

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

**BEDEUTUNG DES HUMANEN GENS *ICB-1* FÜR DIE
ANTIPROLIFERATIVE WIRKUNG VON ANTIÖSTROGENEN IN
MAMMAKARZINOMZELLEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Riedmeier

2019

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

**BEDEUTUNG DES HUMANEN GENS *ICB-1* FÜR DIE
ANTIPROLIFERATIVE WIRKUNG VON ANTIÖSTROGENEN IN
MAMMAKARZINOMZELLEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maria Riedmeier

2019

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck</i>
2. Berichterstatter:	<i>Prof. Dr. med. Christa Büchler</i>
Tag der mündlichen Prüfung:	05. Juni 2020

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis	IV
III.	Tabellenverzeichnis	VI
IV.	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
1.1	Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Pathologie	3
1.1.4	Klinik	4
1.1.5	Diagnostik	4
1.1.6	Therapie.....	6
1.2	Östrogensystem	8
1.2.1	Die Östrogenrezeptoren ER α und β	8
1.2.2	Signalwege der Östrogene.....	10
1.2.3	Bedeutung der Östrogene für die Entstehung und das progressive Wachstum von Brustkrebs	14
1.3	Antiöstrogensystem – Wirkmechanismus und Bedeutung für die endokrine Therapie bei Brustkrebs	19
1.3.1	Antiöstrogen Tamoxifen (SERM)	20

1.3.2	Antiöstrogen ICI 182,780	23
1.4	Verwendete Brustkrebszelllinie T-47-D	25
1.5	Das humane Gen <i>icb-1</i> im Allgemeinen und Bedeutung für die Karzinogenese	25
1.6	Zielsetzung der Dissertationsarbeit	30
2	Methoden	32
2.1	Material.....	32
2.1.1	Krebszelllinie.....	32
2.1.2	Chemische Komponenten.....	32
2.1.3	Hilfsmittel und Geräte	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	Zellkultur	38
2.2.2	Molekulargenetische Methoden	42
3	Ergebnisse	48
3.1	Transienter <i>knockdown</i> bei T-47-D Zellen.....	48
3.2	Proliferation der T-47-D Zellen nach Zugabe der Reagenzien	50
3.2.1	Überblick über das Experiment	50
3.2.2	Proliferationsverhalten unstimulierter T-47-D Zellen	51
3.2.3	Proliferationsverhalten der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2	52
3.2.4	Proliferationsverhalten der T-47-D Zellen nach Zugabe von Antiöstrogenen.....	54
3.3	mRNA-Level E2- und Proliferations-assoziiertes Gene bei T-47-D Zellen ...	72

3.3.1	Überblick.....	72
3.3.2	Ergebnisse der Genanalyse.....	73
4	Diskussion.....	81
4.1	Inhibierender Einfluss des Gens <i>icb-1</i> auf zelluläre Proliferation und das Östrogenansprechen der T-47-D Zellen.....	81
4.2	Einfluss des Gens <i>icb-1</i> auf das Ansprechen der T-47-D Zellen auf Antiöstrogene	87
4.2.1	Antiöstrogen ICI 182,780	87
4.2.2	Tamoxifen	93
4.3	Klinische Relevanz der Daten	98
4.4	Ausblick.....	100
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literaturverzeichnis	103
7	Eidesstattliche Erklärung.....	123
8	Danksagung.....	124

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der humanen Östrogenrezeptoren α und β im Vergleich	10
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Östrogenrezeptor-Mechanismen	14
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Östrogenmetabolismus	16
Abbildung 4 Zusammenfassende graphische Darstellung der vermuteten verantwortlichen Mechanismen für die östrogeninduzierte mamilläre Karzinogenese (92).....	18
Abbildung 5 Graphische Darstellung der Aktionsmechanismen von SERMs (Tamoxifen und Raloxifen) via ERE-abhängigen und ERE-unabhängigen (AP-1 gebundenen) Signalwegen im Zielgewebe	21
Abbildung 6 Schematische Darstellung der metabolischen Aktivierung von Tamoxifen zu phenolischen Metaboliten	22
Abbildung 7 Strukturformel von ICI 182,780, einem steroidalen Östrogenrezeptor-Downregulator (SERD) (114)	24
Abbildung 8 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Östradiol und Fulvestrant im Vergleich.....	24
Abbildung 9 Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen <i>icb-1</i> cDNA	27
Abbildung 10 Graphische Darstellung des transienten <i>icb-1 knockdowns</i> bei T-47-D Zellen....	48
Abbildung 11 Western Blot der Brustkrebszelllinie T-47-D zum Nachweis des <i>icb-1 knockdowns</i> auf Proteinebene.....	49
Abbildung 12 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf das Proliferationsverhalten der unbehandelten T-47-D Zellen.....	52
Abbildung 13 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf die Proliferation der T-47-D Zellen unter E2-Stimulation	54
Abbildung 14 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen ICI 182,780	59

Abbildung 15 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 (nach Herausrechnung des E2-Effekts).....	63
Abbildung 16 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Antiöstrogen 4-OH-Tamoxifen	67
Abbildung 17 Graphische Darstellung des Einflusses von <i>icb-1</i> auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen Endoxifen	71
Abbildung 18 Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1 knockdowns</i> auf die Expression der E2-Zielgene PR, ERα, PS2 und der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 der T-47-D Zellen.	75
Abbildung 19 Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1 knockdowns</i> auf die Expression der E2-Zielgene PR, ERα, pS2 der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2.	79
Abbildung 20 Graphische Darstellung des Einflusses des <i>icb-1 knockdowns</i> auf die Expression der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2.	80
Abbildung 21 Schematische Darstellung der Kontrolle der Zellzyklusprogression von der G1 in die S-Phase	84

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primer und die entsprechenden Sequenzen.....	34
Tabelle 2	Verwendete Stimulanzienkonzentrationen.....	50
Tabelle 3	Proliferation der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2.....	53
Tabelle 4	Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit ICI 182,780	56
Tabelle 5	relative Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit ICI 182,780 (nach Herausrechnung des E2-Effektes).....	61
Tabelle 6	Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen.....	65
Tabelle 7	Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Endoxifen.	69
Tabelle 8	Verwendete Primer und deren Zielgene	72
Tabelle 9	Expression von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach <i>icb-1 knockdown</i>	74
Tabelle 10	Expression der E2-Zielgene PR, ER α , PS2 und der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2	77
Tabelle 11	Expression von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2	78

IV. Abkürzungsverzeichnis

Speziell in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen:

.../con	Negativkontrolle einer Zelllinie
.../icbKD	<i>icb-1 siRNA transfizierte</i> Zellen einer Zelllinie
LMK	Lösungsmittelkontrolle

Allgemeines Abkürzungsverzeichnis: medizinische Fachbegriffe und –gesellschaften, in der Arbeit beschriebene Methoden, Gene und (bio)chemische Substanzen:

AF-1/2	activation-function 1 und 2
AIF	apoptosis-inducing factor
AIB1	amplified in breast1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATRA	all-trans Retinsäure
Bad	proapoptisches Protein
Bax	Bcl-2-associated x-protein, proapoptotisches Protein
Bcl-2, Bcl-x _L	BCL-/ B-cell lymphoma 2, x _L
BRCA1 und 2	breast cancer 1 und 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK 1, 2, 4, 6	Cyclinabhängige Kinase 1, 2, 4, 6

cDNA	complementary DANN
CIS	Carcinoma in situ
myc	c-myc, myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CT	Computertomographie
C _T	Treshold-Zyklus
CTB	CellTiter-Blue
CYP19	Cytochrom P19
CYP17A1	Cytochrom P17A1
CYP450	Cytochrom P450
C1ORF38	chromosome 1 open reading frame 38
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient F-12 Ham
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: engl.: Deoxyribonucleic acid)
DRIP	vitamin D receptor integrating protein

EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER α/β	estrogen receptor α/β
ERE	estrogen responsive element
ERR β	estrogen related receptor β
ESTs	expressed sequence tags
EtOH	Ethanol
E2F	E2F transcription factor
E1	Estron
E2	17- β -Östradiol
E3	16-Hydroxyestradiol/ Estriol
FBS	fetal bovine serum
FIRST	Fulvestrant First-Line Study Comparing Endocrine Treatments
FOS	c-fos, FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	growth hormone
GPCR-30, GPR-30	GPER1, G protein-coupled estrogen receptor 1,

GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
G ₀ -, G ₁ -, G ₂ -, M-, S-Phase	Zellzyklusphasen (G ₀ : Ruhephase, G ₁ : postmitotische Phase/ Präsynthesephase, G ₂ : prämitotische Phase / Postsynthesephase, S: Synthesephase, M: Mitose)
HEC-1B	human endometrial cancer-1B
HER2/neu	Her2/neu; human epidermal growth factor receptor2
HL-60	human promyelocytic leukemia 60
HRE	hormon response element
17-β-HSD	17-β-hydroxysteroid-dehydrogenase
HSP	heat-shock-protein
icb-1/ICB-1	C1orf38, induced by contact to basement membrane 1
ICD-10-GM	International Classification of Diseases, 10th Revision, German Modification
ICI 164,384	N-butyl-11-[(7R,8R,9S,13S,14S,17S)-3,17- dihydroxy-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17- decahydrocyclopenta[a]phenanthren-7-yl]-N- methylundecanamide
ICI 182,780	Fulvestrant TM , Markenname Faslodex, 13-methyl-7-[9-(4,4,5,5,5- pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]7,8,9,11,12,13,14,15 ,16, 17-decahydro-6H-cyclopenta[a] phenanthrene- 3,17-diol
IGF-1	insulin-like growth factor 1

JUN	c-jun, jun proto-oncogene
Ki67	Kiel-67
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LDL	low density lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LYN	Lck/Yes novel tyrosine kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEWEST	Neoadjuvant Endocrine Therapy for Women with Estrogen-Sensitiv Tumours
NLS	Kernlokalisierungssignal (englisch: nuclear localization signal)
NR3A	Nuclear receptor subfamily 3A
4-OH-N-desmethyl-TAM	Endoxifen
P-Box	prolamin box
PBS	phosphate buffered saline

PCR/qPCR	polymerase chain reaction/ quantitative PCR
PELP1	proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1
PI3K	Phosphoinositol3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
pS2	presenilin2, PSEN2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
p21, p27	CDKN1A, CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, 1B)
P53	tumor protein P53
Rb	Retinoblastom-Protein
RIP140	receptor-interacting protein-140
RNA	Ribonukleinsäure (englisch ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
RTK	receptor thyrosinkinase
SERD	selective estrogen receptor degrader
SERM	selective estrogen receptor modulator
siRNA	small interfering RNA

SK-OV-3	ovarian cancer cellline
SNP	single nucleotide polymorphism
SP-1	specificity protein 1, SP1, Sp1 transcription factor
SRC-1, 2 und 3	steroid receptor coactivator 1, 2 und 2
SR2	serum replacement 2
Tamoxifen/TAM/4-OH-Tamoxifen	(Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine
TGF β	transforming growth factor β
THEMIS2	thymocyte selection associated 2
TNM	TNM Classification of Malignant Tumors Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen
TRAP	thyroid hormone receptor associated protein
T-47-D	breast cancer cellline
UICC	Union internationale contre le cancer
VAV	proto-onkogene
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: World Health Organization)
XAF1	Xiap-associated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

AS	Aminosäure
°C	Grad Celsius

Allgemein gängige Abkürzungen:

ggf.	gegebenenfalls
bzw.	beziehungsweise
max.	maximal
ca.	circa

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom [ICD-10 GM: C50 (1)] ist der häufigste bösartige Tumor der Frau in den westlichen Industrieländern (2). Das Lebenszeitrisko für Frauen, an Brustkrebs zu erkranken, liegt statistisch gesehen bei etwa 10%. Aus den offiziellen Zahlen des Krebsregisters in Deutschland geht hervor, dass jährlich circa 71.600 Frauen und knapp 700 Männer neu erkranken. Somit wird auch deutlich, dass jedes 100. Mammakarzinom einen Mann betrifft (3, 4).

Nach aktuellen Daten liegt das mittlere Erkrankungsalter für Frauen bei 64 Jahren, bei Männern ist es durchschnittlich etwas höher. In Deutschland haben Frauen im Alter von 50 bis 70 alle zwei Jahre Anspruch auf ein Mammographie-Screening, da 45 % der Neuerkrankungen genau diese Altersgruppe betreffen (3, 5).

Epidemiologisch sind in Deutschland unterschiedliche Entwicklungstendenzen für Brustkrebs erkennbar. Seit vielen Jahren steigt die Anzahl der Neuerkrankungen an einem Mammakarzinom an. Diese langfristige Tendenz ist auf mehrere Ursachen zurückzuführen. Ein Grund ist die zunehmende Häufigkeit der Risikofaktoren für Brustkrebs, wie beispielsweise die Zunahme kinderloser Frauen, das höhere mittlere Alter der Frauen bei der ersten Geburt und die seit der Jahrhundertwende vermehrte Einnahme von Antikonzeptiva. Vermutet wird auch, dass durch die eingeführten Früherkennungsmaßnahmen wie das Mammographie-Screening mehr Mammakarzinome entdeckt werden als zuvor und der Diagnosezeitpunkt der Erkrankung deutlich vorgezogen wird (3, 4, 6). Gegenläufig zu dieser Entwicklung der Inzidenzzunahme nimmt die Mortalität des Malignoms jedoch insgesamt geringfügig ab. Der Rückgang der Brustkrebssterblichkeit beruht vermutlich auf dem Erfolg des Mammographie-Screenings. Dieses ist dafür verantwortlich, dass in der entsprechenden Altersgruppe weniger Brusttumore erst im bereits fortgeschrittenen Stadium entdeckt werden. Ebenso trägt der Fortschritt in den Therapiemöglichkeiten

erheblich zur sinkenden Sterberate bei. Derzeit liegt das relative 5-Jahres-Überleben bei 88% für Frauen und 77% für Männer (3, 5–7).

Interessanterweise existieren geographische Unterschiede in der Brustkrebsinzidenz. So hat Nordamerika nachgewiesen die höchsten Erkrankungsraten, gefolgt von Nordeuropa. Die niedrigsten Inzidenzraten wurden für Asien verzeichnet. Innerhalb von Europa ist außerdem auffällig, dass ein deutlicher Unterschied der Erkrankungshäufigkeit zwischen Ost und West besteht, indem in westlichen Ländern wesentlich mehr Brustkrebsfälle diagnostiziert werden als in Osteuropa. Bei den Mortalitätsraten ist diese geographische Differenz weniger stark ausgeprägt (3, 4).

1.1.2 Ätiologie

Bei der Entstehung von Brustkrebs spielen verschiedene Risikofaktoren eine Rolle. Besonders anfällig für Brustkrebs sind kinderlose Frauen und Mütter mit niedrigen Geburtenzahlen, einer späten ersten Schwangerschaft (im Alter von über 30 Jahren) oder einer kurzen Stillzeit. Als ungünstig angesehen werden außerdem ein frühes Menarchenalter (vor dem 12. Lebensjahr) und ein spätes Menopausenalter (nach über 52 Jahren) (4, 8, 9). Des Weiteren gehen höheres Lebensalter, ein hoher sozioökonomischer Status, Diabetes mellitus, postmenopausale Adipositas, Tabakrauchen und erhöhter Alkoholkonsum mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher (4, 10, 11). Falls bereits ein Mammakarzinom auf der Gegenseite der Brust oder eine fibrozystische präkanzeröse Mastopathie auf derselben Seite besteht, ist das Erkrankungsrisiko der Brust um den Faktor 10 erhöht. Auch allgemeine Risikofaktoren für Karzinogenese, wie beispielsweise erhöhte Strahlenbelastung, sind an dieser Stelle zu nennen. Ist ein Carcinoma in situ (CIS) an der Mamille vorhanden, entwickelt sich daraus später oft ein invasives Mammakarzinom (2, 4).

Studien zeigen, dass die Einnahme hormonaler Kontrazeptiva und Hormonersatztherapien das Risiko für die Entstehung von Brustkrebs leicht erhöhen. Besonders in den Wechseljahren der Frau steigt mit einer Hormonsubstitution die Wahrscheinlichkeit der Krebserkrankung. Ungünstig ist, wenn die hormonellen Medikamente über einen langen Zeitraum (über 5 Jahre) hinweg eingenommen werden (4, 12–14). Liegt das Absetzen der Kontrazeptiva jedoch bereits mehr als 10 Jahre zurück, besteht kein erhöhtes Risiko mehr an Brustkrebs zu erkranken (13).

Der bedeutendste bekannte Risikofaktor für das Mammakarzinom ist die familiäre Brustkrebsbelastung. Schätzungsweise entstehen rund 7 % der Tumoren durch genetische Prädisposition (12, 15). Falls in der Verwandtschaft ersten Grades eine Frau an Brustkrebs erkrankte, ist das Risiko selbst zu erkranken je nach Alter ca. 2 bis 3-fach erhöht (16). Am häufigsten liegen hierbei Defekte in den Genen BRCA-1 und BCRA-2 vor (17, 18). Es ist bekannt, dass bei einer vorhandenen Mutation im BRCA1-Gen die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken bei 60-80% liegt (15, 18, 19). Eine Mutation im BRCA2-Gen weist ein ähnlich hohes Risiko auf (20, 21). Bei Vorliegen dieser Genmutationen, welche zugleich mit einem enorm erhöhten Risiko für Ovarialkarzinome verbunden sind (21), wird die regelmäßige Durchführung einer intensivierten Früherkennung empfohlen. Diese umfasst das Abtasten der Brust, sowie eine Mammosonographie, eine Mammographie und ein MRT (22–24). Als Maßnahme der Primärprävention für Brustkrebs wird die prophylaktische Mastektomie angeboten. Diese äußerst effektive Methode senkt das Risiko der genetisch vorbelasteten Patienten an Brustkrebs zu erkranken um rund 90% (5, 25–27). Neben diesen beiden sehr häufigen Genmutationen sind unter anderem Veränderungen in den Genen P53, PTEN und ATM mit erhöhter Gefahr für Brustkrebs assoziiert (28).

1.1.3 Pathologie

Kennzeichnend bei der Ausbildung des Brustmalignoms ist, dass der Tumor in der Regel sehr langsam wächst. Am häufigsten (bei über 50% der Fälle) ist das Karzinom im äußeren oberen Quadranten der Brust lokalisiert. Histologisch werden die nicht invasiven Karzinome (CIS) von den invasiven unterschieden. Es existieren ausgehend von den Milchgängen eine duktale Form, eine lobuläre Form, welche ihren Ursprung in den Lobuli oder Azini der Brustdrüse hat, und weitere seltenere Unterformen wie beispielsweise das tubuläre, papilläre, medulläre, inflammatorische oder das mukoide Karzinom (4, 11). Mit 50-80% ist das invasive duktale Karzinom das häufigste, gefolgt von dem invasiven lobulären Karzinom mit 15% (29). Ungünstigerweise metastasieren Mammakarzinome relativ häufig und früh, sodass zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits 50% der Betroffenen von Metastasen befallen sind. Lymphogen streut der Tumor vor allem in die ipsilaterale Axilla oder in parasternale Lymphknoten. Bei einer hämatogenen Metastasierung ist das Skelett

betroffen, weiterhin auch die Pleura, Lunge, Haut, Leber, Ovarien, Nebennieren, das ZNS und der Uterus (4, 11).

