

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

**Einfluss von ER β -Agonisten auf Wachstum und Invasion
von triple-negativen Mammakarzinomzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Oliver Hinsche
aus
Oldenburg

Göttingen 2015

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

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker (Betreuer)

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. C. Binder (Korreferentin)

III. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. M. Schön(Promotor-Vertreterin)

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Histopathologische Einteilung und Rezeptorstatus	1
1.1.3	Triple-negatives Mammakarzinom	2
1.2	Metastasierung und Invasion.....	3
1.2.1	Prozess der Metastasierung und Invasion	3
1.2.2	Metastasierung des primären Mammakarzinoms.....	3
1.2.3	Metastasierung des TNBC.....	4
1.3	Östrogenrezeptoren.....	5
1.3.1	ER β	5
1.4	SDF-1/CXCR4-System.....	6
1.5	ER β -Agonisten	7
1.5.1	Liquiritigenin	7
1.5.2	ERB-041.....	7
1.6	Therapie des primären Mammakarzinoms.....	8
1.6.1	Therapie des metastasierten Mammakarzinoms.....	8
1.6.2	Therapie des TNBC	9
1.7	Fragestellung.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material	11
2.1.1	Geräte	11
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.3	Chemikalien.....	12
2.1.4	Liquiritigenin und ERB-041	12
2.1.5	Matrigel™ Basalmembranmatrix.....	12
2.1.6	Puffer, Lösungen und weitere Substanzen	12
2.1.7	Kultur- und Einfriermedien	14
2.1.8	Zelllinien	15
2.1.9	Oligonukleotide.....	16
2.1.10	Antikörper.....	16
2.1.11	Kommerzielle Reaktionssysteme	17
2.1.12	Software	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur.....	18
2.2.1.1	Kultivierung und Passagieren der Zellen.....	18
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen	19

2.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	19
2.2.1.4	Behandlung mit ER β -Agonisten.....	20
2.2.1.5	Kokultur	21
2.2.1.6	Proliferationsassay	23
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2.1	RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen	24
2.2.2.2	Quantifizierung der RNA.....	24
2.2.2.3	Reverse Transkription.....	25
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	25
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.2.6	Auswertung	27
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.2.3.1	Zellkultivierung zur Proteingewinnung	28
2.2.3.2	Proteinisolation	28
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.2.3.4	Western Blot.....	31
2.2.3.5	Detektion, Visualisierung und Auswertung	31
2.2.4	Zytologische Färbung	32
2.2.4.1	Immunzytologische Färbung der Zelllinien	32
2.2.4.2	Mikroskopische Auswertung der Kokultur	32
2.3	<i>Scratch-Assay</i>	33
2.3.1	Dokumentation und statische Analysen	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Expression des ER α und ER β	35
3.1.1	mRNA-Expression des ER α und ER β	35
3.1.2	Immunzytochemischer Nachweis des ER α und des ER β	35
3.1.3	Nachweis der Proteinexpression des ER α und ER β	36
3.2	Einfluss von ER β -Agonisten auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur	37
3.2.1	Untersuchung des Invasionsverhaltens der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur.....	37
3.2.2	Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur	39
3.2.3	Einfluss des ER β -Agonisten ERB-041 auf die Invasion der TNBC-Zelllinie HCC1937 in Kokultur	41
3.2.4	Einfluss des ER β -Agonisten ERB-041 auf die Invasion der TNBC-Zelllinie HCC1806 in Kokultur	42
3.3	Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806.....	44

3.4	Einfluss der ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937.....	45
3.4.1	Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937.....	45
3.4.2	Einfluss des ER β -Agonisten ERB-041 auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937.....	46
3.5	Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression	47
4	Diskussion	50
4.1	Expression und Funktion des ER β	50
4.2	Inhibition der Invasion und Migration von kokultivierten TNBC-Zellen.....	50
4.2.1	Inhibition der Invasion durch selektive ER β -Agonisten	50
4.2.2	Inhibition der Migration durch selektive ER β -Agonisten.....	52
4.3	Inhibition der CXCR4-Expression in kokultivierten TNBC-Zellen durch selektive ER β -Agonisten.....	53
4.4	Fazit und Ausblick	55
5	Zusammenfassung	56
6	Anhang	57
6.1	Verzeichnis der Abbildungen	57
6.2	Verzeichnis der Tabellen	59

Literaturverzeichnis

Publikation

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>BReast CAncer 1</i>
BRCA2	<i>BReast CAncer 2</i>
CD-FCS	<i>charcoal dextran-treated FCS</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCR4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonuclein acid</i>)
DNAse I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence reaction</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER α	<i>estrogen-receptor-α</i>
ER β	<i>estrogen-receptor-β</i>
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GnRH	Gonadotropin- <i>Releasing</i> Hormon
Her2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
IMP3	<i>Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3</i>

K	Kontrolle
Ki-67	Kiel-67Antigen
KK	Kokultur
L-Gln	L-Glutamin
L7	<i>housekeeping gene L7</i>
MEM	<i>minimal essential medium</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl durchgeführter Versuche
n.s.	nicht signifikant
p53	Tumorsuppressorgen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chainreaction</i>)
PR	Progesteronrezeptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
SERM	selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (<i>selective estrogen receptor modulators</i>)
Tab.	Tabelle

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	Tween-TBS-Puffer
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X114	1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
v/v	volume/volume
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
w	mit (<i>with</i>)
w/o	ohne (<i>without</i>)
w/v	Gewicht/Volumen (<i>weight/volume</i>)

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom stellt weltweit die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Im Jahr 2008 gab es schätzungsweise 1,4.000.000 neu diagnostizierte Brustkrebsfälle und ungefähr 458.400 Todesfälle weltweit. Damit ordnet sich das Mammakarzinom weltweit an fünfter Stelle der Todesursachen aller Krebserkrankungen ein (Ferlay et al. 2010). In der Bundesrepublik Deutschland lag die Neuerkrankungsrate des Mammakarzinoms im Jahr 2010 bei 70.000 und die Sterberate bei 17.466 Frauen. Das Mammakarzinom ist auch in Deutschland die häufigste Krebserkrankung der Frau. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren (RKI 2013).

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die das Auftreten des Mammakarzinoms begünstigen können. Eine frühe Menarche und späte Menopause, Kinderlosigkeit und ein höheres Alter von Erstgebärenden sind in der Literatur beschriebene Risikofaktoren (Antoniou und Easton 2006). Die Verwendung oraler Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien tragen nach aktueller Datenlage ebenfalls zur Entwicklung von Brustkrebs bei (Lacey et al. 2009). BRCA1, BRCA2 und p53-Genmutationen stellen gut untersuchte genetische prädisponierende Faktoren für die Entwicklung des Mammakarzinoms dar, wobei genetische Faktoren im Allgemeinen nur in ungefähr 5 - 10 % der Fälle für die Entstehung von Brustkrebs verantwortlich sind (Antoniou und Easton 2006, Bradbury und Olopade 2007).

1.1.2 Histopathologische Einteilung und Rezeptorstatus

Histopathologisch lässt sich das Mammakarzinom in das nichtinvasive Karzinom (Carcinoma in situ) und das invasive Karzinom unterteilen. Das Carcinoma in situ kann entsprechend dem Ursprungsgewebe weiter in das duktale Carcinoma in situ und das lobuläre Carcinoma in situ aufgeteilt werden. Das invasive Mammakarzinom wird entsprechend in das lobulär invasive und in das duktal invasive Mammakarzinom gegliedert. Das lobulär invasive Mammakarzinom macht mit 10 - 15 % gegenüber dem duktal invasiven Mammakarzinom mit ungefähr 75 % den geringeren Anteil aus (Roessner et al. 2008).

Ergänzend zur histopathologischen Einteilung des Mammakarzinoms wird heute zusätzlich eine Einteilung anhand des Rezeptorstatus vorgenommen. Dabei wird das Vorhandensein oder Fehlen des Östrogenrezeptors α (ER α), des Progesteronrezeptors (PR) und des *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu) mit immunhistochemischen Nachweismethoden festgestellt (Chen und Russo 2009).

75 - 80 % aller Brustkrebsarten sind Hormonrezeptor-positiv und exprimieren den ER α und/oder PR. Bei 15 - 20 % der Mammakarzinome findet sich eine Überexpression des Her2/neu. In dieser Gruppe bilden etwa 50 % zusätzlich einen Östrogen- oder Progesteronrezeptor aus (Dawson et al. 2009, Föst et al. 2011).

1.1.3 Triple-negatives Mammakarzinom

Etwa 15 - 20 % der Mammakarzinome exprimieren immunhistochemisch weder den ER α noch den PR und zeigen keine Überexpression von Her2/neu. Diese heterogene, aus unterschiedlichsten Tumorentitäten bestehende Gruppe wird in der Literatur häufig unpräzise als triple-negatives Mammakarzinom (*triple-negative breast cancer*, TNBC) bezeichnet (Anders und Carey 2009, Dawson et al. 2009). Obwohl diese Gruppe der Mammakarzinome unterschiedlichste Tumorsubtypen umfasst, wird im Folgenden der Einfachheit halber und der Literatur folgend vom TNBC gesprochen. Die Bezeichnung TNBC impliziert mit dem Fehlen des ER α , des PR und der fehlenden Überexpression von Her2/neu fehlende Angriffspunkte für gezielte endokrine und immunologische Krebstherapien. Dies ist der Hauptgrund für eine schlechtere Heilungschance und Prognose, verkürzte Überlebenszeit und eine höhere Sterberate der an TNBC erkrankten Frauen gegenüber anderen Rezeptor-exprimierenden Untergruppen des Mammakarzinoms (Kuo et al. 2012, Marotti et al. 2010). Histologisch zeichnet es sich durch eine hohe Mitoseaktivität und atypische Mitosefiguren aus. Des Weiteren lassen sich ein hoher Ki-67-Proliferationsmarker und viele atypische Zellpleomorphien finden (Dawson et al. 2009). Das TNBC wird in der Literatur als schlecht differenziertes, hoch malignes und sehr aggressives Karzinom charakterisiert (Chen und Russo 2009).

1.2 Metastasierung und Invasion

1.2.1 Prozess der Metastasierung und Invasion

Der Begriff der Metastasierung beschreibt die Absiedelung eines bösartigen Tumors in Entfernung vom Primärtumor. Die entstehenden Absiedelungen des Primärtumors werden als Metastasen bezeichnet (Coghlin und Murray 2010). Bei vielen Krebserkrankungen des Menschen lässt sich im Krankheitsverlauf früher oder später eine Metastasenbildung beobachten, die in den meisten Fällen zu einer deutlich schlechteren Krankheitsprognose führt. Schätzungsweise 90 % der Todesfälle bei Patienten mit einer Krebserkrankung sind den Folgen einer Metastasierung zuzuschreiben (Hanahan und Weinberg 2000). Der genaue Metastasierungsprozess ist bis heute nicht vollständig geklärt. In jüngster Zeit hat jedoch ein Wandel des Verständnisses vom Metastasierungsprozess stattgefunden. Die Metastasierung wird nicht mehr allein als geozentrischer, zellautonomer Prozess, sondern vielmehr als ein Systemmodell verstanden, in dem Interaktionen zwischen Tumorzellen und der umgebenden Mikroumgebung stattfinden (Wai et al. 2013).

Coghlin und Murray (2010) beschreiben die Metastasierung als Migration und Invasion von Krebszellen eines Primärtumors in umliegendes Nachbargewebe und anschließenden Einbruch in Blut- und Lymphgefäße, sodass eine Fernmetastasierung stattfinden kann. Grundsätzlich lässt sich die Entstehung von Metastasen in mehrere Teilschritte gliedern. Nachdem der Primärtumor eine bestimmte Größe und eine umfangreiche Vaskularisation erreicht hat, findet eine Invasion von Tumorzellen in das Nachbargewebe statt. Diese erfolgt durch die Zerstörung der Basalmembran und Invasion in die extrazelluläre Matrix des umliegenden Gewebes. Anschließend kommt es zu einer Intravasation in umliegende Lymph- und Blutgefäße, in denen die Tumorzellen zirkulieren und das körperliche Immunsystem umgehen müssen. Wenn die Krebszellen das Kapillarbett des Zielorgans erreichen, folgt eine Extravasation aus dem Blut- und Lymphgefäßsystem in das Zielgewebe. Im Zielgewebe findet schließlich Adhäsion, Proliferation und Angiogenese der entstandenen Mikrometastasen statt. Dort können die Krebszellen dann wiederum Anschluss an den Systemkreislauf bekommen und weitere Metastasen bilden (Chambers 1999, Fidler 2003).

1.2.2 Metastasierung des primären Mammakarzinoms

Das primäre Mammakarzinom zeigt eine ausgeprägte Metastasierung, welche schon in frühen Stadien stattfinden kann (Sant et al. 2003). Bei 6 - 10 % der Mammakarzinompatientinnen liegt zum Diagnosezeitpunkt bereits eine Fernmetastasierung vor. Die

mittlere Überlebenszeit dieser Frauen liegt zwischen zwei bis vier Jahren. Die Haupttodesursache bei Patientinnen mit Brustkrebs ist somit nicht der Primärtumor, sondern das Vorliegen von Metastasen (Weigelt et al. 2005).

Das Mammakarzinom metastasiert auf verschiedenen Wegen in unterschiedliche Zielorgane. Es kann über Lymphbahnen oder Lymphknoten benachbartes Haut- oder Muskelgewebe infiltrieren. Aber auch die Metastasierung mit dem Blutfluss in die Lunge, Knochen, Leber und Gehirn sind möglich. Mortalität und Prognose des Mammakarzinoms sind direkt mit dem Vorhandensein von Metastasen verknüpft (Davies 2014).

Beim Brustkrebs stellt der Knochen zusammen mit Lunge und Leber das häufigste Zielgewebe für Metastasen dar, wobei unter den Knochenmetastasen bevorzugt lange Röhrenknochen, Wirbelkörper und Rippen infiltriert werden. Ein Mammakarzinom mit bestehenden Knochenmetastasen gilt als nicht mehr heilbar (Weigelt et al. 2005). Knochenmetastasen sind hauptverantwortlich für eine erhöhte Morbidität, jedoch eher weniger für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko. Allerdings sind bei Brustkrebsrezidiven mit Knochenmetastasen ernsthafte Komplikationen zu beobachten, die die Lebensqualität der Patientinnen erheblich einschränken. Dazu zählen chronische Knochenschmerzen, pathologische Knochenfrakturen und Rückenmarkskompressionen sowie Hyperkalzämien (Rose und Siegel 2010).

Die Knochenmetastasen lassen sich in osteoblastische, osteolytische und gemischte Formen einteilen (Coleman 1997, Kingsley et al. 2007, Steinborn et al. 2000). Beim primären Mammakarzinom finden sich am häufigsten osteolytische Metastasen, welche durch eine gesteigerte Knochenresorption mit den entsprechenden Folgen, wie beispielsweise pathologischen Frakturen, gekennzeichnet sind. Die Osteolyse basiert darauf, dass die ins Knochenmark eingewanderten Krebszellen die Interaktion zwischen knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) und knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) sowie dem umliegenden Gewebe beeinflussen und die Differenzierung sowie Aktivität der Osteoblasten oder Osteoklasten kontrollieren (Rose und Siegel 2010).

1.2.3 Metastasierung des TNBC

Das TNBC weist deutlich höhere Raten von Fernmetastasierung auf. Weiterhin unterscheidet sich der Zeitpunkt des Rezidivs vom nicht-TNBC. Das Risiko eines Rückfalls beim TNBC ist in den ersten fünf Jahren nach Diagnosestellung am höchsten. Danach sinkt die Wahrscheinlichkeit des Rückfalls deutlich ab, sodass in der Literatur selten sogar Fälle von Patientinnen mit TNBC beschrieben werden, die geheilt zu sein scheinen, wenn sie in den ersten Jahren nach Diagnosestellung rezidivfrei bleiben. Im

Gegensatz dazu bleibt das Rezidivrisiko beim nicht-TNBC über die Zeit konstant hoch (Dawson et al. 2009).

1.3 Östrogenrezeptoren

Östrogenrezeptoren sind intrazelluläre Steroidhormonrezeptoren und gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren. Sie wirken als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, die im Zytoplasma der Zelle vorliegen und nach Aktivierung in den Zellkern wandern. Dort fungieren sie als DNA-bindender Transkriptionsfaktor und regulieren die Östrogenwirkung über die veränderte Expression verschiedener Zielgene (Chen et al. 2009, Dahlman-Wright et al. 2006).

Die Liganden des Östrogenrezeptors sind Östrogene, die zu den Steroidhormonen gezählt werden. Ihre Bildung findet sowohl bei der Frau als auch beim Mann statt. Bei beiden Geschlechtern fördern Östrogene zusammen mit Testosteron das Knochenwachstum. Die Anlage und Entwicklung der Geschlechtsorgane und Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale sind bei der Frau weitere wichtige Aufgaben dieser Steroidhormone. Die Östrogensynthese findet in der Plazenta, dem Ovar, der Nebennierenrinde und in den Hoden statt. Muskel- und Fettgewebe sind Organe mit Aromatasefunktion, in denen es zu einem geringen Teil zur Umbildung von Androgenen in Östrogene kommt (Dahlman-Wright et al. 2006).

Grundsätzlich können zwei verschiedene Rezeptorsubtypen unterschieden werden: *estrogen-receptor- α* (ER α) und *estrogen-receptor- β* (ER β). Beide Subtypen haben hohe Strukturhomologien und binden endogenes 17 β -Östradiol mit gleicher Affinität, andere natürliche oder synthetische Liganden jedoch mit unterschiedlicher Bindungsstärke (Lindberg et al. 2010). Mit dem ER α wird in der Literatur eine vermehrte Proliferation und Progression des Mammakarzinoms verbunden (Lindberg et al. 2010). In einigen Studien ist der ER α sogar als Antagonist des ER β beschrieben worden (Chen und Russo 2009). Auf den ER β – der in dieser Arbeit näher untersuchte Rezeptorsubtyp - wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

1.3.1 ER β

Der ER β ist im Jahre 1996 entdeckt worden und findet sich sowohl in normalem Brustepithel als auch im Gewebe von Mammakarzinomen. Im normalen Brustgewebe ist der Rezeptor jedoch viel stärker exprimiert als im Mammakarzinomgewebe (Lindberg et al. 2010, Marotti et al. 2010). Bei vielen Patientinnen mit TNBC, die keinen ER α , keinen PR und keine Überexpression des Her2/neu-Gens aufweisen, konnte jedoch die Expression des ER β nachgewiesen werden. Mit dem ER β wird eine geringere Invasivität

und Progression des TNBC assoziiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des ER β im TNBC mit signifikant verbessertem krankheitsfreien Überleben der Patientinnen einhergeht (Lindberg et al. 2010, Marotti et al. 2010). Eine weitere Studie stellte fest, dass das 5-Jahres-Überleben von Patientinnen mit TNBC und positivem ER β -Status deutlich besser als das von Patientinnen mit TNBC ohne ER β -Expression war. Die Autoren schlussfolgerten, dass der ER β als unabhängiger Marker für das klinische Outcome und die Überlebenszeit der Patientinnen beim TNBC angesehen werden kann (Chen und Russo 2009, Sakamoto und Honma 2009). Eine Abnahme der ER β -Expression hingegen scheint mit einer Zunahme der Progression und Invasion des TNBC zu korrelieren. Des Weiteren weisen Mammakarzinome, die keinen ER β besitzen, ein größeres Tumolvolumen und positiven Lymphknotenbefall zum Diagnosezeitpunkt auf. Diese Eigenschaften könnten laut aktueller Literatur auf die mögliche antiproliferative Rolle des ER β hindeuten (Marotti et al. 2010).

