

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

DIE ROLLE DES ÖSTROGENREZEPTORS β
IM ENDOMETRIALEN ADENOKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elisabeth Anna Theresia Diepolder

2019

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

DIE ROLLE DES ÖSTROGENREZEPTORS β
IM ENDOMETRIALEN ADENOKARZINOM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Elisabeth Anna Theresia Diepolder

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christa Büchler

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2019

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Endometriumkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Histologie	1
1.1.3	Risikofaktoren	2
1.1.4	Karzinogenese	6
1.1.5	Früherkennung und Screening	6
1.1.6	Diagnostik	8
1.1.7	Therapieansätze	9
1.2	Östrogene und deren Rezeptoren	12
1.2.1	Östrogene	12
1.2.2	Östrogenrezeptoren	13
1.2.2.1	Allgemeines	13
1.2.2.2	Aufbau der Rezeptoren	13
1.2.2.3	Molekularer Wirkmechanismus	15
1.2.2.4	Expression und Funktion von ER β im Endometrium	16
1.2.2.5	Expression und Funktion von ER β im Endometriumkarzinom	17
1.2.2.6	Die ER β /ER α -Ratio und deren Bedeutung im Endometriumkarzinom	20
1.3	Genexpressionsalterationen im Endometriumkarzinom	23
1.4	Verwendete Krebszelllinien	24
1.4.1	Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-A	24
1.4.2	Die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2	24
1.5	Verwendete ER β -Modulatoren und deren spezifische Eigenschaften	24
1.5.1	PHTPP	24
1.5.2	(R,R)-THC	25
1.5.3	Liquiritigenin	26
1.5.4	ERB041	26

1.5.5	WAY200070	27
1.5.6	Tamoxifen	27
1.5.6.1	Möglichkeiten der endokrinen Therapie mit Tamoxifen	27
1.5.6.2	Tamoxifen und Endometriumkarzinom	28
1.5.6.3	Wirkung von Tamoxifen auf die ERs	29
1.6	Zielsetzung	31
2	Materialien und Methoden	32
2.1	Materialien und Reagenzien	32
2.1.1	Allgemeine Materialien	32
2.1.2	Geräte	33
2.1.3	Versuchsspezifische Materialien	34
2.1.3.1	Zellkultur	34
2.1.3.2	Molekulargenetische Untersuchungen	36
2.2	Methoden	39
2.2.1	Zellkultur	39
2.2.1.1	Standardbedingungen	39
2.2.1.2	Auftauen der Zellen	39
2.2.1.3	Mediumwechsel	39
2.2.1.4	Zellernte	40
2.2.1.5	Zellaussaat	40
2.2.1.6	Umstellung auf serumfreies Medium	41
2.2.1.7	Stimulation der Zellen	41
2.2.1.8	Messung der Zellzahl	42
2.2.1.9	Auswertung der Ergebnisse	43
2.2.1.10	Molekulargenetische Untersuchungen	43
2.2.1.11	RT-PCR	44
2.2.1.12	Microarrays	46
2.3	Statistische Auswertung und Literaturverwaltung	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Transienter ER β -Knockdown	47

3.2	Proliferationsversuche	48
3.2.1	Vergleich von ER β -KD und neg.co.	48
3.2.1.1	Überblick	48
3.2.1.2	Proliferationsvergleich ER β -KD vs. neg.co.	49
3.3	Vergleich des Proliferationsverhaltens nach Stimulation	51
3.3.1	Überblick	51
3.3.2	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit PHTPP	52
3.3.3	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit (R,R)-THC	54
3.3.4	Zusammenfassung ER β -Antagonisten	57
3.3.5	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit ERB041	58
3.3.6	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Liquiritigenin	61
3.3.7	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit WAY200070	63
3.3.8	Zusammenfassung ER β -Agonisten	68
3.3.9	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Tamoxifen	69
3.3.10	Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Tamoxifen und ER β -Modulatoren	71
3.4	Genexpressionsanalyse mittels Microarray	74
3.4.1	Genexpression in den HEC-1-A-Zellen nach ER β -Knockdown	74
3.4.2	Genexpression in den RL95-2-Zellen nach ER β -Knockdown	74
4	Diskussion	75
4.1	Einfluss von ER β auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzellen	75
4.2	Die Wirkung von Tamoxifen auf die Endometriumkarzinomzellen und ER β	80
4.3	Wirkung des ER β -Knockdowns auf die Genexpression	81
4.3.1	Gene mit vermehrter Expression	82
4.3.2	Gene mit verminderter Expression	86
5	Zusammenfassung und Ausblick	87

6	Anhang	89
	Abbildungsverzeichnis	89
	Tabellenverzeichnis	91
	Abkürzungsverzeichnis	92
7	Literaturverzeichnis	99
8	Danksagung	126

1 Einleitung

1.1 Endometriumkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland sowie in anderen westlichen Ländern ist das Endometriumkarzinom die am häufigsten vorkommende Neoplasie des weiblichen Genitaltrakts [1, 2]. Global gesehen steht das Endometriumkarzinom auf Platz 7 [3], bei den deutschen Frauen ist es mit einem Anteil von 4,7% sogar die vierthäufigste aller Krebserkrankungen [2]. Die Zahl der Neuerkrankungen lag 2013 bei 10.740 und 2014 bei 10.680, folgte also einem Negativtrend mit jedoch nahezu gleichbleibender altersstandardisierter Sterberate [2]. Bereits in den Vorjahren war dieser Trend mit 11.140 Fällen im Jahr 2011 und 10.930 Fällen im Jahr 2012 zu beobachten. Höhere Inzidenzraten wurden aus den USA, skandinavischen und osteuropäischen Ländern berichtet [4]. Das Endometriumkarzinom ist eine Erkrankung des Alters. Es tritt überwiegend peri- und postmenopausal auf [1, 5], wobei in Deutschland das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren liegt [2]. Es zählt zu den prognostisch günstigen Malignomen, da etwa 80% der Karzinome bereits im T1-Stadium diagnostiziert werden [4]. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt in Deutschland bei 79%. 2015 wurden in Deutschland 2.602 Sterbefälle durch ein Endometriumkarzinom registriert. Somit beläuft sich derzeit der Anteil an allen malignombedingten Todesfällen auf 2,4% [2].

1.1.2 Histologie

Vor mehr als 30 Jahren teilte Bokhman das Endometriumkarzinom in zwei Subtypen ein. Typ I, welcher in enger Beziehung mit einem hormonellen Ungleichgewicht steht, bezeichnete er als hormonabhängig und Typ II als hormonell unabhängig [6]. Auch heute werden zwei Subtypen ähnlich der Einteilung von Bokhman unterschieden. Die Einstufung erfolgt anhand verschiedener klinisch-pathologischer Charakteristika. Diese sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Das Typ I-Karzinom ist östrogenabhängig, entsteht aus hyperplastischem Gewebe

und ist klassischerweise endometrioid oder muzinös. Die Östrogenabhängigkeit zeigt sich durch eine oftmals erhöhte Expression an Östrogen- und Progesteronrezeptoren und einen perimenopausalen Altersgipfel. Das mittlere Erkrankungsalter ist bei Typ I-Karzinomen niedriger [7, 8]. Im endometrialen Gewebe bilden sich unter Östrogeneinfluss atypische Hyperplasien, welche Vorstufen der Typ I-Karzinome darstellen. Es wird also bei der Entstehung eine Adenom-Karzinom-Sequenz durchlaufen. Daraufhin folgt die Progression des Tumors von einem niedrigen zu einem höheren Malignitätsgrad. 80% aller Endometriumkarzinome sind östrogenabhängig und somit Typ I-Karzinome [4, 8, 9]. Die Entstehung der Typ II-Karzinome ist hingegen unabhängig von Östrogenen. Diese Tumore entstehen aus atrophem Gewebe und sind in ihrer Histologie zu meist klarzellig oder serös-papillär. Bei deren Diagnosestellung sind Prognose und Grading des Typ I-Karzinoms meist günstiger als bei Typ II-Karzinomen [7, 10].

Tabelle 1: Klinisch-pathologische Charakteristika der zwei Typen des Endometriumkarzinoms

Typ I	Typ II
östrogenabhängig	östrogenunabhängig
hyperplastisches Gewebe	atrophes Gewebe
endometrioid, muzinös	klarzellig, serös-papillär
Diagnose oft im frühen Stadium	Diagnose oft im späten Stadium
meist günstige Prognose	meist ungünstige Prognose

1.1.3 Risikofaktoren

Die Tumorentstehung wird sowohl durch exogene als auch endogene Faktoren stark beeinflusst. 10% aller Erkrankungen sind familiär bedingt [10]. Mitunter den größten Anteil an den genetisch verursachten Erkrankungen macht das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) aus. Ursache für

das HNPCC ist eine Mikrosatelliteninstabilität, welche aus einer Mutation von DNA-Mismatch-Reperaturgenen resultiert. Frauen mit dieser Mutation haben, neben einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko, verglichen mit der Normalbevölkerung ein 10-fach erhöhtes Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken [11,12]. Malignome dieser Art treten bevorzugt im jüngeren Lebensalter auf und werden meist in einem fortgeschrittenen Stadium mit schlechter Differenzierung diagnostiziert. Diese hereditäre Form des Karzinoms zeigt ein kribriiformes und muzinöses Wachstumsmuster [12]. Beim Cowden-Syndrom (CS) ist ebenfalls ein deutlich erhöhtes Endometriumkarzinomrisiko bekannt [13, 14]. Auch eine auffällige, positive Familienanamnese erhöht das Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken [8].

Der Großteil der Karzinome (ca. 90%) tritt jedoch sporadisch auf, wobei verschiedene Faktoren die Tumorentstehung und -progression beeinflussen können [10]. Weitreichende Studien zeigten, dass sowohl den endogenen als auch den exogenen Östrogenen eine bedeutende Rolle zukommt. Ein hoher endogener Östrogenkonzentrationslevel ist in Abwesenheit von Gestagen mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden. Postmenopausal steigt das Erkrankungsrisiko bei erhöhtem Östrogenkonzentrationslevel auf das 2- bis 3-Fache an [15]. Auch besteht prä- und postmenopausal ein Zusammenhang zwischen Adipositas und der Entstehung eines Endometriumkarzinoms [16–18]. Übergewichtige Frauen weisen im Vergleich zu normalgewichtigen höhere Konzentrationen an Östrogenen auf [19,20]. Zu einem kleinen Teil werden im Fettgewebe selbst Androgene in Östrogene umgewandelt [21]. Durch einen erhöhten Fettgewebeanteil steigt somit der Östrogenlevel. Zusätzlich nimmt der freie Anteil an Östrogenen zu, da sowohl ein erhöhter Insulinspiegel als auch ein erhöhter Androgenspiegel bei adipösen Frauen zu einer verminderten Produktion von östrogenbindenden Proteinen führen [22, 23]. Potischman et al. fanden hingegen, dass ein erhöhter Level an Sexualbindungshormonen das Erkrankungsrisiko vermindert [15]. Der Hyperinsulinismus, welcher bei adipösen Frauen vorliegt, fördert zudem die Aromatisierung von Androgenen zu Östrogenen [24].

Auch im Rahmen von Östrogenersatztherapien (englisch *hormone replacement therapy*, HRT) ohne Gestagenschutz zeigte sich das Erkrankungsrisiko deutlich

erhöht, wobei es bei perimenopausalen Frauen größer ist und mit steigendem Alter abnimmt [16, 17]. Sowohl die verabreichte Dosis als auch die Dauer der Therapie beeinflussen das Risiko wesentlich [24]. Eine reine Östrogentherapie ist daher nur bei hysterektomierten Frauen empfehlenswert. Eine HRT hingegen, bestehend aus einer Kombination von Östrogenen und Gestagen, erhöht das Risiko zur Entstehung eines Endometriumkarzinoms nicht, es wird sogar eine risikosenkende Wirkung vermutet [25–27]. Das Erkrankungsrisiko steigt durch eine Therapie mit Tamoxifen, abhängig von Dauer und Dosierung [28, 29]. Das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) mit anovulatorischen Zyklen sowie eine erhöhte endogene Östradiolproduktion, z.B. bei Granulosazelltumoren, stellen weitere Risikofaktoren zur Entstehung des Endometriumkarzinoms dar [7]. Eine frühe Menarche und auch eine späte Menopause, d.h. eine lange Lebensphase mit Menstruationszyklen, und wenige Geburten bzw. Nulliparität sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert [16–18, 30]. Multiparität, zunehmendes Alter bei der ersten Geburt und körperliche Aktivität sind hingegen risikosenkend [7, 16, 31]. Cauley et al. zeigten, dass körperlich aktive Frauen niedrigere Östrogenspiegel haben [20]. Nikotinkonsum in Form von Rauchen senkt deutlich das Erkrankungsrisiko [32]. Auch dem Konsum von Alkohol wird teilweise eine risikosenkende Wirkung zugeschrieben. Bei Frauen über 50 Jahre führte der Alkoholkonsum zu einer Risikoreduktion, bei jüngeren Frauen hingegen zeigte sich eine Risikoerhöhung um 70% [33]. In ihrer Studie zeigten Cauley et al., dass mit zunehmendem Konsum von Alkohol die Östron- und Östradiolspiegel abnahmen [20]. Auch führt der Gebrauch von oralen Kontrazeptiva zu einer Risikominderung, welche jedoch nicht signifikant ist [17]. Protektiv sind hier vor allem Östrogen-Gestagen-Kombinationen [4]. Mit einem verminderten Endometriumkarzinomrisiko ist auch die Verwendung von Intrauterinpressaren (IUP), sowohl aus Kupfer- als auch aus Levonorgestrel, assoziiert [34, 35].

Es bestehen statistische Zusammenhänge zwischen Karzinomentstehung und Hypertonus sowie einer Cholezystektomie in der Vorgeschichte [18]. Kelsey et al. fanden, dass Frauen mit einem höheren Bildungsstatus häufiger vom Endometriukarzinom betroffen sind als weniger gebildete und hellhäutige Personen

häufiger erkranken als stärker pigmentierte [17]. Tabelle 2 fasst die wichtigsten Einflussfaktoren bei der Endometriumkarzinomentstehung zusammen.

Tabelle 2: Wichtige risikosteigernde und -senkende Faktoren für die Entstehung des Endometriumkarzinoms

Risikoerhöhung	Risikoreduktion
Erhöhter Östrogenspiegel	Orale Kontrazeption
Tamoxifentherapie ^{*(1)}	IUP-Anwendung
Hypertonus	Alkohol ^{*(2)} - und Nikotinkonsum
Frühe Menarche	Späte Menarche
Nulliparität	Multiparität
Metabolisches Syndrom	Körperliche Aktivität
Reine HRT ^{*(1)}	Kombinierte HRT mit Gestagen ^{*(3)}
Positive Familienanamnese	

*⁽¹⁾ In Abhängigkeit von der Dauer der Anwendung

*⁽²⁾ Abhängig vom Lebensalter. Riskosenkende Wirkung bei Frauen über 50 Jahre

*⁽³⁾ Abhängig von Dauer, Art und Dosis des Gestagens

Sherman et al. untersuchten Zusammenhänge zwischen Risikofaktoren und dem jeweiligen histologisch-pathologischen Subtyp. Sie fanden dabei bei endometrioiden Karzinomen einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit einem hohen Body-Mass-Index (BMI) und mit dem perimenopausalen Gebrauch von Östrogenen. Diese Korrelation konnten sie bei serösen Karzinomen nicht erkennen. Die Faktoren Rauchen und die Einnahme von oralen Kontrazeptiva verringern bei beiden Karzinomtypen das Risiko einer Erkrankung [36].

1.1.4 Karzinogenese

Die Tumorentstehung ist ein Prozess, der schrittweise durch verschiedene Aberrationen im Bereich der Zellregulation abläuft. Sherman beschreibt zwei Wege der Karzinomentstehung: den klassischen und den alternativen Weg [37]. Beim klassischen Weg entstehen indolente Tumore aus vorbestehenden Hyperplasien in östrogenreichem Milieu. Bezieht man sich auf das im Abschnitt 1.1.2 beschriebene Model von Bokhman [6], so entsprechen die indolenten Tumore den Typ I-Karzinomen, d.h. denjenigen Karzinomen, welche durch einen Hyperöstrogenismus entstehen [37, 38]. Beim sogenannten alternativen Weg, welcher die Entstehung von aggressiven Tumoren zu beschreiben versucht, haben diese Faktoren keine Relevanz. Dieser Typ von Tumor entspräche am ehesten dem von Bokhman beschriebenen Typ II, welcher seröse und andere aggressive Karzinomtypen umfasst [36, 37]. Abbildung 1 zeigt einen Überblick der einzelnen Schritte des klassischen Wegs der Karzinomentstehung. Dieser läuft in verschiedenen Einzelschritten bzw. zellulären Veränderungen ab. Ein hormonelles Ungleichgewicht führt zur Entstehung von Hyperplasien ohne Atypien, aus welchen durch Mutationen u.a. in K-ras und PTEN atypische Endometriumhyperplasien (AEH) entstehen. Letztendlich können im späteren Schritt Mismatch-Repair-Defekte (MMR-Defekte) zur Entstehung des Endometriumkarzinoms führen.

Je nach Karzinomtyp unterscheiden sich die genetischen Aberrationen. Wie bereits beschrieben ist Typ I oft mit Mutationen in PTEN, K-ras oder β -catenin verbunden. Hingegen finden sich beim Typ II vor allem Abnormalitäten in p53 oder HER2/neu [26, 37, 39, 40]. Auch wurden bei der Pathogenese des Typ II-Karzinoms die Überexpression von Cyclin E sowie Alterationen des PIK3CA-Pathways beschrieben [41].

1.1.5 Früherkennung und Screening

Bisher etablierte sich zur Früherkennung des Endometriumkarzinoms keine zuverlässige Screeningmethode. Ein neues Leitlinienprogramm Onkologie (S3-Leitlinie) wurde im April 2018 von der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftli-

Entstehung des Typ I-Karzinoms

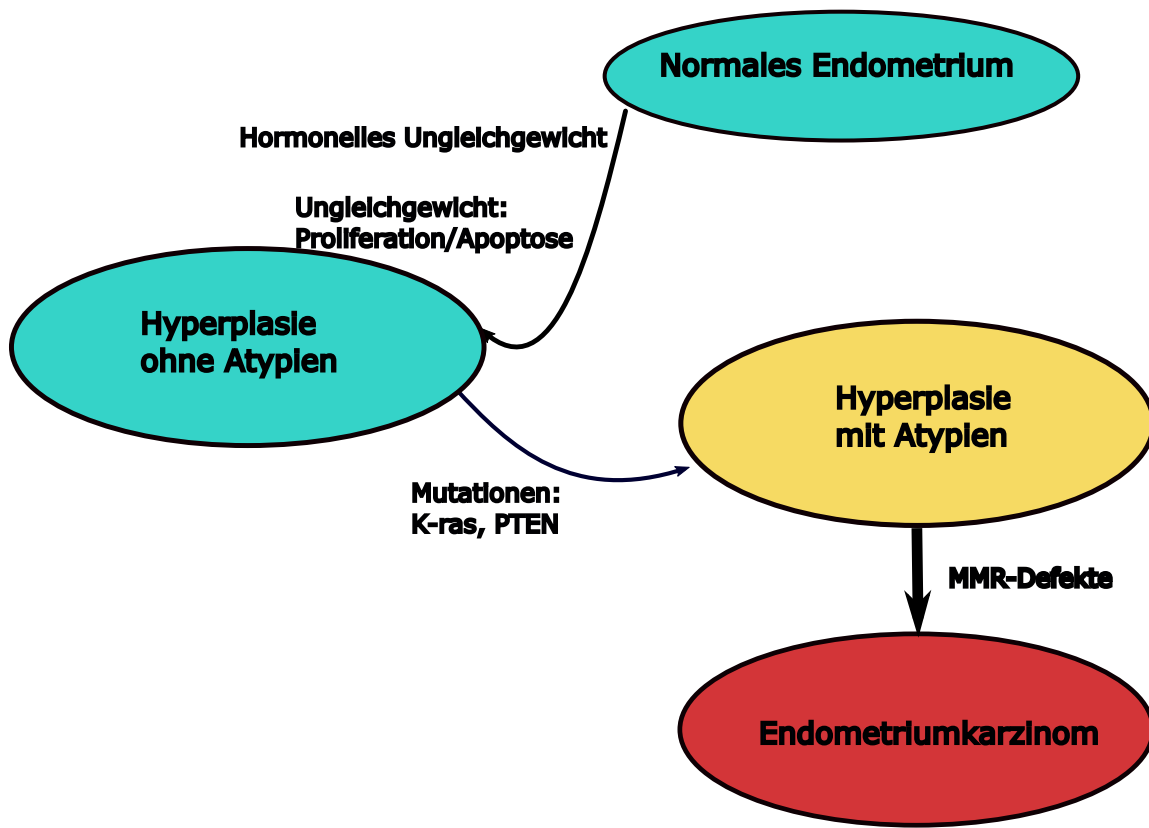


Abbildung 1: Modell der Entstehung des Typ I-Karzinoms, modifiziert nach Sherman et al. [37]

chen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der Deutschen Krebshilfe (DKH) herausgegeben [8]. Untersuchungen mittels transvaginalen Ultraschall senken sowohl bei asymptomatischen Frauen ohne Risikofaktoren für ein Endometriumkarzinom als auch bei Hochrisikopatientinnen die durch das Karzinom bedingte Mortalität nicht. Somit ist bei diesen Patientengruppen die Sonographie im Rahmen eines Screenings zur Früherkennung nicht empfohlen [7, 8]. Auch bei asymptomatischen Patientinnen unter einer Tamoxifentherapie ist die Sonographie nicht indiziert [8]. Durch derzeit gängige Methoden, wie Sonographie und Zytologie, können bei Patientinnen in Hochrisikogruppen lediglich 50% der asymptomatischen

Karzinome entdeckt werden [7].

Das Endometriumkarzinom zeigt jedoch typische Frühsymptome, wodurch die Diagnose meist in einem frühen Erkrankungsstadium gelingt. In etwa 80% der Fälle ist bei Diagnosestellung das Karzinom auf das Endometrium beschränkt [4]. Das zuverlässigste Frühsymptom ist die postmenopausale Blutung. Bei prämenopausalen Patientinnen kann sich ein Endometriumkarzinom durch Menometrorrhagien, d.h. rezidivierende abnorme und starke Blutungen neben der eigentlichen Menstruationsblutung, bemerkbar machen [42]. Gemäß der S3-Leitlinie soll bei prämenopausalen Frauen ohne Risikofaktoren (z.B. Adipositas, Diabetes, HNPCC, unscharf begrenzte Polypen) bei einer abnormen uterinen Blutung zunächst ein konservativer, medikamentöser Therapieversuch unternommen werden. Erst bei Versagen der Therapie, aber auch bei hämodynamisch relevanten Blutungen sollte eine Hysteroskopie, gegebenenfalls mit Abrasio, erfolgen [8]. Begründet wird dieses Vorgehen damit, dass prämenopausal bei abnormen uterinen Blutungen das Risiko für ein Karzinom oder auch eine AEH unter 1,5% liegt [43]. Tritt eine Blutung postmenopausal erstmalig auf und ist hierbei die Endometriumdicke kleiner als 3mm, so wird eine sonographische und auch klinische Kontrolluntersuchung nach drei Monaten empfohlen [44]. Bei Fortbestehen der Symptomatik, erneutem Auftreten oder Zunahme der Endometriumdicke soll dann eine histologische Abklärung erfolgen [8].

1.1.6 Diagnostik

Goldstandard für die Diagnosesicherung des Endometriumkarzinoms ist die Hysteroskopie mit fraktionierter Abrasio. Beim histologisch gesichertem primären Endometriumkarzinom soll eine transvaginaler Ultraschall erfolgen, um Myometrium- und Zervixinfiltration zu beurteilen [8, 45]. Wenn die transvaginale sonographische Beurteilung nur eingeschränkt möglich ist, sollte für die präoperative Einschätzung der Infiltration eine MRT angeboten werden [45].

Seit 1988 ist das operative Staging mit histopathologischer Untersuchung das standardisierte Verfahren, da es allen anderen apparativen Methoden überlegen ist [46]. Es wird auch in der aktuellen S3-Leitlinie als Methode zur Diagnostik für die lokale Ausbreitung des Karzinoms empfohlen [8]. Auch wenn die

endgültige Stadieneinteilung operativ-histologisch erfolgt, wird der präoperative Ultraschall zur Dokumentation und Operationsplanung eingesetzt. Als Basisuntersuchung empfiehlt die ACR-Leitlinie ein Röntgen-Thorax in 2 Ebenen [47]. Auf dieses kann bei Patientinnen mit einem niedrigen Risiko (low risk) laut der Studie von Amkreutz et al. verzichtet werden, da sich pulmonale Metastasen in ihrer Studie auf High-risk-Karzinome beschränkten [48]. Hierbei kann präoperativ neben der Beurteilung von pulmonalen Metastasen der kardiopulmonale Status erhoben werden. Ergibt sich der Verdacht auf Fernmetastasen, sollte eine Evaluierung mittels Schnittbildgebung erfolgen [8]. Ein Staging und Grading des Tumor ist sowohl therapeutisch als auch prognostisch relevant. Die Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms erfolgt nach der jeweils gültigen FIGO-/TNM-Klassifikation. Jedem TNM-Stadium kann ein FIGO-Stadium zugeteilt werden. Die Einteilung und die genaue Definition des jeweiligen Stadiums sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die FIGO-Klassifikation wird von der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) und die TNM-Klassifikation wird durch die Union Internationale Contre le Cancer (UICC) publiziert. Ein präoperatives Staging erhält den Zusatz c (clinical) und die postoperative Einteilung erfolgt nach pTNM (pathologische Klassifikation, postoperative histopathologische Klassifikation) [49]. Das Grading hängt vom histologischen Typ des Tumors ab. Endometrioiden und muzinösen Karzinomen, d.h. Typ I-Karzinomen, werden anhand solider Tumoranteile eingeteilt, was Tabelle 4 zeigt. Kommen hochgradige zelluläre Atypien vor, wird der Tumor um jeweils einen Grad höher gestuft. Seröse und klarzellige Karzinome, d.h. Typ II-Karzinome, werden grundsätzlich als G3 eingestuft [50].

1.1.7 Therapieansätze

Bei der Therapie einer histologisch gesicherten Neoplasie bzw. den Vorstufen des Endometriumkarzinoms gibt es je nach Grading und Staging des Tumors verschiedene Ansätze. Gemäß der S3-Leitlinie können Hyperplasien ohne Atypien konservativ behandelt werden, wohingegen Patientinnen mit AEH ein operatives Vorgehen empfohlen wird [8]. Eine AEH weist ein Risiko zu entarten von 30% auf [51]. Die operative Therapie besteht grundsätzlich aus der tota-

len abdominalen Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie. In Ausnahmefällen kann bei einer AEH auf die operative Entfernung des Uterus und der Ovarien verzichtet werden [8].

Tabelle 3: TNM- und FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms [49]

TNM	FIGO	Definition
T1	I	Karzinom auf Corpus uteri begrenzt
T1a	IA	Endometriumbefall o. Myometriuminfiltration <50%
T1b	IB	Myometriuminfiltration >50%
T2	II	Infiltration des Zervixstromas
T3/N1	III	Lokale und/o. regionäre Ausbreitung
T3a	IIIA	Befall von Serosa und/o. Adnexe (direkt o. Metastasen)
T3b	IIIB	Befall von Vagina o. Parametrium (direkt o. Metastasen)
N1	IIIC	Lymphknotenmetastasen
	IIIC1	Metastasen in Beckenlymphknoten
	IIIC2	Metastasen in paraaortalen Lymphknoten
T4	IVA	Infiltration von Rektum- und/oder Blasenschleimhaut
M1	IVB	Fernmetastasen

Tabelle 4: Grading endometrioider und muzinöser Endometriumkarzinome

Grading	solider Tumoranteil
G1	unter 5%
G2	6 bis 50%
G3	mehr als 50%

Eine starke Empfehlung zur Hysterektomie mit beidseitiger Salpingektomie wird auch beim frühen Endometriumkarzinom ausgesprochen [8]. Dieses Vorgehen führt bei diesem Stadium zu einem krankheitsspezifischen 5-Jahres-Überleben von 99% [52]. Auch hier können unter bestimmten Voraussetzungen die Ovarien und Uterus belassen werden [8]. Im vermuteten Frühstadium können laparoskopische, roboterunterstützte laparoskopische und laparoskopisch assistierte vaginale Verfahren bei endometrioiden Adenokarzinomen angewandt werden [8, 53]. Neben der Exploration des Abdomens erfolgt im Rahmen des Stagings die Entnahme von zytologischen Proben. Liegt eine seröse oder klarzellige Karzinomkomponente vor, sollen peritoneale Biopsien entnommen werden und auch eine Omentektomie erfolgen [46]. Alle suspekten oder palpatorisch bzw. makroskopisch vergrößerten Lymphknoten sollen entfernt werden. Wenn eine systematische Lymphknotenentfernung (LNE) indiziert ist, sollte sie pelvin und infrarenal-paraaortal durchgeführt werden [8]. Eine Lymphadenektomie wird u.a. auch bei Hochrisikopatientinnen empfohlen [46]. In fortgeschrittenen, metastasierten Stadien profitieren Patientinnen, neben einer operativen Reduktion des Tumors mit dem Ziel der makroskopischen Tumorfreiheit [54, 55], von einer maximalen Resektion uterusferner Tumormanifestationen [46].

Abhängig von Typ und Stadium des Endometriumkarzinoms gibt es die Möglichkeit der Strahlentherapie sowie der adjuvanten medikamentösen Therapie. Bei Inoperabilität der Patientin ist eine primäre Strahlentherapie indiziert. Patientinnen mit einem endometrioiden Karzinom im FIGO I- oder II-Stadium und schlechten prognostischen Faktoren sowie Patientinnen mit einer tiefen myometrialen Invasion oder einer schlechten Differenzierung werden ergänzend bestrahlt [56, 57]. Für eine adjuvante Chemotherapie werden Carboplatin und Paclitaxel empfohlen [8]. Auch hier gibt es verschiedene Empfehlungen je nach Grading und Staging des Tumors. Im Stadium pT3 und/oder pN1 wird eine adjuvante Therapie empfohlen. Dies gilt auch für Endometriumkarzinompatientinnen im pT4a oder M1-Stadium, wenn sie makroskopisch tumorfrei operiert wurden oder der Resttumor postoperativ unter 2cm ist. Eine postoperative adjuvante Therapie mit Gestagenen ist nicht angedacht [8]. Es wird derzeit diskutiert, ob Hochrisikopatientinnen im frühen Stadium von einer Chemotherapie

profitieren könnten [58].

Zur Nachsorge werden in den ersten drei Jahren nach Abschluss der Primärtherapie eine gezielte Anamnese und eine gynäkologische Untersuchung inklusive rektovaginaler Palpation im Intervall von drei bis sechs Monaten empfohlen. In den darauffolgenden zwei Jahren sollen die Nachsorgeuntersuchungen halbjährlich durchgeführt werden. Bei dem Verdacht oder nach histologischer Sicherung eines Vaginal- oder Beckenrezidivs oder Fernmetastasierung sollte eine Schnittbildgebung erfolgen [8].