1.1.4 Klinik

Hinsichtlich der klinischen Symptome von Brustkrebs ist zu erwähnen, dass es keine direkten frühen Symptome gibt. In der Regel fällt als erstes ein tastbarer, meist derber und verschieblicher Knoten in der Brust auf. Bei positivem Tastbefund befindet sich der Tumor jedoch meist in einem bereits fortgeschrittenen Stadium. Als späte Zeichen für ein Brusttumorgeschehen sind in der Fachliteratur unter anderem Hauteinziehungen im Bereich des Tumors, Mamillenretraktionen, das Phänomen der Orangenhaut, hervorgerufen durch ein lokales Lymphödem über dem Tumor, Veränderungen in der Brustgröße, Entzündungen und Ödeme der Haut sowie vergrößerte axilläre und/oder supraklavikuläre Lymphknoten beschrieben (2, 4).

1.1.5 Diagnostik

Generell erfolgt die Diagnostik des Mammakarzinoms stufenweise in drei wichtigen Schritten mit der klinischen Untersuchung, der apparativen Diagnostik und schließlich der bildgebungsgesteuerten minimalinvasiven Biopsie (5).

Am Anfang jeder Erstdiagnostik steht die ausführliche Anamnese, um wichtige Hinweise auf mögliche Risikofaktoren, familiäre Belastung und ggf. eigene Beobachtungen des Patienten über Brustveränderungen zu erhalten. Nach wie vor gelten als Basis jeder diagnostischen Untersuchung die Inspektion und Palpation der Mammae und ihrer Lymphabzüge. Hierbei werden Auffälligkeiten wie Verhärtungen oder Formveränderungen der Brust erkannt, als auch die Größe und gegebenenfalls Schmerzhaftigkeit von Lymphknoten im axillären, infra- und supraklavikulären Bereich untersucht. Ein Klopfschmerz im Bereich der Knochen kann einen ersten Hinweis auf vorhandene Knochenmetastasen geben (4, 5, 30–32). Die klinische Untersuchung alleine ermöglicht jedoch keine definitive Diagnose und auch die Beurteilung einer möglicherweise bereits erfolgten Metastasierung in das Lymphgebiet der Axilla ist unsicher (33).

Falls die klinische Untersuchung einen auffälligen Befund ergibt, erfolgt als nächste Stufe die bildgebende Diagnostik. Essentielle Basisuntersuchung hierbei ist die Mammographie in zwei Ebenen. Bereits Tumore ab einer Größe von 5 mm können bei dieser Untersuchung detektiert werden. Empfohlen wird diese weiterführende Diagnostik bei klinischen Auffälligkeiten an Frauen über 40 Jahren (4–6, 34–36). Alternativ wird vor dem 40. Lebensjahr die Mammosonographie als strahlenfreie, bildgebende Untersuchung durchgeführt (5). Gleichfalls wird bei eingeschränkter mammographischer Sensitivität aufgrund hoher Dichte und bei unklaren mammographischen Befunden die Mammosonographie als diagnostische Möglichkeit herangezogen (5, 37). Als dritte Möglichkeit der bildgebenden Verfahren besteht das Kontrastmittel-MRT, welches allerdings nur gesondert bei speziellen Fragestellungen oder unklaren sonographischen und mammographischen Befunden eingesetzt wird (5, 38).

Als diagnostische Sicherung des Mammakarzinoms kommt schließlich nach auffälligem Befund der klinischen und apparativen Untersuchung die bildgebungsgesteuerte minimalinvasive Biopsie zum Einsatz. Mittels Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder offener Exzisionsbiopsie wird eine Gewebeprobe der verdächtigen Brust entnommen (5, 39–41). Anschließend wird das gewonnene Biopsat der Mammae histopathologisch untersucht (5, 42). Bestimmt werden histologischer Typ und Differenzierungsgrad des Brustgewebes. Ebenso werden immunhistochemisch der Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus und das Vorhandensein des HER-2-Proteins, des Proliferationsproteins Ki67 sowie weiterer Proteine als wichtige prognostische Parameter mit untersucht (4, 5, 43, 44). Die histologische Klassifizierung bei invasiven Mammakarzinomen erfolgt mit dem Grading-Score nach WHO (Elston und Ellis-Modifikation des Bloom und Richardson-Gradings). So lassen sich tubuläre Differenzierung, die Zellkernpolymorphie und die Mitoserate beurteilen (45, 46). Bei positivem histopathologischem Befund wird die Diagnose Brustkrebs definitiv gestellt (5, 44).

Ist ein Mammakarzinom lokal fortgeschritten und besteht der Verdacht auf bereits vorhandene Metastasierung, ist anschließend ein präoperatives Staging mittels Röntgen-Thorax-Untersuchung, abdominaler und gynäkologischer Sonographie, Skelettszintigraphie und ggf. CT-Schädel bei neurologischer Klinik erforderlich. Um

Überdiagnostizierung zu vermeiden, sind diese Untersuchungen in frühen Tumorstadien nicht empfohlen (5, 44, 47, 48).

Der letztendlich vorliegende Befund aus Untersuchungen und pathohistologischen Biopsien erlaubt die Stadieneinteilung des Brusttumors mittels TNM-Klassifikation nach aktueller UICC (Stadium I bis IV) oder mittels der 2007 verabschiedeten St.Gallener-Risikoeinteilung, welche zwischen Low-risk-, Medium-risk- und High-risk-Mammakarzinomen differenziert. Zudem erfolgt je nach Lymphknotenbefall eine klinische Einteilung der axillären Lymphknoten von Level I bis III (4, 49). Anhand der Stadieneinteilung des Tumors können anschließende Planungen der Therapieoptionen möglichst präzise durchgeführt werden.

1.1.6 Therapie

Als essentieller Baustein in der Therapie des invasiven Mammakarzinoms gilt die operative Therapie. Generell wird für die frühen, nicht fortgeschrittenen Tumore eine lokale Resektion im Gesunden empfohlen (5, 44, 50). Der Tumor sollte mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1mm entfernt werden, da dadurch das Lokalrezidivrisiko signifikant gesenkt werden kann (51). Bei der frühen Form des invasiven Mammakarzinoms hat der Patient die Möglichkeit der Wahl zwischen der brusterhaltenden Operation mit anschließender Bestrahlung der Mamma und der alleinigen radikalen Mastektomie mit anschließender plastischer Rekonstruktion der Brust (52). Beide Methoden sind hinsichtlich der Überlebensrate als gleichwertig anzusehen (5, 44, 53). Tumore mit diffusen, malignen Mikrokalzifikationen oder mit Multizentrität, inflammatorische Mammakarzinome sowie bestehende Kontraindikationen zur postoperativen Bestrahlung nach lokaler brusterhaltender Therapie sind jedoch eindeutige Indikationen für die Entfernung der kompletten Brust (5, 52). Um den histologischen Lymphknotenstatus sicher bestimmen zu können, wird standardgemäß in Deutschland intraoperativ der Sentinel-Lymphknoten entfernt (54). Erkannt wurde, dass die Entfernung dieses „Wächterknotens“ zur Lokalkontrolle gleichwertig ist zur früher standardmäßig durchgeführten kompletten axillären Lymphnotenentfernung (55) und zudem mit einer deutlich geringeren postoperativen Morbidität einhergeht (56). Bei Metastasen-positivem Ergebnis des Lymphknotens

bzw. bei fehlendem Sentinel-Lymphknoten wird eine axilläre Dissektion durchgeführt (5, 44).

Obligat in der Therapie von Brustkrebs sind neben der operativen Versorgung die adjuvanten Maßnahmen, welche Bestrahlung, Hormontherapie, Antikörpertherapie und Chemotherapie umfassen (4, 5).

Nach brusterhaltender Operation wird standardgemäß postoperativ die gesamte Brust bestrahlt (5, 57). Nach radikaler Mastektomie wird Patienten mit einem hohen Risiko für lokale Rezidivierung eine Radiatio der Brustwand empfohlen (5, 52, 58).

Die systemischen medikamentösen adjuvanten Therapieformen (Hormontherapie, Antikörpertherapie und Chemotherapie) erfolgen prä- oder postoperativ, entweder sequentiell oder in Kombination. Bei Östrogen- und Progesteronrezeptor-positivem Status empfehlen die deutschen Leitlinien eine endokrine Therapie. Mittel erster Wahl für prämenopausale Patientinnen ist das Antiöstrogen Tamoxifen in einem Behandlungszeitraum von 5 Jahren (5, 59). Befindet sich eine Frau bereits in der Postmenopause, werden bevorzugt Aromatasehemmer der 3. Generation gegeben (60, 61). Bei hormonrezeptornegativen Tumoren, jungem Patientenalter (<35 Jahren) und positivem Lymphknoten- und Her2/neu-Status empfiehlt sich die adjuvante Chemotherapie. Als Standardchemotherapeutika werden anthrazyklin- und taxanhaltige Medikamente über einen Zeitraum von 18-24 Wochen eingesetzt (5, 52, 62). Ob eine Chemotherapie vor der Operation, sprich neoadjuvant, oder adjuvant durchgeführt wird, ist hinsichtlich der Mortalität gleichbedeutend. Ist ein Tumor primär inoperabel oder handelt es sich um ein inflammatorisches Mammakarzinom, ist eine neoadjuvante systemische Chemotherapie als Standard vorgesehen (63, 64). Bei Her2-Überexpression im Tumor ($\geq 1\text{cm}$) erhalten die Patienten im Rahmen einer Antikörpertherapie das Medikament Trastuzumab für ein Jahr entweder neoadjuvant oder adjuvant (5, 52).

1.2 Östrogensystem

1.2.1 Die Östrogenrezeptoren ER α und β

1.2.1.1 Struktureller Aufbau der Rezeptoren

Östrogene wirken in den entsprechenden Zielgeweben hauptsächlich über die zwei Östrogenrezeptoren (ER) α und β . Sie gehören der Gruppe der sogenannten *Steroid/Nuclear Receptor Superfamily* an, der größten Familie bekannter Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten. Innerhalb dieser werden sie der *Nuclear Receptor Subfamily 3A* (NR3A) zugeordnet (65). Die Östrogenrezeptoren - normalerweise im Nukleus lokalisiert- besitzen die Eigenschaft, nach Aktivierung durch Östrogene die Transkription östrogenassoziierter Gene zu initiieren. Neben den ERs umfasst die *Steroid/Nuclear Receptor Superfamily* mitunter die Steroidrezeptoren für Progesteron, Androgen, Glucokortikoide und Mineralokortikoide, als auch Rezeptoren für das Thyroidhormon, Vitamin D und Retinsäure (66–68). Wichtige DNA-Sequenzen der nukleären Rezeptoren sind hochgradig konserviert und erlauben somit Rückschluss auf einen gemeinsamen molekularen Ursprung. Die Einteilung der Rezeptorstruktur erfolgt in sechs funktionelle Domänen A-F vom N- zum C-terminus (69). Am N-terminalen Ende des Östrogenrezeptorproteins befindet sich die in Sequenz und Länge hochvariable A/B-Domäne. Sie enthält die Transaktivierungsdomäne (AF-1), welche durch Interaktion mit Komponenten des Transkriptionskomplexes, Koaktivatoren und anderen Transaktivatoren die Transkription östrogenregulierter Gene aktiviert und moduliert. Diese kann sogar ligandenunabhängig aktiviert werden, abhängig vom Phosphorylierungsstatus von ER. Die benachbarte C-Domäne ist hoch konserviert und enthält die DNA-bindende Domäne. Über zwei Zinkfingerformationen leitet sie die Dimerisierung des Rezeptors ein und bewirkt eine gezielte Bindung des Rezeptors an spezielle DNA-Sequenzen, die sogenannten *hormon response elements* (HREs). Anschließend folgt die D-Domäne, eine variable *Hinge*-Region, welche ihre Konformation ändern kann. Bei den Östrogenrezeptoren ER α und β hat die Region Sequenzen für die Dimerisierung des Rezeptors und eine Signalsequenz, die der Kernlokalisierung des Rezeptors dient (NLS). Funktionell komplex und breit stellt sich die E-Domäne als ligandenbindende Domäne (LBD) dar. Die LBD

beinhaltet eine zweite Transaktivierungsdomäne (AF-2), welche durch Liganden aktiviert wird und synergistisch zur AF-1 arbeitet. In der Regel sind in der E-Region zudem Sequenzen, die wichtig sind für die Interaktion mit den als Chaperon bezeichneten Hitzeschockproteinen (HSPs). Im Liganden-ungebundenen Zustand lagert sich ein Multiproteinkomplex aus Chaperon an den Steroidrezeptor an und gewährleistet dadurch, dass die Rezeptoren in einem inaktiven, aber funktionellen Zustand sind. Am C-terminalen Ende des Östrogenrezeptorproteins liegt die F-Domäne, welche vermutlich eine Rolle in der Unterscheidung zwischen Östrogenagonisten und -antagonisten einnimmt (66–72).

1.2.1.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede von ER α und β

Während ER α bereits Ende der 1950er Jahre identifiziert und einige Jahre später die cDNA des humanen ER α aus einem Gewebe der Brustkrebszelllinie MCF-7 isoliert worden war (73, 74), wurde ER β erst später entdeckt und dessen cDNA erstmals schließlich Ende der 90er Jahre aus humanem Gewebe kloniert (75).

Das Gen von ER α liegt auf Chromosom 6 und besteht –wie die Gene aller Steroidrezeptoren- aus 8 Exons. Protein ER α umfasst 595 AS und weist ein Molekulargewicht von 65.000kDa auf. Hingegen ist das Gen des Rezeptors ER β , welcher mit einer Größe von 530 AS geringfügig kleiner ist als ER α , auf Chromosom 14 lokalisiert. Somit handelt es sich bei den beiden Rezeptoren um keine Isoformen (69, 73, 76). Die DNA-Bindungsdomänen (DBDs) der beiden Typen sind mit einer Homologie von 95% strukturell nahezu identisch, während die A/B-Domänen mit AF-1 mit nur 30% Sequenzähnlichkeit sehr different sind. Dies ist vermutlich der Grund dafür, dass die beiden Rezeptoren für die Aktivierung der Transkription von größtenteils unterschiedlichen Genen verantwortlich sind (77). Zudem sind die LBDs und die AF-2 der beiden Rezeptoren verschieden (58% Homologie), was eine unterschiedliche Affinität Liganden zu binden zur Folge hat (72, 73, 78). Obwohl beide Rezeptortypen gleiche Affinität für das Hormon 17- β -Östradiol besitzen, ist beispielsweise die Affinität von ER β für die Antiöstrogene Tamoxifen-4-OHT und ICI 164,384 doppelt so hoch wie die für ER α (79).

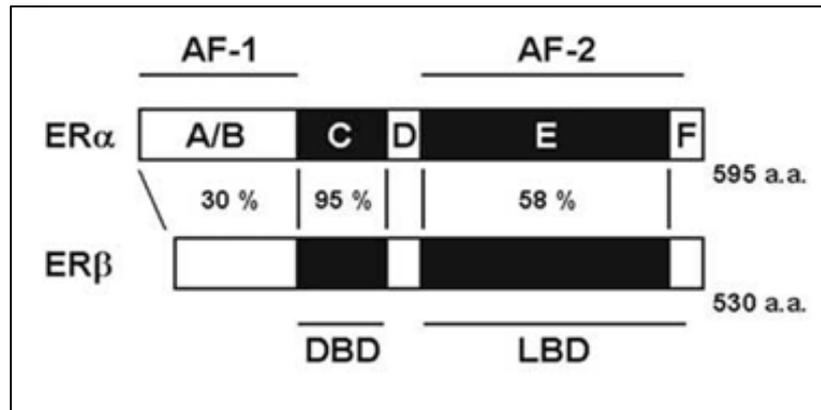


Abbildung 1 Schematische Darstellung der humanen Östrogenrezeptoren α und β im Vergleich

Gezeigt werden die einzelnen strukturellen Domänen vom N-terminalen zum C-terminalen Ende (A/B-Domäne: AF-1; C-Domäne: DBD; D-Domäne: Hinge-Region; E/F-Domäne: LBD, AF-2) sowie die prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen ER α und β (72)

Auch die Verteilung der beiden Östrogenrezeptoren ER α und β in den verschiedenen Geweben unterscheidet sich. ER α wird vorrangig in den weiblichen und männlichen Geschlechtsorganen wie der Brustdrüse, im Uterus, in den Thekazellen des Ovars, dem Hoden, Nebenhoden und im Prostatastroma exprimiert, aber auch im Knochen und in der Leber. ER β hingegen ist wesentlich breiter über den gesamten Körper verteilt, vor allem in Prostataepithel, Brustdrüse, Harnblase, Granulosazellen des Ovars, Lunge, Uterus, Hoden, Gehirn, Blase, Kolon und Immunsystem. Eine Koexpression beider Rezeptoren findet sich im Fettgewebe, im kardiovaskulären System und im ZNS (80, 81). Studien ergaben, dass die Funktion eines Östrogenrezeptorliganden als Agonist oder Antagonist je nach Zielgewebe und -gen variieren kann. Diese gewebsabhängige Funktion der Liganden ist eine essentielle Grundlage für die Entwicklung medikamentöser, östrogenspezifischer Behandlungsstrategien von Brustkrebs (78).

1.2.2 Signalwege der Östrogene

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung existieren zwei wesentlich unterschiedliche Signalwege, über welche die intrazellulären Östrogenaktionen vermittelt werden: der „klassische“ Weg über die Östrogenrezeptoren ER α und β mit langfristigen genomischen Effekten sowie der „nicht-genomische“ Signalweg für die schnellen östrogenregulierten Aktionen der Zellen. Zudem können

Östrogenrezeptoren ligandenunabhängig durch Modifikationen aktiviert werden und somit Wirkung zeigen. (73, 82, 83)

1.2.2.1 Der genomische Signalweg der Östrogenaktionen

Der genomische Signalweg basiert auf einem Zusammenspiel von Östrogenrezeptoren ER α und β , dem Liganden und den sogenannten Effektoren, bestehend aus der DNA mit ihrem HREs und den Coaktivatoren, -regulatoren und –repressoren (84). Nach Binden des lipophilen 17- β -Östradiol (E2) als Ligand an ER α und β erfolgt eine Phosphorylierung mit anschließender Konformationsänderung des Rezeptors. An der DBD des aktivierten Rezeptors bewirkt die sogenannte P-Box die Dimerisierung zweier rezeptorspezifischer Zinkfinger, bestehend aus einem Komplex aus Zink-Ionen und Cysteinen. Die P-Box des DBD wiederum erkennt und bindet hochspezifisch die ERE (*estrogen response element*), eine palindromische Sequenz auf dem Zielgen. EREs sind in oder nahe der Promotorregion der Gene lokalisiert und fungieren als sogenannte *Enhancer*, als Transkriptionsaktivatoren. Die Östrogenrezeptoren können sowohl als Hetero- als auch als Homodimere gebunden werden (68–70, 72). Eine wichtige Determinante der Bindungsqualität von ER an die DNA ist die Sequenz des ERE. Beispielsweise bindet ER α mit höchster Affinität das ERE des Vitellogenins A2, hingegen weniger gut die EREs anderer Gene wie Vitellogenin B1, pS2 und Oxytoxin.