1.4 SDF-1/CXCR4-System

Chemokine (CXC-motif) rezeptor 4 (CXCR4) ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren, welches auf Chromosom 2 kodiert ist. Strukturell handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor. *Stromal derived factor 1 (SDF-1)* ist der zugehörige chemotaktische Ligand des CXCR4. Nach Bindung des Liganden an den CXCR4 wird dieser aktiviert und führt zur Wanderung der CXCR4-exprimierenden Zellen entlang des Konzentrationsgradienten in Richtung SDF-1-Sekretion. Eine Sezernierung von SDF-1 erfolgt durch Stromazellen verschiedener Gewebearten, vor allem Knochen, Lunge und Leber. CXCR4 wird normalerweise hauptsächlich von blutbildenden Zellen und Stammzellen exprimiert. Die Hauptaufgabe des CXCR4 ist die zielgerichtete Mobilisierung und Wanderung blutbildender Zellen und Stammzellen in ihre Speicher, beispielsweise das Knochenmark oder zu ihren Bestimmungsorten bei Organ- und Wundheilung.

Es wurde jedoch festgestellt, dass außer den erwähnten blutbildenden Zellen und Stammzellen auch Tumorzellen unterschiedlicher Entität den CXCR4 auf ihrer Oberfläche überexprimieren können (Rose und Siegel 2010). Dem CXCR4 wird dabei ein fördernder Einfluss sowohl auf die Größenzunahme des Primärtumors als auch auf die Metastasierung zugeschrieben. Tumorassoziierte Stromazellen fördern durch ihre parakrine Sezernierung von SDF-1 das Wachstum und Überleben von CXCR4-positiven primären Tumorzellen. Zusätzlich können CXCR4-positive Tumorzellen entlang des Chemokingradienten zu SDF-1-ausschüttenden Organen migrieren und dort Metastasen bilden. Des Weiteren gelangen Tumorzellen über die genannten Mechanismen des

CXCR4 in SDF-1-reiches Knochenmark und sichern so ihr Überleben und die Größenzunahme des Tumorzellverbandes. Für diesen Vorgang, der auch als *homing* bezeichnet wird, sind hohe SDF-1-Konzentrationen notwendig, die von im Knochenmark befindlichen Stromazellen sezerniert werden. Die Unterbrechung der Kommunikation zwischen CXCR4-exprimierender Tumorzelle und SDF-1-produzierender Stromazelle mittels CXCR4-Inhibitoren wird in der Forschung als Möglichkeit angesehen, die Tumorzellen aus dem Knochenmark zu locken und besser für mögliche Therapien angreifbar zu machen (Domanska et al. 2013).

Beim primären Mammakarzinom ist der CXCR4 mit ungefähr 33 - 55 % der am häufigsten exprimierte Chemokinrezeptor. Sein Vorhandensein wird mit verkürztem krankheitsfreien Überleben und erhöhter Rezidivgefahr assoziiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine CXCR4-Expression bei 67 % der Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen gegenüber Patientinnen mit viszeralen Metastasen nachweisbar ist. Die Expression des CXCR4 scheint somit laut Literatur einen prometastatischen und die Invasion begünstigenden Faktor beim Mammakarzinom darzustellen (Rose und Siegel 2010). Auch beim TNBC wird eine erhöhte Expression des CXCR4 beschrieben und als eine mögliche Ursache für die stärkere Aggressivität und Invasivität dieses Subtyps vermutet (Chen und Russo 2009).

1.5 ERß-Agonisten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen Liquiritigenin und ERB-041 sind beide selektive Agonisten des ERß. Ihnen werden tumorsupprimierende und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Chaudhary et al. 2014, Liu et al. 2012).

1.5.1 Liquiritigenin

Der Naturstoff Liquiritigenin ist ein Isoflavanon, gewonnen aus der Wurzel der *Glycyrrhiza uralensis* und zählt zur Gruppe der Phytoöstrogene. Diese Substanz stellt einen hochselektiven Agonisten des ERß dar und aktiviert regulatorische Elemente und Zielgene des ERß, jedoch nicht des ER α (Mersereau et al. 2008).

1.5.2 ERB-041

Die Substanz ERB-041 ist wie Liquiritigenin hochpotent und selektiv am ERß. Mit diesem ERß-Agonisten werden in der Literatur neben seiner Tumor-supprimierenden Eigenschaft zusätzlich eine starke antientzündliche Wirkweise assoziiert, welche in der Behandlung der Rheumatoiden Arthritis genutzt wird (Chaudhary et al. 2014).

1.6 Therapie des primären Mammakarzinoms

Die Therapiegrundlage für fast alle nicht metastasierten Mammakarzinome ist die im Sinne einer Tumorentfernung im Gesunden brusterhaltende Operation. Sollte diese nicht möglich sein, kann alternativ eine modifizierte radikale Mastektomie vorgenommen werden. Nach jeder brusterhaltenden Operation sollte eine adjuvante Bestrahlung der gesamten Restbrust, der angrenzenden Thoraxwand und des Lymphabflussgebiets erfolgen. Die medikamentöse Therapie beinhaltet die Chemotherapie, endokrine Therapie und Her2/neu-Antikörpertherapie. Die endokrine Therapie ist bei Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus indiziert (AWMF 2012). Bei prämenopausalen Patientinnen sind Antiöstrogene, wie beispielsweise Tamoxifen Mittel der ersten Wahl. Dabei handelt es sich um selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (*selective estrogen receptor modulators*, SERM) (Legha und Carter 1976). Außerdem können GnRH-Analoga (Gonadotropin-*Releasing*-Hormon, GnRH) eingesetzt werden, die eine medikamentöse Kastration bewirken und die Patientinnen in den Zustand der Postmenopause versetzen (Emons et al. 2003). Bei postmenopausalen Patientinnen werden ebenfalls Antiöstrogene oder Aromatase-Inhibitoren eingesetzt (Gibson et al. 2007). Patientinnen, die eine Überexpression des Her2/neu aufweisen, erhalten zusätzlich eine immunologische Therapie mit dem humanen monoklonalen Antikörper Trastuzumab, der am Her2/neu bindet und damit das Wachstum der Krebszellen durch eine Antikörper-induzierte Apoptose hemmt (Viani et al. 2007).

1.6.1 Therapie des metastasierten Mammakarzinoms

Die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms erfolgt heute krankheitsadaptiert und individuell. Sie beinhaltet die Gabe von Chemotherapeutika, vor allem aus der Gruppe der Taxane. Bei positivem Rezeptorstatus können auch endokrine und immunologische Therapien eingesetzt werden. Als endokrine Therapieoptionen finden Antiöstrogene bei prämenopausalen Patientinnen und Aromatasehemmer bei postmenopausalen Patientinnen Verwendung. Trastuzumab als Her2/neu-Inhibitor kann bei Her2/neu-überexprimierenden Tumoren eingesetzt werden. Des Weiteren können spezielle VEGF-Inhibitoren (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF), wie beispielsweise Bevacizumab als Angiogeneseinhibitoren zum Einsatz kommen (Amar et al. 2009). Die Strahlentherapie wird zur lokalen Therapie bei symptomatischen oder frakturgefährdeten Knochenmetastasen, sowie zur Palliation der Brust bei Exulzerationen, Hautmetastasen oder Schmerzen eingesetzt (AWMF 2012). Aber auch eine Operation oder der medikamentöse Einsatz von Bisphosphonaten kann bei der Therapie von Knochenmetastasen verwendet werden (Rose und Siegel 2010).

1.6.2 Therapie des TNBC

Das TNBC wird grundsätzlich wie das nicht-TNBC therapiert. Das Fehlen des ER α und des PR sowie die nicht vorhandene Überexpression des HER2/neu beim TNBC hat jedoch zur Folge, dass es zurzeit keine gezielte endokrine oder immunologische Krebstherapie gibt, da mögliche Rezeptoren als Angriffspunkte für diese Therapieoptionen fehlen (Tan und Swain 2008). Die Chemotherapie stellt für Patientinnen mit TNBC somit zurzeit die einzige medikamentöse adjuvante Systemtherapie dar. Das TNBC ist relativ sensitiv für Chemotherapeutika, scheint jedoch nach kurzer Zeit zum Rezidiv zu neigen. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Entwicklung neuer spezifischer Krebstherapien bei dieser Form des Brustkrebs (Föst et al. 2011, Tan und Swain 2008).

1.7 Fragestellung

Das TNBC gilt, wie bereits erörtert, als besonders aggressive und prognostisch ungünstige Form des Mammakarzinoms. Da beim TNBC weder der ER α , noch der PR und keine Überexpression des Her2/neu vorliegt, fehlt bisher die Möglichkeit einer zielgerichteten Antikörpertherapie.

Obwohl der ER α beim TNBC nicht exprimiert ist, scheint der ER β eine Bedeutung zu haben. Chen und Russo konnten bereits 2009 eine Proteinexpression des ER β in Zellen des TNBC nachweisen. Da der ER β in der Literatur mit Inhibition von Tumorwachstum und Invasion assoziiert ist (Lindberg et al. 2010, Marotti et al. 2010), stellt er einen möglichen Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie dar, die in dieser Arbeit genauer untersucht werden soll.

Insbesondere soll die Rolle des ER β bei der Invasion, Migration und Proliferation des TNBC *in vitro* genauer analysiert werden. Zusätzlich wird die Expression des CXCR4 untersucht werden, welcher in der Literatur als prometastatisch beschrieben wird (Rose und Siegel 2010).

Als Modell für die beim TNBC problematische frühzeitige Metastasierung in den Knochen wird in der vorliegenden Arbeit mit einem Kokultur-System und den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 gearbeitet, die mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 kokultiviert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte bisher bereits zeigen, dass in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 die Invasion von Mammakarzinomzellen stark anstieg. Anhand dieses Modells soll nun der Einfluss von ER β -Agonisten auf die Invasion oben genannter kokultivierter TNBC-Zelllinien untersucht werden. Als ER β -Agonisten werden die Substanzen Liquiritigenin und ERB-041 verwendet, die beide selektive Agonisten des ER β darstellen und mit antiinflammatorischen und tumorsupprimierenden Eigenschaften assoziiert sind (Liu et al. 2012, Shanle et al. 2011).

Des Weiteren soll die Wirkung von Liquiritigenin auf die Expression des als prometastatisch geltenden CXCR4 (Rose und Siegel 2010) in den kokultivierten TNBC-Zellen analysiert werden, um zu überprüfen ob der ER β über die Expression des CXCR4 einen Einfluss auf die Invasion der TNBC-Zellen hat.

Ziel dieser Arbeit ist es somit, die Rolle des ER β bei der Invasion des TNBC anhand eines Kokultur-Systems zu erforschen und dadurch zum einen die Wirkmechanismen des ER β genauer zu verstehen und zum anderen die Basis für eine mögliche zielgerichtete Therapie des TNBC zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller, Firmensitz
Analysenwaage BP 161P	Sartorius, Göttingen
Autoklav 2540 EL	Tuttnauer, Breda, NL
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau
Brutschrank Model 3121 S/N 28439531	Forma Scientific, San Bruno, USA
Elektrophoresekammer DNA	OWL Separation Systems, Portsmouth, USA
Laborfuge 400R	Heraeus Holding, Hanau
Laborzentrifuge Sigma 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Taufkirchen
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikroskop BH-2	Olympus, Hamburg
Mikroskop IX51	Olympus, Hamburg
Mikrowaage, elektronisch M2P	Sartorius, Göttingen
Mini-Protean™ III Cell and Systems	Bio-Rad, München
pH-Meter CG22	Schott-Geräte, Mainz
Photometer (BioPhotometer 6131)	Eppendorf, Hamburg
Power Supply, Pac Basic™	Bio-Rad, München
Power Supply, Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank LaminAir® LFM 2472S	Heraeus Holding, Hanau
Synergy™ HT Multi-Detektions-Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen

Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge 3K30	Sigma, Osterode am Harz
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, CH
Waage Kern 440-47	Kern, Balingen
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
X-Ray Film Röntgenfilmentwickler SRS-101A	Konica, Langenhagen

Tabelle 1 Verwendete Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) stammen von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck (Darmstadt), Nunc (Langenselbold) und Sarstedt (Nümbrecht).

2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, von nachstehend genannten Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), PAA (Cölbe), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München).

2.1.4 Liquiritigenin und ERB-041

Die Substanzen Liquiritigenin und ERB-041 wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf) bezogen. Die Anlieferung erfolgte als Lyophilisat, aus dem eine Stammlösung mit sterilem H₂O in einer Konzentration von 5×10^{-2} M hergestellt wurde. Um das Lyophilisat zu lösen, ist DMSO verwendet worden.

2.1.5 Matrigel™ Basalmembranmatrix

Matrigel™ Basalmembranmatrix, bezogen von der Firma BD Biosciences, stellt eine gelöste Basalmembranvorbereitung dar. Diese ist aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert worden.

2.1.6 Puffer, Lösungen und weitere Substanzen

Zum Ansetzen von Puffer und Lösungen ist doppelt destilliertes und autoklaviertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage der Firma Sartorius (Göttingen) benutzt worden.

Puffer und Lösungen	Komponenten bzw. Hersteller
Ammoniumpersulfat	Appl.Chem, Darmstadt
Anodenpuffer	1,82 g Tris, 100 ml 20% Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O (doppelt destilliertes H ₂ O), pH 10,4
Anodenpuffer, konzentriert	18,2 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 10,4
Antikörper-Stripping-Puffer	Uptima
Blockierungsreagenz	TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver
CellLytic™ M Cell Lysis Reagent	Sigma-Aldrich, München
Ethidiumbromid-Bad	0,007 % (v/v) Ethidiumbromid
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Merck, Darmstadt
Kathodenpuffer	2,62 g 6-Amino-Hexansäure, 1,51 g Tris, 100 ml 20 % Methanol, ad 500 ml ddH ₂ O, pH 9,4
Laemmli-Probenpuffer (2x)	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerol, 0,05 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
Lysispuffer	10mM Tris/HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 2 % (v/v) Triton X-114TM
NuPAGE® LDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ HPO ₄ , pH 7,4
SDS-Elektrophoresepuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
TBE (0,5x)	90 mM Tris, 90mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5

TBST	TBS + 0,1 % (v/v) Tween
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol

Tabelle 2 **Verwendete Puffer und Lösungen**

Inhibitoren	Hersteller
Protease-Inhibitor	Sigma-Aldrich, München
RNasin® plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim

Tabelle 3 **Verwendete Inhibitoren**

Enzyme	Hersteller
DNase I recombinant , RNase-frei	Roche, Mannheim
KAPA2G™ Fast 2x ReadyMix with Dye	Peqlab, Erlangen
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

Tabelle 4 **Verwendete Enzyme**

Größenstandard-Marker	Hersteller
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
PeqGOLD Protein-Marker V	Peqlab, Erlangen

Tabelle 5 **Verwendete Größenstandard-Marker**

2.1.7 Kultur-und Einfriermedien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Medien sowie deren Zusätze sind von den nachstehend genannten Firmen bezogen worden: Biochrom (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), PAA (Cölbe) und Sigma-Aldrich (München).

Für die Kultivierung der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 sowie der Zelllinie MCF-7 wurde das *Minimum Essential Medium* (MEM-Earl) mit Phenolrot verwendet. Die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 wurde in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit Phenolrot kultiviert. Die *in-vitro*-Experimente sind mit DMEM ohne Phenolrot

(Versuchsmedium) durchgeführt worden. Den Medien sind folgende Zusätze hinzugefügt worden (siehe Tabelle 6). Das Einfriermedium ist mittels MEM-Earl mit Phenolrot, 20 % FCS und 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid) hergestellt worden.

	MEM-Earl mit Phenolrot	DMEM mit Phenolrot	DMEM ohne Phenolrot
Funktion	Nährmedium	Nährmedium	Versuchsmedium
Zelllinie	HCC1806 HCC1937 MCF-7	MG63	HCC1806 HCC1937 MG63
Zusätze	10 % (v/v) FCS	10 % (v/v) FCS	10 % (v/v) CD-FCS
	1 % (v/v) P/S	1 % (v/v) P/S	1 % (v/v) P/S
	0,1 % Insulin	-	-
	0,1 % (v/v) Transferrin	-	-
	-	1 % (v/v) L-Gln	1 % (v/v) L-Gln

Tabelle 6 **Verwendete Kulturmedien und Zusätze**

2.1.8 Zelllinien

Folgende etablierte Zelllinien sind für die *in-vitro*-Experimente von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA) bezogen worden:

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Referenz
HCC 1806	Primärtumor	Plattenepithelkarzinom	Gazdar et al. (1998)
HCC 1937	Primärtumor	Primär duktales Karzinom	Gazdar et al. (1998)
MCF-7	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Soule et al. (1973)
MG63	Primärtumor	Osteoblasten-ähnliches Osteosarkom	Billiau et al. (1977)

Tabelle 7 **Verwendete Zelllinien**

2.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert und als Sense- und Antisense-Primer im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion (siehe Kapitel 2.2.2.4) verwendet.

ER α	for 5' – CCA GGG AAG CTA CTG– 3' rev 5' – TCC AGA GAC TTC AGG- 3'
ER β	for 5' –TAG TGG TCC ATC GCC– 3' rev 5' –GGG AGC CAC ACT TCA- 3'
L7	for 5' – AGA TGT ACA GAA CTC AAA TTC – 3' rev 5' – ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA - 3'

Tabelle 8 **Verwendete Oligonukleotide**

2.1.10 Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Primärantikörper	Herkunft/Beschreibung	Referenz
Anti-Aktin	Kaninchen, monoklonal; 1:1000	Epitomics, Hamburg
Anti-CXCR4	Kaninchen, polyklonal; 1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-ER α	Kaninchen, monoklonal; 1:1000	Epitomics, Hamburg
Anti-ER β	Kaninchen, monoklonal; 1:5000	Epitomics, Hamburg

Tabelle 9 **Verwendete Primärantikörper**

Sekundärantikörper	Herkunft/Beschreibung	Referenz
Kaninchen IgG horseradish Peroxidase- gekoppelt	Donkey; 1:20.000-1:50.000	GE Healthcare, Freiburg

Tabelle 10 **Verwendete Sekundärantikörper**

2.1.11 Kommerzielle Reaktionssysteme

Reaktionssystem/ Kit	Hersteller
AlmarBlue®	Serotech, München
dT15-Primer [1,1x10 ⁻⁵ M] als Lyophilisat	Roche, Mannheim
ECL Immobilon™ Western	Merck Millipore, Darmstadt
Histostain® Bulk Kit	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

Tabelle 11 **Verwendete kommerzielle Reaktionssysteme**

2.1.12 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Axio Vision 3.1	Carl Zeiss Vision GmbH, Oberkochen
Bio Doc Analyze 2.1	Software Biometra, Göttingen
EndNote X5	Thomson Reuters, Philadelphia
GraphPad Prism ® (Version 5.00)	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Kodak Digital Science 1D	Eastman Kodak Company, Stuttgart
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Image J Version 1.45s	Wayne Rasband, USA

Tabelle 12 **Verwendete Software**

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren der Zellen

Alle verwendeten Zelllinien (Zelldichte: 4.000 Zellen/cm²) sind in Zellkulturflaschen (Nunc) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Anteil bei 37 °C kultiviert worden. Die Bodenflächen der Zellkulturflaschen betragen entweder 75 cm² oder 175 cm². Nachfolgend werden die der 75 cm² großen Zellkulturflaschen entsprechenden Volumina angegeben und die Volumina der 175 cm² großen Flaschen werden in Klammern aufgeführt. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen wurden mit Handschuhen unter sterilen Bedingungen und unter dem Abzug durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden.