1.2 Östrogene und deren Rezeptoren

1.2.1 Östrogene

Östrogene werden sowohl im weiblichen als auch im männlichen Organismus produziert. Frauen im gebärfähigen Alter weisen dabei eine deutlich erhöhte Konzentration auf. Östrogene spielen sowohl bei Zellwachstum und -differenzierung als auch beim Fortpflanzungsprozess eine wichtige Rolle. Zudem sind sie bei pathologischen Prozessen, wie bei der Entstehung von hormonabhängigen gynäkologischen Karzinomen (Brust-, Endometrium- und Ovarialkarzinom), ein bedeutender Faktor [59–62]. Hauptproduktionsort der Sexualhormone sind die Nebennierenrinde und die Ovarien, ein kleiner Anteil wird auch im Fettgewebe und bei Schwangeren zusätzlich von der Plazenta gebildet [21, 63]. Es existieren drei verschiedene Östrogene: Östron (E1), Östradiol (E2) und Östriol (E3). Sie unterscheiden sich u.a. in der Affinität zu den Östrogenrezeptoren [64, 65]. Vom Gesamtöstrogen macht E2 den Hauptanteil aus. Die Konzentration ist altersabhängig und liegt prämenopausal zwischen 40 und 200-400 pg/ml. Postmenopausal fällt sie auf weniger als 20pg/ml ab, da die Ovarien die Hormonproduktion einstellen [64]. E3 wird während der Schwangerschaft von der Plazenta gebildet, es kommt aber auch bei nicht-schwangeren Frauen vor [21, 60]. Die Hormone wirken über Östrogenrezeptoren (ERs), welche dann ligandenaktiviert als Transkriptionsregulatoren wirken [66]. Die höchste Affinität zu den ERs hat 17β -Östradiol (E2) und ist somit am potentesten [64]. Neben den physiologisch vorkommenden Östrogenen gibt es auch einige Me-

dikamente, die Hormone enthalten oder hormonähnliche Wirkung haben. Sowohl Östrogene als auch Arzneistoffe mit Wirkung auf die Rezeptoren finden Anwendung in der Empfängnisverhütung als Kontrazeptiva, bei dysfunktionalen Gebärmutterblutungen, als Östrogensersatztherapie bei postmenopausalen oder hypogonadotropen Frauen, bei Behandlung von Tumoren und bei der Prävention und Behandlung von Osteoporose [21].

1.2.2 Östrogenrezeptoren

1.2.2.1 Allgemeines

1986 entdeckten Green et al. Östrogenrezeptor α (ER α) [67]. Lange Zeit wurde angenommen, dass die Wirkung von Östrogenen im menschlichen Organismus ausschließlich über diesen Rezeptor erfolgt. Erst 1996 entdeckten Kuiper et al. einen weiteren Östrogenrezeptor in der Prostata und im Ovar von Ratten, den sogenannten Östrogenrezeptor β (ER β) [68]. Im selben Jahr wiesen auch Mosselman et al. ER β im menschlichen Gewebe [69] und Tremblay et al. im Gewebe von Mäusen nach [70]. Mowa et al. untersuchten das Verteilungsmuster von ER α und ER β in den Zellen und Kompartimenten des Fortpflanzungsapparats, wobei sich unterschiedliche Konzentrationen der beiden ERs zeigten [71]. Weitere Studien belegen, dass die beiden ERs überlappende, aber dennoch verschiedene Verteilungsmuster in den einzelnen Geweben zeigen [72–74]. Die Östrogenwirkung wird unter anderem auch durch den jeweiligen vorherrschenden Rezeptor erreicht. Seit der Entdeckung von ER β ist das Bestreben in der Wissenschaft enorm, die Rolle der ERs bei der Vermittlung der Östrogenwirkung zu erforschen und zu verstehen.

1.2.2.2 Aufbau der Rezeptoren

Das den menschlichen Östrogenrezeptor β kodierende Gen ESR2 ist auf Chromosom 14q23.2 lokalisiert. Es hat eine Größe von 61.2kb mit insgesamt acht kodierenden Exons [75]. ER β selbst besteht aus 530 Aminosäuren [76]. Die Östrogenrezeptoren gehören zur Gruppe der Steroidrezeptoren, sog. Kernrezeptoren [77]. Charakteristisch für die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie ist die Zusammensetzung aus verschiedenen funktionellen Domänen. ER β besteht aus

sechs Domänen (A-F) [66,77,78]. Abbildung 2 zeigt den Aufbau des Östrogenrezeptors β aus den einzelnen Domänen (blau: A/B Domäne, grün: C-Domäne, rot: D-Domäne, lila: E/F-Domäne). Diese sind entscheidend für die Hormon- und DNA-Bindung sowie für die Transaktivierung.



Abbildung 2: Schematischer Aufbau von ER β

Die N-terminale A/B-Domäne (in Abbildung 2 blau dargestellt) besitzt eine aktivierende Funktion (AF-1) [79], welche die Transkriptionsaktivität hormonunabhängig moduliert [78,80]. Die zentral gelegene C-Domäne (in Abbildung 2 grün dargestellt) beinhaltet die DNA-Bindungsstelle (DBD = DNA-binding domain). Sie beinhaltet zwei funktionell verschiedene Zink-Finger-Elemente (C1 und C2), welche für die spezifische Bindung der Rezeptoren an Estrogen Response Elements (ERE, hormonempfindliche Bereiche) oder ERE-artige Sequenzen im Promotor von Zielgenen als Antwort auf eine E2-Bindung verantwortlich sind. Neben der DBD liegt die Gelenkregion (D-Domäne, in Abbildung 2 rot dargestellt), welche wie die A/B-Domäne variabel ist. Die E/F-Domäne (in Abbildung 2 lila dargestellt) ist für die Ligandenbindung verantwortlich, sogenannte Ligandenbindungsdomäne (LBD). Sie besteht aus 12 Helices, die eine hydrophobe Tasche zur Bindung von E2 oder selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) bilden. Dies ermöglicht die Spezifität und Selektivität der physiologischen Antwort des Rezeptors. Durch die Bindung des Liganden an die LBD kommt es zur Transformation und zum Übergang des Rezeptors in den transkriptionsaktiven Status. Neben der LBD besitzt die E/F-Domäne auch die Aktivierungsfunktion AF-2. Die A/B-, C- und E/F-Domänen sind also die drei funktionellen Domänen des Rezeptors [78, 80, 81]. In den einzelnen Domänen gibt es zwischen den beiden ERs, neben großen sequentiellen Übereinstimmungen, auch starke Unterschiede. Die größten Sequenzübereinstimmungen zeigen sich in der DBD (mehr als 95%) und LBD (ca. 60%). Die größten Unterschiede finden sich in der A/B-Domäne und in der E/F-

Domäne, wo sie in weniger als 20% der Aminosäuren übereinstimmen. In der Gelenkregion (hinge region, D-Domäne) zeigen die beiden Rezeptorsubtypen eine Übereinstimmung von 30% [59, 60, 70, 82, 83]. Wie bereits oben beschrieben, besitzen die ERs zwei Aktivierungsfunktionen (AF). AF-1 befindet sich in der A/B-Domäne und AF-2 in der E/F-Domäne (siehe Abbildung 2). Durch die AFs ist es ihnen u.a. möglich, die Expression verschiedener Gene zu regulieren. So aktiviert beispielsweise die AF-2 durch Rekrutierung und Bindung von Coaktivatoren die Transkription in Reaktion auf E2 oder andere Agonisten [78]. Die beiden Östrogenrezeptoren unterscheiden sich in diesen Domänen, woraus die verschiedenen Antworten auf Östrogenstimulation resultieren [84–86]. Der Hauptunterschied liegt dabei in der N-terminalen Region. ER β besitzt, verglichen mit ER α , nahezu keine AF-1-Aktivität, wohingegen die AF-2-Aktivität beider Rezeptoren nahezu gleich ist. Wenn die Transkription eines Gens von AF-1 und AF-2 abhängt, übersteigt die Transkriptionsaktivität von ER α diejenige von ER β . Ist sie aber nur von AF-2 abhängig, ist die Aktivität vergleichbar [87].

1.2.2.3 Molekularer Wirkmechanismus

In der Zelle wirken die ERs als Transkriptionsfaktoren und liegen dort prinzipiell in zwei Formen, der inaktiven und der aktiven, vor. In der inaktiven Form befinden sie sich im Zytoplasma oder Zellkern. Die Transformation, d.h. der Übergang in die aktive Form, erfolgt durch eine Ligandenbindung [66]. Östrogene sowie auch SERMs diffundieren durch die Zellmembran und binden an die LBD der ERs. Durch die Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch dissoziiert das an den ER gebundene Hitzeschockprotein 90 (hsp90) und es kommt zur Dimerisierung der Rezeptoren [78]. Die ERs formen sowohl Homo- als auch Heterodimere. Dabei unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Bindungsaffinität [87, 88]. Die Dimerisierung der Rezeptoren erlaubt letztendlich eine Bindung an EREs, welche eine palindrome Sequenz enthalten. Sie befinden sich in der Promotorregion der Zielgene. Die Gentranskription erfolgt dann durch die Bindung von Coaktivatoren (CoA) [78, 88]. Abbildung 3 stellt diesen klassischen Wirkmechanismus der Re-

zeptoren nach der Östrogenbindung dar.

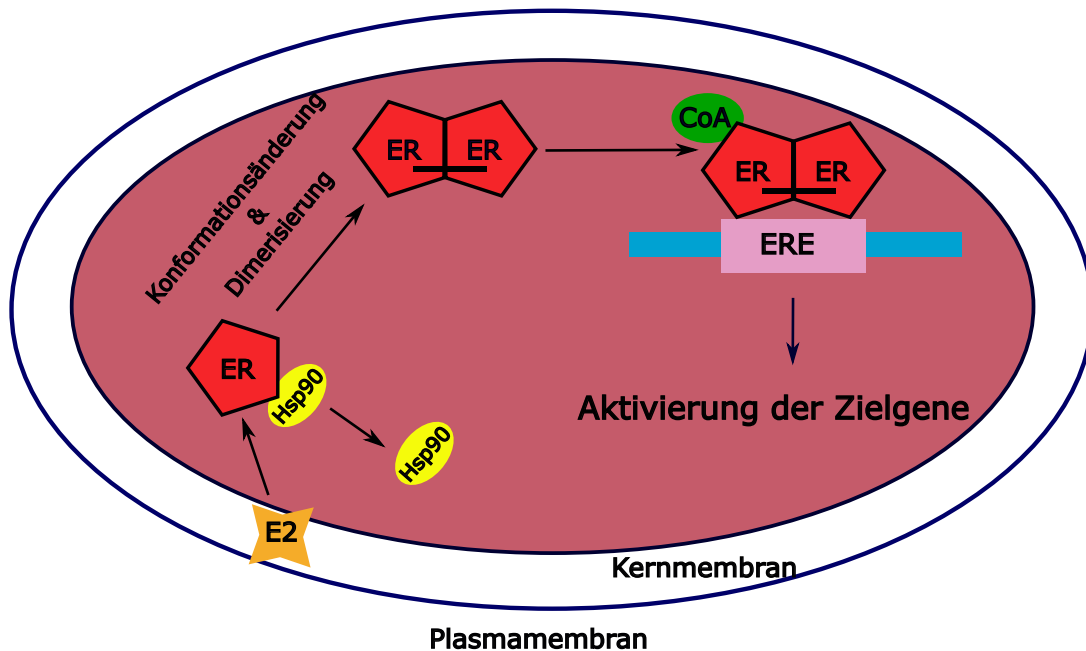


Abbildung 3: Mechanismus der Östrogenwirkung auf die Östrogenrezeptoren, modifiziert nach Lewis et al. [78]

Eine Studie von Trembley et al. zeigte, dass bei Mäusen ER β an ERE weniger stark bindet als ER α [70]. ER α und ER β haben zudem entgegengesetzte Wirkungen auf die Transkription, die durch indirekte Wirkmechanismen vermittelt werden. Obwohl ER α der stärkere Transkriptionsaktivator der beiden ER-Isoformen ist, führt bei physiologischen Konzentrationen von Östradiol die Koexpression von ER β zu einer Unterdrückung der Wirksamkeit hormonstimulierter Reaktionen. ER β moduliert die ERE-abhängige Transkriptionsaktivität von ER α inhibitorisch. Dies könnte teilweise erklären, dass ER β die stimulierende Wirkung von ER α auf die Zellproliferation hemmen kann [86, 89, 90]. Somit kommt auch der relativen Expression der Östrogenrezeptoren eine Schlüsselrolle in der Antwort auf Agonisten bzw. Antagonisten und mit höchster Wahrscheinlichkeit bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms zu.

1.2.2.4 Expression und Funktion von ER β im Endometrium

Im gesunden Endometrium werden sowohl ER α als auch ER β exprimiert. Der Großteil der Studien zeigte, dass dort die ER β -Konzentration geringer ist als die

ER α -Konzentration [91–99]. Matzusaki et al. wiesen nach, dass ER β von allen Zelltypen des Uterus während des gesamten Zyklus exprimiert wird, vor allem aber in den Drüsenepithelzellen [93]. Die Konzentration beider Östrogenrezeptoren variiert in den einzelnen Zyklusphasen. Während der proliferativen Phase ist sie am höchsten und nimmt nach der Ovulation in der sekretorischen Phase wieder ab. Verantwortlich für die Konzentrationsabnahme ist dabei Progesteron [96, 100–102]. Das ER α /ER β -Verhältnis (ER α /ER β -Ratio) variiert in jeder der einzelnen Zyklusphasen. Dies lässt vermuten, dass die Östrogenwirkung durch eine Kooperation zwischen ER α und ER β vermittelt und damit die spezifische Östrogenantwort bestimmt wird [103]. Bei ER β -Knockout-Mäusen zeigte sich im Uterus eine vermehrte Zellproliferation und verstärkte Reaktion auf Östrogene. Vermutlich moduliert ER β die ER α -Wirkung und hat im normalen, gesunden Endometrium eine antiproliferative Funktion [104, 105]. Utsunomiya et al. nehmen an, dass sowohl im zyklischen Endometrium als auch bei der Pathogenese von proliferativen Erkrankungen die Östrogenwirkung primär via ER α vermittelt wird [98]. Bei dem Vergleich von prämenopausalen zu postmenopausalem Endometrium fanden Jazaeri et al. eine signifikante Zunahme der ER α /ER β -mRNA-Ratio, begründet durch einen selektiven Verlust von ER β [106]. Ein Ungleichgewicht der Östrogenrezeptorexpression könnte im Endometrium bei der östrogenabhängigen Tumorgenese und -progression eine entscheidende Rolle spielen.

1.2.2.5 Expression und Funktion von ER β im Endometriumkarzinom

Die Rolle von ER β bei der Karzinogenese und Tumorprogression in verschiedenen Geweben wurde bis heute vielfach untersucht. Bei der Pathogenese des Mammakarzinoms zeigt sich ER β als Tumorsuppressor und ein Expressionsverlust des Rezeptors führt zur Tumorentstehung. ER β fungiert im Brustgewebe als ER α -Antagonist [107, 108]. Auch in einer Studie von Cheng et al. über das Prostatakarzinom zeigte sich ER β tumorsuppressiv mit antiproliferativen, antiinvasiven und proapoptischen Eigenschaften [109]. Treeck et al. wiesen in ihren Studien antitumorale Effekte von ER β in ovariellen Tumorzellen nach. Es zeigten sich sowohl eine verlangsamte Proliferation als auch gesteigerte Apop-

toseraten [110]. Im Mamma-, Prostata- und Ovarialkarzinom nimmt ER β also die Rolle als Tumorsuppressor ein. Welche Rolle er bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms bzw. im Endometriumkarzinom selbst spielt, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Bei der Entstehung hormonabhängiger Erkrankungen im Endometrium, sowohl benigner als auch maligner Art, spielen Östrogene und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle (vgl. dazu *1.1.3 Risikofaktoren*). Studien zum Expressionsmuster der Östrogenrezeptoren in Hyperplasien und im Karzinom führten bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen. Fast alle Studien zeigten, dass die ER β -Konzentration geringer ist als die ER α -Konzentration, sowohl im proliferativen Endometrium als auch in maligne entarteten Zellen [91–99]. Abweichend davon fanden Zhang et al. eine nahezu gleiche Expression von ER α - und ER β -mRNA im Endometriumkarzinom [111]. Hu et al. untersuchten Expressionsunterschiede der ERs zwischen normalem, proliferativem Gewebe und Hyperplasien. Die Konzentration von ER α nahm vom normalen proliferativen Gewebe über die einfache zur komplexen Hyperplasie hin signifikant zu. Die Expression von ER β hingegen unterschied sich in den einzelnen Gruppen kaum [112]. Studien zeigen, dass im endometrialen Adenokarzinom die ERs in geringerer Intensität als im proliferativen Endometrium exprimiert werden [102]. Auch in der Studie von Hu et al. zeigte sich, dass es sowohl in atypischen Hyperplasien als auch im Adenokarzinom zu einer signifikanten Abnahme von ER α und ER β kommt. In nahezu allen endometrioiden Adenokarzinomen konnten sie ER α , sowohl mit als auch ohne ER β , nachweisen [112]. Smuc et al. und auch Chakravarty et al. verglichen mittels qPCR die Expression von ER β in gesundem Endometrium und Endometriumkarzinom und fanden dabei eine geringere Konzentration im malignen Gewebe [113, 114]. Somit stützen sie die Annahme, dass ER β als Tumorsuppressor im Endometrium agiert. Jazaeri et al. verglichen die Expression beide Rezeptoren in prä- und postmenopausalem Endometriumgewebe sowie in Endometriumkarzinomen. Es zeigte sich hierbei zwischen prä- und postmenopausalem Gewebe eine selektive Abnahme der ER β -Expression, sowie weiter zwischen postmenopausalem Gewebe und Endometriumkarzinom eine Abnahme der ER α -Expression [106]. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse der Studien über

die Östrogenrezeptorexpression im Endometriumkarzinom zusammen.

Tabelle 5: Expression der Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) im Endometriumkarzinom (verglichen mit normalem Endometrium)

Verglichen werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeiten, welche die Expression der beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β in Endometriumkarzinom und normalem, gesunden Endometriumgewebe untersuchten ("↓"= verminderte Expression im Karzinomgewebe, "↔"= vergleichbare Expression in Karzinom und gesundem Gewebe), k.A.= keine Angabe).

Autor(en)	ERα	ERβ
Hu et al., 2004 [112]	↓	↓
Smuc et al., 2009 [113]	k.A.	↓
Chakravarty et al., 2007 [114]	k.A.	↓
Jazaeri et al., 2001 [106]	↓	k.A.
Skrzypacz et al., 2004 [115]	k.A.	↔

Häring et al. untersuchten die Expression der einzelnen ER β -Transkriptionsvarianten in gesundem Endometrium und Endometriumkarzinom. Dabei zeigten sich für ER β 1 und ER β 2 keine Unterschiede, wohingegen in Karzinomzellen ER β d4 erniedrigt und ER β 5, ER β d1, ER β d2 und ER β d3 erhöht waren [116]. Skrzypacz et al. fanden keinen Expressionsverlust von ER β während der Tumorgenese. Sie fanden im Karzinom die ER β 2d5-Expression erniedrigt und die ER β 5-Expression erhöht [115]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Änderung der ER β -Expression bzw. der ER β -Isoformen relevante Schritte bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms sind. Auch Utsunomiya et al. wiesen ER β im Endometriumkarzinom nach. Sie vermuteten aber, dass die proliferative Wirkung der Östrogene im entarteten Gewebe hauptsächlich via ER α vermittelt wird [98]. Auch jüngeren Studien von Zhang et al. fanden diesen Zusammenhang. Sie zeigten, dass nach einem ER α -Knockdown der proliferative Effekt von E2 auf endometriale HEC-1-B-Adenokarzinomzellen aufgehoben werden kann. Ein ER β -Knockdown inhibierte die Proliferation der Zellen hingegen nicht [117].

1.2.2.6 Die ER β /ER α -Ratio und deren Bedeutung im Endometriumkarzinom

Wichtiger Mittelpunkt vieler Studien war das Expressionsverhältnis von ER β - und ER α (ER β /ER α -Ratio). Die Ergebnisse dieser Studien differieren stark (vgl. Tabelle 6). Hu et al. zeigten, dass die ER β /ER α -Ratio im Endometriumkarzinom, verglichen mit normalem Gewebe, signifikant verringert war [112]. Zwei andere Studien kamen zu gegensätzlichen Ergebnissen. Mylonas et al. wiesen immunhistochemisch eine erhöhte ER β /ER α -Ratio im Vergleich zu gesundem Endometrium nach [95]. Jazaeri et al. konnten beim Vergleich von postmenopausalem Endometrium mit Grad 1 Adenokarzinomen eine reduzierte ER α /ER β -Ratio (d.h. erhöhte ER β /ER α -Ratio) auf mRNA-Ebene beobachten. Dies führten sie auf einen selektiven Verlust von ER α zurück [106]. Fujimoto et al. fanden eine unveränderte ER β /ER α -mRNA-Ratio zwischen normalem Endometrium und primärem Endometriumkarzinom [118].

Tabelle 6: Vergleich der ER β /ER α -Ratio zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe

Aufgeführt sind die Forschungsergebnisse bezüglich der ER β /ER α -Ratio. Verglichen werden gesundes Endometrium und Endometriumkarzinom ("↓" = verminderte Ratio im Endometriumkarzinom, "↔" = vergleichbare Ratio in Karzinom und gesundem Gewebe, "↑" = erhöhte Ratio im Endometriumkarzinom).

Autor(en)	ER β /ER α -Ratio
Hu et al., 2004 [112]	↓
Mylonas et al., 2005 [95]	↑
Jazaeri et al., 2001 [106]	↑
Fujimoto et al., 2002 [118]	↔

Häring et al. zeigten, dass die ER β /ER α -Ratio für ER β 1 und ER β 2 und teilweise für ER β 5 in G3-Tumoren erhöht ist. Zurückzuführen sei das sowohl auf eine verminderte ER α -Expression sowie auf eine Zunahme der ER β -Expression [116]. Aber auch innerhalb von normalem endometrialen Gewebe zeigte die ER β /ER α -Ratio statistische Unterschiede [95, 96, 112].

Weitere Arbeiten untersuchten den Zusammenhang zwischen der Rezeptor-Ratio und der Prognose, was zu teilweise voneinander abweichenden Ergebnissen führte. Saegusa et al. zeigten, dass in Tumorproben die ER α -Expression schrittweise von Grad 1 bis zu Grad 3 hin abnimmt und die ER β -Expression nicht mit dem Tumorgrad korreliert. Somit nimmt die ER α /ER β -Ratio bei fortschreitendem Tumor ab [99]. Jongen et al. fanden heraus, dass ein ER α /ER β -Verhältnis <1 eindeutig mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben verbunden ist. Zudem zeigten sie einen Zusammenhang zwischen niedrigem Grading und der Expression von ER α und auch eine erhöhte ER β -Expression bei fortgeschrittenem Stadium [119]. Zhang et al. kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie zeigten, dass eine ER β /ER α -mRNA-Ratio <1 , d.h. eine dominante ER α -Expression, mit günstigen histopathologischen Parametern verbunden war. Eine Ratio >1 , d.h. eine dominante ER β -Expression, korrelierte hingegen mit ungünstigen histopathologischen Parametern [111]. Dies konnten Mylonas et al. jedoch nicht bestätigen [96]. Fujimoto et al. verglichen die Ratio von Lymphknotenmetastasen und Primärherd, wobei in den Metastasen die ER β /ER α -mRNA-Ratio signifikant erhöht und mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. Ursache für die veränderte Ratio sei eine Downregulation von ER α während des Metastasierungsprozesses. Zugleich ist aber der Wildtyp ER β nicht in diesem Maße downreguliert und einige ER β -Varianten werden mit dem Fortschreiten der Metastasierung vermehrt synthetisiert [118]. Im Gegensatz dazu fanden Hu et al. in ihrer Studie keine Korrelation zwischen Expression der ERs und dem Lymphknotenbefall bei Adenokarzinomen [112]. Die Aussagen bezüglich der myometrialen Infiltration des Endometriumkarzinoms differieren. So wurde berichtet, dass ER β eine wichtige Rolle bei dem Fortschreiten der Infiltration spielt [96, 98, 120], was jedoch in der Studie von Jongen et al. nicht bestätigt werden konnte [119]. In Tabelle 7 ist der Zusammenhang zwischen der ER α /ER β -Ratio und der Prognose des Endometriumkarzinoms bzw. der Korrelation mit schlechten Prognosefaktoren zusammengefasst. Zusammenfassend kovarierte im Großteil der Studien eine erhöhte ER β -Konzentration (verglichen mit der ER α -Konzentration) mit negativen prognostischen Faktoren.

Tabelle 7: Zusammenhang zwischen der Östrogenrezeptor-Ratio und der Prognose des Endometriumkarzinoms

Aufgeführt sind die Forschungsergebnisse der Arbeiten, welche die Rezeptorratio $ER\beta/ER\alpha$ bzw. $ER\alpha/ER\beta$ -Ratio und dessen Bezug zur Prognose des Tumors untersuchten. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurden die Ratios in eine einheitliche Form gebracht.

Autor(en)	Ergebnis	Interpretation
Saegusa et al., 2000 [99]	Abnahme der $ER\alpha/ER\beta$ -Ratio mit fortschreitendem Tumor	$ER\beta > ER\alpha$ in fortschreitendem Tumorstadium
Jongen et al., 2009 [119]	$ER\alpha/ER\beta$ -Ratio < 1 : kürzeres krankheitsfreies Überleben	$ER\beta > ER\alpha$: kürzeres krankheitsfreies Überleben
Zhang et al., 2004 [111]	$ER\beta/ER\alpha$ -mRNA-Ratio < 1 : günstige Histologie $ER\beta/ER\alpha$ -mRNA-Ratio > 1 : ungünstige Histologie	$ER\beta > ER\alpha$: ungünstige Histologie
Fujimoto et al., 2002 [118]	$ER\beta/ER\alpha$ -mRNA-Ratio in Metastasen erhöht, Assoziation mit schlechter Prognose	$ER\beta > ER\alpha$ in Metastasen, schlechte Prognose
Hu et al., 2005 [112]	Keine Korrelation zw. Ratio und Lymphknotenbefall	

Hinsichtlich der Nachweisbarkeit beider Östrogenrezeptoren in benignem, hyperplastischem und malignem Endometrium kamen nahezu alle oben genannten Studien zu den gleichen Ergebnissen. Die Untersuchungen zu Expressionsunterschieden zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe sowie des Verhältnisses der beiden Östrogenrezeptoren zueinander (Ratio) zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Letztendlich scheinen sowohl ER α als auch ER β im Endometrium eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese zu spielen. Bis heute bestehen Defizite im Kenntnisstand zur Expression und auch zur Funktion von ER β bei präneoplastischen und malignen Erkrankungen des Endometriums. Die Bedeutung der relativen Expression der ER-Subtypen bei Endometriumkarzinomen muss daher noch weitergehend geklärt werden.

1.3 Genexpressionsalterationen im Endometriumkarzinom

Studien zeigten, dass bei der Endometriumkarzinogenese sowohl die Aktivierung von Onkogenen als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wichtige Schritte sind. Verlust und Mutation im Tumorsuppressor PTEN konnte bei 80% der endometrioiden Tumore beobachtet werden, wohingegen eine Überexpression des Onkogens HER2-Rezeptor-Tyrosinkinase bei etwa 60% auftritt [121]. Häring et al. wiesen eine Assoziation zwischen ER β -Expression und der Expression von HER2 und MYBL2 nach. Außerdem führte ein ER β -Knockdown mittels RNA-Interferenz zur signifikanten Abnahme von MYBL2 in den Endometriumkarzinomzellen [122]. Eine weitere molekulare Veränderung des Endometriumkarzinoms ist die Überexpression von wachstumsfördernden Genen wie Cyclinen, die mit einem undifferenzierten Phänotyp und einer ungünstigen Prognose assoziiert ist [123]. Auch Häring et al. konnten in Endometriumkarzinomzellen (HEC-1-A) eine erhöhte Expression von Cyclin B1, Cyclin D1 und Cyclin A2 feststellen, wohingegen sich der Tumorsuppressor PTEN vermindert exprimiert zeigte [122]. Aus der Korrelation mit der Expression von Onkogenen sowie den Ergebnissen des Knockdowns lässt sich eine tumorfördernde Rolle des Östrogenrezeptors im Endometrium vermuten.

1.4 Verwendete Krebszelllinien

1.4.1 Die Endometriumkarzinomzelllinie HEC-1-A

Die Zellen der Linie HEC-1-A (ATCC[®] HTB-112[™]) wurden 1968 von Kuramoto et al. aus dem Adenokarzinom (Stadium IA) des Uterus einer 71-jährigen Patientin isoliert [124, 125]. Tabelle 8 zeigt den Rezeptorstatus der HEC-1-A-Zellen.

1.4.2 Die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2

RL95-2 (ATCC[®] CRL-1671[™]) wurde aus einem mäßig differenzierten adenosquamösen Karzinom (Grad 2) des Endometriums einer 65-jährigen kaukasischen Frau isoliert [126]. Tabelle 8 zeigt den Rezeptorstatus der RL95-2-Zellen.

Tabelle 8: Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien

	HEC-1-A	RL95-2
ERα	negativ	positiv
ERβ	positiv	positiv

1.5 Verwendete ER β -Modulatoren und deren spezifische Eigenschaften

1.5.1 PHTPP

PHTPP (siehe Abbildung 4) ist ein selektiver ER β -Antagonist, der für ER β gegenüber ER α eine 36-fache Selektivität besitzt. PHTPP zeigte in einem Co-Transfectionassay auf endometriale Adenokarzinomzellen (HEC-1) einen vollständigen Antagonismus gegenüber ER β und nur minimale Effekte auf ER α . Die Wirkung auf ER α sei daher vernachlässigbar [127, 128].

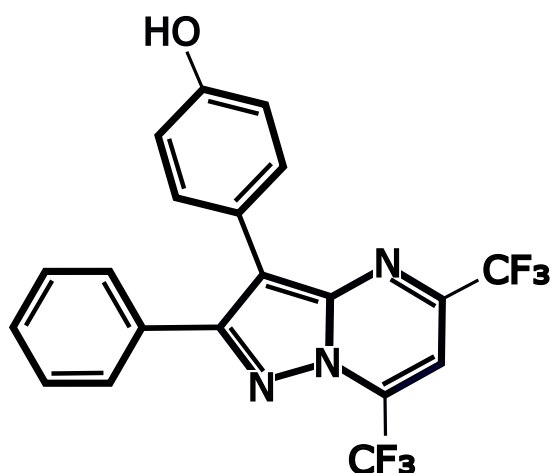


Abbildung 4: Molekulare Struktur von PHTPP

1.5.2 (R,R)-THC

Von Tetrahydrocannabinol (THC) existieren zwei verschiedene Enantiomere und es zeigte sich, dass die Eigenschaften der (S,S)- und (R,R)- Enantiomere bezüglich der Wirkung auf ERs differieren. In dieser Arbeit wurde das (R,R)-Enantiomer verwendet (siehe Abbildung 5).

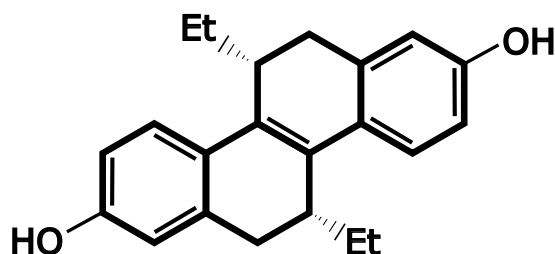


Abbildung 5: Molekulare Struktur von (R,R)-THC

Sun et al. untersuchten u.a. die Bindungseigenschaften von THC sowohl auf Östrogenrezeptor α als auch auf Östrogenrezeptor β . Das (R,R)-Enantiomer, d.h. (R,R)-THC, wirkt vor allem auf ER β als Antagonist. Die Affinität zu ER β ist 3-fach höher als die zu ER α [129]. Das (S,S)-Enantiomer hingegen wirkt als Agonist auf beide Rezeptorsubtypen. Liegt THC in einem Racemat vor, überwiegt die antagonistische Wirkung auf ER β . Ursächlich dafür ist die 20-fach höhere Affinität von (R,R)-THC zu ER β , wodurch die agonistische Aktivität von (S,S)-THC letztendlich dominiert wird [129, 130].

1.5.3 Liquiritigenin

Liquiritigenin (siehe Abbildung 6) ist ein selektiver ER β -Antagonist und stammt aus der Wurzel des Chinesischen Süßholzes (*Glycyrrhiza uralensis*) [131]. Es zeigt eine 20-fach erhöhte Bindungsaffinität zu ER β gegenüber ER α . Zudem aktiviert es keine anderen nukleären Rezeptoren einschließlich der Androgen- und Progesteronrezeptoren. Mersereau et al. begründen die ER β -Selektivität darin, dass Liquiritigenin ausschließlich verschiedene Koaktivatoren von ER β , nicht aber von ER α rekrutiert [132].