Neben dieser direkten ER-E2-ERE-Bindung werden ca. 35% der humanen primären E2-responsiblen Gene ERE-unabhängig durch eine indirekte Assoziation des Östrogenrezeptors mit der DNA transkribiert. Dieser als *transkriptional cross-talk* bezeichnete Mechanismus benötigt einen zweiten DNA-bindenden Transkriptionsfaktor, der schließlich die Assoziation des ER mit einer anderen Kategorie von Genpromotoren vermittelt und die Transkription des entsprechenden Gens initiiert. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor für die indirekte DNA-Bindung ist das Stimulationsprotein-1 (SP-1). Dieses ist für die östrogensensitive Transkription verschiedener Gene wie beispielsweise des LDL-Rezeptors und des CyclinsD1 verantwortlich. Als weiterer bedeutender Transkriptionsfaktor für die indirekte ER-DNA-Bindung fungiert der AP-1-Komplex, bestehend aus Jun-Protein-Dimeren und Jun/Fos-Heterodimeren. Dieser spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Zellproliferation und aktiviert östrogensensitive Gene wie die Kollagenase, den IGF-

1-Rezeptor, Ovalbumin und CyclinD1. Studien zufolge agieren ER α und β hierbei als Gegenspieler. Während ER α -E2 die AP-1-abhängige Transkription aktiviert, inhibiert ER β -E2 diese. Vermutlich geschieht dies durch das Fehlen einer funktionsfähigen AF-1 in ER β , welche zusammen mit AF-2 für die Aktivierung der AP-1-responsiblen Elemente benötigt wird (72, 73).

Um die Transkription der Gene schließlich zu initiieren, ist bei beiden Signalwegen, dem direkten und dem indirekten, eine kooperative Interaktion aus multiplen Faktoren, wie den basalen Transkriptionsfaktoren und Komodulatoren, am Genpromotor nötig. Erst wenn dieser Transkriptions-Initiations-Komplex aus den verschiedenen Faktoren gebildet ist, bindet die RNA-Polymerase II an die DNA und beginnt mit der Transkription der östrogenresponsiblen Gene. Kofaktoren aus Koaktivatoren und –repressoren beeinflussen die Fähigkeit der ER-Liganden, die Genexpression zu regulieren. Als wichtige Gruppe von ER-Kofaktoren ist die *Steroid Receptor Coactivator (SRC) Family* zu nennen, bestehend aus SRC-1, SRC-2 und SRC-3. Leukinreiche Bausteine im Zentrum der Kofaktoren ermöglichen die Interaktion mit ER, sodass eine Plattform gebildet wird, an die sich ergänzende Proteine anheften können. Durch verschiedene rekrutierte Transferasen werden die Histone der DNA methyliert und acetyliert, woraus eine Öffnung des Chromatins resultiert. Schließlich entsteht ein großer Komplex aus Koaktivatoren, bezeichnet als TRAP/DRIP (*thyroid hormone receptor associated protein/vitamin D receptor integrating protein*), welcher eine direkte Bindung von ER an die basalen Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Neben den aktivierenden Kofaktoren existieren Korepressoren wie beispielsweise das RIP140 (*receptor-interacting protein-140*), welche die Transkription durch verschiedene Prozesse verhindern und somit im Zusammenspiel mit den Koaktivatoren für die Regulation der Expression östrogeninduzierter Gene wichtig sind. Weitere Einflussfaktoren, die in den ER-ERE-Bindungsprozess eingreifen und transkriptionell regulierend wirken, sind auch der Zelltyp sowie posttranslationale Modifikationen von ERs und Koaktivatoren, welche die Transkription inhibieren. (70, 72, 73)

1.2.2.2 Der rapide, nicht-genomische Signalweg der Östrogenaktionen

Neben diesem klassischen, genomischen Weg können Östrogene innerhalb weniger Minuten sehr schnelle Effekte in der Zelle erzielen, die nicht durch die Aktivierung

von DNA und anschließender Proteinsynthese zu erklären sind. Dieser nicht-genomische oder rapide Signalweg ist assoziiert mit der Aktivität verschiedener Protein-Kinase-Kaskaden, welche vermutlich durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zu indirekten Veränderungen in der Genexpression führen können. Die Mechanismen, die dem nicht-genomischen Signalweg unterliegen, sind sehr verschieden und komplex und variieren je nach Zelltyp und der entsprechenden Verfügbarkeit von intrazellulären Molekülen. Bekannte rapide Östrogenwirkungen sind die Mobilisierung von intrazellulärem Calcium, die Stimulation der Adenylat-Cyclase-Aktivität und anschließender cAMP-Produktion sowie die Aktivierung der MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinase), der PI3K (Phosphoinositol3-Kinase) und der Membran-RTKs (Membran-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren) (72, 73, 83).

Dieser schnelle Wirkmechanismus der Östrogene wird hauptsächlich über membrangebundene ERs erreicht. Bei diesen auf der Zellmembran gelegenen Rezeptoren handelt es sich um verschiedene Varianten von ER α und β als auch vor allem um den erst später entdeckten Östrogenrezeptor GPER-1. Dieser G-proteingekoppelte heptahelikale Rezeptor (GPCR-30/GPR-30/GPER-1) bewirkt nach selektiver Bindung an Östrogen die Aktivierung einer Adenylatcyclase und der Transaktivierung von EGFR (*epidermal growth factor receptor*). Der Östrogenrezeptor GPER-1, welcher strukturell nicht verwandt ist zu ER α und β , wirkt vor allem im ZNS, im Immunsystem, in den reproduktiven Organen, in der Niere und im kardiovaskulären System. Bisherige Studien zeigen eine positive Assoziation zwischen der Expression von GPER-1 und der Progression von Krebs in den reproduktiven Organen der Frau (83, 85).

Weiterhin können ERs ligandenunabhängig durch Phosphorylierung der Rezeptoren selbst oder ihrer Kofaktoren aktiviert werden. Verantwortlich für diese Modifikation sind die Proteinkinasen A und C sowie extrazelluläre Signale. Letztere umfassen Zytokine, Zellzyklusregulatoren, Neurotransmitter und Peptidwachstumsfaktoren wie beispielsweise EGF, Insulin, IGF-1 oder TGF β (69, 83).

Die Existenz und Komplexität dieser vielfältigen Signalwege erklären vermutlich grundlegend die Tatsache, dass Östrogene je nach Zelltyp sehr unterschiedliche Wirkungen zeigen können, und gewährleisten eine sehr genaue, zellspezifische Regulation östrogenresponsibler Gene (83).

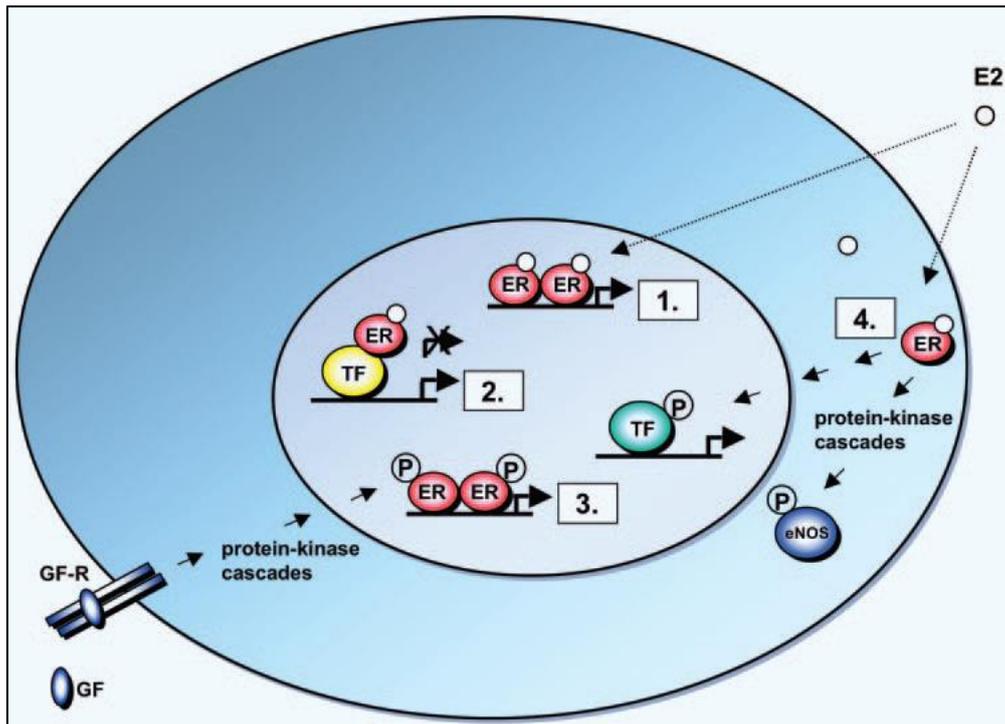


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Östrogenrezeptor-Mechanismen

1. Klassischer genomischer Signalweg der ERs: Nukleäre E2-ERs binden direkt an die EREs in den Zielgenpromotoren. 2. ERE-unabhängiger genomischer Signalweg: E2-ER-Komplexe werden durch Protein-Protein Interaktionen an einen Transkriptionskomplex (TF) angebunden, welcher den Zielgenpromoter aktiviert. 3. Liganden-unabhängiger genomischer Mechanismus: Wachstumsfaktoren (GF) aktivieren Protein-Kinase-Kaskaden. Dies resultiert in Phosphorylierung (P) und Aktivierung von nukleären ERs an EREs. 4. Nicht-genomischer Signalweg: Membrane E2-ER-Komplexe aktivieren Protein-Kinase-Kaskaden. Dies führt zu einer veränderten Funktion der Proteine im Zytoplasma wie beispielsweise die Aktivierung von eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) oder zu einer Regulation der Genexpression durch Phosphorylierung (P) und Aktivierung von TF. (86)

1.2.3 Bedeutung der Östrogene für die Entstehung und das progressive Wachstum von Brustkrebs

Dem weiblichen Geschlechtshormon Östrogen kommt eine bedeutende Rolle zu in der Entwicklung des weiblichen Phänotyps und dem physiologischen Wachstum der Brust während der Pubertät (87). Hohe Östrogenspiegel gehen jedoch einher mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs (88). Durch welche genauen Wirkmechanismen die Östrogene für die Karzinogenese und das progressive Wachstum der Brust verantwortlich sind, ist nach derzeitigem Stand der Forschung noch nicht bis ins Detail verstanden. Studien zeigen, dass zwei verschiedene Mechanismen der östrogenabhängigen Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms existieren:

ein bereits gut erforschter, durch ER α vermittelter Prozess der Karzinogenese und Tumorprogression und ein erst später entdeckter Mechanismus der Brusttumorgenese durch genotoxische Effekte von Östrogenmetaboliten, unabhängig von Östrogenrezeptoren (89, 90). Zum besseren Verständnis werden in den anschließenden Abschnitten beide Mechanismen im Einzelnen ausführlich beschrieben.

1.2.3.1 Metabolismus von Östrogenen und dessen Bedeutung für die Entstehung und die Progression von Brustkrebs

Experimente zeigen, dass Östrogene auf einem ER-unabhängigen Weg zur Entstehung und der Progression von Brustkrebs beitragen. Die Ursache dieser Karzinogenese wird im Metabolismus des humanen Östrogens vermutet (91).

Wie alle Steroidhormone hat das Östrogenhormon seinen Ursprung im C27-Cholesterol. In einem ersten Schritt wird das Cholesterol, stimuliert durch LH, in die Mitochondrien der ovariellen Theka-interna-Zellen eingeschleust und zu „Pregnenolon“ konvertiert, welches als Vorbotenmolekül für alle Steroidhormone fungiert. Durch ein Enzym, einem Produkt des CYP17A1-Gens, wird dieses zu Progesteron und Androstendion umgewandelt. Letzteres wird – reguliert durch FSH – in den ovariellen Granulosazellen durch das Enzym 17- β -HSD weiter metabolisiert zu Androgen und schließlich zu Östrogen. Die Konversion von Androgen zu Östrogen erfolgt durch die Aromatase CYP19. Außer in den Ovarien kommt dieses Enzym auch im peripheren Gewebe vor und ist hierbei hauptsächlich für eine geringe Resterhaltung der Östrogensynthese in der Postmenopause der Frau verantwortlich. Die Aromatase ist durch ihre zentrale Rolle im Östrogenmechanismus ein wichtiger Angriffspunkt für Behandlungsansätze östrogenabhängiger Krankheiten, wie Brustkrebs oder Endometrialkrebs (87, 90).

Es existieren drei wichtige Östrogenformen im menschlichen Körper: das Estradiol (E2), das Estron (E1) und das 16-Hydroxyestradiol, auch Estriol (E3) genannt, welches vorwiegend in der Schwangerschaft dominiert. Estradiol wird in den Granulosazellen der Ovarien synthetisiert und gilt bei prämenopausalen Frauen als das biologisch aktivste Östrogen des Körpers. In der postmenopausalen Phase

hingegen kommt dem Estron, synthetisiert in peripherem Gewebe, die größte Bedeutung zu (90).

Wichtig für das Verständnis der Tumorgenese und des progressiven Brustwachstums durch den Metabolismus von Östrogenen ist die Tatsache, dass die Östrogene in den Zielgeweben (so auch in der Brust) weiter metabolisiert werden. Es sind drei kompetitive Signalwege bekannt, durch die Estradiol und Estron durch NADPH-abhängige CYP450-Enzyme irreversibel hydroxyliert werden und somit zu Catechol-Östrogenen (*2-hydroxy-* (*2-OH-*) oder *4-hydroxy-estrone/estradiol* (*4-OH-E1/E2*)) und zu 16a-Hydroxyestron konvertieren: die 2-Hydroxylierung, die 4-Hydroxylierung und die 16-Hydroxylierung. Diese Metaboliten werden anschließend durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu inaktiven, nicht-genotoxischen Methoxy-Östrogenen konjugiert und können ausgeschieden werden.

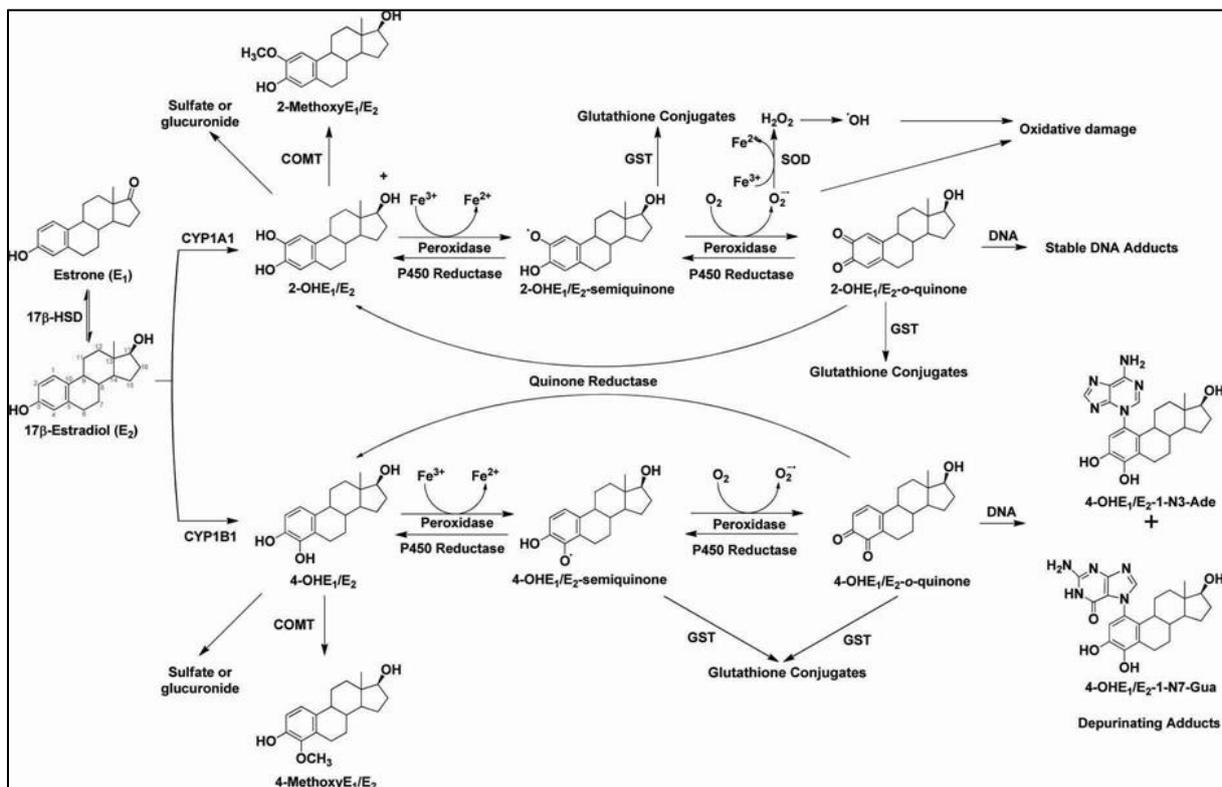


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Östrogenmetabolismus

Dargestellt sind die endogenen Östrogene, Estron (E1) oder 17- β -Östradiol (E2), die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies während der Redoxreaktionen und die Reaktion von Quinonen mit DNA-Basen. Die Entstehung von Hydroxyradikalen von 4-OHE1/E2 ist nicht dargestellt, der Entstehungsprozess entspricht dem von 2-OHE1/E2. (*2-OHE*: 2-Hydroxyestrogen; *4-OHE*: 4-hydroxyestrogen; *COMT*: catechol O-methyltransferase; *GST*: glutathione S-transferase; *17 β -HSD*: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *CYP*: cytochrome P450; *SOD*: superoxide dismutase) (92)

Entscheidend ist, dass die CYP-Enzyme, die für die Hydroxylierung der Östrogene verantwortlich sind, zusammen mit Peroxidase-Enzymen auch die Oxidation der Catechol-Östrogene zu Östrogenquinonen und –semiquinonen katalysieren. Diese Metaboliten gelten als Karzinogene und verursachen durch Reaktion mit der DNA kritische Mutationen (89, 90, 93, 94). Außerdem bilden sich bei der entsprechenden Rückreduktion reaktive Sauerstoffradikale (ROS), welche verantwortlich sind für oxidative Schäden zellulärer Moleküle wie DNA, Lipide und Proteine. Die COMT hat normalerweise die wichtige Funktion, diese Reaktion von Catechol-Östrogenen zu Quinonen zu verhindern und somit die Entstehung gefährlicher ROS zu inhibieren. Genetische Polymorphismen dieses protektiven Enzyms führen jedoch zu einem Funktionsverlust und folglich zu einem signifikant erhöhten Risiko für die Entstehung und der Progression von Brustkrebs (90). Auch die Hydroxylierungsprodukte selbst weisen eine gewisse Karzinogenität auf. Vor allem 16alpha-Hydroxyestrion initiiert unkontrollierte DNA-Synthese und bewirkt verstärktes Wachstum der mamillären Epithelzellen. Von den Catechol-Östrogenen ist 4-OHE1/2 vermutlich genotoxisch, verursacht durch Bildung von depurinierten Addukten, die Mutationen der DNA mit nachfolgendem oxidativen Schaden generieren und somit onkogen wirken (89, 90). Die Metaboliten 2-OHE1/2, entstanden durch 2-Hydroxylierung der Östrogene, weisen hingegen wahrscheinlich keine Karzinogenität auf, wobei hierbei gegensätzliche Studien existieren. In einigen Forschungsarbeiten wird gezeigt, dass diesen 2-OHE1/2 Metaboliten ein antiproliferativer Effekt zukommt, indem sie das Zellwachstum von Brustkrebszellen verhindern (95, 96). Andere Studien besagen jedoch, dass, wie die anderen Hydroxylierungsprodukte des Östrogenmechanismus auch, die 2-OHE1/2-Produkte durch Redoxreaktionen und Radikalfreisetzung zu DNA-Schäden führen und somit genotoxisch wirken.

