

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe  
(Prof. Dr. med. G. Emons)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

## **GPR 30**

Zielgerichtete Therapie triple-negativer Mammakarzinome  
durch Bindung des östrogensensitiven Rezeptors GPR 30

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Sandra Filipescu**  
aus  
Bukarest

Göttingen 2017

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**Referent/in:** Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker

**Ko-Referent/in:** Prof. Dr. Holger Dirk Bastians

**Drittreferent/in:** Prof. Dr. Martin Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 12.12.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "GPR 30 - Zielgerichtete Therapie triple-negativer Mammakarzinome durch Bindung des östrogensensitiven Rezeptors GPR 30" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ..... ..

INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1.1 Mammakarzinom</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	- 1 -
1.1.2 Histopathologische Einteilung.....	- 2 -
1.1.3 Therapie.....	- 4 -
<b>1.2 Triple-negatives Mammakarzinom</b> .....	<b>- 5 -</b>
1.2.1 Rezeptorstatus.....	- 5 -
1.2.2 Therapie.....	- 6 -
1.2.2.1 Zielgerichtete (targeted) Therapie des TNBC.....	- 6 -
<b>1.3 G-Protein gekoppelter Rezeptor 30</b> .....	<b>- 8 -</b>
1.3.1 Struktur/Lokalisierung.....	- 8 -
1.3.2 GPR 30-Liganden.....	- 10 -
1.3.2.1 17 $\beta$ -Estradiol.....	- 10 -
1.3.2.2 Estriol.....	- 11 -
1.3.2.3 G15.....	- 11 -
1.3.3 Signaltransduktion.....	- 12 -
<b>1.4 Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>- 16 -</b>
2.1.1 Geräte.....	- 16 -
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	- 17 -
2.1.3 Chemikalien.....	- 17 -
2.1.4 Puffer, Lösungen und weitere Substanzen.....	- 18 -
2.1.5 Kultur-, Einfrier- und Versuchsmedien.....	- 19 -
2.1.6 Zelllinien.....	- 20 -
2.1.7 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Estriol (E3) und G15.....	- 20 -
2.1.8 Mono- und Oligonukleotide.....	- 20 -
2.1.9 Antikörper.....	- 21 -
2.1.10 Kommerzielle Reaktionssysteme.....	- 21 -
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>- 22 -</b>
2.2.1 Zellkultur.....	- 22 -
2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen.....	- 22 -
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl.....	- 23 -

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	- 23 -
2.2.1.4 Proliferationsassay .....	- 23 -
2.2.2 Molekularbiologische Methoden .....	- 24 -
2.2.2.1 Behandlung der Zellen vor der RNA-Isolierung .....	- 25 -
2.2.2.2 RNA-Gewinnung .....	- 25 -
2.2.2.3 Quantifizierung der RNA.....	- 26 -
2.2.2.4 Reverse Transkription .....	- 26 -
2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion.....	- 27 -
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese .....	- 28 -
2.2.2.7 Visualisierung und Auswertung.....	- 28 -
2.2.3 Proteinbioschemische Methoden .....	- 28 -
2.2.3.1 Zellkultivierung zur Proteinisolierung .....	- 28 -
2.2.3.3 Proteinbestimmung .....	- 29 -
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	- 29 -
2.2.3.5 Western Blot .....	- 30 -
2.2.3.6 Detektion, Visualisierung und Auswertung .....	- 30 -
2.2.3.7 Strippen der PVDF-Transfer-Membran.....	- 31 -
2.2.4 Dokumentation und statistische Analysen .....	- 31 -
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 32 -</b>
<b>3.1 Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien .....</b>	<b>- 32 -</b>
3.1.1 Expression von ER $\alpha$ /ER $\beta$ .....	- 32 -
3.1.2 Expression von GPR 30.....	- 33 -
<b>3.2 Einfluss von GPR 30-Liganden auf das Proliferationsverhalten triple-negativer Mammakarzinomzellen</b>	<b>- 34 -</b>
3.2.1 Einfluss des GPR 30-Antagonisten G15 auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen.....	- 34 -
3.2.2 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol (E3) auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen .....	- 35 -
<b>3.3 Untersuchungen zur GPR 30-induzierten Signaltransduktion in triple-negativen Mammakarzinomzellen</b>	<b>- 36 -</b>
3.3.1 Einfluss von GPR 30-Antagonisten auf die Transaktivierung der Tyrosinkinase c-Src.....	- 37 -
3.3.2 Einfluss von GPR 30-Antagonisten auf die Transaktivierung der mitogen-aktivierten-Proteinkinasen Erk-1 und Erk-2.....	- 41 -
<b>3.4 Untersuchungen zur GPR 30-induzierten Signaltransduktion auf genetischer Ebene in triple-negativen Mammakarzinomzellen.....</b>	<b>- 45 -</b>
3.4.1 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol auf die mRNA-Expression von c-Fos .....	- 46 -
3.4.2 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol auf die mRNA-Expression von Cyclin D1.....	- 48 -
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>- 52 -</b>
4.1 Zellspezifischer ER $\alpha$ -, ER $\beta$ - und GPR-30 Nachweis durch die Gen- und Proteindiagnostik.....	- 52 -
4.2 Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen vermittelt durch GPR 30.....	- 54 -

4.2.1	Wachstumshemmende Effekte auf TNBC-Zellen nach Behandlung mit G15 .....	- 54 -
4.2.2	Wachstumshemmende Effekte auf TNBC-Zellen nach Behandlung mit Estriol .....	- 55 -
<b>4.3</b>	<b>In vitro: Signaltransduktionsweg des GPR 30 in TNBC-Zellen .....</b>	<b>- 56 -</b>
4.3.1	Hintergrund der Versuchsstruktur .....	- 58 -
4.3.2	GPR 30-vermittelte Effekte auf die Proteine EGFR, Src, ERK und die Gene c-Fos, Cyclin D1.....	- 60 -
<b>4.4.</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>- 65 -</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>- 67 -</b>
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	- 67 -
6.2	Tabellenverzeichnis.....	- 69 -
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	- 70 -
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 73 -</b>

### 1. Einleitung

#### 1.1 Mammakarzinom

##### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom und mit 29 % auch die häufigste Ursache für karzinombedingte Sterbefälle bei Frauen in Deutschland (RKI 2013). Im Jahr 2012 gab es weltweit ca. 1,67 Millionen Neuerkrankungen (Ferlay et al. 2015). Somit ist das Mammakarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung nach Lungenkrebs (Shah et al. 2014). Auch weltweit liegt die Mortalität (Anzahl der Todesfälle/Bevölkerung) des Mammakarzinoms an erster Stelle (Bray et al. 2012). Die Brustkrebsinzidenz ist seit 1980 stetig gestiegen (Siegel et al. 2014). 2010 lag die Erkrankungsrate (Erkrankungsfälle/100 000) bei 119,6 und 2014 antizipiert bei 132,3. Der Verlauf ist im Vergleich zu anderen Erkrankungen relativ konstant. Mit Einführung des Mammographiescreenings wird das Mammakarzinom in einem früheren Zustand erkannt (RKI 2013). Dies führt zu besseren Überlebensraten in westlichen Ländern (Coleman et al. 2008). Frauen, die an einem Mammakarzinom erkranken, haben eine durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von 87 % (Siegel et al. 2014).

Viele epidemiologische Studien zeigten, dass es sich bei der Entstehung des Mammakarzinoms um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Dabei stellen autosomal-dominant vererbte Erkrankungen mit 5-10 % aller Erkrankten nur einen kleinen Teil der Patienten dar (Margolin et al. 2006). Im Vordergrund stehen beim hereditären Mammakarzinom drei hoch-penetrante Gene: BRCA-1, BRCA-2 und RAD51C. Nach NATHANSON et al. (2001) handelt es sich hierbei um DNA-Reparaturgene, auf die ca. die Hälfte der genetisch determinierten Brustkrebsfälle zurückgeht. Das Lebenszeit-Risiko für Mutationsträger oben genannter Gene, an Brustkrebs zu erkranken beträgt zwischen 45-85 % (Antoniou et al. 2003). Neben der familiären Prädisposition gibt es zahlreiche weitere Risikofaktoren, die die Entstehung des Mammakarzinoms begünstigen (höheres Alter der Frau, variierende Östrogenlevel im Leben einer Frau, eine frühe Menarche, eine späte Menopause und die Nulliparität) (Jacobson et al. 2010; Mettlin 1994). Auch die Hormonersatztherapie zeigte eine Risikosteigerung. Beim Mammakarzinom ist ebenfalls eine ungesunde Lebensführung ein Faktor für die Risikoerhöhung. 21 % aller an Brustkrebs Verstorbenen sind DANAEI et al. (2005) zufolge auf Alkoholabusus, Übergewicht und körperliche Inaktivität zurückzuführen. Dabei wird dem Risikofaktor Adipositas eine verstärkte Aromatisierung androgener Östrogen-Vorstufen und somit eine höhere Verfügbarkeit endogener Östrogene zu Grunde gelegt (Tretli et al. 1990).

## 1. Einleitung

---

### 1.1.2 Histopathologische Einteilung

Die Einteilung des Mammakarzinoms unterliegt aufgrund zahlreicher Subtypisierungen und anhaltender Forschung einem stetigen Wandel. Zur Übersicht ist die grobe Einteilung anhand von drei Kriterien möglich: Histopathologie, Tumorprogression und Genexpression. Bei der alltäglich verwendeten klinischen Einteilung findet in der Regel nur eine histopathologische Differenzierung statt.

Die histopathologische Einteilung erfolgt anhand des speziellen Gewebetyps, der Tumorinvasivität, des Gradings und des Rezeptorstatus. Eine primäre Differenzierung wird durch Klassifizierung des Mammakarzinoms in zwei histologische Gruppen vorgenommen: nicht invasive Karzinome (*Carcinoma in situ*) und invasive Karzinome. Invasive Karzinome werden weiterhin in Subgruppen je nach histologischer Abstammung der Zellen von duktalem oder lobulärem Gewebe unterteilt. Es entstehen zwei Hauptgruppen: das „invasiv duktales Mammakarzinom“ und das „invasiv lobuläre Mammakarzinom“ (siehe Abbildung 1.). Hierbei werden die invasiv duktales Karzinome aufgrund ihrer nicht spezifischen Abstammung als „invasive Karzinome vom unspezifischem Typ“ bezeichnet. Alle anderen histologischen Typen (lobulär, tubulär, muzinös) weisen eine mindestens 90%ige Differenzierung des Tumors auf und werden damit als „invasive Karzinome vom spezifischem Typ“ geführt.

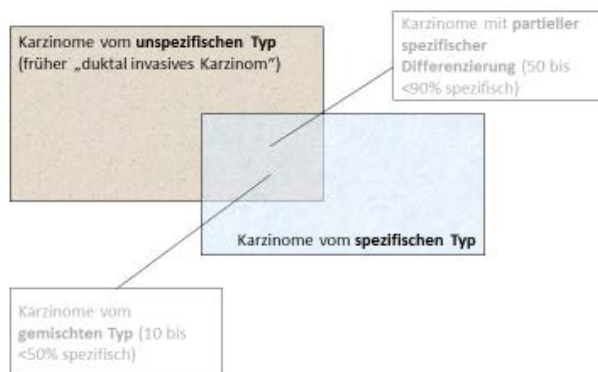


Abbildung 1: Karzinome vom unspezifischen bzw. spezifischen Typ und die Mischformen gemäß neuer WHO-Klassifikation.

Zur weiteren histologischen Differenzierung entstand durch BLOOM und RICHARDSON 1957 das Grading-System. Durch die Beurteilung von Wachstumseigenschaften wie Tubulusausbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate erfolgt eine Einteilung des Mammakarzinoms in drei Stufen (G1, G2, G3). Tumoren, die eine hohe Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe besitzen, werden dementsprechend durch ein niedriges Grading gekennzeichnet. Diese sind vor allem aussagekräftig hinsichtlich des Rezidivrisikos und somit relevant für die Prognose (Elston und Ellis 1991).



## 1. Einleitung

Für die Therapieentscheidung am wichtigsten ist der histopathologisch ermittelte Hormonrezeptorstatus. Die für das Brustgewebe und folglich für das Mammakarzinom relevanten Hormonrezeptoren sind die Östrogenrezeptoren  $\alpha/\beta$  (ER) und die Progesteronrezeptoren (PR). Sie sind deshalb von großer Wichtigkeit, weil sie einen therapeutischen Angriffspunkt bieten. Ein weiterer Rezeptor, der bei jedem Brustkrebspatienten zu ermitteln ist, nennt sich HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*), und ist ein epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Dieser ist bei ca. 25-30 % der Patienten verstärkt exprimiert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Slamon et al. 1989). Sind alle drei Rezeptoren negativ, so handelt es sich um ein „triple-negatives Mammakarzinom“.

Die Einteilung in intrinsische Subtypen erfolgt anhand von Genexpressionssignaturen (Darstellung relevanter Gene der Brustkrebszellen). Es wird unterschieden zwischen dem Luminal-A- und -B-Typ, dem ErbB2-Überexpression- und dem *basal-like*-Typ. Durch diese Differenzierung lassen sich Karzinome mit unterschiedlich schweren Verläufen klassifizieren (Nielsen et al. 2004). Hier wird dem intrinsischen Subtyp *basal-like*, der häufig synonym für das klinisch-pathologisch ermittelte „triple-negative“ Mammakarzinom ist, die schlechteste aller Prognosen zugesprochen. Weitere Zusatzkriterien sind Ki67, ein Proliferationsmarker und das Grading. Die Einteilungen durch diese unterschiedlichen Verfahren sind nicht 100 % deckungsgleich. So entspricht beispielsweise der intrinsische Subtyp *basal-like* nur in ca. 60-80 % der Fälle dem klinisch-pathologisch ermittelten triple-negativen Mammakarzinom (Prat et al. 2013) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Immunhistochemische Charakterisierung der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms

Intrinsische Subtypen	Luminal A	Luminal B HER2-negativ	Luminal B HER2-positiv	ErbB2-Überexpression non-luminal (HER2)	<i>basal-like</i> triplenegativ
<b>Klinisch-pathologische Definition</b>					
ER	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
PR	positiv ( $\geq 20\%$ )	positiv/negativ	positiv/negativ	negativ	negativ
HER2	negativ	negativ	positiv	positiv	negativ
Ki67	<20 %	$\geq 20\%$			
G	G1, G2	G2, G3	G2, G3	G2, G3	G1, G2, G3
ER Östrogenrezeptor, PR Progesteronrezeptor, HER2 humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor2, G Grading					
*die triple-negativen und die <i>basal-like</i> -Mammakarzinome sind nur in etwa 60-80 % deckungsgleich					

Um den aktuellen Verlauf der Erkrankung beurteilen zu können, erfolgt eine weitere Unterteilung anhand der TNM-Klassifikation. Diese unterscheidet Tumorgröße (T), den Befall von Lymphknoten (N) sowie den Grad der Metastasierung (M) voneinander (Singletary et al. 2002).

## 1. Einleitung

---

### 1.1.3 Therapie

Das Mammakarzinom stellt eine sehr heterogene Erkrankung dar. Sie bedarf, abhängig von verschiedenen Risikokonstellationen, einer individualisierten Therapie.

Grundlegend für die kurative Therapie des Mammakarzinoms ist die operative Entfernung des Tumors (Consensus Conference 1991). Die Strahlentherapie hat ebenfalls einen festen Stellenwert in der Behandlung des Mammakarzinoms.

Durch die adjuvante (postoperative) Chemotherapie wird die Mortalität beim primären Mammakarzinom um etwa ein Drittel reduziert (Peto et al. 2012).

Der Stellenwert der endokrinen Therapie (Hormonentzugstherapie) ist in vielen randomisierten Studien untersucht worden. In Metaanalysen der EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative et al. 2011) zeigte sich, dass die Tamoxifengabe das kumulative Sterberisiko über 15 Jahre signifikant um ein Drittel senkt und die Erkrankungsrückfallrate um 5,1 % senkt. Die Voraussetzung dafür ist ein positiver Hormonrezeptorstatus. Dies trifft für ca. 70-80 % aller Mammakarzinome zu (Kreipe et al. 2010). Die Ursprünge von Tamoxifen gehen weit zurück. Bereits 1971 konnten Cole und seine Arbeitsgruppe den positiven Effekt der hormonellen Kastration mittels Ovariectomie auf das Überleben von Brustkrebspatienten nachweisen (Cole et al. 1971).

Bei Tamoxifen handelt es sich um einen selektiven Estrogenrezeptormodulator (SERM), mit dem die Wirkung von Östrogen in bestimmten Geweben gehemmt wird. Aufgrund der deutlich verbesserten Prognose hat sich Tamoxifen als 5-jährige Standardtherapie bei prämenopausalen Mammakarzinompatientinnen etabliert (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative et al. 2011). Die aktuelle ATLAS-Studie (Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter) zeigt hinsichtlich des Rezidivrisikos den eindeutigen Vorteil einer prolongierten Tamoxifen-Therapie über 10 Jahre. Dieses beträgt 25,1 % nach der 5-Jahres-Therapie gegenüber 21,4 % nach der 10-Jahres-Therapie (Davies et al. 2013).

Insgesamt zeigt die Verwendung der Hormontherapie einen hohen therapeutischen Benefit mit gleichzeitig niedriger Toxizität. Das leicht erhöhte Endometriumkarzinomrisiko fällt nur bei Tamoxifen-Einnahme ab dem 55. Lebensjahr ins Gewicht, sodass bei postmenopausalen Frauen die Umstellung auf einen Aromataseinhibitor sinnvoll ist (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group et al. 2011). Dieser wirkt als nicht-steroidaler Inhibitor der Aromatase und hemmt damit die Östrogensynthese. Interessant dabei ist, dass ER $\alpha$ -positive Mammakarzinome nicht zu 100 % auf die Therapie mit Tamoxifen ansprechen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative 2005).

Bei der systemischen Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®) handelt es sich um eine *Target*-Therapie mit einem monoklonalem Antikörper. Eine Zusammenfassung diverser Studien ergab, dass die Therapie mit Trastuzumab eine Senkung des Rezidivrisikos um 37 % und des Mortalitätsrisikos um 34 % erzielt (Dahabreh et al. 2008). Allerdings kann sie nur bei Mammakarzinomen mit einer nachgewiesenen Her2-Überexpression (*human epidermal growth factor receptor 2*) erfolgen. Dies trifft für ca. 5-20 % aller Patientinnen zu (Kreipe et al. 2010). Der Rezeptor sowie der EGFR1 (*epidermal growth factor receptor*) gehören zu der gleichen Kategorie der EGF Rezeptoren und werden vor allem an der Zellmembran vieler maligner Zellen exprimiert (Negro et al. 2004). Er kann, durch die Anwendung von Trastuzumab, gezielt inhibiert werden.

### 1.2 Triple-negatives Mammakarzinom

#### 1.2.1 Rezeptorstatus

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) ist durch die Abwesenheit von Estrogenrezeptoren (ER), Progesteronrezeptoren (PR) und *human epidermal growth factor receptor-2* (HER2) charakterisiert. Dabei hat das *basal-like* Mammakarzinom ähnliche Eigenschaften wie das TNBC. Die Heterogenität könnte sich potentiell unterschiedlich auf diverse Therapieoptionen auswirken. Aktuell relevant sind diese in der vorliegenden Arbeit nicht, sodass, insofern nicht darauf hingewiesen, beide Begriffe synonym verwendet werden.

Trotz eines guten Ansprechens auf die Chemotherapie ist die Prognose dieser Entität vergleichsweise schlecht (Liedtke et al. 2008). Die Mortalität von Patienten mit triple-negativem Mammakarzinom liegt in den ersten 5 Jahren doppelt so hoch wie die Mortalität der Patienten, die an ER $\alpha$ -positivem Mammakarzinom erkrankt sind (Kaplan und Malmgren 2008). Dies hängt unter anderem mit mangelnden Therapiemöglichkeiten zusammen. Ein weiterer entscheidender Faktor für die Prognose ist das Metastasierungsverhalten. Die Metastasierungsbereitschaft innerhalb der ersten 5 Jahre liegt beim triple-negativen Mammakarzinom deutlich höher als bei anderen Mammakarzinomen und ist mit ungünstigen viszeralen Metastasen assoziiert (Dent et al. 2009). Außerdem treten triple-negative Tumoren häufiger im jungen Alter, bei BRCA1-Trägern und bei Afroamerikanern auf. Im Vergleich zu Kaukasiern haben diese ein doppelt so hohes Risiko, an TNBC zu erkranken, wodurch sich Rückschlüsse auf die Bedeutung verschiedener Gensequenzen und Mutationen ziehen lassen (Lund et al. 2009).

Im Allgemeinen gibt es noch keine etablierten Marker, die in der klinischen Routine einsetzbar sind, um triple-negative Karzinome prognostisch oder prädiktiv einteilen zu können. Derzeitig diskutierte

Ansatzpunkte sind veränderte Expression von Proteinen, Onkogenen oder Signalkaskaden. Unter anderem haben YU et al. (2013) eine Kohorte von 44 chemoresistenten TNBC-Patientinnen mit einem *Score* von 7 Genen in Verbindung bringen können, der sich als prognostisch relevant für das Rezidivrisiko zeigte. Mit der gleichen Fragestellung befassten sich auch RODY et al. (2011). Im Falle einer hohen Expression eines sogenannten B-Zell-Metagens (Pool homogener Genexpressionsprofile) sowie einer niedrigen Expression eines IL-8 Metagens ließ sich eine Subgruppe triple-negativer Mammakarzinome identifizieren, die eine gute Prognose aufweist. Beide Arbeiten haben bisher jedoch keine Auswirkungen auf die Therapie des TNBC.

Im Gegensatz dazu finden für hormonrezeptorpositive Tumoren bereits Genexpressionsanalysen wie der Oncotype DX® (prädiktiv) und der Endopredict® (prognostisch) klinische Anwendung.

### 1.2.2 Therapie

Die Basis der Therapie der TNBC beruht auf den in Kapitel 1.1.3 geschilderten Prinzipien. Die Therapie dieser triple-negativen Subgruppe ist dadurch begrenzt, dass die Rezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) sowie der mit HER2 interagierende Antikörper Herceptin (HER2) für eine zielgerichtete Therapie nicht zur Verfügung stehen. Damit ist die Chemotherapie die bisher einzige medikamentöse Alternative für das TNBC.

Den Leitlinien (AWMF 2012) zufolge setzt sich die Chemotherapie aus Anthrazyklinen und Taxanen zusammen. Unterscheiden lassen sich diverse Dosierungen und Schemata. Kontrovers diskutiert wird die Anwendung von Platinderivaten als zusätzliche Substanz. In der Phase II der GeparSixto Studie konnte eine deutlich höhere pathologische Komplettremission bei Patienten mit triple-negativem Mammakarzinom gezeigt werden. Diese betrug 54 % bei der Hinzunahme von Platinsalzen im Vergleich zu 41 % bei der Gabe der Standardtherapie (von Minckwitz et al. 2014). Allerdings hat man in dieser Studie und einer Studie von PETRELLI et al. (2014) sowohl eine hohe Ausfallrate der Probanden als auch eine geringe Aussagekraft des Endpunktes „pathologische Komplettremission“ festgestellt. Diese Ausfallrate war auf eine deutlich gesteigerte Toxizität der Interventionsgruppe zurückzuführen.

#### 1.2.2.1 Zielgerichtete (*targeted*) Therapie des TNBC

Potentielle Ansätze der zielgerichteten Therapie sind vorhanden, die meisten werden noch im Rahmen von Studien getestet. Viele davon zeigen für die Standardtherapie beim primären TNBC geringe Erfolgsaussichten, unter anderem die Substanzklasse der PARP-Inhibitoren. O'SHAUGHNESSY et al. (2014) konnten in einer Phase-III-Studie keinen statistisch signifikanten Unterschied des

## 1. Einleitung

---

Gesamtüberlebens für Iniparib in Kombination mit Gemcitabine und Carboplatin gegenüber Gemcitabine und Carboplatin alleine beim triple-negativen Mammakarzinom zeigen. Die oben beschriebenen Substanzen hemmen gezielt die DNA-Reparaturgene PARP-1/PARP-2, sodass sich der therapeutische Effekt auf Karzinome mit BRCA1/BRCA2-Mutationen beschränkt (Lee et al. 2014). In diesen Tumorentitäten werden durch die Therapie alle DNA-Reparaturmechanismen ausgeschaltet, wodurch es zum Zelltod kommt. Weitere Phase-III-Studien sind ausstehend.

Die Hinzunahme des Angiogeneseinhibitors Bevacizumab hat keinen Vorteil in der Therapie triple-negativer Mammakarzinome gezeigt. In der Beatrice-Studie war der Überlebensvorteil (83,7 % versus 82,7 %) mit dieser Antikörpertherapie nicht signifikant erhöht (Cameron et al. 2013).

Ähnliche Ergebnisse hat es in Bezug auf die Hemmung des EGF-Rezeptors gegeben. Auch dieser wird CORKERY et al. (2009) zufolge vermehrt in triple-negativen Brustkrebszellen exprimiert. Eine Therapie mit einem EGFR-Inhibitor ist daher naheliegend. Die Anwendung von Cetuximab als monoklonalen EGFR-Antikörper hat vielversprechende Effekte in vitro gezeigt. Nichtsdestotrotz hat das Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab in diversen Phase II Studien bisher nur zu geringen Effekten geführt. Die Gruppe um BASELGA et al. (2013) erreichten in der Therapie des mTNBC (metastasierten) ein um 2,2 Monate verlängertes progressionsfreies Überleben bei der Hinzunahme von Cetuximab zur Standardtherapie mit Cisplatin. Das Gesamtansprechen, welches als der primäre Endpunkt der Studie definiert war, konnte nicht erhöht werden.

Ähnlich waren die von CAREY et al. (2012) präsentierten Daten. Sie führten zusätzlich Analysen der EGFR induzierten Signalkaskaden unter laufender Therapie mit Cetuximab durch. Diese zeigten initial eine hohe Aktivierung des EGF-Rezeptors in den triple-negativen Zellen der Probanden. Jedoch hat eine Hemmung durch Cetuximab die Aktivierung dieser Signaltransduktion nur in wenigen Fällen beeinflusst, wodurch suggeriert wird, dass alternative Mechanismen zur Erhaltung dieser Signalkaskade beitragen.

Weitere Therapieoptionen könnten durch die Gensequenzierung von Tumorgewebe eröffnet werden. Durch den Nachweis von Mutationen, wie beispielsweise in der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade, könnten Zellen, die solche Mutation vorweisen, gezielt gehemmt werden. Aktuelle Forschungsergebnisse gibt es bisher nicht (Engebraaten et al. 2013).

### 1.3 G-Protein gekoppelter Rezeptor 30

#### 1.3.1 Struktur/Lokalisierung

Der GPR 30 gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und wurde erstmalig 1997 von CARMECI et al. in der ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 entdeckt. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen dem Rezeptor und der Aktivierung typisch hormonell induzierter Signalkaskaden vermutet.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen ubiquitär im gesamten Körper vor und nehmen mit 1000-2000 Subtypen ca. 1 % des menschlichen Genoms ein (Lander et al. 2001). Fast 50 % aller aktuell verwendeten Pharmazeutika haben einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor als Zielstruktur (Flower 1999). Bei diesem Rezeptortyp handelt es sich um einen Zelloberflächenrezeptor. Liganden können sowohl an die extrazelluläre als auch die transmembranäre Domäne binden, wodurch das Signal zur Aktivierung verschiedener Enzyme oder Ionenkanäle weitergeleitet wird (Luttrell 2008).

