

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Prof. Dr. med. G. Emons)
Arbeitsgruppe Molekulare Gynäkologie
(Prof Dr. rer. nat. C. Gründker)
im Zentrum Frauenheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Einfluss von GnRH-Analoga auf die
Expression von Wachstumsfaktoren und
Wachstumsfaktorrezeptoren in humanen
Mammakarzinomzellen und in der Osteoblasten-
ähnlichen Zellreihe MG-63 während der Kokultur**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Anja Heineke

aus Hannover

Göttingen 2014

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

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker
- II. Berichterstatterin: Prof. Dr. Frauke Alves
- III. Berichterstatter: Prof. Dr. Steven Johnsen
- IV. Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2014

INHALT

| | |
|---|-----------|
| INHALT | I |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Das Mammakarzinom | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie | 1 |
| 1.1.2 Stadieneinteilung | 2 |
| 1.1.3 Knochenmetastasen | 4 |
| 1.1.4 Therapie des fernmetastasierten Mammakarzinoms | 5 |
| 1.2 Das Gonadotropin-Releasing-Hormon | 7 |
| 1.2.1 GnRH-System | 7 |
| 1.2.2 GnRH-Analoga | 9 |
| 1.2.3 GnRH-Analoga in der Gynäkologie und Geburtshilfe | 10 |
| 1.3 Transforming Growth Factor Beta | 10 |
| 1.3.1 TGF-beta – Struktur und Funktion | 10 |
| 1.3.2 TGF-Beta-Rezeptoren | 11 |
| 1.3.3 TGF-beta-Signalkaskade | 11 |
| 1.3.4 Rolle von TGF-beta in der Tumorbologie und Metastasierung | 12 |
| 1.4 Epidermal Growth Factor | 14 |
| 1.4.1 EGF – Struktur und Funktion | 14 |
| 1.4.2 EGF-Rezeptor | 14 |
| 1.4.3 EGF-Signaltransduktion | 15 |
| 1.4.4 Rolle von EGF und EGFR in der Tumorbologie und Metastasierung | 15 |
| 1.5 Fragestellung und Zielsetzung | 17 |
| 2 MATERIAL | 18 |
| 2.1 Geräte | 18 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 19 |
| 2.3 Chemikalien, Lösungen und Puffer | 19 |
| 2.4 GnRH Analoga | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.5 | Zellkultur..... | 20 |
| 2.5.1 | Kulturmedien | 20 |
| 2.5.2 | Zelllinien | 21 |
| 2.6 | Oligonukleotide..... | 21 |
| 2.7 | Enzyme, Proteine, Reaktions- u. Extraktionskits | 22 |
| 2.8 | Software | 22 |
| 3 | METHODEN | 23 |
| 3.1 | Zellkultur und Passagierung adhärenter Zellen | 23 |
| 3.2 | Zellzahlbestimmung | 23 |
| 3.3 | Kokultur und Behandlung der Zellen..... | 24 |
| 3.4 | Zellernte | 27 |
| 3.5 | Isolierung der Gesamt- RNA und Quantifizierung von Nukleinsäuren..... | 27 |
| 3.6 | Reverse Transkription | 28 |
| 3.7 | Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion | 29 |
| 3.8 | Agarose-Gelelektrophorese und Quantifizierung der PCR-Produkte | 30 |
| 3.9 | Statistische Auswertung..... | 31 |
| 4 | ERGEBNISSE | 32 |
| 4.1 | Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von EGF und EGFR während der Kokultur | 32 |
| 4.1.1 | Zeitverläufe der mRNA-Expression..... | 35 |
| 4.1.2 | mRNA-Expression unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration . | 36 |
| 4.2 | Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF-beta während der Kokultur | 38 |
| 4.2.1 | mRNA-Expression von TGF-beta in MG-63 und MCF-7 | 38 |
| 4.2.2 | mRNA-Expression von TGF-beta im Zeitverlauf..... | 41 |
| 4.2.3 | mRNA-Expression von TGF-beta unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration | 42 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.3 | Wirkung von GnRH-Analoga auf die Expression von TGF-beta-Rezeptoren-I und -II | 43 |
| 4.3.1 | mRNA-Expression von TGFBR1 und 2 in MG-63..... | 43 |
| 4.3.2 | mRNA-Expression von TGFBR I und II in MCF-7..... | 44 |
| 5 | DISKUSSION | 46 |
| 5.1 | Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA- Expression von EGF und EGFR in der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 und Mammakarzinomzellen während der Kokultur ... | 46 |
| 5.2 | Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA- Expression von TGF-beta und seinen Rezeptoren TGFBR-I und -II in der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 und Mammakarzinomzellen während der Kokultur | 47 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 51 |
| 7 | LITERATURANGABEN | 52 |
| 8 | ANHANG | 66 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 66 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis | 70 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis | 71 |
| 7.4 | Firmenindex..... | 72 |
| | DANKSAGUNG | 75 |
| | LEBENS LAUF | 76 |

1 EINLEITUNG

1.1 DAS MAMMAKARZINOM

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE

Das Mammakarzinom ist in der Bundesrepublik Deutschland wie auch weltweit die häufigste Malignomerkrankung der Frau. So wurde im Jahr 2006 in Deutschland nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) bei etwa 57000 Frauen Brustkrebs neu diagnostiziert. Das Lebenszeitrisiko beträgt etwa 11 %, was bedeutet, dass jede neunte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt (Schön et al., 2004).

Im Jahr 2006 starben in Deutschland etwa 18000 Frauen an Brustkrebs (GEKID, 2010). Damit ist das Mammakarzinom nicht nur die häufigste Krebserkrankung der Frau, sondern führt mit etwa 18 % auch die Liste der Mortalität der Malignomerkrankungen an (GEKID, 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt mittlerweile bei etwa 79 % (Schön et al., 2004), was sicherlich der verbesserten Früherkennung und verbesserten adjuvanten Therapie zu verdanken ist.

Die Relevanz des Mammakarzinoms wird auch durch die Altersverteilung der Erkrankten deutlich. Die Patientinnen sind mit 62,5 Jahren im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen jung. Etwa 40 % der Erkrankungen und etwa 30 % der Todesfälle durch Brustkrebs treten zwischen dem 35. und 59. Lebensjahr auf (GEKID, 2010).

Bestimmte genetische und exogene Faktoren erhöhen das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. So sind etwa 5 % der Patientinnen Träger einer Keimbahnmutation in den DNA Reparaturgenen BRCA1 oder BRCA2. Das Lebenszeitrisiko, als Träger einer dieser Mutationen an Brustkrebs zu erkranken, beträgt 50-80 %, das Risiko, ein kontralaterales Mammakarzinom zu entwickeln, 60 %. Eine Veränderung dieser Gene führt außerdem zu einem erhöhten Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Antoniou et al., 2003; Goldberg et al., 2006).

Zu den nicht-genetischen Risikofaktoren des Mammakarzinoms zählen hormonelle Einflüsse, wie eine supraphysiologische postmenopausale Östrogensubstitution, eine frühe Menarche und späte Menopause (lang andauernder Östrogeneinfluss) (Apter et al., 1989) oder ein gestörtes Östrogen-Gestagen-Verhältnis (Gestagenmangelhypothese). Aber auch bestimmte Lebensgewohnheiten, wie z.B. fleisch- und fettreiche Ernährung, Rauchen, Adipositas (Schaffler et al., 2007) oder Alkoholabusus (Terry et al., 2007), gehen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher. Frauen mit einem lobulären Carcinoma in situ (LCIS) oder einer atypischen duktaalen Hyperplasie (ADH) haben ein erhöhtes Risiko, Brustkrebs zu entwickeln (Goodwin et al., 1995). Weitere Risikofaktoren sind Nulliparität, ein höheres Alter (>30 Jahre) bei ausgetragener Erstschwangerschaft und Nicht-Stillen (Newcomb et al., 1994). Dagegen zählen Multiparität, frühes Alter bei Erstschwangerschaft und langes Stillen zu den protektiven Faktoren.

1.1.2 STADIENEINTEILUNG

Das Mammakarzinom wird im TNM-System hinsichtlich seiner anatomischen Ausbreitung klassifiziert. Das TNM- System beschreibt Größe des Primärtumors (T - *tumor*), Lymphknotenstatus (N - *node*) und eventuelle Fernmetastasierung (M - *metastasis*).

Tabelle 1.1 TNM-Klassifikation (aus Wittekind und Mayer, 2010, S.178-179)

| | |
|-------|--|
| Tis | Carcinoma in situ |
| DCIS | Ductales Carcinoma in situ |
| LCIS | Lobuläres Carcinoma in situ |
| Paget | Morbus Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor |
| T1 | Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung |
| T1mic | $\leq 0,1$ cm |
| T1a | $\geq 0,1$ cm bis $\leq 0,5$ cm |
| T1b | $> 0,5$ cm bis ≤ 1 cm |
| T1c | > 1 cm bis ≤ 2 cm |
| T2 | Tumor > 2 cm bis ≤ 5 cm in größter Ausdehnung |
| T3 | Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung |

| | |
|------------------------------------|---|
| T4 T4a T4b T4c T4d | Tumor jeder Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand, nicht aber auf den M.pectoralis mit Ödem (einschließlich Peau d'orange) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenknötchen der Haut der gleichen Brust Kriterien T4a und T4b Inflammatorisches Mammakarzinom |
| N0 | Keine regionären Lymphknoten (Lk) befallen |
| N1a | Metastasen in 1-3 axillären Lk |
| N1b | Klinisch inapparente Metastasen in Lk entlang der ipsilateralen A.mammaria interna |
| N1c | Klinisch inapparente Metastasen in 1-3 axillären Lk und in Lk entlang der ipsilateralen A.mammaria interna |
| N2a | Metastasen in 4-9 axillären Lk (mindestens eine größer als 2,0 mm) |
| N2b | Metastasen in klinisch nachweisbaren Lk entlang der A.mammaria interna ohne gleichzeitiges Vorhandensein klinisch nachweisbarer axillärer Lk |
| N3a | Metastasen in 10 oder mehr axillären Lk oder Befall infraklavikulärer Lk |
| N3b | Metastasen in klinisch apperenten Lk entlang der ipsilateralen A.mammaria interna bei gleichzeitig mindestens einem befallenen axillären Lk oder mehr als 3 befallene axilläre Lk und klinisch inapperente Lk-Metastasen entlang der ipsilateralen A.mammaria interna |
| N3c | Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lk |
| M0 | Keine Fernmetastasen nachweisbar |
| M1 | Fernmetastasen nachweisbar |

Die Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (Tabelle 1.2) erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation (Tabelle 1.1). Sie ist mitentscheidend für die jeweilige Therapieplanung. Zusätzlich werden histologisch noch Kriterien wie Tumorgrading, Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression und HER-2-Status bestimmt, die in die Therapieplanung mit einfließen.

Tabelle 1.2 UICC-Stadieneinteilung des Mammakarzinoms (Wittekind und Mayer, 2010, S.177)

| Stadium | T | N | M |
|---------|-----|----|----|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| I | T1 | N0 | M0 |
| IIA | T0 | N1 | M0 |

| | | | |
|------|----------------------------|----------------------------|----|
| | T1 T2 | N1 N0 | |
| IIB | T2 T3 | N1 N0 | M0 |
| IIIA | T0 T1 T2 T3 T3 | N2 N2 N2 N1 N2 | M0 |
| IIIB | T4 | N0, N1, N2 | M0 |
| IIIC | Jedes T | N3 | M0 |
| IV | Jedes T | Jedes N | M1 |

1.1.3 KNOCHENMETASTASEN

Das Skelettsystem ist neben Leber, Lunge und Gehirn eines der bevorzugten Organe des metastasierenden Mammakarzinoms. So entwickeln etwa 65-75 % der Patientinnen im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium Knochenmetastasen (Coleman, 2002).

Man unterscheidet osteolytische und osteoblastische Formen der Knochenmetastasen. Brustkrebs führt überwiegend zu osteolytischen Läsionen, nur etwa 15 % der Metastasen sind osteoblastisch oder gemischtförmig (Akhtari et al., 2008). Beide Formen stören die Balance zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau. Folgen sind Komplikationen wie Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Nerven- und Rückenmarkskompression sowie hyperkalzämische Episoden (Mundy, 2002), was zu erhöhter Morbidität und Mortalität führt (Coleman und Rubens, 1987).

Das Skelettsystem ist ein bevorzugtes Ziel für Metastasen des Mammakarzinoms. Metastasierung beschreibt einen mehrschrittigen Prozess, zu dem Extravasation, Angiogenese, Migration, Chemotaxis, Adhäsion und Proliferation im neuen Gewebe gehören. Ein großer Teil der dafür notwendigen Wachstumsfaktoren und Chemokine ist in größeren Mengen in der

mineralisierten Knochenmatrix gespeichert und wird durch Knochenabbau, mediiert durch Osteoklasten, freigesetzt. Als Beispiele sind *insulin-like growth factors* (IGFs), *fibroblast growth factor 1* und *2* (FGF-1 und -2), *platelet-derived growth factors* (PDGFs), *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *stromal-derived factor 1* (SDF-1) und *transforming growth factor beta* (TGF- β) zu nennen (Hauschka et al., 1986). Die von Osteoblasten synthetisierten Wachstumsfaktoren werden durch Osteoklasten-induzierte Knochenresorption freigesetzt und können somit Tumorzellen anlocken (Orr et al., 1979).

Die Tumorzellen können zu einem geringen Teil selbst den Knochen resorbieren, hauptsächlich ist für die Knochendestruktion allerdings die Interaktion der Tumorzellen mit Osteoblasten und Osteoklasten verantwortlich (Roodman, 2004). Von Brustkrebszellen sezernierte Zytokine und Wachstumsfaktoren (Interleukin 1 und 6, Prostaglandin E2, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *parathyroid hormone related protein* (PTHrP), *transforming growth factor alpha* (TGF- α), *epidermal growth factor* (EGF) und TGF- β) machen dies möglich (Mundy, 1997). PTHrP stimuliert Osteoblasten dazu, *receptor activator of NF- κ B ligand* (RANKL) zu sezernieren, welches wiederum Differenzierung und Aktivierung von Prä-Osteoklasten fördert (Thomas et al., 1999). TGF- β stimuliert Osteoblasten und Tumorzellen, noch mehr PTHrP auszuschütten (Thomas et al., 1999). Auch über den EGF-Rezeptor (EGFR)-Signalweg werden, nach Bindung seiner Liganden TGF- α und EGF Osteoklastenformation und -aktivierung stimuliert (De Luca et al., 2008).

1.1.4 THERAPIE DES FERNMETASTASIIERTEN MAMMAKARZINOMS

Da eine Heilung im fernmetastasierten Stadium nach heutigem Kenntnisstand nur in wenigen Ausnahmefällen zu erreichen ist, sollte das Ziel der Therapie der Erhalt einer möglichst hohen Lebensqualität sein. Therapeutisch stehen dafür, abhängig von Beschwerdebild, Alter, Allgemeinzustand, Aggressivität der Behandlung, Lokalisation der Metastasen, Art der Vorbehandlung, HER-2-Status, Hormonrezeptorstatus und Menopausenstatus, verschiedene Optionen zur Verfügung. Nicht nur bei Patientinnen in den Tumorstadien I-III, sondern

auch bei denen, die bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Fernmetastasen entwickelt haben, sollte der Primärtumor operativ entfernt werden (Rapiti et al., 2006). Besonders bei positivem Hormonrezeptorstatus profitieren die Patientinnen von einer endokrinen Therapie, wobei eine Remission bei bis zu 60 % der Patientinnen zu erwarten ist (Stockler et al., 2000). Bei der Wahl des Medikaments ist der Menopausenstatus zu berücksichtigen. Postmenopausale Patientinnen erhalten in erster Linie einen Aromatasehemmer der dritten Generation, bei Progression stellen Antiöstrogene, Östrogenrezeptor-Antagonisten oder hoch dosierte Gestagene eine Alternative dar (Fossati et al., 1998). Bei prämenopausalen Patientinnen ist die Ausschaltung der Ovarialfunktion mit *gonadotropin-releasing hormone I* (GnRH-I)-Analoge, Ovarektomie oder Radiomenolyse in Kombination mit dem Östrogenrezeptor-Modulator (SERM, *selective estrogen receptor modulator*) Tamoxifen indiziert (Klijn et al., 2001). In der Folge ist auch die Ovarialsuppression in Verbindung mit der Gabe eines Aromatasehemmers möglich (von Minckwitz et al., 1991). Bei erneuter Progression oder Unverträglichkeit des Aromatasehemmers stellt der Östrogenrezeptor-Destruktor (SERD, *selective estrogen receptor destructor*) Fulvestrant eine Alternative dar.

Die zytostatische Therapie ist aufgrund der damit einhergehenden Toxizität kritisch zu beurteilen und sollte erst bei Progress, Ausschöpfung der endokrinen Behandlungsmaßnahmen oder Nichtansprechen auf die endokrine Therapie zum Einsatz kommen. Als Präparate stehen verschiedene Substanzen, wie z.B. Anthrazykline oder Taxane zur Verfügung (Fossati et al., 1998). Bei Patientinnen mit metastasierendem Mammakarzinom, die den *erb-B2* Wachstumsfaktorrezeptor HER-2/neu überexprimieren, besteht die Indikation für HER-2-Inhibitoren in Kombination mit einer zytostatischen Chemotherapie oder als Monotherapie nach Vorbehandlung mit Anthrazyklinen oder Taxanen (Burstein et al., 2001). Einen weiteren Vertreter der gezielten Therapie stellt Bevacizumab, ein *vascular endothelial growth factor* (VEGF)-Inhibitor, dar. In Kombination mit dem Taxan Paclitaxel verlängert er im Vergleich zur Paclitaxel-Monotherapie die Zeit bis zum Progress der Erkrankung (Miller et al., 2007).