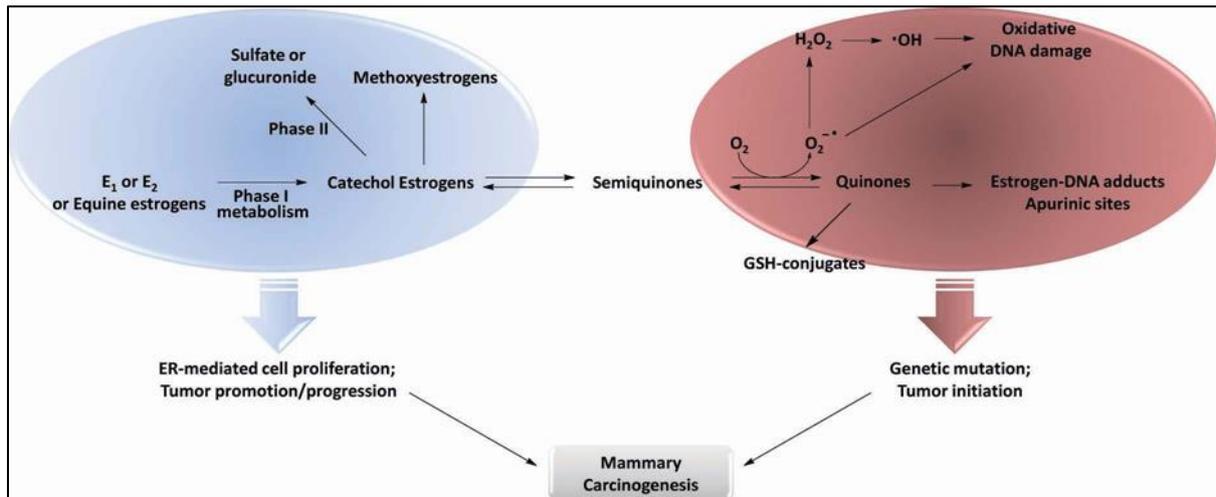


Abbildung 4 Zusammenfassende graphische Darstellung der vermuteten verantwortlichen Mechanismen für die östrogeninduzierte mamilläre Karzinogenese (92)

1.2.3.2 Bedeutung des ER-vermittelten Signalwegs für die Karzinogenese und das progressive Wachstum der Brust

Besser erforscht als der rezeptorunabhängige Mechanismus des Östrogens für die Entstehung und die Progression von Brustkrebs ist der ER-vermittelte Signalweg. Über ihre Rezeptoren bewirken die Östrogene verstärkte Proliferation der Brustkrebszellen, die mit einer erhöhten Gefahr für Karzinogenese und verstärktem Brusttumorstadium einhergeht. Durch die schnelle Zellteilung werden die Mutationsreparaturmechanismen zunehmend ineffektiver. Dies resultiert in unkontrolliertem Zellwachstum und einer Promotion und Progression von Brusttumoren. Zudem werden Protoonkogene aktiviert und die Apoptoseaktivität der Zellen unterdrückt. (89, 92)

Die beiden Östrogenrezeptoren ER α und β spielen hierbei eine entscheidende, gegensätzliche Rolle. Studien ergaben, dass ER α für die Stimulation von Onkogenen verantwortlich ist, die an der Regulation der Zellzyklusprogression und dem Wachstum von Brustepithel beteiligt sind. Übermäßige Expression von ER α in mamillärem Gewebe hat verstärkte Zellproliferation, unkontrollierte Stimulation des Brustwachstums und somit ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs zur Folge (73, 97). Ein sehr bekanntes ER α -responsibles Onkogen ist beispielsweise CyclinD1, welches in Brustkrebs bis zu 50% überexprimiert ist, vor allem in ER α -positiven Tumoren.

Dieses Gen ist verantwortlich für die Aktivierung von CyclinE-Cdk2 und induziert eine Progression des Zellzyklus. Da die CyclinD1-Überexpression sowohl bei Vorstufen von Brustkrebs als auch bei invasiven Mammakarzinomen besteht, wird davon ausgegangen, dass das Gen in Kooperation mit anderen Onkogenen entscheidend ist bei der progressiven Entwicklung von Brustkrebs (98–100). Weiterhin induziert ER α im Sinne einer rapiden Östrogenantwort eine verstärkte c-myc-Expression. Dies aktiviert CyclinE-Cdk2 und beschleunigt somit die Zellzyklusprogression mit dem Ergebnis einer gesteigerten Zellproliferation. Neben ER α induzieren auch ER α -Koregulatoren wie AIB1, SRC-1 oder PELP1 die Expression von Genen, welche die Karzinogenese, die Progression und ferner die Metastasierung von Mammakarzinomen begünstigen (98, 101, 102). Dem Östrogenrezeptor ER β kommt hinsichtlich der Karzinogenese und des Wachstums der Brustkrebszellen eine zu ER α entgegengesetzte, protektive Funktion zu, indem er vermutlich einen antiproliferativen Effekt auf das Brustgewebe ausübt. Die Tatsache, dass während der Karzinogenese ein geringeres Level an ER β im Vergleich zu normalen Brustgewebe nachzuweisen ist und die Ratio von ER α /ER β während der Tumorentstehung steigt, verdeutlichen die Rolle von ER β als Tumorsuppressor (73, 101).

1.3 Antiöstrogensystem – Wirkmechanismus und Bedeutung für die endokrine Therapie bei Brustkrebs

Wie im obigen Abschnitt 1.2.3 bereits erläutert, stimulieren Östrogene die Proliferation von epithelialen Brustzellen und implizieren die Pathogenese von Brusttumoren. Dieses Verständnis vom Mechanismus der Östrogenwirkung verdeutlicht die Wichtigkeit und das Potential von Antiöstrogenen - als Gegenspieler zu Östrogen- in der endokrinen Therapie von Mammakarzinomen. Im Folgenden werden aus der Gruppe von Antiöstrogenen die Substanzen Tamoxifen (SERM) und ICI, Faslodex (SERD), die in den Versuchsreihen dieser Dissertation verwendet werden, näher beschrieben.

1.3.1 Antiöstrogen Tamoxifen (SERM)

Das nicht-steroidale Antiöstrogen Tamoxifen (ICI 46,474 Nolvadex) gehört zur Gruppe der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) und wurde als erstes Antiöstrogen für die Behandlung aller Stadien von Brustkrebs zugelassen und eingesetzt (103, 104). In den aktuellen Leitlinien gilt Tamoxifen als Goldstandard in der endokrinen Therapie für Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positive Brusttumore bei prämenopausalen Frauen. Die Einnahme von Tamoxifen sollte mit 20 mg täglich über einen Zeitraum von 5 Jahren bzw. bis zum Rezidiv erfolgen (5).

Im Gegensatz zu reinen Antagonisten oder Agonisten besitzen die SERMs die Eigenschaft, auf verschiedene östrogensensible Zielgewebe selektiv agonistisch oder antagonistisch zu wirken. Diese besondere Pharmakologie von SERMs lässt sich durch verschiedene Mechanismen erklären: Zum einen findet in den verschiedenen Zielgeweben eine unterschiedliche Östrogenrezeptor-Expression statt. Während die SERMs als Liganden von ER β rein antagonistisch wirken, agieren sie nach Bindung an ER α partiell agonistisch. Des Weiteren können die Östrogenrezeptoren durch die Bindung an Liganden verschiedene Konformationen einnehmen und wirken dementsprechend unterschiedlich. Entscheidend für gewebsspezifische Wirkung der SERMs ist auch, dass das Vorhandensein von ER-Koaktivatoren und -Korepressoren je nach Östrogenzielgewebe variiert und diese Kofaktoren die Funktionen der Östrogenrezeptoren entsprechend gewebsspezifisch modulieren (104–106).

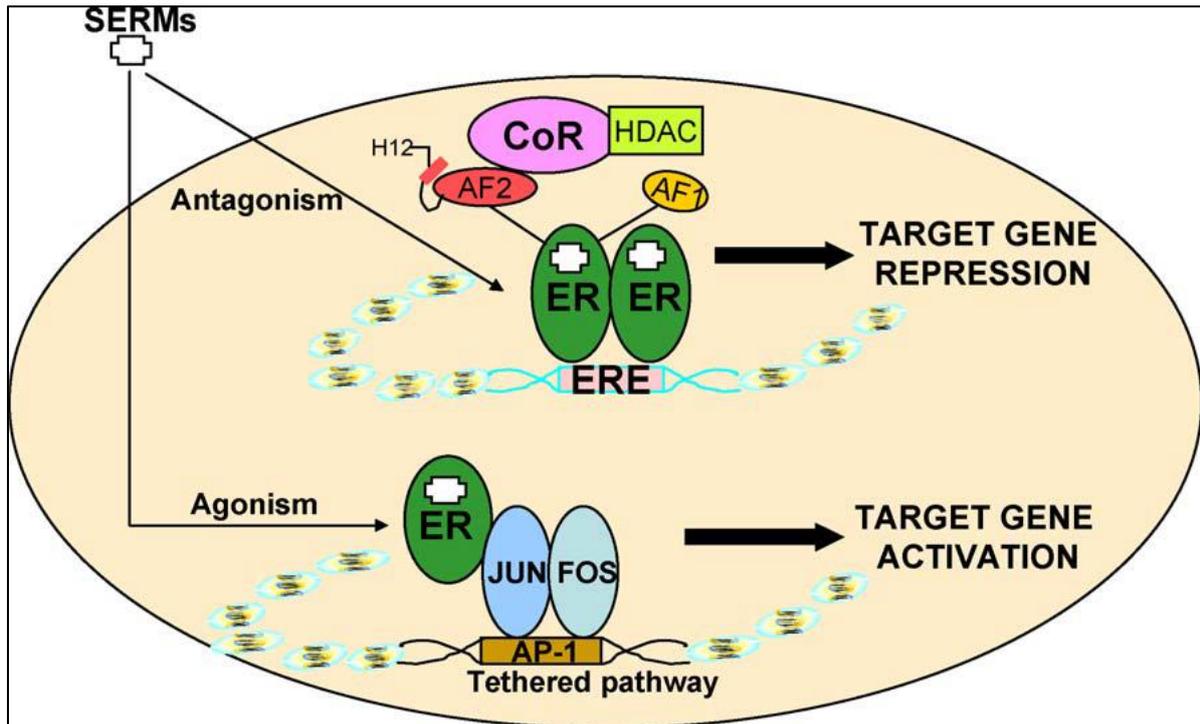


Abbildung 5 Graphische Darstellung der Aktionsmechanismen von SERMs (Tamoxifen und Raloxifen) via ERE-abhängigen und ERE-unabhängigen (AP-1 gebundenen) Signalwegen im Zielgewebe

Schematisch gezeigt wird, dass SERMs ERE-abhängig als Östrogenantagonisten agieren, jedoch AP-1 gebunden agonistische Funktionen aufweisen. Anders als Östrogen, welches die Interaktion von ERs mit Koaktivatoren ermöglicht, binden SERMs an ERs und induzieren verschiedene Konformationszustände, welche zu Interaktion von Korepressoren (CoR) und den ERE-abhängigen Promotoren führen. Dies inhibiert die Rekrutierung von basalen Transkriptionsmaschinerien und somit die Transkription. Im AP-1 gebundenen Signalweg interagieren SERM-gebundene ERs anstatt mit ERE mit dem AP-1 Protein, c-Jun und c-Fos und initiieren die Transkription eines alternativen *Response-Elements*. (107)

Tamoxifen hat die Struktur eines Triphenylderivats und ist eine Vorstufensubstanz, welche durch ein Panel an Cytochrom P450-Proteinen zu einer Vielzahl an primären und sekundären Metaboliten konvertiert und aktiviert wird (103, 108). Besondere Bedeutung unter den Metaboliten kommt dem primären Metabolit 4-OH-Tamoxifen und dem über die Zwischensubstanz N-desmethyl-TAM gebildeten sekundären Metabolit 4-OH-N-desmethyl-TAM, auch Endoxifen genannt, zu. Diese aktiven Substanzen weisen eine sehr starke Bindungsaffinität zu den Östrogenrezeptoren auf und besitzen ein vielfach höheres antiöstrogenes Potential als Tamoxifen selbst (108–111). Klinisch relevant ist diesbezüglich, dass die individuell unterschiedliche Aktivität von Cytochrom P450-Enzymen, genetisch oder durch medikamentöse Interaktionen bedingt, essentiellen Einfluss auf den Metabolismus von Tamoxifen hat

und somit grundlegend zur interindividuell vorhandenen Variabilität im Erfolg der Tamoxifentherapie beiträgt (103, 108).

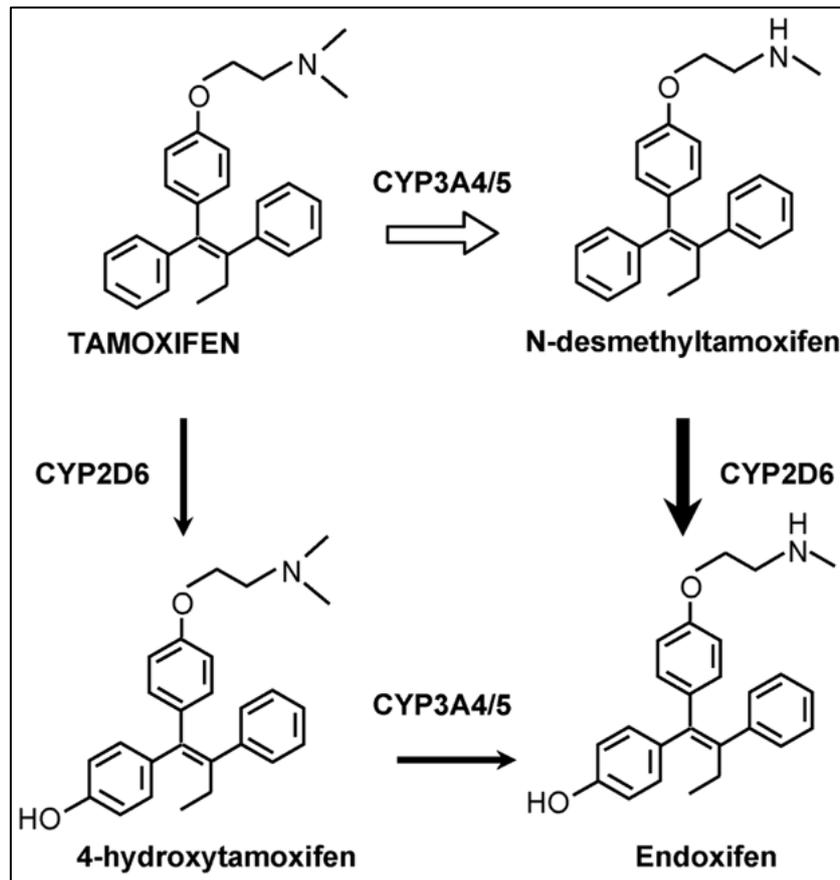


Abbildung 6 Schematische Darstellung der metabolischen Aktivierung von Tamoxifen zu phenolischen Metaboliten

Dargestellt sind die Strukturformeln von Tamoxifen und dessen phenolischen Metaboliten. Die entstandenen Metaboliten besitzen eine hohe Bindungsaffinität für die humanen Östrogenrezeptoren. Sowohl 4-Hydrox-Tamoxifen als auch Endoxifen sind *in vitro* potente Antiöstrogene. (103)

Tamoxifen und dessen Metaboliten konkurrieren mit Östrogen um die Bindung an den Östrogenrezeptor. Ebenso wie bei Östrogen kommt es bei der Bindung von Tamoxifen an die Rezeptoren zur Dimerisierung (107, 112). Im Gegensatz zu den E2-ER-Komplexen, bei denen die beiden transaktivierenden Domänen AF-1 und AF-2 vollständig aktiviert werden, wird durch die Tamoxifen-ER-Bindung die Rezeptorkonformation so verändert, dass zwar die AF-1 Domäne aktiviert wird, die AF-2 Domäne hingegen inaktiv bleibt. Somit ist der Rezeptor nach Bindung von Tamoxifen nur partiell aktiv und die Promoteraktivierung findet nur in Abhängigkeit von AF-1 statt (105, 112). Die Wirkung von Tamoxifen ist somit abhängig davon, ob es auf AF-

1 oder AF-2 dominierende Zellen trifft. Im Brustgewebe finden sich vor allem AF-2 dominierende Zellen, wodurch Tamoxifen auf die Mamma den bei der Brustkrebstherapie erwünschten antagonistischen Effekt zu Östrogen hat. Das Antiöstrogen wirkt zytostatisch und verlangsamt die Proliferation von Brustzellen, indem es die Progression von der G₁-Phase des Zellzyklus inhibiert (106). Desweiteren wirkt Tamoxifen proliferationshemmend auf die Brustkrebszellen, weil es indirekt das Level an IGF-1 in den Hepatozyten senkt. Der Effekt erklärt sich dadurch, dass Tamoxifen als Östrogenantagonist die Ausschüttung von GH aus der Hypophyse, welches die Produktion von IGF-1 stimuliert, vermindert. Das Level an IGF-1 kann so signifikant gesenkt werden. Dem Faktor kommt eine entscheidende Rolle als Trigger der Mitose in Brustkrebszellen zu. IGF-1 wirkt entsprechend proliferationsstimulierend auf die Malignomzellen der Mammae (113).

