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

Beeinflusst der *knockdown* des membranständigen Östrogenrezeptors GPER (GPR30) die anti-invasive Wirksamkeit selektiver Östrogenrezeptor β (ERβ)-Agonisten?

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Vivien Charlotte Schmitz

aus

Großburgwedel

Göttingen 2022

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in:	Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

Prüfungskommission

Referent/in:	Prof Dr. rer. nat. C. Gründker
Ko-Referent/in:	PD Dr. Silke Kaulfuß
Drittreferent/in:	

Datum der mündlichen Prüfung:	21.03.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Beeinflusst der *knockdown* des membranständigen Östrogenrezeptors GPER (GPR30) die anti-invasive Wirksamkeit selektiver Östrogenrezeptor β (ERβ)-Agonisten?“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …… ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **III**

Tabellenverzeichnis ..... **V**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Epidemiologie 1

1.2 Ätiologie 1

1.3 Pathogenese und Histologie 3

1.4 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC) 6

1.5 Metastasierung 7

1.6 Therapie 8

1.7 Östrogenrezeptoren (ER) 10

1.7.1 Spezifische Östrogenrezeptor β (ERβ)-Agonisten 12

1.7.2 G Protein-coupled estrogen receptor (GPER, GPR30) 13

1.8 Fragestellung 15

2 Material und Methoden **16**

2.1 Materialien 16

2.1.1 Geräte 16

2.1.2 Chemikalien 18

2.1.3 Biologische Materialien, Lösungen und Puffer 19

2.1.4 Zelllinien 21

2.1.5 EDV 21

2.1.6 Antikörper 22

2.1.7 ERβ-Agonisten 22

2.1.8 Zellen passagieren 22

2.1.9 Tumorzellen einfrieren 23

2.1.10 Tumorzellen auftauen 24

2.1.11 Bestimmung der Zellzahl 24

2.1.12 siRNA GPR30-Transfektion 25

2.1.13 RNA-Isolation 25

2.1.14 RNA-Konzentration messen 26

2.1.15 Reverse Transkription 26

2.1.16 RT-PCR ... 27
2.1.17 Agarose-Gelelektrophorese ... 28
2.1.18 Auswertung der RT-PCR ... 28
2.1.19 Invasionsassay ... 28
2.1.20 Auswertung ... 30
2.1.21 Proteinisolation ... 30
2.1.22 Bestimmung der Proteinkonzentration ... 31
2.1.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 31
2.1.24 Western Blot ... 32
2.1.25 Detektion und Visualisierung ... 33
2.1.26 Strippen der Membran ... 33

3 Ergebnisse ... 34

3.1 GPR30-*knockdown* und Proteinexpression ... 34
3.1.1 Auswertung PCR nach GPR30-*knockdown* ... 34
3.1.2 Auswertung Western Blot nach GPR30-*knockdown* ... 35

3.2 Invasionsanalyse ... 41
3.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung ... 43
3.2.2 Invasionsverhalten nach GPR30-*knockdown* ... 44
3.2.3 Invasionsverhalten nach GPR30-*knockdown* und ERβ-Agonisten Behandlung ... 45

4 Diskussion ... 51

4.1 Ausblick ... 59

5 Zusammenfassung ... 61

6 Literaturverzeichnis ... 62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsweise von ERβ in TNBC 11

Abbildung 2: Übersicht Signalwege GPER 14

Abbildung 3: Tamoxifen als GPER-Agonist 15

Abbildung 4 A): RT-PCR MDA-MB 231 34

Abbildung 4 B) GPR30-Expression auf m-RNA-Ebene nach siRNA-*knockdown* bei der Zelllinie MDA-MB 231 34

Abbildung 5 A): RT-PCR HCC 1806 35

Abbildung 5 B): GPR30-Expression auf m-RNA-Ebene nach siRNA-*knockdown* bei der Zelllinie HCC 1806 35

Abbildung 6: Proteinexpression von GPR30 nach *knockdown* in den Zelllinien MDA-MB 231-und HCC 1806 im Vergleich zur Kontrolle 36

Abbildung 7: Signifikanter Rückgang der GPR30-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen nach 120 h im Western Blot 36

Abbildung 8: Signifikanter Rückgang der GPR30-Proteinexpression in HCC 1809-Zellen nach 48 h im Western Blot 37

Abbildung 9 A): ERβ-Proteinexpression im Western Blot bei MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* 38

Abbildung 9 B): ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot 38

Abbildung 10 A): ERβ-Proteinexpression im Western Blot bei HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* 39

Abbildung 10 B): ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot 39

Abbildung 11: ERα-Proteinexpression im Western Blot bei MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* 40

Abbildung 12: ERα-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot 40

Abbildung 13: ERα-Proteinexpression im Western Blot bei HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* 40

Abbildung 14: ERα-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot 41

Abbildung 15: Lichtmikroskop ... 43

Abbildung 16: Invasionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen ... 44

Abbildung 17: Invasionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen ... 44

Abbildung 18: Invasionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen ... 46

Abbildung 19: Invasionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen ... 46

Abbildung 20: Vergleich Inversionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 ... 47

Abbildung 21: Vergleich Inversionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 ... 47

Abbildung 22: Western Blot ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen ... 48

Abbildung 23: ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 48 h im Western Blot ... 48

Abbildung 24: ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 120 h im Western Blot ... 49

Abbildung 25: Western Blot ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen ... 49

Abbildung 26: ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 48 h im Western Blot ... 50

Abbildung 27: Schlüsselrolle EGFR ... 55

Abbildung 28: Wirkungsweise ERβ ... 59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Mammakarzinoms 4
Tabelle 2: Subtypen des Mammakarzinoms 4
Tabelle 3: Grading malignes Mammakarzinom nach Elston und Ellis 6
Tabelle 4: UICC/AJCC-Klassifikation des Mammakarzinoms 10
Tabelle 5: Geräte 16
Tabelle 6: Chemikalien und biologische Materialien 18
Tabelle 7: Biologische Materialien, Lösungen und Puffer 19
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien 21
Tabelle 9: Verwendete EDV 21
Tabelle 10: Verwendete Antikörper und deren Herkunft 22
Tabelle 11: Zusammensetzung Kultumedium 23
Tabelle 12: Zusammensetzung Medium für Kryokonservierung 24
Tabelle 13: Reaktionsansatz für PCR 27
Tabelle 14: PCR-Programme/Thermocycler 28
Tabelle 15: Immunzytologische Färbung mithilfe Mayer's Hämalaunlösung 29
Tabelle 16: Zusammensetzung Ko-Kulturmedium 30
Tabelle 17: Zusammensetzung Medium für MG-63 30
Tabelle 18: Zusammensetzung des 7,5 % Trenngels 32
Tabelle 19: Zusammensetzung des 5 % Sammelgels 32
Tabelle 20: ERβ-Unterformen und deren Funktion 58

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	*activator protein-1*
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA1	*breast cancer 1*
BRCA2	*breast cancer 2*
BSA	*bovine serum albumin*
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD-FCS	*charcoal dextran-treated FCS*
cDNA	*complementary deoxyribonuclein acid*
c-fos	Protoonkogen der Fos-Proteine
Co	Kontrolle
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	*Dulbecco's phosphate buffered saline*
DNA	*deoxyribonuclein acid*
DNAse I	Desoxyribonuclease I
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence reaction*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
ERα	*estrogen-receptor-a*
ERß	*estrogen-receptor-ß*
ERE	*estrogen-responsive elements*
FCS	*fetal calf serum*
GPER/GPR30	*G protein-coupled estrogen receptor/G protein-coupled estrogen receptor 30*
Her2/neu	*human epidermal growth factor receptor 2*
HIF1-alpha	*hypoxia inducable factor-1alpha*
Ki-67	Kiel-67Antigen
L-Gln	L-Glutamin
L7	*housekeeping gene L7*
MEM	*minimal essential medium*
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
mRNA	*messenger*-RNA
p53	Tumorsuppressorgen
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	*polymerase chainreaction*
PI3	Phosphoinositol-3
PR	Progesteronrezeptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	*ribonucleic acid*
RNAse	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute*
RT-PCR	*reverse transcription polymerase chain reaction*
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
siRNA	*small interfering ribonucleic acid*
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	*tris-buffered saline*
TBST	*tris buffered saline with Tween20*
TNBC	*triple-negative breast cancer*
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
VEGFR	*vascular endothelial growth factor receptor*
vs.	versus
WHO	World Health Organization
w/o	*with/without*

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit rund 30 % die häufigste Tumorlokalisation der Frau unter den 69.000 jährlich gezählten Brustkrebsneuerkrankungen in Deutschland. Bei ca. 230.000 jährlichen Krebsneuerkrankungen der Frau ist es die häufigste Krebserkrankung des weiblichen Geschlechts. Der Altersgipfel liegt bei 65 - 69 Jahren. Es versterben im Mittel 23 % der Frauen an ihrem Brustkrebs und dieser gilt damit als die häufigste tumorbedingte Todesursache der Frau. Die relative 5-Jahres-Überlebenszeit liegt bei mittlerweile 87 %. Die steigende Prävalenz von Mammakarzinomen lässt sich darauf zurückführen, dass Neuerkrankungen durch modernste Bildgebung immer früher und häufiger diagnostiziert werden. Eine 5-Jahres-Überlebenszeit von 87 % spricht für den deutlichen Fortschritt medizinischer Therapiekonzepte. Ein geringer Anteil von > 1 % betrifft ebenfalls Männer. Derzeit stehen standardisierte und individuelle Therapiekonzepte zur Verfügung, die sich nach den molekularen und histologischen Eigenschaften des Tumors richten. Ebenfalls spielen das Risikoprofil der Frau, genetische Prädispositionen und die Tumorausbreitung eine wichtige Rolle in der Behandlung von Mammakarzinomen (GEKID 2019).

1.2 Ätiologie

Mammakarzinome entstehen aus einer multifaktoriellen Genese heraus. Neben genetischen Ursachen spielen das Alter, sozioökonomischer und ethischer Hintergrund, Lebensstil, Schwangerschaften und Menopause eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Brustkrebs. Beschrieben wird eine höhere Inzidenz in den Industrieländern, während dahingegen die Mortalität in geringer entwickelten Ländern höher ist (Momenimovahed und Salehiniya 2019). Ein großer Risikofaktor in der Entwicklung des Mammakarzinoms ist das Alter. Frauen höheren Alters, insbesondere bei Eintritt in die Menopause, verfügen über ein höheres Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Die Länge des aktiven hormonellen Zeitraums der Frau spielt somit eine wichtige Rolle. Eine eingenommene Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Beschwerden sowie als Prophylaxe nach Mammakarzinom kann das Risiko erhöhen, an Brustkrebs zu erkranken. Der hormonell aktive Zeitraum verlängert sich durch künstliche Östrogensubstitution wesentlich.

Jüngere Frauen neigen jedoch dazu, größere, schlecht differenzierte Tumore mit einer schnelleren Neigung zur Metastasierung und einer schlechteren Überlebenschance auszubilden. Diese sind zudem oft in ihrem *BRCA1*/*BRCA2*-Tumorsuppressorgen mutiert. Eine solche Mutation

ist oft mit Hormonrezeptor-negativen Brustkrebstypen assoziiert. Sie wird autosomal dominant vererbt. Träger einer solchen Mutation haben im Durchschnitt ein über 50-prozentiges Risiko im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken. Ebenfalls ist das Risiko für die Ausbildung anderer maligner Erkrankungen wie Ovarial-, Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinom erhöht. Weiterhin besteht bei Nachweis der *BRCA1*/*BRCA2*-Mutation ein doppelt erhöhtes Risiko, auch ein Karzinom in der kontralateralen Brust zu entwickeln. Neben der Ausbildung von Mutationen spielt die Familienanamnese in der Entwicklung des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle. Bei Auftreten von mehr als zwei Brustkrebserkrankungen bei Frauen jünger als 50 Jahre in mehr als einer folgenden Generation besteht ein deutlich erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Brustkorbbestrahlung bei Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter verfügen über ein stark erhöhtes Risiko für Zweitmalignome der Brust im weiteren Verlauf des Lebens.

Frauen, die zudem an Übergewicht leiden und einen erhöhten BMI besitzen, setzen sich einem höheren Risiko aus, an Brustkrebs zu erkranken. Fettgewebe produziert vermehrt Androgene, welche mithilfe des Enzyms Aromatase in Östrogene umgewandelt werden und somit die Zellproliferation des Drüsengewebes anregen. Leptin wird vom Fettgewebe sezerniert und aktiviert Zellproliferation und Angiogenese. Es wirkt positiv invasiv auf Brustkrebszellen. Leptin interagiert vermehrt mit Insulin und dem Insulin-like Faktor, die Zellwachstum, Invasion und Migration von Brustkrebszellen über eine Costimulation von *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) zusätzlich anregen. Stoffwechselerkrankungen, die mit einem erhöhten Blutglucosespiegel einhergehen und vermehrt dazu führen, dass Insulin und dem Insulin-like Faktor ausgeschüttet werden, erhöhen das Risiko, ein invasives Karzinom auszubilden. Studien belegen, dass Frauen mit einem BMI ≥ 30 kg/m^2 eine schlechtere Überlebensrate haben. Allgemeine Risikofaktoren wie Alkohol und Rauchen gehen ebenfalls mit einem höheren Risiko für die Ausbildung von Brustkrebs einher. Studien belegen, dass Alkohol insbesondere mit Östrogen-positiven Mammakarzinomen assoziiert ist.

Beobachtungen zeigten, dass Frauen mit einem höheren sozioökonomischen Standard häufiger an Brustkrebs erkrankten. Der westliche Lebensstandard vereint mehrere Risikofaktoren wie weniger Bewegung, höheres Alter bei der ersten Geburt, späterer Eintritt in die Menopause sowie einen höheren Alkohol- und Zigarettenkonsum. Andererseits kann aufgrund einer modernen Diagnostik und einer umfangreichen Therapie die mittlere Überlebenschance stark verbessert werden.

Neben einer deutlichen Anzahl von Risikofaktoren für die Entwicklung von Neoplasien der Brustdrüse können ebenfalls protektive Faktoren gegenübergestellt werden. Sportliche Aktivität geht mit einem geringeren Risiko einher, Brustkrebs auszubilden. Ebenfalls verbessert diese die

Überlebenszeit im Falle einer bereits erfolgten Krankheitsausbreitung. Vitamin D zeigt eine negative Korrelation mit der Tumorgröße. Hohe Serumdosen von 25-Hydroxycholecalciferol wirken protektiv in der Ausbildung von Mammakarzinomen. Es verbessert zudem bei Erkrankung die Prognose und die damit verbundene Überlebenszeit. Schwangerschaften und eine ausreichende Stillzeit ≥ 6 Monate reduzieren das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Eine Kombination von Multiparität mit einer Gesamtstillzeit von über 13 Monate kann das Brustkrebsrisiko um mehr als 50 % senken. Allerdings sollte es im Zusammenhang mit dem übrigen Risikoprofil betrachtet werden. Mehrmalige Schwangerschaften können bei älteren Frauen demnach auch einen potenziellen Risikofaktor für die Ausbildung eines Mammakarzinoms darstellen (Vona-Davis et al. 2014).

1.3 Pathogenese und Histologie

Am häufigsten wird das Mammakarzinom durch einen zufälligen Tastbefund entdeckt. Symptome wie Schmerzen, Hauteinziehungen oder Verfärbungen als Zeichen eines fortgeschrittenen Befundes zeigt es nur selten. Mit Abstand am häufigsten lokalisiert sind Mammakarzinome im oberen äußeren Brustquadranten (55 %), gefolgt vom oberen inneren Quadranten (34 %). Zu den selteneren Lokalisationen zählen die unteren Quadranten sowie die Beteiligung der Mamille (Alazahrani et al. 2019). Bei zufälligen Tastbefunden handelt es sich oft um Tumorgrößen zwischen 2–5 cm Durchmesser (siehe Tabelle 1). Histopathologisch lässt sich das Mammakarzinom nach WHO nach seinem Ursprungsgewebe klassifizieren. Es wird unterschieden in Neoplasien des duktalen oder lobulären Typs. Das häufigste Mammakarzinom ist das invasive Karzinom ohne speziellen Typ (NST), ehemals geläufig als das invasive duktale Karzinom. Wesentlich seltener tritt das invasiv-lobuläre Karzinom auf. Bevor es zur Ausbildung des invasiven Karzinoms führt, können in der Regel bei früh erfolgter Bildgebung gewisse Risikoläsionen dargestellt werden. Es wird ebenfalls nach dem Ursprungsgewebe zwischen dem duktalen Carcinoma in situ (DCIS) und der Lobulären intraepithelialen Neoplasie (LIN) unterschieden. Hierbei wird die Basalmembran nicht durchbrochen, sie stellen aber ein erhöhtes Risiko für eine Entartung des Gewebes dar. Es betrifft vor allem jüngere prämenopausale Frauen (Wei et al. 2012). Der Behandlung von Risikoläsionen kommt somit ein wesentlicher Stellenwert in der Prävention vor invasiven Mammakarzinomen zu.

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Mammakarzinoms

TNM	Tumorgröße und -ausbreitung
Tis	Cacinoma in situ
T1	≤ 2 cm
T2	2–5 cm
T3	> 5 cm
T4	Befall von Haut oder Brustwand
N1	Befall beweglicher axillärer Lymphknoten
N2	Befall fixierter axillärer Lymphknoten
N3	Zusätzlicher Befall von supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten
M1	Fernmetastasen

Das maligne Mammakarzinom unterscheidet sich hinsichtlich seiner Histologie, der Expression von immunhistochemischen Markern sowie in der Tendenz zur Proliferation und Metastasierung. Die spezifischen Merkmale des Tumors werden sich in der Therapie des Tumors zunutze gemacht. Es wird in fünf molekulare Subtypen unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer Genexpression unterscheiden. Verglichen werden die Subtypen nach Expression von Östrogenrezeptor-α, Progesteronrezeptor, HER2 und hinsichtlich ihres Proliferationindex Ki-67.

Tabelle 2: Subtypen des Mammakarzinoms

Molekularer Subtyp	ERα	PR	HER2	Proliferations-index
Luminal A	+	+	-	Niedrig
Luminal B	+	-	+	Hoch
Triple-positive	+	+	+	
HER2 überexprimiert	-	-	+	
Basal-like	-	-	-	

ER = Östrogenrezeptor α, PR = Progesteronrezeptor, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, Proliferationsindex gemessen an Expression von Ki-67.

Estrogen-receptor (ER)-positive Tumore werden als luminale Subtypen zusammengefasst. Den häufigsten Subtyp stellt der Luminal-Typ A (34 %) dar, gefolgt von dem unklassifizierten Typ (22,3 %), welcher nach seiner Hormonexpression keinem eindeutigen Subtyp zugeordnet werden kann. Der Luminal-Typ B wird als seltenster Typ (6,7 %) beschrieben (St. Gallen Klassifikation KAUH 2005; Al-thoubaity et al. 2020).

Östrogen- und Progesteronrezeptoren sind Kernrezeptoren, während HER2 im Zytoplasma exprimiert wird. Östrogene und Progesteron dienen im gesunden Drüsengewebe der Regulierung von Wachstums- und Zellerneuerungsprozessen. Sie spielen daher auch eine wesentliche Rolle bei Wachstumsprozessen von entarteten Mammakarzinomzellen. HER2 ist ein Protoonkogen und aktiviert über Signalkaskaden die Zellproliferation. Bei übermäßiger Aktivierung des Protoonkogens wird das Zellwachstum stark beschleunigt und begünstigt damit die Entstehung maligner Zellverbände.

Die Bestimmung der Hormonrezeptoren dient somit in erster Linie der Therapie. So können Östrogenrezeptor-α-positive Tumore durch Anti-Östrogene wie beispielsweise Tamoxifen antagonisert werden, HER2 bietet einen Angriffspunkt für den spezifischen Antikörper Trastuzumab. Eine vermehrte HER2-Expression konnte zudem bei dem duktalen Carcinoma in situ (DCIS) beobachtet werden (Wei et al. 2012). Ein hoher Proliferationsindex Ki-67 entspricht einer schnellen Zunahme des Tumorgewebes und kann sich bei der Therapie mit Zytotherapeutikern, die in den Zellzyklus eingreifen, zunutze gemacht werden. Ki-67 dient als Proliferationsmarker in sich teilenden Zellen und kann durch immunhistochemische Verfahren sichtbar gemacht werden. Ein erhöhtes Tumorgrading und ein erhöhter Proliferationsindex gehen mit einer schlechteren Überlebenszeit einher (Vona-Davis et al. 2014).

Basal-like-Tumore exprimieren keine dieser Hormonrezeptoren und werden zu den triple-negativen Neoplasien gezählt. Diese machen ca. 12,5 - 15 % aller Brustkrebstypen aus. Sie zeichnen sich durch ein hohes Grading, einen hohen mitotischen Index sowie eine geringe histologiesche Differenzierung aus (Badowska-Kozakiewicz und Budzik 2016).

Die histologischen Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Gesamtüberlebenszeit und der Entwicklung eines Rezidivs. Patienten mit Luminal-A Subtyp haben vergleichsweise die längste Gesamtüberlebenszeit (> 10 Jahre), das längste krankheitsfreie Intervall (innerhalb der ersten 15 Jahre) sowie die längste Überlebenszeit nach Entwicklung eines Rezidivs (1,6 Jahre). Wesentlich schlechtere Prognosen weisen dagegen HER2-positive und Basal-like-Tumore auf. Sie zeigen oft bereits in den ersten 5 Jahren nach Diagnose ein Rezidiv. Das Überleben nach Rezidiv ist im Mittel limitiert auf 0,7 bzw. 0,5 Jahre. Während HER2-positive und Basal-like-Tumore vermehrt in das Gehirn, Leber, Knochen und Lunge metastasieren, sind luminale Subtypen nur selten mit

Hirnmetastasen assoziiert und zeigen eine geringere Neigung zur Ausbildung von Leber-, Lungen- oder Lymphknotenmetastasen. Es lässt sich daher davon ausgehen, dass die molekularen Subtypen ein spezifisches Metastasierungsmuster verfolgen, welche eine individuelle Therapie benötigen (Kennecke et al. 2010).