Speziell in der Behandlung der Skelettm metastasen bietet die Strahlentherapie zusätzlich zur systemischen Therapie eine Option zur lokalen Schmerzkontrolle und Stabilisierung frakturgefährdeter Areale (Hoskin et al., 2001). Auch eine operative Intervention kann in einigen Fällen zur Schmerzkontrolle, Stabilisierung und Versorgung pathologischer Frakturen sinnvoll sein (Ali et al., 2003). Medikamentös haben sich Bisphosphonate als Ergänzung zur systemischen endokrinen bzw. Chemo- oder Radiotherapie bewährt. Das Auftreten neuer Läsionen und die Progression, insbesondere osteolytischer Metastasen, kann verzögert werden. Zudem werden Hyperkalzämie und metastasenbedingter Knochenschmerz gelindert (Theriault et al., 1999).

1.2 DAS GONADOTROPIN-RELEASING-HORMON

1.2.1 GNRH-SYSTEM

Das *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH), auch luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon (LHRH) genannt, wurde erstmals im Jahr 1971 beschrieben (Amoss et al., 1971; Schally et al., 1971). Neben dieser zuerst entdeckten Isoform, dem GnRH-I, findet man in fast allen Vertebraten, einschließlich des Menschen, einen weiteren Subtyp, das GnRH-II (Lescheid et al., 1997).

GnRH-I nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation des reproduktiven Systems ein. Zu Beginn der Pubertät schüttet der Hypothalamus pulsatil in 90-120-minütigen Abständen GnRH-I aus. In der Menopause sistiert dies. Die pulsatile Freisetzung stimuliert über Bindung an den GnRH-I Rezeptor die Synthese und Freisetzung von LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen. LH und FSH stimulieren ihrerseits die Produktion der gonadalen Sexualhormone Östrogen und Progesteron. Durch verschiedene Rückkopplungsmechanismen wird die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse reguliert. Keine oder dauerhafte GnRH-Präsenz bzw. Störungen des Pulsgenerators führen zur verminderten Rezeptorexpression und zu Störungen der Follikelreifung, Ovulation und Funktion des Corpus luteum.

GnRH vermittelt sein Signal über zwei spezifische Rezeptoren. Der GnRH-I Rezeptor gehört zur Familie der 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren und ist G-Protein gekoppelt. Nach Bindung von GnRH-I kommt es zur Konformationsänderung der Rezeptoranteile, welches die Interaktion mit den assoziierten G-Proteinen ermöglicht. Die mit GTP beladene α -Untereinheit des G-Proteins aktiviert die Phospholipase C (PLC), die ihrerseits das membrangebundene Inositol-Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat (PIP_2) hydrolysiert. Als Spaltprodukte entstehen dabei die *second messenger* Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP3) (Kraus et al., 2001; McArdle et al., 2002; Ruf et al., 2003). IP3 erhöht über Aktivierung der Calciumkanäle im endoplasmatischen Retikulum die zytosolische Calciumkonzentration. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche weitere Phosphorylierungsschritte einleitet und u.a. die vier mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK 1/2), p38, *c-Jun N terminal kinase* (JNK) und *big MAPK* (BMK) aktiviert, die an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind (Bonfil et al., 2004; Harris et al., 2002; Levi et al., 1998).

Neben dem Vorkommen in Hypothalamus und Hypophyse konnte GnRH-I und sein Rezeptor auch in vielen anderen Geweben wie z.B. Hoden, Ovar, Plazenta, Endometrium und Brustdrüse nachgewiesen werden, wo GnRH in autokriner und parakriner Weise wirkt. Auch gynäkologische Tumoren, wie Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinome exprimieren GnRH-I und seinen Rezeptor. So sind 50-64 % aller Mammakarzinome und ca. 80 % der humanen Ovarial- und Endometriumkarzinome GnRH-I- und GnRH-I-Rezeptor-positiv (Irmer et al., 1994, Völker et al., 2002). Die intrazelluläre Signaltransduktion unterscheidet sich in den Karzinomen von der in der Hypophyse. GnRH-I induziert über G-Protein α_i eine Phosphotyrosinphosphatase (PTP), was zur Hemmung der mitogenen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion führt (Emons et al., 1997; Gründker et al., 2001b; Gründker et al., 2000; Limonta et al., 1999).

Neben GnRH-I wurde 1998 erstmals der Subtyp GnRH-II im Menschen beschrieben (White et al., 1998). Die Primärstruktur von GnRH-II gleicht der von GnRH-I bis auf drei Aminosäuren.

Der GnRH-II-Rezeptor konnte von Millar et al. (2001) beim Weißbüschelaffen und von Neill et al. (2001) beim Rhesusaffen nachgewiesen werden. Beim Menschen gelang der Nachweis eines vollständigen Transkriptes noch nicht. Neben strukturellen Unterschieden zwischen den beiden GnRH-Rezeptoren führt die Aktivierung des GnRH-II-Rezeptors auch zu anderen intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen (Millar et al., 2001). In gynäkologischen Karzinomen hingegen führt die Aktivierung des GnRH-II Rezeptors ähnlich wie über den GnRH-I-Rezeptor zur Interaktion mit der mitogenen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion. Eicke et al. konnten 2006 zeigen, dass GnRH-II über die Aktivierung einer PTP die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmt.

1.2.2 **GNRH-ANALOGA**

GnRH-Analoga umfassen GnRH-Agonisten und -Antagonisten. Strukturell unterscheiden sie sich vom nativen Protein durch den Austausch mindestens einer Aminosäure. Die Anzahl und die Position der substituierten Aminosäuren bestimmen, ob es sich dabei um Agonisten oder Antagonisten handelt. Der Vorteil der GnRH-Analoga gegenüber dem nativen GnRH liegt in der durch die Substitution verlängerten Halbwertszeit und erhöhten Affinität zum Rezeptor.

Die Behandlung mit GnRH-Analoga unterbindet die Steroidhormonbiosynthese. Während Antagonisten zur sofortigen Inhibition der LH- und FSH-Synthese führen, wirken Agonisten erst nach längerfristiger Applikation inhibitorisch auf die LH- und FSH-Synthese. Initial kommt es sogar zum sogenannten *flare up*-Effekt, einem Anstieg der LH- und FSH-Synthese, bevor eine verminderte Rezeptorexpression und Desensibilisierung gegenüber GnRH-I bzw. GnRH-I Agonisten zur Inhibition der Hypophysenhormonsynthese führen.

GnRH-Agonisten und -Antagonisten wirken über ihre Rezeptoren hemmend auf verschiedene zelluläre Funktionen, wie Proliferation (Emons et al. 2000), Zellzyklus (Günthert et al., 2002) und Apoptose (Gründker et al., 2002b). Zudem konnten von Alten et al. (2006) zeigen, dass der GnRH-I Agonist Triptorelin, der GnRH-I Antagonist Cetrorelix und in geringerer Weise der GnRH-II Agonist GnRH-II[D-Lys⁶] die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen unabhängig von ihrer Proliferation hemmen. Es ist

bekannt, dass ein Teil der genannten Effekte über die Interaktion der GnRH-Rezeptoren mit der mitogenen Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und anderen mit Tyrosinkinaseaktivität assoziierten Oncogenen gelingt (Gründker et al., 2001a).

1.2.3 GNRH-ANALOGA IN DER GYNÄKOLOGIE UND GEBURTSHILFE

Aufgrund der Schlüsselposition, die GnRH im reproduktiven System einnimmt, gibt es ein breites Anwendungsspektrum der GnRH-Analoga im Bereich der Gynäkologie und Geburtshilfe. Zu nennen sind dabei beispielsweise die Ovulationsinduktion im Rahmen der *in vitro* Fertilisation (IVF) (Engel et al., 2006), die Behandlung der Endometriose (Olive, 2004) oder der Pubertas praecox (Roth, 2002). Im Bereich der Onkologie werden GnRH-I Analoga zum einen zur Gonadenprotektion im Rahmen einer Chemotherapie bei prämenopausalen Patientinnen eingesetzt (Potolog-Nahari et al., 2007, zum anderen zur ablativen Therapie bei steroidhormonabhängigen Tumoren (Robertson und Blamey, 2003).

1.3 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA

1.3.1 TGF-BETA – STRUKTUR UND FUNKTION

Transforming growth factor beta (TGF- β) ist ein ungefähr 25 kDa großes Polypeptid und gehört zur TGF- β -Superfamilie. Weiterhin zählen zu dieser Gruppe von verschiedenen Zytokinen auch *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *growth and differentiation factors* (GDFs), Activine, Inhibine und das Anti-Müller-Hormon (AMH) (Padua und Massagué, 2009).

Es sind drei Isoformen von TGF- β bekannt (TGF- β 1-3), die sich in ihrer Bindungsaffinität zu den jeweiligen TGF- β -Rezeptoren (Rezeptor Typ I-III) unterscheiden (Massagué, 1990). Während Typ-III-Rezeptoren alle Isoformen gut binden, gibt es abhängig von Typ-I- und Typ-II-Rezeptor-Subtyp sowie Zellart Unterschiede in der Bindungsaffinität zu TGF- β_2 und TGF- $\beta_{1/3}$ (Massagué et al., 1992). In dieser Arbeit wurde mit TGF- β_1 gearbeitet.

TGF- β wird in fast allen eukaryoten Zellen exprimiert und als inaktiver Komplex, bestehend aus einem Dimer an ein *latent transforming growth factor binding*

protein (LTBP) gebunden, sezerniert. Extrazellulär wird der Komplex von Furinen und anderen Proteasen gespalten und so aktiviert (Dubois et al., 1995).

1.3.2 TGF-BETA-REZEPTOREN

Es sind drei verschiedene Rezeptortypen bekannt, an die die aktivierten TGF- β -Signalmoleküle binden. Rezeptor Typ-I und Typ-II sind Glykoproteine mit transmembranären Serin-/Threoninkinasen. Rezeptor Typ-III, auch Betaglycan genannt, ist ein Proteoglycan mit einem Kernprotein von 853 Aminosäuren und liegt neben der membranständigen auch in gelöster Form in der Extrazellulärmatrix vor. Im gelösten Zustand besitzt dieser Rezeptortyp eine höhere Affinität zu seinem Liganden als in membranassoziierter Form (Massagué et al., 1992). Das humane Genom kodiert sieben verschiedene Typ-I-Rezeptoren (ALK 1-7) und fünf verschiedene Typ-II Rezeptoren (ActR-IIa, ActR-IIb, BMPRII, AMHRII und T β RII). Für die Signaltransduktion ist das Zusammenwirken von einem Typ-I- mit einem Typ-II-Rezeptor notwendig. Je nach Ligand sind dafür verschiedene Kombinationen der Typ-I- und Typ-II-Subtypen nötig. Der Typ-III-Rezeptor erhöht durch Präsentation der aktivierten Liganden die Bindungseffizienz zu ihrem jeweiligen Rezeptor und ist nicht direkt in die Signaltransduktion eingebunden (Massagué et al., 1992).

1.3.3 TGF-BETA-SIGNALKASKADE

TGF- β bindet in der klassischen Signalkaskade an TGFBR2 (T β RII), der einen heteromeren Komplex mit TGFBR1 (ALK 5/T β RI) bildet. Die TGFBRII-Kinase phosphoryliert nach Bindung des Liganden die sogenannte GS-Domäne des TGFBR1, was zur Trennung der Kinase-Domäne des Typ-I Rezeptors von FK506 *binding protein* (FKBP12, FKBP 1A), einem TGF- β -Signalinhibitor, führt. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über Smad Proteine, von denen im menschlichen Genom acht exprimiert werden. Der aktivierte Typ-I Rezeptor-Kinase bindet die rezeptorassozierten Smad 2 und Smad 3 (R-Smads) und phosphoryliert diese. Die phosphorylierten R-Smads formieren dann mit Smad 4 einen Komplex und sammeln sich im Nukleus (Padua und Massagué, 2009). Dort regulieren die aktivierten Smad-Komplexe zusammen mit Transkriptionskofaktoren und zellspezifischen DNA-Bindungsdomänen die

Expression hunderter unterschiedlicher Zielgene und beeinflussen auf diese Weise verschiedene Zell- und Gewebefunktionen, wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Migration, Adhäsion, Biosynthese von extrazellulärer Matrix, Angiogenese und Modulation der Immunreaktion (Li et al., 2006; Massagué und Chen, 2000). Die genaue Wirkungsweise ist dabei abhängig von Zelltyp, Wachstumsbedingungen und der Präsenz anderer Wachstumsfaktoren. Speziell in Epithelzellen scheint die TGF- β /TGFBR-1/2 Signalkaskade über einen autokrinen Mechanismus die Balance zwischen Zellerneuerung, -differenzierung und programmiertem Zelltod zu halten (Boyd und Massagué, 1989) und somit neoplastischer Entartung entgegen zu wirken (Cui et al., 1995). Ein Verlust der TGF- β -Rezeptor-Funktion (Markowitz et al., 1995) und/oder seiner Signalmoleküle (Eppert et al., 1996; Hahn et al., 1996; Takaku et al., 1998; Zhu et al., 1998) führt zur malignen Progression.

Neben dem klassischen Smad-Signalweg ist der TGFBR2 auch fähig, mit anderen Mitgliedern der Typ-I-Rezeptorfamilie, wie z.B. ALK-1, ALK-2 und ALK-3 zu interagieren (Bharathy et al., 2008; König et al., 2005; Lebrin et al., 2005; Daly et al., 2008) und so die BMP Smads 1, 5 und 8 zu aktivieren. Normalerweise scheint diese Signalkaskade auf bestimmte Zell- und Gewebetypen, wie z.B. Endothel, neuronales und epidermales Gewebe, beschränkt zu sein. In neoplastischen Zellen bietet dieser Weg TGF- β jedoch die Möglichkeit, auf epitheliale-mesenchymale Transdifferenzierung (EMT), Zellmotilität und Invasion Einfluss zu nehmen (Bharathy et al., 2008). Des Weiteren sind andere zelluläre Mediatoren, wie JNK/p38 MAP Kinasen, Cdc42/Rho oder Par6 als mögliche TGF- β Signalträger bekannt, über die Veränderungen des Zell-Zell-Kontakts, eine Steigerung der Migration, Änderungen der Zellmorphologie oder Reaktionen auf Stress vermittelt werden (Padua und Massagué, 2009).

1.3.4 ROLLE VON TGF-BETA IN DER TUMORBIOLOGIE UND METASTASIERUNG

Der Wachstumsfaktor TGF- β kontrolliert verschiedenste Zellfunktionen, zu denen u.a. Zytostase und Apoptose gehören. So ist es nicht verwunderlich, dass TGF- β in frühen Stadien der Tumorgenese als Tumorsuppressor wirkt,

Zellproliferation inhibiert, Differenzierung unterstützt und Apoptose von normalen epithelialen Zellen und Tumorzellen induziert (Sporn und Roberts, 1990; Brattain et al., 1996, Arteaga et al., 1990). In späteren Stadien der Tumorgenese geht mit einer Inaktivierung oder Mutation einzelner Stationen in der Signalkaskade, wie z.B. Verlust der TGFBR2- oder SMAD 4-Expression, die autokrine Aktivität und die Ansprechbarkeit auf exogenes TGF- β und somit die Tumorsuppressor-Aktivität verloren und TGF- β wirkt über verbleibende Signalwege sogar förderlich auf Wachstum, Invasion, Metastasierung und Angiogenese der Tumorzellen (Serra und Crowley, 2003; Wakefield und Roberts, 2002; Massagué, 1998). Zudem kann eine erhöhte Expression von (Proto-) Onkogenen, die mit dem Smad-Signalweg interagieren, zu verminderter Ansprechbarkeit auf TGF- β führen und den Zellen somit ermöglichen, der Tumorsuppressor-Aktivität zu entgehen (He et al., 2003). Die Bedeutung von TGF- β in der Tumorprogression und Metastasierung wird in verschiedenen präklinischen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen deutlich, die mit TGF- β -Inhibitoren arbeiten (Muraoka et al., 2002; Yang et al., 2002, Bandyopadhyay et al., 2006; Ge et al., 2006).

Eine besondere Rolle spielt TGF- β bei der Metastasierung von Brustkrebszellen in den Knochen. TGF- β , insbesondere TGF- β_1 , ist in der mineralisierten Knochenmatrix gebunden und wird nach Knochenresorption freigesetzt. Zum einen sind verschiedene weitere Faktoren bekannt, wie *connective-tissue growth factor* (CTGF), Interleukin-11 und -6 (IL-11 und -6), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) (Yin et al., 1999; Chirgwin und Guise, 2000), deren Transkription in Mammakarzinomzellen durch TGF- β hochreguliert wird und so Osteolyse und Metastasenwachstum fördert (Guise und Chirgwin, 2003). Zum anderen steigert TGF- β über PTHrP und dadurch freigesetzten *Receptor Activator of NF κ -B-Liganden* (RANKL) die Osteoklastendifferenzierung aus hämatopoetischen Vorstufen (Thomas et al., 1999). Dies führt einerseits zu vermehrter Knochenresorption und TGF- β -Freisetzung aus der Knochenmatrix und andererseits zur weiteren Erhöhung des TGF- β -Spiegels durch Sekretion von aktivem TGF- β aus den Osteoklasten (Oursler et al., 1994). Zudem hemmt von

Brustkrebszellen sezerniertes TGF- β die Osteoblastendifferenzierung (Mercer et al., 2004). Ein Teufelskreis beginnt, der es den Brustkrebszellen ermöglicht, sich im Knochen zu etablieren.

Verschiedene Autoren beschreiben eine Reduktion der Anzahl und Größe von Brustkrebs-Knochenmetastasen nach Blockade der TGF- β -Signaltransduktion an verschiedenen Punkten der Signalkaskade (Bandyopadhyay et al., 2006; Yang et al., 2002; Yin et al., 1999).

1.4 EPIDERMAL GROWTH FACTOR

1.4.1 EGF – STRUKTUR UND FUNKTION

Der epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ist Mitglied der EGF-ähnlichen Peptidfamilie. Dazu zählen auch *transforming growth factor- α* (TGF- α), Amphiregulin (AR), Betacellulin (BTC), *heparin-binding-EGF* (HB-EGF), Epiregulin (EPR), Heregulin (HRG) und Neureguline (NRG) (Olayioye et al., 2000). Die strukturelle Verwandtschaft lässt sich an dem EGF-Motiv erkennen. Dieses besteht aus sechs Cystiinen und bildet über drei Disulfidbrücken verbunden eine typische dreischleifige Sekundärstruktur, die alle Mitglieder der Familie entweder einzeln oder in Wiederholungen aufweisen (Salomon et al., 1995).