In anderen Organsystemen wie beispielsweise im Knochen, im kardiovaskulären System und im Uterus dominieren hingegen Zellen mit Promoteraktivierung durch AF-1. Hierdurch wirkt Tamoxifen in diesen Geweben Östrogen-agonistisch. Tamoxifen vermindert folglich als Östrogenagonist im Knochen die Inzidenz von Osteoporose und schützt im kardiovaskulären System vermutlich vor Arteriosklerose und koronaren Herzerkrankungen, indem es den LDL-Spiegel im Blut verringert. Da Tamoxifen auch am Uterus agonistisch zu Östrogen und somit proliferativ auf die Endometriumzellen wirkt, erhöht es bei einer längerfristigen Einnahme die Gefahr für Endometrialkarzinome signifikant (106, 112). Diese unerwünschten Nebenwirkungen von Tamoxifen und die Tatsache, dass viele initial auf das Antiöstrogen ansprechende Brusttumoren im Laufe der Therapie Resistenzen entwickeln, zeigen die Grenzen der Tamoxifentherapie auf. Sie sind Anlass für intensive Forschung an möglicherweise nebenwirkungsärmeren Alternativen zu dem SERM Tamoxifen (107).

1.3.2 Antiöstrogen ICI 182,780

ICI 182,780 (Faslodex), entdeckt Ausgang der achtziger Jahre, gehört zur Klasse der Östrogenrezeptor-Downregulatoren (SERDs). Diese unterscheiden sich in ihrer Wirkung von den bereits beschriebenen nicht steroidal, partial agonistischen SERMs als steroidale, pure Östrogenantagonisten, indem sie die Östrogenaktivität vollständig unterdrücken (114, 115).

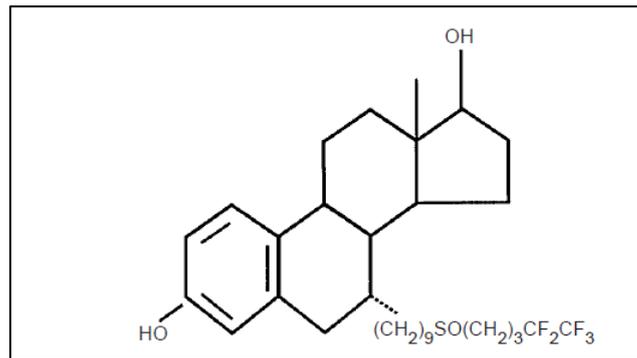


Abbildung 7 Strukturformel von ICI 182,780, einem steroidalen Östrogenrezeptor-Downregulator (SERD) (114)

Faslodex ist strukturell ein Östrogenanalogon verbunden mit einer Alkylsulphonyl-Seitenkette an Position 7 α . Wie Östrogen kann sich das Antiöstrogen kompetitiv an die Östrogenrezeptoren binden, beeinträchtigt dadurch allerdings die Rezeptor-Dimerisierung (114). Die Bindung bewirkt eine rapide Degradierung der Östrogenrezeptoren durch Abnahme der Rezeptorproteine und die aktivierenden Domänen AF-1/-2 bleiben inaktiv. Dieser Mechanismus inhibiert die Kernlokalisierung und die Rekrutierung von Koaktivatoren. Dies resultiert in einer kompletten Blockierung der Östrogenrezeptor-vermittelten Transkription. Studien zufolge reduziert Faslodex neben den Östrogenrezeptoren auch das Progesteronrezeptor-Level, wirkt antiproliferativ und induziert Apoptose in den Tumorzellen der Brust (114–117).

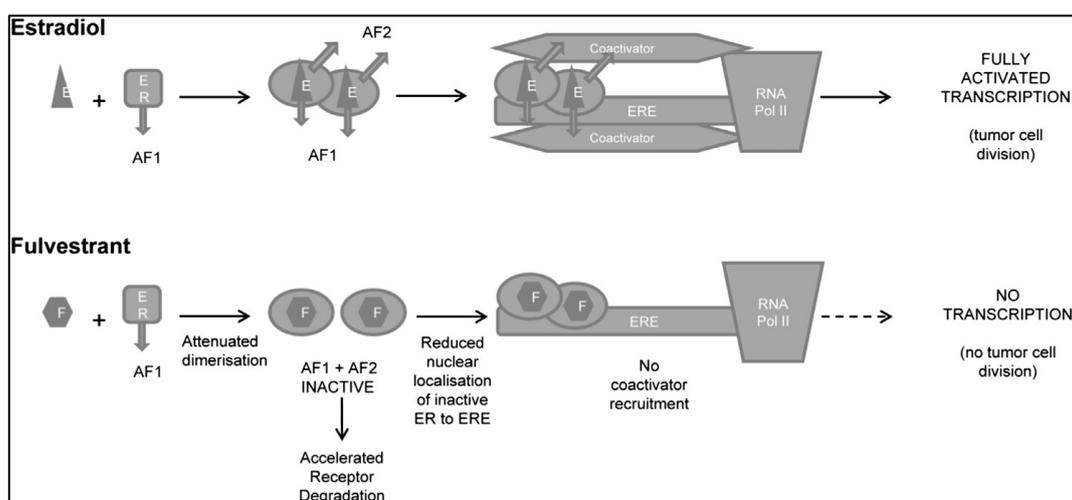


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Östradiol und Fulvestrant im Vergleich

(AF1: activation function 1; AF2: activation function 2; E: estradiol; ER: estrogen receptor; ERE: estrogen response element; F: fulvestrant; RNA Pol II: ribonucleic acid polymerase II) (117)

Indiziert ist die Einnahme von ICI 182,780 bereits für die Behandlung von postmenopausalen Frauen mit ER-positivem, lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs bei Auftreten eines Rezidivs oder Tumorprogression während oder im Anschluss an eine adjuvante Antiöstrogentherapie (117, 118). Aktuell laufen intensive Forschungen an weiteren Einsatzmöglichkeiten von Faslodex bei Brustkrebspatienten, beispielsweise prämenopausalen Frauen. Die potentiellen Vorteile von FulvestrantTM (Faslodex) als medikamentöse Therapie bei Mammakarzinomen sind zum einen die fehlenden östrogenvermittelten Nebenwirkungen wie sie bei dem Partialagonisten Tamoxifen auftreten. Zum anderen verbessert die monatliche parenterale Applikation von ICI 182,780 vermutlich die Compliance der Patienten verglichen mit der täglichen oralen Einnahme anderer endokriner Medikamente (117).

1.4 Verwendete Brustkrebszelllinie T-47-D

Im November 1974 wurde die Zelllinie T-47-D aus einem Pleuraerguss eines 54-jährigen Patienten mit inoperablem, disseminiertem duktalem Mammakarzinom der rechten Brust isoliert und anschließend etabliert. Die Tumorzellen sind epithelialen Ursprungs und formen ein Monolayer in Kultur. Sie enthalten spezifische hoch affine Rezeptoren für Östrogene, Glukokortikoide, Androgene und weisen bekanntermaßen ein sehr hohes Level an PR auf (119–121).

1.5 Das humane Gen *icb-1* im Allgemeinen und Bedeutung für die Karzinogenese

Die Arbeitsgruppe um Oliver Treeck konnte 1998 im Rahmen einer Forschungsarbeit das humane Gen *icb-1* identifizieren. Ziel des Experiments war primär, den Einfluss von extrazellulärer Matrix auf die Genexpression von Tumorzellen zu untersuchen. In diesem Kontext gelang es der Arbeitsgruppe *icb-1* als ein Gen zu identifizieren, welches in Differenzierungsprozesse, ausgelöst durch extrazelluläre Matrix, involviert ist. In Differenzierungsprozesse integrierte Gene könnten somit als potentielle prädiktive Marker für den Zustand der Differenzierung von Tumorzellen dienen. Darüber hinausgehend könnten diese durch extrazelluläre Matrix regulierten Gene

direkt als Therapietarget eingesetzt werden und erlauben ein bedeutendes Verständnis über den grundlegenden Mechanismus der Differenzierung von extrazellulärer Matrix.

Die Abkürzung des Gens *icb-1* steht für „*induced by contact to basement membrane 1*“ und deutet auf seine Eigenschaft hin, dass es bei der in-vitro Differenzierung der HEC1B humanen endometrialen Adenokarzinomzellen verstärkt exprimiert wurde, ausgelöst durch Kontakt der Zellen mit einer künstlichen Basalmembran (122). Das Gen *icb-1* (C1ORF38, THEMIS2) ist ein Gen aller Vertebraten (Euteleostomi). Es ist lokalisiert auf Chromosom 1 (27, 872, 543-27, 886, 685), enthält 7 Exons und codiert mindestens 4 verschiedene ICB-1 Proteine von 643 AS (72 kDa), 514 AS (58 kDa), 260 AS (29 kDa) und 123 AS (13.6 kDa). *icb-1* wird ubiquitär in allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert, ebenso in Tumorzellen verschiedener Art (122, 123). Die stärkste Expression findet in B-Zellen statt. Im Hinblick auf das Mammakarzinom wurde ICB-1 in der Membranfraktion von Mammakarzinom-Gewebe nachgewiesen, was eine mögliche Bindung an GRB2, VAV und LYN stützt (124).

5'		
GACCACGCGTATCGATGTCGACCCACAGGATTGTCACAGAGGGCAGGGTGGTACTGAGGACCAG		65
CTCCTCATGCTTGAGGCTGTGGTGTGACCTCGGGATCCGCTCTGCCCGCTGTGTCTGGGCAT		130
GGAGGGTCAGCAGGTCATCCTGCACCTGCCCTATCCCAGAAGGGGCCCTTCTGGACATGGGAGC		195
E G Q Q V I L H L P L S Q K G P F W T W E	◆	
CTAGTGCCCTCGAACTCTGCTCCAGGTCCTACAGGATCCAGCCCTGAAAGACCTCGTCCTCACC		260
P S A P R T L L Q V L Q D P A L K D L V L T		
TGCCCCACCCTGCCCTGGCATTCCCTGATCTGCGGCCCCAGTATGAGATCCAAGCCATCATGCA		325
C P T L P W H S L I L R P Q Y E I Q A I M H		
CATGCGCAGGACCATTGTCAAGATCCCTTCTACCCTGGAGGTCGACGTGGAGGACGTCACCGCCT		390
M R R T I V K I P S T L E V D V E D V T A		
CCTCCCGGCACGTCCACTTTATCAAACCGCTGCTGCTGAGCGAGGTCCTGGCCTGGGAAGGCCCT		455
S S R H V H F I K P L L L S E V L A W E G P		
◆		
TTCCCCCTGTCCATGGAGATCCTGGAGGTTCTGAGGGCCGCCCATCTTCTCAGCCCCGTGGGT		520
F P L S M E I L E V P E G R P I F L S P W V		
GGGCTCCTTGCAAAAAGGCCAGAGGCTTTGCGTCTATGGCCTAGCCTCACCACCCTGGCGGGTCC		585
G S L Q K G Q R L C V Y G L A S P P W R V		
□		
TGGCCTCAAGCAAGGGCCGCAAGGTGCCCAGGCACTTCTGGTGTGAGGGGGCTACCAAGGCAAG		650
L A S S K G R K V P R H F L V S G G Y Q G K		
◆		
○		
□		
CTGGCGGGCGGCCAAGGGAGTTCCCCACGGCCTATGACCTCCTAGGTGCTTCCAGCCAGGCCG		715
L R R R P R E F P T A Y D L L G A F Q P G R		
▲		
GCCACTCCGGGTGGTGGCCCAAAGGACTGTGAGGGCGAGAGGGAGGAGAATCCCGAGTTCACGT		780
P L R V V A T K D C E G E R E E N P E F T		
CCCTGGCTGTGGGTGACCGGCTGGAGGTGCTGGGGCCTGGCCAGGCCCATGGGGCCAGGGCAGT		845
S L A V G D R L E V L G P G Q A H G A Q G S		
□		
□		
▲		
GACGTGGATGTCTTGGTTTGTGACGGCTGAGTGACAGGCTGGGGAAGATGAGGAGGAAGAGTG		910
D V D V L V C Q R L S D Q A G E D E E E E C		
CAAAGAGGAGGCAGAGACCCAGAGCGGGTCTGCTGCCCTTCCACTTCCCTGGCAGTTTCGTGGA		975
K E E A E T Q S G S C C P S T S L A V S W		
◆		
GGAGATGAGTGACAGCCGGCGCTACAGCCTGGCAGATCTGACTGCCAGTTTTCAATGCCTTGTG		1040
R R *		
AGGTCAAGGTGGTGGCCAAGGACACCAGCCACCCCAATGACCCTCAGAACCTCCTTCTGGGCCT		1105
GCGGCTGGAGGAGAAGATCACAGAGCCATTCTTGGTGGTGGAGCCTGGACTCTGAGCTGGGATGTG		1170
CTTTGAGATCCCTCCCGGAGGCTGGACCTGACTGTCTGGAGGCCAAGGGGCAGCCAGACTTGC		1235
CAGAGGGGTCTCTCCCATAGCCACAGTGGAGGAAGCTGGAACAGACACCTTTATTATTGTCTT		1300
CGGAAGTTACCAGCCTGTGAGATCCAAGCCCCCACCAGGCCCTAAAAATCAGGGCCCTCAG		1365
CAAGCAGAGGAGACACAGCAGTGGAGGAGCGTCAAGTCTCTCAAGTCTTAGGATTGCAGCAAC		1430
ACGTTCCGGCTGCCAAACCAAGGCGAAGACCTTGGCAGAGTTCATCAAGGATGGCTCCAGTACG		1495
TACAGCAAGATTCTTCCACAGGAAGGGCCACAGGCCGCTAAGCCCCAAGGCAGGATCTAGA		1560
TGATGATGAACATGATTATGAAGAAATACTTGAGCAATTCAGAAAACCATCTAAGTGCTGGAGG		1625
AACCACGCTTCTTAAGTCTTCTCAGGGAATCCGACACCAGCCAACATTTTAAGCCTCTAA		1690
AAGACCTCGGGCAAGTCTCACAGAACTGAGCTGCAGACGGGGAGTAGCTTTGTGGAACCTGATT		1755
TGATGGACACTGCACCAGCTTCCCTCAGGTTCTAGATTCTTGCTACTTAGGGCGGGCTGGTTTG		1820
ACCTAACATCTCGCAGTACTCCCTCAGCCTCAGAGCCTTGGGATGCAGAGCAGCTGGCAGGGT		1885
TCCTCTCAATCCTGCAACCCAGCTGCCCACCGGTGGATGCAGAGGGGAAATCCGAGGCCATCAA		1950
CCTTGGTGACAGCAGCCAGTGCCTAATGCTGATCACACTGCATGGGAGATTTGTTAACGCTCTGC		2015
CACCCCCACTCTCACCCCCAAGCTCTAAGCCCCCGGGAGGCCTGGACTGTCTTCTCATCTCTGT		2080
AGCACCAAGCCTGATAGATCTGTATATGGTAAACAGGGGTTAACCACATGTGGTTAACATGGAT		2145
TAATGTGGGAATTTGGCTTCAAGAACAACCTTAGGACCTTGGGCCCCAAAAGCTGGTGGTGAA		2210
ATGAGAGGAGCCAATTTAAGAAGACCCCTTATGGAGACCTGAGGCTGCAGAAAAGCTGGTAGGTTCA		2275
TCAGGTGGTTAAGTCTGCAAGTTGTAAGTGACTAACCAAGATTATTTCAATTTAAAACACAG		2340
AAATAAAATGACACCTGAGCTTCTCC poly A 3'		

Abbildung 9 Nucleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der humanen *icb-1* cDNA

Raute: Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C. Dreieck: Phosphorylierungsstelle für Caseinkinase II. Quadrat: N-Myristoylierungsstelle. Kreis: Amidierungsstelle. Kasten: Nuclear-Targeting-Patterns. Fett: Polyadenylierungssignal (122)

In der DNA-Datenbank wurden keine Homologien zu der kodierenden Region nachgewiesen. Jedoch ergab die Sequenzierung von 24 kurzen cDNA Sequenzen, sogenannten ESTs, an verschiedenen Zelllinien und Geweben signifikante Übereinstimmungen (>95%) zu der 3' untranslatierten Region des cDNA-Klons von *icb-1*. Da die ESTs sich hauptsächlich in Tumor- oder fetalem Gewebe befinden, ist es naheliegend, dass eine Assoziation zwischen dem Gen *icb-1* und der Zellproliferation besteht (122).

Im Jahr 2002 konnte die Arbeitsgruppe um Oliver Treeck im Rahmen einer Forschungsarbeit zeigen, dass neben dem ursprünglich entdeckten Transkript *icb-1*, welches von diesem Zeitpunkt an als *icb-1 α* benannt wurde, zwei weitere Splicevarianten *icb β* und *icb γ* existieren. Zudem konnte eine weitere Isoform *icb-1 δ* des *icb-1* Gens identifiziert werden, welche speziell in der menschlichen Milz exprimiert wird. Es handelt sich jedoch vermutlich um keine vierte Splicevariante von *icb-1*, sondern um ein Transkript eines dem *icb-1* nahe verwandten Gens (123).

Die Ergebnisse der Studie ergaben zudem, dass während der in-vitro Differenzierung der HL-60 promyelotischen Leukämiezellen, induziert durch all-trans Retinsäure, Vitamin D3 oder DMSO, eine gesteigerte Expression des *icb-1* Transkriptes stattfindet. Dies galt sowohl für die monozytäre als auch für die granulozytäre Differenzierung. Dieser Nachweis postulierte *icb-1* als neuen Differenzierungsmarker bei HL60-Zellen (123).

Die weitere Forschung um das Gen *icb-1* im Jahr 2005 zeigte die gegenseitige Beeinflussung von Zytokin Interferon γ und *icb-1*. So konnte die Expression der mRNA von *icb-1 α* und *icb-1 β* durch Interferon γ signifikant erhöht werden. Interferon γ , welches verantwortlich ist für die Regulation des Immunsystems, unterdrückt Zellwachstum und induziert Apoptose von Brust- und Ovarialkarzinomzellen in-vitro und in-vivo. Zusätzlich zeigten die Daten, dass durch den *knockdown* von *icb-1* mRNA durch spezifische siRNA der Effekt von Interferon γ auf die Tumorzellen SK-OV-3 deutlich gesteigert wird. Somit wurde deutlich, dass *icb-1* in die Antwort von gynäkologischen Tumorzellen auf das antitumorale Interferon γ involviert zu sein scheint (125).