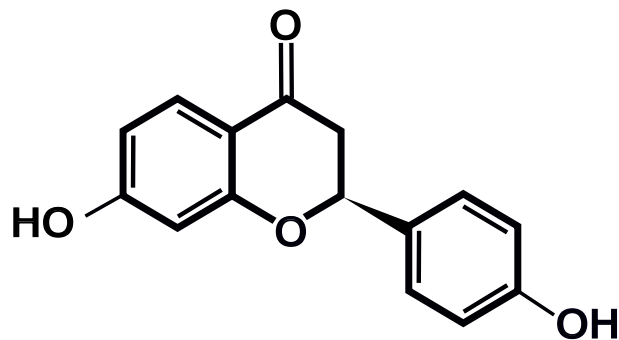


Abbildung 6: Molekulare Struktur von Liquiritigenin

1.5.4 ERB041

ERB041 (siehe Abbildung 7) zeigte in der Studie von Harris et al. eine mehr als 200-fache Selektivität für ER β [133]. Malamas et al. konnten eine mehr als 900-fache Selektivität nachweisen [82]. Demnach ist auch ERB041 ein selektiver ER β -Agonist.

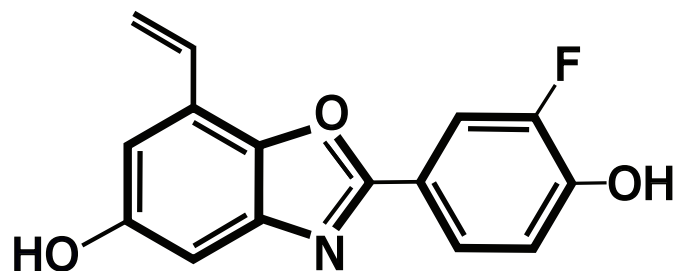


Abbildung 7: Molekulare Struktur von ERB041

1.5.5 WAY200070

WAY200070 ist ebenfalls ein ER β -selektiver Agonist und besitzt eine 68-fach stärkere Selektivität für ER β im Vergleich zu ER α [82, 134]. Abbildung 8 zeigt die molekulare Struktur von WAY200070.

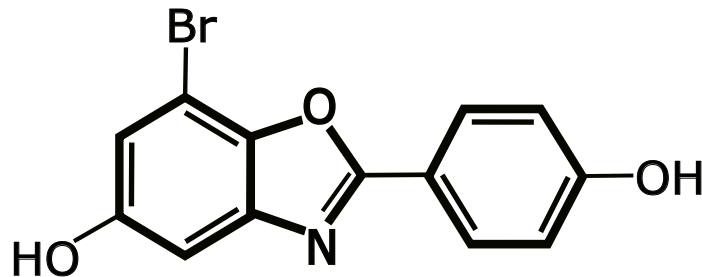


Abbildung 8: Molekulare Struktur von WAY200070

1.5.6 Tamoxifen

1.5.6.1 Möglichkeiten der endokrinen Therapie mit Tamoxifen

Selektive Östrogenrezeptormodulatoren, zu welchen Tamoxifen gezählt wird, sind nicht-steroidale Arzneistoffe, welche je nach Gewebe und deren Wirkspektrum östrogene/agonistische oder antiöstrogene/antagonistische Wirkungen zeigen können [135]. Tamoxifen war der erste klinisch erhältliche SERM und ist weltweit das am meisten verschriebene antineoplastische Medikament. Tamoxifen (ICI 46474) wurde 1966 von Harper et Walpole entwickelt [136] und 1978 von der FDA (United States Food and Drug Administration) zugelassen [137]. M.P. Cole und seine Kollegen vom Christie Hospital waren 1971 die Ersten, die eine günstige Wirkung von Tamoxifen bei Brustkrebs beschrieben [138]. Dort wirkt Tamoxifen durch eine kompetitive Blockade von ER α als Östrogen-Antagonist, was zur Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion von Östrogenrezeptor-positiven Tumorzellen führt [139–142]. Es ist vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) nach Primärbehandlung eines Mammakarzinoms zur adjuvanten Therapie und auch bei metastasiertem Mammakarzinom zugelassen [143]. Abbildung 9 zeigt die molekulare Struktur von Tamoxifen.

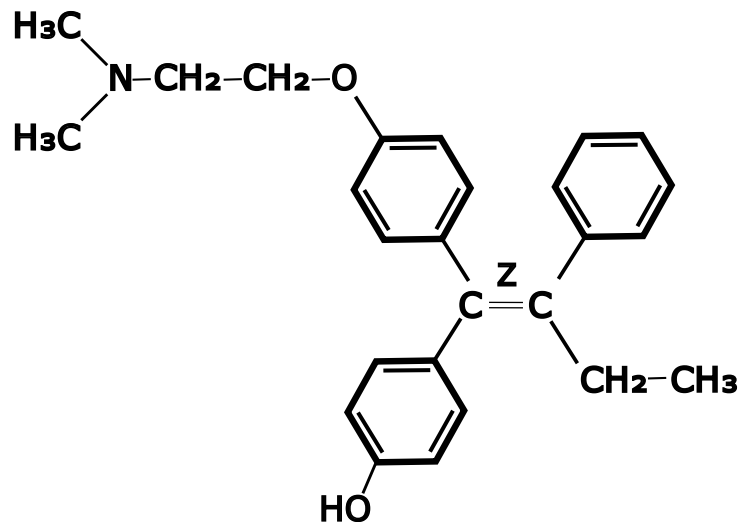


Abbildung 9: Molekulare Struktur von 4-OH-Tamoxifen

Tamoxifen hat die Eigenschaft, abhängig vom Wirkort, agonistisch oder antagonistisch an $ER\alpha$ und $ER\beta$ zu wirken [144]. Bei postmenopausalen Frauen hat Tamoxifen positive Effekte auf Herz-Kreislauf-System und Knochen [145]. Die Wirkungen auf Knochen bzw. Knochendichte ist aber abhängig vom Alter der Frau. Prämenopausal sind die Wirkungen negativ. Eine Einnahme von Tamoxifen erhöht zudem das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose (TBVT) [21, 145].

1.5.6.2 Tamoxifen und Endometriumkarzinom

Auf Zellen des Brustgewebes zeigt Tamoxifen antiöstrogene Wirkungen, wohingegen in anderen Geweben, u.a. dem weiblichen Genitaltrakt, agonistische Effekte beschrieben werden [39, 146]. Im Uterus führt dies zur Zellproliferation und auf längere Sicht zu einem Anstieg der Inzidenz der Endometriumkarzinome um das 2- bis 5-fache [147–149]. Bereits 1985 berichteten Killackey et al. über das Auftreten von endometrialen Adenokarzinomen bei Brustkrebspatientinnen nach Einnahme von Tamoxifen [150]. In den darauf folgenden Jahren wurde in verschiedenen randomisierten Studien ein Zusammenhang zwischen einer Tamoxifentherapie und dem Auftreten von Endometriumkarzinomen beschrieben. Die Beobachtung wurde 1998 von dem National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) in einer groß angelegten Studie zur Brust-

krebsprävention (BCPT, Breast Cancer Prevention Trial) bestätigt. Es wurde berichtet, dass die erhöhte Rate von Endometriumkarzinomen vorwiegend bei Frauen im Alter von 50 oder älter auftrat. Bei Frauen unter 50 Jahren war das Risiko eines Endometriumkarzinoms nicht signifikant erhöht [149].

Weitere Studien zeigten ebenfalls ein deutlich erhöhtes Risiko zur Entstehung eines Zweitkarzinoms im Endometrium [28, 151–153]. 1996 klassifizierte die International Agency for Research on Cancer (IARC) Tamoxifen als Karzinogen für das Endometrium [154]. Dabei steigt das Erkrankungsrisiko sowohl mit der Dauer der Tamoxifentherapie als auch mit der verabreichten Dosis des Medikaments an [28, 29]. Laut Robert Koch-Institut (RKI) führe die Behandlung mit Tamoxifen zu einer Endometriumhyperplasie, wodurch wiederum das Endometriumkarzinomrisiko erhöht wird [4]. Mignotte et al. verglichen die Prognose und den Krankheitsprogress von Patientinnen mit und ohne Tamoxifentherapie. Hierbei stellte sich heraus, dass Patientinnen nach Tamoxifenbehandlung eine schlechtere Prognose bezüglich eines aufgetretenen Endometriumkarzinoms haben [28]. Etwa 25% der Endometriumkarzinome, welche durch eine Tamoxifentherapie bedingt sind, sind serös-papillär oder klarzellig (Typ II-Karzinome) [155]. Eine Analyse über Wirkungen und Nebenwirkungen der Therapie mit Tamoxifen ergab, dass sich das Endometriumkarzinomrisiko nach einer ein- bis zweijährigen Einnahme verdoppelt und nach einer fünfjährigen Therapie sogar vervierfacht [156].

1.5.6.3 Wirkung von Tamoxifen auf die ERs

Bisher wurden verschiedene Studien über die genaue Wirkweise von Tamoxifen an den beiden Östrogenrezeptoren mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. In ihrer Studie wiesen Hall et al. nach, dass Tamoxifen bei alleiniger Expression von ER α eine agonistische Aktivität besitzt, hingegen zeigte sich diese bei alleiniger Expression von ER β nicht. Bei der Expression beider Rezeptorisoformen konnte ER β die Fähigkeit von Tamoxifen, die Transkription ER α -vermittelt zu aktivieren, vollständig aufheben [86]. Zhang et al. hingegen zeigten, dass in HEC-1-B-Endometriumkarzinomzellen sowohl nach dem Knockdown von ER β als auch von ER α die proliferative Wirkung von Tamo-

xifen beeinträchtigt ist und somit beide ERs an der proliferativen Wirkung von Tamoxifen beteiligt sind [117]. Hall et al. vermuten, dass die gewebeselektive Aktivität der SERMs von ihrer Fähigkeit abhängt AF-1 und AF-2 differentiell zu regulieren. So hemmt Tamoxifen die AF-2-Aktivität der ERs und wirkt folglich als Antagonist dort, wo die AF-2-Aktivität des ERs überwiegt. In dem Milieu, in welchem AF-1 der dominante Aktivator ist, wirkt Tamoxifen als partieller Agonist [86]. Dieser Unterschied trägt wahrscheinlich zu liganden- und gewebespezifischen Antworten auf Östrogen und SERMs bei [39]. ER β besitzt nahezu keine AF1-Aktivität, die AF-2-Aktivität der beiden Rezeptorisoformen ist nahezu gleich [87]. Folglich liegt die Vermutung nahe, dass Tamoxifen bei ER β die AF-2-Aktivität hemmt und somit als Antagonist auf ER β wirkt.

Die Studie von Wu et al. mit Genom-Microarrays zur Analyse des menschlichen Transkriptoms zeigte, dass Tamoxifen in Epithelzellen von Endometriumkarzinomzellen die Gentranskription reguliert [157]. Unter anderem wurde ein Paar-Box-Gen (PAX2) identifiziert, welches an der Zellproliferation sowie an der Karzinogenese im Endometrium beteiligt ist. PAX2 wird durch Östrogene und Tamoxifen in Endometriumkarzinomen, aber nicht in normalem Endometrium aktiviert [157]. Auch wird nach Bindung von Tamoxifen an die ERs die Transkription anderer Gene aktiviert als nach Bindung von Östrogenen. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die durch Tamoxifen veränderte Genexpression die Karzinogenese im Endometrium bewirkt [39]. Lewis et al. begründen die differentielle Wirkung von SERMs in den verschiedenen Geweben durch folgende Mechanismen [78]: unterschiedliche ER-Konformation nach Ligandenbindung, voneinander abweichende Expression sowie Bindung kernregulatorischer Proteine an die ERs und divergente Genaktivierung über einen ERE-unabhängigen Weg.

Die Ergebnisse der Arbeiten lassen darauf schließen, dass ER α und ER β eine unterschiedliche und gewebespezifische Funktionsweise besitzen. So scheint es eine Abhängigkeit der Antwort auf die SERMs von dem jeweiligen ER zu geben.

1.6 Zielsetzung

Trotz vieler bisher im Bereich der gynäkologischen Onkologie erfolgten Forschungen ist die Rolle des Östrogenrezeptors β im endometrialen Adenokarzinom bis heute noch nicht vollständig geklärt. Viele Arbeiten beschäftigten sich bereits damit, die Rolle von Östrogenrezeptor β in Bezug auf Karzinogenese und Tumorprogress eingehend zu beleuchten. Sie versuchten neben dem genaueren Verständnis der Karzinomentstehung auch neue Therapieansätze zu entwickeln. In den bisherigen Studien über das Mammakarzinom gelang es verschiedenen Forschungsgruppen die Rolle der Östrogenrezeptoren aufzuklären. Aufgrund der Forschungsergebnisse gelang es, den Rezeptor als Target für eine endokrine adjuvante Therapie mit Tamoxifen in der Onkologie zu nutzen. Neben vielen nützlichen Effekten wird Tamoxifen u.a. zugeschrieben, dass es die Entwicklung von Endometriumkarzinomen fördert. Folgende Fragestellung sollen daher in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- 1 Welchen Einfluss haben selektive ER β -Antagonisten und auch ER β -Agonisten auf das Wachstum von Endometriumkarzinomzellen?
- 2 Kann die proliferative Wirkung von Tamoxifen auf die Karzinomzellen durch selektive ER β -Modulatoren beeinflusst werden?
- 3 Wie verändert sich das Proliferationsverhalten der Endometriumkarzinomzellen nach einem ER β -Knockdown?
- 4 Gibt es Veränderungen der Genexpression nach einem ER β -Knockdown?

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es genauere Kenntnisse über die Rolle des Östrogenrezeptors β in endometrialen Adenokarzinomzellen zu erlangen. Letztendlich soll auch geklärt werden, welche Rolle der Rezeptor im Bezug auf das Wachstum der Endometriumkarzinomzellen einnimmt und ob die proliferativen Eigenschaften von Tamoxifen über diesen Rezeptor vermittelt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Materialien

Aspirations-Pipette, 2ml	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
Combitips advanced [®] , 1ml (steril)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips advanced [®] , 5ml (steril)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips advanced [®] , 1ml (unsteril)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Flächendesinfektion Propanol 70%	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Filterspitzen Biosphere [®] , 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	SARSTEDT (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturflasche Cellstar [®] , 250ml/75cm ² , 550ml/175cm ²	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Haemocytometer-Deckgläser 24*24	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LightCycler [®] Kapillaren, 20µl	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Multipette [®] pro	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
PCR SingleCap 8er-SoftStrips, 0,2ml, farblos	Biozym [®] Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Reaktionsgefäße mit Druckverschluss, 1,6ml	Biozym [®] Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Reference [®] Adjustable Volume Pipette, 0,5-20µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Schraubverschlussröhrchen Cellstar [®] , 15ml, 50ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Serologische Pipetten steril, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zählkammer Neubauer improved	Carl Roth [®] (Karlsruhe, Deutschland)
Zellkultur Multiwell Platten Cellstar [®] 6-Well, steril mit Abdeckplatte 96-Well, steril mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.1.2 Geräte

Brutschrank HeraCell [®] 150 CO ₂ -Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
LightCycler [®] 2.0 PCR Device	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil	Hellma (Müllheim, Deutschland)

Schüttelgerät	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Schüttler MS2 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Sterile Werkbank HERAsafe™ Type KS12	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Thermocycler T-Gradient 96	Biometra (Göttingen, Deutschland)
ThermoMixer® compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Ultratiefkühlschrank HERAfreeze™	Thermo Scientific™ (Waltham, MA, USA)
UV Photometer GeneRay	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Victor 3™ Multilabel Counter	PerkinElmer® (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge Biofuge™ pico™	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge™ 1S-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.1.3 Versuchsspezifische Materialien

2.1.3.1 Zellkultur

Zelllinien

HEC-1-A (Endometrium; HTB-112™)	ATCC® (Manassas, VA, USA)
------------------------------------	---------------------------

RL95-2
(Endometrium; CRL-1671™) ATCC® (Manassas, VA, USA)

Kulturmedien

Fetales Kälberserum (=FBS) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium; Nutrient Mixture F-12 HAM
Mit L-Glutamin und 15mM HEPES
ohne Phenolrot und Natriumbikarbonat D2906 (=DMEM/Hams F12) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Serum Replacement 2 (50x) (=SR2) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Reagenzien der Zellernte

Accutase® PAA (Pasching, Österreich)

Dulbecco's Sulfate Buffered Saline D8537 (=PBS) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Zellviabilitätsassay

CellTiter-Blue® Cell Viability Assay
(= CTB®-Assay) Promega (Madison, WI, USA)

Lösungsmittel

Ethanol (=EtOH; Vergällt,
mind. 99,8%, mit ca. 1% MEK) ROTH (Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol Dimethylsulfoxid 99,9%
(=DMSO) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Stimulanzien

4-OH-Tamoxifen	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
E2	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
ERB041	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Liquiritigenin	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
PHTPP	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
(R,R)-THC	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
WAY200070	Tocris Bioscience (Bristol, UK)

Die spezifischen Eigenschaften der Stimulanzien wurden unter *1.5 Verwendete ERβ-Modulatoren und deren spezifische Eigenschaften* beschrieben. In Tabelle 9 sind die genauen chemischen Bezeichnungen, Summenformeln und Lösungsmittel (LM) der SERMs zusammengefasst.

2.1.3.2 Molekulargenetische Untersuchungen

Transfektion

Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco™)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
TransFectin™ Lipid Reagent	BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Silencer® Negative Control #1 siRNA (AM4611)	Ambion®, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Silencer[®] Select GAPDH Positive Control siRNA (#4390850) Ambion[®], Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Silencer[®] Pre-designed siRNA #145911
#202031
#4148 Ambion[®], Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 9: In der Arbeit verwendete Stimulanzen

SERM	Chemischer Name	Summenformel	LM
ERB041	7-Ethenyl-2-(3-fluoro-4-hydroxyphenyl)-5-benzoxazolol	$C_{15}H_{10}FNO_3$	DMSO
Liquiritigenin	(S)-2,3-Dihydro-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	$C_{15}H_{12}O_4$	DMSO
PHTPP	4-[2-Phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol	$C_{20}H_{11}F_6N_3O$	EtOH
(R,R)-THC	(R,R)-5,11-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydro-2,8-chrysenediol	$C_{22}H_{24}O_2$	EtOH
4-OH-Tamoxifen	trans-4-[1-(4-[2-(Dimethylamino)ethoxy]phenyl)-2-phenyl-1-butenyl]phenol	$C_{26}H_{29}NO_2$	DMSO
WAY200070	7-Bromo-2-(4-hydroxyphenyl)-1,3-benzoxazol-5-ol	$C_{13}H_8BrNO_3$	DMSO

RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
NucleoSpin [®] RNA/Protein	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

RT-PCR

Primer:

Name	Sequenz (5' → 3')	Annealing-T.
ERbeta 1-A	GGCATGCGAGTAACAAGGGC	64°C
ERbeta 1-B	GGGAGCCCTCTTTGCTTTT	64°C
ERBex8-2	TTCTGCCCTCGCATGC	62°C
ERBex2	GTTTGGGTGATTGCCAAGAG	62°C
panERb* ex 5-6 fw	AGATTCCCGGCTTTGTGGAGC	62°C
panERb* ex 5-6 rev	CGCCACATCAGCCCCATCAT	62°C
β-Act1	CTTCCTTCCTGGGCATGGAGT	62°C
β-Act2	CAGGAGGAGCAATGATCTTGA TCTTC	62°C

* panERβ ist eine Variante, welche als genereller ERβ-Marker verwendet werden kann und einen Überblick für die gesamte ERβ-Expressionsstärke gibt.

LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics (Rotkreuz, Schweiz)
RNase-freies Wasser	QIAGEN (Hilden, Deutschland)

Microarray

GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array	Affymetrix (Santa Clara, CA, USA)
--------------------------------------	-----------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Standardbedingungen

Die Zellen wurden in mit 10% fetalem Rinderserum (FBS) angereichertem Standardmedium DMEM/HamsF12 im Inkubator bei 5% CO₂, 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Durchführung der Experimente erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Kulturmedien wurden bei 8°C aufbewahrt und vor Gebrauch mindestens auf Raumtemperatur erwärmt.

2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte bei -80°C. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad erwärmt, das Pellet der Zellen mit PBS gewaschen und im Zellmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in DMEM/Hams-F12 + 10% FBS-Medium und die Kultivierung im Inkubator.

2.2.1.3 Mediumwechsel

Für optimale Wachstumsbedingungen erneuerte man das Kulturmedium in zwei- bis dreitägigen Intervallen. Dazu wurde das aktuelle Medium mittels Vakuumpumpe unter Vorsicht abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von neuem Kulturmedium (10% FBS-Medium).

2.2.1.4 Zellernte

Um die Zellen für die Versuchsreihen nutzen zu können, löste man sie in verschiedenen Einzelschritten unter streng sterilen Bedingungen vom Untergrund. Hierfür wurde nach Absaugen des Mediums der Zellrasen mit PBS (ca. 5-10ml) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 0,5ml Accutase[®] im Brutschrank. Die Accutase[®] wurde zuvor bei -20°C gelagert. Die Dauer der Inkubation variierte hierbei je nach Zelllinie. Das Enzym Accutase[®] dient zur Ablösung der am Boden der Kulturflaschen adhärenen Zellen, ohne dabei Zellmatrixproteine zu schädigen. Nach erfolgter Lösung wurden die fluiden Zellen unter Zugabe von ca. 5ml Medium von der Kulturflasche in einen 50ml-Falcon überführt und für 5 Minuten bei 770 Umdrehungen/Minute und Raumtemperatur (23°C) zentrifugiert. Hierbei trennten sich flüssige und zelluläre Anteile voneinander. Der flüssige Überstand wurde abgesaugt und die sich im Pellet am Boden befindlichen korpuskulären Bestandteile mit frischem Medium durch Auf- und Abpipettieren und unter Zuhilfenahme des Minishakers wieder resuspendiert.

2.2.1.5 Zellaussaat

Für vergleichbare Ergebnisse der beiden Zellreihen erfolgte die Aussaat der Zellen in einer vorher definierten Menge (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verwendete Zellzahlen pro Well in den verschiedenen Nährmedien

Medium	Zelllinie	Zellzahl/Well
DMEM/Hams F12 + 10% FBS	HEC-1-A	600
DMEM/Hams F12 + 10% FBS	RL95-2	1200
1fach SR2 +/-E2% FBS	HEC-1-A	1200
1fach SR2 +/-E2 + 1% FBS	RL95-2	1800

Hierfür wurde die Zellzahl der gewonnenen Zellsuspension, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und folgender Formel bestimmt:

$$\left(\frac{\text{Zellzahl}}{4}\right) * 10^4 * \text{Volumen der Zellsuspension [in ml]}$$

Anschließend wurde die benötigte Menge an Zellsuspension pro definierter Menge an Kulturmedium berechnet, so dass letztendlich die Zellsuspensionen mit der vorher definierten Zellkonzentration hergestellt werden konnten. Vor Aussaat der Zellen wurden die randständigen Wells mit je 100µl PBS befüllt, um einer Verdunstung des Reaktionsvolumens entgegen zu wirken. Für die Stimulationsversuche wurde die pro Well gewünschte Zellzahl in 70µl Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. Nach der Aussaat erfolgte eine fünf- bis sechsstündige Inkubation der Zellen im Brutschrank.

2.2.1.6 Umstellung auf serumfreies Medium

Ein Teil der Versuche wurde unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Dazu erfolgte die Anpassung, d.h. das Runterhungern der Zellen, schrittweise an das serumfreie Medium (1-fach SR2-Medium = DMEM/HamsF12 + Serum Replacement). Am Tag vor dem eigentlichen Versuchsbeginn wurden die Zellen, wie in 2.2.1.4 *Zellernte* beschrieben, gewonnen und in 6-Well-Platten mit je 1ml Zellsuspension und 1ml DMEM/HamsF12 (5% FBS-Medium) ausgesät. Nach fünf Stunden erfolgte eine erneute Umstellung auf 0,5-fach SR2-Medium + 1% FBS. Durch eine weitere Inkubation bis zum Folgetag waren die Zellen an die veränderten Bedingungen adaptiert und konnten aufbereitet, ausgezählt und in 96-Well-Platten ausgesät werden. Dabei wurde als Grundmedium für alle weiteren Versuche das 1-fach SR2-Medium verwendet.

2.2.1.7 Stimulation der Zellen

Zunächst wurde die Stocklösung des jeweiligen Stimulans bedarfsweise verdünnt und anschließend die Stimulationslösung aus der gewünschten Verdünnung und dem jeweiligen Kulturmedium hergestellt. Berücksichtigt wurde hier die 1:3-Verdünnung durch Zugabe von 30µl Stimulationslösung zu 70µl Zell-

suspension, was letztendlich ein Reaktionsvolumen von 100µl je Well ergibt. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen mit 30µl der Stimulationslösung und die Inkubation der Zellkulturplatten im Brutschrank.

2.2.1.8 Messung der Zellzahl

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde indirekt über deren metabolische Aktivität mit dem CellTiterBlue®-Assay (CTB®-Assay) von Promega bestimmt. Hierbei reduzieren vitale, stoffwechselaktive Zellen Resazurin zu Resorufin, was eine Fluoreszenzänderung zur Folge hat. Abbildung 10 zeigt die Reduktionsreaktion von Resazurin zu Resorufin in den viablen, d.h. lebenden, Zellen. Resazurin ist dunkelblau, hat nur eine geringe Eigenfluoreszenz und ein Absorptionsmaximum bei 605nm, wohingegen Resorufin pink ist und stark fluoresziert (579Ex/590Em). Sein Absorptionsmaximum liegt bei 573nm [158].

Pro Well wurden je 10µl des Reagenzes gegeben und die Platten anschließend für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte im Multilabel Counter Victor3™ die Fluoreszenzmessung bei 579Ex/590Em. Das Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zu der Anzahl der lebensfähigen Zellen und somit ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen Zellzahl und Fluoreszenz.

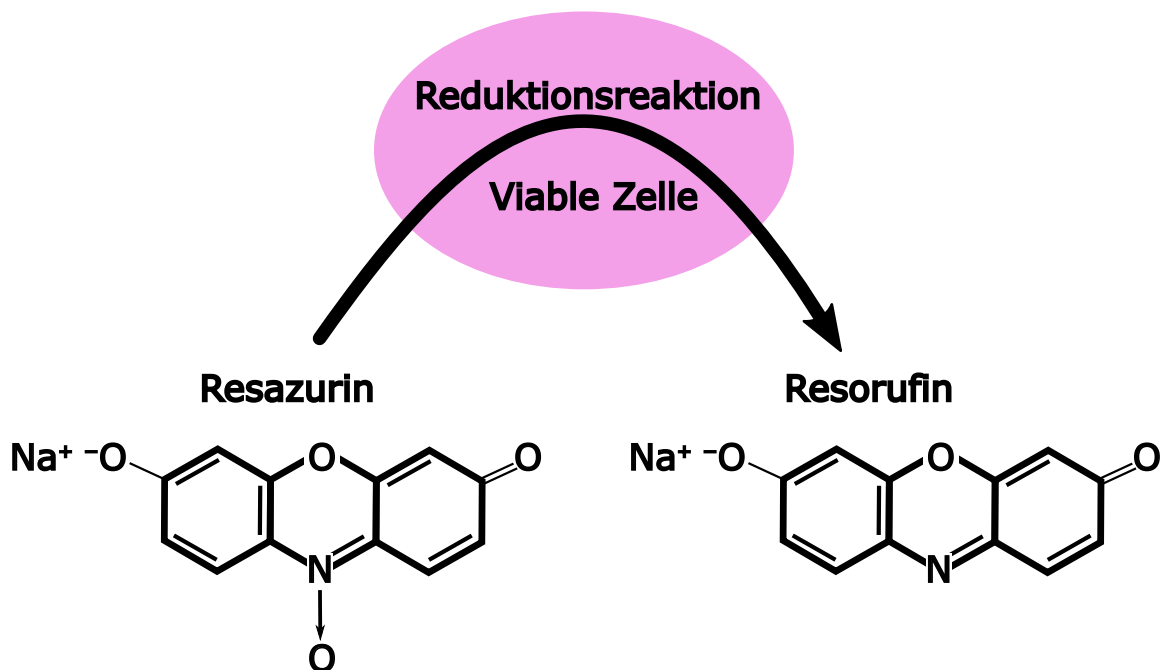


Abbildung 10: Umwandlung von Resazurin zu Resorufin durch metabolisch aktive Zellen, modifiziert nach [158]

2.2.1.9 Auswertung der Ergebnisse

Die im Multilabel Counter generierten Werte wurden in Microsoft® Excel 2013 ausgewertet und unter Zuhilfenahme des studentischen T-Tests auf Signifikanz geprüft. Hierbei wurden Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen verwendet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse wurden in Prozent der unstimulierten Zellen (Lösungsmittelkontrolle = LMK) angegeben.

2.2.1.10 Molekulargenetische Untersuchungen

Transfektion

Für jede der beiden verwendeten Krebszelllinien wurden mittels RNA-Interferenz mit spezifischer siRNA (small interfering RNA) ER β -Knockdown-Zellen (ER β -KD), d.h. Zellen ohne eine relevante ER β -Expression, und auch Kontrollzellen mit normaler ER β -Expression (neg.co.) hergestellt. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des TransFectin™ Lipid Reagents von BioRad Laboratories.

Am Tag vor dem Knockdown wurden die Zellen in DMEM/F12 + 10% FBS-Medium in 6-Well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 100nM siRNA und 8 μ l TransFectin™ in Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium. Für den ESR2-Knockdown wurde ein equimolarer Ansatz aus drei verschiedenen Silencer® Pre-designed siRNAs (#4148, #145911 und #202031 von Ambion®) verwendet. Die Silencer® siRNAs zielen auf verschiedene Regionen der ER β -mRNA. Die siRNA-Sense-Sequenzen (5' \mapsto 3') waren GGAAUUCUGGAAAUCUUUGtt, CCUUACCUGUAAACAGAGAtt bzw. GCAUUCAAGGACAUAUAUGAtt. Für die Negativkontrolle diente die Silencer® Negativ Control #1 siRNA von Ambion®. Diese interagiert mit keiner menschlichen RNA und hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation. Als Positivkontrolle wurde die Silencer® Select GAPDH Positive Control siRNA von Ambion® verwendet.

Während der Inkubationszeit von 48h kam es zum Einschleusen der siRNA in die Zelle und somit zur Translationshemmung der mRNAs. Anschließend erfolgte die Zellernte. Ein Teil der Zellen wurde für CTB®-Assays verwendet

und wie in 2.2.1 *Zellkultur* beschrieben aufbereitet. Die übrigen Zellen kamen für die sich anschließenden molekulargenetischen Untersuchungen zur Anwendung.

Isolierung der RNA

Für die molekulargenetischen Untersuchungen wurden die transfizierten Zellen, wie in 2.2.1.4 *Zellernte* beschrieben, in 1ml PBS resuspendiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und für zwei Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 360µl RP1-Puffer + β-Mercaptoethanol gelöst. Anschließend erfolgte die Isolierung der RNA mit dem NucleoSpin® RNA-Protein Isolierungs-Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

Synthese der cDNA

Die Synthese der cDNA wurde mit dem AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit von Agilent Technologies durchgeführt. Hierbei wurden die RNAs mittels Reverser Transkriptase nach Herstellerangaben in verschiedenen Teilschritten in cDNA umgeschrieben.