Durch Unterschiede in der Bindungsaffinität zu den verschiedenen Rezeptoren der ErbB-Familie, Organ- und Entwicklungsstadium-abhängiger Verfügbarkeit und Kontextabhängigkeit werden verschiedene Wirkungen vermittelt (Olayioye et al., 2000). Den EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren kommt eine wichtige Rolle in Wachstum und Differenzierung zu.

1.4.2 EGF-REZEPTOR

Der EGF-Rezeptor (EGFR/ErbB1/HER1) gehört wie auch ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) zur ErbB-Familie, einer Subgruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Sie werden in vielen verschiedenen Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert, in denen sie eine fundamentale Rolle in Entwicklung, Proliferation und Differenzierung spielen (Salomon et al., 1995). Im Brustdrüsengewebe fördert der EGFR das

duktale Wachstum, wohingegen ErbB2 und ErbB4 wohl eine Schlüsselrolle in loboalveolärer Differenzierung und Laktation zukommt (Olayioye et al., 2000). Der EGF-Rezeptor ist ein membranständiger Rezeptor, bestehend aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer einzelnen hydrophoben Transmembrandomäne und einer Tyrosinkinase im zytosolischen Teil (Olayioye et al., 2000). Die Aktivierung folgt nach Bindung von Liganden der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorenfamilie. TGF- α , EGF und AR binden spezifisch an den EGFR, während BTC, HB-EGF und EPR sowohl an den EGFR als auch an HER4 binden können (Olayioye et al., 2000).

1.4.3 EGF-SIGNALTRANSDUKTION

EGF kann in autokriner und parakriner Weise wirken (Olayioye et al., 2000). Die ErbB Rezeptoren werden nach Bindung eines Liganden der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorenfamilie aktiviert. Die Bindung führt zur Dimerisierung der Tyrosinkinase-Rezeptoren und zur Autophosphorylierung in der Tyrosinregion, wodurch spezielle Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine frei werden (Heldin, 1995). Über Adapterproteine können dann verschiedene interagierende Proteine und intrazelluläre Signalwege aktiviert werden (Olayioye et al., 2000). Dazu zählen die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB/AKT), der Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinasen (MAPK)-Weg, die Phospholipase C-Proteinkinase C (PLC-PKC) und der *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Signalweg. Die Aktivierung dieser Signalmoleküle reguliert über Änderungen im Expressionsmuster verschiedene zelluläre Funktionen, die primär für die normale Zellproliferation, Inhibition der Apoptose, Zellzyklus und Zelldifferenzierung wichtig sind, aber auch in Tumorphathogenese, Progression und Metastasierung involviert sein können (Normanno et al., 2006).

1.4.4 ROLLE VON EGF UND EGFR IN DER TUMORBIOLOGIE UND METASTASIERUNG

Der EGFR und seine Liganden gehören zur Familie der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese der meisten humanen Karzinome (Salomon et al., 1995). Eine Überexpression bzw.

Fehlregulation in der EGF/EGFR-Signalkaskade und in nachgeschalteten Signalwegen ist assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechten klinischen Prognose bei Brustkrebspatienten (Garcia et al., 2006). EGF wirkt über den EGFR in autokriner und parakriner Weise förderlich auf die Tumorphagenese und –progression. Zellproliferation, Überleben, Zellmotilität, Gewebeinvasion, Metastasierung und Zytostatikaresistenz sind Wirkungen der EGF/EGFR-Signalkaskade (Salomon et al., 1995; Garcia et al., 2006).

Das EGFR System ist in wichtige Phänomene involviert, die Tumorprogression und Metastasierung fördern. Dazu zählen (1) Angiogenese, die vom EGFR/Liganden-System über direkte und indirekte Effekte auf endotheliale Zellen reguliert wird, (2) Osteoklasten-medierte Knochendestruktion, welche für die Entwicklung von Knochenmetastasen notwendig ist (De Luca et al., 2008) und (3) Invasivität, z.B. über Stimulierung der uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) und MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9) Expression (Normanno und Gullick, 2006). Ähnlich wie TGF- β , fördert der EGF/EGFR-Signalweg die *epithelial-to-mesenchymal-transition* (EMT), welche ein wichtiger Mechanismus für Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ist (Barr et al., 2008). Charakteristisch für Zellen, die eine Transition durchlaufen haben, ist die Veränderung der Expression verschiedener Proteine, die Zelladhäsion und Zellmotilität beeinflussen (Barr et al., 2008). Die Blockade des EGFR hemmt die EMT und die Migration von Tumorzellen *in vitro* (Barr et al., 2008).

Garcia et al. (2006) zeigten, dass die Behandlung der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit EGF einen moderaten Effekt auf die Zellproliferation hat, allerdings verstärkte Auswirkungen auf Morphologie und Zellmotilität verursacht. Tong et al. (2007) konnten ebenfalls zeigen, dass EGF einen chemotaktischen Effekt auf Östrogenrezeptor-positive MCF-7 Zellen hat und die Invasivität dieser erhöht. Die Vorbehandlung mit Tamoxifen verringert die Zellmotilität.

Da EGF und seinen Rezeptoren eine wichtige Funktion in der Pathogenese maligner Erkrankungen zukommt, stellt die Blockade des EGFR bzw. der HER mit Antagonisten oder Antikörpern eine Option in der gezielten Tumortherapie dar.

1.5 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Bis zu 75 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs entwickeln Knochenmetastasen, die mit einer Vielzahl von Komplikationen und hoher Morbidität verbunden sind. In den einzelnen Schritten der Metastasierung, von der Extravasation bis hin zur Etablierung und Wachstum im neuen Gewebe, spielen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Gerade in der Knochenmatrix sind verschiedene Wachstumsfaktoren in größeren Mengen gespeichert und somit ein bevorzugtes Ziel metastasierender Krebszellen.

Die meisten humanen Mammakarzinome exprimieren GnRH und seinen Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass GnRH-Analoga einen antiproliferativen und Apoptose-induzierenden Effekt auf Tumorzellen haben. In weiteren Versuchen konnte mit dem hier verwendeten Kokultursystem, in dem die Interaktion zwischen Brustkrebs- und Knochenzellen analysiert werden kann, gezeigt werden, dass die GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] die Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen hemmen. Die hierfür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Es liegt jedoch nahe, dass die Beeinflussung der Expressierung von Wachstumsfaktoren dabei eine entscheidende Rolle spielt, zumal bereits nachgewiesen wurde, dass GnRH-Analoga im Kokulturmodell die mRNA-Expression von dem Chemokin SDF-1 in humanen Osteoblasten bzw. MG-63 Zellen signifikant hemmen.

Dem *epidermal growth factor* (EGF) und dem *transforming growth factor β* (TGF- β) sowie deren Rezeptoren kommen in verschiedenen Schritten der Metastasierung wichtige Bedeutungen zu. Daher soll in dieser Arbeit die Wirkung der GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA Expression von EGF, EGFR, TGF- β und TGFBR1 und TGFBR2 während der Kokultur untersucht werden.

Damit soll diese Arbeit einen Beitrag zur Etablierung der GnRH-Analoga in der onkologischen Therapie des Mammakarzinoms leisten.

2 MATERIAL

2.1 GERÄTE

| | |
|--|---------------------|
| Analysenwaage BP161P | Sartorius |
| Autoklav, 2540 EL | Tuttnauer |
| Biofuge pico | Heraeus Holding |
| Bio Doc Analyze | Biometra |
| Brutschrank, Model 3121 S/N 28439531 | Forma Scientific |
| Gene Amp PCR-System 2400 | Amersham Bioscience |
| Labofuge 400R | Heraeus Holding |
| Mikrowaage, elektronisch, M2P | Sartorius |
| Neubauer-Zählkammer (0,1 mm/0,0025 cm ²) | Optik-Labor |
| Phasenkontrastmikroskop, axiovert 25 | Zeiss |
| Pipetus | Hirschmann |
| Pipetten, Research | Eppendorf |
| Polaroid Land-Kamera, MP 4 | Polaroid |
| Quarzglas-Küvette Suprasil® | Hellma |
| Spektralphotometer (Biophotometer) | Eppendorf |
| Standard Power Pack P25 | Biometra |
| Sterilwerkbank, LaminAir®, LFM 2462 S | Heraeus Holding |
| Thermocycler T3000 | Biometra |
| Thermomixer compact | Eppendorf |
| UV-Transilluminator | Biometra |
| Vortex Genie 2™ | Bender & Hobein |
| Waage, Kern 440-47 | Kern |
| Wasserbad | Memmert |

2.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) wurden von den Firmen Biozym, Eppendorf, Greiner bio-one, Merck, Nunc und Sarstedt bezogen.

Glasgeräte, Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen wurden autoklaviert.

2.3 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen und Puffer wurden von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich. Die Chemikalien entsprechen, soweit nicht anders angegeben, dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad.

Für das Ansetzen von Puffern und anderen Lösungen wurde, falls nicht gesondert erwähnt, autoklaviertes, doppelt destilliertes Wasser verwendet. Der pH-Wert wurde, wenn notwendig, eingestellt.

| | |
|-------------------------|---|
| <i>blocking</i> -Lösung | TBST + 5 % (w/v) Magermilchpulver |
| DNA-Ladepuffer (10x) | 50 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol |
| Ethidiumbromid-Bad | 0,007 % (v/v) EtBr |
| 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 |
| TBE | 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8 |
| TBS (10x) | 1,5 M NaCl, 500 mM Tris, pH 7,5 |

2.4 GNRH ANALOGA

Der GnRH-I-Agonist Triptorelin wurde freundlicherweise von Ferring Pharmaceuticals und der GnRH-I-Antagonist Cetrorelix von Aeterna Zentaris zur Verfügung gestellt (Tab. 2.1). Der verwendete GnRH-II-Agonist GnRH-II[D-Lys⁶] wurde in unserem Auftrag von der Firma Peptide Specialty Laboratories GmbH synthetisiert. Die Lieferung erfolgte als HPLC-aufgereinigtes TFA-Salz, das in 1 N Essigsäure angelöst wurde.

Tabelle 2.1 Verwendete GnRH-Analoga

| GnRH-Analoga | Strukturabweichungen vom nativen Protein | Referenz |
|---|--|-----------------------------|
| Triptorelin GnRH-I-Agonist | [D-Trp ⁶] | Ferring Pharmaceuticals |
| Cetrorelix GnRH-I-Antagonist | [(AcD-2Nal ¹), (D-4Cpa ²), (D-3Pal ³), (D-Cit ⁶), (D-Ala ¹⁰) ¹⁰] | Aeterna Zentaris GmbH |
| GnRH-II[D-Lys ⁶] GnRH-II-Agonist | [D-Lys ⁶] | (Gründker et al., 2002a) |

2.5 ZELLKULTUR

2.5.1 KULTURMEDIEN

Die für die Zellkultur eingesetzten Medien und deren Zusätze wurden von Biochrom, Invitrogen, PAA und Sigma-Aldrich bezogen, soweit dies nicht anders vermerkt ist.

DMEM-Kulturmedium,
verringerte
Serumkonzentration
w/o Phenolrot
(für Kokulturversuche)

1 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 1 % (v/v) L-Gln

DMEM-Kulturmedium
w/o Phenolrot
(für Kokulturversuche)

10% (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 1 % (v/v) L-Gln

| | |
|--------------------------------------|--|
| DMEM-Kulturmedium w Phenolrot | 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 1 % (v/v) L-Gln |
| MEM-Earl-Kulturmedium w Phenolrot | 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) P/S, 50 IU Insulin |

2.5.2 ZELLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien MG-63 und MCF-7 wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen.

Vorversuche zu der Arbeit von von Alten et al. (2006) haben gezeigt, dass die Osteosarkom-Zelllinie MG-63 in diesem Versuchsaufbau vergleichbar mit humanen Osteoblasten reagiert. Auch wenn einschränkend angemerkt werden muss, dass MG-63 im Vergleich zu Osteoblasten sich insbesondere in ihrem Wachstumsverhalten unterscheiden. Dies beinhaltet u.a. die hohe Verdopplungsrate, die fehlende Wachstumshemmung mit Ausbildung von Multilayerverbänden sowie die Fähigkeit zur vermehrten Eigenproduktion von Wachstumsfaktoren, wie z.B. auch TGF- β_1 . Aufgrund der besseren Verfügbarkeit, der Stabilität ihrer funktionellen Eigenschaften über längere Passagezeiträume sowie die spezifischen osteoblastären Eigenschaften der Zelllinie MG-63 wurde diese an Stelle von humanen Osteoblasten für alle Versuche in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 2.2 Verwendete Zelllinien: Mammakarzinom, Fibroblasten

| Zelllinie | Herkunft | Histologie | Referenz |
|-----------|--------------|---------------|------------------------|
| MCF-7 | Pleuraerguss | Adenokarzinom | (Soule et al, 1973) |
| MG-63 | Knochen | Osteosarkom | (Billiau et al., 1977) |

2.6 OLIGONUKLEOTIDE

Alle vorliegenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

EGF: for 5' – ACA TCA AAT ATC CTC AAT GG – 3'
rev 5' – GTG GCA TCA AGA CCG GGC TGC – 3'

EGF-R1: for 5' – TCC TCC CAG TGC CTG AAT AC – 3'
rev 5' – TAA TTT GGT GGC TGC CTT TC – 3'

TGF- β 1: for 5' – GGA CAC CAA CTA TTG CTT CAG CT – 3'
rev 5' – CTT GCT GAT CTG CGT TGT CCA GG – 3'

TGF- β -R-I: for 5' – TAT GAT ATG ACA ACG TCA GGT TCT G – 3'
rev 5' – GAG CAA GTT TTA TCA TTC CTT CCA C – 3'

TGF- β -R-II: for 5' – ACT AGA GAC AGT TTG CCA TGA – 3'
rev 5' – ATA TTC TTC TGA GAA GAT GAT G – 3'

L7: for 5' – AGA TGT ACA GAA CTG AAA TTC – 3'
rev 5' – ATT TAC CAA GAG ATC GAG CAA – 3'

2.7 ENZYME, PROTEINE, REAKTIONS- U. EXTRAKTIONSKITS

| | |
|---------------------------------------|------------|
| DNA-Ladder, 100 bp | Invitrogen |
| DNase I® | Roche |
| dNTPs | Roche |
| Recombinant RNasin® RNase Inhibitor | Promega |
| RNeasy® Mini Kit | Quiagen |
| SuperScript™ II Reverse Transcriptase | Invitrogen |
| Taq DNA Polymerase | Roche |
| Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 % in D-PBS) | PAA |

2.8 SOFTWARE

| | |
|---|------------------------|
| GraphPad Prism® (Version 6) | GraphPad Software Inc. |
| Kodak Digital Science 1D Image Analyse Software (Version 2.0.3) | Kodak |
| Microsoft® Office 2007 | Microsoft Corporation |

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTUR UND PASSAGIERUNG ADHÄRENTER ZELLEN

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte bei 37°C im Brutschrank mit wasserdampfgesättigter und 5 % CO₂ angereicherter Atmosphäre. Als Kulturgefäße wurden 75 cm² große Zellkulturflaschen verwendet. Das jeweilige Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die Zellen wurden in bestimmten Zeitintervallen, die sich individuell nach den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie richteten, passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 6 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 ml Trypsin/EDTA 5 bis 10 min. im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde dabei regelmäßig im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Durch Zugabe von 6 ml FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinreaktion gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min. bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer je nach Versuchsprotokoll in die entsprechenden Versuchsgefäße ausgesät. Überschüssige Zellen wurden verworfen.

3.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Bei der Aussaat für quantitative Zellkulturversuche ist eine Bestimmung der Zellzahl unerlässlich. Diese erfolgte manuell durch Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde die auszuzählende Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung verdünnt, um abgestorbene Zellen sichtbar zu machen, und in die Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden nun die nicht angefärbten Zellen gezählt.

Die Neubauer-Zählkammer hat eine Tiefe von 0,1 mm und eine Fläche von 1 mm². Sie beinhaltet ein Gitternetz, das aus 4 Quadranten à 16 Quadraten besteht. Um die Zellzahl pro ml zu bestimmen, wurde die durchschnittliche

Zellzahl pro Quadrant ermittelt und diese Zahl mit 10^4 multipliziert. Die Verdünnung mit Trypanblaulösung wurde in der Berechnung berücksichtigt.

3.3 KOKULTUR UND BEHANDLUNG DER ZELLEN

Die Kokultivierung ohne direkten Zellkontakt von MCF-7 und MG-63 erfolgte in einer modifizierten Boyden Chamber (Abb. 3.1). Das System (ThinCert™, Greiner bio-one) besteht aus einer 6 Well Multiwell Platte, in die Zellkultureinsätze (*Inserts*) eingehängt werden. Diese trennen die verschiedenen Zelltypen über eine Polycarbonat-Membran mit einem Porendurchmesser von 8 μm . Die Membran wird vor der Aussaat der Zellen mit Matrigel™ (Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) 1:1 verdünnt mit phenolrot-freiem, serum-freiem DMEM beschichtet. Der Porendurchmesser von 8 μm erlaubt noch einen Durchtritt der im Insert befindlichen Mammakarzinomzellen.

Die Zellaussaat für die Versuche erfolgte nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer. Pro Vertiefung wurden 6×10^4 Knochenzellen in 2 ml phenolrot-freiem DMEM suspendiert und ausplattiert. Die Aussaat der Mammakarzinomzellen in die Zellkultureinsätze erfolgte in einer Konzentration von 35×10^4 Zellen / 1,5 ml phenolrot-freiem DMEM. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen, die beiden Zelllinien zur Kokultur zusammengesetzt (Abb. 3.2). Zu diesem Zeitpunkt (t_0) erfolgte die erste Stimulation der Mammakarzinomzellen mit den GnRH-Analoga bzw. mit PBS für die Kontrollansätze. Das Kulturmedium der MCF-7-Zellen wurde dafür abgesaugt und in derselben Menge mit der entsprechenden Konzentration der GnRH-Analoga erneuert (Tab. 3.1). Je nach Versuch erfolgte zu den Zeitpunkten t_{48} und / oder t_{72} eine weitere Behandlung der Zellen mit GnRH-Analoga in derselben Konzentration. Das Medium der Knochenzellen wurde bei den länger andauernden Versuchen nach 48 h ersetzt.