Für die Kultivierung der TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und MCF-7 ist das MEM-Earl Kulturmedium mit Phenolrot, für die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 hingegen ein DMEM-Kulturmedium mit Phenolrot verwendet worden. Diese Kulturmedien wurden zusätzlich mit 10 % (v/v) *fetal calf serum* (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) versetzt. Dem MEM-Earl-Kulturmedium ist weiterhin 0,1 % (v/v) Transferrin und 1 % Insulin, dem DMEM-Kulturmedium 1 % (v/v) L-Glutamin (L-Gln) hinzugefügt worden (siehe Tabelle 6). Es wurden 10 ml (25 ml) des entsprechenden Nährmediums in jede Zellkulturflasche gefüllt, wobei die Medien alle zwei bis drei Tage gewechselt worden sind.

Erreichten die Zellen eine ungefähr 80 %ige Konfluenz, sind diese passagiert worden. Dafür wurde das Nährmedium mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 10 ml (25 ml) PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgenommen und 3 ml (7,5 ml) des zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmten Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben. Diese wurde dann für 10 - 15 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die zuvor adhärennten Zellen vom Flaschenboden ablösten. Diese Reaktion ist mit 5 ml (10 ml) des jeweiligen Nährmediums abgestoppt worden. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 400 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes konnte mit dem reinen Zellpellet weitergearbeitet werden.

Für das alleinige Passagieren von Zellen ist das Zellpellet in 1ml Nährmedium resuspendiert und die gewünschte Menge dieser Suspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben worden. Anschließend wurde die Suspension mit dem entsprechenden Nährmedium auf 10 ml (25 ml) aufgefüllt.

Sind die Zellen für Experimente benötigt worden, wurde das Zellpellet in 1ml Versuchsmedium DMEM ohne Phenolrot mit 10 % (v/v) *fetal calf serum* (CD-FCS), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) und 1 % (v/v) L-Glutamin (L-Gln) resuspendiert (siehe Tabelle 6). Danach wurde diese Suspension mit dem Versuchsmedium auf 10 ml aufgefüllt. Im Anschluss sind 10 μ l dieser Suspension für eine Zellzahlbestimmung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und nach dem Auszählen mit der errechneten Menge der Suspension weiter gearbeitet worden (siehe Kapitel 2.2.1.3). Die überschüssige Suspension wurde erneut zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert, kryokonserviert oder für weitere Experimente verwendet.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Für eine längerfristige Konservierung überschüssiger Zellen, wurde das Zellpellet in 1 ml entsprechendes Nährmedium resuspendiert und 5 % DMSO sowie 20 % FCS hinzugefügt. Nach Überführen der entstandenen Suspension in spezielle Kryogefäße wurden die Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und nach 12 - 24 h endgültig in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Auftauvorgang erfolgte durch Erwärmung der Kryogefäße bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad für 5 min und anschließender Zentrifugation bei 400 g für 5 min. Das entstandene Zellpellet wurde dann entsprechend Kapitel 2.2.1.1 in Nährmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach dem Auftauen befanden die Zellen sich mindestens drei Tage in Kultur, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Bevor eine Zellsuspension für einen Versuch eingesetzt wurde, ist mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der Suspension bestimmt worden. Dafür sind 10 μ l der Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben worden. Die Zählkammer besteht aus neun Quadraten, welche jeweils 1 mm^2 groß und 0,1 mm tief sind. Folglich weist ein Quadrat ein Volumen von 0,1 μ l auf. Mithilfe eines Lichtmikroskops ist die Gesamtzellzahl in vier großen Quadraten ausgezählt worden. Davon wurde der Mittelwert bestimmt. Im Anschluss ist der Mittelwert mit dem Faktor 10^4 multipliziert worden, woraus sich die Zellzahl pro ml ergab. Die Gesamtzellzahl errechnete sich aus dem Volumen der Zellsuspension, multipliziert mit der Zellzahl pro ml.

2.2.1.4 Behandlung mit ER β -Agonisten

Die Inkubation mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten. Die nachstehende Verdünnungsreihe ist mit DMEM mit/ohne Phenolrot hergestellt worden. Um Volumenunterschiede zu vermeiden, wurde der jeweilige Kontrollansatz mit einer äquivalenten Menge sterilem H₂O behandelt.

Kokultur (mikroskopische Auswertung):

ERB-041 [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Liquiritigenin [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Behandlungszeitpunkte [h]: t_0 , t_{48}

Versuchsendpunkte [h]: HCC1806: t_{72} ; HCC1937: t_{96}

Kokultur (Proteingewinnung):

ERB-041 [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Liquiritigenin [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Behandlungszeitpunkt [h]: t_0

Versuchsendpunkte [h]: HCC1806: t_{24} , HCC1937: t_{24}

Proliferationsassay:

ERB-041 [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Liquiritigenin [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Behandlungszeitpunkte [h]: t_{24} , t_{72}

Versuchsendpunkte [h]: HCC1806: t_{120} , HCC1937: t_{120}

Scratch-Assay:

Liquiritigenin [M]: 1×10^{-5} , 1×10^{-7} , 1×10^{-9} , 1×10^{-11}

Behandlungszeitpunkte [h]: t_0

Versuchsendpunkte [h]: HCC1806: t_{48} , HCC1937: t_{48}

2.2.1.5 Kokultur

Das Kokultur-System stellt ein *In-vitro*-Modell der gerichteten Invasion dar und kann mögliche Hinweise auf das Invasionsverhalten im Rahmen der Metastasierung *in vivo* liefern (von Alten et al. 2006).

In der Kokultur wird die Invasion anhand der Migrationsrate von TNBC-Zellen durch eine künstliche Basalmembran hindurch in einer modifizierten Boyden-Kammer gemessen. Dabei wurde ein *Insert* (Filter mit poröser Membran) in ein *Well* (Kulturschale) einer *Well*-Platte gesetzt, wodurch Kultur- und Invasionskammer entstanden (Boyden 1962). In diesem System konnten die TNBC-Zellen und die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 ohne direkten Zell-Zell Kontakt wachsen (siehe Abb.1). Die Membran der Kulturkammer (*Insert*) bestand aus Polykarbonat (Porendurchmesser: 8 μm) und ist mit Matrigel™ Basalmembranmatrix beschichtet worden. Das die Extrazellulärmatrix simulierende Matrigel™ Basalmembranmatrix ist mit DMEM ohne Phenolrot ohne Zusätze in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt und anschließend bei 4 °C auf die *Inserts* aufgetragen worden. Je nach Größe der *Inserts* sind unterschiedliche Mengen des verdünnten Matrigel® verwendet worden (siehe Tabelle 13). Danach härteten die beschichteten *Inserts* bei 37 °C für mindestens 30 min aus.

Bei der Aussaat der Zellen ist eine 6-*Well*-Platte für die Gewinnung von RNA und Proteinen und eine 24-*Well*-Platte für die mikroskopische Auswertung der Kokultur verwendet worden. Nachdem die Zellen in den Zellkulturflaschen annähernd eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten, wurden diese trypsinisiert, zentrifugiert und in dem Versuchsmedium DMEM ohne Phenolrot resuspendiert (siehe Kap.2.2.1.1). Die genaue Zellzahl der Suspension wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Kap. 2.2.1.3). Anschließend sind die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 in die *Well*-Platten und die TNBC-Zelllinien separat in die *Inserts* gemäß der entsprechenden Zellzahlen (siehe Tabelle 14) ausgesät worden. Danach wurden diese zunächst getrennt voneinander für 12 h im Versuchsmedium DMEM ohne Phenolrot mit 10 % (v/v) *fetal calf serum* (CD-FCS), 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) und 1 % (v/v) L-Glutamin (L-Gln) kultiviert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Nach 12 h sind die *Inserts* luftblasenfrei in die *Well*-Platten überführt und ab diesem Zeitpunkt (t_0) kokultiviert worden. Als Kontrolle dienten TNBC-Zellen in *Inserts* über den *Wells*. Diese wurden dabei nur mit Versuchsmedium und nicht mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 monokultiviert.

Direkt im Anschluss wurden die TNBC-Zellen mit den selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin (10^{-11} M bis 10^{-5} M) oder ERB-041 (10^{-11} M bis 10^{-5} M) behandelt. Nach 48 h wurde die Behandlung wiederholt (siehe Kap.2.2.1.4). Je Ansatz gab es eine Kokultur,

welche nicht inkubiert wurde, um eine Aussage über das Kokultur-System treffen zu können.

Nach 72 h (t_{72}) wurde bei den HCC1806-Zellen und nach 96 h (t_{96}) bei den HCC1937-Zellen der Versuch beendet, um eine mikroskopische Auswertung vornehmen zu können (siehe Kap. 2.2.4.2). Die Versuche für die Proteingewinnung sind nach 24 h (t_{24}) beendet worden (siehe Kap. 2.2.3.2).

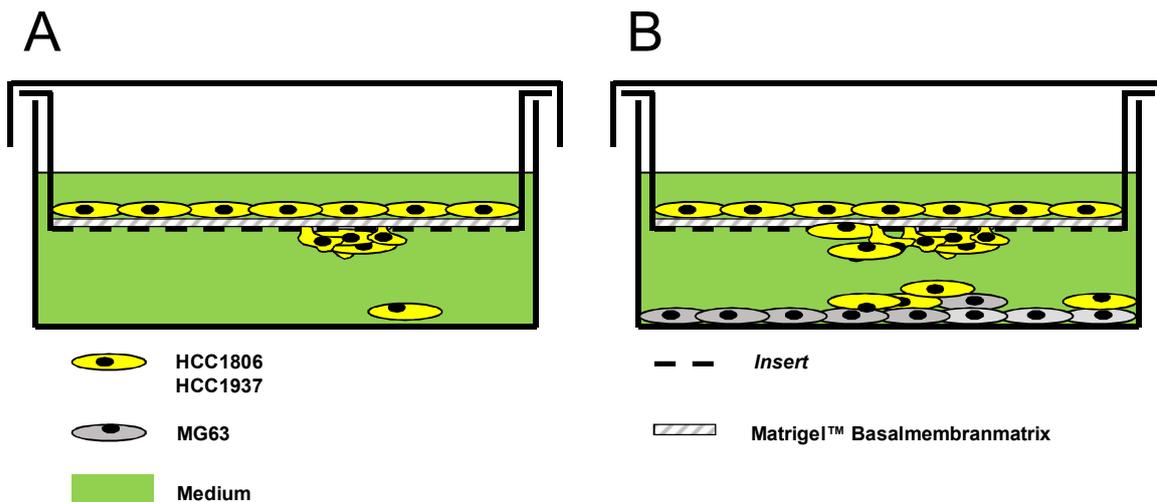


Abb. 1 Schematische Darstellung der verwendeten Kokultur. Die TNBC-Zellen HCC1806 und HCC19367 sind gelb dargestellt und werden auf poröse *Inserts* ausgesät, die mit Matrigel beschichtet sind. In der *Well-Platte* befindet sich Medium (Kontrolle) (A). Unterhalb der auf dem *Insert* sitzenden TNBC-Zellen befinden sich grau dargestellt die Osteoblasten-ähnlichen MG63-Zellen (B).

Substanz	6-Well-Platte	24-Well-Platte
Matrigel™ Basalmembranmatrix	106 µl	15 µl
DMEM ohne Phenolrot	106 µl	15 µl

Tabelle 13 **Aufbereitung Matrigel™ Basalmembranmatrix**

Versuchsaufbau der Kokultur	Insert-Größe Well-Platte	Zelllinie	Zellzahl/Volumen [μl^{-1}]
Mikroskopische Auswertung	24-Well Insert	HCC 1806	$1 \times 10^4 / 400$
		HCC 1937	$1 \times 10^4 / 400$
	24-Well-Platte	MG63	$2 \times 10^4 / 600$
RNA-und Proteingewinnung	6-Well Insert	HCC 1806	$4 \times 10^5 / 1500$
		HCC 1937	$4 \times 10^5 / 1500$
	6-Well-Platte	MG63	$2 \times 10^5 / 2000$

Tabelle 14 Verwendete Zellzahlen für *Inserts* und *Wells* im Invasionsassay

2.2.1.6 Proliferationsassay

Für eine quantitative Messung der Zellvitalität ist in dieser Arbeit das AlamarBlue®assay verwendet worden. Dieses lässt Rückschlüsse auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zellen zu. AlamarBlue® stellt einen wasserlöslichen, blauen Farbstoff dar, der den Redox-Indikator Resazurin enthält. Durch Reduktion wird das oxidierte, nicht fluoreszierende Resazurin irreversibel zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Mithilfe dieser Methode kann die Stoffwechselaktivität von Zellen nachgewiesen werden. Stoffwechselaktive Zellen führen zur Reduktion des Indikators und damit zu einem Farbumschlag der Lösung in Richtung rosa. Metabolisch inaktive oder tote Zellen hingegen haben einen niedrigeren Stoffwechsel und weisen einen geringeren Farbumschlag auf. Der Farbstoff alamarBlue® kann im Rahmen einer Fluoreszenzmessung mithilfe eines Multi-Detektions-Readers bei einer Wellenlänge von 570 nm und 630 nm spektralphotometrisch erkannt werden. Der Proliferationsassay ist über 120 h in 96 *Well*-Platten (Falcon) durchgeführt und zu den Zeitpunkten t_{24} und t_{72} mit den ER β -Agonisten in den entsprechenden Konzentrationen (siehe Kap.2.2.1.4) inkubiert worden.

Zunächst sind die Zellen, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, trypsiniert, zentrifugiert und in Versuchsmedium resuspendiert worden. Nach Zellzahlbestimmung in der Suspension (siehe Kapitel 2.2.1.2) ist die entsprechende Zellzahl in die *Wells* gegeben worden (siehe Tabelle 15). In die äußeren *Wells* wurden zur Vermeidung von Verdunstungsphänomenen keine Zellen, jedoch PBS pipettiert. Damit zum Versuchsende eine Leerwertbestimmung stattfinden konnte, ist in die ersten sechs vertikalen *Wells* nur 100 μl Versuchsmedium gegeben worden. Im Anschluss wurde die *Well*-Platte für 12 h bei 37 °C im Brutschrank kultiviert, sodass die Zellen auf dem Boden der *Well*-Platte anwachsen konnten.

Nach Ablauf dieser Zeit (t_{24}) wurden die Zellen mit den ER β -Agonisten Liquiritigenin oder ERB-041 in den entsprechenden Konzentrationen (1×10^{-5} M bis 1×10^{-11} M, siehe Kap. 2.2.1.4) behandelt, wobei der Kontrollansatz nur mit Versuchsmedium behandelt wurde, um Volumenunterschiede zu vermeiden. Die Inkubation wurde nach 48h (t_{72}) wiederholt und der Versuch nach 120 h (t_{120}) beendet. Im Anschluss sind 20 μ l alamarBlue® in jedes *Well* gegeben und 4 - 6 h im Brutschrank inkubiert worden. Danach konnte mithilfe des Synergy™ HT Multi-Detektions-Reader für Mikroplatten der Farbumschlag detektiert und mithilfe der Software GEN5 ausgewertet werden.

Zelllinie	Zellzahl/ Volumen [μ l ⁻¹]
HCC 1806	$2 \times 10^3 / 200$
HCC 1937	$3 \times 10^3 / 200$

Tabelle 15 **Verwendete Zellzahlen im Proliferationsassay**

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen

Zunächst wurden die TNBC-Zelllinien wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben in Zellkulturflaschen ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von ungefähr 80 % trypsinisiert, zentrifugiert, in Versuchsmedium resuspendiert und mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (siehe Kap. 2.2.1.3). Anschließend ist eine definierte Zellzahl der Suspension in 6-*Well*-Platten in Versuchsmedium ausgesät worden (siehe Tabelle 14). Bei ausreichender Zellkonfluenz in der *Well*-Platte, wurde das Versuchsmedium vorsichtig abgesaugt. Anschließend sind die Zellen durch Inkubation mit einem Gemisch aus β -Mercaptoethanol und RLT Puffer im Verhältnis 1:1000 direkt in der *Well*-Platte lysiert worden.

Die RNA-Isolierung ist mithilfe des RNeasy®Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt worden. Dieses Verfahren beinhaltet eine spezifische RNA-Bindung an eine Silika-Gel-Membran, eine RNA-Reinigung mittels mehrerer Waschschrte und RNA-Eluierung mit doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O). Die Zellaufarbeitung wurde gemäß Herstellerangaben ausgeführt. Im Anschluss wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA wurde mithilfe eines UV-Photometers durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei $\lambda = 260$ nm (A_{260}). Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Proteine, die bei der Aufbereitung als Verunreinigungen auftreten besitzen hingegen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280$ nm (A_{280}). Somit spiegelt das Verhältnis der Extinktionen A_{260} zu A_{280} die Reinheit der

Nukleinsäureprobe wider. Das Verhältnis sollte sich im Bereich zwischen 1,8 und 2 befinden.

2.2.2.3 Reverse Transkription

Bei der Reverse Transkription (RT) wird RNA mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Bestandteil von SuperScript™ II Reverse Transcriptase) in einen komplementären DNA-Strang (*complementary desoxyribonucleic acid, cDNA*) umgeschrieben. Die cDNA stellt die Grundlage für die Polymerase-Kettenreaktion dar.

Im ersten Schritt ist 1 µg RNA mit 12 µl destilliertem Wasser (dH₂O) aufgefüllt worden. Dazu wurde zusätzlich 1 µl DNase I recombinant [10 U/µl] und 1 µl RNasin®plus RNase Inhibitor [40 U/µl] hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe im Thermocycler für 30 min bei 37 °C und für 10 min bei 70 °C erhitzt und danach auf 4 °C herunter gekühlt.

Im Anschluss sind der Probe 26 µl des Enzym-Mix (siehe Tabelle 16) hinzugegeben worden. Danach erfolgte eine Erhitzung für 60 min auf 37 °C und dann eine Denaturierung für 10 min bei 95 °C. Zum Schluss wurde der Probenansatz wieder auf 4 °C herunter gekühlt und die entstandene cDNA bei -20 °C gelagert.

Substanzen	Einsatz je Probe [µl]	Ausgangskonzentration
dT15-Primer	8	1,1x 10 ⁻⁵ M
dNTPs	4	0,01 M
FS-Puffer	8	5x
DTT	4	0,1 M
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	2	200 U/µl

Tabelle 16 Substanzen für die Herstellung des Enzym-Mix für die Reverse Transkription

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist es möglich gezielt bestimmte Sequenzen der DNA *in vitro* zu amplifizieren. Mittels einer DNA-abhängigen Polymerase und DNA-Oligonukleotiden (Primer) wird anhand der Nukleinsäure-Matritze ein komplementärer DNA-Strang erzeugt. Die PCR kann in drei Teilschritte unterteilt werden, die im Folgenden erläutert werden sollen.

Zuerst erfolgt die Erhitzung der doppelsträngigen DNA auf 95 °C, um die Stränge voneinander zu trennen. Bei diesem Prozess kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen (Denaturierung).

Danach wird eine Primer-spezifische Temperatur ausgewählt, welche eine Anlagerung der Primer an die komplementären Stränge der Matrizen-DNA ermöglicht. Dabei ist einer der Primer komplementär mit dem 5'-Ende der Matrize, der andere Primer komplementär zum 3'-Ende, sodass dazwischen ein definierter DNA-Abschnitt vorliegt (*Annealing*). Die spezifische Temperatur ist dabei durch die Sequenz und Länge der Primer definiert. Meist liegt sie unterhalb des Schmelzpunktes der Primer. Dies entspricht in der Regel einer Temperatur von 55 - 65 °C.

