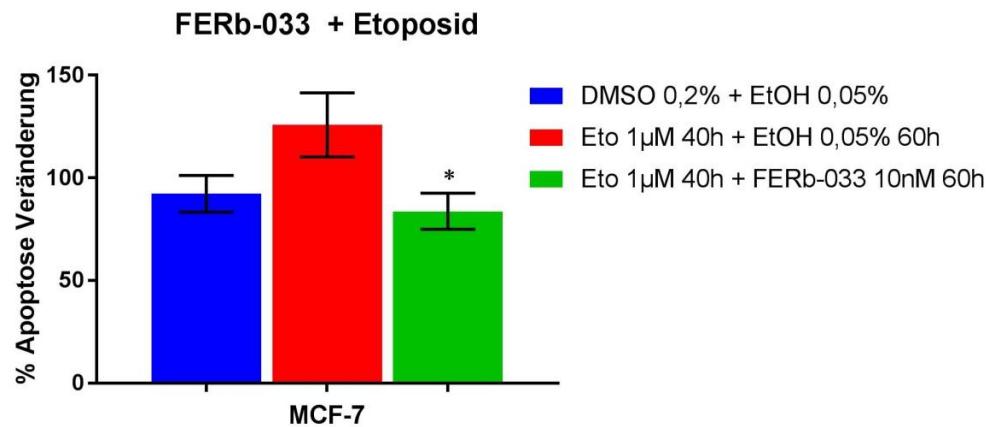


Abbildung 21: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den T47D-Zellen veränderte sich die Apoptoserate jedoch nicht durch die Vorbehandlung mit 10 nM FERb-033, verglichen mit der Vorbehandlung mit dem Lösemittel Ethanol und jeweils anschließender Etoposid-Behandlung (Abbildung 22).

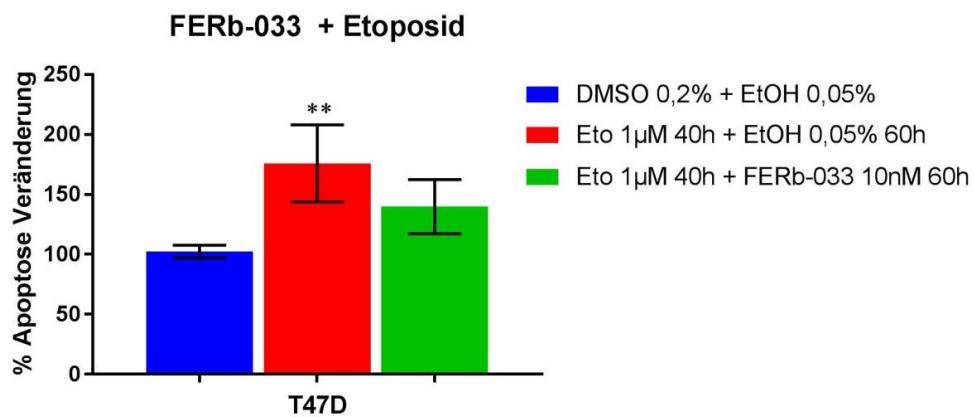


Abbildung 22: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den ZR-75-1-Zellen hingegen wurde der Etoposid-Effekt durch Vorinkubation mit FERb-033 nicht signifikant verändert (Abbildung 23).

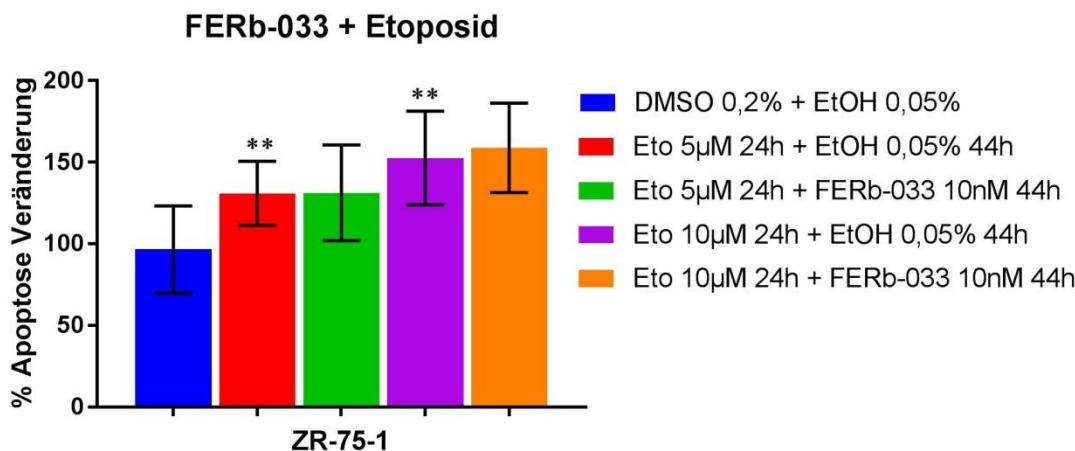


Abbildung 23: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Etoposid + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich über die Kombination FERb-033 mit Etoposid sagen, dass sie lediglich bei den MCF-7-Zellen eine Senkung der Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Etoposid + Lösemittel bewirkte.

4.1.4 FERb-033 + Doxorubicin

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM FERb-033 Doxorubicin in durch Vorversuche ermittelten unterschiedlichen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden wiederum zwei Konzentrationen von Doxorubicin getestet.

Doxorubicin bewirkte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen eine signifikante Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO.

Bei den MDA-MB-231-Zellen führte auch beim Chemotherapeutikum Doxorubicin die vorherige Inkubation mit FERb-033 zu keiner Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Behandlung Doxorubicin + Lösemittel EtOH (Abbildung 24).

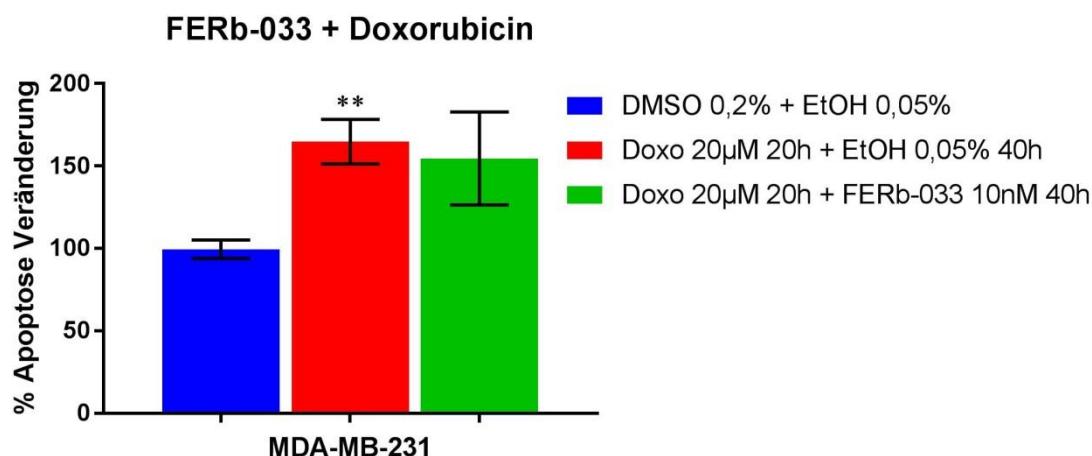


Abbildung 24: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den Versuchen an den MCF-7-Zellen kam es erneut zu einer Senkung der Apoptoserate durch Vorinkubation mit FERb-033 und anschließender Behandlung mit Doxorubicin im Vergleich zu Doxorubicin und Vorinkubation mit dem Lösemittel EtOH (P-Wert 0,024; Abbildung 25).

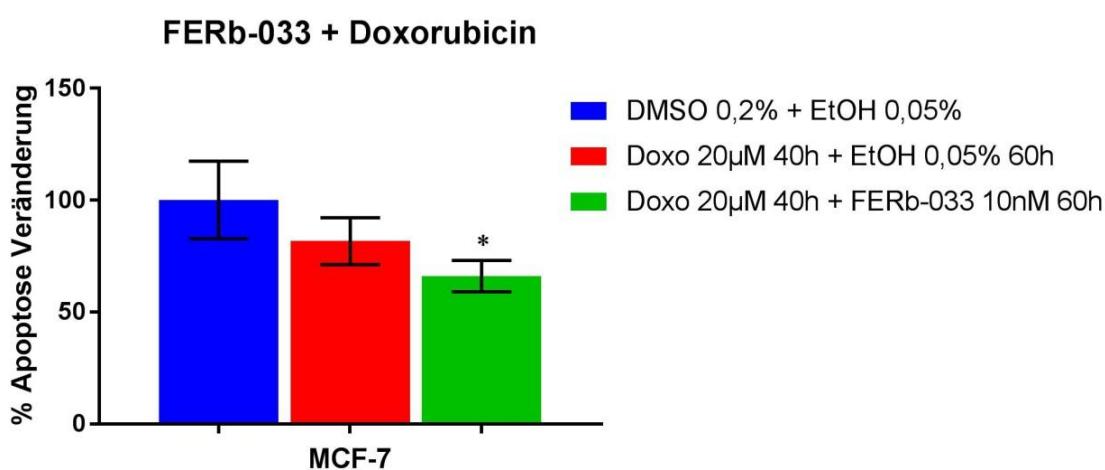


Abbildung 25: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die T47D-Zellen zeigten keine veränderte Apoptoserate bei Vorbehandlung mit FERb-033 und anschließender Behandlung mit Doxorubicin (Abbildung 26).

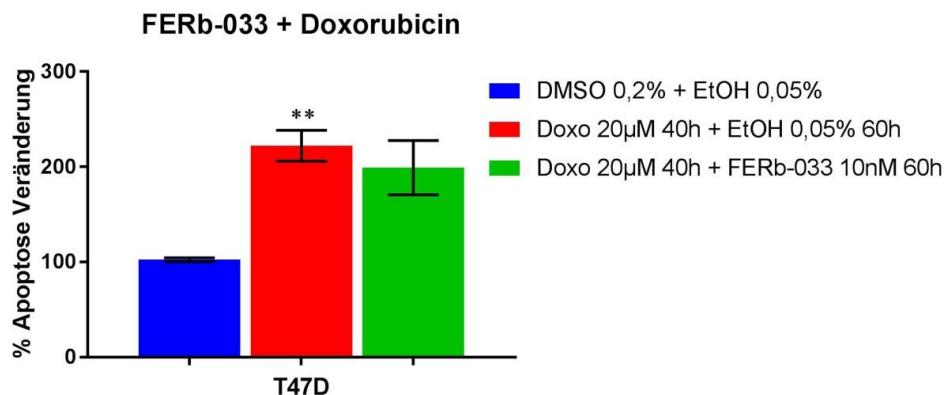


Abbildung 26: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso blieb die Vorinkubation mit FERb-033 und anschließende Behandlung mit Doxorubicin bei den ZR-75-1-Zellen ohne Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Behandlung mit Doxorubicin und dem Lösemittel EtOH (Abbildung 27).

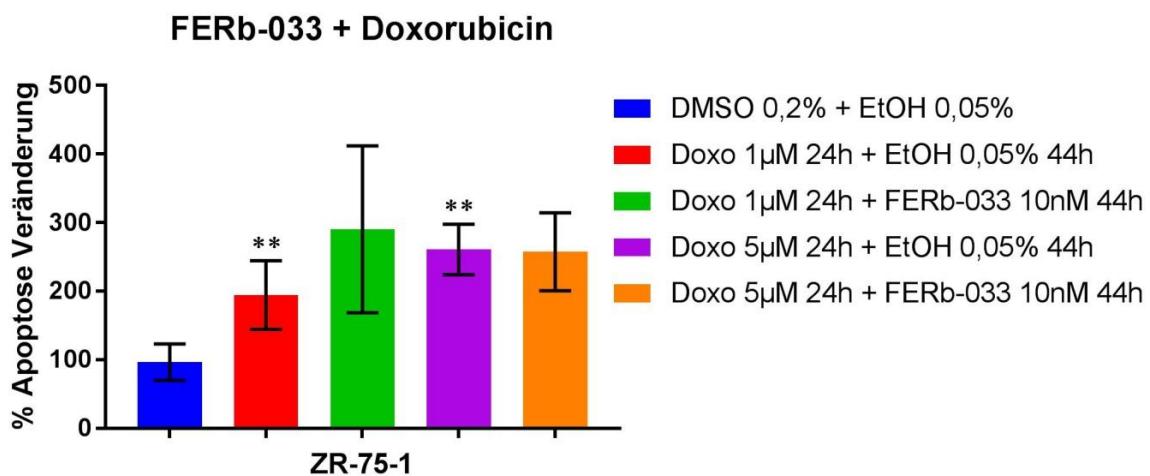


Abbildung 27: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend konnte die Kombination FERb-033 mit Doxorubicin lediglich bei der Zelllinie MCF-7 eine Senkung der Apoptoserate, verglichen mit der alleinigen Doxorubicin-Behandlung, auslösen.

4.1.5 FERb-033 + Docetaxel

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM FERb-033 Docetaxel in durch Vorversuche ermittelten unterschiedlichen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden wie immer zwei Konzentrationen von Docetaxel getestet.

Docetaxel wirkte bei allen Zelllinien außer MCF-7 eine signifikante Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. Die Testung mit MCF-7-Zellen erfolgte trotzdem. Die Effekte an den ZR-75-1-Zellen für Docetaxel waren jedoch schwach und in der höheren 1 µM Konzentration ohne Signifikanz. Zusätzlich war auffällig, dass sich bei der für FERb-033 (in EtOH gelöst) notwendigen Kombination von Docetaxel mit EtOH keine Signifikanz für das Chemotherapeutikum gegenüber dem Referenzmedium DMSO mit EtOH ergab (Abbildung 31).

Dieses Mal kam es auch bei den MDA-MB-231-Zellen zu einer Senkung der Apoptoserate durch die Vorinkubation mit FERb-033 bei anschließender Behandlung mit Docetaxel, verglichen mit alleiniger Docetaxelbehandlung (P -Wert 0,023; Abbildung 28).

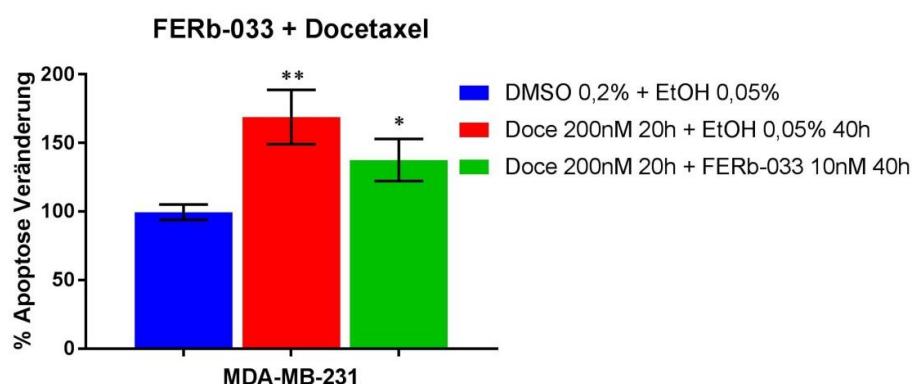


Abbildung 28: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den MCF-7-Zellen kam es dagegen zu keinem Effekt (Abbildung 29).

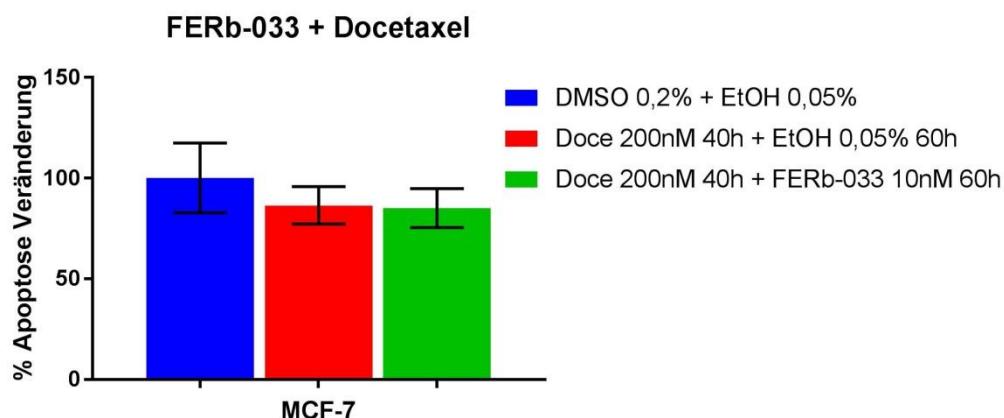


Abbildung 29: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die Vorinkubation mit FERb-033 über 20 h und anschließende Behandlung mit Docetaxel über 40 h löste bei den T47D-Zellen eine signifikante Steigerung der Apoptoserate aus (P-Wert 0,013; Abbildung 30).

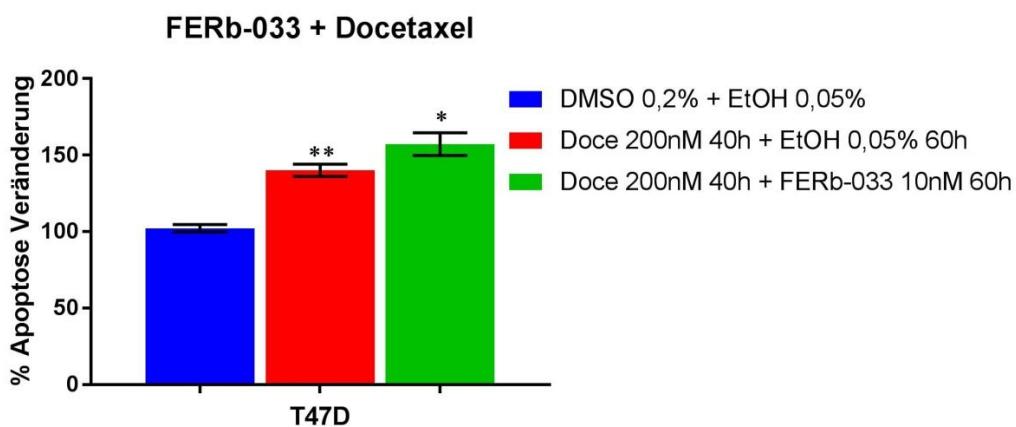


Abbildung 30: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den ZR-75-1-Zellen kam es hingegen zu keinem Effekt durch die Vorinkubation mit FERb-033 bei anschließender Docetaxel-Behandlung (Abbildung 31).

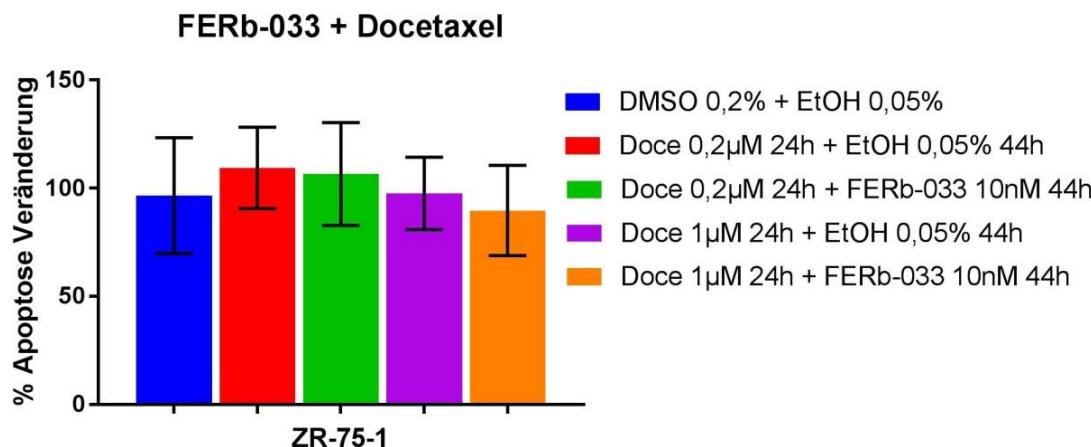


Abbildung 31: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination FERb-033 und Docetaxel lediglich bei den MDA-MB-231-Zellen eine Senkung der Apoptoserate bewirkt hat, verglichen mit alleiniger Docetaxel-Behandlung.

4.2 WAY200070

Da WAY200070, wie FERb-033, erst in späteren Versuchen verwendet wurde, begannen wir sofort mit einer Konzentration von 10 nM an allen Zelllinien. Aufgrund der notwendigen Einwirkzeit der Chemotherapeutika und der Vorinkubation mit ER β -Modulatoren für circa 20 h ergab sich auch hier in den Versuchen mit den Chemotherapeutika eine Gesamteinwirkzeit für WAY200070 von 40 bis 60 h je nach Zelllinie. An den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D wurde in den Ansätzen mit Staurosporine eine Vorbehandlung von 18 h für WAY20070 gewählt sowie je nach Zelllinie eine anschließende Inkubation mit Staurosporine von 3 bis 6 h. Hierdurch ergeben sich in diesen Versuchen Gesamteinwirkzeiten für WAY20070 von 21 bis 24 h je nach Zelllinie. (siehe Kapitel 3.2.2)

4.2.1 WAY200070 ohne Kombination

Die alleinige Behandlung von MDA-MB-231-Zellen mit WAY200070 führte bei keiner Einwirkzeit zu einer Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel Ethanol als Referenzmedium (Abbildung 32).

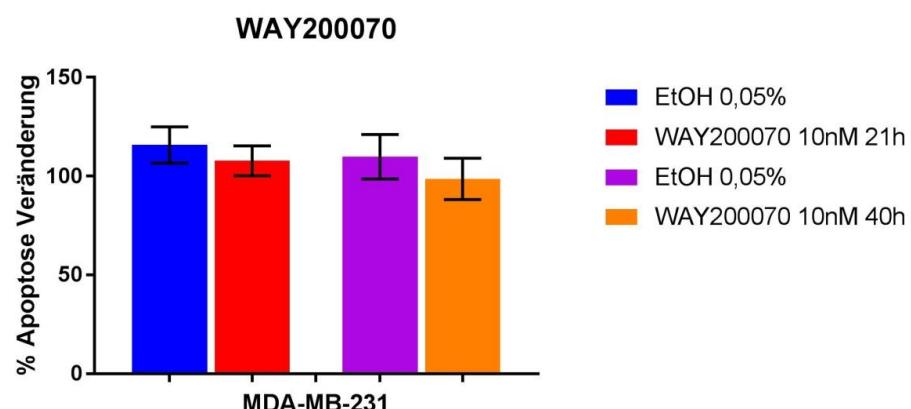


Abbildung 32: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die MCF-7-Zellen reagierten auf WAY200070 ebenfalls ohne signifikanten Effekt, verglichen mit dem Lösemittel Ethanol (Abbildung 33).

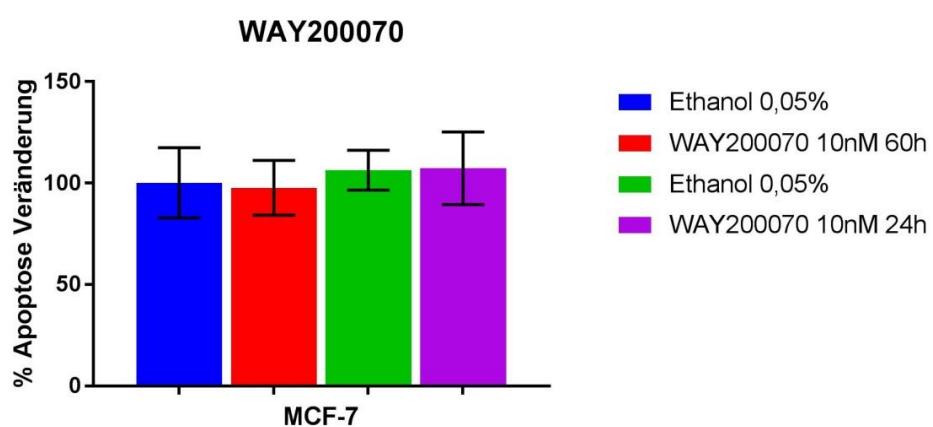


Abbildung 33: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den T47D-Zellen ergab sich auch kein signifikanter Effekt in der Apoptoserate durch WAY200070 (Abbildung 34).

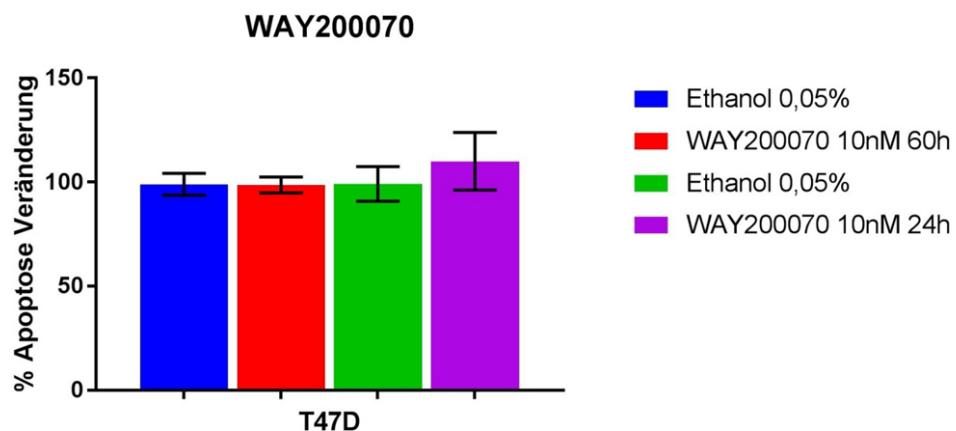


Abbildung 34: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch die ZR-75-1-Zellen reagierten auf WAY200070 mit keiner Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Apoptoserate durch das Lösemittel Ethanol (Abbildung 35).

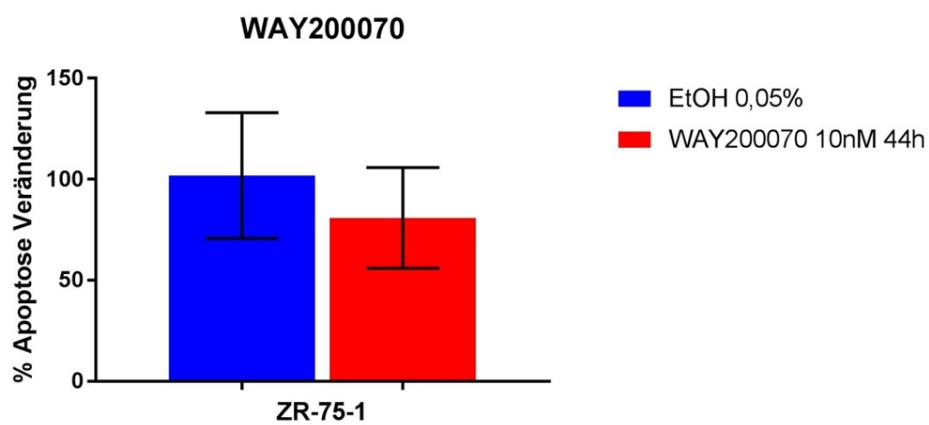


Abbildung 35: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend reagierte keine der Zelllinien mit einer veränderten Apoptoserate auf die alleinige Behandlung mit WAY200070.

4.2.2 WAY200070 + Staurosporine

Wie oben bereits erwähnt, erfolgte die Testung von MDA-MB-231-, MCF-7- und T47D-Zellen nach Vorinkubation mit 10 nM WAY200070 über 18 h und anschließender Inkubation mit Staurosporine in von der Zelllinie abhängiger Konzentration und Einwirkzeit. An den ZR-75-1-Zellen wurden zwei Staurosporine-Konzentrationen getestet und die Vorinkubationszeit von WAY200070 betrug in diesem Versuchsansatz 20 h.

An allen Zelllinien ließ sich durch die Behandlung mit Staurosporine eine signifikante Apoptose-Induktion auslösen.

Bei den MDA-MB-231-Zellen führte die Vorinkubation mit WAY200070 und anschließende Behandlung mit Staurosporine zu keiner Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Apoptoserate durch Vorinkubation mit dem Lösemittel Ethanol und anschließender Staurosporine-Behandlung (Abbildung 36).

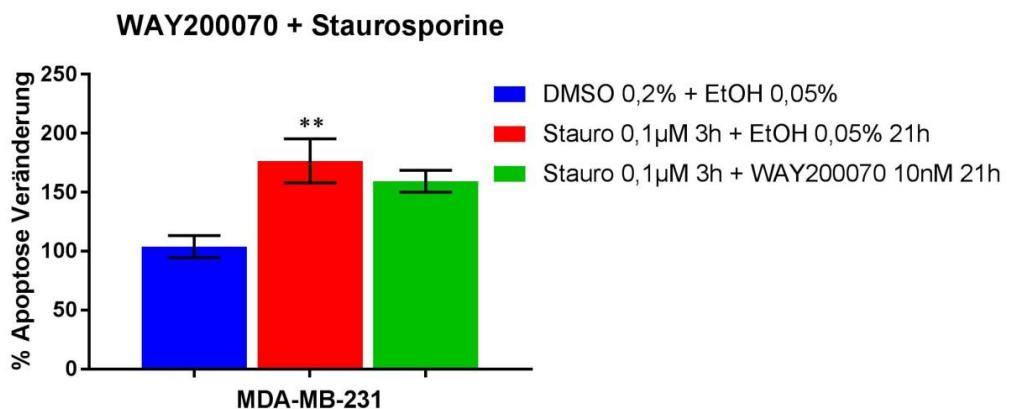


Abbildung 36: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den MCF-7-Zellen kam es bei oben genannter Wirkstoffkombination zu keiner signifikanten Änderung des Effektes (Abbildung 37).

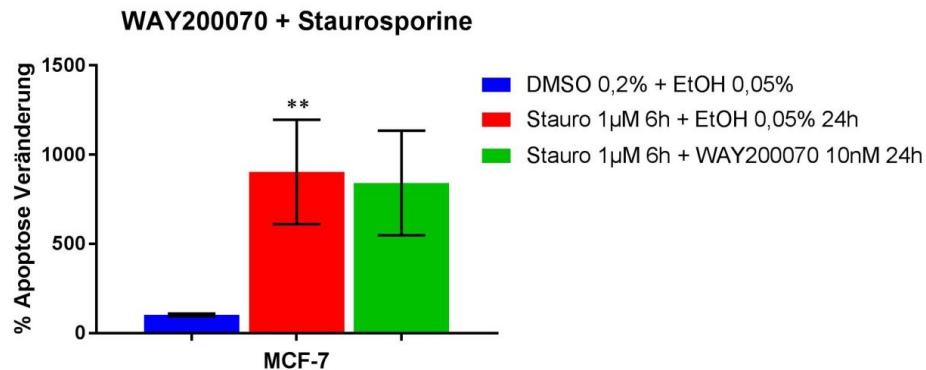


Abbildung 37: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenfalls reagierten die T47D-Zellen auf die Vorinkubation mit WAY20070 und anschließende Behandlung mit Staurosporine mit keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Apoptoserate durch Vorinkubation mit dem Lösemittel Ethanol und anschließender Staurosporine-Behandlung (Abbildung 38).

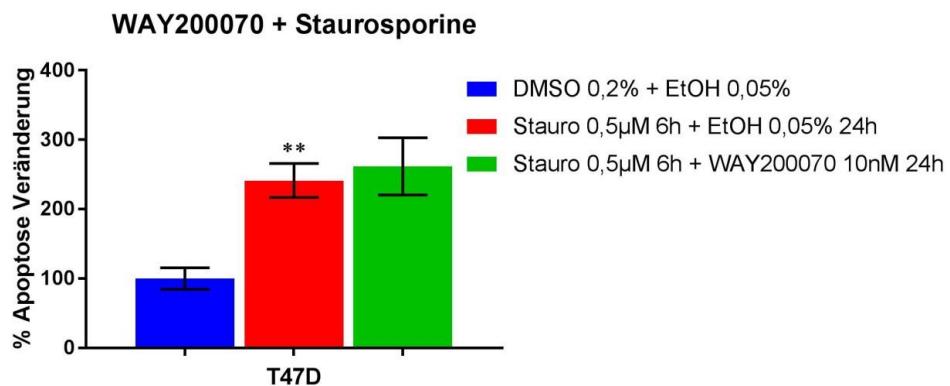


Abbildung 38: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den Versuchen an den ZR-75-1-Zellen kam es durch die Vorinkubation mit WAY200070 zu einer deutlichen Senkung der Apoptoserate, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Staurosporine und der Vorinkubation mit dem Lösemittel EtOH als Kontrolle (bei 0,2 µM Staurosporine P-Wert 0,039, bei 0,5 µM Staurosporine P-Wert 0,029; Abbildung 39).

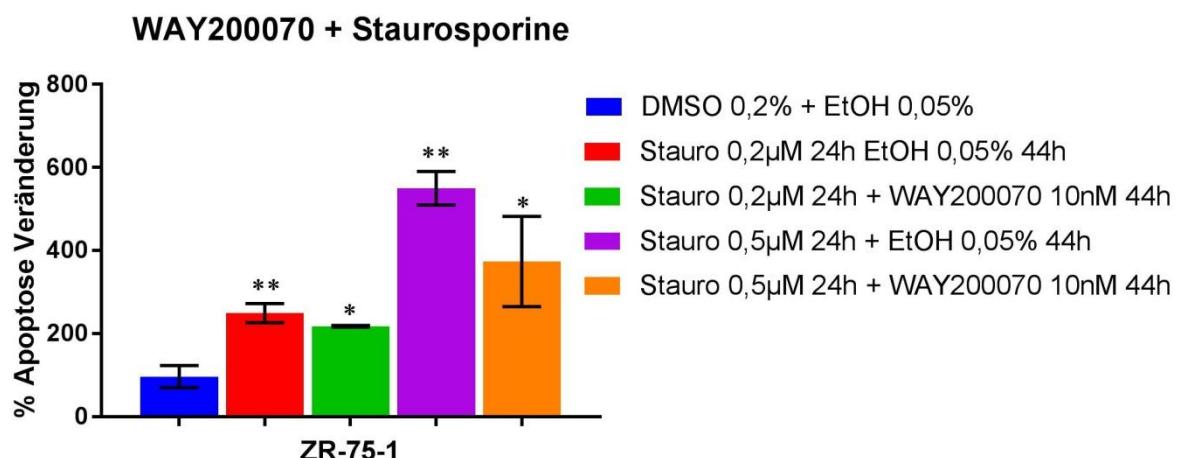


Abbildung 39: : %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend führte die Kombination von WAY200070 mit Staurosporine nur bei den ZR-75-1-Zellen zu einer Senkung der Apoptoserate, verglichen mit alleiniger Staurosporine-Behandlung.

4.2.3 WAY200070 + Etoposid

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM WAY200070 Etoposid in durch Vorversuche ermittelten, verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden erneut zwei Konzentrationen von Etoposid getestet.

Etoposid führte bei allen Zelllinien außer MCF-7 zu einer signifikanten Apoptose-Induktion, verglichen mit dem Lösemittel DMSO.

Die MDA-MB-231-Zellen zeigten jedoch ebenso keine signifikante Veränderung der durch Etoposid ausgelösten Apoptoserate bei vorheriger Stimulation mit WAY200070 (Abbildung 40).

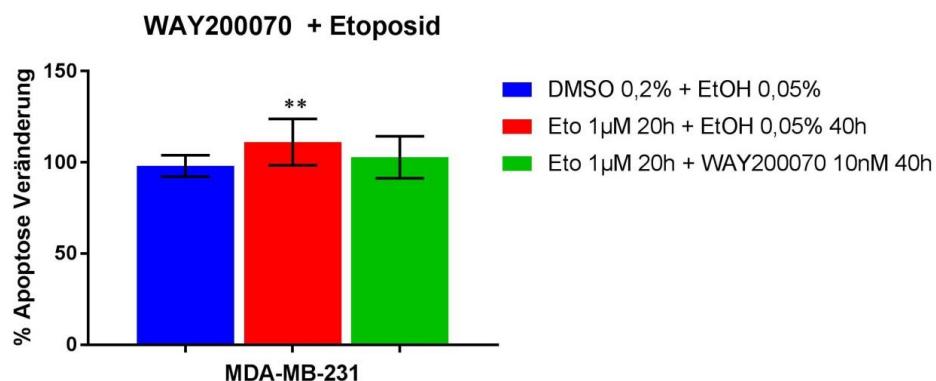


Abbildung 40: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Doch bei den MCF-7-Zellen führte die Vorinkubation mit 10 nM WAY200070 über 20 h und anschließende Behandlung mit 1 µM Etoposid zu einer signifikanten Senkung der Apoptoserate, verglichen mit der Apoptoserate durch Etoposid + EtOH (P-Wert 0,018; Abbildung 41).

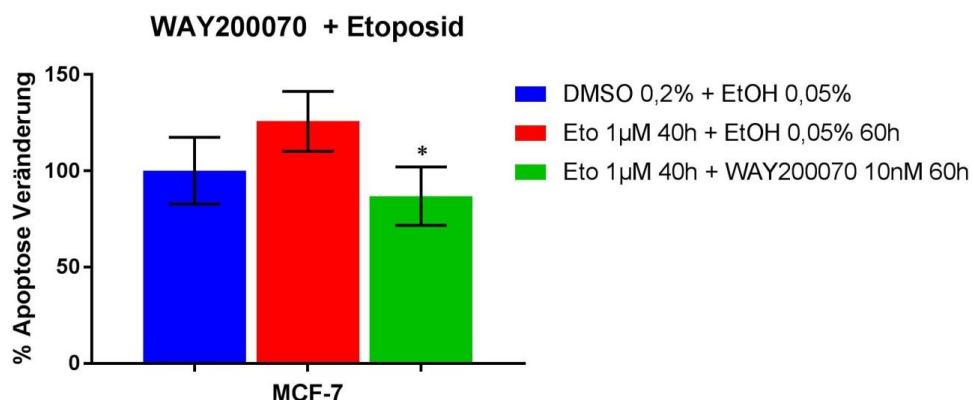


Abbildung 41: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den T47D-Zellen führte die Vorinkubation mit 10 nM WAY200070 über 20 h und anschließende Behandlung mit 1 µM Etoposid zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Apoptoserate durch Etoposid + EtOH (Abbildung 42).

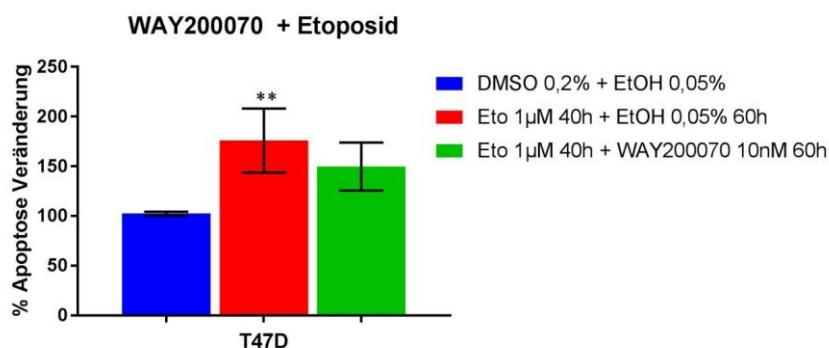


Abbildung 42: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die ZR-75-1-Zellen reagierten bei keiner Etoposidkonzentration mit einer Veränderung der Apoptoserate nach Vorinkubation mit WAY200070, verglichen mit alleiniger Etoposid-Behandlung (Abbildung 43).

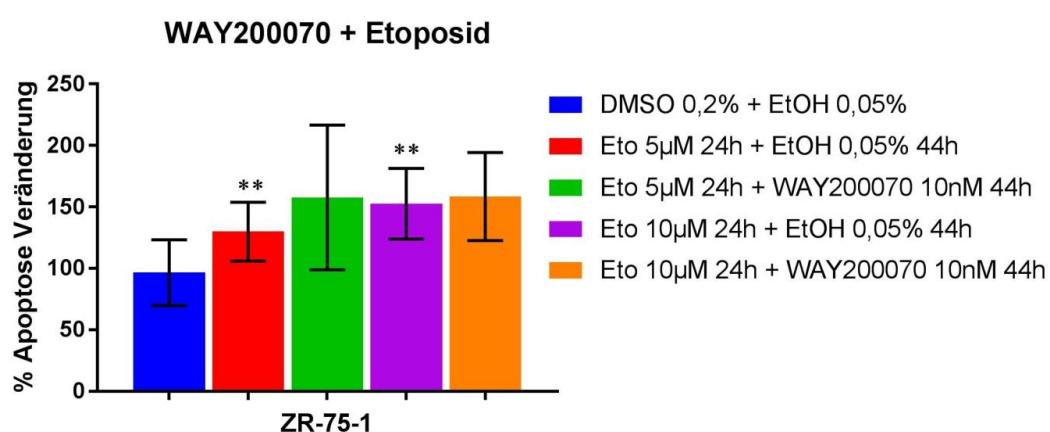


Abbildung 43: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Etoposid + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich über die Kombination WAY2000070 mit Etoposid sagen, dass sie nur bei den MCF-7-Zellen zu einer Apoptose-Senkung geführt hat.

4.2.4 WAY200070 + Doxorubicin

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM FERb-033 Doxorubicin in durch Vorversuche ermittelten unterschiedlichen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie immer, zwei Konzentrationen von Doxorubicin getestet.

