

**Mechanismen der Durchbrechung
der sekundären Antiöstrogenresistenz
durch GnRH-Analoga in
Mammakarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Martin Block
aus Fritzlar

Göttingen 2009

D7

Referent: Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2009

***So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.***

Johann Wolfgang von Goethe

Zusammenfassung

Bei der Therapie des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms stellt die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der antiproliferativen und proapoptischen Wirkung des Antiöstrogens Tamoxifen ein großes Problem dar. Die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden von Wachstumsfaktorrezeptoren und deren Querverknüpfung mit der Signaltransduktion des Östrogenrezeptors sind oft Ursache dieses Wirkungsverlustes, der sekundäre Antiöstrogenresistenz genannt wird. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Modell mit Östrogenrezeptor-positiven, parentalen Mammakarzinomzellen MCF-7 und T47D und ihren Tamoxifen-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR etabliert. Analoga von Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH)-I und -II stellen die Wirksamkeit von Tamoxifen in diesen Zellen wieder her. In der vorliegenden Arbeit sollten nun die mechanistischen Grundlagen der Antiöstrogenresistenz und ihrer Durchbrechung analysiert werden.

Es wurde gezeigt, dass in beiden resistenten Mammakarzinomzelllinien eine gesteigerte Phosphorylierung der Proteinkinase Akt vorliegt und dass GnRH-I- und -II- Analoga diese dephosphorylieren. Der Inhibitor der EGF-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase Gefitinib dephosphorylierte bei T47D-TR ebenfalls phospho-Akt und resensibilisierte die Zellen für Tamoxifen. Bei MCF-7-TR gelang erstmals eine Resensibilisierung Antiöstrogen-resistenter Zellen mit dem potentiellen Akt-Inhibitor Perifosine. Eine Analyse der Oberflächenrezeptoren von Wachstumsfaktoren mittels Durchflusszytometrie, sowie eine Analyse von Mediatoren des PI3K/Akt- und des ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionsweges ergab Hinweise auf die zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen, die bei den beiden verwendeten Zellmodellen unterschiedlich sind. Bei T47D-TR ist vermutlich eine verstärkte Expression des EGF-R und des ERBB2 mit folgender Aktivierung von Akt und MAPK ERK1/2 für die Resistenz verantwortlich. Bei MCF-7-TR wird erstmals ein möglicher Zusammenhang der sekundären Antiöstrogenresistenz mit einer reduzierten Expression des endogenen Akt-Inhibitors CTMP gezeigt.

Die durchgeführten Analysen ermöglichen einen Einblick in Mechanismen, die einer sekundären Antiöstrogenresistenz zu Grunde liegen können und zeigen neue Perspektiven in der kombinierten endokrinen Therapie.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Endokrine Therapie	3
1.2 Östrogene und Östrogenrezeptor-assoziierte Signaltransduktion.....	4
1.3 Antiöstrogene.....	6
1.3.1 Der selektive Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen.....	6
1.3.2 Der selektive Östrogenrezeptordestabilisator (SERD) Fulvestrant.....	10
1.4 Sekundäre Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms	10
1.5 Rolle der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalkaskade bei der sekundären Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms.....	12
1.5.1 Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signaltransduktion	12
1.5.2 Aberrationen innerhalb der PI3K/Akt-Signaltransduktion.....	16
1.5.3 PI3K/Akt-Signaltransduktion und sekundäre Antiöstrogenresistenz.....	17
1.5.4 Inhibitoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion.....	18
1.6 Rolle der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion bei der Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms.....	19
1.6.1 ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion	19
1.6.2 Aberrationen innerhalb der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion	21
1.6.3 ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion und sekundäre Antiöstrogenresistenz	21
1.6.4 Inhibitoren der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion.....	23
1.7 Analoga von GnRH-I und -II und Antiöstrogenresistenz.....	23
1.7.1 Wirkung der Analoga von GnRH-I und GnRH-II auf die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren in Tumorzellen	23
1.7.2 Wirkung von GnRH-I- und -II-Analoga auf OHT-resistente Mammakarzinomzellen	25
1.8 Zielsetzung.....	27
2 Material	28
2.1 Geräte	28
2.2 Verbrauchsmaterialien	29
2.3 Chemikalien	29
2.4 Puffer und Lösungen.....	29
2.4.1 Hergestellte Puffer und Lösungen.....	29
2.4.2 Kommerzielle Puffer und Lösungen	30
2.5 Kulturmedien und Medienzusätze	30

2.6	Biologisches Material	31
2.6.1	Zelllinien.....	31
2.6.2	Oligonukleotide.....	31
2.7	Sequenzierung.....	32
2.7.1	Primer	32
2.7.2	Enzyme.....	33
2.7.3	Antikörper	34
2.8	Inhibitoren, Antiöstrogene und GnRH-I/-II Agonisten	35
2.9	Kommerzielle Reaktionssysteme	35
2.10	Software und Datenbanken	36
3	Methoden	37
3.1	Zellkultivierung	37
3.1.1	Kultivierung und Passagierung adhärenter Zellen	37
3.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	37
3.1.3	Zellzählung	38
3.2	alamarBlue®-Proliferationsassay	38
3.3	Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Apoptose.....	39
3.3.1	Quantifizierung von Apoptose mittels Durchflusszytometrie	39
3.3.2	Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials	40
3.4	Durchflusszytometrie-Analyse von Zelloberflächenrezeptoren	40
3.5	Molekularbiologische Methoden	41
3.5.1	Isolierung von Nukleinsäuren	41
3.6	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	41
3.7	Reverse Transkription.....	42
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	46
3.9.1	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und von PCR-Produkten	47
3.10	Proteinbiochemische Methoden	47
3.10.1	Präparation von Zelllysaten.....	47
3.10.2	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford	47
3.10.3	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.10.4	Western Blot.....	49
3.10.5	Detektion und Visualisierung.....	50
3.10.6	Strippen von Nitrozellulosemembranen	50
3.11	Dokumentation und statistische Analyse	51
3.12	Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der Wirkung von GnRH-I- und -II-Analoga, Gefitinib und Perifosine auf phospho-Akt	51

4	Ergebnisse	52
4.1	Einfluss von GnRH-I- und -II-Agonisten auf die PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade	52
4.2	Bestimmung der Zelloberflächendichte des EGF-Rezeptors, des ERBB2 und des IGF-1-Rezeptors	54
4.3	Western Blot- und PCR-Analyse von GPR30, Aromatase, N-CoR, SMRT sowie SRC-1 und AIB1	56
4.3.1	GPR30	56
4.3.2	Nukleäre Co-Aktivatoren AIB1/SRC-3 und SRC-1	57
4.3.3	Nukleäre Co-Repressoren N-CoR und SMRT	59
4.3.4	Aromatase	60
4.4	Expression wichtiger Mediatoren der ERBB/MAPK ERK1/2- und der PI3K/Akt-Signaltransduktion	60
4.4.1	PTEN	60
4.4.2	CTMP	61
4.4.3	PDK1 und phospho-PDK1	62
4.4.4	MAPK ERK1/2	63
4.5	Sequenzierung wichtiger Mediatoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion und der RT-PCR-Amplifikate von <i>pten</i> und <i>gpr30</i>	63
4.5.1	Katalytische Untereinheit der PI3K	64
4.5.2	PTEN	64
4.5.3	RT-PCR Amplifikate von <i>pten</i> und <i>gpr30</i>	64
4.6	Effekte verschiedener Inhibitoren und Antagonisten auf die Proliferation und die Induktion von Apoptose in MCF, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR	65
4.6.1	4-Hydroxytamoxifen (OHT) und Fulvestrant	66
4.6.2	Hemmung des ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionswegs	70
4.6.3	Hemmung der PI3K/Akt-Signalkaskade	73
4.7	Interaktion von Perifosine und Gefitinib mit der Signaltransduktion in sekundär OHT-resistenten Mammakarzinomzellen	79
4.7.1	Wirkung von Perifosine	79
4.7.2	Wirkung von Gefitinib	80
5	Diskussion	82
5.1	Primäre Ursachen der OHT-Resistenz	82
5.2	Ursachen der Überaktivierung von Akt und weitere mögliche Resistenzmechanismen	84
5.2.1	Östrogen-induzierte Signaltransduktion, nukleäre Co-Faktoren und Fulvestrant	84
5.2.2	Einfluss von Wachstumsfaktorrezeptoren	87
5.2.3	Mediatoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion und ihre Rolle bei der sekundären Antiöstrogenresistenz	89
5.2.4	Mediatoren der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion und ihre Rolle bei der sekundären Antiöstrogenresistenz	92

5.2.5	Hemmung der PI3K/Akt und der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionskaskade.....	92
5.3	Fazit und Ausblick.....	101
6	Literaturverzeichnis.....	104
7	Anhang.....	135
7.1	Ergebnisse der Sequenzierungen	135
7.1.1	ermittelte Sequenzen der Exons von <i>pten</i>	135
7.1.2	ermittelte Sequenzen der Exons 9 und 20 von <i>pik3ca</i>	140
7.1.3	ermittelte Sequenzen der RT-PCR-Amplifikate von <i>gpr30</i> und <i>pten</i>	143
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	143
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	147
7.4	Tabellenverzeichnis	148
8	Danksagung	149
9	Lebenslauf.....	150

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist mit 27,8 % die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung bei Frauen. In Deutschland erkranken jedes Jahr über 57.000 Frauen an Brustkrebs, so dass statistisch ca. 10 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens betroffen sind. Die Sterblichkeit lag im Jahr 2004 durchschnittlich bei ca. 25,7 % über alle Altersgruppen gemittelt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Die Inzidenz der Brustkrebserkrankungen steigt seit den 80er Jahren stetig, wohingegen die Mortalität seit Mitte der 90er Jahre kontinuierlich sinkt und sich so für das Jahr 2004 eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 81 % über alle Stadien ergibt. Es ist allerdings nicht gesichert, ob das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, wirklich gestiegen ist, oder ob der Anstieg durch moderne Diagnostikverfahren und die höhere Lebenserwartung zu erklären ist. Brustkrebs ist in der westlichen, industrialisierten Welt dennoch die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter zwischen 30 und 60 Jahren und tritt dort wesentlich häufiger als in den Entwicklungsländern und in Japan auf (Batzler *et al.*, 2008; Katanoda *et al.*, 2007).

Wie epidemiologische Studien zeigen, liegen der Entstehung eines Mammakarzinoms multifaktorielle Ursachen zu Grunde. Beim hereditären Mammakarzinom spielen hierbei Mutationen in den DNA-Reparaturgenen BRCA-1 und -2 eine gewichtige Rolle, da hierdurch das Risiko einer Erkrankung verzehn- bis verzwanzigfach wird (Claus *et al.*, 1994). Neben der genetischen Prädisposition erhöhen Adipositas und Alkoholkonsum das Risiko einer Erkrankung (Schaffler *et al.*, 2007; Terry *et al.*, 2007). Weitere Risikofaktoren sind Mastopathie, eine frühe Menarche, Kinderlosigkeit oder eine späte Schwangerschaft. Außerdem ergibt sich durch die Einnahme oraler Kontrazeptiva ein geringfügig erhöhtes Brustkrebsrisiko (Apter *et al.*, 1989; Batzler *et al.*, 2008; Goodwin *et al.*, 1995; Hulka *et al.*, 2008; Newcomb *et al.*, 1994). Ob eine postmenopausale

Hormonersatztherapie ebenfalls das Risiko der Entwicklung eines Mammakarzinoms erhöht, wird kontrovers diskutiert und ist noch nicht abschließend geklärt (Emons, 2001; Han *et al.*, 2007).

Das Mammakarzinom wurde 1981 von der WHO (*World Health Organisation*) klassifiziert und nach und nach auch in pathogenetischer Hinsicht aktualisiert. Mammakarzinome sind in ihrem klinischen und morphologischen Erscheinungsbild sehr vielfältig und werden in invasive und nichtinvasive Karzinome (*Carcinoma in situ*) unterteilt. Die Benennung des Karzinoms erfolgt entweder nach dem Ursprungsort oder bei seltenen Karzinomen nach der Ausbreitungsart und ihrem Bindegewebsanteil (z. B. *Carcinoma ductale in situ* oder Phylloides tumor). Durch das so genannte Grading wird der Tumor hinsichtlich seiner histopathologischen Differenzierung beurteilt. Kriterien sind die Tubulusbildung, die Kernmorphologie und die Mitoserate. Die TNM-Klassifikation nach der FIGO (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) dient als Grundlage bei der Wahl der Therapie eines Mammakarzinoms. Die Einteilung wird an Hand der Größe des Tumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und der Fernmetastasierung (M) des Tumors vorgenommen (Susemihl, 1975).

Vor der Auswahl einer Therapieoption werden Mammakarzinome heute standardisiert hinsichtlich ihres Rezeptorstatus untersucht, wobei vornehmlich der Östrogen-, der Progesteronrezeptor und der ERBB2 (*erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog 2, avian; human epidermal growth factor receptor 2, HER-2/neu*) untersucht werden (Slamon *et al.*, 1989; Thorpe *et al.*, 1987). Die Therapien werden durch die Voruntersuchungen immer komplexer und individueller, so dass es keine Standardtherapie für Brustkrebs mehr gibt. Bei 90 % aller Brustkrebspatientinnen wird eine adjuvante Chemotherapie, oft auch vor einer Operation (neoadjuvant), durchgeführt. Eine Operation wird zumeist brusterhaltend durchgeführt, jedoch wird hiernach häufig eine zusätzliche Strahlentherapie durchgeführt, da sich oft noch kleine Tumorreste in der Brust befinden. Bei hormonabhängigen Tumoren ohne Lymphknotenbefall kann evtl. auf eine Chemotherapie verzichtet und eine Antihormontherapie angestrebt werden, die abhängig vom menopausalen Status der Frau ist. Liegt eine Überexpression des ERBB2 vor, kann eine Therapie mit dem gegen diesen Rezeptor gerichteten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) Erfolg versprechend sein (Wu *et al.*, 2005).

1.1.2 Endokrine Therapie

Bereits im Jahr 1896 wurde die Entdeckung gemacht, dass eine Ovariectomie eine Regression des fortgeschrittenen Brustkrebs bewirken kann (Beatson, 1896). Aus heutiger Sicht war diese Operation der Anfang der Antihormontherapie, die auch als endokrine Therapie bezeichnet wird, da so die Östrogenproduktion im Körper unterbrochen wurde. Mit der Adrenalectomie und der Hypophysektomie wurden ebenfalls Erfolge bei der Therapie des Mammakarzinoms erzielt (Dao *et al.*, 1955; Pearson *et al.*, 1959). Im Anschluss an diese invasiven Therapien wurde die Behandlung mit Androgenen, Glukokortikoiden und Östrogenen eingeführt (Kennedy, 1962). Als erstes Antiöstrogen wurde ab 1971 Tamoxifen eingesetzt (Ward, 1973). Eine genauere Beschreibung von Tamoxifen und seines Wirkmechanismus findet sich in Abschnitt 1.3.1. Tamoxifen wird in der postchirurgischen, adjuvanten und systemischen Therapie des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms eingesetzt, zu dem 70 % aller neu auftretenden Karzinome zählen (Furr *et al.*, 1984; Henderson *et al.*, 1988; Love, 1989). Die Antihormontherapie in der Prämenopause war lange Zeit umstritten und bis Mitte der Neunzigerjahre wurde nur etwa ein Drittel der Frauen so behandelt. Antihormonelle Behandlungen des primären Mammakarzinoms sind heute ein Standard in der Therapie, da sie vergleichsweise nur eine geringe Toxizität, tolerable Nebenwirkungen und einen geringen therapeutischen Aufwand aufweisen. So kann z. B. Tamoxifen oral appliziert werden (Catania *et al.*, 2007). Frauen, die während der Prämenopause an einem Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom erkranken, werden durch die Behandlung mit GnRH-I (Gonadotropin-Releasing Hormon-I) chemisch kastriert und so in den Zustand der Postmenopause versetzt (Emons *et al.*, 2003; Klijn *et al.*, 1982). Danach kann eine Therapie wie bei postmenopausalen Frauen erfolgen. Wie oben erwähnt, werden hierbei Antiöstrogene wie Tamoxifen eingesetzt oder es erfolgt eine Behandlung mit Aromatasehemmern (nicht-steroidal: Anastrozol, Letrozol, Aminoglutethimid; steroidal: Exemestan, Formestan, Testolacton), durch die die Bildung von Östrogenen durch Aromatase Cytochrom P450 verhindert wird (siehe Abschnitt 1.2) (Brueggemeier *et al.*, 2005; Santen *et al.*, 1978). In den letzten Jahren werden in der Therapie auch reine Antiöstrogene,

wie Fulvestrant, eingesetzt, die in der Lage sind, die Zahl der Östrogenrezeptoren im Zielgewebe zu reduzieren (siehe Abschnitt 1.3.2).

Ein großes Problem bei der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms stellt die Entwicklung einer sekundären Resistenz gegen Antiöstrogene wie Tamoxifen dar. Dies wird in Abschnitt 1.4 behandelt.

1.2 Östrogene und Östrogenrezeptor-assoziierte Signaltransduktion

Das wichtigste Östrogen im menschlichen Körper ist 17β -Östradiol (E₂), das eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Organismus, bei der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen, im Metabolismus, bei Entzündungsvorgängen, bei der Homöostase und bei kognitiven Funktionen spielt (Edwards, 2005; Song *et al.*, 2005; Yager, 2000). Östrogene sind Liganden des Östrogenrezeptors (*estrogen receptor*, ER), der in Säugetieren durch zwei Gene, alpha und beta, kodiert wird (Jensen, 1962; Mosselman *et al.*, 1996). Beide Rezeptoren werden in vielen Geweben zusammen exprimiert, wobei der ER α z. B. im Uterus oder im Drüsengewebe der Brust sehr viel stärker vorliegt. Es wird angenommen, dass der ER β hier als Dämpfer des ER α fungiert und dessen Funktion als Transkriptionsaktivator unterdrückt (Edwards, 2005; Gustafsson, 1999; Matthews *et al.*, 2006; Saji *et al.*, 2005). Ligandenbindung an ER α oder β induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Dimerisierung und schließlich zur Bindung an EREs (*estrogen response elements*) innerhalb der Promotoren von Genen im Nukleus führt (Webb *et al.*, 1995). Eine andere Möglichkeit der Transkriptionsregulation besteht in der Beeinflussung von heterologen Transkriptionsfaktoren, wie dem AP-1 (Jun/Fos)-Komplex (Webb *et al.*, 1999). Der ER α besitzt zwei autonome Transkriptionsaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2, die durch Östrogene aktiviert werden. AF-1 ist konstitutiv aktiv, AF-2 ist ligandeninduziert aktiv, das heißt eine Rekrutierung von Co-Aktivatoren der p160-Familie wie SRC-1 und AIB1/SRC-3 ist für die Aktivität zwingend erforderlich (Glass *et al.*, 2000; Gronemeyer *et al.*, 1992; Horwitz *et al.*, 1996; McKenna *et al.*, 1999; Torchia *et al.*, 1998). Co-Aktivatoren wie AIB1, SRC-1 oder CBP/p300 sind Histon-Acetyltransferasen (HATs) die verschiedene Domänen besitzen, welche mit dem ER α interagieren (Anzick *et al.*, 1997; McKenna *et al.*, 1999; McKenna *et al.*, 2000; Ogryzko *et al.*, 1996; Spencer *et al.*,

1997). Durch Interaktion der beiden autonomen Transkriptionsaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 rekrutiert der aktivierte ER Komponenten des RNA-Polymerase II-Transkriptionsinitiationskomplexes an die DNA (Klinge, 2000; MacGregor *et al.*, 1998; McKenna *et al.*, 2002). Neben diesem so genannten genomischen Weg der Östrogenwirkung, gibt es auch nicht-genomische Wege, die für eine schnelle Aktivierung (Minuten oder Sekunden) von Signalmolekülen und Signaltransduktionswegen ohne Proteinbiosynthese sorgen (Levin, 2002; Losel *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 1999). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass ER α und ER β zur Plasmamembran rekrutiert werden und nach Assoziation mit der Src-Kinase MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) aktivieren können, die Proliferation und Differenzierung induzieren (Edwards *et al.*, 2003; Kampa *et al.*, 2006; Migliaccio *et al.*, 2000). Ebenfalls durch an die Plasmamembran rekrutierten ER α werden in Brustkrebszellen die CDK (*cyclin-dependent kinases*)-Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} gehemmt. Dies löst eine Progression des Zellzyklus und eine verstärkte Proliferation der Zellen aus (Cariou *et al.*, 2000). Allerdings fehlt bisher die endgültige Bestätigung der Existenz solcher Plasmamembran-assoziiierter Östrogenrezeptoren und ihres Signaltransduktionsmechanismus (Zhao *et al.*, 2008). Andere nicht-genomische Effekte konnten einem membrangebundenen, alternativen Östrogenrezeptor, GPR30, zugeordnet werden (Revankar *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass dieser den Phosphorylierungsstatus der MAPK ERK1/2 (*extracellular regulated kinase 1/2*), die cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)-Abgabe und die Synthese von PI3K reguliert (Filardo *et al.*, 2000; Filardo *et al.*, 2002; Revankar *et al.*, 2005; Sukocheva *et al.*, 2006). Es kommt zur Transaktivierung des EGF-R (*epidermal growth factor receptor*), des IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) und des ERBB2 und damit zur Aktivierung ihrer nachgeschalteten Mediatoren ERK1/2 und PI3K/Akt (Filardo, 2002).

Die Synthese von Östrogenen findet bei prämenopausalen Frauen hauptsächlich in den Granulosazellen der Ovarien statt, in denen durch das Enzym Aromatase Cytochrom P450 (P450arom) eine Umwandlung von Androstendion über Testosteron zu dem wichtigsten Östrogen 17 β -Östradiol (E2) katalysiert wird (Akhtar *et al.*, 1982; Nelson *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1966; Thompson *et al.*, 1974). Andere Organe und Gewebe, in denen 17 β -Östradiol synthetisiert wird, sind die Plazenta, Chondrozyten und Osteoblasten der Knochen, die glat-

te vaskuläre Muskulatur, das Fettgewebe, die Haut und bestimmte Bereiche im Gehirn. Beim Mann findet eine Östrogensynthese auch in den Hoden statt (Harada *et al.*, 1999; Lephart *et al.*, 1992; Longcope *et al.*, 1978; Mendelsohn *et al.*, 1999; Nakazumi *et al.*, 1996; Sasano *et al.*, 1997; Schweikert, Milewich *et al.*, 1976; Simpson *et al.*, 2002; Stumpf, 1969; Sudhir *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1994; Townsley *et al.*, 1973). Die östrogene Signaltransduktion ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Mit der Menopause endet die ovarielle Östrogenproduktion und die Synthese findet nur noch in den anderen oben genannten Geweben durch Umwandlung von Androgenen ovariellen oder adrenalen Ursprungs statt (Miller, 1991). Damit ist Östrogen bei Frauen wie bei Männern kein endokriner Faktor mehr, sondern wirkt eher parakrin oder intrakrin (Labrie *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 2000). In Brustkrebs und beim Endometriumkarzinom wird Aromatase unter Umständen überexprimiert und es tritt eine verstärkte autokrine und parakrine Stimulation auf (Bulun *et al.*, 2005; Miller, 1991; Perel *et al.*, 1980; Reed *et al.*, 1989; Tseng *et al.*, 1982; Yamaki *et al.*, 1985). Die subzelluläre Lokalisation von Aromatase wird kontrovers diskutiert. Manche Autoren gehen davon aus, dass das Enzym in der Membran des endoplasmatischen Retikulums residiert, andere davon, dass es mit mitochondrialen Kompartimenten assoziiert ist und wieder andere wiesen eine Assoziation mit der Plasmamembran nach (Amarneh *et al.*, 1996; Corbin *et al.*, 2001; Fournet-Dulguerov *et al.*, 1987). Diskutiert wird auch, ob Aromatase funktionelle Komplexe bildet, die so an verschiedenen Orten innerhalb der Zelle wirken können (Simpson *et al.*, 1994).

1.3 Antiöstrogene

1.3.1 Der selektive Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen

Bei 70 % aller Mammakarzinome wird in Epithelzellen die Expression des ER α nachgewiesen. Diese ist dabei oft signifikant erhöht und geht mit einer deregulierten Östrogenwirkung einher. Es kommt zu einem Wechsel von parakriner zu autokriner Stimulation und zur verstärkten Proliferation ohne Apoptose und Differenzierung des Gewebes (Bruchovsky *et al.*, 1976; Kobayashi, 1971; Lemon, 1970). Der selektive Östrogenrezeptormodulator (*selective estrogen receptor*

modulator, SERM) Tamoxifen (TAM) wird in der Therapie Östrogenrezeptor-positiver Mammakarzinome seit 1971 eingesetzt und weist keine schwerwiegende Toxizität auf. Die Ansprechraten liegen mit 70 % vergleichsweise hoch. (Furr *et al.*, 1984; Love, 1989; Ward, 1973). TAM bindet unselektiv an ER α und ER β und verhindert kompetitiv die Bindung von Östrogenen, es kommt aber weiterhin zur Dimerisierung der Rezeptoren (Ball *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2002; Shang *et al.*, 2002). Allerdings blockiert die durch Tamoxifen vermittelte Konformationsänderung des ER in Brustgewebe die Bindung von Co-Aktivatoren an die AF-2-Domäne und es werden vornehmlich nukleäre Co-Repressoren rekrutiert (Xu *et al.*, 1999). Zwei Hauptvertreter sind N-CoR (*nuclear co-repressor 1*) und SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor/N-CoR 2*) (Chen *et al.*, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1999; Sande *et al.*, 1996). Die Rekrutierung dieser Co-Repressoren führt zur Bildung eines Co-Repressor-Komplexes, der Histon-Deacetylasen beinhaltet. An Promotoren mit ERE von Zielgenen des Östrogenrezeptors vermittelt dieser eine Deacetylierung von Histonen, so dass eine Transkription verhindert wird (Guenther *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002; Shang *et al.*, 2000; Shang *et al.*, 2002). Vermutlich ist HDAC3 die hauptverantwortliche Histon-Deacetylase (Guenther *et al.*, 2001). Deacetylierte Histone sind wahrscheinlich bevorzugte Bindungsstellen für weitere Co-Repressor-Komplexe, so dass es sich bei der Transkriptionsrepression um einen sich selbst vorantreibenden bzw. verstärkenden Mechanismus handelt (*feed-forward mechanism*) (Yu *et al.*, 2003). Die Blockade der AF-2-Domäne, die Rekrutierung von Co-Repressoren und die daraus resultierende, weitgehende Verhinderung der ER-vermittelten Transkription leistet einen entscheidenden Beitrag zur vollen antagonistischen Wirkung von TAM (Jackson *et al.*, 1997). Antiöstrogene wie TAM induzieren einen Stopp des Zellzyklus, inhibieren die Proliferation und induzieren Apoptose durch Einfluss auf verschiedene Signalmoleküle und Mediatoren der Homöostase von Zellen. Die Expression von Zellzyklusregulatoren wie c-Myc und Cyclin D1 wird reduziert, hypophosphoryliertes Rb (Retinoblastom)-Protein wird akkumuliert, die Zellzyklusinhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} werden induziert, der mutmaßliche Tumorsuppressor IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*) wird induziert und Überlebenssignalwege werden durch Herunterregulation der Bcl-2-Expression und Induktion der Bax-Expression inhibiert (Bouker *et al.*, 2004; Carroll *et al.*,

2000; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003; Thiantanawat *et al.*, 2003) Die ER α -vermittelten, antiöstrogenen Effekte von TAM in Brustkrebszellen führen entweder zur Proliferationsinhibition oder zur Apoptose (Budtz, 1999). Die Induktion geschieht intrinsisch durch Aktivierung der Effektor-Caspase-3 und des JNK1-(C-jun N-terminale Kinase-1) Signalwegs, was unter anderem schließlich zur Degradierung der genomischen DNA der Zelle führt (Mandlekar *et al.*, 2000). *In vitro* Studien zeigten, dass Proliferationsinhibition und Induktion von Apoptose konzentrationsabhängig auftreten (Gelman, 1996; Perry *et al.*, 1995). Bei nanomolaren Konzentrationen findet ausschließlich eine Proliferationsinhibition statt, während bei mikromolaren Konzentrationen Apoptose ausgelöst wird. Die Daten zur Induktion von Apoptose lassen sich auf *in vivo* Verhältnisse übertragen, da bei der Therapie Plasmakonzentrationen von 1×10^{-6} M und *intra*-Tumor Konzentrationen von über 4×10^{-6} M TAM erreicht werden (MacCallum *et al.*, 2000).

Tamoxifen wird *in vivo* weitestgehend in seine aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (OHT) und N-Desmethyltamoxifen (DMT) umgewandelt. OHT bindet mit ähnlicher Affinität an den ER wie 17 β -Östradiol (E2) und mit einer 25-30 Mal größeren Affinität im Vergleich zu TAM. DMT bindet nur mit 1 % der Affinität von Tamoxifen an den ER. Aufgrund der hohen Affinität von OHT und seiner potenten Effekte auf ER-positive Mammakarzinomzellen, ist davon auszugehen, dass dieser Metabolit einer der Hauptvermittler der antiöstrogenen Wirkung von TAM ist (Borgna *et al.*, 1981; Fabian *et al.*, 1981; Murphy *et al.*, 1991).

Neben seinen antagonistischen Eigenschaften im Brustgewebe zeigt TAM z. B. im Knochengewebe, dem kardiovaskulären System oder im endometrialen Gewebe agonistische, das heißt östrogenartige, Eigenschaften. Daher erhöht eine Behandlung mit Tamoxifen gleichzeitig das Risiko für Endometriumkarzinome (Fisher *et al.*, 1994; Shang, 2006). Die unterschiedlichen Effekte von Tamoxifen sind wahrscheinlich zumindest teilweise mit der unterschiedlichen Expression von ER α und von ER β und deren unterschiedlicher Liganden-Rezeptor-Interaktion in verschiedenen Geweben verbunden. Außerdem spielen verschiedene Co-Faktoren- und Transkriptionsfaktoren eine Rolle (Dutertre *et al.*, 2000; Katzenellenbogen *et al.*, 2000a; Katzenellenbogen *et al.*, 2000b; MacGregor *et al.*, 1998; Shang *et al.*, 2000; Shao *et al.*, 2004). Zum Beispiel wird die östro-

genartige Wirkung von TAM im Uterus durch einen hohen Spiegel des nukleären Co-Aktivators SRC-1 verursacht (Shang *et al.*, 2002). Aufgrund dieser gewebsspezifischen, selektiven Eigenschaften werden TAM und vergleichbare Antiöstrogene als SERMs bezeichnet (Riggs *et al.*, 2003).

Eine Restaktivität von ERs an EREs bleibt trotz TAM-Bindung allerdings erhalten, da die AF-1-Domäne des Rezeptors weiterhin aktiv bleibt (Berry *et al.*, 1990; Gronemeyer *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1989; McDonnell *et al.*, 1995). Abb. 1 zeigt schematisch die Tamoxifenwirkung am Östrogenrezeptor.

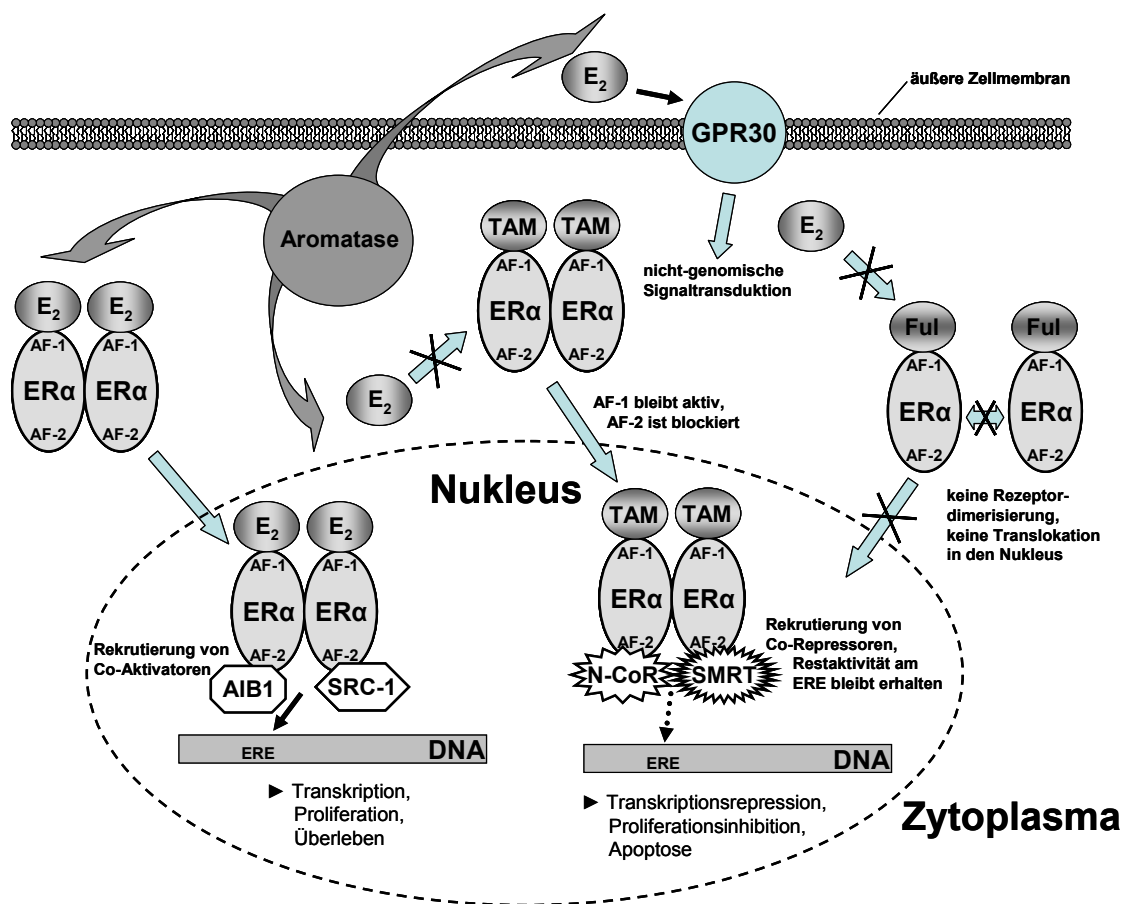


Abb. 1: Signaltransduktion von Östrogenen und Wirkung von Antiöstrogenen in Mammakarzinomzellen. Nähere Erläuterungen zu den dargestellten Mechanismen sind dem Text zu entnehmen. E_2 = Östradiol, ERE = *estrogen response element*; ER α = Östrogenrezeptor alpha; TAM = Tamoxifen; Ful = Fulvestrant; AF-1, AF-2 = Transkriptionsaktivierungsdomänen.

1.3.2 Der selektive Östrogenrezeptordestabilisator (SERD) Fulvestrant

Das reine Antiöstrogen Fulvestrant (Faslodex®) bindet ERs kompetitiv, verhindert aber im Gegensatz zu TAM deren Dimerisierung und den Transport in den Nukleus und leitet zudem deren schnellen Abbau ein. *In vitro* Untersuchungen und klinische Studien zeigten demnach auch, dass es unter dem Einfluss von Fulvestrant zu einer Abnahme von ERs kommt (Martin *et al.*, 2005; McClelland *et al.*, 1996; Parker, 1993; Robertson *et al.*, 2001; Wakeling *et al.*, 1991; Wakeling *et al.*, 1992). Aus diesem Grund bezeichnet man Fulvestrant auch als selektiven Östrogenrezeptordestabilisator (*selective estrogen receptor down regulator*, SERD). Außerdem wurde gezeigt, dass TAM-resistenter Brustkrebs in den meisten Fällen sensitiv gegenüber Fulvestrant bleibt (Hu *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 2005; Lykkesfeldt *et al.*, 1994; Osborne *et al.*, 2004). Die Wirkung von Fulvestrant am Östrogenrezeptor ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

1.4 Sekundäre Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms

In der Therapie des Mammakarzinoms mit Expression von ERs spielt die primäre und die sekundäre Resistenz gegenüber Antiöstrogenen, insbesondere gegenüber dem selektiven ER-Modulator TAM, eine große Rolle (Clarke *et al.*, 2001). Für die primäre Antiöstrogenresistenz (*de novo* Resistenz), die bei 30 % aller Mammakarzinome auftritt und die sekundäre Antiöstrogenresistenz, die die Mehrheit der behandelten Karzinome unter Tamoxifen-Therapie entwickeln, werden u. a. verschiedene Ursachen in der Funktionalität des ERs und Interaktionen mit der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren verantwortlich gemacht (Riggins *et al.*, 2007).

Bei der Entwicklung einer Resistenz gegenüber TAM in Brustkrebszellen scheinen unter anderem nukleäre Co-Faktoren, Aktivatoren und Repressoren, eine Rolle zu spielen. So haben Patienten, die in ihren Mammakarzinomen einen hohen Spiegel des Co-Aktivators AIB1 aufweisen, eine schlechte Prognose unter TAM-Behandlung (Osborne *et al.*, 2003). Ähnliche Schlussfolgerungen zog man aus Analysen des Co-Repressors N-CoR. Hier steht ein niedriger Spiegel

im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose (Girault *et al.*, 2003). Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Co-Aktivatoren SRC-1 ebenfalls für eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit TAM mitverantwortlich sein könnte. So fanden sich in 92 % von Rezidiven nach TAM-Behandlung erhöhte SRC-1 Spiegel (Fleming *et al.*, 2004). Mitogene wie Proteinkinase A, Dopamin oder EGF reduzieren die durch Antiöstrogene verursachte Interaktion von Co-Repressoren mit dem ER, wodurch die Effektivität von TAM bei der Behandlung von ER-positivem Brustkrebs vermindert wird (Fujimoto *et al.*, 1994; Lavinsky *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1993). Eine Überexpression des ERBB2 (HER-2/neu) kann weiterhin die Interaktion des Östrogenrezeptors mit N-CoR unterbrechen (Kurokawa *et al.*, 2000).

Interessant ist auch der Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Wirkung von TAM. Unter dem Einfluss von 1,2 μ Tesla zeigt sich TAM weniger effektiv bezüglich der Proliferationsinhibition von Brustkrebszellen. Aus der Analyse der Zellen ergab sich eine erhöhte Expression der Co-Aktivatoren AIB1 und SRC-1 und eine verminderte Expression der Co-Repressoren N-CoR und SMRT (Girgert *et al.*, 2005; Girgert *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verhältnis zwischen Co-Repressoren und Co-Aktivatoren in ER-positiven Zellen mitentscheidend für die Wirkung von und das Ansprechen auf TAM ist (Girault *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2003). Daher kann eine Veränderung der Co-Faktoren-Zusammensetzung zumindest zu der Entwicklung einer Resistenz gegenüber TAM beitragen. Frogne *et al.* vertreten die Auffassung, dass die Resistenz gegen TAM von Zellen ausgeht, die beim Therapiestart durch Varianten im Genom einen Selektionsvorteil besitzen (Frogne *et al.*, 2005; Lykkesfeldt *et al.*, 1995) Unterstützt wird diese These dadurch, dass auch nach längerer Kultivierung ohne Selektionsdruck die Resistenz vorhanden bleibt (Frogne *et al.*, 2005; Lykkesfeldt *et al.*, 1994; Lykkesfeldt *et al.*, 1995). Bei der primären und sekundären Antiöstrogenresistenz sind oftmals der EGF-Rezeptor, der ERBB2 und der IGF-1-Rezeptor mit ihren nachgeschalteten Mediatoren MAPK ERK1/2, p38 MAPK, Akt/Proteinkinase B (PKB) und Pak1 (*p21-activated kinase-1*) verstärkt aktiviert (Arpino *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2005; Holm *et al.*, 2006; Kirkegaard *et al.*, 2005). Diese Signalwege und ihr Beitrag zur Antiöstrogenresistenz werden in den Abschnitten 1.5 und 1.6 ausführlich behandelt.

Weiterhin spielen das zytoplasmatische Adapterprotein BCAR1 (*breast cancer antiestrogen resistance 1*, p130^{Cas}, Cas), BCAR3, c-Src oder eine Deregulation von Molekülen, die die Kontrolle des Zellzyklus oder der Apoptose involviert sind wie c-Myc, p53, Bad oder Bcl-2 eine Rolle (Cannings *et al.*, 2007; Linke *et al.*, 2006; Rahko *et al.*, 2006; Riggins *et al.*, 2006; van Agthoven *et al.*, 1998; van der Flier *et al.*, 2000; Vazquez *et al.*, 2006). Eine Herunterregulation des ER α , z. B. durch Hypermethylierung der Promoterregion, kann zu einer Antiöstrogenresistenz beitragen. Klinische Studien haben allerdings gezeigt, dass Änderungen in der Expression der Östrogenrezeptoren kein genereller Mechanismus sind, der eine Resistenz gegenüber Antiöstrogenen verursacht (Green *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 1995; Ottaviano *et al.*, 1994). Resistenz gegen eine Behandlung mit Tamoxifen kann auch durch Inaktivierung, verminderte Aufnahme oder durch vermehrten Export aus der Zelle vermittelt werden (Frogne *et al.*, 2005; Vogelstein *et al.*, 2004).

Weiterhin sind Mutationen und verschiedene Phosphorylierungen des ER α sowie Veränderungen von Zellzyklusregulatoren in die Mechanismen der Antiöstrogenresistenz involviert. Analysen auf Genom- und Transkriptomebene geben weitere Hinweise auf Mechanismen, die zu einer Resistenz beitragen (Caldon *et al.*, 2006; Herynk *et al.*, 2004). Die Quintessenz aller bisherigen Untersuchungen ist die, dass die zu Grunde liegenden Resistenzmechanismen wohl von Patient zu Patient variieren und auch kombiniert auftreten. Eine gute Übersicht geben Riggins *et al.* in ihrem Artikel von 2007 (Riggins *et al.*, 2007).

1.5 Rolle der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalkaskade bei der sekundären Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms

1.5.1 Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signaltransduktion

Phosphatidylinositol 3-Kinase

Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Signalweg spielt bei vielen zellulären Prozessen eine zentrale, wichtige Rolle. Er ist unter anderem an der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Proliferation und Apoptose von Zellen, der Steuerung von Zellbewegungen und der Telomermodifikation beteiligt (Bellacosa *et al.*, 2005; Sehgal, 2003; Vivanco *et al.*, 2002).

Klasse I PI3Ks sind heterodimere Enzyme, die aus einer von drei Isoformen einer katalytischen Untereinheit, z. B. 110 α , und einer regulatorischen Untereinheit, z. B. p85, bestehen (Hawkins *et al.*, 2006). Klasse I PI3Ks phosphorylieren Phosphoinositide der Plasmamembran an der D3-Position innerhalb des Inositolrings und katalysieren so die Bildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphaten (PIP₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphaten (PIP₃) (Cantley, 2002; Stephens *et al.*, 1993). Eine Aktivierung der PI3K findet u. a. über verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren, z. B. den IGF-1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) oder durch die aktivierte GTPase Ras statt und resultiert generell in einer selektiven Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase Akt/Proteinkinase B (PKB) (Cantley, 2002; Ignatoski *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997; Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994).

Akt

Akt ist das zelluläre Homolog des retroviralen Onkogens v-akt und ein elementarer Bestandteil des PI3K-Signalwegs. (Bellacosa *et al.*, 1991; Jones *et al.*, 1991). Zytoplasmatisch vorliegendes Akt wird über seine *pleckstrin homology* (PH)-Domäne an, durch aktivierte PI3-Kinase generiertes, PIP₃ in der Plasmamembran rekrutiert. Die Bindung an Phosphoinositole induziert eine Konformationsänderung von Akt, wodurch ein Serin-Rest in der regulatorischen Domäne (Ser⁴⁷³) und ein Threonin-Rest in der katalytischen Domäne (Thr³⁰⁸) für Serin/Threonin-Kinasen zugänglich werden. PDK-1 (*3-phosphoinositid dependent kinase*) katalysiert die Phosphorylierung an Thr³⁰⁸, die Phosphorylierung von Ser⁴⁷³ wird durch einen Komplex aus mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), G β L und SIN1 katalysiert. Dieser Komplex wird als mTORC2 (*mTOR complex 2*) bezeichnet. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ die Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ reguliert und dass damit beide Phosphorylierungen notwendig für eine vollständige Aktivierung von Akt sind (Alessi *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 1999; Jacinto *et al.*, 2006; Sarbasov *et al.*, 2005a; Scheid *et al.*, 2002). Nach erfolgter Aktivierung dissoziiert Akt von der Plasmamembran zu verschiedenen zellulären Kompartimenten, wo es diverse Substrate phosphorylieren kann. Akt spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Nährstoffhaushalts, der Zellproliferation und der Transkriptionsregulation. Außerdem reguliert es verschiedene mitochondrial-vermittelte Apoptose-Signalwege und wird allgemein als starker antiapoptotischer Mediator

betrachtet (Song *et al.*, 2005). Akt entfaltet seine antiapoptotische Wirkung unter anderem durch Inhibition proapoptotischer Moleküle wie Bax, Bid, YAP und mdm2/p53 (Jin *et al.*, 2007; Parcellier *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel für ein solches proapoptotisches Molekül ist Bad. Dieses kann durch Akt phosphoryliert werden, so dass es einen Komplex mit 14-3-3 ζ bildet, was die Heterodimerisierung mit und damit die Inaktivierung von antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wie Bcl-X_L und Bcl-2, verhindert (Adams *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997). Ein weiteres Substrat für Akt ist Caspase-9, die durch Serin-Phosphorylierung inaktiviert wird. Auf diese Weise wird der durch Caspase-9 regulierte Apoptose-induzierende Signalweg ebenfalls inhibiert (Cardone *et al.*, 1998).