Tabelle 3: Grading malignes Mammakarzinom nach Elston und Ellis

Grad 1	Score 3 - 5	Gut differenziert
Grad 2	Score 6 - 7	Mäßig differenziert
Grad 3	Score 8 - 9	Schlecht differenziert

In der histologischen Untersuchung von malignen Brustkrebszellen wird der Grad ermittelt, inwieweit die malignen Zellen in ihrer Morphologie von gesunden Brustdrüsenzellen abweichen. Der Score setzt sich zusammen aus Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitosen aus Stanzbiopsat vs. Resektat.

1.4 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC)

Das triple-negative Mammakarzinom exprimiert weder den Steroidhormonrezeptor Östrogenrezeptor-α oder Progesteronrezeptor, noch HER2. 44,4 % der TNBC exprimieren lediglich *estrogen-receptor-β* (ERβ) (Girgert et al. 2012). Es ist assoziiert mit einer deutlich schlechteren Überlebensprognose. ERβ-positive TNBC sind mit einer signifikant längeren rezidivfreien Überlebenszeit assoziiert (Hinsche et al. 2015). Die Neigung zur hämatogenen Metastasierung und Ausbildung von viszeralen Metastasen bei TNBC ist deutlich erhöht. Die Tumore sind größer, aggressiver und metastasieren schneller, meist innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung. Das krankheitsfreie Intervall ist deutlich verkürzt und die Gesamtüberlebenszeit stark minimiert im Vergleich zu anderen Brustkrebstypen. Typischerweise korreliert in triple-negativen Tumoren die Größe des Tumors nicht mit der Metastasierung in regionäre Lymphknoten (Badowska-Kozakiewicz und Budzik 2016). Häufig sind junge Frauen betroffen und es kann mit einer *BRCA1/2*-Mutation assoziiert vorkommen. Fettleibigkeit gilt als weiterer wesentlicher Risikofaktor für die Ausbildung des TNBC und von Metastasen. TNBC metastasiert vorzugsweise hämatogen in viszerale Organe. Es zeigt im Vergleich zu anderen Hormonrezeptor-positiven Tumoren keine verstärkte ossäre Metastasierung. Die periphere Metastasierung ist prognoselimitierend, insbesondere die pulmonale Metastasierung ist mit der insgesamt schlechtesten mittleren Überlebenszeit assoziiert. Der TNBC zeigt zudem einen vermehrten axillären Lymphknotenbefall. Die axilläre Metastasierung spricht für einen besonders aggressiven Phänotyp des Mammakarzinoms (Vona-Davis et al. 2014). Aufgrund einer vermehrten Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in TNBC-Zellen können Prozesse der

Neovaskularisation, Invasion und Metastasierung beschleunigt ablaufen. Derzeit werden triple-negative Tumore mit Chemotherapeutikern der Gruppe Anthrazykline und Taxanen therapiert (Badowska-Kozakiewicz und Budzik 2016).

1.5 Metastasierung

Die Ausbreitung von Tumorzellen, ausgehend vom Primärtumor in umliegendes Gewebe und periphere Organe, hat im Wesentlichen Auswirkung auf die Morbidität und Mortalität. Periphere Metastasen sind zu 90 % der Fälle Ursache, am Mammakarzinom zu versterben (Seyfried und Huysentruyt 2013). Unabhängig vom Therapiekonzept entwickeln bis zu 30 % der an Brustkrebs erkrankten Patienten periphere Metastasen (Buonomo et al. 2017). Malignen Zellen ist es möglich, in das Lymph- und Blutsystem des Körpers einzubrechen, einer körpereigenen Immunreaktion zu entkommen, in peripheres Gewebe auszutreten und dort zu proliferieren (Seyfried und Huysentruyt 2013). Der Nachweis von Fernmetastasen hat insbesondere Auswirkung auf das Therapiekonzept sowie auf die Überlebenschance des Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate und der damit verbundene Therapieerfolg sind bei Ausbildung von Fernmetastasen limitiert. Bevorzugte Metastasierungsorte sind Knochengewebe, Leber, Lunge, kontralaterale Brust sowie Hirngewebe. Ein Befall der Lymphknoten in unmittelbarer Nähe des Brustgewebes zählt definitionsgemäß nicht zu Fernmetastasen, ist aber dennoch für die Therapieplanung von Bedeutung.

Das invasive duktale sowie das invasiv lobuläre Karzinom haben beide gleichermaßen eine Tendenz zur Metastasierung (Wei et al. 2012). Jedoch kann anhand des genetischen Profils des Tumors ein unterschiedliches Metastasierungsverhalten beobachtet werden. Es kann unterschieden werden in lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung und viszerale bzw. ossäre Metastasierung. Der Nachweis von peripheren Metastasen geht oft mit einem Befall von peripheren Lymphknoten einher. Große Tumore (> 3 cm Durchmesser) neigen vermehrt zur Metastasierung (Vona-Davis et al. 2014). Ein positiver Lymphknotenbefall zählt zu den möglichen Prädiktoren von peripheren Metastasen und ist daher prognostisch wichtig im Hinblick auf die Ausbildung eines Rezidivs der Erkrankung (Buonomo et al. 2017).

Abhängig von dem genetischen Profil des Tumors werden Proteine exprimiert, die eine Metastasierung erlauben. Unterschiede in der Genetik des jeweiligen Mammakarzinoms erklären ein abweichendes Metastasierungsmuster. Ein Großteil der Mammakarzinome, insbesondere der ER-positiven, metastasiert primär ossär. Proteine und Botenstoffe werden exprimiert, welche die Abläufe der Angiogenese, Gefäßinvasion, Zell-Homing und Osteoklastenrecruitierung aktivieren. Besonders aggressive Tumore exprimieren *transforming growth factor* (TGF-beta), welcher

diese Signalkaskaden coaktiviert und somit die Invasion und Metastasierung solcher Tumore stimuliert (Kang et al. 2003). Eine ossäre Metastasierung ist im Vergleich zu einer viszeralen Metastasierung mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert (Vona-Davis et al. 2014). HER2-positive Subtypen neigen am wahrscheinlichsten zu einer systemischen Metastasierung, wohingegen luminale Subtypen bevorzugt in Lymphknoten und Knochen metastasieren. HER2-positive Tumore und Basal-like-Tumore metastasieren häufiger und haben eine schlechtere Prognose bei axillärem Lymphknotenbefall. Bevorzugte Metastasierungsorte sind das zentrale Nervensystem, Leber und Lunge. Sie sind zudem assoziiert mit Mammakarzinomen bei jungen Frauen. Luminale Subtypen metastasieren meist erst später, bevorzugt in den Knochen und haben ein geringeres Rezidivrisiko. Chemotherapien nehmen keinen signifikanten Einfluss auf die Behandlung von peripheren Metastasen. Der HER2-Antikörper Trastuzumab zeigt hingegen bei Anwendung eine rückläufige Tendenz der Fernmetastasierung (Buonomo et al. 2017). Die genetische Heterogenität zwischen malignen Zellen des Primärtumors und den peripheren Metastasen erschwert die adäquate Therapie. (Medeiros et. al 2020)

1.6 Therapie

Das Therapiekonzept des invasiven Mammakarzinoms ist abhängig vom Tumorstadium (siehe Tabelle 4) und umfasst hauptsächlich vier grundlegende Angriffspunkte. Operation, Chemotherapie, Radiotherapie und Hormon- bzw. Immuntherapie zählen derzeit zu der Standardtherapie bei Brustkrebs. Es kann zwischen einem primär kurativen und einem palliativen Ansatz unterschieden werden. Nachdem Fernmetastasen diagnostiziert wurden, spricht man von einem Stadium IV und wählt einen palliativen Therapieansatz. Sofern von einem kurativen Ansatz ausgegangen wird, steht zunächst in den meisten Fällen die Operation an erster Stelle der Therapiekaskade. Diese kann unterschieden werden in brusterhaltende Operation oder radikale Mastektomie, beide mit dem Ziel, den Tumor mit tumorfreien Resektionsrändern (R0) vollständig zu entfernen. In beiden Fällen werden in der Regel die axillären Lymphknoten mit entfernt. Anschließend folgen Zyklen der Chemo- und Radiotherapie. Der Einsatz von systemischer Chemotherapie dient dem Eingriff in den Zellzyklus sich teilender Zellen und verhindert die weitere Proliferation der entarteten Zellen. Als besonders effektiv gilt der Einsatz von Chemotherapie bei schnell proliferierenden Tumorzellen, meistens Tumore mit negativen Hormonrezeptorstatus. Jedoch sterben unter laufender Chemotherapie auch große Teile der gesunden und fertilitätsfähigen Zellen im menschlichen Organismus ab. Der Einsatz von Chemotherapie kann auch neoadjuvant erfolgen, um eine eingeschränkte Operabilität zu verbessern. Die Bestrahlung der Tumorregion und des axillären Lymphabflussweges soll makroskopisch nicht entfernte Karzinomzellen abtöten, vor der Metastasierung schützen und einem Rezidiv im Tumorbett

vorbeugen. Als weitere wichtige Therapieoption wird die Hormontherapie, sofern möglich, eingesetzt. Mithilfe der Hormontherapie können spezifisch die molekularen Subtypen therapiert werden, indem sich das Rezeptorprofil als Angriffspunkt zunutze gemacht wird. Jedoch können nicht alle Subtypen von der Hormontherapie profitieren, da sie entweder den Hormonrezeptor nicht exprimieren oder der Tumor Resistenzmuster entwickelt. Resistenzentwicklung stellt die Therapie des Mammakarzinoms vor eine enorme Problematik, da sie oft als letzte Instanz der Therapiekaskade bei oftmals älteren, multimorbiden Patientinnen verwendet wird und als Prophylaxe nach Remission der Krebserkrankung eingenommen wird.

Insbesondere Tamoxifen, ein *estrogen-receptor-*α-Antagonist (ERα-Antagonist), verfügt über ein breites Nebenwirkungsspektrum. Aufgrund der Reduktion der Östrogenproduktion stehen postmenopausale Beschwerden im Vordergrund. Im Drüsengewebe der Brust dient es als ERα-Antagonist, im Endometrium des weiblichen Uterus bewirkt es eine Zunahme der Zellproliferation. Tamoxifen agiert im Endometrium als ERα-Agonist und stellt ein erhöhtes Risiko für Endometriumkarzinome dar (Du et al. 2012).

Bei jeder vierten Frau exprimiert das Mammakarzinom HER2. Tamoxifen als adjuvantes Therapeutikum bleibt in den meisten Fällen wirkungslos. HER2-positive Brustkrebstumore werden zusätzlich mit Trastuzumab, einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen HER2, therapiert. Im Gegensatz zu Tamoxifen oder alleiniger Chemotherapie konnte nach Einsatz von Trastuzumab auch ein rückläufiger Trend der Fernmetastasierung beobachtet werden. Durch die Aktivierung von körpereigenen Immunzellen gehen die malignen Zellen vermehrt in Apoptose. Die Bindung an den HER2-Rezeptor bewirkt eine Deaktivierung der Signalwege und bewirkt somit ein Ausbleiben von Zellproliferation und Angiogenese der Tumorzellen. Trastuzumab kann jedoch kardiotoxische Nebenwirkungen entfalten und Patienten sollten sich vorher einer Herzuntersuchung aussetzen (S3-Leitlinie Mammakarzinom 2018).

Tabelle 4: UICC/AJCC-Klassifikation des Mammakarzinoms

Stadieneinteilung	TNM
0	Tis, N0, M0
1A 1B	T1, N0, M0 T0 - 1, N mikro, M0
2A 2B	T0 - 1, N1, M0 oder T2, N0, M0 T2, N1, M0 oder T3, N0, M0
3A 3B 3C	T0 - 2, N2, M0 oder T3, N1- N2, M0 T4, N0 - N2, M0 T0 - 4, N3, M0
4	Sobald M1

UICC = Union for International Cancer Control, AJCC = American Joint Commission on Cancer

1.7 Östrogenrezeptoren (ER)

Östrogen wird in beiden Geschlechtern zu unterschiedlichen Anteilen gebildet und ist an unterschiedlichsten Stoffwechselvorgängen des menschlichen Körpers beteiligt. Es handelt sich um ein lipophiles Hormon, welches die Zellmembran passieren kann und an den intrazellulären Östrogenrezeptor binden kann. Seine Wirkung entfaltet es über Östrogenrezeptoren α und β, welche jeweils unterschiedliche Signalkaskaden im Zielgewebe aktivieren. Es handelt sich um Kernrezeptoren, welche durch ihre Liganden aktiviert werden und mithilfe von Transkriptionsfaktoren die Genexpression in Zellen beeinflussen. Spezifische Liganden binden an ihre entsprechende Domäne im Östrogenrezeptor, darauf dimerisiert dieser, ändert seine Konformation und kann durch *estrogen-responsive elements* (ERE) an spezifische Promotorsequenzen der *deoxyribonucleic acid* (DNA) binden. Da sich die Östrogenrezeptoren in ihren Bindungsdomänen unterscheiden, binden entsprechend unterschiedliche Liganden und beeinflussen das Zielgewebe auf unterschiedliche Weise.

Im Uterus dominiert der ERα. Dieser wird über Estradiol (E2) aktiviert und aktiviert wiederum die Endometriumproliferation. Der ERβ hingegen wird vermehrt in Prostata, Hoden, Ovarien, Speicheldrüsen, peripheres Nervensystem, Blutgefäßen und im Immunsystem exprimiert. Es kann unterschieden werden in unterschiedliche Subtypen von ERβ-Rezeptoren. Sie werden von Estradiol aktiviert, vermitteln jedoch verschiedene Zellantworten.

In der weiblichen Brust werden beide Östrogenrezeptoren gleichermaßen coexprimiert. Die duktale Zellproliferation ist ERα-gesteuert, wohingegen ERβ antiproliferativ und prodifferenzierend auf das Brustdrüsengewebe wirkt (siehe Abbildung 1). ERβ ist dominant im normalen Brustdrüsengewebe und fibrozystisch verändertem Gewebe. Duktale Mammakarzinome G1 (siehe Tabelle 3) zeichnen sich durch einen Verlust von ERβ und einer Zunahme von ERα aus. Ab einem Grading von 3 werden beide Östrogenrezeptoren nur noch selten exprimiert (Koehler et al. 2005). ERβ ist mit einer besseren 5-Jahres-Überlebenszeit bei TNBC assoziiert und gilt als wichtiger Prognosemarker für Patienten mit TNBC (Hinsche et al. 2015).

Tamoxifen als ERα-Antagonist ist daher nur wirksam bei Mammakarzinomen, die ERα exprimieren. Im weiblichen Uterus hingegen wirkt Tamoxifen als ERα-Agonist, aktiviert die Endometriumproliferation und stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms dar. Im Gegensatz dazu wirkt Raloxifen aufgrund seiner chemischen Struktur in beiden Zielgeweben als Antagonist (Koehler et al. 2005).

Die antiproliferative und prodifferenzierende Wirkung von ERβ in der weiblichen Brust lässt neue Angriffspunkte in der Therapie des malignen Mammakarzinoms erkennen.

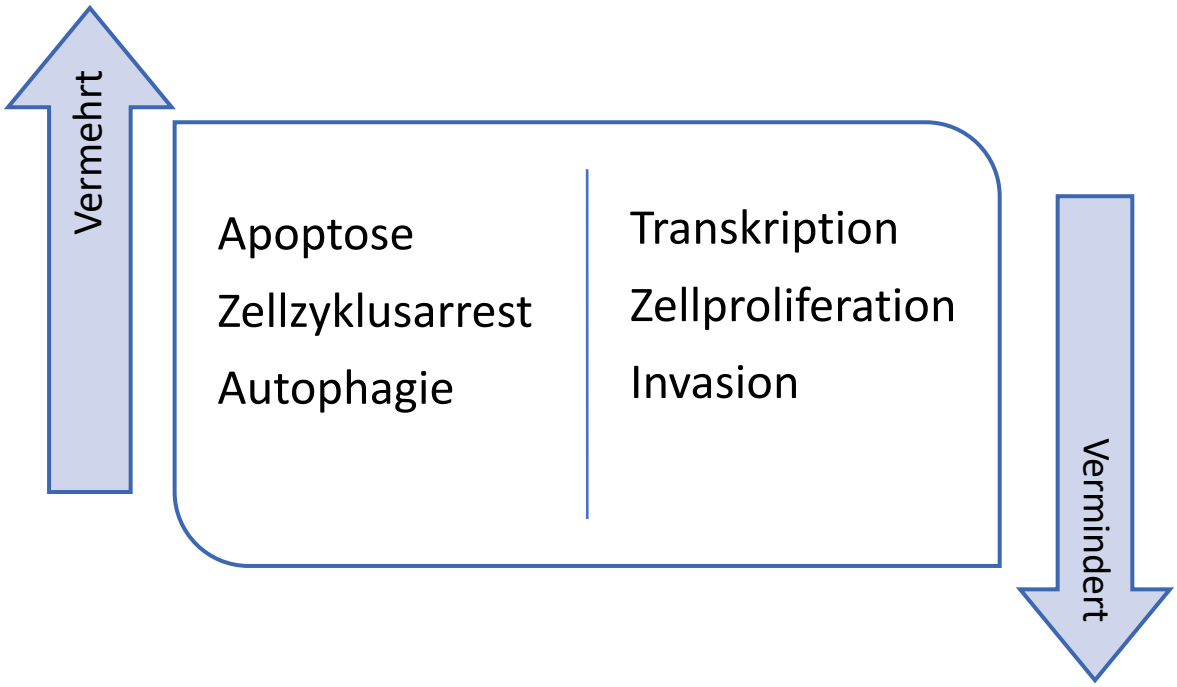


Abbildung 1: Wirkungsweise von ERβ in TNBC

1.7.1 Spezifische Östrogenrezeptor β (ERβ)-Agonisten

ERβ wird in malignen Mammakarzinom-Zellen eine antiproliferative und antiinvasive Wirkung zugesprochen. Dementsprechend wird eine signifikant bessere Überlebensrate von Patienten mit ERβ-positiven TNBC im Vergleich zu ERβ-negativen TNBC erzielt. Nicht nur als Prognosemarker dient ERβ, es stellt auch einen möglichen Angriffspunkt in der Therapie des TNBC dar. Vorangegangene Studien konnten signifikante Ergebnisse mit dem Einsatz von spezifischen ERβ-Agonisten bei TNBC-Zelllinien erzielen. Zum Einsatz kamen Liquiritigenin und ERB-041. Nach Behandlung der Zelllinien mit den spezifischen ERβ-Agonisten konnte ein signifikanter Rückgang der Invasion beobachtet werden (Hinsche et al. 2015). Weitere Studien konnten einen Rückgang der Tumorzellproliferation nach Behandlung herausstellen (Liu et al. 2012).

Liquiritigenin ist eine pflanzliche Verbindung, die aus einer chinsesischen Süßholzpflanze, der Glycyrrhiza uralensis, gewonnen wird. Es hat antientzündliche, antimikrobielle, antioxidative, immunmodulatorische, antiproliferative und antiinvasive Eigenschaften. In Brustkrebstumoren verhindert es Angiogenese und Proliferation über den *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR)-Signalweg, indem es VEGF direkt über *hypoxia inducable factor-1alpha* (HIF1 alpha) inhibiert. Durch weitere inhibierende Effekte in Estradiol vermittelten Signalwegen wird Liquiritigenin als vielversprechendes Therapeutikum des TNBC angesehen (Peng et al. 2015).

ERB-041 ist eine synthetisch hergestellte, nicht steroidale Verbindung, die hoch spezifisch an den ERβ-Rezeptor bindet. Im Gegensatz zu ERα bindet es ERβ 200-mal selektiver. Im Vergleich zu Liquiritigenin wird ERB-041 zwar ebenfalls eine antiinvasive und antiinflammatorische Wirkung zugesprochen, es konnte aber keine antiproliferative Eigenschaft festgestellt werden (Schüler-Toprak et al. 2016).

1.7.2 G protein-coupled estrogen receptor (GPER, GPR30)

G protein-coupled estrogen receptor (GPER) ist ein Transmembranrezeptor, der von Estradiol stimuliert wird und G-Protein-gekoppelt eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert. Er vermittelt Zellantworten, die nicht in die Genexpression der Zelle eingreifen. Die GPER-vermittelten Zellantworten sind wesentlich schneller, innerhalb von Sekunden bis Minuten, da intrazelluläre Signalkaskaden um ein Vielfaches schneller ablaufen können. Durch Aktivierung des membranständigen Östrogenrezeptors laufen gleichzeitig viele Signalkaskaden innerhalb der Zelle ab, welche miteinander kommunizieren und sich zusätzlich aktivieren (Koehler et al. 2005) (siehe Abbildung 2).