Im Detail bestehen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus sieben die Zellmembran durchspannenden Helixstrukturen, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne wird N-Terminus, die intrazelluläre Domäne wird C-Terminus genannt (Rosenbaum et al. 2009). An der Zellinnenseite bindet an den Rezeptor ein heterotrimerisches G-Protein, welches die Verbindung zwischen Rezeptor und den intrazellulär liegenden Effektormolekülen herstellt. Insgesamt besteht das G-Protein aus der G $\alpha$ -Untereinheit, die im inaktiven Zustand GDP-gebunden hat und der G $\beta\gamma$ -Untereinheit (Milligan und Kostenis 2006).

Grundsätzlich werden Subtypen, die einen stimulierenden Effekt haben (G<sub>s</sub>-Protein) und solche, die einen inhibierenden Effekt (G<sub>i</sub>-Protein) haben, unterschieden.

Der Signaltransduktionsweg (siehe Abbildung 2) beginnt mit der Bindung eines Liganden, wodurch der Rezeptor eine Konformationsänderung erfährt und eine Bindung mit dem G-Protein eingeht. Das dann durch GDP-GTP-Austausch aktivierte G-Protein, dissoziiert in seine G $\alpha$ - und G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die Regulation der Aktivität verschiedener Enzyme erfolgt sowohl über die G $\alpha$ -Untereinheit als auch über den aktivierten G $\beta\gamma$ -Komplex (Clapham und Neer 1997) (siehe Abbildung 2). Diese führen bei G-Proteinen zur Aktivierung membranassoziierter Enzyme oder Ionenkanäle, welche im Anschluss eine Kaskade sekundärer Botenstoffe triggern (Herrmann et al. 2004). Das Signal hält an bis die intrinsische GTPase-Aktivität der G $\alpha$ -Untereinheit sich selbstregulierend wieder in den inaktiven Zustand zurückversetzt. Das G-Protein liegt nun wieder in heterotrimerer Form vor. Es gibt diverse regulatorische Mechanismen, die die Signalstärke beeinflussen können. Zur Unterbrechung der Signalweiterleitung spielt insbesondere das GRK-Arrestin-System eine Rolle (Hausdorff et al. 1990). G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) fördern durch Phosphorylierung der aktivierten GPCRs die

## 1. Einleitung

Bindung von Arrestin, das daraufhin die Bindung von G-Proteinen verhindert sowie eine Rezeptor-Internalisierung bewirkt (Krupnick und Benovic 1998). Zur Signalverstärkung kann ein Molekül eines GPCR mehrere G-Protein-Moleküle aktivieren (Alousi et al. 1991).

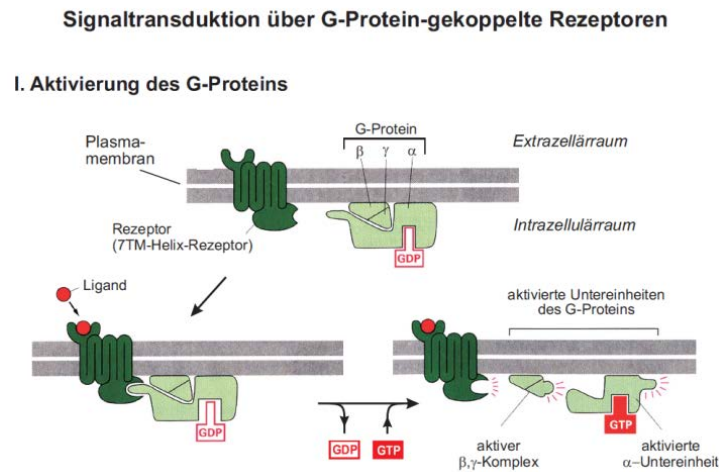


Abbildung 2: Ligandenbindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach Horn et al. 2005, S. 343)

Dem aktuellen Forschungsstand nach wird der GPR 30 unter anderem in Brust- und in Endometriumgewebe exprimiert und wird sowohl mit Malignomen als auch mit aggressiverem Verhalten assoziiert. So haben GPR30-positive Tumoren ein doppelt so hohes Metastasierungsrisiko wie GPR 30-negative Tumoren (Filardo et al. 2006). STEIMAN et al. (2013) konnten in einer retrospektiven Studie zeigen, dass 94 % der untersuchten triple-negativen Mammakarzinome GPR 30-positiv waren. Zudem war die GPR 30-positive Gruppe im Durchschnitt ca. 16 Jahre jünger und entsprach somit einer Patientengruppe, die mit hoher Wahrscheinlichkeit höheren Östrogenspiegeln ausgesetzt war. Weiterhin hatten diese Patienten bei Diagnose ein größeres Tumolvolumen. Ein gehäuftes Auftreten des Her2-Rezeptors, der bekanntlich als Risikofaktor des Mammakarzinoms gilt, haben FILARDO et al. 2006 bei GPR 30-positiven Tumoren beschrieben. Im Hinblick auf das Outcome konnten SJOSTROM et al. (2014) in einer Langzeitstudie die prognostische Bedeutung von GPR 30 auch bei hormonrezeptorpositiven Patienten demonstrieren. Nach einem Follow-up von 17 Jahren zeigte die Therapie mit Tamoxifen, in Abwesenheit des GPR 30, ein krankheitsfreies Überleben von 91 %, während nur 73 % der Patienten mit exprimiertem GPR 30 die Tamoxifenbehandlung überlebten. Dies ließe sich darauf zurückführen, dass Tamoxifen ebenfalls ein Agonist von GPR 30 ist.

## 1. Einleitung

---

### 1.3.2 GPR 30-Liganden

Als Liganden gelten Moleküle, die an einen Rezeptor binden und agonistische, antagonistische oder inverse Wirkung haben. Die Bindung eines Agonisten führt zur Verschiebung des Gleichgewichtes in den aktiven Zustand, dagegen verschiebt ein inverser Agonist das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Zustandes und hemmt so die Interaktion mit dem G-Protein, was letztendlich in einer Reduktion der Basalaktivität resultiert. Antagonisten hemmen dagegen die Bindung weiterer Liganden, wobei die konstitutive Aktivität des Rezeptors nicht beeinträchtigt wird (Neubig et al. 2003).

17 $\beta$ -Östradiol führt zur Aktivierung des membranständigen GPR 30 und löst die Aktivierung nicht-genomischer Mechanismen, die durch schnelle Signalkaskaden innerhalb von Sekunden bis Minuten gekennzeichnet sind, aus (Nemere et al. 1998).

#### 1.3.2.1 17 $\beta$ -Estradiol

17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) ist ein lipophiles Sexualhormon, welches neben dem Estron und dem Estriol das wirksamste endogene Östrogen darstellt (Hu und Mackenzie 2009). 17 $\beta$ -Estradiol bindet an zwei verschiedene Rezeptortypen (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ), die aus zwei verschiedenen Genen kodiert werden (Giguere et al. 1998). Nach der Bindung des Hormons wirkt der Komplex als Transkriptionsfaktor im Zellkern und reguliert die Expression diverser Gene (Horn et al. 2005). Bei diesem Vorgang resultiert eine Latenz von einigen Stunden bis zum Wirkungseintritt. Zusätzlich können Östrogene kurzwirksame Zellantworten hervorrufen, deren Kaskade nicht mit der langwirksamen genomischen Aktion des Estrogenrezeptors in Verbindung gebracht wird (Falkenstein und Wehling 2000). Diese aktivierten Moleküle der Signalkaskade sind zugleich Schlüsselmoleküle des durch den EGF-Rezeptor getriggerten Weges (Levin 2003). Die Schnelligkeit der Calciummobilisation, die Produktion von cAMP und die MAPK-Aktivierung (Bestandteile der intrazellulären Signalkaskade) weisen auf einen membranständigen, durch Östrogen getriggerten Rezeptor hin. THOMAS et al. (2005) zeigten die Bindung von E<sub>2</sub> an GPR 30 in ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -negativen SKBR3-Mammakarzinomzellen. Auch FILARDO et al. (2007) konnten dies in ihrer Studie nachweisen. In triple-negativen BC-Zellen (*breast cancer*) wurde die Proliferationssteigerung der Zellen mittels E<sub>2</sub> durch einen *knock-down* der GPR30-Expression vollständig verhindert (Girgert et al. 2012).

Außer 17 $\beta$ -Estradiol haben auch Tamoxifen (selektiver Estrogenrezeptormodulator) und Fulvestrant (eigentlich bekannt als Estrogenrezeptorantagonist) eine agonistische Wirkung auf den GPR 30. Die Rezeptoraffinität dieser Antiöstrogene war etwas geringer als die von 17 $\beta$ -Estradiol. Die ausbleibende Wirkung einiger antihormoneller Therapien durch erhöhte GPR30-Expression wurde diskutiert (Wittliff



1984). IGNATOV et al. (2011) fanden heraus, dass Patienten nach einer Tamoxifen-Therapie, eine deutlich höhere GPR 30-Expression zeigten und sich zugleich das Gesamtüberleben verschlechterte.

### 1.3.2.2 Estriol

Estriol ( $E_3$ ) ist ein Abbauprodukt des Estradiols und wird vor allem mit hohen Spiegeln während der Schwangerschaft assoziiert (Goodwin 1999), welche im Allgemeinen ein niedrigeres Erkrankungsrisiko für das Mammakarzinom haben (Jacobson et al. 2010). Die geringe Affinität zum Estrogenrezeptor und eine hohe Eliminationsrate erklären die niedrige biologische Aktivität von Estriol im Gegensatz zum Estradiol (Terenius 1971). Nach kontinuierlicher hoher Exposition mit Estriol konnte KATZENELLENBOGEN (1984) jedoch Estriol als ein relativ potentes Estrogen in vitro nachweisen.

Bereits seit längerem wird eine potentielle antagonistische Wirkung des Estriols diskutiert (Goodwin 1999; Clark et al. 1977), so auch auf den GPR 30. Dies wurde durch die Hemmung GPR 30-induzierter Signalwege sowohl in SKBR3- als auch in HCC70-Zellen bestätigt (Girgert et al. 2014; Lappano et al. 2010).

### 1.3.2.3 G15

Mit der Identifizierung des GPR 30 als weiterem Estrogenrezeptor und der zunächst unklaren Bedeutung dieses Rezeptors wurde das Interesse an einer Substanz, die diesen Estrogen-aktivierten Rezeptor hemmt, größer. In der Absicht, ein mögliches therapeutisches Zielmolekül bei der Behandlung des Mammakarzinoms zu entdecken, ist eine ausführlichere Darstellung der ausgelösten Zellantwort erforderlich. Eindeutig ist, dass Estriol und antihormonelle Therapien wie Tamoxifen jeweils unterschiedliche Wirkung auf  $ER\alpha$  und GPR 30 haben.

2009 ist G15 als potentieller GPR30-Antagonist entwickelt worden. DENNIS et al. (2009) beschrieben einen Antagonisten, der mit hoher Affinität an GPR 30 und mit minimaler Affinität an  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  bindet. Jedoch wurde die Zellantwort nicht durch G15 alleine induziert, sondern es bedurfte einer Prästimulation des Rezeptors mit einem Agonisten (Estradiol oder G-1). Beispielsweise wurde die vorherige, durch Estradiol induzierte, Stimulation von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) durch G15 gehemmt (DENNIS et al. 2009). Denselben Effekt hat man für die intrazelluläre Calciummobilisation festgestellt. Die durch  $E_2$ -induzierte Kalziumfreisetzung in der GPR 30-positiven und  $ER\alpha/\beta$ -negativen SKBR3 (Mammakarzinomzelllinie) konnte durch G15 gehemmt werden. Diese Hemmung war nur in Anwesenheit des GPR 30 möglich, wodurch die Spezifität der Substanz für den Rezeptor bestätigt wird. Letztendlich konnte sogar die Resistenzbildung von Zellen nach Therapie mit Tamoxifen mithilfe des

## 1. Einleitung

GPR 30-Inhibitors „G15“, hinsichtlich des Tumorwachstums in Xenograft-Mäusen, deutlich reduziert werden (Mo et al. 2013).

Inzwischen ist von derselben Arbeitsgruppe ein weiterer GPR30-Antagonist (G36) entwickelt worden, der mit derselben Bindungskapazität den GPCR 30 bindet, jedoch eine noch geringere Affinität zu dem ER $\alpha$  hat (Dennis et al. 2011).

### 1.3.3 Signaltransduktion

Die Proteine der  $G_{s/i}$ -Familie stimulieren beziehungsweise inhibieren die Adenylatcyclase und beeinflussen darüber den intrazellulären Spiegel des sekundären Botenstoffes cAMP, wodurch eine Aktivierung der Proteinkinase A erfolgt. Zusammen mit einer durch Diacylglycerin (DAG: siehe unten) aktivierten Proteinkinase C, werden die Effektorproteine phosphoryliert (siehe Abbildung 3).

Eine weitere Gruppe von G-Proteinen, die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden, stellen die Proteine der  $G_q$ -Familie dar. Sie lösen eine Stimulation der Phospholipase C (PLC) aus, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die sekundären Botenstoffe Inositol-3,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und DAG spaltet. Im Anschluss erfolgt die Freisetzung des Ca<sup>2+</sup> (Kalziumionen) aus dem endoplasmatischen Retikulum (siehe Abbildung 3).

Die letzte Gruppe umfasst die Gruppe der  $G_{12/13}$ -Proteine, über die noch wenig bekannt ist (Clapham und Neer 1997) (siehe Abbildung 3).

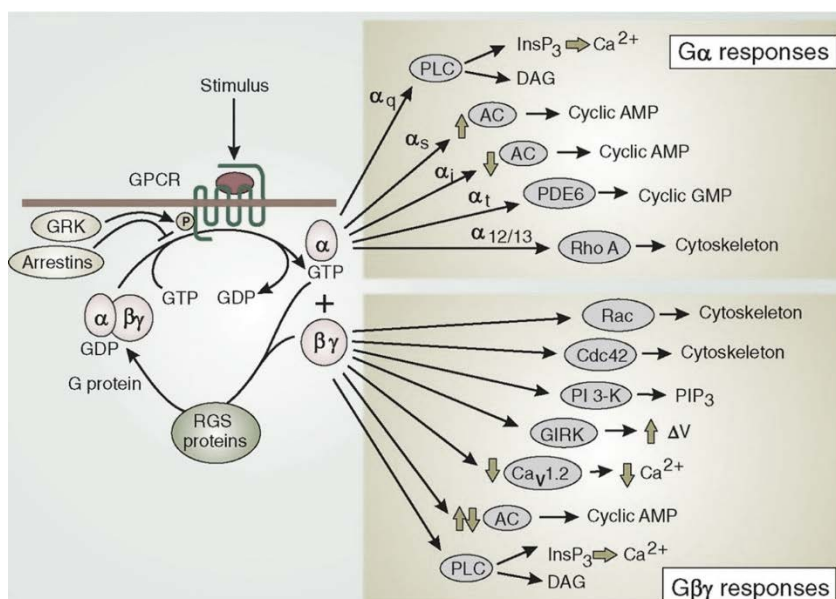


Abbildung 3: Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach Watson 2015, S. 62)

## 1. Einleitung

---

Der GPR 30 gehört zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und löst vor allem oben genannte Signaltransduktionswege aus. Untersuchungen zur Signaltransduktion zeigen, dass GPR 30 zuständig ist für einen alternativen Estrogen-induzierten Weg, der schnelle sekundäre Botenstoffe triggert, die unter anderem spezifisch für den EGF-Rezeptor sind. Daher ist die bisher vermutete Stimulation von ER $\alpha$  und ER $\beta$  nicht allein an der durch Östrogen bedingten Zellantwort beteiligt.

Vor allem die schnelle Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs (mitogenaktivierte Proteinkinasen), von RAS und c-Fos durch Estradiol weist auf eine Aktivierung des EGFR über GPR 30 hin (Simoncini et al. 2000). Die MAPK ist insofern von Bedeutung, als sie an der Steuerung der Genexpression auf Transkriptionsebene beteiligt ist und dadurch die Proliferation des Gewebes induziert.

Grundsätzlich führt die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors EGF zu einer Stimulation der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen Erk-1 und Erk-2. Genau diese Antwort hat man in SKBR3-Zellen, die negativ für ER $\alpha$  und ER $\beta$ , aber positiv für HER2 sind, durch Östrogen hervorrufen können. FILARDO et al. zeigten 2000 erstmalig die Beteiligung des GPR 30 an diesem Vorgang. Durch die Transfektion von GPR 30 in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen (ER $\alpha$  negativ / ER $\beta$  positiv / GPR 30 negativ) ließ sich eine östrogenabhängige Aktivierung von Erk-1/-2 induzieren. Ohne Transfektion des GPR 30 war dies in diesen Zellen nicht möglich. Aufgrund dieser Beobachtung wurde auf einen möglichen *cross-talk* zwischen dem EGF-R und GPR 30-Rezeptor geschlossen. Dieser *cross-talk* wird durch Bindung von E2 an GPR 30 ausgelöst. Bislang bekannt war die Beteiligung von c-Src (Tyrosinkinase src) und Komplexen aus Grb-2/Sos/Shc zur Aktivierung der zytoplasmatischen Seite des EGFR (Luttrell et al. 1997). Sowohl die Arbeitsgruppe um PRENZEL et al. (1999) als auch FILARDO et al. (2005) fanden heraus, dass die G $\beta\gamma$ -Untereinheit (UE) über c-Src Metalloproteasen aktiviert, die zur Freisetzung von Heparin-gebundenem EGF (*HB-EGF*) von der Zellmembran führen. Das dadurch freigesetzte EGF bindet den EGFR. In der letztgenannten Forschungsarbeit konnte diese Signalkaskade in den ER $\alpha$ -negativen / GPR 30-positiven SKBR3-Brustkrebszellen nach Stimulation mit Östrogen nachgewiesen werden. Die Zellantwort ließ sich als nicht genomische Aktivität von E2 innerhalb weniger Minuten nachweisen.

Parallel zur G $\beta\gamma$ -Untereinheit (UE) erfolgt durch die G $\alpha$ -UE eine Stimulation der Adenylylcyclase. Erhöhtes cAMP führt im Anschluss über zwischengeschaltete Signale zu einer Bindung der für mitotische Gene spezifischen Promotorregion der DNA (Lazennec et al. 2001). Mit Erkennung des GPR 30 und dessen Bindung durch Östrogene lassen sich oben genannte Signale auch in triple-negativen Mammakarzinomzellen - trotz eines Mangels an ER $\alpha$  - darstellen.

Zu beachten ist, dass die meisten der untersuchten Zelllinien (unter anderem SKBR3) auch den EGFR 2 (Her2) überexprimieren, die TNBC definitionsgemäß jedoch nicht. In triple-negativen Mammakarzinomen wird jedoch sehr häufig eine Überexpression des EGFR (Her1) nachgewiesen

(Nielsen et al. 2004). Demnach wird bei einer Transaktivierung des EGFR über den GPR 30 in triple-negativen Zellen eine deutlich höhere zelluläre Antwort induziert. Durch ein *knock-down* des GPR 30 konnte diese übermäßige Aktivierung der Signalkaskade dennoch komplett inhibiert werden (Girgert et al. 2012).

Dieser neu entdeckte Rezeptor GPR 30 stellt einen Bindungspartner für viele Liganden dar: 17 $\beta$ -Estradiol bindet als Agonist an beide Rezeptoren; Tamoxifen hat antagonistische Wirkung am ER $\alpha$  und agonistische Wirkung am GPR 30, das Gleiche gilt für Fulvestrant. Estriol ist ein weiterer Antagonist von GPR 30 (Lappano et al. 2010). Dieses Wissen muss sich zukünftig zu Nutze gemacht werden um einen Liganden zu finden, der als Ziel hat, das Wachstum der Brustkrebszelle zu verhindern, idealerweise durch die Inhibition beider Rezeptoren.

### 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, weiteren Aufschluss über die Bedeutung des GPR 30 und seine mögliche Position in der Therapie des triple-negativen Mammakarzinoms zu erlangen.

Grundlegend hierfür ist die Expression des GPR 30 beziehungsweise die Abwesenheit von ER $\alpha$ , PR, Her2/neu in den zu untersuchenden triple-negativen Zelllinien. An erster Stelle wird dies mittels RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese sichergestellt.

Anschließend soll ermittelt werden, inwiefern der GPR 30 Auswirkungen auf die Zellaktivität hat und somit wohlmöglich zu einem Tumorwachstum *in vivo* führt.

Die von anderen Forschungsgruppen hergestellte Substanz G15 wirkt antagonistisch auf den GPR 30. Weiterhin wird diese Wirkung auch dem endogen produzierten Estriol zugesprochen. Sollte der GPR 30 an der Proliferation der TNBC-Zellen beteiligt sein, so ist davon auszugehen, dass die oben genannten Substanzen das Zellwachstum supprimieren.

Mittels verschiedener Verdünnungsreihen soll die effektivste Konzentration von G15/Estriol ermittelt werden. Der mögliche inhibitorische Effekt wird in einem Proliferationsassay demonstriert.

Als zweiter Schwerpunkt soll der Signaltransduktionsweg von GPR 30 in den TNBC-Zellen näher untersucht werden. Hierzu zählt die Beteiligung des EGFR an der Zellantwort und die weiteren, bei der Signalweiterleitung involvierten Gene/Proteine. Um dies zu untersuchen, werden die Zellen zu Beginn mit der zuvor festgestellten G15/Estriol-Konzentration vorbehandelt und im zweiten Schritt mit

## 1. Einleitung

---

Estradiol stimuliert. In den behandelten Zellen wird der Einfluss der Substanzen auf die Tyrosinkinase Src und die MAP-Kinase ERK 1/2 anhand des Western-Blot Verfahrens analysiert.

Eine weitere Analyse der Auswirkung von G15/E3 erfolgt mittels RT-PCR auf Genexpressionsebene. Cyclin D1 ist maßgeblich am Übergang der Zelle von der G1- (gap) in die Synthesephase beteiligt. C-Fos ist Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 und somit ein Protoonkogen. Beide zeigen bei der Zellproliferation eine erhöhte Aktivität, welche in den Untersuchungen nach Hemmung des GPR 30 mit Estriol/G15 bewertet werden soll.

Mit Aufklärung der durch den GPR 30 induzierten zellulären Mechanismen im triple-negativen Mammakarzinom soll eine neue Option für die zielgerichtete Therapie geschaffen werden, die bisher nicht möglich war. Triple-negative Tumoren, die die klassischen Hormonrezeptoren nicht exprimieren, wären mittels GPR 30 dennoch sensibel für den Einfluss von Östrogenen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage BP 161 Sartorius	Sartorius, Göttingen
Autoklav, 2540 EL	Tuttnauer, Breda
Bio Photometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Brutschrank, Modell 3121 S/N28439532	Forma Scientific, Braunschweig
Elektrophoresekammer, DNA	OWL Separation Systems, Portsmouth (USA)
Labofuge 400R	Heraeus Holding, Hanau
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Mikrowaage, elektronisch M2P	Sartorius, Göttingen
Mini-Protean® III Electrophoresis Cell Systems	Bio-Rad, München
Power Supply, Pac Basic™	Bio-Rad, München
Power Supply, Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph, Schwabach
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank, Clean Air	JA Woerden, Niederlande
Synergy™ HT Multi-Detektions-Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator, BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Waage AZ 1502	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
X-Ray Film Prozessor, SRS-101A	Konica, Langenhagen

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Fresenius Kabi (Bad Homburg), GE Healthcare (Dassel), Menzel Gläser (Braunschweig), Merck Millipore (Darmstadt), Nalgene Labware (Rochester, USA), Nalgene Labware (Rochester, USA), Nunc (Roskilde, Dänemark), Sarstedt (Braunschweig), WU (Mainz).

### 2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose, peqGOLD universal	Pelab, Erlangen
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay	BIO-RAD, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USB, Cleveland (USA)
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum, gestrippt	PAN Biotech, Aidenbach
Glycin	USB, Cleveland (USA)
Holo-Transferrin human	Sigma, Steinheim
Insulin, Inuman rapid®	Sanofi-Aventis, Frankfurt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
Methanol (MeOH)	Th. Geyer, Renningen
Pen-Strep, Gibco®	Life Technologies, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Natriumlaurylsulfat)	Roth, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

Tetramethylethyldiamin	BIO-RAD, München
Tris	USB, Cleveland (USA)
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween 80	Sigma, Steinheim

### 2.1.4 Puffer, Lösungen und weitere Substanzen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Komponenten/Hersteller
Agarose (1,5 %)	1,5 % (w/v) Agarose in ½ TBE
AlamarBlue®	AbD Serotec, Düsseldorf
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %)	10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O
<i>Antibody stripping buffer</i> (Antikörper stripping Puffer)	Interchim, Montluçon (Frankreich)
Blockierungslösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
CellLytic™ Buffer	Sigma, St. Louis (USA)
ECL Immobilon® Western	Millipore, Billerica (USA)
Ethidiumbromid-Bad	34µl (10 mg/ml EtBr) in 500ml H <sub>2</sub> O
Puffer für Polyacrylamid-Gele:	
Lösung B	1,5 M Tris in H <sub>2</sub> O (pH 8,8)
Lösung C	10 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O
Lösung D	0,5 M Tris in H <sub>2</sub> O (pH 6,8)
NuPAGE® 2x LDS <i>sample buffer</i> (Laemmli Puffer)	Life Technologies, Darmstadt
PBS (phosphate buffered Saline) (Phosphat gepufferte Salzlösung)	PAN Biotech, Aidenbach
P(dT) 15 primer [1,1x 10 <sup>-5</sup> M] als Lyophilisat	Roche Diagnostics, Mannheim
ProSieve® 50 Gel Acrylamid-Lösung	Lonza, Rockland (USA)
SDS Elektrophorese Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O
TBE	8,4 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,8 mM EDTA in H <sub>2</sub> O
TBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 24,8 mM Tris in H <sub>2</sub> O (pH 7,4)
TBST	0,1 % Tween in TBS
Transfer Puffer für Western-Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) MeOH in H <sub>2</sub> O
Trypsin-EDTA (1x)	GE Healthcare, Pasching (Österreich)



## 2. Material und Methoden

Tabelle 5: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	ThermoFisher™, Schwerte
KAPA2G Fast Standard TAQ Polymerase	KAPA BIO, Boston (USA)

Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren und Größenstandard-Marker

Inhibitoren	Hersteller
Protease-Inhibitor	Sigma, St. Louis (USA)
RNasin®, RNase Inhibitor	Promega, Madison (USA)

Größenstandard-Marker	Hersteller
100bp DNA-Leiter	Life Technologies, Darmstadt
peqGOLD Protein-Marker V	Peqlab, Erlangen

### 2.1.5 Kultur-, Einfrier- und Versuchsmedien

Für die Kultivierung der Mammakarzinomzellen wurde das MEM-Earl (*Minimum Essential Medium*) w stabilem Glutamin, Phenolrot von Biochrom, Berlin verwendet. So ließen sich Farbumschläge während der Versuche erkennen.

Auch das Einfriermedium wurde durch Verwendung des oben genannten fertig bezogenen Mediums hergestellt.

Das Versuchsmedium ist auf Basis des DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium) w/o Phenolrot von Gibco® Life Technologies, Darmstadt, hergestellt.

Folgende Zusätze wurden den Medien beigefügt.

Tabelle 7: Verwendete Kulturmedien: Funktion und Zusätze

	Nährmedium	Versuchsmedium	Einfriermedium
Grundmedium	<b>MEM w Phenolrot</b>	<b>DMEM w/o Phenolrot</b>	<b>Nährmedium</b>
Zusätze	5 % (v/v) FCS	10 % (v/v) gestripptes FCS	142,9 % (v/v) FCS
	1 % (v/v) P/S	1 % (v/v) P/S	-
	0,1 % Insulin	-	-
	0,1 % Transferrin	-	-
	-	1 % (v/v) L-Gln	-
	-	-	8,5 % (v/v) DMSO

## 2. Material und Methoden

### 2.1.6 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden Zelllinien von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas (USA)) verwendet. Die beiden Mammakarzinomzelllinien (HCC 1806/HCC1937) wurden zur Durchführung der Versuchsreihen genutzt. Die Zelllinie MCF-7 diente als Kontrolle.