2.2.1.11 RT-PCR

Allgemeines

PCR (polymerase chain reaction) ist ein In-vitro-Verfahren, mit welchem man bestimmte DNA- bzw. cDNA-Abschnitte vervielfältigen kann. Für die Real Time PCR (RT-PCR) dieser Arbeit wurden die cDNAs verwendet, deren Herstellung in 2.2.1.10 *Molekulargenetische Untersuchungen* beschrieben ist. Die für die PCR verwendeten Primer und deren Sequenzen finden sich unter 2.1.3.2 *Molekulargenetische Untersuchungen*. Neben der cDNA wurde ein Master-Mix (MM) für die RT-PCR aus folgenden Komponenten hergestellt: 1µl spezifischer Primer, 1µl SYBR-Green, 3,4µl Wasser, 0,6µl MgCl₂ (25mM). Die Lagerung der Primer erfolgte bei -20°C, die der restlichen Bestandteile bei 4°C. Die Herstellung des MM erfolgte auf Eis. Im nächsten Schritt wurden in die LightCycler® Capillaries je 4µl cDNA (1:5 verdünnt mit RNase-freiem Wasser) bzw. für die Wasserprobe RNase-freies PCR-Wasser und je 6µl MM pi-

pettiert. Nach Verschließen der Kapillaren wurden sie kurzzeitig zentrifugiert und in den Kapillareblock des LightCycler® 2.0 überführt. Anschließend wurde die RT-PCR nach einem vorgegebenem Programm gestartet. Nach der Initiation (15min, 95°C) folgten die Amplifikationszyklen, bestehend aus drei Einzelschritten: Denaturierung (10sec, 95°C), Annealing (5sec, Temp. Primer-spezifisch, siehe 2.1.3.2.) und Elongation (12sec, 72°C). Die Messung erfolgte während der Elongation, in welcher die Maximalmenge an DNA vorliegt. Als letzter Schritt erfolgte die Erstellung der Schmelzkurve durch erneutes Erhitzen auf 95°C und ein anschließend rasches Herabkühlen. Pro Zyklus wird die DNA Menge verdoppelt, was zu einem exponentiellen Anstieg der DNA führt. Um die Vervielfältigung der DNA in Echtzeit zu beobachten, wird bei der RT-PCR ein Farbstoff (hier: SYBR-Green) zu dem Lösungsansatz gegeben, welcher nach Bindung an die DNA fluoresziert. Nicht gebundener Farbstoff hingegen emittiert kein Licht. Als Referenzgen wurde in allen Versuchen ein β -Actin Fragment amplifiziert. β -Actin stellt Produkte her und zwar unabhängig von äußeren Einflüssen, so dass diese immer konstant vorliegen. Pro Primer wurden vier Proben verwendet: ESR2-Knockdown, Positivkontrolle (GAPDH), Negativkontrolle und die Leerprobe (Wasserprobe).

Fluoreszenzmessung und Ct-Wert

Durch die Lichtemission, welche der LightCycler® detektiert, ist es möglich, die Amplifikation in Echtzeit (Real Time, Abk.: RT) zu beobachten und hieraus den Ct-Wert (cycle threshold) zu bestimmen. Der Ct-Wert entspricht der Zykluszahl, bei welcher erstmals die Fluoreszenz der Probe signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Ein niedriger Ct-Wert entspricht einer hohen DNA-Konzentration und ist somit ein quantitatives Maß für die DNA-Menge [159, 160].

Quantifizierung mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode im Sinne einer relativen Quantifizierung [161]. Zur relativen Quantifizierung der Werte wurde aus den Ct-Werten der Zielsequenz (Zielgen, hier ESR2) und de-

nen des housekeeping Genprodukt β -Actin ein ΔC_t gebildet:

$$\Delta C_t = C_t [\text{Zielgen (hier: ESR2)}] - C_t [\text{Referenzgen (hier: } \beta\text{-Actin)}]$$

Anschließend wurden die ΔC_t -Werte der ESR2-downgeknockten Zellen (Probe) mit den Kontrollzellen (Kontrolle) verglichen und daraus die Ratio gebildet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t [\text{Probe}] - \Delta C_t [\text{Kontrolle}]$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Im letzten Schritt wurden die Werte mit 100 multipliziert.

2.2.1.12 Microarrays

Die molekulargenetischen Untersuchung der Expression von mRNAs (=Transkriptom) erfolgte mittels Microarray. Mithilfe des GeneChip[®] von Affymetrix war es möglich das Transkriptom der Zellen zu beurteilen und zu vergleichen. Die Durchführung erfolgte im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB; Am Biopark 9, 93053 Regensburg, Deutschland).

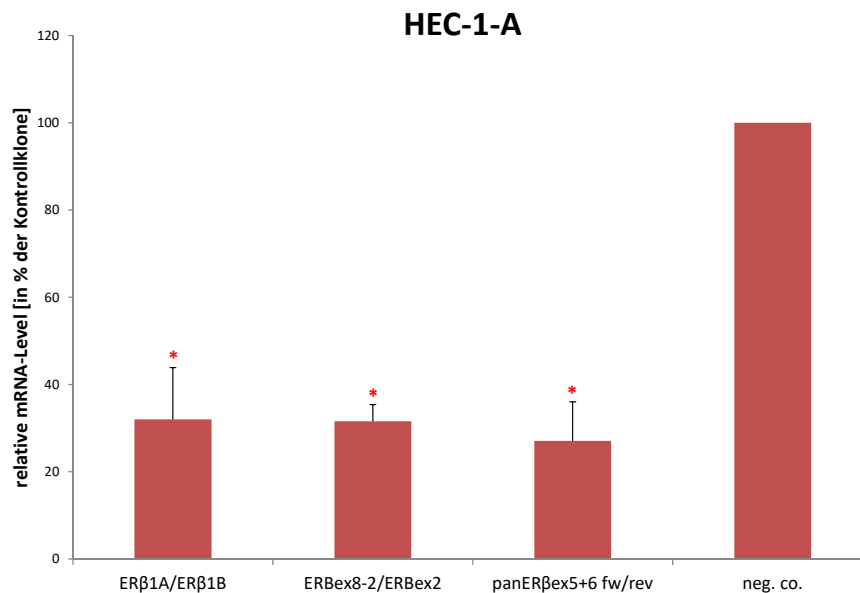
2.3 Statistische Auswertung und Literaturverwaltung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Experimente erfolgte mit Microsoft[®] Excel 2013. Die Literaturverwaltung erfolgte mit Citavi (Version 5.7.1.0) von Swiss Academic Software GmbH.

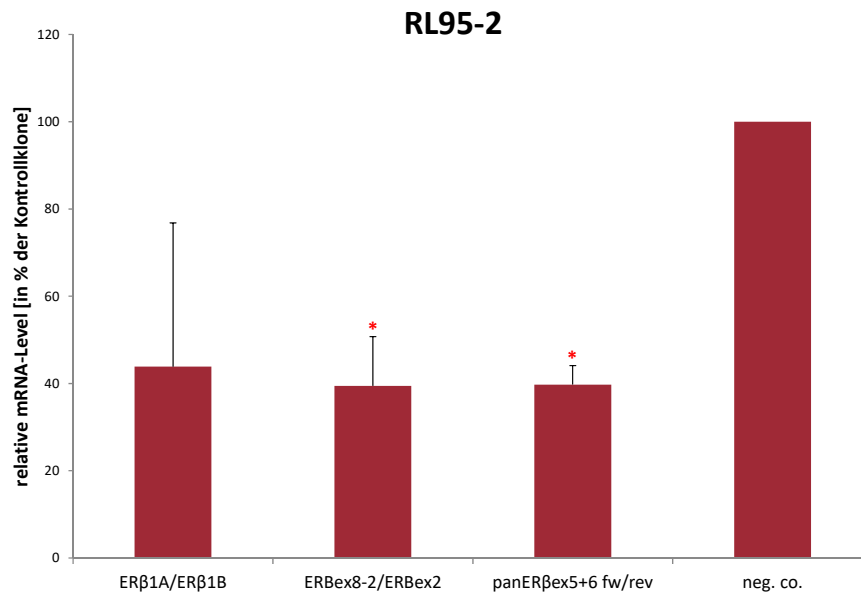
3 Ergebnisse

3.1 Transienter ER β -Knockdown

Um den Einfluss von ER β auf die Zellproliferation der Endometriumkarzinomzellen HEC-1-A und auch RL95-2 valide zu untersuchen, erfolgte eine gezielte Abschaltung (Knockdown) des dem ER β zugehörigen Gens ESR2 mittels spezifischer siRNA. Bei der Transfektion wird mittels RNA-Interferenz die Genexpression für ESR2 in den Karzinomzellen auf RNA-Ebene unterbunden. Um den Erfolg des Knockdowns zu quantifizieren, wurden anschließend die ER β -mRNA-Level der Knockdown-Zellen (HEC-1-A/ER β -KD bzw. RL95-2/ER β -KD) und der Kontrollzellen (HEC-1-A/neg.co. bzw. RL95-2/neg.co.) mittels RT-PCR miteinander verglichen. Der relative Genexpressionslevel der ER β -KD und der neg.co. ist in Abbildung 11 dargestellt. Die ER β -KD-Zellen zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen einen verminderten ER β - bzw. ESR2-mRNA-Level. Somit kann im Weiteren von einer Reduktion der Expression von ER β bei den ER β -KD-Zellen ausgegangen werden.



(a) Erfolg des ESR2-Knockdowns der HEC-1-A-Zellen



(b) Erfolg des ESR2-Knockdowns der RL95-2-Zellen

Abbildung 11: Erfolgskontrolle des ERβ-Knockdowns

Graphische Darstellung des ERβ-Knockdownerfolgs der HEC-1-A- sowie der RL95-2-Zellen (a: HEC-1-A, b: RL95-2). Die Bestimmung der mRNA-Level erfolgte mittels RT-PCR mit ESR2-spezifischen Primern: ERβ1A/ERβ1B, ERBex8-2/ERBex2, panERβ ex 5+6 fw/rev. Gezeigt wird die durchschnittliche ERβ-Expression der ERβ-KD, verglichen mit der neg.co., \pm sd (Standardabweichung), * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): ERβ-KD vs. neg.co.

3.2 Proliferationsversuche

In verschiedenen Versuchsreihen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von ERβ auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzellen untersucht. In einem ersten Schritt verglich man das Proliferationsverhalten von ERβ-KD mit der neg.co. In weiteren Experimenten untersuchte man, ob durch ERβ-spezifische SERMs das Proliferationsverhalten der Endometriumkarzinomzellen beeinflusst werden kann. Hierbei wurden sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirkende SERMs verwendet.

3.2.1 Vergleich von ERβ-KD und neg.co.**3.2.1.1 Überblick**

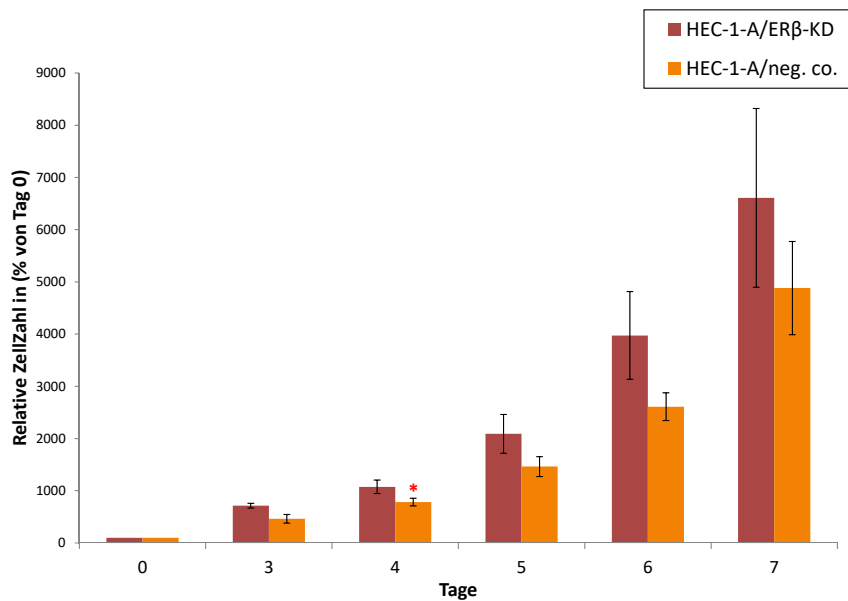
Der erfolgreiche ESR2-Knockdown (siehe 3.1 *Transienter ERβ-Knockdown*) mittels spezifischer siRNA rechtfertigte die Durchführung weiterer Versuchs-

reihen (Proliferationsassays und Microarrays) mit dem Ziel, den Einfluss von ER β auf die Zellproliferation genauer bestimmen zu können sowie in einem weiteren Schritt den Einfluss auf die Genexpression zu untersuchen (siehe 3.4 *Genexpressionsanalyse mittels Microarrays*). Im Anschluss an die Transfektion sollte durch eine indirekte Bestimmung der Anzahl vitaler Zellklone mittels CTB[®]-Assays eine Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen gemacht werden. Es erfolgte ein Vergleich zwischen neg.co. und ER β -KD.

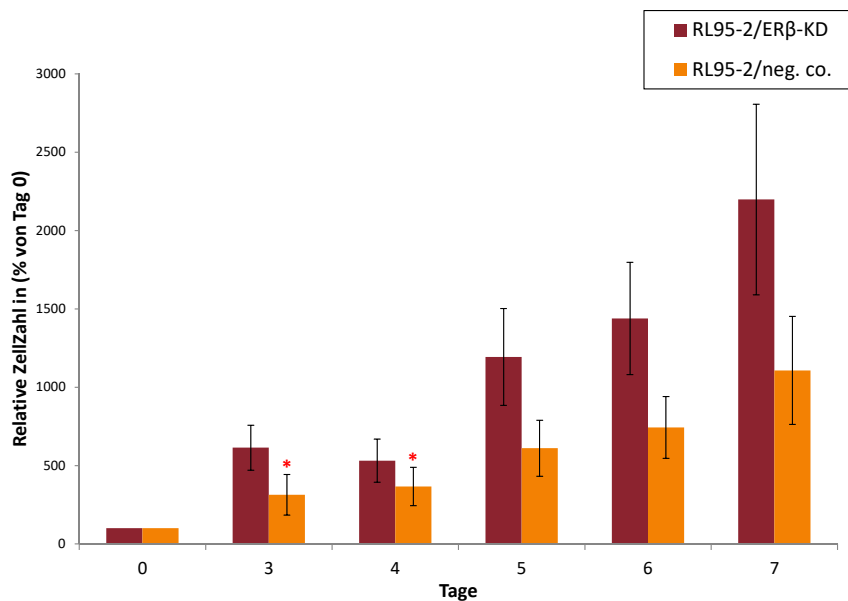
Ziel war es letztlich eine Aussage über veränderte Wachstumsaktivitäten treffen zu können. Die Versuchsreihen erfolgten in 10% FBS-Medium sowie bei HEC-1-A zusätzlich in serumfreien Medium. Die ausgesäten Zellzahlen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Nach Aussaat erfolgten Messungen mittels CTB[®] an Tag 0 sowie an den Tagen 3 bis 8 und zum Vergleich der Messungen wurde der jeweilige Mittelwert herangezogen.

3.2.1.2 Proliferationsvergleich ER β -KD vs. neg.co.

Die HEC-1-A/ER β -KD wiesen im 10% FBS-Medium ein gesteigertes Proliferationsverhalten im Vergleich zu den HEC-1-A/neg.co. (vgl. Abbildung 12a) auf. Dieses Verhalten zeigte sich auch im 1-fach SR2-Medium +/- E2. Signifikante Unterschiede waren hierbei im 10% FBS-Medium an Tag 4 ($p < 0,05$) sowie im serum- und östrogenfreien Medium an Tag 3 ($p < 0,04$) zu beobachten. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei den RL95-2-Zellen im 10% FBS-Medium. Auch hier war die Proliferationsrate der RL95-2/ER β -KD im Vergleich zu den RL95-2/neg.co. mit signifikanten Unterschieden an drei Tagen (vgl. Abbildung 12b) gesteigert.



(a) Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen



(b) Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen

Abbildung 12: Proliferationsverhalten der Endometriumkarzinomzellen vor und nach einem siRNA-vermittelten ERβ-Knockdown in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der Endometriumkarzinomzellen in 10% FBS-Medium. Verglichen werden HEC-1-A/KD und HEC-1-A/neg.co. (a) bzw. RL95-2/KD und RL95-2/neg.co. (b) an den Tagen 3, 4, 5, 6 und 7 nach dem ERβ-Knockdown mittels spezifischer siRNA. Die Darstellung erfolgt in % von Tag 0 \pm SEM (standard error of the mean). n=3, * p<0,05 (Signifikanzniveau): KD versus neg.co.

3.3 Vergleich des Proliferationsverhaltens nach Stimulation

3.3.1 Überblick

In weiteren Versuchen wurde das Wachstumsverhalten nach Stimulation mit ausgewählten ER β -spezifischen Agonisten und Antagonisten (SERMs) mittels CTB[®]-Assays ausgewertet und mit Kontrollzellen (d.h. nicht-stimulierten Zellen) verglichen. Die Versuchsreihen hierzu wurden in 10% FBS-Medium sowie in serumfreiem Kulturmedium (1-fach SR2) mit und ohne E2 (+/- E2) durchgeführt. Die serumfreien Versuche mit den Zellen der Zelllinie RL95-2 erfolgten in 1-fach SR2-Medium + 1% FBS, da ein Wachstum unter strikt serumfreien Bedingungen nicht möglich ist. Die für die Proliferationsassays jeweils gewählten Zellzahlen sind in Tabelle 10 unter 2.2.1.5 *Zellaussaat* aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Konzentrationen der SERMs

SERM	Verwendete Konzentration
ERB041	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM
Liquiritigenin	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM
PHTPP	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM
(R,R)-THC	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM
Tamoxifen	100nM, 1000nM, 10 μ M
WAY200070	1nM, 10nM, 100nM, 1000nM

Nach Aussaat wurden die Messungen an Tag 0 sowie an den Tagen 3 bis 8 nach Stimulation mit einem Messabstand von je 24 Stunden (h) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte prozentual zu den Zellen der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Pro Stimulans, Konzentration (vgl. Tabelle 11) und Zelllinie wurden mindestens drei Versuche (n) durchgeführt. Durch den Vergleich der Mittelwerte vitaler Zellen nach Stimulation mit unbehandelten Zellen (LMK) konnte eine Aussage über veränderte Wachstumsaktivitäten getroffen werden.

3.3.2 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit PHTPP

HEC-1-A-Zellen

Bei der Stimulation der HEC-1-A-Zellen mit dem selektiven ER β -Antagonisten PHTPP zeigten sich im 10% FBS-Medium konzentrationsabhängige Effekte. 1nM PHTPP wirkte proliferationssteigernd mit einem Maximalwert an Tag 3 von $116\% \pm 1,7$ ($p < 0,001$). Auch 10nM PHTPP bewirkte an Tag 3 eine signifikante Proliferationssteigerung bis auf $110\% \pm 1,9$ ($p < 0,008$). Die anfängliche Proliferationssteigerung bei 100nM PHTPP war den Tagen 4, 5 und 6 nicht mehr zu beobachten. Es zeigten sich Werte um die 100%. An keinem der Versuchstage nach Stimulation mit 100nM war die Änderung im Vergleich zur LMK signifikant. Bei der Konzentration von 1000nM wirkte PHTPP hemmend auf die Proliferation der Zellen. Hierbei ging die Zahl der vitalen Zellen an den Tagen 5 und 6 auf Minimalwerte von $82\% \pm 3,7$ bzw. $78\% \pm 5,4$ mit signifikanten Unterschieden zur LMK ($p < 0,02$ bzw. $p < 0,03$) zurück.

Abbildung 13 zeigt eine Übersicht über die Entwicklung der relativen Zellzahlen (in % der LMK) nach Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen von PHTPP. Hier wird deutlich, dass sich im 10% FBS-Medium mit steigender Konzentration von PHTPP die Wirkung auf die Proliferation der Zellen ändert: 1nM, 10nM und zum Teil auch 100nM PHTPP wirkten proliferationsfördernd, wohingegen 1000nM PHTPP zum Proliferationsrückgang der Zellen führte.

Bei den Versuchen im serumfreien Medium (1-fach SR2-Medium) und auch im serumfreien Medium unter Zugabe von E2 (1-fach SR2-Medium + 1nM E2) konnten keine signifikanten Veränderungen der Proliferation nach Stimulation mit PHTPP beobachtet werden.

RL95-2-Zellen

Nach Stimulation mit PHTPP war an allen Versuchstagen und bei jeder der eingesetzten Konzentrationen eine Proliferationssteigerung der Karzinomzellen der Linie RL95-2 zu beobachten. Am deutlichsten fiel der wachstumsfördernde Effekt bei der Konzentration von 1nM mit signifikanten Unterschieden zur LMK ($p < 0,025$) an allen Versuchstagen aus. Der Maximalwert konnte hierbei an Tag 8 mit $115\% \pm 2,4$ erreicht werden. Auch nach der Stimulation mit 10nM war

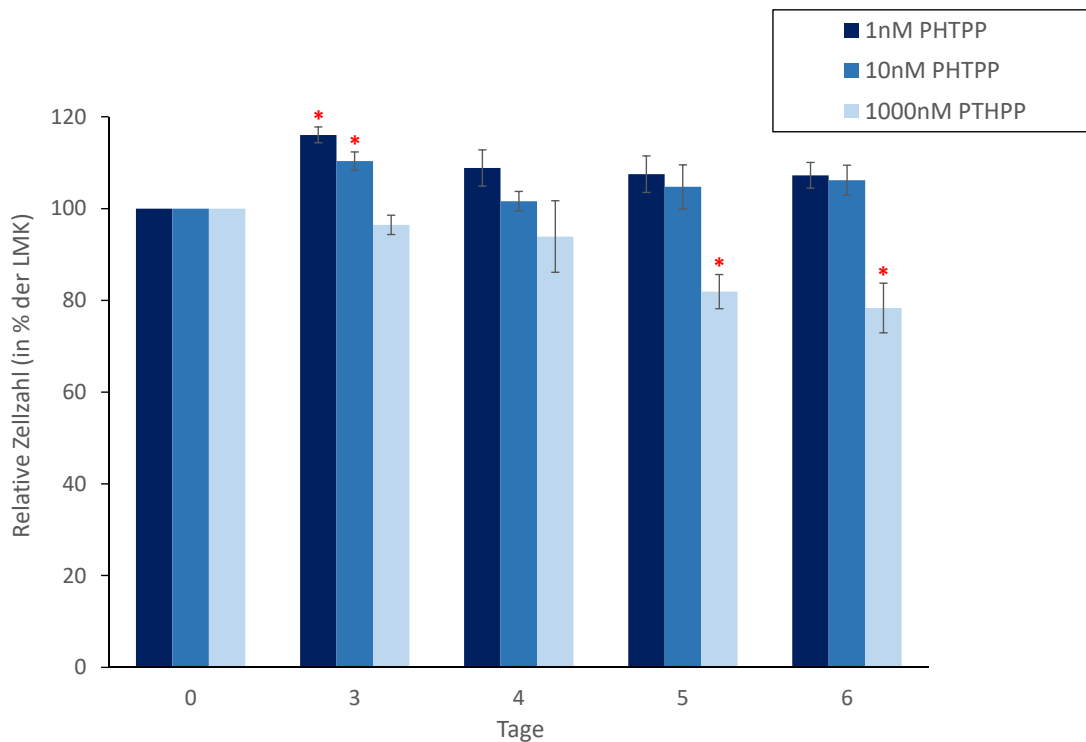


Abbildung 13: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, und 6 nach Stimulation mit 1, 10 und 1000nM PHTPP. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

die Proliferation an allen Tagen mit signifikanten Unterschieden gesteigert. Bei 100nM zeigten sich an den Tagen 5, 6 und 8 signifikante Unterschiede im Vergleich zur LMK ($p < 0,05$) mit einem Maximalwert an Tag 8 ($113\% \pm 1,2$, $p < 0,008$). Auch in der Konzentration von 1000nM erbrachte PHTPP eine Proliferationsförderung mit einem Maximalwert ebenfalls an Tag 8 ($110\% \pm 2,5$). Signifikante Unterschiede zur LMK zeigten sich an den Tagen 4, 5 und 6. Mit steigender Konzentration von PHTPP fiel der proliferationsfördernde Effekt geringer aus (siehe Abbildung 14). Es zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen von den HEC1-A-Zellen bei jeder der eingesetzten Konzentration von PHTPP eine proliferationssteigernde Wirkung.

Im 1-fach SR2-Medium und auch im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 war die Wirkung von PHTPP zum größten Teil auf die Zellen proliferationssteigernd, jedoch ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zur LMK.

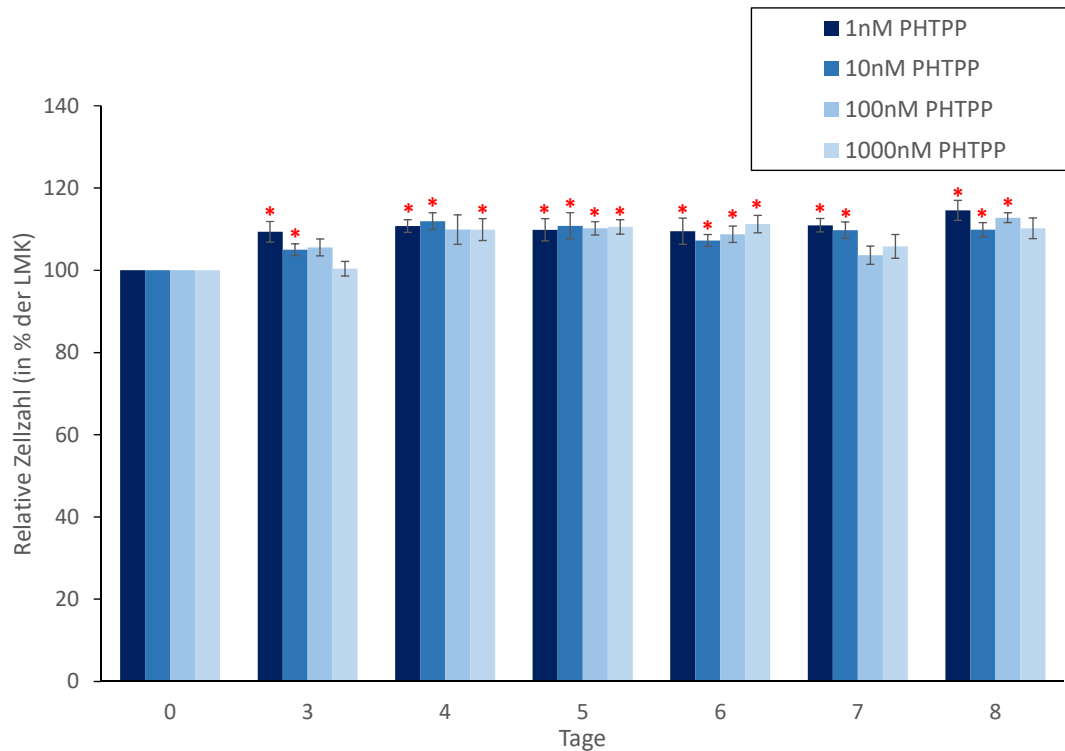


Abbildung 14: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6, 7 und 8 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM PHTPP. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

3.3.3 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit (R,R)-THC

HEC-1-A-Zellen

Im 10% FBS-Medium bewirkte der ER β -Antagonist (R,R)-THC eine Proliferationssteigerung der HEC-1-A-Zellen. Dieser Effekt zeigte sich bei allen verwendeten Konzentrationen von (R,R)-THC. Hierbei fiel die wachstumsfördern-

de Wirkung mit steigender Konzentration stärker aus. Ein Wirkmaximum konnte jeweils an Tag 5 nach Stimulation beobachtet werden. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur LMK zeigten sich bei allen eingesetzten Konzentrationen: Bei 1nM (R,R)-THC an Tag 5 mit $121\% \pm 3,9$ ($p < 0,006$), bei 10nM (R,R)-THC an Tag 5 mit $124\% \pm 5,1$ ($p < 0,006$) und Tag 6 mit $109\% \pm 1,8$ ($p < 0,007$), bei 100nM an den Tagen 3, 4, 5, 6 und 7 und bei 1000nM an den Tagen 4 bis 6. Abbildung 15 zeigt das Proliferationsverhalten der Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC.

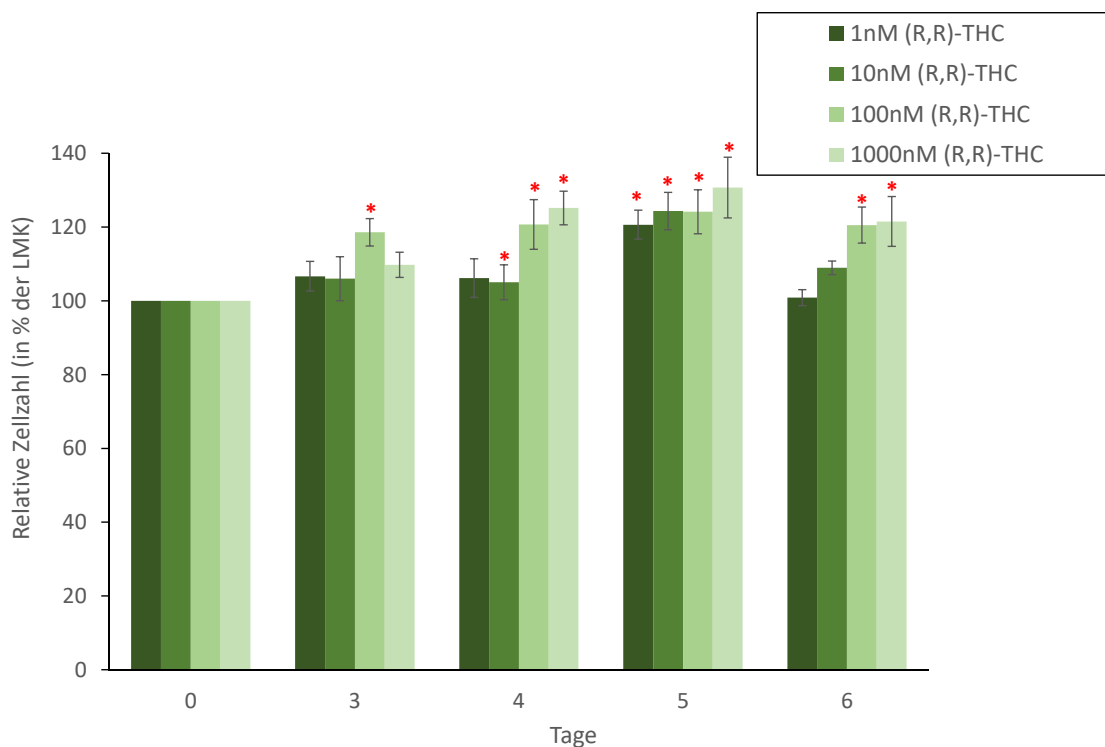


Abbildung 15: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, und 6 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM (R,R)-THC. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Die Wirkung von (R,R)-THC erzielte im 1-fach SR2-Medium an den Tagen 3 bis 5 bei allen eingesetzten Konzentrationen Werte der relativen Zellzahl (in %

der LMK) über 100. Eine signifikante Veränderung war aber nur bei 100nM an Tag 4 mit $107\% \pm 0,7$ ($p < 0,003$) zu beobachten.

Im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 zeigte sich an Tag 3 bei allen Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die Proliferation mit einem signifikanten Unterschied zur LMK bei 1nM (R,R)-THC mit $89\% \pm 2,0$ ($p < 0,03$). Bei 10nM war dieser Rückgang an drei aufeinanderfolgenden Tagen zu verzeichnen, jedoch ohne signifikante Unterschiede zur LMK. 100nM (R,R)-THC zeigten an den Tagen 3 und 4 einen leichten Rückgang der Proliferation. Jedoch war auch hier keiner der Werte signifikant verändert. Bei der Konzentration von 1000nM war die Wirkung ebenfalls antiproliferativ mit einem signifikanten Unterschied zur LMK an Tag 5 ($p < 0,05$) mit einer relativen Zellzahl von $91\% \pm 2,0$.

RL95-2-Zellen

Die Wirkung von (R,R)-THC auf die Endometriumkarzinomzellen der Zelllinie RL95-2 erbrachte im 10% FBS-Medium bei allen eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zur LMK einen Proliferationsanstieg. In Abbildung 16 ist das Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen im 10% FBS-Medium dargestellt. Auch hier zeigte sich, wie bei den HEC-1-A-Zellen bereits beobachtet, bei allen Konzentrationen ein Wirkmaximum an Tag 5. Signifikante Unterschiede sah man im Vergleich zur LMK bei 1nM (R,R)-THC an Tag 4 ($105\% \pm 0,5$, $p < 0,002$), Tag 5 ($109\% \pm 2,4$, $p < 0,03$) und Tag 6 ($104\% \pm 0,9$, $p < 0,03$), bei 10nM an Tag 8 ($108\% \pm 1,8$, $p < 0,04$), bei 100nM an Tag 7 ($107\% \pm 1,1$, $p < 0,02$) und 8 ($106\% \pm 1,2$, $p < 0,04$) und bei 1000nM an Tag 5 ($112\% \pm 2,4$, $p < 0,02$) und Tag 8 ($108\% \pm 1,1$, $p < 0,02$).