Es wird die Adenylatcylase aktiviert, welche mithilfe von Adenosintriphosphat (ATP) den *second messenger* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. Hohe intrazelluläre cAMP-Konzentrationen sind für die Genom-unabhängige Zellantwort verantwortlich, können aber mittels Aktivierung von Proteinkinase A ebenfalls die Genexpression beeinflussen. Ebenfalls rekrutiert GPER über Phospholipase C hohe Mengen an intrazellulärem Calcium. Calcium übernimmt multiple Funktionen innerhalb der Zelle, aktiviert Enzyme, Hormonsekretion und Muskelkontraktion. Es aktiviert wiederum die mitogen-activated protein Kinase (MAP-Kinase)-ERK, welche Zelltranskription induziert. Diese wird zusätzlich über *epidermal growth factor* (EGF) aktiviert. EGF wird G-Protein-gekoppelt über die Tyrosinkinase Src durch Matrix Metalloproteasen (MMP) aktiviert. Neben einer Aktivierung von ERK wird auch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3) aktiviert. Nach Phosphorylierung von Akt-Kinase wird der Transkriptionsfaktor FOXO3 a rekrutiert. Es handelt sich um ein Tumorsupressor-Gen, welches die Zelle vor Entartung schützen soll. Nach Phosphorylierung wird FOXO3 a inhibiert. GPER-Agonisten können somit Zellentartung hervorrufen.

Studien konnten zeigen, dass TNBC-Patienten mit hoher Expression von GPER eine verminderte Überlebenszeit haben als TNBC-Patienten mit geringer Expression von GPER. Nach *knockdown* von GPER in TNBC-Zelllinien wurde das Estradiol-abhängige Zellwachstum, die Src-Kinase und EGFR wesentlich inhibiert. GPER-Antagonisten gelten als eine mögliche Therapieoption des TNBC. Als möglicher GPER-Antagonist im TNBC agiert Estriol (E3), welcher GPER vollständig inhibiert (Girgert et al. 2012; Rice et al. 2020).

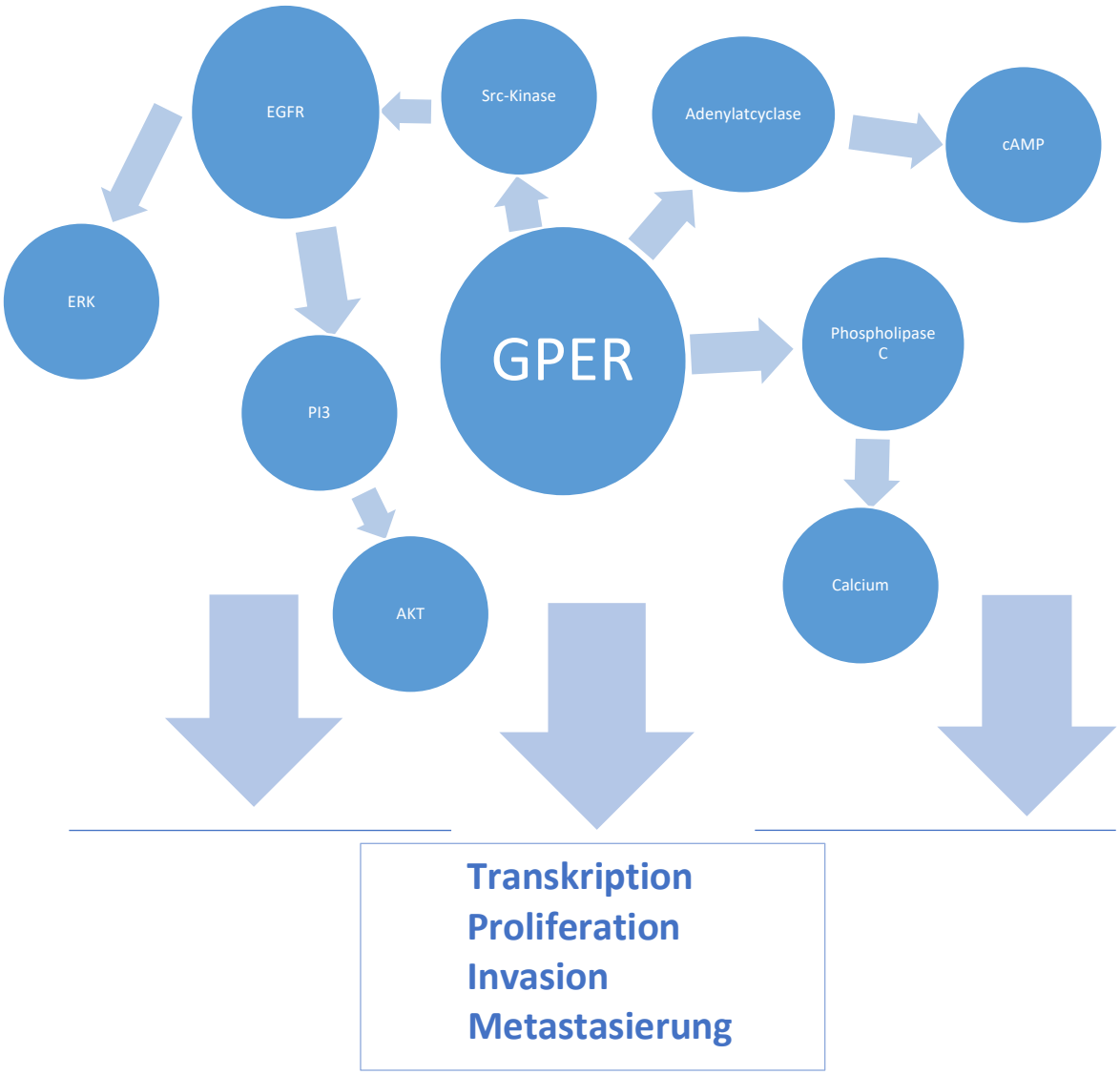


Abbildung 2: Übersicht Signalwege GPER

Tamoxifen wirkt als ERα-Antagonist im Brustdrüsengewebe, bindet aber mit hoher Affinität an den GPER-Rezeptor. Die intrazellulären Signalkaskaden in Brustkrebszellen werden aktiviert, eine vermehrte Proliferation und Invasion werden begünstigt. Tamoxifen wirkt als GPER-Agonist und spielt daher eine wichtige Rolle bei Ausbildung von Tamoxifen Resistenzen in Brustkrebstumoren (Koehler et al. 2005) (siehe Abbildung 3). Studien konnten zeigen, dass die Mehrheit von Tamoxifen resistenten Mammakarzinomen GPER exprimieren (Girgert et al. 2012).

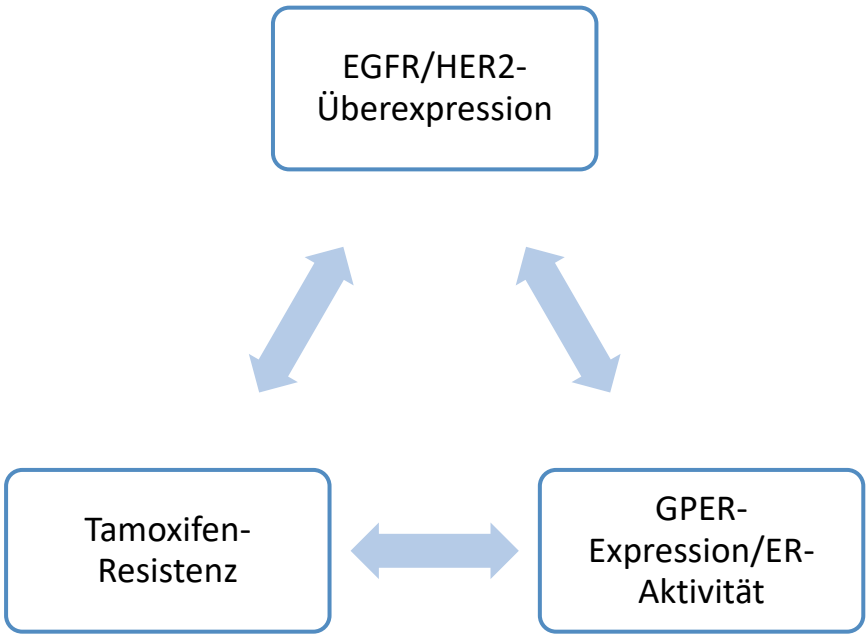


Abbildung 3: Tamoxifen als GPER-Agonist

1.8 Fragestellung

Studien konnten bereits herausstellen, dass spezifische ERβ-Agonisten eine antiinvasive Wirkung auf TNBC-Zellen haben. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der knockdown von GPER als Membranrezeptor mit einer besseren Prognose des TNBC vergesellschaftet ist. Die Wirkung des Membranrezeptors auf die Zelle wird derzeit immer weiter nachvollzogen. Jedoch bleiben noch Signalwege unverstanden.

Es galt zunächst zu untersuchen, inwieweit sich der knockdown von GPER auf die Invasivität von TNBC-Zellen, MDA-MB 231 und HCC 1806, und auf die Expression ihrer Hormonrezeptoren ER auswirkt. Es stellte sich weiterhin die Frage, über welche Rezeptoren spezifische ERβ-Agonisten in TNBC-Zelllinien wirken und welchen Einfluss der knockdown von GPER auf die antiinvasive Wirksamkeit von ERβ-Agonisten nimmt. Neben dem Invasionsverhalten von MDA-MB 231- und HCC 1806-Zellen nach knockdown von GPER- und ERβ-Agonisten-Behandlung wurde auch die jeweilige Hormonexpression untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
-80 °C Gefrierschrank -30 °C Gefrierschrank -4 °C Kühlschrank	GFL, Burgwedel, Deutschland Liebherr, Biberach, Deutschland
Analysenwaage BP 161 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
arium® mini	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav KSG 112	KSG-Sterilisatoren GmbH, Olching, Deutschland
BioPhotometer (8,5 mm Lichtstrahlhöhe)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bunsenbrenner Flammy S	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland
C-Digit Western Blot Scanner	Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA
Eismaschine (S. No. 083308)	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
ErgoOne FAST Pipette Controller	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX51 + Olympus U-RFL-T (Brenner)	Olympus, Shinjuku, Präfektur Tokio, Japan
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 140	Air Liquide, Paris, Frankreich
Immersionsmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Laborschüttler IKA MTS4	IKA, Staufen, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Magnetrührer	IKA, Staufen, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Minizentrifuge MCF-2360	LMS, Hongo, Tokyo, Japan

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Mr. Frosty Kryo-Einfriergerät	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
CO_2-Inkubator SANYO (Modell MCO-18AC)	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
Pipetten „Pipetman“ ▪ 1000 µl ▪ 200 µl ▪ 100 µl ▪ 20 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage AZ1502	Sartorius, Göttingen, Deutschland
qTower 2.2	Analytikjena, Jena, Deutschland
Reax top Schüttel- und Mischgerät	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Rollenmischer	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim v. d. Röhn, Deutschland
Schüttelplatte GFL 3011	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Sterilwerkbank	Clean Air Techniek B.V., Woerden, NL
Synergy HT Microplate Reader	BIO-TEK, Winooski, Vermont, USA
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Vakuumpumpe EcoVac	Schuett biotec, Göttingen, Deutschland
Vibrax Schüttelplatte	Serono, Genf, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien (Einmalartikel) wurden von den Firmen Bemis (Neenah, Wisconsin, USA), Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich), Kimberly-Clark Professional (Roswell, Georgia, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Merck Millipore Ltd. (Burlington, Massachusetts, USA), Paul Hartmann AG (Heidenheim an der Brenz, Deutschland)

Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland), STARLAB GmbH (Hamburg, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien und biologische Materialien

Chemikalien	Firma, Sitz
Ampuwa	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat; 10 %;)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO, D4540)	Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
vergälltes Ethanol (99 %)	Th. Geyer Ingredients GmbH & Co. KG, Höxter, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminol-Enhancer Solution	Westar Supernova, Bioscience, Cyanagen, Italien
2-Mercaptoethanol (M3148)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Methanol (Art.: 1481.2500)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Peroxide-Solution	Westar Supernova, Bioscience, Cyanagen, Italien
Prosieve 50 Gel Solution Acrylamid (50 %)	Lonza, Basel, Schweiz
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate; 10 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Tris-Base	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien, USA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Trypanblau (T8154)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Tween-20	PanReac AppliChem GmbH (ITW Reagents Division), Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Biologische Materialien, Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Biologische Materialien, Lösungen und Puffer

Biologische Materialien, Lösungen und Puffer	Firma, Sitz oder Zusammensetzung
Anodenpuffer pH 10,4	1,82 g Tris Pufferan, 100 ml Methanol, 20 % 500 ml Aqua bidest
Blocking Solution	TBS, 0,1 % Tween-20, 5 % Milchpulver
Bradford Lösung	4 ml Ampuwa 1 ml BioRad-Lösung
BSA (bovines Rinderserumalbumin)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Charcoal-stripped fetale calf serum	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS w/o Calcium, w/o Magnesium (P04-36500)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Elektrophoresepuffer	100 ml Elpho-Puffer (5 x), 5 ml SDS (10 %), ad 500 ml ddH_2O
Elpho-Puffer (5 x)	15,1 g Tris, 72 g Glycin, ad 1000 ml ddH_2O
Ethidiumbromid-Bad	0,007 Ethidiumbromid
FBS superior (S0615) (fetale bovine serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Gibco® Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep; 15140-122)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Glycin	Alfa Aesar, Haysham, UK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Hämalaunlösung (1.094290500)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Holo-Transferrin (t0665), gelöst in PBS (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Insuman® Rapid: Insulin human (40 I.E./ml)	Sanofi, Paris, Frankreich
Kathodenpuffer pH 9,4	1,51 g Tris Pufferan 100 ml Methanol 20 % 500 ml Aqua bidest.

Biologische Materialien, Lösungen und Puffer	Firma, Sitz oder Zusammensetzung
Konz. Anodenpuffer pH 10,4	18,2 g Tris Pufferan 100 ml Methanol 20 % 500 ml Aqua bidest.
L-Alanyl-L-Glutamin (K0302)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Laemmli-Probenpuffer (2 x)	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 4 % SDS 5 % Glycerol 0,05 % β-Mercaptoethanol 0,025 % Bromphenolblau
Lösung A: Prosieve 50 Gel Solution 50 % Acrylamid	Lonza, Basel, Schweiz
Lösung B	Tris Pufferan + 400 ml bidest H_2O, pH 8, 8
Lösung C	10 % SDS
Lösung D	Tris Pufferan + 400 ml bidest H_2O, pH 6, 8
Lysepuffer	Celllyse M, 0, 01 % Protease-Inhibitor und 0, 01 % Phosphatase-Inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland))
Milchpulver (Nonfat dried milk powder)	PanReac AppliChem GmbH (ITW Reagents Division), Darmstadt, Deutschland
Stripping Puffer	Interchim, Montluçon, Frankreich
TBS (10 x)	30 g Tris-Base, 80 g NaCl, 2 g KCl ad1000 ml (pH 7, 6)
TBST	100 ml 10 x TBS, 10 ml Tween-20 (10 %), ad 500 ml ddH_2O
Transferpuffer	3, 03 g Tris, 14, 41 g Glycin, 20 % Methanol ad 1000 ml H_2O (pH 8, 3)
Trypsin /EDTA (Z-12-M)	c-c-pro GmbH, Oberdorla, Deutschland

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 8: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Histologie	Zelltyp
MDA-MB 231	Pleuraerguss	Adenokarzinom	Epithelial
HCC 1806	Primärtumor	Plattenepithelkarzinom	Epithelial
MG 63	Primärtumor	Osteosarkom	Fibroblasten

2.1.5 EDV

Tabelle 9: Verwendete EDV

Software	Hersteller
BioDoc Analyze 2.1	Software Biometra, Göttingen, Deutschland
GEN 5	BioTek, Vermont, USA
GraphPad Prison (5.0)	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Kodak Digital Science 1D	Eastman Kodak Company, Stuttgart, Deutschland
Image J Version 1.52 a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Image Studio Digits	LI-COR, C-Digit-Blot-Scanner, Lincoln, USA
ZEN Configuration Tool	ZEISS, Jena, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Antikörper und deren Herkunft

Antikörper	Herkunft	Erwartete Bande (kDA)
GPR30	Kanninchen, LsBio	45
ERβ	Kaninchen, monoklonal Abcam	59
ERα	Kaninchen, polyklonal Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	66
GAPDH	Rabbit, CST	37
Sekundärantikörper: Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt	Esel GE Healthcare, Freiburg, Deutschland	

2.1.7 ERβ-Agonisten

Die verwendeten ERβ-Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) hergestellt. Liquiritigenin ist eine phenolische Verbindung und wird aus der Süßholzwurzel gewonnen. ERB-041 ist eine nicht steroidale chemische Verbindung und wird synthetisch hergestellt. Geliefert wurden sie als Lyophilisat, aus dem eine Stammlösung mit sterilem H_2O in einer Konzentration von 5 x 10^{-5}M hergestellt wurde. Zuvor wurde das Lyophilisat in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

2.1.8 Zellen passagieren

Die verwendeten Zelllinien HCC-1806, MDA-MB-231 und MG-63 wurden bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 kultiviert. Die Bodenfläche der verwendeten Zellkulturflaschen betrug 75 cm^2 bzw. 25 cm^2. Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden mit Handschuhen unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um Kontaminationen zu vermeiden. Alle Materialien wurden zuvor desinfiziert oder autoklaviert.

Sofern eine Konfluenz der Zellen von 70 - 80 % erreicht wurde, konnten die Zellen passagiert werden. Im Mittel wurden alle drei bis vier Tage die Zellen passagiert oder bei nicht ausreichender Konfluenz lediglich das Medium gewechselt. Als Kulturmedium für die TNBC-Ziellinie

HCC-1806 und MDA-MB -231 wurde rotes MEM-Medium mit Phenolrot der Firma Biowest mit 10 % *fetal calf serum* (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin-Mix, 0,1 % Transferrin und 1 % Insulin verwendet. Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen MG-63 wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit Phenolrot mit 1 % Glutamin der Firma Gibco ebenfalls mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Mix, 0,1 % Transferrin und 1 % Insulin kultiviert. Bevor die Zellen passagiert wurden, mussten Medium und Trypsin kurz vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt werden. Zunächst wurde das alte Medium mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen. Als Nächstes wurden 3 ml Trypsin und Ethylendiamintetraacetat (EDTA) zugegeben und anschließend inkubierten die Zellen bei 37 °C, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst hatten. Anschließend wurden 7 ml Medium hinzugegeben und das Trypsin abgestoppt. Je nach Verdünnungsmenge wurde eine definierte Menge Zellsuspension abgenommen und neues Medium hinzugegeben.

Bei unzureichender Konfluenz wurde nur das Kulturmedium gewechselt. Hierfür wurde zuerst das Medium auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurde das alte Medium von dem Zellrasen mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und daraufhin 10 ml neues Medium zu den Zellen gegeben.

Tabelle 11: Zusammensetzung Kultumedium

Inhalt	Menge
MEM (+ Phenolrot)	500 ml
FCS (10 %)	50 ml
P/S (1 %)	5 ml
Transferrin	500 µg/ml
Insulin	50 IU

2.1.9 Tumorzellen einfrieren

Bevor die Tumorzellen behandelt wurden und eingefroren werden konnten, musste ein Einfriermedium erstellt werden. Bei einem Gesamtvolumen von 20 ml wurden 15 ml *minimal essential medium* (MEM) mit Phenolrot, 4 ml FCS (20 %) und 1 ml DSMO (0,5 %) angesetzt. Ebenfalls wurden die verwendeten Aliquots beschriftet. Pro 75 cm^2 Zellkulturflasche konnten bis zu sechs Aliquots verwendet werden. Zunächst wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % mit jeweils 5 ml *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen und mit jeweils 3 ml Trypsin behandelt und anschließend bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden gelöst

haben. Das Trypsin wurde mit jeweils 7 ml MEM-Medium mit Phenolrot abgestoppt und daraufhin wurden alle Zellen abgenommen und in ein 20 ml Cup überführt. Die Cups wurden 5 min bei 1300 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das entstandene Zellpellet wurde mit jeweils 7 ml Einfriermedium gelöst. Die 7 ml Zellsuspension wurden anschließend auf sechs Aliquots gleichmäßig verteilt. Nun wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tabelle 12: Zusammensetzung Medium für Kryokonservierung

Inhalt	Menge
MEM	500 ml
FCS	20 %
DMSO	10 %

2.1.10 Tumorzellen auftauen

Die Tumorzellen sollten möglichst schnell nach Herausnehmen im Wasserbad bei 37 °C auftauen. Währenddessen wurden 10 ml des entsprechenden Kulturmediums in den Zellkulturflaschen vorgelegt. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen mithilfe einer Pasteurpipette in die mit Medium benetzten Kulturflaschen überführt. Danach wurden die Zellflaschen vorsichtig geschwenkt, sodass sich Zellen und Medium gut verteilen konnten. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um das restliche DSMO vollständig von den Zellen zu entfernen.

2.1.11 Bestimmung der Zellzahl

Für die Durchführung der Versuche wurden die Zellen in kleineren 25 cm^2 Zellkulturflaschen ausgesät. Hierfür wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 cm^2 Fläche, Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland) die Zellzahl der bestimmten Zellsuspension unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Zuvor wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypan Blau im Verhältnis 1:1 zur Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen gefärbt. So wurden anschließend die Zellen in allen vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Zellzahl pro ml errechnet. Anschließend wurde das Gesamtvolumen der Zellsuspension mit der Zellzahl pro ml multipliziert.

2.1.12 siRNA GPR30-Transfektion

Der knockdown des membranständigen GPR30-Rezeptors sollte mithilfe der GPR30 *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) (sc-60743, Santa Cruz Biotechnology) und der nicht-spezifischen Kontroll-siRNA (sc-37007, Santa Cruz Biotechnology) erfolgen. Pro Zellpassage wurden jeweils fünf 25 cm^2 Zellkulturflaschen mit Zellen angesät. Es ermöglichte die Gewinnung von Protein und RNA zu jeweils vier verschieden Zeitpunkten (24 h, 48 h, 96 h und 7 Tagen).