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien: nach Herkunft, Histologie und Rezeptorstatus

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Rezeptorstatus	Referenz
<b>HCC 1806</b>	Primärtumor	Mamma, primär akantholytisch spinozelluläres Karzinom, mäßig differenziert	ER negativ, PR negativ, Her2/neu negativ	Gazdar et al. 1998
<b>HCC 1937</b>	Primärtumor	Mamma, duktales Karzinom, hochgradig differenziert	ER negativ, PR negativ, Her2/neu negativ	Gazdar et al. 1998
<b>MCF-7</b>	Pleuraerguss	Mamma, Adenokarzinom	ER positiv	Soule et al. 1973

### 2.1.7 17 $\beta$ -Estradiol (E2), Estriol (E3) und G15

G15 ist als GPR 30 Antagonist von der Firma Tocris bioscience, Avonmouth, GB bezogen und wurde zur Behandlung der Zellen verwendet. Eine 10<sup>-2</sup> M Stammlösung von G15 wurde in Ethanol hergestellt, die weiteren Verdünnungen erfolgten in PBS.

17 $\beta$ -Estradiol (Sigma Aldrich, USA) und Estriol (Sigma Aldrich, USA) wurden in Ethanol gelöst (Stammlösung 10<sup>-2</sup> M). Die weiteren Verdünnungen erfolgten in PBS.

### 2.1.8 Mono- und Oligonukleotide

Die Mononukleotide (Synonym: Desoxynukleosid-Triphosphate „dNTPs“ (dATP, dCTP, dTDP, dGDP) wurden von Roche Diagnostics, Mannheim bezogen und für die Reverse Transkription der RNA genutzt.

Die Oligonukleotide sind von MWG Biotech AG, Ebersberg hergestellt und als Primer in der Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) verwendet worden.

Tabelle 9: Verwendete Primer für die PCR

Gene	Primer-Sequenz
GPR 30	s 5' – AGT CGG ATG TGA GGT TCA G – 3' as 5' – TCT GTG TGA GGA GTG CAA G – 3'
ER $\alpha$	s 5' – CCA GGG AAG CTA CTG TTT GC – 3' as 5' – TCC AGA GAC TTC AGG GTG CT – 3'
ER $\beta$	s 5' – TAG TGG TCC ATC GCC AGT TAT – 3' as 5' – GGG AGC CAC ACT TCA CCA T – 3'
L7	s 5' – AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC – 3' as 5' – ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA – 3'

## 2. Material und Methoden

c-Fos	s 5' – GAG ATG GAG ATC GGT ATG GT – 3' as 5' – CAG GTC TGA ATC AGT GAA TT – 3'
Cyclin D1	s 5' – CCT CGG TGT CCT ACT TCA AA – 3' as 5' – TTG AGC TTG TTC ACC AGG AG – 3'

### 2.1.9 Antikörper

Alle aufgeführten Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

#### Primärantikörper

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper für das Western-Blot-Verfahren

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
<b>Anti-Actin</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:5000	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
<b>Anti-ERK 1/2</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-pERK 1/2</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-Src</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:4000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-pSrc</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-ER<math>\alpha</math></b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Abcam, Cambridge (UK)
<b>Anti-ER<math>\beta</math></b>	Kaninchen, Verdünnung 1:5000	Abcam, Cambridge (UK)
<b>Anti-EGFR</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-pEGFR</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<b>Anti-GPR30</b>	Kaninchen, Verdünnung 1:2000	SantaCruz, Dallas, TX (USA)

#### Sekundärantikörper

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper für das Western-Blot-Verfahren

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
<b>Anti-Rabbit IgG</b>	Ziege, Verdünnung 1:20 000	GE Healthcare, Buckinghamshire, (UK)
<b>Horseradish Peroxidase</b>	– 1:50 000	

### 2.1.10 Kommerzielle Reaktionssysteme

Tabelle 12: Verwendete kommerzielle Reaktionssysteme nach Hersteller

Reaktionssystem	Hersteller
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript <sup>™</sup> II Reverse Transcriptase	ThermoFisher <sup>™</sup> , Schwerte
KAPA2G Fast ReadyMix with dye (2X)	KAPA BIO, Boston (USA)
ECL Immobilon <sup>™</sup> Western	Millipore, Darmstadt

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1.11 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Firma
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San José (USA)
Bio Doc Analyze 2.1	Software Biometra, Göttingen
Endnote X7	Thomson Reuters, New York City (USA)
KC4 Software	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
GEN5	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
GraphPad Prism® (Version 5.00)	GraphPad Software, Inc., La Jolla (USA)
Kodak Digital Science 1D	Eastman Kodak Company, Rochester (USA)
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Inkubation der verwendeten Zelllinien erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C mit einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 %. Alle Materialien wurden vor ihrem Einsatz gereinigt oder autoklaviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in 10 ml Nährmedium (Kapitel 2.1.5). Das Medium wurde alle 2 - 4 Tage erneuert, bis zu einer Konfluenz von ca. 70-90 %, dann wurden die Zellen subkultiviert. Nach Entfernung des Nährmediums wurde der Zellboden mit 2 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA (1x) ca. 10 Min. im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 8 ml Nährmedium aufgenommen und auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Das vorhandene Volumen wurde mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und die Zellkultur weiter bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach maximal 8 - 10 Passagen wurden die Zellen durch ein neues Aliquot ersetzt.

Für einen Zellversuch wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.2) ermittelt. Für die Proliferationsassays (Kapitel 2.2.1.4) wurden die dissoziierten Zellen für 10 Min. bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml hormonfreiem Versuchsmedium (Kapitel 2.1.5) aufgenommen.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Vor der Durchführung eines Versuches erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus neun Quadraten, die jeweils 1 mm<sup>2</sup> messen. Bei einer Tiefe von 0,1 mm beträgt das Füllvolumen 0,1 µl. Zur Differenzierung der Zellviabilität wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau versetzt. Dadurch lässt sich das Zytosol toter Zellen färben und von den vitalen Zellen unterscheiden. Es wurden vier große Quadrate ausgezählt und unter Berücksichtigung des Kammerfaktors (10<sup>4</sup>) wurde die Zellzahl pro ml errechnet:

$$\text{Konzentration [Zellen/ml]} = \frac{\text{Zellzahl} \times 2}{4} \times 10^4$$

### 2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung der Zellen wurden diese in Stickstoff gelagert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (Kapitel 2.1.5) suspendiert und für einen Tag bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde dieses in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um kryokonservierte Zellen wiederzuverwenden, wurden diese für kurze Zeit im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und mit 9 ml Nährmedium in Zellkulturflaschen überführt. Das Medium wurde am Folgetag erneuert.

### 2.2.1.4 Proliferationsassay

Das Zellwachstum der TNBC Zellen nach Behandlung mit den GPR 30 Liganden Estriol und G15 wurde mithilfe des AlamarBlue® assays bestimmt. Dieses Verfahren wurde entwickelt, um vitale Zellen anhand ihrer Reduktionsfähigkeit voneinander zu unterscheiden. Bei der Lösung handelt es sich um Resazurin, einem blauen Redoxindikator, der die Zellmembran durchdringt und im Zytosol einer lebenden Zelle, zu lilafarbenem Resorufin umgesetzt wird. Geschädigte oder tote Zellen reduzieren den Farbstoff nicht. Der Farbumschlag wird in einem Multi-Detektions-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm und 630 nm gemessen.

Zur Durchführung des Proliferationsassays wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in Versuchsmedium resuspendiert. Die gewünschte Zellzahl pro Well wurde mit der Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.1.2) errechnet (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Proliferationsassay: Angabe der Zellzahl pro Well

Zelllinie	Konzentration: Zellzahl/Volumen [µl <sup>-1</sup> ]
HCC 1806	2x10 <sup>3</sup> /100
HCC 1937	2x10 <sup>3</sup> /100

## 2. Material und Methoden

$2 \times 10^3$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  der beiden Mammakarzinomzelllinien wurden in eine 96-Wellplatte pipettiert (die äußeren Wells wurden ausgespart, um Verdunstungsphänomene zu vermeiden) und die Platte für 24 Stunden kultiviert. Nach Festwachsen der Zellen erfolgte die Behandlung der Zellen mit E3 / G15. Diese wurden in aufsteigender Konzentration (siehe Tab. 15 / 16) in 100  $\mu\text{l}$  Versuchsmedium hinzugefügt. Für die Messung des Leerwertes wurden in das erste *Well* lediglich 200  $\mu\text{l}$  Experimentalmedium eingebracht. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für insgesamt 168 Stunden. Zum Ende der Inkubationszeit wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  des Farbstoffes in jedes *Well* pipettiert. Nach ca. 4 Stunden bei 37 °C wurde der Farbumschlag mit dem Synergy™ HT Multi-Detektions-Reader erfasst und mit dem KC4 Programm ausgewertet.

Tabelle 15: Proliferationsassay: Konzentration von E3 und Behandlungszeitpunkt

Estriol (E3)	
Konzentration [M]:	0, $10^{-5}$ , $2 \times 10^{-5}$ , $5 \times 10^{-5}$ , $10^{-4}$ , $1,2 \times 10^{-4}$ , $1,4 \times 10^{-4}$ , $1,6 \times 10^{-4}$ , $1,8 \times 10^{-4}$ , $2 \times 10^{-4}$
Behandlungszeitpunkt [h]:	$t_0$
Versuchsendpunkt [h]:	$t_{168}$

Tabelle 16: Proliferationsassay: Konzentration von G15 und Behandlungszeitpunkt

G15	
Konzentration [M]:	0, $2 \times 10^{-6}$ , $4 \times 10^{-6}$ , $6 \times 10^{-6}$ , $8 \times 10^{-6}$ , $10^{-5}$ , $2 \times 10^{-5}$ , $4 \times 10^{-5}$ , $6 \times 10^{-5}$ , $8 \times 10^{-5}$
Behandlungszeitpunkt [h]:	$t_0$
Versuchsendpunkt [h]:	$t_{168}$

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Anhand molekularbiologischer Methoden lassen sich Zielstrukturen auf genetischer Ebene untersuchen. Zur Bestimmung der Veränderungen der Genexpression wurde die RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion) verwendet, mit der sich die mRNA-Expression der TNBC-Zellen qualitativ und semiquantitativ beurteilen lässt. Die qualitative PCR dient zum Nachweis eines DNA-Abschnittes und wurde hier für die Bestimmung von ER $\alpha$ /ER $\beta$  und GPR 30 genutzt. Der semiquantitative Nachweis der zu untersuchenden Gene c-Fos und Cyclin D1 erfolgte zur Kontrolle L7, dem *housekeeping gene*. Die Behandlung erfolgte mit Estriol und Estradiol.

## 2. Material und Methoden

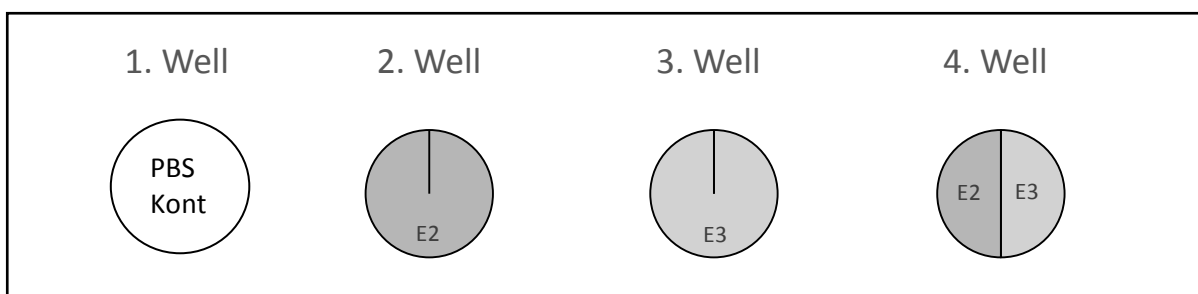
### 2.2.2.1 Behandlung der Zellen vor der RNA-Isolierung

Für den quantitativen Nachweis von ER $\alpha$ /ER $\beta$  und GPR 30 in den triple-negativen Brustkrebszelllinien wurde die RNA-Isolierung ohne vorherige Stimulation der Zellen durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses von Estriol und Estradiol auf die Genexpression wurden die Zellen wie folgt vorbehandelt.

Nach deren Trypsinierung wurden von jeder Zelllinie jeweils 2 000 000 Zellen in 4 *Wells* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium durch hormonfreies Experimentalmedium ersetzt und die Zellen 24 Stunden serumfrei weiterkultiviert. Nach einer 30-minütigen Prästimulation mit Estriol erfolgte die Behandlung mit Estradiol für weitere 30 Min. In die unbehandelte Kontrolle wurde eine äquivalente Menge an PBS hinzugefügt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: RNA-Isolierung: Behandlungszeitpunkte und schematische Darstellung der Wells

Stimulation vor RNA-Isolierung	
Konzentration E3 [M]:	10 <sup>-4</sup>
Konzentration E2 [M]:	10 <sup>-10</sup>
Behandlungszeitpunkt E3 [min]:	t <sub>0</sub>
Behandlungszeitpunkt E2 [min]:	t <sub>30</sub>
Versuchsendpunkt [min]:	t <sub>60</sub>



### 2.2.2.2 RNA-Gewinnung

Das Prinzip der RNA-Gewinnung basiert auf der selektiven Bindung von mRNA an das Silika-Gel einer Trennsäule mit einer Bindekapazität von 100  $\mu$ g RNA. Proteine und DNA werden in den darauffolgenden Schritten entfernt.

Die Lyse der Zellen von dem Boden der 6-*Well*-Platten wurde durch die Hinzugabe eines Gemisches aus Mercaptoethanol und RLT-Puffer erreicht. Das Verhältnis betrug 1:100. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit erfolgten die weiteren Schritte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit. Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol gemischt, auf die Säule aufgetragen und 1 Min bei 13.000 g zentrifugiert. Es erfolgten multiple Waschvorgänge, der erste mit 700  $\mu$ l RW1-Puffer 1 Min. bei 13.000 g, die nächsten beiden mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer 1 und 3 Min. bei 13.000 g, gefolgt von einer weiteren Minute bei 13.000 g. Nach abschließender Eluierung in ddH<sub>2</sub>O, konnten RNA-Moleküle mit

## 2. Material und Methoden

---

Basenpaaren (bp) größer als 200 gewonnen werden. Dieses Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden daraufhin bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.3 Quantifizierung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung wurde mithilfe eines UV-Photometers durchgeführt, das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Verunreinigende Substanzen, wie Proteine, weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm ( $A_{280}$ ) auf.  $A_{280} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$ . Durch Ermittlung des Quotienten wurde der Reinheitsgrad errechnet. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.2.2.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wird verwendet, um aus der vorliegenden RNA einen komplementären DNA-Strang (cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid*) zu synthetisieren. Initiiert wird dieser Vorgang durch Bindung des Oligo(dt)-Primers an den Poly(A)-Schwanz der RNA. Anschließend verbindet die RNA-abhängige DNA-Polymerase (=Reverse Transkriptase) die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) miteinander zu einem komplementären Strang. Für die Durchführung der Reversen Transkription wurde SuperScript™ II Reverse Transcriptase als Kit verwendet. Hierfür wurde 1 µg RNA bis zu einem Gesamtvolumen von 13 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl RNasin® hinzugefügt und die Lösung für 3 Min. bei 70 °C im *Thermocycler* inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 26 µl des in Tabelle 18 aufgeführten Enzym Mix. Die Proben wurden nun für 60 Min. bei 37 °C erhitzt und daraufhin 10 Min. bei 95 °C denaturiert. Die Lagerung der erhaltenen cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 18: Reverse Transkriptase: Zusammensetzung

Substanz	Menge [µl]	Ausgangskonzentration
Oligo(dT) <sub>15</sub> -Primer	8	0,1 mM
dNTP	4	10 mM
FS-Puffer	8	5x
DTT	4	1 mM
Superscript™ II RT	2	200 U/µl



## 2. Material und Methoden

### 2.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Vervielfältigung gezielter DNA-Fragmente *invitro* wird die PCR (*polymerase chain reaction*) verwendet. Bei diesem Vorgang werden von einem DNS-Molekül millionenfache Kopien synthetisiert, die anschließend mit der Gelelektrophorese visualisiert werden können. Zunächst wird die aus DNS-Molekülen, Primern, Nukleotiden und aus Polymerasen bestehende Reaktionslösung auf 95 °C erhitzt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und die DNA liegt als Matrize für die weitere Synthese vor (Denaturierung). Bei der *Annealing*-Temperatur binden die spezifischen Primer an das 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (*Annealing*/Hybridisierung). Das Temperaturoptimum liegt je nach Länge und Sequenz des verwendeten Primers und befindet sich zwischen 55-65 °C. Die Verlängerung (Elongation) des komplementären Stranges erfolgt mit der DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung. Die DNA-Nukleotide werden bei 72 °C miteinander verknüpft. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete KAPA2G™ DNA-Polymerase ist Bestandteil des KAPA2G™ *Fast ReadyMix with dye* (2X). Dieser wurde nach Angaben des Herstellers unter Hinzugabe der cDNA, *sense*- und *antisense-Primer* und destilliertem H<sub>2</sub>O verwendet (siehe Tabelle 19). Die enthaltenen Farbstoffe machen die Analyse der Endprodukte mittels Gelelektrophorese möglich. In Tabelle 20 sind die Programme der jeweiligen zu untersuchenden Gene dargestellt.

Tabelle 19: Polymerase-Kettenreaktion: Zusammensetzung

Substanz	Pro Probe [µl]	Ausgangskonzentration
<b>KAPA2G™ Fast ReadyMix with dye (2X)</b>	7,5	2x
KAPA2G Fast DNA Polymerase	0,075	5 U/µl
dNTPs	1,2	1 mM
MgCl <sub>2</sub>		1,5 mM
cDNA	1	5 ng/µl
<i>Sense-Primer</i>	0,375	20 pM
<i>Antisense-Primer</i>	0,375	20 pM
H <sub>2</sub> O	6,5	

Tabelle 20: Polymerase-Kettenreaktion: Programme nach Temperatur, Zeitangabe und Zyklenanzahl

Gen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
ERα	15 sec, 95°C	15 sec, 56°C	5 sec, 72°C	34
ERβ	15 sec, 95°C	15 sec, 61°C	5 sec, 72°C	35
GPR 30	15 sec, 95°C	15 sec, 56°C	5 sec, 72°C	35
c-Fos	15 sec, 95°C	15 sec, 61°C	5 sec, 72°C	29-31
Cyclin D1	15 sec, 95°C	15 sec, 55°C	5 sec, 72°C	19
L7	15 sec, 95°C	15 sec, 54°C	5 sec, 72°C	15

## 2. Material und Methoden

---

### 2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Das Ziel der Agarose-Gelelektrophorese ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten, um die verschiedenen Nukleinsäuren zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden 1,5 %-Agarose-Gele hergestellt, in deren Taschen nach Aushärtung jeweils 10 µl des Reaktionsproduktes pipettiert wurden. Als Größenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter. Eine Spannung von 95 V wurde für durchschnittlich 50 Min. angelegt.

### 2.2.2.7 Visualisierung und Auswertung

Nach Beendigung der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Gel wurde für 20 - 30 Min. in ein Ethidiumbromidbad gelegt und anschließend in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Detektion sowie die darauffolgende Auswertung erfolgten mittels UV-Transilluminator und dem Bio Doc Analyze 2.1 Programm.

### 2.2.3 Proteinbioschemische Methoden

Zum Nachweis der Zielgene auf Proteinebene kam das Western-Blot-Verfahren zum Ermitteln der Expression von ERα/ERβ und GPR 30 und der Aktivierung von Signalkaskaden mittels EGFR, c-Src und Erk-1/-2 zum Einsatz.

#### 2.2.3.1 Zellkultivierung zur Proteinisolierung

Die Behandlung der Zellen erfolgte identisch zu den in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Vorgängen. Nach Inkubation der Zellen für insgesamt 48 Stunden erfolgte die Prästimulation mit G15 oder Estriol für 30 Min. in den unten aufgeführten Konzentrationen (siehe Tabelle 21 / 22). Der Behandlungsbeginn wurde mit  $t_0$  gekennzeichnet. Nach Ablauf der Zeit wurde jeweils eine Platte für 5 Min., die andere Platte für 10 Min. mit  $10^{-10}$  M Estradiol inkubiert. Um Volumenunterschiede zu vermeiden, wurden in die Kontrollen äquivalente Mengen an PBS hinzugefügt.

Tabelle 21: Proteinisolierung: E2/E3-Konzentration mit Behandlungszeitpunkten

E3-Stimulation zur Proteinisolierung	
Konzentration E3 [M]:	$10^{-4}$
Konzentration E2 [M]:	$10^{-10}$
Behandlungszeitpunkt E3 [min]:	$t_0$
Behandlungszeitpunkt E2 [min]:	$t_{30}$
Versuchsendpunkt 1 [min]:	$t_{35}$
Versuchsendpunkt 2 [min]:	$t_{40}$

## 2. Material und Methoden

---

Tabelle 22: Proteinisolierung: E2/G15-Konzentration mit Behandlungszeitpunkten

G15-Stimulation zur Proteinisolierung	
Konzentration G15 [M]:	$10^{-5}$
Konzentration E2 [M]:	$10^{-10}$
Behandlungszeitpunkt G15 [min]:	$t_0$
Behandlungszeitpunkt E2 [min]:	$t_{30}$
Versuchsendpunkt 1 [min]:	$t_{35}$
Versuchsendpunkt 2 [min]:	$t_{40}$

### 2.2.3.2 Proteinisolierung und -vorbereitung

Nach der Behandlung wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend für 1 Min. mit in PBS gelöstem EDTA (1:2,08) abgelöst. Die adhären Zellen ließen sich daraufhin mit einem Plastikschaaber von dem Boden der *Wells* lösen. Die Suspension wurde mit 3 ml PBS verdünnt und bei 1400 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in je 50 µl CellLytic™ Buffer resuspendiert. Mithilfe des Lysepuffers werden die Proteine extrahiert und anhaltende Reaktionen durch Phosphataseinhibitoren gestoppt. Im Anschluss wurden die Proteine bei -80 °C gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen der Proteine wurden diese erneut bei 13 000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Das aus Zellkernen bestehende Pellet wurde verworfen.

Vor der weiteren Verwendung wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.3).

### 2.2.3.3 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet. Die Unterschiede werden mit einem Multi-Detektions-Reader erfasst. Aus dem Absorptionsmaximum ( $\lambda=595$  nm) wird ein Extinktionskoeffizient ermittelt, der direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Als Standard wird *bovines* Serumalbumin (BSA) unterschiedlicher Konzentration verwendet. Vor Beginn der Proteinbestimmung wurden die Proteine zunächst 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Jeweils 10 µl der Serumalbuminstandards und der Proteinproben wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 200 µl des Bio-Rad Protein-Reagenz nach Angaben des Herstellers hinzugegeben. Die Messung erfolgte mit dem Multi-Detektions-Reader, die Auswertung mit dem GEN5 Programm.

### 2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate* Polyacrylamid-Gelelektrophorese) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Ihre negative Ladung erhalten die Proteine durch die Bindung an das Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergens.

## 2. Material und Methoden

---

Zunächst werden die Proteine in einem pH-neutralem Sammelgel konzentriert und danach in einem basischen Trenngel separiert.

Vor der Verwendung der Proteine mussten diese letztmalig aufbereitet werden. Hierfür wurden die Proben 1:1 mit dem NuPAGE® 2x LDS *sample buffer* versetzt und anschließend für 5 Min. bei 95 °C und 800 rpm im Thermomixer denaturiert.

Die Gele sind entsprechend der Tabelle 23 hergestellt worden. Die Mini-Protean® III Elektrophorese Apparatur wurde nach Herstelleranweisung aufgebaut. Diese wurde mit 500 ml SDS Elektrophorese Puffer befüllt. Die Taschen des Polyacrylamid-Gels wurden mit 40 µg der Proben und dem Molekularmassemarker (peqGOLD Protein-Marker V) beladen. Die Elektrophorese wurde für 30 Min. bei 80 V und für weitere 60 Min. bei 100 V durchgeführt.

Tabelle 23: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Zusammensetzung für die Herstellung von 2 Gelen

Material	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %
ProSieve® 50 Gel Acrylamid Lösung	0,75 ml	2,3 ml
Lösung B	-	2,8 ml
Lösung C	75 µl	110 µl
Lösung D	1,9 ml	-
dd H <sub>2</sub> O	5 ml	5,7 ml
TEMED	22,5 µl	20 µl
APS 10 %	37 µl	37 µl

### 2.2.3.5 Western Blot

Die Western Blot Methode wird verwendet, um Proteine detektieren zu können. Dies geschieht mithilfe hydrophober Wechselwirkungen. Dabei migrieren die bereits nach Größe aufgetrennten Proteine, durch Erzeugen eines elektrischen Feldes, von dem Trenngel auf eine PVDF-Membran (Immobilon®-P Membrane, Millipore, USA). Für die Durchführung wurde hier ein sogenanntes *tank-blot*-System Mini Trans-Blot® *Electrophoretic Transfer Cell* verwendet. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung für 30 - 60 Sek. in Methanol geschwenkt, kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für weitere 5 Min. in TBST geschwenkt. Anschließend wurde der *Blot* in folgender Reihenfolge zusammengebaut: ein Schaumstoffschwamm, 3 Lagen Filterpapier (Whatman, Schleicher und Schuell), Trenngel, PVDF-Membran, 3 Lagen Filterpapier und 1 Schaumstoffschwamm. Sowohl das Filterpapier als auch die Schwämme wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Das *Blotten* erfolgte für ca. 60 Min. bei 100 V.

### 2.2.3.6 Detektion, Visualisierung und Auswertung

Nach dem Transfer der Proteine wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran mithilfe des hergestellten Blockierungsreagenzes (siehe Kapitel 2.1.4) saturiert. Bei RT

(Raumtemperatur) wurde das in TBST gelöste Magermilchpulver für 1 Stunde auf die Membran gegeben. Die Inkubation, mit dem in TBST verdünnten Primärantikörper (siehe Tabelle 2.1.9), erfolgte über Nacht bei 4 °C. Der überschüssige Primärantikörper wurde vier Mal für 15 Min. in TBST abgewaschen. Jetzt wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper in entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 2.1.9) hinzugefügt. Die Antikörperbindung erfolgte für 1 Stunde bei RT, woraufhin sich vier 15-minütige TBST-Waschgänge anschlossen. Die Detektion erfolgte mit dem kommerziellen ECL Immobilon® Western (*enhanced chemiluminescent*) Kit. Bei diesem Vorgang wird die Oxidation von Luminol durch die antikörper-gebundene Peroxidase katalysiert. Dadurch wird eine Chemilumineszenz mit einem Maximum von  $\lambda = 430$  nm erzeugt, welche Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm™ MP, GE Healthcare Limited, Österreich) belichtet. Die Exposition erfolgte in einer Röntgenfilmkassette (X-Ray GmbH), die anschließende Entwicklung in einer Dunkelkammer im X-Ray Film Prozessor, SRS-101A. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden diese mittels Kodak Digital Science 1D festgehalten und analysiert.

### 2.2.3.7 Strippen der PVDF-Transfer-Membran

Bevor man den Blot für weitere Proteindetektionen verwendet, muss dieser von den gebundenen Antikörpern gelöst werden. Dies wurde durch eine 15-minütige Inkubation der Membran mit einem *Antibody stripping buffer* erreicht, anschließend wurde die Membran mit destilliertem H<sub>2</sub>O und TBST gewaschen. Für das weitere Procedere wird mit der Blockierungslösung wie in Kapitel 2.2.3.6 verfahren. Jeder Blot wurde für maximal 5 Detektionen verwendet.