Beim dritten Schritt der PCR (DNA-Synthese) synthetisiert die DNA-Polymerase mithilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) den komplementären Strang zur Matrize (Elongation). Die DNA-Polymerase beginnt am freien 3'-OH-Ende des angelagerten Primers mit der Synthese in 5'-3'-Richtung. Die Elongation wurde bei 72°C durchgeführt, was dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase entspricht. Die *Taq*-Polymerase ist in der vorliegenden Arbeit als DNA-Polymerase verwendet worden und wurde aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq.*) isoliert. Nach der Elongation wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C herunter gekühlt und die einzelnen Reaktionsschritte zyklisch wiederholt um eine exponentielle Amplifizierung der Matrize zu ermöglichen.

Als Kontrolle der semiquantitativen PCR-Methode diente die Amplifikation vom *housekeeping gene* L7, welches ein ribosomales, in allen Geweben exprimiertes Protein darstellt. Der in dieser Arbeit verwendete Standard-Reaktionsansatz für die PCR ist in Tabelle 17 und die PCR-Programme der jeweiligen zu untersuchenden Gene in Tabelle 18 zusammengefasst.

Substanzen	Einsatz je Probe [µl]	Ausgangskonzentration
DEPC H ₂ O	10,5	
Sense-Primer	0,3	20 µM
Antisense-Primer	0,3	20 µM
Puffer	1,5	10x
dNTPs	1,2	1 mM
cDNA	1,2	10-100 ng/µl
Taq-Polymerase	0,075	5 U/µl
Gesamtvolumen	15	

Tabelle 17 Substanzen für die Herstellung des PCR-Ansatzes

Gen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	Target-Größe [bp]
ER α	15 sec, 95 °C	15 sec, 58 °C	5 sec, 72° C	30	215
ER β	15 sec, 95 °C	15 sec, 58 °C	5sec, 72 °C	35	393
L7	15 sec, 95 °C	15 sec, 54 °C	5 sec, 72 °C	22	357

Tabelle 18 PCR-Programme

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Agarosegel hat dabei die Funktion eines Siebes. Mit zunehmender Agarose-Konzentration verkleinern sich die Poren des Gels, durch welche sich die Nukleinsäuren bewegen müssen. Das Wandern und Auftrennen der negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel gelingt durch das Anlegen einer Gleichspannung. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller als größere Moleküle, was eine Auftrennung der Nukleinsäuren anhand der Größe ermöglicht.

In dieser Arbeit sind 1,5 %-ige Agarose-Gele angefertigt worden. Hierfür sind 6 g Agarose mit 400 ml 1/2x TBE aufgekocht und im Anschluss 30 ml davon luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingestecktem Kamm gegossen worden. Nach erfolgter Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit 1/2x TBE aufgefüllt und der Kamm herausgezogen. Es sind je 10 μ l der Nukleinsäureproben mit 2 μ l Agarose-Laufpuffer gemischt und anschließend 10 μ l davon in die entstandenen Geltaschen pipettiert worden. Als Größenstandard diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp *Ladder*, Invitrogen). Im Anschluss liefen die Gele bei 95 V für durchschnittlich 45 min.

2.2.2.6 Auswertung

Nach der Auftrennung der DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte der Nachweis der Nukleinsäuren mithilfe des interkalierenden und fluoreszierenden Farbstoffs Ethidiumbromid. Die Gele sind dazu für 20 min im Ethidiumbromid-Bad gefärbt und in ddH₂O gewaschen worden. Die zu detektierende Wellenlänge der UV-Strahlung liegt bei $\lambda = 302$ nm. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Software Bio Doc Analyze 2.1 von Biometra.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Die Proteinexpression sowohl des ER α und ER β als auch die Proteinexpression des membranständigen CXCR4 in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurde qualitativ und semiquantitativ mithilfe des Western Blots untersucht. Die

Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 diente dabei als Kontrolle. Der semiquantitative Nachweis erfolgte durch einen Aktin-Abgleich. Aktin stellt ein Protein dar, welches ubiquitär im Zytosol exprimiert wird, unabhängig von Zellstadium, Zelltyp und äußeren Einflüssen. Da es somit keinen regulatorischen Prozessen unterliegt, kann es als semiquantitative Kontrolle des Western Blots dienen.

2.2.3.1 Zellkultivierung zur Proteingewinnung

Zum einen wurden die TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937 direkt aus der Zellkultur verwendet, um die Proteinexpression des ER α und ER β analysieren zu können. Zum anderen sind die TNBC-Zellen aus dem Invasionsassay verarbeitet worden, um Diskrepanzen in der CXCR4-Proteinexpression zu untersuchen. Die entsprechenden Zelllinien wurden zunächst wie in Kap. 2.2.1.1 beschrieben, kultiviert, trypsinisiert, ausgezählt und in Versuchsmedium resuspendiert. Im Anschluss sind diese in 6-Well-Platten in Versuchsmedium ausgesät und für 24 h mono- oder kokultiviert worden.

Für die Rezeptorstatusbestimmung des ER α und ER β sind die Zellen nach 24 h in Monokultur mit Versuchsmedium geerntet und aufbereitet worden (siehe Kap.2.2.3.2). Für die Untersuchung der CXCR4-Proteinexpression wurden die TNBC-Zellen nach 24 h laut Kap. 2.2.1.3 zu einem Invasionsassay zusammengefügt und für weitere 24 h mit dem ER β -Agonisten Liquiritigenin inkubiert (siehe Kap. 2.2.1.4 und Tabelle 14). Anschließend erfolgte die Proteinisolation (siehe Kap. 2.2.3.2).

2.2.3.2 Proteinisolation

1. TNBC-Zellen aus matrigelbeschichteten *Inserts*:

Die matrigelbeschichteten *Inserts* mit den Mammakarzinomzellen sind nach 24 h Inkubation mit Liquiritigenin in neue *Well*-Platten überführt und das überflüssige Medium aus den *Inserts* abgesaugt und verworfen worden. Anschließend konnte mithilfe eines Spatels das Matrigel und die darin noch befindlichen TNBC-Zellen vorsichtig abgeschabt und in ein 1,5 ml-Eppendorfcup pipettiert werden. In dieses wurde zuvor 400 μ l PBS vorgelegt. Der gesamte Vorgang der Proteinisolation ist auf Eis durchgeführt worden. Im Anschluss sind die Proben bei 12.000 g für 25 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert worden. Bei diesem Vorgang wurden die Zellen vom Matrigel und PBS getrennt und setzten sich am Boden des Eppendorfcups ab. Nachdem der Überstand abgesaugt und verworfen wurde, verblieb das Zellpellet mit einem Restbestand Matrigel am Boden des Eppendorfcups.

2. Trennung von membranständigen und zytosolischen Proteinen

Die Trennung von membranständigen und zytosolischen Proteinen war für den Nachweis des membranständigen Proteins CXCR4 erforderlich. Dafür wurde das Detergens Triton X-114™-Puffer verwendet. Es sind 200 µl eines Gemisches aus 2 %-igen Triton X-114™-Puffer (Sigma-Aldrich) und Protease-Inhibitor (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:100 in jedes Eppendorfcup mit Zellpellet und Restbestand Matrigel hinzugegeben und auf- und abpipettiert worden. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Danach sind die Proben über Nacht für mindestens 12 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert worden. Anschließend wurden die Proben nochmals bei 12.000 g für 25 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, um letzte unlösliche Rückstände abzutrennen. In der Zwischenzeit sind für jede Probe ein neues Eppendorfcup für die Membranphase und ein Eppendorfcup für die zytosolische Phase vorbereitet worden. Danach wurden 200 µl des Überstandes aus dem ursprünglichen Eppendorfcup vorsichtig abgenommen und in das vorbereitete Eppendorfcup überführt und für 10 min bei 37 °C und 800 rpm im Thermomixer geschüttelt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Zentrifugation der Probe für 5 min und 13.000 g bei Raumtemperatur. Bei diesem Schritt erfolgte die Auftrennung in zwei Phasen, wobei die obere Phase die zytosolische Phase und die untere Phase die membranständige Phase darstellte. Die obere zytosolische Phase wurde vorsichtig abgenommen und in das dafür vorbereitete Eppendorfcup überführt. Die untere membranständige Phase verblieb im Eppendorfcup. Im Anschluss sind für die Proteinfällung 600 µl Aceton zur zytosolischen Phase und 200 µl Aceton zur membranständigen Phase langsam hinzugegeben und auf- und abpipettiert worden. Die Proteine wurden im Anschluss bei -20 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag sind die Proben erneut bei 12.000 g für 25 min bei 4 °C in der Kühlzentrifuge zentrifugiert worden. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das am Boden des Eppendorfcups verbliebene Proteinpellet ist in 2x NuPAGE®LDS Sample Buffer resuspendiert und danach für 10 min bei 95 °C und 800 rpm im Thermomixer denaturiert worden. Die Proben weiterverarbeitet oder bei -20 °C in Stickstoff gelagert.

3. TNBC-Zellen aus Wellplatten:

Nach 24 h in Monokultur mit Versuchsmedium wurde 1 ml Trypsin/EDTA auf die Mammakarzinomzellen der *Wells* gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min ist die Reaktion durch Zugabe von 4 ml Nährmedium gestoppt worden. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert. Der Überstand ist verworfen und das Zellepellet in 1 ml PBS resuspendiert worden. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit anschließender Resuspension in 1 ml PBS. Nach einer letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2x NuPAGE® LDS Sample Buffer resuspendiert und für

10 min bei 95 °C und 800 rpm im Thermomixer denaturiert. Am Ende dieses Vorganges wurden die Proben auf Eis gestellt und danach entweder sofort verarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) ist ein Verfahren, welches Proteine nach ihrer Größe auftrennt. SDS stellt ein anionisches Detergens dar, das an Proteine bindet, welche dadurch eine negative Ladung bekommen.

Bei dem verwendeten Verfahren nach Laemmli (Laemmli 1970) werden die Proben in einem Sammelgel mit 5 % Polyacrylamid (siehe Tabelle 19) konzentriert und danach in einem 10 %-igem Trenngel (siehe Tabelle 20) separiert. Für die SDS-PAGE ist die Mini-PROTEAN III *Electrophoresis Cell* Apparatur von Bio-Rad verwendet und nach Herstellerangaben aufgebaut worden. Die Apparatur wurde mit 500 ml SDS Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. In die Geltaschen sind 20 - 40 µl des Protein-Puffer-Gemisches pipettiert worden. Als Größenstandard wurde zusätzlich 5 µl PeqGOLD Protein-Marker V in eine Geltasche aufgetragen. Im Anschluss sind die Proteine bei 80 V für 30 min konzentriert und bei 150 V für 40 min ihrer Größe entsprechend aufgetrennt worden. Nun konnten die aufgetrennten Proteine im Western Blot-Verfahren auf eine PVDF-(Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen und nachgewiesen werden.

Material	Einsatz
ddH ₂ O	3,1 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	0,5 ml
1,0 mM Tris	1,3 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TMED	4 µl

Tabelle 19 **Zusammensetzung des 5 %igen Sammelgels**

Material	Einsatz
ddH ₂ O	5,3 ml
Prosieve 50 Gel Solution (Cambrex)	2,0 ml
1,0 mM Tris	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TMED	4 µl

Tabelle 20 Zusammensetzung des 10%igenTrenngels (Ansatz für 2 Gele)

2.2.3.4 Western Blot

Die Western Blot-Methode beschreibt die Übertragung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschließend mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können.

Als Trägermembran diente eine PVDF-Membran (Immobilon®-P Membrane, Millipore), welche mit Methanol aktiviert wurde. Nach Abschluss der Gelelektrophorese ist das Sammelgel verworfen worden. Das verbliebene Trenngel wurde mit ddH₂O gewaschen und danach 2 - 5 min in Transferpuffer inkubiert.

Die verwendete Apparatur (Bio-Rad) ist gemäß Herstellerangaben aufgebaut worden. Dabei wurde das SDS-Gel luftblasenfrei auf die PVDF-Membran aufgebracht und zwischen je zwei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere (Whatman, Schleicher & Schuell) gelegt. Dieses Paket wurde zwischen zwei Schaumstoffschichten gespannt, wobei die PVDF-Membran in Anodenrichtung angeordnet sein musste. Im Anschluss wurden die Proteine für 1 h bei 100 V auf die PVDF-Membran transferiert.

2.2.3.5 Detektion, Visualisierung und Auswertung

Die Membran ist nach dem *Blotting* mit TBST gewaschen worden. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem Blockierungsreagenz (*Blocking-Solution*) für 1 h, um die noch freien Bindungsstellen der Membran zu binden und zu blockieren. Nach beendeter Blockierung sind Schale und Membran mit TBST für 5 min gewaschen worden. Anschließend wurde die Membran für 12 h bei 4 °C mit dem vorverdünnten Primäantikörper (siehe Tabelle 9) inkubiert. Der Primäantikörper ist nach 12 h abgenommen und verworfen worden. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für jeweils 20 min mit TBST gewaschen. In dieser Zeit konnte der Peroxidase-gekoppelte Sekundäantikörper in gewünschter Konzentration angesetzt werden (siehe Tabelle 10). Nach den Waschschrinen ist die Membran bei

Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert worden. Nach erneuter Durchführung der drei Waschgänge für je 20 min mit TBST, konnte die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers mithilfe der *enhanced chemiluminescens reaction* (ECL-Reaktion) durchgeführt werden. Durch die Peroxidase zeigt ECL bei der katalytischen Umsetzung eine Chemilumineszenz mit einem Maximum bei $\lambda = 430 \text{ nm}$, mit der Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm™MP, GE Healthcare Limited) belichtet werden können. Die Exposition erfolgte in einer Röntgenfilmkassette (X-Ray GmbH). Der Film wurde anschließend in einer Dunkelkammer im X-Ray Film Prozessor SRS-101A entwickelt. Mithilfe der Kodak Digital Science 1D Software wurden die Ergebnisse festgehalten und ausgewertet.

2.2.4 Zytologische Färbung

2.2.4.1 Immunzytologische Färbung der Zelllinien

Für den immunzytologischen Nachweis des ER α und des ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937, sowie der Kontrollgruppe MCF-7 ist ein monoklonaler Primärantikörper gegen ER α und ER β verwendet worden. Dafür wurden die Zellen auf einen Objektträger (Lab-Tek™ Chamber Slides™ Systeme, Nunc) mit einer 70%-igen Konfluenz ausgesät und über 24h kultiviert. Die immunzytochemische Färbung ist mit dem Histostain® Bulk Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Die monoklonalen Primärantikörper gegen den ER α und ER β inkubierten bei 4 °C über Nacht. Mithilfe der AEC + *High Sensitivity* Substrate Chromogen-Lösung der Firma Dako erfolgte die Detektion des Primärantikörpers. Die Objektträger wurden nach einer belichtungsfreien Einwirkdauer von 30 min mit ddH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte der Waschvorgang mittel Hämalaun-Lösung für 30 sec. Eine Blaufärbung der Proben erfolgte mittels Leitungswasser, das Eindecken der Objektträger mittels Aquatex® der Firma Merck. Mithilfe des Mikroskop IX 51 (Olympus) wurden die gefärbten Zellen fotografiert und ausgewertet.

2.2.4.2 Mikroskopische Auswertung der Kokultur

Nach 72 h (t_{72}) wurde bei den HCC1806-Zellen und nach 96 h (t_{96}) bei den HCC1937-Zellen die Kokultur beendet und die Anzahl der invadierten Zellen bestimmt, die sich adhären an der Unterseite der *Insert*-Membran befanden. Hierfür sind die TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937 unterhalb des Filters mit Methanol fixiert und anschließend in mehreren Schritten mit Mayers-Hämalaun-Lösung angefärbt worden (siehe Tabelle 21). Nach der Hämalaunfärbung ist das Matrigel mit den darin befindlichen Mammakarzinomzellen vorsichtig mithilfe eines Wattestäbchens von der *Insert*-Membran

abgeschabt worden. Somit konnten nur die Zellen haften bleiben, die bereits durch das Matrigel und die Membran hindurch gewandert waren. Anschließend wurde die Membran aus dem *Insert* heraus gestanzt und auf einem Objektträger mittels Deckglas eingedeckelt. Die Deckgläser auf den gefärbten Membranen wurden mit einem Kreuz versehen und somit in vier gleichgroße Quadranten eingeteilt. Später sind alle Quadranten vollständig am Mikroskop IX 51 (Olympus) angeschaut und fotografiert worden. Ein selbständiges Auszählen erfolgte mithilfe der Software Axio Vision 3.1.

Ablauf	Zeit [min]	Menge [ml]
1. PBS Waschschrift	5	1
2. Spülung mit Aqua dest.		1
3. Fixierung mit Methanol 100 %	10 - 15	1
4. Spülung mit Aqua dest		1
5. Hämaunlösung	5 - 10	1
6. Spülung mit Aqua dest		1
7. Bläuung mit Leitungswasser		1
8. Spülung mit Aqua dest		1

Tabelle 21 Immunzytologische Färbung

2.3 Scratch-Assay

Mithilfe des *Scratch*-Assays kann die Migrationsfähigkeit von Zellen *in vitro* festgestellt werden. In dieser Arbeit ist der Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Fähigkeit zur Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806 untersucht worden. Hierfür wurden ca. 30.000 HCC1806-Zellen je Well in MEM-Earl Kulturmedium mit Phenolrot in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 72 h wiesen die Zellen im Well eine Konfluenz von ungefähr 70 - 80 % auf. Daraufhin wurde das überstehende Medium vorsichtig aus dem Well abgesaugt und verworfen. Im Anschluss ist in jedem Well mit einer weißen Pipettenspitze (10 μ l) ein definierter Defekt (*Scratch*) von ca. 1 mm im Zellrasen gesetzt worden. Anschließend sind die Zellen in den Wells mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) und eine Kontrolle ohne Liquiritigenin jedoch mit Versuchsmedium inkubiert worden. Dies entsprach dem Zeitpunkt $t = 0$ h. Die Rückseite vom Well ist mit einem Raster versehen worden, sodass der gesetzte *Scratch* unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte. Die Breite des *Scratches* ist zum Zeitpunkt $t = 0$ h, $t = 24$ h und $t = 48$ h unter dem Mikroskop angeschaut, ausgemessen und fotografiert worden. Die Auswertung der Daten und

Auftragung im Graphen erfolgte anschließend mithilfe der Software GraphPad Prism® (Version 5.00).

2.3.1 Dokumentation und statische Analysen

Alle Ergebnisse dieser Arbeit wurden aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit unterschiedlichen Zellpassagen gewonnen ($n = 3$). Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten diente die Software GraphPad Prism® (Version 5.00). Als statistische Testverfahren wurden der *one-way* ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test oder der t-Test (gepaart) verwendet. Die mikroskopische Auswertung der Kokultur und *Scratch*-Assays erfolgte mithilfe des Mikroskops (Olympus) und der Software Axio Vision (Version 3.1). Die Auszählung der einzelnen Zellen sowie das Ausmessen der *Scratch*-Breite konnte mit der Software ImageJ (Version 1.45s) durchgeführt werden. Die Dokumentation und Auswertung der Agarose-Gele erfolgte mithilfe des UV-Transilluminators von Biometra und der Software Bio Doc Analyze 2. Für die Dokumentation und Auswertung der Western Blots ist die Software Kodak Digital Science 1D genutzt worden.