Doxorubicin bewirkte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen (wie bereits oben erwähnt) eine signifikante Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO.

An den MDA-MB-231-Zellen führte bei Doxorubicin die vorherige Inkubation mit WAY200070 zu keiner Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit einer vorherigen Inkubation mit dem Lösemittel EtOH (Abbildung 44).

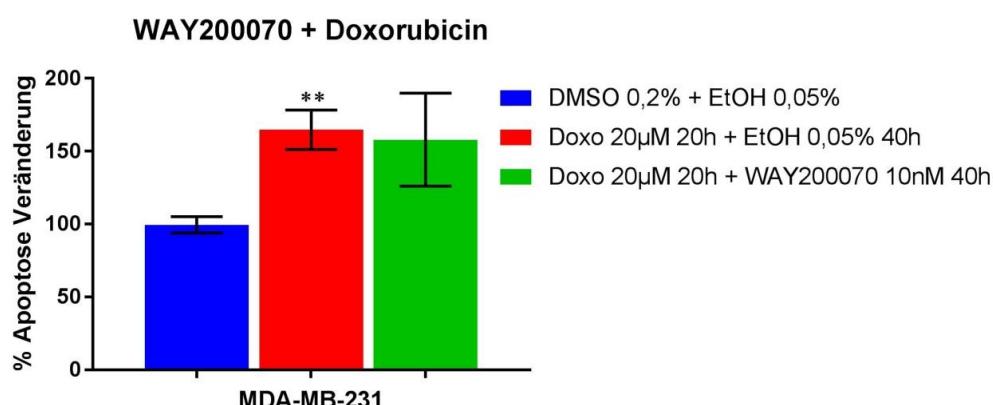


Abbildung 44: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch in den Versuchen mit MCF-7-Zellen konnte durch WAY200070 und Doxorubicin die Apoptoserate nicht beeinflusst werden (Abbildung 45).

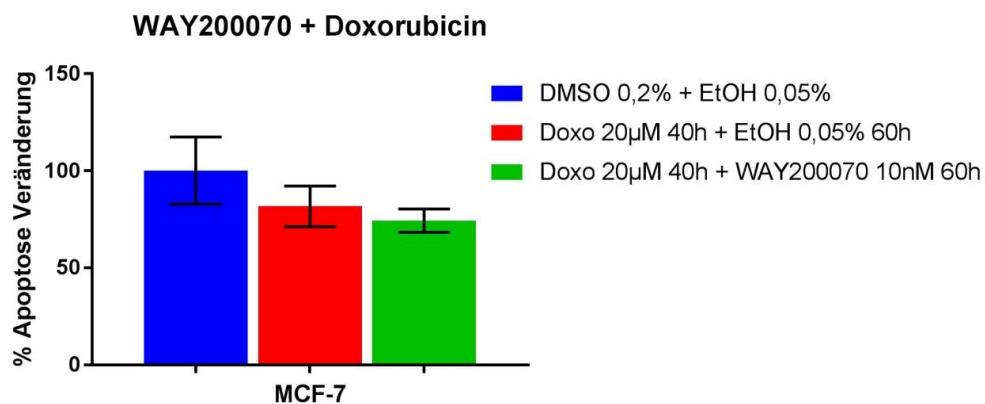


Abbildung 45: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den T47D-Zellen veränderte sich die Apoptoserate durch Doxorubicin nicht durch Vorinkubation mit WAY200070, verglichen mit der Vorinkubation mit EtOH, dem Lösemittel von WAY200070, und anschließender Doxorubicin-Behandlung (Abbildung 46).

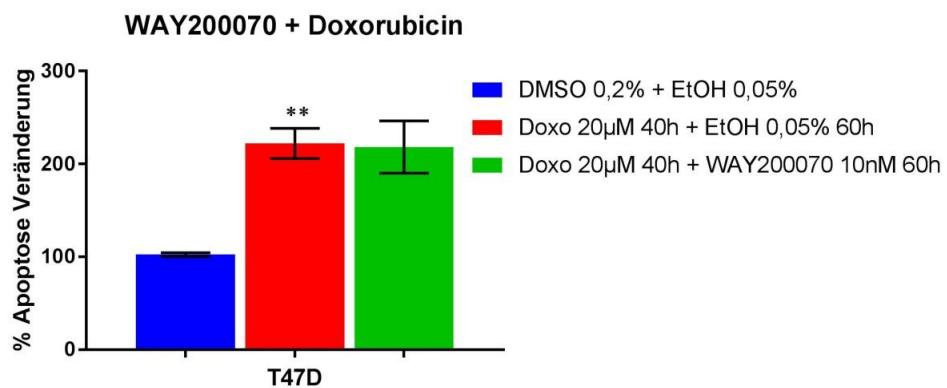


Abbildung 46: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Hingegen reagierten die ZR-75-1-Zellen auf die Vorinkubation mit WAY200070 mit einer Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit der Behandlung mit Doxorubicin und

dem Lösemittel Ethanol (bei 1 µM Doxorubicin P-Wert 0,015, bei 5 µM Doxorubicin P-Wert 0,011; Abbildung 47).

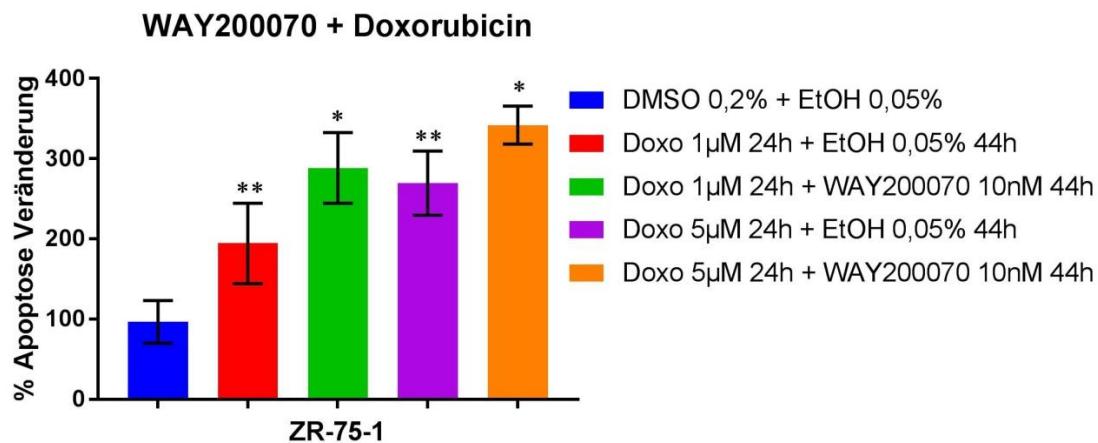


Abbildung 47: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend führte die Kombination WAY200070 und Doxorubicin an den ZR-75-1-Zellen zu einer Steigerung der Apoptoserate.

4.2.5 WAY200070 + Docetaxel

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM FERb-033 Docetaxel in durch Vorversuche ermittelten unterschiedlichen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie bereits erwähnt, zwei Konzentrationen von Docetaxel getestet.

Docetaxel bewirkte nur bei den Zelllinien MDA-MB-231, T47D und ZR-75-1 (wie bereits oben erwähnt) eine signifikante Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. Die Testung mit MCF-7 erfolgte trotzdem. Die Effekte an ZR-75-1-Zellen für Docetaxel waren jedoch schwach und in der höheren Konzentration nicht signifikant. Bei der für WAY200070 (in EtOH gelöst) notwendigen Kombination von Docetaxel mit EtOH ergab sich für Docetaxel keine Signifikanz gegenüber dem Referenzmedium DMSO mit EtOH an den ZR-75-1-Zellen (siehe Abbildung 51).

Bei den MDA-MB-231-Zellen löste die Kombination WAY200070 mit Docetaxel keine Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Behandlung Docetaxel und Ethanol aus (Abbildung 48).

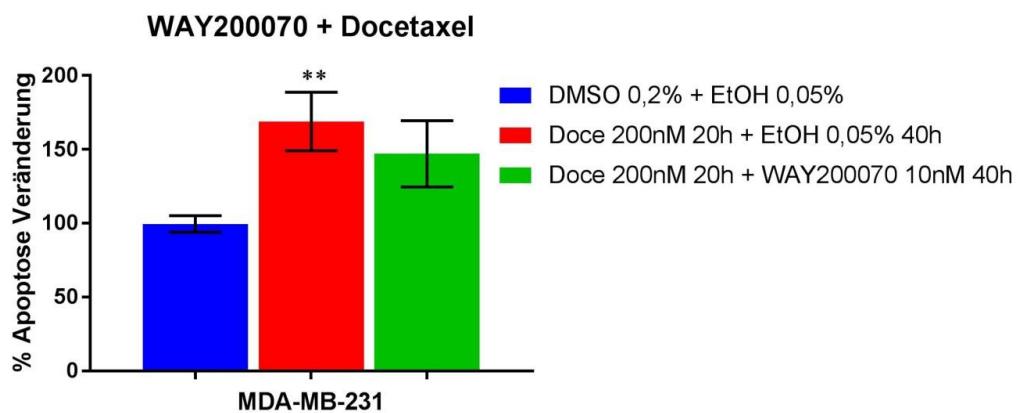


Abbildung 48: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

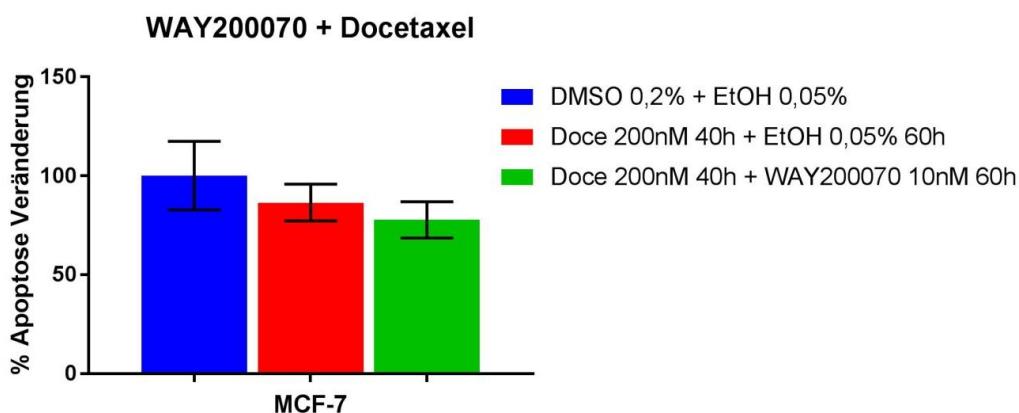


Abbildung 49: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den MCF-7- und den T47D-Zellen konnte durch die Vorinkubation mit WAY200070 und anschließende Behandlung mit Docetaxel kein zusätzlicher Effekt, verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Docetaxel, hervorgerufen werden (Abbildung 49 und Abbildung 50).

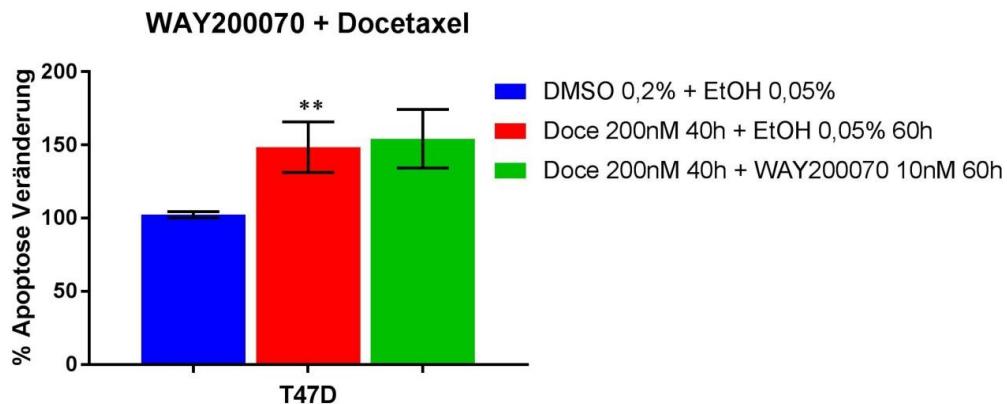


Abbildung 50: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso reagierten die ZR-75-1-Zellen auf diese Kombination nicht mit einer veränderten Apoptoserate (Abbildung 51).

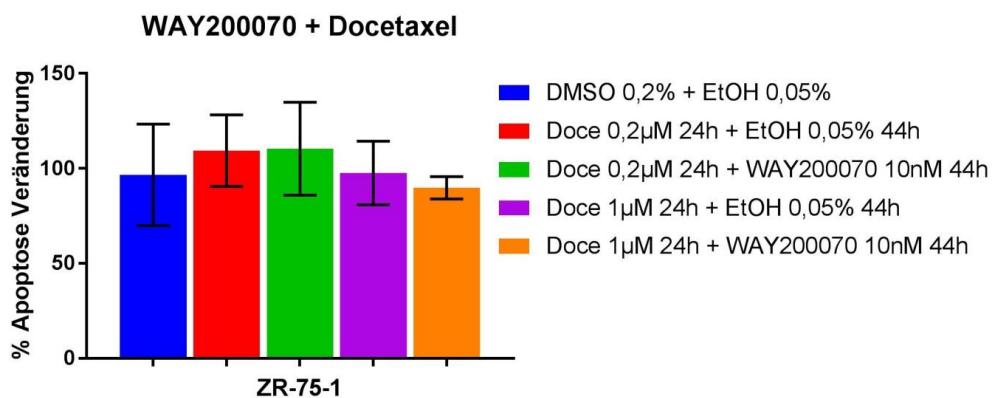


Abbildung 51: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend löste die Kombination WAY200070 mit Docetaxel keine der Zelllinien mit einer Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit alleiniger Docetaxel-Behandlung, aus.

4.3 3- β -Adiol

Da dieser ER β -Agonist erst gegen Ende der Versuchsreihen in unserem Labor verfügbar war, testeten wir ihn nur an der zuletzt verwendeten Zellreihe ZR-75-1. Nach einer Vorinkubation von 20 h mit 10 nM 3- β -Adiol erfolgte die Behandlung mit Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel in je zwei unterschiedlichen Konzentrationen über 24 h, so dass sich eine Gesamteinwirkdauer für 3- β -Adiol von 44 h ergab. Alle Chemotherapeutika und Staurosporine in allen Konzentrationen führten zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel der Stoffe (DMSO) als Kontrolle. Die Effekte für Docetaxel waren jedoch schwach und in der höheren Docetaxel-Konzentration nicht signifikant.

4.3.1 3- β -Adiol ohne Kombination

Die alleinige Behandlung mit 3- β -Adiol führte zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel EtOH (Abbildung 52).

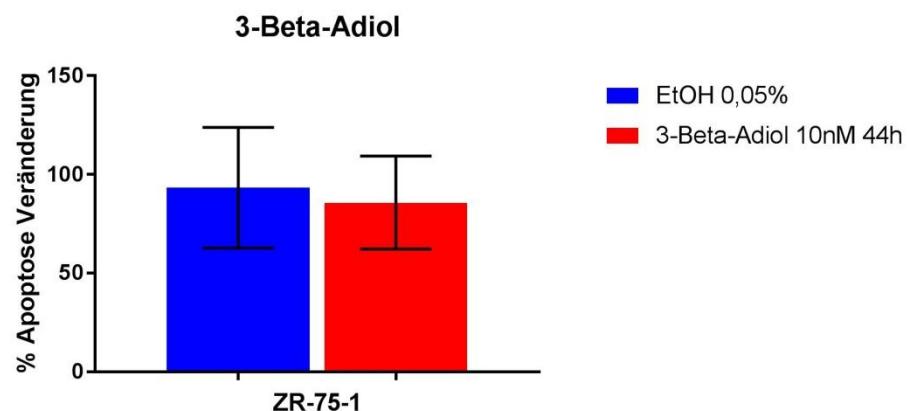


Abbildung 52: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und 3- β -Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.3.2 3- β -Adiol + Staurosporine

Bei der Vorinkubation mit 10 nM 3- β -Adiol von ZR-75-1-Zellen kam es bei anschließender Behandlung mit 0,5 μ M Staurosporine zu einer deutlichen Senkung der Apoptoserate, verglichen mit der Vorinkubation mit dem Lösemittel EtOH als Kontrolle und anschließender Staurosporinebehandlung (P-Wert 0,002). Bei der 0,2 μ M Staurosporine-Konzentration ließ sich durch 3- β -Adiol kein zusätzlicher Effekt zum Staurosporine-Effekt darstellen (Abbildung 53).

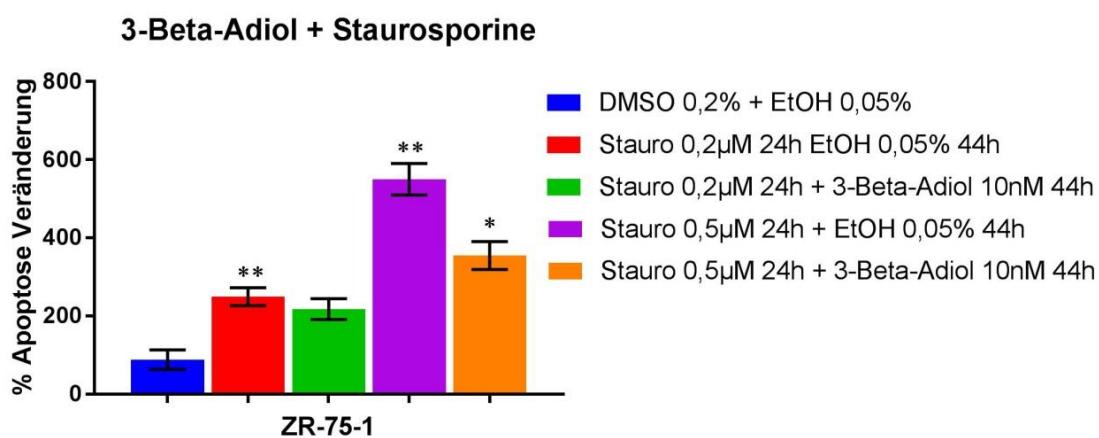


Abbildung 53: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + 3- β -Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.3.3 3- β -Adiol + Etoposid

Bei der anschließenden Behandlung mit Etoposid nach Vorinkubation mit 3- β -Adiol kam es zu keinem signifikanten Effekt (Abbildung 54).

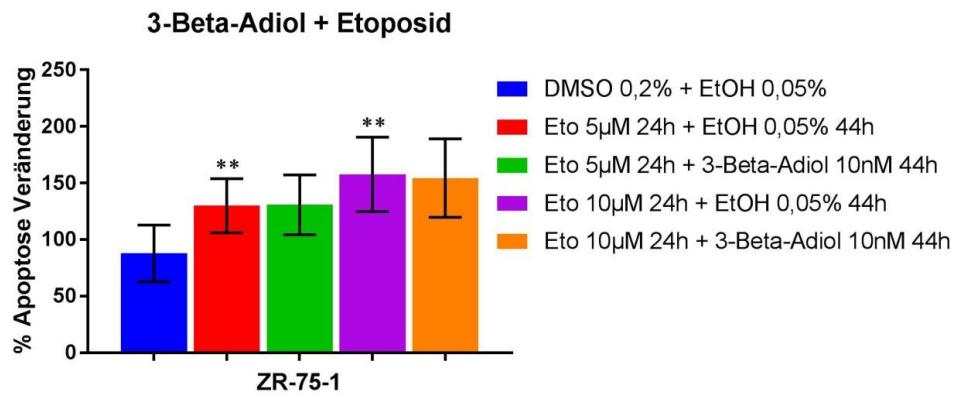


Abbildung 54: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen EtOH und Etoposid + 3-β-Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.3.4 3-β-Adiol + Doxorubicin

Nach Vorinkubation mit 3-β-Adiol und anschließender Behandlung mit Doxorubicin in zwei verschiedenen Konzentrationen kam es bei den ZR-75-1-Zellen nicht zu einer Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der Vorinkubation mit dem Lösemittel Ethanol und anschließender Doxorubicin-Behandlung (Abbildung 55).

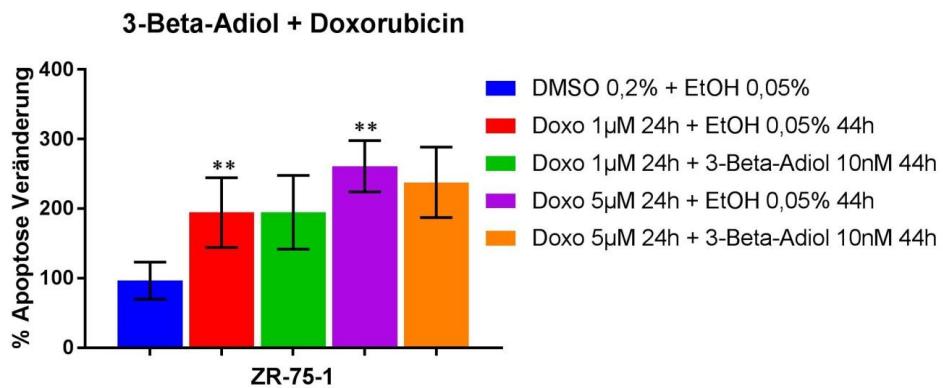


Abbildung 55: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + 3-β-Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.3.5 3β -Adiol + Docetaxel

Auch bei der anschließenden Behandlung mit Docetaxel nach Vorinkubation mit 3β -Adiol kam es zu keiner veränderten Apoptoserate der ZR-75-1-Zellen, verglichen mit der Vorinkubation mit dem Lösemittel Ethanol und anschließender Docetaxel-Behandlung (Abbildung 56).

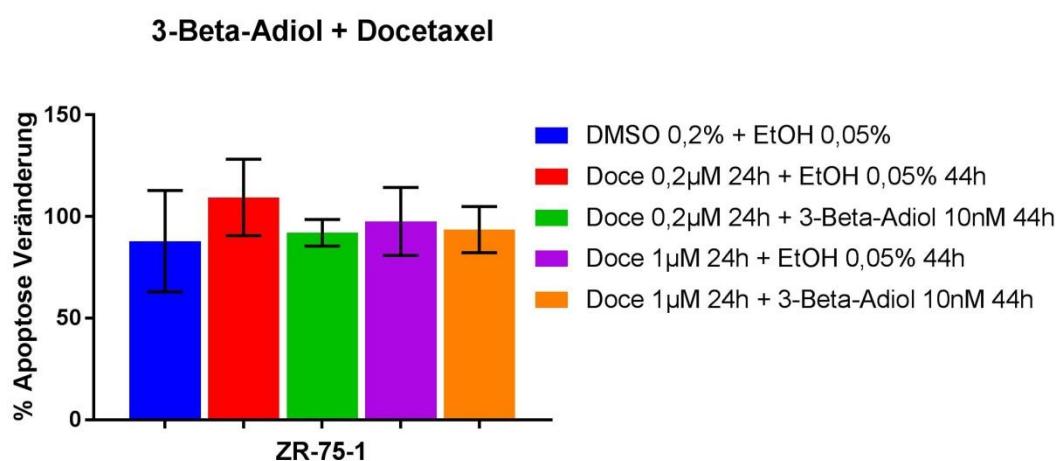


Abbildung 56: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend kam es bei den Kombinationen mit 3β -Adiol lediglich bei der 0,5 μ M Staurosporinekonzentration zu einer Senkung der Apoptoserate, verglichen mit alleiniger Staurosporinebehandlung. Alle anderen Kombinationen blieben ohne zusätzlichen Effekt durch den ER β -Agonisten.

4.4 Liquiritigenin

Liquiritigenin wurde in den ersten Versuchsansätzen an den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D noch in einer Konzentration von 1 μ M verwendet. In späteren Versuchen wurde aufgrund der EC50-Werte (siehe Einleitung Kapitel 1.2.5) die verwendete Konzentration auf 10 nM reduziert, um ER β -unspezifische Effekte gegebenenfalls zu reduzieren bzw. auszuschließen. Aufgrund der notwendigen

Einwirkzeit der Chemotherapeutika und der Vorinkubation mit ER β -Modulatoren für circa 20 h ergab sich eine Gesamteinwirkzeit der ER β -Modulatoren von 40 - 60 h je nach Zelllinie. Bei der letzten Zelllinie ZR-75-1 wurde die 1 μ M Konzentration gar nicht mehr verwendet.

4.4.1 Liquiritigenin ohne Kombination

Die MDA-MB-231-Zellen reagierten auf Liquiritigenin (in DMSO gelöst) in einer Konzentration von 1 μ M bei 24 h Einwirkdauer mit einer signifikanten Apoptose-Steigerung gegenüber der Referenzgröße DMSO (P-Wert 0,035). In den übrigen Versuchsreihen mit 1 μ M über 21 h und 10 nM über 40 h konnte kein signifikanter Effekt dargestellt werden (Abbildung 57).

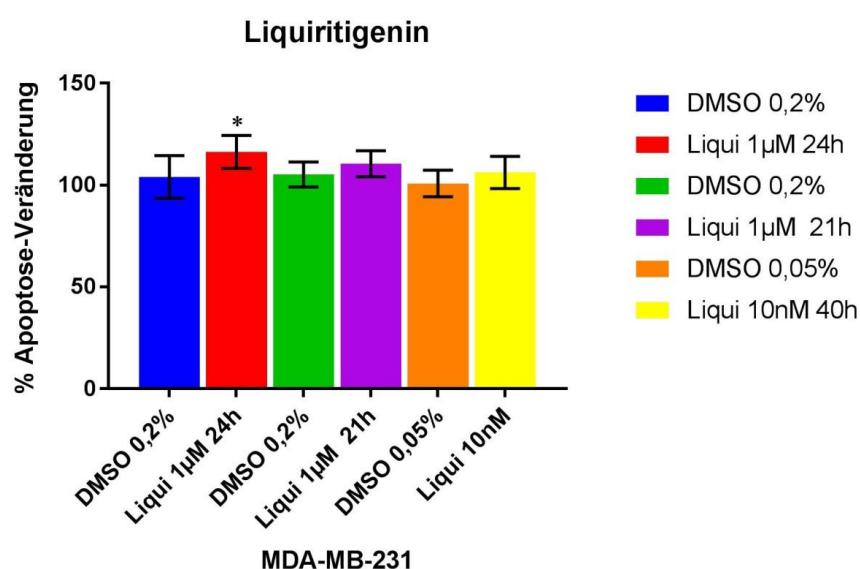


Abbildung 57: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den MCF-7-Zellen ließ sich durch Liquiritigenin allein weder in 1 μ M Konzentration über 24 h noch in 10 nM Konzentration über 60 h ein signifikanter Effekt erzielen (Abbildung 58). Ebenso führten die gleichen Kombinationen an den T47D-Zellen zu keinem signifikanter Effekt (Abbildung 59).

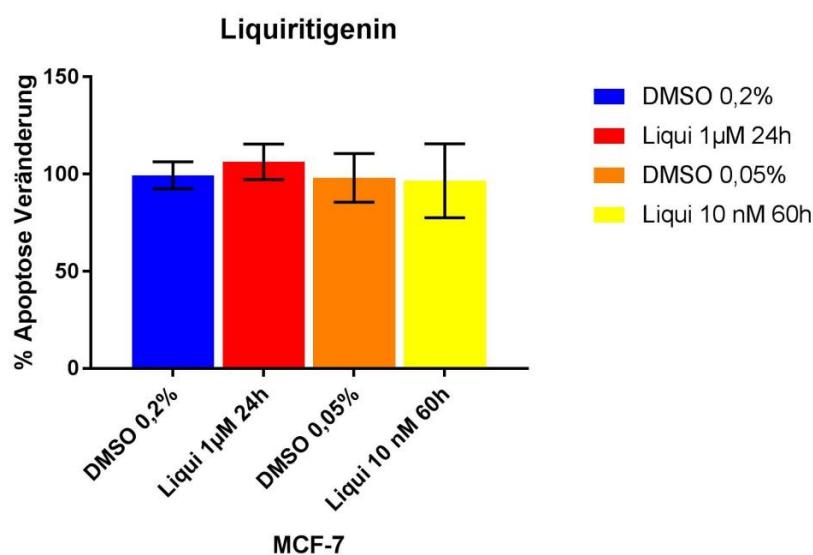


Abbildung 58: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

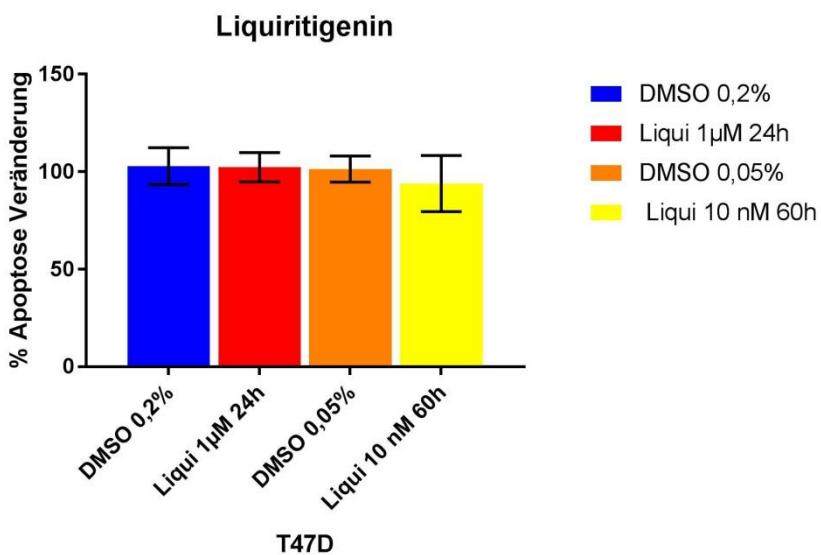


Abbildung 59: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den ZR-75-1-Zellen wurde lediglich die 10 nM Konzentration von Liquiritigenin über 44 h Stunden getestet, was ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate führte (Abbildung 60).

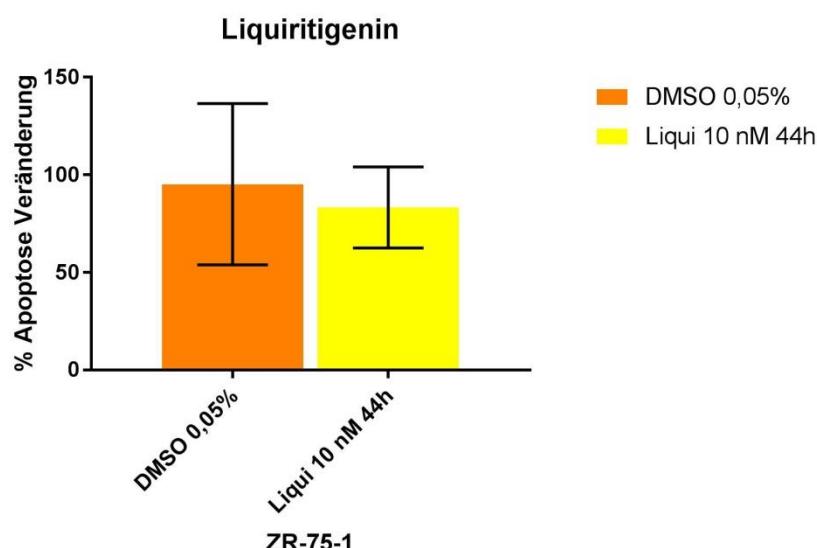


Abbildung 60: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich über Liquiritigenin sagen, dass es ohne Kombination mit Apoptose-auslösenden Stoffen in unseren Versuchsansätzen bis auf die 1 μM Konzentration an MDA-MB-231-Zellen (Apoptose-Induktion verglichen mit dem Lösemittel DMSO als Referenzmedium) keine signifikanten Effekte zeigte.

4.4.2 Liquiritigenin + Staurosporine

Im ersten Versuchsansatz wurde auch Staurosporine in Kombination mit Liquiritigenin untersucht. An den MDA-MB-231-Zellen erfolgte eine Testung in drei unterschiedlichen Konzentrationen von Staurosporine bei gleichzeitiger Inkubation mit 1 μM Liquiritigenin über 24 h. Bei der 0,1 μM Konzentration von Staurosporine erfolgte auch eine Vorinkubation über 21 h mit 1 μM Liquiritigenin. An den MCF-7- und T47D-Zellen wurde jeweils eine Konzentration von Staurosporine mit einer Einwirkzeit von 6 h nach einer Vorinkubation über 18 h mit 1 μM Konzentration von Liquiritigenin untersucht. An

den ZR-75-1-Zellen wurde Staurosporine in zwei unterschiedlichen Konzentrationen über eine Einwirkdauer von 24 h nach Vorinkubation mit 10 nM Liquiritigenin über 20 h getestet.

Staurosporine erzielte an allen vier Zelllinien in allen Konzentrationen signifikante Apoptose-Steigerungen.

An den MDA-MB-231-Zellen ließ sich durch Kombination von Staurosporine 0,1 μ M mit Liquiritigenin in 1 μ M Konzentration und gleichzeitiger Einwirkzeit von 24 h eine signifikante Apoptose-Steigerung, verglichen mit der alleinigen Behandlung von 0,1 μ M Staurosporine hervorrufen (P-Wert 0,007; Abbildung 61).

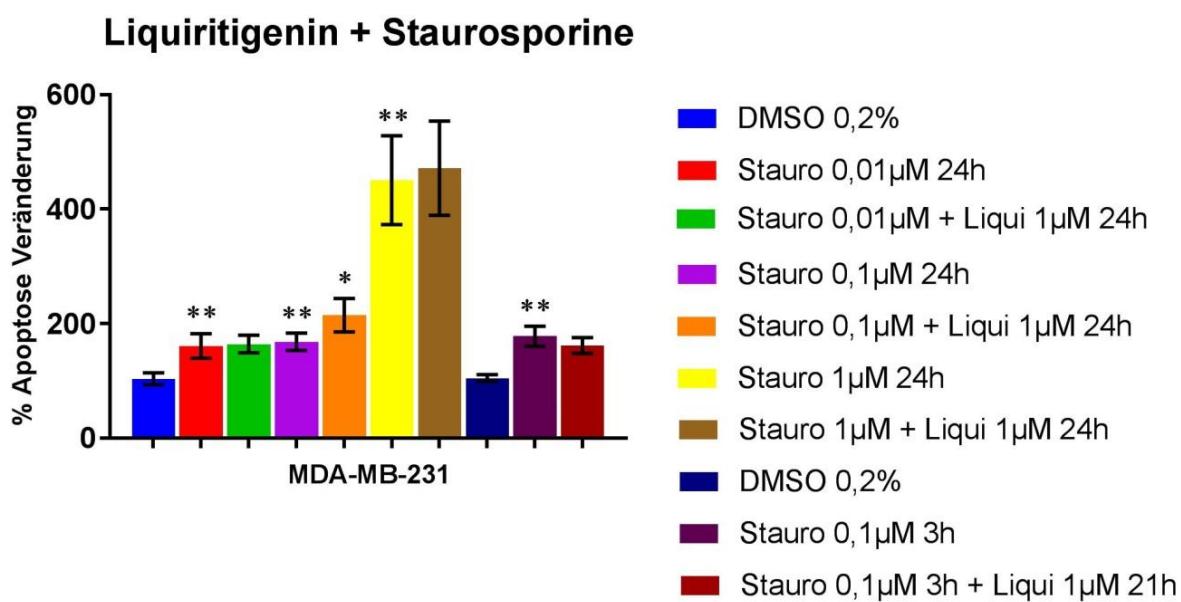


Abbildung 61: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den MCF-7-Zellen kam es nach 18 h Vorinkubation mit 1 μ M Liquiritigenin und anschließender 6-stündiger Inkubation mit 1 μ M Staurosporine zu keiner Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit alleiniger Staurosporinebehandlung (Abbildung 62).

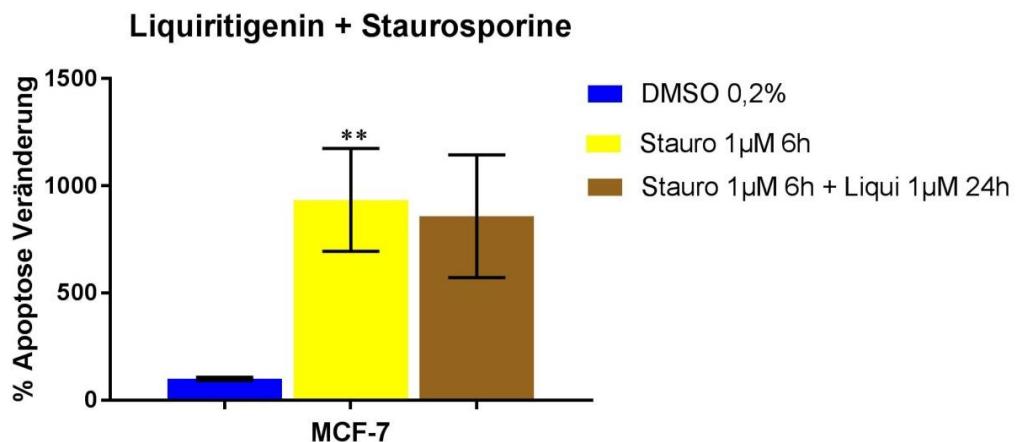


Abbildung 62: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den T47D-Zellen ergab sich ebenfalls kein signifikanter Effekt durch die Vorinkubation mit Liquiritigenin bei der Staurosporinebehandlung (Abbildung 63).

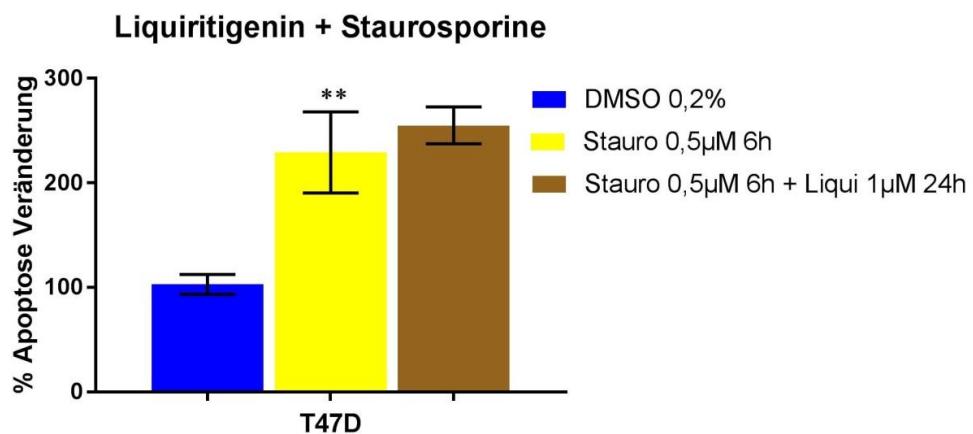


Abbildung 63: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

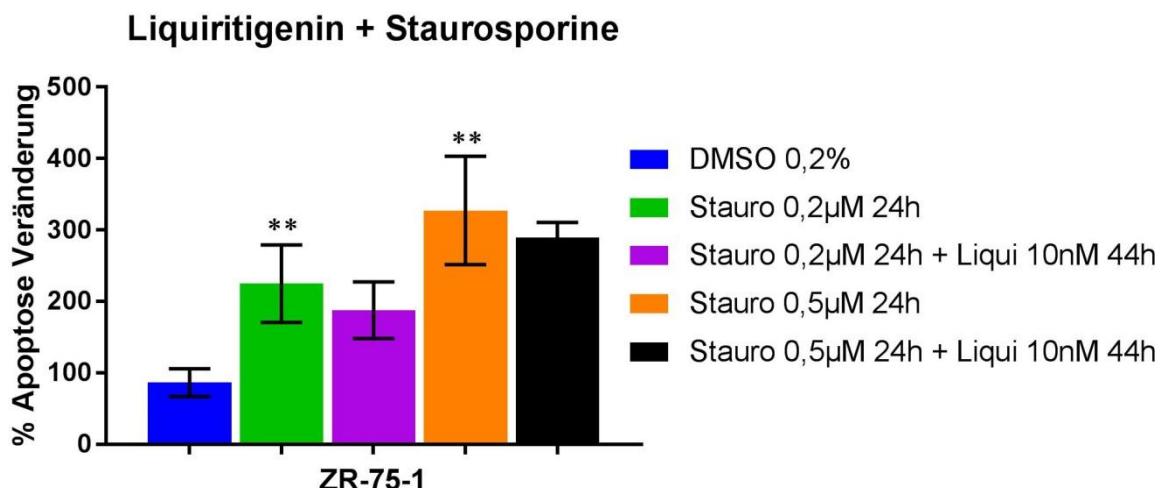


Abbildung 64: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso kam es zwar durch Staurosporine an den ZR-75-1-Zellen zu einer deutlichen Apoptose-Steigerung, verglichen mit dem Referenzmedium DMSO, die Vorinkubation mit 10 nM Liquiritigenin erbrachte jedoch keinen zusätzlichen Effekt (Abbildung 64).

Die Kombination Staurosporine mit Liquiritigenin erbrachte nur an MDA-MB-231-Zellen einen signifikanten Effekt der Apoptose-Steigerung.

4.4.3 Liquiritigenin + Etoposid

Zu allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM Liquiritigenin Etoposid in durch Vorversuche ermittelten verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie gehabt, zwei verschiedene Konzentrationen von Etoposid getestet.