Einer Studie von 2008 zufolge beeinflusst *icb-1* zudem das Östrogensystem. In der Promoterregion des *icb-1* Gens wurde ein mutmaßliches *estrogen-response-element* (ERE) nachgewiesen. Östrogene sind bekannt als wichtige Regulatoren von Wachstum und Differenzierung. Durch die Behandlung von ER α -positiven Brust- und Ovarialkarzinomzellen mit 17- β Östradiol erfolgte ein enormer Anstieg des *icb-1* Transkriptes (126).

In weiteren Studien zu *icb-1* wurde die Relevanz von SNPs im Gen für das Risiko, an Krebs zu erkranken, gezeigt. 2009 erforschten Treeck und Mitwirkende, dass der SNP rs1467465 im Gen *icb-1* vermutlich eine Prädisposition für Brustkrebs darstellt. Es wurde bei erkrankten Frauen häufiger der homozygote Genotyp AA nachgewiesen als bei gesunden Frauen (127). Ebenso wurde später festgestellt, dass der SNP rs1467465 in *icb-1* mit erhöhter Anfälligkeit, an Ovarialkrebs zu erkranken, einhergeht. Die Studie ergab, dass bei Ovarialkarzinompatientinnen öfter das Allel A im besagten SNP von *icb-1* vorkommt als bei der gesunden Kontrollgruppe (128).

Im Jahr 2010 gelang es der Forschungsgruppe um Oliver Treeck zu zeigen, wie das in Differenzierungsvorgänge integrierte Gen *icb-1* möglicherweise antagonistisch zur zellulären Östrogenantwort wirkt, indem es die östrogen-induzierte Proliferation unterdrückt. Der *knockdown* von *icb-1* verursachte so eine verstärkte Wirkung von 17 β -Östradiol auf die Zellproliferation von Brust- und Ovarialkarzinomzellen. Sogar in östrogenunabhängigen SK-OV-3 Zellen wurde durch den *knockdown* von *icb-1* ein östrogenabhängiger Zustand durch Expression des Rezeptors ER α erreicht. *Icb-1* ist demgemäß als mitwirkende Komponente in hormonabhängigen Karzinomen anzusehen und war Anlass für weitere Forschungsarbeiten, um die Signifikanz dieses Gens für Karzinomentwicklung und gegebenenfalls neue Therapiemöglichkeiten zu eruieren (129).

Die Vermutung, dass *icb-1* eine Schlüsselrolle für die Differenzierung von Tumorzellen spielt, wurde 2011 durch die Arbeitsgruppe um Treeck weiter bestätigt. Demnach dient *icb-1* vermutlich als Mediator von Differenzierungssignalen in Brustkrebszellen, induziert durch ATRA (*all-trans retinoic acid*) oder Vitamin D3. So verhinderte der *knockdown* von *icb-1* die durch Vitamin D3 bzw. ATRA induzierte verstärkte Expression von E-Cadherin, welches für Differenzierungsvorgänge von

Brustkrebszellen mit verantwortlich ist, in den Zelllinien MCF-7 und HEC-1B. In MCF-7 Zellen inhibierte das Ausschalten des Gens *icb-1* zudem die Expression von Lactoferrin und ER β , welche ebenfalls durch Vitamin D3 und ATRA induziert wird. Außerdem wurde eine Koexpression von E-Cadherin und *icb-1* in mehreren Brustkrebsgewebsproben nachgewiesen. Dies ist eine weitere Bestärkung der Annahme, dass *icb-1* in Differenzierungsvorgänge von Krebszellen involviert ist (130).

Neueren genetischen Untersuchungen nach kommt *icb-1* eine Funktion als Tumorsuppressor zu und wirkt so inhibitorisch auf das Wachstum und die Progression von Karzinomzellen. Durch den *knockdown* von *icb-1* in Ovarial- und Brustkrebszellen wurden verstärkt Gene exprimiert, die mit schlechter Prognose, Infiltration und Metastasierung einhergehen. Außerdem wurden durch ein reduziertes Level an *icb-1* die Apoptoseinduktoren Tamoxifen, Staurosporine, Actinomycin und Camptothecin weniger wirksam (131, 132).

1.6 Zielsetzung der Dissertationsarbeit

Das humane Gen *icb-1* konnte bereits in verschiedensten malignen Tumorarten nachgewiesen werden. Wie aus bisherigen Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie um Prof. Dr. Treeck hervorgeht, scheint das Gen Einfluss auf Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Progression gynäkologischer Tumoren zu haben. Durch diese Eigenschaften von *icb-1* könnten sich neuartige, zielgerichtete Ansätze für Tumortherapien ergeben.

Eine aktuelle Studie identifizierte das *icb-1* Gen als Teil einer Signatur zur Prädiktion des Ansprechens auf das Antiöstrogen Fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) (133). Darauf aufbauend ist Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit, am Modell von östrogensensitiven T-47-D Mammakarzinom-Zellen zu überprüfen, in welchem Maße die Wirkung von Antiöstrogenen von der Expression des *icb-1* Gens abhängt. Da Antiöstrogene elementare Bausteine in der Brustkrebstherapie darstellen, könnte das Wissen über mögliche Unterschiede in deren Wirksamkeit mit/ohne diesem Gen für die Prognostik der gynäkologischen Tumortherapie von Bedeutung sein.

Vor Durchführung der Proliferationsversuche wurde ein transienter *knockdown* der *icb-1* Genexpression mittels Transfektion spezifischer siRNA bei den T-47-D Zellen durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten ebenso T-47-D Zellen, welche zeitgleich nur mit negativer Kontroll-siRNA behandelt wurden und somit weiterhin das *icb-1* Gen exprimierten. Somit unterschieden sich die beiden verwendeten Zellgruppen allein in ihrer Expression des Gens. Dadurch eigneten sie sich optimal für die Erforschung des Einflusses dieses Gens auf die Proliferation der Zelllinie nach Behandlung mit Antiöstrogenen.

Für das Proliferationsexperiment wurden die transfizierten Zellen mit östrogenhaltigem Medium versetzt. Anschließend wurden die Antiöstrogene 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und ICI 182,780 zugegeben. An den entsprechenden Messtagen wurde indirekt die Anzahl und somit die Proliferation von *knockdown*- und Kontrollzellen gemessen, indem die Stoffwechselfähigkeit und Vitalität der Zellen mittels eines CTB-Assays detektiert wurde.

Durch diese Dissertationsarbeit kann im Rahmen der Untersuchung des *icb-1* Gens erforscht werden, ob neben den bisher bekannten Auswirkungen des Gens auf Proliferation, Differenzierung und Apoptoseverhalten auch Effekte auf die Wirkung von Antiöstrogenen bei Mammakarzinom-Zellen bestehen.

Diese Erkenntnis würde einen weiteren wichtigen Schritt im Verständnis der Rolle des *icb-1* Gens als Tumorsuppressor darstellen. Längerfristig könnten neue Anhaltspunkte im Rahmen einer zielgerichteten gynäkologischen Tumorthapie geschaffen werden.

2 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Krebszelllinie

T-47-D ATCC® (Manassas, VA, USA)

2.1.2 Chemische Komponenten

2.1.2.1 Zellkultur

Kulturmedien und Supplemente

DMEM/F12

(Dulbecco's Modifiziertes Eagle's

Medium/Nutrient F-12 Ham)

D6434 mit HEPES und Natrium Bicarbonat

Ohne L-Glutamin und Phenolrot Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

FBS (Fetal Bovine Serum)

F7524 Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Serum Replacement 2 (50x)

(kurz SR2) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Insulin

(Insulin solution human) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Natriumpyruvat

(Sodium pyruvate solutin) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

L-Glutamin

G 7513

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Reagenzien zur Zellernte

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

(kurz PBS)

D8537 ohne Calciumchlorid und

Magnesiumchlorid

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Accutase® solution

A6964

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Lösungsmittel

Dimethylsulfoxid

(kurz DMSO)

Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

Ethanol (95%ig)

(kurz ETOH)

J.T. Baker® (Phillipsburg, NJ, USA)

Assays

CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay

(kurz CTB-Assay)

Promega (Madison, WI, USA)

2.1.2.2 Molekulargenetische Verfahren

2.1.2.2.1 Transfektion

silencer® select siRNA for

Human C1orf38 (= icb-1)

ID s18155/s18156/s18157 Ambion® (Austin, TX, USA)

Silencer® Negative Control siRNA#1

Cat#AM4611 Ambion® (Austin, TX, USA)

Transfektionsreagenzien

TransFectin™ Lipid Reagent BioRad (Hercules, CA, USA)

Opti-MEM® I Reduced Serum Medium gibco® Life Technologies™ (UK)

2.1.2.2.2 Real-Time qPCR

RNA-Isolierung

RNeasy® Micro Kit (50) QIAGEN (Hilden, Deutschland)

cDNA-Synthese

Affinity Script Multi Temperature

cDNA Synthesis Kit Agilent Technologies (USA)

Master-Mix

Light Cycler® FastStart DNA Master

SYBR Green I Roche Diagnostics GmbH
(Mannheim, Deutschland)

PCR-Primer Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)
bzw. Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland)

Tabelle 1 Verwendete Primer und die entsprechenden Sequenzen

Primer	Sequenz (5'→3')
Icb1/2 F	TCGAGGGCTCCATCTATGA

Icb2/3 R	GAAGTAGCCCTGGAAGTTGG
β -Actin 1 β -Actin 2	CTTCTTTCTGGGCATGGAGT CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCTTC
PR-ABC 2._for PR-ABC 2._rev	CAACTACCTGAGGCCGGATT CATTGCCCTCTTAAAGAAGACCT
ER α OA_for ER α OA_rev	CACATGAGTAACAAAGGCATGG ATGAAGTAGAGCCCGCAGTG
PS2 1 PS2 2	GGCCCAGACAGAGACGTGTA GGGACGTTCGATGGTATTAGG
CYC1 CYC2	CTGGAGGTCTGCGAGGAA GGGGATGGTCTCCTTCATCT
CYCA1 CYCA2	CTGCTGCTATGCTGTTAGCC TGTTGGAGCAGCTAAGTCAAAA
Ki-67_for Ki-67_rev	CAGTTCCACAAATCCAACACA CTTTCATTTTCATACCTGAAGGAAC

2.1.2.3 Antiöstrogene und Östrogene

4-OH-Tamoxifen Stocklösung	Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)
Endoxifen Stocklösung (BG0496)	BIOTREND Chemicals AG (Wangen/Zürich, Schweiz)
ICI 182,780	Stocklösung Tocris Cookson Inc. (Missouri, USA)
17-β-Östradiol (E2)	Gemisch aus 3 verschiedenen E2 (gelöst in H ₂ O) Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA)

2.1.3 Hilfsmittel und Geräte

Pipetten und Pipettenspitzen

Messpipetten

(5ml, 10ml, 25ml) Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Aspirationspipette Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Pipettierhilfe accu-jet® pro Brand® (Wertheim, Deutschland)

Manuelle Mikropipetten

(10µl, 20µl, 100µl, 1000µl) Eppendorf Reference®, Eppendorf
(Hamburg, Deutschland)

Biosphere® Quality und Filter Tips

(10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Kapillaren

LightCycler® Capillaries (20µl) Roche (Indianapolis, IN, USA)

Reaktionsgefäße

Zellkulturflaschen T75/175	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
PP-Schraubverschlussröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Eppendorf Cups (1,6ml)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Softstripes mit Deckel (0,2ml)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Zellkulturplatten steril (6-Well, 96-Well)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Geräte

Zellkultur-Brutschrank	
HERACell 150 CO2 Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Sterile Werkbank	
HERAsafe® Type KS12	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Mixer MS2 Minishaker	IKA® (Staufen, Deutschland)
Zentrifuge Micro	Biozym Scientific (Oldendorf, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 1s-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge® pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Victor3™ Multilabel Counter	PerkinElmer® (Waltham, MA, USA)
UV-Photometer GeneRay	Biometra (Göttingen, Deutschland)
LightCycler 2.0 PCR Device	Roche-Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

Thermocycler	Biometra® (Göttingen, Deutschland)
Microskop	Karl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Standardbedingungen der Zellkulturen

Die verwendete Brustkrebszelllinie wurde in dem Standardmedium DMEM/F12 mit 10% FBS in T75-Flaschen in Kultur gehalten. Dem Medium für die T-47-D-Zellen wurden entsprechende Wachstumsreagenzien hinzugefügt. So enthielt eine 500ml Flasche DMEM/F12-Medium zusätzlich 10% FBS, 0,1mg/ml Insulin, 1mM Natrium-Pyruvat und 0,25mg/ml L-Glutamin.

Die Inkubation der Zelllinie erfolgte bei 5% CO₂ und 37°C in feuchtem Milieu in einem Zellbrutschrank.

2.2.1.2 Mediumwechsel

Alle 3-4 Tage wurde das Medium DMEM/F12 mit den entsprechenden Zusätzen unter sterilen Bedingungen gewechselt, um den Zellen ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Hierbei wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das gleiche Volumen an neuem Kulturmedium hinzugefügt.

2.2.1.3 Splitten der Zellen

Damit die Zellen genügend Platz zum Wachsen haben, wurden sie zweimal wöchentlich unter sterilen Bedingungen gesplittet, das heißt sie wurden von ihrem Boden abgelöst und verhältnismäßig in neue Flaschen umgefüllt.

Hierbei wurde das alte Wachstumsmedium in den T75-Flaschen abgesaugt, der Zellrasen mit 5-10ml PBS gespült und die Zellen anschließend mit 3ml Accutase, einem Enzym, welches die Zellen vom Boden ablöst, behandelt. Die Zellen wurden dann ca. 10 Minuten im Brutschrank inkubiert, bis alle Zellen vom Flaschenboden

gelöst waren. Um die Accutase-reaktion zu stoppen und alle Zellen sicher abzulösen, wurde der Zellrasen mit 5-7ml Wachstumsmedium gespült und das gesamte Volumen in ein 50ml Falcon pipettiert. Durch fünf Minuten langes Abzentrifugieren der Zellsuspension bei 770U/min konnte ein Zellpellet gewonnen werden. Schließlich wurde die Flüssigkeit vorsichtig aus dem 50ml Falcon abgesaugt, sodass man am Ende den reinen Zellüberstand erhielt. Im nächsten Schritt wurde 10ml Standardmedium hinzugegeben, anschließend die Zellflüssigkeit mit einer Pipette resuspendiert und gevortext. Zuletzt wurde das Zellvolumen in die neue(n) Flasche(n) pipettiert und ggf. durch entsprechendes Volumen an Standardmedium ergänzt.

2.2.1.4 Zellernte

Für die Verwendung der Zellen in den Versuchsreihen wurden diese – exakt wie im Abschnitt zuvor beschrieben - in mehreren Schritten vom Zellboden abgelöst, in ein 50ml Falcon überführt und abzentrifugiert. Die entstandene Zellsuspension diente als Ausgangssubstrat.

2.2.1.5 Aussaat der Zellen

Damit vergleichbare Zellexperimente durchgeführt werden konnten, wurden die Zellen in vorher genau definierten Zellzahlen ausgesät.

Nachdem –wie in den Abschnitten zuvor beschrieben- die Zellen abgelöst wurden und eine Zellsuspension hergestellt wurde, pipettierte man 10 μ l der Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer. Durch Auszählen der Zählkammern konnte die genaue Zellzahl der jeweiligen Zellsuspension ermittelt werden. Im Anschluss daran wurde anhand der Zellzahlen und den vorhandenen Volumina unter Berücksichtigung des Kammerfaktors die benötigte Menge an Zellsuspension pro definiertem Volumen an Standardkulturmedium berechnet. Somit erhielt man die erwünschte Konzentration an Zellsuspension mit der entsprechenden Zellzahl.

Für die Transfektion wurden 200000 T-47-D Zellen pro einem 6-Well ausgesät. Hierfür wurde ein Gesamtvolumen von 3ml verwendet.

Die Proliferationsversuche (CTB-Assays) erfolgten mit 96-Well-Platten. Pro Zellansatz wurden für die jeweiligen Messtage identische Platten ausgesät. Die

Zellzahl lag bei 2000 T-47-D Zellen/Well. Das pipettierte Volumen an Kulturmedium mit entsprechender Zellzahl/Well betrug 70µl.

Nach der Aussaat wurden alle Zellen im Brutschrank bei 37°C und feuchtem Milieu inkubiert.

2.2.1.6 „Herunterhungern“ der Zellkultur in 6-Well-Platten

Um zu verhindern, dass die Stimulation durch die im Standardmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, wurde die Stimulation unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Da die *icb-1* siRNA transfizierten Zellen sich zunächst noch in serumreichem Medium befanden, überführte man die Zellen schrittweise von 10% FBS enthaltendem Standardkulturmedium in FBS freies 1xSR2-Medium.

Am Tag nach der Transfektion wurde morgens das alte Medium aus den 6-Wells abgesaugt, pro Well 2ml 5% FBS-Medium zugegeben und weiterhin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abends wurde erneut das Medium abgesaugt und jeweils 2ml an 1% FBS 0,5xSR2-Medium zugefügt. Die Aussaat für die Stimulation am nächsten Tag erfolgte schließlich in 1xSR2-Medium ohne FBS.

2.2.1.7 Behandlung der Zellen mit Antiöstrogenen

24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen mit verschiedenen Antiöstrogenen behandelt, um die Auswirkung dieser Reagenzien auf die Proliferation der Zellen zu erforschen. Die verwendeten Antiöstrogene waren 4-OH-Tamoxifen (primärer Metabolit von Tamoxifen) 100nM, 1µM und 10µM, Endoxifen (sekundärer Metabolit von Tamoxifen) 5nM, 25nM und 100nM und ICI 182 780 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM. Pro 96-Well wurden 30µl Stimulationslösung zu den am Tag zuvor ausgesäten 70µl Zellsuspension pipettiert, sodass das Gesamtvolumen am Ende der Stimulation in allen Wells 100µl betrug. Vor der Stimulation wurde jeweils eine 1:1000 Verdünnung der Antiöstrogene mit E2-haltigem 1xSR2-Medium ohne FBS hergestellt.

In einem ersten Schritt wurden die ursprünglichen Stocklösungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel vorverdünnt. Im Falle des Antiöstrogens Tamoxifen wurde für alle Verdünnungen eine Stocklösung von 30mM verwendet und entsprechend den benötigten Konzentrationen 1:3, 1:30 und 1:300 mit dem

Lösungsmittel 95%-Ethanol vorverdünnt. Bei dem Antiöstrogen ICI 182,780 benutzte man eine Stock von 50mM, welche man bedarfsweise 1:50, 1:150, 1:500, 1:1500, 1:5000, 1:15000 und 1:50000 mit 95%-Ethanol vorverdünnte. Von der 100µM Stock an Endoxifen wurde entsprechend eine 1:4 und 1:25 Vorverdünnung hergestellt, wobei hier das Lösungsmittel DMSO verwendet wurde.