Hierfür wurden die Zellen zunächst an Tag eins der Versuchsreihe in Antibiotika-freiem Medium angesät. 24 Stunden später erfolgte der Mediumwechsel auf jeweils 2 ml MEM mit FCS (10 %) ohne Antibiotikum. Für die Transfektion wurden jeweils 4 µl siRNA und 4 µl Transfektionsreagenz mit jeweils 100 µl Transfektionsmedium gemischt und bei Raumtemperatur für 45 min im Dunklen inkubiert. Zur Vorbereitung der Zellen wurden 10 min vor der Transfektion das Medium abgesaugt und jeweils 1 ml Transfektionsmedium hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe des Transfektionsgemisches. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen wurde jeweils 1 ml MEM (20 % FCS) mit Antibiotikum hinzugegeben. Weitere 18 Stunden Inkubation folgten. An Tag 3 wurde das Medium gewechselt auf jeweils 2 ml Normalmedium. Ebenfalls wurde die erste RNA zum Zeitpunkt von 24 h gewonnen (siehe RNA-Isolation). Es folgten weitere RNA-Isolationen zu den benannten Zeitpunkten. Protein wurde nach 48 h und 120 h isoliert.

Die spätere Behandlung der transfizierten TNBC-Zellen mit den spezifischen ERβ-Agonisten ERB-041 und Liquiritigenin erfolgte zu den Zeitpunkten 48 h und 96 h. Für Liquiritigenin wurden Konzentrationen von 10^{-7} M verwendet, für ERB-041 10^{-11} M.

2.1.13 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das QIAGEN RNeasy Mini Kit verwendet. Das Prinzip der RNA-Isolation beruht auf der selektiven Bindung von mRNA an das Silika-Gel. DNA und andere Zellbestandteile wurden in folgenden Schritten entfernt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit Lysepuffer (10 µl beta-Mercaptoethanol und 1 ml RLT Puffer) benetzt. Weiterhin wurden sieben Reihen Abfallröhrchen benötigt. Die lysierten Zellen wurden abgenommen und in die Röhrchen überführt. Anschließend wurde im Verhältnis 1:1 70 % Ethanol hinzugegeben und die Proben wurden für 1 min für 13.000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde mit dem Röhrchen verworfen. Als Nächstes wurden 700 µl RW1-Puffer zum Waschen der Proben auf die Säule gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Röhrchen jeweils verworfen. Es folgten zwei Schritte mit Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer (Ethanolhaltig) zur Fixierung der RNA. Nach erfolgtem 2-minütigen

Zentrifugieren wurde die gewonnene RNA erneut trocken zentrifugiert, um die Überreste zu entfernen. Für den abschließenden Schritt der Elution der RNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Tube überführt und 30 µl RNAse-freies Wasser direkt auf die Säule gegeben. Es folgte die erneute Zentrifugation und Sicherstellung der RNA.

2.1.14 RNA-Konzentration messen

Die RNA wurde auf Eis gekühlt gelagert und eine 1:10 Verdünnung im Tube hergestellt (7 µl RNA und 63 µl RNAse freies Wasser). Anschließend wurde die RNA-Konzentration mithilfe des UV-Photometers gemessen. Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm. Die Reinheit der Probe wurde mit dem Quotienten A260/A280 (1,8–2,0) angegeben, die Verunreinigungen durch den Quotienten A260/A230. Proteine und andere verunreinigende Substanzen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm.

2.1.15 Reverse Transkription

Bevor die Reverse Transkription erfolgen kann, wird aus der einzelsträngigen RNA eine doppelsträngige DNA gebildet. Mithilfe der DNA-Polymerase Reverse Transkriptase wird die mRNA in einen komplementären DNA-Strang umgeschrieben. Die reverse Transkription wurde mit dem „Superscript II“ Präampplifikationssystem der Firma Invitrogen durchgeführt, welches in größeren Mengen *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) generiert, ohne vorzeitigen Abbau der RNA während der Transkription. Es wurden Oligo-dt-Primer verwendet. Durch Bindung des Oligo(dt)-Primers an den Poly(A)-Schwanz der RNA wird die Transkription gestartet. Im Folgenden verbindet die RNA-abhängige DNA-Polymerase die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) miteinander zu einem komplementären Strang. Zunächst wurde ein Reaktionsansatz von 1 µl RNA, 1 2µl Ampuwa, 1 µl DNAse und 1 µl Rnasin I erstellt und bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden 26 µl des Puffermix hinzugegeben, die Proben auf 37 °C erwärmt und folgend bei 95 °C denaturiert.

Puffermix: 8 µl dt 15 Primer
4 µl dNTPs 10 mM
8 µl 5 x RT-Puffer
4 µl 0,1 M DTT
2 µl Superscript II (Invitrogen)

2.1.16 RT-PCR

Die *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dient der Vervielfältigung spezifischer Genabschnitte innerhalb des DNA-Stranges. Sie erfolgt im Thermocycler und läuft in typischerweise drei Teilreaktionen ab. Für die Durchführung werden zwei Primer, Nukleosidtriphosphate und die hitzestabile Taq-Polymerase benötigt. Die Taq-Polymerase wird aus dem Bakterium Thermus aquaticus isoliert.

Zunächst erfolgte die Denaturierung der DNA bei 94 °C zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Einzelsträngen.

Bei der jeweiligen Annealing-Temperatur binden die beiden spezifischen Primer an das 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 54 und 65 °C.

Während der Elongation erfolgt die Synthese des komplementären DNA-Stranges mithilfe der DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphaten in 5'-3'-Richtung. Hierfür werden die Proben auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase auf 72 °C erwärmt.

Die Ansätze werden anschließend auf 4 °C heruntergekühlt und die Zyklen wiederholen sich zur Herstellung exponentieller Mengen bestimmter DNA-Abschnitte.

Der Kontrolle der PCR diente das *housekeeping gene* L7. Hierbei handelt es sich um ein ribosomales, in allen Geweben exprimiertes Protein.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für PCR

Substanzen	Konzentration in µl/Probe	Ausgangskonzentration
Ampuwa	Auf 15 auffüllen	
Primer sense	0,3	20 µM
Primer antisense	0,3	20 µM
PCR Puffer	1,5	10 x
NTP Mix	1,2	1 mM
cDNA	0,250 µg	10–100 ng/µl
Taq-Polymerase	0,075	5 U/µl

Tabelle 14: PCR-Programme/Thermocycler

Gen	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
L7	30 sec 94 °C	60 sec 54 °C	120 sec 72 °C	22
GPR30	3 min 95 °C	15 sec 65 °C	2 min 72 °C	29–30

2.1.17 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gelelektrophorese erfolgte anhand der Größe der Nukleinsäuren die Auftrennung der PCR-Produkte. Das Anlegen einer Gleichspannung ermöglicht das Wandern der negativ geladenen Nukleinsäuren zur positiv geladenen Anode. Hierbei wandern kleinere Moleküle schneller durch das Agarose-Gel. Es wurden 1,5 % Agarose-Gele verwendet und in eine Gelkammer mit eingestecktem Kamm gegossen. Sofern das Gel ausgehärtet war, wurde Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) hinzugegeben und der Kamm herausgezogen. 10 µl der jeweiligen Probe wurden mit 2 µl Loadingbuffer versetzt und 10 µl in die Geltaschen pipettiert. Als Marker diente ein DNA-Fragmentlängen-Standard (100 bp Ladder, Invitrogen). Bei einer Spannung von 90 V und einer Laufzeit von ca. 45 min ließ sich die DNA auftrennen.

2.1.18 Auswertung der RT-PCR

Für die anschließende Auswertung wurden die Gele 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und danach in ddH_2O gewaschen. Die Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren mit den Nukleinsäuren der DNA, wodurch die Fluoreszenz sich im UV-Licht stark erhöht. Die Detektion erfolgte im UV-Transilluminator und die Auswertung mittels Bio Doc Analyze 2.1 Software (Biometra).

2.1.19 Invasionsassay

Der Invasionsassay gliedert sich in zwei Teilversuche, den siRNA-knockdown und die Invasionsanalyse, die miteinander verbunden werden. Während der Invasionsanalyse werden die TNBC-Zellen mit Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG63) kokultiviert, mit dem Ziel, die aktive Metastasierung von Brustkrebszellen ins Knochengewebe nachzustellen. Zur Nachstellung der humanen Basalmembran mit Extrazellulärmatrix wurde das Matrigel Matrix (BD Matrigel™-Basement Membran) der Firma Biosciences verwendet. Es wurde aus Sarkomen der Maus isoliert und besteht aus 60 % Laminin, 30 % Kollagen, 8 % Etactin, Proteoglykanen und wichtigen Wachstumsfaktoren. Die TNBC-Zellen immigrieren durch die künstliche Basalmembran in eine Boyden-Kammer. Diese wurde gebildet aus einem Insert mit einer porösen Membran an der

Unterseite und einem Well in einer 24-Well-Platte. Die Membran des Inserts besteht aus Polykarbonat mit einem Porendurchmesser von 8 µm und wurde mit dem Matrigel beschichtet.

Zunächst wurden die Zellen mit spezifischer siRNA (GPR30) transfiziert und somit der knockdown von GPR30 ermöglicht (siehe siRNA-Transfektion).

An Tag 3 der Versuchsreihe wurden die Zellen in den 25 cm^2 Zellkulturflaschen trypsiniert und anschließend für die Ivasionsanalyse in die Inserts ausgesät (10.000 Tumorzellen pro Well und 25.000 MG-63 Zellen pro Well). Die Inserts wurden zuvor mit 30 µl Matrigel bei 4 °C beschichtet und für eine Stunde zum Trocknen inkubiert. Die Tumorzellen wurden währenddessen in 400 µl Ko-Kulturmedium (DMEM ohne Phenolrot mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin-Mix (P/S) und 1 % L-Glutamin) pro Insert ausgesät. Die MG-63 Zellen wurden in sterilen 24-Well-Platten mit einem Volumen von 600 µl Ko-Kulturmedium pro Well ausgesät. Beide Zelllinien wurden monokultiviert und für 24 h zum Anwachsen inkubiert. Anschließend wurden die Inserts in die Wells der MG63-Zellen überführt und für fünf Tage kokultiviert.

Am 8. Tag wurde die Kokultivierung beendet und die Inserts mittels Mayer's Hämalaunlösung gefärbt. Hämatoxylin ist positiv geladen und bindet an die negativ geladene Phosphatgruppe der Nukleinsäure im Nukleus. Es werden nur die invadierten Zellen unterhalb der Insert-Membran bestimmt. Die Zellen wurden mit Methanol fixiert und in mehreren Schritten (siehe Tabelle 15) angefärbt. Die nicht invadierten Tumorzellen wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen von den Inserts gelöst. Abschließend wurde die Membran aus dem Insert auf einen Objektträger gestanzt und mit einem Deckglas versehen. Diese wurden durch ein Kreuz in vier gleichgroße Quadranten eingeteilt, welches das Zählen der Tumorzellen am Mikroskop erleichterte.

Tabelle 15: Immunzytologische Färbung mithilfe Mayer's Hämalaunlösung

	Zweck	Menge in µl	Zeit in min
PBS	Waschen	400	5
dH_2O	Spülen	400	
100 % Methanol	Fixieren	400	10–15
dH_2O	Spülen	400	
Hämalaun	Färben	800	5–10
dH_2O	Spülen	400	
Leitungswasser	Bläuen	400	
dH_2O	Spülen	400	

Tabelle 16: Zusammensetzung Ko-Kulturmedium

Inhalt	Menge
DMEM ohne Phenolrot	420 ml
FCS (10 %)	50 ml
P/S (1 %)	5 ml
Glutamin (1 %)	5 ml

Tabelle 17: Zusammensetzung Medium für MG-63

Inhalt	Menge
DMEM (+Phenolrot)	500 ml
FCS (10 %)	50 ml
P/S (1 %)	5 ml
Glutamin (1 %)	5 ml

2.1.20 Auswertung

Pro Insert wurden vier Quadranten auf dem Objektträger abgebildet. Die invasiven Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop OLYMPUS IX50 (Color View II, 10 x Objektiv) dargestellt und mittels ZEN Configuration Tool abfotografiert. Anschließend konnten die Zellen mithilfe des Programms „Image J“ (Version 1.52a) ausgezählt werden.

2.1.21 Proteinisolation

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen zuvor ebenfalls mit siRNA GPR30 transfiziert und inkubiert. Nach jeweils 48 h und 120 h wurde das Protein isoliert. Die Behandlung mit ERβ-Agonisten erfolgte nach 24 h und 96 h. Zum Zeitpunkt der Proteinisolation wurde das Medium abgesaugt und 2 ml PBS-EDTA (2 %) zum Lösen der Zellen hinzugegeben. Anschließend konnte der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst werden und es wurden 3 ml PBS zum Spülen der Zellen hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde abgenommen, in 15 ml Tubes überführt und für 5 min bei 1300 rcf zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 30 µl Lysepuffer gelöst und das Protein extrahiert. Der enthaltende Phosphatase-Inhibitor stoppte die laufende Reaktion ab. Die Proteinproben wurden daraufhin bei -20 °C eingelagert.

2.1.22 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe der Bradford-Methode und wurde mittels Multi-Detektions-Reader erfasst. Hierfür wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Der Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoff verändert seine Absorption bei Bindung an Aminosäurereste von 465 nm auf 595 nm. Zunächst wurde eine Stammlösung mit bovinem Serumalbumin in unterschiedlicher Konzentration angesetzt, die als Standard diente. Die Proteinproben tauten auf Eis auf und wurden anschließend für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde 5 µl des Überstandes der Proteinlösung mit 45 µl ddH_2O verdünnt (1:10). Der restliche Überstand wurde mit 25 µl Laemmli-Puffer versetzt. Je 10 µl der Standardlösungen, der Proteinverdünnung, PBS und ddH_2O wurden in Doppelbestimmung in eine unsterile 96-Well Platte gegeben. Pro Well wurden 200 µl der BioRad-Lösung (1:5 Verdünnung) hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Proteinkonzentration mit dem Multi-Detektions-Reader gemessen werden. Der Auswertung diente die GEN 5-Software von Bio Tek. Anhand der Absorption bei 595 nm in Abhängigkeit der gemessenen Proteinkonzentration (mg/ml) ließ sich der Einsatz der jeweiligen Proteinprobe (µl) pro 40 µg Protein errechnen.

2.1.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*-Gelelektrophorese (SDS-Page) dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse. SDS wird im Überschuss eingesetzt, entfaltet die Proteine und versetzt diese in eine negative Ladung. Nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1979) werden die Proteine zuerst in einem 5 %-Sammelgel (siehe Tabelle 18) konzentriert und daraufhin mit einem 7,5 %-Trenngel (siehe Tabelle 17) separiert. Verwendet wurde für die SDS-Page die Mini-PROTEAN III Electrophoresis Cell Apparatur von Bio Rad, die nach Angaben des Herstellers aufgebaut wurde. Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proteinproben wurden aufgetaut und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend kühlten sie auf Eis ab und das Gel wurde mit dem Proteinmarker (PEC-Gold) sowie den Proteinproben beladen. Die Spannungsapparatur wurde mit 500 ml Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Die Elektrophorese lief 30 min bei 80 V und für 60 min bei 100 V.

Tabelle 18: Zusammensetzung des 7,5 % Trenngels

Lösung A (30 % Acrylamid)	2,3 ml
Lösung B (pH 8,8)	2,8 ml
Lösung C (10 % SDS)	110 µl
H_2O	5,7 ml
TEMED	20 µl
10 % APS	37 µl

Tabelle 19: Zusammensetzung des 5 % Sammelgels

Lösung A (30 % Acrylamid)	0,75 ml
Lösung D (pH 6,8)	1,9 ml
Lösung C (10 % SDS)	75 µl
H_2O	5 ml
TEMED	22 µl
10 % APS	37 µl

2.1.24 Western Blot

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, welches die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran überträgt. Diese können anschließend anhand von spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Als Trägermembran diente eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, die zunächst für 30 sec in Methanol gelegt wurde, bevor sie mit Transferpuffer benetzt wurde. Methanol diente der Aktivierung der Membran zur Freilegung der Bindungsstellen. Für den Western Blot werden 3 Lagen Filterpapier, Trenngel, PVDF-Membran und weitere 3 Lagen Filterpapier zwischen zwei Schaumstoffschwämmen luftblasenfrei in Transferpuffer getränkt zusammengelegt. Die Proteinübertragung auf die Membran erfolgte bei 100 V für 60 min.

2.1.25 Detektion und Visualisierung

Anschließend wird die Membran kurz in *tris-buffered saline with Tween20* (TBST) gewaschen und mit Magermilchpulverlösung (5 %) abgesättigt, um die noch freien Bindungsstellen zu blockieren. Für die Antikörper-Lösung werden 25 ml 5 %-Magermilchpulver in TBST angesetzt und 5µl des Antikörpers hinzugegeben. Die Membran inkubiert in der Antikörper-Lösung bei 4 °C über Nacht. Nachdem die Membran dreimalig gespült und gewaschen wurde, inkubiert die Membran erneut für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:20.000). Nach erfolgter Inkubation der Membran wird diese vor der Visualisierung dreimal in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mithilfe des LI-COR c-Digit Reader, nachdem die Membran vollständig mit einer Detektionslösung (Westar Supernova Cyagen) benetzt wurde. Diese wurde in dem vorhergesehenen Lesefeld gleichmäßig verteilt, bevor die Membran hineingelegt wurde. Zunächst inkubiert die Membran für 2 min, gefolgt von einem 12-minütigen Leseprozess. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms „Image Studio Digits“.

2.1.26 Strippen der Membran

Um eine Wiederverwendung der PVDF-Membran mit einem neuen Primärantikörper zu ermöglichen, wird die Membran gestrippt und der bereits gebundene Antikörper von der Membran gelöst. Zunächst inkubierte die Membran für 2 min bei Raumtemperatur mit dem *stripping buffer*. Danach wurde die Membran mit ddH_2O gewaschen, in TBST geschwenkt und anschließend mit der Blockierungslösung (blocking Solution) behandelt. Dieses Verfahren konnte bei ausreichender Membranqualität zwei bis dreimal wiederholt werden. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem neuen Primärantikörper.

3 Ergebnisse

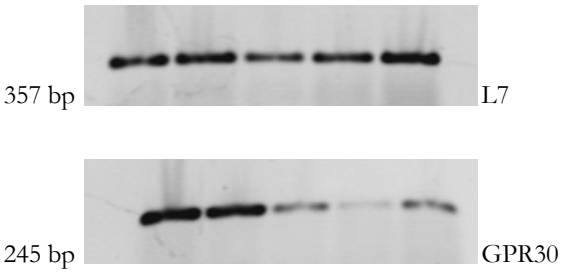
Das Membranprotein GPER konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich mit der siRNA GPR30 (siehe Methoden) ausgeschaltet werden. Ebenfalls wurden die spezifischen ERβ-Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 verwendet und zeigten eine antiinvasive Wirkung auf TNBC-Zellen. Allerdings ist derzeit noch nicht bekannt, über welche Signalkaskaden GPER wirkt und inwieweit spezifische ERβ-Agonisten ihre antiinvasive Wirkung entfalten, sobald GPER ausgeschaltet wurde.

3.1 GPR30-*knockdown* und Proteinexpression

3.1.1 Auswertung PCR nach GPR30-*knockdown*

Zunächst galt es, den *knockdown* von GPR30 auf m-RNA-Ebene nachzuweisen. Hierfür wurden die MDA-MB 231 und HCC 1806-Zellen mit siRNA GPR30 transfiziert und der *knockdown* anschließend zu vier verschiedenen Zeitpunkten (t_{24h}, t_{48h}, t_{96h} und t_{168h}) mittels RT-PCR sichtbar gemacht. Als Kontrolle diente Kontroll-siRNA und das *housekeeping gene* L7 (siehe Abbildung 4 und 5). Es erfolgten mindestens drei unabhängige Experimente mit mindestens drei verschiedenen Passagen. Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

A)



B)

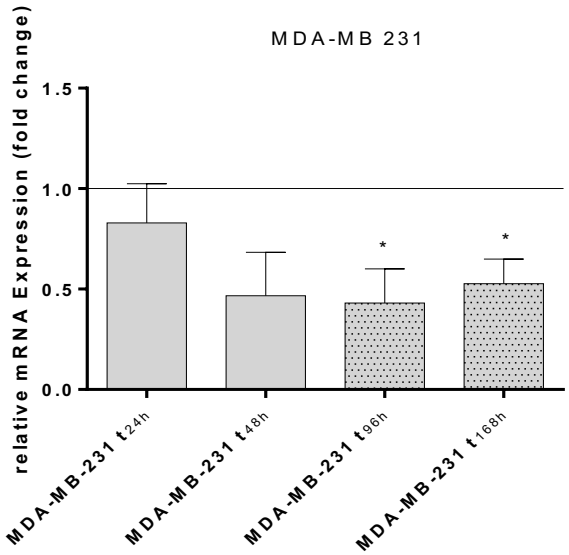
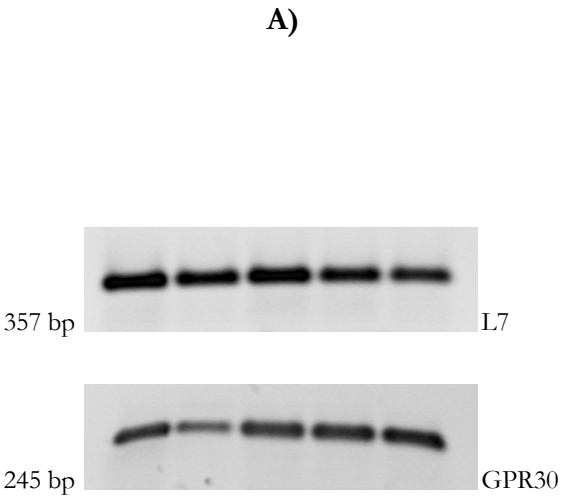


Abbildung 4 A): RT-PCR MDA-MB 231: Kontrolle t_0 vgl. GPR30-Expression t_{24h}, t_{48h}, t_{96h}, t_{168h} L7 vs. GPR30.