3 Ergebnisse

3.1 Expression des ER α und ER β

Zunächst wurde die Expression des ER α und ER β in den verwendeten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 sowie der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 als Kontrollzelllinie untersucht.

3.1.1 mRNA-Expression des ER α und ER β

Die Expression des ER α und ER β wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Das *housekeeping gene* L7 diente hierbei als Kontrolle. Dabei wurde die mRNA-Expression des ER α und ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nachgewiesen (siehe Abb. 2).

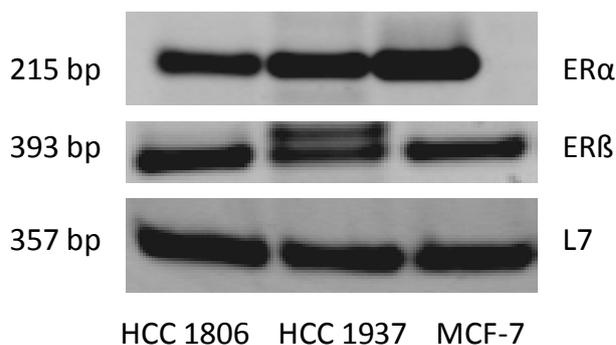


Abb. 2: Expression des ER α und ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Die Expression des ER α und ER β wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente das *housekeeping gene* L7.

3.1.2 Immunzytochemischer Nachweis des ER α und des ER β

Nachdem die Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene analysiert worden ist, ist diese anschließend mithilfe einer immunzytologischen Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen den ER α und ER β untersucht worden. Als Kontrolle diente die Immunfärbung ohne Primärantikörper (siehe Abb. 3 A, D, G). In den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 konnte eine deutliche ER β -Antigenität (siehe Abb. 3 C, F), jedoch keine ER α -Antigenität (siehe Abb. 3 B, E) nachgewiesen werden. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 diente als Positivkontrolle und zeigte sowohl ER β -Antigenität (siehe Abb. 3 I) als auch ER α -Antigenität (siehe Abb. 3 H).

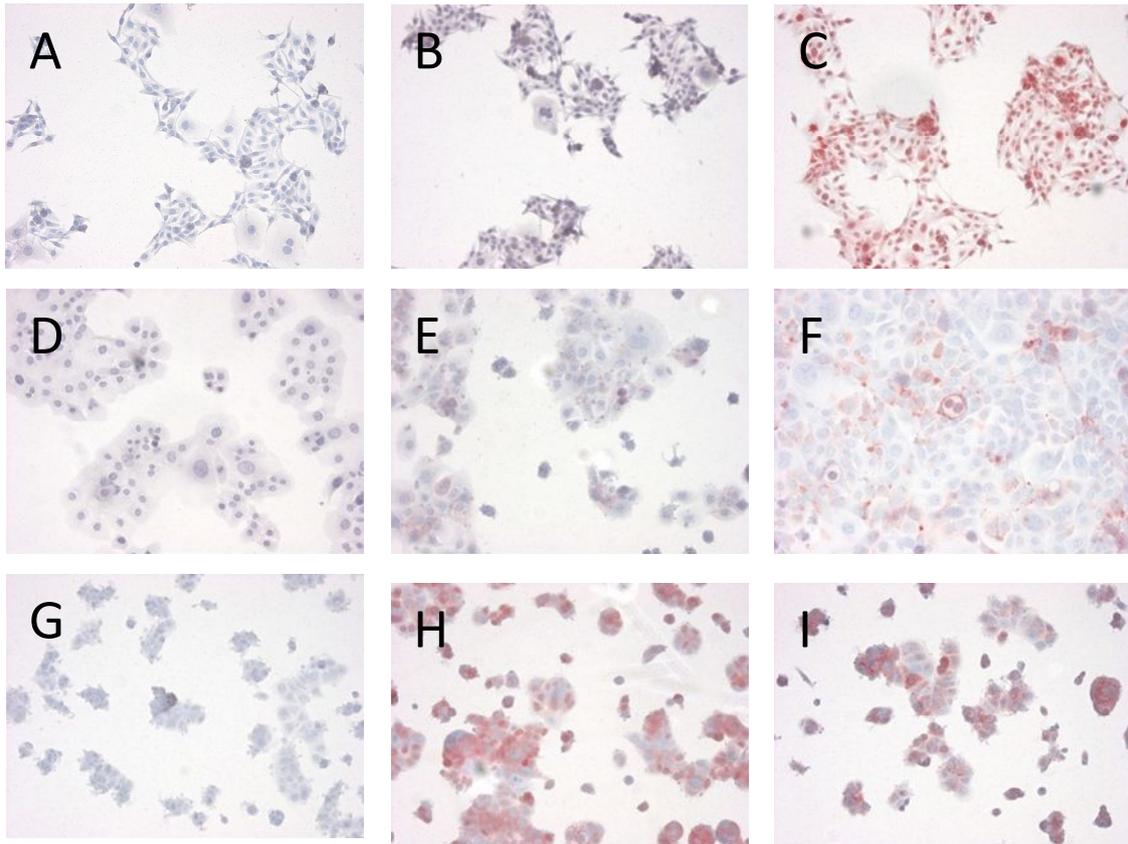


Abb. 3: Immunzytochemischer Nachweis des ER α und ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Der immunzytochemische Nachweis des ER α (B:HCC1806, E: HCC1937, H: MCF-7) und des ER β (C: HCC1806, F: HCC1937, I: MCF-7) erfolgte durch immunzytologische Färbung mit spezifischen Antikörpern. Als Kontrolle wurde die Immunfärbung ohne Primärantikörper durchgeführt (A: HCC1806, D: HCC1937, G: MCF-7).

3.1.3 Nachweis der Proteinexpression des ER α und ER β

Mithilfe des Western Blots konnte die ER α -Proteinexpression in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7, jedoch nicht in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4 (A)). Die ER β -Proteinexpression wurde in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 nachgewiesen (siehe Abb. 4 (B)).

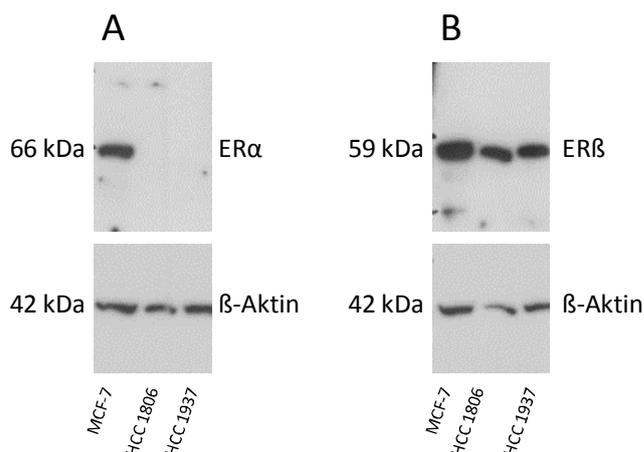


Abb. 4: Nachweis der Proteinexpression des ER α (A) und des ER β (B) in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 sowie der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7. Die Proteinexpression des ER α und ER β wurde mittels Western Blot nachgewiesen. Aktin diente als *Ladder*-Kontrolle.

3.2 Einfluss von ER β -Agonisten auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur

Mithilfe des Kokultur-Systems sollte untersucht werden, ob die ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 einen hemmenden Einfluss auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur haben. Zunächst wurde die Invasion dieser Zelllinien in Kokultur sowohl mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 als auch ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 untersucht.

3.2.1 Untersuchung des Invasionsverhaltens der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur

Es konnte zunächst mikroskopisch nach Hämalaunfärbung gezeigt werden, dass die Anzahl der invadierten Zellen bei Kokultivierung der TNBC-Zelllinien HCC1806 für 72 h und HCC1937 für 96 h (siehe Abb. 5 B, D) mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 gegenüber der Kontrolle (siehe Abb. 5 A, C) ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 deutlich anstieg. Bei Kokultivierung der TNBC-Zelllinie HCC1806 mit der MG63 Zelllinie konnte ein signifikanter Anstieg (KK = $3.680,0 \pm 610,60$ % SEM, $p < 0,001$) der Invasion im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) gezeigt werden (siehe Abb. 6 A). Die TNBC-Zelllinie HCC1937 zeigte in der Kokultur ebenfalls einen signifikanten, aber geringeren Anstieg (KK = $602,0 \pm 104,0$ % SEM, $p < 0,001$) der Invasion gegenüber der Kontrolle (K = 100 %) als die Zelllinie HCC1806 (siehe Abb. 6 B).

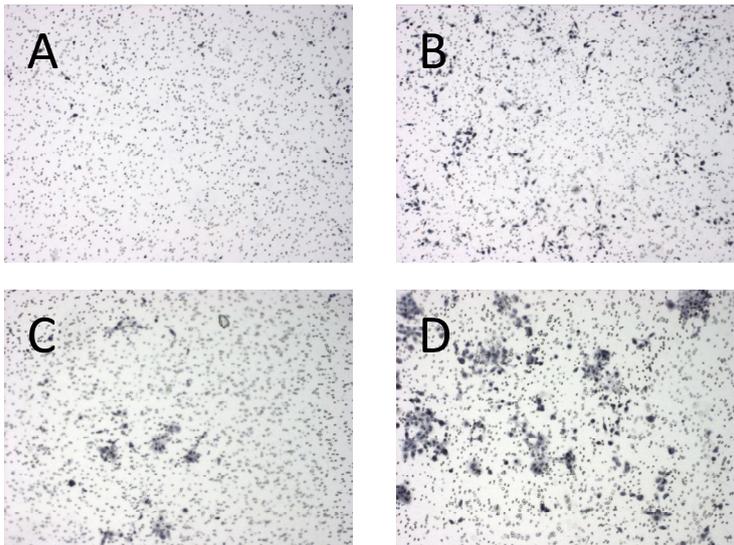


Abb. 5: Invasion monokultivierter und kokultivierter TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 (Hämalaunfärbung). Die HCC 1806 Zellen wurden für 72 h und die HCC1937-Zellen für 96 h ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 (Kontrolle) kultiviert (A: HCC1806, C: HCC1937) und mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (Kokultur) kultiviert (B: HCC1806, D: HCC1937).

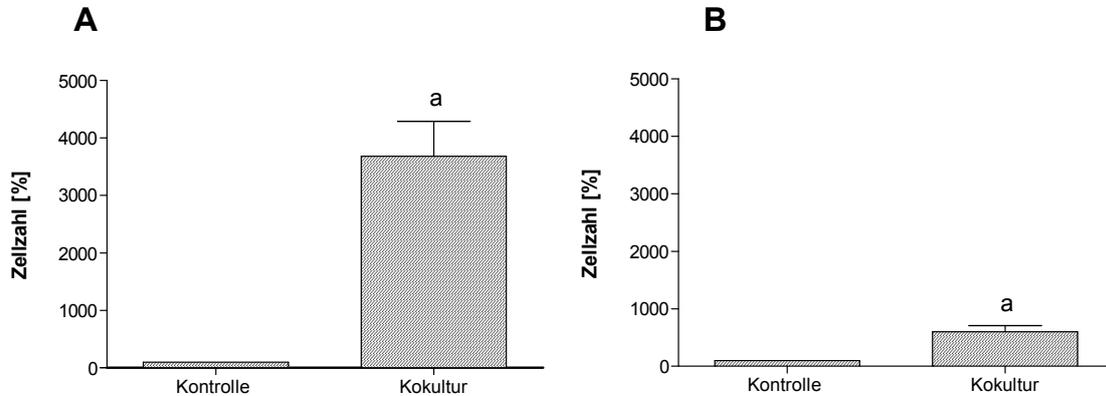


Abb. 6: Invasion von monokultivierten und kokultivierten TNBC-Zellen HCC1806 (A) und HCC1937 (B). Die HCC1806-Zellen wurden für 72 h und die HCC1937-Zellen für 96 h ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 (Kontrolle) und mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (Kokultur) kultiviert. Angegeben sind MW \pm SEM, n = 24 biologische Replikate, Signifikanzen wurden mittels t-test (gepaart) errechnet: (a) $p < 0,001$ vs. Kontrolle.

3.2.2 Einfluss des ERß-Agonisten Liquiritigenin auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur

Wie schon im vorangegangenen Versuch zeigte sich, dass die Anzahl der invadierten TNBC-Zellen HCC1806 in Kokultur für 72 h mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 signifikant ($KK = 4.545,0 \pm 1.090,0 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle ($K = 100 \%$) ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 erhöht war (siehe Abb. 7 A). Im Vergleich hierzu zeigte sich bei der TNBC-Zelllinie HCC1937 in Kokultur für 96 h mit der MG63 Zelllinie gleichfalls ein signifikanter ($KK = 852,0 \pm 290,5 \% \text{ SEM}$, $p < 0,05$) jedoch geringerer Invasions-Anstieg gegenüber der Kontrolle ($K = 100 \%$) als bei der TNBC-Zelllinie HCC1806 (siehe Abb. 8 A).

Nach Behandlung der kokultivierten TNBC-Zelllinie HCC1806 mit Liquiritigenin ($1 \times 10^{-11} \text{ M} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$) zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ h}$ und $t = 48 \text{ h}$ über insgesamt 72 h wurde die Invasion dieser Zelllinie dosisabhängig im Vergleich zur Kokultur ($KK = 100 \%$) bei bestimmten Konzentrationen signifikant gehemmt ($1 \times 10^{-11} \text{ M}$: $96,0 \pm 11,5 \% \text{ SEM}$, n.s. vs. Kokultur; $1 \times 10^{-9} \text{ M}$: $79,0 \pm 6,8 \% \text{ SEM}$, n.s. vs. Kokultur; $1 \times 10^{-8} \text{ M}$: $68,2 \pm 22,2 \% \text{ SEM}$, $p < 0,05$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-7} \text{ M}$: $67,4 \pm 8,0 \% \text{ SEM}$, $p < 0,01$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-6} \text{ M}$: $48,1 \pm 6,8 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-5} \text{ M}$: $18,4 \pm 3,5 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 7 B).

Weiterhin war nach Inkubation der kokultivierten TNBC-Zelllinie HCC1937 mit Liquiritigenin ($1 \times 10^{-11} \text{ M} - 1 \times 10^{-5} \text{ M}$) zu den Zeitpunkten $t = 0 \text{ h}$ und $t = 48 \text{ h}$ über insgesamt 96 h im Vergleich zur Kokultur ($KK = 100 \%$) ein signifikanter Rückgang der Invasion bei allen verwendeten Konzentrationen zu beobachten ($1 \times 10^{-11} \text{ M}$: $72,7 \pm 5,5 \% \text{ SEM}$, $p < 0,05$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-9} \text{ M}$: $54,3 \pm 8,8 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-8} \text{ M}$: $45,7 \pm 13,8 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-7} \text{ M}$: $48,6 \pm 5,6 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-6} \text{ M}$: $44,5 \pm 14,5 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur; $1 \times 10^{-5} \text{ M}$: $46,8 \pm 5,2 \% \text{ SEM}$, $p < 0,001$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 8 B).

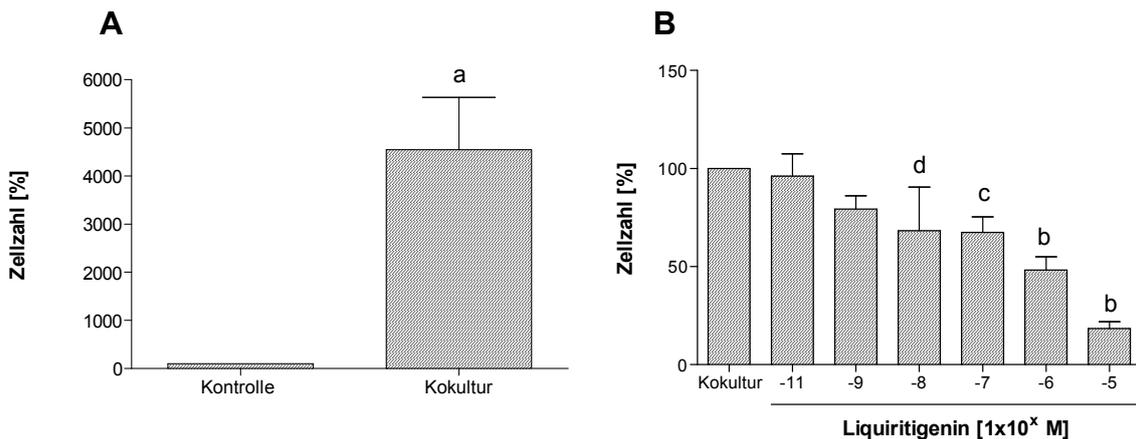


Abb. 7 Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1806-Zellen (A) und Einfluss von Liquiritigenin auf die Invasion kokultivierter HCC1806-Zellen (B). In der Kontrolle wurden die HCC1806-Zellen ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 und in der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 für 72 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 48$ h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Angegeben sind $MW \pm SEM$, $n = 8$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels t-test (gepaart) errechnet (A): (a) $p < 0,01$ vs. Kontrolle sowie mittels one-way ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test (B): (b) $p < 0,001$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,01$ vs. Kokultur, (d) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

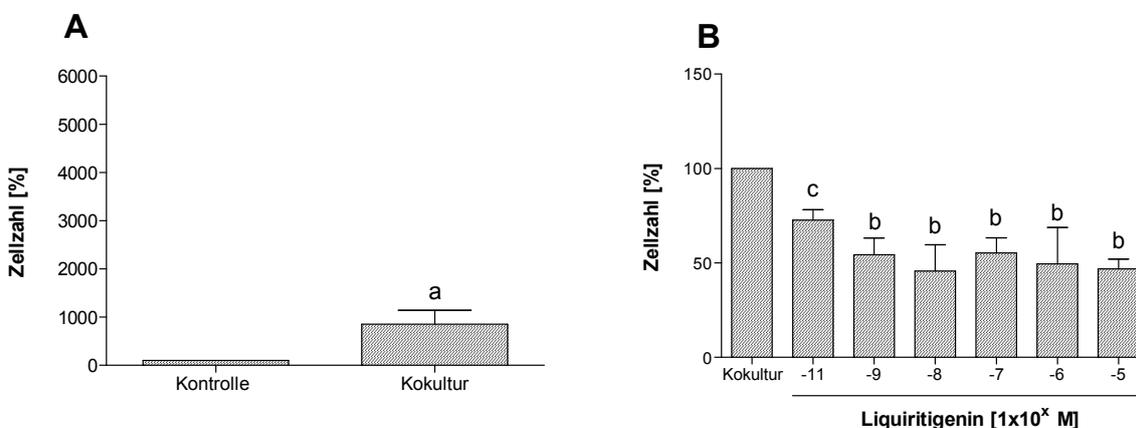


Abb. 8: Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1937-Zellen (A) und Einfluss von Liquiritigenin auf die Invasion kokultivierter HCC1937-Zellen (B). In der Kontrolle wurden HCC1937-Zellen ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 und in der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 für 96 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 48$ h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Angegeben sind $MW \pm SEM$, $n = 6$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels t-test (gepaart) errechnet (A): (a) $p < 0,05$ vs. Kontrolle sowie mittels one-way ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test (B): (b) $p < 0,001$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

3.2.3 Einfluss des ER β -Agonisten ERB-041 auf die Invasion der TNBC-Zelllinie HCC1937 in Kokultur

Bei Kokultivierung der TNBC-Zelllinie HCC1937 mit der MG63 Zelllinie für 96 h zeigte sich eine signifikante Steigerung (KK = $635,0 \pm 136,7$ % SEM, $p < 0,01$) der Invasion dieser Zellen gegenüber der Kontrolle (K = 100 %) ohne die MG63 Zelllinie (siehe Abb. 9 A).