Um schließlich die entsprechenden korrekten Stimulationslösungen zu erhalten, wurde anschließend das benötigte Volumen V an Stimulationslösung pro Ansatz berechnet. Hierbei multiplizierte man die 30µl pro Well mit der Anzahl an zu pipettierenden Wells W pro Ansatz gemäß der Formel $V = 30\mu\text{l} \times W$. Aufgrund der Tatsache, dass die 30µl auf 70µl Zellsuspension pipettiert wurden, musste zudem eine Verdünnung von 1:3,33 bei der Rechnung berücksichtigt werden. Um eine 1:1000 Verdünnung des Antiöstrogens zu erhalten, lautete die allgemeine Formel somit $V/1000 * 3,333$.

Neben den Reagenzien wurden außerdem Lösungsmittelkontrollen (=LMK) pipettiert. Hierbei wurde eine 1:1000 Verdünnung der Lösungsmittel 95%-Ethanol bzw. DMSO mit östrogenhaltigem FBS-freiem 1xSR2-Medium hergestellt. Des Weiteren versetzte man die Zellen auch mit je 30µl 1xSR2-Medium mit und ohne E2. Als Östrogene wurde ein 3nM Mix aus drei verschiedenen E2-Lösungen (je 1nM; gelöst in H₂O) verwendet.

Von jedem Stimulationsansatz bzw. den Kontrollen wurden jeweils 3 Wells pro 96-Well-Platte pipettiert, um bei den späteren CTB-Messungen einen Mittelwert zu berechnen zu können.

2.2.1.8 Messungen: *CellTiter-Blue™ (CTB™-) Cell Viability Assay (Promega)* zur Proliferationsbestimmung

Der CTB-Assay detektiert die Fluoreszenzänderung bei der Reduktion von Resazurin zu Resorufin und erfasst somit die metabolische Aktivität der Zellen. Auf diese Weise misst das Gerät indirekt die Anzahl stoffwechselaktiver und vitaler Zellen.

An den jeweiligen Messtagen wurde das CTB-Reagenz (10µl pro Well) auf die 96-Well Platten gegeben und die angrenzenden Wells mit je 110µl PBS-Puffer befüllt,

um stabilere Messergebnisse zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen 1-4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die CTB-Messungen erfolgten im *Victor3TM Multilabel Counter* (PerkinElmer®) bei 579 Ex/590Em. Gemessen wurde die Proliferation der stimulierten Zellen an den jeweiligen Messtagen (Tag 0, 3, 4, 5, 6 nach Zugabe der Reagenzien).

2.2.1.9 Auswertung des CTB-Assays

Berechnet wurden die gemessenen Werte in Microsoft EXCEL mittels des studentischen t-Tests. Die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt und daraus der Mittelwert bestimmt. Als signifikant galt $p < 0,05$. Angegeben wurden die Ergebnisse je nach Auswertung in % der Lösungsmittelkontrolle LMK (=unbehandelte Zellen mit E2-Zusatz) bzw. in % der unstimulierten Zellen (ohne E2).

2.2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.2.1 Herstellung der Zellen mittels Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man einen Vorgang, bei welchem fremdes genetisches Material in eukaryontische Zellen eingeschleust wird. Im Falle dieser Dissertation wurde *icb-1* siRNA (*small interfering RNA*) in die Mammakarzinomzelllinie T-47-D eingeschleust. Die siRNA im Allgemeinen bewirkt in der Wirtszelle eine sogenannte RNA-Interferenz, ein Prozess, welcher die Expression von Genen unterdrückt. Durch die spezielle *icb-1* siRNA wird somit ein transienter *knockdown* des Gens *icb-1* erreicht. Das transiente Ausschalten des Zielgens ermöglicht die genaue Erforschung der Eigenschaften und Funktionen von *icb-1*.

Circa 24 Stunden vor der Transfektion wurden, wie im Abschnitt „Aussaat der Zellen“ beschrieben, 200000 T-47-D Zellen/Well auf einer 6-Well-Platte im DMEM/F12-Medium mit 10% FKS ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das alte Medium in den Wells abgesaugt und pro Well 1,2ml frisches Standardmedium zugegeben.

Im Anschluss daran setzte man den Transfektionsmix an. Den *icb-1* siRNA-Mix ergab eine Mischung von drei *icb-1* siRNAs. Es handelte sich um die *icb-1* siRNA s18155 mit der Sequenz (5'→3') CCAAGAUUAUUUCAUUUUAtt, die *icb1* siRNA s18156 mit

(5'->3') CCAUCUAAGUGCUGGAGGAtt und die *icb-1* siRNA s18157 mit (5'->3') UCGUCAAGUUGUAAGUGAtt.

In einem ersten Schritt wurde pro Transfektionsansatz 1µg an Gesamt-*icb-1* siRNA bzw. Negativkontrolle in *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium* (gibco®) pipettiert und die Mischung ausreichend gevortext.

Zudem wurde jeweils ein zweiter Ansatz hergestellt, in welchem 6µl *TransFektin™ Lipid Reagent (BioRad)* in *Opti-MEM®* gelöst wurde, und vortexte auch diesen. Schließlich vermengte man die beiden Lösungen, wobei es sehr wichtig war, die Ansätze mit einer Pipette ausreichend zu mischen.

Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix tropfenweise mit der Pipette unter Schwenken der Platten auf die kultivierten Zellen gegeben und anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit die Transfektion der *icb-1* siRNA bzw. Negativkontrolle in die Mammakarzinomzellen stattfinden konnte.

2.2.2.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Messung des RNA-Gehalts der Proben geschah über die *Absorptionsmessung* mittels Photometer. Hierfür wurde die Absorption für die Wellenlängen 260nm und 280nm gemessen und daraus der Quotient A260/A280 bestimmt. Der Zielwert für diese Ratio lag zwischen 1,8 und 2,0, da für Werte außerhalb dieses Bereichs eine Verunreinigung der isolierten RNA durch Lösungsmittel, Proteine oder ähnlichem nicht ausgeschlossen werden konnte.

Um schließlich die Konzentration der RNA-Proben zu messen, wurde zu 9µl Wasser jeweils 1µl RNA zugegeben. Nachdem das Photometer mithilfe einer RNase-freien Wasserprobe geeicht wurde, konnte der RNA-Gehalt der einzelnen Proben bestimmt werden.

2.2.2.3 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mittels *RNeasy Micro Kit (50) (Quiagen)* aus den transfizierten Mammakarzinomzellen isoliert. Bei dieser Vorgehensweise werden die

selektiven Bindungseigenschaften einer Silikagel-Membran und die Mikrosäulenzentrifugation genutzt.

72 Stunden nach der Transfektion wurden das Standardkulturmedium aus den Wells mit den Zellen für die RNA-Isolierung abgesaugt und pro Well 350µl RLT-Puffer mit β -Mercapto-Ethanol zugegeben, um die Zellen zu lysieren und somit im weiteren Prozess die RNA aus den Zellen gewinnen zu können.

Konnte die RNA-Isolierung nicht direkt im Anschluss erfolgen, wurden die Zellen mit dem RLT-Puffer bei -80°C eingefroren und später wieder aufgetaut.

Zur weiteren Verarbeitung wurden schließlich die Zellen mit dem RLT-Puffer homogenisiert, indem die Zellsuspension mit einer Pipette sorgfältig auf- und abpipettiert wurde. Anschließend wurden pro Well jeweils 350µl an 70% Ethanol zugegeben und erneut gut gemischt. Die Lösung wurde in die *RNeasy Mini Spin Columns* überführt und bei 13000 U/min abzentrifugiert. Durch das Ethanol können sich zwischen der Silikagel-Membran und der RNA Wasserstoffbindungen ausbilden und somit die RNA selektiv gebunden werden. In einem weiteren Schritt wurde je 350µl RW-1-Puffer zugesetzt und auf gleiche Weise abzentrifugiert.

Danach wurde pro Ansatz 10µl *DNase I stock solution* zu 70µl RDD-Puffer gegeben, indem man die Flüssigkeit behutsam über Kopf schüttelte und die 80µl direkt auf die Membran der Spin Columns pipettierte. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur kam 350µl RW-1-Puffer hinzu. Durch erneutes Abzentrifugieren wurde die in den Zellen enthaltene DNA ausgefällt. Um schließlich auch zelluläre Bestandteile wie Proteine etc. zu beseitigen, mussten je 500µl RPE-Puffer auf die Columns pipettiert und abzentrifugiert werden. Anschließend wurden 500µl an 80-prozentigem Ethanol zugegeben und 2 min bei 13000 U/min in der Zentrifuge behandelt, um die Membran zu trocknen. Durch erneutes 5 minütiges Abzentrifugieren (max. speed) der Proben mit geöffneten Deckeln, ohne zuvor ein Reagenz beizufügen, konnte das restliche Ethanol entfernt werden. In Abhängigkeit von der Zellmenge konnte die RNA in einem letzten Schritt in 20-25µl RNase freiem Wasser eluiert und ausgefällt werden.

Der Prozess der RNA-Isolierung erfolgte bei Raumtemperatur. Sobald man die RNA erhielt, wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.2.4 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird anhand der vorhandenen totalen RNA die komplementäre DNA synthetisiert und vervielfacht. Das dafür verantwortliche Enzym heißt reverse Transkriptase. Dies ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die vorhandenen RNA-Einzelstränge in die komplementäre DNA umschreibt. Das Enzym enthält zudem eine Ribonuklease, welche die im RNA-DNA-Hybridstrang enthaltene RNA hydrolysiert und hierdurch entfernt. In einem weiteren Schritt können nun DNA-Doppelstränge hergestellt werden.

Zur Synthese der cDNA wurde zuerst ein Mix aus RNA, *Random Primer* und Wasser erstellt. Für jeden Ansatz wurden gleichermaßen $1\mu\text{g}$ RNA und $1,5\mu\text{l}$ *Random Primer* ($100\mu\text{g/ml}$) in PCR-Tubes gegeben und durch das Beifügen von Wasser auf ein Gesamtvolumen von $8\mu\text{l}$ gebracht. Es wurde immer eine Wasserkontrolle mitgemacht, welche keine RNA enthielt. Durch kurzes Zentrifugieren wurden die Reagenzien gemischt. Die Tubes wurden in einem vorgeheizten *Thermocycler* für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend wieder für 10 Minuten auf 4°C abgekühlt, damit sich die Primer an das Poly(A)Ende der RNA-Moleküle anheften konnten.

Danach wurde ein Master-Mix vorbereitet. Pro Ansatz verwendete man $1\mu\text{l}$ *10xAffinity Script RT buffer*, $0,4\mu\text{l}$ *dNTP Mix 100 mM*, $0,2\mu\text{l}$ *RNase Block 40U/ μl* und $0,4\mu\text{l}$ *Affinity Script RT*. Zu jedem RNA-Ansatz wurden $2\mu\text{l}$ dieses Master-Mixes pipettiert und die Proben gut gemischt. In einem zweiten Lauf im vorgeheizten *Thermocycler* erfolgte die reverse Transkription. So wurden die Ansätze zuerst für 10 Minuten bei 25°C behandelt, dann für 60 Minuten bei 48°C inkubiert und schließlich für 15 Minuten bei 70°C erhitzt. Die fertige cDNA wurde auf 4°C abgekühlt.

Sofort wurden die Proben auf Eis gebracht und 1:5 mit Wasser verdünnt, sodass man jeweils ein Gesamtvolumen von $50\mu\text{l}$ pro Ansatz erhielt. Anschließend nicht gleich weiterverwendete Proben wurden bei -20°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2.5 Real-Time qPCR im LightCycler

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bewirkt die Amplifikation genau definierter, kurzer DNA-Abschnitte. Die eingesetzten Primer bestimmen exakt den Start- und den Endzeitpunkt des DNA-Fragments mit dem interessierenden Gen. Die Vervielfachung der cDNA-Abschnitte erfolgt theoretisch unendlich, da die im vorherigen Zyklus entstandenen DNA-Produkte im weiteren Lauf ebenfalls zu Angriffspunkten für die spezifischen Primer werden und somit eine exponentielle Vervielfachung der Zielsequenz stattfindet. Jedoch wird die Amplifikation in der Praxis durch die Michaelis-Menten-Kinetik begrenzt. Somit stellt einerseits die begrenzt vorhandene Menge an Enzym eine Limitation des Vorgangs dar, andererseits findet ein Aktivitätsverlust des Enzyms durch Denaturierung während der PCR-Reaktion statt. Des Weiteren hybridisieren die synthetisierten DNA-Einzelstränge im Reaktionslauf untereinander und verhindern dadurch das adäquate Anlagern der Primer an die Sequenzen.

Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe (*SYBR Green-Enzym-Mix*) ermöglichen die indirekte Darstellung der Amplifikation der cDNA-Abschnitte in Echtzeit (*real-time*). Prinzipiell lagern sich nämlich Fluoreszenzfarbstoffe interkalierend in die Doppelhelix ein und emittieren durch diese Anregung Licht. Freie Farbstoffe leuchten hingegen nicht und sind somit nicht darstellbar. Dadurch wird eine genaue graphische und zeitgetreue Darstellung des PCR-Reaktionsverlaufes möglich.

Zu Beginn der PCR im *LightCycler* wurde ein Master Mix erstellt. Pro Kapillare wurden 6µl davon eingesetzt. Der Mix bestand aus 3,4µl RNase freiem Wasser, 0,6µl Magnesiumchlorid (25nM), 1µl *SYBR Green-Enzym-Mix* und 1µl an zusammengesetzten Primern, welche spezifisch sind für das interessierende Gen. Alle Reagenzien wurden während der Herstellung des Mixes gekühlt aufbewahrt. Entsprechend der Anzahl der Proben bzw. Kapillaren wurde ein Vielfaches dieser 6µl benötigt. Die Reagenzien für den Mastermix wurden in einen Eppendorf Cup gegeben, durch kurzes Abzentrifugieren gemischt und je 6µl des fertigen Master-Mixes in auf Eis gestellte PCR-Tubes pipettiert. In einem nächsten Schritt wurden jeweils 4µl der 1:5 verdünnten, gekühlten cDNA in die Tubes hinzugegeben und diese anschließend ausreichend abzentrifugiert. Danach wurden die 10µl an PCR-Gemisch in Glaskapillaren pipettiert, welche sich bereits in einem vorgefertigten

Kapillarblock befanden, und die Kapillaren mit einem Kapillarstopfen verschlossen. Vorsichtig wurden die Kapillaren in der Zentrifuge gemischt. Jedoch durfte die Drehzahl 200/Minute nicht überschritten werden, da die Kapillaren sonst zerbrachen. Zuletzt wurden gegeben und der Lauf gestartet.

Zu Beginn des *LightCycler*-Laufes wurde die cDNA für 15 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Polymerasekettenreaktion mit 40 Zyklen. Die Zyklen bestanden jeweils aus drei Einzelschritten: 1. Denaturierung bei 95°C (15 sec), 2. Auskühlung (*Primer Annealing*) bei 60°C (5 sec) und 3. Verlängerung (*Elongation*) bei 72°C (12 sec). Nach Abschluss der PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt, indem die Proben ein weiteres Mal kurz auf 95°C erhitzt und im Anschluss daran sofort wieder auf 65°C abgekühlt wurden.

Bei den Läufen wurde für jede cDNA stets eine Referenzprobe mit den Primern β -Actin 1 und 2 durchgeführt. β -Actin gilt als *Houskeeping*-Gen und ist als Referenzwert essentiell für eine korrekte spätere Auswertung der *LightCycler* Ergebnisse.

Entscheidend für die Berechnung und Auswertung der Daten war schließlich der Threshold-Zyklus (C_T), welcher aus einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz über der Zeit (in PCR-Zyklen) aufgetragen ist, bestimmt wurde. Der C_T -Wert gibt die Expression des interessierenden Gens an. Allgemein gilt: Je mehr Gen in einer cDNA vorhanden ist, desto kleiner ist der entsprechende C_T -Wert der Probe. Gebildet wurde für jedes Gen die Differenz aus den C_T -Werten der spezifischen Sequenz des Zielgens und denen der β -Actin-Läufe als Referenz. Im Anschluss wurde aus der Differenz der ΔC_T -Werte der *icb-1* transfizierten Zellen und Kontrollzellen der $\Delta\Delta C_T$ -Wert berechnet. Schließlich wurde die unterschiedliche Expression als n-fache Expression der beiden Vergleichsgruppen anhand der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ bestimmt.

Es wurden pro Primer mindestens drei *LightCycler*-Läufe durchgeführt, um einen validen Mittelwert berechnen zu können. Als signifikant galten p-Werte $<0,05$. Die Ergebnisse wurden je nach Auswertung in % der Kontrollzellen, der östrogenhaltigen Lösungsmittelkontrolle (=LMK) und der unbehandelten Zellen ohne E2 angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Transienter *knockdown* bei T-47-D Zellen

Die Voraussetzung für eine valide Untersuchung des Effektes von *icb-1* auf die Wirkung von Antiöstrogenen bei den Krebszellen T-47-D war der *knockdown* des Gens. Dies gelang mittels Transfektion einer *icb-1* spezifischen siRNA (*small interference RNA*). Für die Kontrollgruppe wurde eine unspezifische siRNA verwendet.

Anschließend wurde der Erfolg des *knockdowns* bei den *icb-1* siRNA transfizierten Zellen überprüft, indem jeweils die *icb-1* mRNA-Level der Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression und der Kontrollzellen mittels *Real-Time* qPCR bestimmt und miteinander verglichen wurden.