Auch unter nahezu serumfreien Bedingungen (1-fach SR2-Medium + 1% FBS) +/- E2 zeigte (R,R)-THC proliferationsfördernde Effekte auf die RL95-2-Zellen an allen Versuchstagen. Die Effekte waren jedoch nicht so ausgeprägt wie im 10% FBS-Medium und zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Zellen der LMK.

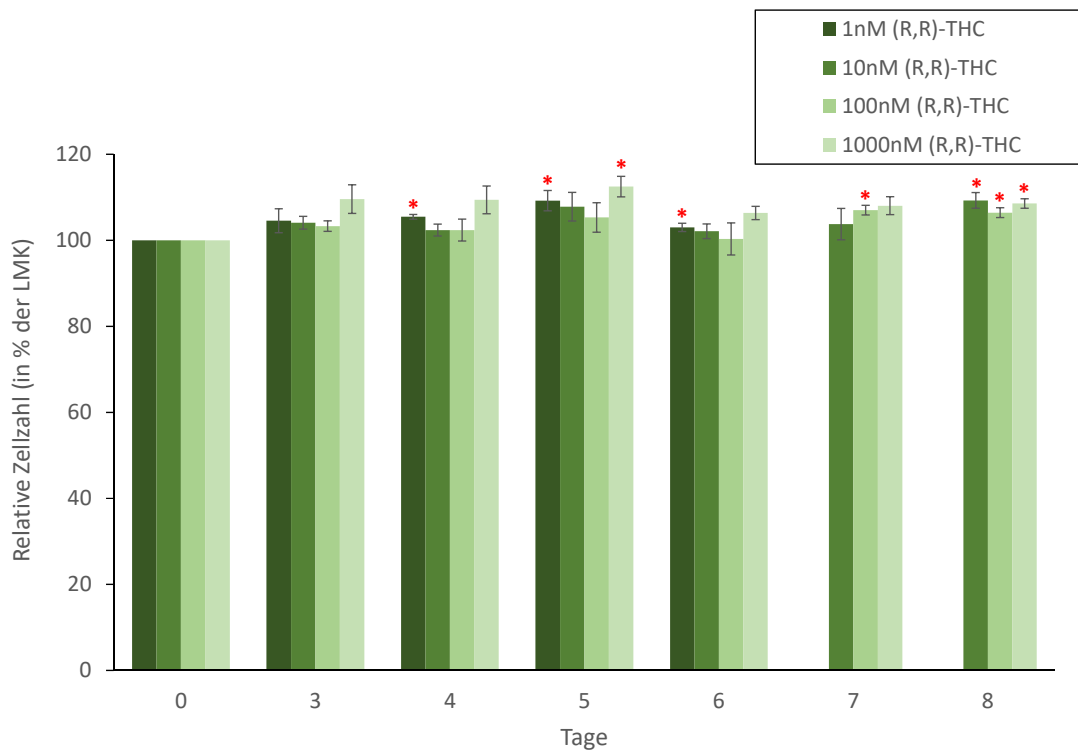


Abbildung 16: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6, 7 und 8 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM (R,R)-THC (1nM an den Tagen 7 und 8 nicht dargestellt). Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

3.3.4 Zusammenfassung ER β -Antagonisten

Im 10% FBS-Medium zeigte (R,R)-THC auf die HEC-1-A-Zellen einen ausschließlich proliferationssteigernden Effekt. Mit steigender Konzentration fiel die wachstumsfördernde Wirkung von (R,R)-THC mit einem Maximum für alle Konzentrationen an Tag 5 stärker aus. Auch im 1-fach SR2-Medium konnte eine wachstumsfördernde Wirkung von (R,R)-THC beobachtet werden, im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 zeigten sich diese Effekte nicht. (R,R)-THC wirkte auf die RL95-2-Zellen sowohl im 10% FBS-Medium als auch im 1-fach SR2-Medium proliferationssteigernd. Auch hier zeigte sich im 10% FBS-Medium

ein Wirkmaximum an Tag 5. Bei beiden Zelllinien konnte die größte Proliferationssteigerung bei der Konzentration von 1000nM (R,R)-THC erreicht werden, wobei bei HEC-1-A deutlich höhere Werte erzielt werden konnten.

Der selektive ER β -Antagonist PHTPP hingegen zeigte teilweise gegensätzliche Wirkungen. Die HEC-1-A-Zellen reagierten abhängig von der eingesetzten Konzentration: 1nM und 10nM PHTPP wirkten proliferationssteigernd, 100nM zeigte eine proliferationsfördernde und antiproliferative Wirkung. Dagegen erbrachten 1000nM PHTPP einen Proliferationsrückgang. Die Stimulation der Endometriumkarzinomzellen der Zelllinie RL95-2 mit PHTPP bewirkte in allen Kulturmedien eine Proliferationssteigerung. Im 10% FBS-Medium fiel mit steigender Konzentration des selektiven ER β -Antagonisten der proliferationsfördernde Effekt geringer aus. Auch unter serumfreien Bedingungen ließ sich ein Anstieg der Proliferation beobachten.

Sowohl bei den HEC-1-A-Zellen als auch bei den RL95-2-Zellen zeigten sich nach Stimulation mit den beiden ER β -Antagonisten im 10% FBS-Medium die aussagekräftigsten Ergebnisse. Mit Ausnahme von 100nM und 1000nM PHTPP bei den HEC-1-A-Zellen konnte durch den Einfluss der Antagonisten eine Proliferationssteigerung der Endometriumkarzinomzellen bewirkt werden.

3.3.5 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit ERB041

HEC-1-A-Zellen

Die Stimulation der HEC-1-A Zellen mit ERB041 erbrachte im 10% FBS-Medium keine signifikanten Veränderungen (bis auf Tag 3 mit 10nM). Es zeigte sich vor allem an den Tagen 3 und 4 die Tendenz zur Proliferationssteigerung. Im 1-fach SR2-Medium bewirkte die Stimulation mit ERB041 bei allen Konzentrationen an den Tagen 3, 4 und 5 eine Proliferationssteigerung. Der Maximalwert der Steigerung wurde bei 10nM mit einer relativen Zellzahl von 117% erreicht. Bei den Konzentrationen 10nM und 1000nM zeigte sich ein signifikanter Unterschied zur LMK an Tag 4 ($p < 0,05$) mit relativen Zellzahlen von $104\% \pm 0,8$ bzw. $109\% \pm 2,8$. Das Proliferationsverhalten im 1-fach SR2-Medium ist in Abbildung 17 dargestellt. Bei den anderen verwendeten Konzentrationen konnten jedoch keine signifikanten Werte beobachtet werden. Die

Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen im 10% FBS-Medium.

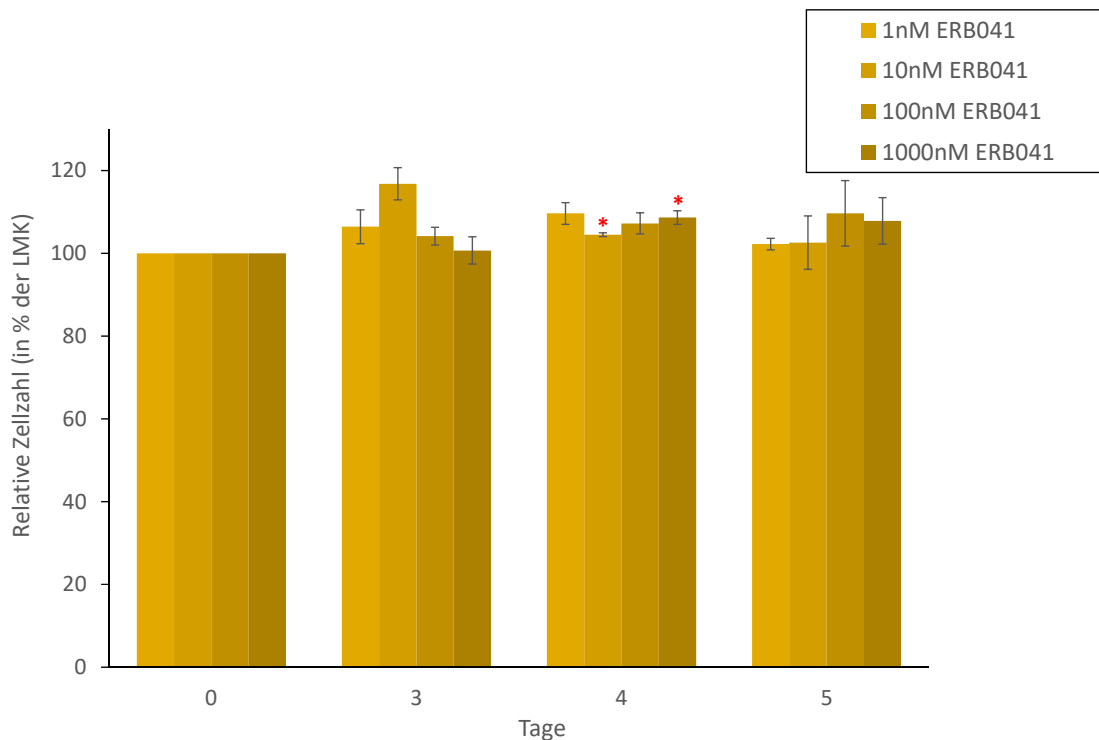


Abbildung 17: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 1-fach SR2-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 1-fach SR2-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4 und 5 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM ERB041. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Auch im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 bewirkte ERB041 keine signifikante Veränderung der Proliferation, erbrachte aber ebenfalls eine Proliferationssteigerung an allen Tagen.

RL95-2-Zellen

Im 10% FBS-Medium war die Wirkung von ERB041 proliferationssteigernd an allen Tagen und bei allen eingesetzten Konzentrationen. Nach Stimulation mit 1nM ERB041 war der Unterschied der relativen Zellzahl zur LMK an allen Tagen signifikant verändert ($p < 0,002$). Auch 10nM ERB041 erbrachte signifikant

te Änderungen an den Tagen 3 bis 6 mit einem Maximalwert von $113\% \pm 2,0$ an Tag 4 ($p < 0,002$). 100nM ERB041 erbrachte signifikante Änderungen an Tag 3 mit $112\% \pm 4,2$ ($p < 0,04$) und an Tag 4 mit $108\% \pm 1,3$ ($p < 0,0008$) sowie 1000nM an Tag 4 mit $112\% \pm 3,1$ ($p < 0,02$). Das Proliferationsverhalten ist in Abbildung 18 dargestellt.

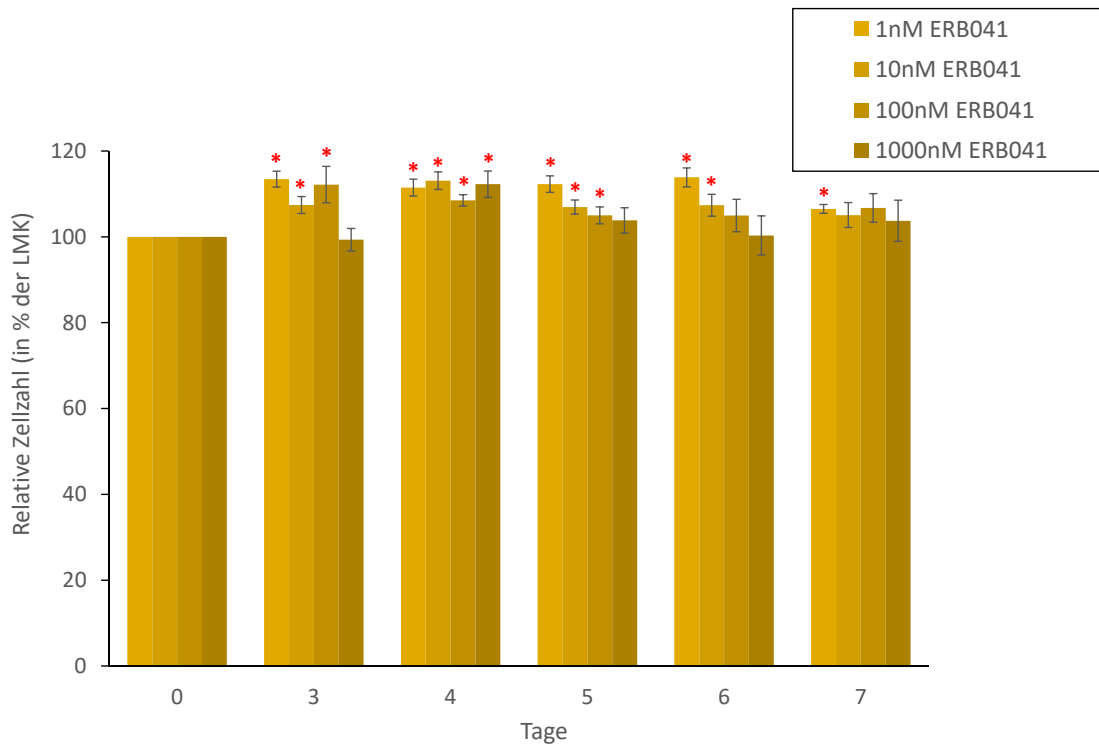


Abbildung 18: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6 und 7 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM ERB041. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Im 1-fach SR2-Medium + 1% FBS erbrachte ERB041 bei den Konzentrationen von 1nM, 10nM und 100nM eine positive Wirkung auf die Proliferation der Zellen, vergleichbar mit den Ergebnissen im 10% FBS-Medium. Die Stimulation mit 1000nM ERB041 führte zu einem nicht signifikanten Rückgang der Zellzahl, wirkte also antiproliferativ. Im serumfreien Medium mit 1% FBS

+ 1nM E2 kam es bei allen Konzentrationen an den Tagen 3 und 4 zum Anstieg der Zellzahl. Hierbei war jedoch an keinem Tag die Zellzahl im Vergleich zur LMK signifikant verändert.

3.3.6 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Liquiritigenin

HEC1-A-Zellen

Im 10% FBS-Medium war die Wirkung von Liquiritigenin auf die Zellen der Linie HEC-1-A an allen Versuchstagen und bei allen eingesetzten Konzentrationen wachstumssteigernd. Das Wachstumsverhalten zeigt Abbildung 19.

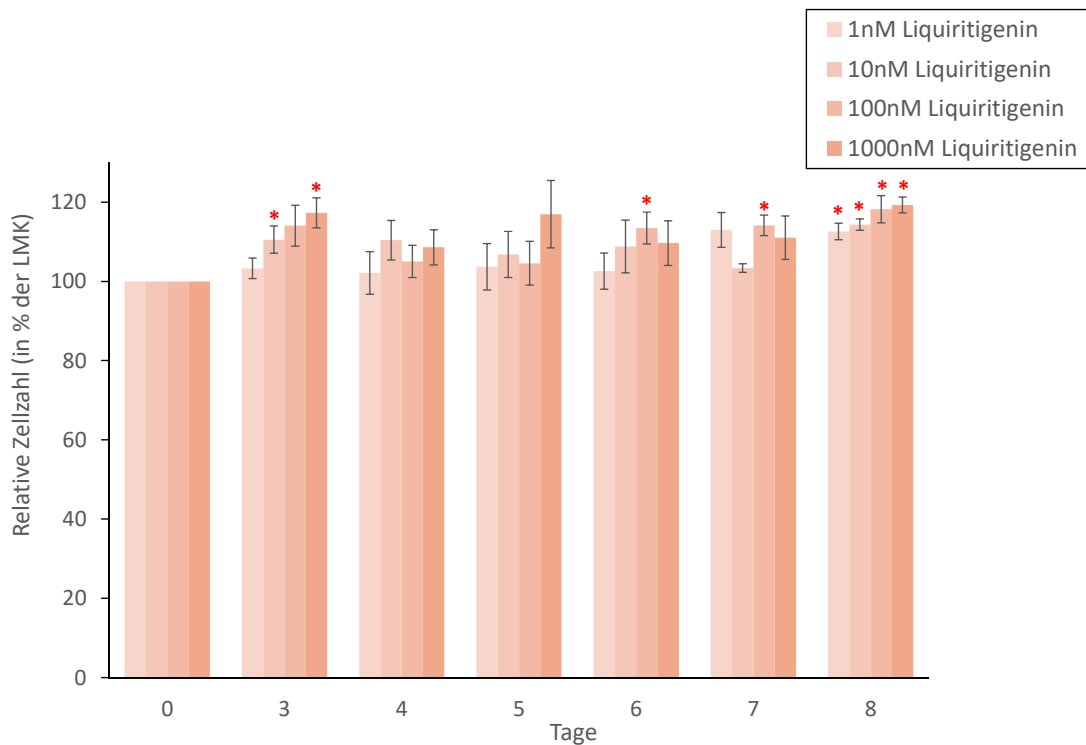


Abbildung 19: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6, 7 und 8 nach Stimulation mit 1, 10 und 100 und 1000nM Liquiritigenin. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Signifikante Veränderungen konnten bei der Konzentration von 1nM Liquiritigenin an Tag 8 ($113\% \pm 2,1$, $p < 0,03$) sowie bei 10nM Liquiritigenin an den Tagen 3 ($110\% \pm 3,4$, $p < 0,04$) und 8 ($114\% \pm 1,4$, $p < 0,001$) beobachtet werden. Ebenfalls signifikant verändert war die Proliferation der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit 100nM an den Tagen 6 ($113\% \pm 4,0$, $p < 0,02$), 7 ($114\% \pm 2,6$, $p < 0,04$) und 8 ($118\% \pm 3,5$) sowie nach Stimulation mit 1000nM an den Tagen 3 ($117\% \pm 3,8$, $p < 0,02$) und 8 ($119\% \pm 2,0$, $p < 0,02$).

Im 1-fach SR2-Medium bewirkte der ER β -Agonist Liquiritigenin in den Konzentrationen von 10nM, 100nM und 1000nM einen Anstieg der relativen Zellzahl im Vergleich zur LMK, welcher jedoch nicht signifikant war (mit Ausnahme bei 10nM Liquiritigenin an Tag 3 bei einer Zellzahl von $107\% \pm 2,1$, $p < 0,03$).

Die Wirkung von Liquiritigenin auf die HEC-1-A-Zellen erbrachte im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2, verglichen mit den Zellen der LMK, keine signifikante Veränderung der Zellzahl bzw. der Proliferation. Im Allgemeinen ließ sich jedoch der im 10% FBS-Medium beobachtete Trend zur Proliferationssteigerung erkennen.

RL95-2-Zellen

Liquiritigenin wirkte auf die Zellen der Linie RL95-2 im 10% FBS-Medium an allen Tagen im Vergleich zu den Zellen der LMK proliferationssteigernd. Signifikante Veränderungen zeigten sich hierbei nur bei 1nM ($106\% \pm 1,7$, $p < 0,02$) und 100nM an Tag 4 ($108\% \pm 1,9$, $p < 0,01$) und auch an Tag 8 ($110\% \pm 1,4$, $p < 0,02$). In Abbildung 20 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Die Wirkung von Liquiritigenin im 1-fach SR2-Medium + 1% FBS war bei allen verwendeten Konzentrationen proliferationssteigernd. Eine signifikante Änderung der Zellzahl zeigte sich nur bei 1000nM an Tag 5 mit einem Wert von $105\% \pm 0,8$ ($p < 0,02$).

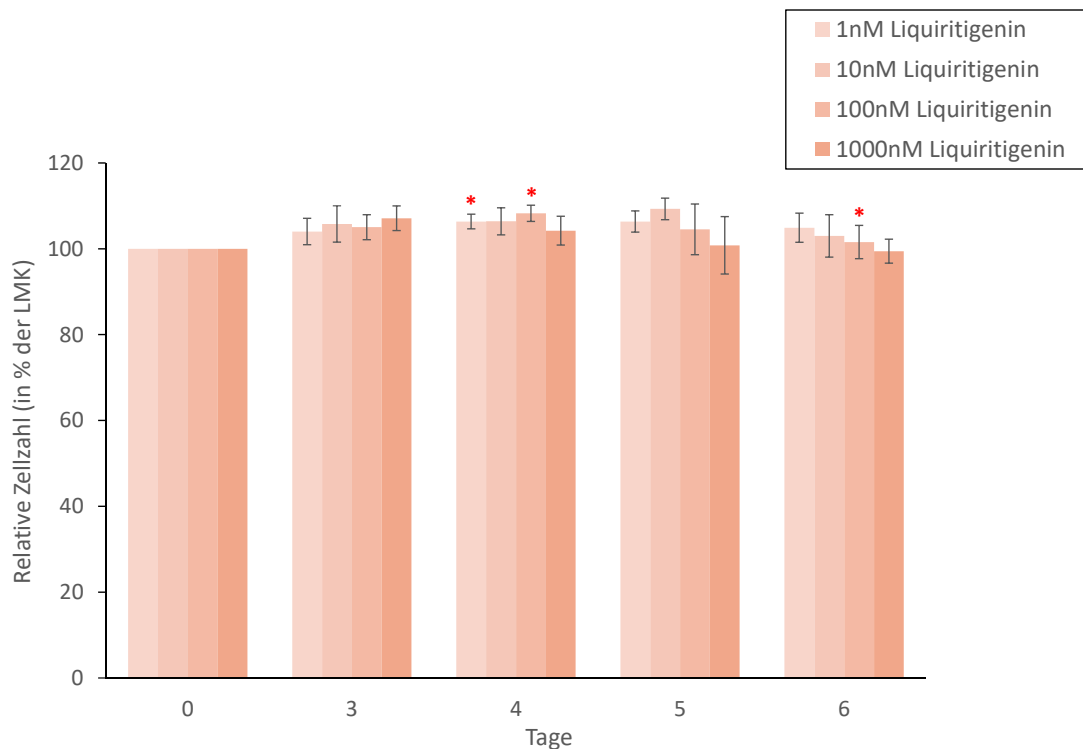


Abbildung 20: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, und 6 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM Liquiritigenin. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

3.3.7 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit WAY200070

HEC-1-A-Zellen

Der ER β -Agonist WAY200070 wirkte auf die HEC-1-A-Zellen im 10% FBS-Medium zum größten Teil antiproliferativ. Abbildung 21 zeigt hierzu eine Übersicht der erzielten Ergebnisse. Die Stimulation mit 1nM erbrachte keine signifikanten Veränderungen. 10nM führten an den Tagen 3 bis 5 zu einem Proliferationsrückgang mit signifikanten Werten an den Tagen 4 ($90\% \pm 3,8$, $p < 0,04$) und 5 ($95\% \pm 3,5$, $p < 0,04$). 100nM WAY200070 führten an den Tagen 3 bis 8 zu einem Proliferationsrückgang mit signifikanten Veränderungen an den Ta-

gen 3 ($90\% \pm 4,8$, $p < 0,03$), 6 ($94\% \pm 3,0$, $p < 0,01$) und 8 ($92\% \pm 3,7$, $p < 0,04$). Auch die Stimulation mit 1000nM WAY200070 erbrachte einen Proliferationsrückgang mit signifikanten Unterschieden zur LMK an vier aufeinanderfolgenden Tagen.

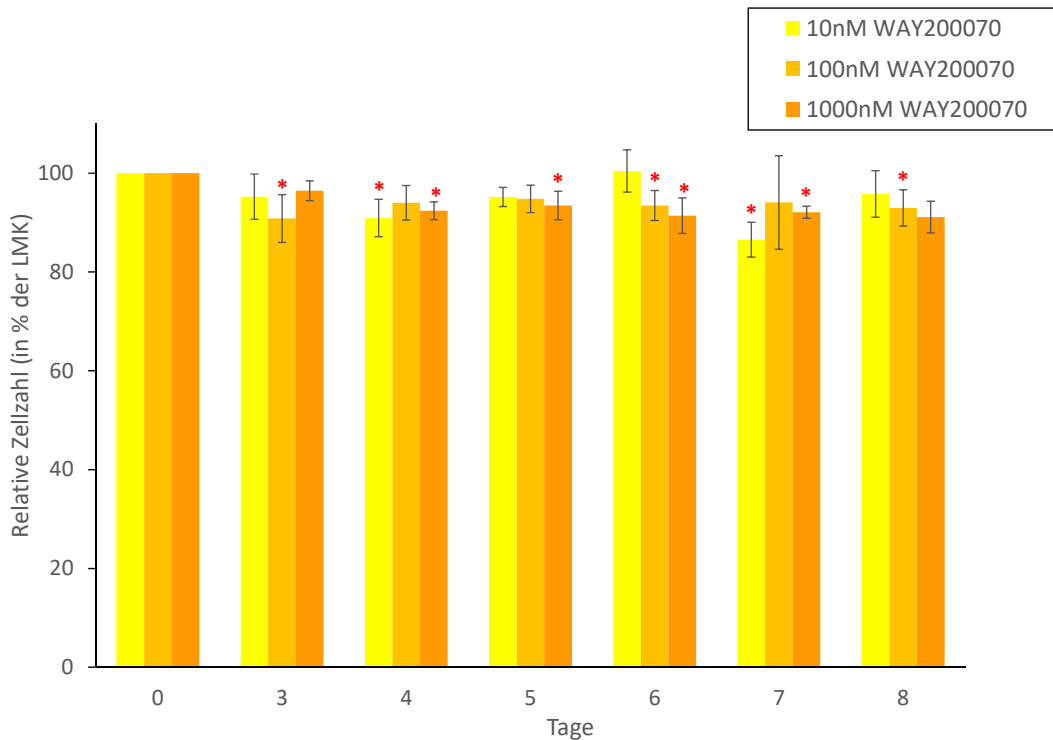


Abbildung 21: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6, 7 und 8 nach Stimulation mit 10, 100 und 1000nM WAY200070. Der zeitliche Messabstand betrug 24h. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Im 1-fach SR2-Medium bewirkte WAY200070 einen Rückgang der Proliferation im Vergleich zu den Zellen der LMK. Am ausschlaggebendsten waren die Veränderungen nach der Stimulation mit 100nM und 1000nM WAY200070. Bei der Konzentration von 1000nM WAY200070 wurden signifikante Veränderungen an Tag 4 ($86\% \pm 2,5$, $p < 0,02$) und Tag 8 ($89\% \pm 1,8$, $p < 0,02$) beobachtet. Im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt wer-

den. Es kam bei allen eingesetzten Konzentrationen zu einer Proliferationshemmung der HEC-1-A-Zellen. Signifikante Werte zeigten sich an Tag 4 bei 10nM ($92\% \pm 2,4$, $p < 0,04$) und bei 100nM ($89\% \pm 2,0$, $p < 0,006$) sowie an Tag 8 bei 1000nM ($89\% \pm 3,2$, $p < 0,03$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst.

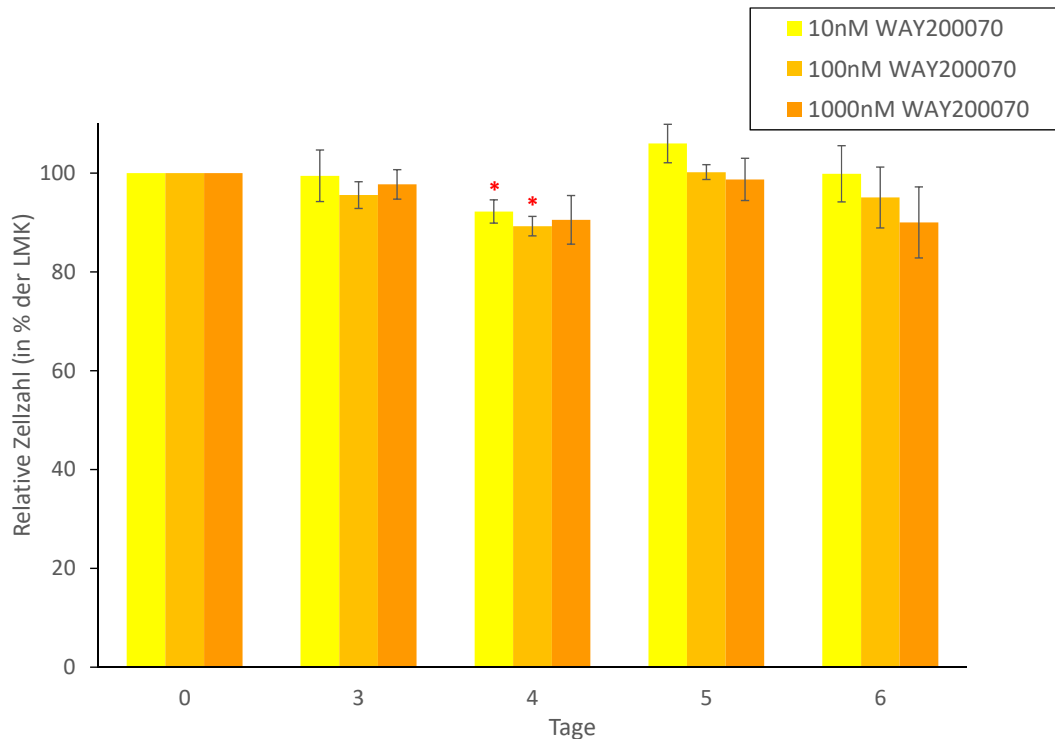


Abbildung 22: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5 und 6 nach Stimulation mit 10, 100 und 1000nM WAY200070. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

RL95-2-Zellen

Im Allgemeinen war die Wirkung von WAY200070 auf die Zellen der Linie RL95-2 im 10% FBS-Medium antiproliferativ. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Testreihe zusammengefasst. Bei allen Konzentrationen zeigten sich an jedem der Versuchstage Mittelwerte der relativen Zellzahlen (in % der LMK)

von unter 100%. Signifikante Veränderungen traten bei 10nM an den Tagen 3 ($93\% \pm 1,7$, $p < 0,013$) und 4 ($93\% \pm 1,2$, $p < 0,003$) sowie bei 1000nM an den Tagen 3 ($94\% \pm 2,1$), 5 ($96\% \pm 1,0$) und 8 ($93\% \pm 1,3$) auf.

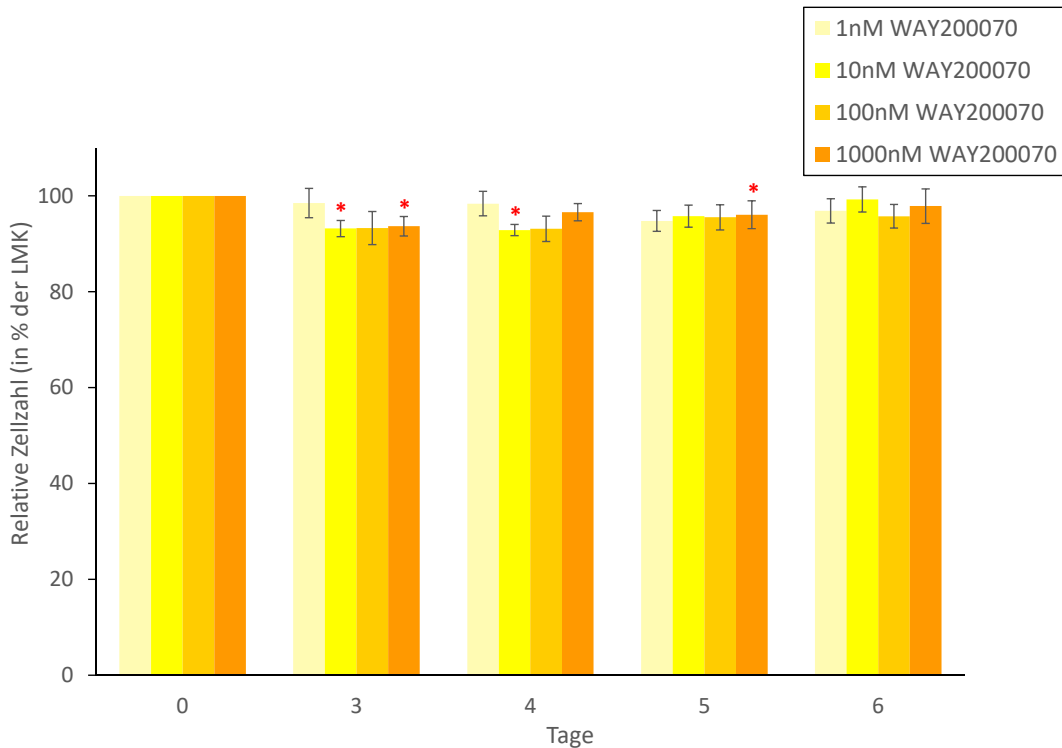


Abbildung 23: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5 und 6 nach Stimulation mit 1, 10, 100 und 1000nM WAY200070. $n \geq 3$ * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Im 1-fach SR2-Medium kam es ab Tag 4 (bei 1nM) bzw. ab Tag 5 (bei 10nM, 100nM und 1000nM) nach Stimulation zu einem Rückgang der Zellzahl im Vergleich zu den unstimulierten Zellen der LMK. Am aussagekräftigsten fielen die Ergebnisse an Tag 5 nach Stimulation mit 10nM mit einem signifikanten Unterschied ($p < 0,05$, $91\% \pm 2,1$) zur LMK aus.