Etoposid führte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. Bei der Zelllinie MCF-7 konnte in unseren Experimenten durch Etoposid allein auch in den Vorversuchen kein signifikanter Apoptose-Anstieg nachgewiesen werden. Die Kombination mit den ER β -

Agonisten erfolgte trotzdem und zwar wurde die gleiche Konzentration und Einwirkzeit für das Chemotherapeutikum verwendet wie für die T47D-Zellen.

Die Kombination von Liquiritigenin mit Etoposid konnte an den MDA-MB-231-Zellen keine signifikante Veränderung der Apoptoserate im Vergleich zur reinen Behandlung mit Etoposid hervorrufen (Abbildung 65).

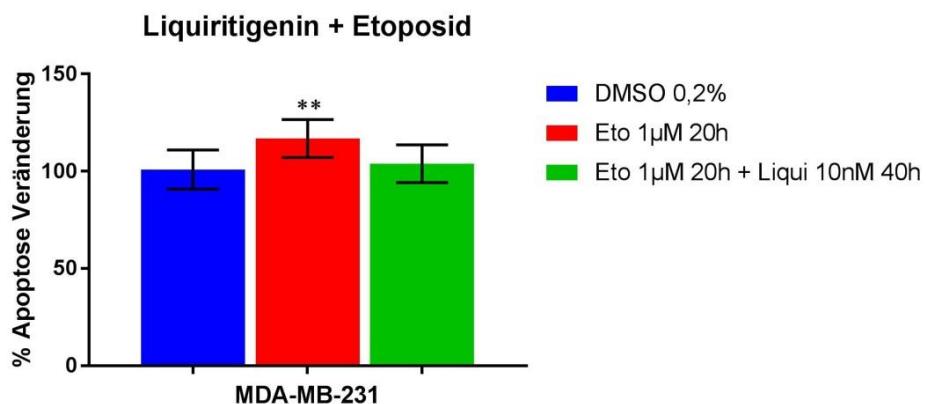


Abbildung 65: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

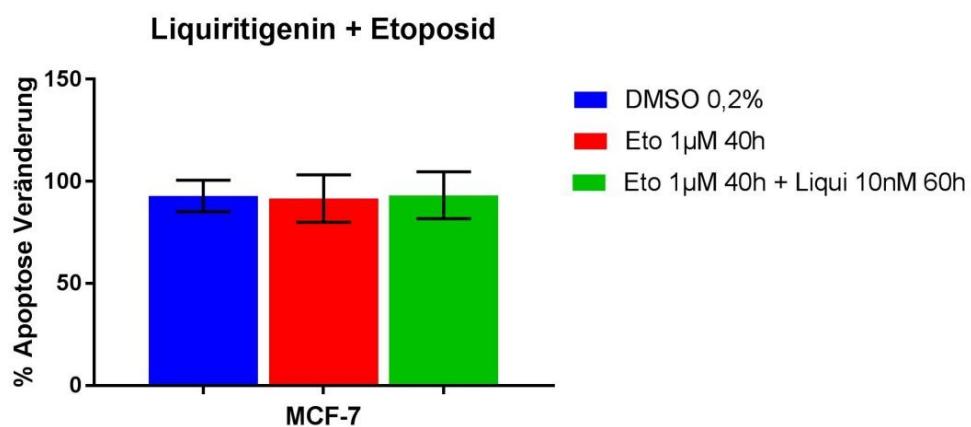


Abbildung 66: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Wie bereits erwähnt, kam es bei den MCF-7-Zellen zu keiner Veränderung der Apoptose durch Etoposid. Auch die Vorinkubation mit Liquiritigenin konnte daran nichts ändern (Abbildung 66). Die T47D-Zellen reagierten zwar auf Etoposid mit einer Apoptose-Induktion, durch die Vorinkubation mit Liquiritigenin ließ sich jedoch kein zusätzlicher Effekt erzielen (Abbildung 67).

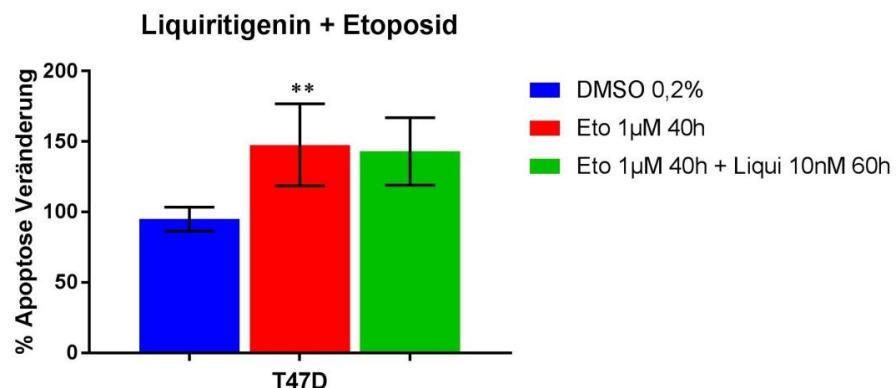


Abbildung 67: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

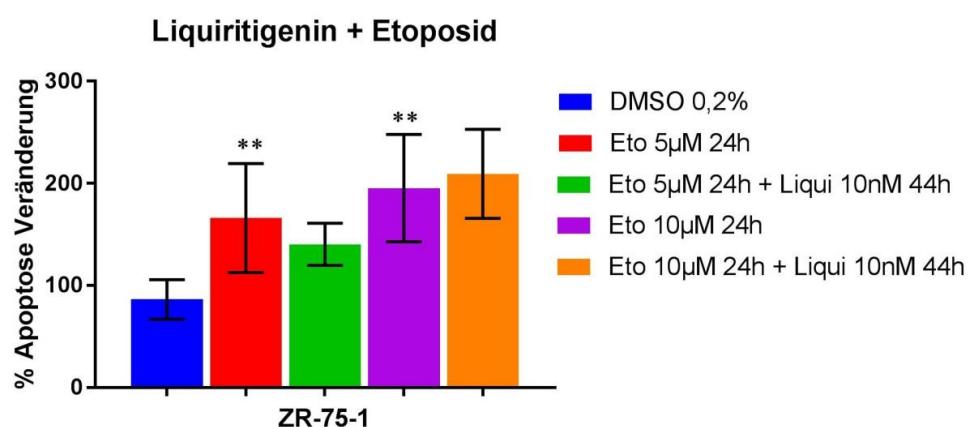


Abbildung 68: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen und Etoposid + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den ZR-75-1-Zellen konnte der durch Etoposid in beiden Konzentrationen ausgelöste Effekt der Apoptose-Steigerung durch eine Vorinkubation mit Liquiritigenin nicht beeinflusst werden (Abbildung 68).

Insgesamt kam es bei keiner Zelllinie zu einem die Apoptoserate verändernden Effekt durch die Kombination Etoposid mit Liquiritigenin, verglichen mit alleiniger Etoposid-Behandlung.

4.4.4 Liquiritigenin + Doxorubicin

Zu allen vier Zelllinien wurde nach gleichem Schema, wie bei der Kombination Liquiritigenin + Etoposid, nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM Liquiritigenin Doxorubicin in durch Vorversuche ermittelten verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängigen Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden wiederum zwei Konzentrationen von Doxorubicin getestet.

Doxorubicin führte, wie alle Chemotherapeutika, bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion gegenüber dem Lösemittel DMSO als Referenzmedium. An den MCF-7-Zellen kam es überraschenderweise sogar zu einer signifikanten Senkung der Apoptoserate durch Doxorubicin (Abbildung 70).

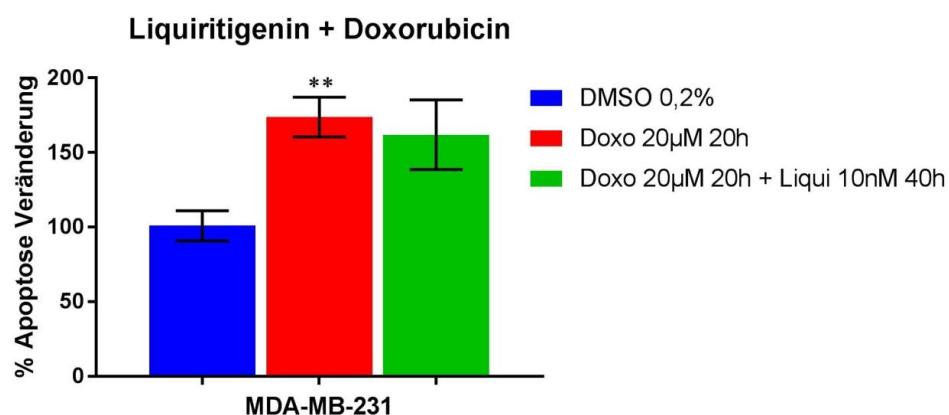


Abbildung 69: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den MDA-MB-231-Zellen ließ sich durch Vorinkubation mit Liquiritigenin keine signifikante Änderung der durch Doxorubicin ausgelösten Apoptoserate darstellen (Abbildung 69). Wie bereits oben erwähnt, führte Doxorubicin (ohne Ethanol) sogar zu einem Apoptose-senkenden Effekt an den MCF-7-Zellen; die Kombination mit Liquiritigenin veränderte diesen Effekt jedoch nicht (Abbildung 70).

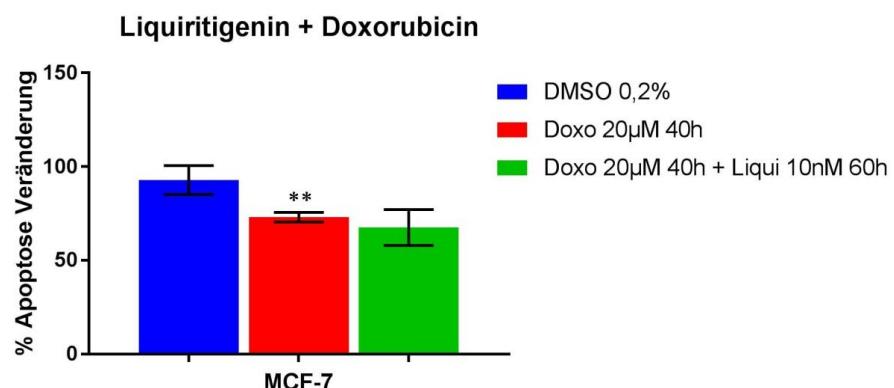


Abbildung 70: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den T47D-Zellen kam es durch Vorinkubation mit 10 nM Liquiritigenin über 20 h zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit der durch Doxorubicin alleine ausgelösten Apoptoserate (Abbildung 71).

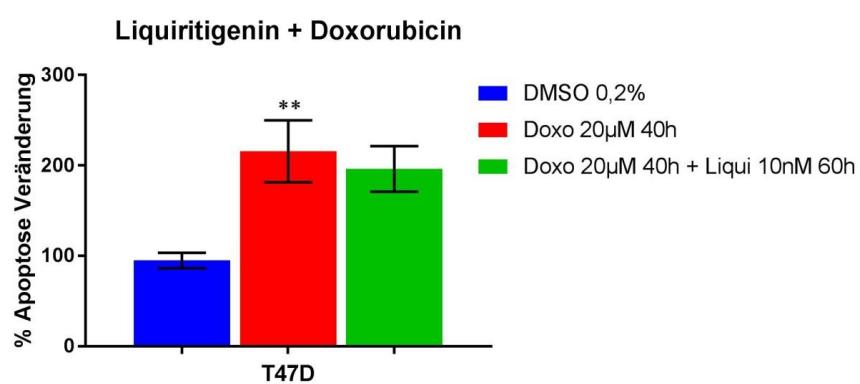


Abbildung 71: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

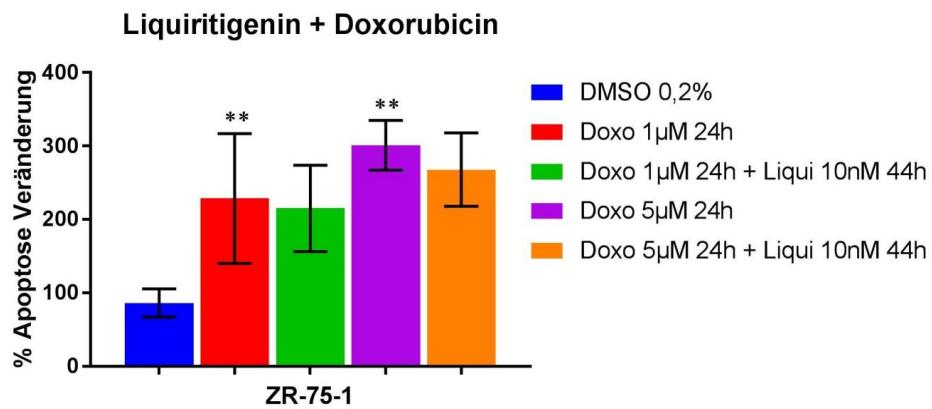


Abbildung 72: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen und Doxorubicin + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Bei den ZR-75-1-Zellen konnte die durch Doxorubicin in zwei verschiedenen Konzentrationen induzierte Apoptoserate durch Vorinkubation mit Liquiritigenin nicht signifikant beeinflusst werden (Abbildung 72).

Zusammenfassend lässt sich über die Kombination Liquiritigenin + Doxorubicin sagen, dass an allen Zelllinien die durch Doxorubicin ausgelöste Apoptoserate durch Liquiritigenin nicht beeinflusst werden konnte.

4.4.5 Liquiritigenin + Docetaxel

Zu allen vier Zelllinien wurde nach gleichem Schema, wie bei Liquiritigenin + Etoposid und Liquiritigenin + Doxorubicin, nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM Liquiritigenin Docetaxel in durch Vorversuche ermittelten Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden auch hier zwei Konzentrationen von Docetaxel getestet.

Docetaxel führte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer deutlichen Apoptose-Induktion gegenüber dem Lösemittel DMSO als Referenzmedium. Die Effekte an den ZR-75-1-Zellen für Docetaxel waren jedoch schwach und in der höheren Konzentration nicht signifikant (Abbildung 76).

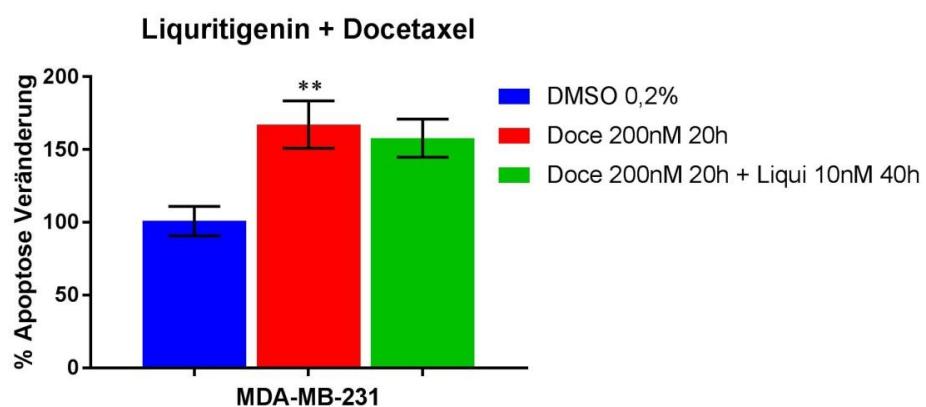


Abbildung 73: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die Vorinkubation mit 10 nM Liquiritigenin über 20 h und anschließender Behandlung mit 200 nM Docetaxel über 20 h führte bei MDA-MB-231-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Apoptoserate im Vergleich zu alleiniger Docetaxel-Behandlung (Abbildung 73).

An den MCF-7-Zellen konnte weder durch Docetaxel noch durch zusätzliche Vorinkubation mit Liquiritigenin ein Effekt erzielt werden (Abbildung 74).

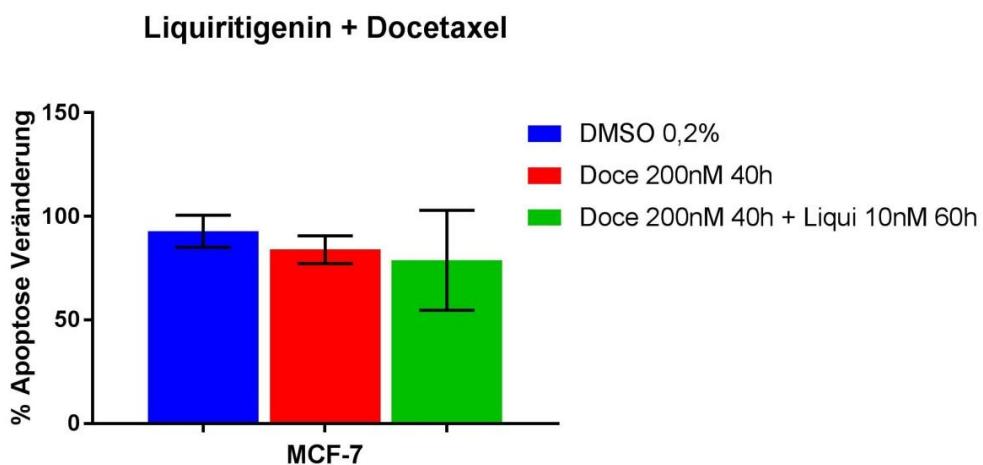


Abbildung 74: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch an den T47D-Zellen erzielte die Vorinkubation mit Liquiritigenin keinen zusätzlichen Effekt im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Docetaxel (Abbildung 75).

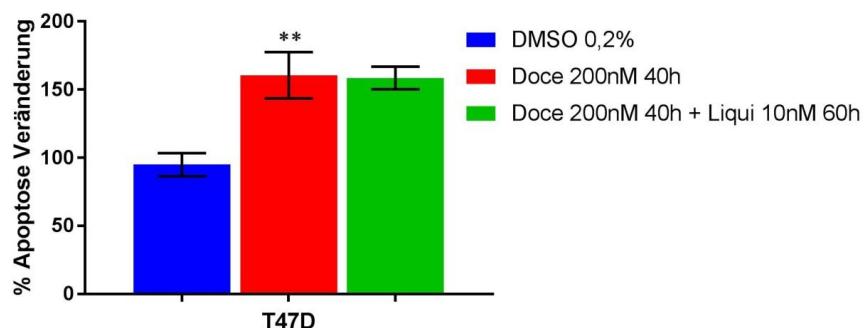


Abbildung 75: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die ZR-75-1-Zellen reagierten zwar auf Docetaxel in beiden getesteten Konzentrationen mit Apoptose, jedoch veränderte die Vorinkubation mit Liquiritigenin daran nichts (Abbildung 76).

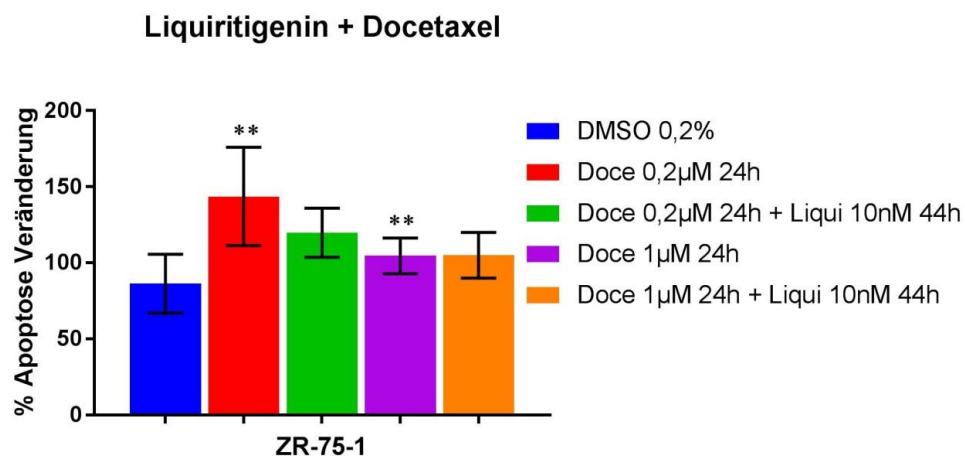


Abbildung 76: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend führte die Kombination Liquiritigenin + Docetaxel in unseren Ansätzen bei keiner Zelllinie zu einer signifikanten Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit alleiniger Docetaxel-Behandlung.

4.5 ErB-041

ErB-041 wurde in den ersten Versuchsansätzen an der Zelllinie MDA-MB-231 noch in einer Konzentration von 1 μ M verwendet. In allen späteren Versuchen wurde ebenso wie bei Liquiritigenin die verwendete Konzentration auf 10 nM reduziert. Auch hier ergeben sich aufgrund der notwendigen Einwirkzeit der Chemotherapeutika und der von Prof. Treeck empfohlenen Vorinkubation mit ER β -Modulatoren für circa 20 h Gesamteinwirkzeiten der ER β -Modulatoren von 40 - 60 h abhängig von der Zelllinie. Bei den ZR-75-1-Zellen wurde ein in DMSO gelöstes ErB-041 in 10 nM Konzentration verwendet, deshalb kam dort als Referenzmedium DMSO zum Einsatz. Bei den Versuchen an den drei anderen Zelllinien war ErB-041 jeweils in EtOH gelöst.

4.5.1 ErB-041 ohne Kombination

An den MDA-MB-231-Zellen führte die alleinige Behandlung mit ErB-041 nach 40 h zu einer signifikanten Senkung der Apoptoserate im Vergleich zum Referenzmedium Ethanol (P-Wert 0,047); nach 24 h war noch kein Effekt nachzuweisen (Abbildung 77).

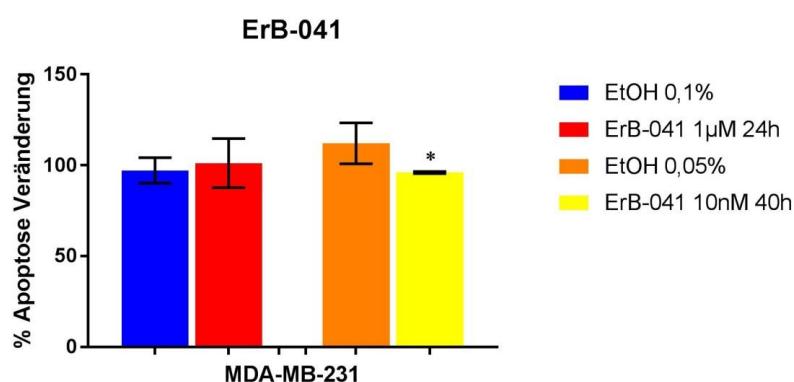


Abbildung 77: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst) mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den restlichen drei Zelllinien ergab sich durch ErB-041 kein Effekt (Abbildung 78, Abbildung 79, Abbildung 80).

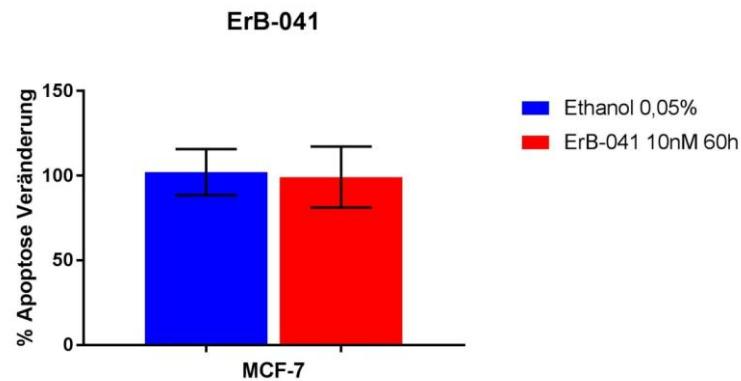


Abbildung 78: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung.
*Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

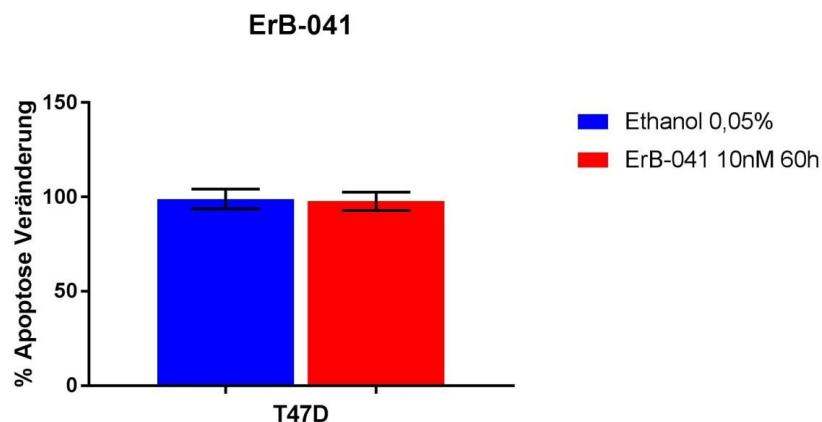


Abbildung 79: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung.
*Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

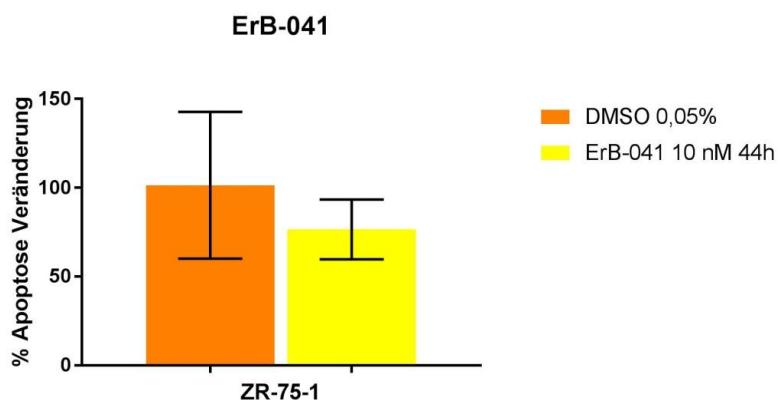


Abbildung 80: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO (Kontrolle) und ErB-041 (in DMSO gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend konnte ErB-041 nur an den MDA-MB-231-Zellen, abhängig von der Einwirkzeit, die Apoptoserate senken.

4.5.2 ErB-041 + Staurosporine

Ebenfalls in einem der ersten Versuchsansätze wurde Staurosporine in Kombination mit ErB-041 untersucht. An den MDA-MB-231-Zellen erfolgte eine Testung in drei unterschiedlichen Konzentrationen von Staurosporine bei gleichzeitiger Inkubation mit 1 μ M ErB-041 über 24 h. An den MCF-7 und T47D-Zelllinien wurde aufgrund eines Lieferengpasses von ErB-041 zum Zeitpunkt der Experimente die Kombination mit Staurosporine nicht durchgeführt. An den ZR-75-1-Zellen wurde Staurosporine in zwei unterschiedlichen Konzentrationen über eine Einwirkdauer von 24 h nach Vorinkubation mit 10 nM ErB-041 (in DMSO gelöst) über 20 h getestet.

Staurosporine erzielte bei allen vier Zelllinien in allen Konzentrationen signifikante Apoptose-Steigerungen, verglichen mit dem Lösemittel DMSO als Referenzmedium.

An den MDA-MB-231-Zellen ließ sich durch Zugabe von ErB-041 zu Staurosporine kein zusätzlicher Effekt darstellen (Abbildung 81). Jedoch muss im Nachhinein auf das Fehlen einer korrekten Vergleichsgruppe hingewiesen werden. Da Erb-041 zum Zeitpunkt dieser Experimente in EtOH gelöst war, hätte als Vergleichsgruppe jeweils Staurosporine +

EtOH gelten müssen. Dies wurde damals leider nicht durchgeführt. Deshalb sind diese Ergebnisse nicht eindeutig aussagekräftig. Da es jedoch zu keinen Signifikanzen kam, wurde auf eine Wiederholung des Versuches verzichtet.

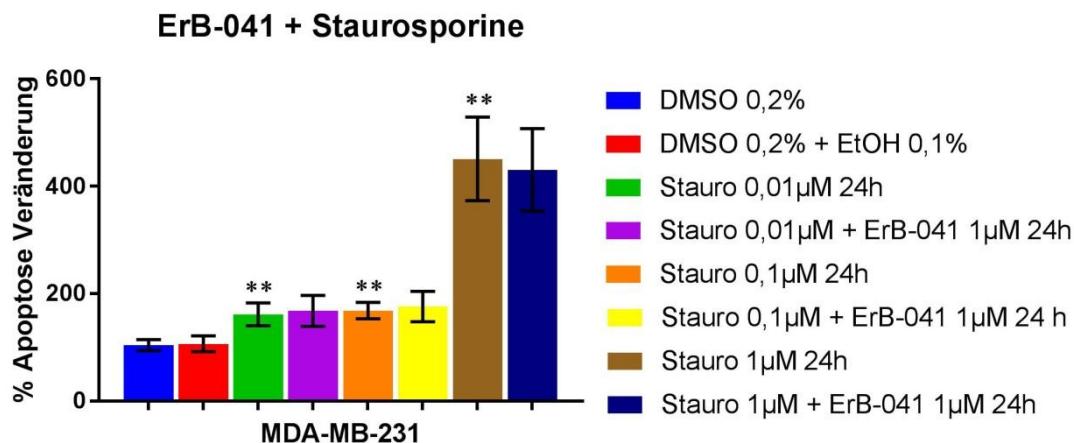


Abbildung 81: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, DMSO + EtOH, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

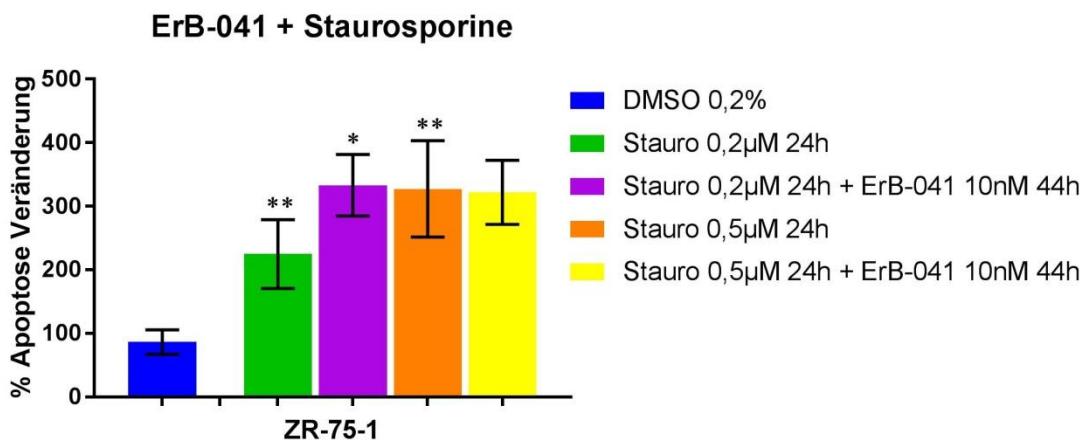


Abbildung 82: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + ErB-04. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 bzw. 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den ZR-75-1-Zellen führte die Vorinkubation mit 10 nM ErB-041 (gelöst in DMSO) über 20 h und anschließende Behandlung mit 0,2 µM Staurosporine über 24 h zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 0,2 µM Staurosporine (P-Wert 0,006). Bei der Konzentration 0,5 µM von Staurosporine ließ sich dieser Effekt jedoch nicht reproduzieren (Abbildung 82).

Zusammenfassend lässt sich über die Kombination ErB-041 + Staurosporine sagen, dass ein Apoptoserate-steigernder Effekt an den ZR-75-1-Zellen und dies auch nur bei der niedrigeren Staurosporine-Konzentration dargestellt werden konnte.

4.5.3 ErB-041 + Etoposid

Bei allen vier Zelllinien wurde nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM ErB-041 Etoposid in durch Vorversuche ermittelten, verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie immer, zwei Konzentrationen von Etoposid getestet.

Etoposid führte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. An den MCF-7-Zellen konnte bereits in den Vorversuchen durch kein einziges Chemotherapeutikum in verschiedensten Konzentrationen nach verschiedensten Einwirkzeiten Apoptose ausgelöst werden. Die Kombination mit den ERβ-Agonisten erfolgte trotzdem und zwar mit der gleichen Konzentration und Einwirkzeit des Chemotherapeutikums wie bei die T47D-Zellen.

ErB-041 war - außer bei den Versuchen mit der Zelllinie ZR-75-1 - in EtOH gelöst, so dass bei den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D als Referenzmedium DMSO + EtOH bzw. Etoposid + EtOH diente.

Bei keiner Zelllinie konnte durch die Vorinkubation mit ErB-041 ein zusätzlicher Effekt zur Apoptose-auslösenden Wirkung des Etoposids erzielt werden (Abbildung 83, Abbildung 84, Abbildung 85, Abbildung 86).

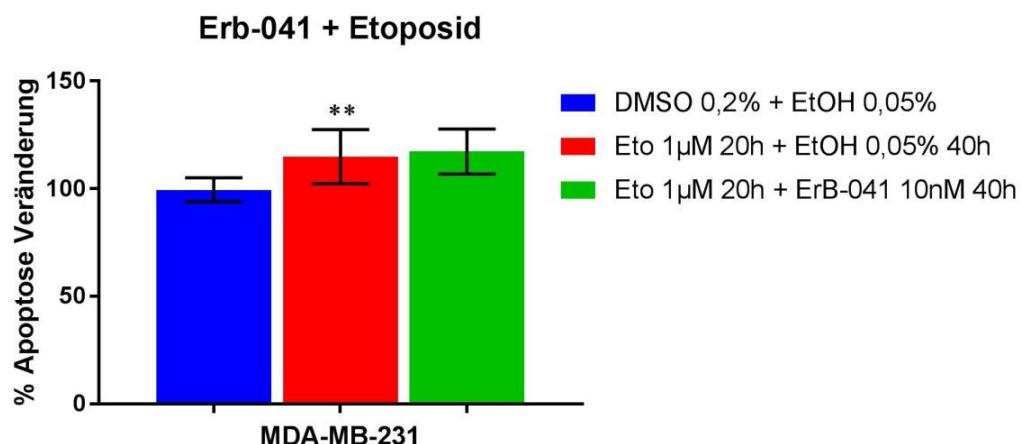


Abbildung 83: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

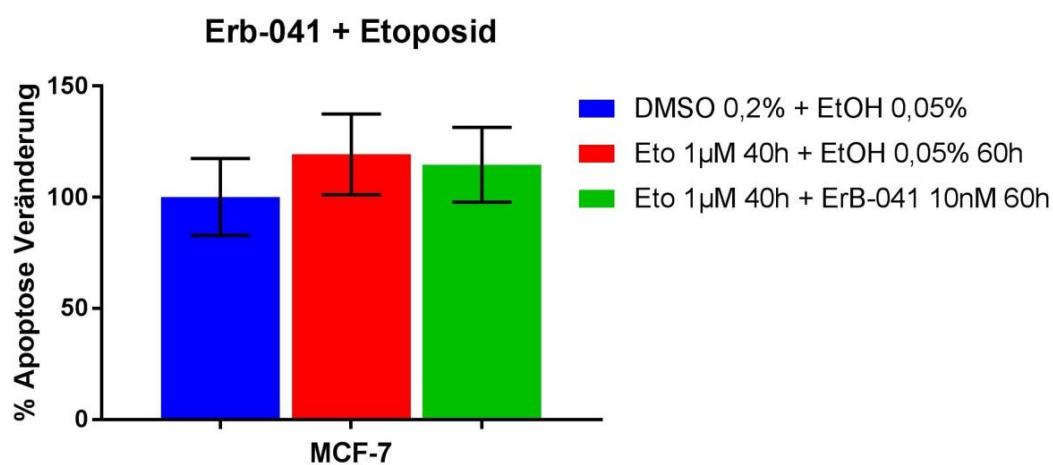


Abbildung 84: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

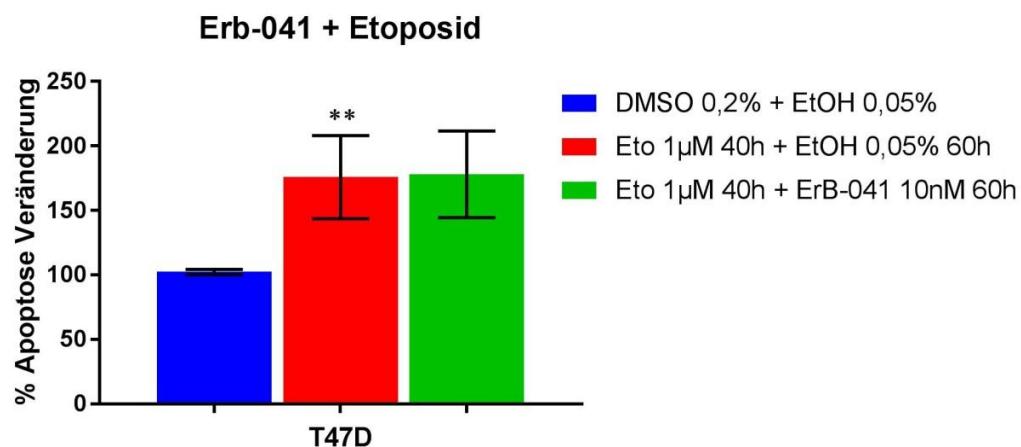


Abbildung 85: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

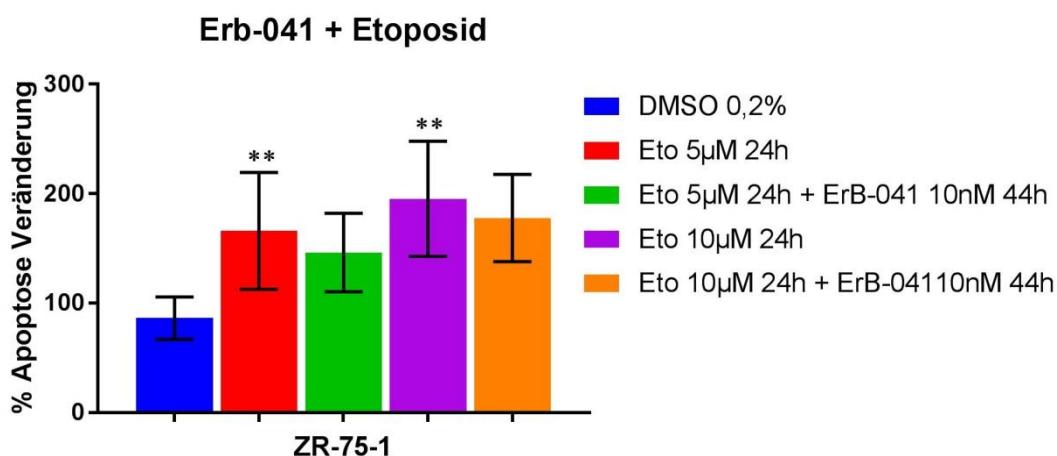


Abbildung 86: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen und Etoposid + ErB-041 (in DMSO gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.5.4 ErB-041 + Doxorubicin

Zu allen vier Zelllinien wurde nach gleichem Schema, wie bei ErB-041 + Etoposid, nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM ErB-041 Doxorubicin in durch Vorversuche ermittelten, verschiedenen Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie bereits dargelegt, zwei Konzentrationen von Doxorubicin getestet.

Doxorubicin führte auch hier bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer signifikanten Apoptose-Induktion gegenüber dem Referenzmedium DMSO. Da das verwendete ErB-041 in EtOH gelöst war, wurde als Referenzmedium DMSO + EtOH bzw. Doxorubicin + EtOH genommen. An den MCF-7-Zellen kam es bei der Behandlung mit Doxorubicin + EtOH im Gegensatz zu reinem Doxorubicin in DMSO zwar erneut eher zu einer Apoptose-Senkung. In der Kombination mit EtOH wurde jedoch keine Signifikanz erreicht (P-Wert 0,059; Abbildung 88).

Bei den MDA-MB-231-Zellen löste die Vorinkubation mit 10 nM ErB041 und anschließende Behandlung mit 20 µM Doxorubicin keine signifikante Veränderung der Apoptose im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Doxorubicin + EtOH aus (Abbildung 87).

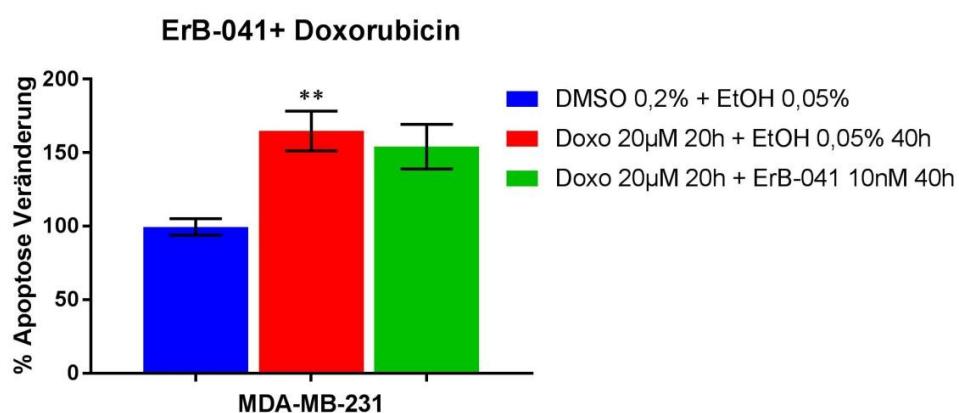


Abbildung 87: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den MCF-7-Zellen ließ sich durch die Kombination ErB-041 + Doxorubicin kein Effekt im Vergleich zu Doxorubicin + EtOH erzielen (Abbildung 88).