Die Versuche wurden unter Stressbedingungen wiederholt. Dafür wurden sowohl Knochen- als auch Mammakarzinomzellen 72 h vor und während des

Versuches in einem Medium kultiviert, das statt mit 10 % FCS nur mit 1 % FCS versetzt war.

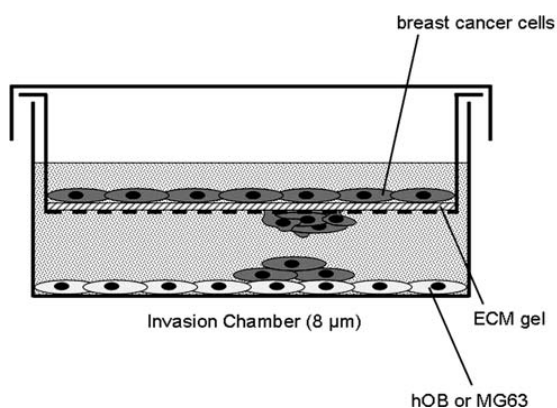


Abbildung 3.1 Kokultur-System

| | | |
|-------------------------|------------------------|--|
| Kein Insert | MCF-7 (+PBS) | MCF-7 (+PBS) |
| MG-63 | DMEM | MG-63 |
| MCF-7 (+Triptorelin) | MCF-7 (+Cetrorelix) | MCF-7 (+GnRH-II[D-Lys ⁶]) |
| MG-63 | MG-63 | MG-63 |

Abbildung 3.2 Schema des Versuchsaufbaus: 6-Well-Platte mit Inserts

Tabelle 3.1 Konzentration der verwendeten GnRH-Analoga

| GnRH-Analoga | Konzentration |
|------------------------------|----------------------|
| Triptorelin | 1×10^{-5} M |
| Cetrorelix | 1×10^{-5} M |
| [D-Lys ⁶]GnRH-II | 1×10^{-9} M |

3.4 ZELLERNTTE

Die Zellernte erfolgte nach 48 h, 72 h und 96 h. Die gewonnenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Zunächst wurde unter dem Abzug der RLT-Puffer des Rneasy® Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers mit β -Mercaptoethanol versetzt, in einem Verhältnis von $10\ \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol pro $10\ \text{ml}$ RLT-Puffer. Für jedes *Well* bzw. *Insert* wurde ein Eppendorf-Cup vorbereitet und auf Eis kühl gestellt. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Mammakarzinomzellen und die Matrigel-Beschichtung mit einem abgeflamnten und abgekühlten Spatel mechanisch gelöst und mit einer Pipette in ein mit $600\ \mu\text{l}$ des vorbereiteten RLT-Puffers gefülltes Eppendorf-Cup überführt. Zur Ernte der Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurde der Überstand abgesaugt und $600\ \mu\text{l}$ des RLT-Puffers in die *Wells* pipettiert. Nach 1 min. unter leichtem Schwenken der 6-*Well*-Platte wurde das Gemisch mit einer Pipette aufgenommen und in ein vorbereitetes Eppendorf-Cup überführt.

3.5 ISOLIERUNG DER GESAMT- RNA UND QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen erfolgte mit Hilfe des Rneasy® Mini Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die RNA mit einem Guanidin-Isothiocyanat-Puffer (RLT-Puffer) lysiert und homogenisiert, anschließend an eine Membran aus Silikagel gebunden, gewaschen und mit RNase-freiem H_2O eluiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration. Nukleinsäuren haben im ultravioletten Licht bei einer Wellenlänge von $260\ \text{nm}$ ihr Absorptionsmaximum. Die Breite des Maximums ist ein Indikator für die Reinheit der DNA bzw. RNA und wird durch den Quotient der Extinktionen bei $260\ \text{nm}$ und $280\ \text{nm}$ ($\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$) bestimmt. Eine $\text{OD} = 1$ entspricht einer RNA-Konzentration von $40\ \mu\text{g/ml}$ in der Messlösung. Der Quotient aus den Absorptionen bei $260\ \text{nm}$ und $280\ \text{nm}$ gilt als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Idealerweise liegt dieser Wert für RNA bei 2,0. Die Absorption der Proben wurde in einem Gesamtvolumen von $70\ \mu\text{l}$ ($7\ \mu\text{l}$ RNA-Eluat und $63\ \mu\text{l}$ Ampuwa) in $10\ \text{mm}$ Quarzküvetten gegen Ampuwa

im Spektralphotometer bestimmt. Es folgte die anschließende Lagerung der gewonnenen RNA-Proben bei -80°C .

3.6 REVERSE TRANSKRIPTION

Um in der semiquantitativen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als *Template* verwendet werden zu können, muss die gewonnene Gesamt-RNA durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase, in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde das SuperScript™ Präamplifikationssystem (Invitrogen) verwendet. Das in diesem System verwendete Enzym weist als Besonderheit eine reduzierte RNase-H-Aktivität auf. Um eventuelle Verunreinigungen ausschließen zu können, erfolgte vor der Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) eine Inkubation mit den Enzymen RNasin® (Promega) und DNase I (Roche). Im Ansatz wurde zu $1\ \mu\text{g}$ RNA je $1\ \mu\text{l}$ der Enzyme hinzugefügt und mit Rnase-freiem H_2O auf $14\ \mu\text{l}$ aufgefüllt. Der Verdau erfolgte im Thermocycler bei 37°C für 30 min. mit anschließender Denaturierung bei 70°C für 10 min. und folgender Kühlung bei 4°C .

Für die eigentliche cDNA-Synthese wurde aus den in Tab. 3.2 aufgeführten Reagenzien ein Mastermix angesetzt.

Zu jeder Probe wurden nun $26\ \mu\text{l}$ des Mastermixes hinzugefügt. Anschließend erfolgte im Thermocycler eine Inkubation für 60 min. bei 37°C und eine Denaturierung für 10 min. bei 95°C . Nach Abkühlung auf 4°C wurde die cDNA bis zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.2 Mastermix

| | Menge |
|--------------------|--------------------|
| Oligo-d(T)15Primer | $8,0\ \mu\text{l}$ |
| dNTPs (10 mM) | $4,0\ \mu\text{l}$ |
| 5 x RT-Puffer | $8,0\ \mu\text{l}$ |
| 0,1 M DTT | $4,0\ \mu\text{l}$ |
| SuperScript™ | $2,0\ \mu\text{l}$ |

3.7 SEMIQUANTITATIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION

Mit der von Mullis et al. (1986) entwickelten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. Als Material diente die zuvor in der RT-PCR gewonnene cDNA. Eine hitzestabile DNA-Polymerase, die *Taq*-Polymerase (Saiki et al., 1988), synthetisiert, ausgehend von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (*Primer*), einen neuen DNA-Doppelstrang an einzelsträngigen DNA-Matrizen. Durch einen zweiten gegenläufig orientierten Primer kann die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern repliziert werden. Der Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C
2. Anlagerung der Primer (*Annealing*) an die DNA-Einzelstränge bei einer primer-spezifischen Temperatur
3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Elongation) bei 72°C

Den Zyklen wird eine 2-minütige Denaturierungsphase vorangestellt, um sicher zu stellen, dass die gesamte eingesetzte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR schließt sich eine 10-minütige Elongationsphase an, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können.

Für den Nachweis, dass die gewonnenen cDNA-Proben intakt sind, wurde eine PCR für das *Housekeeping*-Gen L7 durchgeführt. Um die Reinheit des verwendeten Amplifikationsgemisches (Tab. 3.3) und des H₂O zu überprüfen, wurde jeweils ein Reaktionsgefäß ohne Zugabe von cDNA mitgeführt.

In Tabelle 3.4 sind das PCR-Programm und die Targetgröße für das jeweilige Gen zusammengefasst. Die Zyklenanzahl variiert je nach Zellart und Passage.

Tabelle 3.3 Reaktionsansatz für Polymerasekettenreaktion

| Reagenz | Menge |
|-------------------------|----------|
| DEPC H ₂ O | 11 µl |
| Primer <i>sense</i> | 0,3 µl |
| Primer <i>antisense</i> | 0,3 µl |
| 10x PCR-Puffer | 1,5 µl |
| dNTPs (10 mM) | 1,2 µl |
| <i>Taq</i> -Polymerase | 0,075 µl |
| cDNA | 0,6 µl |
| Gesamtvolumen | 14 µl |

Tabelle 3.4 PCR-Programm: Temperatur und Zeit; Zyklenanzahl; Targetgröße

| Gen | Denaturierung | Annealing | Elongation | Zyklen | Target |
|------------|---------------|--------------|---------------|--------|--------|
| EGF | 30 sec, 94°C | 60 sec, 55°C | 60 sec, 72°C | 22-29 | 330 bp |
| EGF-R-1 | 30 sec, 94°C | 30 sec, 58°C | 60 sec, 72°C | 24-31 | 240 bp |
| TGF-β-1 | 75 sec, 94°C | 75 sec, 58°C | 120 sec, 72°C | 25 | 187 bp |
| TGF-β-R-I | 60 sec, 94°C | 60 sec, 57°C | 120 sec, 72°C | 26-31 | 375 bp |
| TGF-β-R-II | 60 sec, 94°C | 60 sec, 52°C | 60 sec, 72°C | 27-32 | 170 bp |
| L7 | 30 sec, 94°C | 60 sec, 54°C | 120 sec, 72°C | 19-21 | 357 bp |

3.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE UND QUANTIFIZIERUNG DER PCR-PRODUKTE

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe zu trennen. Zur Herstellung der 1,5 %-igen Agarose-Gele wurde die entsprechende Menge an Agarose (peqGOLD Universal Agarose, peqLab) in ½ x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und ohne Luftbläschen in die Gelkammern mit eingestecktem Kamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es mit ½ x TBE-Puffer in einer Elektrophoresekammer überschichtet und der Gelkamm gezogen. Je 10 µl der zu analysierenden Nukleinsäuren wurden mit je 2 µl 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die

Geltaschen pipettiert. Als Referenz diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp Ladder, Invitrogen). Zur Standardisierung liefen die L7-Fragmente auf dem gleichen Gel wie die EGF-, EGF-R-1-, TGF- β -1-, TGF- β -R-I- und TGF- β -R-II-Fragmente.

Die Elektrophorese dauerte 45 min. bei 85 V. Aufgrund der Farbbande des DNA-Ladepuffers ist eine Abschätzung der Laufstrecke möglich. Die Gele wurden anschließend für 20 min. im EtBr-Bad gefärbt, in ddH₂O gewaschen und die Ergebnisse mit dem Bio Doc Analyse der Firma Biometra festgehalten. Die Auswertung erfolgte mit der Kodak Digital Science™ 1D Image Analyse Software. Die Expressionsstufen wurden gegen die Kontrollen abgeglichen.

3.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software (Version 4.03). Es wurden der one-way Anova- sowie der Newman-Keuls-Test zur statistischen Auswertung angewendet. Die statistische Analyse wurde wie folgt angegeben: a, $p < 0,05$ vs. Kokultur; b, $p < 0,01$ vs. Kokultur; c, $p < 0,001$ vs. Kokultur; n. s., nicht signifikant.

4 ERGEBNISSE

4.1 WIRKUNG VON GnRH-ANALOGA AUF DIE MRNA-EXPRESSION VON EGF UND EGFR WÄHREND DER KOKULTUR

Die GnRH-I- und GnRH-II-Rezeptor-positive-Zelllinie MCF-7 wurde mit der Osteoblasten-ähnlichen-Zelllinie MG-63 für 48 h kokultiviert. Daneben wurden als Kontrolle MCF-7 über Medium und MG-63 ohne MCF-7 kultiviert. Nach Aussaat der Zelllinien und einer 24-stündigen Anwachszeit folgte zum Zeitpunkt t_0 das Zusammensetzen zur Kokultur und die Stimulation von MCF-7 mit dem GnRH-I Agonisten Triptorelin, dem GnRH-I Antagonisten Cetrorelix oder dem GnRH-II Agonisten GnRH-II[D-Lys⁶]. Als Kokulturkontrolle diente eine mit PBS behandelte Probe. Nach 48 h wurde der Versuch beendet.

Mittels PCR wurde die EGF mRNA Expression sowohl in MCF-7 als auch in MG-63 bestimmt. Zum Abgleich wurde das *housekeeping-gene* L7 mitgeführt. Wie die Abb. 4.3 zeigt, hat die Behandlung von MCF-7 mit Triptorelin, Cetrorelix oder GnRH-II[D-Lys⁶] weder in MCF-7 noch in MG-63 einen signifikanten Effekt auf die EGF mRNA Expression. MG-63 zeigt in der Kokulturkontrolle, in der mit Triptorelin und in der mit GnRH-II[D-Lys⁶] behandelten Probe eine signifikante Steigerung der EGF mRNA Expression, verglichen mit der ohne MCF-7 kultivierten Kontrolle ($p < 0,05$).

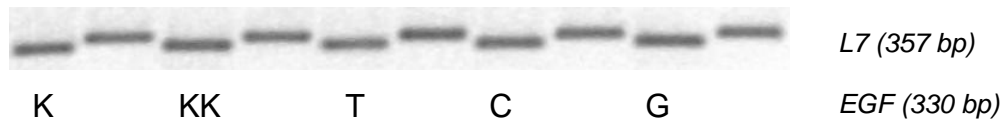


Abbildung 4.1 EGF mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

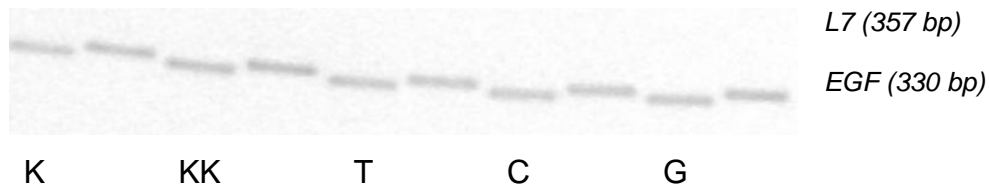


Abbildung 4.2 EGF mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

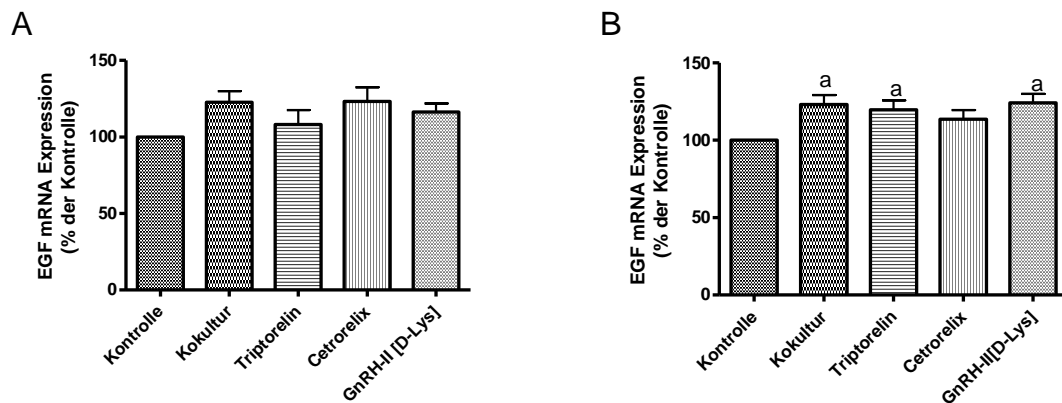


Abbildung 4.3 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von EGF während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF in MCF-7. (n=3). (B) Wirkung Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF in MG-63 (n=3). Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Passagen jeder Zellreihe. a $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Ebenso wie zu EGF beschrieben, wurde die EGFR-mRNA-Expression in den Zelllinien bestimmt. Hier zeigten sich weder im Vergleich von Kontrollen und Kokulturkontrollen noch nach Behandlung mit GnRH-Analoga signifikante Unterschiede in der EGFR-mRNA-Expression (Abb. 4.6).

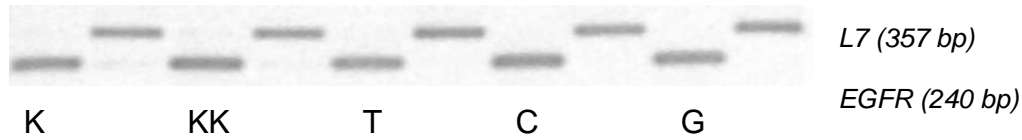


Abbildung 4.4 EGFR mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

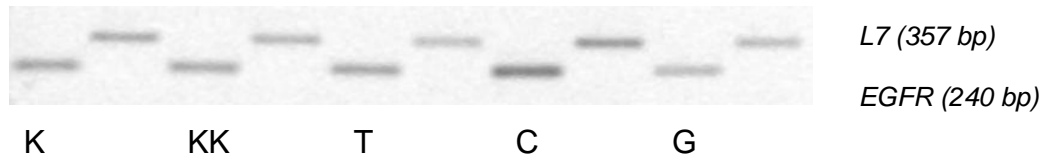


Abbildung 4.5 EGFR mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

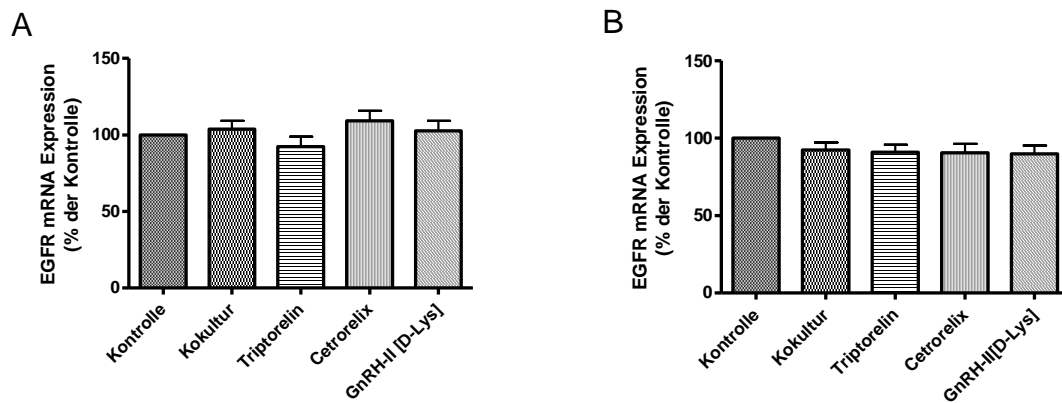


Abbildung 4.6 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von EGFR während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGFR in MCF-7 (n=3), (B) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGFR in MG-63 (n=3). Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Passagen jeder Zellreihe.