### 2.2.4 Dokumentation und statistische Analysen

Die Dokumentation der Daten wurde in den jeweiligen Kapiteln beschrieben, sodass hier von einer erneuten Auflistung abgesehen wird.

Die graphische Erfassung der Ergebnisse erfolgte nach Beendigung aller Versuchsreihen mit der *GraphPad Prism® Software*. Ebenfalls mit diesem Programm durchgeführte statistischen Analysen beruhten auf dem *one-way ANOVA (one-way Analysis of variance)*, gefolgt vom *Student-Newman-Keuls Test*.

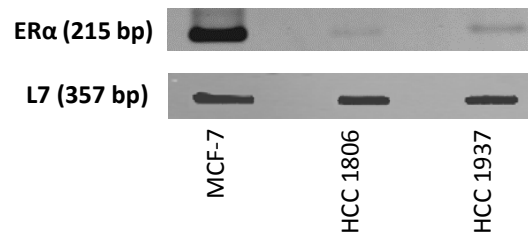
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien

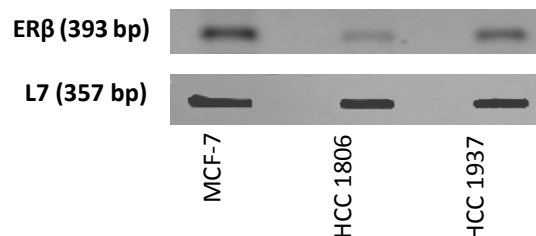
Vor Durchführung der Versuche wurde zunächst die Überprüfung, der für die vorliegende Arbeit, relevanten Rezeptoren erbracht. Die triple-negativen Mammakarzinomzelllinien HCC 1806 und HCC 1937 wurden hinsichtlich der Expression von ER $\alpha$ /ER $\beta$  und GPR 30 untersucht. Dies wurde auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene durchgeführt.

##### 3.1.1 Expression von ER $\alpha$ /ER $\beta$

Laut Definition triple-negativer Zellen exprimieren diese weder ER $\alpha$ /ER $\beta$  noch PR oder HER2. Da diese Eigenschaft grundlegend für die weiteren Versuchsreihen ist, wurde dies zunächst mittels RT-PCR überprüft. Sowohl die HCC 1806- als auch die HCC 1937-Zellen waren negativ für den Estrogenrezeptor  $\alpha$ . Der Estrogenrezeptor  $\beta$  ließ sich in beiden Zelllinien nachweisen. Die Positivkontrolle erfolgte anhand der ER $\alpha$ /ER $\beta$ -positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (siehe Abb. 4 / 5).



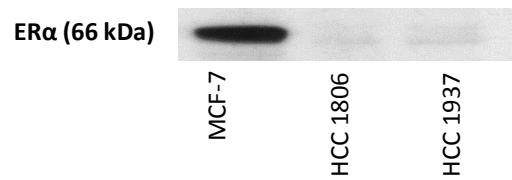
**Abbildung 4:** Darstellung des ER $\alpha$  in HCC 1806 und HCC 1937 auf mRNA-Ebene. Der qualitative Nachweis des ER $\alpha$  erfolgte mittels RT-PCR für die triple-negativen Zelllinien HCC 1806 und HCC 1937. Das PCR-Produkt von ER $\alpha$  hatte die erwartete Größe von 215 bp. Die Kontrolle erfolgte anhand der Estrogenrezeptor-positiven Zelllinie MCF-7 sowie an dem konstitutiv exprimiertem Gen L7.



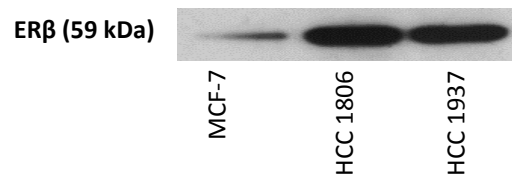
**Abbildung 5:** Darstellung des ER $\beta$  in HCC 1806 und HCC 1937 auf mRNA-Ebene. Die Expression des ER $\beta$  in den Mammakarzinomzelllinien HCC 1806 und HCC 1937 wurde ebenfalls mittels RT-PCR bestimmt. Zur Kontrolle wurde gleichzeitig die ER $\beta$ -mRNA in MCF-7 Zellen nachgewiesen. Das PCR-Produkt von ER $\beta$  hatte eine Größe von 393 bp. Die HCC 1937-Zellen exprimierten mehr ER $\beta$  als die Zelllinie HCC 1806, aber deutlich weniger als die ER $\alpha$ -positive Kontrollzelllinie MCF-7, sowie an dem konstitutiv exprimiertem Gen L7.

### 3. Ergebnisse

Der proteinbiochemische Nachweis der beiden Estrogenrezeptoren wurde mithilfe des Western Blots durchgeführt. Auch hier zeigten HCC 1806 und HCC 1937 keine Expression des ER $\alpha$ . Der ER $\beta$  wurde in beiden Zelllinien exprimiert. Als Kontrolle diente die MCF-7 Zelllinie (siehe Abb. 6 / 7).



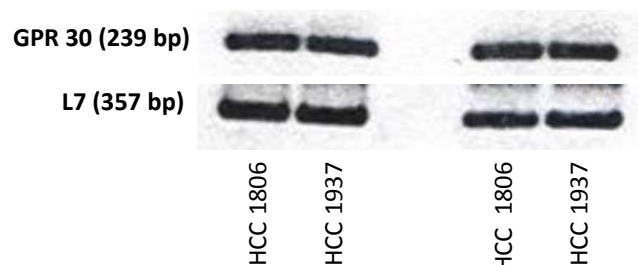
**Abbildung 6: Proteinexpression von ER $\alpha$  in HCC 1806- und HCC 1937-Mammakarzinomzellen.** Die Bestimmung der ER $\alpha$ -Protein-Expression in beiden Zelllinien wurde mit dem Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Die Positivkontrolle erfolgte anhand der MCF-7-Zelllinie, von der bekannt ist, dass sie den Estrogenrezeptor  $\alpha$  bei 66 kDa exprimiert. Der Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurde in keiner der beiden triple-negativen Zelllinien exprimiert.



**Abbildung 7: Proteinexpression von ER $\beta$  in HCC 1806- und HCC 1937-Mammakarzinomzellen.** Der qualitative Nachweis von ER $\beta$  in den TNBC-Zellen HCC 1806/1937 wurde durch das Western-Blot-Verfahren erbracht. Beide Zelllinien zeigten eine starke Expression in Bezug zur MCF-7 Kontrolle. Der ER $\beta$  wurde bei 59 kDa detektiert.

#### 3.1.2 Expression von GPR 30

Die Signaltransduktion des GPR 30 sollte anhand der nachstehenden Versuche erarbeitet werden. Dafür erfolgte zunächst der qualitative Nachweis der mRNA-Expression mithilfe der RT-PCR. Dieser war in beiden TNB- Zelllinien eindeutig positiv. Zur Kontrolle wurde die *housekeeping gene* L7 verwendet (siehe Abb. 8). Beide triple-negativen Zelllinien exprimieren die mRNA für GPR 30 deutlich.



**Abbildung 8: Genexpression von GPR 30 in den Mammakarzinomzellen HCC 1806 und HCC 1937.** Durch Anwendung der RT-PCR wurde der GPR 30 in den beiden Mammakarzinomzelllinien untersucht. In der Abbildung wird der Nachweis in zwei unterschiedlichen Passagen gezeigt.

### 3. Ergebnisse

---

Zuletzt wurde die Proteinexpression des GPR 30 untersucht. Mit dem Western-Blot-Verfahren konnte gezeigt werden, dass sowohl in HCC 1806 als auch in HCC 1937 das GPR 30 Protein vorhanden ist. Der Abgleich wurde an dem Strukturprotein Aktin vorgenommen (siehe Abb. 9).

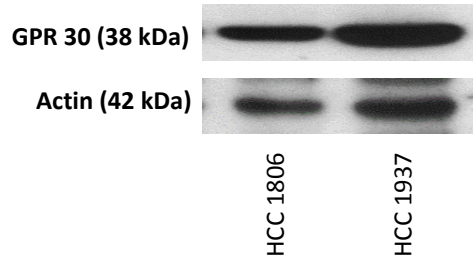


Abbildung 9: Proteinexpression von GPR 30 in den Mammakarzinomzellen HCC 1806 und HCC 1937. Die Expression von GPR 30 auf Proteinebene wurde durch das Western-Blot-Verfahren bestimmt und anhand der Actin-Expression überprüft.

#### 3.2 Einfluss von GPR 30-Liganden auf das Proliferationsverhalten triple-negativer Mammakarzinomzellen

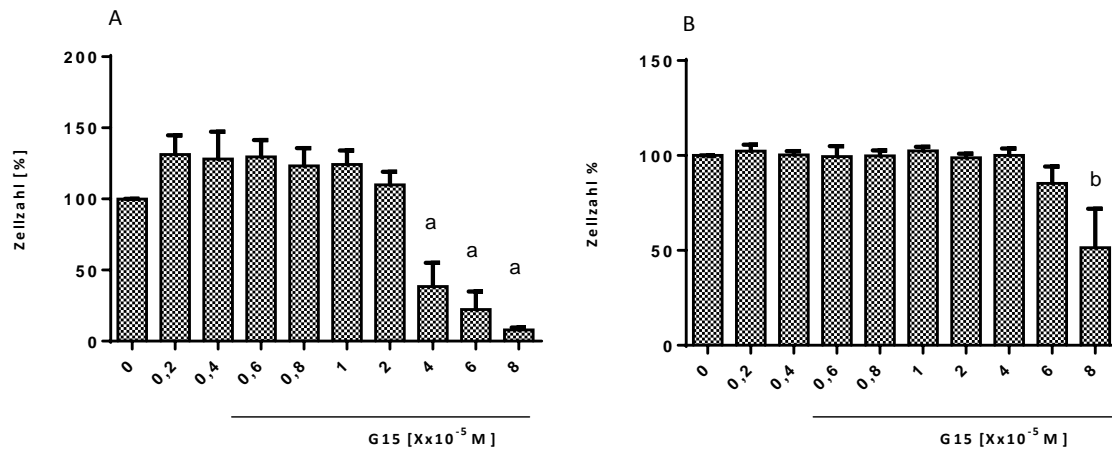
Um das Proliferationsverhalten der Brustkrebszellen im Anschluss an die Behandlung mit GPR 30-Antagonisten auszuwerten, wurde das *alamarBlue*<sup>®</sup> Proliferationsassay verwendet. Beide Zelllinien wurden unabhängig voneinander für 168 Stunden mit Estriol und G15 inkubiert. Die Zellversuche wurden in mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Ansätzen ausgewertet.

##### 3.2.1 Einfluss des GPR 30-Antagonisten G15 auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen

Zunächst erfolgt die Ermittlung der optimalen G15-Konzentration. Hierfür wurden mehrere Versuchsreihen in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen des G15-Gehaltes durchgeführt. Mit der nachfolgend beschriebenen Konzentrationsreihe wurden die eindeutigsten Ergebnisse erzielt (siehe Abb. 10). HCC 1806 und HCC 1937 wurden unter gleichen Versuchsbedingungen kultiviert. Die erreichte Zellzahl nach 168 Stunden Wachstum wurde anhand des Farbumschlages von *alamarBlue* photometrisch gemessen.



### 3. Ergebnisse



**Abbildung 10: Proliferation von HCC 1806 (A) und HCC 1937 (B) in Abhängigkeit von der Hemmung mit dem GPR 30-Antagonisten G15.** Beide Zelllinien wurden mit derselben Konzentrationsreihe für 168 Stunden mit G15 behandelt. Angegeben sind MW ± SEM, Signifikanzen wurden mit der Newman-Keuls-Methode des *one-way*-ANOVA Verfahren ermittelt. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, n=3. a=p<0,001 vs. Kontrolle; b=p<0,01 vs. Kontrolle

In beiden Versuchsreihen wurde eine signifikante Hemmung des Zellwachstums bei der Behandlung mit hohen G15-Konzentrationen in Bezug auf die Kontrolle nachgewiesen.

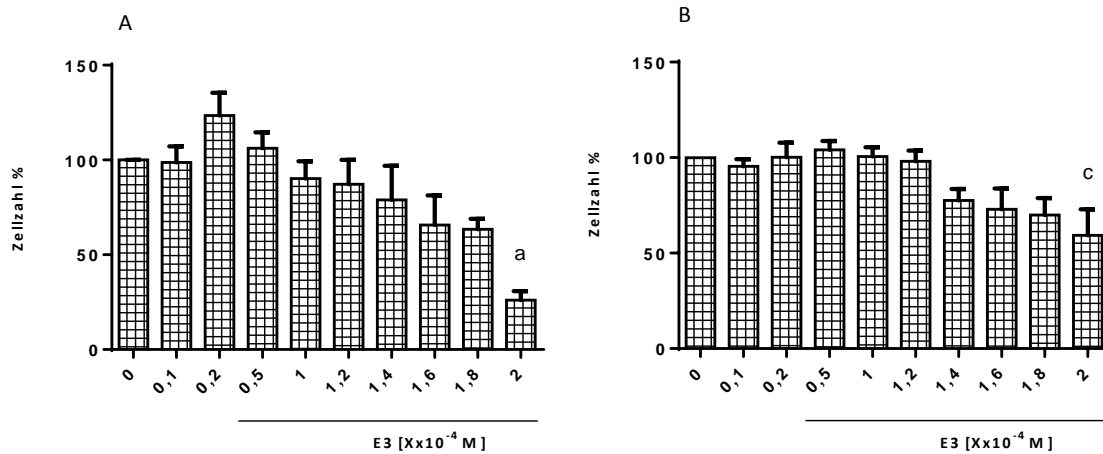
Bei der Auswertung zeigten die HCC 1806-Zellen in den fünf geringeren Konzentrationen von G15 einen Anstieg des Zellwachstums bis maximal  $131 \pm 13,41$  % SEM, n. s. vs. KO (=Kontrolle) bei einer G15-Konzentration von  $[2 \times 10^{-6} \text{ M}]$ . Eine signifikante Hemmung des Zellwachstums war durch die drei höchsten G15-Konzentrationen zu verzeichnen ( $[4 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $38,5 \pm 16,7$  % (p<0,001 vs. KO);  $[6 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $22,3 \pm 12,5$  % (p<0,001 vs. KO);  $[8 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $7,87 \pm 1,74$  % SEM (p<0,001 vs. KO). Alle weiteren Ergebnisse waren nicht signifikant ( $[4 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $128,1 \pm 19,14$  % SEM n. s. vs. KO;  $[6 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $129,6 \pm 11,78$  % SEM n. s. vs. KO;  $[8 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $123,3 \pm 12,34$  % SEM n. s. vs. KO;  $[10^{-5} \text{ M}]$ :  $124,3 \pm 9,83$  % SEM n. s. vs. KO;  $[2 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $110,0 \pm 9,14$  % SEM n. s. vs. KO) (Abb. A).

In der Behandlung der HCC 1937 mit G15 zeigte ausschließlich die höchste G15-Konzentration eine signifikante Abnahme der Zellzahl. Die Hemmung des Zellwachstums wurde mit  $[8 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $51,47 \pm 20,43$  % SEM p<0,01 zur Kontrolle gemessen. Bei allen anderen Konzentrationen wurde kein signifikanter Einfluss des G15 auf das Wachstum dieser Zelllinie beobachtet ( $[2 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $102,4 \pm 3,33$  % SEM n. s. vs. KO;  $[4 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $100,3 \pm 1,96$  % SEM n. s. vs. KO;  $[6 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $99,39 \pm 5,50$  % SEM n. s. vs. KO;  $[8 \times 10^{-6} \text{ M}]$ :  $99,87 \pm 2,78$  % SEM n. s. vs. KO;  $[10^{-5} \text{ M}]$ :  $102,4 \pm 2,21$  % SEM n. s. vs. KO;  $[2 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $98,83 \pm 2,1$  % SEM n. s. vs. KO;  $[4 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $100,1 \pm 3,63$  % SEM n. s. vs. KO;  $[6 \times 10^{-5} \text{ M}]$ :  $85,37 \pm 8,80$  % SEM n. s. vs. KO) (Abb. B).

#### 3.2.2 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol (E3) auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen

Wie oben beschrieben, wurde auch für Estriol der optimale Konzentrationsbereich ermittelt. HCC 1806 zeigten bei der Behandlung mit Estriol einen ähnlichen Verlauf wie bei der Behandlung mit G15. Hier war ein leichter Anstieg der Zellzahl - bei Verwendung geringer Konzentrationen - zu verzeichnen, der sich mit Erhöhung der Konzentration verringerte (siehe Abb. 11).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 11: Proliferation von HCC 1806 (A) und HCC 1937 (B) in Abhängigkeit von der Hemmung mit dem GPR 30-Antagonisten Estriol.** Das Proliferationsassay wurde verwendet, um das Zellwachstum nach Behandlung mit verschiedenen E3-Konzentrationen zu messen. Signifikanzanalysen wurden mit dem im *one-way* Anova verwendeten Newman-Keuls-Verfahren durchgeführt. Die Anzahl der voneinander unabhängigen Versuche betrug mindestens  $n=3$ .

$a=p<0,001$ ;  $c=p<0,05$

([ $10^{-5}$  M]:  $98,7 \pm 8,4$  % SEM n. s. vs. KO; [ $2 \times 10^{-5}$  M]:  $123,5 \pm 11,9$  % SEM n. s. vs. KO; [ $5 \times 10^{-5}$  M]:  $106,2 \pm 8,4$  % SEM n. s. vs. KO; [ $10^{-4}$  M]:  $90,2 \pm 9,1$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,2 \times 10^{-4}$  M]:  $87,2 \pm 12,8$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,4 \times 10^{-4}$  M]:  $78,9 \pm 18,0$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,6 \times 10^{-4}$  M]:  $65,6 \pm 15,6$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,8 \times 10^{-4}$  M]:  $63,3 \pm 5,5$  % SEM n. s. vs. KO). Nur die Maximalkonzentration hatte einen signifikant hemmenden Effekt auf die Proliferation der HCC 1806-Zellen ([ $2 \times 10^{-4}$  M]:  $26,0 \pm 4,7$  % SEM  $p<0,001$ ) (Abb. A).

Im Hinblick auf die Hemmung der HCC 1937-Zelllinie mit Estriol wurden ähnliche Ergebnisse erzielt. Durch die Behandlung mit niedriger E3-Konzentration blieb die Zellzahl relativ konstant ([ $10^{-5}$  M]:  $95,4 \pm 3,6$  % SEM n. s. vs. KO; [ $2 \times 10^{-5}$  M]:  $100,2 \pm 7,6$  % SEM n. s. vs. KO; [ $5 \times 10^{-5}$  M]:  $104,0 \pm 4,7$  % SEM n. s. vs. KO; [ $10^{-4}$  M]:  $100,6 \pm 4,9$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,2 \times 10^{-4}$  M]:  $98,0 \pm 5,6$  % SEM n. s. vs. KO). Ab einer Konzentration von [ $1,4 \times 10^{-4}$  M] Estriol wurde die Proliferation dieser Zelllinie gehemmt. Eine signifikante Hemmung wurde erst durch die Maximalkonzentration erzielt ([ $1,4 \times 10^{-4}$  M]:  $77,6 \pm 6,0$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,6 \times 10^{-4}$  M]:  $72,9 \pm 10,9$  % SEM n. s. vs. KO; [ $1,8 \times 10^{-4}$  M]:  $69,9 \pm 8,7$  % SEM n. s. vs. KO; [ $2 \times 10^{-4}$  M]:  $59,3 \pm 13,5$  % SEM  $p<0,05$ ) (Abb. B).

In beiden Zelllinien ließ sich durch Anwendung der Maximalkonzentration eine signifikant niedrigere Zellzahl in Bezug auf die Kontrolle nachweisen.

### 3.3 Untersuchungen zur GPR 30-induzierten Signaltransduktion in triple-negativen Mammakarzinomzellen

Durch die Durchführung folgender Versuche wurde der Einfluss verschiedener GPR 30-Liganden auf die Signaltransduktion diverser an der Zellaktivität beteiligter Proteine untersucht. Ziel war es, durch die Behandlung mit GPR 30-Antagonisten die Östrogen-Stimulation zu hemmen. Unter Verwendung der in den Proliferationsassays ermittelten G15- / E3-Konzentrationen erfolgte die Zellkultivierung der HCC 1806- und HCC 1937-Zelllinien. Die Auswertung wurde auf proteinbiochemischer Ebene mit dem Western-Blot-Verfahren durchgeführt.

#### 3.3.1 Einfluss von GPR 30-Antagonisten auf die Transaktivierung der Tyrosinkinase c-Src

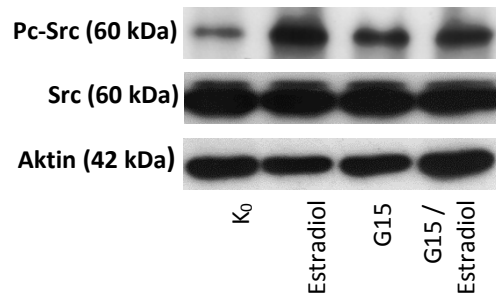
Als Protoonkogen ist die Tyrosinkinase c-Src potenziell an der Entstehung von Karzinom-Vorstufen beteiligt. C-Src wird nach Ligandenbindung an GPR 30 durch den G $\beta$  $\gamma$ -Komplex aktiviert (siehe Einleitung Kapitel 1.3.3). Eine Aktivierung von GPR 30 sollte zu einer Erhöhung der c-Src-Phosphorylierung führen, eine Hemmung von GPR 30 ist durch eine geringere Phosphorylierung von c-Src nachweisbar. Die Kultivierung der Zellen erfolgte mit den GPR 30-Antagonisten G15 / Estriol, gefolgt von einer Stimulation mit Estradiol. Die Stimulation mit Estradiol wurde zunächst in Vorversuchen für 5 Min. bzw. 10 Min. erprobt. Aufgrund eindeutigerer Ergebnisse durch die 10-minütige Stimulation der Zellen wurde diese als Grundlage für die weiteren Versuche genutzt. Die Behandlung mit G15 / E3 erfolgte für 30 Min. Bei der semiquantitativen Bestimmung erfolgte die Quantifizierung des Ausgangs-c-Src-Gehaltes in Relation zu dem im Zytoskelett vorkommenden Strukturprotein Aktin. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches konstitutiv exprimiert wird und unabhängig von äußeren Einflüssen nahezu konstant bleibt. Für diese Versuchsreihe sind jeweils drei unabhängig voneinander kultivierte Passagen zur Durchführung drei verschiedener Versuche verwendet worden.

##### G15: HCC 1806

Mittels Western-Blot-Verfahren wurde der Einfluss von G15 auf die Transaktivierung der Tyrosinkinase c-Src untersucht. Dabei wurde das Verhältnis des phosphorylierten Proteins zum unphosphorylierten Protein bestimmt. Zur Kontrolle wurde ein Aktin-Abgleich durchgeführt.

Die Behandlung der HCC 1806-Zellen mit Estradiol zeigte einen Anstieg des phosphorylierten c-Src. Eine reproduzierbare Hemmung von p-Src durch G15 war weder zur Kontrolle noch zu der Prästimulation mit Estradiol nachweisbar. Die Inhibition durch G15 war sehr divergent. Infolgedessen wurde die Versuchsreihe abgebrochen (siehe Abbildung 12).

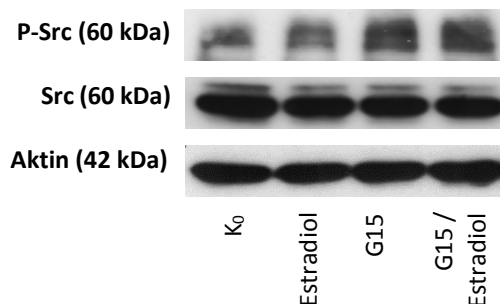
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 12:** Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1806-Zellen. Die Stimulation erfolgte für 30 Min. mit  $10^{-5}$  M G15, anschließend für 10 Min. mit  $10^{-10}$  M Estradiol. Die Kontrolle wurde mit einem äquivalentem Volumen PBS behandelt.

#### G15: HCC 1937

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von c-Src in den HCC 1937-Zellen erzielt. Die alleinige Stimulation mit Estradiol zeigte einen leichten Anstieg in der Phosphorylierung von c-Src. Die Prästimulation mit G15 ließ keine reproduzierbaren Ergebnisse zu. Die Durchführung der Versuche wurde auf wenige, nicht quantifizierbare, Versuche beschränkt (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1937-Zellen. Die HCC 1937 Zellen wurden 30 Min. mit  $10^{-5}$  M G15 und anschließend 10 Minuten mit  $10^{-10}$  M Estradiol inkubiert. Die Western-Blots der Lysate wurden nacheinander mit Antikörpern gegen p-Src, c-Src und Aktin detektiert.

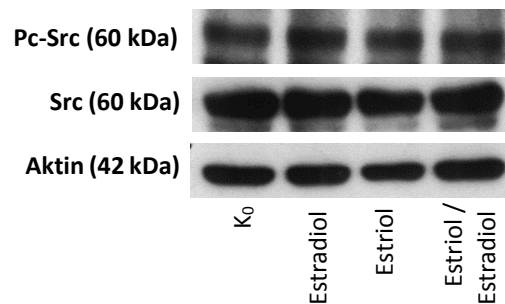
Zur eindeutigen Beurteilung wurde sowohl das phosphorylierte c-Src als auch das unphosphorylierte c-Src bestimmt. Die Kontrolle erfolgte durch das zytosolische Protein Aktin.

#### Estradiol: HCC 1806

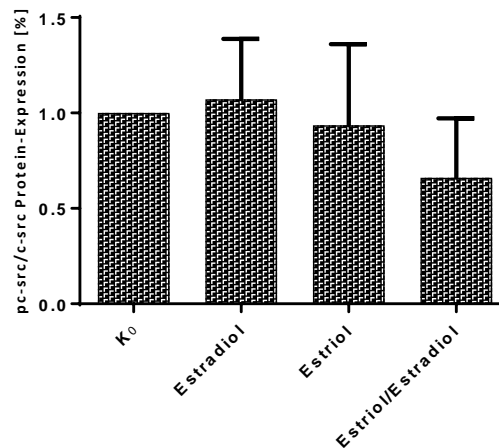
Analog zu den mit G15 durchgeführten Versuchen wurde, unter identischen Versuchsbedingungen, der Einfluss des GPR 30 Antagonisten-Estradiol auf die Proteinaktivierung von c-Src untersucht. Begonnen wurde zum Zeitpunkt  $t_0$  mit der Prästimulation. Diese wurde mit  $[10^{-4}$  M] Estradiol durchgeführt. Zum Zeitpunkt  $t_{30}$  wurden die Zellen weitere 10 Min. mit  $[10^{-10}$  M] Estradiol stimuliert. Das endgültige Ergebnis wurde durch Relation des phosphorylierten / unphosphorylierten Proteins ermittelt.

### 3. Ergebnisse

Die Effekte von Estriol auf die Aktivierung des GPR 30-Signalweges waren aussagekräftiger als die Ergebnisse der G15-Behandlung, jedoch trotzdem nicht signifikant. Die reine Behandlung mit E2 ergab eine leichte Steigerung der pc-Src-Aktivität (E2 [ $10^{-10}$  M]:  $107,1 \pm 31,7$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). In den HCC 1806 TNBC-Zellen wurde eine geringfügige Hemmung der Phosphorylierung von c-Src durch die Inkubation mit [ $10^{-4}$  M] E3 nachgewiesen ( $93,6 \pm 42,4$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Die parallele Behandlung mit Estriol gefolgt von Estradiol zeigte eine geringere Aktivierung als durch die alleinige E2-Behandlung: Estriol hat die Phosphorylierung von c-Src gehemmt. Auch hier konnten keine Signifikanzen erreicht werden ( $t_{0-30}$  E3 [ $10^{-4}$  M] +  $t_{30-40}$  E2 [ $10^{-10}$  M]:  $66,0 \pm 31,1$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ) (siehe Abb. 14 / 15).