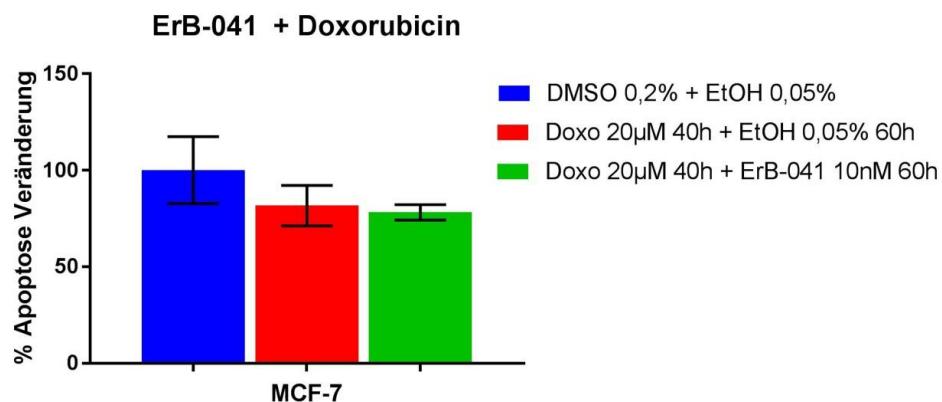


Abbildung 88: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso reagierten die T47D-Zellen nicht mit einer veränderten Apoptoserate auf die Vorinkubation mit ErB-041 im Vergleich zur Referenz Doxorubicin + EtOH (Abbildung 89).

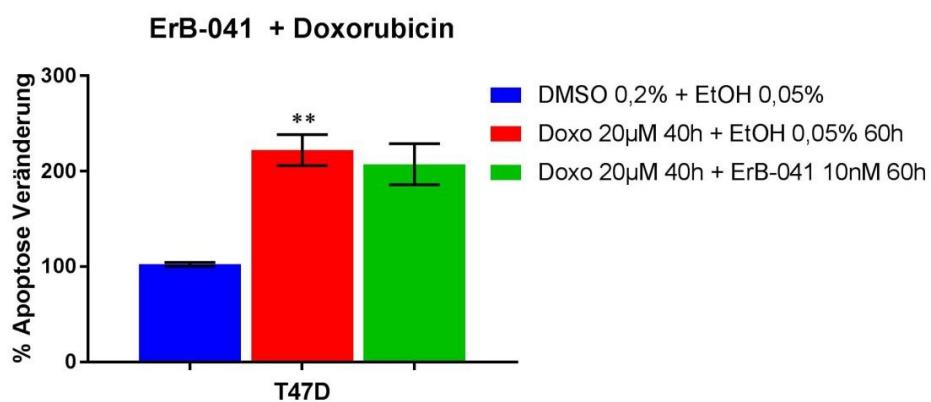


Abbildung 89: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die ZR-75-1-Zellen reagierten außer auf Doxorubicin ebenfalls nicht mit einer veränderten Apoptoserate auf die Vorinkubation mit ErB-041 (Abbildung 90).

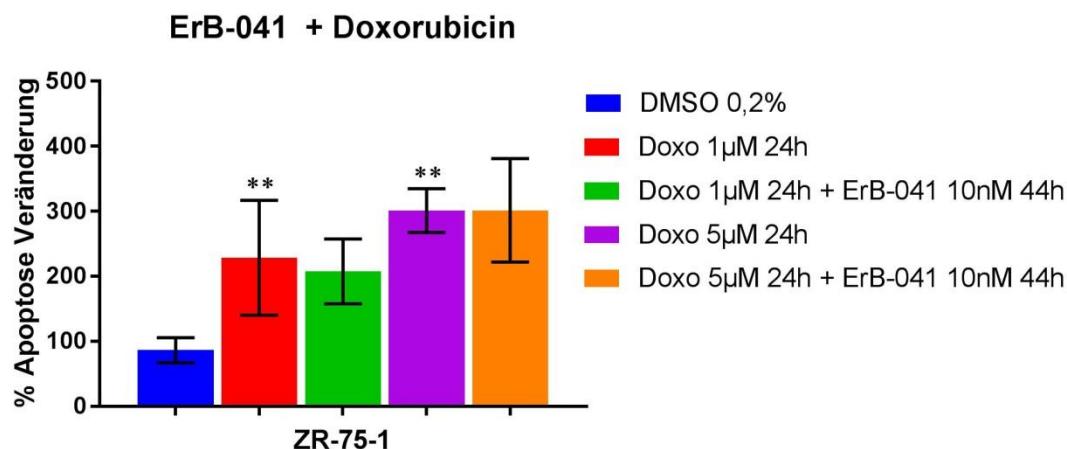


Abbildung 90: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen und Doxorubicin + ErB-041 (in DMSO gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Doxorubicin, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend reagierte auf die Vorinkubation mit ErB-041 und anschließender Behandlung mit Doxorubicin keine der Zelllinien mit einer Veränderung der durch Doxorubicin ausgelösten Apoptoserate.

4.5.5 ErB-041 + Docetaxel

Bei allen vier Zelllinien wurde nach gleichem Schema, wie bei ErB-041 + Etoposid und ErB-041 + Doxorubicin, nach Vorinkubation über 20 h mit 10 nM ErB-041 Docetaxel in durch Vorversuche ermittelten Konzentrationen über eine von der Zelllinie abhängige Einwirkzeit hinzugefügt. An den ZR-75-1-Zellen wurden, wie bereits erwähnt, zwei Konzentrationen von Docetaxel getestet.

Auch Docetaxel führte bei allen Zelllinien außer den MCF-7-Zellen zu einer Apoptose-Induktion gegenüber den Lösemitteln DMSO bzw. DMSO + EtOH als Referenzmedium. Die Effekte an ZR-75-1-Zellen für Docetaxel waren jedoch schwach und in der höheren Konzentration nicht signifikant (Abbildung 94).

Bei den MDA-MB-231-Zellen löste die Vorinkubation mit 10 nM ErB-041 und anschließende Behandlung mit 200nM Docetaxel keine signifikante Veränderung der Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Docetaxel + EtOH aus (Abbildung 91).

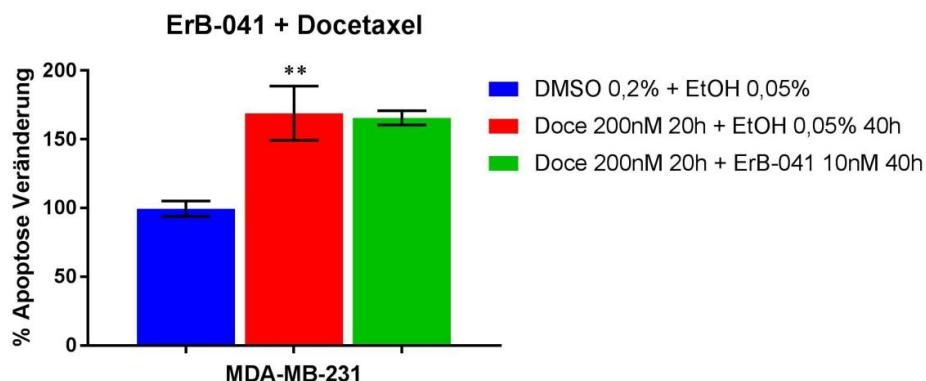


Abbildung 91: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den MCF-Zellen ließ sich durch diese Kombination ebenfalls kein Effekt nachweisen und auch Docetaxel bewirkte - wie bereits erwähnt - keine Apoptose-Induktion (Abbildung 92).

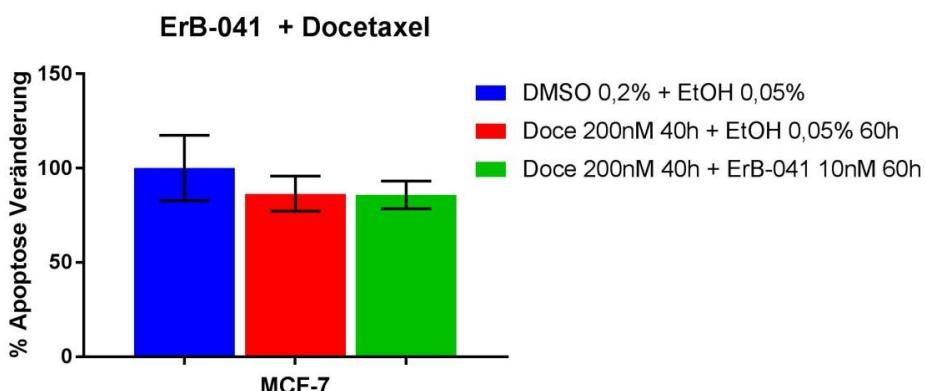


Abbildung 92: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch die T47D-Zellen reagierten auf die Vorinkubation mit 10 nM ErB-041 über 20 h und anschließende Behandlung mit 200 nM Docetaxel mit einer gesteigerten Apoptoserate gegenüber der Apoptoserate nach Behandlung mit Docetaxel + EtOH (P-Wert 0,003; Abbildung 93).

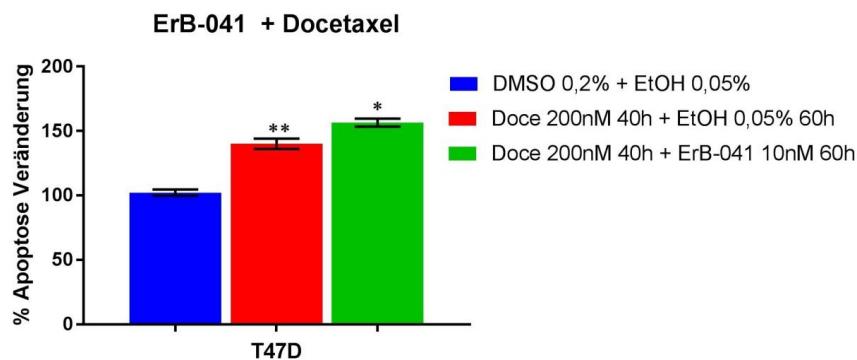


Abbildung 93: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

An den ZR-75-1-Zellen konnte trotz zweier verschiedener Docetaxel-Konzentrationen kein zusätzlicher Effekt durch die Vorinkubation mit Erb-041 nachgewiesen werden (Abbildung 94).

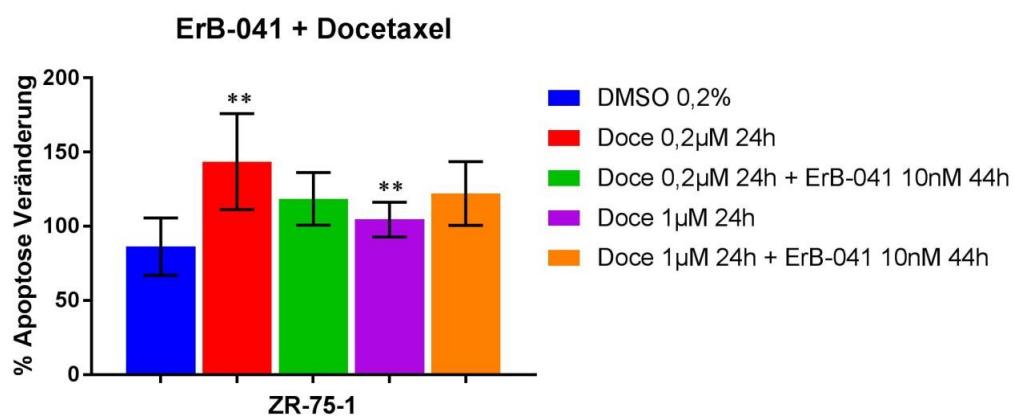


Abbildung 94: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen und Docetaxel + ErB-041 (in DMSO gelöst). Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Docetaxel, **Signifikanz gegenüber dem Lösemittel DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ErB-041 in Kombination mit Docetaxel bei keiner Zelllinie eine veränderte Apoptoserate, verglichen mit Docetaxel und Vorinkubation mit EtOH, dem Lösemittel von ErB-041, auslösen konnte.

4.6 PHTPP

PHTPP (in EtOH gelöst) wurde als ER β -Antagonist an den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D alleine und in Kombination mit Staurosporine getestet. Nach Vorinkubation mit 10 nM PHTPP über 18 h wurde Staurosporine je nach Zelllinie für 3 (MDA-MB-231) bzw. 6 (MCF-7, T47D) Stunden in von der Zelllinie abhängiger Konzentration hinzugefügt. Die Gesamteinwirkzeiten von PHTPP sind somit 21 bzw. 24 Stunden. Auf eine Kombination mit Chemotherapeutika wurde im Verlauf verzichtet, da der Schwerpunkt der Arbeit auf die ER β -Agonisten gelegt wurde. Bei dem Versuchsansatz mit ZR-75-1-Zellen wurde aufgrund des Arbeitsumfangs und der an den anderen Zelllinien wenig versprechenden Ergebnisse auf PHTPP und (R,R)-THC verzichtet.

4.6.1 PHTPP ohne Kombination

Die Behandlung mit 10 nM PHTPP von MDA-MB-231-Zellen über 21 h führte im Vergleich zur Behandlung mit dem Lösemittel EtOH zu keinem Effekt (Abbildung 95).

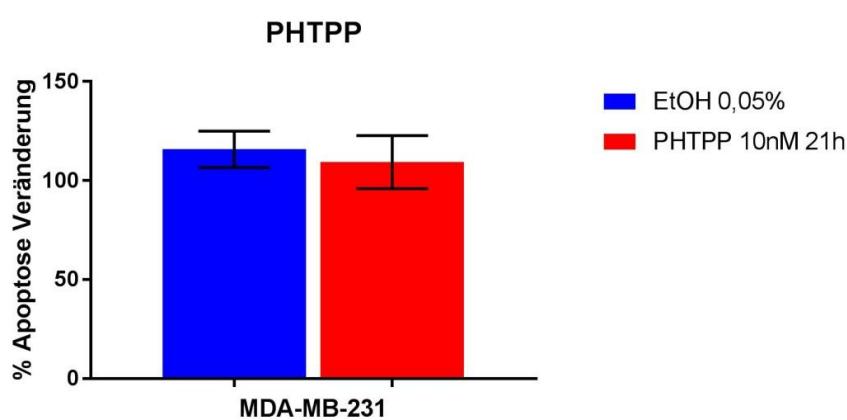


Abbildung 95: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso kam es zu keinem signifikanten Effekt bei den MCF-7-Zellen nach einer Behandlung mit 10 nM PHTPP über 24 h (Abbildung 96).

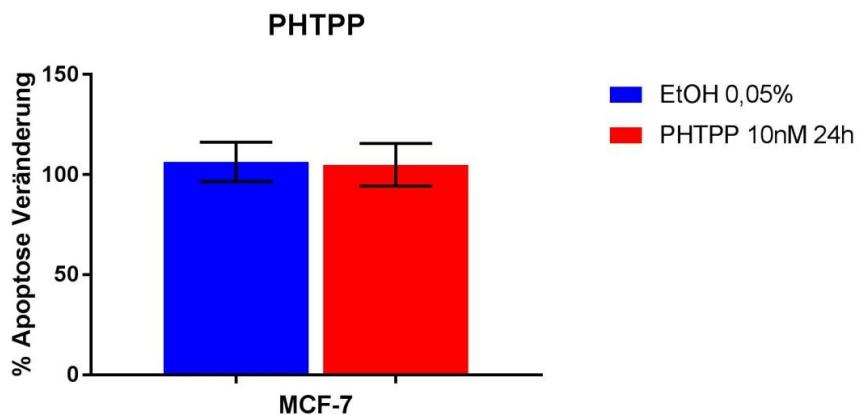


Abbildung 96: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die T47D-Zellen reagierten hingegen auf eine Behandlung mit 10 nM PHTPP über 24 h mit einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate gegenüber dem Lösemittel EtOH als Kontrolle (P-Wert 0,045; Abbildung 97).

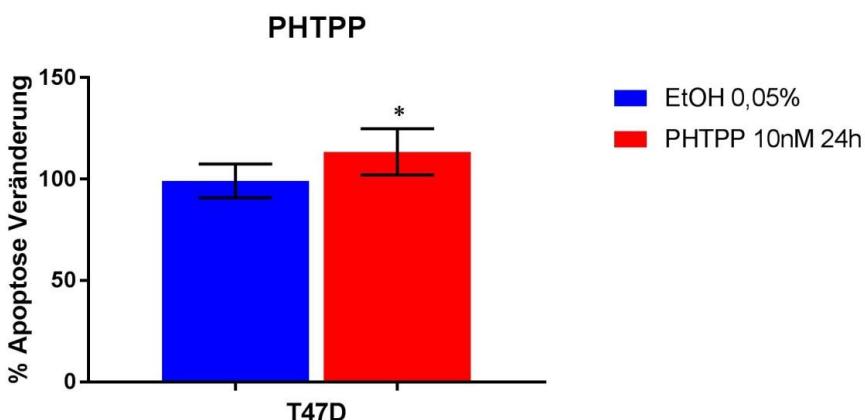


Abbildung 97: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend reagierten lediglich die T47D-Zellen mit einer Veränderung der Apoptoserate im Sinne einer Steigerung auf PHTPP.

4.6.2 PHTPP mit Staurosporine

Wie bereits beschrieben, reagierten alle getesteten Zelllinien auf eine Behandlung mit Staurosporine (+ EtOH) mit einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel DMSO (+ EtOH).

Die Kombination von PHTPP und mit Staurosporine führte bei den MDA-MB-231-Zellen zu keinem signifikanten Effekt (Abbildung 98).

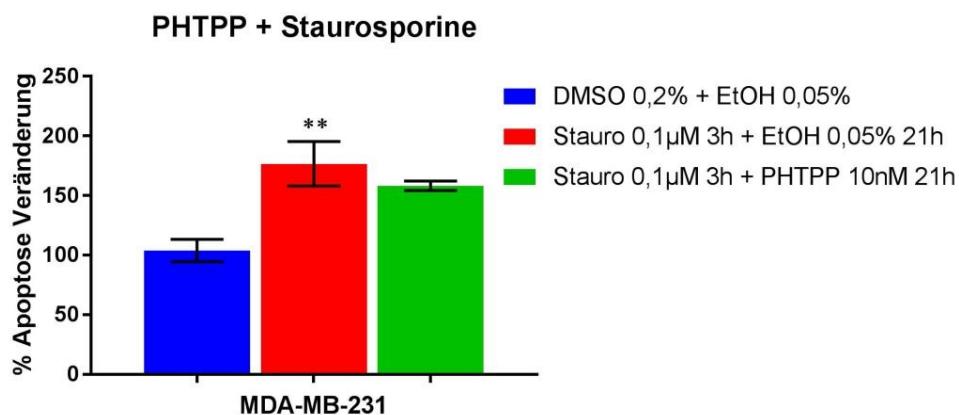


Abbildung 98: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Ebenso zeigten die MCF-7-Zellen und T47D-Zellen keine veränderte Apoptoserate nach Vorinkubation über 18 h mit 10 nM PHTPP und anschließender Staurosporine-Behandlung, verglichen mit der Apoptoserate durch Staurosporine + EtOH (Abbildung 99 und Abbildung 100).

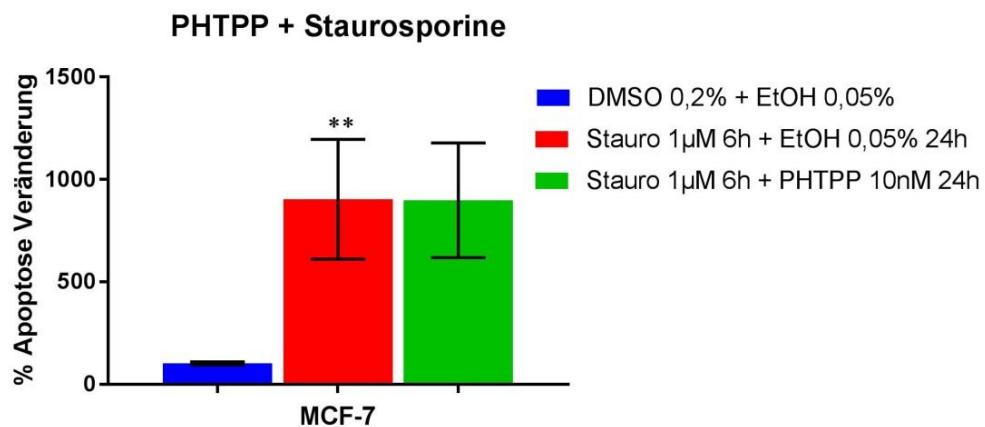


Abbildung 99: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

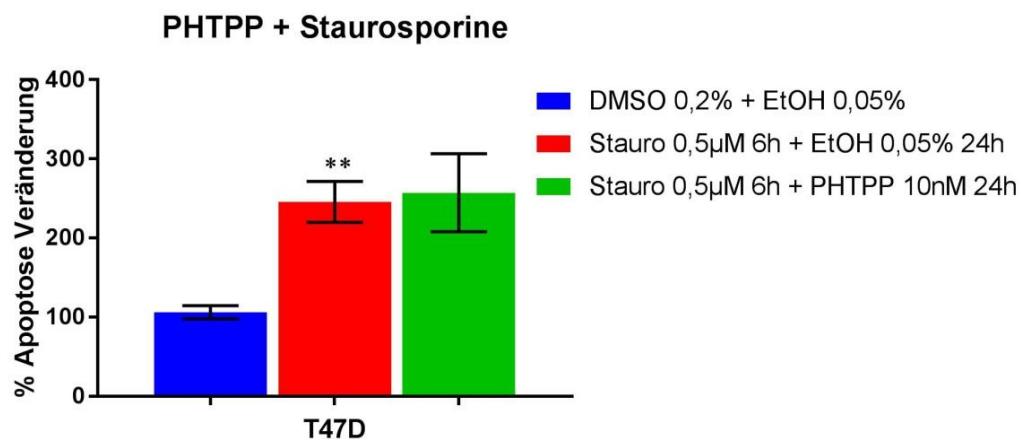


Abbildung 100: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend ergab die Vorbehandlung mit PHTPP und anschließende Behandlung mit Staurosporine an allen drei getesteten Zelllinien keine signifikanten Effekte.

4.7 (R,R)-THC

(R,R)-THC (in EtOH gelöst) wurde als ER β -Antagonist genauso wie PHTPP an den Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T47D alleine und in Kombination mit Staurosporine getestet. Nach Vorinkubation mit 10 nM THC über 18 h wurde Staurosporine je nach Zelllinie für 3 (MDA-MB-231) bzw. 6 (MCF-7, T47D) Stunden in von der Zelllinie abhängiger Konzentration hinzugefügt. Die Gesamteinwirkzeiten von THC betragen somit auch 21 bzw. 24 Stunden. Auch bei THC wurde auf eine Kombination mit Chemotherapeutika im Verlauf verzichtet, da der Schwerpunkt der Arbeit auf die ER β -Agonisten gelegt werden sollte. Die ZR-75-1-Zellen wurden ebenfalls nicht getestet.

4.7.1 (R,R)-THC ohne Kombination

Die MDA-MB-231-Zellen reagierten auf eine Behandlung mit 10 nM THC über 21 h ohne signifikante Änderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel EtOH als Referenzmedium (Abbildung 101).

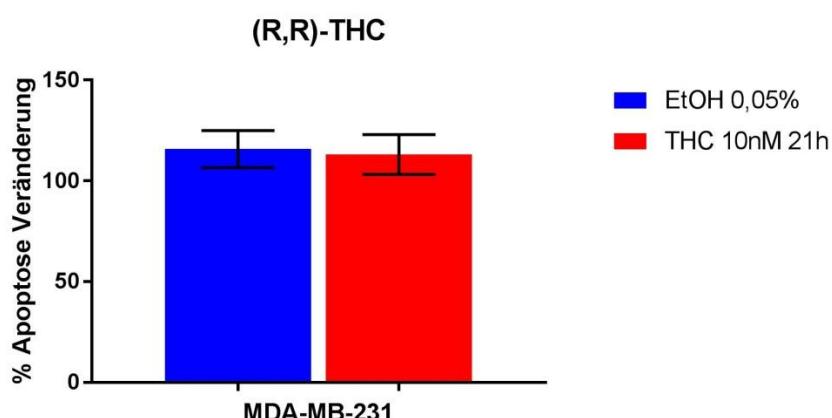


Abbildung 101: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch die MCF-7-Zellen zeigten keine Veränderung der Apoptoserate nach Behandlung mit 10 nM THC über 24 h, verglichen mit dem Lösemittel als Referenzmedium (Abbildung 102).

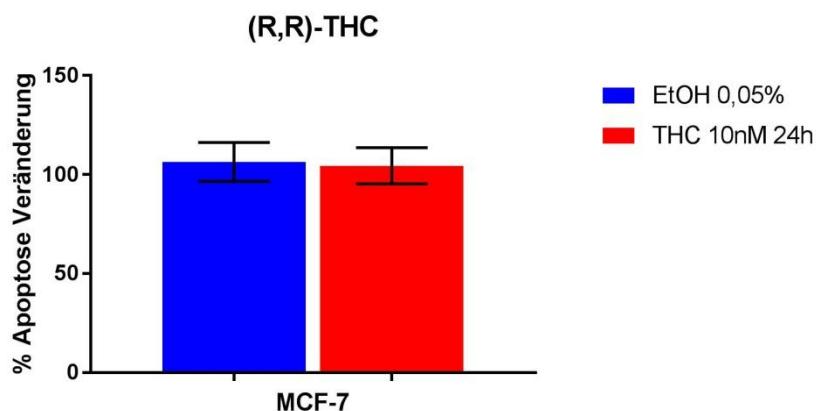


Abbildung 102: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Die T47D-Zellen reagierten auf THC ebenfalls nicht mit einer Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Referenzmedium EtOH (Abbildung 103).

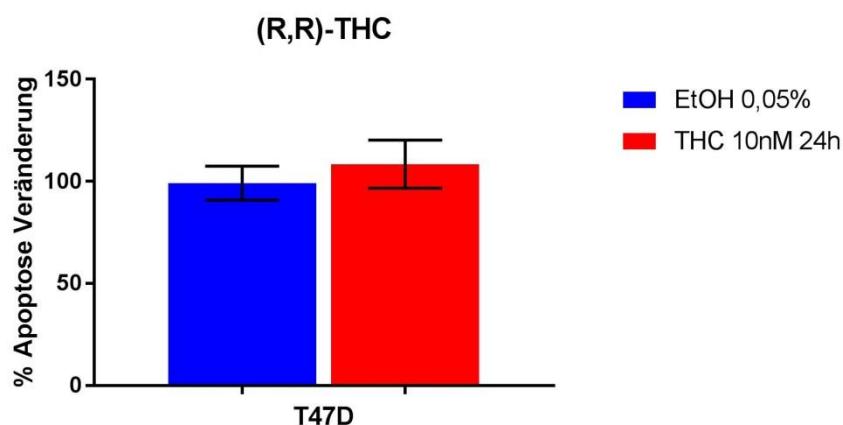


Abbildung 103: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend reagierte keine der Zelllinien auf (R,R)-THC mit einer Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit dem Lösemittel Ethanol.

4.7.2 (R,R)-THC + Staurosporine

Nach Vorinkubation mit 10 nM THC über 18 h und anschließender Behandlung mit 0,1 μ M Staurosporine über 3 h zeigten die MDA-MB-231-Zellen keine signifikante Veränderung der Apoptoserate gegenüber dem Vergleichsmedium Staurosporine mit EtOH (Abbildung 104).

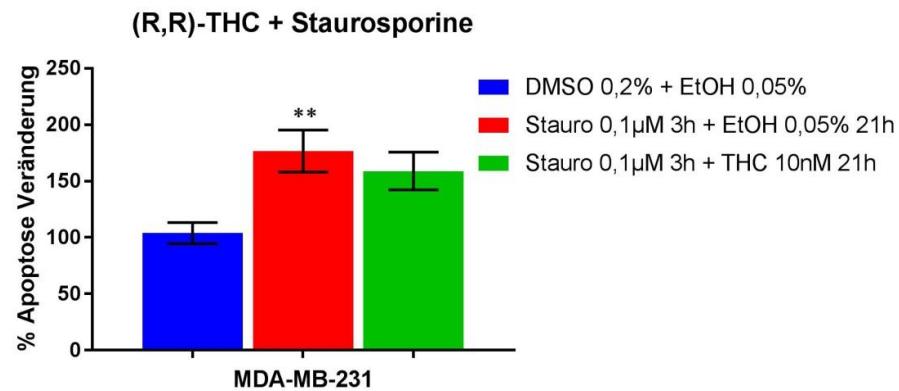


Abbildung 104: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

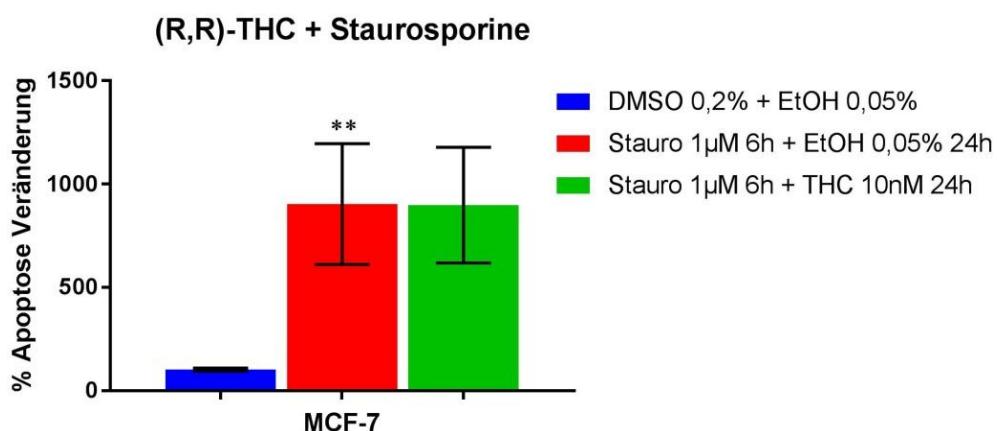


Abbildung 105: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Auch bei den MCF-7-Zellen zeigte sich nach Vorinkubation mit 10 nM THC und anschließender Behandlung mit 1 µM Staurosporine über 6 h kein Effekt, verglichen mit Staurosporine + Ethanol (Abbildung 105). Die T47D-Zellen hingegen reagierten auf diese Behandlung mit einer deutlichen Apoptosesenkung, verglichen mit einer Behandlung mit Staurosporine und dem Lösemittel Ethanol (P -Wert 0,038; Abbildung 106).

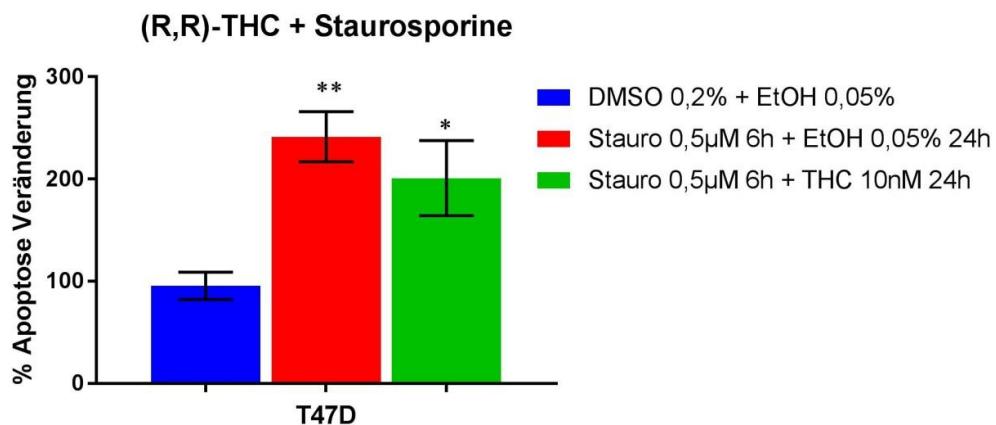


Abbildung 106: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

Zusammenfassend konnte lediglich an den T47D-Zellen eine Senkung der Apoptoserate durch die Kombination THC und Staurosporine im Vergleich zu Staurosporine alleine ausgelöst werden.

Im Anschluss folgt die Darstellung der oben aufgeführten Ergebnisse in Übersichten nach Zelllinien zusammengefasst, um gegebenenfalls ähnliche Effekte der unterschiedlichen ER β -Modulatoren auf die jeweilige Zelllinie herauszuarbeiten.

4.8 MDA-MB-231-Zellen

ER- β -Agonisten bei alleiniger Anwendung

An den MDA-MB-231-Zellen führte Liquiritigenin in der 1 μM Konzentration zu einer Steigerung der Apoptoserate. ErB-041 führte in der niedrigeren Konzentration eine Senkung der Apoptoserate aus. Alle anderen Testungen blieben ohne signifikanten Effekt. (Abbildung 107)

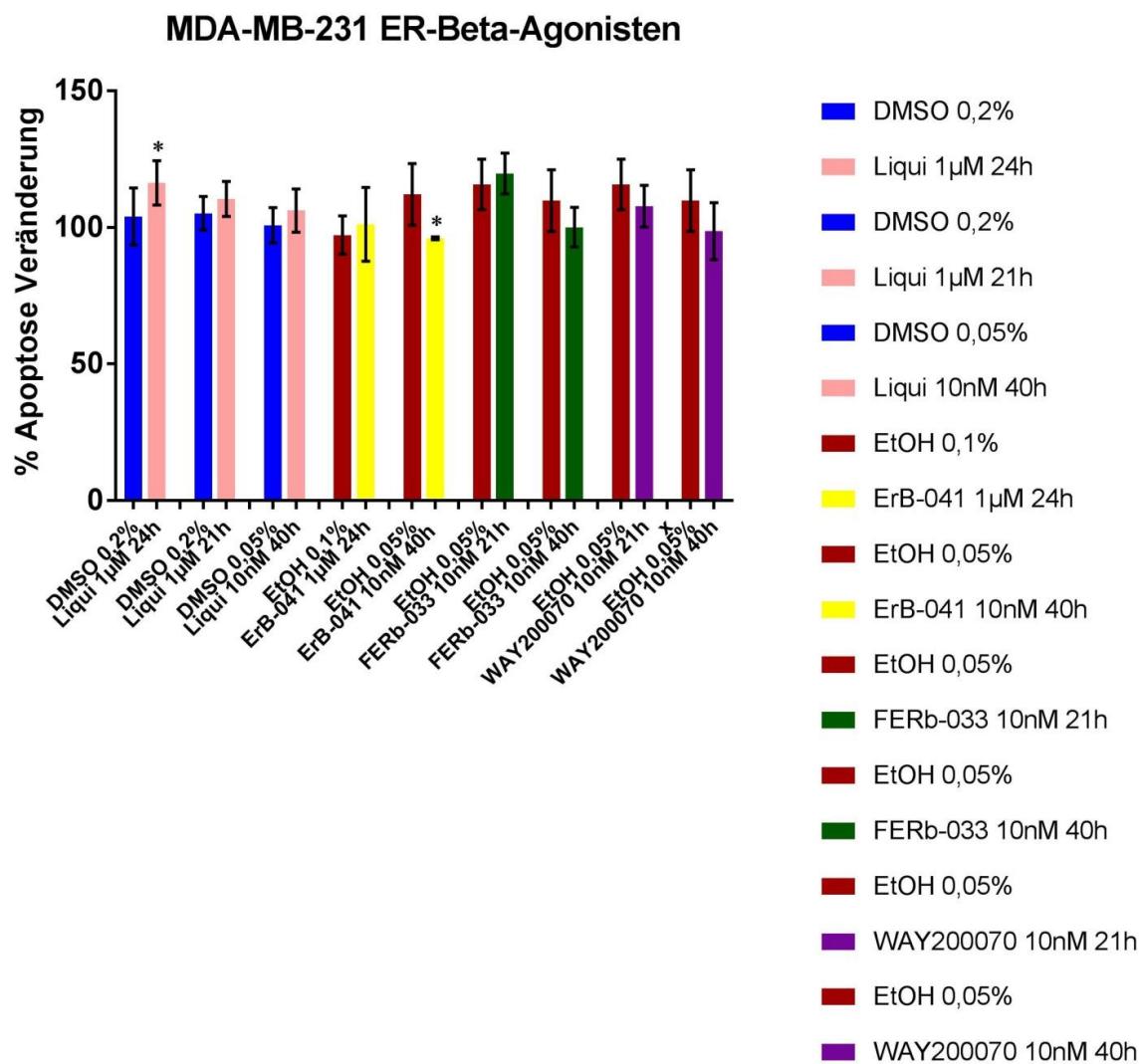


Abbildung 107: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten bei alleiniger Anwendung

Die ER β -Antagonisten PHTPP und (R,R)-THC zeigten keinen Effekt an den MDA-MB-231-Zellen (Abbildung 108).

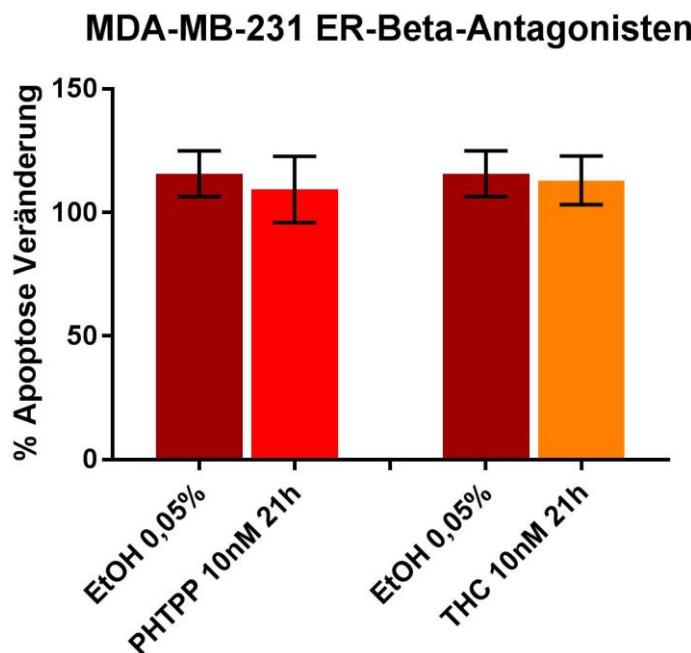


Abbildung 108: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Agonisten in Kombination mit Chemotherapeutika und Staurosporine

An den MDA-MB-231-Zellen führte FERb-033 in Kombination mit 200 nM Docetaxel zur Senkung der Apoptoserate. Die Kombination von Staurosporine in 0,1 μ M Konzentration mit 1 μ M Liquiritigenin und gleichzeitiger Behandlung zeigte nach 24 h einen Apoptose-steigernden Effekt. Alle anderen Kombinationen blieben ohne signifikanten Effekt. (Abbildung 109)

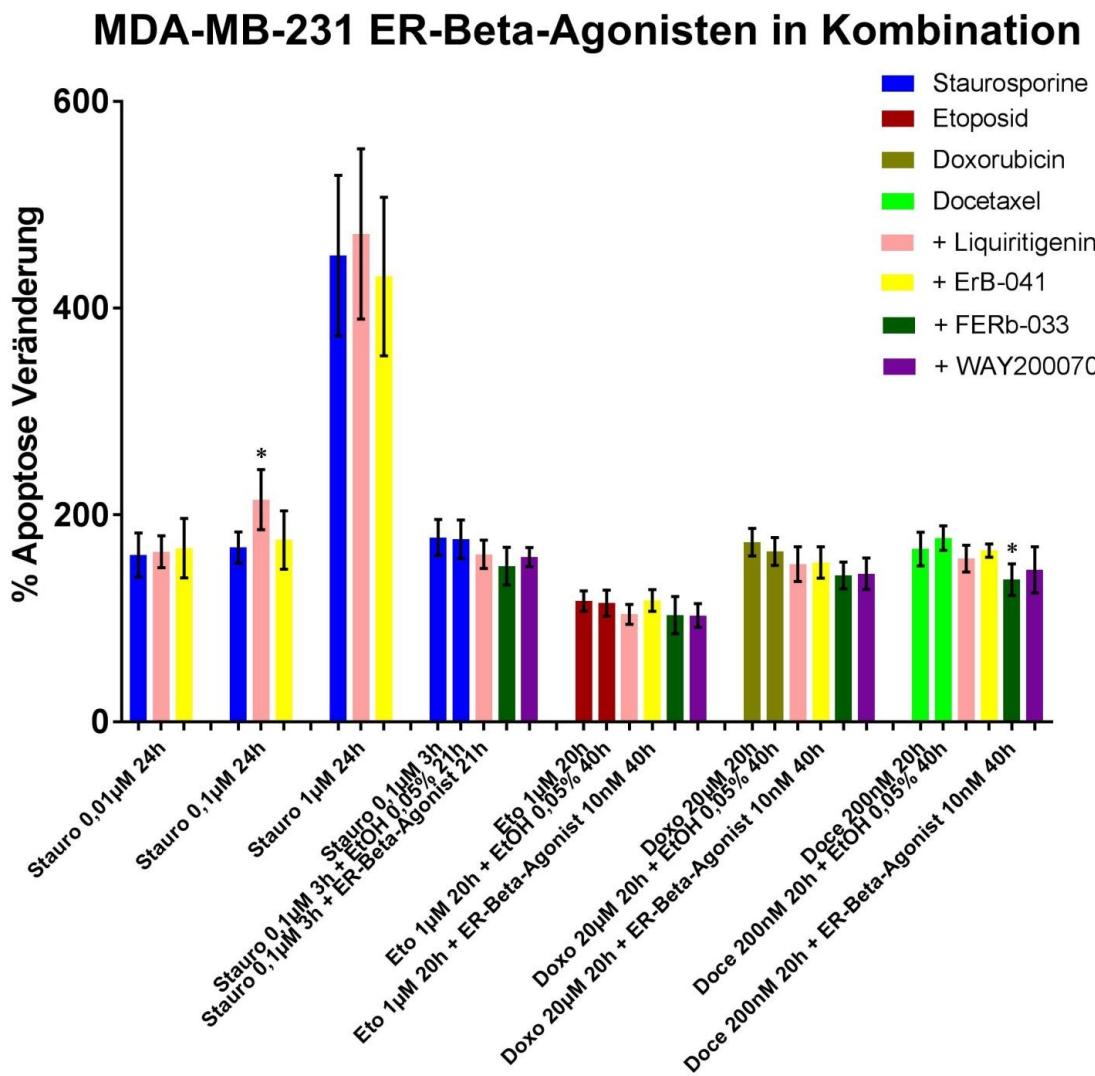


Abbildung 109: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine

Bei der Kombination von ER β -Antagonisten mit Staurosporine reagierten die MDA-MB-231-Zellen in beiden Fällen nicht mit einer Veränderung der Apoptoserate (Abbildung 110).