4.1.1 ZEITVERLÄUFE DER MRNA-EXPRESSION

Da nach 48 h keine signifikanten Effekte der GnRH-Analoga sichtbar waren, wurden die Kokulturversuche auf 72 h bzw. 96 h verlängert, um mögliche Effekte im Zeitverlauf aufzudecken. Die Stimulation der Proben mit den GnRH-Analoga bzw. PBS in der Kokulturkontrolle erfolgte zum Zeitpunkt t0 und t48. Verglichen mit der Kokulturkontrolle zeigen sich in den behandelten Proben weder in MCF-7 noch in MG-63 signifikante Unterschiede in der EGF-mRNA-Expression (Abb. 4.7).

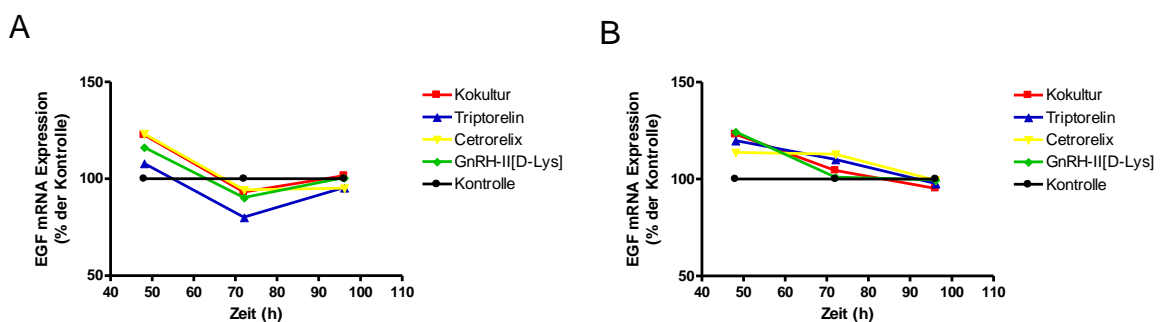


Abbildung 4.7 Zeitabhängige Wirkung der GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von EGF während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF in MCF-7 während der Kokultur; (B) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF in MG-63 während der Kokultur. Die Kokulturversuche wurden zu den Zeitpunkten t48, t72 und t96 beendet (je n=3). Die Stimulation der Brustkrebszellen mit den GnRH-Analoga erfolgte zum Zeitpunkt t0 und t48.

Genauso wurde die mRNA-Expression des EGFR zeitabhängig untersucht (Abb. 4.8). Auch hier zeigen sich im Vergleich der stimulierten Proben mit der Kokulturkontrolle weder in MCF-7 noch in MG-63 signifikante Expressionsunterschiede.

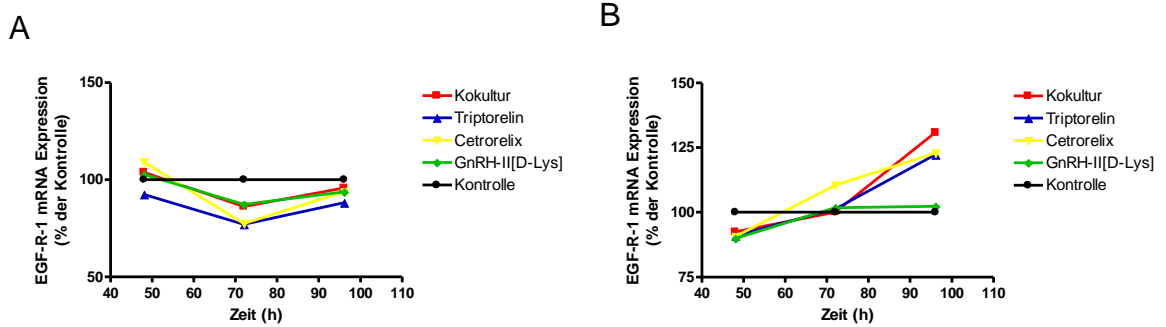


Abbildung 4.8 Zeitabhängige Wirkung der GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression des EGFR während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression des EGFR in MCF-7 während der Kokultur; (B) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression des EGFR in MG-63 während der Kokultur. Die Kokulturversuche wurden zu den Zeitpunkten t48, t72 und t96 beendet (je n=3). Die Stimulation der Brustkrebszellen mit den GnRH-Analoga erfolgte zum Zeitpunkt t0 und t48h

4.1.2 mRNA-EXPRESSION UNTER KULTURBEDINGUNGEN MIT VERRINGERTER SERUMKONZENTRATION

Um eventuelle Effekte der GnRH-Analoga bzw. der Kokultur auf die mRNA-Expression von EGF und EGFR zu verstärken, wurden die Zellen 72 h vor und während der Kokulturversuche unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration kultiviert. Das Kulturmedium wurde dafür statt mit 10 % nur mit 1 % FCS versetzt. Es gab keine weiteren Unterschiede im Ablauf der Versuche.

In Abb. 4.13 sind die Ergebnisse der Kokulturversuche unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration dargestellt. Weder in MCF-7 noch in MG-63 werden signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression von EGF und EGFR sichtbar.

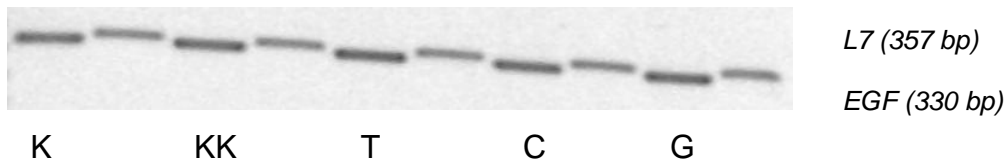


Abbildung 4.9 EGF mRNA Expression in MCF-7 bei verringerter Serumkonzentration K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

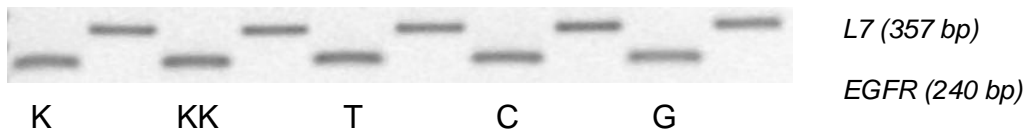


Abbildung 4.10 EGFR mRNA Expression in MCF-7 bei verringerter Serumkonzentration K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

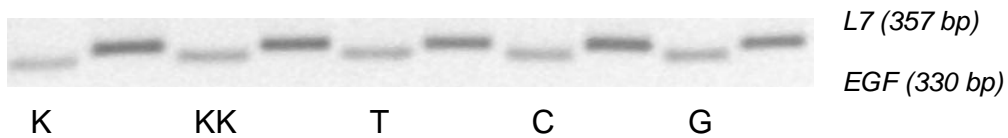


Abbildung 4.11 EGF mRNA Expression in MG-63 bei verringerter Serumkonzentration K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

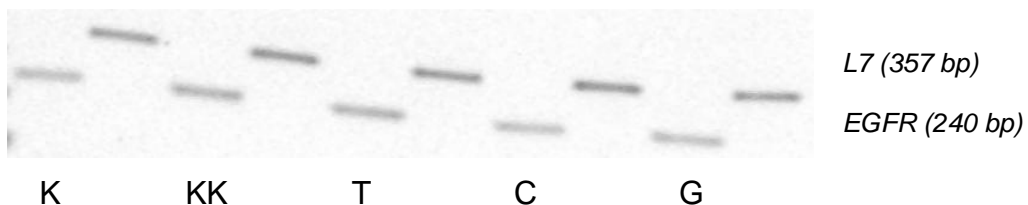


Abbildung 4.12 EGFR mRNA Expression in MG-63 bei verringerter Serumkonzentration K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

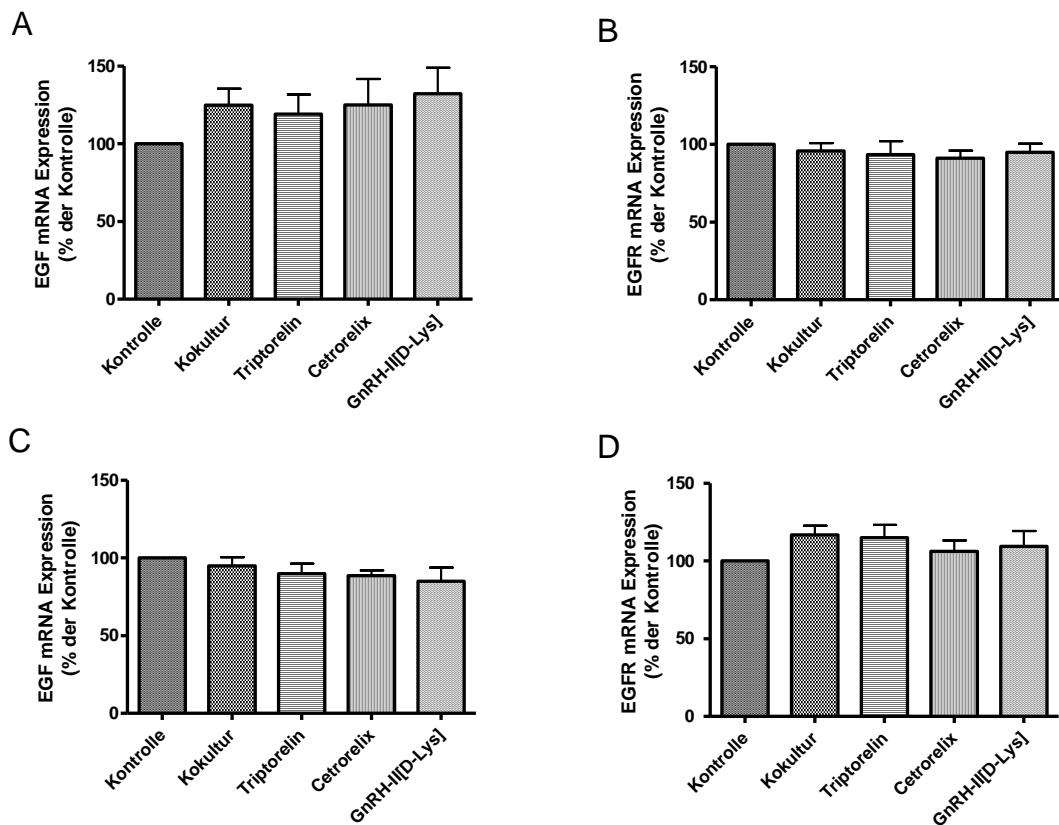


Abbildung 4.13 Wirkung der GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von EGF und EGFR während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF (A) (n=3) und des EGFR (B) (n=3) in MCF-7 während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration; Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von EGF (C) (n=3) und des EGFR (D) (n=3) in MG-63 während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration.

4.2 WIRKUNG VON GNRH-ANALOGA AUF DIE MRNA-EXPRESSION VON TGF-BETA WÄHREND DER KOKULTUR

4.2.1 MRNA-EXPRESSION VON TGF-BETA IN MG-63 UND MCF-7

Da sich in der mRNA-Expression von EGF und EGFR kaum signifikante Unterschiede zeigen, wurde die mRNA-Expression eines weiteren Wachstumsfaktors untersucht. Abb. 4.16 zeigt die mRNA-Expression von TGF- β_1 in MCF-7 und MG-63 nach 48 h Versuchsdauer. Man kann in MCF-7 einen signifikanten Abfall der Expression von TGF- β_1 in den Proben der mit den

GnRH-Analoga behandelten Zellen verglichen mit der ohne MG-63 kultivierten Kontrolle, erkennen ($p < 0,05$). In MG-63 ist keine Signifikanz in der TGF- β_1 mRNA-Expression sichtbar.

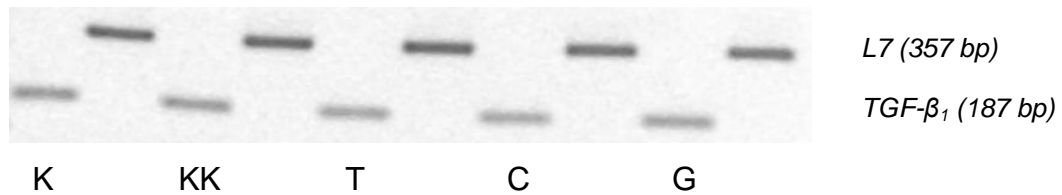


Abbildung 4.14 TGF- β_1 mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

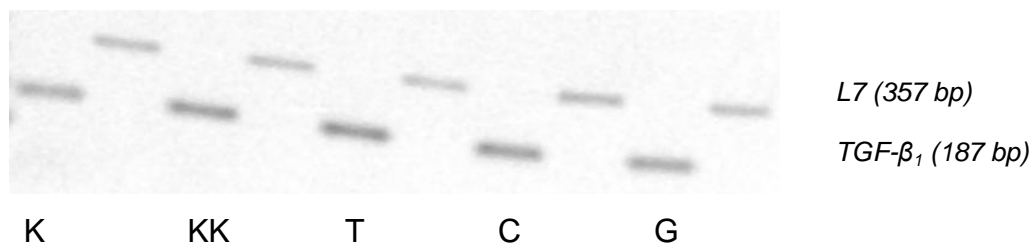


Abbildung 4.15 TGF- β_1 mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

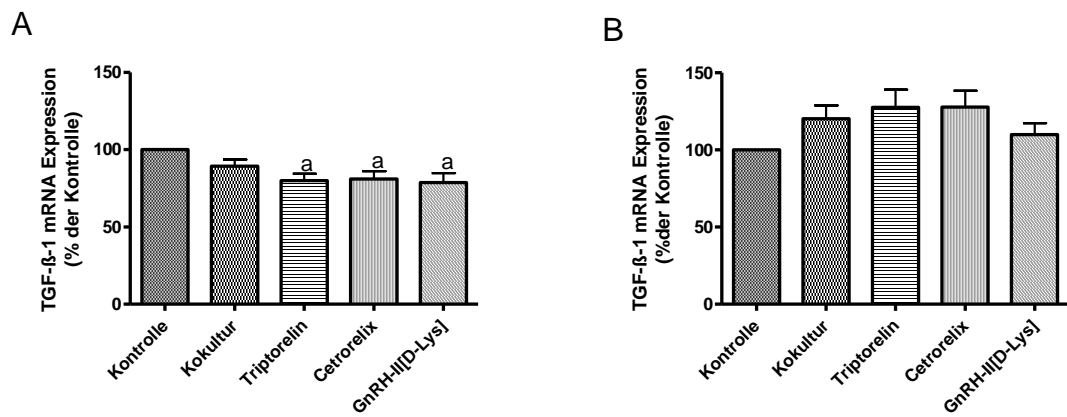


Abbildung 4.11 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF-β₁ während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF-β₁ in MCF-7 während der Kokultur (n=3). (B) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF-β in MG-63 während der Kokultur (n=3). a p<0,05 vs. Kontrolle.

4.2.2 mRNA-EXPRESSION VON TGF-BETA IM ZEITVERLAUF

Wie bei EGF und EGFR wurde eine eventuelle Zeitabhängigkeit der TGF- β_1 mRNA-Expression untersucht. In MCF-7 ist der Effekt der GnRH-Analoga nach 72 und 96 h vergleichbar mit dem nach 48 h.

In MG-63 zeigt sich nach 96 h Versuchsdauer ein signifikanter Anstieg der Kokulturkontrolle im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Die Expressionsunterschiede der mit GnRH-Analoga behandelten Proben zur Kontrolle sind nicht signifikant (Abb. 4.17).

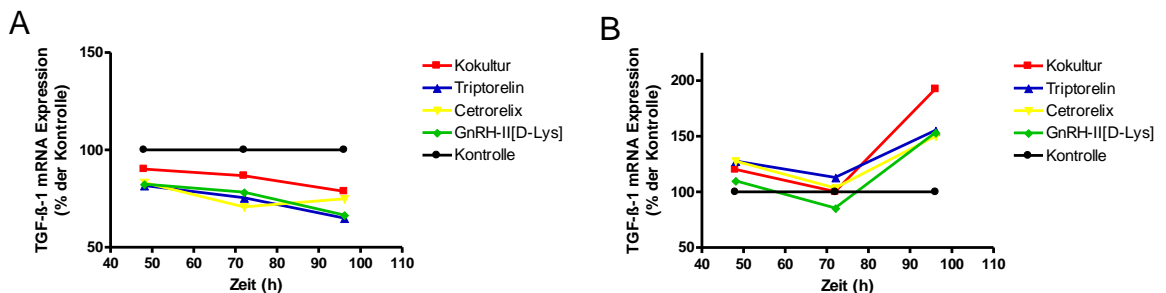


Abbildung 4.12 Zeitabhängige Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF- β_1 während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF- β in MCF-7 während der Kokultur. (B) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF- β in MG-63 während der Kokultur. Die Kokulturversuche wurden zu den Zeitpunkten t48, t72 und t96 beendet (je n=3). Die Stimulation der Brustkrebszellen mit den GnRH-Analoga erfolgte zum Zeitpunkt t0 und t48.

4.2.3 mRNA-EXPRESSION VON TGF-BETA UNTER KULTURBEDINGUNGEN MIT VERRINGERTER SERUMKONZENTRATION

Auch die TGF- β_1 -mRNA-Expression wurde bei den Versuchen unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration untersucht. Hier zeigen sich wie in Abb. 4.20 dargestellt, weder in MCF-7 noch in MG-63 signifikante mRNA-Expressionsunterschiede.