Im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS zeigten sich nach Stimulation mit WAY200070 an den Tagen 3 und 4 bei allen Konzentrationen Mittelwerte

unter 100%. An Tag 4 wurden sowohl bei Stimulation mit 10nM ($92\% \pm 3,1$, $p < 0,04$) als auch mit 100nM WAY200070 ($89\% \pm 2,6$, $p < 0,006$) signifikante Veränderungen beobachtet. Der Proliferationsrückgang hielt bei der Konzentration von 1000nM an allen sechs Versuchstagen mit signifikanten Veränderungen an Tag 8 ($89\% \pm 4,2$, $p < 0,003$) an. Somit lässt sich die antiproliferative Wirkung von WAY200070 auf die Endometriumkarzinomzellen auch im serumfreien Medium erkennen. Abbildung 24 zeigt das Proliferationsverhalten im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS.

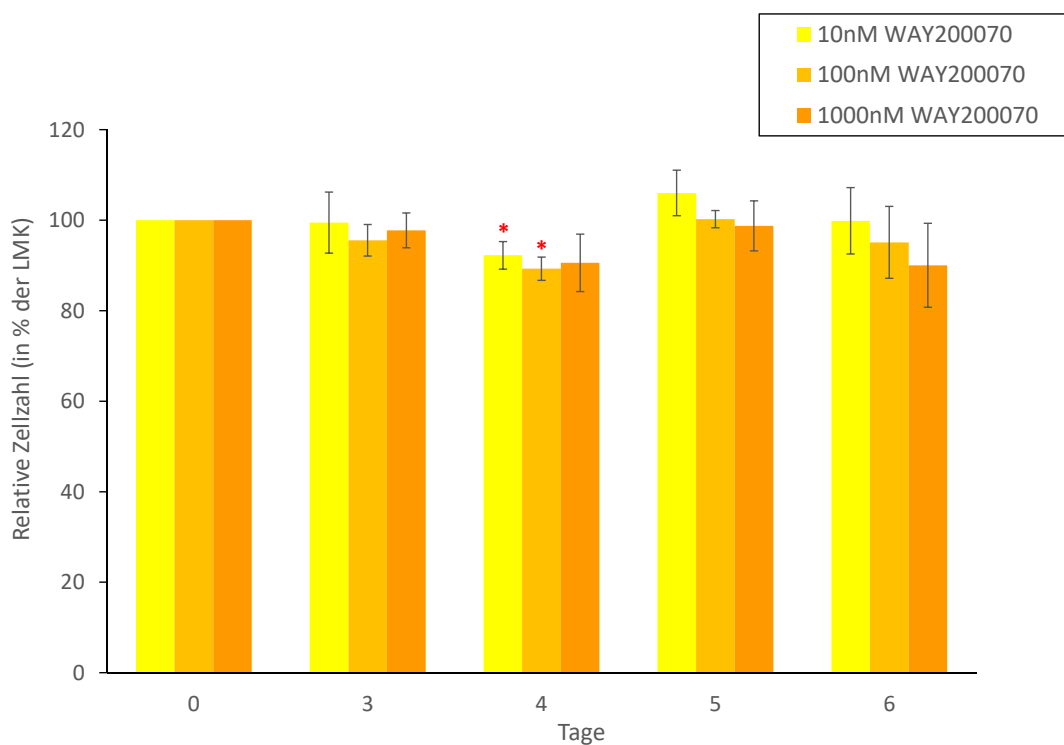


Abbildung 24: Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5 und 6 nach Stimulation mit 10, 100 und 1000nM WAY200070. $n \geq 3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau); stimulierte Zellen vs. LMK

3.3.8 Zusammenfassung ER β -Agonisten

ERB041 führte bei den HEC-1-A Zellen sowohl im 10% FBS-Medium als auch im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 zu keiner signifikanten Veränderung der Zellzahl. An den frühen Versuchstagen zeigte sich eine proliferationsfördernde Tendenz. Auch im 1-fach SR2-Medium kam es nur vereinzelt zu einer Proliferationssteigerung mit signifikanten Veränderungen. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen der Linie RL95-2 durch ERB041 an allen Tagen und bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Proliferationssteigerung bewirkt werden. Hier waren vor allem bei 1nM und 10nM ERB041 die Zellzahlen signifikant verändert. Auch im 1-fach SR2-Medium + 1% FBS, mit Ausnahme bei 1000nM, wirkte ERB041 proliferationsfördernd. Signifikante Unterschiede zeigten sich im 1-fach SR2-Medium sowohl mit als auch ohne E2 nicht.

Im 10% FBS-Medium war die Wirkung von Liquiritigenin an allen Versuchstagen und bei allen eingesetzten Konzentrationen auf die HEC-1-A-Zellen wachstumssteigernd. Auch im 1-fach SR2-Medium kam es bei den Konzentrationen von 10nM, 100nM und 1000nM zu einem Anstieg der relativen Zellzahl. Ebenso ließ sich der Trend zur Proliferationssteigerung im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 erkennen. Auf die Zellen der Linie RL95-2 wirkte Liquiritigenin im 10% FBS-Medium bei allen Konzentrationen und an allen Versuchstagen proliferationsfördernd. Auch im 1-fach SR2-Medium + 1% FBS war die Wirkung von Liquiritigenin bei allen verwendeten Konzentrationen proliferationssteigernd. Der ER β -Agonist WAY200070 bewirkte bei den HEC-1-A-Zellen einen Proliferationsrückgang unabhängig von dem verwendeten Medium. Die aussagekräftigsten Ergebnisse zeigten sich bei 100nM und 1000nM WAY200070.

Auch auf die RL95-2-Zellen war die Wirkung von WAY200070 im 10% FBS-Medium an allen Versuchstagen antiproliferativ. Im 1-fach SR2-Medium kam es ab Tag 4 (bei 1nM) bzw. ab Tag 5 (bei 10nM, 100nM und 1000nM) nach Stimulation zu einem Rückgang der Zellzahl. Ebenso zeigten sich im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS an den Tagen 3 und 4 bei allen Konzentrationen Mittelwerte unter 100%. Der Proliferationsrückgang setzte sich lediglich bei 1000nM WAY200070 an allen weiteren Versuchstagen fort.

3.3.9 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Tamoxifen

Tamoxifen wirkte auf die HEC-1-A-Zellen im 10% FBS-Medium in den Konzentrationen von 100nM und 1000nM proliferationssteigernd. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied der relativen Zellzahl im Vergleich zur LMK bei 1000nM an Tag 4 ($115\% \pm 52,6$, $p < 0,03$). Die Konzentration von $10\mu\text{M}$ Tamoxifen erbrachte einen sehr starken Rückgang der Zellzahl bis hin zum Absterben der Zellen. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Testreihe zusammengefasst.

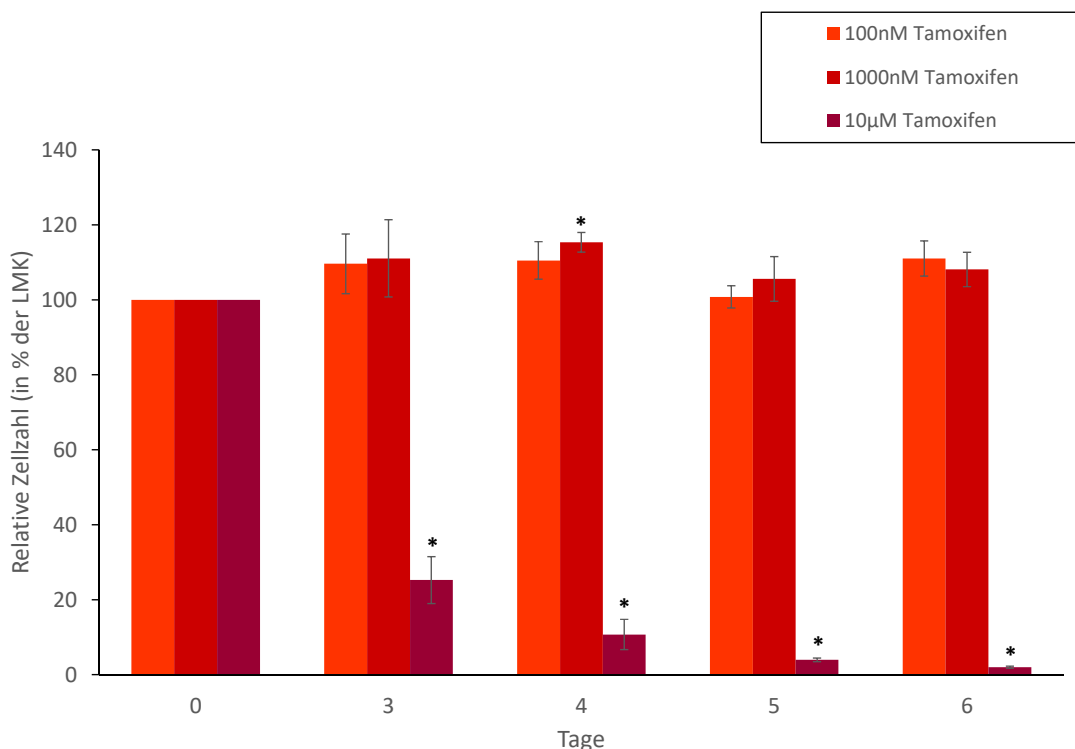


Abbildung 25: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 10% FBS-Medium

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 10% FBS-Medium. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5 und 6 nach Stimulation mit 100nM, 1000nM und $10\mu\text{M}$ Tamoxifen. $n=3$, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

Die im 10% FBS-Medium beobachtete Proliferationssteigerung nach Stimulation mit Tamoxifen zeigte sich ebenfalls im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2,

wie in Abbildung 26 dargestellt. 100nM Tamoxifen bewirkte im 1-fach SR2 an den Tagen 3 bis 7 Mittelwerte $>100\%$ im Vergleich zu der LMK. Signifikante Steigerungen der Zellzahl im Vergleich zu den unstimulierten Zellen wurden an den Tagen 3, 4 und 5 bei 100nM und 1000nM beobachtet.

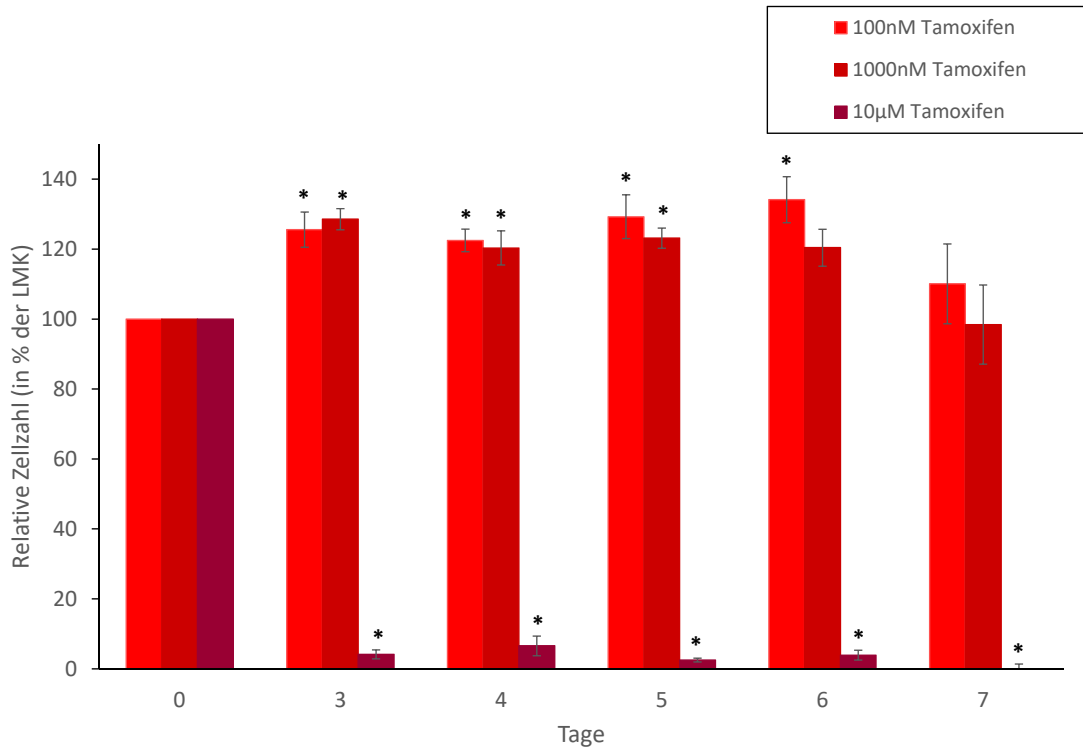


Abbildung 26: Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6, und 7 nach Stimulation mit 100nM, 1000nM und 10µM Tamoxifen. n=3, * $p < 0,05$ (Signifikanzniveau): stimulierte Zellen vs. LMK

3.3.10 Proliferationsverhalten nach Stimulation mit Tamoxifen und ER β -Modulatoren

Hintergrund

In dieser Arbeit zeigte sich, dass Tamoxifen sowohl im 10% FBS-Medium als auch im serumfreien Medium bei den Konzentrationen von 100nM und 1000nM eine proliferationsfördernde Wirkung auf die HEC-1-A-Zellen hat. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die beobachtete Wirkung von Tamoxifen durch eine gleichzeitige Stimulation mit ausgewählten ER β -Agonisten und Antagonisten beeinflusst oder gar aufgehoben werden kann. Tabelle 12 zeigt die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Stimulanzien.

Tabelle 12: Eingesetzte Konzentrationen bei der Stimulation mit Tamoxifen und ER β -Antagonisten bzw. -Agonisten

Stimulans	Konzentration(en)
Tamoxifen	100nM
Tamoxifen + PHTPP	100nM + 10nM
Tamoxifen + (R,R)-THC	100nM + 10nM
Tamoxifen + WAY200070	100nM + 10nM

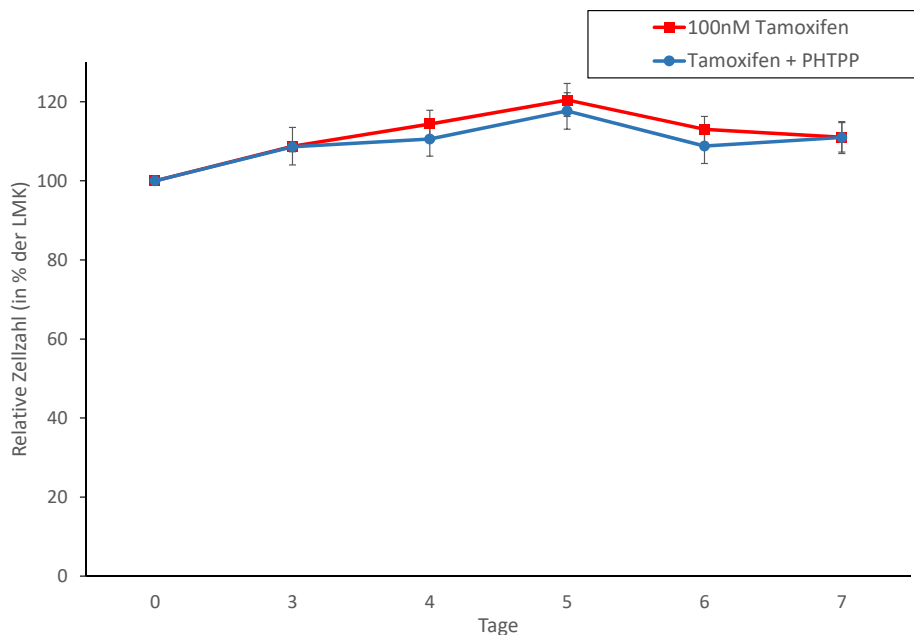
Ergebnisse

Nach gleichzeitiger Stimulation der HEC-1-A-Zellen mit Tamoxifen und PHTPP zeigte sich kaum eine Veränderung der Proliferationsrate. Die Zellzahl an den Tagen 3, 4, 5 und 6 lagen unterhalb der Werte, welche bei alleiniger Stimulation mit Tamoxifen erreicht wurden. An Tag 7 waren die Zellzahlen nahezu gleich. An keinem der Versuchstage wurde eine signifikante Veränderung beobachtet.

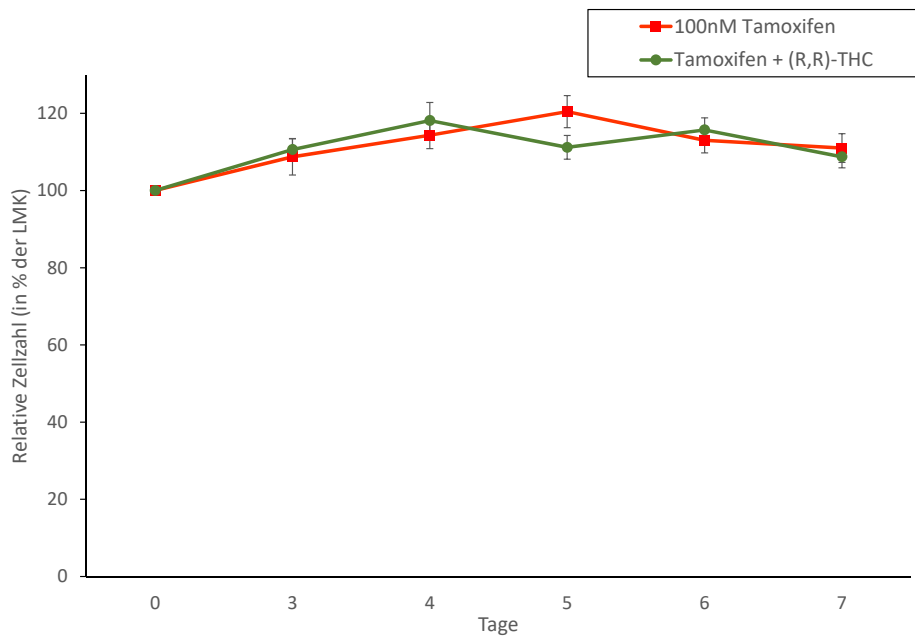
Die Ergebnisse sind in Abbildung 27a dargestellt.

Nach gleichzeitiger Stimulation der HEC-1-A-Zellen mit Tamoxifen und (R,R)-THC zeigte sich kaum eine Veränderung der Proliferationsrate im Vergleich zu einer Stimulation der Zellen nur mit Tamoxifen. Wie in Abbildung 27b dargestellt lagen die relativen Zellzahlen bei der gleichzeitigen Stimulation an den Tagen 3, 4 und 6 nur etwas oberhalb der Vergleichszahlen, d.h. nach alleiniger Stimulation mit Tamoxifen. Es waren jedoch keine signifikanten Veränderungen zu beobachten.

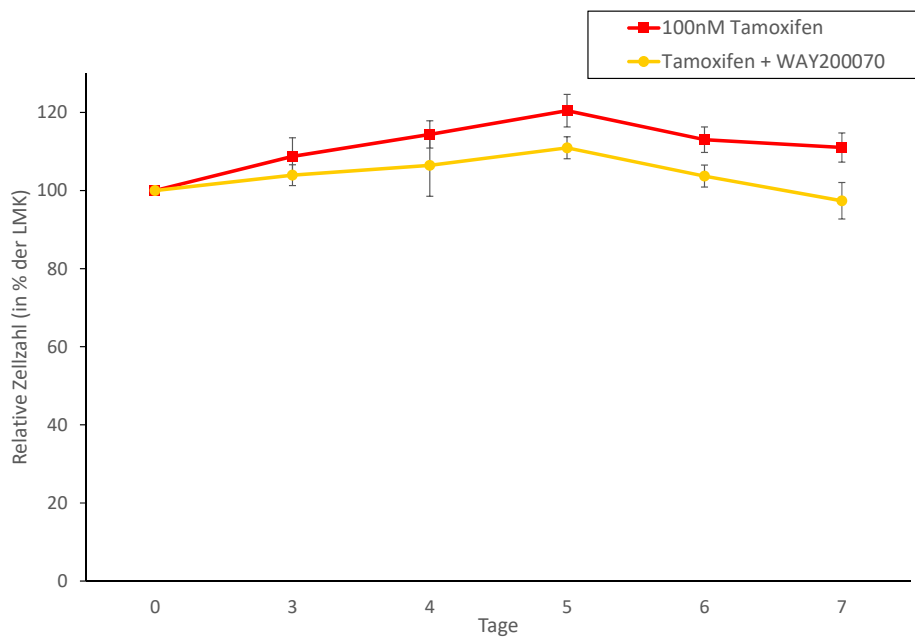
Durch die simultane Stimulation der HEC-1-A-Zellen mit 100nM Tamoxifen und 10nM WAY200070 konnte die proliferationsfördernde Wirkung von Tamoxifen gesenkt werden. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 27c dargestellt. Ein signifikanter Unterschied konnte an keinem der Tage beobachtet werden.



(a) 100nM Tamoxifen + 10nM PHTPP



(b) 100nM Tamoxifen + 10nM (R,R)-THC



(c) 100nM Tamoxifen + 10nM WAY200070

Abbildung 27: Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen + ER β -Modulatoren im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2

Graphische Darstellung des Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen und ER β -Modulatoren (PHTPP, (R,R)-THC, WAY200070) in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2. Die Darstellung erfolgt in % der Lösungsmittelkontrolle (LMK). Dargestellt ist die mittlere relative Zellzahl \pm SEM (standard error of the mean) an den Tagen 0 sowie 3, 4, 5, 6 und 7 nach Stimulation mit 100nM Tamoxifen + 10nM PHTPP (a), 10nM (R,R)-THC (b) bzw. 10nM WAY200070 (c). n=5

3.4 Genexpressionsanalyse mittels Microarray

Das Transkriptom (mRNAs) sowohl der ER β -Knockdown-Zellen als auch der Kontrollzellen wurde mittels Microarray analysiert. Anschließend wurde das gesamte Transkriptom der Endometriumkarzinomzellen vor und nach dem ER β -Knockdown miteinander verglichen. Neben der Genexpression auf mRNA-Ebene wurde auch das Expressionsmuster verschiedener miRNAs (micro RNA, kurze nicht-kodierende, regulierende RNAs) untersucht.

Nach dem erfolgreichen Knockdown von ER β konnte ein verändertes Genexpressionsmuster der Endometriumkarzinomzellen beobachtet werden. Verglichen wurde bei beiden Endometriumkarzinomzelllinien die Genexpression der ER β -KD mit der der neg.co. Die verminderte Expression von ER β führte auf molekularer Ebene sowohl zur Aktivierung als auch zur Herabregulation verschiedener Gene. Betrachtet wurden in dieser Arbeit sowohl diejenigen Gene, welche die Proliferation und Differenzierung von Gewebe beeinflussen, als auch Gene, die eine Rolle bei der Entstehung und Progression von malignen Entartungen spielen.

3.4.1 Genexpression in den HEC-1-A-Zellen nach ER β -Knockdown

In den Endometriumkarzinomzellen der Linie HEC-1-A zeigten sich verschiedene Gene in ihrer Expression verändert. Unter anderem waren nach dem Knockdown SSX1 (5,9-fach), NAMPT (4,2-fach), GATA2 (3-fach), HAVCR1 (2,8-fach), FR α (2,5-fach), CyclinL1 (2-fach), RAB15 (2-fach) und SSX2 (2-fach) vermehrt exprimiert. Eine reduzierte Expression hingegen zeigten TAF9B (3,1-fach) sowie TMEM109 (2,4-fach).

3.4.2 Genexpression in den RL95-2-Zellen nach ER β -Knockdown

Auch die RL95-2-Zellen wiesen ein verändertes Expressionsmuster nach dem ER β -Knockdown auf. So war unter anderem die Expression von VAV3 (2,8-fach) und PNR2 (2,7-fach) erhöht, die von DKK1 (2,3-fach), XAGE3 (2,5-fach), MUC15 (3-fach) und PSG1 (4,8-fach) vermindert.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genauere Kenntnisse über die Rolle des Östrogenrezeptors β in endometrialen Adenokarzinomzellen zu erlangen. Hierbei lag der Fokus darauf zu klären, ob und, wenn ja, welche Wirkung ER β auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzellen hat. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse (siehe Kapitel 3) werden im Folgenden mit der bisherigen Studienlage verglichen und anschließend diskutiert.

4.1 Einfluss von ER β auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzellen

Sowohl die Expression als auch die Rolle von ER β in verschiedenen Geweben wurde bis heute vielfach untersucht und ein Einfluss des Rezeptors auf die Tumorentstehung postuliert. In einigen Studien zeigte sich, dass ER β im Mamma-, Prostata- und auch Ovarialkarzinom die Rolle als Tumorsuppressor einnimmt [107–110]. Studien über die Expression und die Aufgabe von ER β im Endometrium lassen vermuten, dass ein Ungleichgewicht der Östrogenrezeptorexpression (ER α und ER β) bei der Tumorgenese und -progression eine entscheidende Rolle spielen könnte.

Saegusa et al. beobachteten bei Endometriumkarzinomen mit zunehmendem Grading einen Expressionsverlust von ER α bei unveränderter ER β -Expression [99]. Jongen et al. fanden eine erhöhte ER β -Expression bei fortgeschrittenen Tumoren. Zudem zeigten sie in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen einer ER α /ER β -Ratio < 1 und einem kürzeren krankheitsfreien Überleben [119]. In der Studie von Zhang et al. war eine dominante ER β -Expression mit ungünstigen histopathologischen Parametern verbunden [111]. Dies konnten Mylonas et al. jedoch nicht bestätigen [96]. Fujimoto et al. fanden zudem einen Expressionsverlust von ER α während des Metastasierungsprozesses, wohingegen einige ER β -Varianten mit dem Fortschreiten der Metastasierung vermehrt synthetisiert wurden [118]. Aussagen über die Infiltration des Myometriums differierten. So wurde unter anderem postuliert, dass ER β bei dem Fortschreiten der Infiltration eine wichtige Rolle spielt [96, 98, 120]. Dies konnten jedoch Jongen

et al. in ihrer Studie nicht bestätigen [119]. Der Großteil der bisherigen Studien zeigte eine Korrelation zwischen einem Überwiegen der ER β -Konzentration (verglichen mit der ER α -Konzentration) und negativen prognostischen Faktoren.

Im Bezug auf die Proliferation zeigten Zhang et al. in ihrer Studie, dass die proliferativen Effekte in Endometriumkarzinomzellen primär via ER α vermittelt werden [117]. Auch Utsunomiya et al. nehmen an, dass die Östrogene sowohl im zyklischen, gesunden Endometrium als auch bei der Entstehung von proliferativen Erkrankungen primär auf ER α wirken [98]. In Studien mit ER β -Knockout-Mäusen zeigte sich zudem im Uterus sowohl eine vermehrte Zellproliferation als auch eine verstärkte Reaktion auf Östrogene, vermutlich bedingt durch modulierende Eigenschaften von ER β auf ER α [104, 105]. Somit kann ER β im normalen, gesunden Endometrium eine antiproliferative Funktion zugeschrieben werden. Wie genau jedoch ER β bei der Tumorentstehung und auch -progression fungiert, ist bis heute noch nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Rezeptors auf das Wachstum von Adenokarzinomzellen der Linien HEC-1-A und RL95-2 untersucht. Auch hier wurde eine antiproliferative Wirkung von ER β auf die Zellen beobachtet. Nach einem ER β -Knockdown mittels spezifischer siRNA konnte eine erhöhte Zellproliferation der endometrialen Karzinomzellen beider Zelllinien beobachtet werden. Nach dem ER β -Knockdown war die Proliferationsrate der ER β -KD im Vergleich zu den Zellen der Negativkontrolle gesteigert. Proliferationssteigerungen zeigten sich in allen verwendeten Kulturmedien, wobei diese im 10% FBS-Medium und auch im serum- und östrogenfreien Medium signifikant waren.

Zudem wurde untersucht, ob auch durch eine Modulation des Rezeptors mit spezifischen ER β -Antagonisten und -Agonisten die Proliferation beeinflusst werden kann. In den dabei durchgeführten Proliferationsassays (CTB[®]-Assays) mit den verschiedenen ER β -Antagonisten und -Agonisten wurde eine Änderung der Proliferationsrate der Endometriumkarzinomzellen festgestellt. Somit wurde unter anderem die Beeinflussbarkeit des Zellwachstums via Modulation von ER β nachgewiesen. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass dem Rezep-

tor in den Endometriumkarzinomzellen eine entscheidende Rolle bei der Tumorphorprogression zukommt.

Bei den Experimenten sind aufgrund der ER α -Negativität der HEC-1-A-Zellen [162] sowohl ER α -vermittelte Effekte auf die Proliferation als auch Effekte, welche durch eine Modulation von ER β auf ER α zustande kommen, auszuschließen. Als ER β -Antagonisten wurden PHTPP und (R,R)-THC verwendet. PHTPP hat eine 36-fache Selektivität auf ER β gegenüber ER α und somit kann von einem vollständigen Antagonismus auf ER β und einer vernachlässigbaren Wirkung auf ER α ausgegangen werden [127, 128]. Basierend auf diesen Ergebnissen von Compton et al. wird hier die selektive Wirkung von PHTPP auf ER β als gegeben angenommen. Dabei führte die Antagonisierung an ER β zu einer Proliferationssteigerung der Endometriumkarzinomzellen im 10% FBS-Medium. Diese Wirkung beschränkte sich bei HEC-1-A-Zellen auf die Konzentrationen von 1nM und 10nM. Bei der Konzentration von 100nM ergab sich nahezu keine Veränderung der Proliferation, bei 1000nM PHTPP kam es zu einem Proliferationsrückgang. Auch auf die RL95-2-Endometriumkarzinomzellen war die Wirkung von PHTPP proliferationssteigernd, was hier bei allen eingesetzten Konzentrationen zutraf. Die stärksten Effekte zeigten sich allerdings bei 1nM und mit zunehmender Konzentration von PHTPP nahm der Effekt ab. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Zelllinien bei 100nM und 1000nM PHTPP könnte durch Nebeneffekte bei RL95-2 auf ER α bei steigender Konzentration von PHTPP bedingt sein. Eine Antagonisierung von ER β durch den ER β -Antagonisten PHTPP führte hier also zu einer Proliferationssteigerung auf HEC-1-A und auch auf RL95-2, vor allem bei den Konzentrationen von 1nM und 10nM PHTPP. Schlussfolgernd bewirkt die Antagonisierung durch den selektiven ER β -Antagonist PHTPP bei den Karzinomzellen eine Proliferationssteigerung und es lässt vermuten, dass ER β eine proliferationshemmende Wirkung hat.

Sun et al. sowie Kraichley et al. zeigten, dass (R,R)-THC antagonistisch auf ER β , aber auch agonistisch auf ER α wirkt. Es hat eine 3-fach höhere Affinität zu ER β als zu ER α [129, 130]. In dieser Arbeit wurde, basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen, die selektive Wirkung von (R,R)-THC auf ER β

als gegeben angenommen. Hier zeigte (R,R)-THC auf die HEC-1-A-Zellen im 10% FBS-Medium und 1-fach SR2-Medium proliferationssteigernde Effekte. Mit steigender Konzentration fiel dieser Effekt stärker aus und mit einem Maximum an Tag 5. Die gleichen Effekte zeigte (R,R)-THC auf die RL95-2-Zellen, mit einem Wirkmaximum im 10% FBS-Medium an Tag 5. Bei beiden Zelllinien konnte die größte Proliferationssteigerung bei der Konzentration von 1000nM (R,R)-THC erreicht werden. Jedoch wurde bei HEC-1-A eine deutlich höhere Proliferationssteigerung erzielt. Bei den RL95-2-Zellen kann ein geringer Nebeneffekt auf $ER\alpha$ vor allem bei höheren Konzentrationen von (R,R)-THC vermutet werden. Auch eine Antagonisierung von $ER\beta$ mit (R,R)-THC führte zu einer Proliferationsförderung der Endometriumkarzinomzellen. Aus den Ergebnissen der Versuche mit den beiden $ER\beta$ -Antagonisten PHTPP und (R,R)-THC kann geschlossen werden, dass $ER\beta$ eine antiproliferative Wirkung auf die Endometriumkarzinomzellen hat. Dieses Ergebnis stützt die Ergebnisse des gesteigerten Proliferationsverhaltens der Zellen nach $ER\beta$ -Knockdown.