Durch eine Behandlung der kokultivierten TNBC-Zelllinie HCC1937 mit ERB-041 (1×10^{-11} M - 1×10^{-5} M) zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 48$ h über insgesamt 96 h wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der Invasion gezeigt. Eine signifikante Hemmung konnte bei nachstehenden Konzentrationen gegenüber der Kokultur (KK = 100 %) beschrieben werden (1×10^{-11} M: $80,5 \pm 12,2$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $77,2 \pm 5,0$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-8} M: $64,7 \pm 13,8$ % SEM, $p > 0,05$ vs. Kokultur, 1×10^{-7} M: $62,5 \pm 10,0$ % SEM, $p < 0,01$ vs. Kokultur; 1×10^{-6} M: $60,0 \pm 6,1$ % SEM, $p < 0,01$ vs. Kokultur; 1×10^{-5} M: $42,0 \pm 4,5$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 9 B).

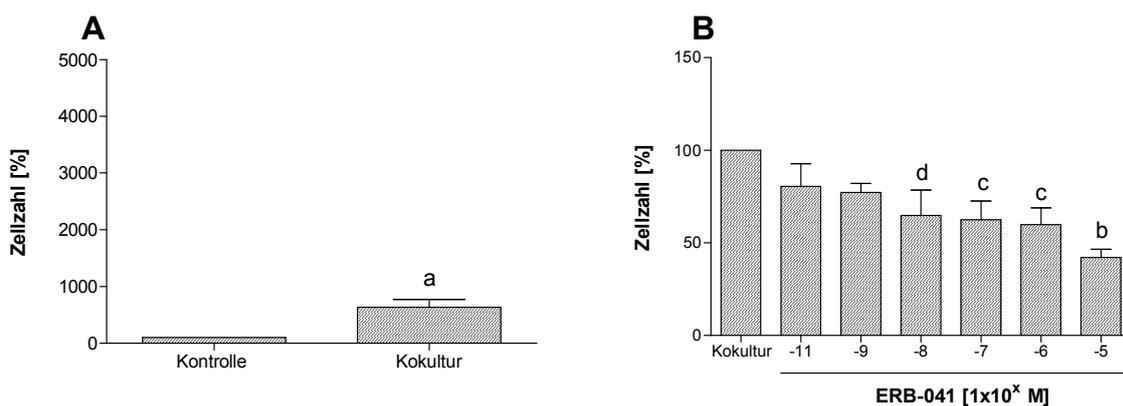


Abb. 9: Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1937-Zellen (A) und Einfluss von ERB-041 auf die Invasion kokultivierter HCC1937-Zellen (B). In der Kontrolle wurden die HCC1937-Zellen ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 und in der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 für 96 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 48$ h dosisabhängig mit ERB-041 (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Angegeben sind MW und \pm SEM, $n = 4$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels t-test (gepaart) errechnet (A): (a) $p < 0,01$ vs. Kontrolle sowie mittels one-way ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test (B): (b) $p < 0,001$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,01$ vs. Kokultur, (d) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

3.2.4 Einfluss des ERß-Agonisten ERB-041 auf die Invasion der TNBC-Zelllinie HCC1806 in Kokultur

Die TNBC-Zelllinie HCC1806 zeigte während der Kokultur für 72 h mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 einen signifikanten Anstieg (KK = $1.731,0 \pm 385,0$ % SEM, $p < 0,01$) der Invasion im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) ohne die Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (siehe Abb. 10 A).

Die Behandlung der TNBC-Zelllinie HCC1806 mit ERB-041 (1×10^{-11} M - 1×10^{-5} M) zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 48$ h über insgesamt 72 h erbrachte keine dosisabhängige Hemmung der Invasion. Vielmehr zeigte sich ein wellenförmiger Verlauf der Anzahl von invadierten inkubierten HCC1806-Zellen gegenüber der Kokultur (KK = 100 %) mit Signifikanzen in allen Konzentrationen (1×10^{-11} M: $37,2 \pm 5,4$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $57,3 \pm 7,1$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur; 1×10^{-8} M: $34,3 \pm 14,4$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur; 1×10^{-7} M: $69,9 \pm 4,6$ % SEM, $p < 0,01$ vs. Kokultur; 1×10^{-6} M: $55,4 \pm 12,4$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur; 1×10^{-5} M: $39,4 \pm 4,8$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 10 B).

Aufgrund dieses Ergebnisses sind anschließend Versuche unter gleichen Bedingungen, jedoch zusätzlich weiteren geringeren Konzentrationen von ERB-041 (1×10^{-14} M - 1×10^{-5} M) durchgeführt worden, um eine in diesen Bereichen eventuell bestehende konzentrationsabhängige Wirkung der Substanz zeigen zu können (siehe Abb. 11). Der zuvor beschriebene wellenförmige Verlauf bestand jedoch weiterhin und es ließ sich keine dosisabhängige Inhibierung der Invasion nachweisen. Bei bestimmten Konzentrationen trat eine gegenüber der Kokultur (KK = 100 %) signifikante Hemmung der Invasionsfähigkeit der TNBC-Zelllinie HCC1806 auf (1×10^{-14} M: $54,07 \pm 9,49$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur, 1×10^{-13} M: $37,31 \pm 7,27$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-12} M: $31,3 \pm 13,49$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-11} M: $58,63 \pm 32,14$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur; 1×10^{-10} M: $36,27 \pm 8,31$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $38,33 \pm 11,85$ % SEM, $p < 0,01$ vs. Kokultur, 1×10^{-8} M: $62,55 \pm 28,36$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur, 1×10^{-7} M: $33,02 \pm 6,54$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur; 1×10^{-6} M: $41,46 \pm 7,26$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur; 1×10^{-5} M: $56,38 \pm 29,89$ % SEM, $p < 0,001$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 11).

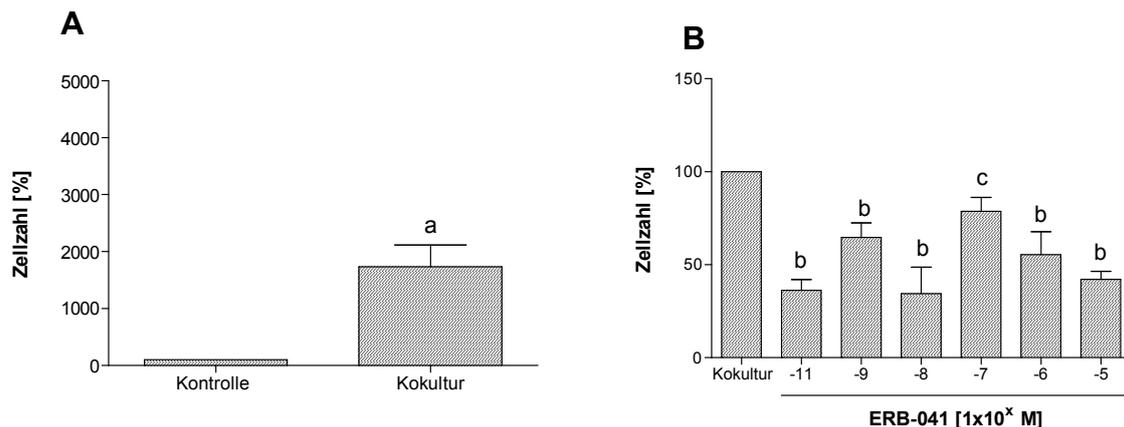


Abb. 10: Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1806-Zellen (A) und Einfluss von ERB-041 auf die Invasion kokultivierter HCC1806-Zellen (B). In der Kontrolle wurden die HCC1806-Zellen ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 und in der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 für 72 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 48$ h dosisabhängig mit ERB-041 (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Angegeben sind MW und \pm SEM, $n = 4$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels t-test (gepaart) errechnet (A): (a) $p < 0,01$ vs. Kontrolle sowie mittels one-way ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test (B): (b) $p < 0,001$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,01$ vs. Kokultur.

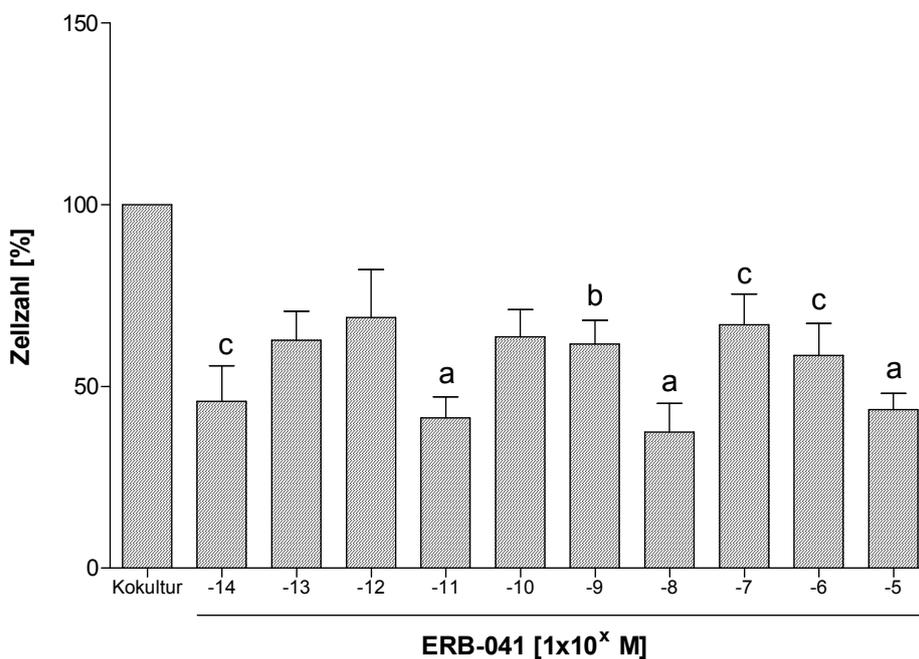


Abb. 11: Einfluss von ERB-041 auf die Invasion von kokultivierten HCC1806-Zellen. Die HCC1806-Zellen wurden in der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 für 72 h kultiviert und zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 48$ h dosisabhängig mit ERB-041 (1×10^{-14} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Angegeben sind MW \pm SEM, $n = 4$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels one-way ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test errechnet: (a) $p < 0,001$ vs. Kokultur, (b) $p < 0,01$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

3.3 Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806

Der Einfluss von Liquiritigenin auf die Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806 wurde mithilfe eines *Scratch-Assays* untersucht. Die HCC1806-Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h nach Durchführung des *Scratches* mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M - 1×10^{-5} M) und ohne Liquiritigenin (Kontrolle) inkubiert. Die Breite des *Scratches* ist zum Zeitpunkt $t = 0$ h, $t = 24$ h und $t = 48$ h mikroskopisch ausgemessen worden. Eine Abnahme der *Scratch*-Breite entsprach einer zunehmenden Migration. Zunächst zeigte sich mikroskopisch nach Inkubation mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M und 1×10^{-5} M) sowie mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme der *Scratch*-Breite, dies zeigte sich auch in der Kontrolle (siehe Abb. 12).

Nach Auswertung der Messergebnisse konnte gezeigt werden, dass bei Inkubation der TNBC-Zelllinie HCC1806 mit Liquiritigenin mit den Konzentrationen 1×10^{-7} M und 1×10^{-5} M gegenüber der Kontrolle (K = 100 %) eine Verringerung der Migration erreicht wurde (1×10^{-11} M: $62,4 \pm 20,4$ % SEM, n. s. vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $59,0 \pm 21,7$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-7} M: $67,0 \pm 17,0$ % SEM, n. s. vs. Kokultur; 1×10^{-5} M: $66,18 \pm 17,8$ % SEM) (siehe Abb. 13).

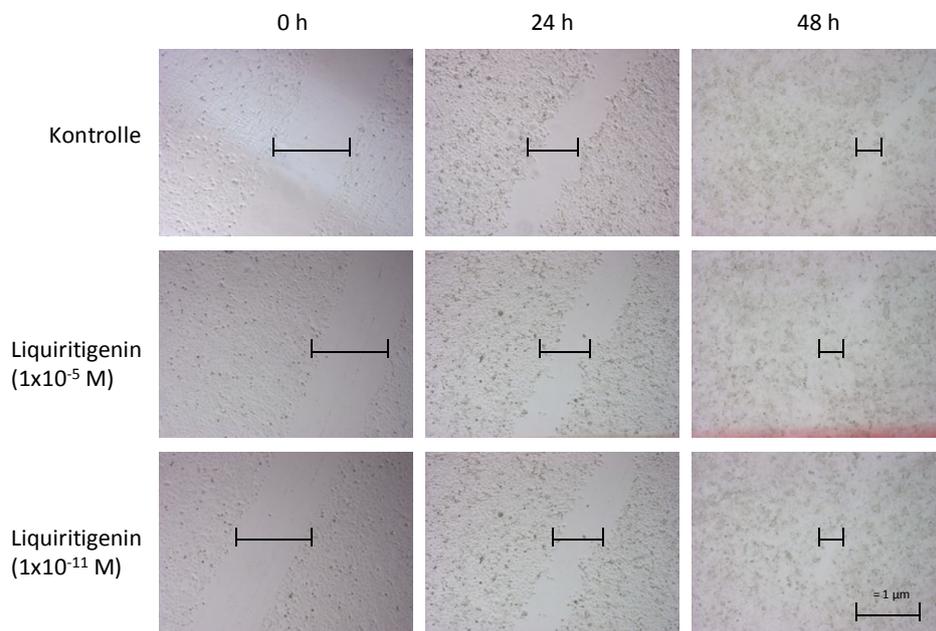


Abb. 12: Einfluss von Liquiritigenin auf die Migration der HCC1806-Zellen im *Scratch-Assay* (Mikroskopische Darstellung). Die HCC1806-Zellen wurden dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M und 1×10^{-5} M) und ohne Liquiritigenin (Kontrolle) inkubiert. Es wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h, $t = 24$ h und $t = 48$ h unter dem Mikroskop die *Scratch*-Breite ausgemessen.

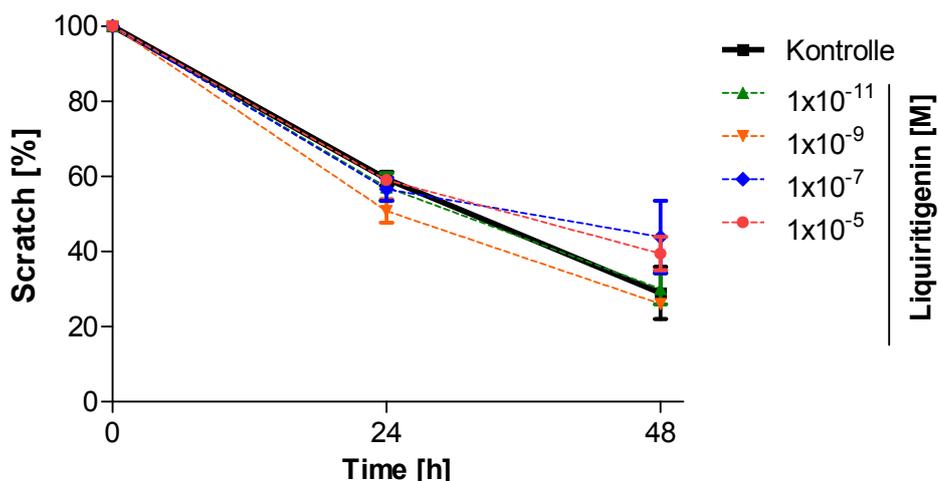


Abb. 13: Einfluss von Liquiritigenin auf die Migration der HCC1806-Zellen im Scratch-Assay. Die HCC1806-Zellen wurden dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) und ohne Liquiritigenin (Kontrolle) inkubiert. Es wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ h, $t = 24$ h und $t = 48$ h ein mikroskopisches Bild erstellt und die Scratch-Breite ausgemessen. Die gemessenen Werte wurden jeweils auf ihre Ausgangswerte zum Zeitpunkt $t = 0$ h in [%] bezogen und in der Grafik zu den Zeitpunkten $t = 0$ h, $t = 24$ h und $t = 48$ h dargestellt. Angegeben sind MW \pm SEM.

3.4 Einfluss der ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937

Der Einfluss der ER β -Agonisten auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zelllinien ist mithilfe des *AlamarBlue*® Assay untersucht worden.

3.4.1 Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937

Die TNBC-Zelllinie HCC1806 zeigte nach Kultivierung für 120 h und einer dosisabhängigen Behandlung mit dem ER β -Agonisten Liquiritigenin zu den Zeitpunkten $t = 24$ h und $t = 72$ h gegenüber den unbehandelten HCC1806-Zellen (Kontrolle = 100%) keine signifikante Veränderung der Proliferationsfähigkeit (1×10^{-11} M: $96,30 \pm 11$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-9} M: $107,0 \pm 5,0$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M: $98,4 \pm 1,0$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-5} M: $91,6 \pm 1,0$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle) (siehe Abb. 14 A).

Eine Kultivierung der TNBC-Zelllinie HCC1937 für 120 h und eine konzentrationsabhängige Behandlung dieser mit Liquiritigenin zu den Zeitpunkten $t = 24$ h und $t = 72$ h erbrachte im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) wie bei der TNBC-Zelllinie HCC1806 keine signifikante Änderung der Proliferation (1×10^{-11} M: $97,70 \pm 5,6$ % SEM, n. s. vs.

Kontrolle; 1×10^{-9} M: $85,4 \pm 3,2$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M: $91,6 \pm 1,0$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle; 1×10^{-5} M: $106,0 \pm 15,0$ % SEM, n. s. vs. Kontrolle)

(siehe Abb. 14 B).

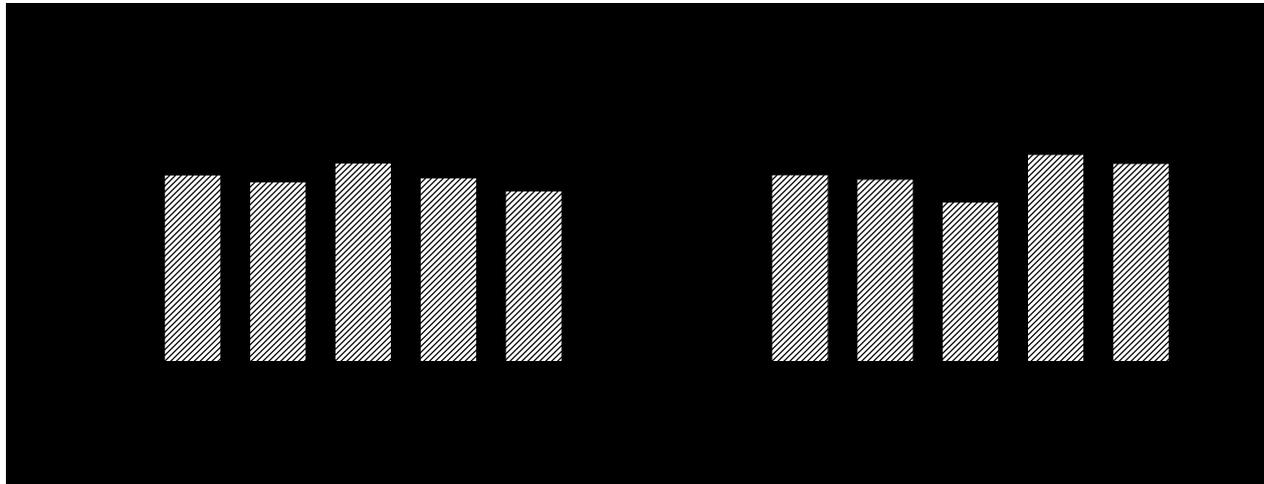


Abb. 14: Einfluss von Liquiritigenin auf die Zellproliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 (A) und HCC1937 (B). Die TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937 wurden für 120 h kultiviert und zum Zeitpunkt $t = 24$ h und $t = 72$ h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) sowie ohne Liquiritigenin (Kontrolle) inkubiert. Zum Zeitpunkt $t = 120$ h wurde die Zellproliferation bestimmt und in [%] zur Kontrolle (= 100%) aufgetragen. Angegeben sind MW \pm SEM, $n = 3$ biologische Replikate.