Abbildung 4 B) GPR30-Expression auf m-RNA-Ebene nach siRNA-*knockdown* bei der Zelllinie MDA-MB 231: Die m-RNA-Expression konnte mittels RT-PCR dargestellt werden. Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt. Zum Zeitpunkt t_{96h} $p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,4300 ± 0,1701 %, N = 3. Zum Zeitpunkt t_{168h} $p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,5267 ± 0,1233 %, N = 3.

Eine signifikante Reduktion der GPR30-Expression in den MDA-MB 231-Zellen nach siRNA-Transfektion konnte zu den Zeitpunkten t_{96h} ($p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,4300 ± 0,1701 %, N = 3) und t_{168h} ($p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,5267 ± 0,1233 %, N = 3) gezeigt werden.



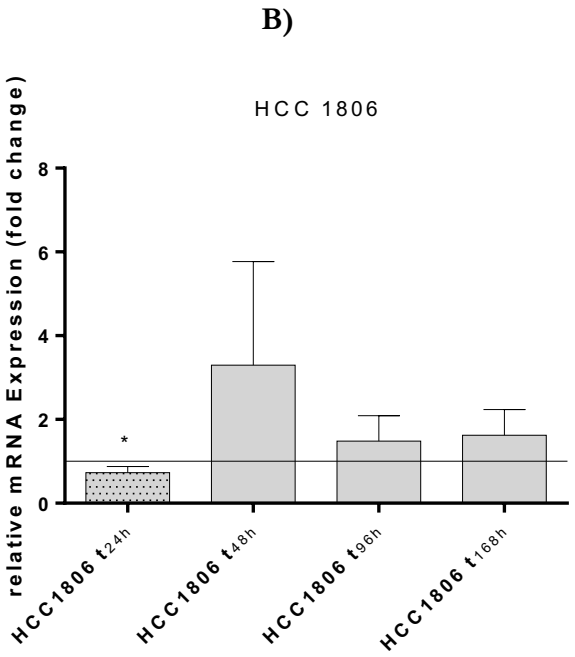


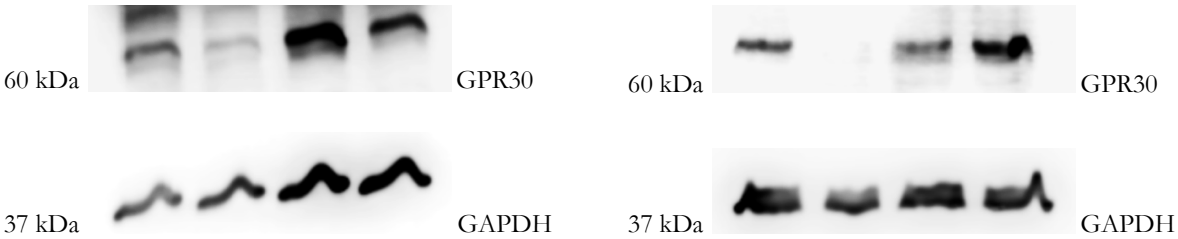
Abbildung 5 A): RT-PCR HCC 1806: Kontrolle t_0 vgl. GPR30-Expression t_{24h}, t_{48h}, t_{96h}, t_{168h} L7 vs. GPR30.

Abbildung 5 B): GPR30-Expression auf m-RNA-Ebene nach siRNA-*knockdown* bei der Zelllinie HCC 1806: Die m-RNA-Expression konnte mittels RT-PCR dargestellt werden. Die Signifikanz wurde mittels unpaired T-Test ermittelt. Zum Zeitpunkt t_{24h} $p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,7325 ± 0,1422 %, N = 4.

Eine signifikante Reduktion der GPR30-Expression in den HCC 1806-Zellen nach siRNA-Transfektion konnte zum Zeitpunkt t_{24h} ($p < 0{,}01$ vs. Kontrolle, 0,7325 ± 0,1422 %, N = 4) gezeigt werden.

3.1.2 Auswertung Western Blot nach GPR30-*knockdown*

Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung des *knockdowns* von GPR30 auf translationeller Ebene mittels Western Blot. Als Kontrolle diente GAPDH als Antikörper. Ein *knockdown* von GPR30 auf Proteinebene wurde bei beiden Zelllinien gezeigt (siehe Abbildung 6). Eine signifikante Reduktion der GPR30-Expression wurde bei den MDA-MB 231-Zellen nach 120 h erzielt ($p < 0{,}05$, 66,0 ± 12,06 %, N = 3) (siehe Abbildung 7). Dahingegen konnte bei den HCC 1809-Zellen ein hoch signifikanter Rückgang der GPR30-Expression bereits nach 48 h erreicht werden ($p < 0{,}0001$, 17,0 ± 4,583 %, N = 3) (siehe Abbildung 8).



a) MDA-MB 231 b) HCC 1806

Abbildung 6: Proteinexpression von GPR30 nach *knockdown* in den Zelllinien MDA-MB 231-und HCC 1806 im Vergleich zur Kontrolle. a) MDA-MB231 obere Auftragung GPR30: K_{48h}, $GPR30_{48h}$, K_{120h}, $GPR30_{120h}$ vgl. untere Auftragung GAPDH: K_{48h}, $GPR30_{48h}$, K_{120h}, $GPR30_{120h}$ b) HCC 1806 obere Auftragung GPR30: K_{48h}, $GPR30_{48h}$, K_{120h}, $GPR30_{120h}$ vgl. untere Auftragung GAPDH: K_{48h}, $GPR30_{48h}$, K_{120h}, $GPR30_{120h}$.

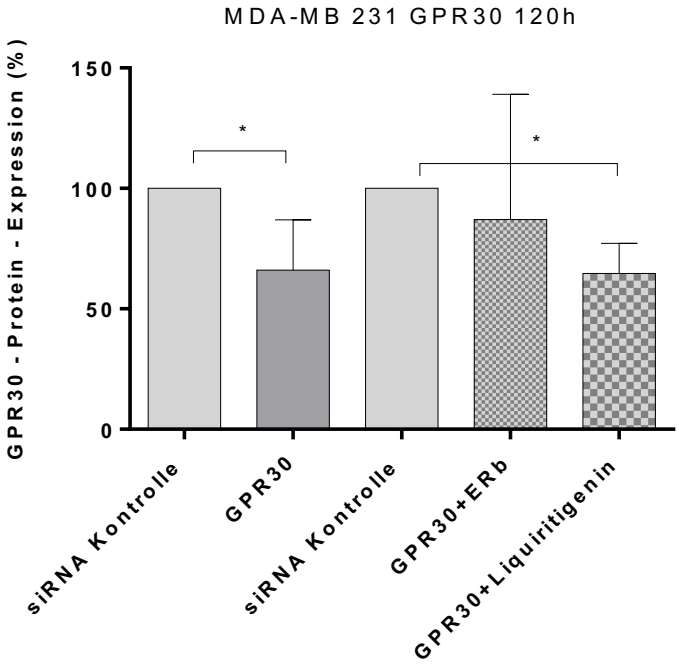


Abbildung 7: Signifikanter Rückgang der GPR30-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen nach 120 h im Western Blot. Die Signifikanz wurde mittels unpaired T-Test ermittelt. GPR30 $p < 0{,}05$ vs. Kontrolle, 66,0 ± 12,06 %, N = 3. In den MDA-MB 231-Zellen konnte weiterhin eine signifikante Reduktion der GPR30-Expression auf Proteinebene nach Behandlung mit Liquiritigenin nach 120 h ermittelt werden ($p < 0{,}05$, 64,67 ± 7,25 %, N = 3).

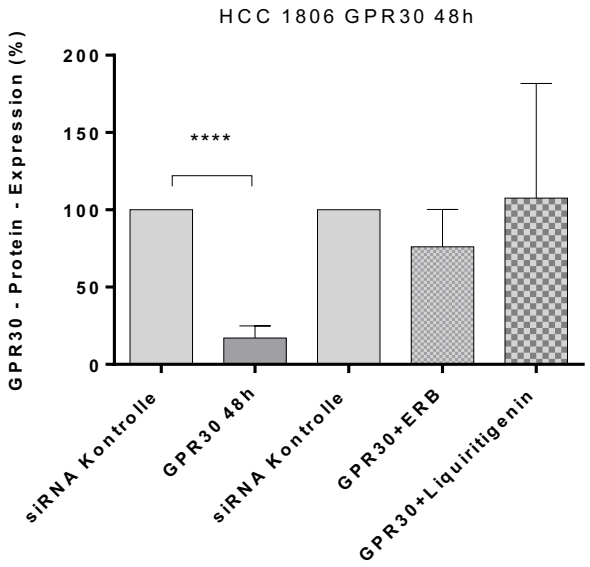


Abbildung 8: Signifikanter Rückgang der GPR30-Proteinexpression in HCC 1809-Zellen nach 48 h im Western Blot. Die Signifikanz wurde mittels unpaired T-Test ermittelt. GPR30 $p < 0{,}0001$ vs. Kontrolle, 17,0 ± 4,53 %, N = 3.

Bevor die Invasionsanalyse begonnen wurde, konnte somit nachgewiesen werden, dass ein GPR30-*knockdown* auf mRNA- und Proteinebene in beiden Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte (siehe Abbildung 4, 5, 7 und 8).

Im nächsten Schritt galt es zu untersuchen, inwieweit sich der *knockdown* von GPR30 auf die Proteinexpression von ERβ (siehe Abbildung 9 und 10) und ERα (siehe Abbildung 15 und 17) auswirkt.

A)

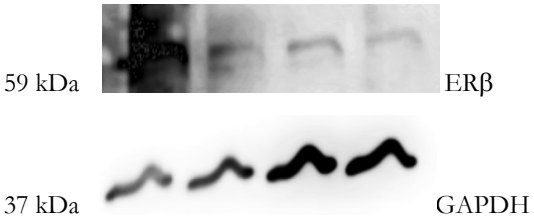


Abbildung 9 A): ERβ-Proteinexpression im Western Blot bei MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown*. Auftragung ERβ/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30 t_{120h}.

B)

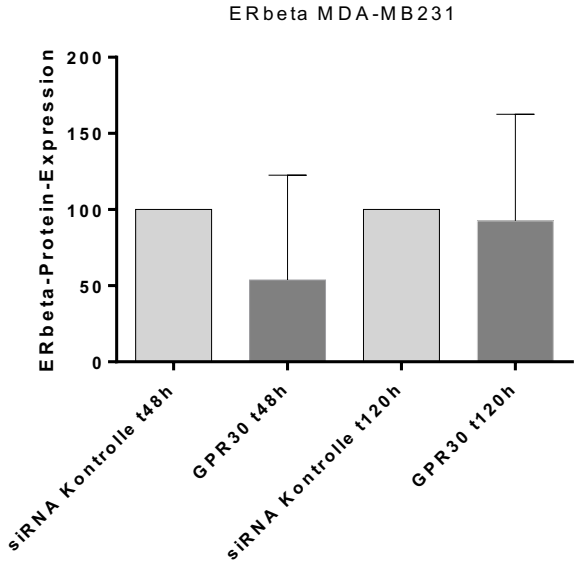
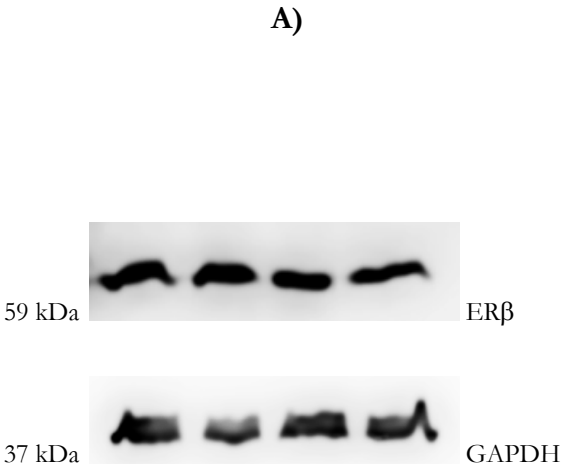


Abbildung 9 B): ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot. Zu den Zeitpunkten t_{48h} und t_{120h} wurde bei den MDA-MB 231-Zellen unter GPR30-*knockdown* keine signifikant veränderte ERβ-Expression im Vergleich zur Kontrolle im Western Blot nachgewiesen.

In den MDA-MB 231-Zellen konnte festgestellt werden, dass der *knockdown* von GPR30 zunächst eine geringere ERβ-Expression nach 48 h zur Folge hatte. Anschließend nahm die ERβ-Expression bei 120 h wieder zu (siehe Abbildung 9).



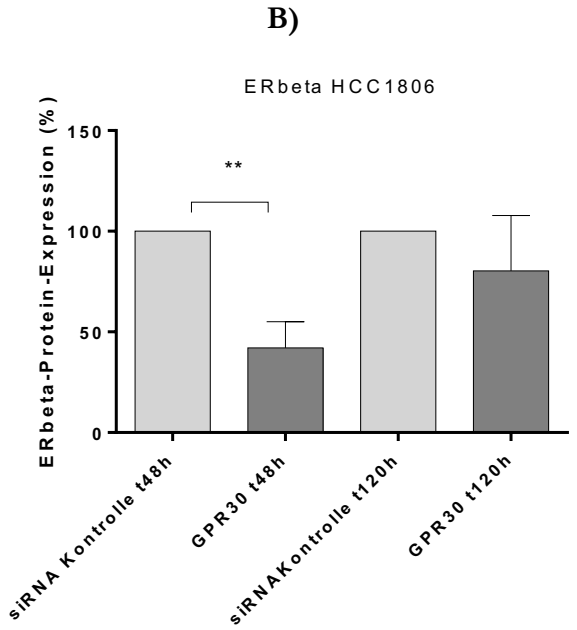


Abbildung 10 A): ERβ-Proteinexpression im Western Blot bei HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown*. Auftragung ERβ/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30 t_{120h}.

Abbildung 10 B): ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot. Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt. Bei t_{48h} wurde im Vergleich zur Kontrolle bei GPR30-*knockdown* eine verminderte ERβ-Expression ($p < 0{,}05$, 42,0, 7,55, N = 3) festgestellt. Zum Zeitpunkt t_{120h} lässt sich ein Anstieg von ERβ in HCC 1806-Zellen erkennen.

In den HCC 1806-Zellen konnte eine vergleichsweise ähnliche ERβ-Proteinexpression wie bei den MDA-MB 231-Zellen festgestellt werden. Ein Rückgang bei 48 h und eine folgende Zunahme der ERβ-Expression bei 120 h konnten im Western Blot detektiert werden (siehe Abbildung 10).

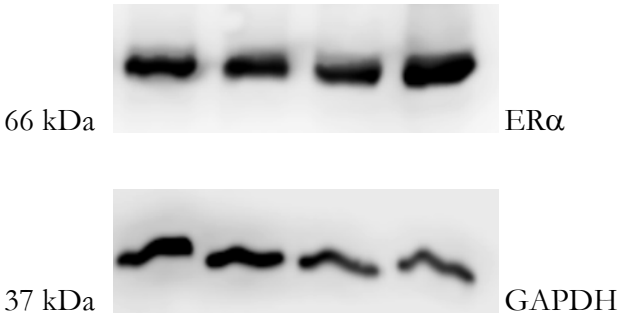


Abbildung 11: ERα-Proteinexpression im Western Blot bei MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown*. Auftragung ERα/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30 t_{120h}.

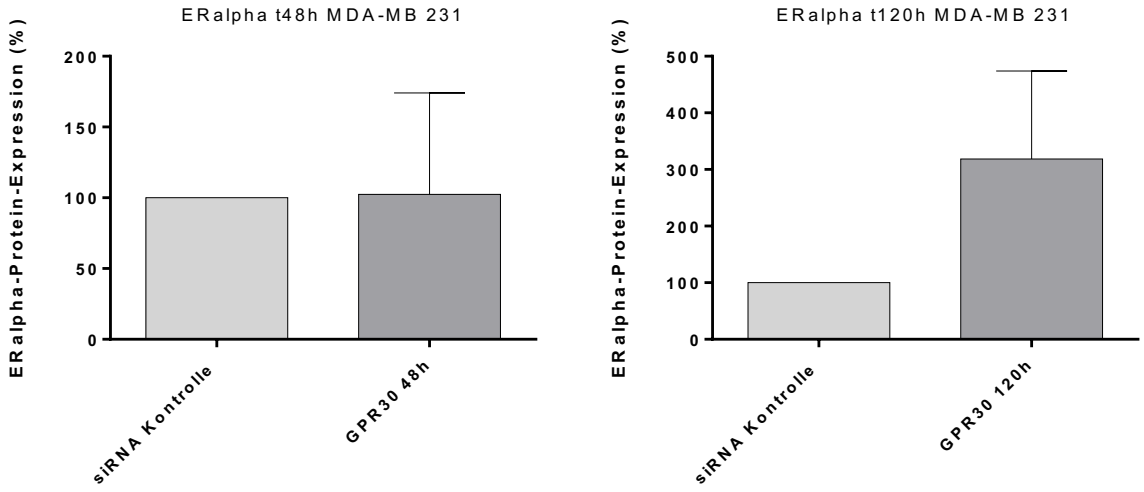


Abbildung 12: ERα-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot. a) t_{48h} b) t_{120h} Anstieg der ERα-Proteinexpression. Es wurden keine Signifikanzen ermittelt.

Zu beiden Zeitpunkten (t_{48h}, t_{120h}) wurde ERα in den MDA-MB 231-Zellen exprimiert. Eine deutliche Zunahme der ERα-Expression konnte zum Zeitpunkt t_{120h} festgestellt werden (siehe Abbildung 11 und 12).

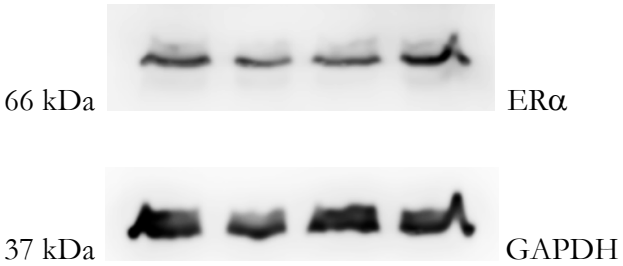


Abbildung 13: ERα-Proteinexpression im Western Blot bei HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown*. Auftragung ERα/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30 t_{120h}.

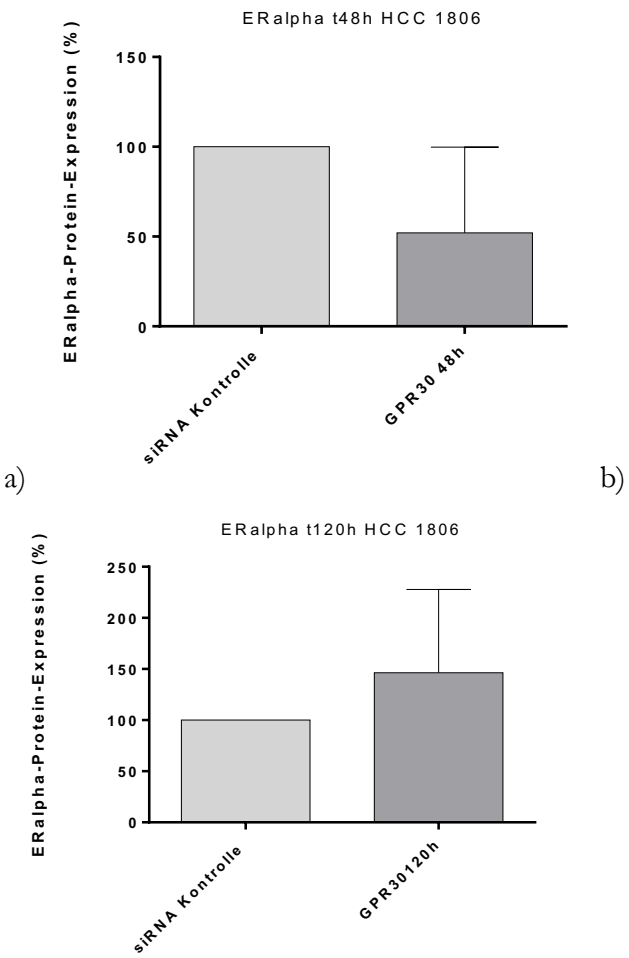


Abbildung 14: ERα-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten im Western Blot. a) t_{48h} mit reduzierter ERα-Proteinexpression b) t_{120h} Anstieg der ERα-Proteinexpression. Es wurden keine Signifikanzen ermittelt.

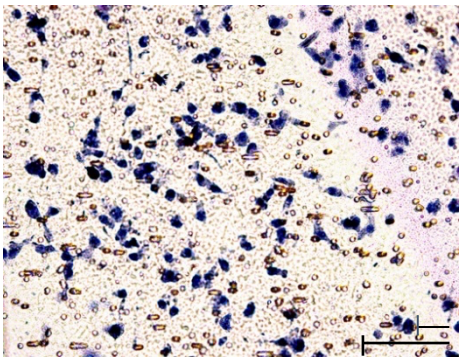
In den HCC 1806-Zellen zeigte sich nach GPR30-*knockdown* zunächst eine verringerte ERα-Expression zum Zeitpunkt t_{48h} im Vergleich zur Kontrolle. Zum Zeitpunkt t_{120h} stieg die ERα-Expression stark an (siehe Abbildung 13 und 14).