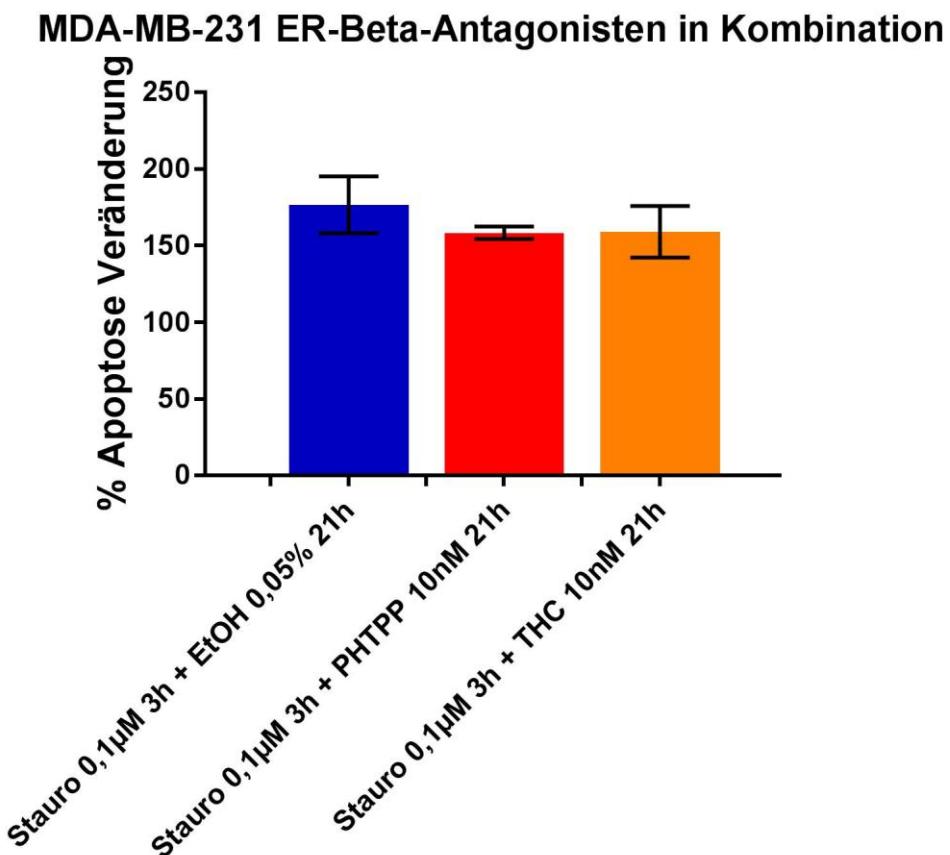


Abbildung 110: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.9 MCF-7-Zellen

ER- β -Agonisten bei alleiniger Anwendung

Die MCF-7-Zellen reagierten auf FERb-033 in 10 nM Konzentration nach einer Behandlung über 24 h mit einer Steigerung der Apoptoserate, wobei eine Behandlung über 60 h keinen Effekt zeigte. Die übrigen ER β -Agonisten blieben ohne signifikanten Effekt. (Abbildung 111)

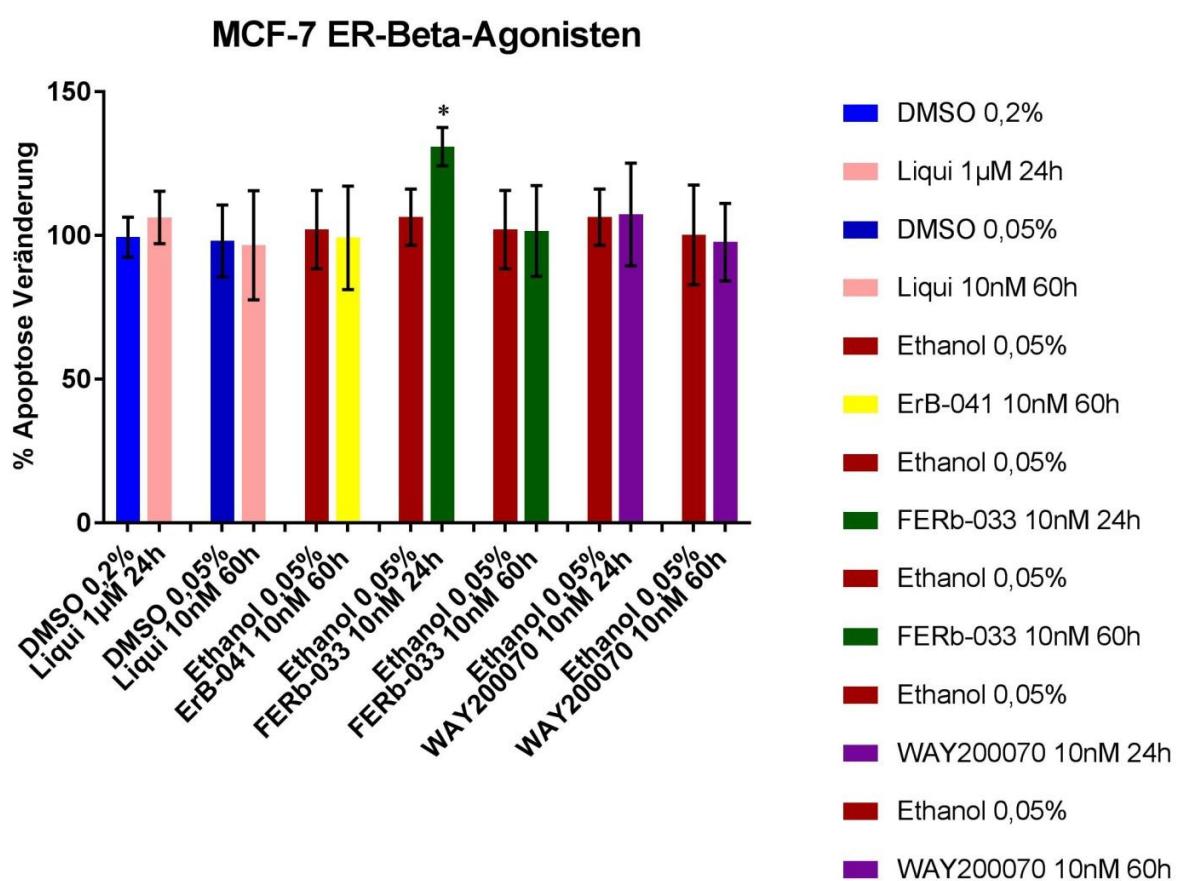


Abbildung 111: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten bei alleiniger Anwendung

Die ER β -Antagonisten PHTPP und THC führten bei den MCF-7-Zellen nicht zu signifikanten Veränderungen der Apoptoserate (Abbildung 112).

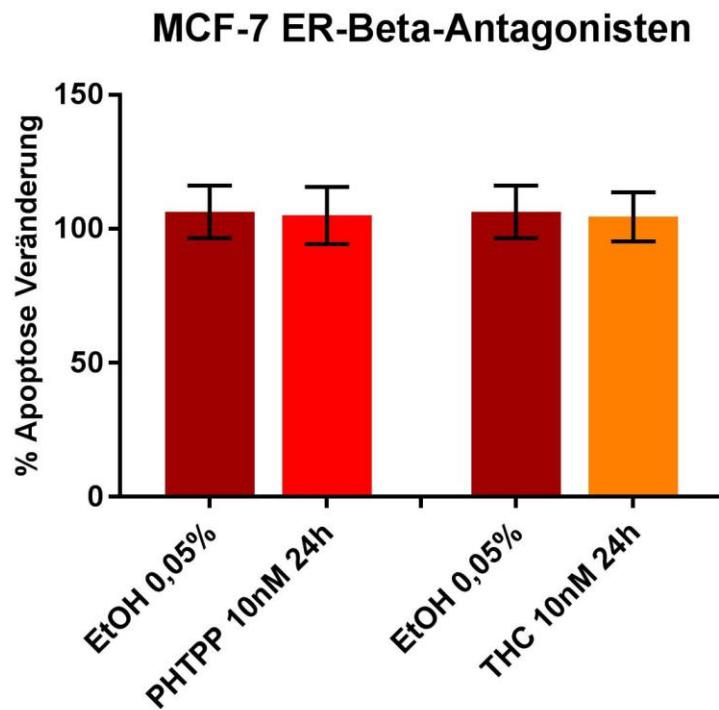


Abbildung 112: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER-β-Agonisten in Kombination mit Chemotherapeutika und Staurosporine

Auch an den MCF-7-Zellen kam es durch die ER β -Agonisten lediglich zu Senkungen der Apoptoserate, verglichen mit dem jeweiligen Referenzmedium. So senkten FERb-033 in den Kombinationen mit Etoposid und Doxorubicin und WAY200070 mit Etoposid die Apoptoserate. Alle anderen Kombinationen blieben ohne Effekt. (Abbildung 113)

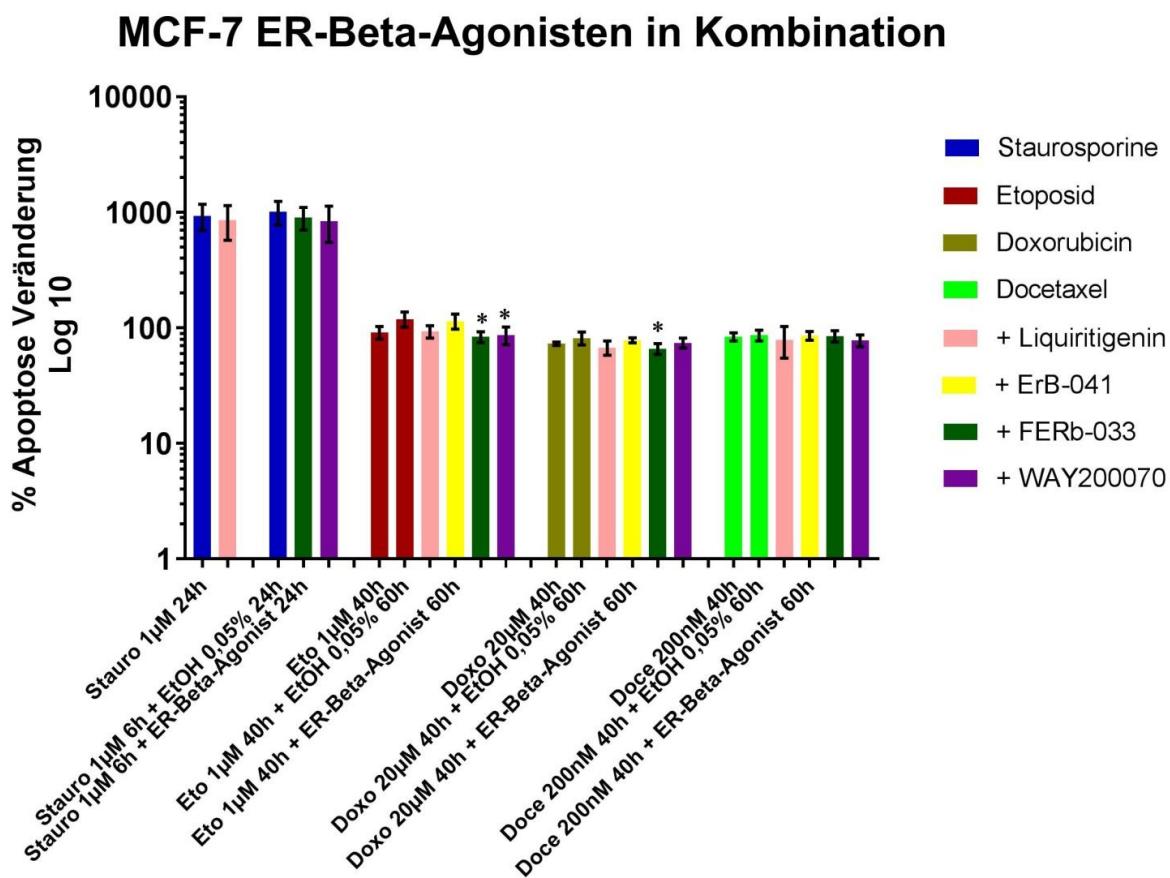


Abbildung 113: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine

Von den ER β -Antagonisten führte an den MCF-7-Zellen keine Kombination mit Staurosporine zu einer signifikanten Veränderung der Apoptoserate (Abbildung 114).

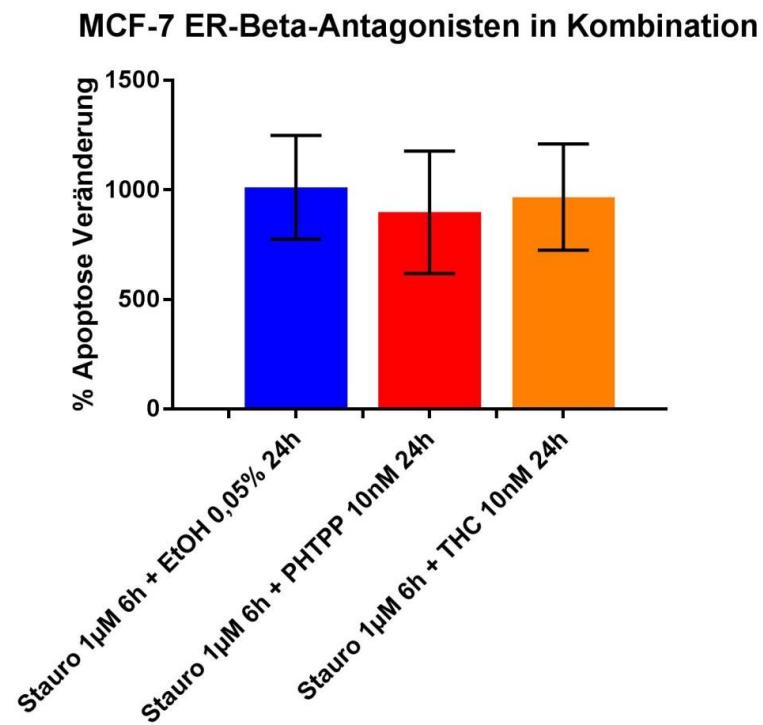


Abbildung 114: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.10 T47D-Zellen

ER- β -Agonisten bei alleiniger Anwendung

Die T47D-Zellen reagierten lediglich auf FERb-033 nach 24 h mit einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit dessen Referenzmedium EtOH (Abbildung 115). Alle anderen ER β -Agonisten führten an den T47D-Zellen nicht zu signifikanten Veränderungen der Apoptoserate.

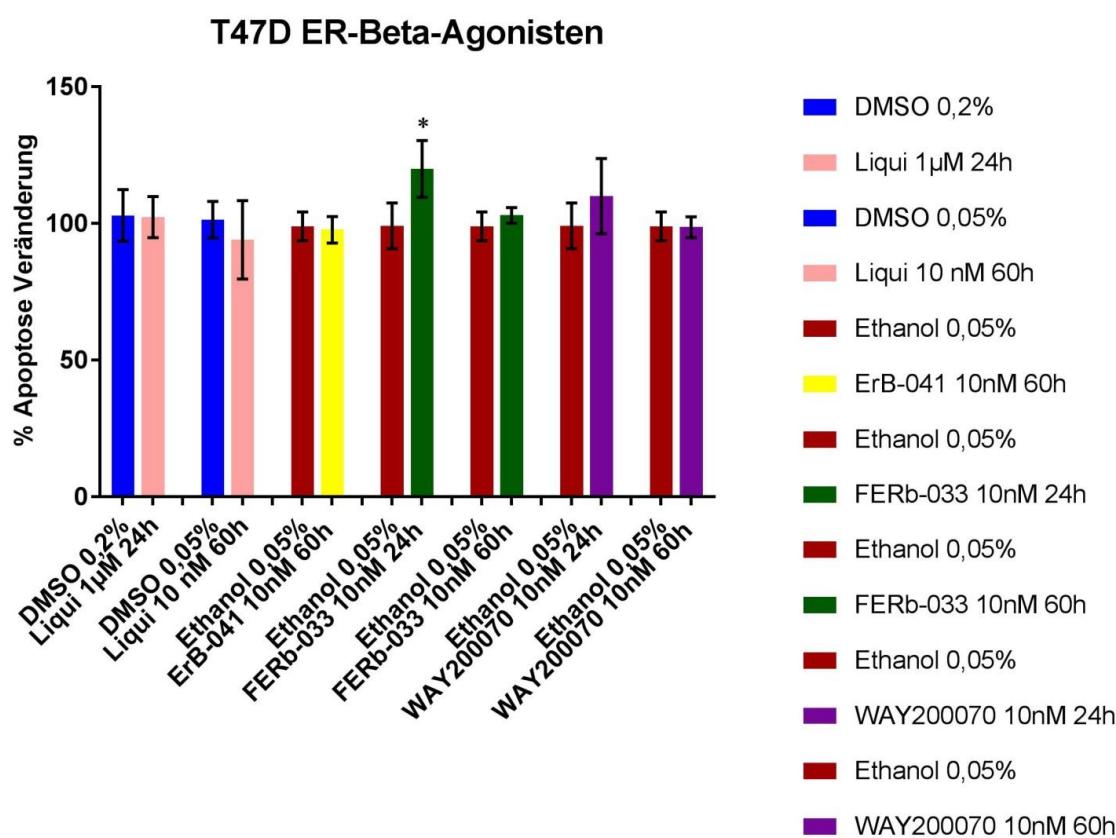


Abbildung 115: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten

Es führte der ER β -Antagonist PHTPP zu einer leichten Steigerung der Apoptoserate, verglichen mit seinem Referenzmedium Ethanol (Abbildung 116).

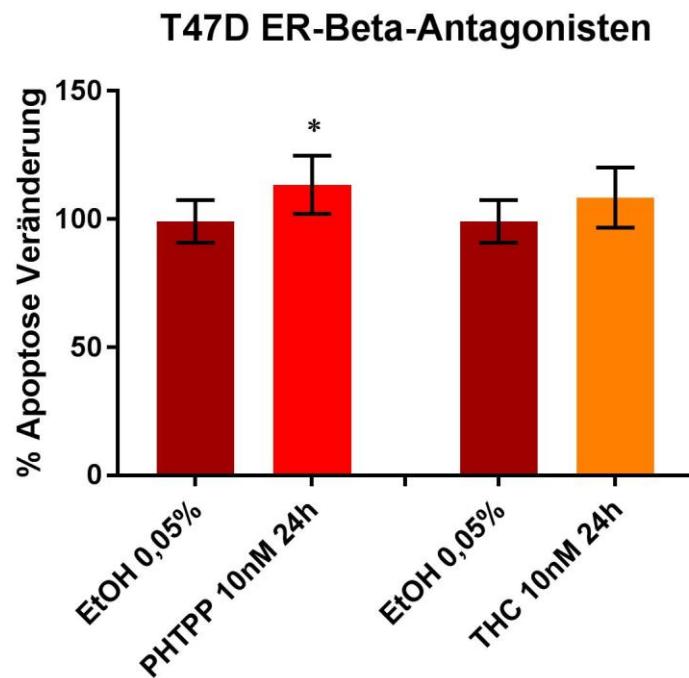


Abbildung 116: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER-β-Agonisten in Kombination mit Chemotherapeutika und Staurosporine

An den T47D-Zellen führte kein ERβ-Agonist in Kombination mit einem Chemotherapeutikum zu einer veränderten Apoptoserate, verglichen mit der alleinigen Chemotherapeutikum-Behandlung (Abbildung 117).

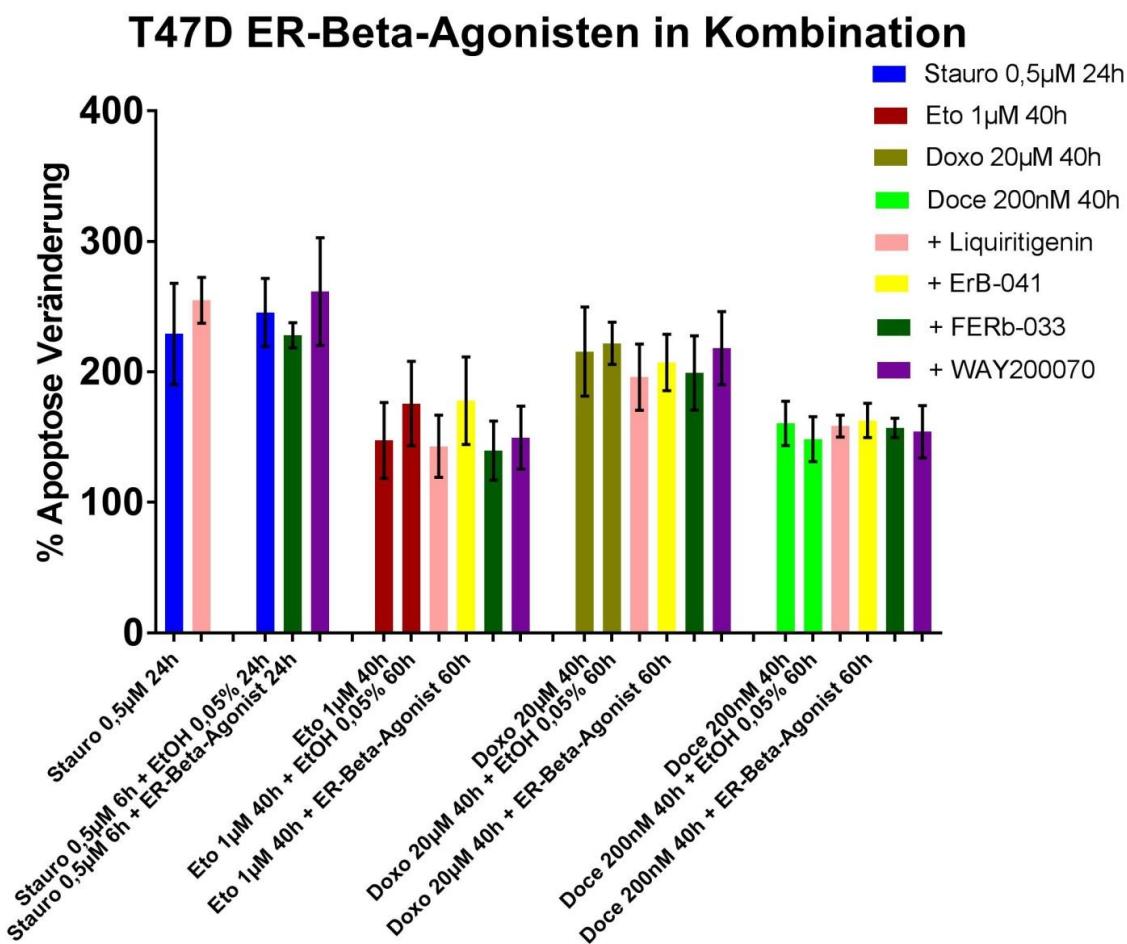


Abbildung 117: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ERβ-Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ERβ-Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine

Die T47D-Zellen reagierten mit einer signifikanten Senkung der Apoptoserate nach Behandlung mit THC und Staurosporine im Vergleich zu Staurosporine mit dem Lösemittel EtOH (Abbildung 118).

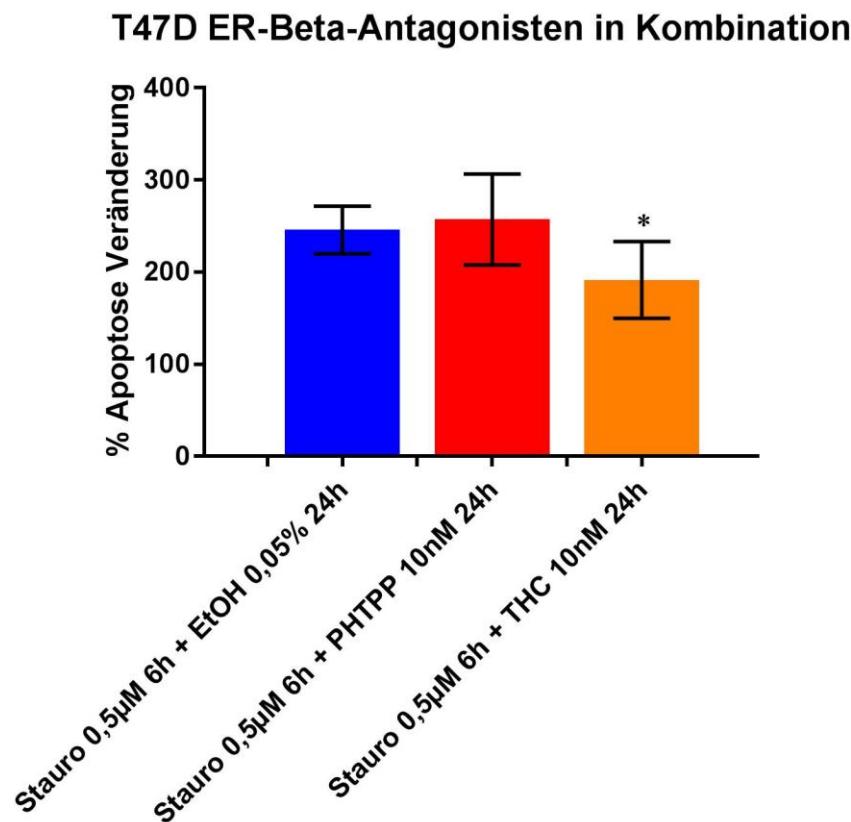


Abbildung 118: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

4.11 ZR-75-1-Zellen

ER- β -Agonisten bei alleiniger Anwendung

Bei den ZR-75-1-Zellen zeigte keiner der ER β -Agonisten eine signifikante Veränderung der Apoptoserate, verglichen mit seinem jeweiligen Referenzmedium DMSO oder EtOH (Abbildung 119).

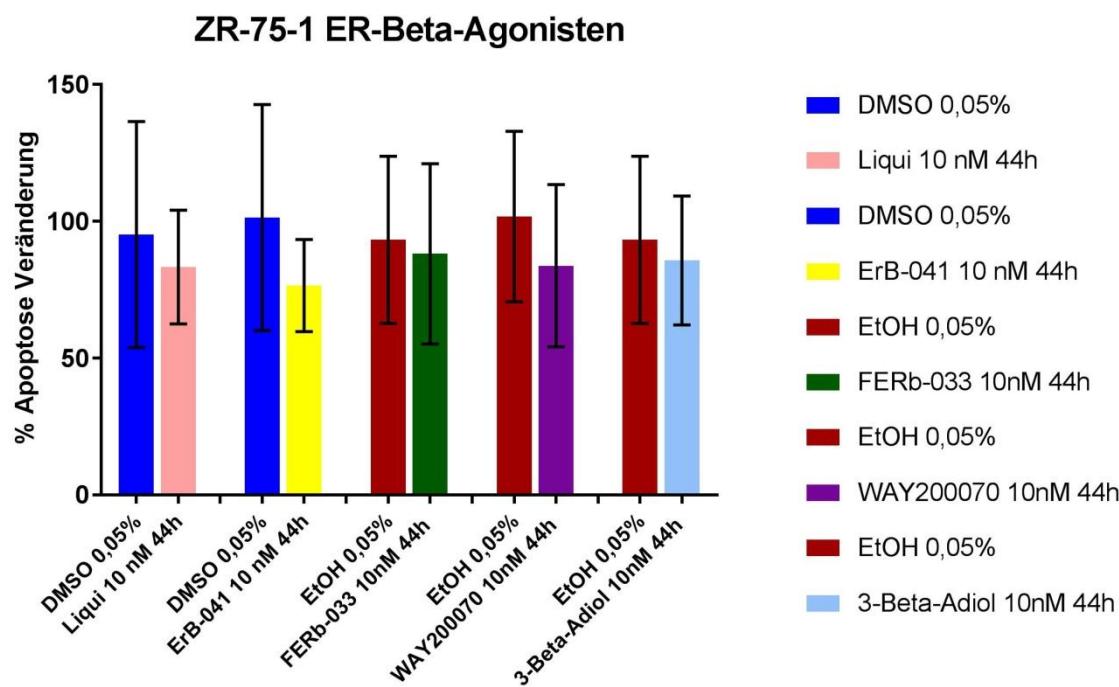


Abbildung 119: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070 und 3-Beta-Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

ER- β -Antagonisten in Kombination mit Chemotherapeutika und Staurosporine

Die ZR-75-1-Zellen reagierten sehr unterschiedlich auf die ER β -Agonisten. So führte ErB-041 in Kombination mit der niedrigeren Staurosporine-Konzentration zu einer Steigerung der Apoptoserate. Ebenfalls führte WAY200070 in der Kombination mit

beiden Doxorubicin-Konzentrationen zur Apoptose-Steigerung. Dahingegen löste WAY200070 in der Kombination mit beiden Staurosporine-Konzentrationen eine Senkung der Apoptoserate aus. Auch FERb-033 bewirkte zusammen mit Staurosporine eine Reduktion der Apoptose-Induktion. Ebenso erzielte 3-β-Adiol zusammen mit der größeren Staurosporine-Konzentration eine Senkung der Apoptoserate. Die übrigen Kombinationen blieben ohne signifikanten Effekt. (Abbildung 120)

ZR-75-1 ER-Beta-Agonisten in Kombination

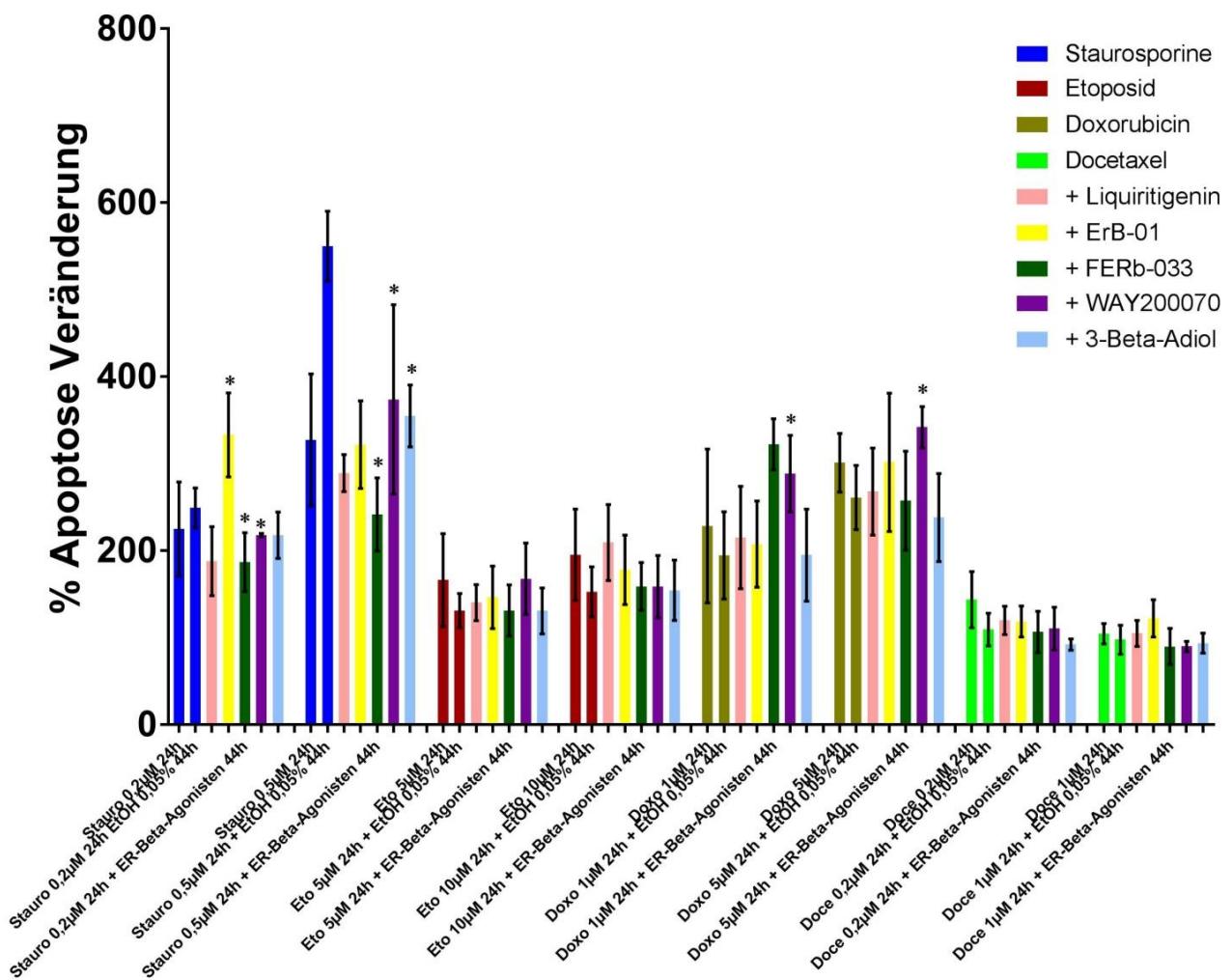


Abbildung 120: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070 und 3-β-Adiol in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.

5 Diskussion

ER β wurde in den letzten Jahren zunehmend als vielversprechendes Target in der Therapie des Mammakarzinoms diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass ER β die Proliferation von Brustkrebszellen unterdrückt und ein reduzierter Level an ER β mit einer schlechteren Prognose korreliert.¹⁷² Treeck et al. demonstrierten, dass bei einem Knockdown von ER β -Transkripten mittels ER β -shRNA sowohl MCF-10A-Mammaepithelzellen als auch MCF-7-Mammakarzinomzellen einen signifikanten Wachstumsschub erfahren, welcher Liganden- und ER α -unabhängig ist. Die Daten weisen darauf hin, dass ER β einen antiproliferativen oder pro-apoptotischen Effekt auf MCF-10A- und MCF-7-Zellen ausübt und somit wohl Tumor-supprimierende Eigenschaften besitzt.¹⁷³ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des ER β -Wildtyps sowohl in ER α -negativen als auch ER α -positiven Brustkrebszellen nicht nur die Proliferation senkt, sondern auch explizit die Apoptoserate erhöht im Gegensatz zur Überexpression gewisser Splicevarianten (ER $\beta\delta125$ und ER $\beta\delta1256$).¹⁷⁴

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine gezielte Aktivierung von ER β mit Hilfe von ER β -Agonisten alleine oder ER β -Agonisten in Kombination mit Apoptose-auslösenden Stoffen zu erhöhten Apoptose-Raten von ER β -positiven Mammakarzinomzellen führen könnte, was im späteren Therapieansatz als Ziel eine gezieltere und gesteigerte Abtötung von Tumorzellen hätte.

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Estrogenrezeptors β im Hinblick auf seine Apoptose-auslösenden Funktionen an Brustkrebszelllinien untersucht. Es wurde mittels Apoptose-Assay getestet, ob diverse ER β -Modulatoren (insbesondere die ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070, 3- β -Adiol und als Umkehrprobe auch die ER β -Antagonisten PHTPP und (R-R)-THC) bei vier verschiedenen bekannten Brustkrebszelllinien (MDA-MB-231, MCF-7, T47D, ZR-75-1) einerseits die basale Apoptoserate im Vergleich zum Lösungsmittel als Referenzmedium und andererseits die

¹⁷² Chen et al. 2008

¹⁷³ Treeck et al. 2010

¹⁷⁴ Treeck et al. 2008

durch bekannte Apoptose-auslösende Stoffe, wie Staurosporine und Chemotherapeutika (Etoposid, Doxorubicin, Docetaxel), ausgelöste Apoptoserate beeinflussen können.

5.1 FERb-033

FERb-033, als bekannter ER β -Agonist¹⁷⁵, führte teilweise zu sehr deutlichen Effekten, aber überraschenderweise sowohl zu Apoptose-steigernden als auch zu Apoptose-senkenden Effekten.

Es führte an den MDA-MB-231-Zellen in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Docetaxel zu einer Senkung der Apoptoserate verglichen mit der alleinigen Behandlung mit Docetaxel als Referenzmedium. Im Gegensatz dazu konnte FERb-033 an MDA-MB-231-Zellen, welche mit ER β 1 transfiziert wurden, die Proliferation hemmen.¹⁷⁶ ER β 1 konnte an normalen MDA-MB-231-Zellen nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden.¹⁷⁷ Somit könnten auch hier die vorhandenen Splicevarianten von ER β eine unterschiedliche Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielen.¹⁷⁸ Denn an den in unseren Versuchen verwendeten, genetisch unveränderten MDA-MB-231-Zellen löste FERb-033 bei alleiniger Anwendung keine veränderte Apoptoserate gegenüber dem Lösemittel von FERb-033 aus.

An den MCF-7-Zellen hingegen konnte bei alleiniger Behandlung mit FERb-033 eine deutliche Steigerung der Apoptoserate erreicht werden. Aber durch die Kombination von FERb-033 mit Etoposid und Doxorubicin kam es dann im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit den Apoptose-auslösenden Mitteln zur Senkung der Apoptoserate. Bei Reese et al. hatte FERb-033 in 10 nM Konzentration über 12 Tage hinweg keinen Effekt auf die Proliferation von MCF-7-Zellen, höhere Dosen von 100 nM hingegen steigerten die Zellproliferation.¹⁷⁹ In unseren Versuchen konnte FERb-033 die Apoptose in verschiedenen Kombinationen durchaus signifikant beeinflussen.

¹⁷⁵ Minutolo et al. 2009

¹⁷⁶ Reese et al. 2014

¹⁷⁷ Leygue et al. 1999

¹⁷⁸ Warner und Gustafsson 2010

¹⁷⁹ Reese et al. 2014

Inwiefern sich der Gegensatz in der Apoptose-auslösenden Fähigkeit bezüglich der MCF-7-Zellen erklären lässt, bleibt unklar. Es scheint eine Rolle zu spielen, ob eine Kombination mit Apoptose-auslösenden Stoffen erfolgt oder nicht.

Die T47D-Zellen reagierten genauso wie die MCF-7-Zellen mit Apoptose-steigerndem Effekt auf die alleinige Behandlung mit FERb-033. Die Kombination von FERb-033 mit Chemotherapeutika blieb größtenteils ohne signifikante Effekte, jedoch konnte erfreulicherweise die Kombination von FERb-033 mit Docetaxel an den T47D-Zellen die Apoptoserate effektiv steigern. Hier bleibt nur die Erklärung, dass weitere intra- und extrazelluläre Umgebungsfaktoren durchaus eine Rolle dabei spielen, ob und inwiefern der jeweilige ER β -Agonist die Apoptose beeinflussen kann. Cotrim et al. zeigten, dass die durch ER β modulierte Apoptose auch von Comodulatoren wie ERK ½ (extracellular signal-regulated kinase 1 und 2) abhängt. So konnte die durch den ER β -Agonisten DPN (2,3-bis(4-hydroxy-phenyl)-propionitrile) ausgelöste Apoptose an Brustepithel- und Brustkrebszellen durch diese Coregulatoren unterdrückt werden und DPN steigerte PI3K(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3-kinase)-vermittelt sogar in gleicher Weise die Proliferation wie Estrogen.¹⁸⁰ Dies macht deutlich, dass all unsere Ergebnisse von bestimmten Coregulatoren und Umgebungsfaktoren abhängig sein können.