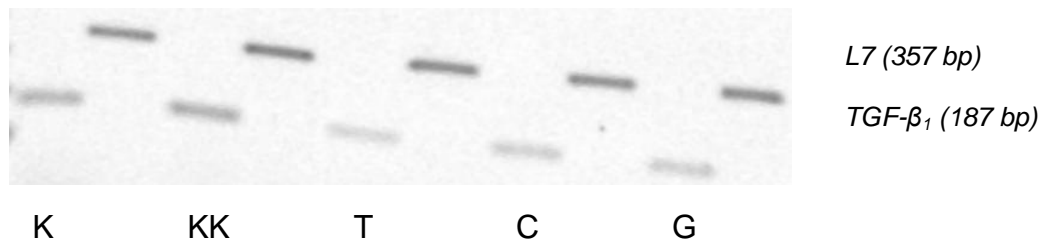


Abbildung 4.18 TGF- β_1 mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

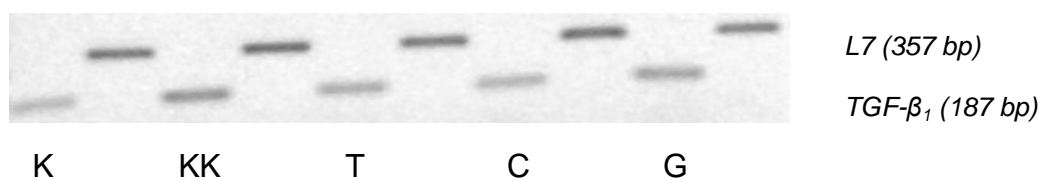


Abbildung 4.19 TGF- β_1 mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

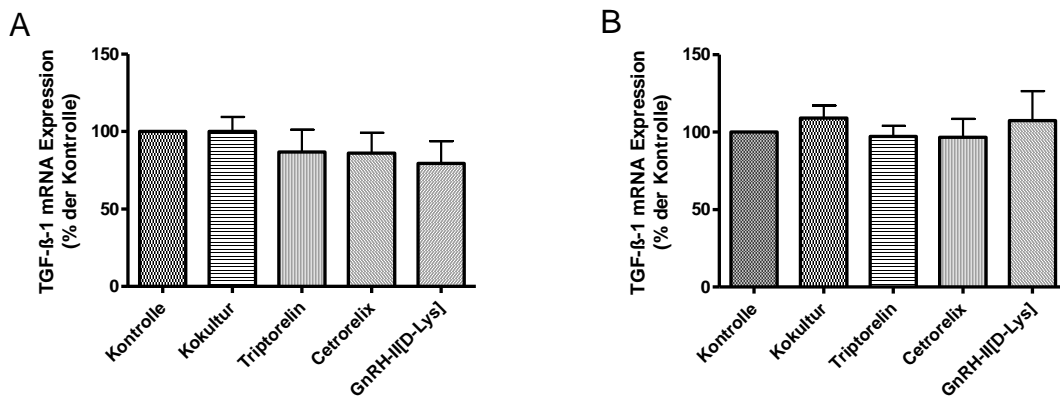


Abbildung 4.20 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF-β1 während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration (A) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF-β in MCF-7 während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration (n=3). (B) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGF-β in MG-63 während der Kokultur unter Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration (n=3).

4.3 WIRKUNG VON GNRH-ANALOGA AUF DIE EXPRESSION VON TGF-BETA-REZEPTOREN-I UND -II

4.3.1 MRNA-EXPRESSION VON TGFBR1 UND 2 IN MG-63

Die mRNA-Expression der mit TGF-β₁ korrespondierenden Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2 wurde in zunächst in MG-63 untersucht. Gezeigt sind in Abb. 4.23 die Ergebnisse der 48-h-Versuche ohne Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration. Es gibt keine signifikanten Expressionsunterschiede der Rezeptoren in MG-63.

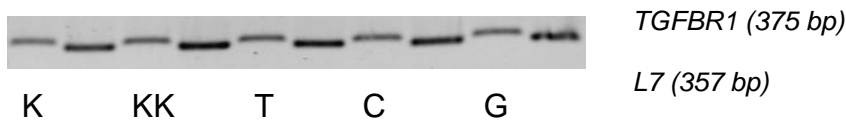


Abbildung 4.21 TGFBR1 mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

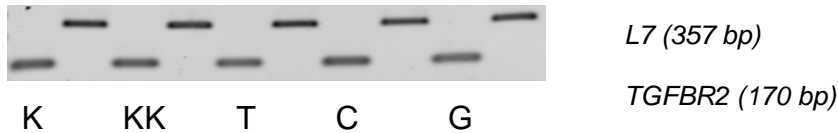


Abbildung 4.22 TGFBR2 mRNA Expression in MG-63 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetrorelix) G (GnRH-II[D-Lys]⁶)

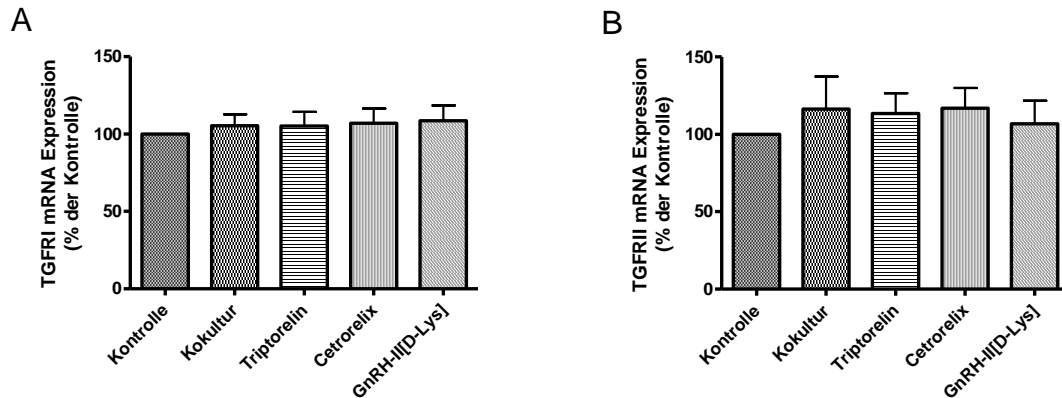


Abbildung 4.23 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF- β -Rezeptoren in MG-63 während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys]⁶ auf die mRNA-Expression von TGFBR1 in MG-63.während der Kokultur (n=3). (B) Wirkung von Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys]⁶ auf die mRNA-Expression von TGFBR2 in MG-63 während der Kokultur (n=3).

4.3.2 mRNA-EXPRESSION VON TGFBR I UND II IN MCF-7

Die TGFBR-I- und TGFBR-II-mRNA-Expression wurde auch in den MCF-7 Proben der 48-h-Versuche ohne Kulturbedingungen mit verringerter Serumkonzentration untersucht. Hier zeigt sich in der Kokulturkontrolle, verglichen mit der Kontrolle, ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression des TGFBR2. Des Weiteren fällt die mRNA-Expression sowohl des TGFBR1 als auch des TGFBR2 in den mit GnRH-Analoga behandelten Proben im Vergleich zur Kokulturkontrolle und im Vergleich zur Kontrolle deutlich signifikant ab (Abb.4.26).

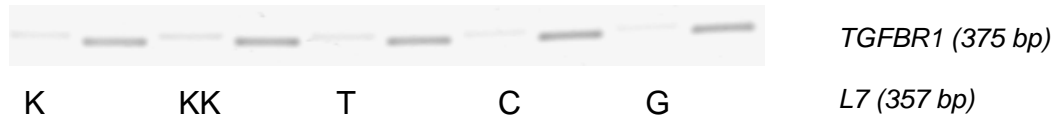


Abbildung 4.24 TGFBR1 mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

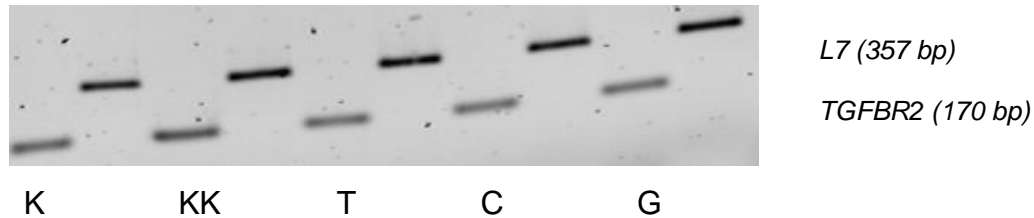


Abbildung 4.25 TGFBR2 mRNA Expression in MCF-7 K (Kontrolle) KK (Kokultur) T (Triptorelin) C (Cetorelix) G (GnRH-II[D-Lys⁶])

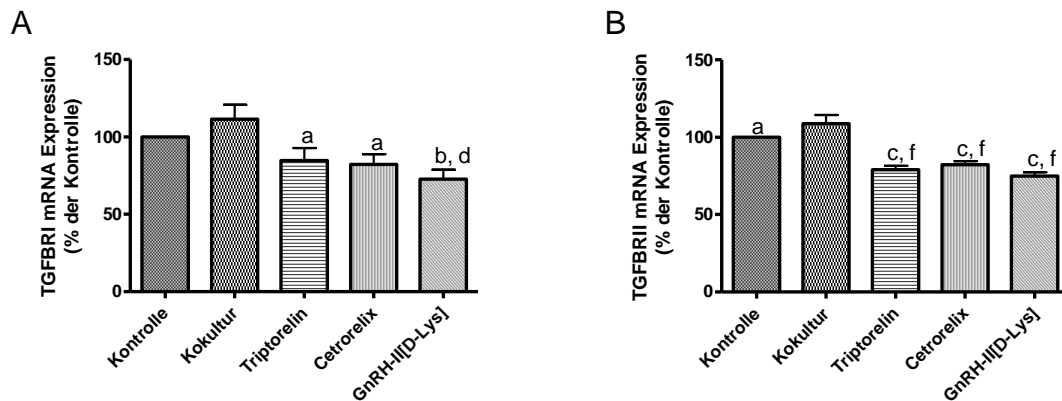


Abbildung 4.26 Wirkung von GnRH-Analoga auf die mRNA-Expression von TGF-β-Rezeptoren in MCF-7-Mammakarzinomzellen während der Kokultur (A) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGFBR1 in MCF-7 während der Kokultur (n=3). (B) Wirkung von Triptorelin, Cetorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA-Expression von TGFBR2 in MCF-7 während der Kokultur (n=3). a p<0,05 vs. Kokultur, b p<0,01 vs. Kokultur, c p<0,001 vs. Kokultur, d p<0,05 vs. Kontrolle, f p<0,001 vs. Kontrolle

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in humanen Mammakarzinomzellen und der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 während der Kokultur untersucht. Grundlage davon war die Erkenntnis, dass eine Hemmung der Invasivität und Migration von Mammakarzinomzellen durch GnRH-Analoga gehemmt werden konnte (von Alten et al., 2006). Die molekularen Mechanismen, die dieser Hemmung zugrunde liegen, sollten hierbei näher untersucht werden.

Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie die nachgeschalteten Signalwege sind in der Literatur vielfach in zentralen Positionen in den verschiedenen Schritten der Tumorgenese beschrieben worden. Daher lag die Vermutung nahe, dass auch eine GnRH-vermittelte Wirkung möglicherweise über eine Veränderung im Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren erzielt wird. Genauer untersucht wurden in dieser Arbeit der *epidermal growth factor* (EGF), dessen Rezeptor EGFR sowie TGF β ₁ und dessen Rezeptoren TGFBR1 und RII.

5.1 WIRKUNG VON GNRH-ANALOGA AUF DIE MRNA-EXPRESSION VON EGF UND EGFR IN DER OSTEOLASTEN-ÄHNLICHEN ZELLREIHE MG-63 UND MAMMAKARZINOMZELLEN WÄHREND DER KOKULTUR

Der Rolle des epidermalen Wachstumsfaktors und seiner Rezeptoren in der Tumorgenese humaner Karzinome ist weitgehend bekannt. Dazu zählen u.a. Zellmotilität, Invasivität, Osteoklasten-medierte Knochendestruktion und Angiogenese (De Luca et al., 2008, Normanno und Gullick, 2006). Zudem konnte bereits eine Beeinflussung der EGF-Signaltransduktion durch GnRH-Analoga gezeigt werden. So interferiert der GnRH-I-Agonist Triptorelin und der GnRH- II-Agonist GnRH-II[D-Lys⁶] mit der EGF-induzierten Signaltransduktion und wirkt entgegen die EGF-induzierte Autophosphorylation der EGF-Rezeptoren (Günthert et al., 2005). Scott et al. (1991) konnten nachweisen, dass direkte antiproliferative Effekte von GnRH-I Analoga auf humane

Brustkrebszellen *in vitro* und auch xenotransplantiert im Nacktmausmodell zumindest teilweise durch den Antagonismus von Wachstumsfaktoren wie EGF vermittelt werden. Wachstum und Invasivität von Brustkrebszellen sind mit dem EGF-Signaltransduktionsweg gekoppelt (Spencer et al. 2000, Price et al. 1999). Dennoch konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt der GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] auf die mRNA Expression von EGF und EGFR in der Mammakarzinomzellreihe MCF-7 und der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 während der Kokultur gezeigt werden. Auch eine Veränderung der Versuchsbedingungen (Kultivierung in Medium mit verringerter Serumkonzentration) und der Zeit der Kokultivierung erbrachte kein anderes Ergebnis. Somit wird die reduzierte Invasion und Migration der humanen Mammakarzinomlinie MCF-7 während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 nicht durch die Regulierung der Transkription von EGF und dem EGFR erreicht.

5.2 WIRKUNG VON GNRH-ANALOGA AUF DIE MRNA-EXPRESSION VON TGF-BETA UND SEINEN REZEPTOREN TGFBR-I UND -II IN DER OSTEOLASTEN-ÄHNLICHEN ZELLREIHE MG-63 UND MAMMAKARZINOMZELLEN WÄHREND DER KOKULTUR

Ebenso wie für EGF bzw. den EGF-induzierten Signalweg ist für TGF- β und die nachfolgende Signalkaskade eine zentrale Bedeutung in der Tumorbologie und der Metastasierung nachgewiesen worden. TGF- β kann sowohl als Tumorpromoter als auch als Tumorsuppressor wirken. Die gegensätzliche Wirkungsweise erklärt sich zum Teil aus den unterschiedlichen Auswirkungen des TGF- β -Signals auf das Zielgewebe, die u.a. von der Beschaffenheit der nachfolgenden Signalkaskade oder einer möglichen Gewebeschädigung abhängig sind. So gehen in der Carcinogenese die Tumorsuppressorfunktionen, wie Apoptoseinduktion und Hemmung der Zellproliferation durch das TGF- β -Signal, verloren und es zeigen sich vermehrt pro-onkogene Wirkungsweisen von TGF- β , wie u.a. eine vermehrte Zellmigration durch Induktion von epithelialer-mesenchymaler Transdifferenzierung, was den Verlust von Zell-Zell-Kontakten und Akquisition

von Fibroblasten zur Folge hat (Padua und Massagué, 2009). TGF- β kann das Überleben und die Motilität der Zellen im Kreislauf und Gewebe durch Immunregulation (Massagué und Chen, 2000) und vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix und Proteasen (Derynck et al., 2001) erleichtern. Durch Stimulation der Angiogenese (Padua und Massagué, 2009) und Steigerung der Osteoklastenaktivität (Oursler et al., 1994) und damit verbundener Freisetzung weiterer förderlich wirkender Faktoren wird gerade im Knochen die Etablierung und das Wachstum der Metastasen durch TGF- β gefördert (Guise und Chirgwin, 2003). Dieses Wirkspektrum von TGF- β erklärt dessen immense Bedeutung in Carcinogenese und Metastasierung der verschiedensten Tumoridentitäten und sollte daher auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, auch wenn in dem verwendeten *in vitro*-Kokulturmodell sicher nicht alle Eigenschaften zum Tragen kommen.

In der Literatur gibt es bisher nur einzelne Arbeiten, die sich mit der Wirkung von GnRH-Analoga auf die Expression von TGF- β oder dessen Rezeptoren beschäftigen.

Dou et al. (1996) konnten eine verminderte mRNA-Expression von TGF- β und dessen Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2 in Uterusleiomyomen nach Behandlung der Patientinnen mit dem GnRH-Agonisten Leuprolidacetat nachweisen. Ebenso konnten Chegini et al. (2003) eine verminderte Expression von TGFBR-I und -II in Leiomyomen nach Behandlung der Patientinnen mit GnRH-Analoga belegen. Trotz der Tatsache, dass GnRH-Rezeptoren in vielen weiteren extrahypophysären Geweben, wie auch in vielen gynäkologischen Karzinomen, nachgewiesen (Völker et al., 2002) wurden, war eine GnRH-Analoga-vermittelte Änderung der Expression von TGF- β oder seinen Rezeptoren in Karzinomen bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnte nun erstmals belegt werden, dass die GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] die mRNA-Expression des TGFBR1 und -2 in MCF-7 Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 signifikant hemmen. Die mRNA-Expression von TGF- β ändert sich hingegen weder in den Mammakarzinomzellen noch in den Osteoblasten-

ähnlichen Zellreihe MG-63, anders, als es Dou et al. (1996) in Leiomyomen zeigen konnten.

Da GnRH-Analoga eine Hemmung der Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 bewirken, stellt sich die Frage, ob die in dieser Arbeit nachgewiesene verminderte mRNA-Expression von TGFBR1 oder -2 nach Behandlung mit GnRH-Analoga damit in Zusammenhang steht.

In der klassischen Signalkaskade bindet TGF- β an den TGFBR-II, woraufhin der Liganden/Rezeptor-Komplex einen heteromeren Komplex mit TGFBR-I bildet und die weitere Signaltransduktion über verschiedene nachgeschaltete Wege aktiviert wird.