3.4.2 Einfluss des ER β -Agonisten ERB-041 auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937

Auch nach einer dosisabhängigen Behandlung mit dem ER β -Agonisten ERB-041 zu den Zeitpunkten $t = 24$ h und $t = 72$ h zeigte die TNBC-Zelllinie HCC1806 keine signifikante Veränderung der Proliferation (1×10^{-11} M: $107,0 \pm 7,9$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-9} M: $107,0 \pm 4,8$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M: $101,4 \pm 8,6$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-5} M: $101,0 \pm 8,4$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle) im Vergleich zu unbehandelten HCC1806-Zellen ($K = 100$ %) (siehe Abb. 15 A).

In gleicher Weise konnte nach einer Behandlung der TNBC-Zelllinie HCC1937 mit dem ER β -Agonisten ERB-041 zu den Zeitpunkten $t = 24$ h und $t = 72$ h kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation (1×10^{-11} M: $97,0 \pm 5,6$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-9} M: $104,6 \pm 5,1$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-7} M: $111,0 \pm 5,7$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle; 1×10^{-5} M: $109,0 \pm 7,7$ % SEM, n.s. vs. Kontrolle) im Vergleich zu unbehandelten HCC1937-Zellen ($K = 100$ %) beobachtet werden (siehe Abb. 15 B). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass beide ER β -Agonisten keinen Effekt auf die Proliferation der TNBC-Zelllinien zeigten.

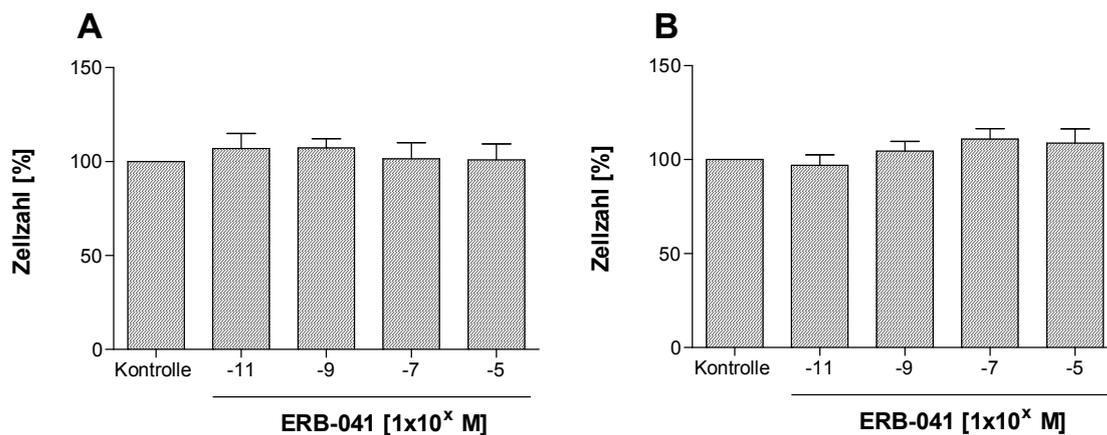


Abb. 15: Einfluss von ERB-041 auf die Zellproliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 (A) und HCC1937 (B). Die TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937 wurden für 120 h kultiviert und zum Zeitpunkt $t = 24$ h und $t = 72$ h dosisabhängig mit ERB-041 (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) sowie ohne ERB-041 (Kontrolle) inkubiert. Zum Zeitpunkt $t = 120$ h wurde die Zellproliferation bestimmt und in [%] zur Kontrolle (= 100%) aufgetragen. Angegeben sind MW \pm SEM, $n = 3$ biologische Replikate.

3.5 Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression

Da das CXCR4/SDF-1-System eine entscheidende Rolle bei der Invasion von Tumorzellen spielt, ist der Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 im Kokultursystem untersucht worden. Die TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 wurden für die Dauer von 24 h ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 (Kontrolle) und mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (Kokultur) kultiviert. Die kokultivierten Zellen sind zum Zeitpunkt $t = 0$ h für 24 h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M - 1×10^{-5} M) inkubiert worden. Nach Proteinaufarbeitung erfolgte ein quantitativer Nachweis der CXCR4-Proteinexpression mittels Western Blot, wobei Aktin als Kontrolle diente (siehe Abb. 16 B und Abb. 17 B).

Bei der TNBC-Zelllinie HCC1806 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CXCR4-Proteinexpression in der unbehandelten Kokultur (KK = $196,2 \pm 14,3$ % SEM, $p < 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle (K = 100 %) (siehe Abb. 16 A).

Nach der Behandlung mit Liquiritigenin war gegenüber der Kokultur (KK = 100 %) eine deutliche, signifikante Abnahme der CXCR4-Proteinexpression zu erkennen (1×10^{-11} M: $137,0 \pm 22,6$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $120,0 \pm 13,4$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur; 1×10^{-7} M: $153,0 \pm 17,0$ % SEM, n.s. vs. Kokultur, 1×10^{-5} M: $121,0 \pm 2,9$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 16 A).

Auch die unbehandelte kokultivierte TNBC-Zelllinie HCC1937 wies eine signifikante Zunahme der CXCR4-Proteinexpression (KK = $225,3 \pm 36,7$ % SEM, $p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle (K = 100 %) auf (siehe Abb. 17 A). Nach Inkubation mit Liquiritigenin konnte gegenüber der Kokultur (KK = 100 %) eine signifikante Abnahme der CXCR4 Proteinexpression gezeigt werden (1×10^{-11} M: $199,0 \pm 34,9$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-9} M: $176,0 \pm 14,5$ % SEM, n.s. vs. Kokultur; 1×10^{-7} M: $198,8 \pm 10,5$ % SEM, $p < 0,01$ vs. Kokultur, 1×10^{-5} M: $128,8 \pm 13,6$ % SEM, $p < 0,05$ vs. Kokultur) (siehe Abb. 17 A).

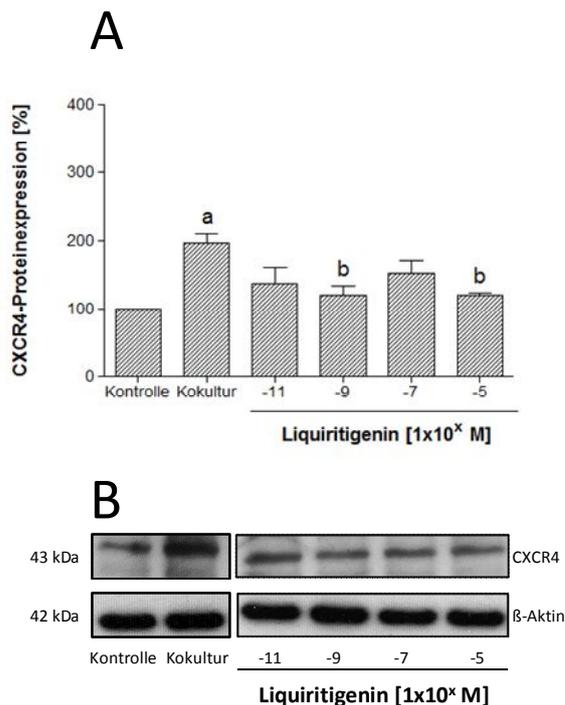


Abb. 16: Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression von HCC1806-Zellen. Die HCC1806-Zellen wurden ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 (Kontrolle) und mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (Kokultur) für 24 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h für 24 h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Im Western Blot wurde die CXCR4-Proteinexpression nachgewiesen (B). Aktin diente hierbei als Kontrolle. Angegeben sind MW \pm SEM, $n = 3$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels *one-way* ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test, errechnet (A): (a) $p < 0,01$ vs. Kontrolle, (b) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

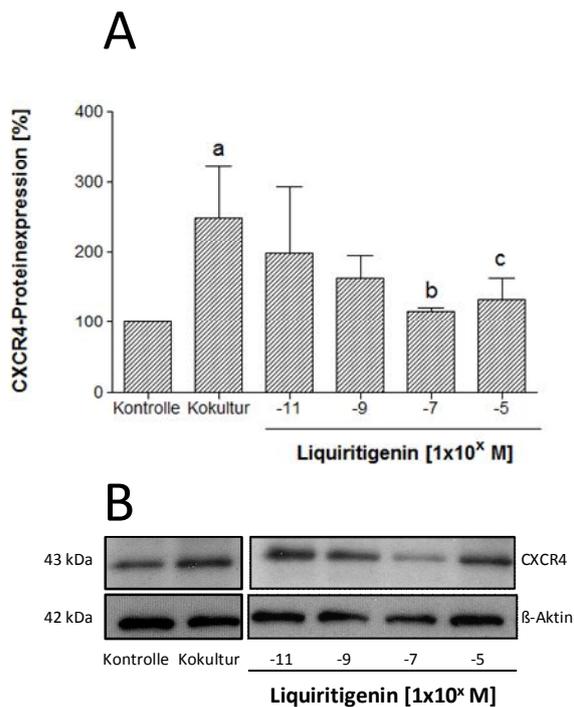


Abb. 17: Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression von HCC1937-Zellen. Die HCC1937-Zellen wurden ohne die Osteoblasten-ähnliche Zelllinie MG63 (Kontrolle) und mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 (Kokultur) für 24 h kultiviert. Die kokultivierten Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ h für 24 h dosisabhängig mit Liquiritigenin (1×10^{-11} M bis 1×10^{-5} M) inkubiert. Im Western Blot wurde die CXCR4-Proteinexpression nachgewiesen (B). Aktin diente hierbei als Kontrolle. Angegeben sind MW \pm SEM, $n = 3$ biologische Replikate. Signifikanzen wurden mittels *one-way* ANOVA, gefolgt vom Tukey's HSD-Test, errechnet (A): (a) $p < 0,01$ vs. Kontrolle, (b) $p < 0,01$ vs. Kokultur, (c) $p < 0,05$ vs. Kokultur.

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Wirkung der bislang wenig untersuchten selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 auf die Invasion von kokultivierten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 zu analysieren und dadurch Einblicke in die Funktion des ER β bei der Invasion, Migration und Proliferation des TNBC zu bekommen. Des Weiteren sollte die Expression des als prometastatisch geltenden CXCR4 in den kokultivierten TNBC-Zelllinien nach Behandlung mit dem ER β -Agonisten Liquiritigenin untersucht werden.

4.1 Expression und Funktion des ER β

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verwendeten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 den ER β auf Proteinebene in hohem Maße exprimieren. Eine Proteinexpression des ER α war jedoch in den TNBC-Zellen nicht zu finden. In der Kontrollzelllinie MCF-7 hingegen zeigte sich die Proteinexpression des ER α und des ER β . Diese Ergebnisse stellten die Grundlage für die weiterführenden Untersuchungen mit den selektiven ER β -Agonisten dar. Auch Chen und Russo (2009) zeigten, dass bei einem großen Teil von Patientinnen mit TNBC die Proteinexpression des ER β im Tumor nachzuweisen war. Mit dem ER β werden in der Literatur Tumorstadium und Invasion, inhibierende Eigenschaften assoziiert (Lindberg et al. 2010, Mersereau et al. 2008).

4.2 Inhibition der Invasion und Migration von kokultivierten TNBC-Zellen

4.2.1 Inhibition der Invasion durch selektive ER β -Agonisten

Um die Invasion im Rahmen der Metastasierung von Mammakarzinomzellen in den Knochen simulieren zu können, wurde in dieser Arbeit das Kokultur-System verwendet. Dies ist ein von unserer Abteilung entwickeltes *in-vitro*-Modell der gerichteten Invasion, bei dem die Mammakarzinomzellen mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 kokultiviert und die Invasion der Mammakarzinomzellen durch eine künstliche Basalmembran untersucht wird (von Alten et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 signifikant zunimmt, wobei die Zelllinie HCC1806 eine deutlich stärkere Invasion als die Zelllinie HCC1937 aufweist. Auch Ziegler (2013) konnte in ihrer Arbeit einen starken Anstieg der Invasion von HCC1806 -und HCC1937-Zellen in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 nachweisen.

Mithilfe dieses Modells wurde im weiteren Verlauf untersucht, inwieweit die ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 einen möglicherweise inhibierenden Effekt auf die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur haben. Die verwendeten Substanzen Liquiritigenin, ein aus der Wurzel der *Glycyrrhiza uralensis* isolierter Naturstoff, und die Substanz ERB-041 sind beide selektive Agonisten des ER β (Shanle et al. 2011). Ihnen werden antiinflammatorische und tumorsupprimierende Eigenschaften zugeschrieben (Liu et al. 2012).

Es konnte bei den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 gezeigt werden, dass die Invasion durch eine künstliche Basalmembran durch die Behandlung mit den selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 signifikant und dosisabhängig reduziert wurde. Die Behandlung der TNBC-Zelllinie HCC1806 mit Liquiritigenin zeigte eine signifikante Inhibierung der Invasion im Bereich von 1×10^{-8} M bis 1×10^{-5} M. Bei der Zelllinie HCC1937 wurde die Anzahl der invadierten TNBC-Zellen durch Liquiritigenin bei allen verwendeten Konzentrationen signifikant reduziert. Auch bei Inkubation der Zelllinie HCC1937 mit ERB-041 ließ sich eine dosisabhängige Reduktion der Invasion beobachten. Lediglich bei Inkubation der Zelllinie HCC1806 mit dem ER β -Agonisten ERB-041 konnte keine dosisabhängige, jedoch bei einigen Konzentrationen signifikante Hemmung der Invasion gegenüber der Kontrolle gezeigt werden.

Diese Ergebnisse unterstützten die Hypothese, dass der ER β und somit auch seine selektiven Agonisten beim TNBC eine Invasion hemmende und tumorsupprimierende Funktion zu haben scheinen. Chaudhary et al. (2014) konnten zeigen, dass der verwandte selektive ER β -Agonist ERB-041 in einem *in-vivo*-Modell, die durch UVB Licht induzierte Karzinogenese in SKH-1 Mäusen supprimieren konnte. Weiterhin postulierten die Autoren, dass der ER β nicht nur die Tumorentstehung reduziere, sondern zudem die Progression in einen aggressiven und invasiven Tumorphänotyp abschwächen könne. Des Weiteren konnten auch Samanta et al. im Jahr 2012 nachweisen, dass der ER β durch Aktivierung mit dem selektiven ER β -Agonisten 3 β A-diol zur Reduzierung der Invasion und Migration beim TNBC führte. Grund dafür ist die Inhibierung der Expression des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) durch den ER β und die damit verbundene Suppression des *Insulin-like growth factor-II mRNA-binding protein-3* (IMP3). IMP3 ist normalerweise für die Migration und die Invasion des TNBC verantwortlich. Diese Feststellung wird durch Lindberg et al. (2010) unterstützt, die in ihrer Publikation darauf hinwiesen, dass mit der Expression des ER β eine geringere Invasivität und Progression beim TNBC einhergehe.

Ergänzend konnten verschiedene Studien zeigen, dass ER β -Agonisten das Wachstum von ER β -positiven Tumoren vermindern können. Liu et al. (2012) zeigten in einer *in-vivo*-Studie, dass Liquiritigenin das Tumorstadium der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa in Nacktmäusen, über die Inhibierung der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-Expression, signifikant reduzierte. Auch Shanle et al. (2011) veröffentlichten, dass nach Inkubation einer isogenen TNBC-Reporterzelllinie Hs578T-ER β mit dem selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin *in vitro*, ein signifikanter Rückgang der Tumorgroße zu verzeichnen war.

In den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 konnten in dieser Arbeit jedoch keine antiproliferativen Effekte der selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass es sich bei der Studie von Liu et al. (2012) um ein *in-vivo*-Modell handelt und nicht wie in unserer Arbeit um eine *in-vitro*-Studie. Des Weiteren wurde bei besagter Studie mit einer Zervixkarzinomzelllinie und nicht - wie in unserer Arbeit - mit einer Mammakarzinomzelllinie gearbeitet. Es liegen somit zum einen zwei unterschiedliche Systeme, zum anderen zwei Zelllinien unterschiedlicher Entitäten vor, was eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von ER β -Agonisten auf die Proliferation von TNBC-Zellen angesehen werden könnte. Auch der beschriebene Mechanismus, die Hemmung der VEGF Expression bei HeLa-Zellen *in vivo* und darüber die Inhibierung der Ausbildung von Blutgefäßen stellt einen Effekt dar, der *in vitro* nicht vorliegen muss.

4.2.2 Inhibition der Migration durch selektive ER β -Agonisten

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss des ER β -Agonisten Liquiritigenin auf die Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806 mithilfe eines *in-vitro*-Wundheilungsassays (*Scratch Assay*) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich eine artifizell eingefügte Wunde (*Scratch*) in konfluent gewachsene HCC1806-Zellen mit Zunahme der Zeit wieder verschloss. Dies kann als Beleg für die Migration der HCC1806-Zellen angesehen werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Wundverschluss nach Inkubation der HCC1806-Zellen mit dem selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin mit den Konzentrationen 1×10^{-7} M und 1×10^{-5} M im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt war. Dies deutet daraufhin, dass Liquiritigenin die Migration zu hemmen scheint. Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte die Auswirkung des selektiven ER β -Agonisten ERB-041 auf das Migrationsverhalten der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SCC mithilfe eines *in-vitro*-Wundheilungsassays. Dabei wurde deutlich, dass die Substanz ERB-041 die Migration von SCC Zellen um etwa 55 % reduzierte (Chaudhary et al. 2014). Dieses Ergebnis unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse und lässt eine Migration

hemmende Wirkung des ERß und seines Agonisten vermuten. Auch Lindberg et al. publizierten 2011, dass der ERß bei verschiedenen *in-vitro*-Experimenten mit Mammakarzinomzellen zu einer Inhibierung der Migration geführt habe. Des Weiteren entdeckten Lindberg et al. (2010), dass der ERß eine wesentliche Rolle in der Modulation der Zelladhäsion und dem Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen aufweist. Sie zeigten, dass die Expression des ERß zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen führte. Dies hatte eine stärkere Bindung der Mammakarzinomzellen an ihre Extrazelluläre Matrix zur Folge, wodurch die Migrationsfähigkeit signifikant reduziert wurde.