3.2 Invasionsanalyse

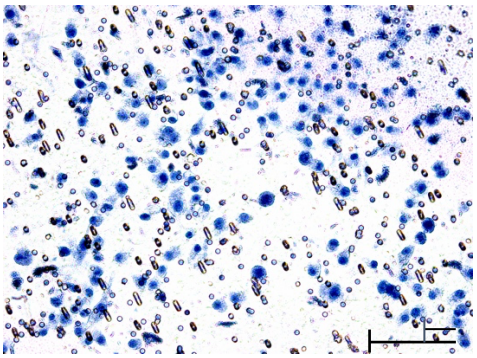
Die Darstellung der Invasivität der TNBC-Zellen gelang mithilfe der Kokultur von MDA-MB 231- und HCC 1806-Zellen mit MG63 Osteoblasten-ähnlichen Zellen über 120 Stunden. Die invadierten Zellen wurden mithilfe von Methanol fixiert und konnten anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden (siehe Abbildung 15). Als Kontrolle dienten jeweils mit Kontroll-siRNA behandelten MDA-MB231 bzw. HCC 1806-Zellen. Zunächst wurde die Invasion der Zellen nach GPR30-*knockdown* mit denen der Kontroll-siRNA behandelten Zellen verglichen. Nach Ausschaltung des Membranproteins GPR30 zeigten die Zellen ein verändertes

Invasionsverhalten. Es konnte in beiden Zelllinien ein signifikanter Rückgang der Invasion nach GPR30-*knockdown*, MDA-MB 231 ($p < 0{,}01$, 70,75 ± 6,276 %, N = 18) und HCC 1806 ($p < 0{,}0001$, 66,08 ± 2,033 %, N = 18), gegenüber der Kontrolle (K = 100 %) beobachtet werden. Einen stärkeren Rückgang der Invasion zeigten somit die HCC 1806-Zellen gegenüber den MDA-MB 231-Zellen (siehe Abbildung 16 und 17).

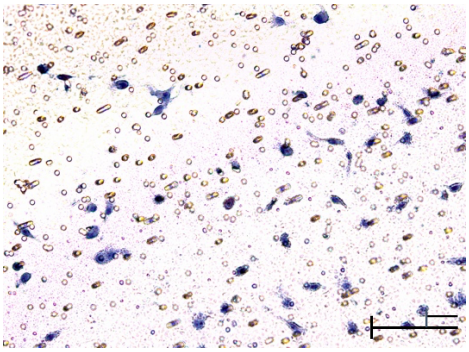
3.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung



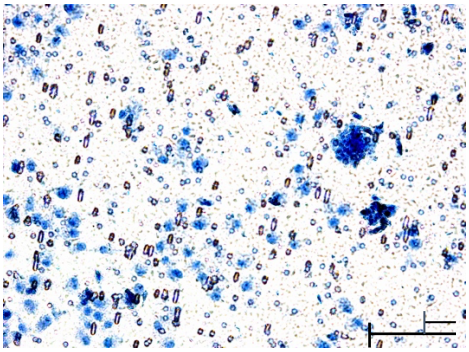
MDA-MB 231 siRNA-Kontrolle



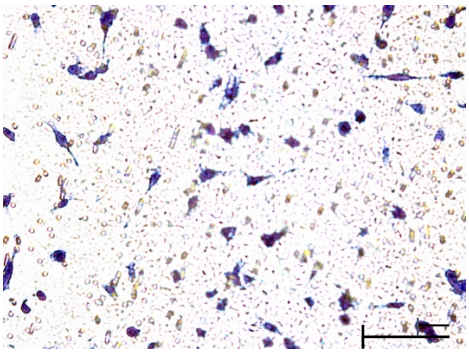
HCC 1806 siRNA-Kontrolle



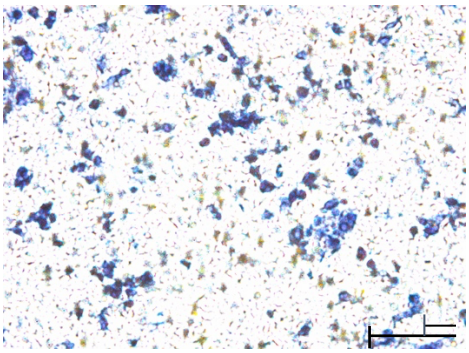
MDA-MB 231 nach GPR30-*knockdown*



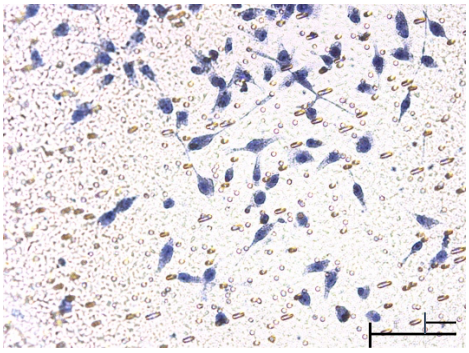
HCC 1806 nach GPR30-*knockdown*



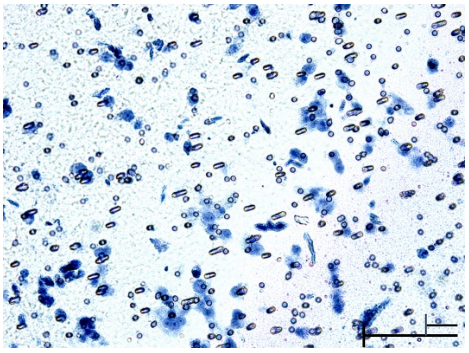
MDA-MB 231 GPR30 und Behandlung mit ERB-041



HCC 1806 GPR30 und Behandlung mit ERB-041



MDA-MB 231 GPR30 und Behandlung mit Liquiritigenin



HCC 1806 GPR30 und Behandlung mit Liquiritigenin

Abbildung 15: Lichtmikroskop: OLYMPUS IX50, Color View II, 10 x Objektiv 0,67112477 µm/PIXEL (Angaben Mikroskop), 200 PIXEL Balken durch ZEN eingefügt, 200 Pixel = 134,224954 µm, Balkenlänge 1,15 cm = 134,224954 µm, 100µm = 0,429 cm (bei Bildgröße 6 cm).

3.2.2 Invasionsverhalten nach GPR30-*knockdown*

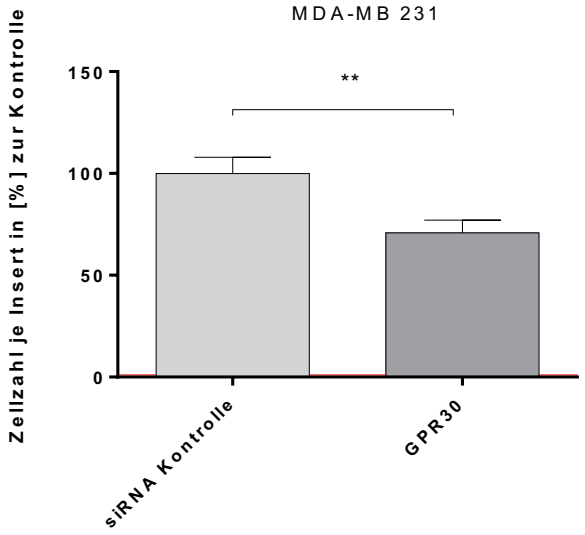


Abbildung 16: Invasionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen. Signifikanter Rückgang der Invasion von MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* ($p < 0{,}01$, 70,75 ± 6,276 %, N = 18). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

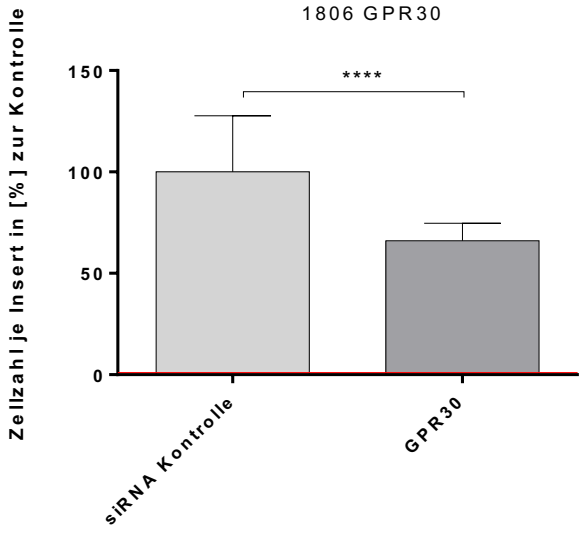


Abbildung 17: Invasionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen. Hoch signifikanter Rückgang der Invasion von HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* ($p < 0{,}0001$, 66,08 ± 2,033 %, N = 18). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

3.2.3 Invasionsverhalten nach GPR30-*knockdown* und ERβ-Agonisten Behandlung

Im Folgenden wurden die mit siRNA GPR30 transfizierten Zellen mit den ERβ-Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 zu den Zeitpunkten t_{48h} und t_{96h} behandelt und die Invasivität auf gleiche Weise dargestellt. Als Kontrolle dienten nur mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen sowie jeweils mit Kontroll-siRNA und ERβ-Agonisten behandelte Zellen.

Nachdem bereits ein Rückgang der Invasion nach GPR30-*knockdown* gezeigt werden konnte, ließ sich eine weitere Reduktion des Invasionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach Abschluss der Behandlung mit selektiven ERβ-Agonisten ERB-041($p < 0{,}0001$, 42,5 ± 3,632 %, N = 9) und Liqiritigenin ($p < 0{,}0001$, 32,79 ± 1,887 %, N = 9) gegenüber der mit siRNA-Kontrolle versetzten Zellen darstellen. Ebenfalls zeigte sich im Vergleich zu der siRNA-Kontrolle und gleichfalls mit selektiven ERβ-Agonisten ERB-041 ($p < 0{,}0001$, 112,4 ± 8,324 %, N = 9) und Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 99.81 ± 5,466 %, N = 9) behandelten Zellen ein signifikanter Rückgang der Invasionsneigung. Unter der Behandlung mit Liquiritigenin zeigten sich stärkere Effekte der reduzierten Invasionsneigung (siehe Abbildung 18).

Ebenfalls konnte eine Reduzierung der Invasivität in der HCC 1806-Zelllinie bewiesen werden. Ein signifikanter Rückgang des Invasionsverhalten nach Abschluss der Behandlung mit ERB-041 ($p < 0{,}0001$, 39.10 ± 2,272 %, N = 9) bzw. Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 42,50 ± 4,063 %, N = 9) gegenüber der siRNA-Kontrolle sowie gegenüber der mit siRNA-Kontrolle und selektiven ERβ-Agonisten ERB-041 ($p < 0{,}001$, 81,90 ± 9.194 %, N = 9) bzw. Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 106,0 ± 6,596 %, N = 9) behandelten Zellen konnte dargestellt werden (siehe Abbildung 19).

Beide Zelllinien weisen stärkere Effekte geminderter Invasion unter der Behandlung mit Liquiritigenin auf. Ein geringeres signifikantes Ansprechen auf die Behandlung mit ERB-041 konnte bei den HCC 1806-Zellen beobachtet werden.

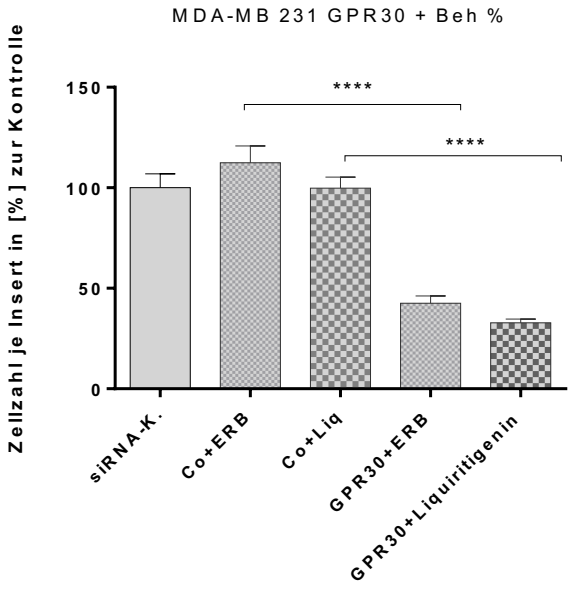


Abbildung 18: Invasionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen. Hoch signifikanter Rückgang der Invasion nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit ERB-401 ($p < 0{,}0001$, 42,5 ± 3,632 %, N = 9) bzw. Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 32,79 ± 1,887 %, N = 9) gegenüber siRNA-Kontrolle (K = 100 %). Ebenfalls hoch signifikante Reduktion der Invasion gegenüber der behandelten Kontrolle mit ERB-041 ($p < 0{,}0001$, 112,4 ± 8,324 %, N = 9) bzw. Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 99,81 ± 5,466 %, N = 9). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

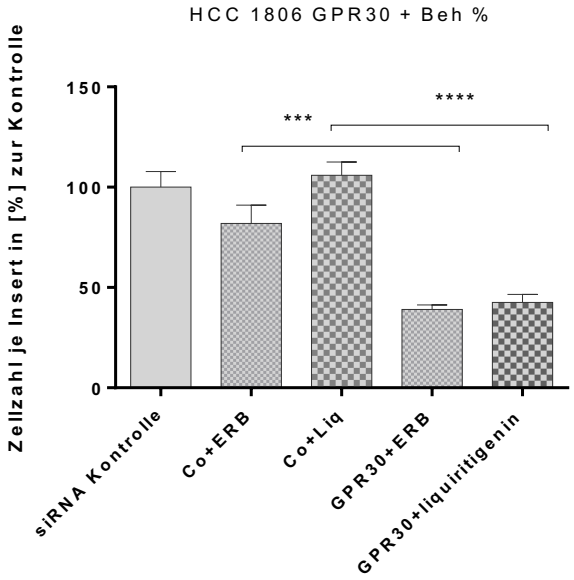


Abbildung 19: Invasionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041 in 120 h Kokultur mit MG63-Zellen Hoch signifikanter Rückgang der Invasion nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit ERB-041 ($p < 0{,}0001$, 39,10 ± 2,272 %, N = 9) bzw. Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 42,50 ± 4,063 %, N = 9) gegenüber siRNA-Kontrolle (K = 100 %). Signifikante Reduktion der Invasion gegenüber der behandelten Kontrolle mit ERB-041 ($p < 0{,}001$, 81,90 ± 9,194 %, N = 9) bzw. hoch signifikanter Rückgang mit Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 106,0 ± 6,596 %, N = 9). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

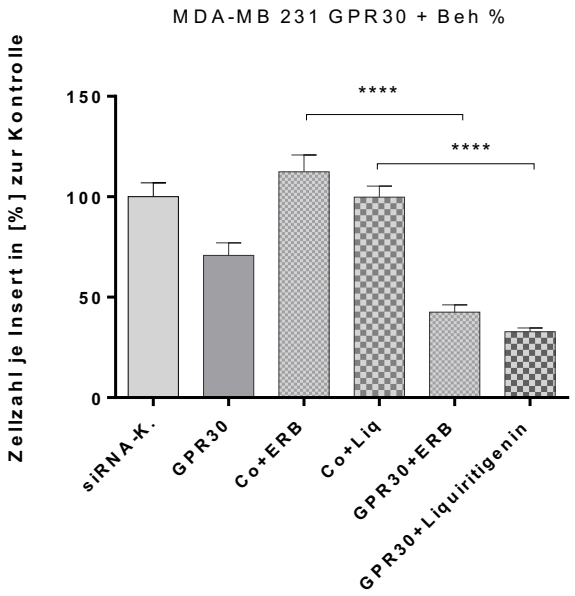


Abbildung 20: Vergleich Inversionsverhalten der MDA-MB 231-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041. Als Kontrolle wurden zum selben Zeitpunkt die Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert und ebenfalls zu den Zeitpunkten t_{48h} und t_{96h} mit den ERβ-Agonisten ERB-041 und Liquiritigenin behandelt. Dargestellt wird der hoch signifikante Rückgang der Invasion im Vergleich zu den unbehandelten MDA-MB 231-Zellen. Im Vergleich GPR30 ($p < 0{,}01$, 70,75 ± 6,276 %, N = 18) vs. GPR30+ERB-041 ($p < 0{,}01$, 42,5 ± 3,632 %, N = 9) behandelte Zellen sowie GPR30 ($p < 0{,}01$, 70,75 ± 6,276 %, N = 18) vs. GPR30+Liquiritigenin ($p < 0{,}001$, 32,79 ± 1,887 %, N = 9). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

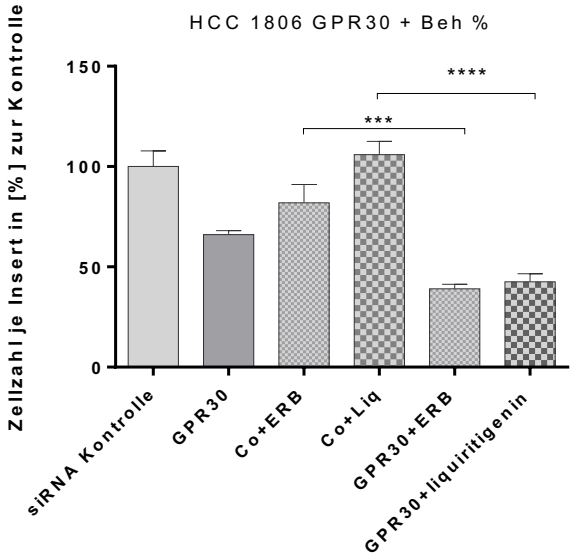


Abbildung 21: Vergleich Inversionsverhalten der HCC 1806-Zellen nach GPR30-*knockdown* und Behandlung mit Liquiritigenin und ERB-041. Als Kontrolle wurden zum selben Zeitpunkt die Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert und ebenfalls zu den Zeitpunkten t_{48h} und t_{96h} mit den ERβ-Agonisten ERB-041 und Liquiritigenin behandelt. Dargestellt wird der Rückgang der Invasion im Vergleich zu den unbehandelten HCC 1806-Zellen und nach GPR30-*knockdown*. Im Vergleich GPR30 ($p < 0{,}00001$, 66,08 ± 2,033 %, N = 18) vs. GPR30+ERB-041 ($p < 0{,}0001$, 39,1 ± 2,272 %, N = 9) behandelte Zellen sowie GPR30 ($p < 0{,}0001$, 66,08 ± 2,033 %, N = 18) vs. GPR30+Liquiritigenin ($p < 0{,}0001$, 42,5 ± 4,063 %, N = 9). Signifikanzen wurden mittels unpaired T-Test ermittelt.

Ein signifikanter Rückgang der Invasivität von TNBC-Zellen konnte nach GPR30-*knockdown* dargestellt werden. Nach Abschluss der Behandlung mit selektiven ERβ-Agonisten ließ sich darüber hinaus eine weitere Reduktion des Invasionsverhalten für beide Zelllinien (MDA-MB 231 und HCC 1806) darstellen. Stärkere Effekte konnten unter Verwendung des ERβ-Agonisten Liquiritigenin erzielt werden (siehe Abbildung 20 und 21).

Abschließend wurden die behandelten TNBC-Zellen im Western Blot auf die Expression von ERβ untersucht. Es galt zu untersuchen, inwiefern der *knockdown* von GPR30-Auswirkungen auf die Proteinexpression ERβ hatte.

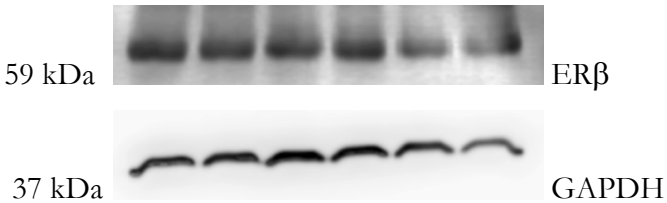


Abbildung 22: Western Blot ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen. Auftragung ERβ/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 + ERB-041 t_{48h}, GPR30+Liquiritigenin t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30+Erb041 t_{120h}, Gpr30+Liquiritigenin t_{120h}.

In Abbildung 22 wurde die ERβ-Expression zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (t_{48h}und t_{120h}) in den mit ERB-041 und Liquiritigenin behandelten MDA-MB 231-Zellen aufgezeigt. In den behandelten Zellen wurde GPR30 ausgeschaltet. Als Kontrolle diente GAPDH als Antikörper.

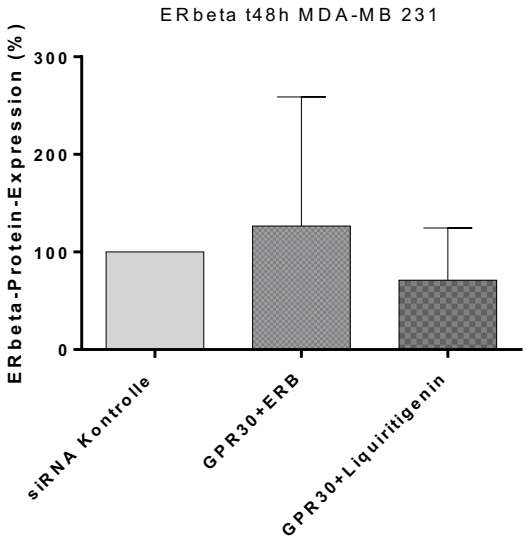


Abbildung 23: ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 48 h im Western Blot. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ERβ-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle erzielt. Die mit ERB-041 behandelten Zellen zeigten einen Trend der Upregulation von ERβ nach 48 h im Western Blot.