Akt beeinflusst jedoch nicht nur die vorhandene „Apoptose-Maschinerie“ der Zelle, sondern auch die *de novo* Genexpression. So induziert z. B. die Phosphorylierung von *forkhead*-Transkriptionsfaktoren deren Bindung an 14-3-3-Proteine, was eine Translokation vom Zytoplasma in den Nukleus verhindert. Dadurch wird die Transkription von Genen wie dem für den Apoptose-induzierenden Fas-Liganden unterbunden (Brunet *et al.*, 1999). CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist ein weiteres Beispiel für einen durch Akt phosphorylierten Transkriptionsfaktor. Dieser wird durch Phosphorylierung aktiviert und führt nach Translokation in den Nukleus zur erhöhten Transkription von so genannten *survival*-Genen (Du *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). Neben diesen Apoptose-inhibierenden Funktionen werden Akt, wie oben erwähnt, noch weitere Funktionen zugeordnet. Dies sind beispielsweise die Regulation der Glykogensynthese durch Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3 α/β) oder die Stimulation der Zellproliferation durch Inhibition von p21^{WAF1/CIP1} und p27^{Kip1} (Cross *et al.*, 1995; Takeda *et al.*, 2004).

mTOR

Akt liegt in der Signalkaskade oberhalb von mTOR. Durch Phosphorylierung von TSC (*tuberous sclerosis complex*) wird die Inhibition von Rheb aufgehoben, so dass dieses mit FKBP38 interagieren kann und eine Aktivierung von mTOR ermöglicht. Dieses bildet im aktivierten Zustand einen Komplex mit Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) und G β L (mTORC1, mTOR *complex 1*) (Bai *et al.*, 2007; Bjornsti *et al.*, 2004; Manning *et al.*, 2003). Die Funktion von mTOR kann man als eine Art biologischer Schalter sehen, der im Zusammen-

spiel mit anderen Molekülen wie ein Sensor auf Veränderungen der Zellumwelt reagiert. Hierbei handelt es sich um Reaktionen auf wachstumsregulierende Signale von anderen Zellen, oxidativen und anderen zellulären Stress oder Veränderungen der Nährstoffzusammensetzung. Mögliche Reaktionen sind die Modifizierung des Wachstums, der Zellbeweglichkeit und der Zellteilung. Außerdem wird beispielsweise über eine Beeinflussung der mRNA-Translation Apoptose induziert oder inhibiert (Beuvink *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2002). Direkte Ziele von mTOR sind die S6 Kinase-1 (S6K1) und 4E-BP1, die beide in die ribosomale Translation von mRNA involviert sind (Gingras *et al.*, 2001; Hara *et al.*, 1998; Proud, 2002).

PTEN

Ein endogener Inhibitor der PI3K-Signaltransduktion ist die Tyrosinphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*). Diese wird durch Dephosphorylierung aktiviert und dephosphoryliert unter anderem PIP₃ zu PIP₂, so dass die Phosphorylierung von Akt an der Membran verhindert wird. PTEN wirkt somit als Antagonist der PI3K und erfüllt die Funktion eines Tumorsuppressors (Li *et al.*, 1997; Maehama *et al.*, 1998).

CTMP

Ein weiterer Inhibitor der PI3K/Akt-Signaltransduktion ist CTMP (*carboxy terminal modulator protein*), das im Gegensatz zu PTEN allerdings erst nach erfolgter Phosphorylierung von Akt in die Signalkaskade eingreift. Durch Bindung von CTMP an die regulatorische, carboxyterminale Domäne von Akt an der Plasmamembran kommt es zur Dephosphorylierung von Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ und eine erneute Phosphorylierung wird blockiert (Maira *et al.*, 2001).

Die PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade ist in Abb. 2 dargestellt.

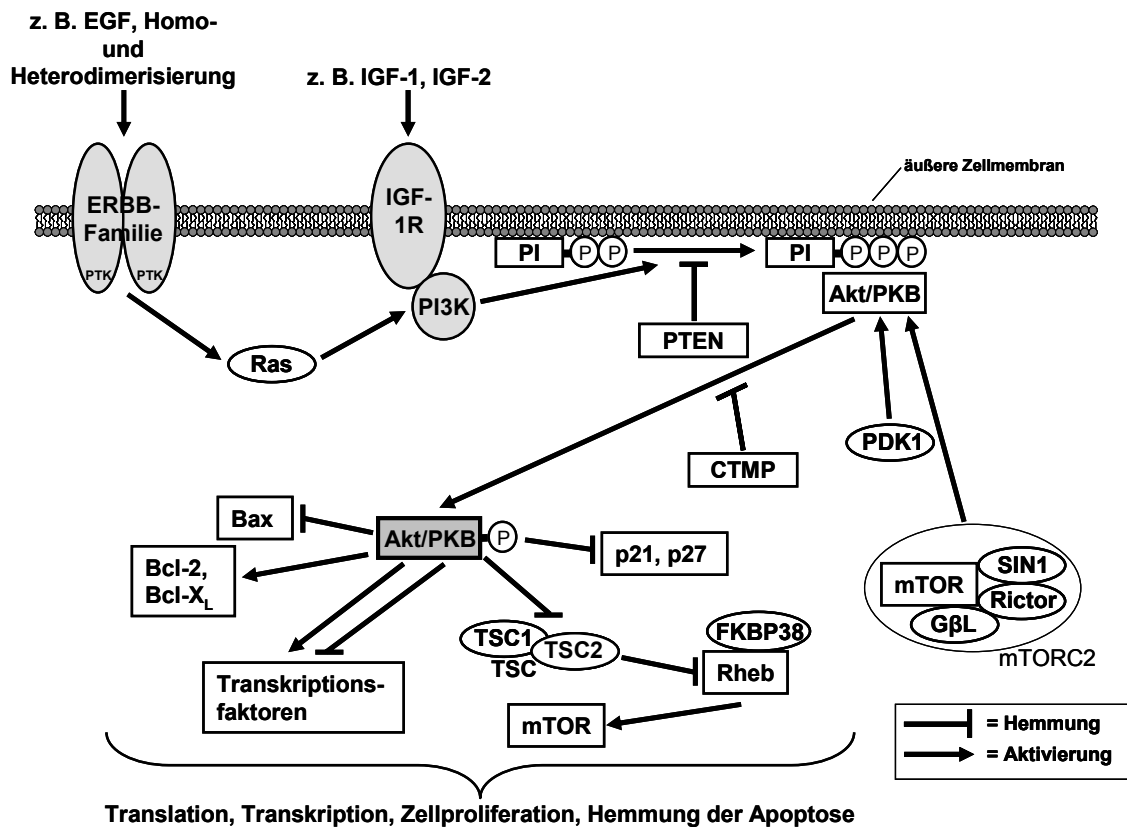


Abb. 2: PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade. Nähere Erläuterungen finden sich im Text.

1.5.2 Aberrationen innerhalb der PI3K/Akt-Signaltransduktion

PI3K

Die durch Mutationen ausgelöste übermäßige Aktivierung der PI3K spielt bei der Progression verschiedener maligner Tumore eine entscheidende Rolle (Samuels *et al.*, 2004). Eine daraus resultierende, verstärkte Aktivierung von Akt wird in 30 – 38 % aller Mammakarzinome festgestellt (Stal *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2001). Mutationen innerhalb des Gens *pik3ca* der katalytischen Untereinheit der PI3K, p110 α , wurden unter anderem in Tumoren der Ovarien und der Brust nachgewiesen (Bachman *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2004; Levine *et al.*, 2005; Saal *et al.*, 2005; Samuels *et al.*, 2004). Außerdem ist bekannt, dass Änderungen in der Aktivität des PI3K-Signalwegs zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapien beitragen (Knuefermann *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2003). 82-90 % der vorkommenden Mutationen liegen hierbei innerhalb von Exon 9 (helikale Domäne) und Exon 20 (Kinase-Domäne)

des Gens *pik3ca* (Samuels *et al.*, 2004). Bei Melanomen ließen sich aktivierende Mutationen in *pik3ca* nicht jedoch in *pik3cb* und *pik3cd* nachweisen, die für die anderen beiden katalytischen Untereinheiten p110 β und p110 γ kodieren. Mutationen von *pik3ca* sind in Mammakarzinomen mit einer ERBB2-Überexpression assoziiert und Oda *et al.* zeigten eine Zunahme der Aktivität von Akt und von Ras bei Mutation der *pik3ca* in Mammakarzinomzellen (Oda *et al.*, 2008; Saal *et al.*, 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kang *et al.*, die wiederum zeigen konnten, dass die durch die Mutation der *pik3ca* induzierte Transformation der Zelle durch Inhibition des mTOR mit Rapamycin beeinflusst wurde (Kang *et al.*, 2005). In der kodierenden Sequenz der regulatorischen Untereinheit der PI3K, p85, wurden Mutationen bei Tumoren der Ovarien und des Kolons detektiert (Philp *et al.*, 2001).

PTEN

Eine verringerte Expression von PTEN oder ein Verlust der PTEN-Funktion durch Mutationen zieht eine Überaktivierung der PI3K-Signaltransduktion nach sich und führt zu einer verstärkten Aktivierung von Akt. Dies bedeutet in vielen Karzinomen eine erhöhte Zellproliferation und die Unterdrückung von apoptotischen Vorgängen (Whang *et al.*, 1998). Ein Ausfall von PTEN, gefolgt von verstärkter Akt-Phosphorylierung korreliert zum Beispiel mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Endometriumkarzinomen (Terakawa *et al.*, 2003). Kong *et al.* zeigten, dass in 21 von 38 (55%) Endometriumkarzinomen deaktivierende Mutationen vorlagen (Kong *et al.*, 1997). Weiterhin treten deaktivierende *pten*-Mutationen unter anderem in 30 – 40 % aller Glioblastome und auch gelegentlich beim Mammakarzinom auf (Nicholson *et al.*, 2003; Sansal *et al.*, 2004). Bei 30 – 40 % aller sporadisch auftretenden, nicht hereditären Mammakarzinome liegt eine heterozygote *pten*-Deletion vor, die zu einer Verstärkung der Akt-Aktivität führt (Mills *et al.*, 2001; Perren *et al.*, 1999; Rhei *et al.*, 1997; Stal *et al.*, 2003; Yakes *et al.*, 2002)

1.5.3 PI3K/Akt-Signaltransduktion und sekundäre Antiöstrogenresistenz

In den letzten Jahren zeigte sich immer deutlicher, dass bei der Antiöstrogenresistenz von Mammakarzinomzellen der PI3K-Signaltransduktionsweg mit der assoziierten Kinase Akt eine bedeutende Rolle spielt (Nicholson *et al.*, 2002a).

Akt-Aktivierung geht mit einer schlechten Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom einher und hat ebenfalls einen negativen prädiktiven Wert für das Ansprechen einer Therapie mit Antiöstrogenen in ER-positiven Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* (Jordan, 2004; Kirkegaard *et al.*, 2005; Panigrahi *et al.*, 2004; Perez-Tenorio *et al.*, 2002). MCF-7 Zellen mit experimentell gesteigerter Akt-Aktivität entwickeln eine sekundäre Resistenz gegenüber den antiproliferativen Eigenschaften von TAM (deGraffenried *et al.*, 2004; Faridi *et al.*, 2003). Bei Inhibition von mTOR mit Rapamycin oder dem Rapamycin-Analogen CCI-779 (Temsilimus) wurde die antiproliferative und proapoptotische Aktivität von TAM in Mammakarzinomzellen mit gesteigerter Akt-Aktivität und Antiöstrogenresistenz wieder hergestellt (deGraffenried *et al.*, 2004).

1.5.4 Inhibitoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion

Rapamycin und Everolimus

Rapamycin wurde erstmals 1975 aus Bodenproben der Insel Rapa Nui isoliert und wird durch das Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiert. In den nachfolgenden Analysen zeigte sich, dass Rapamycin mit FKBP-12 (FK506 binding protein-12) komplexiert und dass dieser Komplex dann die Aktivierung von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) durch direkte Bindung an mTORC1 inhibiert, so dass eine Phosphorylierung von P70S6K und 4EBP1 verhindert wird (Lorenz *et al.*, 1995; Sabers *et al.*, 1995; Sehgal *et al.*, 1975; Vignot *et al.*, 2005). Rapamycin fand zunächst als Immunsuppressivum Verwendung in der Transplantationsmedizin (Kahan, 1993). Nach und nach wurde es dann bei verschiedenen Krebserkrankungen getestet und hielt zumindest Einzug in die experimentelle Therapie von malignen Tumoren (Douros *et al.*, 1981; Eng *et al.*, 1984). Der Komplex mTORC1, der sich nach Aktivierung über Akt bildet, ist rapamycinsensitiv, der Komplex mTORC2, der die Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ katalysiert, ist nicht durch Rapamycin zu inhibieren (Sarbasov *et al.*, 2004; Sarbasov *et al.*, 2005a). Everolimus (RAD001) ist ein Derivat von Rapamycin, das oral appliziert werden kann. Die *in vitro*-Wirkung als Immunsuppressivum ist drei Mal niedriger im Vergleich zu Rapamycin, allerdings ist seine Wirkung *in vivo* auf Grund der besseren pharmakokinetischen Eigenschaften vergleichbar mit der von Rapamycin (Schuler *et al.*, 1997; Schuurman *et al.*, 1997).

Perifosine

Perifosine ist ein synthetisches, oral zu verabreichendes Alkylphospholipid mit einer Piperidin-Kopfgruppe, dessen Struktur auf Lysophosphatidylcholin basiert, einem im menschlichen Körper vorkommendem Phospholipid. Perifosine hat eine Halbwertszeit von 137 Stunden und ist *in vivo* stabil (LoPiccolo *et al.*, 2007; Vink *et al.*, 2005). Perifosine ist ein Akt-Inhibitor, der die PH-Domäne von Akt selektiv und reversibel zu inhibieren scheint und somit die für die Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ notwendige Rekrutierung an die Plasmamembran verhindert (Chiarini *et al.*, 2008; Kondapaka *et al.*, 2003).

1.6 Rolle der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion bei der Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms

1.6.1 ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion

Die EGF-R (HER; ERBB)-Signaltransduktion mit dem MAPK ERK1/2-Modul ist auch als die klassische Mitogen-aktivierte Signalkaskade bekannt und besitzt als zentrale MAPK ERK1 und ERK2, die ca. 83 % Homologie bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung aufweisen (Chen *et al.*, 2001).

Der EGF-R ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor mit einer relativen Molekülmasse von 170 kDa. und gehört zur ERBB-Familie. Bindung von Liganden der EGF-Familie, wie EGF, TGF α (*transforming growth factor- α*), Heregulin (Neuregulin) oder Betacellulin führt zur Rezeptordimerisierung, Autophosphorylierung, Aktivierung nachgeschalteter Mediatoren der Signalkaskade und schließlich zur lysosomalen Degradierung (Ferrand *et al.*, 1985; Gospodarowicz *et al.*, 1978; Gusterson *et al.*, 1984; Hackel *et al.*, 1999; Heimberg *et al.*, 1965; Holmes *et al.*, 1992; Sasada *et al.*, 1993; Veale *et al.*, 1987; Zwick *et al.*, 1999). Durch Phosphorylierung an Tyr¹¹⁴⁸ und Tyr¹¹⁷³ kommt es zur Rekrutierung des SHC (*Src homology 2 domain containing*)-Gerüstproteins, über das in mehreren Schritten der MAPK ERK1/2-Signaltransduktionsweg aktiviert wird (Zwick *et al.*, 1999). Andere Mitglieder der ERBB-Familie sind ERBB2 (HER-2/neu), ERBB3 (HER-3) und ERBB4 (Kraus *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1990; Plowman *et al.*, 1993; Schechter *et al.*, 1985; Semba *et al.*, 1985). ERBB2 ist ein so genannter *orphan receptor*, das heißt, ihm ist kein Ligand zugeordnet, allerdings findet eine Aktivierung seiner Tyrosinkinasedomäne durch Heterodimerisierung mit

anderen Mitgliedern der ERBB-Familie statt (Qian *et al.*, 1994). ERBB3 besitzt keine Kinaseaktivität und benötigt nach Ligandenbindung eine Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ERBB-Rezeptorfamilie, die dann zur Phosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb von ERBB3 und nachfolgender Aktivierung des MAPK ERK1/2-Moduls führt (Guy *et al.*, 1994; Karunakaran *et al.*, 1996; Riese *et al.*, 1996; Sliwkowski *et al.*, 1994). ERBB3 verfügt über sechs Bindungsstellen für PI3K und kann so den PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg aktivieren (Kim *et al.*, 1994; Kraus *et al.*, 1989).

ERBB4 homo- oder heterodimerisiert nach Ligandenbindung von z. B. Heregulin mit anderen Mitgliedern der ERBB-Familie und nachfolgende aktivierte Signaltransduktionswege wie das MAPK ERK1/2-Modul spielen bei der normalen Entwicklung des Organismus, bei Herzfunktionen und bei der Entstehung von Krebs, z. B. beim Mammakarzinom, eine Rolle (Carpenter, 2003; Holbro *et al.*, 2004; Roskoski, 2004).

Nach Aktivierung von Rezeptoren der ERBB-Familie oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren kommt es aufeinander folgend zur Aktivierung von Ras, Raf und schließlich der MAP Kinase Kinase (MAPKK/MEK1/2). MAP Kinase Kinase aktiviert die MAP Kinase ERK1/2 (p44/p42 MAPK) durch Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten (Alessi *et al.*, 1994; Avruch *et al.*, 1994; Boguski *et al.*, 1993; Crews *et al.*, 1992).

MAPKs sind eine weitestgehend konservierte Familie von Serin/Threonin Kinasen, die in viele zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Motilität und der Regulation von Apoptose involviert sind (Chen *et al.*, 2001). Unter den sehr zahlreichen Substraten von ERK1/2 befinden sich viele zytoplasmatische Proteine, Membranproteine, Proteine des Zytoskeletts und nukleäre Proteine (Fukunaga *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 1999; Hsiao *et al.*, 1994; Stokoe *et al.*, 1992; Sturgill *et al.*, 1988; Waskiewicz *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1996). Außerdem werden Transkriptionsfaktoren direkt phosphoryliert, Beispiele sind hier c-Fos und der ER (Chen *et al.*, 1993; Joel *et al.*, 1998). Beispiel für nukleäre ERK1/2-Substrate sind der nukleäre Co-Aktivatoren SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) oder Mitglieder der STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Familie wie STAT5a (Pircher *et al.*, 1999; Rowan *et al.*, 2000).

Kommt es zur Aktivierung von ERK1/2, akkumuliert eine signifikante Menge der aktivierten Kinase innerhalb des Nukleus (Chen *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand *et al.*, 1993).

1.6.2 Aberrationen innerhalb der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion

Eine Deregulation des ERBB/ERK1/2-Signaltransduktionswegs spielt aufgrund seiner vielfältigen Substrate bei verschiedenen Krankheiten, insbesondere bei Krebs, eine entscheidende Rolle und ist daher Ziel der Entwicklung verschiedener Inhibitoren (Kohno *et al.*, 2003). Eine verstärkte Aktivierung des EGF-Rezeptors und des ERBB2, u. a. durch Mutationen, überaktiviert die MAPK ERK1/2. Eine hierdurch erhöhte Proliferation und die Verhinderung von Apoptose spielen bei vielen Krebserkrankungen, inklusive des Mammakarzinoms, eine entscheidende Rolle (Favoni *et al.*, 2000; Olayioye *et al.*, 2000; Salomon *et al.*, 1995). Eine Amplifikation des ERBB2-Gens und eine damit verbundene Überexpression seines Genprodukts liegt in 40 % aller untersuchten Mammakarzinome vor (Dittadi *et al.*, 2000).

ERBB3 wird in vielen Krebszellen stark exprimiert und eine Aktivierung des ERBB3/PI3K-Signalwegs korreliert mit malignen Phänotypen von Adenokarzinomen (Kobayashi *et al.*, 2003; Sithanandam *et al.*, 2003).

Die Expression von ERBB4 wurde unter anderem in Mammakarzinomen nachgewiesen und trägt zu einer Überaktivierung des ERBB/ERK1/2-Signaltransduktionswegs bei (Carpenter, 2003).

Onkogene Ras-Mutationen treten bei vielen verschiedenen Karzinomen auf, so z. B. im Pankreas (90 %), im Kolon (50 %), in der Schilddrüse (50 %), in der Lunge (30 %) und bei der myeloischen Leukämie (30 %) (Bos, 1989). Raf-Mutationen können zu verstärkter Kinaseaktivität führen, was z. B. bei malignen Melanomen der Fall sein kann (Davies *et al.*, 2002).

1.6.3 ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion und sekundäre Antiöstrogenresistenz

Die sekundäre Resistenz gegen Antiöstrogene wie TAM ist oftmals mit einer erhöhten Expression von Mitgliedern von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren der ERBB-Familie, wie dem EGF-R (ERBB) und dem ERBB2 (HER-2/neu), as-

soziiert, die u. a. durch eine Amplifikation der entsprechenden Gene verursacht wird. Die Überexpression des ERBB2 oder des EGF-Rezeptors und die Heterodimerisierung von Mitgliedern der ERBB-Familie führt zur Aktivierung der MAPK ERK1/2, wodurch es im Folgenden zu einer Phosphorylierung von Ser¹¹⁸ des ERs kommen kann. Hierdurch wird dieser Liganden-unabhängig aktiviert, was in Mammakarzinomzellen mit einem konsekutiven Verlust der inhibitorischen Wirkung von TAM einher geht (Bunone *et al.*, 1996; Dowsett, 2001; Dowsett *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1995; Knowlden *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2000; Shou *et al.*, 2004). Eine durch experimentelle ERBB2-Überexpression induzierte MAPK-Aktivierung inhibiert durch Phosphorylierung die durch TAM vermittelte Assoziation des ERs mit nukleären Co-Repressoren (N-CoR) in Mammakarzinomzellen und ist Ursache für eine Resistenz gegenüber TAM. Die selektive Inhibition der MAPK-Aktivierung mit den Inhibitoren U0126 oder AG1478 stellte die ER/N-CoR Assoziation wieder her und resensibilisierte diese Zellen für Antiöstrogene (Kurokawa *et al.*, 2000). Eine mögliche endogene Ursache einer gesteigerten ERBB2-Expression kann eine vermehrte Transkription des betreffenden Gens durch direkte Einwirkung des ER α sein. Hurtado *et al.* zeigten, dass im Gen für ERBB2 von ER-positiven Mammakarzinomzellen eine Bindungsstelle für den ER α existiert. Der mit dem bisher unbekanntem Regulator *paired box 2 gene product* (PAX2) assoziierte ER α bindet, nach Aktivierung durch TAM oder Östrogene, an diese Stelle und reprimiert die Expression des ERBB2. Der nukleäre Co-Aktivatoren AIB-1 konkurriert mit PAX2 um die Bindungsstelle am ER und bei einer Veränderung des Verhältnisses zwischen PAX2 und AIB1 zu Gunsten des AIB1 resultiert eine HER-2-dominierte Wachstumsregulation, die die Zellen gegenüber den antiproliferativen und apoptotischen Effekten von TAM resistent werden lässt (Hurtado *et al.*, 2008).

Die Expression des EGF-Rezeptors lässt sich in etwa 60 % aller Mammakarzinome nachweisen und steht in umgekehrter Beziehung zu der Verteilung der ER-Expression. Die Überexpression des EGF-Rezeptors hat einen negativen prädiktiven Wert für das Ansprechen einer Antiöstrogen-Therapie *in vitro* und *in vivo* (Knowlden *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 1993; van Agthoven *et al.*, 1992). Es wurde beschrieben, dass Mammakarzinomzellen mit sekundärer Resistenz gegen TAM spezifische Liganden des EGF-Rezeptors exprimieren können und MAPK ERK1/2 durch bevorzugte Heterodimerisierung des EGF-Rezeptors mit

dem ERBB2 aktiviert wird. Durch den spezifischen Inhibitor der EGF-Rezeptor assoziierten Phosphotyrosinkinase Gefitinib (siehe 1.6.4), den monoklonalen Antikörper gegen den ERBB2, Trastuzumab (Herceptin[®]), oder den MAP Kinase Kinase (MEK, MAPK or ERK kinase)-Inhibitor PD98059 wurde in diesen Zellen die MAPK Aktivierung und die Zellproliferation gehemmt (Knowlden *et al.*, 2003).

1.6.4 Inhibitoren der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion

Gefitinib

Wie in Abschnitt 1.6.1 beschrieben, wird durch Ligandenbindung an den EGF-Rezeptor und Homo- oder Heterodimerisierung mit dem ERBB2 (HER-2/neu) die Signaltransduktion über die MAPK ERK1/2 aktiviert. Der Inhibitor der EGF-R assoziierten Phosphotyrosinkinase Gefitinib (Iressa[®]) blockiert dies, indem er kompetitiv die Bindung von ATP an die Tyrosinkinasedomäne des EGF-R verhindert (Ciardiello *et al.*, 2000; Wakeling *et al.*, 2002; Yarden *et al.*, 1987; Yarden *et al.*, 2001).

PD98059

PD98059 ist ein Inhibitor der MAP Kinase Kinase (MEK, *mitogen activated protein kinase* or ERK kinase), der sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hierdurch indirekt die Aktivierung der MAPK ERK1/2 verhindert (Alessi *et al.*, 1995; Cowley *et al.*, 1994; Crews *et al.*, 1992; Dudley *et al.*, 1995; Rosen *et al.*, 1994).

1.7 Analoga von GnRH-I und -II und Antiöstrogenresistenz

1.7.1 Wirkung der Analoga von GnRH-I und GnRH-II auf die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren in Tumorzellen

Die Expression des Typ I Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH-I), auch synonym Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon genannt (LHRH), und seines 7-Transmembran-Rezeptors wurde in 50 – 64 % aller Mammakarzinome nachgewiesen (Baumann *et al.*, 1993; Fekete *et al.*, 1989; Mangia *et al.*, 2002; Moriya *et al.*, 2001). In Tumorzelllinien dieser Malignome konnte das Wachstum der Tumorzellen durch GnRH-Analoga sowohl zeit- als auch dosisabhängig in-

hibiert werden (Blankenstein *et al.*, 1985; Eidne *et al.*, 1987; Foekens *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1985). Anders als in der Hypophyse, erfolgt in Tumorzellen die intrazelluläre Signaltransduktion überwiegend über das mit dem GnRH-I-Rezeptor assoziierte G-Protein α_i und die Aktivierung von an dieses gekoppelten spezifischen Phosphotyrosin-Phosphatasen (Grundker *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 1996). Die antiproliferativen Eigenschaften von GnRH-I-Analoga in GnRH-I-Rezeptor positiven Tumorzellen beruhen auf unterschiedlichen, teilweise noch unklaren Mechanismen. Sie interagieren mit der mitogenen Signaltransduktion und inhibieren die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, wie z. B. für EGF (Dondi *et al.*, 1998; Emons *et al.*, 1996b; Yano *et al.*, 1994). Außerdem belegen verschiedene Untersuchungen, dass die antiproliferativen Effekte der GnRH-I-Analoga in GnRH-I-Rezeptor positiven Mammakarzinomzellen auf einer Antagonisierung wachstumsstimulierender Faktoren, wie z. B. E2, EGF oder dem Insulin-like Growth Factor (IGF) beruhen (Hershkovitz *et al.*, 1993; Neri *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1991). Zum Beispiel inhibieren GnRH-I-Analoga die durch EGF induzierte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und die Aktivierung der MAPK ERK1/2 in Ovarial- und Endometriumkarzinomzellen (Emons *et al.*, 1993; Emons *et al.*, 1996a). Dadurch wird durch GnRH-I-Analoga die EGF-induzierte *c-fos*-Expression, die AP-1 Aktivität, die JunD-DNA Bindung gehemmt und die DNA-Synthese und der Zellzyklus in Tumorzellen gehemmt (Grundker *et al.*, 2002b).

In der Tierwelt existieren drei strukturelle Dekapeptid-Varianten des GnRH, eine davon ist GnRH-II, welches sich durch seine Aminosäuresequenz nur geringfügig von GnRH-I unterscheidet. Die Expression eines funktionellen GnRH-II wurde beim Menschen in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen, was dafür spricht, dass dem GnRH-II beim Menschen vermutlich sehr unterschiedliche Funktionen zuzuschreiben sind (Choi *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2001; Siler-Khodr *et al.*, 2001; Tanriverdi *et al.*, 2004). Aufgrund eines *in-frame* Stoppcodon, sowie einer *frame-shift* Mutation in der DNA-Sequenz des GnRH-II-Rezeptors war zunächst zu vermuten, dass kein funktioneller GnRH-II-Rezeptor beim Menschen existiert (Grundker *et al.*, 2002a; Morgan *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2001; van Biljon *et al.*, 2002). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA des putativen GnRH-II-Rezeptors ubiquitär in menschlichen Geweben exprimiert wird. Es wird jedoch vermutet, dass es sich dabei um

unvollständige Rezeptor-Transkripte handelt (Neill, 2002). Das vorzeitige Stoppcodon TGA im GnRH-II-Rezeptor könnte durch den Einbau der Aminosäure Selenocystein übergangen werden und somit zum translatierbaren Codon dekodiert werden (Bertram *et al.*, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese auch durch das Identifizieren eines humanen GnRH-II-Rezeptor-ähnlichen Proteins, welches in der Plazenta und Karzinomen des Reproduktionstraktes nachgewiesen wurde und vom Molekulargewicht einem 5-Transmembran-Rezeptor entsprechen könnte (Eicke *et al.*, 2005).

GnRH-II zeigte deutliche antiproliferative Effekte in humanen Endometrium- und Ovarialkarzinomzelllinien (Grundker *et al.*, 2002a; Neill, 2002). Die antiproliferativen Effekte von GnRH-II persistierten in Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen noch nach *knock-out* des GnRH-I-Rezeptors, wohingegen der GnRH-I-Agonist Triptorelin in diesen Zellen keinen Effekt mehr zeigte. Ebenso zeigte GnRH-II in der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV-3 antiproliferative Effekte, in welcher sich keine Expression von GnRH-I-Rezeptoren nachweisen lässt, aber mRNA für den GnRH-II-Rezeptor exprimiert wird (Grundker *et al.*, 2002a). Dies lässt darauf schließen, dass die antiproliferativen Effekte von GnRH-II nicht über den GnRH-I-Rezeptor vermittelt werden (Grundker *et al.*, 2004). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Enomoto *et al.*, welche die Expression einer Splice-Variante des GnRH-II-Rezeptors bei Menschen diskutierten (Miyake *et al.*, 2008).

1.7.2 Wirkung von GnRH-I- und -II-Analoga auf OHT-resistente Mammakarzinomzellen

Wie in Abschnitt 1.7.1 beschrieben, interagieren GnRH-I-Analoga mit der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, wie z. B. der ERBB-Signaltransduktion, in Endometrium- und Ovarialkarzinomzellen und zeigen antiproliferative Effekte. Auch im Hinblick auf die Antiöstrogenresistenz bei Mammakarzinomen waren diese Untersuchungen von Interesse, da hier eine verstärkt aktivierte ERBB-Signaltransduktion oft eine wichtige Rolle spielt (siehe Abschnitt 1.6.3). Wie in Abschnitt 1.7.1 erwähnt, konnte die Expression von GnRH-I-Rezeptoren in 50 – 64 % aller Mammakarzinome nachgewiesen werden und das Wachstum dieser Zellen dosisabhängig mit GnRH-I-Analoga gehemmt werden. Bei MCF-7 und T47D Mammakarzinomzellen konnte eine deut-

liche Oberflächenexpression des GnRH-I- und des GnRH-II-Rezeptors nachgewiesen werden und die antiproliferativen Effekte und die Hemmung der DNA-Synthese durch das agonistisch wirkende GnRH-II-Analogon [D-Lys⁶]GnRH-II waren bei gleicher Konzentration vergleichbar mit denen des GnRH-I-Agonisten Triptorelin (Gunthert *et al.*, 2005).

ER-positive MCF-7 und T47D wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten mit OHT kultiviert, bis diese Zellen vergleichbare Proliferationsraten zeigten, wie die parentalen Zelllinien ohne OHT. Nach weiteren drei Monaten wurden diese Zellen analysiert und mit den parentalen Zellen verglichen. Die OHT-resistenten Sublinien wurden MCF-7-TR und T47D-TR genannt und stellen ein Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz dar. Die Expression der Rezeptoren für GnRH-I und GnRH-II ist in den resistenten Zelllinien etwas niedriger im Vergleich zu den parentalen Zellen, dennoch sind die inhibitorischen Effekte der Analoga von GnRH-I und GnRH-II auf die EGF-induzierte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und die Aktivierung der MAPK ERK1/2 in diesen Zellen vergleichbar mit denen in parentalen Zellen (Gunthert *et al.*, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass in OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR eine Resensibilisierung gegenüber OHT durch Behandlung mit dem GnRH-I-Agonisten Triptorelin und dem GnRH-II-Agonisten [D-Lys⁶]GnRH-II, nicht aber mit Gefitinib erreicht werden kann (Gunthert *et al.*, 2005). In OHT-resistenten Zellen MCF-7-TR und T47D-TR findet durch Gefitinib eine marginale Verschiebung des Zyklus zu Gunsten der G1/0-Phase statt, allerdings werden die Zellen nicht für OHT resensibilisiert (Gunthert *et al.*, 2005). Agonistisch wirkende GnRH-I-Analoga wie Triptorelin und agonistisch wirkende GnRH-II-Analoga wie [D-Lys⁶]GnRH-II interferieren, wie Gefitinib, ebenfalls mit der EGF-R-Signalkaskade und inhibieren die EGF induzierte Autophosphorylierung des EGF-R und Induktion der MAPK (siehe Abschnitt 1.7.1) (Emons *et al.*, 1993; Emons *et al.*, 1996a; Gunthert *et al.*, 2005; Knowlden *et al.*, 2003). Dass aber die GnRH-I- und -II-Analoga eine Durchbrechung der Antiöstrogenresistenz bewirken, Gefitinib jedoch nicht, spricht dafür, dass in den hierbei untersuchten Zellen nicht die EGF-Rezeptor/ERBB2-Hetero- und Homodimerisierung dominiert, sondern die Inhibition anderer Signalwege eine Rolle zu spielen scheint (Gunthert *et al.*, 2005). In Prostatakarzinomzellen konnte außerdem

gezeigt werden, dass GnRH-I-Analoga die PI3K/Akt-Signalkaskade hemmen können (Kraus *et al.*, 2004).

1.8 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die mechanistischen Grundlagen der Durchbrechung der sekundären Antiöstrogenresistenz mit Analoga von GnRH-I und -II anhand zweier etablierter, Östrogenrezeptor-positiver Mammakarzinomzelllinien analysiert werden.

Hierzu werden verschiedene Mediatoren der PI3K/Akt- und der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionskaskade mittels RT-PCR und Western Blot analysiert. Außerdem werden ausgewählte Gene, bei denen Aberrationen gehäuft auftreten, sequenziert und auf Mutationen untersucht. Durch diese Strategie sollen Signalwege identifiziert werden, die in den vorliegenden Zellmodellen der sekundären Antiöstrogenresistenz eine wichtige Rolle einnehmen könnten.

Weiterhin werden andere potentielle Möglichkeiten zur Durchbrechung der Resistenz mit verschiedenen Inhibitoren der PI3K/Akt- und der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion analysiert. Hierzu werden diese Substanzen hinsichtlich ihrer antiproliferativen und proapoptotischen Wirkung auf parentale Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D und deren resistente Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR untersucht. Dabei soll die kombinierte Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen im Vordergrund stehen.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der Antiöstrogenresistenz bei Mammakarzinomen beitragen und neue potentielle Strategien zu deren Durchbrechung aufzeigen. Die so gewonnenen Daten könnten in nachfolgenden Arbeiten die Grundlage für *in vivo*-Versuche bei xenotransplantierten Mäusen bilden.

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage, BP161P	Sartorius, Göttingen
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer, Breda, NL
Brutschrank, Model 3121 S/N 28439532	Forma Scientific, San Bruno, USA
Durchflusszytometer, FACScalibur [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems, Rochester, USA
Kodak Digital Science [®] Electrophoresis Documentation And Analysis System DC120	Kodak, Stuttgart
Magnetrührer, MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikroskop, IX51	Olympus, Hamburg
Mikrowaage, elektronisch, M2P	Sartorius, Göttingen
Mini Trans-Blot Cell-System	Bio-Rad, München
Multidetektions-Mikrotiterplattenleser, Synergy HT	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Netzgerät, 1000/500	Bio-Rad, München
Netzgerät, 200/2.0	Bio-Rad, München
pH-Meter, CG 22	Schott Geräte, Mainz
Polaroid Land-Kamera, MP 4	Polaroid, Concord, USA
Röntgenfilmentwickler, SRS-101A	Konica, Langenhagen
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
SDS-PAGE Kammer, Mini-Protean [®] III	Bio-Rad, München
Spektralphotometer, BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbank, LaminAir [®] HA 2448 GS	Heraeus Holding, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermozykler, T3000	Biometra, Göttingen
Ultrazentrifuge, (UZ ⁶) Sorvall	Thermo Fisher Scientific, Bonn
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2 [®]	Bender & Hobein, Bruchsal

Waage, Kern 440-47	Kern, Balingen
Wasserbad, beheizbar	Memmert, Schwabach
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge, Labofuge 400R	Heraeus Holding, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden als Einmalartikel von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Nunc (Langenselbold) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert erwähnt, von den Firmen Merck (Darmstadt), PAA (Cölbe), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Riedel-de Häen (Seelze) und Roche (Mannheim) bezogen. Die Chemikalien entsprechen, soweit nicht anders angegeben, dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Hergestellte Puffer und Lösungen

Für das Ansetzen von Puffern und anderen Lösungen wurde Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Sartorius (Göttingen) bezogen, das eine Leitfähigkeit von nicht mehr als $18 \text{ M}\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$ hatte.

Tab. 1: Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösung	Zusammensetzung
<i>blocking</i> -Lösung, Western Blot	TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver
DNA-Ladepuffer (10x), DNA-Agarosegelelektrophorese	50 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol
Laemmli-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Nicoletti-Lösung	0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) Na-Citrat, 0,005 % (w/v) Propidiumiodid
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2HPO_4 , pH 7,4

Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	50 mM C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P, 10 mM NaF, 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 2 mM Na ₃ VO ₄
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBE	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH = 8,0
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 500 mM Tris, pH = 7,5
TBST	TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % SDS (w/v), 20 % (v/v) Methanol

2.4.2 Kommerzielle Puffer und Lösungen

10 x PCR-Puffer	Roche, Mannheim
dNTP-Mix für PCR	Roche, Mannheim
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Prosieve 50 Gel Solution	Cambrex, Charles City, USA
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RNase Inhibitor, RNasin [®] Plus	Promega, Mannheim
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zellysepuffer, CellLytic [®] -M	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.5 Kulturmedien und Medienzusätze

Die für die Zellkultur eingesetzten Medien und deren Zusätze wurden von Biochrom (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), Sanofi-Aventis (Frankfurt), PAA (Cölbe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen, soweit dies nicht anders vermerkt ist. Supplemente wurden vor der Zugabe steriltrifert.

Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien mit supplementierten Substanzen

Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	MEM-Earl Kulturmedium mit 10 % DMSO
Kulturmedium	MEM-Earl mit Phenolrot; 10 % (v/v) FCS, 10 µg/ml P/S, 50 IU Insulin
Medium für Apoptose- und Proliferationsassays	MEM-Earl ohne Phenolrot; 10 % (v/v) CD-FCS (Allgäu BioTech Service, Görisried), 10 µg/ml P/S, 4 mM L-Gln, 0,22 % (w/v) NaHCO ₃
Medium zur Vorbereitung der Apoptoseassays	MEM-Earl ohne Phenolrot; 10 µg/ml P/S, 4 mM L-Gln, 0,22 % (w/v) NaHCO ₃

2.6 Biologisches Material

2.6.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) bezogen. Die ER-positiven Mammakarzinomzellen MCF-7 und T47D wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT kultiviert, bis diese Zellen vergleichbare Proliferationsraten zeigten, wie die parentalen Zelllinien ohne OHT. Die OHT-resistenten Sublinien wurden MCF-7-TR und T47D-TR genannt und stellen ein Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz dar (Gunthert *et al.*, 2005).

Tab. 3: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
MCF7, Mammakarzinom	Pleuraerguss	Adenokarzinom	(Soule <i>et al.</i> , 1973)
MCF-7-TR, Mammakarzinom	OHT-resistente Sublinie von MCF-7	Adenokarzinom	(Gunthert <i>et al.</i> , 2005)
T47D, Mammakarzinom	Pleuraerguss	Adenokarzinom	(Freake <i>et al.</i> , 1981)
T47D-TR, Mammakarzinom	OHT-resistente Sublinie von T47D	Adenokarzinom	(Gunthert <i>et al.</i> , 2005)
BG-1, Ovarialkarzinom	Primärtumor	Adenokarzinom, sehr schwach differenziert	(Geisinger <i>et al.</i> , 1989)

2.6.2 Oligonukleotide

Alle vorliegenden Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder biomers.net (Ulm) synthetisiert.

RT-PCR

Die als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Programm Primer 3 im Internet (http://biotools.umassmededu/bioapps/primer3_www.cgi) entworfen oder stammen aus der Literatur und sind mit den zugehörigen Produktlängen in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: Primer für die RT-PCR

Zielgen	Primersequenz	Produktlänge (Bp)	Referenz
<i>aib1</i>	F: 5'-TCACTGAGATCCTCCATGAG-3'	386	(Girgert <i>et al.</i> , 2007)
	R: 5'-GGCATCTGTAAGCCTTGGTT-3'		
<i>aromatase</i>	F: 5'-CGGCCTTGTTTCGTATGGTCA-3'	372	Primer 3
	R: 5'-GCAAAGTCCATACATTCTTCCAG-3'		
<i>pten</i>	F: 5'-ACACCGCCAAATTTAATTGC-3'	295	Primer 3
	R: 5'-ACATAGCGCCTCTGACTGG-3'		
<i>src-1</i>	F: 5'-GATATAGACACAAGCTGCAA-3'	309	(Girgert <i>et al.</i> , 2007)
	R: 5'-ATAGCGTAGGAGCTGATGGT-3'		
<i>smrt</i>	F: 5'-CACGAGGTGTCAGAGATCAT-3'	549	(Girgert <i>et al.</i> , 2007)
	R: 5'-GTCGTCTGTCTTCTCCTTGA-3'		
<i>n-cor</i>	F: 5'-TGCCACTGTATAACCAGCCA-3'	382	(Girgert <i>et al.</i> , 2007)
	R: 5'-TGCTCAGAGAGCCCATCAAT-3'		
<i>gpr30</i>	F: 5'-CTC CAA CAG CTG CCT AAA CC-3'	203	Primer 3
	R: 5'- ATG TGG CCA AGG CTG TCT AC-3'		
<i>l7</i>	F: 5'- AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC-3'	357	Primer 3
	R: 5'- ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA-3'		

Die für die durchgeführten Sequenzierungen verwendeten Primer finden sich in Abschnitt 2.7.1.

2.7 Sequenzierung

2.7.1 Primer

Die Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung der Exons von *pten* wurden gemäß einer Veröffentlichung von Bertelsen *et al.* konstruiert (Bertelsen *et al.*, 2006).

Tab. 5: Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung der Exons von *pten*

Exon	Primersequenz	Produktlänge (Bp)
1	F: 5'-CATTTCCATCCTGCAGAAG-3'	249
	R: 5'-ACTACGGACATT TTCGCAT-3'	
2	F: 5'-TTTCAGATATTTCTTTCCTTA-3'	147
	R: 5'-TGAAATAGAAAATCAAAGCAT-3'	
3	F: 5'-ATAGAAGGGGTATTTGTTGGA-3'	292
	R: 5'-CCTCACTCTAACAAGCAGATA-3'	

4	F: 5'-CAGGCAATGTTTGTAGTAT-3'	184
	R: 5'-GATACAGTCTATCGGGTTTA-3'	
5a	F: 5'-CCTGTTAAGTTTGTATGCAA-3'	213
	R: 5'-GAATTGCTGCAACATGAT-3'	
5b	F: 5'-CACCACAGCTAGAACTTATC-3'	253
	R: 5'-CAGATCCAGGAAGAGGAAAG-3'	
6	F: 5'-CGACCCAGTTACCATAGCA-3'	265
	R: 5'-CCAATACATGGAAGGATGAG-3'	
7	F: 5'-CCCTGTGAAATAACTGGT-3'	232
	R: 5'-TTCTCCCAATGAAAGTAAAG-3'	
8a	F: 5'-GTTTAACATAGGTGACAGA-3'	257
	R: 5'-AAGTAAGTACTAGATATTCC-3'	
8b	F: 5'-GAAAATGGAAGTCTATGTG-3'	201
	R: 5'-TACATACAAGTCACCAACC-3'	
9	F: 5'-GAGTCATATTTGTGGGTTTT-3'	261
	R: 5'-ATGGTGTTTTATCCCTCTT-3'	

Die Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung von Exon 9 und Exon 20 von *pik3ca* wurden gemäß einer Veröffentlichung von Curtin *et al.* konstruiert (Curtin *et al.*, 2006).

Tab. 6: Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung der Exons 9 und 20 von *pik3ca*

Exon	Primersequenz	Produktlänge (Bp)
9	F: 5'-GGGGAAAAATATGACAAAGAAA-3'	250
	R: 5'-TGAGATCAGCCAAATTCAGTT -3'	
20	F: 5'-ACAGCATGCCAATCTTTCAT-3'	208
	R: 5'-TGTGTGGAAGATCCAATC CAT-3'	

2.7.2 Enzyme

SuperScript® II Rnase H Reverse Transkriptase Invitrogen, Karlsruhe

Taq DNA Polymerase Roche, Mannheim

Typsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS) PAA, Cölbe

2.7.3 Antikörper

Alle bezogenen Antikörper wurden nach den Angaben der Hersteller eingesetzt.

Tab. 7: Primärantikörper für Western Blots

Antikörper gegen:	Ursprung	Bestellnr.	Referenz/Herkunft
AIB1	Kaninchen	PA1-845	Affinity Bioreagents, Golden, USA
AIB1	Maus	MA1-23150	Affinity Bioreagents
AIB1	Kaninchen	ab10310	Abcam, Cambridge, GB
Akt	Kaninchen	9272	Cell Signaling, Danvers, USA
phospho-Akt (Ser ⁴⁷³)	Kaninchen	4058	Cell Signaling
phospho-Akt (Thr ³⁰⁸)	Kaninchen	4056	Cell Signaling
Aktin	Kaninchen	A5060	Sigma, Deisenhofen
Aromatase	Maus	ab34193	Abcam
CTMP	Kaninchen	4612	Cell Signaling
ERK1/2	Kaninchen	14-6718	eBiosciences, San Diego, USA
phospho-p44/42 MAP Kinase ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	Kaninchen	3044	Cell Signaling
GPR30	Kaninchen	LS-A1183	Genetex, Irvine, USA
N-CoR	Kaninchen	Sc-8994	Santa Cruz, Heidelberg
PDK1	Kaninchen	3062	Cell Signaling
phospho-PDK1 (Ser ²⁴¹)	Kaninchen	3061	Cell Signaling
PTEN	Kaninchen	9552	Cell Signaling
SMRT	Kaninchen	MA1-2390	Affinity Bioreagents
SRC-1	Kaninchen	sc-8995	Santa Cruz
SRC1	Kaninchen	ab2859	Abcam

Tab. 8: HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für Western Blots

Antikörper	Ursprung	Bestellnr.	Referenz/Herkunft
Anti-Kaninchen IgG	Affe	NA934-1ML	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Maus IgG	Schaf	NA931-1ML	GE Healthcare

Tab. 9: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper gegen	Ursprung	Bestellnr.	Referenz/Herkunft
EGF-R	Maus	E2760	Sigma-Aldrich
ERBB2 (HER-2/neu)	Maus	340553	BD Biosciences
IGF-1R α	Maus	555998	BD Biosciences

Tab. 10: FITC-gekoppelte Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Ursprung	Bestellnr.	Referenz/Herkunft
Anti-Mouse IgG	Ziege	F-5387	Sigma-Aldrich

2.8 Inhibitoren, Antiöstrogene und GnRH-I/-II Agonisten

Die verschiedenen Substanzen wurden gemäß den Angaben der Hersteller gelöst und verwendet und sind zusammen mit ihren Lösungsmitteln in Tab. 11 aufgelistet.