Die ZR-75-1-Zellen reagierten auf die Kombination von FERb-033 und Staurosporine mit einer deutlichen Senkung der Apoptoserate im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Staurosporine. Warum FERb-033 in den Kombinationen mit den Chemotherapeutika die Apoptoserate nicht beeinflussen konnte, bleibt unklar. Der Unterschied im Effekt zwischen Staurosporine und den übrigen Chemotherapeutika in Kombination mit FERb-033 an den ZR-75-1-Zellen könnte sich durch eine unterschiedliche Apoptoseauslösung erklären lassen. Staurosporine verursacht Apoptose mitunter über eine intrazelluläre Calciumfreisetzung und ROS-Aktivierung.¹⁸¹ Die verwendeten Chemotherapeutika greifen eher in die Zellteilung oder DNA-Synthese bzw. -Reparatur ein. Die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin beruht hauptsächlich auf einer Interkalation in die DNA, was zur Hemmung der Nucleinsäuresynthese führt, und auf einer Hemmung der Topoisomerase II, wodurch es zur Induktion von Doppelstrangbrüchen kommt. Docetaxel

¹⁸⁰ Cotrim et al. 2013

¹⁸¹ Kruaman et al. 1998

hingegen blockiert den Zellzyklus in der G²- bzw. M-Phase und führt zum Absterben der Zellen, indem es erst die Bildung der Mikrotubuli beschleunigt, dann an die β-Tubulin-Untereinheit bindet und so die Desaggregation des Spindelapparates verhindert und somit die Mitose stört.¹⁸² (siehe Kapitel 3.5.1) Aber der die Mitose störende Effekt von Docetaxel¹⁸³ wurde durch FERb-033 in unseren Versuchen an den MDA-MB-231-Zellen reduziert. Für andere ERβ-Agonisten, wie Liquiritigenin, ist eine Apoptose-auslösende Wirkung ebenfalls mitunter über ROS beschrieben¹⁸⁴, was eventuelle Parallelen zu der durch Staurosporine ausgelösten Apoptose andeutet und den Effekt in der Kombination mit Staurosporine erklären könnte.

Bei der alleinigen Anwendung von FERb-033 zeigten sich in unseren Versuchen die Effekte abhängig von der Einwirkdauer. Der Apoptose-steigernde Effekt von FERb-033 hingegen zeigte sich nach 24 h bei den MCF-7- und T47D-Zellen und war bei einer Einwirkzeit von 60 h nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen erneut im Widerspruch zu den Ergebnissen von Reese et al.¹⁸⁵

Auch wenn unsere Hypothese, dass FERb-033, als ERβ-Agonist, die Apoptose alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika steigern könnte, in drei Fällen (FERb-033 an MCF-7- und T47D-Zellen, FERb-033 + Docetaxel) bestätigt wurde, so bleibt aufgrund der zum Teil auch deutlichen Apoptose-senkenden Effekte von FERb-033 (FERb-033 + Staurosporine an ZR-75-1-Zellen, FERb-033 + Etoposid/Doxorubicin an MCF-7-Zellen, FERb-033 + Docetaxel an MDA-MB-231-Zellen) eine endgültige Aussage offen. In Zusammenschau der Ergebnisse und der bisher recht spärlichen Literatur zu FERb-033 lässt sich aktuell keine definitive Aussage bezüglich seiner Apoptose- und Proliferationsbeeinflussenden oder tumorsupprimierenden Eigenschaften treffen. Jedoch sollte aufgrund der in unseren Versuchen sehr interessanten und teilweise recht starken Effekte ein Ziel der weiteren Forschung sein, die Effekte von FERb-033 auf Brustkrebszellen weiter zu untersuchen.

¹⁸² Mutschler et al. 2013

¹⁸³ Mutschler et al. 2013

¹⁸⁴ Zhang et al. 2009

¹⁸⁵ Reese et al. 2014

5.2 WAY200070

Auch WAY20000, als ER β -Agonist¹⁸⁶, führte teils zu Apoptose-steigernden und teils zu Apoptose-senkenden Effekten. Die MCF-7-Zellen reagierten in unseren Versuchen bei der Kombination von WAY200070 mit Etoposid mit einer Senkung der Apoptoserate. Dieses Verhalten passt zu den Ergebnissen von Chakrabarti et al., weil WAY200070 VSC4.1-Motoneuronzellen vor der durch Calciumionophore ausgelösten Apoptose schützen konnte. Die neuroprotektiven micro-RNA-Level von miR-206, miR-17 und miR-7-1 wurden durch WAY200070 in diesen Zellen hochreguliert. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 wurde erhöht sowie das pro-apoptotische Bax-Protein erniedrigt. Zudem verstärkte die Transfektion dieser Zellen mit neuroprotektiver micro-RNA den anti-apoptotischen Effekt von WAY200070.^{187,188} Dies stellt erneut einen Hinweis darauf dar, dass die Wirkung der ER β -Agonisten insbesondere durch Comodulatoren beeinflusst wird.

Reese et al. konnten für WAY20070 in 10 nM Konzentration an normalen MCF-7-Zellen sowie an ER β 1-überexprimierenden MCF-7-Zellen keinen Proliferations-verändernden Effekt nachweisen. In der Konzentration 100 nM hingegen löste es sogar eine verstärkte Proliferation aus. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Ergebnissen für die Behandlung mit 10 nM WAY200070. Die alleinige Behandlung mit WAY200070 hatte in unseren Versuchen keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose der Zelllinien.

Neueste Studien an den triple-negativen MDA-MB-231-Brustkrebszellen konnten für WAY200070 zeigen, dass es die Proliferation nicht beeinflussen, jedoch die Invasionsrate durch eine künstliche Basalmembran der Zellen reduzieren konnte.¹⁸⁹ Im Kontrast zu unseren Ergebnissen stehen die Ergebnisse von Reese et al. bezüglich WAY200070 an MDA-MB-231-Zellen, was zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationsrate führte. Aber diese MDA-MB-231-Zellen waren im Gegensatz zu unseren mit ER β 1 transfiziert.¹⁹⁰ Unsere MDA-MB-231-Zellen reagierten, ebenso wie die

¹⁸⁶ Malamas et al. 2004

¹⁸⁷ Chakrabarti und Ray 2016

¹⁸⁸ Chakrabarti et al. 2014

¹⁸⁹ Schüler-Toprak et al. 2016

¹⁹⁰ Reese et al. 2014

T47D-Zellen, bei alleiniger Anwendung von WAY200070 sowie in Kombination mit Apoptose-auslösenden Stoffen nicht mit einer Veränderung der Apoptoserate.

Latrich et al. zeigten für WAY200070 hingegen sowohl an MCF-7- und T47D-Zellen, dass es den antiproliferativen Effekt von Tamoxifen signifikant steigern konnte, jedoch konnte WAY200070 bei alleiniger Anwendung über 6 Tage hinweg ebenfalls nicht die Proliferation beeinflussen.¹⁹¹

Bei den ZR-75-1-Zellen konnte die Kombination von WAY200070 mit Doxorubicin einen deutlichen Apoptose-steigernden Effekt darstellen, wohingegen WAY200070 in Kombination mit Staurosporine interessanterweise einen Apoptose-senkenden Effekt an den ZR-75-1-Zellen bewirkte. Diesbezüglich liegt die Vermutung nahe, dass der Unterschied im Stoff, wodurch die Apoptose ausgelöst wird, eine Rolle spielen könnte. Es bleibt somit der Verdacht, dass es auch von der Art der Auslösung der Apoptose abhängt, ob die Apoptose verstärkt oder gehemmt wird. Doxorubicin wirkt hauptsächlich über eine Interkalation in die DNA, was zur Hemmung der Nucleinsäuresynthese führt, und über die Hemmung der Topoisomerase II, was zur Induktion von Doppelstrangbrüchen führt.¹⁹² Dies konnte wohl an den ZR-75-1-Zellen durch WAY200070 verstärkt werden. Staurosporine hingegen verursacht Apoptose mitunter über eine intrazelluläre Calciumfreisetzung und ROS-Aktivierung.¹⁹³ Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für FERb-033 in Kombination mit Staurosporine an den ZR-75-1-Zellen beobachtet (siehe Kapitel 5.1.). Dass WAY200070 an den ZR-75-1-Zellen bei alleiniger Anwendung die Apoptose nicht beeinflussen konnte, jedoch in Kombination mit Doxorubicin zu einer gesteigerten Apoptoserate führte, lässt sich zum Teil mit den Ergebnissen von Ruddy et al. vereinen. WAY200070 hatte einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt auf SERM-resistente LCC9-Zellen, welche eine niedrige ER α /ER β -Ratio haben. Jedoch konnte auch in den Versuchen von Ruddy et al. der Zelltod erst durch Zugabe von Chloroquine, einem Apoptose-induzierenden Reagenz, ausgelöst werden.¹⁹⁴

¹⁹¹ Latrich et al. 2014

¹⁹² Mutschler et al. 2013

¹⁹³ Kruman et al. 1998

¹⁹⁴ Ruddy et al. 2014

Ruddy et al. zeigten, dass das anti-apoptotische Protein Bcl-2 bei einer Behandlung mit WAY200070 in MCF-7-Zellen nach 24 h anstieg und bei 72 h wieder auf die Ausgangswerte sank. Mit welcher Verzögerung eine Veränderung der Bcl-2-Expression dann die Apoptoserate beeinflusst, ist jedoch nicht klar.

An LCC9-Zellen führte WAY200070 hingegen zu einer deutlichen Down-Regulation von Bcl-2, so dass der Rückschluss nahe liegt, dass es von der Zelllinie bzw. eventuell von dem ER α / β -Rezeptorstatus abhängt, wie die Zelle auf einen ER β -Agonisten reagiert.¹⁹⁵

Eine sehr neue Studie zeigte für WAY200070 auch an Ovarialkarzinomzellen, dass es in 10 nM Konzentration über 7 Tage hinweg die Zellzahl deutlich herabsetzen konnte.¹⁹⁶

Bei Cotrim et. al. waren die Effekte von WAY200070 in vivo anders als in vitro. Bei Versuchen an Mäusen in vivo begünstigte es die Proliferation von Brustepithel. In vitro löste WAY20070 an verschiedenen Brustepithel- und Brustkrebszellen Apoptose aus, konnte jedoch die Proliferation nicht beeinflussen.¹⁹⁷

In vivo am Menschen konnte bereits eine antidepressive und anxiolytische Wirkung für WAY200070 nachgewiesen werden.¹⁹⁸

WAY200070 konnte unsere Hypothese, dass es die Apoptoserate von Brustkrebszellen steigern könnte, vor allem im Zusammenspiel mit Chemotherapeutika, lediglich an den ZR-75-1-Zellen in Kombination mit Doxorubicin bestätigen. Ob und inwiefern WAY200070 die Apoptose beeinflussen kann, scheint den Hinweisen in der Literatur und auch unseren Ergebnissen zufolge von vielen verschiedenen Faktoren abhängig zu sein. Fest steht, WAY200070 kann bei Vorliegen passender Faktoren die Apoptoserate sowohl negativ als auch positiv beeinflussen und könnte somit durchaus einen Stellenwert in der Karzinomtherapie bekommen.

¹⁹⁵ Ruddy et al. 2014

¹⁹⁶ Schüler-Toprak et al. 2017

¹⁹⁷ Cotrim et al. 2013

¹⁹⁸ Hughes et al. 2008

5.3 3-β-Adiol

3-β-Adiol, als physiologisch vorkommender ER β -Agonist und Androgen-Derivat¹⁹⁹, wurde nur an den ZR-75-1-Zellen getestet. Die Zellen zeigten lediglich bei der Kombination von 3 β -Adiol mit Staurosporine einen deutlichen Apoptose-senkenden Effekt. Auch hier lässt sich aufgrund des Effektes bei Staurosporine und aufgrund des fehlenden Effektes bei den übrigen Chemotherapeutika die These aufstellen, dass der Unterschied in der Apoptoseauslösung zwischen Staurosporine und Chemotherapeutika bedeutsam sein könnte (siehe auch Kapitel 5.1-5.5).^{200,201,202} Die Ergebnisse von Lattrich et al. passen insofern zu unseren, als 3-β-Adiol in serumhaltigem Kulturmedium, wie in unseren Versuchen verwendet, keinen Wachstums-beeinflussenden Effekt auf ZR-75-1-Zellen hatte, jedoch sehr starke antiproliferative Effekte in serumfreiem Kulturmedium entstehen ließ. 3-β-Adiol konnte durchaus auch an MCF-7-Zellen in serumhaltigem Kulturmedium das Wachstum hemmen, wohingegen in Serum-freiem Kulturmedium die 100 nM Konzentration sogar zu einem Wachstumsanstieg führte, aber die 1 nM Konzentration zu einer Wachstumshemmung. MDA-MB-231-Zellen reagierten dagegen gar nicht auf 3-β-Adiol.²⁰³ In unseren Versuchen wurde immer ein Standardmedium mit 10% FBS verwendet und es wurden nur ZR-75-1-Zellen getestet.

Sikora et al. zeigten, dass 3-β-Adiol in 10 nM Konzentration angewendet über 5 Tage an MCF-7- und T47D-Zellen zu einem deutlichen Proliferationsanstieg führte, jedoch nicht im selben Ausmaß wie E2. Der EC50-Wert lag bei diesen Untersuchungen bei 0,2 nM.²⁰⁴ Dies lässt vermuten, dass die von uns verwendete Konzentration von 10 nM eventuell zu hoch gewesen sein könnte. Die Apoptose-Reduktion in unseren Ergebnissen ist möglicherweise mit dem Proliferationsanstieg bei Sikora et al. vereinbar.

Zu beachten bleibt, dass 3-β-Adiol auch an ER α als Agonist wirkt, zwar in geringerem Ausmaß als an ER β , aber somit könnte der Apoptose-senkende Effekt an unseren ZR-75-1-Zellen auch ER α -vermittelt sein, da den Untersuchungen von Lattrich et al. zufolge der

¹⁹⁹ Guerini et al. 2005

²⁰⁰ Mutschler et al. 2013

²⁰¹ Tamaoki et al. 1986

²⁰² Kruman et al. 1998

²⁰³ Lattrich et al. 2013

²⁰⁴ Sikora et al. 2009

Level an ER α , verglichen mit den ER β -Varianten 1,2 und 5, an ZR-75-1-Zellen eindeutig höher ist.^{205,206} Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen von Leygue et al., die für ZR-75-1-Zellen ebenfalls ER β 5 als die am stärksten exprimierte ER β -Variante darstellten.²⁰⁷

Übereinstimmend mit unseren Daten konnte 3- β -Adiol bei alleiniger Anwendung die Proliferation von triple-negativen Brustkrebszellen, unter anderem MDA-MB-231-Zellen, nicht beeinflussen, konnte jedoch in einer 10 nM Konzentration deren Invasionsrate durch eine künstliche Basalmembran signifikant reduzieren.²⁰⁸

An Ovarialkarzinomzellen hingegen führte 3- β -Adiol in 10 nM Konzentration zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl nach 3 Tagen.²⁰⁹ In unseren Versuchen betrug die maximale Einwirkzeit jedoch nur 44 h.

Weihua et al. konnten für 3- β -Adiol in Versuchen an Mäusen und Ratten eine wachstumshemmende Wirkung auf deren Prostatazellen feststellen.²¹⁰ Des Weiteren konnte es an Prostatakarzinomzellen die Proliferation senken, die Zelladhäsion stärken und die Invasivität reduzieren. In vivo an Mäusen reduzierte 3- β -Aiol das Wachstum von Tumoren und hemmte die Metastasierung.²¹¹ An neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass 3- β -Adiol vor allem die über ER β 1 induzierte Transkription auslöste, aber nicht die von ER α oder ER β 2.²¹²

Interessant für unsere Versuche wäre gewesen, 3- β -Adiol auch an den anderen Zelllinien und zum Beispiel in Serum-freiem Kulturmedium zu testen, da dieser Wirkstoff in verschiedenen Veröffentlichungen durchaus Potenzial für die Karzinomtherapie gezeigt hat.

²⁰⁵ Kuiper et al. 1997

²⁰⁶ Latrich et al. 2013

²⁰⁷ Leygue et al. 1999

²⁰⁸ Schüller-Toprak et al. 2016

²⁰⁹ Schüller-Toprak et al. 2017

²¹⁰ Weihua et al. 2002

²¹¹ Dondi et al. 2010

²¹² Pak et al. 2005

5.4 Liquiritigenin

Liquiritigenin, als bekannter ER β -Agonist²¹³, führte besonders an den MDA-MB-231-Zellen zu interessanten Ergebnissen. Es wurde ein deutlicher, Apoptose-steigernder Effekt an den MDA-MB-231-Zellen bei der alleinigen Behandlung mit Liquiritigenin in 1 μM Konzentration und bei gleichzeitiger Kombination von 1 μM Liquiritigenin mit 0,1 μM Staurosporine nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte an den MDA-MB-231-Zellen nach Vorinkubation mit 10 nM Liquiritigenin und anschließender Behandlung mit Chemotherapeutika (Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel) und auch mit Staurosporine keine Veränderung der Apoptoserate erreicht werden. Da der EC50-Wert für Liquiritigenin an ER β bei 36,5 nM liegt²¹⁴, ist der Apoptose-steigernde Effekt bei der Behandlung mit 1 μM Liquiritigenin eventuell auch über einen ER β -unabhängigen Nebeneffekt erklärbar. Es zeigten einige Studien, dass es neben den traditionellen Rezeptoren, wie ER α und ER β , weitere Östrogenrezeptoren gibt, darunter der G-Protein Coupled Receptor-30 (GPR30). Durch Bindung von Östrogen wie auch von ER-Modulatoren an GPR30 werden zum Beispiel MAPK (Mitogen-activated protein Kinase) und ERK1/2 (extracellular signal-related kinases 1/2) sowie EGFR (epidermal growth factor receptor) in SKBR3-Brustkrebszellen stimuliert.^{215,216} Der aktivierte EGFR-Signalweg unterstützt beispielsweise das Zellwachstum und inhibiert Apoptose.²¹⁷ Girgert et al. konnten durch einen Knockdown von GPR30 in triple-negativen Brustkrebszelllinien die durch 17 β -Estradiol und Tamoxifen ausgelöste Proliferation verhindern.²¹⁸ Da Östrogen und Tamoxifen eine Wirkung auf den membrangebundenen GPR30 haben, könnte er auch durch Liquiritigenin beeinflusst werden.

MDA-MB-231-Zellen gelten als ER α negativ²¹⁹, deshalb kann die bei der Verwendung von 1 μM Liquiritigenin durch Shanle et al. beschriebene Aktivierung von ER α in unseren Versuchen wohl vernachlässigt werden. In den Versuchen von Shanle et al. zeigten sich die ER β -spezifischen Effekte am ehesten bei einer Liquiritigenin-

²¹³ Mersereau et al. 2008

²¹⁴ Mersereau et al. 2008

²¹⁵ Chen et al. 2008

²¹⁶ Filardo et al. 2008

²¹⁷ Dutta und Maity 2007

²¹⁸ Girgert et al. 2012

²¹⁹ LGC Standards

Konzentration von 100 nM, so dass möglicherweise die 10 nM Liquiritigenin-Konzentration in unseren Versuchen nicht ausgereicht haben könnte oder die Einwirkzeit zu kurz war. Shanle et al. behandelten ER negative Hs578T-Brustkrebszellen, welche mit ER β versehen wurden, über 5 Tage mit 100 nM Liquiritigenin und konnten dadurch eine deutliche Reduktion der Zellzahl erreichen.²²⁰

Ähnliche Effekte für Liquiritigenin beschrieben auch Zhang et al.; sie wiesen für Liquiritigenin an SMMC-7721-Leberzellkarzinomzellen den von uns ebenfalls erhofften proapoptotischen Effekt nach. Sie verwendeten eine 0,4 mM Konzentration von Liquiritigenin. Die Apoptose wurde hierbei vermutlich durch ROS (reactive oxygen species) ausgelöst, was zu einer Störung des mitochondrialen Membranpotenzials und somit zur Apoptose führt.²²¹

Unsere fehlenden Effekte auf die Apoptose der Zelllinien MCF-7, T47D und ZR-75-1 durch Liquiritigenin stehen im Gegensatz zu unserer durch Ergebnisse aus vorangegangenen Untersuchungen entstandenen Erwartung^{222,223}, dass Liquiritigenin als ER β -Agonist die Apoptoserate steigern könnte.

Aber auch Hinsche et al. konnten an den triple-negativen (ER α negativ, PR negativ, HER2-neu negativ), jedoch ER β -positiven Brustkrebszelllinien HCC1806 und HCC 1937 durch eine Behandlung mit Liquiritigenin in den Konzentrationen 10^{-11} bis 10^{-5} M für 12 bis zu maximal 120 h keine Veränderung der Zellproliferation messen. Die Apoptoserate wurde dabei leider nicht gemessen. Jedoch konnte diese Arbeitsgruppe durch eine Behandlung mit Liquiritigenin dosisabhängig die Invasion der oben genannten Zellen durch eine künstliche Basalmembran signifikant reduzieren.²²⁴

In vitro konnten Liu et al. durch Liquiritigenin in Konzentrationen von 0,05 bis 0,4 mM über 24 - 72 h an HeLa-Zervixkarzinomzellen Apoptose über einen mitochondrialen Aktivierungsweg auslösen.²²⁵ In vivo an den gleichen humanen Zervixkarzinomzellen, transplantiert in Mäuse, zeigte Liquiritigenin, als Flavonoid, tumorsupprimierende und

²²⁰ Shanle et al. 2011

²²¹ Zhang et al. 2009

²²² Treeck et al. 2010

²²³ Treeck et al. 2008

²²⁴ Hinsche et al. 2015

²²⁵ Liu et al. 2011

anti-inflammatory Wirkungen. Es unterdrückte das Tumorwachstum und die Mikrovaskularisation wurde herabgesetzt, indem die VEGF-Expression im Tumor dosisabhängig reduziert wurde.²²⁶ Auch Wang et al. konnten durch eine Behandlung über 24 h mit Liquiritigenin in den Konzentrationen 200 und 400 µM in verschiedenen Leberzellkarzinomzellen Apoptose erreichen - mitunter spielte dabei wohl die Aktivierung von MAP-Kinasen eine Rolle.²²⁷

Liquiritigenin reduzierte Proliferation und Tumorwachstum von Gliomzellen bzw. Gliomtumoren, welche abhängig vom Malignitätsgrad ERβ exprimieren (je maligner das Gliom, desto weniger ERβ wird exprimiert), sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Mausmodell.²²⁸

In aktuellen Studien konnte durch eine Behandlung mit 10 nM Liquiritigenin über 5 Tage bei ERβ-positiven Ovarialkarzinomzelllinien die Zellzahl deutlich reduziert werden.²²⁹ Hingegen führte in der gleichen Arbeitsgruppe die Behandlung mit Liquiritigenin an Brustkrebszelllinien wie MDA-MB-231, MCF-7 und ZR-75-1 zu keiner Veränderung der Zellzahl. Lediglich die MCF-7-Zellen reagierten mit einer Steigerung der Zellzahl auf Liquiritigenin.²³⁰

Auch wenn Liquiritigenin in unseren Versuchen mit zwei Ausnahmen nicht, wie erhofft und in der Literatur zum Teil beschrieben, zu einer zusätzlichen Steigerung der durch Chemotherapeutika induzierten Apoptoserate führte, so bleibt es - im Spiegel der Wissenschaft betrachtet - doch ein interessanter und potenzieller Wirkstoff für unterschiedlichste Karzinomtherapien.

²²⁶ Liu et al. 2012

²²⁷ Di Wang et al. 2014

²²⁸ Sareddy et al. 2012

²²⁹ Schüler-Toprak et al. 2017

²³⁰ Latrich et al. 2013

5.5 ErB-041

ErB-041, als hoch-selektiver ER β -Agonist²³¹, konnte ebenfalls sowohl Apoptose-steigernde als auch Apoptose-senkende Effekte bewirken. An den MDA-MB-231-Zellen führte die alleinige Behandlung mit ErB-041 zu einer deutlichen Senkung der Apoptoserate. Bewirkte ErB-041 in unseren Versuchen an MCF-7-Zellen keinen Effekt, so verursachte ErB-041 bei Lee et al. einen Arrest und eine Ansammlung der MCF-7-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus und es reduzierte den Level von BCA2 (breast cancer-associated gene 2), welches ER α -vermittelt transkribiert wird und mit verschiedenen Variablen beim Mamma-Karzinom wie ER α -Status, Lymphknotenbefall und Lokalrezidiv korreliert. Eine BCA2-Überexpression erhöhte an T47D-Zellen die Proliferation.^{232,233} Aber auch die T47D-Zellen reagierten in unseren Versuchen bis auf eine Ausnahme nicht mit einer Veränderung der Apoptoserate auf die Behandlung mit ErB-041. Die Kombination ErB-041 mit Docetaxel jedoch führte zu einer Steigerung der Apoptoserate an den T47D-Zellen.

An den ZR-75-1-Zellen kam es erfreulicherweise bei der Kombination ErB-041 mit Staurosporine in der 0,2 μ M Konzentration zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate. Bei der 0,5 μ M Konzentration von Staurosporine war der Apoptose-auslösende Effekt alleine schon so groß, dass durch die Vorinkubation mit ErB-041 wohl kein zusätzlicher Effekt erzielt werden konnte. Omoto et al. stellten fest, dass die Isoform ER β 2 (=ER β cx) zwar wie ER β 1 (Wildtyp) Heterodimere mit ER α bildet, jedoch im Gegensatz zum Wildtyp nicht an ERE (Estrogen responding elements) bindet und die ER α -Funktion somit auf andere Weise hemmt.^{234,235} Zellen mit einem hohen ER β 2-Status wie MDA-MB-231, MCF-7 und T47D könnten demnach anders auf ER β -Agonisten reagieren als ZR-75-1-Zellen, welche keinen ER β 2 besitzen.²³⁶ Unsere Ergebnisse ließen sich zumindest zum Teil in diese Richtung interpretieren. Dagegen sprechen jedoch die Apoptose-steigernde Effekte durch ErB-041 mit Docetaxel an den T47D-Zellen. Es gibt

²³¹ Malamas et al. 2004

²³² Lee et al. 2015

²³³ Burger et al. 2005

²³⁴ Omoto et al. 2003

²³⁵ Ogawa et al. 1998b

²³⁶ Leygue et al. 1999

einige Hinweise darauf, dass der ER β cx-Status eine prädiktive Aussagekraft bezüglich der Effektivität einer Hormontherapie haben könnte oder mit einer schlechteren Prognose und schlechterem Ansprechen auf Chemotherapie korrelieren könnte, jedoch sind die Untersuchungen hierzu teilweise widersprüchlich.^{237,238} Evers et al. fanden heraus, dass es auch von der ER α /ER β -Ratio einer Zelllinie abhängt, inwiefern sie auf ER β -Agonisten reagiert.²³⁹

ErB-041 alleine konnte in unseren Versuchen lediglich an den MDA-MB-231-Zellen einen Apoptose-verändernden Effekt hervorbringen, was weniger mit den Ergebnissen von Hinsche et al. korreliert, da ErB-041 an triple-negativen, jedoch ER β -positiven Brustkrebszellen keinerlei Effekt auf die Zellproliferation ausübte.²⁴⁰ Wie auch in unseren Versuchen auf die Apoptose hatte bei Lattrich et al. ErB-041 alleine keine Auswirkung auf das Zellwachstum von MCF-7 und T47D-Zellen. Zusammen mit Tamoxifen jedoch konnte ErB-041 das Zellwachstum deutlich reduzieren im Vergleich zu alleiniger Tamoxifenbehandlung.²⁴¹ In unseren Versuchen hingegen führte die Kombination mit Chemotherapeutika zu keinem veränderten Effekt der Apoptoserate. Auch wenn ER β einigen Studien zufolge im Tiermodell entzündungshemmende Eigenschaften vorweisen konnte und ErB-041 enorm positive Effekte im Rattenversuch auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Arthritis bewirkte^{242,243,244}, so zeigte ErB-041 bei Catley et al. keinen entzündungshemmenden Effekt in vitro und in vivo in Bezug auf eine Behandlung von Asthma.²⁴⁵

ErB-041 reduzierte in vivo in Versuchen an haarlosen Mäusen die UVB-assoziierte Karzinogenese. Tumoranzahl und -größe konnten signifikant verringert werden im Vergleich zur Kontrollgruppe durch eine Behandlung mit ErB-041. Es wirkte hautkrebspräventiv, indem es den WNT/ β -Catering-Signalweg schwächte.²⁴⁶

²³⁷ Saji et al. 2005

²³⁸ Yan et al. 2011

²³⁹ Evers et al. 2014

²⁴⁰ Hinsche et al. 2015

²⁴¹ Lattrich et al. 2014

²⁴² Harris et al. 2003

²⁴³ Harris 2007

²⁴⁴ Harris 2006

²⁴⁵ Catley et al. 2008

²⁴⁶ Chaudhary et al. 2014

In neuesten Experimenten an Ovarialkarzinomzelllinien konnte ErB-041, angewendet über mehrere Tage hinweg, die Zellzahl signifikant verringern²⁴⁷, was sich mit unseren Ergebnissen der Apoptose-Steigerung an den ZR-75-1-Zellen decken könnte. Hierzu wäre auch die reine Testung der Zellzahl in unserem Ansatz interessant gewesen.

ErB-041 konnte sogar die Zellinvasion durch eine künstliche Basalmembran von den triple-negativen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 und HS578T signifikant reduzieren. Jedoch hatte es keine Auswirkung auf die Proliferation dieser beiden Zelllinien.²⁴⁸ In unseren Versuchen hingegen konnte ErB-041 an den MDA-MB-231-Zellen die Apoptoserate reduzieren.

ErB-041 lieferte in unseren Versuchen nur an den ZR-75-1-Zellen in Kombination mit Staurosporine den erwünschten Effekt einer Apoptose-Steigerung und senkte jedoch an den MDA-MB-231-Zellen bei alleiniger Anwendung die Apoptoserate. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der Literatur scheint es von diversen Faktoren abzuhängen, ob und in welchem Ausmaß ErB-041 Auswirkungen auf den programmierten Zelltod hat. Diesbezüglich werden weiterführende Untersuchungen notwendig und sinnvoll sein. Der bisher noch recht knappen Studienlage zufolge könnte ErB-041 durchaus noch einen Stellenwert in der Tumortherapie, nicht nur beim Mammakarzinom, bekommen.

5.6 PHTPP

PHTPP, als bekannter ERβ-Antagonist²⁴⁹, zeigte entgegen unserer Hypothese bei alleiniger Anwendung an den T47D-Zellen einen Apoptose-steigernden Effekt verglichen mit dem Lösungsmittel Ethanol als Referenzmedium. Die übrigen Versuchsansätze mit PHTPP brachten gar keine Veränderung der Apoptoserate. Über PHTPP wurde vor kurzem berichtet, dass es das Tumorwachstum von Brustkrebszellen in Mäusen reduzieren kann²⁵⁰, was mitunter zu unserem Apoptose-steigerndem Effekt passen könnte. PHTPP konnte ebenso die Proliferation von Prostatakarzinomzellen reduzieren,

²⁴⁷ Schüler-Toprak et al. 2017

²⁴⁸ Schüler-Toprak et al. 2016

²⁴⁹ Compton et al. 2004

²⁵⁰ Ma et al. 2017

welche durch 27-Hydroxycholesterol (27-OHC), einem Cholesterin-Metabolit, der bei Patienten mit Hypercholesterinämie erhöht ist, zur Proliferation angeregt wurden. Die alleinige Behandlung mit PHTPP führte bei Raza et al. im Gegensatz zu unserem Ergebnis zu keiner Veränderung der Proliferationsrate.²⁵¹

Ebenso führte PHTPP sowohl in vitro an Blasenkarzinomzellen als auch in vivo an Mäusen mit induziertem Blasenkarzinom zu einer Reduktion von Zellwachstum, Invasivität und Sterblichkeit.²⁵²

Weiterhin konnte PHTPP an MCF-7-Zellen eine durch Silibinin-ausgelöste Apoptoserate reduzieren. In unseren Versuchen dahingegen wurde die Apoptoserate durch PHTPP, außer bei alleiniger Anwendung an den T47D-Zellen, nicht verändert. Andererseits löst Silibinin eine ER β -vermittelte Apoptose aus.²⁵³ In unseren Versuchen wurde Staurosporine verwendet, welches auf anderem Wege den Zelltod induziert.^{254,255}

Sowohl die Literatur als auch unsere Ergebnisse sprechen gegen unsere These, PHTPP könnte die Apoptoserate von Mammakarzinomzellen senken, außer es handelt sich definitiv um eine ER β -vermittelte Apoptoseauslösung, was in unseren Versuchen mit Staurosporine nicht gegeben war.

5.7 (R,R)-THC

THC, als selektiver ER β -Antagonist²⁵⁶, konnte in der Kombination mit Staurosporine unsere Hypothese an den T47D-Zellen bestätigen und die durch Staurosporine induzierte Apoptoserate vermochte durch Behandlung mit THC gesenkt zu werden. Ähnlich zu unseren Ergebnissen hatte (R,R)-THC protektive Effekte gegen Glutamat-induzierten Zelltod an kortikalen Zellen von Ratten und hypothalamischen Zellen von Mäusen.²⁵⁷

²⁵¹ Raza et al. 2017

²⁵² Hsu et al. 2014

²⁵³ Zheng et al. 2016

²⁵⁴ Tamaoki et al. 1986

²⁵⁵ Krumman et al. 1998

²⁵⁶ Sun et al. 1999

²⁵⁷ Xia et al. 2009

THC wirkt an ER α als Agonist, jedoch mit größerer Affinität zu ER β .²⁵⁸ THC bewirkt an den Rezeptoren ER α und β gewisse Konformationsänderungen, vor allem der LBD, und unterschiedliche Muster der Koaktivatorbindung. So führt es bei ER α zur Bindung von SRC-1 (gehört zur Familie der p160 nuclear receptor coactivator proteins) und an ER β verhindert es die Bindung von SRC-1.²⁵⁹ Auch Shaiu et al. bestätigten, dass (R,R)-THC an ER α die Bindung von Koaktivatoren, wie GRIP1, ermöglicht und an ER β eher deren Bindung verhindert.²⁶⁰

Da in unseren Versuchen die ER α -negativen MDA-MB-231-Zellen (keine Veränderung der Apoptoserate) anders als die ER α -positiven T47D-Zellen (Senkung der Apoptoserate) reagiert haben, könnte der nachgewiesene Effekt in unseren Ergebnissen auch durch ER α beeinflusst sein. Dies könnte auch dazu passen, dass PHTPP, als reiner ER β -Antagonist, die T47D-Zellen genau entgegengesetzt beeinflusste.

Zu THC gibt es, nach meinem Kenntnisstand, bisher leider nur wenige Studien in Bezug auf Karzinomtherapie, Proliferation oder Apoptose.

Andere Versuche zeigten für (R,R)-THC, dass es der Hemmung durch E2, welches die N-methyl-D-aspartat-stimulierte Vasopressin-Freisetzung in magnozellulären Neuronen von Ratten hemmt, entgegenwirkte.²⁶¹

Um abschließend zu beurteilen, inwiefern (R,R)-THC die Apoptoserate von Mammakarzinomzellen beeinflussen kann, müssten weitaus mehr Versuche durchgeführt werden.

5.8 MDA-MB-231-Zellen

Wie bereits mehrfach in der Literatur gezeigt und in unseren Vorversuchen bestätigt (Daten nicht gezeigt in dieser Arbeit), reagierten die MDA-MB-231-Zellen auch in unseren Versuchen mit einer signifikanten Apoptose-Induktion auf die

²⁵⁸ Sun et al. 1999

²⁵⁹ Kraichely et al. 2000

²⁶⁰ Shaiu et al. 2002

²⁶¹ Somponpun und Sladek 2002

Chemotherapeutika Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel und auf Staurosporine verglichen mit dem jeweiligen Lösungsmittel als Referenzmedium (DMSO/EtOH).^{262,263,264,265,266}

Mit der Ausnahme - Liquiritigenin alleine in 1 µM Konzentration und in Kombination mit Staurosporine - zeigten die MDA-MB-231-Zellen nach der Behandlung mit ERβ-Agonisten entgegen unserer Hypothese hauptsächlich keine Apoptose-verändernden oder Apoptose-senkenden (ErB-041, FERb-033 + Docetaxel) Effekte verglichen mit dem jeweiligen Referenzmedium.

MDA-MB-231-Zellen, welche mit ERβ1 versehen wurden, reagierten hingegen auf die ERβ-Agonisten DPN und WAY200070, mit einer deutlichen Senkung der Proliferation, was nicht wirklich mit unseren Daten übereinstimmt.²⁶⁷ Verschiedenen Veröffentlichungen zufolge besitzen alle MDA-MB-231-Zellen ERβ1, jedoch wird das Verhältnis zu ERβ2 und ERβ5 unterschiedlich angegeben. Sie besitzen aber keinen ERα.^{268,269} In unseren Versuchen reagierten diese Zellen auf WAY200070 nämlich ohne Veränderung der Apoptoserate. Interessant wäre der ERβ1-Status der in unseren Versuchen verwendeten Zellpassagen.

Bei Lazennec et al. hemmte ERβ, welcher auf MDA-MB-231-Zellen übertragen wurde, die Zellproliferation Liganden-unabhängig.²⁷⁰

In neuesten Veröffentlichungen von Schüler-Toprak et al. reagierten MDA-MB-231-Zellen zwar mit einer verminderten Invasion durch eine künstliche Basalmembran auf die Behandlung mit den auch in unseren Versuchen verwendeten ERβ-Agonisten ErB-041, WAY20070, Liquiritigenin und 3-β-Adiol, jedoch hatten die ERβ-Agonisten alleine keinen Effekt auf die Proliferation. In diesen Versuchen wurde die Behandlung mit ERβ-Agonisten über 48 h durchgeführt. Ein ERβ-Knockdown bewirkte an diesen Zellen hingegen eine Steigerung der Proliferation und eine Steigerung der Invasionsrate, ebenso kam es zu einer Transkriptionssteigerung von Genen, die an der Regulation von

²⁶² Kruman et al. 1998

²⁶³ Yamaguchi und Murata 2015

²⁶⁴ Øverbye et al. 2017

²⁶⁵ Park et al. 2015

²⁶⁶ Zhang et al. 2005

²⁶⁷ Reese et al. 2014

²⁶⁸ Lattrich et al. 2013

²⁶⁹ Leygue et al. 1999

²⁷⁰ Lazennec et al. 2001

apoptotischen Prozessen beteiligt sind.²⁷¹ Dies passt zu unseren Ergebnissen insofern, als die ER β -Agonisten die Apoptoserate durchaus in einigen Fällen beeinflussen konnten.

Eine andere sehr neue Veröffentlichung zu MDA-MB-231-Zellen zeigte auf, dass Glycyrrhizin-Säure (Metabolit von Glycyrrhizin aus der gleichen Pflanze *Glycyrrhiza* wie auch Liquiritigenin) die Topoisomerase-II α in den Zellen sowie die Sensitivität gegenüber Etoposid erhöhte und somit die Apoptoserate steigerte. Dies steht im Gegensatz zu unseren Daten, wo Liquiritigenin in Kombination mit Etoposid an MDA-MB-231-Zellen die Apoptoserate nicht veränderte. Jedoch bleibt zu vermerken, dass Glycyrrhizin nicht als ER β -Modulator bekannt ist.²⁷²

Da die Apoptose-steigernden Effekte durch Liquiritigenin in unseren Versuchen nur bei der 1 μ M Konzentration auftraten, kam es möglicherweise zu ER-unabhängigen Effekten, wie zum Beispiel zur bereits oben beschriebenen Aktivierung von GPR30.²⁷³ ER α -vermittelt kann der Effekt an den ER α -negativen MDA-MB-231-Zellen jedenfalls nicht sein.²⁷⁴ Dies wäre zumindest eine Erklärung dafür, wieso die ER β -Agonisten in unseren Versuchen sowohl die Apoptoserate steigern als auch senken konnten, obwohl die Hinweise aus der bisherigen Forschung eher eine Steigerung der Apoptoserate hätten erwarten lassen. Auch Studien von Paruthiyil et al. erbrachten - passend zu unseren Ergebnissen - die Vermutung, dass verschiedene ER β -Agonisten nicht nur Zelllinienspezifisch, sondern auch vom jeweiligen ER β -Agonisten abhängig, diverse Gene regulieren und somit auch unterschiedliche Effekte provozieren können.²⁷⁵

Insgesamt bleibt der Effekt der ER β -Agonisten auf die MDA-MB-231-Zellen unklar und sollte Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Arbeiten werden. Möglich ist auch, dass gerade für die ER-Modulatoren noch längere Inkubationszeiten speziell für MDA-MB-231-Zellen sinnvoll wären.