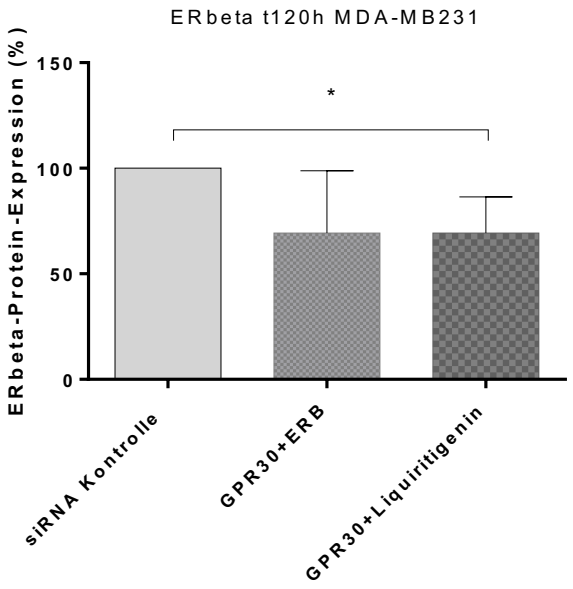


Abbildung 24: ERβ-Proteinexpression in MDA-MB 231-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 120 h im Western Blot. Signifikanz wurde mittels T-Test ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle exprimierten die behandelten Zellen mit Liquiritigenin ($p < 0{,}05$, 69,33 ± 9,905, N = 3) signifikant weniger ERβ. Für die behandelten Zellen mit ERB-041 wurden im Vergleich zur Kontrolle keine Signifikanzen im Bezug auf die ERβ-Proteinexpression erzielt.

Die ERβ-Proteinexpression wurde in den beiden Zelllinien zu den Zeitpunkten t_{48h} und t_{120h} ermittelt. Zum Zeitpunkt t_{48h} ergab sich in den MDA-MB 231-Zellen kein signifikanter Unterschied der ERβ-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 23). Zum Zeitpunkt t_{120h} ergab sich für die behandelten Zellen mit Liquiritigenin eine signifikant geringere ERβ-Expression ($p < 0{,}05$, 69,33 ± 9,905, N = 3) im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 24).

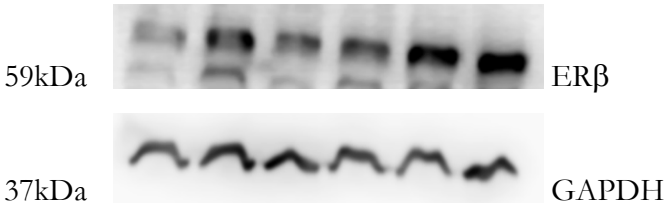


Abbildung 25: Western Blot ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen. Auftragung ERβ/GAPDH: Kontrolle t_{48h}, GPR30 + ERB-041 t_{48h}, GPR30+Liquiritigenin t_{48h}, Kontrolle t_{120h}, GPR30+Erb041 t_{120h}, GPR30+Liquiritigenin t_{120h}.

In Abbildung 25 wurde die ERβ-Expression zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (t_{48h}und t_{120h}) in den mit ERB-041 und Liquiritigenin behandelten HCC 1806-Zellen aufgezeigt. In den behandelten Zellen wurde GPR30 ausgeschaltet. Als Kontrolle diente GAPDH als Antikörper.

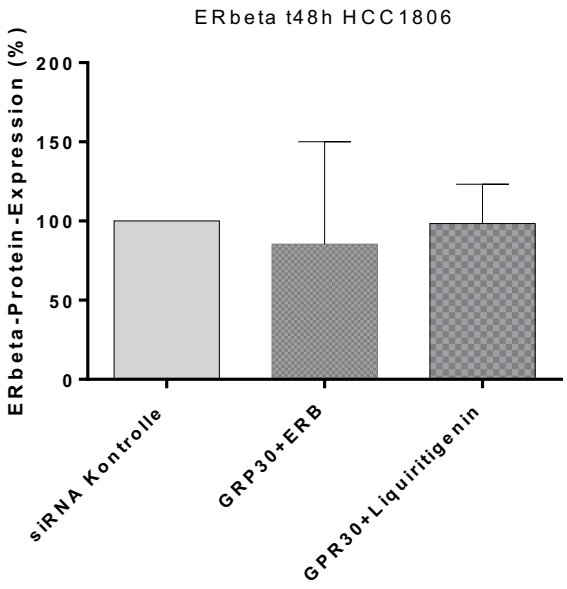


Abbildung 26: ERβ-Proteinexpression in HCC 1806-Zellen bei *knockdown* von GPR30 und Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin nach 48 h im Western Blot. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der ERβ-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle erzielt. Es zeigte sich eine annähernd unveränderte ERβ-Proteinexpression bei Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin.

Eine Behandlung mit ERB-041 und Liquiritigenin der HCC 1806-Zellen konnte keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der ERβ-Expression feststellen (siehe Abbildung 26). Zum Zeitpunkt t_{48h} und t_{120h} wurden keine Signifikanzen erzielt.

Der *knockdown* von GPR30 sowie die Behandlung der TNCB-Zellen mit selektiven ERβ-Agonisten erzielten keine signifikante Veränderung hinsichtlich der ERβ-Proteinexpression gegenüber der Kontrolle. Zum Zeitpunkt t_{120h} wurde nach Behandlung mit Liquiritigenin in den MDA-MB 231-Zellen bei GPR30-*knockdown* eine signifikant geringere ERβ-Proteinexpression im Western Blot nachgewiesen ($p < 0{,}05$, $69{,}33 \pm 9{,}905$, $N = 3$).

4 Diskussion

Vorangegangene Arbeiten konnten herausstellen, dass TNBC-Zellen, zu denen die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 231 und HCC 1806 gehören, vermehrt ERβ exprimieren. Darüber hinaus konnte die Funktion von ERβ in TNBC-Zellen weiter untersucht werden. Aufgrund der antiinvasiven und antiproliferativen Eigenschaften von ERβ wurden *in vitro*-Versuchsreihen von TNBC-Zellen unter Behandlung mit spezifischen ERβ-Agonisten durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass TNBC-Zellen eine deutlich verminderte Metastasierungsneigung nach Behandlung mit ERβ-Agonisten zeigten (Hinsche et al. 2015).

Des Weiteren fiel in TNBC-Zellen auf, dass die Zellen nach Östrogenaktivierung eine rapide Zellantwort zeigten, die mit Zellproliferation und Zellinvasion und anschließend Metastasierung einhergeht. Nukleäre Östrogenrezeptoren benötigen für die Generierung ihrer Zellantwort wesentlich länger, als dass es eine solch rapide Zellantwort erklären würde. Man fand schließlich heraus, dass der Transmembranrezeptor GPER von Estradiol aktiviert wird, unabhängig von nukleären Östrogenrezeptoren vielfache Signalkaskaden innerhalb der Zelle aktiviert und ebenfalls Transkriptionsfaktoren zur Genexpression rekrutiert (Girgert et al. 2019).

Es stellte sich somit die Frage, über welche Rezeptoren ERβ-Agonisten wirken, inwieweit GPER mit ERβ interagiert und inwiefern der *knockdown* des membranständigen Östrogenrezeptors GPER die antiinvasive Wirksamkeit selektiver ERβ-Agonisten beeinflusst.

Der *knockdown* von GPER sollte herausstellen, ob ERβ-Agonisten über GPER wirken oder einen unabhängigen Signalweg nehmen. Dafür wurde eine spezifische siRNA verwendet, sodass der *knockdown* für einen Zeitraum von ca. sieben Tagen stabil bleibt (Girgert et al. 2012).

In dieser Arbeit erfolgte zunächst der *knockdown* von GPER für die MDA-MB 231- und HCC 1806-Zelllinien, welcher mithilfe der RT-PCR auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden konnte. Eine signifikante Reduktion der GPER-Expression in MDA-MB 231-Zellen konnte für die Zeitpunkte nach 96 h und 168 h erzielt werden. Im Vergleich dazu zeigten die HCC 1806-Zellen eine signifikant verminderte Expression von GPER nach 24 h und eine Tendenz der Upregulation von GPER nach 48 h mit anschließendem erneutem Rückgang der GPER-Expression. Es ist anzunehmen, dass es sich in dem Falle um eine reaktive Upregulation der Genexpression von GPER nach dessen *knockdown* in dem Falle handelt.

Weiterhin folgte der Nachweis des GPER-*knockdowns* auf Proteinebene. Ebenfalls gelang es, auf translationaler Ebene in beiden Zelllinien die GPER-Expression signifikant zu vermindern. Bei

den MDA-MB 213 Zellen wurde der GPER-*knockdown* bei 120 h und für die HCC 1806-Zellen bei 48 h erzielt.

Im Western Blot wurde die Proteinexpression von ERβ und ERα bei TNCB-Zellen nach GPER-*knockdown* untersucht. In den MDA-MB 231-Zellen konnte im Vergleich zu den HCC 1806-Zellen keine signifikante Veränderung der ERβ-Proteinexpression herausgestellt werden. Die HCC 1806-Zellen zeigten zum Zeitpunkt t_{120h} eine verstärkte Expression von ERβ gegenüber t_{48h}. Ebenfalls wurde in den MDA-MB 231-Zellen eine leichte Erhöhung der ERβ-Proteinexpression im Vergleich zum Zeitpunkt t_{48h} festgestellt. Der *knockdown* von GPER begünstigt demnach die Expression von ERβ.

Die Expression von ERα konnte in beiden Zelllinien im Western Blot nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt t_{120h} wurde im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Proteinexpression von ERα in beiden Zelllinien festgestellt. Eine Einordnung der molekularen Subtypen des TNBC erfolgt mittels Immunhistochemie und oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Abhängig von Definitionen unterscheidet sich die ERα-Expression in der Immunhistochemie von TNBC-Zellen zwischen < 1 % und < 10 % (Cheang et al. 2015). Es wird den TNBC-Zellen eine natürliche Heterogenität in der Rezeptorexpression zugesprochen. Demnach unterscheiden sich TNBC-Zellen trotz eines gleichen molekularen Subtypens in ihrer Expression von Rezeptoren (Prat et al. 2013).

Eine vermehrte Heterogenität weist die MDA-MB 231-Zelllinie in ihrer Proteinexpression sowie Signalbildung auf. Aufgrund einer variablen Phosphorylierung von Zielproteinen kommt es zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Signalkaskaden innerhalb der Zelllinie (Smith et al. 2017). Ebenfalls können MDA-MB 231-Zellen eine unterschiedliche morphologische Konfiguration einnehmen, wodurch eine variable Aktivität der Zellen resultiert. Die Änderung ihrer morphologischen Struktur verhilft den Zellen wiederum dabei, aktiv eine Basalmembran zu durchdringen (Ivers et al. 2014). Ein abweichendes Verhalten der MDA-MB 231-Zellen sollte bei der Interpretation von Ergebnissen bei TNBC-Studien bedacht werden (Smith et al. 2017).

Anschließend wurde das Metastasierungsverhalten beider Zelllinien überprüft, zunächst nach Ausschaltung von GPER. Die TNBC-Zellen wurden hierfür mit Osteoblasten ähnlichen Zellen, MG 63, für fünf Tage kokultiviert. Die Osteoblasten ähnlichen Zellen imitieren das menschliche Knochengewebe, die humane Basalmembran mit Extrazellulärmatrix wurde mithilfe des Matrigel Matrix (BD Matrigel™Basement Membran) nachgestellt. Die Brustkrebszellen mussten durch die nachgestellte Basalmembran aktiv zu den MG63-Zellen immigrieren. Dieser Vorgang

sollte das natürliche Metastasierungsverhalten von TNBC-Zellen *in vitro* imitieren. Beide Zelllinien zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Invasionsneigung nach knockdown von GPER, wobei die HCC 1806-Zellen sich stärker invasiv erwiesen und nach knockdown einen höher signifikanten Rückgang von knapp 40 % der Invasion zeigten.

Nachdem sich der *knockdown* für beide Zelllinien als antiinvasiv erweisen konnte, galt es weiterhin die Beziehung zwischen GPER und spezifischen ERβ-Agonisten zu untersuchen. Entsprechend wurden beide Zelllinien nach GPER-*knockdown* an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten der Kokultivierung mit Osteoblasten ähnlichen Zellen mit den beiden ERβ-Agonisten Liquiritigenin und ERB-041 behandelt. Anschließend konnte herausgestellt werden, dass beide TNBC-Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einen signifikanten Rückgang der Invasion aufzeigten. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass beide Zelllinien nach Behandlung mit den ERβ-Agonisten einen noch weiteren Invasionsrückgang von fast 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigten. Gegenüber den unbehandelten Zellen nach GPER-*knockdown* konnte eine weitere Reduktion der Invasivität von über 20 % in der HCC 1806-Zelllinie und mehr als 30 % in der MDA-MB 231-Zelllinie beobachtet werden. Den stärksten Rückgang der Invasion zeigten die MDA-MB 231-Zellen nach Behandlung mit Liquiritigenin.

In dieser Arbeit konnte mithilfe des Invasionsassays gezeigt werden, dass der *knockdown* von GPER eine antiinvasive Wirkung auf TNBC-Zellen ausübt. Es konnte ein signifikanter Rückgang der Invasion in Osteoblasten ähnliches Zellgewebe dargestellt werden. Jedoch ist zu diesem Zeitpunkt die Wirkungsweise von GPER noch nicht ausreichend erklärt. In vorangegangenen Arbeiten konnte selektiven ERβ-Agonisten ebenfalls eine antiinvasive Wirksamkeit nachgewiesen werden. Es stellte sich daher die Frage, ob ERβ-Agonisten über ERβ, GPER oder beide Rezeptoren agieren. Nachdem das Membranprotein GPER in den jeweiligen Zelllinien erfolgreich ausgeschaltet wurde, folgte die Behandlung mit den selektiven ERβ-Agonisten für die Invasionsanalyse. Nach Behandlung zeigten die TNBC-Zellen einen weiteren signifikanten Rückgang ihres Invasionsverhaltens gegenüber Osteoblasten ähnlichem Zellgewebe. Es konnte nachgewiesen werden, dass der GPER-*knockdown* einen positiven Einfluss auf die antiinvasive Wirksamkeit selektiver ERβ-Agonisten nimmt und das Invasionsverhalten nochmals reduziert wurde. Damit konnte ebenfalls festgestellt werden, dass GPER unabhängig von ERβ wirkt. Nach dessen Ausschaltung kam es zu einer Invasionshemmung, was sich dadurch erklären lässt, dass GPER in TNBC eine proliferative und proinvasive Wirkung aufweist. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass nach Ausschaltung von GPER der ERβ weiterhin von spezifischer ERβ-Agonisten aktivierbar bleibt und diesbezüglich unabhängig von GPER antiinvasive

Eigenschaften zeigt. In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich resultieren, dass der *knockdown* von GPER und der Einsatz von spezifischen ERβ-Agonisten den signifikantesten Rückgang der Invasion aufweist. Es muss daher davon auszugehen sein, dass eine Interaktion von GPER und ERβ innerhalb der Zelle stattfinden muss. Hierfür würde auch die vermehrte ERβ-Proteinexpression nach GPER-*knockdown* sprechen. Es gilt nun zu überlegen, welche Signalkaskaden ERβ-Agonisten in den TNBC-Zellen nehmen, worüber sie Ihre antiinvasive Wirkung entfalten. Der alleinige *knockdown* von GPER zeigte eine antiinvasive Wirkung auf TNBC-Zellen, die anschließende Behandlung mit spezifischen ERβ-Agonisten ebenfalls. Weiterhin konnte eine Interaktion zwischen ERβ-Agonisten mit dem Membranprotein GPER nachgewiesen werden. Es gab Signifikanzunterschiede der verwendeten ERβ-Agonisten in Bezug auf das Invasionsverhalten. ERB-041 nahm einen leicht geringeren Einfluss auf den Rückgang der Invasion. Die Behandlung mit ERβ-Agonisten sowie der *knockdown* des Membranproteins GPER haben eine synergistische, antiinivasive Wirkung auf TNBC-Zellen. Signalkaskaden über GPER werden durch dessen Ausschaltung inhibiert. Entsprechend fällt eine proinvasive und proliferierende Zellantwort weg. ERβ-Agonisten aktivieren spezifisch den ERβ, welcher vermehrt und als einziger Hormonrezeptor in TNBC-Zellen exprimiert wird. Dieser wirkt sich positiv auf Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellzyklusarrest und Autophagie von entarteten Zellen aus und inhibiert Transkription und Zellwachstum von malignen Brustkrebszellen (Petterson et al. 2000; Zhao et al. 2018). Andere Studien konnten bereits herausstellen, dass EGFR eine Schlüsselrolle in der Interaktion von Estradiol und Aktivierung der verschiedenen Östrogenrezeptoren einnimmt. EGFR wird direkt nach Aktivierung von GPER durch Estradiol aktiviert. Nach Rekrutierung von EGF wird unabhängig von der Dignität der Zellen die Zellreplikation über multiple untereinander kommunizierende Signalkaskaden beschleunigt. Über die nukleären Östrogenrezeptoren ER wird die EGF-Genexpression aktiviert, über den membranständigen GPER werden rapide Zellantworten bezüglich Zellproliferation und Genexpression generiert. Sofern GPER ausgeschaltet wird und die direkte Aktivierung von EGFR unterbleibt, wird eine eingeschränkte E2-abhängige Zellantwort resultieren.

ERα-positive Tumore zeigen eine vermehrte Expression von EGFR, da sie ihren Wachstumsreiz spezifisch durch Östrogene erhalten (Albanito et al. 2008). Estradiol kann ERα direkt aktivieren und somit die Proliferation ERα-positiver Tumore begünstigen (Cheng et al. 2004). Eine gesteigerte EGFR-Expression ist mit einer schlechteren Prognose solcher Tumore assoziiert. Darüber hinaus konnte in TNBC-Zellen nachgewiesen werden, dass Tamoxifen als spezifischer ERα-Antagonist GPER direkt aktiviert (Vergleich Abb. 3). Dementsprechend kommt es im

Falle einer Tamoxifen-Behandlung zu einer Aktivierung von EGFR, was eine Steigerung der Proliferationsrate der maligen Zellen zur Folge hat. Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Faktor scheint die Entwicklung von Tamoxifen-Resistenzen zu sein (Albanito et al. 2008). Nur ca. 70 % der ERα-positiven Tumore sprechen auf eine Tamoxifen-Behandlung an (Haldosen et al. 2014). Erklären lässt sich dieses Phänomen anhand der agonistischen Wirkung am GPER und der daraus resultierenden EGFR-Aktivierung. Der Zellwachstumsrückgang bleibt bei vermehrter GPER/EGFR-Expression folglich aus. Weiterhin konnte herausgestellt werden, dass das Nicht-Ansprechen auf ERα-Antagonisten einer vielschichtigen Genese zugrunde liegt. Neben einer genetischen Heterogenität von ER-Expression und Resistenzentwicklung in Mammakarzinomen spielt die variable Anwesenheit verschiedener Transkriptionsfaktoren, die unterschiedliche Affinität der Rezeptoren zu ihrem Substrat und die Ausprägung der Rezeptor-spezifischen Domänen eine wesentliche Rolle (Albanito et al. 2008). Cheng et al. (2004) beschreiben in ihrer Arbeit, dass Tamoxifen ERβ herunterreguliert, indem sich ein Tamoxifen-ERβ-Komplex bildet. Im Rahmen einer Tamoxifen-Resistenz konnte wiederum eine vermehrte Expression von ERβ nachgewiesen werden.

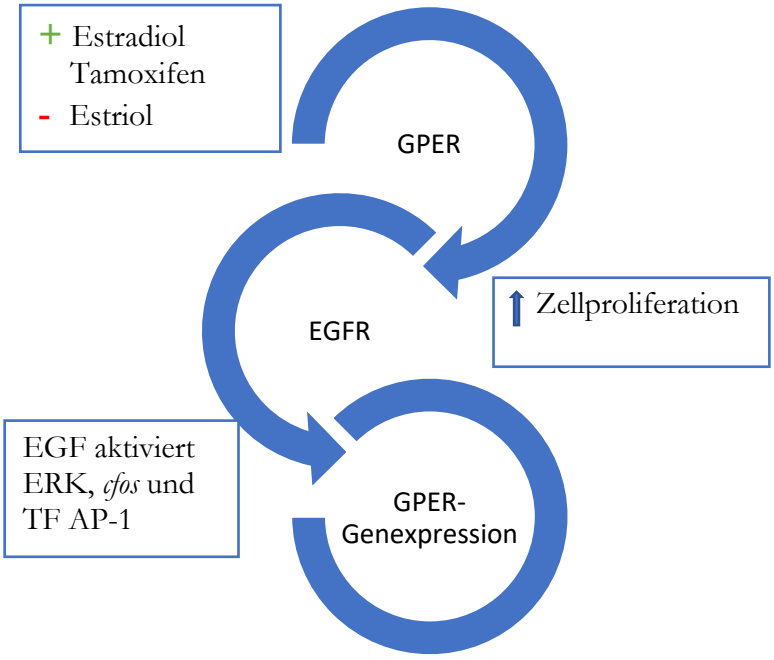


Abbildung 27: Schlüsselrolle EGFR

Aufgrund der unzureichenden Therapiemöglichkeiten des TNBC kann die Unterbrechung des GPER-EGFR-Signalweges ein wichtiger Ansatzpunkt in der Minimierung von Tumorproliferation und Invasion darstellen. Das TNBC erhält eine Östrogenaktivierung mittels GPER, welcher durch EGF einen positiven *feedback loop* auf die intrazelluläre Proteinexpression von GPER

nimmt und somit die Proliferation von triple-negativen Tumorzellen stark beschleunigt. EGF kann über die Aktivierung von ERK Phosphorylierung, c-fos-Expression und Rekrutierung des Transkriptionsfaktors *activator protein* (AP-1) direkten Einfluss auf die GPER-Genexpression nehmen (siehe Abbildung 27) (Maggiolini et. al 2004). TNBC-Tumore mit GPER-Überexpression zeichnen sich durch eine schlechtere Überlebensrate, einen aggressiveren Tumorverlauf mit schnellerer Neigung zur Metastasierung aus (Albanito et al. 2008). *In vivo* übt Estriol (E3) einen hemmenden Effekt auf GPER aus. Es ist davon auszugehen, dass GPER spezifisch nur von Estradiol aktiviert wird, da *in vitro*-Versuche zeigen konnten, dass GPER nach Zugabe von E3 inhibiert wird und die Zellproliferation maligner TNBC-Zellen reduziert wird (Girgert et al. 2019). Weiterhin konnten Chen at al. (2017) beobachten, dass der Einsatz von Baicalein ERα und GPER binden kann, die normalerweise von E2 reguliert werden. Baicalein ist ein Flavonoid, dass aus der *Scutellaria baicalensis* gewonnen wird und antiinflammatorische, antibiotische und antioxidative Eigenschaften besitzt. Nachdem Baicalein an die Rezeptoren gebunden hat, kommt es zur Hemmung der E2-abhängigen Signalantworten. Die E2-abhängige Migration, Adhäsion und Invasion von triple-negativen und ERα-positiven Brustkrebszellen wird inhibiert. Es stellt daher eine Therapieoption in der Behandlung des malignen Mammakarzinoms dar (Chen et al. 2017).