Tab. 11: Inhibitoren, Antiöstrogene, Agonisten und verwendete Lösungsmittel

Substanz	Lösungsmittel	Referenz/Herkunft
4-Hydroxytamoxifen (OHT)	Ethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
[D-Lys ⁶]GnRH-II	PBS	(Grundker <i>et al.</i> , 2002a)
Everolimus (RAD001)	DMSO	Novartis, Nürnberg
Fulvestrant	Ethanol	Astra-Zeneca, Wedel
Gefitinib	DMSO	Astra Zeneca
Perifosine	PBS	Zentaris, Frankfurt
Rapamycin	DMSO	Calbiochem, Darmstadt
Triptorelin	PBS	Ferring Pharmaceuticals, Kiel

Der Metabolit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) ist der Hauptvermittler der antiöstrogenen Aktivität von Tamoxifen und wurde in dieser Arbeit daher zur Darstellung der Effekte von Tamoxifen verwendet (Borgna *et al.*, 1981; Fabian *et al.*, 1981; Murphy *et al.*, 1991).

2.9 Kommerzielle Reaktionssysteme

ECL Immobilon [®] Western	Millipore, Schwalbach
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena
innuPREP Gel Extraction Kit	Analytik Jena, Jena
innuPREP PCRpure Kit	Analytik Jena, Jena
JC-1 Mitochondrial Membran Potential Detection Kit	AbD Serotec, Düsseldorf
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase free Dnase Set	Qiagen, Hilden
Wizard [®] SV Genomic DNA Kit	Promega, Mannheim

2.10 Software und Datenbanken

Adobe Acrobat Reader	Adobe Systems, München
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Chromas Lite 2.0	Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Australien
Clone Manager 7	Sci-Ed Software, Cary, USA
CellQuest [®] Software (Version 3.0)	Becton Dickinson, Heidel- berg
Emboss Align	http://www.ebi.ac.uk/Tools/ emboss/align/index.html
GraphPad Prism [®] (Version 5.0)	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
KC4 [®] Synergy HT	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3)	Kodak, New York, USA
Microsoft [®] Office 2003	Microsoft Corporation, Unter- schleißheim
Primer 3	http://biotools.umassmed.edu/ bioapps/primer3_www.cgi

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

3.1.1 Kultivierung und Passagierung adhärenter Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden in MEM-Earl Kulturmedium bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium enthielt 10 % (v/v) fötales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) und 50 IU Insulin. Das Medium für die resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR enthielt 1,25 µM 4OH-Tamoxifen (OHT). Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 - 80 % oder bei Bedarf an einer Expansion, wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS) bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit MEM-Earl Kulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 300 x g 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in MEM-Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine entsprechende Anzahl Zellen auf Zellkulturgefäße verteilt oder in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen wurden nicht gezählt, wenn sie direkt zur Proteingewinnung lysiert wurden.

3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Um Zellen langfristig zu konservieren, wurden Zellpellets mit der entsprechenden Zellzahl in Einfriermedium aufgenommen und zunächst bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff (ca. -196 °C). Zum Auftauen der Zellen wurden diese bei 37 °C erwärmt und möglichst rasch mit MEM-Earl Kulturmedium gewaschen. Nach Zentrifugation bei 300 x g wurde das entstandene Pellet in MEM-Earl Kulturmedium resuspendiert und die Zellen kultiviert.

3.1.3 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 cm² Fläche, Laboroptik, Friedrichsdorf) unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Der Ausschluss von toten Zellen erfolgte mittels Trypanblau-Färbung, bei der Zellsuspension und Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis von 1:2 gemischt wurden.

3.2 alamarBlue[®]-Proliferationsassay

Die Proliferation von Zellen wurde mittels alamarBlue[®]-Proliferationsassay bestimmt. alamarBlue[®] ist ein Farbstoff, dessen Umsetzung vom oxidierten Zustand in den reduzierten Zustand auf der Atmungsaktivität (Elektronentransport) der Mitochondrien basiert (Ahmed *et al.*, 1994). Inhaltsstoff von alamarBlue[®] ist der Redox-Indikator Resazurin, der in oxidierte Form ein Absorptionsmaximum bei 570 nm aufweist und somit blau erscheint. Durch Reduktion verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 630 nm und der Farbstoff (Resorufin) erscheint rot. Dies kann mittels UV-Spektrometrie und Fluoreszenzspektrometrie gemessen werden. Wurde die Proliferation gehemmt oder besitzen die Zellen eine verminderte Vitalität, fällt der Farbumschlag gering aus.

Die entsprechende Menge Zellen (siehe Tab. 12) wurde in 96-Well-Platten in MEM-Earl Kulturmedium für Apoptose- und Proliferationsassays ohne Phenolrot und mit 10 % (v/v) CD-FCS, um den Einfluss exogener Östrogene auszuschließen, ausgesät, um den Einfluss exogener Östrogene auszuschließen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für weitere 96 Stunden zusammen mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und danach vermessen. Die Anwendung von alamarBlue[®] erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die spektralphotometrische Messung wurde bei $\lambda = 570$ nm und als Referenz bei $\lambda = 630$ nm in einem Multidetektions-Mikrotiterplattenleser durchgeführt.

Tab. 12: Aussaatdichten der verschiedenen Zelllinien für den alamarBlue® - Proliferationsassay

Zelllinie	Aussaatdichte
MCF-7	750 Zellen/Well
MCF-7-TR	2000 Zellen/Well
T47D	2000 Zellen/Well
T47D-TR	2000 Zellen/Well

3.3 Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Apoptose

3.3.1 Quantifizierung von Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden und lichtstreuenden Effekte analysiert und charakterisiert werden. Dazu werden die Zellen in Suspension in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl in einer Kapillare aneinandergereiht (hydrodynamische Fokussierung) und passieren so einzeln den Laserstrahl. Physikalische Zelleigenschaften wie Größe und Granularität bestimmen die charakteristische Streuung des Laserlichtes. Die Streuung entlang des Laserlichtstrahls in Vorwärtsrichtung gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Dieser Parameter wird als *forward scatter* (FSC) bezeichnet. Des Weiteren erfolgt eine von der Granularität abhängige Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht. Diese Seitwärtsstreuung wird als *side scatter* (SSC) bezeichnet und ist umso höher, je größer die Granularität der Zelle ist. Die gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzdaten werden von speziellen Detektoren erfasst und verstärkt (sog. Photomultiplier, PMT).

Die Aufnahme und Analyse der verschiedenen Parameter der Zellen wird mit Hilfe des Programms CellQuest (Version 3.0) ausgewertet. Die durchflusszytometrischen Messungen zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurden an einem Durchflusszytometer (FACScalibur) mit Argon-Laser (Becton Dickinson) vorgenommen. Zuvor wurden die Zellen nach einer Methode von Nicoletti *et al.* behandelt., bei der die DNA der intakten Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt wird, nachdem die Zellmembran mit Triton X-100 lysiert wurde (Nicoletti *et al.*, 1991). Als Grundlage dieses Apoptoseassays dient der Nachweis von DNA-Strangbrüchen, zu denen es in der späten Apop-

tose kommt. Kleine, abgebaute DNA-Fragmente können die Zellkerne über deren Kernporen verlassen, so dass der DNA-Gehalt in den Zellkernen mit fortlaufender Apoptose abnimmt und mit Propidiumiodid nachgewiesen werden kann. Für die Analyse der Apoptose wurden die Zellen in 6-Well-Platten in normalem Kulturmedium ausgesät, nach 24 h mit PBS gewaschen und weitere 24 Stunden mit MEM-Earle (siehe Tab. 2) mit 4 mM L-Glutamin ohne FCS und Phenolrot inkubiert. Dann wurden die Zellen 96 h mit MEM-Earl Kulturmedium für Apoptose- und Proliferationsassays ohne Phenolrot und mit 10 % (v/v) CD-FCS, um den Einfluss exogener Östrogene auszuschließen, und den entsprechenden Substanzen kultiviert. Für die Messung werden 1×10^6 Zellen benötigt, die in 200 - 500 μ l Nicoletti-Lösung resuspendiert wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C und die Messung im FACScalibur.

3.3.2 Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, der durch Porenbildung in den Mitochondrienmembran verursacht wird, ist charakteristisch für die frühe Apoptose des intrinsischen Weges. Der elektrochemische Gradient kann mit Hilfe des lipophilen, kationischen Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 bestimmt werden (Smiley *et al.*, 1991). JC-1 kann sowohl die Plasma- als auch die Mitochondrienmembran passieren und reichert sich im negativ geladenen Inneren der Mitochondrien gesunder Zellen an und bildet dort rot fluoreszierende Aggregate. In apoptotischen Zellen führt das verringerte Membranpotential dazu, dass JC-1 keine Aggregate bilden kann und als grün fluoreszierendes Monomer vorliegt. Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentialverlusts wurde der JC-1 Mitochondrial Membran Detection Kit der Firma AbD Serotec verwendet und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Messung erfolgte im Multidetektions-Mikrotiterplattenleser von Bio-Tek.

3.4 Durchflusszytometrie-Analyse von Zelloberflächenrezeptoren

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen hinsichtlich der Dichte der Rezeptoren auf ihrer Oberfläche analysiert werden. MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR wurden bezüglich des EGF-R, des ERBB2 und des IGF-1R so analy-

siert. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 50 μl HBSS mit 0,1 % Natriumazid, 1,5 % HEPES sowie 2 % FCS resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden jeweils 50 μl Lösung mit dem Primärantikörper gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen drei Mal mit HBSS gewaschen und, falls nötig, mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneutem dreifachem Waschen mit HBSS wurde die Analyse umgehend an einem FACScalibur Durchflusszytometer vorgenommen. Die Ergebnisse der Analyse wurden mit dem Programm CellQuest (Version 3.0) ausgewertet. Bei der Negativkontrolle wurde auf den Primärantikörper verzichtet. Bei jeder Messung wurden 1×10^5 Zellen analysiert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen

Zur Isolierung von RNA aus adhärennten Zellen wurde der RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25 cm^2) ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Isolierung von genomischer DNA aus adhärennten Zellen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR Zellen wurde der Wizard[®] SV Genomic DNA Kit von Promega oder der inuPREP DNA Mini Kit von Analytik Jena verwendet und nach den Herstellerangaben durchgeführt.

3.6 Quantifizierung von Nukleinsäuren

UV-Licht führt zur Anregung zyklisch konjugierter π -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen von DNA und bewirkt den Elektronenübergang in ein nichtbesetztes π -Orbital. Der pH-Wert und die Polarität des umgebenden Lösungsmittels können sowohl die Wellenlängen der Absorptionsmaxima als auch die molaren Extinktionskoeffizienten beeinflussen (Wilfinger *et al.*, 1997).

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde mittels Messung der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}) bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Ab-

sorptionsmaximum besitzen. Hierbei entspricht eine A_{260} von 1,0 einer Konzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ doppelsträngiger DNA. Werte für andere Nucleinsäuren sind in Tab. 13 angegeben. Die Messung ist im Bereich von $A_{260} = 0,1$ bis 1,0 direkt proportional zur Konzentration. Höher konzentrierte Proben wurden entsprechend mit Wasser verdünnt. Die Messung wurde in UV-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm mit Wasser als Referenz durchgeführt. Proteine, die bei einer DNA/RNA-Präparation als Verunreinigung gelten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei A_{280} . Das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} gibt Auskunft über Proteinkontaminationen in der Lösung, wobei der Wert zwischen 1,8 und 2 liegen sollte (Glasel, 1995). Für die Messungen wurde das BioPhotometer 6131 der Firma Eppendorf verwendet.

Tab. 13: Umrechnungsfaktoren zur Bestimmung von Nucleinsäurekonzentrationen durch Absorptionsspektroskopie

Nucleinsäure	$A_{260} = 1$
dsDNA	$\cong 50 \mu\text{g/ml}$
ssDNA	$\cong 37 \mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	$\cong 30 \mu\text{g/ml}$
RNA	$\cong 40 \mu\text{g/ml}$

3.7 Reverse Transkription

Die Reverse-Transkriptase-PCR dient dazu spezifische RNA-Sequenzen zu amplifizieren. Zunächst muss die RNA in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden, was als reverse Transkription (RT) bezeichnet wird (Veres *et al.*, 1987). Dies wird von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen durchgeführt, die einen Primer als Startpunkt benötigen. Es wird ein Oligo-d(T)-Primer verwendet, der mehrere Thymin-Basen enthält, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Somit kann eine DNA-Synthese über die gesamte Länge der RNA stattfinden. Anschließend wird die Probe in eine PCR eingesetzt, in der die gebildete cDNA als *template* dient.

In die RT wurde $1 \mu\text{g}$ RNA eingesetzt und mit $8 \mu\text{l}$ Oligo-d(T)-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) 3 min bei $72 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde der Enzym-Mix (siehe Tab. 14) hinzugegeben und der Ansatz 60 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$

10 min denaturiert. Die entstandene cDNA wurde als *template* in eine PCR eingesetzt.

Tab. 14: Komponenten eines RT-PCR-Ansatzes

Komponente	Einsatz [μ l]	Ausgangskonzentration
RT-Puffer	8	5 x
DTT	4	100 mM
dNTPs (Roche)	4	10 mM
RNase-Inhibitor (Promega)	1	k. A.
SuperScript II (Invitrogen)	2	k. A.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der selektiven *in vitro* Amplifikation von DNA (Saiki *et al.*, 1988). Zwei kurze Oligonukleotide, die Primer, flankieren die zu amplifizierende DNA-Region, *template*, an Strang und Gegenstrang und bilden den Ausgangspunkt der DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase unter Verwendung von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). Der erste Schritt eines PCR-Zyklus ist die Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C. Der zweite Schritt ist die Anlagerung der Primer. Dafür wird die Temperatur auf eine Primer-spezifische Anlagerungstemperatur (*annealing*-Temperatur) gesenkt. Zur Elongation der Primer wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum von 72 °C der verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase erhöht, die vom 3'-Ende der Primer aus den neuen DNA-Strang synthetisiert. Dies geschieht, in dem neue dNTPs über den α -Phosphatrest mit der 3-OH-Gruppe des vorangegangenen dNTPs unter Freisetzung von Pyrophosphat verknüpft werden. Die *Taq*-DNA-Polymerase stammt aus dem Organismus *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988).

Schließlich wird das neu gebildete PCR-Produkt wieder zu Einzelsträngen denaturiert und steht dem nächsten PCR-Zyklus zur Primer-Anlagerung wieder zur Verfügung. Durch eine zyklische Wiederholung dieses Prozesses kann eine exponentielle Amplifikation erreicht werden. In Tab. 15 sind alle Komponenten eines PCR-Ansatzes zur Herstellung eines PCR-Amplikons aufgelistet. Tab. 16 fasst den Ablauf der PCRs für die jeweiligen Gene zusammen. Am Beginn jeder

PCR stand eine initiale Denaturierungsphase von 10 min bei 94 °C, am Ende wurde die Temperatur 10 min bei 72 °C gehalten, um die letzte Elongation auf jede Fall vollständig ablaufen zu lassen. Die in der reversen Transkription gewonnene cDNA aus den Zellen MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR wurde in verschiedenen PCRs eingesetzt. Hierbei wurden Primer eingesetzt, die Sequenzen auf der cDNA der Gene für AIB1, SRC-1, SMRT, N-CoR, PTEN, Aromatase und GPR 30 flankieren. In der semiquantitativen PCR diente die Amplifikation eines Abschnitts der cDNA des Gens *17* als Kontrolle. *17* ist ein Haushaltsgen (*housekeeping-Gen*) und kodiert für ein ribosomales Protein, das in allen Geweben exprimiert wird. Die PCR-Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese (s. u.) aufgetrennt, anschließend dokumentiert und analysiert oder ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 3.9.1). Die DNA für die extern durchgeführten Sequenzierungen wurden durch eine PCR mit genomischer DNA und Primern, die die zu untersuchenden Exons flankieren, generiert. In Tab. 15 ist das Pipettierschema und in Tab. 16 das PCR-Programm für das jeweilige Gen zusammengefasst.

Tab. 15: Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes

Komponente	Einsatz [μ l]	Ausgangskonzentration
H ₂ O	11,025	/
dNTPs	1,2	1 mM
PCR-Puffer	1,5	10 x
DNA- <i>template</i>	0,6	10-100 ng/ μ l
<i>forward</i> -Primer	0,3	20 μ M
<i>reverse</i> -Primer	0,3	20 μ M
<i>Taq</i> -Polymerase	0,075	5 U/ μ l
Gesamtvolumen	15	/

Tab. 16: Parameter der durchgeführten PCRs

Gen	Denaturierung	<i>annealing</i> - Temperatur	Elongation	Zyklen
RT-PCR <i>aib1</i>	30 s, 94 °C	30 s, 57 °C	60 s, 72 °C	22
RT-PCR <i>aromatase</i>	60 s, 94 °C	60 s, 52 °C	120 s, 72 °C	24
RT-PCR <i>gpr30</i>	30 s, 94 °C	30 s, 60 °C	120 s, 72 °C	35
RT-PCR <i>n-cor</i>	30 s, 94 °C	30 s, 58 °C	60 s, 72 °C	24
RT-PCR <i>pten</i>	30 s, 94 °C	60 s, 51 °C	120 s, 72 °C	32
RT-PCR <i>smrt</i>	30 s, 94 °C	30 s, 58 °C	60 s, 72 °C	32
RT-PCR <i>src-1</i>	30 s, 94 °C	30 s, 57 °C	60 s, 72 °C	28
<i>pten</i> Exon 1	50 s, 94 °C	50 s, 55 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 2	50 s, 94 °C	50 s, 52 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 3	50 s, 94 °C	50 s, 53 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 4	50 s, 94 °C	50 s, 50 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 5a	50 s, 94 °C	50 s, 50 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 5b	50 s, 94 °C	50 s, 55 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 6	50 s, 94 °C	50 s, 58 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 7	50 s, 94 °C	50 s, 55 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 8a	50 s, 94 °C	50 s, 51 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 8b	50 s, 94 °C	50 s, 55 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pten</i> Exon 9	50 s, 94 °C	50 s, 58 °C	60 s, 72 °C	45
<i>pik3ca</i> Exon 9	30 s, 94 °C	30 s, 61 – 57 °C <i>touchdown</i> -PCR	60 s, 72 °C	30
<i>pik3ca</i> Exon 20	30 s, 94 °C	30 s, 57 – 50 °C <i>touchdown</i> -PCR	60 s, 72 °C	30

3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarosegelen erlaubt die Auftrennung von DNA nach Größe in einer Matrix aus Agarose, bei der die Konzentration die Maschenweite des Gels bestimmt (McDonnell *et al.*, 1977). Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen gewonnen. Die Agarose wird durch Aufkochen in Pufferlösung gelöst und geliert beim Abkühlen. Durch das Anlegen einer Gleichspannung an horizontale, pufferüberschichtete Gele können die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden, da sie unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten besitzen. Die Agarose-Gelelektrophorese ist reproduzierbar und über einen weiten Größenbereich der DNA besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus (\log_{10}) der Länge des linearen Fragments in Bp und der Wanderungsstrecke. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Molekülen hängt außerdem davon ab, ob sie superhelikal, offen, doppelsträngig, linear oder einzelsträngig vorliegen. Die Nukleinsäure-Banden können durch Farbstoffe wie Ethidiumbromid (EthBr), die zwischen die Basen der DNA interkalieren, nachgewiesen werden. Nach Anregung mit UV-Strahlung ($\lambda = 302 \text{ nm}$) fluoresziert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex als rot-orange leuchtende Bande und erlaubt so eine Analyse und Dokumentation. Zur Auftrennung wurden Gele mit 0,5 – 1,0 % (w/v) Agarose verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde dafür in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und ohne Luftblasen in die Gelkammern mit eingestecktem Kamm gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurde es mit 1 x TBE-Puffer in einer Elektrophoresekammer überschichtet und der Gelkamm gezogen. 10 μl der zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden mit 2 μl 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und 10 μl dieses Gemischs in die Geltaschen pipettiert. Als Referenz diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp Ladder, Invitrogen).

Bei einer Spannung von 85 V dauert ein Lauf ca. 45 min, wobei die Farbbande des DNA-Ladepuffers am schnellsten migriert und so eine Kontrolle der Laufweite und eine eventuelle Anpassung der Parameter ermöglicht. Die Gele wurden anschließend 15 – 20 min im EthBr-Bad gefärbt, in H_2O gewaschen und auf dem UV-Transilluminator mit dem Kodak Digital Science[®] Electrophoresis

Documentation And Analysis System DC120 (Kodak) dokumentiert und ausgewertet.

3.9.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und von PCR-Produkten

Eine Aufreinigung von PCR-Produkten der genomischen DNA, die sequenziert werden sollten, erfolgte mittels des innuPREP PCRpure Kits von Analytik Jena oder des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen. Die RT-PCR Amplifikate von *gpr30* und *pten*, die ebenfalls sequenziert werden sollten, wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des innuPREP Gel Extraction Kit von Analytik Jena nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

3.10 Proteinbiochemische Methoden

3.10.1 Präparation von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten für die Proteinanalytik wurden die Zellpellets zweimal in PBS gewaschen, bei 300 x *g* 5 min zentrifugiert und anschließend in 20 – 500 µl Lysepuffer (CellLytic[®]-M, Sigma-Aldrich), abhängig von der Pelletgröße, resuspendiert. Um den Abbau der Proteine und Dephosphorylierungen zu verhindern, wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) und ein Phosphatase-Inhibitor-Cocktail zugesetzt. Die resuspendierten Pellets wurden anschließend 15 min bei RT und 800 U/min geschüttelt und dann bei 4 °C und 20.000 x *g* 15 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung durchgeführt oder die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.10.2 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford mit Hilfe eines Proteinassays (Bio-Rad) durchgeführt (Bradford, 1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau bildet mit den Seitenketten der Proteine Komplexe, deren Absorptionsmaximum bei $\lambda = 595$ nm liegt. Das Absorptionsverhalten nimmt linear mit der Konzentration der Proteine zu. Zur Ermittlung einer Kalibrierungsgeraden dienen BSA (bovines Serumalbumin)-Lösungen mit verschiedenen, bekannten Konzentrationen. Coomassie Brilliant Blau (Bio-Rad) wurde 1:5 mit H₂O

verdünnt und filtriert. Die Zelllysate wurden 1:20 mit H₂O verdünnt und 50 µl dieser Proben und des Standards wurden mit 2,5 ml der verdünnten Coomassie-Lösung versetzt. Nach 10 – 50-minütiger Inkubation der Proben wurden 350 µl jedes Ansatzes in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte gegeben und bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ im Multidetektions-Mikrotiterplattenleser (Bio-Tek) gemessen. Es wurden Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

3.10.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Größe. SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das an Proteine anlagert und so deren Eigenladung überdeckt. Es entstehen Mizellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. Die Gelmatrix bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE ist in zwei Bereiche eingeteilt: In ein weitporiges Sammelgel und ein engporiges Trenngel, die sich in ihrem Acrylamidgehalt unterscheiden (Laemmli, 1970).

Nach dem Gießen des Trenngels (siehe Tab. 18) zwischen zwei Glasplatten wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Kante zu erzielen. War das Gel fertig polymerisiert, wurde es mit dem Sammelgel (siehe Tab. 17) überschichtet, in welches der Kamm zur Ausformung der Probenaschen gesteckt wurde. Für die SDS-PAGE wurde die Mini-Protean[®] III Elektrophorese Apparatur (Bio-Rad) verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut. Die Proben wurden mit zweifach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 3 min denaturiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis, wurde das Gel mit diesen und dem Molekularmassenmarker (Precision Plus Protein[®] Standards, Bio-Rad) beladen. Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei 80 V und anschließend 60 min bei 150 V in SDS-Elektrophorese-Puffer. Die aufgetrennten Proteine konnten nun im Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und analysiert werden.

Tab. 17: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponente	Einsatz
H ₂ O	3,1 ml
Prosieve 50 Gel Solution	0,5 ml
1,0 mM Tris	1,3 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	4 µl

Tab. 18: Zusammensetzung von Trenngelen mit 10 und 14 % Acrylamid für die SDS-PAGE

Material	10 % Trenngel	14 % Trenngel
H ₂ O	5,3 ml	4,8 ml
Prosieve 50 Gel Solution	2,0 ml	2,5 ml
1,0 mM Tris	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

3.10.4 Western Blot

Beim Western Blot oder Immuno Blot werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinbanden aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und auf eine Membran transferiert, um sie dann durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern nachweisen zu können. Für den Western Blot wurde das Mini Trans-Blot Cell System von Bio-Rad verwendet und nach den Angaben des Herstellers aufgebaut. Auf der zur Anode weisenden Seite des Gels wurde eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm, Hybond-ECL[®], GE Healthcare) aufgelegt. Auf beiden Seiten des Gels wurden je zwei Lagen Filterpapier und je ein Schwamm angeordnet. Die Membran, die Filterpapiere und die Schwämme wurden zuvor mit Transferpuffer (siehe Tab. 1) getränkt und es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Nitrozellulosemembran und Gel gerieten. Das mehrlagige Päckchen wurde in eine Gitterkassette gepackt, die senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingapparatur gebracht wurde, so dass die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte über 60 min bei 100 V. Anschließend diente der vorgefärbte Molekularmassenmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz. Um das Bandenmuster der Proteine nach dem Transfer sichtbar zu machen, wurde die

Membran in einigen Fällen zunächst mit Ponceau-Rot S (Sigma-Aldrich) gemäß des Herstellerprotokolls gefärbt oder direkt der immunologischen Detektion des nachzuweisenden Proteins zugeführt.

3.10.5 Detektion und Visualisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen 60 min bei Raumtemperatur in *blocking*-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Nitrozellulosemembranen drei Mal 10 min mit TBST-Puffer gewaschen, gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 7) in einer 1:1000 oder 1:2000 Verdünnung in einer 5 % BSA-TBST-Lösung bei 4 °C über Nacht. Danach erfolgte, nach wiederholtem Waschen mit TBST, unter gleichen Bedingungen die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen oder Anti-Maus Sekundärantikörper (1:10000 oder 1:20000 in TBST, GE Healthcare, siehe Tab. 8) 1 h bei Raumtemperatur.

Vor der Visualisierung wurden die Membranen dreimal 10 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Sekundärantikörper wurde eine ECL-Lösung (Immobilon[®], Millipore) eingesetzt. Das Reagenz zeigt bei der katalytischen Umsetzung durch Peroxidase eine Chemolumineszenz mit einem Maximum bei $\lambda = 430$ nm, mit der Röntgenfilme belichtet werden können. Es wurden Röntgenfilme der Firma Kodak verwendet, die nach der Exposition in einer Röntgenfilmkassette (Barthel X-Ray GmbH, München), im Röntgenfilmentwickler SRS-101A (Konica) in einer Dunkelkammer entwickelt wurden.

3.10.6 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Um eine Nitrozellulosemembran erneut mit einem Primärantikörper hybridisieren zu können, muss diese Membran von bereits gebundenen Antikörpern befreit werden. Dieser Vorgang wird als *strippen* bezeichnet und wurde mit dem Antibody Stripping Buffer der Firma Uptima Interchim (Bourg-lès-Valence, F) durchgeführt. Die Membranen wurden für 15 min bei RT und 1000 U/min mit diesem Puffer inkubiert, anschließend mit H₂O gespült, erneut geblockt und mit dem neuen Primärantikörper behandelt. Das *Strippen* der Membranen wurde maximal drei Mal pro Nitrozellulosemembran durchgeführt.

3.11 Dokumentation und statistische Analyse

Die Dokumentation und Analyse der Western Blots bzw. der belichteten Röntgenfilme erfolgte mittels Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3).

Agarosegele wurden mit dem Kodak Digital Science[®] Electrophoresis Documentation And Analysis System DC120 fotografiert und mit der Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3) ausgewertet.

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse diente die Software GraphPad Prism (Version 5.0). Zur Varianzanalyse wurde der *one-way* ANOVA-Test und zur Bestimmung der Signifikanz der einzelnen Wertegruppen der Newman Keuls *post-hoc*-Test angewendet.

3.12 Bestimmung der zeitlichen Abhängigkeit der Wirkung von GnRH-I- und -II-Analoga, Gefitinib und Perifosine auf phospho-Akt

Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 % kultiviert, bevor sie mit PBS gewaschen und weitere 24 Stunden mit MEM-Earle mit 4 mM L-Glutamin ohne FCS und Phenolrot inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen mit MEM-Earl Kulturmedium ohne Phenolrot mit 10 % (v/v) CD-FCS, 0,22 % (w/v) NaHCO₃ und 4 mM L-Glutamin (Medium für Apoptose- und Proliferationssassays) kultiviert. Die Behandlung erfolgte mit Gefitinib, Triptorelin und [D-Lys⁶]GnRH-II 15, 30, 45 und 60 min, mit Perifosine 15, 30, 45, 60 min und 72 h. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen, wie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.10.1 beschrieben, abgelöst und der Probenvorbereitung für den Western Blot zugeführt (siehe oben).

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von GnRH-I- und -II-Agonisten auf die PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade

Um zu untersuchen, ob in den verwendeten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR verstärkt phosphoryliertes Akt als ein Mediator der PI3-Kinase/Akt-Signalkaskade vorlag (Abb. 3) und ob die agonistisch wirkenden GnRH-I- und -II-Analoga Triptorelin und [D-Lys⁶]GnRH-II einen Einfluss auf diese Phosphorylierung hatten (Abb. 4), wurden Western Blots durchgeführt.

Aus Abb. 3 wird ersichtlich, dass in den sekundär OHT-resistenten Sublinien keine Veränderung der basalen Akt-Expression im Vergleich zu den parentalen Mammakarzinomzellen MCF-7 und T47D vorlag. In den resistenten Sublinien zeigte sich im Vergleich zu den parentalen Zellen eine deutlich erhöhte Aktivierung von Akt, was durch einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ (phospho-Akt) nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt wurde in fünf unabhängigen Versuchen in fünf verschiedenen Passagen jeder Sublinie beobachtet. Die Phosphorylierung an Thr³⁰⁸ wurde analog untersucht und lieferte vergleichbare Ergebnisse in allen verwendeten Zellen. Abb. 4 zeigt die durch 1×10^{-7} M Triptorelin und 1×10^{-7} M [D-Lys⁶]GnRH-II hervorgerufene Dephosphorylierung von Akt innerhalb von einer Stunde in den resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR. Hierbei wird die zeitliche Abhängigkeit der Dephosphorylierung deutlich, da eine längere Inkubationsdauer zu einer stärkeren Abnahme führte. Die basale Akt-Expression blieb hierbei unverändert. Der

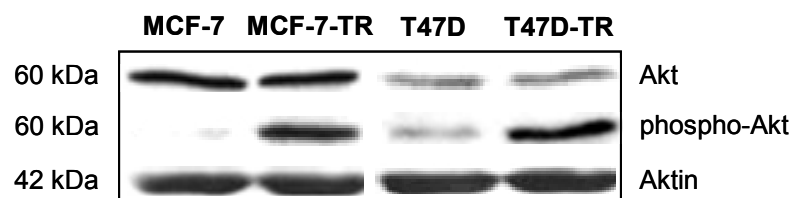


Abb. 3: Western Blot-Nachweis der Akt-Expression und -Phosphorylierung bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR. Beide resistenten Sublinien zeigten eine erhöhte Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ und damit eine verstärkte Aktivität von Akt. Der Nachweis von Aktin fungierte als Ladungskontrolle.

Versuch wurde fünf Mal mit fünf unterschiedlichen Passagen durchgeführt, Abb. 4 zeigt repräsentative Western Blots.

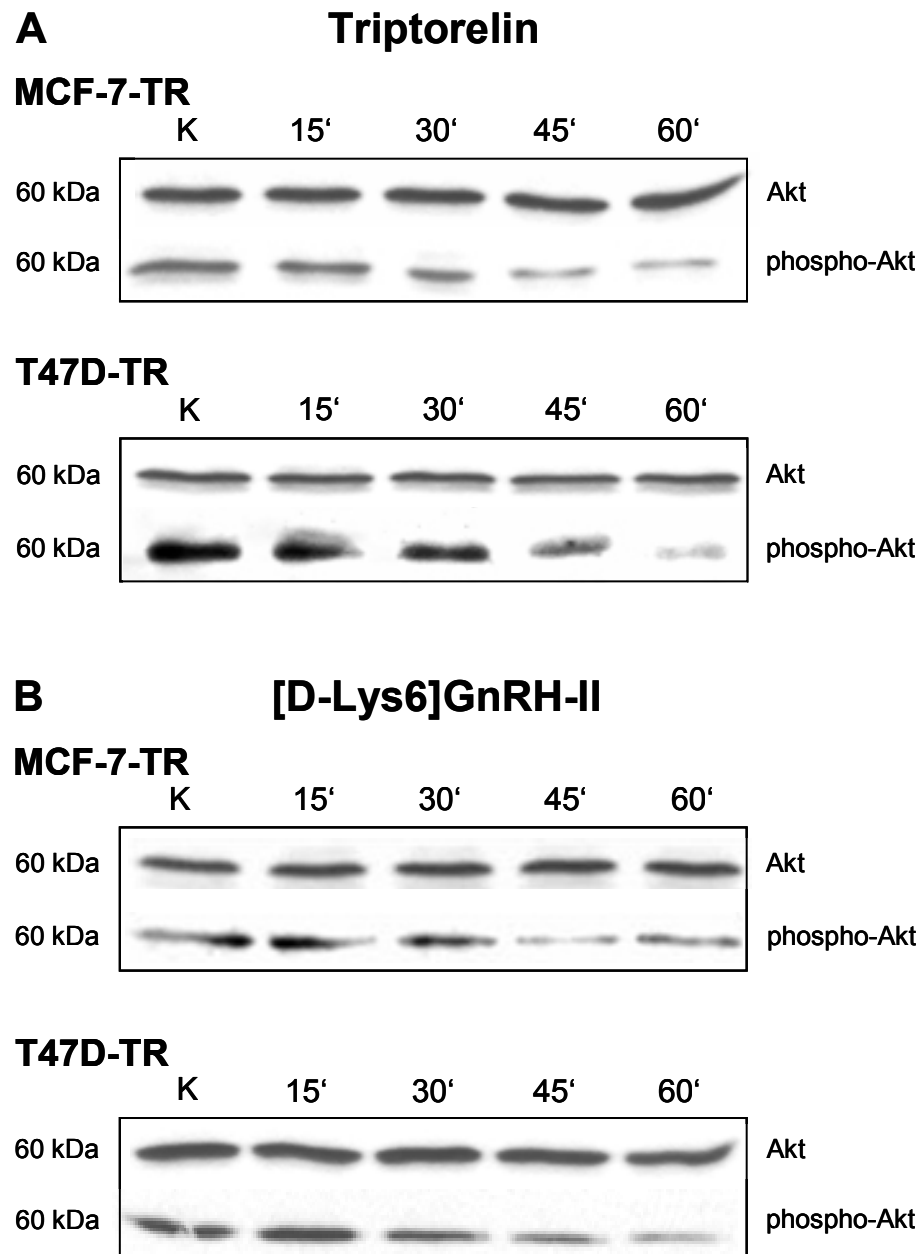
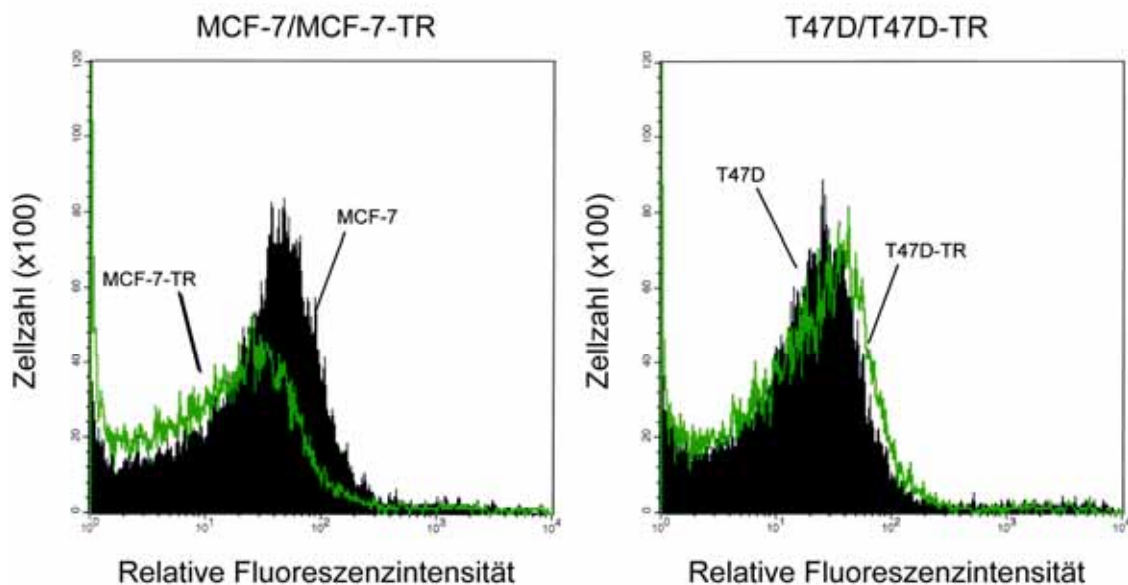


Abb. 4: Western Blots von basalem und phosphoryliertem Akt nach Behandlung mit GnRH-I- und -II-Analoga. (A) Wirkung von 1×10^{-7} M Triptorelin (GnRH-I-Analogon) auf Akt und phospho-Akt bei MCF-7-TR und T47D-TR. (B) Wirkung von 1×10^{-7} M [D-Lys⁶]GnRH-II (GnRH-II-Analogon) auf Akt und phospho-Akt bei MCF-7-TR und T47D-TR. Beide Analoga verringerten innerhalb einer Stunde die Phosphorylierung von Akt; K = Kontrolle, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

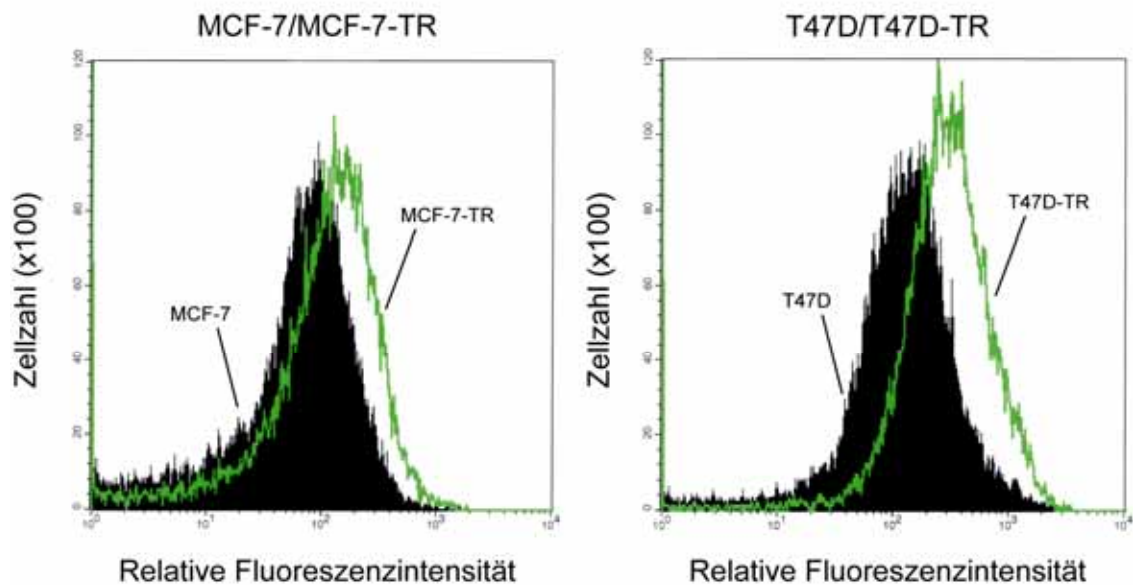
4.2 Bestimmung der Zelloberflächendichte des EGF-Rezeptors, des ERBB2 und des IGF-1-Rezeptors

Um die Dichte des EGF-Rezeptors (ERBB), des ERBB2 (HER-2/neu) und des IGF-1-Rezeptors an der Zelloberfläche von MCF-7 und T47D sowie deren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR zu analysieren, wurden die Zellen nach Antikörpermarkierung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei den OHT-resistenten MCF-7 war eine deutliche Abnahme der Dichte des IGF-1R und des EGF-R zu beobachten. Die Dichte des ERBB2 war im Vergleich zu den parentalen Zellen bei MCF-7-TR erhöht. Bei T47D-TR war die Dichte des EGF-R leicht und die des ERBB2 deutlich gegenüber T47D erhöht. Die Dichte des IGF-1R war deutlich reduziert gegenüber der parentalen Zelllinie. Repräsentative Histogramme der Analysen zeigt die Abb. 5.

A EGF-R



B ERBB2



C IGF-1R

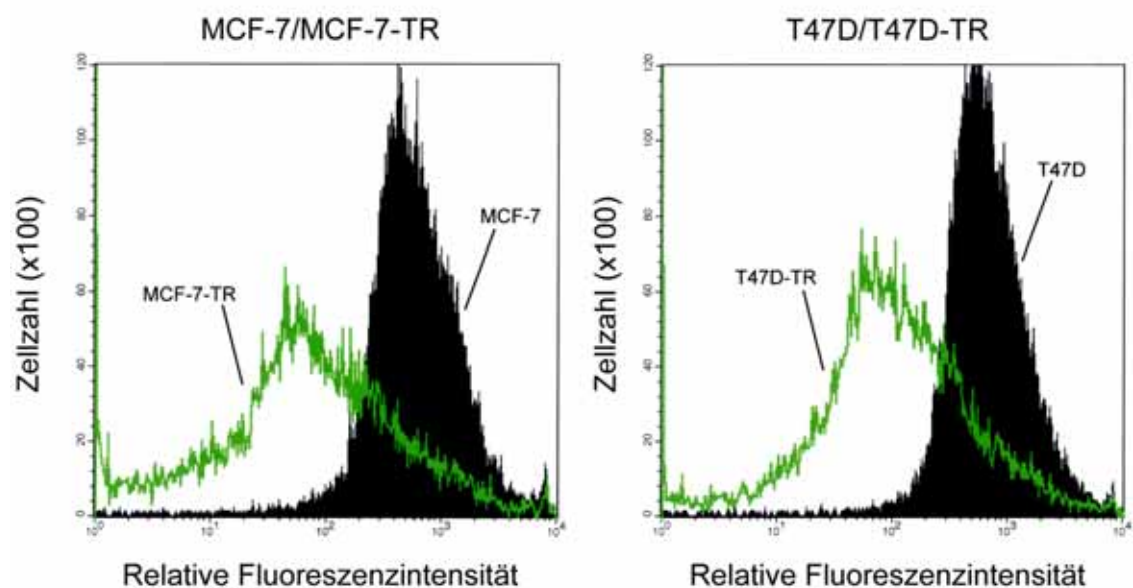


Abb. 5: Dichte des EGF-Rezeptors, des ERBB2 und des IGF-1-Rezeptors auf der Zelloberfläche. Nach Markierung mit spezifischen Antikörpern wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Verteilung des EGF-Rezeptors bei MCF-7 im Vergleich mit MCF-7-TR und bei T47D im Vergleich mit T47D-TR. (B) Dichte des ERBB2 an der Zelloberfläche parentaler und OHT-resistenter Zellen. (C) Zelloberflächendichte des IGF-1R. Die dargestellten Histogramme zeigen repräsentative Ergebnisse dreier unabhängiger Untersuchungen. In jedem Experiment wurden 1×10^5 Zellen analysiert. MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien, EGF-R = *epidermal growth factor receptor*, ERBB2 = *erythroblastic leukemia viral (v-erb-b2) oncogene homolog 2*, IGF-1R = *insulin-like growth factor receptor*.

4.3 Western Blot- und PCR-Analyse von GPR30, Aromatase, N-CoR, SMRT sowie SRC-1 und AIB1

Um die nicht-genomische und die genomische Signaltransduktion der Östrogen-abhängigen Wachstumsregulation vergleichend zu analysieren, wurde die Expression des Membran-assoziierten Östrogenrezeptors GPR30 und der zellulären Aromatase mittels RT-PCR und Western Blot untersucht. Außerdem wurde die Expression der nukleären Co-Repressoren N-CoR und SMRT sowie der nukleären Co-Aktivatoren SRC-1 und AIB1/SRC-3 mittels RT-PCR und Western Blot untersucht, um zu analysieren, ob hinsichtlich dieser Co-Faktoren Unterschiede zwischen parentalen und OHT-resistenten Zellen vorlagen. Bei den dargestellten Diagrammen der statistischen Auswertung repräsentieren die einzelnen Säulen den Mittelwert aller Ergebnisse der durchgeführten Versuche, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an (*standard error of the mean*, SEM).

4.3.1 GPR30

Aus Abb. 6 wird deutlich, dass in beiden OHT-resistenten Sublinien die Expression des GPR30 deutlich vermindert war. Bei MCF-7 und MCF-7-TR war der

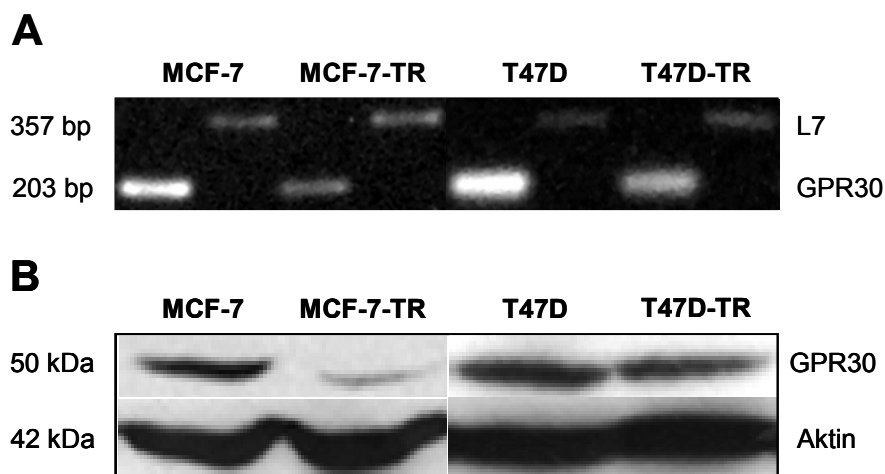


Abb. 6: Expression von GPR30 in parentalen MCF-7 und T47D Zellen sowie deren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR. (A) Mit EthBr gefärbte Agarosegele von RT-PCR Ansätzen. Die Expression von *l7* fungiert als externer Standard. (B) Western Blot von GPR30 und der Ladungskontrolle Aktin. Die Abbildung repräsentiert Ergebnisse von drei unabhängigen Analysen mit drei unterschiedlichen Passagen.