Ebenfalls wurden Proliferationsversuche mit selektiven $ER\beta$ -Agonisten durchgeführt. Hierbei wurden WAY200070, ERB041 und Liquiritigenin verwendet. WAY200070 besitzt eine 68-fach stärkere Selektivität für $ER\beta$ im Vergleich zu $ER\alpha$ [82, 134]. Basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen wurde in dieser Arbeit die selektive, agonistische Wirkung von WAY200070 auf $ER\beta$ angenommen. Auf die HEC-1-A-Zellen zeigte WAY200070 im 10% FBS-Medium bei der Konzentration von 1nM leicht proliferationsfördernde Effekte, wohingegen 10nM, 100nM und 1000nM antiproliferativ wirkten. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt bei 1000nM. Es wurden hier Minimalwerte bis 86% der LMK ($p < 0,02$) erzielt. Auch im serumfreien Medium konnten diese Effekte beobachtet werden. Die antiproliferativen Eigenschaften von WAY200070 zeigten sich ebenfalls bei RL95-2. Hier kam es bei allen eingesetzten Konzentrationen im 10% FBS-Medium zu einem Rückgang des Zellwachstums mit teilweise signifikanten Veränderungen. Im serumfreien Medium fand man diesen Effekt nur teilweise. Die Agonisierung von $ER\beta$ durch WAY200070 führte in der vorliegenden Arbeit zu einem Proliferationsrückgang. Somit bewirkte also eine Aktivierung von $ER\beta$ einen Rückgang der Proliferationsrate, was dafür

spricht, dass ER β in den Karzinomzellen antiproliferativ wirkt.

ERB041 zeigt in der Studie von Harris et al. eine mehr als 200-fache Selektivität für ER β [133] und Malamas et al. konnten eine mehr als 900-fache Selektivität nachweisen [82]. Aufgrund dieser Ergebnisse ging man in dieser Arbeit von selektiven, agonistischen Eigenschaften von ERB041 auf ER β aus. Harris et al. fanden in ihrer Studie, dass ERB041 keine proliferativen Eigenschaften auf uterine Zellen in Ratten hat [133]. Entgegen dieser Annahme zeigten sich in dieser Studie durchaus proliferative Effekte von ERB041 auf die Endometriumkarzinomzellen beider Zelllinien. ERB041 führte bei beiden verwendeten Zelllinien zu einer Wachstumssteigerung. Der wachstumsfördernde Effekt von ERB041 war auf die RL95-2-Zellen ausgeprägter. Vor allem bei 1nM und 10nM zeigten sich signifikante Veränderungen der Zellzahl im Vergleich zur LMK. Bei den HEC-1-A-Zellen konnten die deutlichsten Ergebnisse im 1-fach SR2-Medium erzielt werden.

Liquiritigenin hat eine 20-fach erhöhte Bindungsaffinität zu ER β gegenüber ER α . Mersereau et al. begründen die ER β -Selektivität darin, dass es verschiedene Koaktivatoren von ER β rekrutiert, was jedoch bei ER α nicht der Fall ist [132]. Aufgrund der Forschungsergebnisse von Mersereau et al. wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass Liquiritigenin als selektiver ER β -Agonist fungiert. In der Studie von Mersereau et al. zeigte Liquiritigenin keine stimulierende Wirkung auf Brust- und Uteruszellen von Ratten [132]. In der vorliegenden Arbeit waren durchaus proliferationsfördernde Effekte von Liquiritigenin auf die Endometriumkarzinomzellen beider Zelllinien zu beobachten. Bei den HEC-1-A-Zellen sah man diese Effekte im 10% FBS-Medium vor allem an Tag 8 (mit signifikanten Werten bei allen Konzentrationen) und bei den RL95-2-Zellen an den Tagen 3 bis 6.

Die Stimulation mit dem ER β -Agonisten führte somit zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. ERB041 und Liquiritigenin riefen einen Proliferationsanstieg der Zellen hervor. Diese Beobachtungen stehen widersprüchlich sowohl zu den Ergebnissen mit den ER β -Antagonisten als auch zu den Ergebnissen des ER β -Knockdowns. Die Behandlung der Endometriumkarzinomzellen mit den ER β -Agonisten WAY200070 war hemmend auf die Proliferation. Letzte-

res unterstützt die bereits beschriebenen Beobachtungen, dass ER β in den Endometriumkarzinomzellen antiproliferativ wirkt.

4.2 Die Wirkung von Tamoxifen auf die Endometriumkarzinomzellen und ER β

In bisherigen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der antineoplastischen Therapie mit Tamoxifen und der Entstehung von Endometriumkarzinomen gefunden [25, 28, 147–153]. In der Therapie des Mammakarzinoms ist Tamoxifen ein effektives Therapeutikum, da es auf Zellen des Brustgewebes antiöstrogene Wirkung zeigt. In Östrogenrezeptor-positiven Tumorzellen führt eine kompetitive Blockade von ER α zur Wachstumshemmung und Induktion der Apoptose [139–142]. Hingegen in anderen Geweben, u.a. dem weiblichen Genitaltrakt, wurden bisher proliferationsfördernde agonistische Effekte beschrieben [39, 146].

Castro-Rivera et al. konnten in ihrer Studie proliferationsfördernde Eigenschaften von Tamoxifen auf HEC-1-A-Zellen nachweisen. Der Effekt der Wachstumsförderung lag dabei unter 20% [163]. Zhang et al. zeigten in ihrer Studie, dass die proliferativen Effekte von Tamoxifen bei HEC-1-B-Endometriumkarzinomzellen durch ER β und auch ER α vermittelt werden [117]. Hall et al. kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Sie zeigten, dass alleine ER α die agonistischen Eigenschaften von Tamoxifen vermittelt und bei einer Expression beider Rezeptorisoformen ER β die Aktivierung von ER α hemmt [86].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Tamoxifen auf die Adenokarzinomzellen der Zelllinie HEC-1-A untersucht. Es zeigte sich ebenfalls eine proliferationsfördernde Wirkung von Tamoxifen auf die Zellen nach Stimulation mit 100nM und 1000nM Tamoxifen. Der Effekt lag im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 und auch zum Teil im 10% FBS-Medium über 20%. 10 μ M Tamoxifen führte zum Absterben der Zellen, was am wahrscheinlichsten durch die zu hohe und somit toxische Konzentration zu erklären ist. Bei bekannter ER α -Negativität und ER β -Positivität der HEC-1-A-Zellen ist hier die positive Wirkung auf das Zellwachstum via ER β vermittelt. Tamoxifen zeigt also

eine Wirkungsweise ähnlich den ER β -Antagonisten. Eine mögliche Erklärung für diese Wirkung von Tamoxifen könnte sein, dass es die AFs der ERs unterschiedlich regulieren kann. Die AF-2-Aktivität der ERs wird durch Tamoxifen gehemmt. Deshalb wirkt es dort, wo die AF-2-Aktivität überwiegt als Antagonist. In Gewebe, wo AF-1 der dominante Aktivator ist, wirkt Tamoxifen als Agonist [86]. Dies führt zu einer gewebe selektiven Aktivität von Tamoxifen. Es wurde zudem gezeigt, dass sich beide Östrogenrezeptoren in der Aktivität der AFs unterscheiden. So besitzt ER β nahezu keine AF-1-Aktivität, wohingegen die AF-2-Aktivität der beiden ERs vergleichbar ist [87]. Somit wirkt Tamoxifen auf ER β , durch Hemmung der AF-2-Aktivität, als Antagonist. Bei bekannter ER α -Negativität überwiegt in den HEC-1-A-Zellen die Aktivität von AF-2, sodass Tamoxifen antagonistisch auf ER β wirkt und die Zellproliferation fördert. In dieser Arbeit wurde zudem untersucht, ob die proliferationssteigernde Wirkung von Tamoxifen durch ER β -selektive Rezeptormodulatoren beeinflusst werden kann. Hierbei konnte durch den ER β -Agonisten WAY200070, welcher anti-proliferative Eigenschaften auf die Endometriumkarzinomzellen zeigte, die proliferationsfördernde Wirkung von Tamoxifen deutlich, jedoch nicht signifikant gesenkt werden. Die beobachtete Wirkung war dabei zu schwach, um den Agonisten für den klinischen Einsatz in Betracht ziehen zu können.

4.3 Wirkung des ER β -Knockdowns auf die Genexpression

Die bisherigen Studien zeigten, dass bei der Karzinogenese im Endometrium einerseits die Aktivierung von Onkogenen, andererseits aber auch die Inaktivierung von Tumorsuppressoren wichtige Schritte sind. Mutationen sowie der Verlust des Tumorsuppressors PTEN und auch eine Überexpression des Onkogens HER2-Rezeptor-Tyrosinkinase konnte bei einer Vielzahl von Karzinomen im Endometrium beobachtet werden [121]. In ihrer Arbeit zeigten Häring et al. ebenfalls, dass PTEN in Endometriumkarzinomzellen vermindert exprimiert ist. Zudem konnten sie eine Assoziation zwischen der ER β -Expression und der Expression der Onkogene MYBL2 und HER2 nachweisen [116]. Tusda et al. fanden eine Überexpression von wachstumsfördernden Genen wie Cyclinen, die mit einem undifferenzierten Phänotyp und einer ungünstigen Prognose assozi-

iert ist [123]. Häring et al. konnten in Endometriumkarzinomzellen (HEC-1-A) ebenfalls eine erhöhte Expression von Cyclinen, darunter A2, B1 und D1, feststellen. [116].

Auch in dieser Arbeit wurde das Transkriptom von Endometriumkarzinomzellen (HEC-1-A, RL95-2) untersucht. Hierbei wurden die Expressionslevel der mRNAs vor und nach einem siRNA-vermittelten ER β -Knockdown miteinander verglichen, um Aussagen über veränderte Genaktivitäten zu treffen. In den oben genannten Genen waren in der vorliegenden Arbeit keine auffälligen Veränderungen zu beobachten. Es zeigten sich aber eine Reihe anderer Gene in den ER β -KD verändert exprimiert. Darunter waren Gene, welchen entscheidende Rollen bei der Tumorentstehung und -progression zukommen. Im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand über die Funktion der Gene beschrieben und die bisherigen Forschungsergebnisse dargelegt.

4.3.1 Gene mit vermehrter Expression

HEC-1-A-Zellen

In den Endometriumkarzinomzellen zeigten sich nach dem Knockdown Mitglieder der SSX-Familie (synovial sarcoma, X breakpoint) vermehrt exprimiert. Die Expression von SSX-Familienmitgliedern wurde bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Mehrere Studien zeigten, dass die SSX-mRNA und SSX-Proteinexpression in verschiedenen Tumoren mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien und einer schlechteren Patientenprognose korrelieren [164–166]. Im Endometriumkarzinom wurden sowohl SSX1 als auch SSX2 nachgewiesen [167]. Nach dem ER β -Knockdown zeigte sich SSX1 (synovial sarcoma, x breakpoint 1) in den ER β -KD um das 5,9-Fache vermehrt exprimiert. SSX1 ist ein Transkriptionsmodulator, wobei die Funktion von SSX1 im Endometrium bzw. Endometriumkarzinom noch nicht geklärt ist. Jedoch wurden bereits Studien über SSX1 im Kolonkarzinom und Multiplen Myelom durchgeführt. Hilal et al. zeigten, dass die Expression von SSX1 im Kolonkarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [168]. Im Multiplen Myelom war eine positive Assoziation zwischen dem klinischen Stadium und dem mRNA-Expressionslevel von SSX1 zu erkennen, d.h. bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien zeigten sich erhöhte

Expressionslevel [169].

Ebenfalls zeigte sich SSX2 (synovial sacroma, x breakpoint 2) in den ER β -KD um das 2-Fache vermehrt exprimiert. Die Expression von SSX2 wurde bereits im Mamma- und Prostatakarzinom sowie im malignen Melanom untersucht. In Mammakarzinomzellen induzierte eine Überexpression von SSX2 das Zellwachstum und förderte die Zellinvasion [170]. In Melanomzellen führte die SSX2-Expression zu einem erhöhten, am wahrscheinlichsten durch Replikationsaberrationen verursachten, DNA-Gehalt. Des Weiteren vermuten Greve et al., dass SSX2 in Melanomzellen proliferativ wirkt [171]. Bloom et al. wiesen nach, dass SSX2 unter anderem am Verlust der fokalen Adhäsion beteiligt ist, d.h. an der Zelltransformation von epithelial zu mesenchymal (EMT) und an der Tumorzell dissemination [172]. Anhand der Studienergebnisse lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Expression von SSX1 sowie SSX2 und einer Tumorprogression vermuten. Im Endometrium könnte SSX1 und SSX2 eine ähnliche Rolle zukommen.

Bei dem Vergleich des Transkriptom der ER β -KD mit den neg.co.-Zellen zeigte sich auch Cyclin L1 um das 2-Fache vermehrt exprimiert. Cycline spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus, indem sie unter anderem mit CDKs interagieren. Wie bereits angesprochen, fanden Häring et al. in HEC-1-A eine erhöhte Expression von Cyclin B1, Cyclin D1 sowie Cyclin A2 [116]. Cyclin L1 interagiert unter anderem mit CDK11, welches wiederum eine wichtige Rolle in Karzinomen spielt. So wurde nachgewiesen, dass eine Hemmung von CDK11 zu Krebszelltod und Apoptose führt [173, 174]. Bei Plattenepithelkarzinomen im Hals- und Kopf-Bereich (HNSCC) äußerte sich Cyclin L1 als Onkogen [175, 176]. Auch bei der Entstehung des Zervixkarzinoms soll Cyclin L1 eine wichtige Rolle spielen [177].

In dieser Arbeit zeigte sich NAMPT (Nikotinamidphosphoribosyltransferase) bei ER β -KD der Linie HEC-1-A, verglichen mit den Zellen der neg.co., mehr als vierfach vermehrt exprimiert. NAMPT ist das geschwindigkeitslimitierende Enzym, das Nicotinamid in NAD⁺ umwandelt und essentiell für viele Zellprozesse, wie Zellmetabolismus und DNA-Reparatur, ist [178, 179]. Es ist in vielen epithelialen und mesenchymalen Neoplasien stark exprimiert. Dazu zählen

u.a. das Melanom, kolorektale Karzinom, Magen-, Prostata- und Ovarialkarzinom [180–185]. Vora et al. fanden einen Zusammenhang zwischen NAMPT-Expression und CIN-Stadium (cervical intraepithelial neoplasia). Somit kann es als Marker für die Progression bei zervikaler Dysplasie dienen [186]. Auch Studien bezüglich der Expression im Endometriumkarzinom wurden durchgeführt. So fanden Tian et al. signifikant erhöhte Serumspiegel von NAMPT bei Endometriumkarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen. Zudem war eine starke Expression von NAMPT mit einem fortgeschrittenen FIGO-Stadium und myometrialer Invasion assoziiert. Das Gesamtüberleben der Karzinompatientinnen war bei erhöhter NAMPT-Expression signifikant erniedrigt [187].

In dieser Arbeit zeigte sich außerdem der Folat-Rezeptor 1 (FR α) bei ER β -KD vermehrt exprimiert (2,5-fach). FR α , welcher eine Rolle beim Zellwachstum spielt, ist in verschiedenen epithelialen Neoplasien, einschließlich Ovarial-, Nieren-, Lungen- und Mammakarzinom, überexprimiert [188–190]. Im Zervixkarzinom war die FR α -Expression mit fortschreitender Schwere der Läsion erhöht. Eine Suppression hemmte die Zellproliferation und förderte die Apoptose [191]. Zudem wurde berichtet, dass FR α die Proliferation von Mammakarzinomzellen erhöht [189, 192]. Im Ovarialkarzinom war eine Überexpression mit einer vermehrten Tumoraggressivität assoziiert [193–195]. Im Endometriumkarzinom fanden Wu et al. eine Korrelation zwischen der Expression und dem Differenzierungsgrad des Tumors [196]. Allard et al. zeigten, dass Endometriumkarzinompatientinnen mit einer FR α -Überexpression ein kürzeres progressionsfreies Überleben haben [197]. Senol et al. ermittelten eine signifikant erhöhte FR α -Expression in den Endometriumkarzinomzellen im Vergleich zu endometrialen Hyperplasien. Auch war die FR α -Expression in AEHs im Vergleich zu anderen Hyperplasie-Untergruppen signifikant erhöht. Die Überexpression des Folat-Rezeptors könnte eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese im Endometrium und Karzinomprogression spielen [198]. Eine erhöhte Expression des Folat-Rezeptors nach dem ER β -Knockdown lässt auf eine tumorsupprimierende Rolle von ER β in den Endometriumkarzinomzellen schließen.

Die ER β -KD wiesen eine erhöhte Expression (2,8-fach) von HAVCR1 (Hepatitis A virus cellular receptor 1) auf. Das auch als TIM-1 bekannte Mucin-

Domäne-Protein wirkt auf die T-Zellen stark regulierend und kann Autophagie und Apoptose vermitteln [199, 200]. In verschiedenen menschlichen Karzinomen zeigte sich die Expression von HAVCR1 erhöht, vor allem bei Ovarial- und Nierenzellkarzinomen [201, 202]. Auch im kolorektalen Karzinom war die Expression erhöht. Hierbei zeigten Wang et al., dass die Expression mit einer längeren krankheitsfreien Zeit verbunden ist. Zudem verringert die Überexpression von HAVCR1 die Zellinvasion signifikant [203]. Im gesunden Gewebe ist die Expression eingeschränkt [199, 204]. Die Rolle von HAVCR1 im Endometrium bzw. Endometriumkarzinom wurde bisher noch nicht eingehend untersucht. Nach heutigem Wissensstand nimmt HAVCR1 eher eine protektive Rolle ein, womit dieses Ergebnis widersprüchlich zu den anderen in den ER β -KD vermehrt exprimierten Genen ist.

RL95-2-Zellen

In den RL95-2-Endometriumkarzinomzellen war nach dem ER β -Knockdown das Protoonkogen VAV3 (vav guanine nucleotide exchange factor 3) 2,8-fach erhöht exprimiert. Auch in anderen Karzinomen wurde eine vermehrte Expression von VAV3 nachgewiesen. Beim Pankreaskarzinom zeigte sich eine Korrelation der Expression von VAV3 mit einer schlechten Prognose. Dort fördert es unter anderem die Zellinvasivität [205]. Bei Magenkarzinomzellen führte eine Hemmung von VAV3 zur Minderung der Zellaktivität und förderte die Apoptose der Zellen [206]. Auch in hormonunabhängigen Prostatakarzinomzellen ist VAV3 überexprimiert. Es verstärkt die Aktivität der Androgenrezeptoren und stimuliert zudem das androgenunabhängige Wachstum [207, 208]. VAV3 spielt sowohl bei der Entwicklung als auch dem Fortschreiten des Mammakarzinoms eine Rolle. Dort ist es ebenfalls überexprimiert, komplexiert ER α und verstärkt dessen Aktivität [209]. Die Ergebnisse des ER β -Knockdowns in den RL95-2-Zellen deuten darauf hin, dass der Rezeptor die Expression von VAV3 in gewissem Maße unterdrückt und dass ER β somit als Tumorsuppressor wirkt.

4.3.2 Gene mit verminderter Expression

In den HEC-1-A-Endometriumkarzinomzellen zeigte sich TAF9B (TATA-box binding protein associated factor 9b) nach dem ER β -Knockdown um mehr als das 3-Fache vermindert exprimiert. TAF9B, welcher unter anderem wesentlich für die Lebensfähigkeit der Zellen ist [210], ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIID [211]. Er agiert unter anderem als ein Transkriptions-Co-Aktivator des Tumorsuppressors p53. Hierbei wird der Faktor für die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung benötigt [212]. Somit gibt die verminderte Expression von TAF9B in den ER β -KD einen Hinweis auf die tumorsupprimierende Wirkung von ER β .

In den Zellen der Linie HEC-1-A war ebenfalls TMEM109 (transmembrane protein 109) nach dem Knockdown 2,4-fach vermindert exprimiert. TMEM109 ist ein Protein, das hauptsächlich im Endoplasmatischem Retikulum vorkommt. Das Endoplasmatische Retikulum kann auf verschiedene Stressfaktoren reagieren und letztendlich die Apoptose induzieren. Yamazaki et al. beobachteten, dass TMEM109 nach aufgetretenen DNA-Schäden spezifisch den Zelltod verstärkt. Sie vermuten, dass TMEM109 hierbei ein wesentlicher Bestandteil von den apoptotischen Signalen ist, welche das Endoplasmatische Retikulum generiert [213]. TMEM109 ist also wichtig zur Apoptoseinduktion bei aufgetretenen DNA-Schäden. Durch den Knockdown von ER β ist die Expression vermindert und weist ebenfalls darauf hin, dass ER β tumorsupprimierend wirkt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Mehrheit der bisherigen Forschungsarbeiten zeigten Östrogenrezeptor β als Tumorsuppressor in endokrin reaktiven Geweben [75, 109, 214, 215]. Die Rolle von ER β bei der Karzinogenese und Tumorprogression in verschiedenen Geweben wurde bis heute vielfach untersucht. Im Mamma-, Prostata- und Ovarialkarzinom wird ER β die Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [107–110]. Studien bezüglich der Rolle von ER β im Endometrium führten bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Forschungsergebnisse zeigen eine Downregulation von ER β im Endometriumkarzinom. Bei der Karzinogenese scheint es zu einem Expressionsverlust von ER β zu kommen und es wird vermutet, dass ER β schützende Eigenschaften auf das Endometrium hat [113, 114, 216]. Viele Arbeiten untersuchten das Expressionsverhältnis von ER α und ER β und versuchten es mit der Prognose in Zusammenhang zu bringen. Einige Studien zeigten, dass ein Überwiegen der ER β -Konzentration (verglichen mit der ER α -Konzentration) mit negativen prognostischen Faktoren korreliert [99, 111, 118, 119]. Letztendlich konnte aber die genaue Funktion des Rezeptors bei der Entstehung des Endometriumkarzinoms bzw. die Rolle im Endometriumkarzinom bis heute nicht vollständig geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufgabe von ER β in endometrialen Adenokarzinomzellen am Beispiel von den Zelllinien HEC-1-A und RL95-2 untersucht. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Proliferationsverhalten der Zellen nach Beeinflussung von ER β . Das Abschalten von ER β mittels Transfektion in den endometrialen Adenokarzinomzellen beider Zelllinien führt zu einer Steigerung der Proliferationsrate der Zellen. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass ER β -KD eine verstärkte Expression von Proliferationsgenen, aber eine verminderte Expression von Differenzierungsmarkern aufwies. Eine Hemmung des Rezeptors mit spezifischen ER β -Antagonisten führte zu einem Proliferationsanstieg. Die Wirkung der ER β -Agonisten erbrachte hingegen widersprüchliche, d.h. zum einen Teil hemmende, zum anderen Teil fördernde Einflüsse auf die Proliferation der Zellen. Auch der bereits vorher beschriebene proliferative Effekt von Tamoxifen auf die Endometriumkarzinomzellen konnte beobachtet werden. Dieser Effekt von Tamoxifen konnte durch den ER β -

Agonisten WAY200070 teilweise aufgehoben werden. Für den klinischen Einsatz ist die Wirkung von WAY200070 jedoch zu schwach. Weitere Arbeiten bezüglich der Wirkung von Tamoxifen auf Endometriumkarzinomzellen müssen noch folgen. Im Endeffekt sollte das Ziel dabei sein, eine klinisch einsetzbare Therapie zu finden, um die Entstehung von Malignomen durch eine Tamoxifen-Therapie reduzieren zu können.

Die Mehrheit der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse weist auf einen protektiven, tumorsupprimierenden Effekt von ER β in den Karzinomzellen hin. Jedoch sind weitere Forschungen über die Rolle von ER β im Endometriumkarzinom nötig, um dessen Wirkungsweise abzusichern.

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis

1	Modell der Entstehung des Typ I-Karzinoms, modifiziert nach Sherman et al. [37]	7
2	Schematischer Aufbau von ER β	14
3	Mechanismus der Östrogenwirkung auf die Östrogenrezeptoren, modifiziert nach Lewis et al. [78]	16
4	Molekulare Struktur von PHTPP	25
5	Molekulare Struktur von (R,R)-THC	25
6	Molekulare Struktur von Liquiritigenin	26
7	Molekulare Struktur von ERB041	26
8	Molekulare Struktur von WAY200070	27
9	Molekulare Struktur von 4-OH-Tamoxifen	28
10	Umwandlung von Resazurin zu Resorufin durch metabolisch aktive Zellen, modifiziert nach [158]	42
11	Erfolgskontrolle des ER β -Knockdowns	48
12	Proliferationsverhalten der Endometriumkarzinomzellen vor und nach einem siRNA-vermittelten ER β -Knockdown in 10% FBS-Medium	50
13	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium	53
14	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit PHTPP in 10% FBS-Medium	54
15	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium	55
16	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit (R,R)-THC in 10% FBS-Medium	57
17	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 1-fach SR2-Medium	59

18	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit ERB041 in 10% FBS-Medium	60
19	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium	61
20	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit Liquiritigenin in 10% FBS-Medium	63
21	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium	64
22	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2	65
23	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 10% FBS-Medium	66
24	Proliferationsverhalten der RL95-2-Zellen nach Stimulation mit WAY200070 in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2 + 1% FBS	67
25	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 10% FBS-Medium	69
26	Proliferationsverhalten der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen in 1-fach SR2-Medium + 1nM E2	70
27	Proliferationsverhaltens der HEC-1-A-Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen + ER β -Modulatoren im 1-fach SR2-Medium + 1nM E2	73

Tabellenverzeichnis

1	Klinisch-pathologische Charakteristika der zwei Typen des Endometriumkarzinoms	2
2	Wichtige risikosteigernde und -senkende Faktoren für die Entstehung des Endometriumkarzinoms	5
3	TNM- und FIGO-Klassifikation des Endometriumkarzinoms [49]	10
4	Grading endometrioider und muzinöser Endometriumkarzinome	10
5	Expression der Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) im Endometriumkarzinom (verglichen mit normalem Endometrium) . . .	19
6	Vergleich der ER β /ER α -Ratio zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe	20
7	Zusammenhang zwischen der Östrogenrezeptor-Ratio und der Prognose des Endometriumkarzinoms	21
8	Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien	24
9	In der Arbeit verwendete Stimulanzen	37
10	Verwendete Zellzahlen pro Well in den verschiedenen Nährmedien	40
11	Verwendete Konzentrationen der SERMs	51
12	Eingesetzte Konzentrationen bei der Stimulation mit Tamoxifen und ER β -Antagonisten bzw. -Agonisten	71

Abkürzungsverzeichnis

AEH	Atypische Endometriumhyperplasie
AF	Aktivierungsfunktion
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	Body-Mass-Index
BCPT	Breast Cancer Prevention Trial
BRCA-Gene	Breast Cancer Gene
cDNA	complementary DNA
CDK	cyclin-dependent kinase
CIN	cervical intraepithelial neoplasia
cm ²	Quadratzentimeter
CoA	Coaktivator
CS	Cowden-Syndrom

Ct	cycle treshold
CTB	CellTiter-Blue [®]
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft e. V.
DKH	Deutsche Krebshilfe
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMEM/ Hams F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 HAM
DNA	deoxyribonucleic acid
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	estrogen receptor/Östrogenrezeptor
ER α	estrogen receptor/Östrogenrezeptor α

ER β	estrogen receptor/Östrogenrezeptor β
ERE	Estrogen Response Element
ER β -KD	ER β -Knockdownzellen
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum
FDA	United States Food and Drug Administration
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FR α	Folat Rezeptor α
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA2	GATA-binding factor 2
h	hora
HAVCR1	Hepatitis A virus cellular receptor 1
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	hereditary non-polyposis colorectal cancer/ hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma

HRT	hormone replacement therapy/Östrogensatztherapie
hsp	Hitzeschockprotein
IARC	International Agency for Research on Cancer
IUP	Intrauterinpeessar
kb	Kilobasenpaare
KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LM	Lösungsmittel
LMK	Lösungsmittelkontrolle
LNE	Lymphonodektomie (Lymphadenektomie)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
MM	Master-Mix
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar

MMR-Defekte	Mismatch-Repair-Defekte
mRNA	messenger ribonucleic acid
miRNA	micro ribonucleic acid
MUC15	Mucin 15, Cell Surface Associated
MYBL2	MYB Proto-Oncogene Like 2
n	Anzahl der Versuche
NAD+	Nicotinamidadenindinukleotid
NAMPT	Nikotinamidphosphoribosyltransferase
neg.co.	Zellen der Negativkontrolle (negativ control)
nM	Nanomolar
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
p	Signifikanzniveau
PAX2	Paar-Box-Gen 2
PBS	phosphate buffered saline
PCOS	polycystisches Ovarvialsyndrom
PCR	polymerase chain reaction

pg	Pikogramm
PR	progesteron receptor
PNRC2	Proline Rich Nuclear Receptor Coactivator
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	quantitative PCR
ras	rat sarcoma
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleid acid
RT-PCR	Real Time PCR
sd	Standardabweichung
SEM	standard error of the mean
SERM	selektiver Östrogenrezeptormodulator
siRNA	small interfering RNA
SR2	Serum Replacement 2
SSX	Synovial sarcoma, X breakpoint
TAF9B	TATA-box binding protein associated factor 9b

TBVT	tiefe Beinvenenthrombose
TNM	Tumor/Nodus/Metastase
TMEM109	transmembrane protein 9
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VAV3	Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 3
XAGE3	X Antigen Family Member 3

7 Literaturverzeichnis

- [1] Yeramian A, Moreno-Bueno G, Dolcet X, Catusus L, Abal M, Colas E, et al. Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression. *Oncogene*. 2013;32(4):403–413.
- [2] Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 2017;11. Ausgabe.
- [3] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
- [4] Robert-Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015;10. Ausgabe.
- [5] Sivridis E, Giatromanolaki A. The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures. *Journal of Clinical Pathology*. 2011;64(7):553–560.
- [6] Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*. 1983;15(1):10–17.
- [7] Imesch P, Fink D. Das Endometriumkarzinom: Diagnostik und Therapie. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie*. 2013;(4):2–6.
- [8] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientinnen mit Endometriumkarzinom, Langversion 1.0, 2018, AWMF Registernummer: 032/034-OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/>; (abgerufen 09.11.2018).

- [9] Lacey JV Jr, Sherman ME, Rush BB, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, et al. Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(5):788–792.
- [10] Ryan AJ, Susil B, Jobling TW, Oehler MK. Endometrial cancer. *Cell and Tissue Research*. 2005;322(1):53–61.
- [11] Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Human Molecular Genetics*. 1997;6(1):105–110.
- [12] Parc YR, Halling KC, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN, et al. Microsatellite instability and hMLH1/hMSH2 expression in young endometrial carcinoma patients: Associations with family history and histopathology. *International Journal of Cancer*. 2000;86(1):60–66.
- [13] Riegert-Johnson DL, Gleeson FC, Roberts M, Tholen K, Youngborg L, Bullock M, et al. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2010;8(1):6.
- [14] Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(2):400–407.
- [15] Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, et al. Case-Control Study of Endogenous Steroid Hormones and Endometrial Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(16):1127–1135.
- [16] La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognoni G. Risk factors for endometrial cancer at different ages. *Journal of National Cancer Institute*. 1994;73(3):667–671.