Ein hoch signifikanter Rückgang der Invasion von TNBC-Zellen konnte nach GPR30-*knockdown* und ERβ-Agonisten Behandlung gezeigt werden. ERβ-positive Tumore zeichnen sich durch einen höheren Grad an Zelldifferenzierung, durch eine kleinere Tumorgröße und eine bessere Überlebensprognose aus. Die molekulare Struktur des ERβ unterscheidet sich wesentlich von der des ERα. Folglich verfügen beide Rezeptoren über eine unterschiedliche Affinität zu E2 und aktivieren verschiedene Signalkaskaden innerhalb der Zelle. Der ERβ verfügt über mehrere Subtypen, die in ihrer Funktion zum jetzigen Zeitpunkt unterschiedlich weit erforscht sind (siehe Tabelle 19). Sie entstehen durch Splicing-Varianten ihrer Exons. So konnten Haldosén et al. (2014) herausstellen, dass ERβ2 eine vermeidliche antagonistische Wirkung auf ERα hat und Proteasom-abhängig zu einer Degradierung des ERα führt. Somit ist die E2-abhängige Aktivierung von ERβ2 mit einer Inhibition von ERα verbunden und führt entsprechend zu einer geminderten Genexpression von ERα. Bei Überexpression von ERβ im TNBC-könnte es erklären, weshalb ERα nicht nachweislich exprimiert wird und Tamoxifen eine ausbleibende Wirkung in der Behandlung von TNBC-zeigt. Weiterhin wird eine Komplexbildung von Tamoxifen und ERβ beschrieben, sodass von einer Inaktivierung von ERβ auszugehen ist (Cheng et al. 2004).

ERβ4 und ERβ5 gelten als Transaktivatoren von ERβ1 und können als Liganden seine Wirkung verstärken (Leung et al. 2012). ERβ1 und ERα ähneln sich im molekularen Aufbau ihres Rezeptors am meisten und zeigen Übereinstimmung in ihrer Liganden-Bindungsdomäne. Es konnte gezeigt werden, dass ERβ1 Genexpression aktivieren konnte, die normalerweise von ERα reguliert werden. Neben Matthews und Gustafsson et al. (2006) konnten auch weitere Studien herausstellen, dass ERβ1 und ERα miteinander kommunizieren, kooperieren und konkurrieren. Sofern beide Rezeptoren exprimiert werden, scheint ERβ1 ein negativer Regulator von ERα zu sein und wirkt sich negativ auf die Genexpression der Zelle aus. Neben einem Rückgang der Zellproliferation wird auch Zellzyklusarrest und Apoptose maligner Zellen induziert. Weiterhin konnten Williams et al. (2008) zeigen, dass bei Überexpression von ERβ1 in Mammakarzinomen ein gleichzeitig inhibierender Effekt auf ERα-regulierte Zellantworten ausgeübt wird. Andere Studien konnten sogar zeigen, dass spezifische ERα-Agonisten Zellproliferation anregen, während spezifische ERβ-Agonisten einen gegenteiligen Effekt ausüben und Zellwachstum inhibieren sowie Zellapoptose aktivieren (Haldosén et al. 2014). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass ERβ über den Transforming growth factor beta (TGFβ)-Signalweg kommuniziert. TGFβ wirkt antiproliferativ, antiinflammatorisch, proapoptotisch, antiangiogenetisch, adhäsiv und prodifferenzial auf die Zelle. Durch Aktivierung von ERβ werden mittels TGFβ-Tumor suppressive Zellantworten begünstigt und reguliert.

Derzeit werden Mammakarzinome nur hinsichtlich der Expression des ERα histologisch untersucht. Viele Studien konnten bereits herausstellen, dass die Expression von ERβ einen Einfluss auf das Tumorgeschehen nimmt. Abhängig von der Ausprägung der jeweiligen Unterform des ERβ werden verschiedene Signalwege reguliert. Durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen die Unterformen des ERβ konnten bereits klinisch pathologische Parameter aufgestellt werden, die eine Korrelation mit entsprechenden Mammakarzinomtypen erkennen lässt (Haldosén et al. 2014). Daher gilt die Untersuchung von ERβ-Expression in Brusttumoren als wichtiger Prognosefaktor und sollte in die standardisierte histopathologische Untersuchung des Mammakarzinoms etabliert werden. Weiterhin sollte der Einsatz von spezifischen ERβ-Agonisten als Therapiemöglichkeit bei TNBC-untersucht werden.

Tabelle 20: ERβ-Unterformen und deren Funktion

ERβ1	Einziges Homodimer, heterodimerisiert mit ERβ2, 4 und 5, hohe Affinität zu E2
ERβ2	Ligand von ERβ1, keine Affinität zu E2
ERβ4	Ligand von ERβ1, mittlere Affinität zu E2
ERβ5	Ligand von ERβ1, mittlere Affinität zu E2

Die ERβ-Unterformen unterscheiden sich auf molekularer Ebene lediglich in ihrem C-Terminus des letzten Exons, worin sich die unterschiedlichen Funktionsweisen erklären lassen. ERβ1 ist der einzige Rezeptor, der über Liganden-Bindungsdomänen verfügt und intrinsische Signalkaskaden Liganden-abhängig aktivieren kann. Die Unterformen ERβ2, 4 und 5 können ERβ1 als Ligand binden und coaktivieren (Leung et al. 2012).

Spezifische ERβ-Agonisten vermitteln tumorsuppressive, antimetastatische Wirkungsweisen auf TNBC. Damit maligne Zellen invasiv werden und fernmetastasieren können, müssen sie Angiogenese betreiben. Hierfür wird vermehrt von den Tumorzellen VEGF aktiviert, wodurch die Endothelproliferation von Blutgefäßen und anschließende Migration von Tumorzellen begünstigt wird. Es wurden bereits spezifische VEGF-Antikörper entwickelt, die derzeit bei zervikalen oder kolorektalen Karzinomen erfolgreich eingesetzt werden. Nicht zu vernachlässigen ist das Nebenwirkungsprofil einer VEGF-Antikörpertherapie, die mit Blutdruckanstieg, Blutungsneigung und gastrointestinaler Perforation einhergehen kann. Spezifische ERβ-Agonisten, wie Liquiritigenin inhibieren VEGF reversibel und verfügen über ein deutlich geringeres Nebenwirkungsprofil. Neben Hemmung der Neovaskularisationen von Karzinomzellen induziert es Zellapoptose über die mitochondriale Aktivierung von Caspase 9 und 3. *In vivo*-Versuchsreihen am Mausmodell konnten nachweisen, dass nach Behandlung mit Liquiritigenin VEGF signifikant gehemmt wird und immunhistochemisch im Xenograftt-Tumor dosisabhängig vermindert nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls wurde eine verminderte Neovaskularisation beobachtet und lässt darauf schließen, dass Liquiritigenin durch Hemmung von VEGF die Tumorangiogenese und damit Tumorproliferation inhibieren kann (siehe Abbildung 28) (Liu et al. 2012).

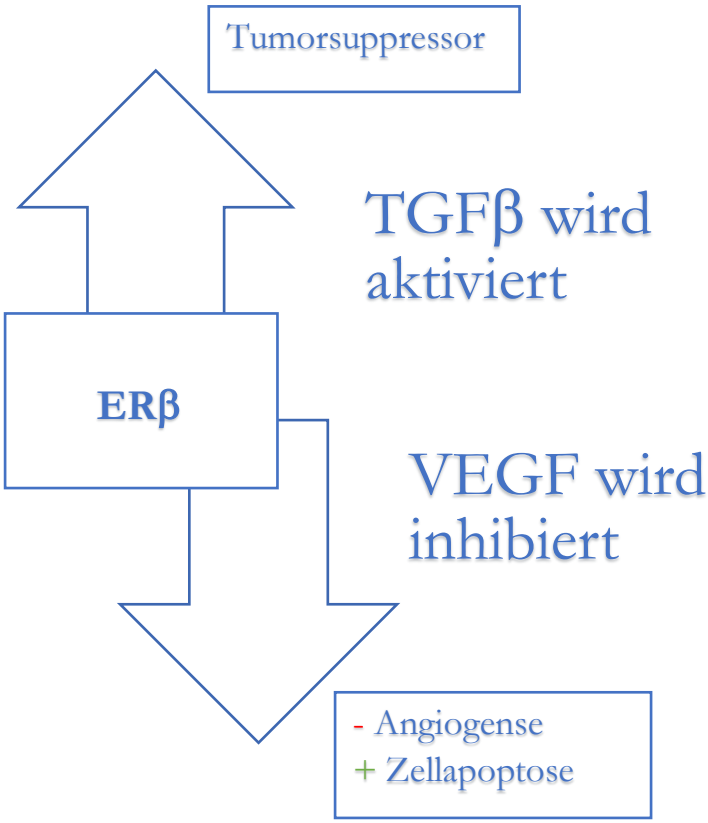


Abbildung 28: Wirkungsweise ERβ

4.1 Ausblick

Diese Arbeit hatte zum Ziel herauszustellen, inwieweit sich der *knockdown* des Transmembranrezeptors GPER auf die antiinvasive Wirksamkeit von spezifischen ERβ-Agonisten auswirkt. Vorangegangene Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass TNBC ERβ und GPER exprimieren. ERβ ist ein nukleärer Östrogenrezeptor und zeichnet sich im Gegensatz zu ERα durch antiproliferative, antiinvasive, prodifferenzierende und zellapoptotische Eigenschaften aus. GPER ist ein membranständiger G-gekoppelter Rezeptor, der eine rapide Signaltransduktion innerhalb der Zelle induziert. Es findet eine Aktivierung von wachstumsfördernden, invasiven und schließlich metastasierenden Prozessen statt.

Es konnte herausgearbeitet werden, dass ein *knockdown* des membranständigen GPER einen Rückgang der Metastasierung von TNBC zur Folge hat. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Behandlung der Zellen mit spezifischen ERβ-Agonisten bei GPER-knockdown eine deutliche Reduktion des Metastasierungsverhaltens hervorruft. Es ist somit davon auszugehen, dass GPER unabhängig von ERβ agiert, aber untereinander Wechselwirkungen der Signalkaskaden vorhanden sind. Auf translationaler Ebene ist davon auszugehen, dass der *knockdown* von GPER eine vermehrte Proteinexpression von ERβ zur Folge hat. Demnach begünstigt

der *knockdown* von GPER mit folgender Expressionssteigerung von ERβ die Wirkungsweise von ERβ.

Der *knockdown* von GPER und die Aktivierung von ERβ durch spezifische ERβ-Agonisten haben einen synergistischen Effekt. Sie zeigen beide eine anitiinvasive Wirkung in TNBC, in Kombination mit deutlich stärkerem Effekt.

Im Hinblick auf eine zielgerichtete Therapie für das TNBC sollten GPER und ERβ einen Angriffspunkt darstellen. Ebenfalls sollte in der histopathologischen Untersuchung des Tumorgewebes eine Differenzierung der Östrogenrezeptoren für eine bestmögliche Therapie vorgenommen werden. Des Weiteren kann GPER ein möglicher Ansatzpunkt für die Verhinderung von Tamoxifen-Resistenzen beim ERα-positiven Mammakarzinom werden.

5 Zusammenfassung

Das TNBC zeichnet sich histopathologisch dadurch aus, dass es weder Östrogen- oder Progesteronrezeptoren noch HER2 exprimiert. Unter den Brustkrebstypen handelt es sich bei dem TNBC um einen schwer therapierbaren, schnell metastasierenden und sehr aggressiven malignen Tumor. Durch eine fehlende Expression von Rezeptoren und damit fehlenden Angriffspunkt einer Therapie ist es bis dato noch nicht gelungen, eine spezifische Therapie für das TNBC zu entwickeln. Ein Tumorwachstum wird versucht zu verhindern, indem nach frühzeitiger Diagnose Chemotherapie, Strahlentherapie oder eine chirurgische Therapie eingesetzt werden. Oft betrifft diese Erkrankung jüngere Frauen, ist assoziiert mit der *BRCA1/2*-Mutation und verläuft nicht selten letal.

In dieser Arbeit wurde stellvertretend für das TNBC mit den Zelllinien MDA-MB 231 und HCC 1806 gearbeitet. Zunächst gelang der *knockdown* des Transmembranrezeptors GPER mittels Transfektion von spezifischer siRNA. Der Nachweis dieses *knockdowns* erfolgte auf transkriptioneller Ebene durch RT-PCR und auf translationaler Ebene durch das Western Blot-Verfahren. Ebenfalls wurde im Western Blot die Auswirkung des GPER-*knockdowns* auf die Proteinexpression von ERα und ERβ untersucht. In beiden Zelllinien wurde eine ERα-Proteinexpression nachgewiesen. Im Vergleich wurde eine deutlich höhere ERβ-Proteinexpression festgestellt sowie im Vergleich zur Kontrolle bei GPER-*knockdown* ein Anstieg der ERβ-Proteinexpression detektiert.

Die Zellinvasion konnte anhand einer Kokultur mit Osteoblasten ähnlichen Zellen MG63 unter Verwendung von Matrigel Matrix (BD Matrigel™Basement Membran) durch eine künstliche Basalmembran untersucht werden. Der *knockdown* von GPER bewirkte eine signifikant reduzierte Invasion von TNBC-Zellen MDA-MB 231 und HCC 1806. Darüber hinaus wurde unter zusätzlicher Verwendung von spezifischen ERβ-Agonisten ein weiterer Rückgang der Invasivität festgestellt. Somit ergibt sich, dass der *knockdown* von GPER einen positiven Effekt auf das ossäre Metastasierungsverhalten von TNBC-Zellen unter Behandlung von spezifischen ERβ-Agonisten ausübt.

Diese Erkenntnis sollte sich für weitere Forschungsarbeiten an einer zielgerichteten Therapie für das TNBC zunutze gemacht werden.

6 Literaturverzeichnis

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

Al-thoubaity FK (2020): Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. Ann Med Surg 49, 44-48

Alzahrani W, Althoubaity F, Alsobhi D, Mohamed Y, AlMutairi A, Sindi D, Alharbi R, Zaidi N (2019): Clinicopathological Features and Metastatic Pattern of Triple-positive Breast Cancer Among Female Patients at a Tertiary Care Hospital. Cureus 11, e6458

Badowska-Kozakiewicz AM, Budzik MP (2016): Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. Contemporary Oncology 6, 436-443

Buonomo OC, Caredda E, Portarena I, Vanni G, Orlandi A, Bagni C, Petrella G, Palombi L, Orsaria P (2017): New insights into the metastatic behavior after breast cancer surgery, according to well-established clinicopathological variables and molecular subtypes. PLOS ONE 12, e0184680

Cheang MCU, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, Chia SK, Goldstein LC, Gelmon KA, Huntsman D, Gilks CB, et al. (2006): Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. J Clin Oncol 24, 5637-5644

Cheang MCU, Martin M, Nielsen TO, Prat A, Voduc D, Rodriguez-Lescure A, Ruiz A, Chia S, Shepherd L, Ruiz-Borrego M, et al. (2015): Defining Breast Cancer Intrinsic Subtypes by Quantitative Receptor Expression. Oncologist 20, 474-482

Chen Y, Wang J, Hong DY, Chen L, Zhang YY, Xu YN, Pan D, Fu LY, Tao L, Luo H, Shen X-C (2017): Baicalein has protective effects on the 17β-estradiol-induced transformation of breast epithelial cells. Oncotarget 8, 10470-10484

Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptors ER and ER in proliferation in the rodent mammary gland. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 3739-3746

Du G-Q, Zhou L, Chen XY, Wan X.P, He YY (2012): The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative and invasive effects induced by hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 420, 343-349

GEKID, ZfKD: Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe; Robert Koch-Institut, Berlin 2019

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

Girgert R, Emons G, Gründker C (2019): Estrogen Signaling in ERα-Negative Breast Cancer: ERβ and GPER. Front Endocrinol 9, 781

Haldosén LA, Zhao C, Dahlman-Wright K (2014): Estrogen receptor beta in breast cancer. Mol and Cell Endocrinol 382, 665-672

Hinsche O, Girgert R, Emons G, Gründker C (2015): Estrogen receptor β selective agonists reduce invasiveness of triple-negative breast cancer cells. Int J Oncol 46, 878-884

Huang Z, Yu P, Tang J (2020): Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model. Can Pharm J 13, 5395-5405

Ivers LP, Cummings B, Owolabi F, Welzel K, Klinger R, Saitoh S, O'Connor D, Fujita Y, Scholz D, Itasaki N (2014): Dynamic and influential interaction of cancer cells with normal epithelial cells in 3D culture. Cancer Cell Int 14, 108

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordón-Cardo C, Guise TA, Massagué J (2003): A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell 3, 537-549

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K (2010): Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. J Clin Oncol 28, 3271-3277

Koehler KF, Helguero LA, Haldosén LA, Warner M, Gustafsson JÅ (2005): Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor β. Endocr Rev 26, 465-478

Leitlinienprogramm Onkologie L (Hrsg.): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms: Langversion 4.1, September 2018. 4. Auflage, revidierte Ausgabe; Zuckschwerdt, Germering 2018

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM (2006): Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: A key to understanding ER-beta signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13162-13167

Leung YK, Lee MT, Lam H.M, Tarapore P, Ho SM (2012): Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. J Steroid Biochem Mol Biol 77, 727-737

Liu Y, Xie S, Wang Yu, Luo K, Wang Yang, Cai Y (2012): Liquiritigenin inhibits tumor growth and vascularization in a mouse model of HeLa cells. Molecules 17, 7206-7216

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S (2004): The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-*fos* Up-regulation by 17β-Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. World J Biol Chem 279, 27008-27016

Matthews J, Gustafsson JÅ (2006): Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. Nucl Recept Signal 4, nrs.04016

Medeiros B, Goodale D, Postenka C, Lowes LE, Kiser P, Hearn S, Salmond N, Williams KC, Allan AL (2020): Triple-Negative Primary Breast Tumors Induce Supportive Premetastatic Changes in the Extracellular Matrix and Soluble Components of the Lung Microenvironment. Cancers (Basel) 12, 172

Momenimovahed Z, Salehiniya H (2019): Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast Cancer (Dove Med Press) 11, 151-164

Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, Shen J, Chen J (2015): A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin: A Review: The Pharmacology of ISL. Phytother Res 29, 969-977

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

Prat A, Adamo B, Cheang MCU, Anders CK, Carey LA, Perou CM (2013): Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. Oncologist 18, 123-133

Rice A, Cortes E, Lachowski D, Oertle P, Matellan C, Thorpe SD, Ghose R, Wang H, Lee DA, Plodinec M, del Río Hernández AE (2020): GPER Activation Inhibits Cancer Cell Mechanotransduction and Basement Membrane Invasion via RhoA. Cancers 12, 289

Schüler-Toprak S, Häring J, Inwald EC, Moehle C, Ortmann O, Treeck O (2016): Agonists and knockdown of estrogen receptor β differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. BMC Cancer 16, 951

Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013): On the origin of cancer metastasis. Crit Rev Oncol Hematol 18, 43-73

Smith SE, Mellor P, Ward AK, Kendall S, McDonald M, Vizeacoumar FS, Vizeacoumar FJ, Napper S, Anderson DH (2017): Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. Breast Cancer Res 19, 65

Vona-Davis L, Rose DP, Gadiyaram V, Ducatman B, Hobbs G, Hazard H, Kurian S, Abraham J (2014): Breast Cancer Pathology, Receptor Status, and Patterns of Metastasis in a Rural Appalachian Population. J Cancer Epidemiol 2014, 1-9

Wei Z, Er-li G, Yi-li Z, Qi Z, Zhang-yong Z, Gui-long G, Guo-rong C, Hua-min Z, Guan-li H, Xiao-hua Z (2012): Different distribution of breast ductal carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ with microinvasion, and invasion breast cancer. World J Surg Oncol 10, 262

Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, Yang XL, Wu YM, Chen XH, Huang HB, Liu HL, Cai SH, Du J, Wang HS (2014): The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. Cell Death Dis 5, e1428-e1428

Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson JÅ (2008): A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. Oncogene 27, 1019-1032

Zhao L, Huang S, Mei S, Yang Z, Xu L, Zhou N, Yang Q, Shen Q, Wang W, Le X, et al. (2018): Pharmacological activation of estrogen receptor beta augments innate immunity to suppress cancer metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A 115, E3673-E3681

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit, für das Engagement und die stets konstruktiven Anregungen. Einen weiteren Dank möchte ich Frau Sonja Blume und Frau Dr. Johanna Hellinger für die technisch-methodische Unterstützung und der wertvollen Betreuung der Arbeiten im Labor aussprechen.