Unterschied wesentlich stärker ausgeprägt als bei T47D und T47D-TR. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden durch die der Western Blots bestätigt. Die Abb. 6 zeigt repräsentative Ergebnisse von Versuchen, die mindestens drei Mal mit drei unterschiedlichen Passagen durchgeführt wurden.

4.3.2 Nukleäre Co-Aktivatoren AIB1/SRC-3 und SRC-1

Bei der Expressionsanalyse mittels RT-PCR zeigte sich in der statistischen Auswertung in beiden OHT-resistenten Sublinien hinsichtlich der *aib1/src-3* Expression kein signifikanter Unterschied gegenüber den parentalen Zellen, deren Werte zur besseren Vergleichbarkeit auf eins normiert wurden (Abb. 7 A und B) (*aib1*: MCF-7-TR: $0,83 \pm 0,09$, n. s. vs. MCF-7; T47D-TR: $0,89 \pm 0,34$, n. s. vs. T47D). Die mRNA des Co-Aktivatoren SRC-1 war bei MCF-7-TR im Ver-

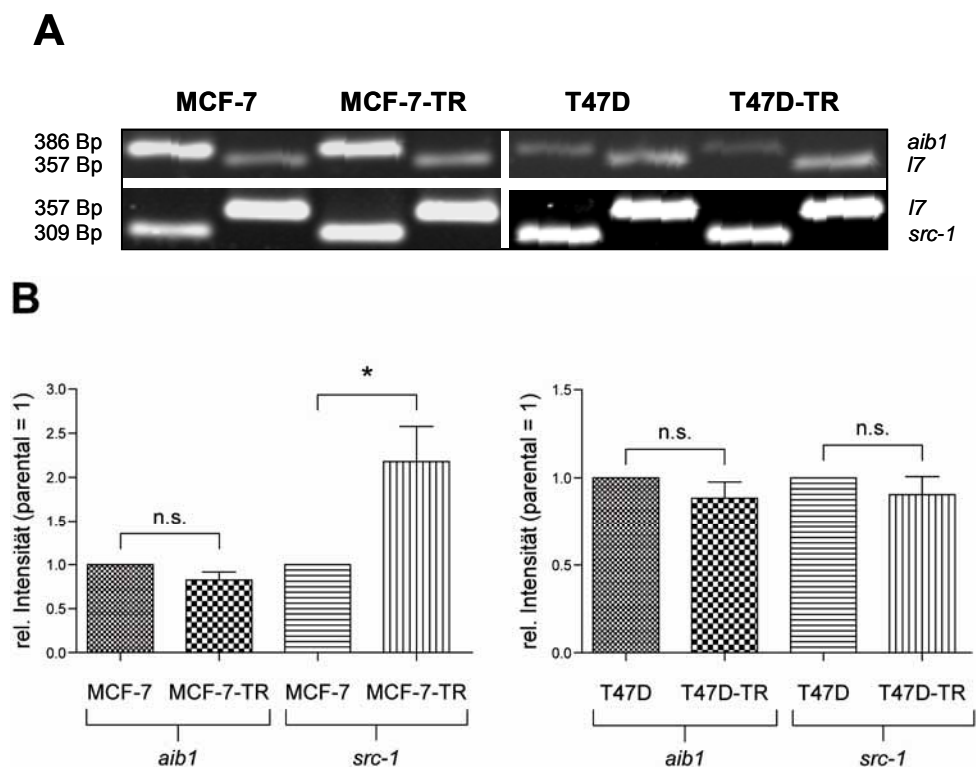


Abb. 7: RT-PCR-Analyse der nukleären Co-Aktivatoren AIB1/SRC-3 und SRC-1 und statistische Auswertung. (A) Repräsentative Agarosegele von RT-PCR-Ansätzen. (B) Statistische Auswertung von 15 verschiedenen RT-PCR Ansätzen fünf verschiedener Passagen von MCF-7 und MCF-7-TR bzw. T47D und T47D-TR. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der parentalen Zellen auf eins normiert. *** = $p < 0,001$ vs. Kontrolle, n. s. = nicht signifikant vs. Kontrolle, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM), MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM).

gleich zu MCF-7 signifikant stärker exprimiert (*src-1*: MCF-7-TR: $2,18 \pm 0,40$, $p < 0,001$ vs. MCF-7). Bei T47D-TR waren dagegen keine signifikanten Änderungen im Vergleich zu den parentalen Zellen zu erkennen (*src-1*: T47D-TR: $0,91 \pm 0,32$, n. s. vs. T47D).

Mittels Western Blot-Analyse sollten die Ergebnisse der RT-PCR Analyse verifiziert werden. Es wurden hierzu bei MCF-7-TR zehn voneinander unabhängige Analysen mit fünf verschiedenen Passagen und drei verschiedenen Anti-AIB1-Antikörpern sowie zwei verschiedenen Anti-SRC-1-Antikörpern durchgeführt. Bei AIB1 ergaben fünf Blots auswertbare Ergebnisse, hierbei wurden bei zwei Blots Banden eines Proteins mit der relativen Molekülmasse 100 kDa, bei zwei Blots Banden mit der Masse von 75 kDa und bei einem Blot Banden mit der Masse von 130 kDa detektiert. Das als Positivkontrolle aufgetragene Lysat aus BG-1 Zellen führte einmal zu Banden entsprechend einer Laufweite der Masse von 75 kDa und einmal der Masse von 100 kDa und lief parallel mit den detektierten Banden der anderen Zellen. Laut Literatur hat AIB1 eine relative Molekülmasse von 155 - 160 kDa (Anzick *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 1997). Die PC-gestützte, densitometrische, statistische Auswertung der Western Blot-Daten ergab ein recht uneinheitliches Bild bezüglich der Expressionsunterschiede zwischen parental MCF-7 und OHT-resistenten MCF-7-TR. Die Durchschnittswerte aller erfassten Messwerte ergeben eine Steigerung der Expression bei MCF-7-TR, die allerdings nicht signifikant ist. Bei SRC-1 konnten acht Blots ausgewertet werden. Bei sechs Blots lagen die Banden im Bereich der relativen Molekülmassen von 70 - 75 kDa, bei einem Blot bei der Masse von 130 kDa und bei einem bei einer von 60 kDa. Laut Literatur soll die relative Molekülmasse bei 160 kDa liegen (Takeshita *et al.*, 1996). Die Daten zeigen auch hier ein uneinheitliches Bild, aber die SRC-1 Expression sinkt über alle Werte gemittelt bei MCF-7-TR. Diese Veränderung ist allerdings nicht signifikant. Bei T47D und T47D-TR ergab die Analyse ähnlich inhomogene Ergebnisse und die Western Blots zeigen Banden von Proteinen mit den gleichen schwankenden relativen Molekülmassen für AIB1 und SRC-1 wie die bei MCF-7 und MCF-7-TR. Die Durchschnittswerte ergeben hier bei T47D-TR für beide nukleäre Co-Aktivatoren nicht signifikante Expressions-Reduzierungen.

4.3.3 Nukleäre Co-Repressoren N-CoR und SMRT

Bei der Analyse der Expression von nukleären Co-Repressoren mittels RT-PCR zeigte sich in beiden OHT-resistenten Sublinien eine signifikant verminderte Expression von *n-cor* im Vergleich zu den parentalen Zellen (*n-cor*: MCF-7-TR: $0,72 \pm 0,05$, $p < 0,05$ vs. MCF-7; T47D-TR: $0,80 \pm 0,07$, $p < 0,01$ vs. T47D). Bei *smrt* zeigte sich bei MCF-7-TR im Vergleich zu den parentalen Zellen eine signifikant gesteigerte Expression (*smrt*: MCF-7-TR: $1,45 \pm 0,19$, $p < 0,001$ vs. MCF-7). Bei T47D-TR ergaben die Analysen eine geringfügig verminderte Expression, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (*smrt*: T47D-TR: $0,85 \pm 0,07$, n. s. vs. T47D). Die Ergebnisse sind in Abb. 8 dargestellt. Nach Durchfüh-

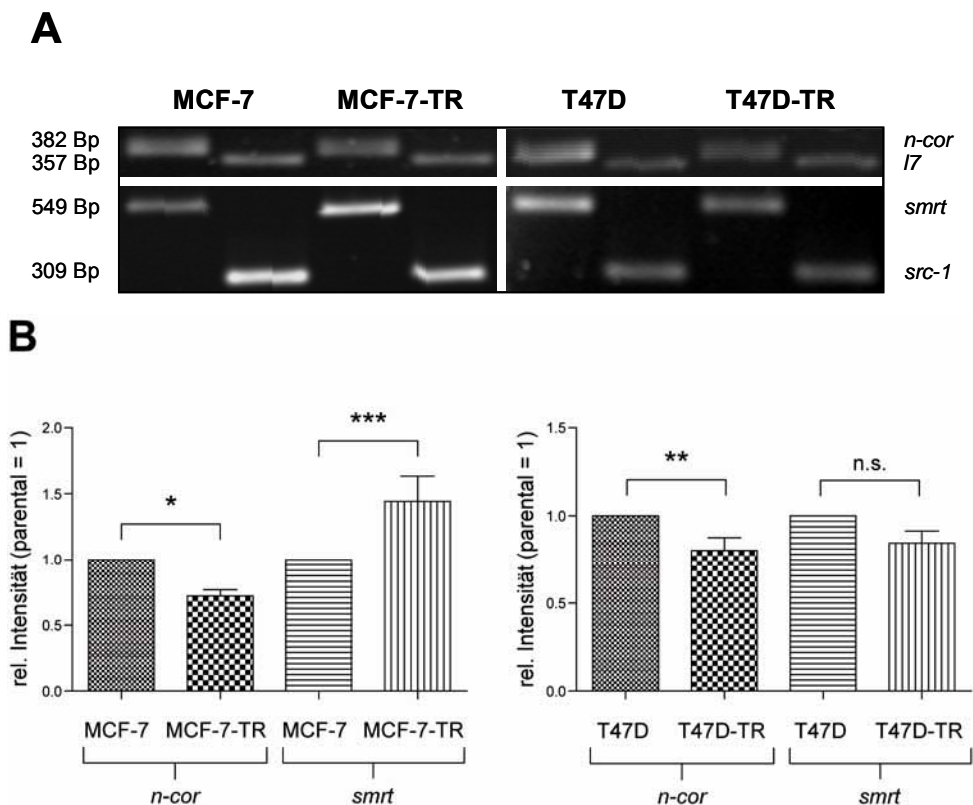


Abb. 8: RT-PCR-Analyse der nukleären Co-Repressoren N-CoR und SMRT. (A) Repräsentative Agarosegelen von RT-PCR-Ansätzen (B) Statistische Auswertung von 15 verschiedenen RT-PCR Ansätzen fünf verschiedener Passagen von MCF-7 und MCF-7-TR bzw. T47D und T47D-TR. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der parentalen Zellen auf eins normiert. *** = $p < 0,001$ vs. Kontrolle, ** = $p < 0,01$ vs. Kontrolle, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, n. s. = nicht signifikant vs. Kontrolle, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM), MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM).

rung der RT-PCR wurden auch fünf Western Blots mit drei unterschiedlichen Passagen mit Antikörpern gegen N-CoR und SMRT durchgeführt, die jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten.

4.3.4 Aromatase

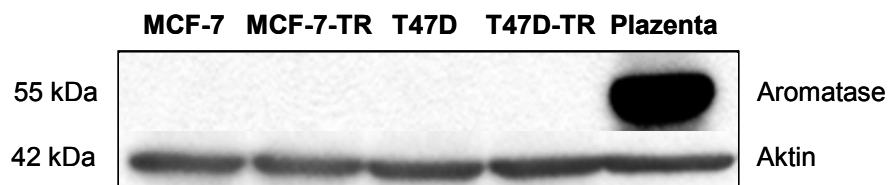


Abb. 9: Western Blot-Nachweis von Aromatase bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR. In keinem der untersuchten Zelltypen konnte Aromatase nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein Homogenisat aus humanem Plazentagewebe aufgetragen.

Mittels Western Blot konnte Aromatase in mehreren unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Passagen nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 9). In der ebenfalls durchgeführten RT-PCR zeigte sich eine sehr geringe Expression (nicht gezeigt).

4.4 Expression wichtiger Mediatoren der ERBB/MAPK ERK1/2- und der PI3K/Akt-Signaltransduktion

4.4.1 PTEN

Um herauszufinden, ob Änderungen der Expression von PTEN in unserem Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz eine Rolle spielen, wurde dessen Expression mittels RT-PCR und Western Blot analysiert. Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse, die keinen Unterschied in der Expression zwischen parentalen Zellen und OHT-resistenten Sublinien zeigten. Abb. 10 zeigt

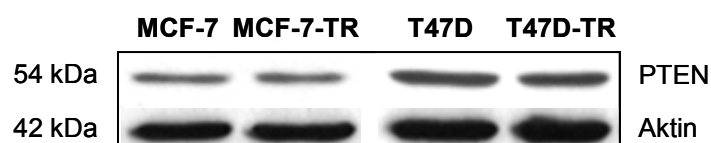


Abb. 10: Western Blot-Nachweis von PTEN bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR. In parentalen Zellen und resistenten Sublinien war jeweils kein Unterschied in der Expression von PTEN zu erkennen.

repräsentative Western Blots mehrerer unabhängiger Versuche mit fünf verschiedenen Passagen. Die RT-PCR Ergebnisse sind nicht dargestellt.

4.4.2 CTMP

Um eventuelle Unterschiede hinsichtlich der Expression von CTMP zwischen MCF-7 und MCF-7-TR bzw. T47D und T47D-TR zu analysieren, wurde die Expression in allen vier Zelltypen mittels Western Blot untersucht, Abb. 11 zeigt repräsentative Bilder. Man erkennt, dass die Expression von CTMP bei MCF-7-TR im Vergleich zu MCF-7 deutlich runterreguliert war. Bei T47D und T47D-TR sind keine Unterschiede in der Expression zu erkennen. Die Ladungskontrolle Aktin zeigt, dass in den untereinander verglichenen Spuren des Blots gleiche Mengen Protein eingesetzt wurden.

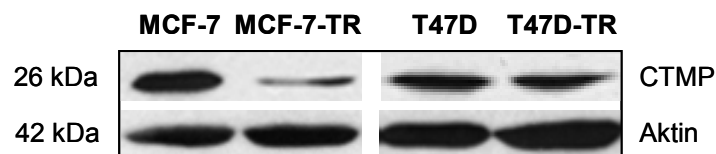


Abb. 11: Nachweis der Expression von CTMP mittels Western Blot bei MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR. Der Versuch wurde drei Mal mit Lysat aus drei unterschiedlichen Passagen durchgeführt, die Abbildung zeigt repräsentative Abbildungen dieser Western Blots. MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

4.4.3 PDK1 und phospho-PDK1

Um die basale Expression und die Phosphorylierung von PDK1 an Ser²⁴¹ zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Eine verstärkte Phosphorylierung der PDK1 hat eine erhöhte Aktivität und damit eine stärkere Phosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ zur Folge. Diese könnte indirekt zu einer stärkeren Phosphorylierung von Akt an Ser⁴⁷³ beitragen, da zur vollständigen Aktivierung von Akt beide genannten Aminosäurereste phosphoryliert sein müssen (Alessi *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 1999). Eine solche verstärkte Aktivierung ist auch in unseren Zellen vorstellbar. Repräsentative Western Blots sind in Abb. 12 dargestellt. In den MCF-7-TR Zellen zeigte sich im Vergleich zu den parentalen Zellen eine geringfügig verringerte Expression der basalen PDK1, was sich auch in der phosphorylierten Form widerspiegelt. In den T47D-TR Zellen war dagegen die Expression der PDK1 im Vergleich zu den parentalen Zellen deutlich gesteigert und dementsprechend lag auch mehr PDK1 in phosphorylierter Form vor. Die Western Blots wurden fünf Mal mit fünf verschiedenen Passagen jeder Zelllinie durchgeführt. Hierbei wurde drei Mal der Antikörper gegen die basale PDK1 als erstes eingesetzt und zwei Mal der gegen die phosphorylierte Form gerichtete, um Fehlinterpretationen durch, eventuell nach dem *stripping* der Membran noch haftende, Antikörper gegen die jeweilige andere Form zu vermeiden.

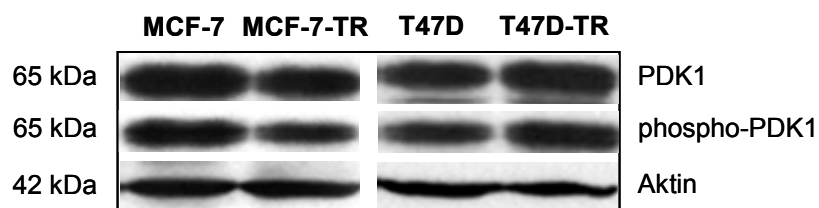


Abb. 12: Western Blot zum Nachweis der Expression und der Phosphorylierung von PDK1. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder der durchgeführten Western Blots mit Aktin als Ladungskontrolle, MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

4.4.4 MAPK ERK1/2

Um die basale Expression und die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 an Thr²²² zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. In Abb. 13 sind repräsentative Western Blots aus fünf verschiedenen Versuchen mit fünf unterschiedlichen Passagen abgebildet. Bei der basalen Expression von ERK1/2 sowie bei der phosphorylierten Form gab es zwischen MCF-7 und MCF-7-TR keine Unterschiede. Bei T47D war die Expression basaler ERK1 im Vergleich zu T47D-TR geringfügig stärker, bei ERK2 war es umgekehrt. Bei T47D-TR waren ERK1 und ERK2 wesentlich stärker phosphoryliert als bei den parentalen T47D.

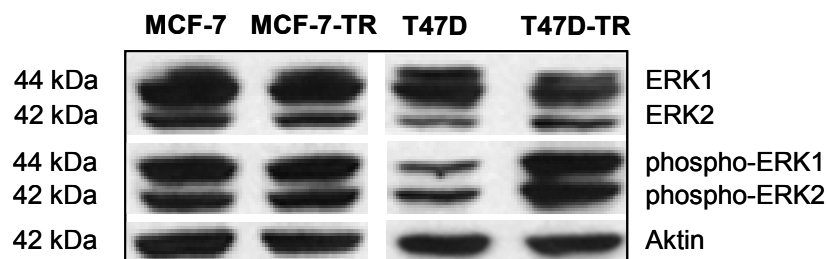


Abb. 13: Western Blot von basaler und phosphorylierter MAPK ERK1/2. Die Abbildung zeigt Western Blots parentaler Mammakarzinomzellen MCF-7 und T47D sowie OHT-resistenter Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR, wobei Aktin als Ladungskontrolle diente.

4.5 Sequenzierung wichtiger Mediatoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion und der RT-PCR-Amplifikate von *pten* und *gpr30*

Um zu untersuchen, ob in den verwendeten Zellen in den kodierenden DNA-Sequenzen der katalytischen Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), p110 α , und von *pten*-Mutationen vorliegen, die eventuell einen Einfluss auf die Funktion des jeweiligen Moleküls haben, wurden die entsprechenden Bereiche der genomischen DNA von MCF-7 und T47D und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR sequenziert. Außerdem wurden die RT-PCR-Amplifikate der Analyse von *pten* und *gpr30* sequenziert, um zu verifizieren, dass die korrekten Sequenzen bei der RT-PCR (siehe Abschnitte

4.3.1 und 4.4.1) amplifiziert und analysiert wurden. Hierbei wurden als Referenz nur die Amplifikate von MCF-7 untersucht.

4.5.1 Katalytische Untereinheit der PI3K

Das Gen für die katalytische Untereinheit p110 α der PI3K, *pik3ca*, trägt bei Brustkrebs sehr häufig Mutationen (Bachman *et al.*, 2004). 75 % aller Mutationen liegen dabei in Exon 9 (helikale Domäne) und in Exon 20 (katalytische Domäne). Daher beschränkte sich die Sequenzierung auf diese beiden Exons, es wurden beide DNA-Stränge (3'-5' und 5'-3') untersucht. Durch Vergleich mit der Referenz-Sequenz konnten bei MCF-7 und MCF-7-TR keine Mutationen nachgewiesen werden, bei T47D und T47D-TR bestätigte sich die bereits in der Literatur beschriebene Transition von Adenin durch Guanin an Position 3140 der gesamten kodogenen Sequenz (Bachman *et al.*, 2004; Volinia *et al.*, 1994). Diese Mutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Histidin durch Arginin. Die ermittelten Sequenzen sind im Anhang (siehe 7.1) aufgeführt.

4.5.2 PTEN

Wie in Abschnitt 1.5.2 erwähnt, spielen deaktivierende *pten*-Mutationen zum Beispiel beim Endometriumkarzinom eine große Rolle und führen zur Überaktivierung von Akt. Um einen möglichen Beitrag zur Akt-Überaktivierung einer Mutation bei *pten* in unserem Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz zu untersuchen, wurden alle Exons des Gens für PTEN sequenziert. Es wurden der kodogene und der nicht-kodogene Strang untersucht. Beide OHT-resistenten Sublinien zeigten im Vergleich zu den parentalen Zellen keine Unterschiede und es wurden auch keine Mutationen im Vergleich zur Referenzsequenz aus der Literatur festgestellt (Li *et al.*, 1997). Die ermittelten Sequenzen sind im Anhang (siehe 7.1) aufgeführt.

4.5.3 RT-PCR Amplifikate von *pten* und *gpr30*

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen der RT-PCR Amplifikate von *pten* zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit den theoretisch ermittelten Sequenzen (Li *et al.*, 1997). Auch bei *gpr30* stimmten die Sequenzen mit Literaturdaten ü-

berein (Strausberg *et al.*, 2002). Die ermittelten Sequenzen sind im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

4.6 Effekte verschiedener Inhibitoren und Antagonisten auf die Proliferation und die Induktion von Apoptose in MCF, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR

MCF, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR wurden mit verschiedenen Inhibitoren und Antagonisten behandelt, um diese bezüglich ihrer proliferationsinhibierenden Wirkung und ihrem Potential bezüglich der Induktion von Apoptose zu testen. Hierzu wurden Proliferationsassays mit alamarBlue® (siehe 3.2) und Apoptoseassays nach Nicoletti bzw. JC-1 Apoptoseassay durchgeführt (siehe 3.3.1 und 3.3.2).

Die getesteten Substanzen wurden alleine oder in Kombination mit OHT eingesetzt. Im Medium der Kontrollen der resistenten Sublinien befand sich $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT, da dies auch im Standard-Kulturmedium enthalten war. Wenn die verschiedenen Inhibitoren und Antagonisten als Einzelsubstanzen getestet werden sollten, wurde auf diesen Zusatz im Medium verzichtet. Die Lösungsmittel der verwendeten Substanzen, Ethanol, DMSO und PBS, wurden in den entsprechenden Konzentrationen in ihrer Wirkung auf Proliferation und Induktion von Apoptose untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Einflüsse festgestellt werden, so dass ein Beitrag zur jeweiligen Wirkung der Substanz ausgeschlossen werden kann. Außerdem wurde zumindest bei einem Versuch jeder Reihe eine Kontrolle mit dem Anthracyclin Doxorubicin mitgeführt, welches bei der Chemotherapie verschiedener Karzinome als Zytostatikum eingesetzt wird (Arcamone *et al.*, 1969; Lown, 1993). Doxorubicin löste in allen Versuchen in allen verwendeten Zelllinien signifikant Apoptose aus und inhibierte signifikant die Proliferation. Die Ergebnisse für die Lösungsmittel und Doxorubicin werden nicht gezeigt. Die Ergebnisse der Proliferations- und Apoptoseassays sind als Säulendiagramme dargestellt. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert aller Ergebnisse der durchgeführten Versuche, der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwerts an (*standard error of the mean*, SEM).

4.6.1 4-Hydroxytamoxifen (OHT) und Fulvestrant

Um die aus der Literatur bekannte Induktion von Apoptose und Proliferationsinhibition durch OHT bei MCF-7 und T47D nachzuvollziehen, wurden die Zellen verschiedenen OHT-Konzentrationen ausgesetzt und diese dann mittels Nicoletti-Assay und alamarBlue®-Proliferationsassay analysiert (Budtz, 1999; Gunthert *et al.*, 2005; Mouridsen *et al.*, 1978). Außerdem sollte die Resistenz ge-

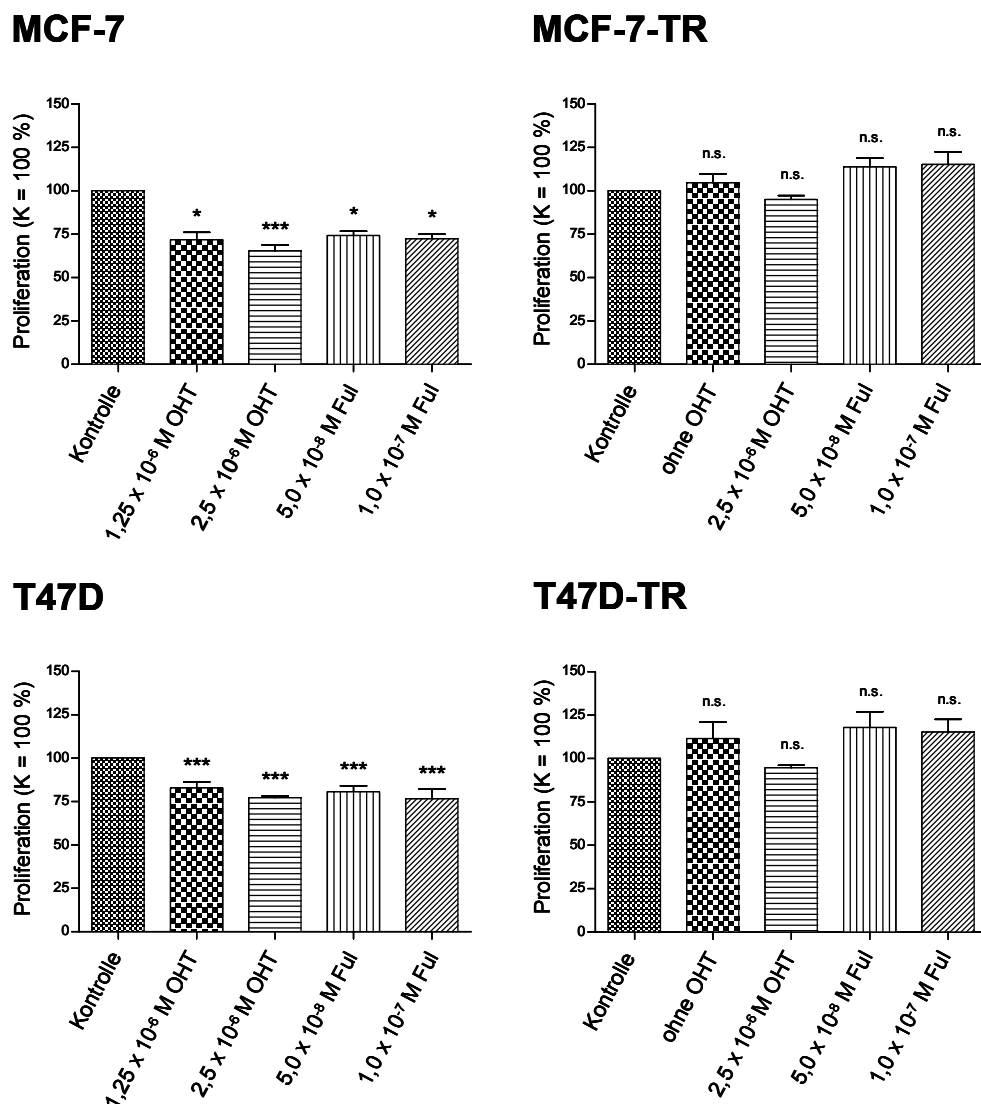


Abb. 14: Einfluss von Antiöstrogenen auf die Zellproliferation parentaler (MCF-7 & T47D) und sekundär OHT-resistenter (MCF-7-TR & T47D-TR) Mammakarzinomzellen. Die Abbildung zeigt die Durchschnittswerte aller Ergebnisse der alamarBlue®-Proliferationsassays als Säulendiagramme. Kontrolle bei parentalen Zellen: Medium ohne Antiöstrogene, Kontrolle bei resistenten Sublinien: Medium mit 1,25 x 10⁻⁶ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen, Ful = Fulvestrant; *** = p<0,001 vs. Kontrolle, * = p<0,05 vs. Kontrolle, n. s. = nicht signifikant vs. Kontrolle, Fehlerbalken = standard error of the mean (SEM).

genüber OHT in den Sublinien mit entwickelter Antiöstrogenresistenz, MCF-7-TR und T47D-TR, ebenfalls erneut demonstriert werden (Gunthert *et al.*, 2005). Die Effekte des reinen Antiöstrogens Fulvestrant auf Proliferation und Induktion von Apoptose wurden ebenfalls untersucht.

Proliferation

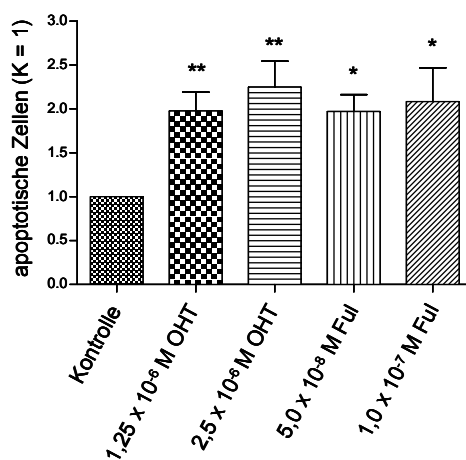
Um die Wirkung von OHT und Fulvestrant hinsichtlich einer Proliferationsinhibition in parental Mammakarzinomzellen und ihren OHT-resistenten Sublinien zu untersuchen, wurde ein alamarBlue®-Proliferationsassay durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen 96 Stunden mit der jeweiligen Substanz inkubiert und gemäß Abschnitt 3.2 vermessen. Die Ergebnisse aus mindestens drei verschiedenen Versuchen mit mindestens drei unterschiedlichen Passagen sind in Abb. 14 in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Bei MCF-7 zeigten sowohl OHT als auch Fulvestrant signifikante proliferationsinhibierende Effekte (MCF-7: $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT: $71,72 \% \pm 4,28 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $65,27 \% \pm 3,53 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: $74,19 \% \pm 2,52 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $72,28 \% \pm 2,68 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Eine Verdopplung der OHT-Konzentration, im Vergleich zur Kontrollgruppe, auf $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT, und auch der Einfluss von Fulvestrant wirkten sich nicht hemmend auf die Proliferation von MCF-7-TR Zellen aus. Ohne OHT und mit Fulvestrant wuchsen die resistenten Zellen geringfügig besser, diese Proliferationssteigerung ist allerdings nicht signifikant (MCF-7-TR: Ohne OHT: $104,6 \% \pm 5,07 \%$, n. s. vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $94,95 \% \pm 2,39 \%$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: $113,7 \% \pm 5,09 \%$, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $115,1 \% \pm 7,31 \%$, n. s. vs. Kontrolle). Bei T47D zeigten beide Antiöstrogene in jeweils beiden eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Inhibition der Proliferation (T47D: $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT: $82,83 \% \pm 3,43 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $77,19 \% \pm 1,17 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: $80,54 \% \pm 3,57 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $76,57 \% \pm 5,67 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Bei T47D-TR zeigte sich ein nahezu identisches Bild im Vergleich zu MCF-7-TR: Ohne OHT und mit beiden eingesetzten Fulvestrant-Konzentrationen stieg die Proliferation nicht signifikant, unter dem Einfluss von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT sank sie ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT

(T47D-TR: Ohne OHT: 111,4 % \pm 9,51 %, n. s. vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: 94,53 % \pm 1,53 %, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: 117,8 % \pm 9,18 %, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: 115,2 % \pm 7,35 %, n. s. vs. Kontrolle).

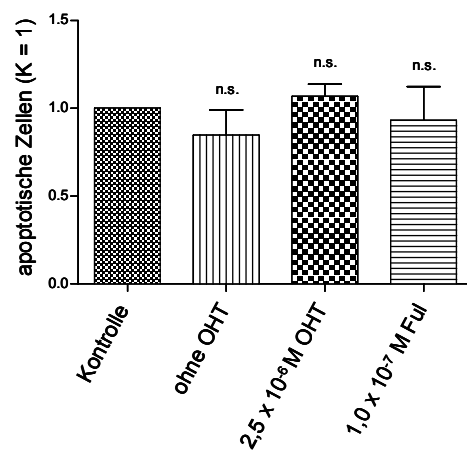
Apoptose

Um zu untersuchen, welche Rolle apoptotische Vorgänge bei der proliferation-

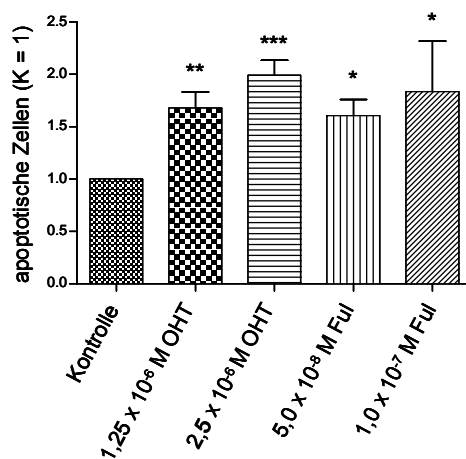
MCF-7



MCF-7-TR



T47D



T47D-TR

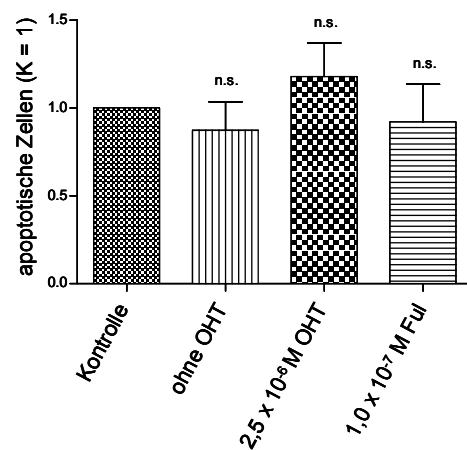


Abb. 15: Induktion von Apoptose bei MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR durch OHT und Fulvestrant. Dargestellt sind Säulendiagramme, die die Mittelwerte der jeweiligen Ergebnisse aus den Nicoletti-Apoptoseassays repräsentieren. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Prozentwerte der Kontrollen auf eins normiert. Kontrolle bei parentalen Zellen: Medium ohne Antiöstrogene, Kontrolle bei resistenten Sublinien: Medium mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen, Ful = Fulvestrant *** = $p < 0,001$ vs. Kontrolle, ** = $p < 0,01$ vs. Kontrolle, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle, n. s. = nicht signifikant vs. Kontrolle, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM), MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

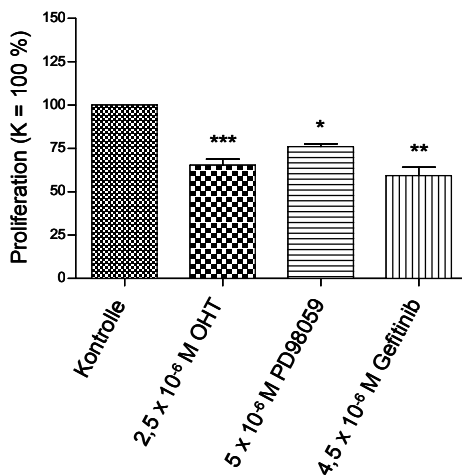
sinhibierenden Wirkung von OHT und Fulvestrant spielen, wurden die Zellen ebenfalls 96 Stunden mit den jeweiligen Substanzen behandelt und nach der in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Methode nach Nicoletti analysiert. Die Resultate aus sechs voneinander unabhängigen Versuchen mit sechs unterschiedlichen Passagen sind in Abb. 15 in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Bei MCF-7 induzierten sowohl OHT als auch Fulvestrant in beiden eingesetzten Konzentrationen Apoptose. Dies geschah konzentrationsabhängig, die Steigerungen bei Verdopplung der Konzentrationen sind allerdings nicht signifikant (MCF-7: $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,98 \pm 0,22$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $2,25 \pm 0,29$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: $1,97 \pm 0,19$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $2,08 \pm 0,39$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Eine Verdopplung der OHT-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($2,5 \times 10^{-6}$ M OHT) führte bei MCF-7-TR zu einer nicht signifikanten Zunahme der Apoptose. Unter dem Einfluss von 1×10^{-7} M Fulvestrant und ohne OHT waren die Zellen im Vergleich zur Kontrolle etwas weniger apoptotisch, was allerdings ebenfalls keine signifikanten Änderungen sind (MCF-7-TR: Ohne OHT: $0,85 \pm 0,14$, n. s. vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,07 \pm 0,07$, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $0,93 \pm 0,19$, n. s. vs. Kontrolle). Bei T47D zeigten sich Parallelen zu MCF-7, allerdings lag die Apoptoserate insgesamt etwas niedriger als bei MCF-7. Hierbei zeigte sich eine Konzentration von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT am wirkungsvollsten. Es ist eine nicht signifikante Konzentrationsabhängigkeit erkennbar (T47D: $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,68 \pm 0,16$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,99 \pm 0,14$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 5×10^{-8} M Fulvestrant: $1,61 \pm 0,15$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $1,84 \pm 0,48$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Bei T47D-TR lösten weder OHT noch Fulvestrant Apoptose aus. Ohne OHT und unter dem Einfluss von 1×10^{-7} M Fulvestrant nahm die Apoptoserate nicht signifikant ab, bei $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT nicht signifikant zu (T47D-TR: Ohne OHT: $0,87 \pm 0,16$, n. s. vs. Kontrolle, $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,18 \pm 0,16$, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M Fulvestrant: $0,92 \pm 0,22$, n. s. vs. Kontrolle).

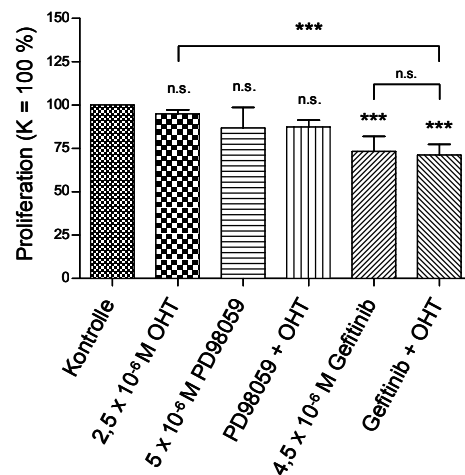
4.6.2 Hemmung des ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionswegs

Um die Effekte der Hemmung der mitogenen Signaltransduktion zu analysieren, wurde der Einfluss der Inhibitoren Gefitinib und PD98059 auf die Proliferation der verwendeten Zellen und die Induktion von Apoptose untersucht.

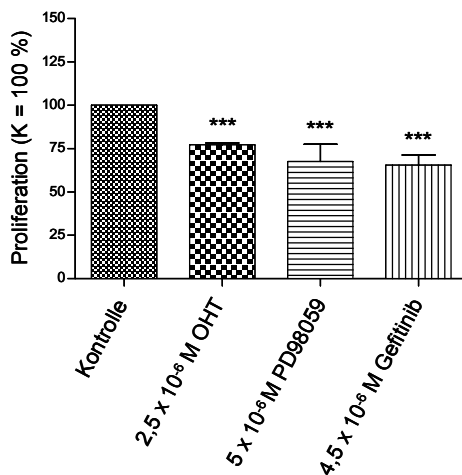
MCF-7



MCF-7-TR



T47D



T47D-TR

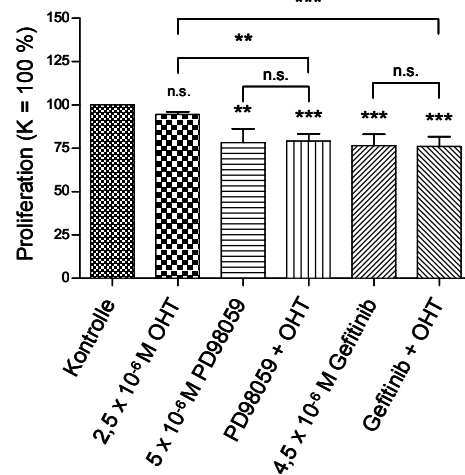


Abb. 16: Einfluss von Gefitinib und PD98059 auf die Zellproliferation in parentalen MCF-7 und T47D und resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR. Die Zellen wurden nach 96-stündiger Behandlung mit der jeweiligen Substanz mittels alamarBlue®-Proliferationsassay untersucht. Die Mittelwerte aller Versuchsergebnisse sind in Säulendiagrammen aufgetragen. Die Konzentrationen von OHT, Gefitinib und PD98059 in Kombination entsprachen den Konzentrationen der Einzelgaben. Kontrolle bei parentalen Zellen: Medium ohne Antiöstrogene, Kontrolle bei resistenten Sublinien: Medium mit 1,25 x 10⁻⁶ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen; Signifikanz gegenüber Kontrolle bzw. Einzelgabe: *** = p<0,001, ** = p<0,01, * = p<0,05, n. s. = nicht signifikant, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM).

Proliferation

Mittels alamarBlue[®]-Proliferationsassay wurde die Wirkung von Gefitinib und PD98059 auf die Proliferation von MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR untersucht. Gemäß Abschnitt 3.2 wurden die Zellen mit den Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen 96 Stunden inkubiert und dann der Analyse zugeführt. Abb. 16 zeigt die Durchschnittswerte aus sechs verschiedenen Versuchen mit sechs unterschiedlichen Passagen als Säulendiagramme. Dabei wird auch immer die Wirkung von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT (aus Abschnitt 4.6.1) zum Vergleich mit dargestellt. PD98059 und Gefitinib hemmten beide die Proliferation parentaler MCF-7 Zellen, dabei wirkte Gefitinib stärker als OHT, PD98059 dagegen schwächer (MCF-7: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $65,27 \% \pm 3,53 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $76,02 \% \pm 1,73 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib: $59,31 \% \pm 4,87 \%$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Bei MCF-7-TR reduzierte PD98059 die Proliferation nicht signifikant gegenüber der Kontrolle ($1,25 \times 10^{-6}$ M OHT), auch die Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT zeigte keine weiteren Effekte. Gefitinib dagegen hemmte die Proliferation signifikant, die Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT verstärkte diesen Effekt minimal, wobei dies nur signifikant im Vergleich mit dem Effekt von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT, nicht aber von Gefitinib als Einzelgabe ist (MCF-7-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $94,95 \% \pm 2,39 \%$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $86,86 \% \pm 11,53 \%$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059 + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $87,25 \% \pm 4,05 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib: $73,31 \% \pm 8,62 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $71,18 \% \pm 6,16 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Gefitinib und PD98059 zeigten beide bei T47D eine signifikante Proliferationsinhibition, die tendenziell stärker als bei $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT war. Hierbei wirkte Gefitinib unwesentlich stärker als PD98059, dies ist aber nicht signifikant. (T47D: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $77,19 \% \pm 1,17 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $67,62 \% \pm 9,94 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib: $65,41 \% \pm 5,94 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle).

Bei T47D-TR zeigten PD98059 und Gefitinib eine signifikante Reduktion der Proliferation gegenüber der Kontrolle mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT. Die Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT zeigte keine nennenswerte Verstärkung der antiproliferativen Wirkung, lediglich der Effekt von PD98059 gegenüber der Kontrolle wurde signifikanter. Beide Kombinationsbehandlungen sind signifikant gegenüber

$2,5 \times 10^{-6}$ M OHT (T47D-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $94,53 \% \pm 1,53 \%$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $78,31 \% \pm 8,03 \%$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059 + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $79,09 \% \pm 4,39 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib: $76,62 \% \pm 6,50 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $76,10 \% \pm 5,75 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle).

Apoptose

Die Effekte von Gefitinib und PD98059 hinsichtlich der Induktion von Apoptose, alleine oder in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT, wurden in den OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR mittels des Assays nach Nicoletti (Abschnitt 3.3.1) analysiert. Bei den parentalen Zellen wurden die Effekte von PD98059 und Gefitinib nicht untersucht, da diese nicht im Fokus des Interesses standen. $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib wurde nicht als Einzelgabe analysiert, da frühere Untersuchungen der verwendeten Zellen keinen signifikanten Effekt gezeigt hatten (Gunthert *et al.*, 2005). Abb. 17 zeigt Durchschnittswerte in Form von

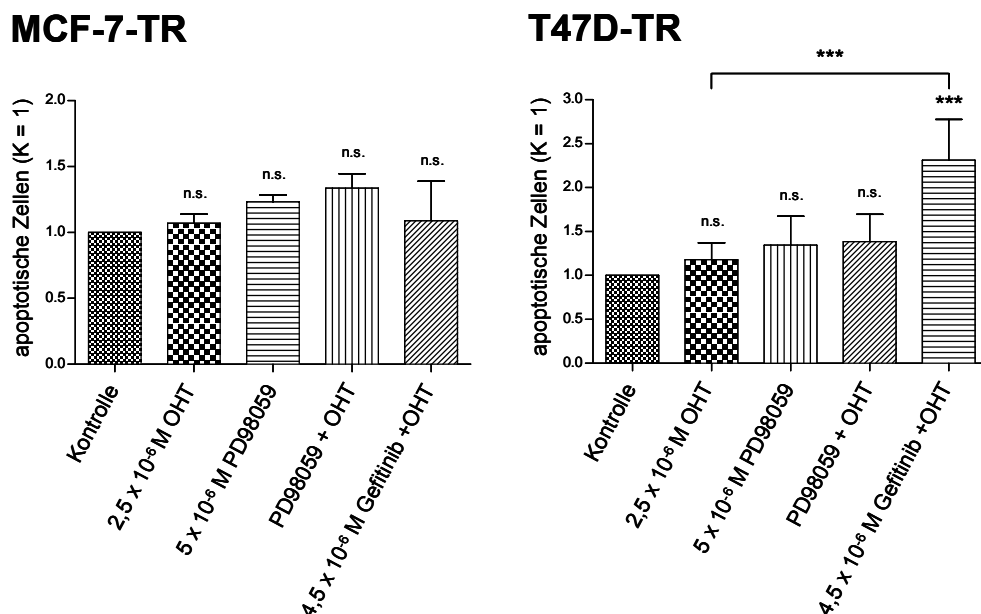


Abb. 17: Induktion von Apoptose durch PD98059, Gefitinib und OHT. Die Induktion von Apoptose wurde mittels Nicoletti-Apoptoseassay gemessen. Die Säulen in den gezeigten Diagrammen repräsentieren die Durchschnittswerte der jeweiligen Ergebnisse. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Prozentwerte der Kontrollen auf eins normiert. Die Konzentrationen von OHT und PD98059 in Kombination entsprachen den Konzentrationen der Einzelgaben. Kontrolle: Medium enthält $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen; Signifikanz gegenüber Kontrolle bzw. Einzelgabe: *** = $p < 0,001$, n. s. = nicht signifikant, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM), MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

Säulendiagrammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit drei verschiedenen Passagen. Als Vergleich wurden die Werte für $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT aus Abschnitt 4.6.1 erneut mit aufgetragen. Unter dem Einfluss von 5×10^{-6} M PD98059 zeigte sich bei MCF-7-TR eine leicht erhöhte Induktion von Apoptose, die bei Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT noch geringfügig stärker ausfiel. Beide Effekte sind aber nicht signifikant. $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib bewirkte in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT eine marginale, nicht signifikante Erhöhung der Zahl der apoptotischen Zellen (MCF-7-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,07 \pm 0,07$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $1,23 \pm 0,05$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059 + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,34 \pm 0,11$, n. s. vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,08 \pm 0,30$, n. s. vs. Kontrolle). 5×10^{-6} M PD98059 induzierte bei T47D-TR Zellen alleine und in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT nur marginal und nicht signifikant Apoptose, $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib induzierte dagegen zusammen mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT gegenüber der Kontrolle ($1,25 \times 10^{-6}$ M OHT) und gegenüber $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT signifikant Apoptose. Die Zahl der apoptotischen Zellen wurde hierbei mehr als verdoppelt (T47D-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,18 \pm 0,19$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059: $1,34 \pm 0,33$, n. s. vs. Kontrolle; 5×10^{-6} M PD98059 + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,38 \pm 0,31$, n. s. vs. Kontrolle; $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $2,31 \pm 0,47$, n. s. vs. Kontrolle).