4.3 Inhibition der CXCR4-Expression in kokultivierten TNBC-Zellen durch selektive ERß-Agonisten

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der CXCR4 der am häufigsten exprimierte Chemokinrezeptor beim Mammakarzinom ist und zusammen mit seinem Liganden SDF-1 das Wachstum und die Invasion des Mammakarzinoms fördert. Müller et al. (2001) fanden hohe CXCR4-Konzentrationen in Mammakarzinomzellen, malignen Brustkrebs-Tumoren und Metastasen. Andererseits traten hohe SDF-1-Konzentrationen in den Gewebetypen auf, welche die initialen Zielgewebe von Brustkrebs-Metastasen (Knochen, Leber und Lunge) darstellen. In einer retrospektiven Studie wurde festgestellt, dass eine CXCR4-Überexpression bei Patientinnen mit TNBC ein signifikant höheres Risiko für ein Rezidiv und ein durch den Krebs induzierten Tod bedeutete (Chu et al. 2010). Aus diesem Grund haben wir in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit die Behandlung von kokultivierten TNBC-Zelllinien mit dem ERß-Agonisten Liquiritigenin einen Einfluss auf die CXCR4-Expression hat. Hierfür wurde das schon erwähnte *in-vitro*-Kokultur-System verwendet. Wie im vorangehenden Kapitel bereits festgestellt, nahm die Anzahl der invadierten TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937 in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 signifikant zu. Weiterhin konnte im Western Blot gezeigt werden, dass nicht nur die Invasion, sondern auch die CXCR4-Proteinexpression in den kokultivierten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 signifikant gegenüber der Kontrolle anstieg. Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass die CXCR4-Expression positiv mit der Anzahl von invadierten TNBC-Zellen korreliert.

Zu dieser Erkenntnis kommen auch Sobolik et al. (2014), die postulieren, dass der CXCR4 den metastasenbildenden Phänotyp beim Mammakarzinom antreibe. Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben worden, dass das CXCR4-SDF-1-System eng mit der Metastasierung von Brustkrebs korreliert und die Invasion des TNBC fördert (Sun et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Behandlung von kokultivierten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 mit dem selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin zu einer bei einigen Konzentrationen signifikanten und dosisabhängigen Abnahme der CXCR4-Proteinexpression führte.

Dazu passend wurde in einer anderen Studie herausgefunden, dass die Inhibition von CXCR4 in TNBC-Zelllinien die Metastasierung in Lunge und Lymphknoten und damit die Fähigkeit zur Invasion *in vivo* deutlich reduziert (Liang et al. 2005). Die gefundene Korrelation zwischen CXCR4-Expression und Invasion beim Mammakarzinom beschrieben auch Li et al. (2009), die durch *Knock-down* des CXCR4 in MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen eine signifikante Abnahme der Invasion herbeiführten.

Alle diese Ergebnisse können als Beleg für eine positive Korrelation zwischen Invasion und CXCR4-Expression angesehen werden. Der CXCR4 spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Invasion des Mammakarzinoms *in vitro* und repräsentiert einen prometastatischen Faktor. Die verwendeten ER β -Agonisten scheinen dabei einen direkt inhibierenden Effekt auf die CXCR4-Proteinexpression zu haben.

Diese Ergebnisse stellen nach aktuellem Kenntnisstand den ersten Bericht dar, dass die Invasion von TNBC-Zellen durch die selektive Aktivierung des ER β reduziert werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Behandlung mit selektiven ER β -Agonisten die Anzahl invadierter Zellen und auch die CXCR4-Proteinexpression, als einen wichtigen prometastatischen Faktor verringert, könnte der Gebrauch von ER β -Agonisten eine neue antimetastatische therapeutische Möglichkeit darstellen. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die diese Effekte erklären könnten, sind jedoch weitgehend ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.

4.4 Fazit und Ausblick

Zusammengefasst deuten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse darauf hin, dass die selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 die Invasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 *in vitro* dosisabhängig und signifikant hemmen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in der Kokultur eine hohe Proteinexpression des prometastatischen CXCR4 in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 vorliegt, welche jedoch durch Behandlung mit dem selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin signifikant und konzentrationsabhängig reduziert werden kann. Es scheint somit auf molekularer Ebene einen hemmenden Einfluss des ER β auf das CXCR4-SDF-1-System zu geben, was eine Reduktion der Invasion zur Folge hat. Die genaueren Mechanismen der Signaltransduktion sind momentan noch unklar und müssen in zukünftigen Untersuchungen weiter analysiert werden.

Beide ER β -Agonisten zeigen in der vorliegenden Arbeit keine Effekte auf die Proliferationsfähigkeit der TNBC-Zelllinien.

Die gewonnenen Erkenntnisse suggerieren, dass der ER β eine entscheidende Rolle bei der Invasion von TNBC-Zellen spielt und dass die Knochen-gerichtete Invasion durch selektive ER β -Agonisten gehemmt werden kann.

Bezogen auf die Therapie des sehr aggressiven und bis heute schwer behandelbaren TNBC lässt sich festhalten, dass selektive ER β -Agonisten aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eine vielversprechende zielgerichtete Therapieoption ergänzend zur konventionellen Chemotherapie darstellen könnten – dies muss jedoch in zukünftigen *in-vivo*-Experimenten untersucht und bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

Beim fortgeschrittenen Mammakarzinom ist die Metastasierung in den Knochen ein häufiges Problem. Eine besonders schlechte Prognose und aggressives Verhalten werden vor allem mit dem TNBC assoziiert, welches keinen ER α und PR sowie keine Überexpression des HER2 aufweist. Da bei dieser Unterform des Mammakarzinoms die typischen Rezeptoren fehlen, existieren derzeit keine wirklich zielgerichteten Therapieansätze.

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Invasion von Mammakarzinomzellen in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 stark anstieg. Mithilfe dieses Modells haben wir in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit der ER β , welcher beim TNBC exprimiert wird, eine Rolle bei der Zellinvasion von TNBC-Zellen spielt.

Die ER α - und ER β -Proteinexpression wurde mithilfe des Western Blot-Verfahrens untersucht. Die Zellinvasion ist anhand der Migrationsrate der TNBC-Zellen durch eine künstliche Basalmembran in einer modifizierten Boyden-Kammer in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 analysiert worden. Die Migration der TNBC-Zellen wurde mithilfe eines *Scratch*-Assays untersucht. Die Proliferation ist mit dem alamarBlue®-assay quantifiziert worden. Die Wirkung der ER β -Agonisten auf die CXCR4-Proteinexpression während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63, wurde mithilfe des Western Blots nachgewiesen.

Die TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 weisen keine ER α -Proteinexpression, jedoch eine hohe ER β -Proteinexpression auf. Die Zellinvasion der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 stieg in Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG63 signifikant an. Die Behandlung mit den selektiven ER β -Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 reduzierte die Invasion der TNBC-Zellen durch eine künstliche Basalmembran. Während der Kokultur stieg die CXCR4-Expression der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 signifikant an. Die Behandlung mit dem ER β -Agonisten Liquiritigenin führte zu einem signifikanten Abfall der CXCR4-Proteinexpression. Im *Scratch*-Assay zeigte sich, dass die Migration der TNBC-Zelllinie HCC1806 nach Behandlung mit dem ER β -Agonisten Liquiritigenin im Vergleich zur Kontrolle verlangsamt war. In dieser Arbeit zeigten beide ER β -Agonisten keinen Effekt auf die Proliferation der verwendeten TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der ER β und der CXCR4 eine wesentliche Rolle bei der Invasion von TNBC-Zellen spielen und selektive ERB-Agonisten die knochengerichtete Invasion von TNBC-Zellen inhibieren können.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1 :	Schematische Darstellung der verwendeten Kokultur.....	22
Abb.2 :	Expression des ER α und ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	35
Abb.3 :	Immunzytochemischer Nachweis des ER α und ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806, HCC1937 und der Mammakarzinom- zelllinie MCF-7.....	36
Abb.4 :	Nachweis der Proteinexpression des ER α und des ER β in den TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 sowie der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	37
Abb.5 :	Invasion monokultivierter und kokultivierter TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937 (Hämalaunfärbung).....	38
Abb.6 :	Invasion von monokultivierten und kokultivierten TNBC-Zellen HCC1806 und HCC1937	38
Abb.7 :	Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1806-Zellen und Einfluss von Liquiritigenin auf die Invasion von kokultivierten HCC1806-Zellen	40
Abb.8 :	Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1937 Zellen und Einfluss von Liquiritigenin auf die Invasion kokultivierter HCC1937-Zellen	40
Abb.9 :	Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1937-Zellen und Einfluss von ERB-041 auf die Invasion kokultivierter HCC1937-Zellen	41
Abb.10:	Invasion von monokultivierten und kokultivierten HCC1806-Zellen und Einfluss von ERB-041 auf die Invasion kokultivierter HCC1806-Zellen	43
Abb.11:	Einfluss von ERB-041 auf die Invasion von kokultivierten HCC1806-Zellen.....	43

Abb.12:	Einfluss von Liquiritigenin auf die Migration der HCC1806-Zellen im <i>Scratch-Assay</i> (Mikroskopische Darstellung).....	44
Abb.13:	Einfluss von Liquiritigenin auf die Migration der HCC1806-Zellen im <i>Scratch-Assay</i>	45
Abb.14:	Einfluss von Liquiritigenin auf die Zellproliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937.....	46
Abb.15:	Einfluss von ERB-041 auf die Zellproliferation der TNBC-Zelllinien HCC1806 und HCC1937	47
Abb.16:	Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression von HCC1806-Zellen.....	48
Abb.17:	Einfluss von Liquiritigenin auf die CXCR4-Proteinexpression von HCC1937-Zellen.....	49

6.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Verwendete Geräte.....	12
Tabelle 2	Verwendete Puffer und Lösungen.....	14
Tabelle 3	Verwendete Inhibitoren	14
Tabelle 4	Verwendete Enzyme.....	14
Tabelle 5	Verwendete Größenstandard-Marker.....	14
Tabelle 6	Verwendete Kulturmedien und Zusätze	15
Tabelle 7	Verwendete Zelllinien.....	15
Tabelle 8	Verwendete Oligonukleotide	16
Tabelle 9	Verwendete Primärantikörper	16
Tabelle 10	Verwendete Sekundärantikörper.....	16
Tabelle 11	Verwendete kommerzielle Reaktionssysteme	17
Tabelle 12	Verwendete Software.....	17
Tabelle 13	Aufbereitung Matrigel™ Basalmembranmatrix.....	22
Tabelle 14	Verwendete Zellzahlen für <i>Inserts</i> und <i>Wells</i> im Invasionsassay	23
Tabelle 15	Verwendete Zellzahlen im Proliferationsassay	24
Tabelle 16	Substanzen für die Herstellung des Enzym-Mix für die Reverse Transkription.....	25
Tabelle 17	Substanzen für die Herstellung des PCR-Ansatzes	26
Tabelle 18	PCR-Programme	27
Tabelle 19	Zusammensetzung des 5 %igen Sammelgels	30
Tabelle 20	Zusammensetzung des 10%igen Trenngels (Ansatz für 2 Gele).....	31
Tabelle 21	Immunzytologische Färbung	33

Literaturverzeichnis

- Amar S, Roy V, Perez EA (2009): Treatment of metastatic breast cancer: looking towards the future. *Breast Cancer Res Treat* 114, 413-422
- Anders CK, Carey LA (2009): Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 9 Suppl 2, S73-81
- Antoniou AC, Easton DF (2006): Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25, 5898-5905
- AWMF (2012): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms
- Billiau, A., Edy, V. G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J. A., and De Somer, P. (1977) Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*, 12, 11-15
- Boyden S (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466
- Bradbury AR, Olopade OI (2007): Genetic susceptibility to breast cancer. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 255-267
- Chambers AF (1999): The metastatic process: basic research and clinical implications. *Oncol Res* 11, 161-168
- Chaudhary SC, Singh T, Talwelkar SS, Srivastava RK, Arumugam A, Weng Z, Elmets CA, Afaq F, Kopelovich L, Athar M (2014): Erb-041, an estrogen receptor-beta agonist, inhibits skin photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice by downregulating the WNT signaling pathway. *Cancer Prev Res (Phila)* 7, 186-198
- Chen JQ, Russo J (2009): ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* 1796, 162-175
- Chen L, Mayer JA, Krisko TI, Speers CW, Wang T, Hilsenbeck SG, Brown PH (2009): Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. *Cancer Res* 69, 8853-8861
- Chu QD, Panu L, Holm NT, Li BD, Johnson LW, Zhang S (2010): High chemokine receptor CXCR4 level in triple negative breast cancer specimens predicts poor clinical outcome. *J Surg Res* 159, 689-695
- Coghlin C, Murray GI (2010): Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol* 222, 1-15
- Coleman RE (1997): Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 80, 1588-1594
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006): International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58, 773-781
- Davies KJ (2014): The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma. *Int J Breast Cancer* 2014, 839094
- Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C (2009): Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer* 45 Suppl 1, 27-40
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, Walenkamp AM (2013): A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer* 49, 219-230

- Emons G, Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Kavanagh J, Verschraegen C (2003): GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer* 10, 291-299
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917
- Fidler IJ (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453-458
- Föst C, Duwe F, Hellriegel M, Schweyer S, Emons G, Gründker C (2011): Targeted chemotherapy for triple-negative breast cancers via LHRH receptor. *Oncol Rep* 25, 1481-1487
- Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., Kodagoda, D., Stasny, V., Cunningham, H. T., Wistuba, II, Tomlinson, G., Tonk, V., Ashfaq, R., Leitch, A. M., Minna, J. D. & Shay, J. W. 1998. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 78, 766-74
- Gibson LJ, Dawson C, Lawrence DH, Bliss JM (2007): Aromatase inhibitors for treatment of advanced breast cancer in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* CD003370
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007): Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* 6, 2609-2617
- Kuo WH, Chang YY, Lai LC, Tsai MH, Hsiao CK, Chang KJ, Chuang EY (2012): Molecular characteristics and metastasis predictor genes of triple-negative breast cancer: a clinical study of triple-negative breast carcinomas. *PLoS One* 7, e45831
- Lacey JV, Jr., Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, Hoover RN, Prorok PC, Berg CD, Hartge P (2009): Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 9, 84
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Legha SS, Carter SK (1976): Antiestrogens in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 3, 205-216
- Li HY, Ren GS, Tan JX (2009): [The effects of shRNA-CXCR4 on breast cancer cells migration and invasion]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 40, 393-397
- Liang Z, Yoon Y, Votaw J, Goodman MM, Williams L, Shim H (2005): Silencing of CXCR4 blocks breast cancer metastasis. *Cancer Res* 65, 967-971
- Lindberg K, Strom A, Lock JG, Gustafsson JA, Haldosen LA, Helguero LA (2010): Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells. *J Cell Physiol* 222, 156-167
- Lindberg K, Helguero LA, Omoto Y, Gustafsson JA, Haldosen LA (2011): Estrogen receptor beta represses Akt signaling in breast cancer cells via downregulation of HER2/HER3 and upregulation of PTEN: implications for tamoxifen sensitivity. *Breast Cancer Res* 13, R43
- Liu Y, Xie S, Wang Y, Luo K, Cai Y (2012): Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. *Molecules* 17, 7206-7216

- Marotti JD, Collins LC, Hu R, Tamimi RM (2010): Estrogen receptor-beta expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Mod Pathol* 23, 197-204
- Mersereau JE, Levy N, Staub RE, Baggett S, Zogovic T, Chow S, Ricke WA, Tagliaferri M, Cohen I, Bjeldanes LF (2008): Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor beta agonist. *Mol Cell Endocrinol* 283, 49-57
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56
- Robert-Koch-Institut (2013): *Krebs in Deutschland 2009/ 2010*, Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
- Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink H K: Grundmann Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie 11. Auflage (2008) Elsevier, München; Urban & Fischer
- Rose AA, Siegel PM (2010): Emerging therapeutic targets in breast cancer bone metastasis. *Future Oncol* 6, 55-74
- Sakamoto G, Honma N (2009): Estrogen receptor-beta status influences clinical outcome of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer* 16, 281-282
- Samanta S, Sharma VM, Khan A, Mercurio AM (2012): Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene* 31, 4689-4697
- Sant M, Allemani C, Capocaccia R, Hakulinen T, Aareleid T, Coebergh JW, Coleman MP, Grosclaude P, Martinez C, Bell J (2003): Stage at diagnosis is a key explanation of differences in breast cancer survival across Europe. *Int J Cancer* 106, 416-422
- Shanle EK, Hawse JR, Xu W (2011): Generation of stable reporter breast cancer cell lines for the identification of ER subtype selective ligands. *Biochem Pharmacol* 82, 1940-1949
- Sobolik T, Su YJ, Wells S, Ayers GD, Cook RS, Richmond A (2014): CXCR4 drives the metastatic phenotype in breast cancer through induction of CXCR2 and activation of MEK and PI3K pathways. *Mol Biol Cell* 25, 566-582
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 51, 1409-1416
- Steinborn M, Tiling R, Heuck A, Brugel M, Stabler A, Reiser M (2000): [The diagnosis of metastases in the bone marrow by MRT]. *Radiologe* 40, 826-834
- Sun Y, Mao X, Fan C, Liu C, Guo A, Guan S, Jin Q, Li B, Yao F, Jin F (2014): CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol*
- Tan AR, Swain SM (2008): Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Cancer J* 14, 343-351
- Viani GA, Afonso SL, Stefano EJ, De Fendi LI, Soares FV (2007): Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 7, 153
- von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Grundker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 100, 13-21

- Wai LE, Narang V, Gouaillard A, Ng LG, Abastado JP (2013): In silico modeling of cancer cell dissemination and metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 1284, 71-74
- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602
- Ziegler E, Olbrich T, Emons G und Gründker C (2013): Antiproliferative effects of kisspeptin-10 depend on artificial GPR54 (KISS1R) expression levels. *Oncol Rep* 29, 549–554

Publikation

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben zu folgender Publikation beigetragen:

Hinsche O, Girgert R, Emons G, Gründker C (2015): Estrogen receptor beta selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. International Journal of Oncology 46, 878-884

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. G. Emons für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung und seinem Labor die experimentellen Arbeiten durchführen zu können.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker aussprechen, der jederzeit für mich ansprechbar war und mich mit wertvollen Anregungen, Tipps und sehr großem Engagement unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt weiterhin meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat Antje Schubert, und Frau Sonja Blume, die mich bei den Arbeiten im Labor unterstützte.

Lebenslauf

Am 08. Juni 1985 bin ich, Oliver Hinsche, als Sohn des Dipl.-Ing. Thomas Hinsche und der Lehrerin Petra Hinsche in Oldenburg (Oldenburg) geboren worden.

In den Jahren 1991 bis 1995 ging ich in die Grundschule Röwekamp in Oldenburg, anschließend für zwei Jahre in die Orientierungsstufe Alexanderstraße in Oldenburg. Ab 1997 besuchte ich das Alte Gymnasium Oldenburg und erlangte dort im Jahr 2004 das Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife.

Nach dem Abitur war ich in Teilzeit in der Firma Gastroprojekt Thomas Hinsche GmbH in Oldenburg zur Überbrückung bis zur Feststellung der Wehrdienstfähigkeit eingestellt. Von 2005 bis 2006 leistete ich für neun Monate meinen Zivildienst in der Pflege der Kardiologie der Universitätsmedizin Göttingen. In den Jahren 2006 bis 2009 arbeitete ich bis zur Überbrückung der Wartezeit auf meinen Medizinstudienplatz in Vollzeit als kaufmännischer Mitarbeiter in der Firma Gastroprojekt Thomas Hinsche GmbH in Oldenburg.

Ich begann das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen im Sommersemester 2009. Im April 2011 absolvierte ich nach vier vorklinischen Semestern den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich vor Beginn des Praktischen Jahres im April 2014 ab. Im Anschluss begann ich mein Praktisches Jahr im Mai 2014 im Fach Chirurgie in der Universitätsmedizin Göttingen. Das zweite Tertial (Innere Medizin) absolvierte ich in der Universitätsmedizin Göttingen. Mein Wahltertial habe ich im Fach Allgemeinmedizin in einer Hausarztpraxis in Waake absolviert. Den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung legte ich am 10.06.2015 erfolgreich in Göttingen ab.