²⁷¹ Schüller-Toprak et al. 2016

²⁷² Cai et al. 2017

²⁷³ Girgert et al. 2012

²⁷⁴ Lattrich et al. 2013

²⁷⁵ Paruthiyil et al. 2009

5.9 MCF-7-Zellen

Wie in der Literatur eindeutig beschrieben, sind Doxorubicin, Etoposid und Docetaxel Chemotherapeutika und damit Apoptose-induzierende Stoffe, die bekannterweise an MCF-7-Zellen Apoptose auslösen.^{276,277,278,279,280} Daher war es durchaus überraschend, dass sich die Apoptoserate der MCF-7-Zellen in unseren Versuchsreihen nach der Behandlung mit den genannten Chemotherapeutika verglichen mit dem jeweiligen Lösemittel des Chemotherapeutikums nicht veränderte beziehungsweise im Falle von Doxorubicin sogar senkte. Da es sich um vier voneinander unabhängige Versuche sowie um diverse Vorversuche (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt) handelte, ist es unwahrscheinlich, dass ein Versuchsfehler, wie zum Beispiel ein Pipettierfehler, vorliegt. Denkbar wäre, dass die MCF-7-Zellen eine Resistenz gegenüber Doxorubicin, Etoposid und Docetaxel ausgebildet haben, was an einer Veränderung des miRNA Profils sowie an einer veränderten Expression von miRNA prozessierenden Enzymen, wie Dicer und Argonaut 2, liegen könnte.²⁸¹ Micro-RNA-31 begünstigt zum Beispiel die Apoptose an Brustkrebszellen.²⁸² Ein reduzierter Level würde somit eine erschwerte Apoptose bedeuten. Auch über miR-129-3p ist bekannt, dass es eine Resistenz gegenüber Docetaxel an MCF-7-Zellen begünstigen kann.²⁸³ Allerdings scheinen auch Ceramide eine Rolle in der Resistenzentwicklung von Brustkrebszellen gegenüber Doxorubicin zu spielen.²⁸⁴ Zukünftig sollten MCF-7-Zellen unterschiedlicher Passagen bezüglich ihrer Chemotherapeutika-Sensitivität geprüft und verglichen werden.

Da die Chemotherapeutika bei alleiniger Anwendung in unseren Versuchen an den MCF-7-Zellen keine Apoptose auslösten, stellt sich natürlich die Frage, inwiefern man die Ergebnisse bezüglich der ER β -Modulatoren werten kann. Wie Treeck et al. zeigen konnten, so beeinflusst die jeweilige Isoform von ER β durchaus die Apoptoserate von

²⁷⁶ Mutschler et al. 2013

²⁷⁷ Park et al. 2015

²⁷⁸ Tavangar et al. 2017

²⁷⁹ Doroshow 1986

²⁸⁰ Rahmani-Nezhad et al. 2014

²⁸¹ Kovalchuk et al. 2008

²⁸² Körner et al. 2013

²⁸³ Zhang et al. 2015

²⁸⁴ Liu et al. 2008

MCF-7-Zellen und bestimmte Isoformen mit Deletionen in Exons konnten keine Apoptose induzieren.²⁸⁵ Da unsere MCF-7-Zellen Resistenzen gegenüber den Chemotherapeutika entwickelt zu haben scheinen, könnten natürlich auch Veränderungen am ER β geschehen sein, was dementsprechend die Reaktion auf ER β -Modulatoren verändern würde.

In unseren Versuchen an den MCF-7-Zellen ergaben sich entgegen unserer Hypothese hauptsächlich Apoptose-senkende Effekte durch ER β -Agonisten in Kombination mit Chemotherapeutika (FERb-033 + Etoposid, FERb-033 + Doxorubicin, WAY200070 + Etoposid) oder gar keine Effekte. Dies war umso überraschender, da Treeck et al. durch ER β -Knockdown an MCF-7-Zellen eine gesteigerte Zellproliferation bewirkten.²⁸⁶ Ohne die Kombination mit Chemotherapeutika führte zumindest der ER β -Agonist FERb-033, wie von uns erhofft, zu einer erhöhten Apoptose-Induktion, während Liquiritigenin, ErB-041, WAY 200070 wie auch (R,R)-THC und PHTPP keinen Einfluss auf die Apoptose-Rate von MCF-7-Zellen hatten. Übereinstimmend konnten bei Latrich et. al. ErB-041 und WAY200070 alleine die Proliferation von MCF-7-Zellen ebenfalls nicht beeinflussen.²⁸⁷

Laut An et al. besitzen MCF-7-Zellen keinen ER β .²⁸⁸ Ausgehend von dieser Aussage transfizierten Paruthiyil et al. MCF-7-Zellen mit ER β , was zu einer deutlichen Reduktion der Zellproliferation führte. Diese Reduktion der Proliferation konnte in diesen Zellen sogar durch E2 weiter reduziert werden, indem es zu einem Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus kam.²⁸⁹ Auch Lewandowski et al. vermuteten, dass die Einführung von ER β in MCF-7-Zellen die Estrogen-vermittelten Effekte schwächen und die Zellen gegenüber TNF-vermitteltem Zelltod sensibilisieren könnte. Estrogen bewirkte an MCF-7-Zellen eine Reduktion der TNF-Zelltoxizität am ehesten über eine Translokation des Tumorsuppressorproteins p53 aus dem Zellkern ins Zytoplasma, was zu einer

²⁸⁵ Treeck et al. 2008

²⁸⁶ Treeck et al. 2010

²⁸⁷ Latrich et al. 2014

²⁸⁸ Paruthiyil et al. 2004

²⁸⁹ An et al. 2001

verminderten Transkriptionsaktivität von p53 führte. Dies wiederum veränderte das Verhältnis vom anti-apoptotischen Protein bcl-2 zum pro-apoptotischen Protein bax.²⁹⁰ Diverse andere Veröffentlichungen konnten ERβ an MCF-7-Zellen hingegen nachweisen, so dass wir in unseren Versuchen „normale“ MCF-7-Zellen verwendeten.^{291,292} Interessant wäre jedoch trotzdem, inwiefern sich die Apoptoserate durch ERβ-Agonisten bei einer Hochregulierung von ERβ in unseren Zellen verändert hätte.

Wie aufgrund der bisherigen Literatur^{293,294,295} erwartet, löste Staurosporine in unseren Versuchen an den MCF-7-Zellen eine deutlich signifikante Apoptose-Induktion, verglichen mit dem Lösemittel als Referenzmedium, aus. Dass Staurosporine Apoptose induzierte und die Chemotherapeutika dies nicht taten, könnte einerseits an unterschiedlichen Passagen liegen, die jeweils für diese Versuche verwendet wurden, oder andererseits an der unterschiedlichen Art der Apoptose-Auslösung für Staurosporine und Chemotherapeutika (siehe Kapitel 3.5.1).

Allerdings führte auch die Kombination von Staurosporine mit den ERβ-Agonisten zu keiner veränderten Apoptoserate.

Da die Effekte an den MCF-7-Zellen durch die ERβ-Agonisten nicht eindeutig Apoptose-steigernd oder –senkend waren, bleibt die Überlegung, ob die gemessenen Effekte tatsächlich ERβ-vermittelt waren. Hierfür wären weitere PCR-Untersuchungen nach Behandlung mit ERβ-Agonisten interessant, die zum Beispiel bekannte ERβ-induzierte Genprodukte quantitativ bestimmen könnten.

Die ERβ-Expression an MCF-7-Zellen ist laut Treeck et al. 1000 Mal schwächer als die ERα-Expression, so dass an den MCF-7-Zellen ERα der vorherrschende Rezeptor ist.²⁹⁶ Dies könnte eine mögliche Erklärung für die eher Apoptose-senkenden Effekte durch die ERβ-Agonisten an den MCF-7-Zellen sein, da die meisten von ihnen, wenn auch mit deutlich geringerer Affinität, ebenso an ERα binden (siehe Einleitung Kapitel 1.2.5). ERα-Aktivierung mittels Estradiol führt zu Zellwachstum und aktiviert MAP-Kinasen in

²⁹⁰ Lewandowski et al. 2005

²⁹¹ Lattrich et al. 2013

²⁹² Leygue et al. 1999

²⁹³ Kruman et al. 1998

²⁹⁴ Tamaoki et al. 1986

²⁹⁵ Cyr et al. 2008

²⁹⁶ Treeck et al. 2010

MCF-7-Zellen.²⁹⁷ Jedoch sollte die in unseren Versuchen verwendete 10 nM Konzentration der ER β -Agonisten dies eigentlich verhindern.

Razandi et al. fanden Hinweise darauf, wieso E2 in MCF-7-Zellen wachstumsfördernd wirkt und in Zellen menschlicher, glatter Gefäßmuskulatur hingegen nicht. Sie vermuteten eine durch Caveolin-1 begünstigte Translokation des ER-Rezeptors an die Zellmembran in den Gefäßmuskelzellen. In MCF-7-Zellen wird die Caveolin-Synthese hingegen durch E2 unterdrückt. Caveolin-Expression in MCF-7-Zellen führte jedoch zur Translokation der ERs an die Membran.²⁹⁸ Störungen der Caveolin-Regulation könnten somit zu Translokationen der ERs an die Zellmembran und somit zu gänzlich anderen Effekten der ER-Aktivierung führen.

Andererseits könnte auch ein Pipettier- oder Berechnungsfehler ursächlich sein, dass es zu unterschiedlichen Endkonzentrationen von Chemotherapeutikum vs. Chemotherapeutikum mit ER β -Modulator gekommen ist, sodass es im zweiten Fall durch Zugabe des Modulators zu einer Verdünnung und somit zu einer geringeren Endkonzentration des Chemotherapeutikums und damit zur reduzierten Apoptoserate kam. Jedoch erscheint dies sehr unwahrscheinlich angesichts mehrerer nacheinander und unabhängig voneinander durchgeföhrter Versuche.

5.10 T47D-Zellen

In den Versuchsreihen mit T47D-Zellen wurde, wie aufgrund bisheriger Literatur erwartet, bestätigt, dass die verwendeten Apoptose-induzierenden Stoffe (Doxorubicin, Etoposid, Docetaxel und Staurosporine) gegenüber dem Vergleichsmedium DMSO bzw. DMSO und EtOH zu einer signifikanten Apoptose-Induktion führen.^{299,300,301,302,303,304}

Interessant war bei den T47D-Zellen, dass die ER β -Agonisten in drei Ansätzen (FERb-033 bei alleiniger Anwendung, FERb-033 + Docetaxel, ErB-041 + Docetaxel) die

²⁹⁷ Migliaccio et al. 1996

²⁹⁸ Razandi et al. 2002

²⁹⁹ Kruaman et al. 1998

³⁰⁰ Mutschler et al. 2013

³⁰¹ McKeague et al. 2003

³⁰² Barzegar et al. 2015

³⁰³ Zhao et al. 2009

³⁰⁴ Jiménez-Lara et al. 2010

Apoptose positiv beeinflussen konnten, aber auch der ER β -Antagonist PHTPP bei alleiniger Anwendung eine Steigerung der Apoptoserate bewirkte. Zumindest für die ER β -Agonisten korrelieren unsere Ergebnisse mit einigen Veröffentlichungen. So reduzierte die vektor-assoziierte ER β -Expression in T47D-Zellen die Estradiol-stimulierte Proliferation deutlich und senkte mit der Proliferation assoziierte Zellzyklusproteine wie Cyclin A, Cyclin E und Cdc25A (ein Regulator von Cdk2).³⁰⁵ Ähnliches fanden Hartman et al. heraus. Sie injizierten mit ER β versehene T47D-Zellen in immuninkompetente Mäuse und verglichen dann das Tumorwachstum mit dem von Mäusen, die die normalen T47D-Zellen injiziert bekommen haben. Die Tumore mit höherer ER β -Expression wuchsen deutlich weniger und waren weniger stark durchblutet.³⁰⁶ Die Annahme von Hartman et al., dass T47D-Zellen keinen ER β besitzen, war allerdings eigentlich vorher schon widerlegt.³⁰⁷ Jedoch scheint das Verhältnis ER α zu ER β 9:1 zu sein.³⁰⁸ In unseren Versuchen wurden nur normale T47D-Zellen verwendet. Dies könnte eine mögliche Erklärung zu unseren Ergebnissen für die ER β -Agonisten sein, welche in den meisten Fällen eher keine Veränderung der Apoptoserate bewirken konnten. Ein künstlich erhöhter ER β -Status hätte eventuell die Apoptose-Steigerungen stärker oder für mehr Kombinationen deutlich werden lassen.

Warum die T47D-Zellen auf den ER β -Antagonist PHTPP bei alleiniger Anwendung genauso wie auf den ER β -Agonist FERb-033 bei alleiniger Anwendung mit einer Steigerung der Apoptoserate reagiert haben, bleibt aktuell offen. Untersuchungen von Cotrim et al. lassen vermuten, dass es vom zellulären Kontext abhängt, ob ER β Apoptose oder Proliferation begünstigt. Sie postulieren, dass dabei ER α/β -Ratio, Phosphorylierungsstatus der ERs und MAPK/PI3K-Aktivitätslevel bedeutsam sind.³⁰⁹ Hierzu könnte auch passen, dass (R,R)-THC in Kombination mit Staurosporine dann doch eine Senkung der Apoptoserate verglichen mit der von Staurosporine alleine induzierten Apoptoserate bewirkte.

³⁰⁵ Ström et al. 2004

³⁰⁶ Hartman et al. 2006

³⁰⁷ Leygue et al. 1999

³⁰⁸ Ström et al. 2004

³⁰⁹ Cotrim et al. 2013

Zeigte bei uns der ER β -Agonist WAY20070 bei alleiniger Anwendung eine unveränderte Apoptoserate an T47D-Zellen verglichen mit dem Lösemittel Ethanol, so reagierten T47D-Zellen auch bei Latrich et al. ohne Veränderung der Proliferation darauf. Auch ErB-041 bei alleiniger Anwendung beeinflusste weder bei uns die Apoptose noch bei Latrich et al. die Proliferation von T47D-Zellen.³¹⁰ In Kombination mit Docetaxel konnte es jedoch in unseren Versuchen die Apoptoserate signifikant steigern.

Weiterhin zeigten Lindberg et al. an mit ER β -transfizierten T47D-Zellen, dass eine erhöhte ER β -Expression die Zellmigration reduziert und die Zelladhäsion an die Extrazellulärmatrix steigert und somit wohl die Metastasierung beeinflussen könnte.³¹¹

Zusammenfassend konnten an den T47D-Zellen FERb-033 bei alleiniger Anwendung, FERb-033 in Kombination mit Docetaxel und ErB-041 mit Docetaxel die hier untersuchte Hypothese bestätigen. Zudem wirkte auch der ER β -Antagonist PHTPP alleine apoptotisch auf T47D-Zellen. Insgesamt scheinen die ER β -Agonisten durchaus Apoptose-steigernde Effekte auf die T47D-Zellen zu haben. Dies scheint aber auch von in unseren Versuchen unbekannten und insgesamt noch nicht gänzlich geklärten, verschiedenen Faktoren abhängig zu sein. Diese könnten für unsere Ergebnisse durch weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von ER β , herausgearbeitet werden.³¹²

5.11 ZR-75-1-Zellen

Die zuletzt verwendeten ZR-75-1-Zellen wurden zum Schluss der Arbeit als einzige mit jeweils zwei Chemotherapeutika-Konzentrationen getestet, um herauszufinden, ob die Chemotherapeutikum-Konzentration den Effekt der ER β -Agonisten beeinflussen kann, was für zwei Kombinationen auch der Fall war (Effekt des ER β -Agonisten nur bei einer der zwei Konzentrationen des Apoptose-auslösenden Stoffes sichtbar). Wie auch in der Literatur bereits mehrfach beschrieben, resultierten die ZR-75-1-Zellen bei Behandlung mit einem Chemotherapeutikum oder mit Staurosporine mit einer deutlich erhöhten

³¹⁰ Latrich et al. 2014

³¹¹ Lindberg et al. 2010

³¹² Sanchez et al. 2010

Apoptoserate im Vergleich zu den Lösungsmitteln DMSO bzw. DMSO und Ethanol als Referenzmedium.^{313,314,315,316,317,318} Jedoch war die Apoptose-Induktion durch die 1 µM Docetaxel-Konzentration zu hoch, um zum Zeitpunkt des Messens noch Signifikanz zu erreichen. Außerdem war bei der Kombination von Docetaxel mit dem Lösemittel Ethanol keine Signifikanz gegenüber DMSO und Ethanol festzustellen, was die Vermutung nahe legt, dass Ethanol die Apoptoserate negativ beeinflussen könnte. Interessant wäre demnach auch, ob die ERβ-Agonisten in anderen Lösemitteln vielleicht stärkere oder eindeutigere Effekte gehabt hätten. Allerdings wurden deshalb als Referenzmedien immer die Lösemittel DMSO und/oder Ethanol verwendet, was einen durch DMSO oder Ethanol bewirkten falschen Effekt ausschließen sollte.

Bei der Kombination von Chemotherapeutika mit ERβ-Agonisten kam es bei den ZR-75-1-Zellen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Die Ergebnisse konnten die von uns aufgestellte Hypothese, dass ERβ-Agonisten zu einer erhöhten Apoptose-Induktion im Vergleich zur alleinigen Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum führen, nicht eindeutig belegen, jedoch für einige Kombinationen bestätigen (ErB-041 + 0,2 µM Staurosporine, WAY200070 + Doxorubicin in beiden Konzentrationen). Nassa et al. zeigten, dass ERβ in ZR-75-1-Zellen bereits Liganden-unabhängig die Gentranskription mittels microRNA beeinflussen kann. Durch das künstlich erhöhte Vorhandensein von ERβ in Zellen wurde unter anderem die microRNA miR-30a, welche als Onkosuppressor gilt, in diesen Zellen hochreguliert.³¹⁹

Andererseits führten FERb-033 mit beiden Staurosporine-Konzentrationen, WAY200070 mit beiden Staurosporine-Konzentrationen und 3β-Adiol mit 0,5 µM Staurosporine zu einer Senkung der Apoptoserate, verglichen mit dem bloßen jeweiligen Chemotherapeutikum. Hierbei scheint es einerseits vom ERβ-Agonisten, andererseits vom Chemotherapeutikum und dessen Konzentration abzuhängen, ob ein ERβ-Agonist Apoptose-senkend oder Apoptose-steigernd auf diese Zellen wirkt oder auch gar keinen

³¹³ Kruman et al. 1998

³¹⁴ Mutschler et al. 2013

³¹⁵ Novak-Hofer et al. 1988

³¹⁶ Leong et al. 2012

³¹⁷ Leong et al. 2007

³¹⁸ Tortora et al. 1999

³¹⁹ Nassa et al. 2014

Effekt hat. Kurebayashi et al. fanden bereits vor längerem heraus, dass die Expression gewisser Koaktivatoren, wie zum Beispiel CBP, mit der Expression von ER β korreliert, so dass diese wohl wichtige Rollen bei der ER β -Funktion besitzen.³²⁰

Die Testung der ER β -Agonisten ohne Chemotherapeutika ergab an den ZR-75-1-Zellen keine Veränderung der Apoptoserate. Wie auch bei Lattrich et al. die Zellzahl durch 3- β -Adiol in normalem FBS-haltigen Kulturmedium nicht beeinflusst wurde, so konnte 3- β -Adiol bei alleiniger Anwendung auch bei uns die Apoptose nicht beeinflussen. Im serumfreien Kulturmedium wurde die Zellzahl von ZR-75-1-Zellen bei Lattrich et al. durch 3- β -Adiol hingegen gesenkt. Dies wurde in unseren Versuchen leider nicht getestet. Weder bei uns noch bei Lattrich et al. hatte Liquiritigenin bei alleiniger Anwendung auf die ZR-75-1-Zellen einen signifikanten Effekt bezüglich Apoptose oder Zellzahl.³²¹ Ergebnisse einer anderen Studie weisen erneut darauf hin, dass der Effekt der ER β -Agonisten auch vom ER α -Status der Zellen abhängig sein könnte.³²²

Insgesamt lässt sich zu den ZR-75-1-Zellen sagen, dass sie auf einige Kombinationen aus ER β -Agonisten und Chemotherapeutikum durchaus mit einer gesteigerten Apoptoserate reagiert haben, was in Anbetracht der restlichen Literatur Hoffnung auf mögliche Therapieoptionen für bestimmte Mammakarzinompatientinnen entstehen lässt.

³²⁰ Kurebayashi et al. 2000

³²¹ Lattrich et al. 2013

³²² Lattrich et al. 2011

6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit zeigte sich, dass Östrogenrezeptor-β-Agonisten die Apoptose von Mammakarzinomzellen beeinflussen und die Chemotherapeutika-induzierte Apoptose steigern oder auch vermindern können. Während der ERβ-Agonist FERb-033 die Apoptose von ERα- und ERβ-positiven MCF-7- und T-47D-Zellen signifikant erhöhte, wurde die Apoptose von ERα-negativen MDA-MB-231-Zellen durch den Agonisten ErB-041 reduziert, aber durch den Agonisten Liquiritigenin dagegen deutlich gesteigert. In unseren Versuchen führten für jede Zelllinie verschiedene Kombinationen aus Chemotherapeutikum und ERβ-Agonist zu erhöhten oder aber zu erniedrigten Apoptose-Induktionen. Der ERβ-Agonist FERb-033 steigerte an den T47D-Zellen die durch Docetaxel induzierte Apoptose, ebenso wie der Agonist ErB-041. An den ZR-75-1-Zellen konnte der Agonist WAY200070 die durch Doxorubicin induzierte Apoptoserate und der Agonist ErB-041 die durch Staurosporine induzierte Apoptose deutlich steigern, wohingegen die Agonisten WAY200070, FERb-033 und 3β-Adiol die durch Staurosporine ausgelöste Apoptoserate an den ZR-75-1-Zellen signifikant reduzierten. Ebenso senkte WAY200070 die durch Etoposid induzierte Apoptoserate an den MCF-7-Zellen. Aber auch der Agonist FERb-033 senkte an den MCF-7-Zellen die durch Etoposid und Doxorubicin ausgelösten Apoptoseraten. An den MDA-MB-231-Zellen steigerte Liquiritigenin eindeutig die durch Staurosporine induzierte Apoptose, während der Agonist FERb-033 die durch Docetaxel ausgelöste Apoptoserate senkte.

Aber auch die ERβ-Antagonisten beeinflussten die Apoptoserate. So erhöhte der Antagonist PHTPP an den T47D-Zellen die Apoptoserate, während der Antagonist (R,R)-THC die Staurosporine-induzierte Apoptoserate signifikant reduzierte.

Bisherige Veröffentlichungen zu ERβ-Agonisten testeten immer in erster Linie die Proliferation, die Zellzahl oder das Zellwachstum, jedoch kaum die Apoptoserate, so dass es umso schwieriger ist, die Daten dieser Arbeit einzurichten und zu vergleichen. In Zusammenschau unserer Ergebnisse und der Daten aus der Literatur scheint es von diversen Faktoren (z.B. ERα-Status, vorhandene ERβ-Isoformen, Coaktivatoren, Corepressoren, Phosphorylierungsstatus von ERβ, Einwirkdauer, Apoptose-Auslöser) abzuhängen, inwiefern eine ERβ-Aktivierung die Apoptose beeinflussen kann.

Gegenstand weiterer Forschung sollte sein, all diese Faktoren aufzudecken und deren Wirkung zu analysieren.

Inwieweit ER β -Agonisten einen Stellenwert in der Karzinomtherapie einnehmen können, wird sich erst im Laufe der Zeit zeigen. Insbesondere muss die sowohl durch unsere Ergebnisse als auch in der Literatur vermutete Wirksamkeit in der Mammakarzinom-Therapie durch in-vivo-Studien verifiziert werden. Unsere Ergebnisse lassen jedenfalls auf zukünftige Therapieoptionen hoffen.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Bader, Maie; Ford, Christopher; Al-Ayadhy, Bushra; Francis, Issam (2011): Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. In: *Experimental and therapeutic medicine* 2 (3), S. 537–544. DOI: 10.3892/etm.2011.226.
- Alberts, Bruce (2011): Molekularbiologie der Zelle. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Alexander Katalinic, Stefan Hentschel Peter Kaatsch Claudia Spix (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. Hg. v. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V Robert Koch-Institut, zuletzt geprüft am 03.12.2014.
- Ali, Simak; Coombes, R. Charles (2002): ENDOCRINE-RESPONSIVE BREAST CANCER AND STRATEGIES FOR COMBATING RESISTANCE. In: *Nat Rev Cancer* 2 (2), S. 101–112. DOI: 10.1038/nrc721.
- Alzheimer, Christian (2009): Physiologie. Mit 92 Tabellen. S. 716. 5. Aufl., [Nachdr.]. Hg. v. Erwin-Josef Speckmann. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer (Studentconsult.de).
- An, J.; Tzagarakis-Foster, C.; Scharschmidt, T. C.; Lomri, N.; Leitman, D. C. (2001): Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (21), S. 17808–17814. DOI: 10.1074/jbc.M100953200.
- Bardin, A.; Boulle, N.; Lazennec, G.; Vignon, F.; Pujol, P. (2004): Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. In: *Endocr. Relat. Cancer* 11 (3), S. 537–551.
- Bardou, Valerie-Jeanne; Arpino, Grazia; Elledge, Richard M.; Osborne, C. Kent; Clark, Gary M. (2003): Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. In: *J. Clin. Oncol.* 21 (10), S. 1973–1979. DOI: 10.1200/JCO.2003.09.099.
- Barzegar, Elmira; Fouladdel, Shamileh; Movahhed, Tahereh Komeili; Atashpour, Shekoufeh; Ghahremani, Mohammad Hossein; Ostad, Seyed Nasser; Azizi, Ebrahim (2015): Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. In: *Iranian journal of basic medical sciences* 18 (4), S. 334–342.
- Baudino, T. A.; Cleveland, J. L. (2001): The Max network gone mad. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (3), S. 691–702.
- Behrends, Jan; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer (2012): Duale Reihe Physiologie. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme (DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob).

- Bertos, Nicholas R.; Park, Morag (2011): Breast cancer - one term, many entities? In: *J. Clin. Invest.* 121 (10), S. 3789–3796. DOI: 10.1172/JCI57100.
- Böcker, Werner (2012): Pathologie. 5. Aufl. München u.a: Urban & Fischer in Elsevier.
- Brandenberger, A. W.; Tee, M. K.; Jaffe, R. B. (1998): Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83 (3), S. 1025–1028. DOI: 10.1210/jcem.83.3.4788.
- Burger, Angelika M.; Gao, Yuguang; Amemiya, Yutaka; Kahn, Harriette J.; Kitching, Richard; Yang, Yili et al. (2005): A novel RING-type ubiquitin ligase breast cancer-associated gene 2 correlates with outcome in invasive breast cancer. In: *Cancer Res.* 65 (22), S. 10401–10412. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2103.
- Cai, Yun; Zhao, Boxin; Liang, Qianying; Zhang, Yunqi; Cai, Jieying; Li, Guofeng (2017): The selective effect of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid on topoisomerase II α and apoptosis in combination with etoposide on triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. In: *European journal of pharmacology* 809, S. 87–97. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.026.
- Catley, Matthew C.; Birrell, Mark A.; Hardaker, Elizabeth L.; Alba, Jorge de; Farrow, Stuart; Haj-Yahia, Saleem; Belvisi, Maria G. (2008): Estrogen receptor beta. Expression profile and possible anti-inflammatory role in disease. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326 (1), S. 83–88. DOI: 10.1124/jpet.108.136275.
- Chakrabarti, M.; Banik, N. L.; Ray, S. K. (2014): MiR-7-1 potentiated estrogen receptor agonists for functional neuroprotection in VSC4.1 motoneurons. In: *Neuroscience* 256, S. 322–333. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.10.027.
- Chakrabarti, Mrinmay; Ray, Swapan K. (2016): Experimental Procedures for Demonstration of MicroRNA Mediated Enhancement of Functional Neuroprotective Effects of Estrogen Receptor Agonists. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1366, S. 359–372. DOI: 10.1007/978-1-4939-3127-9_29.
- Chaudhary, Sandeep C.; Singh, Tripti; Talwelkar, Sarang S.; Srivastava, Ritesh K.; Arumugam, Aadithya; Weng, Zhiping et al. (2014): Erb-041, an estrogen receptor- β agonist, inhibits skin photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice by downregulating the WNT signaling pathway. In: *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 7 (2), S. 186–198. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0276.
- Chen, George G.; Zeng, Qiang; Tse, Gary Mk (2008): Estrogen and its receptors in cancer. In: *Med Res Rev* 28 (6), S. 954–974. DOI: 10.1002/med.20131.
- Cheng, Jennifer; Lee, Eun Jig; Madison, Laird D.; Lazennec, Gwendal (2004): Expression of estrogen receptor β in prostate carcinoma cells inhibits invasion and

- proliferation and triggers apoptosis. In: *FEBS Letters* 566 (1-3), S. 169–172. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.04.025.
- Choi, K. C.; Kang, S. K.; Tai, C. J.; Auersperg, N.; Leung, P. C. (2001): Estradiol up-regulates antiapoptotic Bcl-2 messenger ribonucleic acid and protein in tumorigenic ovarian surface epithelium cells. In: *Endocrinology* (142), S. 2351–2360, zuletzt geprüft am 30.10.2015.
- Clarke, Robert; Liu, Minetta C.; Bouker, Kerrie B.; Gu, Zhiping; Lee, Richard Y.; Zhu, Yuelin et al. (2003): Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. In: *Oncogene* 22 (47), S. 7316–7339. DOI: 10.1038/sj.onc.1206937.
- Clere, Nicolas; Faure, Sébastien; Martinez, Maria Carmen; Andriantsitohaina, Ramaroson (2011): Anticancer properties of flavonoids. Roles in various stages of carcinogenesis. In: *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 9 (2), S. 62–77.
- Compton, Dennis R.; Sheng, Shubin; Carlson, Kathryn E.; Rebacz, Natalie A.; Lee, In Young; Katzenellenbogen, Benita S.; Katzenellenbogen, John A. (2004): Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. In: *J. Med. Chem.* 47 (24), S. 5872–5893. DOI: 10.1021/jm049631k.
- Cotrim, C. Z.; Fabris, V.; Doria, M. L.; Lindberg, K.; Gustafsson, J.-Å; Amado, F. et al. (2013): Estrogen receptor beta growth-inhibitory effects are repressed through activation of MAPK and PI3K signalling in mammary epithelial and breast cancer cells. In: *Oncogene* 32 (19), S. 2390–2402. DOI: 10.1038/onc.2012.261.
- Cyr, Louis; Langler, Richard; Lavigne, Carole (2008): Cell cycle arrest and apoptosis responses of human breast epithelial cells to the synthetic organosulfur compound p-methoxyphenyl p-toluenesulfonate. In: *Anticancer research* 28 (5A), S. 2753–2763.
- Dang, C. V. (1999): c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (1), S. 1–11.
- Das, A.; Smith, J. A.; Gibson, C.; Varma, A. K.; Ray, S. K.; Banik, N. L. (2011): Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF- α -induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. In: *Journal of Endocrinology* 208 (2), S. 171–182. DOI: 10.1677/JOE-10-0338.
- Datta, S. R.; Brunet, A.; Greenberg, M. E. (1999): Cellular survival. A play in three Akts. In: *Genes & development* 13 (22), S. 2905–2927.
- Deroo, Bonnie J.; Buensuceso, Adrian V. (2010): Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 24 (9), S. 1703–1714. DOI: 10.1210/me.2009-0288.
- Di Wang; Lu, Jiahui; Liu, Yan; Meng, Qingfan; Xie, Jing; Wang, Zhenzuo; Teng, Lesheng (2014): Liquiritigenin induces tumor cell death through mitogen-activated

- protein kinase- (MPAKs-) mediated pathway in hepatocellular carcinoma cells. In: *BioMed research international* 2014, S. 965316. DOI: 10.1155/2014/965316.
- Dondi, Donatella; Piccolella, Margherita; Biserni, Andrea; Della Torre, Sara; Ramachandran, Balaji; Locatelli, Alessia et al. (2010): Estrogen receptor beta and the progression of prostate cancer. Role of 5alpha-androstan-3beta,17beta-diol. In: *Endocr Relat Cancer* 17 (3), S. 731–742. DOI: 10.1677/ERC-10-0032.
- Doroshow, J. H. (1986): Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135 (1), S. 330–335.
- Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Watson, P. H.; Murphy, L. C. (1997): Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82 (7), S. 2371–2374. DOI: 10.1210/jcem.82.7.4212.
- Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Watson, P. H.; Murphy, L. C. (1999): Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies. Relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. In: *Cancer Res.* 59 (3), S. 529–532.
- Dunnwald, Lisa K.; Rossing, Mary Anne; Li, Christopher I. (2007): Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. In: *Breast Cancer Research* 9 (1), R6. DOI: 10.1186/bcr1639.
- Dutta, Pinaki R.; Maity, Amit (2007): Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. In: *Cancer letters* 254 (2), S. 165–177. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.02.006.
- Elston, C. W.; Ellis, I. O. (2002): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. In: *Histopathology* 41 (3A), 151-2, discussion 152-3.
- Enmark, Eva; Pelto-Huikko, Markku; Grandien, Kaj; Lagercrantz, Svetlana; Lagercrantz, Jacob; Fried, Gabriel et al. (1997): Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern 1. In: *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 82 (12), S. 4258–4265. DOI: 10.1210/jcem.82.12.4470.
- Evan, Gerard I.; Vousden, Karen H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. In: *Nature* 411 (6835), S. 342–348. DOI: 10.1038/35077213.
- Evers, Nynke M.; van den Berg, Johannes H. J.; Wang, Si; Melchers, Diana; Houtman, René; Haan, Laura H. J. de et al. (2014): Cell proliferation and modulation of interaction of estrogen receptors with coregulators induced by ER α and ER β agonists. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, S. 376–385. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.06.002.
- Facchini, L. M.; Penn, L. Z. (1998): The molecular role of Myc in growth and transformation. Recent discoveries lead to new insights. In: *FASEB journal : official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 12 (9), S. 633–651.

Filardo, Edward J.; Quinn, Jeffrey A.; Sabo, Edmond (2008): Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. In: *Steroids* 73 (9-10), S. 870–873. DOI: 10.1016/j.steroids.2007.12.025.

Fisher, J. S.; Millar, M. R.; Majdic, G.; Saunders, P T K; Fraser, H. M.; Sharpe, R. M. (1997): Immunolocalisation of oestrogen receptor- within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. In: *Journal of Endocrinology* 153 (3), S. 485–495. DOI: 10.1677/joe.0.1530485.

Foley, E. F.; Jazaeri, A. A.; Shupnik, M. A.; Jazaeri, O.; Rice, L. W. (2000): Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. In: *Cancer Research* 60 (2), S. 245–248.

Förster, Carola; Mäkela, Sari; Wärri, Anni; Kietz, Silke; Becker, David; Hultenby, Kjell et al. (2002): Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (24), S. 15578–15583. DOI: 10.1073/pnas.192561299.

Fox, Emily M.; Davis, Rebecca J.; Shupnik, Margaret A. (2008): ERbeta in breast cancer-onlooker, passive player, or active protector? In: *Steroids* 73 (11), S. 1039–1051. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.04.006.

Girgert, Rainer; Emons, Günter; Gründker, Carsten (2012): Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells. Possible application in targeted therapy. In: *Breast Cancer Res Treat* 134 (1), S. 199–205. DOI: 10.1007/s10549-012-1968-x.

Gruvberger-Saal, Sofia K.; Bendahl, Pär-Ola; Saal, Lao H.; Laakso, Mervi; Hegardt, Cecilia; Edén, Patrik et al. (2007): Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. In: *Clin. Cancer Res.* 13 (7), S. 1987–1994. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1823.

Guerini, Vittoria; Sau, Daniela; Scaccianoce, Eugenia; Rusmini, Paola; Ciana, Paolo; Maggi, Adriana et al. (2005): The androgen derivative 5alpha-androstan-3beta,17beta-diol inhibits prostate cancer cell migration through activation of the estrogen receptor beta subtype. In: *Cancer Res.* 65 (12), S. 5445–5453. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1941.

Harrington, E. A.; Fanidi, A.; Evan, G. I. (1994): Oncogenes and cell death. In: *Current opinion in genetics & development* 4 (1), S. 120–129.

- Harris, H. A. (2006): Preclinical characterization of selective estrogen receptor beta agonists. New insights into their therapeutic potential. In: *Ernst Schering Foundation symposium proceedings* (1), S. 149–161.
- Harris, Heather A. (2007): Estrogen receptor-beta. Recent lessons from in vivo studies. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (1), S. 1–13. DOI: 10.1210/me.2005-0459.
- Harris, Heather A.; Albert, Leo M.; Leathurby, Yelena; Malamas, Michael S.; Mewshaw, Richard E.; Miller, Chris P. et al. (2003): Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. In: *Endocrinology* 144 (10), S. 4241–4249. DOI: 10.1210/en.2003-0550.
- Hartman, Johan; Lindberg, Karolina; Morani, Andrea; Inzunza, José; Ström, Anders; Gustafsson, Jan-Ake (2006): Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts. In: *Cancer Res.* 66 (23), S. 11207–11213. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0017.
- Heldring, N.; Pike, A.; Andersson, S.; Matthews, J.; Cheng, G.; Hartman, J. et al. (2007): Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. In: *Physiological Reviews* 87 (3), S. 905–931. DOI: 10.1152/physrev.00026.2006.
- Henderson, B. E.; Ross, R.; Bernstein, L. (1988): Estrogens as a cause of human cancer. The Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. In: *Cancer Research* (48), S. 246–253.
- Herynk, Matthew H.; Fuqua, Suzanne A. W. (2004): Estrogen Receptor Mutations in Human Disease. In: *Endocrine Reviews* 25 (6), S. 869–898. DOI: 10.1210/er.2003-0010.
- Hinsche, Oliver; Girgert, Rainer; Emons, Günter; Gründker, Carsten (2015): Estrogen receptor β selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. In: *International journal of oncology* 46 (2), S. 878–884. DOI: 10.3892/ijo.2014.2778.
- Hodges-Gallagher, Leslie; Valentine, Cathleen D.; Bader, Suzy El; Kushner, Peter J. (2008): Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. In: *Breast Cancer Res Treat* 109 (2), S. 241–250. DOI: 10.1007/s10549-007-9640-6.
- Hsu, Iawen; Chuang, Kun-Lung; Slavin, Spencer; Da, Jun; Lim, Wei-Xun; Pang, See-Tong et al. (2014): Suppression of ER β signaling via ER β knockout or antagonist protects against bladder cancer development. In: *Carcinogenesis* 35 (3), S. 651–661. DOI: 10.1093/carcin/bgt348.
- Hughes, Zoë A.; Liu, Feng; Platt, Brian J.; Dwyer, Jason M.; Pulicicchio, Claudine M.; Zhang, Guoming et al. (2008): WAY-200070, a selective agonist of estrogen receptor beta as a potential novel anxiolytic/antidepressant agent. In: *Neuropharmacology* 54 (7), S. 1136–1142. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.03.004.

- Iwao, K.; Miyoshi, Y.; Egawa, C.; Ikeda, N.; Noguchi, S. (2000): Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers. In: *International journal of cancer* 88 (5), S. 733–736.
- Järvinen, T. A.; Pelto-Huikko, M.; Holli, K.; Isola, J. (2000): Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. In: *The American journal of pathology* 156 (1), S. 29–35.
- JENSEN, E. V. (1962): On the mechanism of estrogen action. In: *Perspectives in biology and medicine* 6, S. 47–59.
- Jiménez-Lara, Ana M.; Aranda, Ana; Gronemeyer, Hinrich (2010): Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms. In: *Molecular cancer* 9, S. 15. DOI: 10.1186/1476-4598-9-15.
- Kandel, E. S.; Hay, N. (1999): The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. In: *Experimental cell research* 253 (1), S. 210–229. DOI: 10.1006/excr.1999.4690.
- Katzenellenbogen, B. S.; Choi, I.; Delage-Mouroux, R.; Ediger, T. R.; Martini, P. G.; Montano, M. et al. (2000): Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74 (5), S. 279–285.
- Kelley, S. T.; Thackray, V. G. (1999): Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. In: *Journal of molecular evolution* 49 (5), S. 609–614.
- Kiechle, Marion (2011): Gynäkologie und Geburtshilfe. Mit 237 Tabellen. 2. Aufl. Hg. v. Marion Kiechle. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Körner, Cindy; Keklikoglou, Ioanna; Bender, Christian; Wörner, Angelika; Münstermann, Ewald; Wiemann, Stefan (2013): MicroRNA-31 sensitizes human breast cells to apoptosis by direct targeting of protein kinase C epsilon (PKCepsilon). In: *The Journal of biological chemistry* 288 (12), S. 8750–8761. DOI: 10.1074/jbc.M112.414128.
- Kos, M.; Reid, G.; Denger, S.; Gannon, F. (2001): Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (12), S. 2057–2063. DOI: 10.1210/mend.15.12.0731.
- Kovalchuk, O.; Filkowski, J.; Meservy, J.; Ilnytskyy, Y.; Tryndyak, V. P.; Chekhun, V. F.; Pogribny, I. P. (2008): Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (7), S. 2152–2159. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0021.
- Kraichely, D. M.; Sun, J.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. (2000): 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. In: *Endocrinology* 141 (10), S. 3534–3545. DOI: 10.1210/endo.141.10.7698.
- Kruman, I.; Guo, Q.; Mattson, M. P. (1998): Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. In: *J. Neurosci. Res.* 51 (3), S. 293–308.
- Kuiper, G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. In: *PNAS* (93), S. 5925–5930.
- Kuiper, G. G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. In: *Endocrinology* 138 (3), S. 863–870. DOI: 10.1210/endo.138.3.4979.
- Kurebayashi, J.; Otsuki, T.; Kunisue, H.; Tanaka, K.; Yamamoto, S.; Sonoo, H. (2000): Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators, and corepressors in breast cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 6 (2), S. 512–518.
- Kyprianou, N.; English, H. F.; Davidson, N. E.; Isaacs, J. T. (1991): Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following estrogen ablation. In: *Cancer Research* (51), 162–166.
- Latrich, Claus; Lubig, Julia; Springwald, Anette; Goerse, Regina; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2011): Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells. In: *Anti-cancer drugs* 22 (3), S. 253–261. DOI: 10.1097/CAD.0b013e3283427bb5.
- Latrich, Claus; Schüler, Susanne; Häring, Julia; Skrzypczak, Maciej; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2014): Effects of a combined treatment with tamoxifen and estrogen receptor β agonists on human breast cancer cell lines. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 289 (1), S. 163–171. DOI: 10.1007/s00404-013-2977-7.
- Latrich, Claus; Stegerer, Anette; Häring, Julia; Schüler, Susanne; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2013): Estrogen receptor β agonists affect growth and gene expression of human breast cancer cell lines. In: *Steroids* 78 (2), S. 195–202. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.10.014.
- Lazennec, Gwendal; Bresson, Damien; Lucas, Annick; Chauveau, Corine; Vignon, Françoise (2001): ER β Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. In: *Endocrinology* 142 (9), S. 4120–4130. DOI: 10.1210/endo.142.9.8395.
- Lee, Yuan-Hao; Sun, Youping; Gerweck, Leo E.; Glickman, Randolph D. (2015): Regulation of DNA Damage Response by Estrogen Receptor β -Mediated Inhibition of Breast Cancer Associated Gene 2. In: *Biomedicines* 3 (2), S. 182–200. DOI: 10.3390/biomedicines3020182.