4.6.3 Hemmung der PI3K/Akt-Signalkaskade

Die in Abschnitt 4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den sekundär OHT-resistenten Sublinien im Vergleich zu den parentalen Zellen eine deutlich erhöhte Aktivierung von Akt vorlag. Daher sollte die Wirkung einer Hemmung wichtiger Mediatoren dieser Signalkaskade untersucht werden. Hierzu wurden Perifosine, Rapamycin (Sirolimus) und das Rapamycin-Analogon Everolimus eingesetzt.

Proliferation

Um die Wirkung von Perifosine, Rapamycin und Everolimus auf die Proliferation von MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR zu untersuchen, wurden diese mittels alamarBlue[®]-Proliferationsassay nach 96 Stunden Inkubationszeit analysiert. Die hierzu notwendigen Versuche wurden für alle Zellen mindestens drei

Mal mit drei unterschiedlichen Passagen wiederholt. Die Proliferationsdaten der mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT behandelten Zellen (siehe 4.6.1) wurden in Abb. 18 erneut mit aufgetragen. Man erkennt, dass 2×10^{-8} M Rapamycin bei MCF-7 die Proliferation deutlich und signifikant auf unter 70 % im Vergleich zur Kontrolle reduzierte. Die Kombination von Rapamycin mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT reduzierte diese

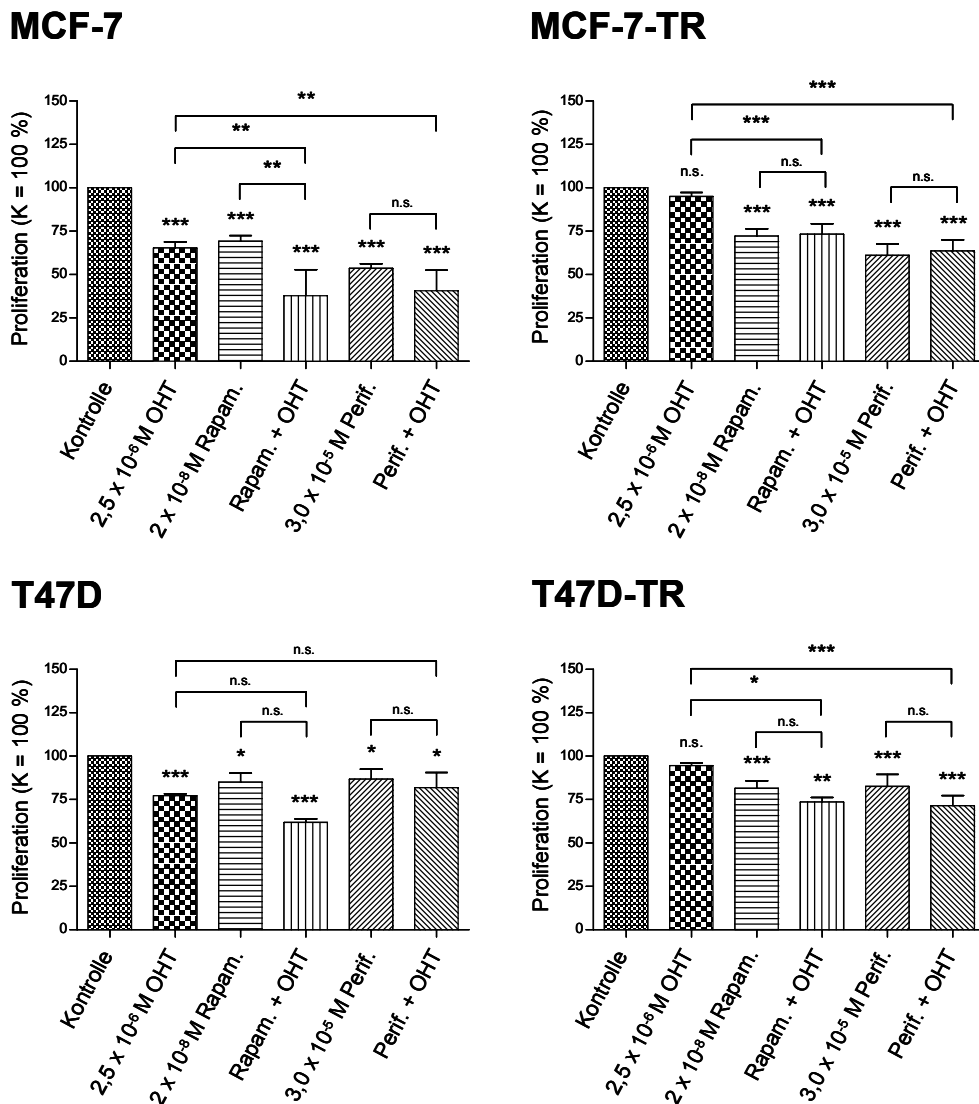


Abb. 18: Wirkung von Rapamycin und Perifosine auf die Proliferation von MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR. Die Proliferationsinhibition, die durch die jeweilige Substanz ausgelöst wurde, wurde mittels alamarBlue®-Proliferationsassay ermittelt. Die Mittelwerte der Ergebnisse aller Versuche wurden als Säulendiagramm aufgetragen. Die Konzentrationen von OHT, Rapamycin und Perifosine in Kombination entsprachen den Konzentrationen der Einzelgaben. Kontrolle bei parentalen Zellen: Medium ohne Antiöstrogene, Kontrolle bei resistenten Sublinien: Medium mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen, Rapam. = Rapamycin, Perif. = Perifosine; Signifikanz gegenüber Kontrolle bzw. Einzelgabe: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, n. s. = nicht signifikant, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM), MCF-7 und T47D = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

noch einmal signifikant auf unter 40 %. 3×10^{-5} M Perifosine wirkte noch stärker antiproliferativ als Rapamycin und auch die Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT verstärkte diesen Effekt, allerdings geschah dies nicht signifikant. Die Effekte beider Kombinationsbehandlungen sind signifikant gegenüber der alleinigen Behandlung mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT. Everolimus zeigte mit Rapamycin vergleichbare Effekte, diese Ergebnisse sind nicht dargestellt (MCF-7: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $65,27 \% \pm 3,53 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $69,21 \% \pm 3,26 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $37,84 \% \pm 15,03 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $53,51 \% \pm 2,73 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $40,72 \% \pm 11,71 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Bei MCF-7-TR fiel der antiproliferative Effekt von Perifosine, Rapamycin und Everolimus (nicht gezeigt) im Vergleich zu MCF-7 insgesamt schwächer aus, ist aber dennoch signifikant. Eine Kombination der Substanzen mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT bewirkte eine leichte durchschnittliche Erhöhung der Proliferation, die gegenüber den Einzelgaben von Rapamycin und Perifosine aber nicht signifikant ist. Die Proliferationsergebnisse, die aus den Kombinationen mit OHT resultieren, sind gegenüber denen, die aus einer alleinigen Gabe von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT resultieren, signifikant. Die nicht gezeigten Ergebnisse für Everolimus sind auch hier mit denen für Rapamycin vergleichbar (MCF-7-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $94,95 \% \pm 2,39 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $72,09 \% \pm 4,25 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $73,18 \% \pm 6,07 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $61,10 \% \pm 6,41 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $63,61 \% \pm 6,28 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Der antiproliferative Effekt von Rapamycin war bei T47D im Vergleich zu MCF-7 schwächer ausgeprägt, eine Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT führte zu einer signifikanten Proliferationsinhibition, die jedoch nicht signifikant gegenüber der alleinigen Gabe von Rapamycin oder $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT ist. Perifosine inhibierte die Proliferation mit einer Reduktion auf ca. 80 % ebenfalls wesentlich geringer als bei MCF-7, eine Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT ergab eine im Vergleich etwas erniedrigte Proliferation, die aber gegenüber der alleinigen Gabe von OHT oder Perifosine nicht signifikant ist (T47D: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $77,19 \% \pm 1,17 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $84,92 \% \pm 5,29 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $61,77 \% \pm$

2,00 %, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $86,68 \% \pm 5,92 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle ; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $81,86 \% \pm 8,75 \%$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Bei T47D-TR hemmten sowohl Perifosine als auch Rapamycin die Proliferation signifikant. Eine Kombination mit jeweils $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT führte zu einer um ca. 10 % geringeren Proliferation gegenüber der Einzelgabe, was aber nicht signifikant ist. Die Ergebnisse beider Kombinationen sind signifikant gegenüber den Ergebnissen aus dem Ansatz mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT (T47D-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $94,53 \% \pm 1,53 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $81,41 \% \pm 4,45 \%$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $73,6 \% \pm 2,64 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $82,58 \% \pm 6,91 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle ; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $71,42 \% \pm 5,95 \%$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Bei T47D und T47D-TR zeigte Everolimus analoge Effekte zu Rapamycin.

Apoptose

Mittels Nicoletti-Apoptoseassay sollten die Wirkung von Rapamycin und Perifosine nach 96 Stunden Kultivierungsdauer auf die Induktion von Apoptose in parentalen Mammakarzinomzellen MCF-7 und den OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR analysiert werden. Die Effekte auf T47D wurden nicht untersucht, da diese zum Zeitpunkt der Experimente nicht mehr im Fokus des Interesses standen. Die Versuche wurden mindestens drei Mal mit drei unterschiedlichen Passagen durchgeführt, bei MCF-7-TR wurde der Effekt von Rapamycin alleine oder in Kombination in neun voneinander unabhängigen Versuchen untersucht. Der Effekt von Perifosine wurde hier in 19 voneinander unabhängigen Versuchen verifiziert. Zum Vergleich ist wieder der Effekt von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT (siehe Abschnitt 4.6.1) als Säule im Diagramm in Abb. 19 A mit aufgetragen. Teil B der Abbildung zeigt zwei repräsentative Histogramme der Analyse von MCF-7-TR Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Durchführung des Nicoletti-Assays. Bei MCF-7 induzierte Rapamycin signifikant Apoptose, vergleichbar mit den Effekten von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT. Die proapoptotischen Effekte von Perifosine fielen sogar noch stärker aus und führten zu ca. 2,5 x so vielen apoptotischen Zellen wie bei der Kontrolle (MCF-7: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $2,02 \pm 0,15$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $2,06 \pm 0,49$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $2,66 \pm 0,16$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Bei

MCF-7-TR Zellen induzierten weder Rapamycin alleine noch dieses in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT Apoptose. Damit war die Wirkung vergleichbar mit

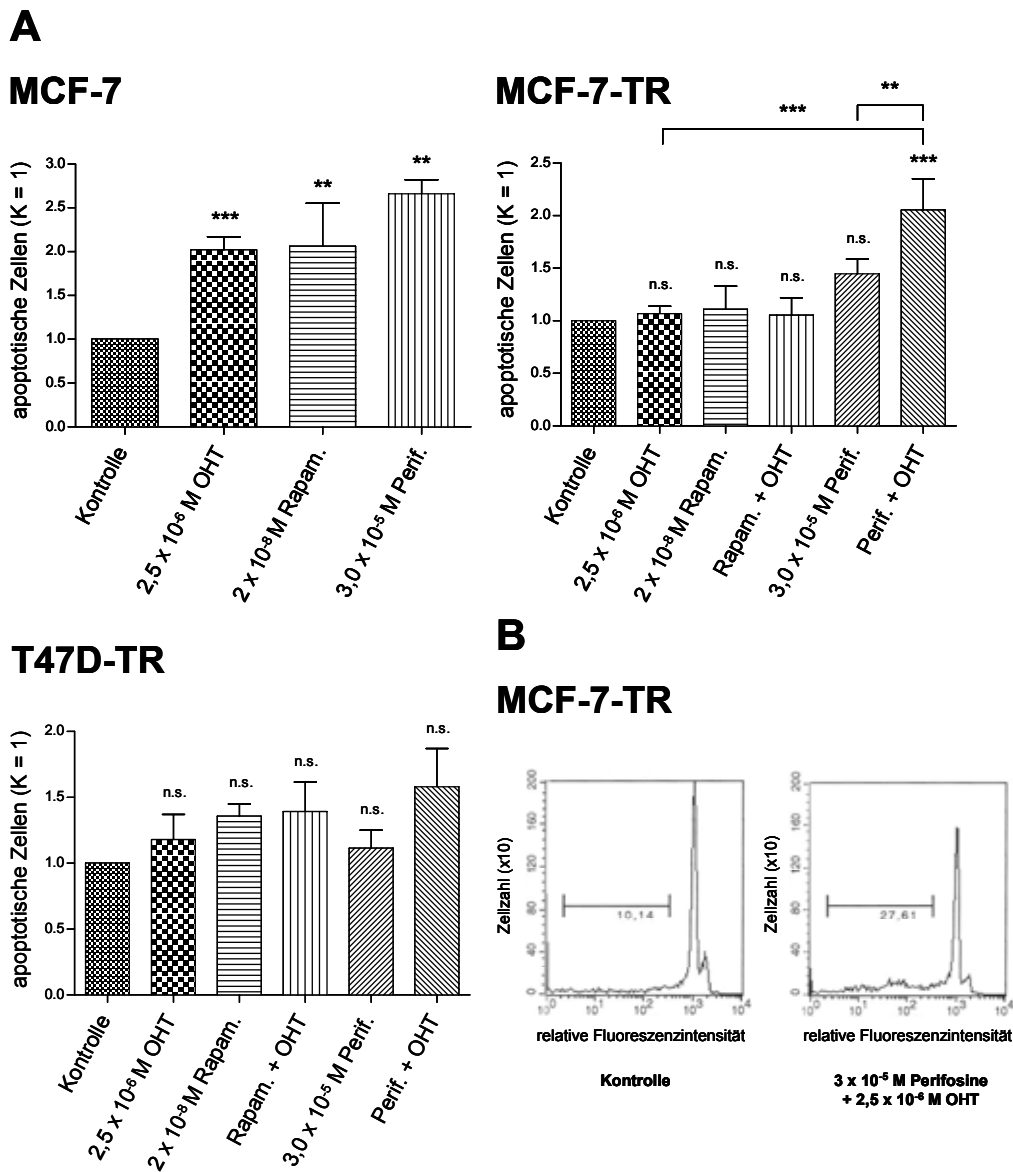


Abb. 19: Induktion von Apoptose durch Rapamycin und Perifosine bei MCF-7, MCF-7-TR und T47D. (A) Die Mittelwerte der Ergebnisse aus Apoptoseassays nach Nicoletti wurden als Säulendiagramme aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Prozentwerte der Kontrollen auf eins normiert. Die Konzentrationen von OHT und Perifosine in Kombination entsprachen den Konzentrationen der Einzelgaben. Kontrolle bei parentalen Zellen: Medium ohne Antiöstrogene, Kontrolle bei resistenten Sublinien: Medium mit $1,25 \times 10^{-6}$ M OHT; K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen, Rapam. = Rapamycin, Perif. = Perifosine; Signifikanz gegenüber Kontrolle bzw. Einzelgabe: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ vs., n. s. = nicht signifikant, Fehlerbalken = *standard error of the mean* (SEM). (B) Die abgebildeten Histogramme zeigen den DNA-Gehalt der Zellen entsprechend ihres Zellzyklus-Status nach Behandlung und Durchführung des Nicoletti-Assays. Die apoptotischen Zellen wurden in der prä- G_0/G_1 -Phase (DNA-Gehalt $< 2n$), detektiert, die vor dem großen Peak (G_0/G_1 -Phase) liegt. Der kleine Peak hinter der G_0/G_1 -Phase repräsentiert Zellen, die sich in der S-Phase befinden, MCF-7 = parentale Mammakarzinomzellen, MCF-7-TR und T47D-TR = 4-Hydroxytamoxifen-resistente Mammakarzinom-Subzelllinien.

der von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT alleine. Die Inkubation mit Perifosine führte zu einer leicht verstärkten Induktion von Apoptose, die allerdings nicht signifikant ausfiel. Die Kombination von Perifosine mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT induzierte dagegen gegenüber der Kontrolle signifikant Apoptose. Die Effekte waren auch signifikant gegenüber den Effekten von $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT und Perifosine als alleinige Gaben (MCF-7-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,07 \pm 0,07$, n. s. vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $1,48 \pm 0,32$, n. s. vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,05 \pm 0,17$, n. s. vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $1,45 \pm 0,14$, n. s. vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $2,05 \pm 0,3$, $p < 0,001$. vs. Kontrolle). Die Ergebnisse des Apoptoseassays nach Nicoletti wurden bei MCF-7-TR für 3×10^{-5} M Perifosine und 5×10^{-5} M PD98059 mittels JC-1 Apoptoseassay (siehe Abschnitt 3.3.2) in fünf voneinander unabhängigen Versuchen mit fünf unterschiedlichen Passagen überprüft. Die so ermittelte Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials in der Zellpopulation ist ein Maßstab für über den intrinsischen Weg ablaufende apoptotische Vorgänge (Koseoglu *et al.*, 2007; Smiley *et al.*, 1991). Die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen durch den Nicoletti-Apoptoseassay ermittelten und zeigten ebenfalls eine deutliche Induktion von Apoptose durch 3×10^{-5} M Perifosine in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT und eine schwache, nicht signifikante Induktion von Apoptose durch 5×10^{-5} M PD98059, alleine oder in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT. Die Ergebnisse werden hier nicht gezeigt.

Rapamycin und, ungefähr gleich stark, Rapamycin in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT induzierten bei T47D-TR Zellen geringfügig mehr Apoptose als $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT, allerdings waren diese Effekte nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. Perifosine löste alleine kaum verstärkt Apoptose aus, die Erhöhung ist nicht signifikant. Am stärksten induzierte Perifosine in Kombination mit $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT Apoptose, der Wert wurde auf das ca. 1,6 fache der Kontrolle erhöht. Dies ist allerdings nicht signifikant (T47D-TR: $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,18 \pm 0,19$, n. s. vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin: $1,36 \pm 0,09$, n. s. vs. Kontrolle; 2×10^{-8} M Rapamycin + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,39 \pm 0,22$, n. s. vs. Kontrolle; 3×10^{-5} M Perifosine: $1,12 \pm 0,14$, n. s. vs. Kontrolle ; 3×10^{-5} M Perifosine + $2,5 \times 10^{-6}$ M OHT: $1,58 \pm 0,29$, n. s. vs. Kontrolle).

4.7 Interaktion von Perifosine und Gefitinib mit der Signaltransduktion in sekundär OHT-resistenten Mammakarzinomzellen.

Um zu analysieren, wie Perifosine und Gefitinib mit der PI3K/Akt-Signaltransduktion und der MAPK ERK1/2-Signaltransduktion interagieren und welchen Einfluss sie auf die Expression und die Aktivität wichtiger Mediatoren dieser Signalkaskaden haben, wurden Western Blots angefertigt. Bei diesen wurden Zellysate analysiert, die aus MCF-7-TR und T47D-TR Zellen gewonnen wurden, die zuvor unterschiedlich lange Perifosine oder Gefitinib ausgesetzt waren. So sollte die in den Abschnitten 4.6.2 und 4.6.3 gezeigte antiproliferative und proapoptotische Wirkung auf Proteinebene nachvollzogen werden.

4.7.1 Wirkung von Perifosine

Der Einfluss von $3,5 \times 10^{-5}$ M Perifosine auf die Expression und die Aktivierung

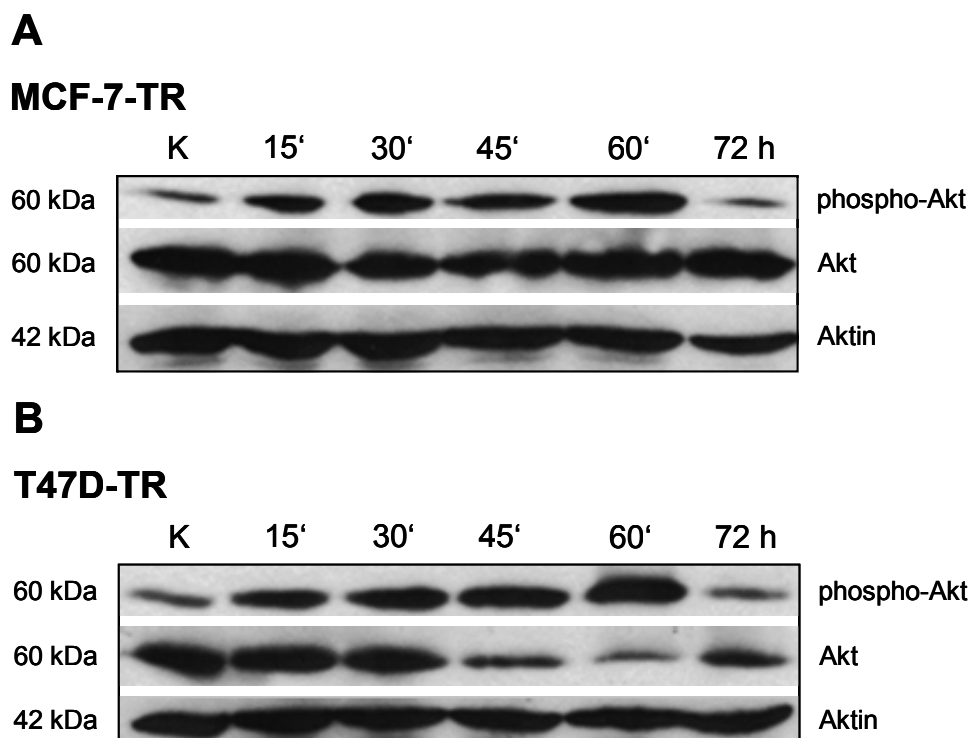


Abb. 20: Western Blot zur Analyse der Wirkung von Perifosine auf basales Akt und dessen Phosphorylierung in OHT-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR. (A) Wirkung von $3,5 \times 10^{-5}$ M Perifosine auf MCF-7-TR. (B) Wirkung von $3,5 \times 10^{-5}$ M Perifosine auf T47D-TR. Aktin diente als Ladungskontrolle. K = Kontrolle, OHT = 4-Hydroxytamoxifen.

von Akt wurde mittels Western Blot untersucht. Die Zelllysate hierfür stammten aus Zellen, die 15, 30, 45, 60 Minuten oder 72 Stunden mit Perifosine inkubiert wurden. Das Medium enthielt im Gegensatz zum regulären Kulturmedium der resistenten Sublinien kein OHT. Eine unbehandelte Kontrolle wurde mitgeführt. Abb. 20 zeigt repräsentative Western Blots dreier un-abhängiger Versuche mit drei verschiedenen Passagen von MCF-7-TR und T47D-TR. Aus der Abbildung (Teil A) wird ersichtlich, dass die Phosphorylierung von Akt zunächst bis zum Zeitpunkt 60 Minuten zunahm und nach 72 Stunden leicht unter der der unbehandelten Kontrolle lag. Die Menge basalen Akts zeigt keine wesentlichen Veränderungen. Die Stärke der Aktinbanden zeigt an, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Wie Teil B der Abbildung zu entnehmen ist, nahm die Phosphorylierung von Akt auch bei T47D-TR bis zum Zeitpunkt 60 Minuten zu, bei 72 Stunden war sie etwas niedriger als bei der Kontrolle. Die basale Akt-Expression blieb die ersten 30 Minuten gleich und sank dann bis zum Zeitpunkt 60 Minuten ab. Nach 72 Stunden war sie wieder leicht erhöht, hatte jedoch noch nicht wieder das Niveau der Kontrolle erreicht.

4.7.2 Wirkung von Gefitinib

Die Wirkung von $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib auf MCF-7-TR und T47D-TR Zellen im Hinblick auf die Expression und die Phosphorylierung von Akt sollten analysiert werden. Dazu wurden Lysate von Zellen, die verschiedene Zeitspannen bis 60 Minuten mit Gefitinib inkubiert wurden, mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht. Bei den in Abb. 21 gezeigten Western Blots handelt es sich um repräsentative Bilder aus sieben voneinander unabhängigen Versuchen mit sieben unterschiedlichen Passagen. In Teil A der Abbildung erkennt man, dass Gefitinib bei MCF-7-TR keinen großen Einfluss auf die Phosphorylierung von Akt hatte und nur zu einer leichten Zunahme führte. Die Menge basalen Akts blieb gleich, die Ladungskontrolle Aktin zeigt an, dass in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen wurde. Bei T47D-TR kam es durch Gefitinib bis zum Zeitpunkt 45 Minuten zu einer deutlichen Abnahme der Akt-Phosphorylierung, beim Zeitpunkt 60 Minuten ist wieder eine etwas stärkere Phosphorylierung zu erkennen, die aber immer noch deutlich unter der Kontrolle liegt. Die basale Expression von Akt blieb bis zum Zeitpunkt 45 Minuten gleich, bei 60 Minuten

sieht man eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

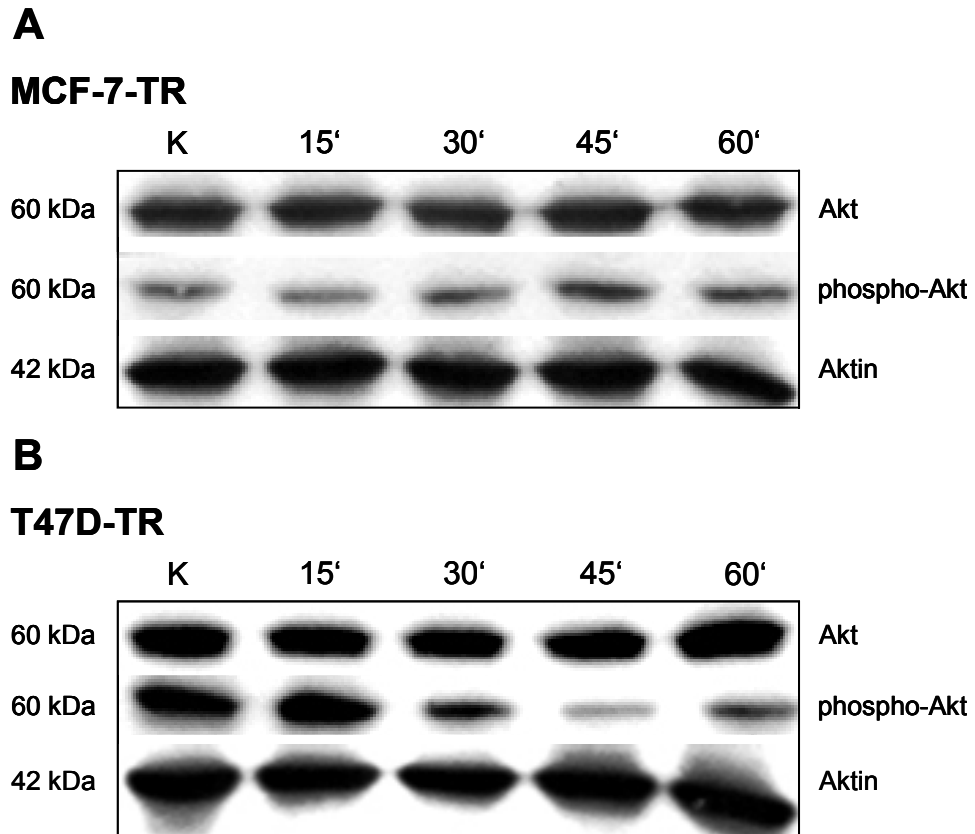


Abb. 21: Western Blot zur Analyse der Wirkung von Gefitinib auf basales Akt und ERK1/2 und deren Phosphorylierung in OHT-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR. (A) Wirkung von $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib auf MCF-7-TR. (B) Wirkung von $4,5 \times 10^{-6}$ M Gefitinib auf T47D-TR. Die Aktinbanden zeigen bei (A) und (B), dass in allen Spuren gleich viel Protein aufgetragen wurde; K = Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 Primäre Ursachen der OHT-Resistenz

Bei der Therapie Östrogenrezeptor (ER)-positiver Mammakarzinome spielt der selektive Östrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen eine große Rolle. Eine primäre und sekundäre Resistenz gegenüber Antiöstrogenen, insbesondere gegenüber Tamoxifen, stellen ein großes klinisches Problem dar. Verschiedene Mechanismen, wie u. a. die Aktivierung von Signalkaskaden von Wachstumsfaktoren oder Änderungen in der Funktionalität des ERs, sind für die Entwicklung einer Resistenz verantwortlich.

Zur Aufklärung von Mechanismen der Antiöstrogenresistenz wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz mit parentalen, ER-positiven, nicht-resistenten Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D und 4-Hydroxytamoxifen (OHT)-resistenten Subzelllinien MCF-7-TR und T47D-TR etabliert und charakterisiert. Agonistisch wirkende Analoga von GnRH-I und GnRH-II zeigten in diesen Zellen direkte antiproliferative Effekte und eine Interaktion mit der ERBB-Signaltransduktion. Außerdem resensibilisierten sie die resistenten Zellen für die proapoptotische und antiproliferative Wirkung von OHT. Die Aufhebung der Resistenz konnte aber nicht allein durch die Interaktion der GnRH-I- und -II-Analoga mit der ERBB-Signaltransduktion erklärt werden, da der Inhibitor der EGF-R-assoziierten Tyrosinkinase Gefitinib zunächst keinen Effekt auf die Wirkung von OHT bei MCF-7-TR und T47D-TR hatte (Gunthert *et al.*, 2005). Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die in diesen Zellen bestimmenden Resistenzmechanismen analysiert werden, wobei zunächst untersucht wurde, inwieweit Analoga von GnRH-I und -II mit der Signaltransduktion anderer Wachstumsfaktorrezeptoren interagieren. Mehrere Autoren zeigten, dass der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg und insbesondere eine Aktivierung der Proteinkinase Akt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer sekundären Antiöstrogenresistenz zu spielen scheinen (deGraffenried *et al.*, 2004; Faridi *et al.*, 2003; Frogne *et al.*, 2005; Jordan, 2004; Shin *et al.*, 2006). Außerdem konnte in Prostatakarzinomzellen gezeigt werden, dass das agonistisch wirkende GnRH-I-Analogon Triptorelin die PI3K/Akt-Signalkaskade

hemmen und Akt-abhängig Apoptose induzieren kann (Kraus *et al.*, 2004). Gleiches gilt für den GnRH-Agonisten Leuprorelin, welcher in Myomen phospho-Akt reduziert und vermutlich Apoptose induziert (Mizutani *et al.*, 1998). Daher lag es nahe, bei den verwendeten OHT-resistenten Mammakarzinomzellen zu untersuchen, ob eine verstärkte Aktivierung von Akt gegeben war. Die dazu durchgeführten Western Blots zeigten, dass, sowohl bei MCF-7-TR als auch bei T47D-TR, Akt im Vergleich zu den parentalen Zellen verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert vorlag. Triptorelin und das agonistisch wirkende GnRH-II-Analogon [D-Lys⁶]GnRH-II verringerten, zeitlich abhängig, die Phosphorylierung von Akt. Da diese beiden GnRH-I- und -II-Analoga auch zu einer Aufhebung der OHT-Resistenz führten, ist davon auszugehen, dass phosphoryliertes Akt in dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz eine wichtige Rolle spielt.

Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, werden durch phosphoryliertes Akt proliferationsfördernde und antiapoptotische Signalwege induziert, so dass den proapoptotischen und antiproliferativen Effekten von TAM direkt entgegengewirkt werden kann, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist (Campbell *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2002; Kandel *et al.*, 1999; Riggins *et al.*, 2007). Weiterhin ist auch eine Liganden-unabhängige Aktivierung des ER α durch eine aktivierte PI3K/Akt-Signaltransduktion möglich, so dass OHT nicht mehr antagonistisch wirken kann und die Expression von Zielgenen des ER α Östrogen-unabhängig induziert wird (Campbell *et al.*, 2001).

Bei einer erneuten, in dieser Arbeit durchgeführten, Untersuchung der Wirkung von Gefitinib in Bezug auf die Induktion von Apoptose ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse zu den bereits veröffentlichten und oben angesprochenen Daten aus Versuchen mit diesen Zellen in unserer Arbeitsgruppe (Gunthert *et al.*, 2005). Bei T47D-TR wurde eine Durchbrechung der Resistenz gegenüber OHT erreicht, so dass eine Kombination von OHT mit Gefitinib signifikant Apoptose auslöste, was zuvor nicht gelang, aber konsistent mit anderen Daten aus der Literatur ist. So zeigten Knowlden *et al.*, dass Gefitinib in Mammakarzinomzellen mit sekundärer Antiöstrogenresistenz die Zellproliferation hemmt (Knowlden *et al.*, 2003). Außerdem wird in Mammakarzinomzellen bei kombinierter Exposition mit TAM und Gefitinib die Ausbildung einer Resistenz verhin

dert (Gee *et al.*, 2003). Weiterhin lässt sich in TAM-resistenten Zellen mit einer AIB1- und ERBB2-Überexprimierung eine Resensibilisierung für TAM durch Gefitinib erreichen (Pfeiler *et al.*, 2007; Shou *et al.*, 2004).

Bei MCF-7-TR bestätigten sich dagegen die von Günthert *et al.* veröffentlichten Daten und Gefitinib hatte keinen Einfluss auf die Resistenz. Dies deutet auf zwei verschiedene Resistenzmechanismen in den hier verwendeten Modellen der sekundären Antiöstrogenresistenz hin, was aufgrund der von Günthert *et al.* veröffentlichten Ergebnisse so zunächst nicht zu erwarten war (Günthert *et al.*, 2005). Warum in dieser Arbeit mit Gefitinib bei T47D-TR andere Ergebnisse erzielt wurden, als die veröffentlichten kann nicht mit Sicherheit geklärt werden. Vermutlich veränderte sich die OHT-resistente Sublinie von T47D während der Langzeitkultivierung so, dass sie andere Charakteristika aufwies als bei den zuvor von Günthert *et al.* durchgeführten Versuchen. Die hier präsentierten Ergebnisse und ihre Diskussion untermauern allerdings schlüssig die Daten zu Gefitinib zum Einfluss auf T47D-TR, wie in den nächsten Abschnitten deutlich wird.

5.2 Ursachen der Überaktivierung von Akt und weitere mögliche Resistenzmechanismen

5.2.1 Östrogen-induzierte Signaltransduktion, nukleäre Co-Faktoren und Fulvestrant

Bei den verwendeten, parentalen Mammakarzinomzellen MCF-7 und T47D konnte gezeigt werden, dass OHT die Proliferation hemmt und Apoptose induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit Literaturdaten und bilden die Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Durchbrechung der OHT-Resistenz in den entwickelten OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR (Budtz, 1999; Furr *et al.*, 1984; Mandlekar *et al.*, 2001; Nazarewicz *et al.*, 2007).

Fulvestrant induzierte, wie in der Literatur beschrieben, bei den verwendeten Zellen MCF-7 und T47D Apoptose und inhibierte die Proliferation vergleichbar mit OHT (Cicatiello *et al.*, 2000; Dowsett *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1997). Die von uns entwickelten OHT-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR zeigten in den durchgeführten Versuchen im Gegensatz zu anderen,

aus der Literatur bekannten Modellen, allerdings ebenfalls eine Resistenz gegenüber dem SERD Fulvestrant (Hu *et al.*, 1993; Johnston *et al.*, 2005; Lykkesfeldt *et al.*, 1994; Osborne *et al.*, 2004). Dies ist insofern von Bedeutung, da eine Tamoxifen-Resistenz, basierend auf modulierten Effekten auf Ebene der nukleären Co-Aktivatoren und Co-Repressoren, in den untersuchten Zellen eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Würde zur Resistenz gegenüber OHT eine veränderte Co-Faktoren-Zusammensetzung beitragen, würde Fulvestrant, welches jegliche Aktivität des ER unterdrückt, immer noch inhibitorisch wirken können. Die Ergebnisse bezüglich der Expression der Co-Faktoren sind bei den verwendeten Zellen unterschiedlich. Während sich bei T47D-TR bei der Expression der nukleären Co-Aktivatoren und Co-Repressoren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den parental Zellen nachweisen ließen, zeigte sich bei MCF-7-TR eine Hochregulation des nukleären Co-Aktivators SRC-1, aber auch des nukleären Co-Repressors SMRT.

Dies, die Resistenz gegenüber OHT und die Ergebnisse zu Fulvestrant lassen vermuten, dass sich in den resistenten Zellen MCF-7-TR und T47D-TR eine weitestgehend Östrogen-unabhängige Wachstumsregulation, unter Aktivierung anderer Wachstumsfaktorsignalwege, eingestellt hat. Dafür spricht auch die verstärkte Phosphorylierung von Akt in unseren Zellen. Wie bereits erwähnt, kann der ER α über den aktiven PI3K/Akt-Signalweg Liganden-unabhängig aktiviert werden, so dass diese Zellen u. a. resistent gegenüber TAM sind (Campbell *et al.*, 2001). Nach Unterbrechung der aktivierten Signaltransduktionskaskade, durch z. B. GnRH-I- und -II-Analoga, wirkt OHT wieder antiproliferativ und proapoptotisch, was verdeutlicht, dass die Wirkung von OHT nicht durch veränderte Co-Faktoren moduliert wird, wie es bei anderen Resistenzmodellen der Fall ist (Fleming *et al.*, 2004; Girault *et al.*, 2003; Osborne *et al.*, 2003). Die gesteigerte Expression je eines Co-Repressors und eines Co-Aktivators bei MCF-7-TR scheint sich zu nivellieren und keine Veränderung in der OHT-Wirkung zu verursachen.

Ein weiterer bekannter Mechanismus der Aktivierung von Akt und der MAPK ERK1/2 ist, insbesondere in Mammakarzinomzellen, eine Überexpression des membrangebundenen Östrogenrezeptors GPR30 und eine verstärkte Aktivierung der nachfolgenden, nicht-genomischen Östrogenwirkung. Die Überexpression von GPR30 kann zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber Tamoxifen

beitragen, da sowohl Östradiol als auch Tamoxifen und seine Metaboliten an GPR30 binden und agonistisch wirken (Filardo, 2002; Filardo *et al.*, 2002; Prossnitz *et al.*, 2007; Revankar *et al.*, 2005). Die Untersuchungen zeigten, sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Ebene der Proteine, eine deutlich verminderte Expression von GPR30 bei MCF-7-TR und T47D-TR. Somit erscheint eine Bedeutung des nicht-genomischen Weges der Östrogenwirkung über GPR30 unwahrscheinlich, was, zusammen mit der nicht vorhandenen zellulären Aromatase-Expression, die These vom Östrogen-unabhängigen Wachstum der OHT-resistenten Sublinien zusätzlich erhärtet und eine auto- und parakrine Östrogenstimulation unwahrscheinlich macht. Auf Grund dieser Ergebnisse ist auch davon auszugehen, dass GPR30 nicht für eine verstärkte Phosphorylierung von Akt in diesen Zellen verantwortlich ist.

Um den Einfluss der Co-Faktoren besser zu ergründen, sollten diese auch mittels Western Blot untersucht werden. Wie im Ergebnisteil unter 4.3.3 ausgeführt, wurden beim versuchten Nachweis der Co-Repressoren N-CoR und SMRT keine Proteine detektiert. Unter anderem könnte ein Grund sein, dass Proteine mit sehr großen relativen Molekülmassen, wie N-CoR mit 270 kDa, sehr schwer mittels einfacher SDS-PAGE darzustellen sind. Eine abschließende Klärung der Ursachen gelang allerdings nicht.

Bei AIB1 wurden dagegen bei verschiedenen Western Blots Proteine mit unterschiedlichen relativen Molekülmassen detektiert, die alle nicht mit dem Literaturwert von 160 kDa übereinstimmen (Takeshita *et al.*, 1996; Takeshita *et al.*, 1997). Auch korrelieren die verschiedenen Proteingrößen nicht mit der Verwendung der drei verschiedenen Antikörper gegen AIB1. BG-1 Zellen exprimieren AIB1 relativ stark, so dass eine Lysatprobe dieser Zellen als Positivkontrolle mitgeführt wurde (persönliche Korrespondenz mit dem Hersteller Affinity Bio-reagents, Golden, USA). Die detektierte Bande bei den BG-1 Zellen war im Vergleich zu den Banden der anderen Proben auch wesentlich stärker, befand sich aber bei den gleichen Massenbereichen. Eine Literaturrecherche ergab, dass durch alternatives Spleißen fünf verschiedene AIB1-Isoformen entstehen, deren Kleinste allerdings auch schon eine relative Molekülmasse von ca. 147 kDa aufweist und somit nicht Massen von 75 kDa erklären kann, die im Western Blot detektiert wurden. AIB1 wird acetyliert, methyliert und phosphoryliert, was aber auch keine Erklärung für die unterschiedlichen Massen bietet

(Naeem *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2004). Eine mögliche Degradierung des Proteins kann auch ausgeschlossen werden, da den verwendeten Lysaten immer so früh wie möglich Proteinase-Inhibitoren zugesetzt wurden und da die verschiedenen Proteinmassen sowohl bei frischen, als auch bei lange gelagerten Lysaten auftraten. Da auch eine Rücksprache mit den Herstellerfirmen keinen Aufschluss brachte, können die detektierten, verschiedenen relativen Molekülmassen von AIB1 an dieser Stelle nicht erklärt werden (Anzick *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 2006; McKenna *et al.*, 1999; Myers *et al.*, 2005; Takeshita *et al.*, 1997). Analoges gilt für SRC-1.

5.2.2 Einfluss von Wachstumsfaktorrezeptoren

IGF-1R

Im Vorfeld zu weiteren Versuchen wurde die Verteilung des EGF-R, des ERBB2 und des IGF-1R auf der Plasmamembranaußenseite der verwendeten Zellen analysiert. In beiden OHT-resistenten Sublinien zeigte sich eine deutliche Abnahme des IGF-1R. Die große Bedeutung des IGF-1R für den menschlichen Organismus wird anhand der Vielzahl von Substraten und Zielproteinen seiner nachgeschalteten Signaltransduktionswege deutlich. Ein Beispiel ist die Aktivierung der MAPK ERK 1/2 über Ras, c-Raf und MAPKK/MEK (De Meyts *et al.*, 1994). Ein anderer wichtiger Signaltransduktionsweg, der über den Ligandenaktivierten IGF-1R induziert wird, ist der PI3K/Akt-Signalweg (Baserga *et al.*, 1997; Myers *et al.*, 1993; Seely *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1992). Es ist außerdem bekannt, dass die Expression des IGF-1R in malignem Brustgewebe oft 10 – 14 Mal höher ist als in normalem Gewebe (Papa *et al.*, 1993; Resnik *et al.*, 1998). Durch Kopplung des IGF-1R an den PI3K/Akt-Signalweg und die folgende Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung werden viele intrazelluläre Prozesse, wie antiapoptotische Signaltransduktion, Proliferation, Glukosetransport und Proteinbiosynthese reguliert (Baserga *et al.*, 1997; Butler *et al.*, 1998). Auf Grund der Abnahme der Rezeptormenge in beiden OHT-resistenten Sublinien ist allerdings nicht von einem Beitrag der IGF-1R-Signaltransduktion zur verstärkten Akt-Phosphorylierung auszugehen. Untersuchungen in anderen Tamoxifen-resistenten MCF-7 zeigten ebenfalls eine von IGF-1R-unabhängige Akt-Phosphorylierung (Frogne *et al.*, 2005). Daher wurden auch keine Untersu-

chungen zu den Liganden des IGF-1R, wie IGF-1, und deren Bindeproteinen, den IGFBPs, durchgeführt (Clemmons, 1997; Jones *et al.*, 1995).

EGF-R & ERBB2

Bei MCF-7-TR war im Vergleich zur parentalen Zelllinie die Dichte der EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche deutlich verringert, bei T47D-TR war sie hingegen im Vergleich zu T47D leicht erhöht. Der ERBB2 zeigte sich in beiden resistenten Sublinien im Vergleich zu den parentalen Zellen erhöht, wobei dies bei T47D-TR stärker ausgeprägt war. Dies erlaubt weitere Rückschlüsse auf die Mechanismen der Antiöstrogenresistenz bei T47D-TR. Eine Überexpression des ERBB2 und/oder des EGF-Rezeptors, ihre Heterodimerisierung und eine damit verbundene Aktivierung der MAPK ERK1/2 spielt beim Mammakarzinom und bei der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Antiöstrogenen eine große Rolle (Dowsett, 2001; Dowsett *et al.*, 2001; Knowlden *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2002b). Da bei T47D-TR beide Rezeptoren in erhöhter Dichte nachgewiesen wurden und mit dem Inhibitor der EGF-R assoziierten Tyrosinkinase Gefitinib eine Durchbrechung der Resistenz erreicht werden konnte, ist zumindest ein großer Beitrag dieses Mechanismus zur Antiöstrogenresistenz in den betreffenden Zellen nahe liegend. Eine Aktivierung des ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionswegs kann wahrscheinlich über die Beeinflussung von Proliferation, Apoptose und eine Phosphorylierung des ER α , mit folgender Liganden-unabhängiger Aktivierung, eine Resistenz von Mammakarzinomzellen gegenüber Tamoxifen induzieren, was bereits in Abschnitt 1.6 der Einleitung näher erläutert wurde (Bunone *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 1995; Riggins *et al.*, 2006). In diesen Zellen verstärkt vorliegendes phospho-Akt kann auf die gleiche Weise erklärt werden, da Querverknüpfungen beider Signalwege bekannt sind und es in Mammakarzinomen mit Überexpression des ERBB2 zu einer verstärkten Aktivierung von Akt kommt (Ignatoski *et al.*, 2000; Nicholson *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2000). Vorstehende Autoren gehen in ihren Artikeln allerdings nicht genauer auf den Mechanismus der Transaktivierung ein. Wahrscheinlich geschieht diese durch die GTPase Ras, welche die PI3K aktivieren und somit eine verstärkte Phosphorylierung von Akt induzieren kann (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994).