**Abbildung 14:** Aktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. Die TNBC-Zellen zeigen eine leichte Aktivierung von c-Src nach der Behandlung mit Estradiol. Die mit Estriol prästimulierten Zellen zeigten eine leichte Reduktion der p-Src-Proteinexpression. Die Bestimmung der Aktinexpression zeigt, dass annähernd gleiche Mengen zellulären Proteins auf das Gel aufgetragen wurden.



**Abbildung 15:** Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. Dargestellt ist der Einfluss der Behandlung mit  $10^{-4}$  M Estriol und  $10^{-10}$  M Estradiol auf das phosphorylierte c-Src. Die aktivierte Tyrosinkinase wurde in Relation gesetzt zu der nicht-aktivierten Tyrosinkinase c-Src. Die Kontrolle wurde mit einer äquivalenten Menge PBS behandelt. Mittelwerte und Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen ( $n=3$ ). Signifikante Unterschiede wurden durch den Newman-Keuls-Test, des *one-way* ANOVA Verfahrens geprüft.

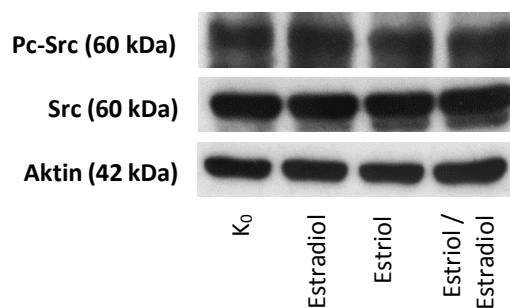
### 3. Ergebnisse

---

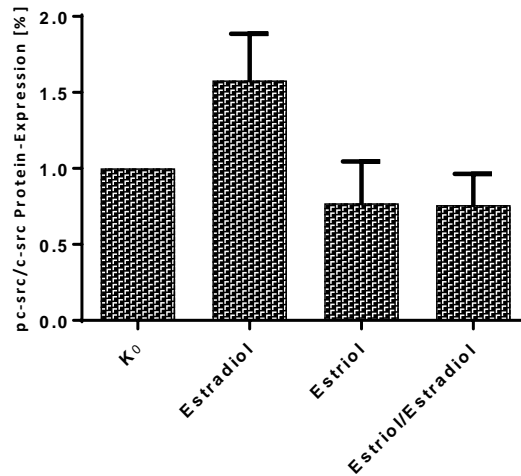
#### Estriol: HCC 1937

Die semiquantitative Bestimmung der c-Src-Aktivierung in der triple-negativen Zelllinien HCC 1937 erfolgte ebenfalls auf proteinbiochemischer Ebene. Der Einfluss von Estradiol wurde mehrfach, unter Verwendung mindestens drei unterschiedlicher Zellpassagen (n=3), in Abhängigkeit der Estriol-Prästimulation untersucht. Hierfür wurden die in hormonfreiem Medium inkubierten TNBC-Zellen in vier Ansätzen mit a) PBS-Kontrolle (unstimuliert), b) 10 Min.  $10^{-7}$ M Estradiol, c) 30 Min. Estriol d) Estriol + 10 Min. Estradiol behandelt. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede in der Proteinexpression von pc-Src/c-Src. Signifikante Veränderungen mit einem p-Wert  $p < 0,05$  vs. Kontrolle wurden nicht erreicht.

Die alleinige Stimulation mit dem wichtigsten, endogen produzierten Östrogen [ $10^{-10}$  M] E2 ließ eine eindeutige Erhöhung der pc-Src-Expression erkennen ( $158,0 \pm 30,5$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Durch die Behandlung mit dem GPR 30-Antagonisten E3 konnte die Aktivierung des Protoonkogens c-Src gegenüber der Kontrolle etwas gehemmt werden ( $[10^{-4}$  M] E3:  $77,0 \pm 27,5$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Die Inkubation der HCC 1937-Zellen mit beiden Östrogenderivaten zeigte vergleichsweise eine nur leichte Senkung der pc-Src-Aktivität zur Kontrolle:  $75,9 \pm 20,5$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ . Wie in Abbildung 16 / 17 zu sehen, ließ sich die Erhöhung der pc-Src-Proteinaktivität durch Estradiol nach vorangegangener Prästimulation mit Estriol eindeutig senken.



**Abbildung 16: Darstellung der Proteinexpression von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurde sowohl pc-Src, c-Src als auch Aktin mit dem Western-Blot-Verfahren dargestellt. Aktin diente als konstitutiv nachweisbares Protein, zur Kontrolle des verwendeten Proteingehaltes.



**Abbildung 17: Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Dargestellt ist die alleinige Behandlung der HCC 1937-Zellen zum Zeitpunkt  $t_{0-30}$  mit  $[10^{-4} \text{ M}]$  E3 bzw.  $t_{30-40}$  mit  $[10^{-10} \text{ M}]$  E2 sowie die Behandlung mit Estriol gefolgt von Estradiol. Errechnet ist die Expression von pc-Src/c-Src im Vergleich zur Kontrolle ( $K_0 = 100 \%$ ). Angegeben sind  $MW \pm SEM$ , minimale Versuchszahl  $n=3$ .

#### 3.3.2 Einfluss von GPR 30-Antagonisten auf die Transaktivierung der mitogen-aktivierten-Proteinkinasen Erk-1 und Erk-2

Erk-1 und Erk-2 gehören als Bestandteile von Phosphorylierungskaskaden zu den MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierten Kinasen) und werden über extrazelluläre Signale aktiviert. Durch die Steuerung der Genexpression auf Transkriptionsebene sind die MAP-Kinasen vor allem an der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Sie bewirken eine Aktivierung von Protoonkogenen, was zur Folge hat, dass die Signaltransduktionswege in 30 % aller Karzinome überexprimiert werden. In den nachstehenden Versuchen soll der Einfluss von GPR 30-Liganden in triple-negativen Mammakarzinomzellen auf die Expression von Erk-1/-2 untersucht werden. Die Behandlung beider TNBC-Zelllinien erfolgte 30 Min. mit den GPR 30-Antagonisten Estriol bzw. G15 sowie anschließend für weitere 10 Min. mit Estradiol. Die Ergebnisse wurden auf proteinbiochemischer Ebene mit dem Western-Blot-Verfahren dargestellt.

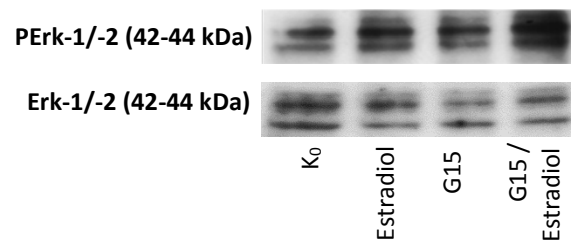
#### G15: HCC 1806

Die Behandlung wurde zunächst mit dem speziell entwickelten GPR 30-Antagonisten G15 durchgeführt. Die verwendete Konzentration  $[10^{-5} \text{ M}]$  wurde anhand des Proliferationsassays ermittelt (siehe Kapitel 3.2.1). Nach der 30-minütigen Prästimulation mit G15 ( $t = 0 - 30$ ) wurden die Zellen für weitere 10 Min. mit  $[10^{-10} \text{ M}]$  Estradiol ( $t = 30 - 40$ ) behandelt. Die HCC 1806- und HCC 1937-Zellen wurden in jeweils vier Ansätzen mit G15 und / oder Estradiol inkubiert. Die Kontrolle erfolgte durch

### 3. Ergebnisse

Hinzugabe einer äquivalenten PBS-Menge. Die Aktivierung der MAP-Kinasen wurde durch Untersuchung des phosphorylierten Proteins in Relation zu dem unphosphorylierten Protein bewertet.

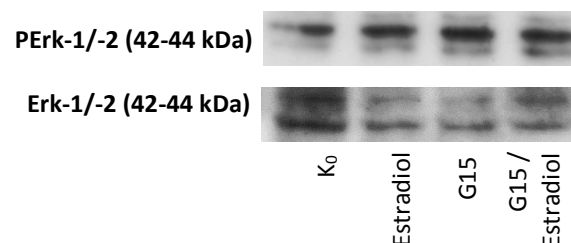
Durch die Stimulation mit Estradiol zeigte sich, wie in Abbildung 18 zu erkennen, ein leichter Anstieg in der Erk-1/2-Aktivität. In den HCC 1806-Zellen zeigte die Hemmung durch den GPR 30-Antagonisten G15 keine reproduzierbare Abnahme der Phosphorylierung von Erk-1/-2 in Bezug auf die Kontrolle ( $K_0$ ). Die Behandlung durch beide Substanzen führte zu keinem aussagekräftigen Ergebnis. Insgesamt waren die Ergebnisse so divergent, dass keine weitere statistische Auswertung erfolgte.



**Abbildung 18:** Aktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1806-Zellen. Mit dem Western-Blot-Verfahren wurden Erk-1/-2 in ihrem phosphorylierten und unphosphorylierten Zustand nachgewiesen. Erk-1 entspricht der oberen Bande, Erk-2 der unteren. Eine Probe wurde mit  $[10^{-10}$  M] Estradiol, eine Probe mit  $[10^{-5}$  M] G15 sowie eine Probe mit beiden Substanzen behandelt. Die Behandlung der Kontrolle erfolgte mit PBS.

#### G15: HCC 1937

In der HCC 1937-Zelllinie ist eine leichte Steigerung der pERK-1/-2-Aktivität nach Stimulation mit Estradiol zu erkennen. Dieser Anstieg war mehrfach nachweisbar. Sowohl die alleinige Hemmung durch  $[10^{-5}$  M] G15 als auch die kombinierte Behandlung mit G15 und  $[10^{-10}$  M] Estradiol zeigten keine einheitlichen Ergebnisse. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit ist auf eine statistische Auswertung verzichtet worden (siehe Abb. 19).



**Abbildung 19:** Aktivierung von ERK-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1937-Zellen. Erk-1/-2 wurden auf Western-Blots dargestellt. Die obere Bande entspricht Erk-1, die untere Erk-2. Die Stimulation der Zellen wurden in der Zellkultur für 30 Min. mit G15 und für 10 Min. mit Estradiol durchgeführt. Die Kontrolle wurde ausschließlich mit PBS behandelt. Das verwendete Medium war hormonfrei.

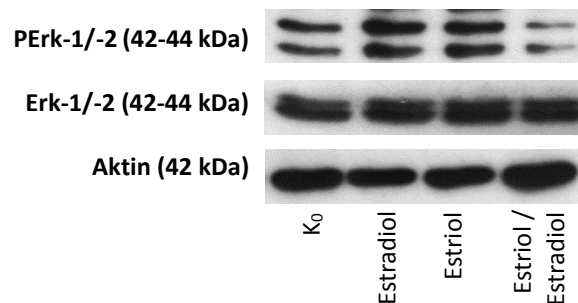


### 3. Ergebnisse

#### Estriol: HCC 1806

Zum Nachweis des Einflusses von Estriol auf die GPR 30-Signaltransduktion wurde die Proteinexpression der MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 nach Hemmung des GPR 30 durch den Antagonisten Estriol untersucht. Das Layout der Versuche war identisch zu den Versuchen mit G15: HCC 1806- und HCC 1937-Zellen wurden 30 Min. ( $t_{0-30}$ ) mit  $[10^{-4}$  M] Estriol vorbehandelt und im Anschluss 10 Min. ( $t_{30-40}$ ) mit  $[10^{-10}$  M] Estradiol behandelt. Für jede Behandlung gab es eine Kontrolle mit einer der vorliegenden Substanzen sowie eine Kontrolle, die ausschließlich mit PBS durchgeführt wurde. Es wurde das aktivierte und das inaktivierte Protein mit dem Western-Blot-Verfahren nachgewiesen.

Bei der Verwendung der HCC 1806-Zellen wurde durch die Stimulation mit Estradiol eine deutliche Aktivitätszunahme von Erk-1: ( $[10^{-10}$  M] E2:  $126,5 \pm 62,0$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ), jedoch nur eine leichte Aktivitätszunahme von Erk-2: ( $[10^{-10}$  M] E2:  $102,9 \pm 39,4$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ) erreicht. Durch die alleinige E3-Behandlung wurde wider Erwarten die Proteinphosphorylierung von Erk-1 aktiviert ( $[10^{-4}$  M] E3:  $134,9 \pm 79,6$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ), Erk-2 zeigte eine leichte Abnahme der Proteinphosphorylierung ( $[10^{-4}$  M] E3:  $40,4 \pm 25,0$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Die initiale Hemmung des GPR 30 mit Estriol verhinderte einen Anstieg der Erk-1/-2-Phosphorylierung durch Estradiol (Erk-1:  $t_{0-30}$  E3  $[10^{-4}$ M] +  $t_{30-40}$  E2  $[10^{-10}$  M]:  $77,6 \pm 41,7$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ; Erk-2:  $t_{0-30}$  E3  $[10^{-4}$ M] +  $t_{30-40}$  E2  $[10^{-10}$  M]:  $31,3 \pm 14,5$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Die Ergebnisse waren nach Prüfung auf einen p-Wert  $p < 0,05$  nicht signifikant (siehe Abbildung 20 / 21).



**Abbildung 20:** Darstellung der Proteinexpression von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. Die Proteinexpression nach Behandlung der HCC 1806-Zellen wurde mittels WesternBlot erfasst. Es wurde sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte MAP-Kinase bestimmt, wobei die obere Bande Erk-1 und die untere Bande Erk-2 zeigt. Der Aktin-Nachweis diente zur Überprüfung des Proteingehaltes.

a

b

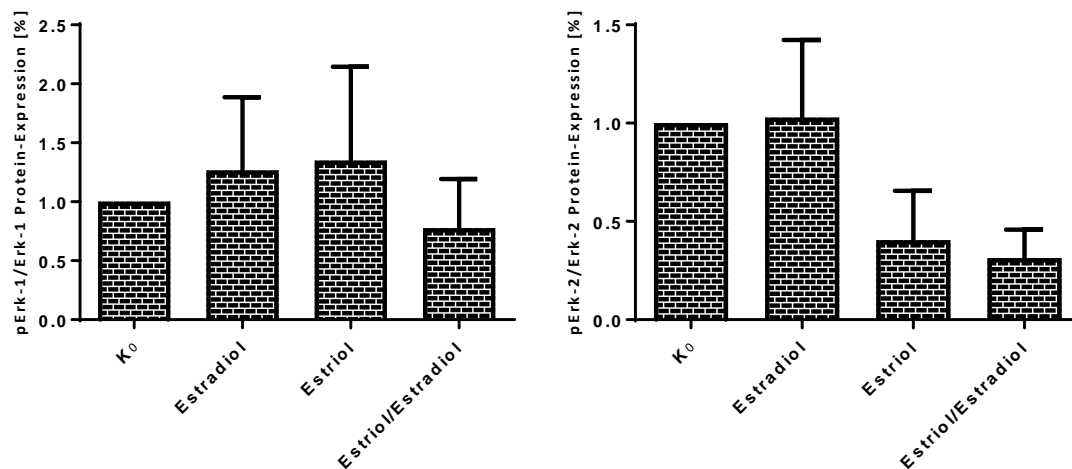
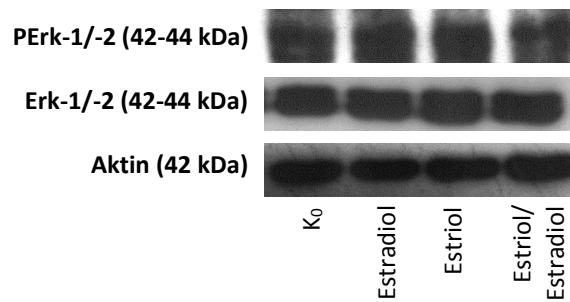


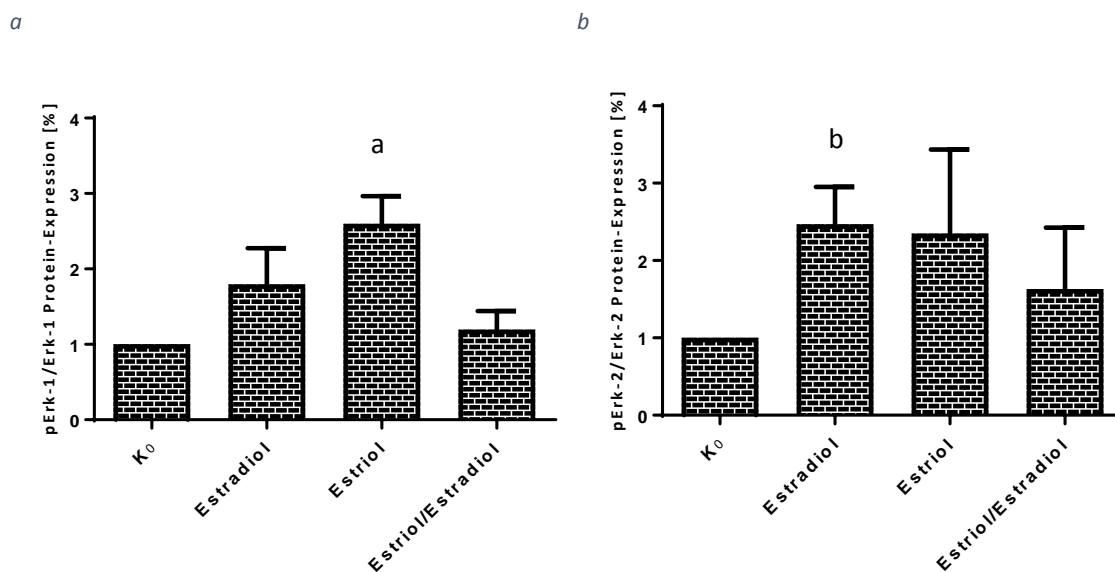
Abbildung 21: Transaktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. (a) Aktivierung von pErk-1/Erk-1 und (b) pErk-2/Erk-2 in Abhängigkeit der Stimulation mit [10<sup>-4</sup> M] Estriol, [10<sup>-10</sup> M] Estradiol und Estriol+Estradiol in gleichbleibender Konzentration. Die Bewertung erfolgte zur Kontrolle K<sub>0</sub>. Angegeben sind MW ± SEM. Die Probenanzahl beträgt mindestens n=3.

Estriol: HCC 1937

Die TNBC-Zellen HCC 1937 ließen bei der Stimulation mit Estradiol eine deutliche Aktivitätssteigerung des phosphorylierten Erk-1 und Erk-2 erkennen, Signifikanzen konnten nicht erreicht werden (Erk-1: [10<sup>-10</sup> M] E2: 179,5 ± 48,0 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>; Erk-2: [10<sup>-10</sup> M] E2: 246,8 ± 48,4 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Paradoxerweise zeigten sie ebenfalls einen Anstieg in der Proteinexpression nach der Behandlung mit Estriol, die für Erk-1 mit einer signifikant nachweisbaren Veränderung zur Kontrolle einherging ([10<sup>-4</sup> M] E3: 259,7 ± 36,6 % SEM s. vs. K<sub>0</sub>, p<0,05). Der Anstieg der Erk-2-Aktivität war nicht signifikant ([10<sup>-4</sup> M] E3: 234,8 ± 108,6 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Trotz der initialen Expressionserhöhung durch die alleinige E3-Behandlung, konnte die Estradiol-induzierte Steigerung der Erk-1/-2-Aktivität durch E3 deutlich gehemmt werden (siehe Abb. 22 / 23). Die Hemmung erfolgte nicht gegenüber der Kontrolle (Erk-1: t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M] + t<sub>30-40</sub> E2 [10<sup>-10</sup> M]: 119,3 ± 24,9 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>; Erk-2: t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M] + t<sub>30-40</sub> E2 [10<sup>-10</sup> M]: 163,3 ± 79,1 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>), sondern gegenüber der E2-Behandlung. Signifikanzen wurden mit der MAP-Kinase Erk-1 in Bezug auf die Estriol-Prästimulation erreicht (t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M] + t<sub>30-40</sub> E2 [10<sup>-10</sup> M]: 119,3 ± 24,9 % s. vs. t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M], p<0,05).



**Abbildung 22:** Darstellung der Proteinexpression von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. Durch die Chemilumineszenz konnten geblottete Proteine mittels Röntgen detektiert werden. Dargestellt sind die Expression von p-Erk, Erk und Aktin nach Behandlung mit Östrogenderivaten. Dabei entspricht die oben liegende Bande Erk-1, die unten Erk-2. Das Aktin diente der Kontrolle.



**Abbildung 23:** Transaktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. HCC 1937-Zellen wurden vor Durchführung des Western-Blot mit unterschiedlichen Substanzen vorbehandelt. Die Stimulation erfolgte mit [10<sup>-4</sup> M] Estriol sowie mit [10<sup>-10</sup> M] Estradiol für eine bestimmte Dauer. Die Ergebnisse wurden anhand der p-Erk/Erk-Proteinexpression gemessen. Angegeben sind MW ± SEM. Für die Errechnung der Signifikanzen wurde die Newman-Keuls Methode, des *one-way* ANOVA angewandt. In a: p<0,05 Estriol vs. K<sub>0</sub>; in b: p<0,05 Estradiol vs. Estriol.

### 3.4 Untersuchungen zur GPR 30-induzierten Signaltransduktion auf genetischer Ebene in triple-negativen Mammakarzinomzellen

Mit den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von GPR 30-Agonisten und -Antagonisten auf die wesentlich an der Zellproliferation und -differenzierung beteiligten Gene untersucht. Es sollte überprüft werden, inwiefern eine Vorbehandlung durch den GPR 30-Antagonisten Estriol die darauffolgende Estradiolstimulation auf genetischer Ebene hemmt. Aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit der Versuche mit G15 wurden die Versuche nur mit Estriol durchgeführt. Die

verwendeten Konzentrationen entsprechen den in den Proliferationsassays ermittelten Konzentrationen mit den größtmöglich erzielten Effekten. Für den semiquantitativen Abgleich wurde das *housekeeping gene* L7 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein ribosomales Gen, welches konstitutiv exprimiert wird und keinerlei regulatorischer Prozesse unterliegt. Somit eignete es sich für die Beurteilung der zu untersuchenden Gene c-Fos und Cyclin D1. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Zellpassagen in jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt.

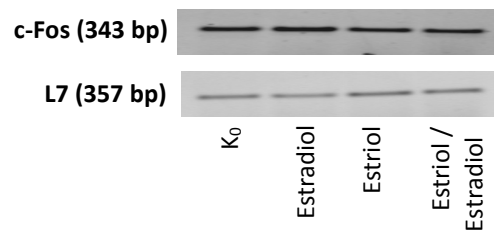
#### 3.4.1 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol auf die mRNA-Expression von c-Fos

Als Protoonkogen gehört c-Fos zu einer häufig untersuchten Zielstruktur in der Carcinogenese. Durch Assoziation mit dem c-Jun-Protein bildet es den Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivatorprotein 1), welcher die Transkription wesentlicher am Zellwachstum beteiligter Gene aktiviert. Es handelt sich um ein *immediate early gene*, welches seine Genexpression kurz nach Reizeinwirkung regulieren kann. Die Hemmung bzw. Stimulation mit Estriol bzw. Estradiol sollte Aufschluss über den Signaltransduktionsweg von GPR 30 geben. Dabei sollte die Estradiol-induzierte Steigerung der c-Fos-Expression durch die Prästimulation mit Estriol verringert werden. Die Behandlung der Zellen erfolgte in hormon-freiem Medium. Beide Östrogenderivate wurden für die Dauer von 30 Minuten angewendet. 2 Proben wurden jeweils nur mit einem der beiden GPR 30-Liganden behandelt. Zur Kontrolle diente eine unbehandelte Kultur, die eine äquivalente Menge an PBS enthielt. Nach der Inkubation wurde die mRNA isoliert und das zu untersuchende Gen mit der RT-PCR und Gelelektrophorese nachgewiesen.

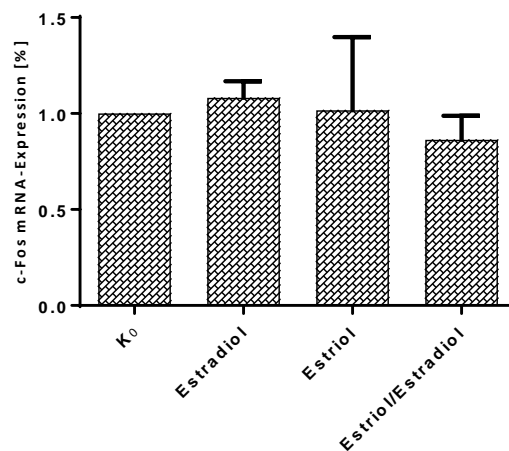
#### HCC 1806

Die triple-negativen HCC 1806-Zellen wurden für jeweils 30 Minuten mit  $[10^4 \text{ M}]$  Estriol und / oder  $[10^{10} \text{ M}]$  Estradiol behandelt. Die Behandlung erfolgte sukzessive. Das nachzuweisende Gen c-Fos wurde durch RT-PCR auf genetischer Ebene untersucht und mit der Gelelektrophorese dargestellt.

Durch die Behandlung mit Estradiol ließ sich, wie erwartet, eine leichte Steigerung der c-Fos-Expression zeigen ( $[10^{-10} \text{ M}]$  E2:  $108,2 \pm 8,6 \%$  SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Die alleinige Hemmung von c-Fos mit Estriol zeigte keinen reproduzierbaren Effekt, einhergehend mit einer hohen Standardabweichung vom Mittelwert ( $[10^{-4} \text{ M}]$  E3:  $101,6 \pm 38,2 \%$  SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Vergleichsweise dazu, war eine Hemmung der c-Fos-Expression durch eine Vorbehandlung mit Estriol zu verzeichnen ( $t_{0-30}$  E3  $[10^{-4} \text{ M}]$  +  $t_{30-60}$  E2  $[10^{-10} \text{ M}]$ ):  $86,3 \pm 12,5 \%$  SEM n. s. vs.  $K_0$ ). (siehe Abb. 24 / 25)



**Abbildung 24:** Darstellung der Genexpression von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. Die Veränderung der c-Fos-Expression nach der Behandlung mit den Östrogenderivaten wurde auf molekularbiologischer Ebene mit der RT-PCR untersucht und durch die Gelelektrophorese erfasst. Die Kontrolle wurde anhand des *housekeeping gene* L7 durchgeführt.



**Abbildung 25:** Genetische Aktivierung von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. Dargestellt ist die mRNA-Expression von c-Fos in HCC 1806-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung. Die Estriol-Stimulation wurde in  $[10^{-4}$  M] Konzentration für 30 Min. durchgeführt. Die Estradiol-Stimulation wurde in  $[10^{-10}$  M] Konzentration für 30 Min. durchgeführt. Die Berechnung erfolgte in Prozent zur Kontrolle. Angegeben sind MW  $\pm$  SEM. Es sind 3 biologische Replikate verwendet worden.

In den dargestellten Versuchen konnten keine Signifikanzen erreicht werden.

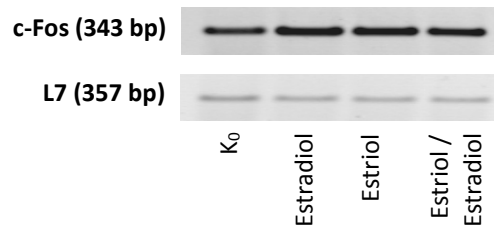
#### HCC 1937

Unter gleichen, oben genannten, Versuchsbedingungen wurden die HCC 1937-Zellen behandelt. Ziel war es, die Unterschiede in der Genexpression nach Behandlung mit Estriol und / oder Estradiol, zu erfassen.