- [17] Kelsey JL, LiVolsi VA, Holford TR, Fischer DB, Mostow ED, Schwartz PE, et al. A case-control study of cancer of the endometrium. *American Journal of Epidemiology*. 1982;116(2):333–342.
- [18] Weiss NS, Farewall VT, Szekely DR, English DR, Kiviat N. Oestrogens and endometrial cancer: effect of other risk factors on the association. *Maturitas*. 1980;2(3):185–190.
- [19] Frumar AM, Meldrum DR, Geola F, Shamonki IM, Tatarzyn IV, Deftos LJ, et al. Relationship of fasting urinary calcium to circulating estrogen and body weight in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1980;50(1):70–75.
- [20] Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, LeDonne D, Powell JG. The epidemiology of serum sex hormones in postmenopausal women. *American Journal of Epidemiology*. 1989;129(6):1120–1131.
- [21] Ruggiero RJ, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *Journal of Midwifery & Women's Health*. 2002;47(3):130–138.
- [22] Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schragger S. Obesity and women's health: an evidence-based review. *Journal of the American Board of Family Medicine*. 2011;24(1):75–85.
- [23] Kaye SA, Folsom AR, Soler JT, Prineas RJ, Potter JD. Associations of Body Mass and Fat Distribution with Sex Hormone Concentrations in Postmenopausal Women. *International Journal of Epidemiology*. 1991;20(1):151–156.
- [24] Kurzeder C, Sauer G, Kreienberg R. Epidemiologie des Endometriumkarzinoms. *Gynäkologe*. 2007;(40):10–13.
- [25] Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SA, Pettinger M, Liu J, McNeeley SG, Lopez AM, Women's Health Initiative Investigators. Effects of Estrogen Plus Progestin on Gynecologic Cancers

- and Associated Diagnostic Procedures: The Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA*. 2003;290(13):1739–1748.
- [26] Genazzani A, Gadducci A, Gambacciani M, International Menopause Society Expert Workshop. Hormone replacement therapy and cancer: International Menopause Society Expert Workshop. *Gynecological Endocrinology*. 2001;15:453–465.
- [27] Persson I, Adami HO, Bergkvist L, Lindgren A, Pettersson B, Hoover R, et al. Risk of endometrial cancer after treatment with oestrogens alone or in conjunction with progestogens: results of a prospective study. *BMJ*. 1989;298(6667):147–151.
- [28] Mignotte H, Lasset C, Bonadona V, Lesur A, Luporsi E, Rodier JF, et al. Iatrogenic risks of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. *Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC)*. *International Journal of Cancer*. 1998;76(3):325–330.
- [29] Bergman L, Beelen MLR, Gallee MPW, Hollema H, Benraadt J, van Leeuwen, Flora E, et al. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *The Lancet*. 2000;356(9233):881–887.
- [30] Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(20):2607–2618.
- [31] Kvåle G1, Heuch I, Ursin G. Reproductive Factors and Risk of Cancer of the Uterine Corpus: A Prospective Study. *Cancer Research*. 1988;48(21):6217–6221.
- [32] Lawrence C, Tessaro I, Durgerian S, Caputo T, Richart R, Jacobson H, et al. Smoking, body weight, and early-stage endometrial cancer. *Cancer*. 1987;59(9):1665–1669.

- [33] Weiderpass E, Ye W, Mucci LA, Nyren O, Trichopoulos D, Vainio H, et al. Alcoholism and risk for endometrial cancer. *International Journal of Cancer*. 2001;93(2):299–301.
- [34] Soini T, Hurskainen R, Grénman S, Mäenpää J, Paavonen J, Pukkala E. Cancer risk in women using the levonorgestrel-releasing intrauterine system in Finland. *Obstetrics and Gynecology*. 2014;124(2 Pt 1):292–299.
- [35] Felix AS, Gaudet MM, La Vecchia C, Nagle CM, Shu XO, Weiderpass E, et al. Intrauterine devices and endometrial cancer risk: a pooled analysis of the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. *International Journal of Cancer*. 2015;136(5):E410–22.
- [36] Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, Potischman N, Kurman RJ, Berman ML, et al. Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas. *Modern pathology*. 1997;10(10):963–968.
- [37] Sherman ME. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2000;13(3):295–308.
- [38] Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human Pathology*. 1995;26(11):1268–1274.
- [39] Shang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):360–368.
- [40] Matias-Guiu X, Catusus L, Bussaglia E, Lagarda H, Garcia A, Pons C, et al. Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Human Pathology*. 2001;32(6):569–577.
- [41] Kuhn E, Wu RC, Guan B, Wu G, Zhang J, Wang Y, et al. Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma

- by genome-wide analyses. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(19):1503–1513.
- [42] Imesch P. Das Endometriumkarzinom: Epidemiologie, Präkanzerosen, Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Schweizer Zeitschrift für Onkologie*. 2008;(5):6–10.
- [43] Pennant ME, Mehta R, Moody P, Hackett G, Prentice A, Sharp SJ, et al. Premenopausal abnormal uterine bleeding and risk of endometrial cancer. *BJOG*. 2017;124(3):404–411.
- [44] Timmermans A, Opmeer BC, Khan KS, Bachmann LM, Epstein E, Clark TJ, et al. Endometrial thickness measurement for detecting endometrial cancer in women with postmenopausal bleeding: A systematic review and meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*. 2010;116(1):160–167.
- [45] Savelli L, Ceccarini M, Ludovisi M, Fruscella E, de Iaco PA, Salizzoni E, et al. Preoperative local staging of endometrial cancer: Transvaginal sonography vs. magnetic resonance imaging. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*. 2008;31(5):560–566.
- [46] Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O, editors. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2011.
- [47] Lalwani N, Dubinsky T, Javitt MC, Gaffney DK, Glanc P, Elshaikh MA, et al. ACR Appropriateness Criteria[®] pretreatment evaluation and follow-up of endometrial cancer. *Ultrasound Quarterly*. 2014;30(1):21–28.
- [48] Amkreutz LCM, Mertens HJMM, Nurseta T, Engelen MJA, Bergmans M, Nolting E, et al. The value of imaging of the lungs in the diagnostic workup of patients with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*. 2013;131(1):147–150.

- [49] Wittekind C, Meyer HJ. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7th ed. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2010.
- [50] Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington S, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed. Lyon: IARC; 2014.
- [51] Zaino R, Carinelli SG, Ellenson LH. Tumours of the uterine Corpus: Epithelial Tumours and Precursors. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs 4th Ed. 2014;p. 125–126.
- [52] Chan JK, Wu H, Cheung MK, Shin JY, Osann K, Kapp DS. The outcomes of 27,063 women with unstaged endometrioid uterine cancer. *Gynecologic Oncology*. 2007;106(2):282–288.
- [53] Galaal K, Bryant A, Fisher AD, Al-Khaduri M, Kew F, Lopes AD. Laparoscopy versus laparotomy for the management of early stage endometrial cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012;(9):CD006655.
- [54] Tanner EJ, Leitao MM, Garg K, Chi DS, Sonoda Y, Gardner GJ, et al. The role of cytoreductive surgery for newly diagnosed advanced-stage uterine carcinosarcoma. *Gynecologic Oncology*. 2011;123(3):548–552.
- [55] Barlin JN, Puri I, Bristow RE. Cytoreductive surgery for advanced or recurrent endometrial cancer: A meta-analysis. *Gynecologic Oncology*. 2010;118(1):14–18.
- [56] Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Wárlám-Rodenhuis CC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: Multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. *Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma*. *Lancet*. 2000;355(9213):1404–1411.

- [57] Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, Zaino RJ, Spirtos NM, Bloss JD, et al. A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*. 2004;92(3):744–751.
- [58] Kodama J, Seki N, Hiramatsu, Y. Chemotherapy for high-risk early-stage endometrial cancer. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2007;19(1):42–47.
- [59] Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;50(1):3–22.
- [60] Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure–function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(4):299–402.
- [61] Galand P, Leroy F, Chrétien J. Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice. *Journal of Endocrinology*. 1971;49(2):243–252.
- [62] Ritzén EM, Nilsson O, Grigelioniene G, Holst M, Sävendahl L, Wroblewski J. Estrogens and human growth. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2000;74(5):383–386.
- [63] Henley DV, Lindzey J, Korach KS. Steroid Hormones: In: Melmed S, Conn P. M. (eds) *Endocrinology*. Humana Press. 2005;p. 49–65.
- [64] Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal Research Reviews*. 2008;28(6):954–974.
- [65] Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 6th ed. Baltimore, Md. [u.a.]: Lippincott Williams & Williams; 1999.

- [66] Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*. 1994;(63):451–486.
- [67] Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320(6058):134–139.
- [68] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5925–5930.
- [69] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ERbeta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*. 1996;392(1):49–53.
- [70] Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V. Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor beta. *Molecular Endocrinology*. 1997;11(3):353–365.
- [71] Mowa CN, Iwanaga T. Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *Journal of Endocrinology*. 2000;165(1):59–66.
- [72] Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 1997;388(4):507–525.
- [73] Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(5):2309–2314.

- [74] Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JÅ. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(1):337–342.
- [75] Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear Receptor Signaling*. 2008;6:e003.
- [76] Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998;243(1):122–126.
- [77] Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile*. 1995;2(11):1173–1308.
- [78] Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutation Research*. 2005;591(1-2):247–263.
- [79] Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989;59(3):477–487.
- [80] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(14):2905–2919.
- [81] Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835–839.
- [82] Malamas MS, Manas ES, McDevitt RE, Gunawan I, Xu ZB, Collini MD, et al. Design and synthesis of aryl diphenolic azoles as potent and selective estrogen receptor-beta ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(21):5021–5040.

- [83] Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(12):4258–4265.
- [84] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240(4854):889–895.
- [85] Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989;56(3):335–344.
- [86] Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*. 1999;140(12):5566–5578.
- [87] Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by ERalpha and ERbeta. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;69(1-6):165–175.
- [88] Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 1986;46(7):1053–1061.
- [89] Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*. 2000;19(43):4970–4978.
- [90] Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA. Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *American Journal of Pharmacogenomics*. 2004;4(1):19–28.
- [91] Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue Distribution of Estrogen Receptors Alpha (ER-alpha) and Beta (ER-beta) mRNA

- in the Midgestational Human Fetus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(10):3509–3512.
- [92] Brandenberger AW, Lebovic DI, Tee MK, Ryan IP, Tseng JF, Jaffe RB, et al. Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Molecular Human Reproduction*. 1999;5(7):651–655.
- [93] Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, Murakami T, Sasano H, Yajima A. Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*. 1999;5(6):559–564.
- [94] Matsuzaki S, Uehara S, Murakami T, Fujiwara J, Funato T, Okamura K. Quantitative analysis of estrogen receptor alpha and beta messenger ribonucleic acid levels in normal endometrium and ovarian endometriotic cysts using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Fertility and Sterility*. 2000;74(4):753–759.
- [95] Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Balle A, Kriegel S, et al. Immunohistochemical analysis of estrogen receptor alpha, estrogen receptor beta and progesterone receptor in normal human endometrium. *Acta Histochemica*. 2004;106(3):245–252.
- [96] Mylonas I, Jeschke U, Shabani N, Kuhn C, Kriegel S, Kupka MS, Friese K. Normal and malignant human endometrium express immunohistochemically estrogen receptor alpha (ER-alpha), estrogen receptor beta (ER-beta) and progesterone receptor (PR). *Anticancer Research*. 2005;25(3A):1679–1686.
- [97] Strick R, Ackermann S, Langbein M, Swiatek J, Schubert SW, Hashemolhosseini S, et al. Proliferation and cell-cell fusion of endometrial carcinoma are induced by the human endogenous retroviral Syncytin-1 and regulated by TGF-beta. *Journal of Molecular Medicine*. 2007;85(1):23–38.

- [98] Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Ito K, Matsuzaki S, Konno R, et al. Analysis of estrogen receptor alpha and beta in endometrial carcinomas: correlation with ER β and clinicopathologic findings in 45 cases. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2000;19(4):335–341.
- [99] Saegusa M, Okayasu I. Changes in expression of estrogen receptors α and β in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2000;91(5):510–518.
- [100] Fujishita A, Nakane PK, Koji T, Masuzaki H, Chavez RO, Yamabe T, et al. Expression of estrogen and progesterone receptors in endometrium and peritoneal endometriosis: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Fertility and Sterility*. 1997;67(5):856–864.
- [101] Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS Jr. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1988;67(2):334–340.
- [102] Leidenberger FA, Strowitzki T, Ortmann O. *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014.
- [103] Juhasz-Böss I, Lattrich C, Buchholz S, Ortmann O, Treeck O. Expression und Funktion von Östrogenrezeptor β und seinen Splicevarianten im humanen Endometrium. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2008;68(9):896–900.
- [104] Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, et al. Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(11):5936–5941.
- [105] Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Applanat M. Presence of estrogen receptor β in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells: Expression in

- glandular, stromal, and vascular cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86(3):1379–1386.
- [106] Jazaeri AA, Nunes KJ, Dalton MS, Xu M, Shupnik MA, Rice LW. Well-differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression. *Oncogene*. 2001;20(47):6965–6969.
- [107] Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ERbeta Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Endocrinology*. 2001;142(9):4120–4130.
- [108] Sanders L, Görse R, Treeck O, Ortmann O. Benigne Brusterkran- kungen - Ätiologie und Klinik. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2007;67(4):321–328.
- [109] Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen re- ceptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Letters*. 2004;566(1-3):169–172.
- [110] Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Lattrich C, Piendl G, Ortmann O, et al. Estrogen receptor beta1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Journal of Endocrinology*. 2007;193(3):421–433.
- [111] Zhang JW, Peng ZL. Association between the expression of estrogen receptor subunit in endometrial carcinoma and the prognostic factors of endometrial carcinoma. *Journal of Sichuan University Medical science edition*. 2004;35(6):843–845.
- [112] Hu K, Zhong G, He F. Expression of estrogen receptors ERalpha and ERbeta in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2005;15(3):537–541.
- [113] Šmuc T, Rižner TL. Aberrant pre-receptor regulation of estrogen and progesterone action in endometrial cancer. *Molecular and Cellular En- docrinology*. 2009;301(1-2):74–82.

- [114] Chakravarty D, Srinivasan R, Ghosh S, Gopalan S, Rajwanshi A, Majumdar S. Estrogen receptor beta1 and the beta2/betacx isoforms in non-neoplastic endometrium and in endometrioid carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2007;17(4):905–913.
- [115] Skrzypczak M, Bieche I, Szymczak S, Tozlu S, Lewandowski S, Girault I, et al. Evaluation of mRNA expression of estrogen receptor beta and its isoforms in human normal and neoplastic endometrium. *International Journal of Cancer*. 2004;110(6):783–787.
- [116] Häring J, Skrzypczak M, Stegerer A, Lattrich C, Weber F, Görse R, et al. Estrogen receptor beta transcript variants associate with oncogene expression in endometrial cancer. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012;29(6):1127–1136.
- [117] Zhang Y, Liao Q, Chen C, Yu L, Zhao J. Function of estrogen receptor isoforms alpha and beta in endometrial carcinoma cells. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2006;16(4):1656–1660.
- [118] Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Toyoki H, Tamaya T. Clinical implications of the expression of estrogen receptor-alpha and -beta in primary and metastatic lesions of uterine endometrial cancers. *Oncology*. 2002;62(3):269–277.
- [119] Jongen V, Briët J, de Jong R, ten Hoor K, Boezen M, van der Zee A, et al. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor-A and -B in a large cohort of patients with endometrioid endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*. 2009;112(3):537–542.
- [120] Takama F, Kanuma T, Wang D, Kagami I, Mizunuma H. Oestrogen receptor beta expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer. *British Journal of Cancer*. 2001;84(4):545–549.
- [121] Cirisano FD, Karlan BY. The role of the HER-2/neu oncogene in gynecologic cancers. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1996;3(3):99–105.

- [122] Häring J, Schüler S, Lattrich C, Ortmann O, Treeck O. Role of estrogen receptor beta in gynecological cancer. *Gynecologic Oncology*. 2012;127(3):673–676.
- [123] Tsuda H, Hashiguchi Y, Inoue T, Yamamoto K. Alteration of G2 cell cycle regulators occurs during carcinogenesis of the endometrium. *Oncology*. 2003;65(2):159–166.
- [124] Kuramoto H. Studies of the growth and cytogenetic properties of human endometrial adenocarcinoma in culture and its development into an established line. *Acta obstetrica et gynaecologica Japonica*. 1972;19(1):47–58.
- [125] Kuramoto H, Tamura S, Notake Y. Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1972;114(8):1012–1019.
- [126] Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA, Christian CD. Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In vitro*. 1983;19(3 Pt 1):147–158.
- [127] Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Rebacz NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, et al. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(24):5872–5893.
- [128] Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Rebacz NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, et al. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Estrogen receptor ligands possessing estrogen receptor beta antagonist activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005;48(7):2724.
- [129] Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology*. 1999;140(2):800–804.

- [130] Kraichely DM, Sun J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: Correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology*. 2000;141(10):3534–3545.
- [131] Yahara S, Nishioka I. Flavonoid glucosides from licorice. *Phytochemistry*. 1984;23(9):2108–2109.
- [132] Mersereau JE, Levy N, Staub RE, Baggett S, Zogovic T, Chow S, et al. Liguiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor b agonist. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2008;283(1-2):49–57.
- [133] Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, et al. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology*. 2003;144(10):4241–4249.
- [134] Harris HA. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Molecular Endocrinology*. 2007;21(1):1–13.
- [135] Mitlak BH, Cohen FJ. Selective estrogen receptor modulators: a look ahead. *Drugs*. 1999;57(5):653–663.
- [136] Harper MJ, Walpole AL. A new derivative of triphenylethylene: Effect on implantation and mode of action in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1967;13(1):101–119.
- [137] Goldstein SR. The effect of SERMs on the endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;949:237–242.
- [138] Cole MP, Jones CT, Todd ID. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*. 1971;25(2):270–275.
- [139] Jordan VC, Jaspan T. Tamoxifen as an anti tumor agent: oestrogen binding as a predictive test for tumor response. *Journal of Endocrinology*. 1976;68(3):453–460.

- [140] Jordan VC, Koerner S. Tamoxifen as an anti-tumour agent: Role of oestradiol and prolactin. *Journal of Endocrinology*. 1976;68(02):305–311.
- [141] Jordan VC. Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacological Reviews*. 1984;36(4):245–276.
- [142] Dowsett M, Archer C, Assersohn L, Gregory RK, Ellis PA, Salter J, et al. Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocrine-related Cancer*. 1999;6(1):25–28.
- [143] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Muster-text für Fachinformation Tamoxifen. Online verfügbar auf: <https://sunset-clause.dimdi.de/muster/O9b59fc22f0a34cf7a8fb53b59eee5096.pdf>; (abgerufen am 03.02.2019).
- [144] Grese TA, Dodge JA. Selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Current Pharmaceutical Design*. 1998;4(1):71–92.
- [145] Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(19):1449–1457.
- [146] Ward HW. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: A trial of tamoxifen at two dose levels. *British Medical Journal*. 1973;1(5844):13–14.
- [147] Senkus-Konefka E, Konefka T, Jassem J. The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer Treatment Reviews*. 2004;30(3):291–301.
- [148] Jones PS, Parrott E, White IN. Activation of transcription by estrogen receptor alpha and beta is cell type- and promoter-dependent. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(45):32008–32014.
- [149] Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(18):1371–1388.

- [150] Killackey MA, Hakes TB, Pierce VK. Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens. *Cancer Treatment Reports*. 1985;69(2):237–238.
- [151] Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994;86(7):527–537.
- [152] Fornander T, Hellström AC, Moberger B. Descriptive clinicopathologic study of 17 patients with endometrial cancer during or after adjuvant tamoxifen in early breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85(22):1850–1855.
- [153] Andersson M, Storm HH, Mouridsen HT. Carcinogenic effects of adjuvant tamoxifen treatment and radiotherapy for early breast cancer. *Acta Oncologica*. 1992;31(2):259–263.
- [154] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some pharmaceutical drugs; 1996.
- [155] DeMichele A, Troxel AB, Berlin JA, Weber AL, Bunin GR, Turzo E, et al. Impact of raloxifene or tamoxifen use on endometrial cancer risk: a population-based case-control study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(25):4151–4159.
- [156] Clarke MJ. WITHDRAWN: Tamoxifen for early breast cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2008;(4):CD000486.
- [157] Wu H, Chen Y, Liang J, Shi B, Wu G, Zhang Y, et al. Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature*. 2005;438(7070):981–987.
- [158] CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin. Online verfügbar auf: <https://www.promega.de/resources/protocols/technical->

- bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/;(abgerufen am 18.11.2018).
- [159] Grody WW. *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. Academic Press; 2010.
- [160] Bustin SA. *A - Z of quantitative PCR*. vol. 5 of IUL biotechnology series. La Jolla, CA: International University Line; 2004.
- [161] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.
- [162] Hevir-Kene N, Rižner TL. The endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1A, and the control cell line HIEEC, differ in expression of estrogen biosynthetic and metabolic genes, and in androstenedione and estrone-sulfate metabolism. *Chemico-biological Interactions*. 2015;234:309–319.
- [163] Castro-Rivera E, Safe S. Estrogen- and antiestrogen-responsiveness of HEC1A endometrial adenocarcinoma cells in culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1998;64(5-6):287–295.
- [164] Dubovsky JA, McNeel DG. Inducible expression of a prostate cancer-testis antigen, SSX-2, following treatment with a DNA methylation inhibitor. *The Prostate*. 2007;67(16):1781–1790.
- [165] Naka N, Joyama S, Tsukamoto Y, Yoshioka K, Hashimoto N, Ujiiye T, et al. Quantification of SSX mRNA expression in human bone and soft tissue tumors using nucleic acid sequence-based amplification. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2005;7(2):187–197.
- [166] Taylor BJ, Reiman T, Pittman JA, Keats JJ, de Bruijn DRH, Mant MJ, et al. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: Co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse

- prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *Journal of Immunotherapy*. 2005;28(6):564–575.
- [167] Türeci O, Chen YT, Sahin U, Güre AO, Zwick C, Villena C, et al. Expression of SSX genes in human tumors. *International Journal of Cancer*. 1998;77(1):19–23.
- [168] Hilal NR, Novikov DV, Novikov VV, Karaulov AV. Cancer-testis genes in colon cancer. *Terapevticheskii Arkhiv*. 2017;89(5):113–117.
- [169] He L, Ji Jn, Liu Sq, Xue E, Liang Q, Ma Z. Expression of cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences*. 2014;34(2):181–185.
- [170] Chen L, Zhou WB, Zhao Y, Liu XA, Ding Q, Zha XM, et al. Cancer/testis antigen SSX2 enhances invasiveness in MCF-7 cells by repressing ERalpha signaling. *International Journal of Oncology*. 2012;40(6):1986–1994.
- [171] Greve KBV, Lindgreen JN, Terp MG, Pedersen CB, Schmidt S, Mollenhauer J, et al. Ectopic expression of cancer/testis antigen SSX2 induces DNA damage and promotes genomic instability. *Molecular oncology*. 2015;9(2):437–449.
- [172] Bloom JE, McNeel DG. SSX2 regulates focal adhesion but does not drive the epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(32):50997–51011.
- [173] Zhou Y, Shen JK, Hornicek FJ, Kan Q, Duan Z. The emerging roles and therapeutic potential of cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) in human cancer. *Oncotarget*. 2016;7(26):40846–40859.
- [174] Loyer P, Trembley JH, Grenet JA, Busson A, Corlu A, Zhao W, et al. Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(12):7721–7732.

- [175] Redon R, Hussenet T, Bour G, Caulee K, Jost B, Muller D, et al. Amplicon mapping and transcriptional analysis pinpoint cyclin L as a candidate oncogene in head and neck cancer. *Cancer Research*. 2002;62(21):6211–6217.
- [176] Sticht C, Hofele C, Flechtenmacher C, Bosch FX, Freier K, Lichter P, et al. Amplification of Cyclin L1 is associated with lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *British Journal of Cancer*. 2005;92(4):770–774.
- [177] Mitra S, Mazumder Indra D, Basu PS, Mondal RK, Roy A, Roychoudhury S, et al. Amplification of CyclinL1 in uterine cervical carcinoma has prognostic implications. *Molecular Carcinogenesis*. 2010;49(11):935–943.
- [178] Imai SI. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt): A link between NAD biology, metabolism, and diseases. *Current Pharmaceutical Design*. 2009;15(1):20–28.
- [179] Revollo JR, Grimm AA, Imai SI. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(49):50754–50763.
- [180] Bi TQ, Che XM, Liao XH, Zhang DJ, Long HL, Li HJ, et al. Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncology Reports*. 2011;26(5):1251–1257.
- [181] Wang B, Hasan MK, Alvarado E, Yuan H, Wu H, Chen WY. NAMPT overexpression in prostate cancer and its contribution to tumor cell survival and stress response. *Oncogene*. 2011;30(8):907–921.
- [182] van Beijnum JR, Moerkerk PTM, Gerbers AJ, de Bruïne AP, Arends JW, Hoogenboom HR, et al. Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: A study of five gene products overexpressed

- in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*. 2002;101(2):118–127.
- [183] Maldi E, Travelli C, Caldarelli A, Agazzone N, Cintura S, Galli U, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is over-expressed in melanoma lesions. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2013;26(1):144–146.
- [184] Shackelford RE, Bui MM, Coppola D, Hakam A. Over-expression of nicotinamide phosphoribosyltransferase in ovarian cancers. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2010;3(5):522–527.
- [185] Lv X, Zhang L, Zhu Y, Said HM, Shi J, Xu G. Regulative Effect of Nampt on Tumor Progression and Cell Viability in Human Colorectal Cancer. *Journal of Cancer*. 2015;6(9):849–858.
- [186] Vora M, Alattia LA, Ansari J, Ong M, Cotelingam J, Coppola D, et al. Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase a Reliable Marker of Progression in Cervical Dysplasia. *Anticancer Research*. 2017;37(9):4821–4825.
- [187] Tian W, Zhu Y, Wang Y, Teng F, Zhang H, Liu G, et al. Visfatin, a potential biomarker and prognostic factor for endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*. 2013;129(3):505–512.
- [188] Elnakat H, Ratnam M. Role of folate receptor genes in reproduction and related cancers. *Frontiers in Bioscience*. 2006;11:506–519.
- [189] Hartmann LC, Keeney GL, Lingle WL, Christianson TJH, Varghese B, Hillman D, et al. Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2007;121(5):938–942.
- [190] Corona G, Giannini F, Fabris M, Toffoli G, Boiocchi M. Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells. *International Journal of Cancer*. 1998;75(1):125–133.

- [191] Liu C, Ding L, Bai L, Chen X, Kang H, Hou L, et al. Folate receptor alpha is associated with cervical carcinogenesis and regulates cervical cancer cells growth by activating ERK1/2/c-Fos/c-Jun. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;491(4):1083–1091.
- [192] Jhaveri MS, Rait AS, Chung KN, Trepel JB, Chang EH. Antisense oligonucleotides targeted to the human alpha folate receptor inhibit breast cancer cell growth and sensitize the cells to doxorubicin treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3(12):1505–1512.
- [193] Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *International Journal of Cancer*. 1997;74(2):193–198.
- [194] Toffoli G, Russo A, Gallo A, Cernigoi C, Miotti S, Sorio R, et al. Expression of folate binding protein as a prognostic factor for response to platinum-containing chemotherapy and survival in human ovarian cancer. *International Journal of Cancer*. 1998;79(2):121–126.
- [195] Bottero F, Tomassetti A, Canevari S, Miotti S, Ménard S, Colnaghi MI. Gene transfection and expression of the ovarian carcinoma marker folate binding protein on NIH/3T3 cells increases cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Research*. 1993;53(23):5791–5796.
- [196] Wu M, Gunning W, Ratnam M. Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1999;8(9):775–782.
- [197] Allard JE, Risinger JI, Morrison C, Young G, Rose GS, Fowler J, et al. Overexpression of folate binding protein is associated with shortened progression-free survival in uterine adenocarcinomas. *Gynecologic Oncology*. 2007;107(1):52–57.
- [198] Senol S, Ceyran AB, Aydin A, Zemheri E, Ozkanli S, Kösemetin D, et al. Folate receptor a expression and significance in endometrioid endome-

- trium carcinoma and endometrial hyperplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015;8(5):5633–5641.
- [199] Du P, Xiong R, Li X, Jiang J. Immune Regulation and Antitumor Effect of TIM-1. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:8605134.
- [200] Gou R, Chen J, Sheng S, Wang R, Fang Y, Yang Z, et al. KIM-1 Mediates High Glucose-Induced Autophagy and Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;38(6):2479–2488.
- [201] Han WK, Alinani A, Wu CL, Michaelson D, Loda M, McGovern FJ, et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005;16(4):1126–1134.
- [202] Lin F, Zhang PL, Yang XJ, Shi J, Blasick T, Han WK, et al. Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*. 2007;31(3):371–381.
- [203] Wang RY, Chen L, Chen HY, Hu L, Li L, Sun HY, et al. MUC15 inhibits dimerization of EGFR and PI3K-AKT signaling and is associated with aggressive hepatocellular carcinomas in patients. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1436–48.e1–12.
- [204] Thomas LJ, Vitale L, O’Neill T, Dolnick RY, Wallace PK, Minderman H, et al. Development of a Novel Antibody-Drug Conjugate for the Potential Treatment of Ovarian, Lung, and Renal Cell Carcinoma Expressing TIM-1. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2016;15(12):2946–2954.
- [205] Tsuboi M, Taniuchi K, Furihata M, Naganuma S, Kimura M, Watanabe R, et al. Vav3 is linked to poor prognosis of pancreatic cancers and promotes the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 2016;16(5):905–916.

- [206] Tan BB, Zhang MM, Li Y, Zhao Q, Fan LQ, Liu Y, et al. Inhibition of Vav3 gene can promote apoptosis of human gastric cancer cell line MGC803 by regulating ERK pathway. *Tumour Biology*. 2016;37(6):7823–7833.
- [207] Dong Z, Liu Y, Lu S, Wang A, Lee K, Wang LH, et al. Vav3 oncogene is overexpressed and regulates cell growth and androgen receptor activity in human prostate cancer. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(10):2315–2325.
- [208] Lyons LS, Burnstein KL. Vav3, a Rho GTPase guanine nucleotide exchange factor, increases during progression to androgen independence in prostate cancer cells and potentiates androgen receptor transcriptional activity. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(5):1061–1072.
- [209] Lee K, Liu Y, Mo JQ, Zhang J, Dong Z, Lu S. Vav3 oncogene activates estrogen receptor and its overexpression may be involved in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:158.
- [210] Chen Z, Manley JL. In vivo functional analysis of the histone 3-like TAF9 and a TAF9-related factor, TAF9L. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(37):35172–35183.
- [211] Frontini M, Soutoglou E, Argentini M, Bole-Feysot C, Jost B, Scheer E, et al. TAF9b (formerly TAF9L) is a bona fide TAF that has unique and overlapping roles with TAF9. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;25(11):4638–4649.
- [212] Lu H, Levine AJ. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):5154–5158.
- [213] Yamazaki T, Sasaki N, Nishi M, Takeshima H. Facilitation of DNA damage-induced apoptosis by endoplasmic reticulum protein mitsugumin23. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;392(2):196–200.

- [214] Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *Journal of Internal Medicine*. 2008;264(2):128–142.
- [215] Treeck O, Lattrich C, Springwald A, Ortman O. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;120(3):557–565.
- [216] Paul M, Cholewa K, Mazurek U, Witek A, Wilczok T. Estrogen receptor beta delta 6 (ER beta delta 6) isoform in human endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Cancer Investigation*. 2004;22(2):211–218.

8 Danksagung

Für die Überlassung sowohl des interessanten und spannenden Themas als auch des Arbeitsplatzes im Labor sowie der Bereitstellung aller benötigten Materialien bedanke ich mich beim Lehrstuhlinhaber Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortman.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich zu jeder Zeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung meiner Versuchsreihen unterstützt hat. Bei der Anfertigung und Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit stand er mir mit seinem fachkundigen Rat stets zur Seite.

Auch möchte ich Frau Helena Lowack für die gute Einarbeitung in die labortechnischen Methoden, sowie Frau Julia Häring, die mich bei der Durchführung der Arbeiten unterstützte, danken.

Mein großer Dank geht auch an die Menschen, die mich von Beginn meiner Arbeit bis zur Fertigstellung begleitet, ermutigt und unterstützt haben.