Ein Beitrag der erhöhten ERBB2-Expression zur Resistenz bei MCF-7-TR in gleicher Weise wie bei T47D-TR ist durch die verminderte Menge an EGF-R

eher unwahrscheinlich. Möglich wäre eine Aktivierung der PI3K bei MCF-7-TR über eine Heterodimerisierung des ERBB2 mit dem ERBB3, welcher über sechs Bindungsstellen für PI3K verfügt und so diese direkt aktivieren kann, was aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde (Holbro *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1994; Kraus *et al.*, 1989).

5.2.3 Mediatoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion und ihre Rolle bei der sekundären Antiöstrogenresistenz

PTEN & PI3K

Wie in Abschnitt 1.5.2 beschrieben, führt eine durch Mutationen ausgelöste Veränderung oder eine Herunterregulation von PTEN und ebenso eine Aberration des katalytischen Zentrums der PI3K, p110 α , zu einer Überaktivierung von Akt. Diese Veränderungen kommen in ER-positiven Mammakarzinomen gehäuft vor und sind mit einer Antiöstrogenresistenz assoziiert (Perez-Tenorio *et al.*, 2007). Die Untersuchung von PTEN mittels Western Blot und RT-PCR zeigte in beiden Resistenzmodellen keine Unterschiede zwischen parentalen Zellen und resistenten Sublinien bezüglich der Expression auf Ebene der mRNA und der Proteine. Auch die Auswertung der Sequenzierung aller Exons des zugehörigen Gens für PTEN ergab keine Hinweise auf Mutationen, so dass ein Beitrag von PTEN zur verstärkten Phosphorylierung von Akt ausgeschlossen werden kann. Dies wurde für diverse andere Brustkrebszellen mit erhöhtem phospho-Akt bereits demonstriert (Sun *et al.*, 2001). PTEN scheint bei Mammakarzinomen im Gegensatz zu Endometriumkarzinomen keine große Rolle zu spielen. Frogne *et al.* zeigten sogar, dass die PTEN-Spiegel in ihrem Modell mit Tamoxifen-resistenten MCF-7 in diesen, im Vergleich zu parentalen Zellen, erhöht sind (Frogne *et al.*, 2005). In einigen Melanomen korrelieren erhöhte phospho-Akt Spiegel nicht mit einer *pten*-Mutation und Jordan *et al.* bestätigten die verstärkte Aktivierung von Akt bei OHT-resistenten Mammakarzinomzellen, ohne dass PTEN involviert ist (Curtin *et al.*, 2005; Jordan, 2004). Die Sequenzierung der zwei hauptsächlich von Mutationen betroffenen Exons 9 und 20 von *pik3ca*, dem Gen für p110 α , ergab bei MCF-7 und MCF-7-TR keine Hinweise auf Mutationen. Bei T47D und T47D-TR bestätigte sich allerdings eine Transition von Adenin durch Guanin in Exon 20, die zu einem Austausch von Histidin gegen Arginin führt (Bachman *et al.*, 2004). Dies hat eine verstärkte Lipidkinase-

Aktivität der PI3K zur Folge, was über die verstärkte Bildung von PIP₂ und PIP₃ zu einer stärkeren Phosphorylierung von Akt beitragen kann (Kang *et al.*, 2005). Da aber sowohl die resistenten als auch die parentalen Zellen diese Mutation tragen, lässt sich der Unterschied in der Menge des phospho-Akts zwischen diesen Zellen dadurch nicht erklären. Lediglich das Ergebnis, dass Akt bei parentalen T47D stärker als bei MCF-7 phosphoryliert ist, könnte die Konsequenzen der Mutation widerspiegeln.

PDK1

Eine gesteigerte Aktivität der PDK1 geht mit einer gesteigerten Aktivität von Akt einher und ist in Mammakarzinomen mit einer schlechten Differenzierung assoziiert (Lin *et al.*, 2005). Bei MCF-7-TR nimmt die basale Menge an PDK1 im Vergleich zu parentalen Zellen leicht ab, so dass auch weniger phosphorylierte und damit aktive PDK1 in den OHT-resistenten Zellen nachgewiesen wurde. Die erhöhte Phosphorylierung von Akt bei MCF-7-TR scheint daher in unserem Modell nicht mit einer veränderten Aktivität der PDK1 zusammen zu hängen. Bei T47D-TR ist dagegen die basale und die phosphorylierte Menge an PDK1 größer als bei T47D, so dass diese auch zu der verstärkten Akt-Phosphorylierung bei T47D-TR beitragen könnte.

CTMP

Neben PTEN ist CTMP ein weiterer negativer Regulator der PI3K/Akt-Signaltransduktion, der durch Bindung an die carboxyterminale Domäne von Akt an der Plasmamembran zur Dephosphorylierung von Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ führt (Maira *et al.*, 2001). Die Analyse der verwendeten Zellen zeigte eine deutlich verringerte Menge CTMP bei MCF-7-TR gegenüber der Menge bei MCF-7. Zwischen T47D und T47D-TR gab es keine Differenz. Unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse von Maira *et al.* wäre weniger vorhandenes CTMP als Ursache für die erhöhte Menge phospho-Akt denkbar. Allerdings zeigen Ergebnisse von Ono *et al.* eine andere Funktion von CTMP. Laut dieser Untersuchungen ist CTMP an die Plasmamembran gebunden und induziert die Translokation von Akt an diese, so dass es zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt kommt. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich eventuell durch die Versuchsstrategie erklären, die beide Arbeitsgruppen angewendet haben. Maira *et al.* und Ono *et al.* verwendeten CTMP, welches mit einem *flag tag* fusioniert wurde und beide Arbeitsgruppen zeigten eine Interaktion von

CTMP mit Akt an der Zellmembran. Allerdings wird dies wahrscheinlich durch die positiv geladenen Aminosäuren des *flag tag* verursacht, die einen Einbau des Fusionsproteins in die Plasmamembran vermitteln und somit die Translokation in andere Zellkompartimente verhindern. Die Interaktion zwischen Akt und CTMP an der Plasmamembran ist somit wahrscheinlich künstlich herbeigeführt, so dass die Ergebnisse von Maira *et al.* und Ono *et al.* als Artefakt gelten müssen (Parcellier *et al.*, 2009). Parcellier *et al.* berichten hingegen, dass CTMP ein nukleär-kodiertes, mitochondriales Protein ist, was nach Synthese an zytosolischen Ribosomen mittels seiner mitochondrialen Erkennungssequenz an die innere Membran und in den inneren Membranzwischenraum der Mitochondrien gelangt, wo es prozessiert wird. CTMP wird nach zytotoxischer Stimulation von den Mitochondrien in das Zytosol abgegeben, sensibilisiert Zellen für Apoptose und verstärkt diese somit, löst sie aber selber nicht aus. Dies geschieht wahrscheinlich durch eine indirekt CTMP-vermittelte Inhibition von stark antiapoptotisch wirkendem Akt im Zytosol. Weiterhin wurde gezeigt, dass das antiapoptotisch wirkende Bcl-2 die CTMP-Abgabe aus den Mitochondrien in das Zytosol hemmt (Parcellier *et al.*, 2009).

Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen bestätigen die Ergebnisse von Parcellier *et al.* dahingehend, dass es sich bei CTMP um einen negativen Akt-Regulator handelt, ohne allerdings ebenso detaillierte, mechanistische Überlegungen anzustellen. Es wurde gezeigt, dass eine epigenetische Herunterregulation der CTMP-Transkription zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt führt, was häufig in Glioblastomen (*Glioblastoma multiforme*) vorkommt (Knobbe *et al.*, 2004). Außerdem inhibiert eine Lentivirus-basierte CTMP-Gabe die Akt-Aktivität durch selektive Verhinderung der Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ in einem Mausmodell für Lungenkrebs (Hwang *et al.*, 2009). In apoptotischen Neuronen nach einer Ischämie findet eine verstärkte Expression von CTMP statt. Dieses bindet an phospho-Akt, senkt durch Dephosphorylierung dessen Kinaseaktivität und inhibiert so dessen Funktion. Hierbei zeigte sich, dass CTMP nötig, aber nicht ausreichend ist, um neuronale Apoptose auszulösen. (Miyawaki *et al.*, 2009). Somit ist eine Rolle von CTMP als negativer Regulator der PI3K/Akt-Signalkaskade anzunehmen und eine reduzierte Expression von CTMP bei MCF-7-TR Zellen könnte eine Erklärung für die gesteigerte Akt-

Aktivität und die damit verbundene Resistenz gegenüber OHT in diesen Zellen sein, wobei der Mechanismus hierfür noch nicht vollständig geklärt ist.

5.2.4 Mediatoren der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion und ihre Rolle bei der sekundären Antiöstrogenresistenz

T47D und T47D-TR unterscheiden sich deutlich hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK1/2. Die wesentlich stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 bei T47D-TR im Vergleich zu T47D ist, neben der Wirkung von Gefitinib, ein weiteres Indiz für die verstärkte Aktivierung des ERBB/MAPK ERK1/2-Signalwegs und seines Beitrags zur OHT-Resistenz in diesen Zellen. Die Konsequenzen dieser verstärkten Aktivierung des Signalwegs, wie Proliferationsinduktion und Inhibition von Apoptose sind bereits in den vorangehenden Abschnitten diskutiert worden.

Bei MCF-7 und MCF-7-TR traten hinsichtlich der basalen Expression und der Phosphorylierung von ERK1/2 keine Unterschiede auf, so dass deutlich wird, dass die ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion hier nicht im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber OHT steht.

5.2.5 Hemmung der PI3K/Akt und der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionskaskade

Es sollte geklärt werden, ob durch spezifische Hemmung der MAPK ERK1/2 oder der Proteinkinase Akt bzw. des nachgeschalteten mTOR eine Resensibilisierung der resistenten Sublinien gegenüber OHT erfolgt.

Rapamycin & Everolimus

Als ein wichtiger Mediator der Akt-Signaltransduktion ist mTOR prinzipiell ein Konvergenzpunkt verschiedener proliferationsfördernder und antiapoptotischer Signalwege, so dass eine Blockade bei Überaktivierung in Krebszellen hier sinnvoll erscheint (Sarbasov *et al.*, 2005b). Außerdem scheint die Präsenz von aktiviertem Akt ein sehr guter prädiktiver Wert für das Ansprechen der Zellen auf mTOR-Inhibitoren zu sein (Noh *et al.*, 2004).

Rapamycin und Rapamycin-Derivate wie Everolimus/RAD001 dienen als mTOR-Inhibitoren und sind teilweise bereits in der klinischen Erprobung (Fasolo *et al.*, 2008). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden synergistische Effekte von Rapamycin bzw. dessen Derivaten in Kombination mit Tamoxifen bzw. Ful-

vestrant beschrieben. So konnte auch gezeigt werden, dass in ähnlichen Modellen, wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten, eine Durchbrechung der sekundären Antiöstrogenresistenz durch Inhibition von mTOR möglich ist (Beeram *et al.*, 2007; deGraffenried *et al.*, 2004; Ghayad *et al.*, 2008; Treeck *et al.*, 2006). In dem hier verwendeten Modell zeigten Rapamycin und sein Analogon Everolimus antiproliferative Effekte, in Kombination mit OHT konnte bei MCF-7 sogar ein signifikanter additiver Effekt ermittelt werden. Außerdem induzierte Rapamycin bei parentalen MCF-7 signifikant Apoptose und war hinsichtlich des Ausmaßes mit der Wirkung von OHT zu vergleichen, was die grundsätzliche Wichtigkeit von mTOR für die Homöostase der Zelle demonstriert (Sarbasov *et al.*, 2005b). In beiden resistenten Sublinien wurde durch Rapamycin und Everolimus aber keine Apoptose induziert. Eine Durchbrechung der Antiöstrogenresistenz und somit eine Resensibilisierung für OHT gelang ebenso weder durch Rapamycin noch durch Everolimus bei MCF-7-TR und T47D-TR. In diesen Zellen scheint mTOR somit keine Rolle bei der Vermittlung der Resistenz gegen OHT zu spielen, so dass andere Substrate von Akt in den Fokus rücken. Wie bereits erwähnt, könnte eine Phosphorylierung von ER α durch Akt und eine damit verbundene Liganden-unabhängige Aktivierung mit einhergehender Resistenz gegenüber Tamoxifen eine Rolle spielen (Campbell *et al.*, 2001). Außerdem könnten durch Akt induzierte antiapoptotische und proliferationsfördernde Signalkaskaden unabhängig von mTOR bestimmend für die Ausprägung der OHT-Resistenz in den verwendeten Zellen sein (Datta *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2005). So mutmaßen Jordan *et al.* z. B. dass eine Deaktivierung von GSK3 α/β ein wichtiger Akt-vermittelter Resistenzmechanismus gegenüber Tamoxifen sein könnte (Jordan, 2004). GSK3 α/β inhibiert indirekt nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren, z. B. die des Wnt-Signalwegs (Ali *et al.*, 2001; Woodgett, 1994). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass ein hoher Spiegel von antiapoptotischem Bcl-2 im Zusammenhang mit einer Resistenz gegen mTOR-Inhibitoren steht (Aguirre *et al.*, 2004; Majumder *et al.*, 2004). Aktives Akt verhindert indirekt durch Phosphorylierung die Inaktivierung von antiapoptotischem Bcl-2, so dass dieser Mechanismus auch in unserem Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz eine weitere Erklärung dafür sein könnte, warum mTOR-Inhibitoren sowohl als Einzelgabe als auch in Kombination keine Apoptose induzierten (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997).

Gefitinib & PD98059

Die Ergebnisse der Inhibition der EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung durch Gefitinib in OHT-resistenten Zellen hinsichtlich der Induktion von Apoptose wurden bereits in den Abschnitten 5.1 und 5.2.2 diskutiert. Eine Durchbrechung der Resistenz gegenüber OHT gelang bei T47D-TR und die Überexpression des EGF-R und des ERBB2 scheint die Ursache für verstärkt vorliegendes phospho-Akt zu sein. Dagegen gelang bei MCF-7-TR mit Gefitinib keine Resensibilisierung der Zellen für OHT. Allerdings wurde durch eine Einzelgabe von Gefitinib eine signifikante Proliferationsinhibition in beiden parental Zellen und ihren resistenten Sublinien erreicht. Die Kombination mit OHT zeigte in OHT-resistenten Sublinien eine mit der Einzelgabe vergleichbare, signifikante, antiproliferative Wirkung. Diese Hemmung spiegelt die grundsätzliche Wichtigkeit der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktionskaskade bei vielen zellulären Prozessen wider (Chen *et al.*, 2001).

Der Einfluss von Gefitinib auf phospho-Akt bei MCF-7-TR und T47D-TR, mittels Western Blot analysiert, bestätigte die bisher gemachten Annahmen zu den Resistenzmechanismen. Die Abnahme von phospho-Akt bei T47D-TR durch Gefitinib ist ein Beleg für die Querverknüpfung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs mit der ERBB/MAPK ERK1/2-Signalkaskade und wird auch so in der Literatur beschrieben (Moasser *et al.*, 2001). Da die Abnahme von phospho-Akt durch Gefitinib ebenso mit der Durchbrechung der OHT-Resistenz korreliert, wie dies bei der Wirkung von Triptorelin und [D-Lys⁶]GnRH-II der Fall ist, ist dies ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle von phospho-Akt bei der sekundären Antiöstrogenresistenz von T47D-TR. Bei MCF-7-TR hatte Gefitinib keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Akt, was belegt, dass der EGF-Rezeptor und damit auch die ERBB/MAPK ERK1/2-Signalkaskade bei der Vermittlung der OHT-Resistenz in diesen Zellen keine Rolle spielt. Bestätigt wurde dies weiterhin dadurch, dass auch PD98059, was als MAPKK/MEK-Inhibitor die Aktivierung der MAPK ERK1/2 hemmt, die Zellen nicht für OHT resensibilisieren kann (Alessi *et al.*, 1995; Crews *et al.*, 1992). Bei T47D-TR gelang dies ebenfalls nicht, obwohl man dies auf Grund der sehr starken Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 (siehe 5.2.4) hätte annehmen können. Dies lässt vermuten, dass es nicht ausreicht, die Phosphorylierung von ERK1/2 zu unterbinden und damit den ERBB/MAPK ERK1/2-

Signalweg zu inhibieren, um die sekundäre Antiöstrogenresistenz bei T47D-TR zu durchbrechen. Weiterhin unterstreicht dies die hierbei wichtige Rolle von phospho-Akt. Die antiproliferative Wirkung von PD98059 bei MCF-7, T47D und MCF-7-TR lässt sich mit der allgemeinen Wichtigkeit der MAPK ERK1/2 für viele zelluläre Prozesse begründen, was bereits ausgeführt wurde.

Perifosine

Der Akt-Inhibitor Perifosine bindet die PH-Domäne von Akt selektiv und reversibel, so dass dessen für die Phosphorylierung notwendige Translokation an die Plasmamembran unterbunden wird und die Phosphorylierung von Akt *in vitro* an Ser⁴⁷³ und Thr³⁰⁸ im Zytoplasma abnimmt (Chiarini *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2008; Kondapaka *et al.*, 2003; Rüter *et al.*, 2003). Perifosine hemmte die Proliferation bei MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR, wobei dies bei MCF-7 am deutlichsten geschah. Durch eine Kombination mit OHT wurde bei keinem der Zelltypen eine signifikante Steigerung der proliferationshemmenden Wirkung gegenüber der alleinigen Behandlung mit Perifosine erzielt. Der PI3K/Akt-Signalweg spielt in der Homöostase von normalen Zellen und Krebszellen eine große Rolle, so dass durch einen Akt-Inhibitor wichtige Zellfunktionen gestört werden, was eine Proliferationsinhibition verursacht (Brazil *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005; Vivanco *et al.*, 2002). Durch die Behandlung mit Perifosine werden neben der Induktion von Apoptose auch zytostatische Effekte beobachtet, so z. B. bei Epithelkarzinomzellen (Floryk *et al.*, 2008; Momota *et al.*, 2005).

Perifosine induzierte als Einzelgabe bei MCF-7, nicht jedoch bei MCF-7-TR und T47D-TR signifikant Apoptose. Es ist bekannt, dass Perifosine bei verschiedenen malignen Zellen, z. B. bei hämatologischen Krankheiten, über eine Stimulierung des Todesrezeptors den extrinsischen, Caspase-abhängigen, Apoptoseweg induziert. Wichtige Mediatoren scheinen hierbei CD95/FAS, *lipid rafts*, JNK aber nicht Akt zu sein, so dass sich die proapoptotische Wirkung auf MCF-7 Zellen, die keine verstärkte Akt-Phosphorylierung aufweisen, so erklären lassen könnte (Chiarini *et al.*, 2008; Gajate *et al.*, 2007; Papa *et al.*, 2008; van der Luit *et al.*, 2007).

Bei MCF-7-TR führte die Kombination von OHT mit Perifosine, im Gegensatz zur Einzelgabe beider Substanzen, zu einer signifikanten Induktion von Apoptose und damit zu einer Durchbrechung der Resistenz gegenüber OHT. Dies ist ein weiteres Indiz für die entscheidende Rolle des PI3K/Akt-

Signaltransduktionswegs bei der sekundären Antiöstrogenresistenz bei MCF-7-TR. Eine Übersicht über die untersuchten Mediatoren der PI3K/Akt-Signaltransduktion und den möglichen Resistenzmechanismus bei MCF-7-TR gibt Abb. 22.

Bei T47D-TR gelang mit Perifosine trotz des schon diskutierten, wahrscheinlich wichtigen, Beitrags von phospho-Akt zur Antiöstrogenresistenz keine Resensibilisierung dieser Zellen für OHT. Da auch eine Inhibition der MAPK ERK1/2 mit

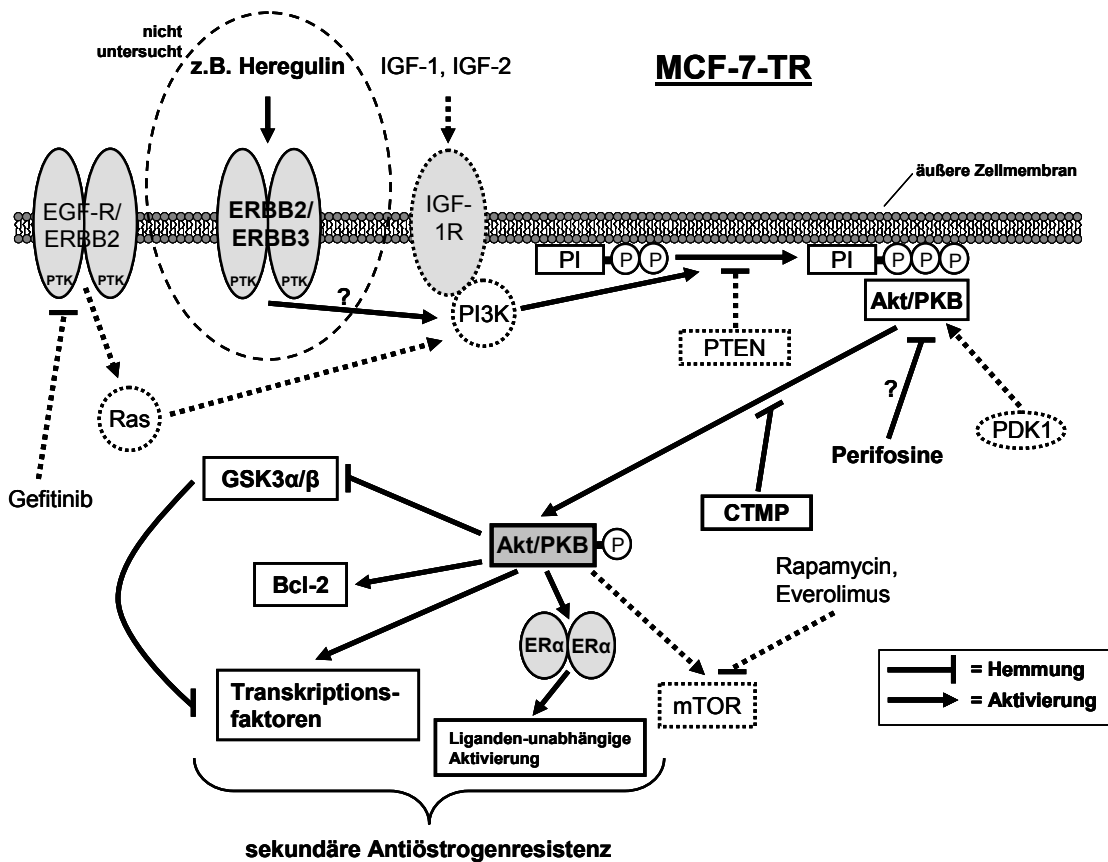


Abb. 22: Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz bei MCF-7-TR und verwendete Inhibitoren. Gepunktete Pfeile und Linien stehen für Aktivierungen und Inhibitionen, die in diesem Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz keine Rolle spielen. Ebenso sind Mediatoren der Signaltransduktion mit einer gepunkteten Linie umrandet und im Standard-Schriftschnitt geschrieben, die wahrscheinlich keine Ursache der sekundären Antiöstrogenresistenz darstellen. Wichtige Mediatoren und wichtige Inhibitions- und Aktivierungspfeile erscheinen dagegen fett. Die gestrichelte Linie umschließt die nicht untersuchte ERBB2/ERBB3-Heterodimerisierung, der mit Fragezeichen gekennzeichnete Pfeil steht für einen möglichen Beitrag zur Phosphorylierung von Akt. CTMP ist vereinfacht als Akt-Inhibitor dargestellt, da die genaue Funktionsweise bisher nicht geklärt werden konnte. Aus dem gleichen Grund ist der Inhibitions Pfeil bei Perifosine mit einem Fragezeichen versehen. Die ausgeschlossene, mögliche Aktivierung von Akt durch GPR30 und die Hemmung der Signalkaskade durch GnRH-I/II-Analoga und PD98059 wird hier nicht gezeigt. Nähere Erläuterungen zu dieser Abbildung sind dem Text zu entnehmen.

PD98059 alleine nicht ausreichte, GnRH-I- und -II-Analoga aber eine Durchbrechung der Resistenz bewirkten und sowohl die PI3K/Akt- als auch die ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion hemmten, ist davon auszugehen, dass beide Signaltransduktionswege zusammen einen wichtigen Beitrag zur Vermittlung der sekundären Antiöstrogenresistenz leisten. Die Unterbrechung nur einer der beiden Signalkaskaden reicht nicht aus, um die Zellen wieder für OHT zu resensibilisieren. Auch die Wirkung von Gefitinib im Hinblick auf die Durchbrechung der sekundären Antiöstrogenresistenz bei T47D-TR lässt sich mit diesem Resistenzmechanismus erklären. Da die Aktivierung von Akt wahrscheinlich durch die GTPase Ras über PI3K vermittelt wird, Gefitinib in der Signalkaskade aber direkt an der EGF-R-assoziierten Tyrosinkinase wirkt, ist hierdurch eine Hemmung beider Signalwege gegeben. Die detektierte Mutation in der katalytischen Untereinheit von PI3K und die verstärkte Aktivierung von PDK1 tragen sicherlich zu einer verstärkten Phosphorylierung von Akt bei T47D-TR bei, entscheidend für die Ausbildung der Resistenz sind sie aber nicht. Jordan *et al.* analysierten ein Modell von OHT-resistenten MCF-7 Zellen, welches deutliche Parallelen im Mechanismus der Resistenz zu den hier verwendeten T47D-TR Zellen aufweist. Die von Jordan *et al.* untersuchten Zellen wiesen ebenfalls verstärkt phosphoryliertes Akt auf, zeigten aber nur ein mäßiges Ansprechen auf einen PI3K-Inhibitor, so dass die Autoren einen Resistenzmechanismus mit Dominanz der MAPK ERK1/2 und eines Beitrags von phospho-Akt postulierten. Da u. a. auch Gefitinib in diesen Zellen die Phosphorylierung von Akt inhibierte, gehen Jordan *et al.* von einer Aktivierung der Signaltransduktion durch eine EGF-R/ERBB2-Heterodimerisierung mit konstitutiver Aktivierung oder autokriner Stimulation durch TGF α aus (Jordan, 2004; Knowlden *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2000). Die Heterodimerisierung des EGF-R mit ERBB2 ist, wie schon in Abschnitt 5.2.2 erwähnt, aufgrund der erhöhten Dichte beider Rezeptoren auf der Zytoplasmamembran-Außenseite ebenfalls in dem hier verwendeten Modell bei T47D-TR denkbar. Auch eine autokrine Stimulation mit TGF α kommt in Betracht, wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht. Eine Übersicht über den möglichen Resistenzmechanismus bei T47D-TR mit den eingesetzten Inhibitoren zeigt Abb. 23.

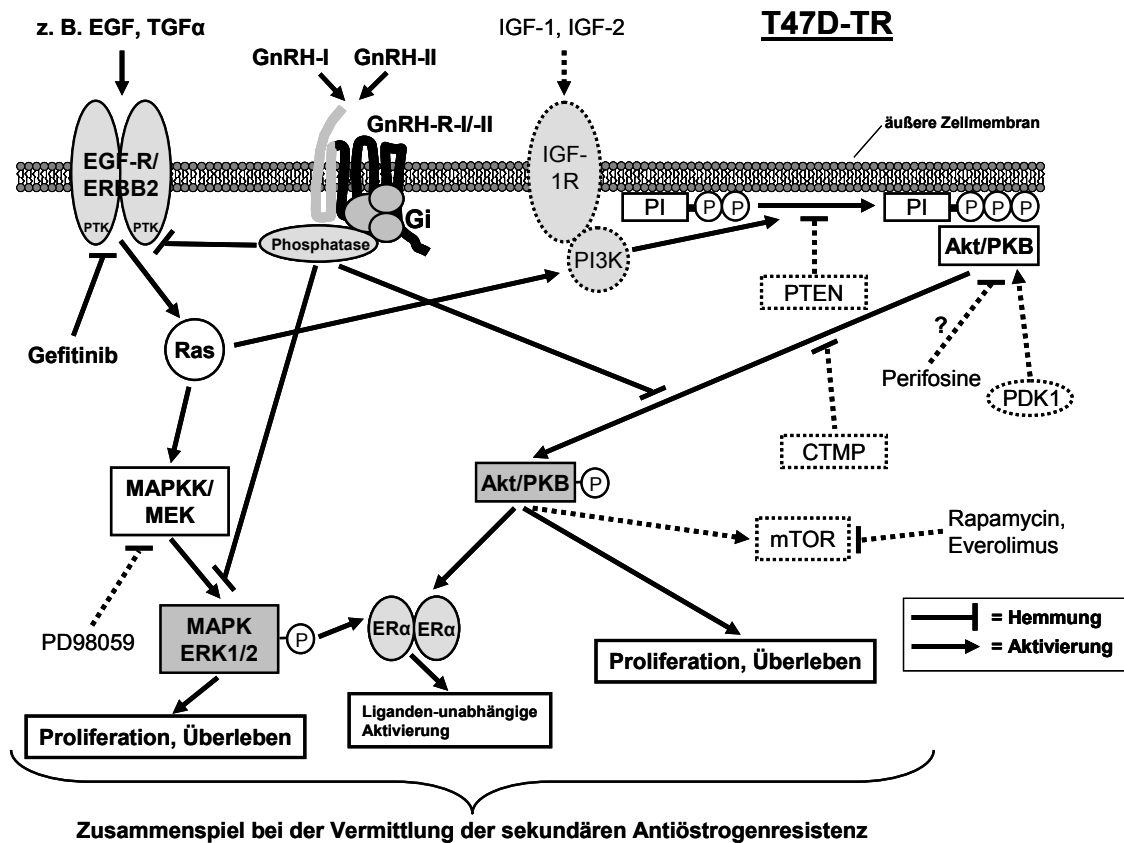


Abb. 23: Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz bei T47D-TR. Gepunktete Pfeile und Linien stehen für Aktivierungen und Inhibitionen, die in diesem Modell der sekundären Antiöstrogenresistenz keine Rolle spielen. Ebenso sind Mediatoren der Signaltransduktion mit einer gepunkteten Linie umrandet und im Standardschriftschnitt geschrieben, die wahrscheinlich keine Ursache der sekundären Antiöstrogenresistenz darstellen. Wichtige Mediatoren und wichtige Inhibitions- und Aktivierungspfeile erscheinen dagegen fett. CTMP ist vereinfacht als Akt-Inhibitor dargestellt, da die genaue Funktionsweise bisher nicht geklärt werden konnte. Aus dem gleichen Grund ist der Inhibitionspfeil bei Perifosine mit einem Fragezeichen versehen. Die ausgeschlossene, mögliche Aktivierung von Akt durch GPR30 wird hier nicht gezeigt. Nähere Erläuterungen zu dieser Abbildung sind dem Text zu entnehmen.

Um die Wirkung von Perifosine auf phospho-Akt zu überprüfen, wurden Western Blots angefertigt, in denen Lysate von MCF-7-TR und T47D-TR eingesetzt wurden, die unterschiedlich lange einer Konzentration von $3,0 \times 10^{-5}$ M Perifosine ausgesetzt waren. In beiden Subzelllinien nahm die phospho-Akt-Menge innerhalb von 60 Minuten zu und war nach 72 h leicht unterhalb der Kontrolle. Da Perifosine die MCF-7-TR Zellen für OHT resensibilisiert und die Resistenz nach den Ergebnissen der bisherigen Versuche mit einer verstärkten Phosphorylierung von Akt im Zusammenhang zu stehen scheint, war dies so nicht zu erwarten. Auch wenn bei T47D-TR mit Perifosine keine Durchbrechung der Resistenz gegenüber OHT erreicht wurde, hätte die Menge an phospho-Akt

unter Perifosine-Einfluss trotzdem ebenfalls schnell sinken müssen, wie es bei PC-3 Zellen (Prostatakarzinom) der Fall ist. Hier wird eine völlige Dephosphorylierung von Akt an Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ nach 0,5 h durch Einwirkung von 5×10^{-6} M Perifosine erreicht (Kaighn *et al.*, 1979; Kondapaka *et al.*, 2003). Hennessy *et al.* zeigten ebenfalls, dass Perifosine in niedriger mikromolarer Dosis, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, Akt inhibiert. Eine signifikante Inhibition der Akt-Phosphorylierung an Ser⁴⁷³ wurde bei xenotransplantierten PC-3 Zellen aber erst nach 7 und 21 Tagen (168 h und 504 h) Inkubationszeit festgestellt, nach 24 – 48 h jedoch noch nicht. Die Inhibition von Akt korrelierte außerdem mit einer *in vivo*-Wachstumsinhibition und es konnte gezeigt werden, dass Zellen die eine überaktive PI3K/Akt-Signaltransduktion besitzen, besonders sensibel für eine Behandlung mit Perifosine sind (Hennessy *et al.*, 2007). Die von Hennessy *et al.* demonstrierte lange Inkubationsdauer zur Akt-Dephosphorylierung könnte, auch wenn es sich um *in vivo*-Daten handelt, erklären, warum in unseren Zellen nach 72 h eine leichte Reduzierung der phospho-Akt-Menge zu beobachten war, vorher jedoch noch nicht. Die Proliferations- und Apoptoseassays wurden mit den entsprechenden Substanzen aber immer 96 h inkubiert, so dass man im Western Blot eventuell zu diesem Zeitpunkt eine deutlichere Reduktion von phospho-Akt hätte detektieren können. Die Inkubation der Zellen mit Perifosine für die Western Blots wurde nur für 72 Stunden durchgeführt, da die Daten von Kondapaka *et al.* zur schnellen Dephosphorylierung von Akt als Grundlage der Versuche genommen wurden (Kondapaka *et al.*, 2003). Da Perifosine aber eine Halbwertszeit von 137 Stunden besitzt, wären hier sicher weitere Versuche mit längeren Inkubationszeiten angebracht (Vink *et al.*, 2005).

Die Mechanismen die zur Wirkung von Perifosine auf Zellen beitragen, werden allerdings kontrovers diskutiert und sind bisher nicht eindeutig geklärt, so dass die Effekte von Perifosine auch ohne eine Wirkung auf phospho-Akt zu begründen sein könnten (Gills *et al.*, 2009). Zusätzlich zur Verringerung der Phosphorylierung von Akt vermindert Perifosine auch die Phosphorylierung von Mediatoren, die in der Signalkaskade unterhalb von Akt stehen, wie zum Beispiel S6K1 und GSK3 α/β (Elrod *et al.*, 2007; Hennessy *et al.*, 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass Perifosine den PTEN-Spiegel und die Gesamtmenge des vorhandenen Akt bei NSCLC Zellen (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) reduziert, wobei der Mechanismus unklar blieb (Elrod *et al.*, 2007). Auch bei T47D-TR

wurde die Menge des basalen Akt nach 45 min Inkubationszeit deutlich reduziert, so dass man hier eventuell eine Parallele zu den Versuchen von Elrod *et al.* ziehen kann.

Neben der Inhibition von Akt und anderen Mediatoren der PI3K-Signalkaskade zeigt Perifosine noch andere biologische Aktivitäten, die zu seiner Zytotoxizität beitragen könnten, wie die Aktivierung der p38 MAPK und der JNK, die Inhibition der Phosphatidylcholin-Synthese oder die Herunterregulation der MAPK ERK1/2-Phosphorylierung (Kondapaka *et al.*, 2003; Papa *et al.*, 2008; van der Luit *et al.*, 2007). Allerdings wurde auch nachgewiesen, dass Perifosine die Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGF-R erhöhen und somit zu einer Stimulation von Akt führen kann. Die Mechanismen, die diesem Effekt zu Grunde liegen sind allerdings noch nicht aufgeklärt, könnten aber mit einer Störung der Membranstruktur oder deren Funktionen zusammenhängen (Hennessy *et al.*, 2007). Durch seine lange Halbwertszeit könnte Perifosine in der Plasmamembran in *lipid rafts* akkumulieren und so Membranregionen stören, die in Signaltransduktionsmechanismen involviert sind (van der Luit *et al.*, 2007). Dies könnte entweder durch eine Veränderung der Zusammensetzung von *lipid rafts* geschehen oder aber auch durch die Hochregulation von Ceramiden, einer zytotoxischen Untergruppe von Sphingolipiden (Gajate *et al.*, 2007; Rahmani *et al.*, 2005). *Lipid rafts* sind Cholesterol- und Sphingolipid-reiche Mikrodomänen, die als Gerüst für diverse Signaltransduktionsmechanismen dienen und u. a. bei der Aktivierung von Akt eine Rolle spielen (Lasserre *et al.*, 2008). Aufgrund der verschiedenen biologischen Effekte von Perifosine ist es wahrscheinlich, dass viele verschiedene Mechanismen zusammen zum antitumoralen Effekt dieser Substanz beitragen (Gills *et al.*, 2009).

Trotz der Kontroverse um den genauen biologischen Mechanismus der Perifosine-Wirkung konnte in klinischen Phase I-Studien gezeigt werden, dass durch Perifosine ein erhöhtes Ansprechen auf eine Strahlentherapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren der Prostata, der Speiseröhre, des Darms und der Blase erreicht werden kann (Vink *et al.*, 2006). Gleiche Erfolge wurden bei der Kombination mit Chemotherapeutika erzielt, so dass derzeit verschiedene Phase II-Studien durchgeführt werden. Allerdings wurde in kaum einer Studie die Aktivität von Akt gemessen, so dass die Wirksamkeit von Perifosine *in vivo* auf

Grund fehlender Daten bisher nicht auf eine Inhibition von Akt zurückgeführt werden konnte (Gills *et al.*, 2009).

Obwohl Perifosine in einer klinischen Phase II-Studie beim fortgeschrittenen Mammakarzinom nur moderate Aktivität zeigte (Leighl *et al.*, 2008), könnte die Kombination von Perifosine mit Antiöstrogenen dennoch vielversprechend sein, da in einem der beiden verwendeten Modelle der sekundären Antiöstrogenresistenz, bei MCF-7-TR, eine Durchbrechung der Resistenz erreicht wurde.

5.3 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz in dem hier untersuchten Modell sehr komplex sind und mit einer gesteigerten ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion und/oder gesteigerten Aktivität von Akt assoziiert sind. Dabei besitzen beide verwendeten OHT-resistenten Subzelllinien unterschiedliche Resistenzmechanismen. Bei T47D-TR ist die Resistenz mit einer erhöhten EGF-R- und ERBB2-Dichte und daraus resultierender, verstärkter Aktivierung der ERBB/ERK1/2- und der PI3K/Akt-Signaltransduktion verbunden. Bei MCF-7-TR spielt wahrscheinlich eine Reduzierung von CTMP eine Rolle, auch wenn der genaue Mechanismus auf Grund der Kontroverse um die Funktionsweise von CTMP unklar bleibt. Ein möglicher Beitrag von CTMP zur Antiöstrogenresistenz bei Mammakarzinomzellen ist bisher noch nicht beschrieben worden und konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden. Weitere Untersuchungen sollten die genaue Rolle von CTMP und Gründe für eine Herunterregulation dieses endogenen Inhibitors der PI3K/Akt-Signaltransduktion bei MCF-7-TR mit einschließen. Auch eine mögliche Heterodimerisierung des ERBB2 mit dem ERBB3 könnte über die Aktivierung von PI3K einen Beitrag zur Resistenz in diesen Zellen leisten und wäre ein lohnendes Ziel weiterer Untersuchungen. Bei T47D-TR bleibt zu klären, was die Ursachen der erhöhten Dichte des ERBB2 und des EGF-R sind, wobei ein möglicherweise verminderter PAX2-Spiegel in die Überlegungen mit einzubeziehen ist. Eine Rolle von ERBB4 bei der verstärkten Aktivierung der Signalkaskade sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden. Auch, ob die Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs über die GTPase Ras vermittelt wird, sollte analysiert werden. Eine Untersuchung der Zellen mittels komparativer genom-

scher Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*) zeigte in einer ersten Analyse der Ergebnisse deutliche Unterschiede zwischen der DNA von MCF-7 und der von MCF-7-TR, jedoch weniger zwischen T47D und T47D-TR. Beispielsweise wurde eine Verachtfachung der DNA, gemittelt über alle untersuchten Chromosomensätze, bei MCF-7-TR im Bereich der *breast cancer-amplified sequence 3* (BCAS3) gefunden, die bei prämenopausalen Frauen mit einer Tamoxifen-Resistenz assoziiert ist (Gururaj *et al.*, 2006). Eine genauere Analyse der Daten wird sicherlich einen tieferen Einblick in die Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz dieser Zellen erlauben und Ursachen auf genetischer Ebene aufzeigen.

Die gesteigerte PI3K/Akt-Aktivität und die Aktivierung der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion können als zwei entscheidende Wege bei der sekundären Antiöstrogenresistenz festgehalten werden, welche teilweise in Beziehung zueinander stehen, aber auch unabhängig voneinander agieren können. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Strategien für eine Durchbrechung der Resistenz und es wird deutlich, dass die alleinige Bestimmung von phospho-Akt oder von Mediatoren der ERBB/MAPK ERK1/2-Signaltransduktion nur bedingt als prädiktive Marker für eine zielzellgerichtete Therapie in der Klinik ausreichen. Vermutlich hat sogar nur ein ausführliches, molekularbiologisches Profil der Tumorzellen einen erhöhten prädiktiven Wert. Dazu können z. B. die Mutationsanalyse des Gens für Ras oder von *pik3ca* und die Bestimmung nukleärer Co-Faktoren gehören.

Die Kombinationen aus Gefitinib und OHT, Perifosine und OHT sowie Analoga von GnRH-I/-II und OHT zeigten anhand der verwendeten Modelle viel versprechende Ergebnisse, wobei in dieser Arbeit erstmals eine Durchbrechung der sekundären Antiöstrogenresistenz mit Perifosine gezeigt werden konnte. Die kombinierte Behandlung bietet sich für Versuche bei mit MCF-7-TR und T47D-TR xenotransplantierten Mäusen an, um ihre Wirkung *in vivo* zu verifizieren. Interessant wäre weiterhin die Untersuchung der Wirkung einer Kombination von Perifosine und PD98059 auf T47D-TR, da bei einer erfolgreichen Durchbrechung der sekundären Resistenz die Theorie des angenommenen, dualen Resistenzweges unterstützt und zudem weitere Therapiemöglichkeiten aufgezeigt würden. Ebenso wäre die Untersuchung der Wirkung von Gefitinib

und Analoga von GnRH-I/-II auf phosphorylierte MAPK ERK1/2 bei T47D-TR mittels Western Blot lohnenswert. Dies würde zur weiteren Klärung des Resistenzmechanismus beitragen. Zu untersuchen wären ebenfalls die Wirkungsmechanismen von Perifosine, bzw. die Identifizierung zellulärer Marker, die eine Erklärung der Resistenzdurchbrechung durch Perifosine ermöglichen und so zum weiteren Verständnis des Resistenzmechanismus bei MCF-7-TR beitragen würden.

Langfristig könnten die Erkenntnisse aus dieser Arbeit und aus darauf basierenden Folgeuntersuchungen bei der Optimierung der endokrinen Therapie des Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinoms mit sekundärer Antiöstrogenresistenz helfen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M. and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**(5381), 1322-6.
- Aguirre, D., Boya, P., Bellet, D., Faivre, S., Troalen, F., Benard, J., Saulnier, P., Hopkins-Donaldson, S., Zangemeister-Wittke, U., Kroemer, G. and Raymond, E. (2004). Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. *Apoptosis* **9**(6), 797-805.
- Ahmed, S. A., Gogal, R. M., Jr. and Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* **170**(2), 211-24.
- Akhtar, M., Calder, M. R., Corina, D. L. and Wright, J. N. (1982). Mechanistic studies on C-19 demethylation in oestrogen biosynthesis. *Biochem J* **201**(3), 569-80.
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J. and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* **13**(7), 1610-9.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. and Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **270**(46), 27489-94.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* **15**(23), 6541-51.
- Ali, A., Hoeflich, K. P. and Woodgett, J. R. (2001). Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation. *Chem Rev* **101**(8), 2527-40.
- Amarneh, B. A. and Simpson, E. R. (1996). Detection of aromatase cytochrome P450, 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 and NADPH:P450 reductase on the surface of cells in which they are expressed. *Mol Cell Endocrinol* **119**(1), 69-74.
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**(5328), 965-8.
- Apter, D., Reinila, M. and Vihko, R. (1989). Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer* **44**(5), 783-7.
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* **11**(6), 1101-10.
- Arpino, G., Green, S. J., Allred, D. C., Lew, D., Martino, S., Osborne, C. K. and Elledge, R. M. (2004). HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. *Clin Cancer Res* **10**(17), 5670-6.

- Avruch, J., Zhang, X. F. and Kyriakis, J. M. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**(7), 279-83.
- Bachman, K. E., Argani, P., Samuels, Y., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Konishi, H., Karakas, B., Blair, B. G., Lin, C., Peters, B. A., Velculescu, V. E. and Park, B. H. (2004). The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* **3**(8), 772-5.
- Bai, X., Ma, D., Liu, A., Shen, X., Wang, Q. J., Liu, Y. and Jiang, Y. (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* **318**(5852), 977-80.
- Ball, L. J., Levy, N., Zhao, X., Griffin, C., Tagliaferri, M., Cohen, I., Ricke, W. A., Speed, T. P., Firestone, G. L. and Leitman, D. C. (2009). Cell type- and estrogen receptor-subtype specific regulation of selective estrogen receptor modulator regulatory elements. *Mol Cell Endocrinol* **299**(2), 204-11.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M. and Valentinis, B. (1997). The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1332**(3), F105-26.
- Batzler, W. U., Giersiepen, K., Hentschel, S., Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Kieschke, J., Kraywinkel, K., Meyer, M., Stabenow, R., Stegmaier, C., Bertz, J., Haberland, J. and Wolf, U. (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 6. überarbeitete Auflage, Berlin.
- Baumann, K. H., Kiesel, L., Kaufmann, M., Bastert, G. and Runnebaum, B. (1993). Characterization of binding sites for a GnRH-agonist (buserelin) in human breast cancer biopsies and their distribution in relation to tumor parameters. *Breast Cancer Res Treat* **25**(1), 37-46.
- Beatson, G. (1896). Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet* **2**, 104-107.
- Beeram, M., Tan, Q. T., Tekmal, R., Russell, D., Middleton, A. and Degraffenried, L. (2007). Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann Oncol* **18**(8), 1323-1328.
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P. and Tsichlis, P. N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* **254**(5029), 274-7.
- Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A. and Testa, J. R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* **94**, 29-86.
- Berry, M., Metzger, D. and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *Embo J* **9**(9), 2811-8.
- Bertelsen, B. I., Steine, S. J., Sandvei, R., Molven, A. and Laerum, O. D. (2006). Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer* **118**(8), 1877-83.
- Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J. and Stansfield, I. (2001). Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology* **147**(Pt 2), 255-69.