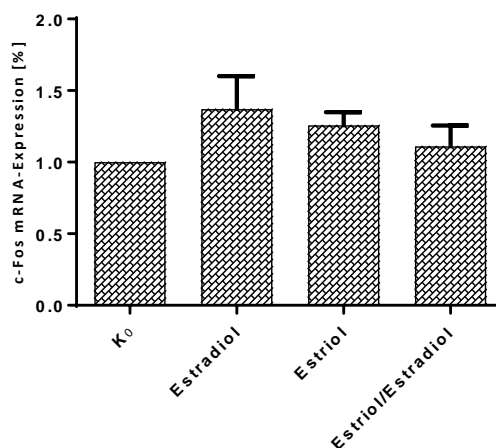
Die Stimulation mit Estradiol führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Erhöhung der c-Fos-Expression ( $[10^{-10}$  M] E2:  $137,0 \pm 23,0$  % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Zudem zeigte sich, analog der Proteinaktivierung von Erk-1/-2 in HCC 1937, wider Erwarten eine Erhöhung der Transkription durch die Behandlung mit dem GPR 30-Antagonisten Estriol ( $[10^{-4}$  M] E3:  $125,7 \pm 9,2$  % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Durch die sukzessive Verwendung beider Substanzen ließ sich ein deutlich abgeschwächeres Signal von c-

### 3. Ergebnisse

Fos gegenüber der alleinigen E2-Stimulation erreichen. Im Vergleich zur Kontrolle erfolgte keine Hemmung der Genexpression ( $t_{0-30}$  E3 [ $10^{-4}$ M] +  $t_{30-60}$  E2 [ $10^{-10}$  M]:  $111,1 \pm 14,4$  % SEM n. s. vs.  $K_0$ ). Eine signifikante Stimulation bzw. Hemmung zur Kontrolle ließ sich mit einem p-Wert  $p < 0,05$  nicht nachweisen (siehe Abb. 26 / 27).



**Abbildung 26: Genexpression von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Zur Erfassung der Unterschiede in der mRNA-Expression von c-Fos nach vorangegangener Behandlung wurden die RT-PCR-Ergebnisse mittels Gelelektrophorese visualisiert. L7 diente, als konstitutiv exprimiertes Gen, der Kontrolle.



**Abbildung 27: Aktivierung der c-Fos-Expression nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Die mRNA-Expression von c-Fos wurde nach 30-minütiger Behandlung mit E3 und E2 untersucht und bezogen auf die Kontrolle ausgewertet. Dargestellt sind MW  $\pm$  SEM in %-Angaben. Die Fallzahl betrug mindestens n=3.

#### 3.4.2 Einfluss des GPR 30-Antagonisten Estriol auf die mRNA-Expression von Cyclin D1

Eine weitere Analyse der Auswirkung von E3 bzw. E2 erfolgte mittels RT-PCR auf Genexpressionsebene, zum Nachweis des Cyclin D1-Gens. Dieses ist maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und kann gemeinsam mit den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK = engl. *cyclin-dependent kinases*) den Übergang der Zelle von der G1- (gap) in die S- (Synthese) Phase vermitteln. Dieser Vorgang wird durch die Transkriptionssteigerung verantwortlicher Gene induziert und führt zur weiteren Zellproliferation. Durch die Hemmung bzw. Stimulation mit oben genannten Östrogenderivaten sollte der Einfluss auf die Genexpression von Cyclin D1 und somit auf die Signaltransduktion von GPR 30 untersucht werden.

### 3. Ergebnisse

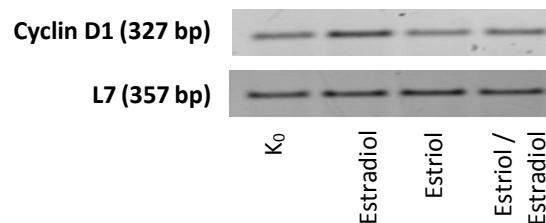
---

Die Zellen wurden sowohl unabhängig als auch sukzessive 30 Min. mit Estriol und Estradiol behandelt. Die Auswertung erfolgte durch den Vergleich mit der Kontrollexpression. Für den semiquantitativen Abgleich wurde L7 verwendet.

#### HCC 1806

Aufgeteilt in vier Proben wurden die HCC 1806 Zellen für die Dauer von 30 Min. jeweils mit  $[10^{-4} \text{ M}]$  Estriol, mit  $[10^{-10} \text{ M}]$  Estradiol bzw. nacheinander mit Estriol ( $t_{0-30}$ ) gefolgt von Estradiol ( $t_{30-60}$ ) behandelt. Mit der RT-PCR wurde die isolierte mRNA des Cyclin D1-Gens amplifiziert und visualisiert.

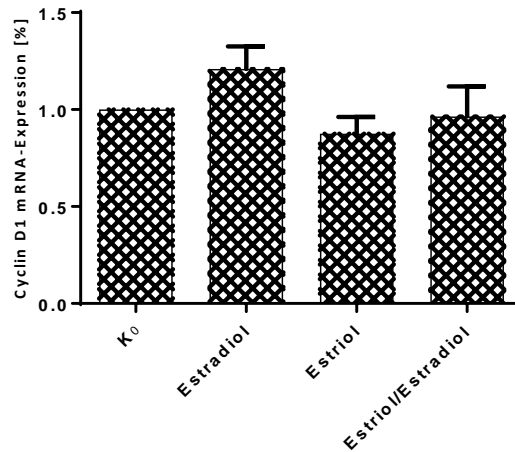
Wie in Abbildung 28 / 29 dargestellt, lassen sich durch die Behandlung eindeutige Veränderungen der Expression von Cyclin D1 erkennen. Es zeigte sich eine Steigerung der Cyclin D1-Transkription durch Stimulation des GPR 30 mit Estradiol ( $[10^{-10} \text{ M}]$  E2:  $120,9 \pm 11,6 \% \text{ SEM n. s. vs. } K_0$ ) sowie eine Abnahme der Cyclin D1-Transkription durch Hemmung des GPR 30 mit Estriol ( $[10^{-4} \text{ M}]$  E3:  $87,6 \pm 8,5 \% \text{ SEM n. s. vs. } K_0$ ). Die Auswirkungen der Estriol-Prästimulation auf die anschließende Estradiol-Behandlung sind vergleichsweise gering zur Kontrolle ausgefallen ( $t_{0-30} \text{ E3 } [10^{-4} \text{ M}] + t_{30-60} \text{ E2 } [10^{-10} \text{ M}]$ :  $96,4 \pm 15,4 \% \text{ SEM n. s. vs. } K_0$ ). Verglichen mit der reinen Estradiol-Stimulation wurde jedoch eine deutliche Abnahme der Cyclin D1-Expression erreicht. Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen ergab jedoch noch keine signifikanten Ergebnisse.



**Abbildung 28: Genexpression von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen.** Die Expression von Cyclin D1, nach Behandlung mit den zwei Östrogenderivaten wurde durch die Gelelektrophorese visualisiert. Die Kontrolle erfolgte anhand des konstitutiv exprimierten L7.

### 3. Ergebnisse

---



**Abbildung 29: Aktivierung der Cyclin D1-Expression nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1805-Zellen.** Die HCC 1806-Zellen wurden für jeweils 30 Minuten mit Estriol, Estradiol und Estriol + Estradiol inkubiert. Für den molekularbiologischen Nachweis von Cyclin D1 wurde die RT-PCR genutzt. Dargestellt sind die Ergebnisse in Relation zur Kontrolle. Angegeben sind MW ± SEM, n=3 biologische Replikate. Signifikanzen konnten nicht nachgewiesen werden.

#### HCC 1937

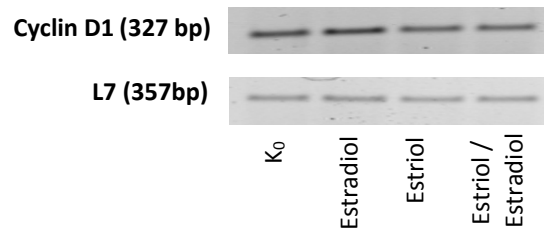
Der Einfluss von [10<sup>-4</sup> M] Estriol und [10<sup>-10</sup> M] Estradiol auf Cyclin D1 wurde auch in den triple-negativen Mammakarzinomzellen HCC 1937 untersucht.

Es zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in der Behandlung der HCC 1806-Zelllinie. Die Behandlung durch Estradiol führte auch hier zu einer Erhöhung der Cyclin D1-Aktivität ([10<sup>-10</sup> M] E2: 125,4 ± 19,4 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Die alleinige Anwendung von Estriol konnte eine geringe Hemmung der Cyclin D1-Expression bewirken ([10<sup>-4</sup> M] E3: 90,4 ± 14,7 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Eine Abnahme der Expression von Cyclin D1 war bei der Behandlung mit Estriol und Estradiol gegenüber der Kontrolle nicht zu verzeichnen (t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M] + t<sub>30-60</sub> E2 [10<sup>-10</sup> M]: 101,4 ± 12,7 % SEM n. s. vs. K<sub>0</sub>). Jedoch ließ sich der Estradiol-Effekt durch die Estriol-Vorbehandlung deutlich senken ([10<sup>-10</sup> M] E2: 125,4 ± 19,4 % SEM v.s. t<sub>0-30</sub> E3 [10<sup>-4</sup>M] + t<sub>30-60</sub> E2 [10<sup>-10</sup> M]: 101,4 ± 12,7 % SEM) (siehe Abbildung 30 / 31). Der Einfluss auf die genetische Expression von Cyclin D1 in HCC 1937 war nicht signifikant.

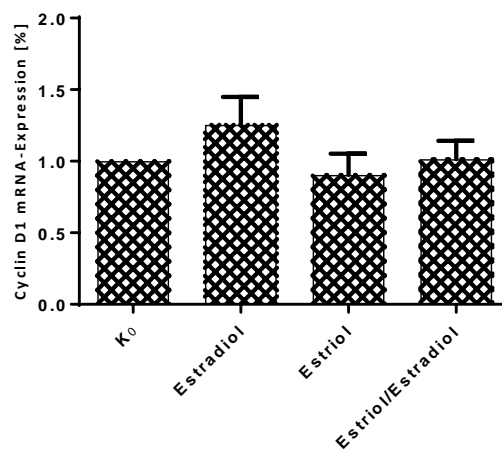


### 3. Ergebnisse

---



**Abbildung 30: Genexpression von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Zu sehen ist die Detektion von Cyclin D1 nach Zellkultivierung, RT-PCR und Gelelektrophorese. Die Kontrolle der Ergebnisse erfolgte anhand L7, dem *housekeeping gene*.



**Abbildung 31: Genetische Aktivierung von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.** Dargestellt sind die Einflüsse der Östrogenbehandlung auf die mRNA-Expression von Cyclin D1 gegenüber der Kontrolle. Es wurde [10<sup>-4</sup> M] Estriol sowie [10<sup>-10</sup> M] Estradiol verwendet. Die Kontrolle wurde ausschließlich mit PBS inkubiert. Angegeben sind MW ± SEM. Die Versuchsanzahl betrug n=3.

### 4. Diskussion

Bis 1996, das Jahr in dem KUIPER et al. einen weiteren, bis zu dem Zeitpunkt gänzlich unentdeckten Estrogenrezeptor beschrieben, war es der Estrogenrezeptor (ER)  $\alpha$ , der im menschlichen System ubiquitär verteilt war und den Effekt von Östrogenen (v.a. 17 $\beta$ -Estradiol) auf reproduktives Gewebe, Knochen einschließlich Knochenmark und das kardiovaskuläre System vermittelte (Filardo 2002). Unabhängig davon, dass der als ER $\beta$  bezeichnete Rezeptor sich in seiner Struktur an der N-terminalen A/B-Domäne um 18 % der Aminosäuren vom ER $\alpha$  nur unwesentlich unterscheidet, scheinen Östrogenderivate nicht mit demselben Effekt an beide Rezeptoren zu binden (Katzenellenbogen et al. 2000). So wurden von TREMBLAY et al. bereits 1997 Unterschiede des therapeutisch verwendeten selektiven Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen, der durch den Verlust seiner agonistischen Wirkung am ER $\beta$  gekennzeichnet ist, herausgearbeitet. Weiterhin war ER $\alpha$  1996 nicht nur alleiniges Substrat in der Übermittlung der Steroidhormonaktivität, es wurde vermutet, er sei Substrat für die schnelle, nicht genomische Aktivität. Gleichzeitig galt er als ein an der Transkription von Genen beteiligter Rezeptor. Zufolgedessen schien es plausibel, als CARMECI et al. (1997) einen weiteren Rezeptor identifizierten, der im Laufe der Jahre nachweislich als verantwortlich für die Entstehung von Tamoxifen-Resistenzen sowie die Einleitung schneller, östrogen-induzierter Signalkaskaden identifiziert wurde. Auch wenn die Aufschlüsselung molekularer Mechanismen des bis dahin als *orphan* (Waise) GPR 30 bezeichneten Rezeptors noch Kontroversen ergibt, bleiben keine Zweifel an der Estrogen-Bindung (Thomas et al. 2005) und dem Tamoxifen-Agonismus (Ignatov et al. 2010; Vivacqua et al. 2006). Folglich wird er jetzt als Estrogenrezeptor tituiert: GPER-1 (*G Protein-coupled estrogen receptor*) (Filardo und Thomas 2012). Die hier erlangten wissenschaftlichen Erkenntnisse, basierend auf der Erarbeitung detaillierter Signaltransduktion des GPR 30, postulieren die Richtigkeit oben aufgeführter Grundlagen und werden in Anlehnung daran diskutiert.

#### 4.1 Zellspezifischer ER $\alpha$ ,- ER $\beta$ - und GPR-30 Nachweis durch die Gen- und Proteindiagnostik

Estrogenrezeptor-, Progesteronrezeptor- und HER-2/neu-negativ ist die zuvor korrekt wiedergegebene Definition triple-negativer Mammakarzinome (TNBC), die als essentiell für den weiteren Versuchsablauf galt, ohne zu wissen, diese Aussage könnte nur eingeschränkt korrekt sein (Dent et al. 2009; Hergueta-Redondo et al. 2008). Sogar in der Empfehlung der *American Society of Clinical Oncology* für die pathologische Einstufung in die Unterkategorie des TNBC ist nur die reine Differenzierung des ER, PR und HER-2 berücksichtigt worden. Ungeachtet des ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Vorkommens gilt die Einteilung durch immunhistochemische Färbung der Zellen für eine Ausprägung von  $\geq 1$  % des

ER, PR und  $\geq 30\%$  des HER2 als positiv (Hammond et al. 2010; Wolff et al. 2007). Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass ca. 42 % der TNBC-Patienten den Estrogenrezeptor  $\beta$  exprimieren (Litwiniuk et al. 2008). Eine Erkenntnis, die sich durch die eigenen gewonnenen Daten an den triple-negativen HCC 1806/1937 Zellen bestätigen ließ. Beide Zelllinien zeigten sowohl auf gendiagnostischer als auch auf proteindiagnostischer Ebene eindeutige Signale für den ER $\beta$ . Obwohl die Signalweiterleitung weitestgehend der des ER $\alpha$  entspricht und beide Rezeptoren in ähnlicher Isoform vorliegen, werden ihnen unterschiedliche biologische Aktivitäten zugesprochen (Kuiper et al. 1997), weshalb es durchaus denkbar wäre, dass sich diese Tatsache auf die Anwendung von 17 $\beta$ -Estradiol, Estriol oder G15 auswirken könnte. Im Jahr 2000 wurde die bereits 1997 von COWLEY et al. beschriebene, durch E2 ausgelöste geringe transkriptionelle Wirkung des ER $\beta$  von PETERSSON et al. nochmals bestätigt. Nichtsdestoweniger gibt es viele Uneinigigkeiten über den ER $\beta$ . GUO et al. (2015) berichteten, ein triple-negatives Mammakarzinom betreffend, von einer negativen Korrelation zwischen dem krankheitsfreien Überleben und der ER $\beta$ -Rezeptorpositivität. Dieser Aussage widersprach die Forschungsgruppe um MAEHLE et al. (2009) nach der statistischen Analyse von 145 Mammakarzinomen. Die Diskordanz agonistisch und antagonistisch ausgelöster Zellaktivität durch denselben Liganden soll im Verlauf erneut zum Anlass genommen werden, um gewonnene Ergebnisse zu diskutieren.

Deutlich wichtiger war es, für die Untersuchung der GPR 30-Aktivität und ihren zellulären Mechanismen, die Abwesenheit des ER $\alpha$  in den untersuchten Zellen sicherzustellen. Wie erwartet ließ sich ein äußerst geringes Signal des Estrogenrezeptor  $\alpha$  nachweisen. Das PCR-Produkt ließ eine minimale Ausprägung des ER $\alpha$  in den HCC 1937-Zellen mehr als in den HCC 1806-Zellen erkennen, wobei dies durchaus mit der bereits erwähnten 1%igen Grenze für die ER-Negativität/-Positivität vereinbar wäre. Letztlich entscheidend ist das durch den Proteinnachweis ermittelte Ergebnis, welches in Gegenüberstellung zur estrogenrezeptorpositiven MCF-7-Zelllinie eindeutig keine Expression für den ER $\alpha$  erkennen lässt. Unabhängig vom vorliegenden Genom spiegeln die Proteine das Ergebnis von Transkription, posttranskriptionaler Modifizierung der mRNA, Translation und posttranslationaler Modifizierung des Proteins bis zum Transport des fertigen Proteins an den Zielort wider. Insgesamt kann eine minimale Interaktion der Restfunktion nicht ausgeschlossen werden, sollte hier aber nicht erheblich zur Beeinflussung der Ergebnisse beitragen.

In den Fokus geraten ist der GPR 30 durch die Hypothese, ein anderer als der bis zu dem Zeitpunkt bekannter Estrogenrezeptor  $\alpha/\beta$  sei maßgeblich an der Ursache der peritherapeutisch entstehenden Resistenz von Tamoxifen beteiligt (Ignatov et al. 2010). MAGGIOLINI et al. (2010) bestätigten dies, indem eine agonistische Tamoxifen-Wirkung über den GPR 30 nachgewiesen wurde und infolgedessen einer von vier estrogenrezeptorpositiven Brustkrebspatienten nicht von einer solchen Therapie

profitiert. Unumgänglich schienen weitere Untersuchungen zu der Ausprägung des neuen Estrogenrezeptors in Mammakarzinomen, die in Verbindung mit einer tendenziell schlechteren Prognose gebracht werden (Sjostrom et al. 2014). Interessant waren hier die durch FILARDO et al. (2006) erhobenen Ergebnisse, in denen die durch Immunhistochemie ermittelte Expression des GPR 30 eine signifikant positive Korrelation zur ER $\alpha$ -Expression 361 maligner Brusttumoren aufwies. Obwohl eine gleichwertige statistische Analyse mit einer Fallzahl von 742 Mammakarzinomen konkordant zu der oben genannten Analyse war (Sjostrom et al. 2014), drängt sich die Frage der, ebenfalls in beiden Publikationen ermittelten, herabgesetzten Prognose auf. So zeigt der GPR 30, trotz seiner Korrelation zu dem ER $\alpha$ , sowohl eine Assoziation zur HER2-Positivität als auch zur Tumorgroße und histologischem Grading. Als potentielle Erklärung für die beobachteten Erkenntnisse wäre eine Interaktion des GPR 30 mit dem ER denkbar, die sogar bereits durch VIVACQUA et al. (2009) in Estrogenrezeptor-positiven Endometrium-, Ovarial- und Mammakarzinom Zellen beschrieben wurde. Der durch GPR 30 ungünstig beeinflusste Krankheitsverlauf stimmte überein mit den Ergebnissen von STEIMAN et al. (2013), die in 17 der 18 immunhistochemischen Färbungen triple-negativer Karzinome den GPR 30 nachwiesen. Die Divergenz der Ergebnisse könnte durch die Auswahl unterschiedlicher Probandengruppen entstanden sein, die sich in der Forschungsgruppe um STEIMAN (2013) auf Patienten bis zum 50. Lebensjahr beschränkte, das TNBC also mit einer höheren Wahrscheinlichkeit vertreten war. In der vorliegenden Arbeit ließ sich, in Übereinstimmung zu FILARDO et al. (2007), der GPR 30 eindeutig mit einer Größe von 44 kDa im Western-Blot-Verfahren identifizieren. In beiden hier verwendeten triple-negativen Zelllinien wurde der GPR 30 sowohl als Gen als auch als Protein nachgewiesen. Dabei wird der Rezeptor vergleichsweise stärker in den HCC 1937- als in den HCC 1806-Zellen exprimiert.

### **4.2 Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen vermittelt durch GPR 30**

#### **4.2.1 Wachstumshemmende Effekte auf TNBC-Zellen nach Behandlung mit G15**

Anknüpfend an die neu gewonnene Erkenntnis der GPR 30-bedingten Tamoxifen Resistenz wurde in diversen Arbeitsgruppen der Effekt auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen durch Rezeptorinteraktion Gegenstand der Diskussion. Unter der Voraussetzung eine Zellproliferation durch GPR 30-Agonisten erzielen zu können, Ergebnisse die ALBANITO et al. 2007 demonstrierten, sollte folglich eine Hemmung des GPR 30 antiproliferative Effekte bewirken. Nicht nur in Mammakarzinomen sondern auch in den hormonabhängigen Ovarial- und Endometriumtumoren wurde eine erhöhte Zellaktivität, induziert durch den GPR 30, gezeigt (Vivacqua et al. 2006; Albanito et al. 2007; Lappano et al. 2012a). Die Proliferationssteigerung, erzielt durch Estradiol und G1, konnte durch ein knock-

down von GPR 30 (Girgert et al. 2012) bzw. durch die Transfektion von GPR 30-Antisense-Oligonukleotiden (Vivacqua et al. 2006) aufgehoben werden, welche wegweisend für die GPR 30-Spezifität ist. Die in dieser Arbeit untersuchte proliferationshemmende Wirkung, des von DENNIS et al. (2009) entwickelten GPR 30-Antagonisten, der keine signifikante Bindung weder zum ER $\alpha$  noch zum ER $\beta$  besitzt, zeigte nur bei der Verwendung äußerst hoher Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf weniger als 50 % der Kontrolle. Die insgesamt erzielte geringe Wirkung von G15 könnte diversen Ursachen zu Grunde liegen. Hierbei könnte vor allem die durch die Arbeitsgruppe um Dennis et al. eigenständig korrigierte Wirkung des GPR 30-Antagonisten G15 eine große Rolle spielen. Zwei Jahre nach der Publikation zu G15 postulierten DENNIS et al. 2011 die weitaus spezifischere Bindung eines neuen GPR 30-Antagonisten G36, welcher die Estrogen- und G1-induzierte Proliferation der Zellen herabsetzt. Dessen beschriebene geringere Affinität zum ER $\alpha$  drängt die Hypothese auf, der zuerst synthetisierte, bisher verwendete Antikörper G15 könnte stimulierende Wirkung auf den ER $\alpha/\beta$  haben und somit die in beiden Zelllinien beobachtete initiale Proliferationssteigerung vermittelt haben. Entsprechende Daten könnten in zukünftigen Arbeiten unter Verwendung des G36 erhoben werden. Hinsichtlich der signifikanten Reduktion der Proliferationsaktivität durch hohe G15 Konzentrationen - sowohl in den HCC 1806- als auch in den HCC 1937-Zellen - lassen sich keine eindeutigen Aussagen treffen. Die plötzliche Differenz der Zellzahl, um mehr als 50 % innerhalb zwei aufeinanderfolgender G15-Konzentrationen, könnte möglicherweise auf rein toxische Effekte zurückzuführen sein. Weitere Erkenntnisse sind in Zusammenhang mit G15 bisher nicht gewonnen worden.

#### 4.2.2 Wachstumshemmende Effekte auf TNBC-Zellen nach Behandlung mit Estriol

Ein identisches Versuchslayout wurde verwendet, um den antiproliferativen Effekt von Estriol in Mammakarzinomzellen zu eruieren. Die bereits protektive Wirkung einer Schwangerschaft - in der Estriol in deutlich höherer Konzentration vorliegt - auf die Inzidenz eines Mammakarzinoms, wurde bereits zu Beginn der Arbeit beschrieben. 2010 demonstrierten in-vitro Studien von LAPPANO et al. die wachstumshemmende Wirkung von Estriol auf die ER-negativen Brustkrebszellen der SKBR3-Zellreihe. LAPPANO et al. (2012b) den GPR 30-Antagonisten MIBE synthetisieren, der das Estradiol-induzierte Wachstum von SKBR3- und MCF-7 Zellen herabsetzte und 2014 bestätigten CHIMENTO et al. die antiproliferative, GPR 30 vermittelte Wirkung durch Verwendung von Oleuropein und Hydroxytyrosol in ER-positiven MCF-7-Mammakarzinomzellen. Auf Grundlage vorangegangener Versuche galt es, in der aktuellen Arbeit bisher nicht erforschte antiproliferative Effekte an Zellreihen, die durch ihre triple-Negativität ein verhältnismäßig schlechteres Outcome haben, durch eine gezielte Hemmung des GPR 30 zu erlangen. Die zu erwartende Reduktion der Zellzahl durch Behandlung mit

Estriol bedurfte Konzentrationen die, begonnen mit  $[1,4 \times 10^{-4} \text{ M}]$  E3, die im menschlichen Körper zur Verfügung stehende Menge weit überschreitet. Sowohl HCC 1806 als auch HCC 1937 reagieren in-vitro ähnlich auf das mit Estriol durchgeführte Proliferationsassay, indem sie einen anfänglichen Anstieg zeigen und in signifikant reduzierter Zellzahl nach Inkubation mit der höchsten Konzentration an Estriol vorliegen. Kritisch zu hinterfragen ist der erneut aufgetretene reproduzierbare Effekt der Proliferationssteigerung, bei dem es sich möglicherweise um die Wirkung exogener Wachstumsfaktoren handelt, die selbst im gestripten Nährmedium nicht vollkommen auszuschließen sind. Konkordant hierzu passt die durch KATZENELLENBOGEN 1984 beschriebene, zeitlich kurz anhaltende und zugleich geringe Wirkung von Estriol, wodurch die fehlende Reaktion durch niedrige Konzentrationen zu begründen wäre. Auch lassen Daten von KUIPER et al. (1997) die Vermutung zu, dass der Estrogenrezeptor  $\beta$  in der Behandlung mit Estriol eine wesentliche Rolle spielen könnte. Die durch die Arbeitsgruppe publizierten Ergebnisse deuten auf eine vergleichsweise hohe Estriol Bindekapazität zum ER $\beta$ , mit nur geringer Affinität zum ER $\alpha$  hin. Im Umkehrschluss wird der hier unweigerlich erhobene Nachweis des ER $\beta$  in beiden TNBC-Zelllinien zu einer möglichen, interferierenden Komponente in der Erarbeitung der Signaltransduktion von Estriol am GPR 30. Somit könnten in der Auswertung der Versuche unterschiedliche ER $\beta$ -Expressionsmuster beider Mammakarzinomzelllinien zum Tragen kommen. Der Wirkung des Estriol am ER $\beta$  und dessen Einfluss auf die Proliferation der Zellen müsste in zukünftigen Arbeiten nachgegangen werden. Auch STEIMAN et al. (2013) äußerten in ihrer umfassenden Ausarbeitung über den GPR 30 mögliche gegenregulatorische Einflüsse durch den ER $\beta$  die es zu erarbeiten gilt.

### 4.3 In vitro: Signaltransduktionsweg des GPR 30 in TNBC-Zellen

Als zentralen Punkt des neuen Estrogenrezeptors - in der Vermittlung transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Antworten - scheint der EGF-Rezeptor Mittelpunkt aktueller Literaturrecherchen zu sein. Unter anderem durch Interaktionen, wie mit dem muskarinergen Acetylcholinrezeptor und dem *platelet-derived growth factor* Rezeptor (PDGF-R), gibt dieser Transduktionsweg Aufschluss über die Aktivierung mitogener Kaskaden, welche Zellproliferation, -differenzierung und -überleben vermitteln (Sledge 2002).