Die Expressierung und Funktion der beiden Rezeptoren kann entscheidend für Wirkung und Effekte von TGF- β sein. So wurden Mutationen und Expressionsveränderungen in verschiedenen Tumortypen gefunden. Mutationen des TGFBR1 wurden in metastasierenden Mammakarzinomzellen (Chen et al., 1998) und Ovarialkarzinomen (Chen et al., 2001) gefunden. Regelmäßig kann man TGFBR2- Mutationen bei Magenkarzinomen (Chung et al., 1996) und Kolonkarzinomen (Grady et al., 1999) beobachten. Mutationen sind ein Weg, die Rezeptoren zu inaktivieren oder das nachfolgende Signal zu verändern.

Fast alle soliden Tumortypen und auch einige Leukämieformen zeigen Expressionsveränderungen einer oder beider TGF- β -Rezeptoren. Expressionsveränderungen von TGFBR-I werden insgesamt seltener gefunden als von TGFBR2. So findet sich beispielsweise eine verringerte Expression von TGFBR1 in Magenkarzinomzellen (Kang et al., 1999). Reduzierte TGFBR2 Expression in hepatozellulären Karzinomen (HCC) ist mit einem aggressiveren Phänotypen und höherer Metastasierungsrate vergesellschaftet (Mamiya et al., 2010). Auch Prostataepithelzellen zeigen häufig eine Expressionsveränderung der beiden Rezeptoren. Der Verlust der Rezeptor-mRNA-Expression korreliert hier mit der Karzinomentwicklung (Kim et al., 1996) und eine ausreichende

Rezeptordichte ist notwendig, um die TGF- β -induzierte Apoptose zu erhalten (Wikström et al., 2000).

Eine Expressionsverminderung einer oder beider Rezeptoren wird also in fast allen Tumortypen beobachtet und ist zumeist ein Indiz für ein fortgeschrittenes Karzinom mit hoher Metastasierungsneigung. Jedoch wird häufig auch das genaue Gegenteil beobachtet. So konnten Siegel und Massagué (2003) eine vermehrte Metastasierung von neu-induziertem Brustkrebs in transgenen Mäusen bei Überexpression des TGFBR1 zeigen. Ein niedriges Expressionslevel der TGF- β -Rezeptoren in Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen ist mit einem verbessertem *outcome* assoziiert (Buck et al., 2004). Zheng et al. (2012) konnten im Linsenepithel eine Verminderung der auch für die Migration und Invasion von Tumorzellen wichtigen EMT durch verringerte Expression von TGFBR2-mRNA und -Protein nachweisen. Futakuchi et al. (2008) haben sich mit den molekularen Veränderungen von in Knochen metastasierten Mammakarzinomzellen beschäftigt und konnten zeigen, dass die TGFBR1-Expression in den Metastasen und im betroffenen Knochengewebe höher war als im Primärtumor selbst. Zudem wurde die tumor-induzierte Osteolyse sowie die Expression des TGFBR1 durch Behandlung mit einem TGF- β -R-I Kinase-Inhibitor reduziert.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass GnRH-Analoga eine Expressionsverminderung des TGFBR1 und TGFBR2 in Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 bewirken. Ob dies zu der nachgewiesenen Hemmung der Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 beiträgt, muss letztendlich offen bleiben. Die Forschungsergebnisse der bisherigen Arbeiten zu diesem Thema lassen jedoch den Schluss zu, dass eine TGF- β -Rezeptormodulation einer der Mechanismen ist, über den die GnRH-Analoga Einfluss auf die Migration und Invasion der Mammakarzinomzellen nehmen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Mammakarzinom ist weltweit eine der häufigsten Malignomerkrankungen der Frau. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung entwickeln bis zu 75 % der Patientinnen ossäre Metastasen. Eine Vielzahl molekularer Mechanismen, die den einzelnen Schritten der Metastasierung zu Grunde liegen, wurde aufgedeckt. Häufig spielt dabei die Exprimierung von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren eine zentrale Rolle. Ziel einer onkologischen Therapie ist u.a. die Hemmung der Entwicklung von Metastasen. GnRH-Analoga können Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 hemmen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von GnRH-Analoga auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in Mammakarzinomzellen und Knochenzellen aufzudecken.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die GnRH-Analoga Triptorelin, Cetrorelix und GnRH-II[D-Lys⁶] die mRNA Expression des TGFBR-I und -II in MCF-7 Mammakarzinomzellen während der Kokultur mit der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 signifikant hemmen. Keinerlei Veränderungen, auch nicht unter verlängerter Einwirkungszeit oder nach Verringerung der Serumkonzentration im verwendeten Zellkulturmedium, bewirken sie im Expressionsmuster von TGF- β_1 , EGF und dessen Rezeptor EGFR.

Expressionsveränderungen der TGF- β -Rezeptoren werden in fast allen Karzinomtypen beobachtet. Die Modulation des Expressionsprofiles kann das Metastasierungsverhalten der Krebszellen beeinflussen. Daher liegt der Schluss nahe, dass die durch GnRH-Analoga bewirkte Expressionsminderung der TGF- β -Rezeptoren in direktem Zusammenhang mit der durch GnRH-Analoga vermittelten Hemmung der Migration und Invasion der Mammakarzinomzellen steht.

7 LITERATURANGABEN

- Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, Guise TM and Seth P (2008): Biology of breast cancer bone metastasis. *Cancer Biol Ther*, **7**, 3-9.
- Ali SM, Harvey HA and Lipton A (2003): Metastatic breast cancer: overview of treatment. *Clin Orthop Relat Res*, **415**, suppl S132-S137.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R and Guillemin R (1971): Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*, **44**, 205-210.
- Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch A, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg Á, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG and Easton DF (2003): Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, **72**, 1117-1130.
- Apter D, Reinila M and Vihko R (1989): Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood. *Int J Cancer*, **44**, 783-787.
- Arteaga CL, Coffey RJ Jr., Dugger TC, McCutchen CM, Moses HL and Lyons RM (1990): Growth stimulation of human breast cancer cells with anti-transforming growth factor beta antibodies: Evidence for autocrine negative regulation by transforming growth factor beta. *Cell Growth Differen*, **1**, 367-374.
- Bandyopadhyay A, Agyin JK, Wang L (2006): Inhibition of pulmonary and skeletal metastasis by a transforming growth factor-beta type I receptor kinase inhibitor. *Cancer Res*, **66**, 6714-6721
- Barr S, Thomas S, Buck E, Russo S, Petti F, Sujika-Kwok I, Eyzaguirre A, Rosenfeld-Franklin M, Gibson NW, Miglarese M, Epstein D, Iwata KK and Haley JD (2008): Bypassing cellular EGF receptor dependence through

- epithelial-to-mesenchymal-like transitions. *Clin Exp Metastasis*, **25**, 685-693.
- Bharathy S, Xie W, Yingling JM and Reiss M (2008): Cancer associated transforming growth factor beta type II receptor gene mutant causes activation of bone morphogenetic protein-smads and invasive phenotype. *Cancer Res*, **68**, 1656-1666.
- Billiau A, Edy VG, Heremans H, van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA and de Somer P (1977): Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother*, **12**, 11-15.
- Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Shahbazian D, Friedberg I, Seger R and Naor Z (2004): Extracellular signal-regulated kinase, Jun N-terminal kinase, p38, and c-Src are involved in gonadotropin-releasing hormone-stimulated activity of the glycoprotein hormone follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter. *Endocrinology*, **145**, 2228-2244.
- Boyd FT and Massagué J (1989): Growth inhibitory response to TGF- β linked expression of a 53 kDa cell surface TGF- β receptor. *J Biol Chem*, **264**, 2272-2278.
- Brattain MG, Ko Y, Banerji SS, Wu G and Willson JKV (1996): Defects of TGF- β receptor signaling in mammary cell tumorigenesis. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*, **1**, 365-372.
- Buck MB, Fritz P, Dippon J, Zugmaier G and Knabbe C (2004): Prognostic significance of transforming growth factor beta receptor II in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **10**, 491-498.
- Burstein HJ, Kuter I, Campos SM, Gelman RS, Tribou L, Parker LM, Manola J, Younger J, Matulonis U, Bunnell CA, Partridge AH, Richardson PG, Clarke K, Shulman LN and Winer EP (2001): Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, **19**, 2722-2730.
- Chegini N, Luo X, Ding L and Ripley D (2003): The expression of smads and transforming growth factor beta receptors in leiomyoma and myometrium and the effect of gonadotropin releasing hormone analogue therapy. *Mol Cell Endocrinol*, **209**, 9-16.

- Chen T, Carter D, Garrigue-Antar L and Reiss M (1998): Transforming growth factor β type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res*, **58**, 4805-4810.
- Chen T, Triplett J, Dehner B, Hurst B, Colligan B, Pemberton J, Graff JR and Carter JH (2001): Transforming growth factor β type I receptor gene is frequently mutated in ovarian carcinomas. *Cancer Res*, **61**, 4679-4682.
- Chirgwin JM and Guise TA (2000): Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **10**, 159-178.
- Chung YJ, Song JM, Lee JY, Jung YT, Seo EJ, Choi SW and Rhyu MG (1996): Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high risk population. *Cancer Res*, **56**, 4662-4665.
- Coleman RE (2002): Bisphosphonates for the prevention of bone metastases. *Semin Oncol*, **29**, S43-S49.
- Coleman RE and Rubens RD (1987): The clinical course of bone metastases from breast cancer. *Br J Cancer*, **55**, 61-66.
- Cui W, Fowlis DJ, Cousins FM, Duffie E, Brysons S, Balmain A and Akhurst RJ (1995): Concerted action of TGF beta 1 and its type II receptorin control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev*, **9**, 945-955.
- Daly AC, Randall RA and Hill CS (2008): Transforming growth factor β -induced smad 1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol*, **28**, 6889-6902.
- de Luca A, Carotenuta A, Rachiglio A, Gallo M, Maiello MR, Aldinucci D, Pinto A and Normanno N (2008): The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol*, **214**, 559-567.
- Derynck R, Akhurst RJ and Balmain A (2001): TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Gen*, **29**, 117-129.
- Dou Q, Zhao Y, Tarnuzzer RW, Rong H, Williams RS, Schultz, GS and Chegini N (1996): Suppression of transforming growth factor- β (TGF β) and TGF β receptor messenger ribonucleic acid and protein expression in

- leiomyomata in women receiving gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 3222-3230.
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE and Leduc R (1995): Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem*, **270**, 10618-10624.
- Eicke N, Günthert AR, Emons G and Gründker C (2006): GnRH-II agonist [D-Lys6]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Oncol*, **29**, 1223-1229.
- Emons G and Schulz KD (2000): Primary and salvage therapy with LH-RH analogues in ovarian cancer. *Recent Results Cancer Res*, **153**, 83-94.
- Emons G, Ortmann O, Schulz KD and Schally AV (1997): Growth inhibitory actions of luteinizing hormone-releasing hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab*, **8**, 355-362.
- Engel JB, Griesinger G, Schultze-Mosgau A, Felberbaum R and Diedrich K (2006): GnRH agonists and antagonists in assisted reproduction: pregnancy rate. *Reprod Biomed Online*, **13**, 84-87.
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL and Attisano L (1996): MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell*, **86**, 543-552
- Fossati R, Confalonieri C, Torri V, Ghislandi E, Penna A, Pisotti V, Tinazzi A and Liberati A (1998): Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer: a systematic review of published randomized trials involving 31510 women. *J Clin Oncol*, **16**, 3439-3460.
- Futakuchi M, Nannuru KC, Varney ML, Sadanandam A, Nakao K, Asai K, Shirai T, Sato S and Singh RK (2008): Transforming growth factor- β signaling at the tumor-bone interface promotes mammary tumor growth and osteoclast activation. *Cancer Sci*, **100**, 71-81.
- Garcia R, Franklin RA and McCubrey JA (2006): EGF induces cell motility and multi-drug resistance gene expression in breast cancer cells. *Cell Cycle*, **5**, 2820-2826.

- Ge R, Rajeev V, Ray P, Lattime E, Ritting S, Medicherla S, Protter A, Murphy A, Chakravarty J, Dugar S, Schreiner G, Barnard N and Reiss M (2006): Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in vivo. *Clin Cancer Res*, **12**, 4315-4330.
- GEKID,RKI (Hrsg): Krebs in Deutschland 2005/2006, 7. Auflage; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das Robert-Koch-Institut, Berlin 2010.
- Goldberg JI and Borgen PI (2006): Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*, **6**, 1205-14.
- Goodwin PJ, DeBoer G, Clark RM, Catton P, Redwood S, Hood N and Boyd NF (1995): Cyclical mastopathy and premenopausal breast cancer risk. Results of a case-control study. *Breast Cancer Res Treat*, **33**, 63-73.
- Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingan S, Lutterbaugh JD, Neumann A, Brattain MG, Chang J, Kim SJ, Kinzler KW, Vogelstein B, Willson JKV and Markowitz S (1999): Mutational inactivation of transforming growth factor β receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res*, **59**, 320-324.
- Gründker C, Völker P, Schulz KD and Emons G (2000): Luteinizing hormone-releasing hormone agonist triptorelin and antagonist cetrorelix inhibit EGF-induced c-fos expression in human gynecological cancers. *Gynecol Oncol*, **78**, 194-202.
- Gründker C, Schlotawa L, Viereck V and Emons G (2001a): Protein kinase C-independent stimulation of activator protein-1 and c-Jun N-terminal kinase activity in human endometrial cancer cells by the LHRH agonist triptorelin. *Eur J Endocrinol*, **145**, 651-658.
- Gründker C, Völker P and Emons G. (2001b): Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein $\alpha(I)$ -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology*, **142**, 2369-2380.
- Gründker C, Günthert AR, Millar RP and Emons G (2002a): Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human

- endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 1427-1430.
- Gründker C, Günthert AR, Westphalen S and Emons G (2002b): Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, **146**, 1-14.
- Günthert AR, Gründker C, Hollmann K and Emons G (2002): Luteinizing hormone-releasing hormone induces JunD-DANN binding and extends cell cycle in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 11-15.
- Günthert AR, Gründker C, Olota A, Läsche J, Eicke N and Emons G (2005): Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen. *Eur J Endocrinol*, **153**, 613-625.
- Guise TA and Chirgwin JM (2003): Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases. *Clin Orthop Rel Res*, **415S**, S32-S38.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH and Kern SE(1996): DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science*, **271**, 350-353.
- Harris D, Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Seger R and Naor Z (2002): Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHbeta-subunit promoter. *Endocrinology*, **143**, 1018-1025.
- Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrati MD, Doleman SE and Klagsbrun M (1986): Growth factors in bone matrix. *J Biol Chem*, **261**, 12665-12674.
- He J, Tegen SB, Krawittz AR, Martin GS and Luo K (2003): The transforming activity of Ski and SnoN is dependent on their ability to repress the activity of smad proteins. *J Biol Chem*, **278**, 30540-30547.
- Heldin CH (1995): Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-223.

- Hoskin PJ, Yarnold JR, Roos DR and Bentzen S (2001): Second workshop on palliative radiotherapy and symptom control: radiotherapy for bone metastases. *Clin Oncol*, **13**, 88-90.
- Irmer G, Burger C, Ortmann O, Schulz KD and Emons G (1994): Expression of luteinizing hormone releasing hormone and its mRNA in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 916-919.
- Kang SH, Bang YJ, Im YH, Kang HK, Lee DA, Lee HY, Lee HS, Kim NK and Kim SJ (1999): Transcriptional repression of the transforming growth factor β type I receptor gene by DNA methylation results in the development of TGF β resistance in human gastric cancer. *Oncogene*, **18**, 7280-7286.
- Kim IY, Ahn HJ, Zelner DJ, Shaw JW, Lang S, Kato M, Oefelein MG, Miyazono K, Nemeth JA, Kozlowski JM and Lee C (1996): Loss of expression of transforming growth factor beta type I and type II receptors correlates with tumor grade in human prostate cancer tissues. *Clin Cancer Res*, **2**, 1255-1261.
- Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L and Sylvester R (2001): Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *J Clin Oncol*, **19**, 343-353.
- König HG, Kögel D, Rami A and Prehn JHM (2005): TGF- β 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- κ B signaling. *J Cell Biol*, **168**, 1077-1086.
- Kraus S, Naor Z and Seger R (2001): Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*, **32**, 499-509.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P and ten Dijke P (2005): TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res*, **65**, 599-608.
- Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Millar RP and Sherwood NM (1997): A second form of gonadotropin-releasing hormone

- (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology*, **138**, 5618-5629.
- Levi NL, Hanoch T, Benard O, Rozenblat M, Harris D, Reiss N, Naor Z and Seger R (1998): Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol*, **12**, 815-824.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK and Flavell RA (2006): Transforming growth factor-beta regulation of immune response. *Ann Rev Immunol*, **24**, 99-146.
- Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Parenti M and Motta M (1999): The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology*, **140**, 5250-5256.
- Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T and Sakamoto M (2010): Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. *Lab Invest*, **90**, 1339-1345.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M and Willson KJV (1995): Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*, **268**, 1336-1338.
- Massagué J (1990): The transforming growth factor- β family. *Ann Rev Cell Biol*, **6**, 597-641.
- Massagué J (1998): TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, **67**, 753-791.
- Massagué J and Chen YG (2000): Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, **14**, 627-644.
- Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M and Wrana JL (1992): TGF- β receptors. *Mol Reprod Dev*, **32**, 99-104.

- McArdle CA, Franklin J, Green L and Hislop JN (2002): The gonadotrophin-releasing hormone receptor: signalling, cycling and desensitisation. *Arch Physiol Biochem*, **110**, 113-122.
- Mercer RR, Miyasaka C and Mastro AM (2004): Metastatic breast cancer cells suppress osteoblast adhesion and differentiation. *Clin Exp Metastasis*, **21**, 427-435.
- Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E and Katz A (2001): A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9636-9641.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D, Davidson NE (2007): Paclitaxel plus Bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Eng J Med*, **357**, 2666-2676
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Mundy GR (1997): Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*, **80**, 1546-1556.
- Mundy GR (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, **2**, 584-593.
- Muraoka RS, Dumont N, Ritter CA, Dugger TC, Brantley DM, Chen J, Easterly E, Roebuck LR, Ryan S, Gotwals PJ, Kotliansky V and Arteaga CL (2002): Blockade of TGF-beta inhibits mammary tumor cell viability, migration and metastases. *J Clin Invest*, **109**, 1551-1559.
- Neill JD, Duck LW, Sellers JC and Musgrove LC (2001): A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 1012-1018.
- Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC and MacMahon B (1994): Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*, **330**, 81-87.