- Beuvink, I., Boulay, A., Fumagalli, S., Zilbermann, F., Ruetz, S., O'Reilly, T., Natt, F., Hall, J., Lane, H. A. and Thomas, G. (2005). The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell* **120**(6), 747-59.
- Bjornsti, M. A. and Houghton, P. J. (2004). The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**(5), 335-48.
- Blankenstein, M. A., Henkelman, M. S. and Klijn, J. G. (1985). Direct inhibitory effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist on MCF-7 human breast cancer cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* **21**(12), 1493-9.
- Boguski, M. S. and McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**(6456), 643-54.
- Borgna, J. L. and Rochefort, H. (1981). Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *J Biol Chem* **256**(2), 859-68.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**(17), 4682-9.
- Bouker, K. B., Skaar, T. C., Fernandez, D. R., O'Brien, K. A., Riggins, R. B., Cao, D. and Clarke, R. (2004). Interferon regulatory factor-1 mediates the proapoptotic but not cell cycle arrest effects of the steroidal antiestrogen ICI 182,780 (faslodex, fulvestrant). *Cancer Res* **64**(11), 4030-9.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brazil, D. P. and Hemmings, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signaling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* **26**(11), 657-64.
- Bruchovsky, N. and Van Doorn, E. (1976). Steroid receptor proteins and regulation of growth in mammary tumors. *Recent Results Cancer Res* (57), 121-42.
- Brueggemeier, R. W., Hackett, J. C. and Diaz-Cruz, E. S. (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr Rev* **26**(3), 331-45.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**(6), 857-68.
- Budtz, P. E. (1999). Role of proliferation and apoptosis in net growth rates of human breast cancer cells (MCF-7) treated with oestradiol and/or tamoxifen. *Cell Prolif* **32**(5), 289-302.
- Bulun, S. E., Lin, Z., Imir, G., Amin, S., Demura, M., Yilmaz, B., Martin, R., Utsunomiya, H., Thung, S., Gurates, B., Tamura, M., Langoi, D. and Deb, S. (2005). Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* **57**(3), 359-83.
- Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J. and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* **15**(9), 2174-83.
- Butler, A. A., Yakar, S., Gewolb, I. H., Karas, M., Okubo, Y. and LeRoith, D. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **121**(1), 19-26.

- Caldon, C. E., Daly, R. J., Sutherland, R. L. and Musgrove, E. A. (2006). Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* **97**(2), 261-74.
- Campbell, I. G., Russell, S. E., Choong, D. Y., Montgomery, K. G., Ciavarella, M. L., Hooi, C. S., Cristiano, B. E., Pearson, R. B. and Phillips, W. A. (2004). Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* **64**(21), 7678-81.
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S. and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* **276**(13), 9817-24.
- Cannings, E., Kirkegaard, T., Tovey, S. M., Dunne, B., Cooke, T. G. and Bartlett, J. M. (2007). Bad expression predicts outcome in patients treated with tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* **102**(2), 173-9.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**(5573), 1655-7.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**(5392), 1318-21.
- Cariou, S., Donovan, J. C., Flanagan, W. M., Milic, A., Bhattacharya, N. and Slingerland, J. M. (2000). Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16), 9042-6.
- Carpenter, G. (2003). ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* **284**(1), 66-77.
- Carroll, J. S., Prall, O. W., Musgrove, E. A. and Sutherland, R. L. (2000). A pure estrogen antagonist inhibits cyclin E-Cdk2 activity in MCF-7 breast cancer cells and induces accumulation of p130-E2F4 complexes characteristic of quiescence. *J Biol Chem* **275**(49), 38221-9.
- Catania, C., Ascione, G., Adamoli, L., De Pas, T., Medici, M., Franceschelli, L., Verri, E., Magni, E., Sanna, G., Torrisi, R., Goldhirsch, A. and Nole, F. (2007). Fulvestrant in heavily pre-treated patients with advanced breast cancer: results from a single compassionate use programme centre. *Breast Cancer Res Treat*.
- Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548), 454-7.
- Chen, R. H., Sarnecki, C. and Blenis, J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* **12**(3), 915-27.
- Chen, R. H., Abate, C. and Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23), 10952-6.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. and Cobb, M. H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* **101**(8), 2449-76.
- Chiarini, F., Del Sole, M., Mongiorgi, S., Gaboardi, G. C., Cappellini, A., Mantovani, I., Follo, M. Y., McCubrey, J. A. and Martelli, A. M. (2008). The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia* **22**(6), 1106-16.

- Choi, K. C., Auersperg, N. and Leung, P. C. (2001). Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(10), 5075-8.
- Chou, C. S., Beristain, A. G., MacCalman, C. D. and Leung, P. C. (2004). Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(3), 1459-66.
- Ciardiello, F., Caputo, R., Bianco, R., Damiano, V., Pomatico, G., De Placido, S., Bianco, A. R. and Tortora, G. (2000). Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **6**(5), 2053-63.
- Cicatiello, L., Addeo, R., Altucci, L., Belsito Petrizzi, V., Boccia, V., Cancemi, M., Germano, D., Pacilio, C., Salzano, S., Bresciani, F. and Weisz, A. (2000). The antiestrogen ICI 182,780 inhibits proliferation of human breast cancer cells by interfering with multiple, sequential estrogen-regulated processes required for cell cycle completion. *Mol Cell Endocrinol* **165**(1-2), 199-209.
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S. and Dennis, P. A. (2002). Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* **1**(9), 707-17.
- Clarke, R., Leonessa, F., Welch, J. N. and Skaar, T. C. (2001). Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* **53**(1), 25-71.
- Claus, E. B., Risch, N. and Thompson, W. D. (1994). Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* **73**(3), 643-51.
- Clemmons, D. R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(1), 45-62.
- Corbin, C. J., Trant, J. M. and Conley, A. J. (2001). Porcine gonadal and placental isozymes of aromatase cytochrome P450: sub-cellular distribution and support by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mol Cell Endocrinol* **172**(1-2), 115-24.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* **77**(6), 841-52.
- Crespo, J. L. and Hall, M. N. (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4), 579-91, table of contents.
- Crews, C. M., Alessandrini, A. and Erikson, R. L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**(5081), 478-80.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**(6559), 785-9.
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K. H., Aiba, S., Brocker, E. B., LeBoit, P. E., Pinkel, D. and Bastian, B. C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* **353**(20), 2135-47.

- Curtin, J. A., Stark, M. S., Pinkel, D., Hayward, N. K. and Bastian, B. C. (2006). PI3-kinase subunits are infrequent somatic targets in melanoma. *J Invest Dermatol* **126**(7), 1660-3.
- Dao, T. L. and Huggins, C. (1955). Bilateral adrenalectomy in the treatment of cancer of the breast. *AMA Arch Surg* **71**(5), 645-57.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**(2), 231-41.
- Datta, S. R., Brunet, A. and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* **13**(22), 2905-27.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R. and Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**(6892), 949-54.
- De Meyts, P., Wallach, B., Christoffersen, C. T., Urso, B., Gronskov, K., Latus, L. J., Yakushiji, F., Ilondo, M. M. and Shymko, R. M. (1994). The insulin-like growth factor-I receptor. Structure, ligand-binding mechanism and signal transduction. *Horm Res* **42**(4-5), 152-69.
- deGraffenried, L. A., Friedrichs, W. E., Russell, D. H., Donzis, E. J., Middleton, A. K., Silva, J. M., Roth, R. A. and Hidalgo, M. (2004). Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity. *Clin Cancer Res* **10**(23), 8059-67.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**(5338), 687-9.
- Dittadi, R. and Gion, M. (2000). More about: prognostic importance of low c-erbB2 expression in breast tumors. *J Natl Cancer Inst* **92**(17), 1443-4.
- Doisneau-Sixou, S. F., Cestac, P., Faye, J. C., Favre, G. and Sutherland, R. L. (2003). Additive effects of tamoxifen and the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 on inhibition of MCF-7 breast cancer cell-cycle progression. *Int J Cancer* **106**(5), 789-98.
- Dondi, D., Moretti, R. M., Montagnani Marelli, M., Pratesi, G., Polizzi, D., Milani, M., Motta, M. and Limonta, P. (1998). Growth-inhibitory effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on xenografts of the DU 145 human androgen-independent prostate cancer cell line in nude mice. *Int J Cancer* **76**(4), 506-11.
- Douros, J. and Suffness, M. (1981). New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* **8**(1), 63-87.
- Dowsett, M., Archer, C., Assersohn, L., Gregory, R. K., Ellis, P. A., Salter, J., Chang, J., Mainwaring, P., Boeddinghaus, I., Johnston, S. R., Powles, T. J. and Smith, I. E. (1999). Clinical studies of apoptosis and proliferation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **6**(1), 25-8.

- Dowsett, M. (2001). Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**(3), 191-5.
- Dowsett, M., Harper-Wynne, C., Boeddinghaus, I., Salter, J., Hills, M., Dixon, M., Ebbs, S., Gui, G., Sacks, N. and Smith, I. (2001). HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. *Cancer Res* **61**(23), 8452-8.
- Du, K. and Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* **273**(49), 32377-9.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. and Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(17), 7686-9.
- Dutertre, M. and Smith, C. L. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther* **295**(2), 431-7.
- Edwards, D. P. and Boonyaratanakornkit, V. (2003). Rapid extranuclear signaling by the estrogen receptor (ER): MNAR couples ER and Src to the MAP kinase signaling pathway. *Mol Interv* **3**(1), 12-5.
- Edwards, D. P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* **67**, 335-76.
- Eicke, N., Gunthert, A. R., Viereck, V., Siebold, D., Behe, M., Becker, T., Emons, G. and Grundker, C. (2005). GnRH-II receptor-like antigenicity in human placenta and in cancers of the human reproductive organs. *Eur J Endocrinol* **153**(4), 605-12.
- Eidne, K. A., Flanagan, C. A., Harris, N. S. and Millar, R. P. (1987). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab* **64**(3), 425-32.
- Ellis, P. A., Sacconi-Jotti, G., Clarke, R., Johnston, S. R., Anderson, E., Howell, A., A'Hern, R., Salter, J., Detre, S., Nicholson, R., Robertson, J., Smith, I. E. and Dowsett, M. (1997). Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* **72**(4), 608-13.
- Elrod, H. A., Lin, Y. D., Yue, P., Wang, X., Lonial, S., Khuri, F. R. and Sun, S. Y. (2007). The alkylphospholipid perfosine induces apoptosis of human lung cancer cells requiring inhibition of Akt and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Mol Cancer Ther* **6**(7), 2029-38.
- Emons, G., Ortmann, O., Becker, M., Irmer, G., Springer, B., Laun, R., Holzel, F., Schulz, K. D. and Schally, A. V. (1993). High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* **53**(22), 5439-46.
- Emons, G., Muller, V., Ortmann, O., Grossmann, G., Trautner, U., Stuckrad, B. V., Schulz, K. D. and Schally, A. V. (1996a). Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin antagonizes signal transduction and mitogenic activity of epidermal growth factor in human ovarian and endometrial cancer cell lines. *Int J Oncol* **9**, 1129-1137.
- Emons, G., Ortmann, O., Teichert, H. M., Fassl, H., Lohrs, U., Kullander, S., Kauppila, A., Ayalon, D., Schally, A. and Oberheuser, F. (1996b). Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin in combination with cytotoxic chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. A prospective double blind randomized trial. Decapeptyl Ovarian Cancer Study Group. *Cancer* **78**(7), 1452-60.

- Emons, G. (2001). [Hormone replacement therapy after menopause]. *Dtsch Med Wochenschr* **126**(9), 253-4.
- Emons, G., Grundker, C., Gunthert, A. R., Westphalen, S., Kavanagh, J. and Verschraegen, C. (2003). GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* **10**(2), 291-9.
- Eng, C. P., Sehgal, S. N. and Vezina, C. (1984). Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)* **37**(10), 1231-7.
- Engel, J. B., Honig, A., Schonhals, T., Weidler, C., Hausler, S., Krockenberger, M., Grunewald, T. G., Dombrowski, Y., Rieger, L., Dietl, J. and Wischhusen, J. (2008). Perifosine inhibits growth of human experimental endometrial cancers by blockade of AKT phosphorylation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **141**(1), 64-9.
- Fabian, C., Tilzer, L. and Sternson, L. (1981). Comparative binding affinities of tamoxifen, 4-hydroxytamoxifen, and desmethyltamoxifen for estrogen receptors isolated from human breast carcinoma: correlation with blood levels in patients with metastatic breast cancer. *Biopharm Drug Dispos* **2**(4), 381-90.
- Faridi, J., Wang, L., Endemann, G. and Roth, R. A. (2003). Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo. *Clin Cancer Res* **9**(8), 2933-9.
- Fasolo, A. and Sessa, C. (2008). mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* **17**(11), 1717-34.
- Favoni, R. E. and de Cupis, A. (2000). The role of polypeptide growth factors in human carcinomas: new targets for a novel pharmacological approach. *Pharmacol Rev* **52**(2), 179-206.
- Fekete, M., Wittliff, J. L. and Schally, A. V. (1989). Characteristics and distribution of receptors for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal* **3**(3), 137-47.
- Feng, Q., Yi, P., Wong, J. and O'Malley, B. W. (2006). Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol Cell Biol* **26**(21), 7846-57.
- Ferrand, C., Giess, M. C., Raynaud, B., Swerts, J. P., Delteil, C., Clarous, D. and Weber, M. (1985). The role of extracellular signals in the differentiation of cholinergic neurons from the CNS and PNS in culture. *J Physiol (Paris)* **80**(4), 233-7.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. and Frackelton, A. R., Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* **14**(10), 1649-60.
- Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**(2), 231-8.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., Jr. and Bland, K. I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* **16**(1), 70-84.

- Fisher, B., Costantino, J. P., Redmond, C. K., Fisher, E. R., Wickerham, D. L. and Cronin, W. M. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* **86**(7), 527-37.
- Fleming, F. J., Hill, A. D., McDermott, E. W., O'Higgins, N. J. and Young, L. S. (2004). Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1), 375-83.
- Floryk, D. and Thompson, T. C. (2008). Perifosine induces differentiation and cell death in prostate cancer cells. *Cancer Lett* **266**(2), 216-26.
- Foekens, J. A., Henkelman, M. S., Fekking, J. F., Blankenstein, M. A. and Klijn, J. G. (1986). Combined effects of buserelin, estradiol and tamoxifen on the growth of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **140**(2), 550-6.
- Fournet-Dulguerov, N., MacLusky, N. J., Leranath, C. Z., Todd, R., Mendelson, C. R., Simpson, E. R. and Naftolin, F. (1987). Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **65**(4), 757-64.
- Freake, H. C., Marcocci, C., Iwasaki, J. and MacIntyre, I. (1981). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ specifically binds to a human breast cancer cell line (T47D) and stimulates growth. *Biochem Biophys Res Commun* **101**(4), 1131-8.
- Frogne, T., Jepsen, J. S., Larsen, S. S., Fog, C. K., Brockdorff, B. L. and Lykkesfeldt, A. E. (2005). Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated protein kinase B/Akt for growth. *Endocr Relat Cancer* **12**(3), 599-614.
- Fujimoto, N. and Katzenellenbogen, B. S. (1994). Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence. *Mol Endocrinol* **8**(3), 296-304.
- Fukunaga, R. and Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* **16**(8), 1921-33.
- Furr, B. J. and Jordan, V. C. (1984). The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* **25**(2), 127-205.
- Gajate, C. and Mollinedo, F. (2007). Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **109**(2), 711-9.
- Gee, J. M., Harper, M. E., Hutcheson, I. R., Madden, T. A., Barrow, D., Knowlden, J. M., McClelland, R. A., Jordan, N., Wakeling, A. E. and Nicholson, R. I. (2003). The antiepidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves antihormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology* **144**(11), 5105-17.
- Geisinger, K. R., Kute, T. E., Pettenati, M. J., Welander, C. E., Dennard, Y., Collins, L. A. and Berens, M. E. (1989). Characterization of a human ova-

- rian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors. *Cancer* **63**(2), 280-8.
- Gelmann, E. P. (1996). Tamoxifen induction of apoptosis in estrogen receptor-negative cancers: new tricks for an old dog? *J Natl Cancer Inst* **88**(5), 224-6.
- Ghayad, S. E., Bieche, I., Vendrell, J. A., Keime, C., Lidereau, R., Dumontet, C. and Cohen, P. A. (2008). mTOR inhibition reverses acquired endocrine therapy resistance of breast cancer cells at the cell proliferation and gene-expression levels. *Cancer Sci* **99**(10), 1992-2003.
- Gills, J. J. and Dennis, P. A. (2009). Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep* **11**(2), 102-10.
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R. and Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev* **15**(21), 2852-64.
- Girault, I., Lerebours, F., Amarir, S., Tozlu, S., Tubiana-Hulin, M., Lidereau, R. and Bieche, I. (2003). Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res* **9**(4), 1259-66.
- Girgert, R., Schimming, H., Korner, W., Grundker, C. and Hanf, V. (2005). Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by ELF electromagnetic fields. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(4), 1144-9.
- Girgert, R., Grundker, C., Emons, G. and Hanf, V. (2007). Electromagnetic fields alter the expression of estrogen receptor cofactors in breast cancer cells. *Bioelectromagnetics*.
- Glasel, J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* **18**(1), 62-3.
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**(2), 121-41.
- Gonzalez, F. A., Seth, A., Raden, D. L., Bowman, D. S., Fay, F. S. and Davis, R. J. (1993). Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol* **122**(5), 1089-101.
- Goodwin, P. J., DeBoer, G., Clark, R. M., Catton, P., Redwood, S., Hood, N. and Boyd, N. F. (1995). Cyclical mastopathy and premenopausal breast cancer risk. Results of a case-control study. *Breast Cancer Res Treat* **33**(1), 63-73.
- Gospodarowicz, D., Greenburg, G., Bialecki, H. and Zetter, B. R. (1978). Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro* **14**(1), 85-118.
- Green, K. A. and Carroll, J. S. (2007). Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer* **7**(9), 713-22.
- Gronemeyer, H., Benhamou, B., Berry, M., Bocquel, M. T., Gofflo, D., Garcia, T., Lerouge, T., Metzger, D., Meyer, M. E., Tora, L. and et al. (1992). Mechanisms of antihormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**(3-8), 217-21.
- Grundker, C., Volker, P. and Emons, G. (2001). Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovari-

- an cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* **142**(6), 2369-80.
- Grundker, C., Gunthert, A. R., Millar, R. P. and Emons, G. (2002a). Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(3), 1427-30.
- Grundker, C., Gunthert, A. R., Westphalen, S. and Emons, G. (2002b). Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* **146**(1), 1-14.
- Grundker, C., Schlotawa, L., Viereck, V., Eicke, N., Horst, A., Kairies, B. and Emons, G. (2004). Antiproliferative effects of the GnRH antagonist cetrorelix and of GnRH-II on human endometrial and ovarian cancer cells are not mediated through the GnRH type I receptor. *Eur J Endocrinol* **151**(1), 141-9.
- Guenther, M. G., Barak, O. and Lazar, M. A. (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* **21**(18), 6091-101.
- Gunthert, A. R., Grundker, C., Olota, A., Lasche, J., Eicke, N. and Emons, G. (2005). Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol* **153**(4), 613-25.
- Gururaj, A. E., Rayala, S. K., Vadlamudi, R. K. and Kumar, R. (2006). Novel mechanisms of resistance to endocrine therapy: genomic and nongenomic considerations. *Clin Cancer Res* **12**(3 Pt 2), 1001s-1007s.
- Gustafsson, J. A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* **163**(3), 379-83.
- Gusterson, B., Cowley, G., Smith, J. A. and Ozanne, B. (1984). Cellular localization of human epidermal growth factor receptor. *Cell Biol Int Rep* **8**(8), 649-58.
- Gutierrez, M. C., Detre, S., Johnston, S., Mohsin, S. K., Shou, J., Allred, D. C., Schiff, R., Osborne, C. K. and Dowsett, M. (2005). Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol* **23**(11), 2469-76.
- Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. and Carraway, K. L., 3rd. (1994). Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17), 8132-6.
- Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999). Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2), 184-9.
- Han, E. K., Levenson, J. D., McGonigal, T., Shah, O. J., Woods, K. W., Hunter, T., Giranda, V. L. and Luo, Y. (2007). Akt inhibitor A-443654 induces rapid Akt Ser-473 phosphorylation independent of mTORC1 inhibition. *Oncogene* **26**(38), 5655-61.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C. and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* **273**(23), 14484-94.

- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K. and Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 5), 647-62.
- Heimberg, M., Weinstein, I., LeQuire, V. S. and Cohen, S. (1965). The induction of fatty liver in neonatal animals by a purified protein (EGF) from mouse submaxillary gland. *Life Sci* **4**(17), 1625-33.
- Henderson, B. E., Ross, R. and Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* **48**(2), 246-53.
- Hennessy, B. T., Lu, Y., Poradosu, E., Yu, Q., Yu, S., Hall, H., Carey, M. S., Ravoori, M., Gonzalez-Angulo, A. M., Birch, R., Henderson, I. C., Kundra, V. and Mills, G. B. (2007). Pharmacodynamic markers of perifosine efficacy. *Clin Cancer Res* **13**(24), 7421-31.
- Hershkovitz, E., Marbach, M., Bosin, E., Levy, J., Roberts, C. T., Jr., LeRoith, D., Schally, A. V. and Sharoni, Y. (1993). Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists interfere with autocrine and paracrine growth stimulation of MCF-7 mammary cancer cells by insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* **77**(4), 963-8.
- Herynk, M. H. and Fuqua, S. A. (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* **25**(6), 869-98.
- Hoffmann, R., Baillie, G. S., MacKenzie, S. J., Yarwood, S. J. and Houslay, M. D. (1999). The MAP kinase ERK2 inhibits the cyclic AMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *Embo J* **18**(4), 893-903.
- Holbro, T., Beerli, R. R., Maurer, F., Koziczak, M., Barbas, C. F., 3rd and Hynes, N. E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15), 8933-8.
- Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 195-217.
- Holm, C., Rayala, S., Jirstrom, K., Stal, O., Kumar, R. and Landberg, G. (2006). Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* **98**(10), 671-80.
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D. and et al. (1992). Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**(5060), 1205-10.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**(6548), 397-404.
- Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S. and Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol* **10**(10), 1167-77.
- Hsiao, K. M., Chou, S. Y., Shih, S. J. and Ferrell, J. E., Jr. (1994). Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12), 5480-4.

- Hu, X. F., Veroni, M., De Luise, M., Wakeling, A., Sutherland, R., Watts, C. K. and Zalcborg, J. R. (1993). Circumvention of tamoxifen resistance by the pure anti-estrogen ICI 182,780. *Int J Cancer* **55**(5), 873-6.
- Huang, H. J., Norris, J. D. and McDonnell, D. P. (2002). Identification of a negative regulatory surface within estrogen receptor alpha provides evidence in support of a role for corepressors in regulating cellular responses to agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* **16**(8), 1778-92.
- Hulka, B. S. and Moorman, P. G. (2008). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* **61**(1-2), 203-13; discussion 213.
- Hurtado, A., Holmes, K. A., Geistlinger, T. R., Hutcheson, I. R., Nicholson, R. I., Brown, M., Jiang, J., Howat, W. J., Ali, S. and Carroll, J. S. (2008). Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* **456**(7222), 663-6.
- Hwang, S. K., Lim, H. T., Minai-Tehrani, A., Lee, E. S., Park, J., Park, S. B., Beck Jr, G. R. and Cho, M. H. (2009). Repeated Aerosol Delivery of Carboxyl-Terminal Modulator Protein Suppresses Tumor in the Lungs of K-rasLA1 mice. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Ignatoski, K. M., Maehama, T., Markwart, S. M., Dixon, J. E., Livant, D. L. and Ethier, S. P. (2000). ERBB-2 overexpression confers PI 3' kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells. *Br J Cancer* **82**(3), 666-74.
- Imai, A., Takagi, H., Furui, T., Horibe, S., Fuseya, T. and Tamaya, T. (1996). Evidence for coupling of phosphotyrosine phosphatase to gonadotropin-releasing hormone receptor in ovarian carcinoma membrane. *Cancer* **77**(1), 132-7.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S. Y., Huang, Q., Qin, J. and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**(1), 125-37.
- Jackson, T. A., Richer, J. K., Bain, D. L., Takimoto, G. S., Tung, L. and Horwitz, K. B. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* **11**(6), 693-705.
- Jensen, E. V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* **6**, 47-59.
- Jin, S., DiPaola, R. S., Mathew, R. and White, E. (2007). Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* **120**(Pt 3), 379-83.
- Joel, P. B., Smith, J., Sturgill, T. W., Fisher, T. L., Blenis, J. and Lannigan, D. A. (1998). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* **18**(4), 1978-84.
- Johnston, S. R., Sacconi-Jotti, G., Smith, I. E., Salter, J., Newby, J., Coppen, M., Ebbs, S. R. and Dowsett, M. (1995). Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res* **55**(15), 3331-8.
- Johnston, S. R., Martin, L. A., Head, J., Smith, I. and Dowsett, M. (2005). Aromatase inhibitors: combinations with fulvestrant or signal transduction inhibitors as a strategy to overcome endocrine resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* **95**(1-5), 173-81.

- Jones, J. I. and Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**(1), 3-34.
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F. and Hemmings, B. A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10), 4171-5.
- Jordan, V. C. (2004). Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* **5**(3), 207-13.
- Kahan, B. D. (1993). Optimization of cyclosporine therapy. *Transplant Proc* **25**(4 Suppl 3), 5-9.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. and Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**(1), 16-23.
- Kampa, M. and Castanas, E. (2006). Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells. *Mol Cell Endocrinol* **246**(1-2), 76-82.
- Kandel, E. S. and Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* **253**(1), 210-29.
- Kang, S., Bader, A. G. and Vogt, P. K. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(3), 802-7.
- Kang, S. K., Tai, C. J., Nathwani, P. S. and Leung, P. C. (2001). Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* **142**(1), 182-92.
- Karunakaran, D., Tzahar, E., Beerli, R. R., Chen, X., Graus-Porta, D., Ratzkin, B. J., Seger, R., Hynes, N. E. and Yarden, Y. (1996). ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *Embo J* **15**(2), 254-64.
- Katanoda, K. and Qiu, D. (2007). Comparison of Time Trends in Female Breast Cancer Incidence (1973-1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents, Vols IV-VIII. *Jpn J Clin Oncol* **37**(8), 638-9.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**(5241), 1491-4.
- Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G., Montano, M., Sun, J., Weis, K. and Katzenellenbogen, J. A. (2000a). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5), 279-85.
- Katzenellenbogen, B. S. and Katzenellenbogen, J. A. (2000b). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* **2**(5), 335-44.
- Kennedy, B. J. (1962). Massive estrogen administration in premenopausal women with metastatic breast cancer. *Cancer* **15**, 641-8.
- Kim, H. H., Sierke, S. L. and Koland, J. G. (1994). Epidermal growth factor-dependent association of phosphatidylinositol 3-kinase with the erbB3 gene product. *J Biol Chem* **269**(40), 24747-55.

- Kirkegaard, T., Witton, C. J., McGlynn, L. M., Tovey, S. M., Dunne, B., Lyon, A. and Bartlett, J. M. (2005). AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol* **207**(2), 139-46.
- Klijn, J. G. and de Jong, F. H. (1982). Treatment with a luteinising-hormone-releasing-hormone analogue (buserelin) in premenopausal patients with metastatic breast cancer. *Lancet* **1**(8283), 1213-6.
- Klinge, C. M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**(5), 227-51.
- Knobbe, C. B., Reifenberger, J., Blaschke, B. and Reifenberger, G. (2004). Hypermethylation and transcriptional downregulation of the carboxyl-terminal modulator protein gene in glioblastomas. *J Natl Cancer Inst* **96**(6), 483-6.
- Knowlden, J. M., Hutcheson, I. R., Jones, H. E., Madden, T., Gee, J. M., Harper, M. E., Barrow, D., Wakeling, A. E. and Nicholson, R. I. (2003). Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* **144**(3), 1032-44.
- Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G. B., Mendelsohn, J. and Fan, Z. (2003). HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* **22**(21), 3205-12.
- Kobayashi, M., Iwamatsu, A., Shinohara-Kanda, A., Ihara, S. and Fukui, Y. (2003). Activation of ErbB3-PI3-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas. *Oncogene* **22**(9), 1294-301.
- Kobayashi, S. (1971). Studies on the estrogen-receptors in human breast cancer. *Nagoya Med J* **16**(3), 165-76.
- Kohno, M. and Pouyssegur, J. (2003). Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 219-24.
- Kondapaka, S. B., Singh, S. S., Dasmahapatra, G. P., Sausville, E. A. and Roy, K. K. (2003). Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* **2**(11), 1093-103.
- Kong, D., Suzuki, A., Zou, T. T., Sakurada, A., Kemp, L. W., Wakatsuki, S., Yokoyama, T., Yamakawa, H., Furukawa, T., Sato, M., Ohuchi, N., Sato, S., Yin, J., Wang, S., Abraham, J. M., Souza, R. F., Smolinski, K. N., Meltzer, S. J. and Horii, A. (1997). PTEN1 is frequently mutated in primary endometrial carcinomas. *Nat Genet* **17**(2), 143-4.
- Koseoglu, S., Lu, Z., Kumar, C., Kirschmeier, P. and Zou, J. (2007). AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knock-down of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines. *Cancer Biol Ther* **6**(5), 755-62.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C. and Aaronson, S. A. (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23), 9193-7.
- Kraus, S., Levy, G., Hanoch, T., Naor, Z. and Seger, R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH2-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer Res* **64**(16), 5736-44.

- Kurokawa, H., Lenferink, A. E., Simpson, J. F., Pisacane, P. I., Sliwkowski, M. X., Forbes, J. T. and Arteaga, C. L. (2000). Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* **60**(20), 5887-94.
- Labrie, F., Belanger, A., Cusan, L., Gomez, J. L. and Candas, B. (1997). Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* **82**(8), 2396-402.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Lasserre, R., Guo, X. J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A. M., Soudja, S. M., Lenne, P. F., Rigneault, H., Olive, D., Bismuth, G., Nunes, J. A., Payrastre, B., Marguet, D. and He, H. T. (2008). Raft nano-domains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol* **4**(9), 538-47.
- Lavinsky, R. M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T. M., Schiff, R., Del-Rio, A. L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Rose, D. W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6), 2920-5.
- Lee, A. V. and Yee, D. (1995). Insulin-like growth factors and breast cancer. *Biomed Pharmacother* **49**(9), 415-21.
- Lee, A. V., Weng, C. N., Jackson, J. G. and Yee, D. (1997). Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells. *J Endocrinol* **152**(1), 39-47.
- Lees, J. A., Fawell, S. E. and Parker, M. G. (1989). Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J Steroid Biochem* **34**(1-6), 33-9.
- Leighl, N. B., Dent, S., Clemons, M., Vandenberg, T. A., Tozer, R., Warr, D. G., Crump, R. M., Hedley, D., Pond, G. R., Dancey, J. E. and Moore, M. J. (2008). A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **108**(1), 87-92.
- Lemon, H. M. (1970). Abnormal estrogen metabolism and tissue estrogen receptor proteins in breast cancer. *Cancer* **25**(2), 423-35.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993). Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *J Cell Biol* **122**(5), 1079-88.
- Levin, E. R. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* **67**(6), 471-5.
- Levine, D. A., Bogomolny, F., Yee, C. J., Lash, A., Barakat, R. R., Borgen, P. I. and Boyd, J. (2005). Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* **11**(8), 2875-8.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Milaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H. and Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**(5308), 1943-7.

- Liang, K., Jin, W., Knuefermann, C., Schmidt, M., Mills, G. B., Ang, K. K., Milas, L. and Fan, Z. (2003). Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway for enhancing breast cancer cells to radiotherapy. *Mol Cancer Ther* **2**(4), 353-60.
- Lin, H. J., Hsieh, F. C., Song, H. and Lin, J. (2005). Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br J Cancer* **93**(12), 1372-81.
- Linke, S. P., Bremer, T. M., Herold, C. D., Sauter, G. and Diamond, C. (2006). A multimarker model to predict outcome in tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **12**(4), 1175-83.
- LoPiccolo, J., Granville, C. A., Gills, J. J. and Dennis, P. A. (2007). Targeting Akt in cancer therapy. *Anticancer Drugs* **18**(8), 861-74.
- Lorenz, M. C. and Heitman, J. (1995). TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J Biol Chem* **270**(46), 27531-7.
- Losel, R. and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(1), 46-56.
- Love, R. R. (1989). Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol* **7**(6), 803-15.
- Lown, J. W. (1993). Anthracycline and anthraquinone anticancer agents: current status and recent developments. *Pharmacol Ther* **60**(2), 185-214.
- Lykkesfeldt, A. E., Madsen, M. W. and Briand, P. (1994). Altered expression of estrogen-regulated genes in a tamoxifen-resistant and ICI 164,384 and ICI 182,780 sensitive human breast cancer cell line, MCF-7/TAMR-1. *Cancer Res* **54**(6), 1587-95.
- Lykkesfeldt, A. E., Larsen, S. S. and Briand, P. (1995). !!!Artikel nicht verfügbar!!! Human breast cancer cell lines resistant to pure anti-estrogens are sensitive to tamoxifen treatment. *Int J Cancer* **61**(4), 529-34.
- MacCallum, J., Cummings, J., Dixon, J. M. and Miller, W. R. (2000). Concentrations of tamoxifen and its major metabolites in hormone responsive and resistant breast tumours. *Br J Cancer* **82**(10), 1629-35.
- MacGregor, J. I. and Jordan, V. C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* **50**(2), 151-96.
- Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**(22), 13375-8.
- Maira, S. M., Galetic, I., Brazil, D. P., Kaech, S., Ingley, E., Thelen, M. and Hemmings, B. A. (2001). Carboxyl-terminal modulator protein (CTMP), a negative regulator of PKB/Akt and v-Akt at the plasma membrane. *Science* **294**(5541), 374-80.
- Majumder, P. K., Febbo, P. G., Bikoff, R., Berger, R., Xue, Q., McMahon, L. M., Manola, J., Brugarolas, J., McDonnell, T. J., Golub, T. R., Loda, M., Lane, H. A. and Sellers, W. R. (2004). mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* **10**(6), 594-601.
- Mandlekar, S., Yu, R., Tan, T. H. and Kong, A. N. (2000). Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* **60**(21), 5995-6000.

- Mandlekar, S. and Kong, A. N. (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* **6**(6), 469-77.
- Mangia, A., Tommasi, S., Reshkin, S. J., Simone, G., Stea, B., Schittulli, F. and Paradiso, A. (2002). Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep* **9**(5), 1127-32.
- Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* **28**(11), 573-6.
- Martin, L. A., Pancholi, S., Chan, C. M., Farmer, I., Kimberley, C., Dowsett, M. and Johnston, S. R. (2005). The anti-oestrogen ICI 182,780, but not tamoxifen, inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells refractory to long-term oestrogen deprivation through down-regulation of oestrogen receptor and IGF signalling. *Endocr Relat Cancer* **12**(4), 1017-36.
- Matthews, J., Wihlen, B., Tujague, M., Wan, J., Strom, A. and Gustafsson, J. A. (2006). Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol* **20**(3), 534-43.
- McClelland, R. A., Gee, J. M., Francis, A. B., Robertson, J. F., Blamey, R. W., Wakeling, A. E. and Nicholson, R. I. (1996). Short-term effects of pure anti-oestrogen ICI 182780 treatment on oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha protein expression in human breast cancer. *Eur J Cancer* **32A**(3), 413-6.
- McDonell, M. W., Simon, M. N. and Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **110**(1), 119-46.
- McDonnell, D. P., Dana, S. L., Hoener, P. A., Lieberman, B. A., Imhof, M. O. and Stein, R. B. (1995). Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci* **761**, 121-37.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B. and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20**(3), 321-44.
- McKenna, N. J. and O'Malley, B. W. (2000). An issue of tissues: divining the split personalities of selective estrogen receptor modulators. *Nat Med* **6**(9), 960-2.
- McKenna, N. J. and O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**(4), 465-74.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C. and Auricchio, F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J* **19**(20), 5406-17.
- Miller, W. R., Scott, W. N., Morris, R., Fraser, H. M. and Sharpe, R. M. (1985). Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* **313**(5999), 231-3.
- Miller, W. R. (1991). Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* **39**(5B), 783-90.
- Mills, G. B., Lu, Y., Fang, X., Wang, H., Eder, A., Mao, M., Swaby, R., Cheng, K. W., Stokoe, D., Siminovitch, K., Jaffe, R. and Gray, J. (2001). The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase

- pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. *Semin Oncol* **28**(5 Suppl 16), 125-41.
- Miyake, T., Yoshino, K., Enomoto, T., Takata, T., Ugaki, H., Kim, A., Fujiwara, K., Miyatake, T., Fujita, M. and Kimura, T. (2008). PIK3CA gene mutations and amplifications in uterine cancers, identified by methods that avoid confounding by PIK3CA pseudogene sequences. *Cancer Lett* **261**(1), 120-6.
- Miyawaki, T., Ofengeim, D., Noh, K. M., Latuszek-Barrantes, A., Hemmings, B. A., Follenzi, A. and Zukin, R. S. (2009). The endogenous inhibitor of Akt, CTMP, is critical to ischemia-induced neuronal death. *Nat Neurosci*.
- Mizutani, T., Sugihara, A., Nakamuro, K. and Terada, N. (1998). Suppression of cell proliferation and induction of apoptosis in uterine leiomyoma by gonadotropin-releasing hormone agonist (leuprolide acetate). *J Clin Endocrinol Metab* **83**(4), 1253-5.
- Moasser, M. M., Basso, A., Averbuch, S. D. and Rosen, N. (2001). The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* **61**(19), 7184-8.
- Momota, H., Nerio, E. and Holland, E. C. (2005). Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res* **65**(16), 7429-35.
- Morgan, K., Conklin, D., Pawson, A. J., Sellar, R., Ott, T. R. and Millar, R. P. (2003). A transcriptionally active human type II gonadotropin-releasing hormone receptor gene homolog overlaps two genes in the antisense orientation on chromosome 1q.12. *Endocrinology* **144**(2), 423-36.
- Moriya, T., Suzuki, T., Pilichowska, M., Ariga, N., Kimura, N., Ouchi, N., Nagura, H. and Sasano, H. (2001). Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* **51**(5), 333-7.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* **392**(1), 49-53.
- Mouridsen, H., Palshof, T., Patterson, J. and Battersby, L. (1978). Tamoxifen in advanced breast cancer. *Cancer Treat Rev* **5**(3), 131-41.
- Murphy, C. S., Parker, C. J., McCague, R. and Jordan, V. C. (1991). Structure-activity relationships of nonisomerizable derivatives of tamoxifen: importance of hydroxyl group and side chain positioning for biological activity. *Mol Pharmacol* **39**(3), 421-8.
- Myers, E., Hill, A. D., Kelly, G., McDermott, E. W., O'Higgins, N. J., Buggy, Y. and Young, L. S. (2005). Associations and interactions between Ets-1 and Ets-2 and coregulatory proteins, SRC-1, AIB1, and NCoR in breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**(6), 2111-22.
- Myers, M. G., Jr., Sun, X. J., Cheatham, B., Jachna, B. R., Glasheen, E. M., Backer, J. M. and White, M. F. (1993). IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* **132**(4), 1421-30.
- Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M. T. and Torchia, J. (2007). The activity and stability of the transcriptional coactivator

- p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol Cell Biol* **27**(1), 120-34.
- Nazarewicz, R. R., Zenebe, W. J., Parihar, A., Larson, S. K., Alidema, E., Choi, J. and Ghafourifar, P. (2007). Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* **67**(3), 1282-90.
- Neill, J. D., Duck, L. W., Sellers, J. C. and Musgrove, L. C. (2001). A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun* **282**(4), 1012-8.
- Neill, J. D. (2002). GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* **143**(3), 737-43.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. and Nebert, D. W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**(1), 1-42.
- Neri, C., Berthois, Y., Schatz, B., Drieu, K. and Martin, P. M. (1990). Compared effects of GnRH analogs and 4-hydroxytamoxifen on growth and steroid receptors in antiestrogen sensitive and resistant MCF-7 breast cancer cell sublines. *Breast Cancer Res Treat* **15**(2), 85-93.
- Newcomb, P. A., Storer, B. E., Longnecker, M. P., Mittendorf, R., Greenberg, E. R., Clapp, R. W., Burke, K. P., Willett, W. C. and MacMahon, B. (1994). Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med* **330**(2), 81-7.
- Nicholson, K. M. and Anderson, N. G. (2002a). The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**(5), 381-95.
- Nicholson, K. M., Streuli, C. H. and Anderson, N. G. (2003). Autocrine signalling through erbB receptors promotes constitutive activation of protein kinase B/Akt in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* **81**(2), 117-28.
- Nicholson, R. I., McClelland, R. A., Finlay, P., Eaton, C. L., Gullick, W. J., Dixon, A. R., Robertson, J. F., Ellis, I. O. and Blamey, R. W. (1993). Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer* **29A**(7), 1018-23.
- Nicholson, R. I., Hutcheson, I. R., Harper, M. E., Knowlden, J. M., Barrow, D., McClelland, R. A., Jones, H. E., Wakeling, A. E. and Gee, J. M. (2002b). Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* **963**, 104-15.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**(2), 271-9.
- Noh, W. C., Mondesire, W. H., Peng, J., Jian, W., Zhang, H., Dong, J., Mills, G. B., Hung, M. C. and Meric-Bernstam, F. (2004). Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res* **10**(3), 1013-23.
- Oda, K., Okada, J., Timmerman, L., Rodriguez-Viciano, P., Stokoe, D., Shoji, K., Taketani, Y., Kuramoto, H., Knight, Z. A., Shokat, K. M. and McCormick, F. (2008). PIK3CA cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Res* **68**(19), 8127-36.

- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**(5), 953-9.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* **19**(13), 3159-67.
- Osborne, C. K., Bardou, V., Hopp, T. A., Chamness, G. C., Hilsenbeck, S. G., Fuqua, S. A., Wong, J., Allred, D. C., Clark, G. M. and Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **95**(5), 353-61.
- Osborne, C. K., Wakeling, A. and Nicholson, R. I. (2004). Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer* **90** Suppl 1, S2-6.
- Ottaviano, Y. L., Issa, J. P., Parl, F. F., Smith, H. S., Baylin, S. B. and Davidson, N. E. (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* **54**(10), 2552-5.
- Panigrahi, A. R., Pinder, S. E., Chan, S. Y., Paish, E. C., Robertson, J. F. and Ellis, I. O. (2004). The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* **204**(1), 93-100.
- Papa, V., Gliozzo, B., Clark, G. M., McGuire, W. L., Moore, D., Fujita-Yamaguchi, Y., Vigneri, R., Goldfine, I. D. and Pezzino, V. (1993). Insulin-like growth factor-I receptors are overexpressed and predict a low risk in human breast cancer. *Cancer Res* **53**(16), 3736-40.
- Papa, V., Tazzari, P. L., Chiarini, F., Cappellini, A., Ricci, F., Billi, A. M., Evangelisti, C., Ottaviani, E., Martinelli, G., Testoni, N., McCubrey, J. A. and Martelli, A. M. (2008). Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor perifosine in acute myelogenous leukemia cells. *Leukemia* **22**(1), 147-60.
- Parcellier, A., Tintignac, L. A., Zhuravleva, E. and Hemmings, B. A. (2008). PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal* **20**(1), 21-30.
- Parcellier, A., Tintignac, L. A., Zhuravleva, E., Cron, P., Schenk, S., Bozulic, L. and Hemmings, B. A. (2009). Carboxy-Terminal Modulator Protein (CTMP) is a mitochondrial protein that sensitizes cells to apoptosis. *Cell Signal* **21**(4), 639-50.
- Park, E. J., Schroen, D. J., Yang, M., Li, H., Li, L. and Chen, J. D. (1999). SMRTE, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors-extended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7), 3519-24.
- Parker, M. G. (1993). Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Treat* **26**(2), 131-7.
- Parsons, D. W., Wang, T. L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J. M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Lengauer, C. and Velculescu, V. E. (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* **436**(7052), 792.
- Pearson, O. H. and Ray, B. S. (1959). Results of hypophysectomy in the treatment of metastatic mammary carcinoma. *Cancer* **12**(1), 85-92.

- Perel, E., Wilkins, D. and Killinger, D. W. (1980). The conversion of androstenedione to estrone, estradiol, and testosterone in breast tissue. *J Steroid Biochem* **13**(1), 89-94.
- Perez-Tenorio, G. and Stal, O. (2002). Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* **86**(4), 540-5.
- Perez-Tenorio, G., Alkhori, L., Olsson, B., Waltersson, M. A., Nordenskjold, B., Rutqvist, L. E., Skoog, L. and Stal, O. (2007). PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* **13**(12), 3577-84.
- Perren, A., Weng, L. P., Boag, A. H., Ziebold, U., Thakore, K., Dahia, P. L., Komminoth, P., Lees, J. A., Mulligan, L. M., Mutter, G. L. and Eng, C. (1999). Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. *Am J Pathol* **155**(4), 1253-60.
- Perry, R. R., Kang, Y. and Greaves, B. (1995). Effects of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and -independent human breast cancer cells. *Ann Surg Oncol* **2**(3), 238-45.
- Pfeiler, G., Horn, F., Lattrich, C., Klappenberger, S., Ortmann, O. and Treeck, O. (2007). Apoptotic effects of signal transduction inhibitors on human tumor cells with different PTEN expression. *Oncol Rep* **18**(5), 1305-9.
- Philp, A. J., Campbell, I. G., Leet, C., Vincan, E., Rockman, S. P., Whitehead, R. H., Thomas, R. J. and Phillips, W. A. (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* **61**(20), 7426-9.
- Pircher, T. J., Petersen, H., Gustafsson, J. A. and Haldosen, L. A. (1999). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol Endocrinol* **13**(4), 555-65.
- Plowman, G. D., Whitney, G. S., Neubauer, M. G., Green, J. M., McDonald, V. L., Todaro, G. J. and Shoyab, M. (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(13), 4905-9.
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. and Shoyab, M. (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5), 1746-50.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B. and Sklar, L. A. (2007). GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* **265-266**, 138-42.
- Proud, C. G. (2002). Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* **269**(22), 5338-49.
- Qian, X., LeVea, C. M., Freeman, J. K., Dougall, W. C. and Greene, M. I. (1994). Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: a mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4), 1500-4.
- Rahko, E., Blanco, G., Bloigu, R., Soini, Y., Talvensaaari-Mattila, A. and Jukkola, A. (2006). Adverse outcome and resistance to adjuvant antiestrogen therapy in node-positive postmenopausal breast cancer patients-The role of p53. *Breast* **15**(1), 69-75.