- Leong, Sharon; Christopherson, Richard I.; Baxter, Robert C. (2007): Profiling of apoptotic changes in human breast cancer cells using SELDI-TOF mass spectrometry. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 20 (5), S. 579–590. DOI: 10.1159/000107541.
- Leong, Sharon; McKay, Matthew J.; Christopherson, Richard I.; Baxter, Robert C. (2012): Biomarkers of breast cancer apoptosis induced by chemotherapy and TRAIL. In: *Journal of proteome research* 11 (2), S. 1240–1250. DOI: 10.1021/pr200935y.
- Lewandowski, Sebastian; Kalita, Katarzyna; Kaczmarek, Leszek (2002): Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. In: *FEBS letters* 524 (1-3), S. 1–5.
- Lewandowski, Sebastian A.; Thiery, Jerome; Jalil, Abdelali; Leclercq, Guy; Szczylak, Cezary; Chouaib, Salem (2005): Opposite effects of estrogen receptors alpha and beta on MCF-7 sensitivity to the cytotoxic action of TNF and p53 activity. In: *Oncogene* 24 (30), S. 4789–4798. DOI: 10.1038/sj.onc.1208595.
- Leygue, E.; Dotzlaw, H.; Watson, P. H.; Murphy, L. C. (1998): Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. In: *Cancer Res.* 58 (15), S. 3197–3201.
- Leygue, E.; Dotzlaw, H.; Watson, P. H.; Murphy, L. C. (1999): Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. In: *Cancer Res.* 59 (6), S. 1175–1179.
- LGC Standards, ATCC: Accessed November 4, 2014 at <http://www.lgcstandards-atcc.org>, Catalogue Search. Online verfügbar unter <http://www.lgcstandards-atcc.org/>, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
- Lindberg, Karolina; Ström, Anders; Lock, John G.; Gustafsson, Jan-Ake; Haldosén, Lars-Arne; Helguero, Luisa A. (2010): Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells. In: *Journal of cellular physiology* 222 (1), S. 156–167. DOI: 10.1002/jcp.21932.
- Liu, Changwei; Wang, Yu; Xie, Sirou; Zhou, Yijing; Ren, Xiangmei; Li, Xiaoting; Cai, Yunqing (2011): Liquiritigenin induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome c release and caspases activation in HeLa Cells. In: *Phytotherapy research : PTR* 25 (2), S. 277–283. DOI: 10.1002/ptr.3259.
- Liu, Yong-Yu; Yu, Jing Yuan; Yin, Dongmei; Patwardhan, Gauri Anand; Gupta, Vineet; Hirabayashi, Yoshio et al. (2008): A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (7), S. 2541–2551. DOI: 10.1096/fj.07-092981.

- Liu, Yuxin; Xie, Sirou; Wang, Yu; Luo, Kang; Wang, Yang; Cai, Yunqing (2012): Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 17 (6), S. 7206–7216. DOI: 10.3390/molecules17067206.
- Ma, Ran; Karthik, Govindasamy-Muralidharan; Lövrot, John; Haglund, Felix; Rosin, Gustaf; Katchy, Anne et al. (2017): Estrogen Receptor β as a Therapeutic Target in Breast Cancer Stem Cells. In: *Journal of the National Cancer Institute* 109 (3), S. 1–14. DOI: 10.1093/jnci/djw236.
- Malamas, Michael S.; Manas, Eric S.; McDevitt, Robert E.; Gunawan, Iwan; Xu, Zhang B.; Collini, Michael D. et al. (2004): Design and synthesis of aryl diphenolic azoles as potent and selective estrogen receptor-beta ligands. In: *J. Med. Chem.* 47 (21), S. 5021–5040. DOI: 10.1021/jm049719y.
- Manente, A. G.; Valenti, D.; Pinton, G.; Jithesh, P. V.; Daga, A.; Rossi, L. et al. (2013): Estrogen receptor β activation impairs mitochondrial oxidative metabolism and affects malignant mesothelioma cell growth in vitro and in vivo. In: *Oncogenesis* 2, e72. DOI: 10.1038/oncsis.2013.32.
- Mateyak, M. K.; Obaya, A. J.; Adachi, S.; Sedivy, J. M. (1997): Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 8 (10), S. 1039–1048.
- Matthews, Jason; Gustafsson, Jan-Ake (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. In: *Mol. Interv.* 3 (5), S. 281–292. DOI: 10.1124/mi.3.5.281.
- McKeague, A. L.; Wilson, D. J.; Nelson, John (2003): Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. In: *British journal of cancer* 88 (1), S. 125–131. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600675.
- McPherson, S. J.; Hussain, S.; Balanathan, P.; Hedwards, S. L.; Niranjan, B.; Grant, M. et al. (2010): Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNF mediated. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (7), S. 3123–3128. DOI: 10.1073/pnas.0905524107.
- Mendoza, R. A.; Enriquez, M. I.; Mejia, S. M.; Moody, E. E.; Thordarson, G. (2010): Interactions between IGF-I, estrogen receptor- (ER α), and ER β in regulating growth/apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. In: *Journal of Endocrinology* 208 (1), S. 1–9. DOI: 10.1677/JOE-10-0235.
- Mersereau, Jennifer E.; Levy, Nitzan; Staub, Richard E.; Baggett, Scott; Zogovic, Tatjana; Zogric, Tetjana et al. (2008): Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 283 (1-2), S. 49–57. DOI: 10.1016/j.mce.2007.11.020.

- Migliaccio, A.; Di Domenico, M.; Castoria, G.; Falco, A. de; Bontempo, P.; Nola, E.; Auricchio, F. (1996): Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. In: *The EMBO journal* 15 (6), S. 1292–1300.
- Minutolo, Filippo; Bertini, Simone; Granchi, Carlotta; Marchitiello, Teresa; Prota, Giovanni; Rapposelli, Simona et al. (2009): Structural evolutions of salicylaldoximes as selective agonists for estrogen receptor beta. In: *J. Med. Chem.* 52 (3), S. 858–867. DOI: 10.1021/jm801458t.
- Mitter, D.; Ortmann, O.; Treeck, O. (2005): Östrogenrezeptor-β-Isoformen -Funktionen und klinische Bedeutung bei Brustkrebs. In: *Zentralbl Gynakol* 127 (4), S. 228–234. DOI: 10.1055/s-2005-836563.
- Moore, J. T.; McKee, D. D.; Slentz-Kesler, K.; Moore, L. B.; Jones, S. A.; Horne, E. L. et al. (1998): Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1), S. 75–78. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8738.
- Mosselman, S.; Polman, J.; Dijkema, R. (1996): ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. In: *FEBS letters* 392 (1), S. 49–53.
- Murphy, Leigh; Cherlet, Tracy; Lewis, Anthony; Banu, Yasmin; Watson, Peter (2003): New insights into estrogen receptor function in human breast cancer. In: *Annals of medicine* 35 (8), S. 614–631.
- Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Kroemer, Heyo K.; Menzel, Sabine; Ruth, Peter (2013): Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit 257 Tabellen und 1417 Strukturformeln. 10. Aufl. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Nassa, Giovanni; Tarallo, Roberta; Giurato, Giorgio; Filippo, Maria Rosaria de; Ravo, Maria; Rizzo, Francesca et al. (2014): Post-transcriptional regulation of human breast cancer cell proteome by unliganded estrogen receptor β via microRNAs. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13 (4), S. 1076–1090. DOI: 10.1074/mcp.M113.030403.
- Novak-Hofer, I.; Küng, W.; Fabbro, D.; Matter, A.; Eppenberger, U. (1988): Regulation of ribosomal protein S6 kinase in human mammary tumor cells. Effect of estrogen, growth factors and phorbol ester. In: *Experientia* 44 (2), S. 162–166.
- Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Hiroi, H.; Orimo, A.; Hosoi, T. et al. (1998a): The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1), S. 122–126. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7893.
- Ogawa, S.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Orimo, A.; Hosoi, T.; Ouchi, Y.; Muramatsu, M. (1998b): Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax. A

- potential inhibitor of estrogen action in human. In: *Nucleic acids research* 26 (15), S. 3505–3512.
- Omoto, Yoko; Eguchi, Hidetaka; Yamamoto-Yamaguchi, Yuri; Hayashi, Shin-ichi (2003): Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta α /beta2 inhibit ER α function differently in breast cancer cell line MCF7. In: *Oncogene* 22 (32), S. 5011–5020. DOI: 10.1038/sj.onc.1206787.
- Osborne, C. K. (1998): Steroid hormone receptors in breast cancer management. In: *Breast cancer research and treatment* 51 (3), S. 227–238.
- Øverbye, Anders; Holsæter, Ann Mari; Markus, Fusser; Škalko-Basnet, Nataša; Iversen, Tore-Geir; Torgersen, Maria Lyngaa et al. (2017): Ceramide-containing liposomes with doxorubicin. Time and cell-dependent effect of C6 and C12 ceramide. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 76921–76934. DOI: 10.18632/oncotarget.20217.
- Pak, Toni R.; Chung, Wilson C. J.; Lund, Trent D.; Hinds, Laura R.; Clay, Colin M.; Handa, Robert J. (2005): The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. In: *Endocrinology* 146 (1), S. 147–155. DOI: 10.1210/en.2004-0871.
- Palmieri, C.; Cheng, G. J.; Saji, S.; Zelada-Hedman, M.; Warri, A.; Weihua, Z. et al. (2002): Estrogen receptor beta in breast cancer. In: *Endocr Relat Cancer* 9 (1), S. 1–13.
- Park, Sang O.; Yoo, Young Bum; Kim, Yong Hun; Baek, Kwang Je; Yang, Jung-Hyun; Choi, Pil Cho et al. (2015): Effects of combination therapy of docetaxel with selenium on the human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. In: *Annals of surgical treatment and research* 88 (2), S. 55–62. DOI: 10.4174/asstr.2015.88.2.55.
- Paruthiyil, Sreenivasan; Cvoro, Aleksandra; Zhao, Xiaoyue; Wu, Zhijin; Sui, Yunxia; Staub, Richard E. et al. (2009): Drug and cell type-specific regulation of genes with different classes of estrogen receptor beta-selective agonists. In: *PLoS one* 4 (7), e6271. DOI: 10.1371/journal.pone.0006271.
- Paruthiyil, Sreenivasan; Parmar, Hema; Kerekatte, Vaishali; Cunha, Gerald R.; Firestone, Gary L.; Leitman, Dale C. (2004): Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. In: *Cancer Res.* 64 (1), S. 423–428.
- Perillo, B.; Sasso, A.; Abbondanza, C.; Palumbo, G. (2000): 17 β -Estradiol inhibits apoptosis in MCF-7 cells, inducing bcl-2 expression via two estrogen-responsive elements present in the coding sequence. In: *Molecular and Cellular Biology* (20), S. 2890–2901.
- Pfützner, Wolfgang (2003): Karzinogenese. Gestörte Kontrollsysteme und Optionen für die molekulare Therapie. In: *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 1 (6), S. 444–449. DOI: 10.1046/j.1610-0387.2003.03008.x.

- Poola, Indra; Abraham, Jessy; Liu, Aiyy (2002): Estrogen receptor beta splice variant mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82 (2-3), S. 169–179.
- Price, R. H.; Butler, C. A.; Webb, P.; Uht, R.; Kushner, P.; Handa, R. J. (2001): A splice variant of estrogen receptor beta missing exon 3 displays altered subnuclear localization and capacity for transcriptional activation. In: *Endocrinology* 142 (5), S. 2039–2049. DOI: 10.1210/endo.142.5.8130.
- Prof. Dr. Rolf Kreienberg et al. (2012): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Hg. v. Deutschen Krebsgesellschaft e.V und Deutschen Krebshilfe e.V Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF.
- Promega Corporation (Hg.): Caspase-Glo® 3/7 Assay. Instructions for Use of Products G8090, G8091, G8092 and G8093. Online verfügbar unter https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical_bulletins/101/caspase-glo_3_7_assay_protocol.pdf.
- Promega Corporation (Hg.): CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Instructions for use of Products G8080, G8081 AND G8082. Online verfügbar unter https://www.promega.de/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/cell_titer-blue%20cell%20viability%20assay%20protocol.pdf.
- Pujol, P.; Rey, J. M.; Nirde, P.; Roger, P.; Gastaldi, M.; Laffargues, F. (1998): Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. In: *Cancer Research* (58), S. 5367–5373.
- Qiu, Y.; Waters, C. E.; Lewis, A. E.; Langman, M. J. S.; Eggo, M. C. (2002): Oestrogen-induced apoptosis in colonocytes expressing oestrogen receptor beta. In: *J. Endocrinol.* 174 (3), S. 369–377.
- Rahmani-Nezhad, Samira; Safavi, Maliheh; Pordeli, Mahboobeh; Ardestani, Sussan Kabudanian; Khosravani, Leila; Pourshojaei, Yaghoub et al. (2014): Synthesis, in vitro cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. In: *European journal of medicinal chemistry* 86, S. 562–569. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.017.
- Rastelli, Francesca; Crispino, Sergio (2008): Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. In: *Tumori* 94 (3), S. 370–383.
- Raza, Shaneabbas; Meyer, Megan; Goodyear, Casey; Hammer, Kimberly D. P.; Guo, Bin; Ghribi, Othman (2017): The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol stimulates cell proliferation via ER β in prostate cancer cells. In: *Cancer cell international* 17, S. 52. DOI: 10.1186/s12935-017-0422-x.
- Razandi, Mahnaz; Oh, Philip; Pedram, Ali; Schnitzer, Jan; Levin, Ellis R. (2002): ERs associate with and regulate the production of caveolin. Implications for signaling and

- cellular actions. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (1), S. 100–115. DOI: 10.1210/mend.16.1.0757.
- Reese, Jordan M.; Suman, Vera J.; Subramaniam, Malayannan; Wu, Xianglin; Negron, Vivian; Gingery, Anne et al. (2014): ER β 1. Characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ER α -positive and -negative breast cancer. In: *BMC cancer* 14, S. 749. DOI: 10.1186/1471-2407-14-749.
- Riedl, Stefan J.; Shi, Yigong (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (11), S. 897–907. DOI: 10.1038/nrm1496.
- Roger, P.; Sahla, M. E.; Mäkelä, S.; Gustafsson, J. A.; Baldet, P.; Rochefort, H. (2001): Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. In: *Cancer Res.* 61 (6), S. 2537–2541.
- Ruddy, Samantha C.; Lau, Rosanna; Cabrita, Miguel A.; McGregor, Chelsea; McKay, Bruce C.; Murphy, Leigh C. et al. (2014): Preferential estrogen receptor β ligands reduce Bcl-2 expression in hormone-resistant breast cancer cells to increase autophagy. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 13 (7), S. 1882–1893. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1066.
- Saji, Shigehira; Hirose, Makiko; Toi, Masakazu (2005): Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. In: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 56 Suppl 1, S. 21–26. DOI: 10.1007/s00280-005-0107-3.
- Sanchez, Mélanie; Picard, Nathalie; Sauvé, Karine; Tremblay, André (2010): Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 21 (2), S. 104–110. DOI: 10.1016/j.tem.2009.09.007.
- Sareddy, Gangadhara R.; Nair, Binoj C.; Gonugunta, Vijay K.; Zhang, Quan-guang; Brenner, Andrew; Brann, Darrell W. et al. (2012): Therapeutic significance of estrogen receptor β agonists in gliomas. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 11 (5), S. 1174–1182. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0960.
- Schüler-Toprak, Susanne; Häring, Julia; Inwald, Elisabeth C.; Moehle, Christoph; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2016): Agonists and knockdown of estrogen receptor β differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. In: *BMC cancer* 16 (1), S. 951. DOI: 10.1186/s12885-016-2973-y.
- Schüler-Toprak, Susanne; Moehle, Christoph; Skrzypczak, Maciej; Ortmann, Olaf; Treeck, Oliver (2017): Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 319. DOI: 10.1186/s12885-017-3246-0.
- Shanle, Erin K.; Hawse, John R.; Xu, Wei (2011): Generation of stable reporter breast cancer cell lines for the identification of ER subtype selective ligands. In: *Biochemical pharmacology* 82 (12), S. 1940–1949. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.08.026.

- Shaw, L. E.; Sadler, A. J.; Pugazhendhi, D.; Darbre, P. D. (2006): Changes in oestrogen receptor-alpha and -beta during progression to acquired resistance to tamoxifen and fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) in MCF7 human breast cancer cells. In: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99 (1), S. 19–32. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2005.11.005.
- Shiau, Andrew K.; Barstad, Danielle; Radek, James T.; Meyers, Marvin J.; Nettles, Kendall W.; Katzenellenbogen, Benita S. et al. (2002): Structural characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism. In: *Nature structural biology* 9 (5), S. 359–364. DOI: 10.1038/nsb787.
- Sikora, Matthew J.; Cordero, Kevin E.; Larios, Jose M.; Johnson, Michael D.; Lippman, Marc E.; Rae, James M. (2009): The androgen metabolite 5alpha-androstan-3beta,17beta-diol (3betaAdiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor: implications for aromatase inhibitor resistance. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 115 (2), S. 289–296. DOI: 10.1007/s10549-008-0080-8.
- Singletary, S. Eva; Greene, Frederick L. (2003): Revision of breast cancer staging: the 6th edition of the TNM Classification. In: *Semin Surg Oncol* 21 (1), S. 53–59. DOI: 10.1002/ssu.10021.
- Skliris, George P.; Munot, Kailas; Bell, Sandra M.; Carder, Pauline J.; Lane, Sally; Horgan, Kieran et al. (2003): Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. In: *The Journal of pathology* 201 (2), S. 213–220. DOI: 10.1002/path.1436.
- Soengas, M. S.; Capodieci, P.; Polksky, D.; Mora, J.; Esteller, M.; Opitz-Araya, X. et al. (2001): Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. In: *Nature* 409 (6817), S. 207–211. DOI: 10.1038/35051606.
- Somponpun, Suwit; Sladek, Celia D. (2002): Role of estrogen receptor-beta in regulation of vasopressin and oxytocin release in vitro. In: *Endocrinology* 143 (8), S. 2899–2904. DOI: 10.1210/endo.143.8.8946.
- Speirs, V.; Malone, C.; Walton, D. S.; Kerin, M. J.; Atkin, S. L. (1999): Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. In: *Cancer Res.* 59 (21), S. 5421–5424.
- Stendahl, Maria; Rydén, Lisa; Nordenskjöld, Bo; Jönsson, Per Ebbe; Landberg, Göran; Jirström, Karin (2006): High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (15), S. 4614–4618. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0248.
- Ström, Anders; Hartman, Johan; Foster, James S.; Kietz, Silke; Wimalasena, Jay; Gustafsson, Jan-Ake (2004): Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (6), S. 1566–1571. DOI: 10.1073/pnas.0308319100.

- Sun, J.; Meyers, M. J.; Fink, B. E.; Rajendran, R.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. (1999): Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. In: *Endocrinology* 140 (2), S. 800–804. DOI: 10.1210/endo.140.2.6480.
- Sundermann, Erin E.; Maki, Pauline M.; Bishop, Jeffrey R. (2010): A review of estrogen receptor α gene (ESR1) polymorphisms, mood, and cognition. In: *Menopause* 17 (4), S. 874–886. DOI: 10.1097/gme.0b013e3181df4a19.
- Tacar, Oktay; Sriamornsak, Pornsak; Dass, Crispin R. (2013): Doxorubicin. An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 65 (2), S. 157–170. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
- Tamaoki, T.; Nomoto, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F. (1986): Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺-dependent protein kinase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135 (2), S. 397–402.
- Tavangar, Farzaneh; Sepehri, Hamid; Saghaeian Jazi, Marie; Asadi, Jahanbakhsh (2017): Amphotericin B potentiates the anticancer activity of doxorubicin on the MCF-7 breast cancer cells. In: *Journal of chemical biology* 10 (3), S. 143–150. DOI: 10.1007/s12154-017-0172-1.
- Tocris (2016): Certificate of Analysis. Hg. v. Tocris. Online verfügbar unter https://www.tocris.com/products/ferb-033_3523#product-details.
- Tong, Dan; Schuster, Eva; Seifert, Michael; Czerwenka, Klaus; Leodolte, Sepp; Zeillinger, Robert (2002): Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. In: *Breast Cancer Res Treat* 71 (3), S. 249–255.
- Tortora, G.; Caputo, R.; Pomatico, G.; Pepe, S.; Bianco, A. R.; Agrawal, S. et al. (1999): Cooperative inhibitory effect of novel mixed backbone oligonucleotide targeting protein kinase A in combination with docetaxel and anti-epidermal growth factor-receptor antibody on human breast cancer cell growth. In: *Clin. Cancer Res.* 5 (4), S. 875–881.
- Treeck, Oliver; Juhasz-Boess, Ingolf; Latrich, Claus; Horn, Felicitas; Goerse, Regina; Ortmann, Olaf (2008): Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. In: *Breast Cancer Res. Treat.* 110 (3), S. 507–520. DOI: 10.1007/s10549-007-9749-7.
- Treeck, Oliver; Latrich, Claus; Springwald, Anette; Ortmann, Olaf (2010): Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. In: *Breast Cancer Res Treat* 120 (3), S. 557–565. DOI: 10.1007/s10549-009-0413-2.
- Treeck, Oliver; Pfeiler, Georg; Horn, Felicitas; Federhofer, Bettina; Houlihan, Helena; Vollmer, Angelika; Ortmann, Olaf (2007): Novel estrogen receptor beta transcript

- variants identified in human breast cancer cells affect cell growth and apoptosis of COS-1 cells. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 264 (1-2), S. 50–60. DOI: 10.1016/j.mce.2006.10.003.
- Warner, Margaret; Gustafsson, Jan-Ake (2010): The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396 (1), S. 63–66. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.144.
- Weihua, Z.; Saji, S.; Mäkinen, S.; Cheng, G.; JENSEN, E. V.; Warner, M.; Gustafsson, J. A. (2000): Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (11), S. 5936–5941.
- Weihua, Zhang; Lathe, Richard; Warner, Margaret; Gustafsson, Jan-Ake (2002): An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (21), S. 13589–13594. DOI: 10.1073/pnas.162477299.
- Weyerstahl, Thomas; Stauber, Manfred (2013): Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe).
- Wu, Xianglin; Subramaniam, Malayannan; Grygo, Sarah B.; Sun, Zhifu; Negron, Vivian; Lingle, Wilma L. et al. (2011): Estrogen receptor-beta sensitizes breast cancer cells to the anti-estrogenic actions of endoxifen. In: *Breast Cancer Research* 13 (2), R27. DOI: 10.1186/bcr2844.
- Xia, Y.; Xing, J. Z.; Krukoff, T. L. (2009): Neuroprotective effects of R,R-tetrahydrochrysene against glutamate-induced cell death through anti-excitotoxic and antioxidant actions involving estrogen receptor-dependent and -independent pathways. In: *Neuroscience* 162 (2), S. 292–306. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.068.
- Yager, James D.; Davidson, Nancy E. (2006): Estrogen carcinogenesis in breast cancer. In: *N. Engl. J. Med.* 354 (3), S. 270–282. DOI: 10.1056/NEJMra050776.
- Yamaguchi, Masayoshi; Murata, Tomiyasu (2015): Exogenous regucalcin suppresses the proliferation of human breast cancer MDA-MB-231 bone metastatic cells in vitro. In: *Molecular medicine reports* 12 (5), S. 7801–7805. DOI: 10.3892/mmr.2015.4352.
- Yan, Max; Rayoo, Mukta; Takano, Elena A.; Fox, Stephen B. (2011): Nuclear and cytoplasmic expressions of ER β 1 and ER β 2 are predictive of response to therapy and alters prognosis in familial breast cancers. In: *Breast Cancer Res Treat* 126 (2), S. 395–405. DOI: 10.1007/s10549-010-0941-9.
- Yu, H.; Rohan, T. (2000): Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (18), S. 1472–1489.

- Zhang, Baolin; Zhang, Yaqin; Dagher, Marie-Claire; Shacter, Emily (2005): Rho GDP dissociation inhibitor protects cancer cells against drug-induced apoptosis. In: *Cancer Res.* 65 (14), S. 6054–6062. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0175.
- Zhang, Shi-ping; Zhou, Yi-jing; Liu, Yan; Cai, Yun-qing (2009): Effect of liquiritigenin, a flavanone existed from Radix glycyrrhizae on pro-apoptotic in SMMC-7721 cells. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 47 (4), S. 693–701. DOI: 10.1016/j.fct.2008.12.015.
- Zhang, Yuan; Wang, Yu; Wei, Yifang; Li, Mengyang; Yu, Shentong; Ye, Mingxiang et al. (2015): MiR-129-3p promotes docetaxel resistance of breast cancer cells via CP110 inhibition. In: *Scientific reports* 5, S. 15424. DOI: 10.1038/srep15424.
- Zhao, Chunyan; Dahlman-Wright, Karin; Gustafsson, Jan-Ake (2008): Estrogen receptor beta: an overview and update. In: *Nucl Recept Signal* 6, e003. DOI: 10.1621/nrs.06003.
- Zhao, Chunyan; Dahlman-Wright, Karin; Gustafsson, Jan-Åke (2010): Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. In: *J. Biol. Chem.* 285 (51), S. 39575–39579. DOI: 10.1074/jbc.R110.180109.
- Zhao, Tian-suo; Jiang, Hai-ping; Wang, Xiu-chao; Ren, He; Hao, Ji-hui (2009): Apoptosis resistance induced by leptin and its mechanism in breast cancer cells. In: *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 31 (9), S. 651–654.
- Zheng, Nan; Liu, Lu; Liu, Weiwei; Zhang, Ping; Huang, Huai; Zang, Linghe et al. (2016): ER β up-regulation was involved in silibinin-induced growth inhibition of human breast cancer MCF-7 cells. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 591, S. 141–149. DOI: 10.1016/j.abb.2016.01.002.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
FBS	Fetales bovines Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERα	Östrogenrezeptor/Estrogenrezeptor alpha
ERβ	Östrogenrezeptor/Estrogenrezeptor beta
PR	Progesteronrezeptor
HER-2-neu	human epidermal growth factor receptor 2
ml	Milliliter
mM	Millimolar
EtOH	Ethanol
Stauro	Staurosporine
Liqui	Liquiritigenin
Doxo	Doxorubicin
Doce	Docetaxel
WAY	WAY 200070
5-FU	5-Floururacil
DMF	Dimethylformamid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
BRCA	Breast Cancer Gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
DCIS	duktales Carcinoma in situ
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
BET	brusterhaltende Therapie
DHT	5α-Dihydrotestosteron
E2	17β-Estradiol
3β-HSD	3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
LH	luteinisierendes Hormon
TNFα	Tumornekrosefaktor α
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose

DPN	2,3-bis-(4-hydroxyphenyl)-Propionitril
IGF	Insulin-like Growth Factor
AS	Aminosäure
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
VEGF	Vascular endothelial growth factor
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
h	Stunde

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Mammakarzinom'	7
Tabelle 2: Zellreihe MDA-MB-231 1. Ansatz	42
Tabelle 3: Zellreihe MDA-MB-231 2. Ansatz	43
Tabelle 4: Zellreihe MDA-MB-231 3. Ansatz	44
Tabelle 5: Zellreihe MCF-7 1. Ansatz	45
Tabelle 6: Zellreihe MCF-7 2. Ansatz	46
Tabelle 7: Zellreihe T47D 1. Ansatz	47
Tabelle 8: Zellreihe T47D 2. Ansatz	48
Tabelle 9: Zellreihe ZR-75-1 1. Ansatz	49
Tabelle 10: Verwendete Reagenzien, Materialen und Geräte.....	52

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des humanen ER β -Gens sowie des Proteins mit funktionalen Domänen	13
Abbildung 2: ER β -Isoformen.....	14
Abbildung 3: Vier verschiedene Signalwege der ER Aktivität.....	16
Abbildung 4: Schema des ER α und ER β Ungleichgewichts bei der Östrogen-abhängigen Tumor Progression.	21
Abbildung 5: Proliferation von MCF-10A- und MCF-7-Zellen transfiziert mit ER β shRNA plasmid.	23
Abbildung 6: Nachweis von mRNA unterschiedlicher ER β -Isoformen in verschiedenen Brustkrebszelllinien.....	27
Abbildung 7: Aktivierung des extrinsischen Wegs der Apoptose durch Fas-Todesrezeptoren.	29
Abbildung 8: Der intrinsische Weg der Apoptose.	30
Abbildung 9: Schritte in der Karzinogenese	32
Abbildung 10: Möglicher Ablauf einer Karzinogenese	33
Abbildung 11: Möglichkeiten der Apoptose-Fehlregulation	34

Abbildung 12: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten.....	57
Abbildung 13: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten.....	57
Abbildung 14: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033 mit verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	58
Abbildung 15: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	58
Abbildung 16: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, **Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	59
Abbildung 17: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033.....	60
Abbildung 18: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + FERb-033.....	60
Abbildung 19: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + FERb-033.....	61
Abbildung 20: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033.....	62
Abbildung 21: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033.....	63
Abbildung 22: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + FERb-033. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Etoposid + EtOH,	

**Signifikanz gegenüber den Lösemitteln DMSO mit EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	63
Abbildung 23: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Etoposid + FERb-033.	64
Abbildung 24: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033.....	65
Abbildung 25: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033.....	65
Abbildung 26: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + FERb-033.....	66
Abbildung 27: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + FERb-033.	66
Abbildung 28: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033.....	67
Abbildung 29: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033.	68
Abbildung 30: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + FERb-033.	68
Abbildung 31: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + FERb-033.	69
Abbildung 32: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten.	70
Abbildung 33: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten.	70
Abbildung 34: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070 mit verschiedenen Inkubationszeiten.	71
Abbildung 35: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und WAY200070.....	71

Abbildung 36: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070.....	72
Abbildung 37: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070.....	73
Abbildung 38: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + WAY200070.....	73
Abbildung 39: : %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + FERb-033.	74
Abbildung 40: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070.....	75
Abbildung 41: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070.	75
Abbildung 42: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + WAY200070.	76
Abbildung 43: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Etoposid + WAY200070.....	76
Abbildung 44: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070.....	77
Abbildung 45: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070.....	78
Abbildung 46: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + WAY200070.....	78
Abbildung 47: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + WAY200070.....	79
Abbildung 48: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070.....	80

Abbildung 49: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070.....	80
Abbildung 50: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + WAY200070.....	81
Abbildung 51: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + WAY200070.....	81
Abbildung 52: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit EtOH und 3-β-Adiol.....	82
Abbildung 53: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO+ EtOH, Staurosporine + EtOH mit verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + 3-β-Adiol.....	83
Abbildung 54: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen EtOH und Etoposid + 3-β-Adiol	84
Abbildung 55: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Doxorubicin + 3-β-Adiol	84
Abbildung 56: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen + EtOH und Docetaxel + WAY200070.....	85
Abbildung 57: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.	86
Abbildung 58: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.	87
Abbildung 59: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.....	87
Abbildung 60: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO und Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.....	88

Abbildung 61: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.....	89
Abbildung 62: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin.....	90
Abbildung 63: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine und Staurosporine + Liquiritigenin.....	90
Abbildung 64: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + Liquiritigenin.....	91
Abbildung 65: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin.....	92
Abbildung 66: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin...92	92
Abbildung 67: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid und Etoposid + Liquiritigenin....	93
Abbildung 68: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen und Etoposid + Liquiritigenin.....	93
Abbildung 69: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin.....	94
Abbildung 70: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin.....	95
Abbildung 71: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin und Doxorubicin + Liquiritigenin.....	95
Abbildung 72: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen und Doxorubicin + Liquiritigenin.....	96
Abbildung 73: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin.....	97
Abbildung 74: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin.....	97

Abbildung 75: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin.	98
Abbildung 76: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel und Docetaxel + Liquiritigenin.	98
.....	98
Abbildung 77: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst) mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten.....	99
Abbildung 78: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst).	100
.....	100
Abbildung 79: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH (Kontrolle) und ErB-041 (in EtOH gelöst)..	100
Abbildung 80: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO (Kontrolle) und ErB-041 (in DMSO gelöst).	101
.....	101
Abbildung 81: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO, DMSO + EtOH, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + ErB-041.....	102
Abbildung 82: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Staurosporine in verschiedenen Konzentrationen und Staurosporine + ErB-04.....	102
Abbildung 83: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041.....	104
Abbildung 84: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041.....	104
Abbildung 85: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Etoposid + EtOH und Etoposid + ErB-041.....	105
Abbildung 86: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Etoposid in verschiedenen Konzentrationen und Etoposid + ErB-041 (in DMSO gelöst).....	105
Abbildung 87: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041.....	106
Abbildung 88: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041.....	107

Abbildung 89: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Doxorubicin + EtOH und Doxorubicin + ErB-041.....	107
Abbildung 90: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen und Doxorubicin + ErB-041 (in DMSO gelöst).	108
Abbildung 91: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041.....	109
Abbildung 92: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041.	109
Abbildung 93: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Docetaxel + EtOH und Docetaxel + ErB-041.	110
Abbildung 94: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit DMSO, Docetaxel in verschiedenen Konzentrationen und Docetaxel + ErB-041 (in DMSO gelöst).....	110
Abbildung 95: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP.	111
Abbildung 96: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP.	112
Abbildung 97: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und PHTPP.	112
Abbildung 98: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP.	113
Abbildung 99: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP.	114
Abbildung 100: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + PHTPP.	114
Abbildung 101: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC.	115
Abbildung 102: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC.	116
Abbildung 103: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit EtOH und (R,R)-THC.	116

Abbildung 104: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC.....	117
Abbildung 105: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC.....	117
Abbildung 106: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit DMSO + EtOH, Staurosporine + EtOH und Staurosporine + (R,R)-THC.....	118
Abbildung 107: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	119
Abbildung 108: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	120
Abbildung 109: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test ..	121
Abbildung 110: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MDA-MB-231-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	122
Abbildung 111: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	123
Abbildung 112: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die	

Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	124
Abbildung 113: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	125
Abbildung 114: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von MCF-7-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	126
Abbildung 115: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	127
Abbildung 116: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Antagonisten PHTPP und THC. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	128
Abbildung 117: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033 und WAY200070 in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	129
Abbildung 118: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von T47D-Zellen nach Behandlung mit den beiden ER β -Antagonisten in Kombination mit Staurosporine. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Staurosporine + EtOH, nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test.....	130
Abbildung 119: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070 und 3-Beta-Adiol. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße	

DMSO oder EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test..... 131
Abbildung 120: %-Apoptose-Veränderung (normalisierte Werte bezüglich FBS) von ZR-75-1-Zellen nach Behandlung mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin, ErB-041, FERb-033, WAY200070 und 3-Beta-Adiol in Kombination mit den Apoptose-Induktoren Staurosporine, Etoposid, Doxorubicin und Docetaxel. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-5 unabhängigen Versuchen sowie die Standardabweichung. *Signifikanz gegenüber der Referenzgröße Chemotherapeutikum in DMSO oder Chemotherapeutikum in EtOH (je nach Lösemittel des ER β -Agonisten), nachgewiesen durch einen einseitigen T-Test. .. 132

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Dietlmeier
Vorname	<u>Katharina</u> Maria
Geburtsdatum	15. März 1988
Geburtsort	Regensburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Bekenntnis	römisch – katholisch

Hochschulausbildung

Okt. 2007- Mai 2014	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
6. Mai 2014	2. Ärztliche Prüfung, Note „gut“
17. Sept. 2009	1. Ärztliche Prüfung, Note „gut“

Assistenzarztweiterbildung für Allgemeinmedizin

Feb. 2015 - Dez. 2015	Prof. Dr. Sieber, Abteilung für Allgemeine Innere Medizin und Geriatrie Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg
Jan. 2016 - Juli 2016	Prof. Dr. Seelbach-Göbel, Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum St. Hedwig, Barmherzige Brüder, Regensburg
Aug. 2016 - Dez. 2016	Dr. Merl, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Krankenhaus Barmherzige Brüder St. Barbara, Schwandorf; im Rahmen einer Assistenzarztrotation des Klinikums St. Hedwig
Dez. 2016 - März 2017	Prof. Dr. Seelbach-Göbel, Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
April 2017 - Sept. 2017	Dr. Merl, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Krankenhaus Barmherzige Brüder St. Barbara, Schwandorf

Praktisches Jahr

Feb. 2013 - Juni 2013	PD Dr. Pech, Abteilung für Gastroenterologie
	PD Dr. Sick, Abteilung für Kardiologie
	Dr. Rockmann, Notfallzentrum
Juni 2013 - Aug. 2013	Krankenhaus Barmherzige Brüder, Regensburg
	Prof. Dr. Nerlich, Klinik für Unfallchirurgie
	Prof. Dr. Schlitt, Klinik für Viszeralchirurgie

Lebenslauf

Uniklinikum Regensburg

Aug. 2018 - Okt. 2013 Dr. Kadek Sri Mulyawati, Onkologische Chirurgie,

RSUP Sanglah Denpasar, Bali, Indonesien

Okt. 2013 - Jan. 2013 Prof. Dr. Krauß, Frauenklinik, Klinikum Passau

Famulaturen

Sept. 2010

Prof. Dr. Ortmann, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Caritas-Krankenhaus St. Josef der Universität Regensburg

Feb. - März 2011

Dr. Kindler, Allgemeinmedizinische Praxis, Schierling Notaufnahme am Bangkok Hospital Trat, Koh Chang, Thailand

März 2012

Aug./Okt. 2012 Prof. Dr. Landthaler, Abteilung Dermatologie, Uniklinikum Regensburg

Extracurriculäre Interessen und Engagement

WS 10/11

Wahlfach Notfallmedizin

SS 11 - WS 11/12

Wahlfach Akupunktur

Juli 2011 - Dez 2014

Aktives Mitglied Migrantenmedizin Regensburg e.V., Amt der Schriftführerin (Mai 2012 – Mai 2014)

Zusätzliche berufliche Erfahrungen

April - Sept. 2012

SHK bei der Ethikkommission Regensburg

Aug. 2006 - April 2011

Geringfügig Beschäftigte bei Fa. Xanaka/GDM

Schulbildung

Sept. 1998 - Juni 2007

Burkhart-Gymnasium Mallersdorf-Pfaffenberg

Abitur Juni 2007

Note 1,3

10 Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Bei Herrn Prof. Dr. Olaf Ortmann bedanke ich mich für die Möglichkeit, im Labor seines Institutes arbeiten zu dürfen. Ganz besonders möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck bedanken, der mir dieses interessante Thema überlassen und mich sowohl während der experimentellen Phase als auch während der schriftlichen Ausarbeitung jederzeit hervorragend unterstützt und betreut hat. Die hilfreichen Ratschläge und Tipps haben mir die Fertigstellung dieser Arbeit enorm erleichtert. Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Frau Helena Lowak für die intensive und stets aufmunternde Betreuung bei der Planung sowie der praktischen Ausführung meiner Experimente. Besonders bei der Handhabung der Geräte, in der Durchführung der Zellkultur und bei der Ausführung der Versuchsarbeiten stand sie mir freundlichst mit Rat und Tat zur Seite. Auch bei Frau Julia Häring möchte ich mich für das stets angenehme und freundliche Arbeitsklima im Labor bedanken.

Größter Dank gilt insbesondere meinen Eltern, Brigitte und Gerhard Dietlmeier, und meiner gesamten Familie, die mich während dieser Arbeit unermüdlich unterstützten und mir das Medizinstudium sowie die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten. Ganz besonderer Dank gilt auch meinem Freund Martin für seine Geduld und stets aufbauenden Worte, während der Fertigstellung dieser Arbeit. Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meinen Freundinnen, insbesondere Melanie Frick, Caroline Güntner, Tatjana Roth und Christiane Schellenberger bedanken, die mir stets motivierend beistanden.

11 Erklärung zur eigenhändigen Anfertigung

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe des Caritaskrankenhauses St. Josef Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann) angeregt und deren Ausarbeitung durch ihn selbst überwacht.

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.

Straubing, den 30.12.2017

Katharina Dietlmeier