- Normanno N and Gullick WJ (2006): Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and bone metastases: different mechanisms of action for a novel therapeutic application? *End Rel Cancer*, **13**, 3-6.
- Normanno N, de Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, de Feo G, Capanigro F and Salomon DS (2006): Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, **366**, 2-16.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA and Hynes NE (2000): The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, **19**, 3159-3167.
- Olive DL (2004): Optimizing gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in women with endometriosis. *Treat Endocrinol*, **3**, 83-89.
- Orr W, Varani J, Gondex MK, Ward PA and Mundy GR (1979): Chemotactic responses of tumor cells to products of resorbing bone. *Science*, **203**, 176-179.
- Oursler MJ (1994): Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*, **9**, 443-452.
- Padua D and Massagué J (2009): Role of TGF-beta in metastasis. *Cell Res*, **19**, 89-102.
- Potolog-Nahari C, Fishman A and Cohen I (2007): Protection of ovarian function and fertility using a combination of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist and GnRH antagonist during cancer treatment in young females. *Gynecol Endocrinol*, **23**, 290-294.
- Price JT, Tiganis T, Agarwal A, Djakiew D and Thompson EW (1999): Epidermal growth factor promotes MDA-MB-231 breast cancer cell migration through a phosphatidylinositol 3'-kinase and phospholipase C-dependent mechanism. *Cancer Res*, **59**, 5475-5478.
- Rapiti E, Verkooijen HM, Vlastos G, Fioretta G, Neyroud-Caspar I, Sappino AP, Chappuis PO and Bouchardy C (2006): Complete excision of primary breast tumor improves survival of patients with metastatic breast cancer at diagnosis. *J Clin Oncol*, **24**, 2743-2749.

- Robertson JF and Blamey RW (2003): The use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre- and perimenopausal women. *Eur J Cancer*, **39**, 861-869.
- Roodman GD (2004): Mechanisms of bone metastasis *N Engl J Med*, **250**, 1655-1664
- Roth C (2002): Therapeutic potential of GnRH antagonists in the treatment of precocious puberty. *Expert Opin Investig Drugs*, **11**, 1253-1259.
- Ruf F, Fink MY and Sealton SC (2003): Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics. *Front Neuroendocrinol*, **24**, 181-199.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F and Normanno N (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, **19**, 183-232.
- Schaffler A, Scholmerich J and Buechler C (2007): Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, **3**, 345-354.
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L and White WF (1971): Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, **173**, 1036-1038.
- Schön D, Bertz J, Görsch B, Haberland J, Kurth BM (2004): Die Dachdokumentation Krebs -Eine Surveillance-Einrichtung der Krebsregistrierung in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, **47**, 429-436.
- Scott WN, Mullen P and Miller WR (1991): Factors influencing the response of MCF-7 cells to an agonist of luteinising hormone-releasing hormone. *Eur J Cancer*, **27**, 1458-1461.

- Serra R and Crowley MR (2003): TGF-beta in mammary gland development and breast cancer. *Breast Dis*, **18**, 61-73.
- Siegel PM and Massagué J (2003): Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 807-821.
- Soule HD, 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.
- Spencer KS, Graus-Porta D, Leng J, Hynes NE and Klemke RL (2000): ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J Cell Biol*, **148**, 385-97.
- Sporn MB and Roberts AB (1990): TGF- β : problems and prospects. *Cell Regul*, **1**, 875-882.
- Stockler M, Wilcken NR, Gersh D and Simes RJ (2000): Systemic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev*, **26**, 151-166.
- Takaku K, Oshima M, Myoshi H, Matsui H, Seldin MF and Taketo MM (1998): Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell*, **92**, 645-656.
- Terry MB, Knight JA, Zablotska L, Wang Q, John EM, Andrulis IL, Senie RT, Daly M, Ozcelik H, Briollais L and Santella RM (2007): Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. *Breast Cancer Res Treat*, **106**, 281-288.
- Theriault RL, Lipton A, Hortobagyi GN, Leff R, Gluck S, Stewart JF, Costello S, Kennedy I, Simeone J, Seaman JJ, Knight RD, Mellars K, Heffernan M and Reitsma DJ (1999): Pamidronate reduces skeletal morbidity in women with advanced breast cancer and lytic bone lesions: a randomized, placebo-controlled trial. Protocol 18. *J Clin Oncol*, **17**, 846-854.
- Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliot J, Horwood NJ, Martin TJ and Gillespie MT (1999): Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology*, **140**, 4451-4458.

- Tong GM, Rajah TT, Zang XP, Bahr SJ and Pento JT (2007): Effect of antiestrogens on EGF-mediated movement of human breast cancer cells. *Pharmacology*, **79**, 93-96.
- Völker P, Gründker C, Schmidt O, Schulz KD and Emons G (2002): Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues. *Am J Obstet Gynecol*, **186**, 171-179.
- von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G and Gründker C (2006): GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, **100**, 13-21.
- von Minckwitz G, Kaufmann M, Möhrle D, Schmid H and Bastert G (1991): Hormonelle Folgetherapien nach Goserelin (Zoladex) beim metastasierten Mammakarzinom prämenopausaler Patientinnen. *Arch Gynecol Obst*, **25**, 258-260.
- Wakefield LM and Roberts AB (2002): TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 22-29.
- White RB, Eisen JA, Kasten TL and Fernald RD (1998): Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 305-309.
- Wikström P, Bergh A and Danber JE (2000): Transforming growth factor- β 1 and prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol*, **34**, 85-94.
- Wittekind C und Mayer HJ.: UICC, International Union Against Cancer. 7. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGA, Weinheim 2010
- Yang Y, Dukhanina O and Tang B (2002): Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest*, **109**, 1607-1615.
- Yin JJ, Selander K, Chrgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massagué J, Mundy GR and Guise TA (1999): TGF- β -signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest*, **103**, 197-206.

- Zheng D, Song T, Zhongliu X, Wu M, Liang J and Liu Y (2012): Downregulation of transforming growth factor- β type II receptor prohibit epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Mol Vis*, **18**, 1238–1246.
- Zhu Y, Richardson JA, Parada LF and Graff JM (1998): Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*, **94**, 703-714.

8 ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| A | Adenosin |
| Abb. | Abbildung |
| ActR | <i>activin receptor</i> |
| ADH | atypische duktale Hyperplasie |
| ALK | <i>activin receptor-like kinase</i> |
| AMH | Anti-Müller-Hormon |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BMK | <i>big MAPK</i> |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BRCA | <i>breast cancer genes</i> |
| BTC | Betacellulin |
| C | Cytosin |
| cDNA | <i>copy-DNA</i> |
| cm | Zentimeter |
| CTGF | <i>connective tissue growth factor</i> |
| Da | Dalton |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> |
| DNA | Deoxyribonukleinsäure |
| Dnase I | Deoxyribonuklease I |
| dNTP | Deoxyribonukleosid-Triphosphat |
| ds | doppelsträngig (<i>double strand</i>) |
| EDTA | Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Na-Salz |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EMT | <i>epithelial-to-mesenchymal-transition</i> |

| | |
|-----------------|--|
| EPR | Epiregulin |
| ERK1/2 | <i>extracellular regulated kinases 1/2</i> |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FCS | fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| FKBP | <i>FK binding protein</i> |
| FSH | Follikel stimulierendes Hormon |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GDF | <i>growth and differentiation factor</i> |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing Hormon |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde(n) (<i>hour(s)</i>) |
| HB-EGF | <i>heparin-binding EGF</i> |
| HER | <i>human epidermal growth factor receptor</i> |
| HER2/neu | <i>human epidermal growth factor receptor2</i> |
| HCC | hepatozelluläres Karzinom |
| hOb | humane Osteoblasten |
| HRG | Heregulin |
| IGF | <i>insulin like growth factor</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-Triphosphat |
| IU | internationale Einheit (<i>international unit</i>) |
| IVF | <i>in vitro</i> -Fertilisation |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| kB | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LCIS | lobuläres Carcinoma in situ |
| LH | Luteinisierendes Hormon |
| LHRH | Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon |
| LTBP | <i>latent transforming growth factor binding protein</i> |
| µg | Mikrogramm |

| | |
|------------------|--|
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| M | Molar |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MEM | <i>minimal essential medium</i> |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| mRNA | <i>messenger-RNA</i> |
| NFκB | <i>nuclear factor kappa B</i> |
| nm | Nanometer |
| NRG | Neuregulin |
| n.s. | nicht signifikant |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat |
| PKB | Proteinkinase B |
| PKC | Phosphokinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PTHrP | <i>parathyroid hormone related protein</i> |
| PTP | Phosphotyrosinphosphatase |
| RANKL | <i>receptor activator of NFκB ligand</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | Umdrehungen pro minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse Transkription-PCR |
| sec | Sekunde(n) (<i>second(s)</i>) |

| | |
|------------|---|
| SDF-1 | <i>stromal derived factor-1</i> |
| SERD | <i>selective estrogen receptor destructor</i> |
| SERM | <i>selective estrogen receptor modulator</i> |
| STAT | <i>signal transducer and activator of transcription</i> |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| <i>Taq</i> | <i>thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TGF | <i>transforming growth factor</i> |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Uracil |
| uPA | Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator |
| UV | ultraviolett |
| V | Volt |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| w | mit (<i>with</i>) |
| w/o | ohne (<i>without</i>) |
| z.B. | zum Beispiel |

8.2 **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

| | |
|---------------------|----|
| Abbildung 3.1..... | 26 |
| Abbildung 3.2..... | 26 |
| Abbildung 4.1..... | 32 |
| Abbildung 4.2..... | 32 |
| Abbildung 4.3..... | 32 |
| Abbildung 4.4..... | 33 |
| Abbildung 4.5..... | 33 |
| Abbildung 4.6..... | 33 |
| Abbildung 4.7..... | 34 |
| Abbildung 4.8..... | 35 |
| Abbildung 4.9..... | 36 |
| Abbildung 4.10..... | 36 |
| Abbildung 4.11..... | 36 |
| Abbildung 4.12..... | 36 |
| Abbildung 4.13..... | 37 |
| Abbildung 4.14..... | 38 |
| Abbildung 4.15..... | 38 |
| Abbildung 4.16..... | 39 |
| Abbildung 4.17..... | 40 |
| Abbildung 4.18..... | 41 |
| Abbildung 4.19..... | 41 |
| Abbildung 4.20..... | 42 |
| Abbildung 4.21..... | 42 |
| Abbildung 4.22..... | 43 |
| Abbildung 4.23..... | 43 |
| Abbildung 4.24..... | 44 |
| Abbildung 4.25..... | 44 |
| Abbildung 4.26..... | 44 |

8.3 TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|------------------|----|
| Tabelle 1.1..... | 2 |
| Tabelle 1.2..... | 3 |
| Tabelle 2.1..... | 20 |
| Tabelle 2.2..... | 21 |
| Tabelle 3.1..... | 26 |
| Tabelle 3.2..... | 28 |
| Tabelle 3.3..... | 30 |
| Tabelle 3.4..... | 30 |

7.4 FIRMENINDEX

| | |
|------------------------------------|-----------------------|
| Abcam | Cambridge, UK |
| Abd Serotec | Düsseldorf, D |
| Abnova GmbH c/o EMBLEM | Heidelberg, D |
| Acris Antibodies GmbH | Hiddenhausen, D |
| Adobe Systems GmbH | Unterschleißheim, D |
| Aeterna Zentaris GmbH | Frankfurt am Main, D |
| ATCC LGC Promochem | Wesel, D |
| B. Braun Melsungen AG | Melsungen, D |
| BD Biosciences | Heidelberg, D |
| BD Plastipak | Heidelberg, D |
| BDH Chemicals Ltd. | Poole, UK |
| Becton Dickinson GmbH | Heidelberg, D |
| Bender & Hobein AG | Zürich, CH |
| Biochrom AG | Berlin, D |
| Biometra GmbH i.L | Göttingen, D |
| Bio-Rad Laboratories GmbH | München, D |
| Bio-Tek Instruments GmbH | Bad Friedrichshall, D |
| Biozym Scientific | Hess. Oldendorf, D |
| Cambrex GmbH | Taufkirchen, D |
| Carl-Roth GmbH & Co. | Karlsruhe, D |
| Carl Zeiss AG | Oberkochen, D |
| Cell Signaling Technology Inc. | Danvers, USA |
| Cell Technology Inc. | Minneapolis, USA |
| Charles River Laboratories | Sulzfeld, D |
| Dako Deutschland GmbH | Hamburg, D |
| Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH | Hamburg, D |
| Ferring Pharmaceuticals | Kiel, D |
| GE Healthcare | München, D |
| GraphPad Software Inc. | San Diego, USA |
| Greiner GmbH | Frickenhausen, D |
| Hanna Instruments Deutschland GmbH | Kehl, D |

| | |
|--|----------------------|
| Heidolph Instruments GmbH & Co. KG | Schwabach, D |
| Heraeus Holding GmbH | Hanau, D |
| Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG | Tuttlingen, D |
| HMD Healthcare | Horsham, UK |
| IKA® Werke GmbH & Co. KG | Staufen, D |
| Invitrogen GmbH | Karlsruhe, D |
| Kern & Sohn GmbH | Balingen-Frommern, D |
| Konica Minolta Medical and Graphic Imaging Europe GmbH, München, D | |
| Memmert GmbH & Co. KG | Schwabach, D |
| Merck KGaA | Darmstadt, D |
| Microsoft Deutschland GmbH | Unterschleißheim, D |
| Millipore Corporation | Billerica, USA |
| Molecular Devices Corporation | Sunnyvale, USA |
| MWG-Biotech AG | Ebersberg, D |
| New England Biolabs GmbH | Frankfurt am Main, D |
| Nunc GmbH und Co. KG | Wiesbaden, D |
| Optik-Labor | Friedrichshofen, D |
| OWL Separation Systems Inc. | Portsmouth, USA |
| PAA Laboratories GmbH | Pasching, A |
| Peptide Specialty Laboratories GmbH | Heidelberg, D |
| Promega GmbH | Mannheim, D |
| Qiagen GmbH | Hilden, D |
| REX Messinstrumente GmbH | Babenhausen, D |
| Roche Deutschland Holding GmbH | Grenzach-Wyhlen, D |
| Santa Cruz Biotechnology, Inc. | Heidelberg, D |
| Sarstedt AG & Co. | Nümbrecht, D |
| Sartorius AG | Göttingen, D |
| Schleicher & Schuell GmbH | Dassel, D |
| Schott-Geräte GmbH | Mainz, D |
| Schütt Labortechnik GmbH | Göttingen, D |
| Sigma-Aldrich Chemie GmbH | München, D |
| Slee Mainz | Mainz, D |

| | |
|----------------------------|--------------------------|
| SuperBioChips Laboratories | Seoul, Südkorea |
| Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA |
| Thomson Scientific | London, UK |
| Tuttnauer Europe B.V. | Breda, NL |
| Ultima Interchim | Montlucon, F |
| Zymed® Laboratories | South San Francisco, USA |

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Carsten Gründker, meinem Doktorvater, danke ich für die Möglichkeit, bei ihm promovieren zu dürfen, und die Stellung des interessanten Themas. Die Denkanstöße und die Motivation in vielen Situationen waren sehr wertvoll. Ich danke ihm besonders dafür, dass er das Interesse und den Glauben an das Gelingen der Arbeit während der Jahre nicht verloren hat.

Dr. Antje Schubert, meiner Betreuerin, für die immer freundliche, geduldige und kompetente Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Prof. Dr. Günter Emons dafür, dass ich die vorliegende Arbeit im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Göttingen unter der Leitung von Prof. Dr. Carsten Gründker anfertigen konnte.

Ein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Gynäkologie. Besonders herausstellen möchte ich hier Dr. Stefanie Fister, Hiltrud Schulz und Renate. Die Unterstützung und die nette Atmosphäre waren etwas Besonderes und bleiben unvergesslich.

LEBENS LAUF

Mein Name ist Anja Heineke, ich wurde am 01.12.1981 in Hannover geboren. Wohnhaft bin ich in der Krausenstraße 4c in Hannover. Ich bin ledig und habe keine Kinder.

Meine schulische Laufbahn begann ich 1987 in der Grundschule Sehnde. Von 1992 bis zum Erreichen des Abschlusses der allgemeinen Hochschulreife 2001 besuchte ich das Gymnasium Andreanum in Hildesheim. Schon während der Schulzeit galt mein besonderes Interesse den naturwissenschaftlichen Fächern, so dass ich im Anschluss an das Abitur im Wintersemester 2001 zunächst ein Studium der Chemie an der Leibniz-Universität Hannover begonnen habe. Nachdem mir bewusst geworden war, dass mir das rein naturwissenschaftliche Arbeiten nicht ausreicht, entschloss ich mich sehr bald zu einem Wechsel des Studienfachs. Vom Sommersemester 2002 bis zum erfolgreichen Abschluss mit Staatsexamen 2008 studierte ich an der Universität Göttingen Humanmedizin. Während der Studienzzeit wurde erneut mein Interesse an naturwissenschaftlicher Arbeit und Forschung geweckt, so dass ich mich seit 2007 mit der Promotionsarbeit zum Thema „Der Einfluss von GnRH-Analoga auf die Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren in Mammakarzinomzellen und der Osteoblasten-ähnlichen Zellreihe MG-63 während der Kokultur“ im Labor für Molekulare Gynäkologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen beschäftige. Betreut werde ich seit dieser Zeit durch meinen Doktorvater Prof. Dr. rer.nat. Carsten Gründker.

Nach Abschluss des Studiums habe ich im Juli 2009 meine Facharztweiterbildung zur Viszeralchirurgin als Assistenzärztin in der chirurgischen Klinik des Diako-Krankenhauses in Bremen bei Prof. Dr. S. Freys begonnen. Aus familiären Gründen habe ich im März 2011 meinen Wohnort nach Hannover verlegt. Daher setze ich seither meine weitere Facharztweiterbildung in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des St. Bernward Krankenhaus in Hildesheim unter Leitung von Dr. Th. Gaertner fort

Hannover, 11.02.2013