- Rahmani, M., Reese, E., Dai, Y., Bauer, C., Payne, S. G., Dent, P., Spiegel, S. and Grant, S. (2005). Coadministration of histone deacetylase inhibitors and perifosine synergistically induces apoptosis in human leukemia cells through Akt and ERK1/2 inactivation and the generation of ceramide and reactive oxygen species. *Cancer Res* **65**(6), 2422-32.
- Reed, M. J., Owen, A. M., Lai, L. C., Coldham, N. G., Ghilchik, M. W., Shaikh, N. A. and James, V. H. (1989). In situ oestrone synthesis in normal breast and breast tumour tissues: effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione. *Int J Cancer* **44**(2), 233-7.
- Resnik, J. L., Reichart, D. B., Huey, K., Webster, N. J. and Seely, B. L. (1998). Elevated insulin-like growth factor I receptor autophosphorylation and kinase activity in human breast cancer. *Cancer Res* **58**(6), 1159-64.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. and Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**(5715), 1625-30.
- Revankar, C. M., Mitchell, H. D., Field, A. S., Burai, R., Corona, C., Ramesh, C., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. and Prossnitz, E. R. (2007). Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* **2**(8), 536-44.
- Rhei, E., Kang, L., Bogomolnii, F., Federici, M. G., Borgen, P. I. and Boyd, J. (1997). Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas. *Cancer Res* **57**(17), 3657-9.
- Riese, D. J., 2nd, Bermingham, Y., van Raaij, T. M., Buckley, S., Plowman, G. D. and Stern, D. F. (1996). Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and erbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin-beta. *Oncogene* **12**(2), 345-53.
- Riggins, R. B., Thomas, K. S., Ta, H. Q., Wen, J., Davis, R. J., Schuh, N. R., Donelan, S. S., Owen, K. A., Gibson, M. A., Shupnik, M. A., Silva, C. M., Parsons, S. J., Clarke, R. and Bouton, A. H. (2006). Physical and functional interactions between Cas and c-Src induce tamoxifen resistance of breast cancer cells through pathways involving epidermal growth factor receptor and signal transducer and activator of transcription 5b. *Cancer Res* **66**(14), 7007-15.
- Riggins, R. B., Schrecengost, R. S., Guerrero, M. S. and Bouton, A. H. (2007). Pathways to tamoxifen resistance. *Cancer Lett* **256**(1), 1-24.
- Riggs, B. L. and Hartmann, L. C. (2003). Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* **348**(7), 618-29.
- Robertson, J. F., Nicholson, R. I., Bundred, N. J., Anderson, E., Rayter, Z., Dowsett, M., Fox, J. N., Gee, J. M., Webster, A., Wakeling, A. E., Morris, C. and Dixon, M. (2001). Comparison of the short-term biological effects of 7alpha-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonyl]estra-1,3,5, (10)-triene-3,17beta-diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res* **61**(18), 6739-46.
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**(6490), 527-32.

- Rosen, L. B., Ginty, D. D., Weber, M. J. and Greenberg, M. E. (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron* **12**(6), 1207-21.
- Roskoski, R., Jr. (2004). The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **319**(1), 1-11.
- Rowan, B. G., Weigel, N. L. and O'Malley, B. W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **275**(6), 4475-83.
- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. and Verheij, M. (2003). Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* **14**(2), 167-73.
- Ryan, K. J. and Petro, Z. (1966). Steroid biosynthesis by human ovarian granulosa and thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **26**(1), 46-52.
- Saal, L. H., Holm, K., Maurer, M., Memeo, L., Su, T., Wang, X., Yu, J. S., Malmstrom, P. O., Mansukhani, M., Enoksson, J., Hibshoosh, H., Borg, A. and Parsons, R. (2005). PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* **65**(7), 2554-9.
- Sabers, C. J., Martin, M. M., Brunn, G. J., Williams, J. M., Dumont, F. J., Wiederrecht, G. and Abraham, R. T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* **270**(2), 815-22.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839), 487-91.
- Saji, S., Hirose, M. and Toi, M. (2005). Clinical significance of estrogen receptor beta in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **56 Suppl 1**, 21-6.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3), 183-232.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* **304**(5670), 554.
- Sande, S. and Privalsky, M. L. (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol* **10**(7), 813-25.
- Sansal, I. and Sellers, W. R. (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**(14), 2954-63.
- Santen, R. J., Santner, S., Davis, B., Veldhuis, J., Samojlik, E. and Ruby, E. (1978). Aminoglutethimide inhibits extraglandular estrogen production in postmenopausal women with breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **47**(6), 1257-65.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-

- independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**(14), 1296-302.
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005a). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712), 1098-101.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005b). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* **17**(6), 596-603.
- Sasada, R., Ono, Y., Taniyama, Y., Shing, Y., Folkman, J. and Igarashi, K. (1993). Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem Biophys Res Commun* **190**(3), 1173-9.
- Schaffler, A., Scholmerich, J. and Buechler, C. (2007). Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(4), 345-54.
- Schechter, A. L., Hung, M. C., Vaidyanathan, L., Weinberg, R. A., Yang-Feng, T. L., Francke, U., Ullrich, A. and Coussens, L. (1985). The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* **229**(4717), 976-8.
- Scheid, M. P., Marignani, P. A. and Woodgett, J. R. (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol* **22**(17), 6247-60.
- Schuler, W., Sedrani, R., Cottens, S., Haberlin, B., Schulz, M., Schuurman, H. J., Zenke, G., Zerwes, H. G. and Schreier, M. H. (1997). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation* **64**(1), 36-42.
- Schuurman, H. J., Cottens, S., Fuchs, S., Joergensen, J., Meerloo, T., Sedrani, R., Tanner, M., Zenke, G. and Schuler, W. (1997). SDZ RAD, a new rapamycin derivative: synergism with cyclosporine. *Transplantation* **64**(1), 32-5.
- Scott, W. N., Mullen, P. and Miller, W. R. (1991). Factors influencing the response of MCF-7 cells to an agonist of luteinising hormone-releasing hormone. *Eur J Cancer* **27**(11), 1458-61.
- Seely, B. L., Reichart, D. R., Staubs, P. A., Jhun, B. H., Hsu, D., Maegawa, H., Milarski, K. L., Saltiel, A. R. and Olefsky, J. M. (1995). Localization of the insulin-like growth factor I receptor binding sites for the SH2 domain proteins p85, Syp, and GTPase activating protein. *J Biol Chem* **270**(32), 19151-7.
- Sehgal, S. N., Baker, H. and Vezina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **28**(10), 727-32.
- Sehgal, S. N. (2003). Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* **35**(3 Suppl), 7S-14S.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1985). A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(19), 6497-501.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M. A. and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* **103**(6), 843-52.

- Shang, Y. and Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* **295**(5564), 2465-8.
- Shang, Y. (2006). Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* **6**(5), 360-8.
- Shao, W. and Brown, M. (2004). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* **6**(1), 39-52.
- Shin, I. and Arteaga, C. L. (2006). Expression of active Akt protects against tamoxifen-induced apoptosis in MCF-7 Cells. *IUBMB Life* **58**(11), 664-9.
- Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C. K., Wakeling, A. E., Ali, S., Weiss, H. and Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **96**(12), 926-35.
- Siler-Khodr, T. M. and Grayson, M. (2001). Action of chicken II GnRH on the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(2), 804-10.
- Simpson, E., Rubin, G., Clyne, C., Robertson, K., O'Donnell, L., Jones, M. and Davis, S. (2000). The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* **11**(5), 184-8.
- Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., Michael, M. D. and et al. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* **15**(3), 342-55.
- Sithanandam, G., Smith, G. T., Masuda, A., Takahashi, T., Anderson, L. M. and Fornwald, L. W. (2003). Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Carcinogenesis* **24**(10), 1581-92.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**(4905), 707-12.
- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L. and Carraway, K. L., 3rd. (1994). Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* **269**(20), 14661-5.
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., Jr. and Chen, L. B. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(9), 3671-5.
- Smith, C. L., Conneely, O. M. and O'Malley, B. W. (1993). Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13), 6120-4.
- Song, G., Ouyang, G. and Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**(1), 59-71.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. and Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**(5), 1409-16.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**(6647), 194-8.

- Stal, O., Perez-Tenorio, G., Akerberg, L., Olsson, B., Nordenskjold, B., Skoog, L. and Rutqvist, L. E. (2003). Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Res* **5**(2), R37-44.
- Stein, R. C. and Waterfield, M. D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* **6**(9), 347-57.
- Stephens, L. R., Jackson, T. R. and Hawkins, P. T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim Biophys Acta* **1179**(1), 27-75.
- Stokoe, D., Campbell, D. G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S. J., Marshall, C. and Cohen, P. (1992). MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *Embo J* **11**(11), 3985-94.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., Zeeberg, B., Buetow, K. H., Schaefer, C. F., Bhat, N. K., Hopkins, R. F., Jordan, H., Moore, T., Max, S. I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A. A., Rubin, G. M., Hong, L., Stapleton, M., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Casavant, T. L., Scheetz, T. E., Brownstein, M. J., Usdin, T. B., Toshiyuki, S., Carninci, P., Prange, C., Raha, S. S., Loquellano, N. A., Peters, G. J., Abramson, R. D., Mullahy, S. J., Bosak, S. A., McEwan, P. J., McKernan, K. J., Malek, J. A., Gunaratne, P. H., Richards, S., Worley, K. C., Hale, S., Garcia, A. M., Gay, L. J., Hulyk, S. W., Villalon, D. K., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Lu, X., Gibbs, R. A., Fahey, J., Helton, E., Kettelman, M., Madan, A., Rodrigues, S., Sanchez, A., Whiting, M., Madan, A., Young, A. C., Shevchenko, Y., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., Touchman, J. W., Green, E. D., Dickson, M. C., Rodriguez, A. C., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R. M., Butterfield, Y. S., Krzywinski, M. I., Skalska, U., Smailus, D. E., Schnerch, A., Schein, J. E., Jones, S. J. and Marra, M. A. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26), 16899-903.
- Sturgill, T. W., Ray, L. B., Erikson, E. and Maller, J. L. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature* **334**(6184), 715-8.
- Sukocheva, O., Wadham, C., Holmes, A., Albanese, N., Verrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C. K., Ullrich, A., Vadas, M. A. and Xia, P. (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J Cell Biol* **173**(2), 301-10.
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z. Q., Ma, X. L., Shelley, S. A., Jove, R., Tschlis, P. N., Nicosia, S. V. and Cheng, J. Q. (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* **159**(2), 431-7.
- Susemihl, D. (1975). [Tumor classification using the TNM system. Sequel 1: breast cancer]. *Fortschr Med* **93**(35-36), 1759-63.
- Takeda, A., Osaki, M., Adachi, K., Honjo, S. and Ito, H. (2004). Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt signal pathway in the proliferation of human pancreatic ductal carcinoma cell lines. *Pancreas* **28**(3), 353-8.
- Takehita, A., Yen, P. M., Misiti, S., Cardona, G. R., Liu, Y. and Chin, W. W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* **137**(8), 3594-7.

- Takeshita, A., Cardona, G. R., Koibuchi, N., Suen, C. S. and Chin, W. W. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* **272**(44), 27629-34.
- Tanriverdi, F., Gonzalez-Martinez, D., Silveira, L. F., Hu, Y., Maccoll, G. S., Travers, P. and Bouloux, P. M. (2004). Expression of gonadotropin-releasing hormone type-I (GnRH-I) and type-II (GnRH-II) in human peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) and regulation of B-lymphoblastoid cell proliferation by GnRH-I and GnRH-II. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **112**(10), 587-94.
- Terakawa, N., Kanamori, Y. and Yoshida, S. (2003). Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**(2), 203-8.
- Terry, M. B., Knight, J. A., Zablotska, L., Wang, Q., John, E. M., Andrulis, I. L., Senie, R. T., Daly, M., Ozelik, H., Briollais, L. and Santella, R. M. (2007). Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat*.
- Thiantanawat, A., Long, B. J. and Brodie, A. M. (2003). Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. *Cancer Res* **63**(22), 8037-50.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**(2), 624-32.
- Thompson, E. A., Jr. and Siiteri, P. K. (1974). The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization. *J Biol Chem* **249**(17), 5373-8.
- Thorpe, S. M., Rose, C., Rasmussen, B. B., Mouridsen, H. T., Bayer, T. and Keiding, N. (1987). Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* **47**(22), 6126-33.
- Torchia, J., Glass, C. and Rosenfeld, M. G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* **10**(3), 373-83.
- Treeck, O., Wackwitz, B., Haus, U. and Ortmann, O. (2006). Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells. *Gynecol Oncol* **102**(2), 292-9.
- Tseng, L., Mazella, J., Mann, W. J. and Chumas, J. (1982). Estrogen synthesis in normal and malignant human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **55**(5), 1029-31.
- van Agthoven, T., van Agthoven, T. L., Portengen, H., Foekens, J. A. and Dorsers, L. C. (1992). Ectopic expression of epidermal growth factor receptors induces hormone independence in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Cancer Res* **52**(18), 5082-8.
- van Agthoven, T., van Agthoven, T. L., Dekker, A., van der Spek, P. J., Vreede, L. and Dorsers, L. C. (1998). Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells. *Embo J* **17**(10), 2799-808.

- van Biljon, W., Wykes, S., Scherer, S., Krawetz, S. A. and Hapgood, J. (2002). Type II gonadotropin-releasing hormone receptor transcripts in human sperm. *Biol Reprod* **67**(6), 1741-9.
- van der Flier, S., Brinkman, A., Look, M. P., Kok, E. M., Meijer-van Gelder, M. E., Klijn, J. G., Dorssers, L. C. and Foekens, J. A. (2000). Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J Natl Cancer Inst* **92**(2), 120-7.
- van der Luit, A. H., Vink, S. R., Klarenbeek, J. B., Perrissoud, D., Solary, E., Verheij, M. and van Blitterswijk, W. J. (2007). A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* **6**(8), 2337-45.
- Vazquez, F., Matsuoka, S., Sellers, W. R., Yanagida, T., Ueda, M. and Devreotes, P. N. (2006). Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10), 3633-8.
- Veale, D., Ashcroft, T., Marsh, C., Gibson, G. J. and Harris, A. L. (1987). Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **55**(5), 513-6.
- Veres, G., Gibbs, R. A., Scherer, S. E. and Caskey, C. T. (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* **237**(4813), 415-7.
- Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D. and Raymond, E. (2005). mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol* **16**(4), 525-37.
- Vink, S. R., Schellens, J. H., van Blitterswijk, W. J. and Verheij, M. (2005). Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anticancer alkylphospholipid. *Invest New Drugs* **23**(4), 279-86.
- Vink, S. R., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., Sindermann, H., Engel, J., Dubbelman, R., Moppi, G., Hillebrand, M. J., Bartelink, H. and Verheij, M. (2006). Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours. *Radiother Oncol* **80**(2), 207-13.
- Vivanco, I. and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(7), 489-501.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**(8), 789-99.
- Volinia, S., Hiles, I., Ormondroyd, E., Nizetic, D., Antonacci, R., Rocchi, M. and Waterfield, M. D. (1994). Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110 alpha (PIK3CA) gene. *Genomics* **24**(3), 472-7.
- Wakeling, A. E., Dukes, M. and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* **51**(15), 3867-73.
- Wakeling, A. E. and Bowler, J. (1992). ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* **43**(1-3), 173-7.
- Wakeling, A. E., Guy, S. P., Woodburn, J. R., Ashton, S. E., Curry, B. J., Barker, A. J. and Gibson, K. H. (2002). ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* **62**(20), 5749-54.
- Wang, J. M., Chao, J. R., Chen, W., Kuo, M. L., Yen, J. J. and Yang-Yen, H. F. (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* **19**(9), 6195-206.

- Ward, H. W. (1973). Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J* **1**(5844), 13-4.
- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G. and Cooper, J. A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J* **16**(8), 1909-20.
- Watson, C. S. and Gametchu, B. (1999). Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med* **220**(1), 9-19.
- Webb, P., Lopez, G. N., Uht, R. M. and Kushner, P. J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* **9**(4), 443-56.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G. N., Kwok, G. R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B. S., Enmark, E., Gustafsson, J. A., Nilsson, S. and Kushner, P. J. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* **13**(10), 1672-85.
- Whang, Y. E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R. E., Tran, C., Vessella, R. L., Said, J. W., Isaacs, W. B. and Sawyers, C. L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9), 5246-50.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**(3), 474-6, 478-81.
- Woodgett, J. R. (1994). Regulation and functions of the glycogen synthase kinase-3 subfamily. *Semin Cancer Biol* **5**(4), 269-75.
- Wu, G., Xing, M., Mambo, E., Huang, X., Liu, J., Guo, Z., Chatterjee, A., Goldenberg, D., Gollin, S. M., Sukumar, S., Trink, B. and Sidransky, D. (2005). Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res* **7**(5), R609-16.
- Wu, R. C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2004). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* **15**(6), 937-49.
- Xu, L., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* **9**(2), 140-7.
- Yager, J. D. (2000). Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr* (27), 67-73.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S. and Arteaga, C. L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* **62**(14), 4132-41.
- Yamaki, J., Yamamoto, T. and Okada, H. (1985). Aromatization of androstenedione by normal and neoplastic endometrium of the uterus. *J Steroid Biochem* **22**(1), 63-6.
- Yamamoto, K., Altschuler, D., Wood, E., Horlick, K., Jacobs, S. and Lapetina, E. G. (1992). Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase p85. *J Biol Chem* **267**(16), 11337-43.

- Yano, T., Pinski, J., Halmos, G., Szepeshazi, K., Groot, K. and Schally, A. V. (1994). Inhibition of growth of OV-1063 human epithelial ovarian cancer xenografts in nude mice by treatment with luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15), 7090-4.
- Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**(5), 1443-51.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2), 127-37.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M. G. and Lazar, M. A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J* **22**(13), 3403-10.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K. and Gustafsson, J. A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* **6**, e003.
- Zhao, Y., Bjorbaek, C. and Moller, D. E. (1996). Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**(47), 29773-9.
- Zhou, B. P., Hu, M. C., Miller, S. A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S. Y. and Hung, M. C. (2000). HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem* **275**(11), 8027-31.
- Zwick, E., Hackel, P. O., Prenzel, N. and Ullrich, A. (1999). The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* **20**(10), 408-12.

7 Anhang

7.1 Ergebnisse der Sequenzierungen

7.1.1 ermittelte Sequenzen der Exons von *pten*

MCF-7

Exon1:

ACCAGCAGCTTCTGCCATCTCTCTCCTCTTTTTCTTCAGCCACAGGCTCCCAGACATGAC
AGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGATTTCGAC
TTAGACTTGACCTGTATCCATTTCTGCGGCTGCTCCTCTTTACCTTTCTGTCACTCTCTTAG
AACGTGGGAGTAGACGGATGCGAAAAATGTCCGTAGTA

Exon 2:

AGTCATCAGATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCTGCAGAAAGACTTGAAGGC
GTATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTAAGAATGCTTTGATTTTCTATTTCAA

Exon 3:

TATTTTTTCATTAATGGTATTTGAGATTAGGAAAAAGAAAATCTGTCTTTTGGTTTTTCTTGAT
AGTATTAATGTAATTTCAAATGTTAGCTCATTTTTGTTAATGGTGGCTTTTTGTTGTTGTTT
TGTTTTAAGGTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAACCATTACAAGATATACAATCTGTAAGTATG
TTTTCTTATTTGTATGCTTGCAAATATCTTCTAAAACAACCTATTAAGTGAAAGTTATCTGCTTG
TTAGAGTGAGGA

Exon 4:

TGTCTTTTTTTTCTTCCTAAGTGCAaaAGATAACTTTATATCACTTTTAACTTTTCTTT-
TAGTTGTGCTGAAAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGGTAGGTATGAATGTA
CTGTAATGTTGTATAACTTAAACCCGATAGACTGTATCA

Exon 5a:

TCTAAGTTACCTACTTGTTAATTAATAAATTCAAGAGTTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTATCTT
TTTACCACAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAA
ACCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTC
A

Exon 5b:

ACCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTC
CTGTAAAGCTGGAAAGGGACGAACTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGC
AAATTTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAA
AGGTAAGTTATTTTTTGTATGTTTTTCTTTCCCTTTCCCCGGGATCTGAG

Exon 6:

TCGACCCAGTTACATAGCAATTTAGTGAAATAACTATAATGGAACATTTTTTTTCAATTTGGC

TTCTCTTTTTTTCTGTCCACCAGGGAGTAACTATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTA
TTATAGCTACCTGTAAAGAATCATCTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTTGTTTCACAAGA
TGATGTTTGAACACTATTCCAATGTTTCAGTGGCGGAACCTTGCAAGTAAAGTCTTGA

Exon7:

TTTAACCATGCAGATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCCAA
TTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAAGTTCATGTACTTTGAGTTCCCTCAGCCGTTACCT
GTGTGTGGTGATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAACAGAACAAGATGCTAAAAAAGGTTT
GTACTTTACTTTCCATTGGGAGAAA

Exon 8a:

AGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCAGGACCAGAGGAAACCTCA
GAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGATAGCATTTCAGTATA-
GAGCG

Exon 8b:

TCGATAGCATTTCAGTATAGAGCGTGACAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTA
ACAAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAATTT
TAAGGTCAGTTAAATTAACATTTTGTGGGGGTTGGGAACCTTGATGTAA

Exon 9:

TGAGTCATATTTGTGGGTTTTCATTTTAAATTTTCTTCTCTAGGTGAAGCTGACTTCACAA
AAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAACACCAGATGT
TAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATG
AACCTTTTGATGAAGATCAGCATAACAAAATTACAAAAGTCTGAATTTT

MCF-7-TR**Exon 1:**

GCCCCAGCAGCTTCTGCCATCTCTCCTCCTTTTTCTTCAGCCACAGGCTCCCAGACATG
ACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGATTCCG
ACTTAGACTTGACCTGTATCCATTTCTGCGGCTGCTCCTCTTACCTTTCTGTCACTCTCTT
AGAACGTGGGAGTAGACGGATGCGAAAAT

Exon 2:

GTCTCAGAATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCTGCAGAAAGACTTGAAGGCG
TATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTAAGAATGCTTTGATTTTCTATTTCAAAA

Exon 3:

TTATTTTCCTTAATGGTATTTGAGATTAGGAAAAAGAAAATCTGTCTTTTGGTTTTTCTTGATA
GTATTAATGTAATTTCAAATGTTAGCTCATTTTTGTTAATGGTGGCTTTTTGTTTGTGTTTT
GTTTTAAGTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAACCATTACAAGATATACAATCTGTAAGTATGT
TTTCTTATTTGTATGCTTGCAAATATCTTCTAAAACAACCTATTAAGTGAAGTTATCTGCTGTT
TAAGAGTGAGGATAA

Exon 4:

TTTTTTTTCTTCCTAAGTGCAAAGATAACTTTATATCACTTTTAACTTTTCTTTTAGTTGTG
CTGAAAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGGTAGGTATGAATGTACTGTACTA
TGTTGTATAACTTAAACCCGAATAGACTGTATCA

Exon 5a:

TTTCTAAGTTACCTACTTGTTAATTAATAAATTCAAGAGTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTATC
TTTTTACCACAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATC
AAACCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTTGCAGCAA
TTCAA

Exon 5b:

ACCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTCA
CTGTAAAGCTGGAAAGGGACGAAGTGGTGAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGC
AAATTTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAA
AGGTAAGTTATTTTTGATGTTTTCTTTCCCTTTCCCCGGGATCTGA

Exon 6:

AGTGAATACTATAATGGAACATTTTTTTTCAATTTGGCTTCTCTTTTTTTCTGTCCACCAGG
GAGTAACTATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTATAGCTACCTGTTAAAGAATCAT
CTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTTGTTTCACAAGATGATGTTTGAACTATTCCAATGTT
CAGTGGCGGAACCTTGACGTAAGTGCTTGAATTCTCATCCTCCCCATGTATTG

Exon 7:

TGTTTTACCATGCAGATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCC
AATTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAAGTTCATGTACTTTGAGTTCCCTCAGCCGTTAC
CTGTGTGTGGTGATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAACAGAACAAGATGCTAAAAAAGGTT
TGTACTTTACTTTCCATTGGGAGAAA

Exon 8a:

AGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCAGGACCAGAGGAAACCTCA
GAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGATAGCATTGTCAGTATAGAGC
GTGCAGAAAGTCAA

Exon 8b:

TAGCATTTGCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTAACAA
AAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCAAATTTTAAG
GTCAGTTAAATTAACATTTTGTGGGGGTTGGGGACCTTGTATGTAA

Exon 9:

TGAGTCATATTTGTGGGTTTTCAATTTAAATTTTCTTCTCTAGGTGAAGCTGTACTTCACAA
AAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAACACCAGATGT
TAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATG
AACCTTTTGTGAAGATCAGCATAACAAAATTACAAAAGTCTGAATTTT

T47D

Exon 1:

CGCCCCAGCAGCTTCTGCCATCTCTCCTCCTTTTTCTTCAGCCACAGGCTCCCAGACAT
GACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGATTC
GACTTAGACTTGACCTGTATCCATTTCTGCGGCTGCTCCTCTTTACCTTTCTGTCACTCTCT
TAGAACGTGGGAGTAGACGGATGCGAAAATGTCCGTAGTA

Exon 2:

TTTTCAGATATTTCTTTTCTTAATACTAAAGTACTCAGATATTTATCCAAACATTATTGCTATGG
GATTTCTGCAGAAAGACTTGAAGGCGTATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTA
AGA

Exon 3:

TTATTTTCTTAAATGGTATTTGAGATTAGGAAAAAGAAAATCTGTCTTTTGGTTTTTCTTGAT
AGTATTAATGTAATTTCAAATGTTAGCTCATTTTTGTTAATGGTGGCTTTTTGTTTGTGTTT
TGTTTTAAGGTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAACCATTACAAGATATAAATCTGTAAGTATG
TTTTCTTATTTGTATGCTTGCAAATATCTTCTAAAACAATAAAGTAAAAGTTATCTGCTTG
TTAGAGTGAGGA

Exon 4:

AATGTCCGTAGTACTAAGTGCAAAAAGATAACTTTATATCACTTTTAACTTTTCTTTTAGTTG
TGCTGAAAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGGTAGGTATGAATGTACTGTAC
TATGTTGTATAACTTAAACCCGATAGACTGTATCA

Exon 5a:

CTTTCTAAGTTACCTACTTGTTAATTAATAAATTCAAGAGTTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTAT
CTTTTTACCACAGTTGCACAATATCCTTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTAT
CAAACCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGGCAGC
AATTCA

Exon 5b:

CTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTCAGTAAAGCTGGAA
AGGGACGAACTGGTGAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGCAAATTTTTAAAGGCA
CAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAAGGTAAGTTATTTTT
TGATGTTTTTCTTTCCCTTTCCCTGGATCTGA

Exon 6:

TTCAATTTGGCTTCTTTTTTTTTCTGTCCACCAGGGAGTAACTATTCCCAGTCAGAGGCGC
TATGTGATTATTATAGCTACCTGTAAAGAATCATCTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTT
GTTTCACAAGATGATGTTTGAACTATTCCAATGTTTCAGTGGCGGAACTTGCAAGTAAAGTCT
TGAAATTCTCATCCTTCCCATGTATTGGA

Exon 7:

TCCCTGTGAAAATTATACTGGTATGTATTTAACCATGCAGATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCA
GCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCCAATTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAAGTTCATG

TACTTTGAGTTCCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGGTGATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAA
ACAGAACAAGATGCTAAAAAAGGTTTG

Exon 8a:

AGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCAGGACCAGAGGAAACCTCA
GAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAGAGC
GTGCAGAAAGTCAAGCTA

Exon 8b:

TGTCTTGTTGTATTGCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTT
TAACAAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAT
TTTAAGGTCAGTTAAATTAACATTTTGTGGGGGTTGGTGACTTGTATGTAA

Exon 9:

CTTTTAATTTTCTTTCTCTAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCCGTCAAA
TCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAACACCAGATGTTAGTGACAATGAACCTGATCATT
ATAGATATTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGTGAAGATCAGCAT
ACACAAATTACAAAAGTCTGAATTTTTTTTTTATCAAGAGGGATATAAACACCATAAA

T47D-TR

Exon 1:

CCAGCAGCTTCTGCCATCTCTCCTCCTTTTTCTTCAGCCACAGGCTCCCAGACATGACA
GCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATCAAGAGGATGGATTGACT
TAGACTTGACCTGTATCCATTTCTGCGGCTGCTCCTCTTTACCTTTCTGTCACTCTCTTAGA
ACGTGGGAGTAGACGGATGCGAAAAT

Exon2:

GTCTCAGATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCTGCAGAAAGACTTGAAGGCGT
ATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGGTAAGAATGCTTTGATTTTCTATTTCAA

Exon 3:

TTATTTTCTTAAATGGTATTTGAGATTAGGAAAAAGAAAATCTGTCTTTTGGTTTTTCTTGAT
AGTATTAATGTAATTTCAAATGTTAGCTCATTTTTGTTAATGGTGGCTTTTTGTTGTTTGT
TGTTTTAAGGTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAACCATTACAAGATATACAATCTGAAGTATGT
TTTCTTATTTGCATGCTTGCAAATATCTTCTAAAACAACCTATTAAGTGAAAGTTATCTGCTTG

Exon 4:

TTTTTTTTCTTCCTAAGTGCAAAGATAACTTTATATCACTTTTAACTTTTCTTTTAGTTGTG
CTGAAAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGGTAGGTATGAATGTACTGTACTA
TGTTGTATAACTTAAACCCGAATAGACTGTATCA

Exon 5a:

TTCTAAGTTACCTACTTGTTAATTAATAAATTCAAGAGTTTTTTTTTCTTATTCTGAGGTTATCT
TTTTACCACAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCA

AACCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCAGTTGGCCAGCAA
TTCA

Exon 5b:

ACCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTCA
CTGTAAAGCTGGAAAGGGACGAACTGGTGAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGC
AAATTTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAA
AGGTAAGTTATTTTTTGTATGTTTTTCCTTCCCTCCTTCCCTGGGATCTGGA

Exon 6:

AGTGAATACTATAATGGAACATTTTTTTTCAATTTGGCTTCTCTTTTTTTTCTGTCCACCAGG
GAGTAACTATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTATAGCTACCTGTTAAAGAATCAT
CTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTTGTTTCAACAAGATGATGTTTAAACTATTCCAATGTT
CAGTGGCGGAACTTGCAGTAAGTGCTTGAATTCTCATCCTCCCCTGGTATTGGA

Exon 7:

TGTTTTACCATGCAGATCCTCAGTTTGTGGTCTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCC
AATTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAAGTTCATGTACTTTGAGTTCCTCAGCCGTTAC
CTGTGTGTGGTATATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAACAGAACAAGATGCTAAAAAAGGTT
TGACTTTACTTTCCATTGGGAGAAA

Exon 8a:

AGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCAGGACCAGAGGAAACCTCA
GAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAGAGC
GTGCAGAAAGTCAACCAG

Exon 8b:

CTTGTGTGTTTGCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTAA
CAAAAAATGATCTTGACAAAGCAAATAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAATTTT
AAGGTCAGTTAAATTAACATTTTGTGGGGGTTGGGGACTTGTATGTAA

Exon 9:

AGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGCAGTT
CAACTTCTGTAACACCAGATGTTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACC
ACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACTTTTGATGAAGATCAGCATAACAAAATTACAAAAGT
CTGAATTTTTTTTTATCAAGAGGGATAAAACACCATA

7.1.2 ermittelte Sequenzen der Exons 9 und 20 von *pik3ca*

MCF-7

Exon 9, *forward*:

TAGATTATTTTATTTTACAGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGAC
AAAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGA
AAGATTTTCTATGGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGATTCTCTGTTTCTTTTTCTTTAT
TACAGAAAAATAACTGAATTTGGCTGATCTCAA

Exon 9, *reverse*:

TCGTAGAAAGAACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTC
TCCTGCTYAGTGATTTTCAGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTCTTTGTC
ATTTTCCCTTAATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATAAAATAATATCTTATA
TAGCTTTCTTTGTCATATTTTCCCCA

Exon 20, *forward*:

TTCATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTCCG
AAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGAAACAAATG
AATGATGCACATCATGGTGGCTGGACAACAAAAATGGATTGGATCTTCCACACAA

Exon 20, *reverse*:

GCGCCCATGATGTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTCAGTTT
TATCTAAGGCTAGGGTCTTTCGAATGTATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTTCTGGCATT
CCAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTA

MCF-7-TR

Exon 9, *forward*:

TAGATTATTTTATTTTACAGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGAC
AAAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGA
AAGATTTTCTATGGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGATTCTCTGTTTCTTTTTCTTTAT
TACAGAAAAATAACTGAATTTGGCTGATCTCAA

Exon 9, *reverse*:

GTAGAAAGAACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTC
CTGCTCAGTGATTTTCAGAGAGAGGATCTCGTGTAGAAATTGCTTTGAGCTGTTCTTTGTCAT
TTTCCCTTAATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATAAAATAATATCTTATATA
GCTTTCTTTGTCATATTTTCCCCA

Exon 20, *forward*:

CATTCATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATT
CGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTTCATGAAACAAA
TGAATGATGCACATCATGGTGGCTGGACAACAAAAATGGATTGGATCTTCCACACAA

Exon 20, *reverse*:

TGCGCCATGAATGTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTCAGTT
TTATCTAAGGCTAGGGTCTTTCGAATGTATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTTCTGGCAT
TCCAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTAA

T47D

Exon 9, *forward*:

GTAGATTATTTTATTTAAGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACA
AAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAA

AGATTTTCTATGGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGATTCTCTGTTTCTTTTCTTTATT
ACAGAAAAATAACTGAATTTGGCTGATCTCAA

Exon 9, *reverse*:

GAAGAAAGAACAGAGAATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTC
CTGCTCAGTGATTTAGAGAGAGGATCTCGTGAGAAATTGCTTTGAGCTGTTCTTTGTCAT
TTCCCTTAATTCATTGTCTCTAGCTAGTCTGTTACTCTGTAAAATAAAAATAATATCTTATATA
GCTTTCTTTGTCATATTTTCCCCA

Exon 20, *forward*:

ATTCATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATTC
GAAAGACCCTAGCCTTAGATAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTGATGAAACAAAT
GAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAA

Exon 20, *reverse*:

AGAAAGAACAGAGTATCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGACTCCRTAGAAAATCTTTCTCCT
GCTCAGYGATTTAGAGAGAGGATCTCGYGYAGAAATTGCTTTGAGCKGTTCTTTGTCWTT
TTCCCTTAATTCRTTGTCTCTAGCTAGGCKGTTMCTCKGTAAAATAAAAATAATATCTTATATA
GCTTTCTTTGTCATATTTTCCCCA

T47D-TR

Exon 9, *forward*:

TATATTATTTTATTTTACAGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATGACA
AAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAA
AGATTTTCTATGGAGTCACAGGTAAGTGCTAAAATGGAGATTCTCTGTTTCTTTTCTTTATT
ACAGAAAAATAACTGAATTTGGCTGATCTCAA

Exon 9, *reverse*:

CCATGACGTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTCAGTTTTATCT
AAGGCTAGGGTCTTTTGAATGTATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTTCTGGCATTCCAGA
GCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTA

Exon 20, *forward*:

CATTCATGATGCTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAATCTTTTGATGACATTGCATACATT
CGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAACTGAGCAAGAGGCTTTGGAGTATTTGATGAAACAAA
TGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACAACAAAATGGATTGGATCTTCCACACAA

Exon 20, *reverse*:

CGCCCATGACGTGCATCATTCAATTTGTTTCATGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTCAGTTTT
ATCTAAGGCTAGGGTCTTTTGAATGTATGCAATGTCATCAAAGATTGTAGTTCTGGCATTCC
CAGAGCCAAGCATCATTGAGAAAAGATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTA

7.1.3 ermittelte Sequenzen der RT-PCR-Amplifikate von *gpr30* und *pten*

MCF-7

gpr30, forward:

TATGGGGACTTACTATTGCAGCTAGAAAACAATTTGCCGGCCCTGAACCGCTTCTGTCACG
CTGCCCTGAAGGCCGTCATTCCAGACAGCACCGAGCAGTCGGATGTGAGGTTTCAGCAGTG
CCGTGTAGACAGCCTTGGCCACATATCTT

gpr30, reverse:

AGCGTGACAGAAGCGGTTTCAGGGCCGGCAAATTTGTTTTCTGCTCAATGTACAGCCCAGC
ATTGTCCCTGAAGGTCTCCCCGAGAAAGCTGTAGATGAGGGGGTTTAGGCAGCTGATTGG
AG

MCF-7

pten, forward:

CATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAAACCCTTTTGTGAAGATCT
TGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTCCTGTAAAGCTGGAAAG
GGACGAACTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGCAAATTTTTAAAGGCACA
AGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAAGGGAGTAACTATTCC
CAGTCAGAGGCGCTATGTA

pten, reverse:

TTTGTCTCTGGTCCTTACTTCCCATAGAAATCTAGGGCCTCTTGTGCCTTTAAAAATTTGC
CCCGATGTAATAAATATGCACATATCATTACACCAGTTCGTCCTTTCCAGCTTTACAGTGA
ATTGCTGCAACATGATTGTCATCTTCACTTAGCCATTGGTCAAGATCTTCACAAAAGGGTTT
GATAAGTTCTAGCTGTGGTGGGTTATGGTCTTCAAAGGATATTGTGCAACTCTGCAATTA
ATTTGGCGGTGTA

7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AIB1	<i>amplified in breast cancer 1</i>
AP-1	<i>activator-protein 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat

Bp	Basenpaar(e)
BRCA	<i>breast cancer genes</i>
BSA	bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cAMP	zyklisches AMP (cyclic AMP)
cerb-B2	siehe HER2/neu
cDNA	<i>copy-DNA</i>
CD-FCS	<i>charcoal dextran-treated FCS</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (<i>double strand</i>)
ECL	<i>enhanced chemical luminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGF-R	<i>epidermal growth factor receptor 1/2</i>
ERE	<i>estrogen response element</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERBB	<i>erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog</i> , siehe EGF-R
ERBB2	<i>erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog 2</i>
EthBr	Ethidiumbromid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
h	Stunde(n) (<i>hour(s)</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , siehe ERBB2
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IU	internationale Einheit (<i>international unit</i>)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
k. A.	keine Angabe
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-Gln	L-Glutamin
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
M	molar
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i> , siehe MEK
MEK	<i>mitogen activated protein kinase kinase or ERK kinase</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MKK	siehe MEK
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
n. s.	nicht signifikant
N-CoR	nuclear co-repressor
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
OHT	4-Hydroxytamoxifen
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PC	<i>personal computer</i>
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat

PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PTEN	<i>phosphatase and tensin like homolog</i>
Raptor	<i>regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
Ser	Serin
SERD	<i>selective estrogen receptor destructor</i>
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator (<i>selective estrogen receptor modulator</i>)
SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid receptors</i>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator 1</i>
ss	einzelsträngig (<i>single strand</i>)
SSC	<i>side scatter</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAM	Tamoxifen
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte NaCl-Lösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TBST	Tween-TBS Puffer
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
u. a.	unter anderem
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen = Volumenprozent

vs.	<i>versus</i>
w/v	Gewicht/Volumen = Masseprozent (weight/volume)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
z. B	zum Beispiel

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Signaltransduktion von Östrogenen und Wirkung von Antiöstrogenen in Mammakarzinomzellen.....	9
Abb. 2: PI3K/Akt-Signaltransduktionskaskade	16
Abb. 3: Western Blot-Nachweis der Akt-Expression und –Phosphorylierung bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR	52
Abb. 4: Western Blots von basalem und phosphoryliertem Akt nach Behandlung mit GnRH-I- und –II-Analoga	53
Abb. 5: Dichte des EGF-Rezeptors, des ERBB2 und des IGF-1-Rezeptors auf der Zelloberfläche.	55
Abb. 6: Expression von GPR30 in parental MCF-7 und T47D Zellen sowie deren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR..	56
Abb. 7: RT-PCR-Analyse der nukleären Co-Aktivatoren AIB1/SRC-3 und SRC-1 und statistische Auswertung..	57
Abb. 8: RT-PCR-Analyse der nukleären Co-Repressoren N-CoR und SMRT.	59
Abb. 9: Western Blot-Nachweis von Aromatase bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR	60
Abb. 10: Western Blot-Nachweis von PTEN bei MCF-7 und T47D Zellen und ihren OHT-resistenten Sublinien MCF-7-TR und T47D-TR	60
Abb. 11: Nachweis der Expression von CTMP mittels Western Blot bei MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR	61
Abb. 12: Western Blot zum Nachweis der Expression und der Phosphorylierung von PDK1.....	62
Abb. 13: Western Blot von basaler und phosphorylierter MAPK ERK1/2.....	63
Abb. 14: Einfluss von Antiöstrogenen auf die Zellproliferation parental (MCF-7 & T47D) und sekundär OHT-resistenter (MCF-7-TR & T47D-TR) Mammakarzinomzellen.....	66
Abb. 15: Induktion von Apoptose bei MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR durch OHT und Fulvestrant.....	68
Abb. 16: Einfluss von Gefitinib und PD98059 auf die Zellproliferation in parental MCF-7 und T47D und resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR	70
Abb. 17: Induktion von Apoptose durch PD98059, Gefitinib und OHT	72
Abb. 18: Wirkung von Rapamycin und Perifosine auf die Proliferation von MCF-7, MCF-7-TR, T47D und T47D-TR	74
Abb. 19: Induktion von Apoptose durch Rapamycin und Perifosine bei MCF-7, MCF-7-TR und T47D	77
Abb. 20: Western Blot zur Analyse der Wirkung von Perifosine auf basales Akt und dessen Phosphorylierung in OHT-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR	79

Abb. 21:Western Blot zur Analyse der Wirkung von Gefitinib auf basales Akt und ERK1/2 und deren Phosphorylierung in OHT-resistenten Mammakarzinomzellen MCF-7-TR und T47D-TR	81
Abb. 22:Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz bei MCF-7-TR und verwendete Inhibitoren	96
Abb. 23:Mechanismen der sekundären Antiöstrogenresistenz bei T47D-TR...	98

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Puffer und Lösungen	29
Tab. 2: Verwendete Zellkulturmedien mit supplementierten Substanzen	30
Tab. 3: Zelllinien	31
Tab. 4: Primer für die RT-PCR.....	32
Tab. 5: Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung der Exons von <i>pten</i>	32
Tab. 6: Primer zur Herstellung der Amplifikate für die Sequenzierung der Exons 9 und 20 von <i>pik3ca</i>	33
Tab. 7: Primärantikörper für Western Blots.....	34
Tab. 8: HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für Western Blots.....	34
Tab. 9: Primärantikörper für die Durchflusszytometrie	34
Tab. 10:FITC-gekoppelte Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie....	35
Tab. 11:Inhibitoren, Antiöstrogene, Agonisten und verwendete Lösungsmittel	35
Tab. 12:Aussaatdichten der verschiedenen Zelllinien für den alamarBlue®-Proliferationsassay	39
Tab. 13:Umrechnungsfaktoren zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen durch Absorptionsspektroskopie	42
Tab. 14:Komponenten eines RT-PCR-Ansatzes	43
Tab. 15:Komponenten eines Standard-PCR-Ansatzes.....	44
Tab. 16:Parameter der durchgeführten PCRs	45
Tab. 17:Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE	49
Tab. 18:Zusammensetzung von Trenngelen mit 10 und 14 % Acrylamid für die SDS- PAGE	49

8 Danksagung

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Sigrid Hoyer-Fender danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit, viele anregende Gespräche und die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Braus danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter Emons für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit im Labor für Molekulare Gynäkologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Carsten Gründker durchführen zu können.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Andreas Günthert für die Stellung des interessanten Themas und viele interessante, produktive Gespräche bedanken. Seine positive, optimistische Art trug entscheidend dazu bei, die Motivation bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zu erhalten.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Carsten Gründker für die vielen Anregungen und Tipps sowie die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Renate Dietrich, Matthias Läsche und allen anderen Kollegen im Labor für Molekulare Gynäkologie möchte ich für die freundliche und produktive Atmosphäre danken. Insbesondere gilt mein Dank Cornelia Kaber und Sonja Blume für ihre Hilfestellung bei vielen Experimenten.

Besonders danken möchte ich Antje Schubert, Dr. Stefanie Fister, Dr. Jan-Hendrik Streich, Dr. Fadi Hussein und Karl Frontzek, durch die viele lange Arbeitstage im Labor aufgelockert wurden.

Mein Dank gilt auch den Geschäftsführern der Firma Trinos Vakuum-Systeme GmbH und Dr. Kai Sturm, die mir durch flexible Arbeitszeiten eine problemlose Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die großzügige zweijährige Förderung dieser dreieinhalb Jahre dauernden Arbeit bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich zu jeder Zeit in jeglicher Hinsicht unterstützt und mir stets starken Rückhalt geboten hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei Anke Weißschuh bedanken, die während des Schreibens dieser Arbeit viele Launen aushalten musste, trotzdem immer für mich da war und mir gerade in den letzten Wochen im wahrsten Sinne des Wortes ein sicheres Dach über dem Kopf geboten hat.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Block
Vorname	Martin
Geburtsdatum	06.08.1979
Geburtsort	Fritzlar
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Auf dem Lohberge 24 A, 37085 Göttingen

Ausbildung

seit April 2006	Promotion Labor für Molekulare Gynäkologie, Universitätsfrauenklinik Göttingen
Oktober 2005 - März 2006	Wissenschaftliche Hilfskraft Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld
August 2004 - September 2005	Diplomarbeit Lehrstuhl für Fermentationstechnik, Universität Bielefeld
1999 - 2005	Studium der Molekularen Biotechnologie Universität Bielefeld, Abschluss: Diplom-Biotechnologe
August 2003 - Februar 2004	Auslandsstudium Königlich Technische Hochschule, Stockholm, Schweden
1989 - 1998	König-Heinrich-Schule Fritzlar, Gymnasium Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufserfahrung

seit September 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Firma Trinos Vakuum-Systeme GmbH, Göttingen
------------------------	---