Der GPR 30 soll Wachstum und Migration von hormonsensitiven Tumoren der Brust, des Endometriums sowie des Ovars positiv beeinflussen (Maggiolini et al. 2004; Vivacqua et al. 2006; Albanito et al. 2007). Für die Induktion ebensolcher proliferativer Effekte liegen zum jetzigen Zeitpunkt aus der Literatur Gensignaturen vor, vereinbar mit einer E2-getriggerten Signalkaskade, die sowohl an

ER-negativen als auch an GPR 30-transfektierten triple-negativen Mammakarzinomzellen erkannt wurden.

Die Abbildung zeigt das aus dieser Arbeit hervorgegangene Modell für ein besseres Verständnis der Signaltransduktion (vergleiche Abbildung 32). Eine Ligandenbindung des GPR 30 durch Estrogenderivate führt zu einer Dissoziation der Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, sodass zwei zelluläre Prozesse parallel eingeleitet werden. Zum einen wird durch die G $\beta$ -UE mithilfe von Calcium die Tyrosinkinase Src aktiviert, die zu einer Phosphorylierung des SHC-Adapterproteins führt, woraus eine Freisetzung des heparin-gebundenen EGF (HB-EGF) durch die Matrix-Metalloproteasen resultiert (Razandi et al. 2003; Filardo et al. 2007; Quinn et al. 2009). Gebunden durch das HB-EGF bildet der in TNBC-Zellen übermäßig stark exprimierte EGF-Rezeptor Homo- /Heterodimere, wodurch eine Autophosphorylierung an der SH2-Domäne hervorgerufen wird (Schlessinger 2000). Komplexe mit shc/Grb-2 aktivieren ca. 10-15 Min. nach initialer E2-Stimulation transitorisch sowohl die MAPK, die PI3K als auch die Proteinkinase C, allesamt Proteine die über Transkriptionsfaktoren wie SRF (*serum response factor*) und CREB (*cAMP response element-binding protein*) Signale zur Hochregulation von weiteren Transkriptionsfaktoren wie c-Fos/c-Jun weiterleiten (Daub et al. 1996; Filardo et al. 2000; Kanda und Watanabe 2003; Prossnitz et al. 2008). Cyclin D1 stellt eines der Zielgene dar, welches im Anschluss an die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren vom Nukleus in das Cytoplasma transloziert und den Zellzyklusprogress fördert (Zhang et al. 2005).

Zum anderen führt die G $\alpha$ -UE über eine Aktivierung der Adenylylcyclase, die ATP (Adenosintri-phosphat) zu cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat) umwandelt, zu einer simultanen Freisetzung von Calcium als auch zur Phosphorylierung von CREB durch die PKA.

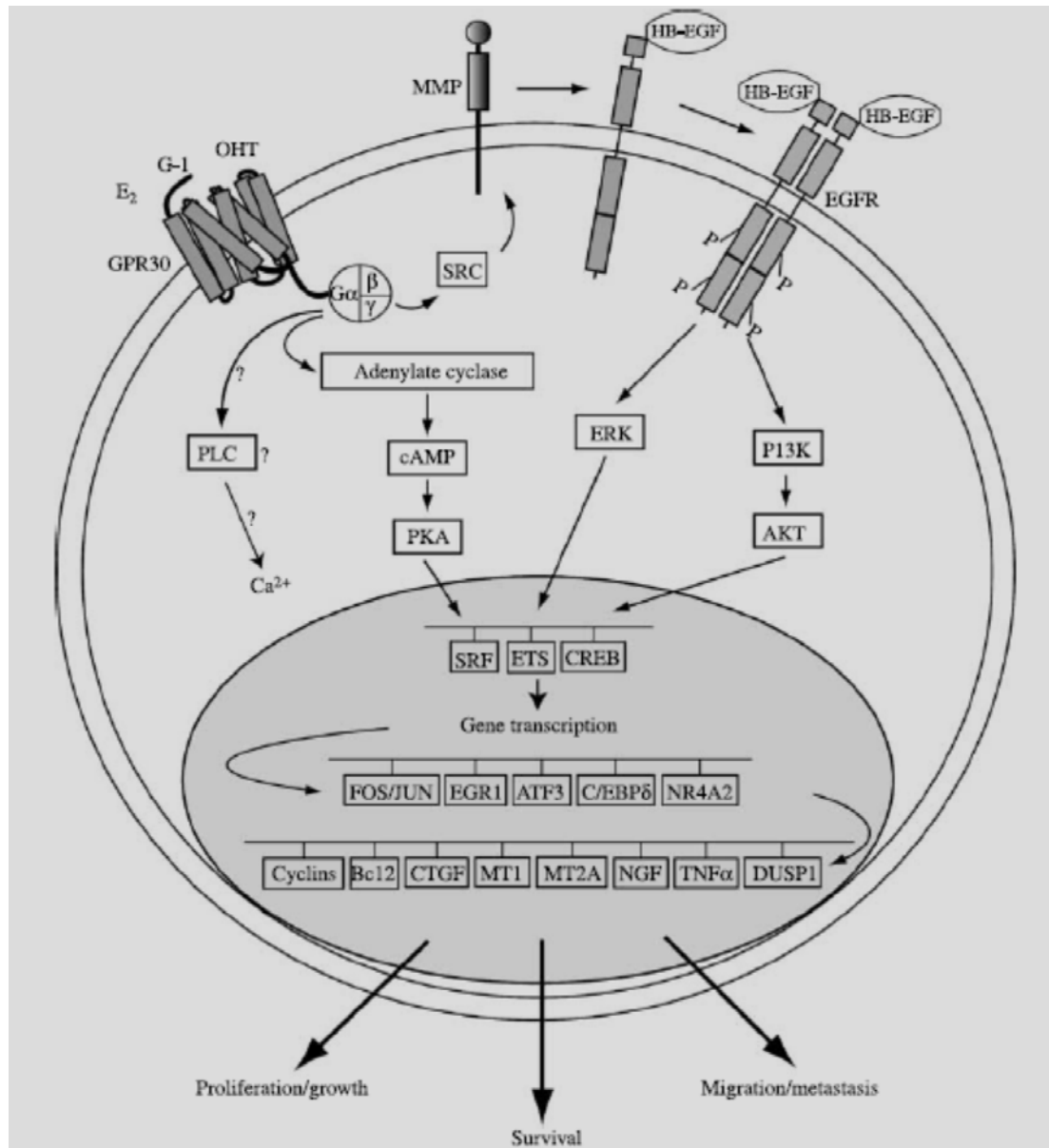


Abbildung 32: Zelluläre Signaltransduktion des GPR 30 (modifiziert nach Maggiolini und Picard 2010, S. 106).

#### 4.3.1 Hintergrund der Versuchsstruktur

Im Wesentlichen sollen hier alle bezüglich der Signaltransduktion erhobenen Daten in Anbetracht der gewählten Versuchsbedingungen diskutiert werden.

Hierbei scheint die Abfolge der (G15-/E3-) + E<sub>2</sub>-Behandlung grundlegend für die zu erzielenden Effekte zu sein. So wurde bereits durch KRUPNICK und BENOVIC (1998) unterschieden, dass unabhängig von den verwendeten Substanzen, G Proteine durch Agonisten internalisiert und desensibilisiert werden. Im Umkehrschluss würde eine zu Beginn durchgeführte Aktivierung des GPR 30 zu einer signifikanten Abnahme des zur Verfügung stehenden Rezeptors führen. Die sekundäre Inhibition würde dann möglicherweise geringer ausfallen als es die vorliegenden Ergebnisse zulassen. Darüber hinaus werden



Effekte durch einen GPR 30-Antagonisten in den Arbeitsgruppen um DENNIS et al. (2009) und um LAPPANO und SANTOLLA und et al. (2012) nur in Zusammenhang mit einer zusätzlichen Estradiol-Rezeptoraktivierung beschrieben. Sowohl MIBE als auch G15 erreichen durch alleinige Anwendung keine Hemmung der zu untersuchenden Substrate. Von dieser Erkenntnis ausgehend könnte die zusätzliche Estradiol-Behandlung einen, über die erzielte antiproliferative Wirkung hinaus, signifikanten Unterschied der in Kapitel 4.2 erhobenen Ergebnisse erbringen. Das beschriebene Versuchslayout wurde durch VIVACQUA et al. (2006) und LAPPANO und ROSANO und et al. (2012) im Hinblick darauf bereits erfolgreich angewandt. Schlussendlich kommt bei der Behandlung der Zellen auch die Affinität der verwendeten Substanzen zum Tragen, zwischen denen bezüglich des GPR 30 deutliche Differenzen auszumachen sind. Im Allgemeinen konnten FILARDO et al. (2005) mit der Durchführung kompetitiver Bindungsassays eine ausgeprägte E2-Selektivität des GPR 30 beobachten. Andere Hormone zeigten bis zur Konzentration von 1  $\mu$ M keine Affinität zu diesem Rezeptor. Obwohl in den publizierten Daten keine der hier verwendeten Substanzen inbegriffen war, sind diese konkordant zu weiteren Forschungsergebnissen in denen eine Estriol-Affinität von  $<0,1$  % (Thomas et al. 2005) und eine G15-Affinität von 15 % (Dennis et al. 2009) zum GPR 30, verglichen mit der E2-Affinität, beschrieben wurde. Unklar ist, inwiefern die getrennt voneinander untersuchten Substanzen in ihrer Affinität miteinander verglichen werden können. Nichtsdestotrotz sind die hier gewonnenen Antworten von ERK/Src/c-Fos/Cyclin D1 - nach der Antagonisierung des GPR 30 mittels Estriol und G15 - vereinbar mit den zuvor genannten Erkenntnissen. Insgesamt wurde in der hier vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von G15 keine vergleichbare, der von DENNIS et al. 2009 postulierten, Reduktion der Proteinexpression erreicht. Unter diesen Umständen ist aufgrund der hohen Standardabweichung und der mangelnden Reproduzierbarkeit diese ursprünglich festgesetzte Versuchsreihe nicht zu Ende geführt worden. Die Bedeutung von G15 als Hemmstoff für GPR 30 hat beträchtlich an Stellenwert verloren, zumal nicht nur LAPPANO und ROSANO und et al. (2012) keinen Effekt auf die untersuchten Zielgene wie c-fos/ATF3 und CTGF erfasste, sondern auch die Entwickler des G15 2011 eine neu synthetisierte Substanz mit deutlich besseren Eigenschaften vorstellten (Dennis et al. 2011).

Im direkten Vergleich ließ die Behandlung mit Estriol eindeutiger Aussagen zu. Auch wenn die Ergebnisse zum Teil differierend ausfielen, so ist eine deutliche Senkung der Protein- und Genexpression nach einer Kombinationsbehandlung mit E2/E3 entweder gegenüber der Kontrolle oder gegenüber der alleinigen Stimulation mit E2 nachzuweisen. Demnach ist ein inhibitorischer Effekt durch Estriol erkennbar. Jedoch sollte zur Diskussion gestellt werden inwiefern die Substanz - dessen Affinität vermeintlich zu gering sei, um Estradiol vom Rezeptor zu verdrängen - durch eine potentere Substanz zu ersetzen wäre (Thomas et al. 2005).

Eine weitere, nicht von der Hand zu weisende Fragestellung hinsichtlich des Versuchslayouts tritt auf bei Beurteilung der optimalen Konzentration der Estradiol-Behandlung. Die von KUIPER et al. (1997) und BARKHEM et al. (1998) publizierten Daten lassen die Vermutung zu das größtmögliche Wirkungsspektrum ließe sich mit einer 100 nanomolaren E2-Lösung erreichen, abweichend von der hier verwendeten 0,1 nanomolaren Lösung. Ergänzend sei erwähnt, dass diese Angaben zur Estradiol-Konzentration für die Stimulation des ER $\alpha$ / $\beta$  gemacht wurden und möglicherweise nicht deckungsgleich für den GPR 30 verwendet werden sollten. Unter Berücksichtigung oben genannter Erkenntnisse würde eine effizientere GPR 30-Aktivierung durch eine höhere E2-Konzentration eine insgesamt deutlichere Hemmung der GPR 30-Signaltransduktion hervorrufen. Bei den hier erhobenen Daten wurde grundsätzlich eine Erhöhung der exprimierten Gene nach E2-Behandlung beobachtet. Dabei konnten jedoch nicht immer Signifikanzen festgestellt werden.

### 4.3.2 GPR 30-vermittelte Effekte auf die Proteine EGFR, Src, ERK und die Gene c-Fos, Cyclin D1

Die oben beschriebene Signalkaskade gewinnt maßgeblich an Bedeutung durch die Überexpression des EGF-Rezeptors (Her-1) in TNBC (Nielsen et al. 2004). Zugleich steht, Vivacqua zufolge, das Vorhandensein des EGFR in triple-negativen Brusttumoren in engem Zusammenhang mit der Überexpression des GPR 30 (Vivacqua et al. 2009). Umso wichtiger erschien es für die vollständige Erschließung des Signalweges den Nachweis des *Epidermal Growth Factor Receptors* zu erbringen sowie dessen estradiol- und estriolabhängige Veränderungen nachzuvollziehen. In den durchgeführten Versuchen gestaltete sich die Detektion des phosphorylierten EGFR als erschwert. Effekte hinsichtlich der E2/E3-Behandlung waren mit dem Western-Blot-Verfahren nicht darstellbar. Dieser Umstand könnte am ehesten einem hohen Rezeptormolekulargewicht sowie mangelnder Antikörperqualität trotz Anwendung von Präparaten diverser Hersteller geschuldet sein. Nichtsdestoweniger wurde die aufgestellte Hypothese der durch Estradiol hervorgerufenen p-EGFR-Expressionssteigerung durch andere Arbeiten bestätigt. Anhand der von GIRGERT et al. (2017) erhobenen Daten erfahren die zuvor mit Estradiol stimulierten HCC 1806-Zellen eine vollständige Hemmung der EGFR-Aktivierung durch die Behandlung mit Gefitinib, einem Antagonisten des *Epidermal Growth Factor Receptors*. Parallel dazu wurde beschrieben, dass eine Hemmung der initialen Estradiol-getriggerten Zellproliferation von 145 % zu einer 60 %-igen Reduktion des Zellwachstums durch den Rezeptorantagonisten führte. Zusammenfassend ergibt sich, dass hierdurch die Signaltransduktion des GPR 30 über den EGFR bestätigt wird.

##### ERK-1/-2

Da der EGFR nachweislich zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Weges führt, wurde wegen der mangelnden Darstellbarkeit des phosphorylierten EGFR in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung von ERK-1/-2 (dem MAP-Kinase-Weg entsprechend) äquivalent verwendet. Viele der bisher durchgeführten Versuche zur Erarbeitung von ERK-1 und ERK-2 sind an der ER-negativen Brustkrebszelllinie SKBR3 durchgeführt worden, die sich in der Her2-Überexpression von den hier verwendeten TNBC-Tumoren unterscheidet (Albanito et al. 2008; Lappano et al. 2010). Sowohl in den SKBR3-Mammakarzinomzellen als auch in Ovarialtumorzellen konnten ALBANITO et al. 2007 und 2008 bereits erste Ergebnisse zu der GPR 30-spezifischen Signaltransduktion liefern, die durch eine eindeutige Expressionssteigerung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen gekennzeichnet waren. Die Expression und initiale Steigerung der Zellproliferation im Anschluss an die Behandlung mit GPR 30-Agonisten wurde durch EGFR-Inhibitoren fast vollständig aufgehoben, insgesamt Daten, die mit den hiesigen vereinbar sind. Zudem scheint eine zusätzliche Hochregulation der GPR 30-Expression durch eine bisher unbekannte positive Verstärkung stattzufinden, die nach Aktivierung des EGFR und der MAPK beobachtet wurde (Albanito et al. 2008). Ähnliche Resultate mit einem geringfügig anderen Versuchslayout publizierte die Arbeitsgruppe um FILARDO et al. (2000). Mithilfe der Transfektion eines GPR 30-Vektors wurden die zu untersuchenden Mammakarzinomzellen sensibel für die Stimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol. Dies wurde ebenfalls anhand der ERK-1/ERK-2 Expression gemessen.

Bezugnehmend auf die Estradiol-Stimulation von HCC 1806 und HCC 1937 in der aktuellen Arbeit scheinen die Ergebnisse etwas voneinander zu differieren. Während in den HCC 1937-Zellen eine eindeutige Steigerung der ERK-1/2-Aktivierung zu verzeichnen ist, sprechen die HCC 1806-Zellen vergleichsweise gering auf die Behandlung an. Hierzu lassen sich mögliche Parallelen in den von FILARDO et al. (2000) publizierten Messungen finden. In der Datenerhebung der drei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien zeigen die ER $\alpha$ -negativen / ER $\beta$ -positiven MDA-MB-231 Zellen die geringste Antwort auf die 17 $\beta$ -Estradiol-Behandlung. Möglicherweise könnte der hier nachgewiesene Unterschied auf die ER $\beta$ -Ausprägung der drei Zelllinien zurückzuführen sein. So zeigt sich im Western-Blot-Verfahren der eigenen Arbeit in den HCC 1806-Zellen eine höhere Konzentration an ER $\beta$  als in den HCC 1937-Zellen. Um dies zu bestätigen, müssten entsprechende Untersuchungen in zukünftigen Arbeiten vorgenommen werden.

##### Src

Die Tyrosinkinase Src ist an der Weiterleitung der Signale des G<sub>i</sub>-Rezeptors beteiligt. In einer Arbeit von LUTTRELL et al. demonstrierte man 1997 bereits, durch Antagonisierung von Src, eine G-Protein vermittelte EGFR-Phosphorylierung, um die Bindung der c-Src SH2-Domäne an dem EGF-Rezeptor

unterbinden zu können. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde eine direkte Interaktion von Src und EGFR angenommen (Filardo 2002). FILARDO (2002) beschäftigte sich mit eben dieser Fragestellung, wobei deren Daten nicht miteinander übereinstimmten. Der GPR 30 ließ sich in der Signalkaskade oberhalb des Heparin-bindenden EGF lokalisieren. Grundlage dessen war die Herunterregulation von HB-EGF mittels Diphtherietoxin, die zu einer Inhibierung des ERK-Signals führte. Noch aussagekräftiger scheinen Western-Blot-Ergebnisse, in denen eine Hemmung des EGFR durch den Src-Inhibitor PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) bestätigt wurde. Diese Hemmung blieb jedoch aus, wenn die zuvor durchgeführte Stimulation durch den *Epidermal Growth Factor* direkt erfolgte (Filardo et al. 2000). Gleichzeitig haben Antisense-Oligonukleotide der MMP-2 (Matrix-Metalloproteasen) und MMP-9 die E2 induzierte HB-EGF Freisetzung verhindert (Razandi et al. 2003). Die Gesamtheit dieser Daten spiegelt die zuvor beschriebene Signalkaskade wider. Der weitere, spezifische Nachweis in der Tumorentität der triple-negativen Mammakarzinome war bisher nicht beschrieben und sollte hier erbracht werden. Die hier erhobenen Daten steigern eindeutig die Evidenz der Src-Beteiligung bei der Vermittlung von GPR 30-Stimuli am EGF-Rezeptor. Proteinbiochemisch konnte eine Hemmung der agonistischen Wirkung von Estradiol durch Estriol auf die Tyrosinkinase Src bestätigt werden. Wie zu erwarten, ließ sich auch in dieser Versuchsreihe durch Behandlung der HCC 1937-Zellen mit Estradiol ein mit 158 % wesentlich größerer proliferativer Effekt gegenüber einem Effekt von 107,1 % in den HCC 1806-Zellen erzielen. Möglicherweise spielen zellspezifische Unterschiede eine Rolle. Bisher an TNBC-Zellen durchgeführte Versuche stammen von GIRGERT et al. (2012). Die durchgeführte E2-Stimulation von Src wurde nach Anwendung von GPR 30-siRNA weitestgehend aufgehoben. Hierbei handelte es sich um minimal höhere Konzentrationen von Estradiol als die eigenständig verwendeten.

#### C-Fos

Als Teil der AP-1, assoziiert c-Fos mit c-Jun zu einem Heterodimer um als *immediate early gene* (IEG), ohne vorherige Proteinbiosynthese, innerhalb weniger Minuten aktiviert zu werden. Durch die Initiierung der Transkription wird die weitere Proteinbiosynthese eingeleitet. Die Abschaltung des Gens erfolgt unmittelbar im Anschluss und bedarf keiner weiteren Stimuli. Daher erfolgte der Nachweis von c-Fos mittels RT-PCR auf genetischer Ebene. Die besondere Bedeutung von c-Fos ist auf dessen protoonkogene Funktion zurückzuführen. Durch Wachstumsfaktoren und andere extrazelluläre Stimuli erfolgt eine Induktion der MAP-Kinasenkaskade, welche hochkonserviert ist und unter anderem in der Phosphorylierung von AP-1 Mitgliedern wie c-Fos mündet. Dieser Vorgang beinhaltet Zwischenschritte wie die Aktivierung von TCF/Elk1, welches zusammen mit SRF (*serum*

*response factor*) an das *serum response element* (SRE) bindet und zur transkriptionellen Aktivierung von c-Fos führt.

Die hier erlangten Ergebnisse zeigten die zu erwartende Tendenz von c-Fos nach dessen agonistischer Behandlung mit Estradiol sowie dessen antagonistischer Behandlung mit Estriol. Rückblickend fielen die Daten verhältnismäßig zu der Bestimmung von ERK-1/-2 und Src etwas weniger aussagekräftig aus, wobei c-Fos in den HCC 1937-Zellen besser anspricht als in den HCC 1806 Zellen. Einen denkbaren Diskussionsansatz könnte die Eigenschaft des unmittelbaren frühen Gens (IEG) liefern. Gene, die vorübergehend transkribiert werden und eine geringe Halbwertszeit der mRNA aufweisen, könnten sich möglicherweise erschwert nachweisen lassen. Interessanterweise haben LAPPANO und ROSANO und et al. (2012) bei der Induktion von c-Fos ebenfalls eine geringe Wirksamkeit in der Anwendung von Estradiol beobachtet, andere GPR 30-Agonisten waren E2 deutlich überlegen. So konnten für GPER-1 und GPER-2 in einem Assay eine offensichtlich höhere Bindekapazität zu GPR 30 im Vergleich zum 17 $\beta$ -Estradiol nachgewiesen werden. Konkordant zu den eigenen Daten finden sich die ausbleibenden Effekte nach Stimulation von c-Fos mit dem Rezeptorantagonisten G15 wieder. Dennoch verhinderten andere exogen zugeführte Antagonisten wie AG (EGFR Inhibitor) und PD (ERK Inhibitor) den Anstieg von c-Fos und trugen somit zu dem Nachweis einer Beteiligung des EGF-Rezeptors und der MAP-Kinasekaskade in der Signaltransduktion bei (Albanito et al. 2007). Alle in dieser Arbeit beschriebenen vorgenommenen Untersuchungen wurden an der SKBR3-Mammakarzinomzelllinie durchgeführt. Unabhängig davon hat eine weitere Forschungsgruppe sich mit dieser Fragestellung befasst und einen estradiolabhängigen Effekt auf c-Fos sowohl in SKBR3- als auch in MCF-7-Zellen erarbeitet. Die im Anschluss durchgeführte Transfektion von GPR 30-Antisense-Oligonukleotiden hob die Expressionssteigerung von c-Fos vollständig auf (Maggiolini et al. 2004). Ein identisches Versuchslayout wurde von GIRGERT et al. (2012) auf die Expression von c-Fos in HCC 1806-Zellen angewandt. Die erzielten Ergebnisse stimmten mit den oben beschriebenen überein. Nimmt man die Richtigkeit aller Daten an, so ist die Voraussetzung für die Proliferation der Zellen durch die Induktion von c-Fos als Transkriptionsfaktor gegeben.

#### Cyclin D1

Der Abschluss der vorliegenden Forschungsarbeit ist gleichzeitig Knotenpunkt des Zellzyklus und von wesentlicher Bedeutung bei der Progression der Zelle von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase. Die Cyclin-abhängigen Kinasen werden aktiviert, indem sie mit den Cyclinen assoziieren und gemeinsam D-Cdk4/6-Komplexe bilden. Während der wachstumsfaktorinduzierten Synthesephase bedarf die Hochregulierung der Cyclin D1 mRNA-Expression der Aktivierung der Mitogen-Kinasekaskade sowie unmittelbar vorausgehend des Einbeziehens der *immediate-early genes*. Das bedeutet, dass

Transkriptionsänderungen der *late-response genes* wie Cyclin D1 durch *early-response genes* wie c-Fos erfolgen (Herschman 1991; Brown et al. 1998). Darüber hinaus hat man nachweisen können, dass Alterungsprozesse der Zellen nicht nur mit einer verringerten Expression von c-Fos assoziiert sind, sondern auch zu geringeren Cyclin D1-Spiegeln führen (Won et al. 1992). All diese Erkenntnisse zeigen den Stellenwert von Cyclinen bei dem Neuauftreten von Mutationen und daraus resultierenden Karzinomen.

Bezugnehmend auf die durchgeführte Literaturrecherche ist die Erforschung der Regulation von Cyclinen in Abhängigkeit vom G-Protein Rezeptor 30 bisher noch nicht weit fortgeschritten. Zum aktuellen Zeitpunkt liegt jeweils eine Arbeit von ALBANITO et al. (2007) und CHAN et al. (2010) vor, die sich mit diesem Nachweis in anderen Karzinomtypen befasst haben. Einerseits beobachtete die Gruppe um ALBANITO et al. eine durch die GPR 30-Agonisten Estradiol und G1 hervorgerufene Steigerung der Cyclin D1-Expression, andererseits erzielte CHAN et al. konträre Ergebnisse. Sie befassten sich mit der Erforschung der GPR 30-Signaltransduktion an Prostata-Karzinomen im Anschluss an die G1-Stimulation. Paradoxerweise zeigte sich hier eine Senkung der Zellproliferation sowie eine Reduktion der Cyclin D1-Expression und somit ein Zellzyklusarrest in der G<sub>2</sub>-Phase. Ebenfalls durch diese Forschungsgruppe vermutet, wurden Ursachen, die in Zusammenhang mit einer über die durchschnittliche Dauer hinaus stattfindenden pERK-Aktivierung und den dadurch vermittelten apoptotischen Signalen stehen. Zur Bestätigung dessen wären hier weitere Untersuchungen erforderlich. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde Cyclin D1 molekularbiologisch anhand des bereits zuvor angewandten Versuchslayouts nachgewiesen. In den Experimenten zeigte sich ein eindeutiges Herabsetzen der Estradiol-Stimulation durch die vorherige Behandlung mit Estriol. Diese Ergebnisse gelten sowohl für die HCC 1806- als auch die HCC 1937-Zellen, die Unterschiede fielen nur gering aus. Nur Lappano und seine Arbeitsgruppen führten bereits ähnliche Versuche durch. 2012 zeigten sie mit einem GPR 30-Antagonisten (MIBE), einem EGFR-Inhibitor (AG) und einem ERK-Inhibitor (PD) die vollständige Unterbindung der Estradiol hervorgerufenen Cyclin D1-Expressionssteigerung. Diese publizierten Daten wurden an SKBR3- und MCF-7-Mammakarzinomzellen erhoben und stimmen mit den eigenen überein (Lappano et al. 2012a; Lappano et al. 2012b). Insgesamt handelt es sich bei den hier erhobenen Daten um die eindeutigsten Ergebnisse, die sowohl die eigene Hypothese der Doktorarbeit stützen als auch aktuelle Forschungsergebnisse widerspiegeln.

### 4.4. Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit im wesentlichen festgesetzten Ziele, namentlich die Untersuchung des Proliferationsverhaltens und der Signaltransduktion von GPR 30 in triple-negativen Mammakarzinomen, sind erreicht worden und haben wegweisende Erkenntnisse erbracht.

Mithilfe der Durchführung von Proliferationsassays konnte erstmalig ein persistierendes, estriolabhängiges Ansprechen - der eigentlich hormonrezeptornegativen Brustkrebszellen HCC 1806 und HCC 1937 - nachgewiesen werden. Die Ergebnisse ließen eine signifikante Abnahme der Zellzahl nach mehrtägiger Inkubation mit den GPR 30-Antagonisten Estriol und G15 erkennen.

Unter Verwendung der ermittelten idealen Estriolkonzentration gelang es, durch molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden die Weiterleitung von GPR 30-Signalen weiter zu differenzieren und mögliche inhibitorische Effekte von Estriol darzustellen. Bisher durchgeführte Experimente anderer Forschungsgruppen hatten sich mit ähnlichen Fragestellungen befasst, jedoch weder unter Berücksichtigung triple-negativer Brusttumoren noch unter Verwendung des natürlich vorkommenden Hormons Estriol.

In allen durchgeführten Versuchen war die eindeutige Reduktion in der Expression der Zielstrukturen durch Estriol erreicht worden. Die sich auf dem Weg der Signaltransduktion befindlichen Moleküle wie Erk-1/-2, Src, c-Fos und Cyclin D1 sind verantwortlich für den Zellzyklusprogress und ließen sich durch die Hemmung von GPR 30 herunterregulieren. Insgesamt sollte dies Anlass zur weiteren Ausarbeitung an der zielgerichteten Therapie hormonrezeptornegativer Brusttumoren geben, in diesem Fall unter Berücksichtigung des GPR 30. Dabei sollte der Fokus in der Herstellung neuer und höher potenter Wirkstoffe zur GPR 30-Antagonisierung liegen. Der hier zuerst erprobte GPR 30-Antagonist G15 wies kaum reproduzierbare Ergebnisse auf und zeigte eine zu geringe Affinität zum GPR 30, sodass die Wirkung von Estradiol diesem überlegen war. Im Vergleich hierzu ließen sich mit Estriol größere Fortschritte machen. Insgesamt handelt es sich bei den verwendeten Konzentrationen jedoch um Lösungen, die sich an der Grenze zur Löslichkeit befinden. Sie können weder weiter potenziert werden noch *in vivo* als solches verwendet werden.

Im Fazit steigt die Notwendigkeit optimierter GPR 30-Antagonisten, die zukünftig Anlass für *In-vivo*-Untersuchungen sein sollten. Der G-Protein-Rezeptor scheint bereits sorgfältig untersucht. Um im klinischen Alltag einen Stellenwert zu erlangen, sollten in weiteren Forschungsarbeiten Fragen bezüglich seiner Prädiktion und Prognose erarbeitet werden.

### 5. Zusammenfassung

Bei Betrachtung der Gesamtheit aller Mammakarzinome zeichnet sich das TNBC aufgrund seiner Eigenschaft der fehlenden Rezeptoren für Östrogen, Progesteron und des mangelnden Zielmoleküls für den monoklonalen Antikörper Trastuzumab von den anderen Entitäten ab. Auch wenn diese Subgruppe ein gutes Ansprechen auf die Therapie mit Zytostatika besitzt, wird sie mit der höchsten Aggressivität und einer besonders schlechten Prognose in Verbindung gebracht. Für andere Malignome der Brust sind bereits diverse Therapien vorhanden, die eine zielgerichtete Destruktion der Zelle durch Rezeptorbindungen zulassen. Insgesamt erfordern die oben genannten Kriterien die Notwendigkeit neuer Strukturen für eine optimierte Behandlung triple-negativer Karzinome.

Diese Dissertation befasst sich mit einem hormonsensitiven Rezeptor, der vermehrt in TNBC-Zellen exprimiert wird und ebenfalls mit einem schlechteren Outcome assoziiert wird. Dieser inzwischen als GPER (G-Protein-gekoppelter Estrogen-Rezeptor) bezeichnete Rezeptor ist in der Zellmembran lokalisiert und wird mit der Auslösung sowohl typischer hormoninduzierter Signalkaskaden als auch schneller, nicht-genomischer Antworten in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Hemmung des GPR 30 (GPER) durch Estriol in zwei TNBC-Zelllinien untersucht. Hierfür wurde die Zellproliferation nach Antagonisierung des GPR 30 mithilfe des *AlamarBlue*<sup>®</sup> assay bestimmt. Die Signaltransduktion wurde mit der RT-PCR und dem Western-Blot-Verfahren nach Estradiol-/Estriol-Behandlung untersucht. Die dabei untersuchten Gene und Proteine sind durch ihre Beteiligung am Zellzyklusprogress sowie der Zelldifferenzierung bekannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Analysen zeigen in der durch Estriol durchgeführten Hemmung eine signifikante Abnahme der Zellzahl. Weiterhin konnte die in anderen Arbeiten durchgeführte Behandlung von anderen, teilweise hormonrezeptorpositiven (ER-/PR-/Her2-positiv) Mammakarzinomzelllinien in TNBC-Zelllinien bestätigt werden. Anhand der erarbeiteten Zielmoleküle wurde eine aktivierende Wirkung von Estradiol und eine inhibierende Wirkung von Estriol deutlich. Eine Aktivierungskaskade unter Beteiligung der analysierten Strukturen wie ERK/src/c-Fos und Cyclin D1 wird durch Bindung von Estradiol an GPR 30 getriggert und durch Estriol gehemmt.

Sowohl in der heutigen antihormonellen Therapie der Mammakarzinome als auch in der zukünftigen Erarbeitung weiterer *target*-Therapien sollte man sich dieses Wissen zu Nutze machen. Ein signifikanter Vorteil der zielgerichteten Behandlung ergibt sich durch die geringe Toxizität auf gesundes Gewebe.



## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Karzinome vom unspezifischen bzw. spezifischen Typ und die Mischformen gemäß neuer WHO-Klassifikation. ....	- 2 -
Abbildung 2: Ligandenbindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach Horn et al. 2005, S. 343).....	- 9 -
Abbildung 3: Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren. (modifiziert nach Watson 2015, S. 62) .....	- 12 -
Abbildung 4: Darstellung des ER $\alpha$ in HCC 1806 und HCC 1937 auf mRNA-Ebene. ....	- 32 -
Abbildung 5: Darstellung des ER $\beta$ in HCC 1806 und HCC 1937 auf mRNA-Ebene. ....	- 32 -
Abbildung 6: Proteinexpression von ER $\alpha$ in HCC 1806- und HCC 1937-Mammakarzinomzellen. ....	- 33 -
Abbildung 7: Proteinexpression von ER $\beta$ in HCC 1806- und HCC 1937-Mammakarzinomzellen. ....	- 33 -
Abbildung 8: Genexpression von GPR 30 in den Mammakarzinomzellen HCC 1806 und HCC 1937. ....	- 33 -
Abbildung 9: Proteinexpression von GPR 30 in den Mammakarzinomzellen HCC 1806 und HCC 1937. ....	- 34 -
Abbildung 10: Proliferation von HCC 1806 (A) und HCC 1937 (B) in Abhängigkeit von der Hemmung mit dem GPR 30 Antagonisten G15.....	- 35 -
Abbildung 11: Proliferation von HCC 1806 (A) und HCC 1937 (B) in Abhängigkeit von der Hemmung mit dem GPR 30-Antagonisten Estriol.....	- 36 -
Abbildung 12: Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1806-Zellen. ....	- 38 -
Abbildung 13: Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1937-Zellen. ....	- 38 -
Abbildung 14: Aktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 39 -
Abbildung 15: Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 39 -
Abbildung 16: Darstellung der Proteinexpression von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 40 -
Abbildung 17: Transaktivierung von c-Src nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 41 -
Abbildung 18: Aktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1806-Zellen. ....	- 42 -
Abbildung 19: Aktivierung von ERK-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und G15 in HCC 1937-Zellen. ....	- 42 -
Abbildung 20: Darstellung der Proteinexpression von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 43 -
Abbildung 21: Transaktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 44 -
Abbildung 22: Darstellung der Proteinexpression von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 45 -
Abbildung 23: Transaktivierung von Erk-1/-2 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 45 -
Abbildung 24: Darstellung der Genexpression von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 47 -

Abbildung 25: Genetische Aktivierung von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen.....	- 47 -
Abbildung 26: Genexpression von c-Fos nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 48 -
Abbildung 27: Aktivierung der c-Fos Expression nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.....	- 48 -
Abbildung 28: Genexpression von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1806-Zellen. ....	- 49 -
Abbildung 29: Aktivierung der Cyclin D1 Expression nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1805-Zellen.....	- 50 -
Abbildung 30: Genexpression von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen. ....	- 51 -
Abbildung 31: Genetische Aktivierung von Cyclin D1 nach Behandlung mit Estradiol und Estriol in HCC 1937-Zellen.....	- 51 -
Abbildung 32: Zelluläre Signaltransduktion des GPR 30 (modifiziert nach Maggiolini und Picard 2010, S. 106).....	- 58 -

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Immunhistochemische Charakterisierung der intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms.....	- 3 -
Tabelle 2: Verwendete Geräte .....	- 16 -
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien .....	- 17 -
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	- 18 -
Tabelle 5: Verwendete Enzyme.....	- 19 -
Tabelle 6: Verwendete Inhibitoren und Größenstandard-Marker.....	- 19 -
Tabelle 7: Verwendete Kulturmedien: Funktion und Zusätze.....	- 19 -
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien: nach Herkunft, Histologie und Rezeptorstatus .....	- 20 -
Tabelle 9: Verwendete Primer für die PCR.....	- 20 -
Tabelle 10: Verwendete Primäantikörper für das Western-Blot-Verfahren .....	- 21 -
Tabelle 11: Verwendete Sekundäantikörper für das Western-Blot-Verfahren .....	- 21 -
Tabelle 12: Verwendete kommerzielle Reaktionssysteme nach Hersteller.....	- 21 -
Tabelle 13: Verwendete Software.....	- 22 -
Tabelle 14: Proliferationsassay: Angabe der Zellzahl pro Well .....	- 23 -
Tabelle 15: Proliferationsassay: Konzentration von E3 und Behandlungszeitpunkt.....	- 24 -
Tabelle 16: Proliferationsassay: Konzentration von G15 und Behandlungszeitpunkt .....	- 24 -
Tabelle 17: RNA-Isolierung: Behandlungszeitpunkte und schematische Darstellung der Wells .....	- 25 -
Tabelle 18: Reverse Transkriptase: Zusammensetzung .....	- 26 -
Tabelle 19: Polymerase-Kettenreaktion: Zusammensetzung .....	- 27 -
Tabelle 20: Polymerase-Kettenreaktion: Programme nach Temperatur, Zeitangabe und Zyklenanzahl .....	- 27 -
Tabelle 21: Proteinisolierung: E2/E3-Konzentration mit Behandlungszeitpunkten .....	- 28 -
Tabelle 22: Proteinisolierung: E2/G15-Konzentration mit Behandlungszeitpunkten.....	- 29 -
Tabelle 23: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Zusammensetzung für die Herstellung von 2 Gelen .....	- 30 -

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AP-1	Aktivator-Protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cREB	<i>CAMP response element binding protein</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAG	Diacylglycerin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E2	17 $\beta$ -Estradiol
E3	Estriol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Östrogenrezeptor
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GPR	G-Protein Rezeptor
Grb-2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRK	<i>G protein-coupled receptor kinase</i>
G1-Phase	<i>gap 1-phase</i>
HB-EGF	Heparin-gebundener EGF
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor 2</i>

IEG	<i>immediate early gene</i>
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Ki-67	Kiel 67
MCF-7	<i>michigan cancer foundation - 7</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MIBE	ethyl 3-[5-(2-ethoxycarbonyl-1-methylvinyl)oxy]-1-methyl-1H-indol-3-yl]but-2-enoate
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTNBC	metastasiertes TNBC
MW	Mittelwert
n.s.	nicht signifikant
PARP-1/-2	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	<i>protein kinase A</i>
PLC	Phospholipase C
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4- <i>d</i> ]pyrimidine
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma-protein</i>
RKI	Robert Koch-Institut
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

SEM	<i>standard error of mean</i>
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
Shc	<i>src homology 2 domain containing</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with tween20</i>
TNBC	<i>triple negative breast cancer</i>
UE	Untereinheit
v/v	<i>volume/volume</i>
vs.	versus
w	<i>with</i>
w/o	<i>without</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 7. Literaturverzeichnis

Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S, et al. (2007): G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 67, 1859-1866

Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, Lappano R, Pandey DP, Picard D, Mauro L, et al. (2008): Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology* 149, 3799-3808

Alousi AA, Jasper JR, Insel PA, Motulsky HJ (1991): Stoichiometry of receptor-Gs-adenylate cyclase interactions. *Faseb j* 5, 2300-2303

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, et al. (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72, 1117-1130

(AWMF:) Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)-Ständige Kommission Leitlinien. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 3.0, Aktualisierung 2012.

Verfügbar: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/032-045OL.html>

Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S (1998): Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 54, 105-112

Baselga J, Gomez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, Kaufman B, Stemmer SM, Pego A, Chan A, et al. (2013): Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 31, 2586-2592

Bloom HJ, Richardson WW (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11, 359-377

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D (2012): Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 13, 790-801

Brown JR, Nigh E, Lee RJ, Ye H, Thompson MA, Saudou F, Pestell RG, Greenberg ME (1998): Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol* 18, 5609-5619

Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, Steger GG, Suter TM, Toi M, Parmar M, et al. (2013): Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14, 933-942

Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, Liu MC, Storniolo AM, Rimawi MF, Forero-Torres A, et al. (2012): TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 30, 2615-2623

Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ, et al. (1997): Identification of a gene (GPR 30) with homology of the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45(3), 607-17

Chan QK, Lam HM, Ng CF, Lee AY, Chan ES, Ng HK, Ho SM, Lau KM (2010): Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest Cell Death. *Differ* 17, 1511-1523

Chimento A, Casaburi I, Rosano C, Avena P, De Luca A, Campana C, Martire E, Santolla MF, Maggiolini M, Pezzi V, et al. (2014): Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 58, 478-489

Clapham DE, Neer EJ (1997): G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 167-203

Clark JH, Paszko Z, Peck EJ, Jr. (1977): Nuclear binding and retention of the receptor estrogen complex: relation to the agonistic and antagonistic properties of estriol. *Endocrinology* 100, 91-96

Cole MP, Jones CT, Todd ID (1971): A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer* 25, 270-275

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, et al. (2008): Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD) *Lancet Oncol* 9, 730-756

Consensus conference. Treatment of early stage breast cancer. National Institutes of Health (1991): *Conn Med* 55, 101-107

Corkery B, Crown J, Clynes M, O'Donovan N (2009): Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 20, 862-867

Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG (1997): Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272, 19858-19862

Dahabreh IJ, Linardou H, Siannis F, Fountzilas G, Murray S (2008): Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist* 13, 620-630



## 7. Literaturverzeichnis

---

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating (2005): Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784-1793

Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A (1996): Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379, 557-560

Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, et al. (2013): Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381, 805-816

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, et al. (2009): In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol* 5, 421-427

Dennis MK, Field AS, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Bologna CG, Oprea TI, Yamaguchi Y, Hayashi S, Sklar LA, et al. (2011): Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127, 358-366

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA (2009): Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer *Breast Cancer. Res Treat* 115, 423-428

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative G (2005): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687-1717

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, et al. (2011): Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-784

Elston CW, Ellis IO (1991): Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19, 403-410

Engelbraaten O, Vollan HK, Borresen-Dale AL (2013): Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *Am J Pathol* 183, 1064-1074

Falkenstein E, Wehling M (2000): Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3, 51-54

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386

Filardo EJ (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, 231-238

Filardo EJ, Thomas P (2005): GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* 16, 362-367

Filardo EJ, Thomas P (2012): Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* 153, 2953-2962

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, 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, 1649-1660

Filardo EJ, Quinn J, Pang Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P (2007): Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148, 3236-3245

Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, Resnick MB, Giri D, DeLellis RA, Steinhoff MM, Sabo E (2006): Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin Cancer Res* 12, 6359-6366

Flower DR (1999): Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1422, 207-234

Gazdar A, Kurvari V, Virmani A, Gollahon L, Sakaguchi M, Westerfield M, Kodagoda D, Stasny V, Cunningham H, Wistubal I, Tomlinson G, Tonk V, Ashfax R, Leitch A, Minna J, Shay J et al. (1998): Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int. J. Cancer* 78, 766-774

Giguere V, Tremblay A, Tremblay GB (1998): Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 63, 335-339

Girgert R, Emons G, Grundker C (2012): Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res Treat* 134, 199-205

Girgert R, Emons G, Grundker C (2014): Inhibition of GPR30 by estriol prevents growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17beta-estradiol. *BMC Cancer* 14, 935

Girgert R, Emons G, Grundker C (2017): Gefitinib inhibits growth of triple-negative breast cancer cells in part by reduction of GPER expression, preventing 17β-Estradiol induced cell growth. *Oncology Reports* 37, 1212-1218

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International agency for research on cancer. (WHO)

Verfügbar: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

Goodwin TM (1999): A role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol* 180, S208-213

Guo L, Zhu Q, Aisimutuola M, Yilamu D, Liu S, Jakulin A (2015): Expression and prognostic value of estrogen receptor beta in patients with triple-negative and triple-positive breast cancer. *Exp Ther Med* 9, 2147-2150

Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S (2010): American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 6, 195-197

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990): Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 4, 2881-2889

Hergueta-Redondo M, Palacios J, Cano A, Moreno-Bueno G (2008): "New" molecular taxonomy in breast cancer. *Clin Transl Oncol* 10, 777-785

Herrmann R, Heck M, Henklein P, Henklein P, Kleuss C, Hofmann KP, Ernst OP (2004): Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* 279, 24283-24290

Herschman HR (1991): Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60, 281-319

Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G: *Biochemie des Menschen*. 3. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Hu DG, Mackenzie PI (2009): Estrogen receptor alpha, fos-related antigen-2, and c-Jun coordinately regulate human UDP glucuronosyltransferase 2B15 and 2B17 expression in response to 17beta-estradiol in MCF-7 cells. *Mol Pharmacol* 76, 425-439

Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T (2010): Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 123, 87-96

Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, Eggemann H, Bischoff J, Semczuk A, Roessner A, Costa SD, Kalinski T (2011): G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 128, 457-466

## 7. Literaturverzeichnis

---

Jacobson HI, Lemanski N, Agarwal A, Narendran A, Turner KE, 2nd, Bennett JA, Andersen TT (2010): A proposed unified mechanism for the reduction of human breast cancer risk by the hormones of pregnancy. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 212-220

Kanda N, Watanabe S (2003): 17Beta-estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Invest Dermatol* 121, 771-780

Kaplan HG, Malmgren JA (2008): Impact of triple negative phenotype on breast cancer prognosis. *Breast J* 14, 456-463

Katzenellenbogen BS (1984): Biology and receptor interactions of estriol and estriol derivatives in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem* 20, 1033-1037

Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA (2000): Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74, 279-285

Kreipe HH, Ahrens P, Christgen M, Lehmann U, Langer F (2010): [Beyond staging, typing and grading. New challenges in breast cancer pathology]. *Pathologe* 31, 54-59

Krupnick JG, Benovic JL (1998): The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-5930

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921

Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Francesco EM, Pezzi V, Maggiolini M (2010): Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 320, 162-170

Lappano R, Rosano C, Santolla MF, Pupo M, De Francesco EM, De Marco P, Ponassi M, Spallarossa A, Ranise A, Maggiolini M (2012a): Two novel GPER agonists induce gene expression changes and growth effects in cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets* 12, 531-542

Lappano R, Santolla MF, Pupo M, Sinicropi MS, Caruso A, Rosano C, Maggiolini M (2012b): MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor alpha and GPER in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 14, R12

Lazennec G, Thomas JA, Katzenellenbogen BS (2001): Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 77, 193-203

Lee JM, Ledermann JA, Kohn EC (2014): PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol* 25, 32-40

Levin ER (2003): Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 17, 309-317

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessy B, Green M, et al. (2008): Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 26, 1275-1281

Litwiniuk MM, Roznowski K, Filas V, Godlewski DD, Stawicka M, Kaleta R, Breborowicz J (2008): Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of BRCA1 mutation carriers. *BMC Cancer* 8, 100

Lund MJ, Trivers KF, Porter PL, Coates RJ, Leyland-Jones B, Brawley OW, Flagg EW, O'Regan RM, Gabram SG, Eley JW (2009): Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA *Breast Cancer Res Treat* 113, 357-370

Luttrell LM (2008): Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39, 239-264

Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ (1997): Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem* 272, 4637-4644

Maehle BO, Collett K, Tretli S, Akslen LA, Grotmol T, et al. (2009): Estrogen receptor beta - an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer? *APMIS* 117, 644-50

Maggiolini M, Picard D (2010): The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J Endocrinol* 204, 105-114

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S (2004): The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem* 279, 27008-27016

Margolin S, Johansson H, Rutqvist LE, Lindblom A, Fornander T (2006): Family history, and impact on clinical presentation and prognosis, in a population-based breast cancer cohort from the Stockholm County. *Fam Cancer* 5, 309-321

## 7. Literaturverzeichnis

---

Mettlin C (1994): The relationship of breast cancer epidemiology to screening recommendations. *Cancer* 74, 228-230

Milligan G, Kostenis E (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S46-55

Mo Z, Liu M, Yang F, Luo H, Li Z, Tu G, Yang G (2013): GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer *Breast Cancer. Res* 15, R114

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL (2001): Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat Med* 7, 552-556

Negro A, Brar BK, Lee KF (2004): Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res* 59, 1-12

Nemere I, Schwartz Z, Pedrozo H, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD (1998): Identification of a membrane receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D3 which mediates rapid activation of protein kinase. *C J Bone Miner Res* 13, 1353-1359

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003): International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 55, 597-606

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, et al. (2004): Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 5367-5374

O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, Miller KD, Rugo HS, Neubauer M, Robert N, Hellerstedt B, Saleh M, Richards P, et al. (2014): Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 32, 3840-3847

Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Taylor C, et al. (2012): Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 379, 432-444

Petrelli F, Coiu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, Barni S (2014): The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis *Breast Cancer Res Treat* 144, 223-232

Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19, 4970-4978

Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM (2013): Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 18, 123-133

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999): EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884-888

Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ (2008): Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 70, 165-190

Quinn JA, Graeber CT, Frackelton AR, Jr., Kim M, Schwarzbauer JE, Filardo EJ (2009): Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30. *Mol Endocrinol* 23, 1052-1064

Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER (2003): Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 278, 2701-2712

(RKI:) Robert-Koch-Institut (2013): *Krebs in Deutschland 2009/ 2010*, 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, Berlin 2013

Rody A, Karn T, Liedtke C, Pusztai L, Ruckhaeberle E, Hanker L, Gaetje R, Solbach C, Ahr A, Metzler D, et al. (2011): A clinically relevant gene signature in triple negative and basal-like breast cancer *Breast Cancer. Res* 13, R97

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363

Schlessinger J (2000): Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225

Shah R, Rosso K, Nathanson SD (2014): Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* 5, 283-298

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A (2014): Cancer statistics, 2014 *CA Cancer J Clin* 64, 9-29

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000): Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541

Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark G, Edge SB, Hayes DF, et al. (2002): Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 3628-3636

Sjostrom M, Hartman L, Grabau D, Fornander T, Malmstrom P, Nordenskjold B, Sgroi DC, Skoog L, Stal O, Leeb-Lundberg LM, et al. (2014): Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145, 61-71

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712

Sledge GW, Jr. (2002): Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. *Semin Oncol* 29, 104-110

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

Steiman J, Peralta EA, Louis S, Kamel O (2013): Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am J Surg* 206, 698-703

Terenius L (1971): Structure-activity relationships of anti-oestrogens with regard to interaction with 17-beta-oestradiol in the mouse uterus and vagina. *Acta Endocrinol (Copenh)* 66, 431-447

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J (2005): Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624-632

Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V (1997): Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 11, 353-365

Tretli S, Haldorsen T, Ottestad L (1990): The effect of pre-morbid height and weight on the survival of breast cancer patients. *Br J Cancer* 62, 299-303

Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M (2006): The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol* 20, 631-646

Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, Fuqua SA, Ando S, Maggiolini M (2009): G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Mol Endocrinol* 23, 1815-1826

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, Blohmer JU, Jackisch C, Paepke S, Gerber B, et al. (2014): Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 15, 747-756

Watson H (2015): Biological membranes. *Essays Biochem.* 59, 43-70



## 7. Literaturverzeichnis

---

WHO (1982). The world Health Organization Histological Typing of Breast Tumors-Second Edition. The World Organization. *Am J Clin Pathol* 78, 806-16

Wittliff JL (1984): Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer* 53, 630-643

Won KA, Xiong Y, Beach D, Gilman MZ (1992): Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9910-9914

Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S, Makris A, Lehmann BD, Chen X, Mayer I, et al. (2013): Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 19, 2723-2733

Zhang H, McElrath T, Tong W, Pollard JW (2005): The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *J Endocrinol* 184, 129-140

## **Danksagung**

Für die Leitung der Arbeit und ständige Betreuung möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. Carsten Gründker danken. Mit der Wahl eines äußerst interessanten Themas habe ich die Möglichkeit erhalten, einen soliden Einblick in die Forschung des Mammakarzinoms zu erhalten.

Weiterhin gilt ein ganz besonderer Dank PD Dr. Rainer Girgert, der mich in der Durchführung der experimentellen Arbeit und in der schriftlichen Niederlegung meiner Ergebnisse pausenlos unterstützt hat. Insbesondere vielen Dank für sein Durchhaltevermögen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Günter Emons für die Gelegenheit, diese Dissertation im Labor der Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe durchführen zu können.

Allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Gynäkologie vielen Dank für die fortwährende Hilfsbereitschaft. Hier möchte ich ebenfalls einen Dank an Dr. Antje Schubert für den wissenschaftlichen und freundschaftlichen Beistand aussprechen.

## Curriculum Vitae

Am 6. Mai 1987 wurde ich als jüngste Tochter meiner Eltern Florentina Filipescu und Dr. Rudolf Filipescu in Bukarest geboren. Mein Vater ist Gynäkologe und meine Mutter Diplominformatikerin. Im 2. Lebensjahr wechselte ich gemeinsam mit meinen Eltern den Wohnort von Rumänien nach Deutschland. Von 1993 bis 1997 besuchte ich die Brüder-Grimm-Grundschule in Oberhausen. Ab der 6. Klasse besuchte ich das Gymnasium Broich in Mülheim an der Ruhr. Nach einem Schüleraustausch 2003-2004 in Shepparton, Australien, habe ich meine weitere Oberstufenzeit auf dem Landfermann Gymnasium in Duisburg absolviert.

Auf diesem erwarb ich im Juni 2006 mit dem Abitur die allgemeine Hochschulreife.

Zum Wintersemester 2006 begann ich den Bachelor-Studiengang Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen. Mit dem Erhalt des Studienplatzes für das Humanmedizinstudium begann ich dieses 2007 an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Im Wintersemester 2007 wechselte ich an die Georg-August-Universität in Göttingen, um mein Humanmedizinstudium hier fortzusetzen. Dort absolvierte ich im März 2013 das Staatsexamen der Humanmedizin.

Im Zeitraum April 2013 bis Dezember 2013 führte ich die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Promotion in der gynäkologischen Abteilung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gründker der Georg-August-Universität durch.

Die Facharztausbildung im Fachgebiet Gynäkologie begann ich im Januar 2014 in der gynäkologischen Praxis Dr. Olbermann & Dr. Filipescu in Oberhausen.

Seit Juli 2014 arbeite ich als Assistenzärztin in der gynäkologischen Abteilung des Elisabeth-Krankenhauses in Essen, Chefarzt Prof. Dr. Niesert.