Durch die Transfektion der T-47-D Zellen mit *icb-1* siRNA konnte eine signifikante Reduktion der Expression von *icb-1* gegenüber den Kontrollzellen erreicht werden. Das relative *icb-1* mRNA-Level der *knockdown* Zellen betrug durchschnittlich nur 18,8% der Kontrollzellen bei T-47-D Zellen ($p < 0,01$). [Abbildung 10]

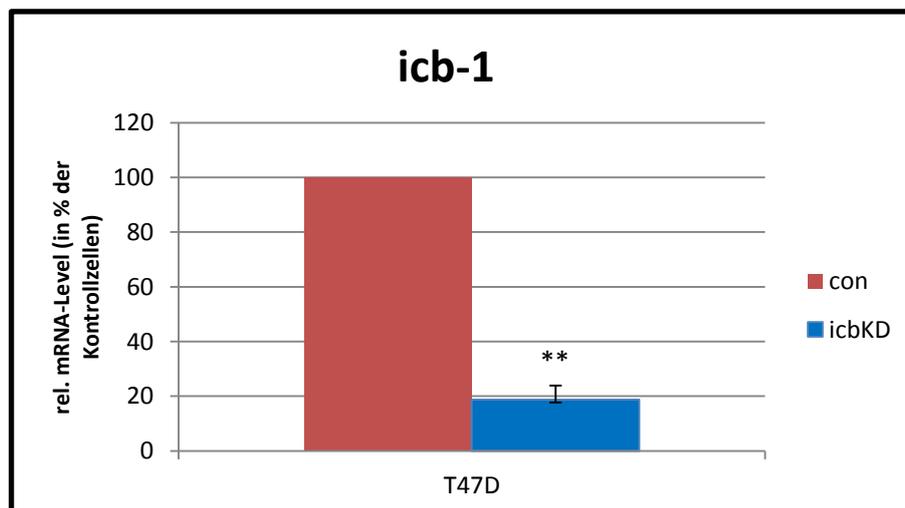


Abbildung 10 Graphische Darstellung des transienten *icb-1* *knockdowns* bei T-47-D Zellen

Abgebildet ist die durchschnittliche *icb-1*-Expression der mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen (T47D/icbKD) im Vergleich zu den Kontrollzellen (T47D/con) mit unspezifischer siRNA. Das *icb-1* mRNA-Level wurde via Real-Time qPCR bestimmt. ** $p < 0,01$ versus T47D/con

Die erfolgreiche Reduktion des *icb-1* mRNA-Levels auf unter 20% des Ausgangslevels erlaubte im weiteren die valide Durchführung der Versuchsreihen (Zellkultur und CTB-Assay) mit dem Ziel der Erforschung der Bedeutung von *icb-1* für die Wirkung von Antiöstrogenen auf T-47-D Zellen. Die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen wurden als T47D/*icb*KD bezeichnet, die Kontrollzellen wurden T47D/con genannt.

Zusätzlich zur Überprüfung des *icb-1 knockdowns* der Zellen auf mRNA-Ebene erfolgte mittels Western Blot ein Nachweis auf Proteinebene. Der unten abgebildete Western Blot liefert den Beweis der fehlenden ICB1-Protein-Expression bei den *icb-1 knockdown* Zellen. So sind auf dem Blot-Bild bei den Kontrollzellen kräftige Proteinbanden im Sinne einer normalen Proteinexpression erkennbar, hingegen ist bei den *icb-1* transfizierten Zellen keine bzw. eine nur sehr schwache Proteinbande als Nachweis eines erfolgreichen *icb-1 knockdowns* mit konsekutivem Ausfall der entsprechenden ICB1-Protein-Expression vorhanden. [Abbildung 11]

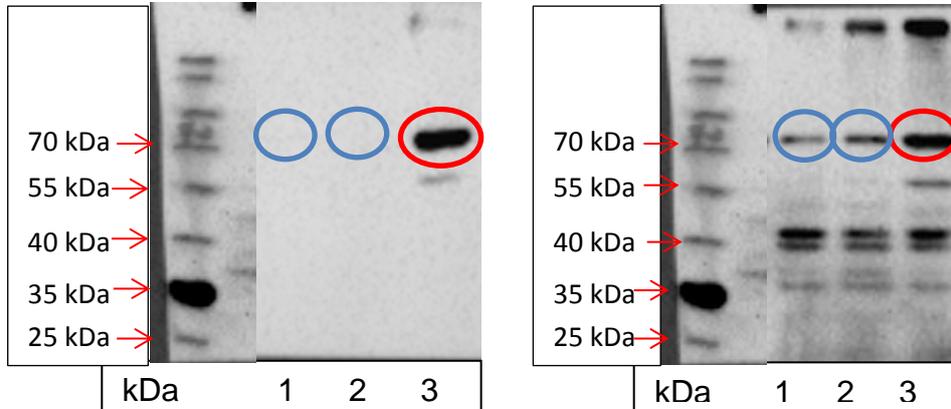


Abbildung 11 Western Blot der Brustkrebszelllinie T-47-D zum Nachweis des *icb-1 knockdowns* auf Proteinebene

Dargestellt ist die unterschiedlich stark vorhandene Expression des ICB-1 Proteins (bei einem Molekulargewicht von ca. 80kDa) in den verschiedenen Ansätzen der T-47-D Zellen. (1: T47D *icb-1* siRNA (Mix aus drei verschiedenen *icb-1* siRNAs mit je 5nM); 2: T47D *icb-1* siRNA (s18156) 20nM; 3: T47D control siRNA (Negativ-siRNA) 30nM. Zu erkennen ist sowohl im linken und als auch im rechten Westernblot-Bild eine stark gefärbte T47D control siRNA Bande [3] (rot umrandet) im Gegensatz zu den beiden Ansätzen mit der *icb-1* siRNA [1; 2] (blau umrandet) (linker Blot: keine Anfärbung der Banden mit *icb-1* siRNA; rechter Blot: nur schwache Anfärbung der Banden mit *icb-1* siRNA im Vergleich zur *cosiRNA*-Bande). Beide Westernblot-Bilder bestätigen den erfolgreichen *icb-1 knockdown* auf Proteinebene (ICB-1 Protein). Linker und rechter Blot unterscheiden sich in den verwendeten Antikörpern und den jeweils eingesetzten Antikörper-Konzentrationen. (links: 1.AK Anti-ICB1 (H-8) 1:500 (SantaCruz SC515413)/ 2.AK Anti-mouse-HRP 1:10000; rechts: 1.AK Anti-ICB1 (C-term) 1:100 (Biomol, WA-AP9910b)/ 2.AK Anti-rabbit-HRP 1:10000) Die Durchführung der

Proteinisolierung und des WesternBlots erfolgte durch Frau Federhofer (leitende MTA) nach Herstellerangaben.

3.2 Proliferation der T-47-D Zellen nach Zugabe der Reagenzien

3.2.1 Überblick über das Experiment

Ziel der Versuchsreihe war, die Bedeutung von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Zugabe von Antiöstrogenen zu erforschen. Die Messungen erfolgten über einen CTB-Assay, indem die Anzahl vitaler Zellen bei T47D/*icb*KD und T47D/con nach Stimulation bestimmt wurden.

Die Zellen wurden vor der Messung mit den verschiedenen konzentrierten Antiöstrogenen 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und ICI 182,780 (jeweils mit Zusatz von Östrogen E2) versetzt. Zusätzlich wurden Zellen nur mit 17- β Östradiol stimuliert ohne Zugabe von Antiöstrogenen. [Tabelle 2] Außerdem proliferierten zum Vergleich Zellen ohne jeglichen Zusatz.

Tabelle 2 Verwendete Stimulanzienkonzentrationen

Aufgelistet sind die in den Zellkulturexperimenten (CTB-Assay) eingesetzten Konzentrationen der Antiöstrogene 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen, ICI 182,780 und von E2.

Stimulans	Verwendete Konzentrationen
17- β Östradiol (E2)	3nM (Mix aus 3 verschiedenen E2; je 1nM)
4-OH-Tamoxifen	100nM, 1 μ M, 10 μ M
Endoxifen	5nM, 25nM, 100nM
ICI 182,780	1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M

Für die Versuchsreihen wurden 24 h vor Stimulation je 2000 T-47-D Zellen/Well ausgesät.

Die Experimente wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, nachdem die Zellen zuvor gemäß Protokoll (siehe 2.2.1.6) von 10% FBS enthaltenden Standardmedium an das serumfreie Medium (1xSR2) angepasst wurden.

Die Proliferationsmessungen mittels CTB-Assay erfolgten je nach Reagenz 3, 4, 5, 6 Tage nach Stimulation.

Als Lösungsmittelkontrolle (=LMK) dienten T-47-D Zellen, welche in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium ohne FBS und dem entsprechenden Lösungsmittel EtOH (bei 4-OH-Tamoxifen und ICI 182,780) bzw. DMSO (bei Endoxifen) proliferierten.

Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, erfolgten mindestens drei Wiederholungen des Versuches.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proliferationsversuchsreihen genau beschrieben. Aufgeführt werden im Einzelnen die Proliferation der Zellen ohne Reagenzzusatz, der Effekt von E2 auf die Proliferation der Zellen und anschließend die Auswirkung der Antiöstrogene auf die Proliferation der Zellen. Verglichen werden hierbei immer T47D/icbKD und T47D/con.

3.2.2 Proliferationsverhalten unstimulierter T-47-D Zellen

Bei jeder Versuchsreihe proliferierten T-47-D Zellen unbehandelt ohne E2 (CTB-Assay), um den reinen Wachstumseffekt von *icb-1* auf die Zellen zu untersuchen. Allgemein lässt sich sagen, dass die T-47-D Zellen gegenüber dem Tag 0 deutlich proliferiert sind. Es manifestierte sich jedoch ein differentes Wachstumsverhalten für T47D/icbKD und T47D/con. Bei den T47D/icbKD verlief die Wachstumskurve zunächst steiler als bei den T47D/con. An Tag 4 ($p < 0,005$) und Tag 5 ($p < 0,05$) nach Proliferationsbeginn konnte ein signifikant gesteigertes Wachstum gegenüber T47D/con beobachtet werden. Am Tag 6 sank die Anzahl vitaler Zellen bei T47D/icbKD wieder im Vergleich zum Vortag, sodass zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied mehr zu T47D/con im Proliferationsverhalten erkennbar war. Bei T47D/con konnte anders als bei T47D/icbKD ein konstantes Wachstum über die Messtage verzeichnet werden. [Abbildung 12]

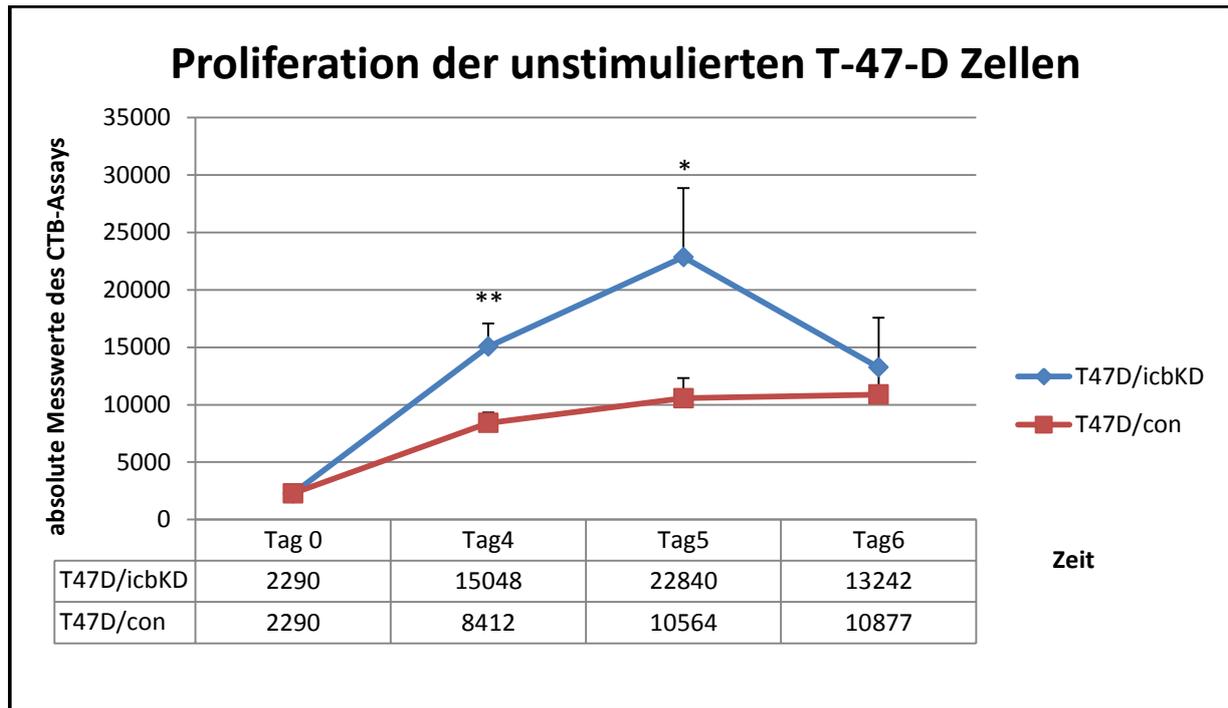


Abbildung 12 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf das Proliferationsverhalten der unbehandelten T-47-D Zellen

Gezeigt werden die absoluten Messwerte des CTB-Assays als Maß für die Anzahl vitaler Zellen der T47D/icbKD und T47D/con 0, 4, 5 und 6 Tage nach Wachstumsbeginn. Die T-47-D Zellen wurden unbehandelt belassen. In der unterhalb der Graphik befindlichen Legende sind die absoluten Messwerte (CTB-Assay) an den jeweiligen Messtagen aufgeführt. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus T47D/con

3.2.3 Proliferationsverhalten der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2

E2 bewirkte bei den T-47-D Zellen (T47D/con) eine durchschnittlich gesteigerte Proliferation (CTB-Assay) gegenüber den unstimulierten Zellen (ohne E2) mit einer Signifikanz für Tag 4 ($p < 0,05$), 5 ($p < 0,01$) und 6 ($p < 0,01$).

Hinsichtlich des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation von T-47-D Zellen unter E2-Einfluss zeigte sich in den CTB-Assays eine signifikant gesteigerte durchschnittliche relative Anzahl vitaler Zellen der T47D/icbKD gegenüber den T47D/con an Tag 4 ($p = 0,02$), Tag 5 ($p = 0,009$) und Tag 6 ($p = 0,003$). Während 4 Tage nach Zugabe von E2 die relative Proliferation der Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression 127% derjenigen der unstimulierten Zellen betrug, lag die der Kontrollzellen hingegen nur bei 109%. Dieser Wachstumsunterschied konnte ebenso für Tag 5 verzeichnet werden mit einer prozentualen durchschnittlichen Proliferationsrate von 148% bei

den T47D/icbKD und 125% bei den Kontrollzellen. Auch 6 Tage nach Stimulation mit E2 lag die durchschnittliche relative Proliferationsrate der mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen T47D/icbKD mit 191% der unstimulierten Zellen (ohne E2) deutlich über derjenigen der Kontrollzellen T47D/con mit 141%. [Tabelle 3; Abbildung 13]

Wie aus durchschnittlichen prozentualen Messwerten hervorgeht, stieg sowohl bei den mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen T47D/icbKD als auch bei den Kontrollzellen T47D/con mit dem Fortlaufen der Zeit die relative Proliferation gegenüber den unstimulierten Zellen konstant an im Sinne eines zunehmenden Zellwachstums unter Östrogeneinfluss.

Tabelle 3 Proliferation der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2

Aufgeführt ist die durchschnittliche Proliferationsrate der T47D/icbKD und T47D/con in % der unstimulierten T-47-D Zellen ohne E2 4,5,6 Tage nach Stimulation mit E2. Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Messzeitpunkt [d]	E2-Konzentration		
	T47D/icbKD [in % zur Kontrolle ohne E2]	T47D/con [in % zur Kontrolle ohne E2]	p
4	127	109	0,02
5	148	125	0,009
6	191	141	0,0003

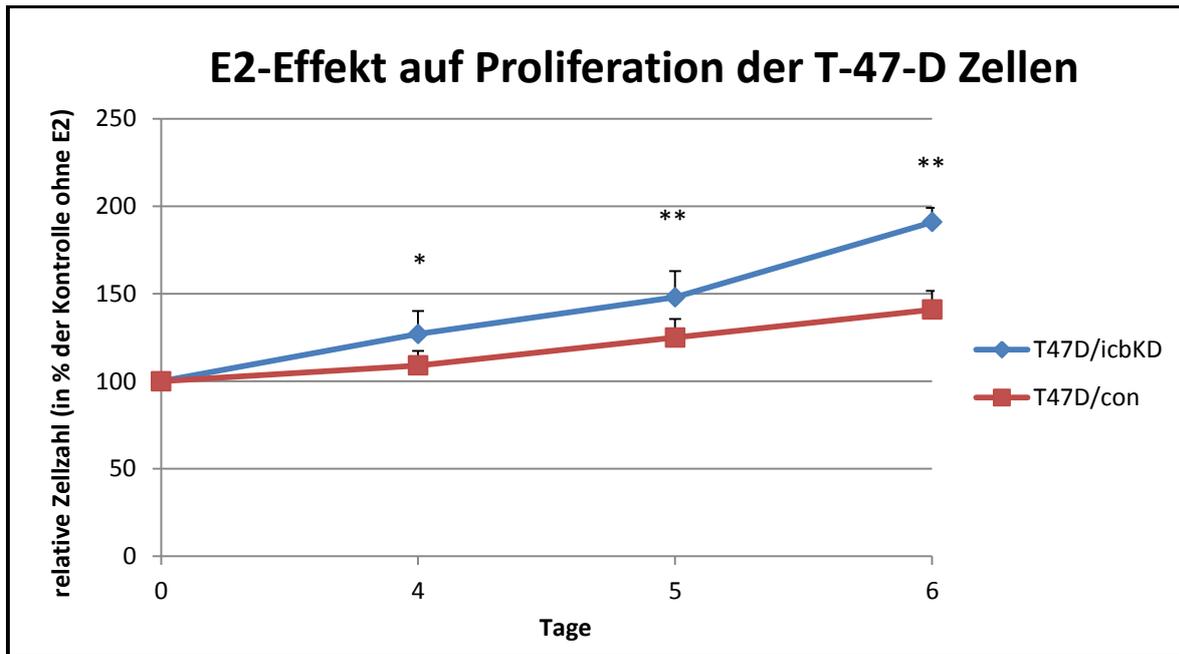


Abbildung 13 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen unter E2-Stimulation

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Anzahl vitaler T-47-D Zellen 0,4,5,6 Tage nach Stimulation mit E2. Die Werte sind angegeben in % der unstimulierten T-47-D Zellen ohne E2. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus unstimulierte T-47-D ohne E2.

3.2.4 Proliferationsverhalten der T-47-D Zellen nach Zugabe von Antiöstrogenen

3.2.4.1 ICI 182,780

Die Behandlung von T-47-D Zellen mit ICI 182,780 führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen durchschnittlichen vitalen Zellzahl der T47D/con gegenüber der LMK (=unstimulierte Zellen) im Sinne einer Proliferationshemmung. Der Unterschied war an Tag 4 nach Zugabe von ICI 182,780 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1 μ M ($p < 0,01$), an Tag 5 nach Zugabe von ICI 182,780 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1 μ M ($p < 0,01$) und an Tag 6 nach Zugabe von ICI 3nM ($p < 0,05$), 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1 μ M ($p < 0,01$) signifikant. Je höher ICI 182,780 konzentriert war, desto stärker war der wachstumshemmende Effekt im Vergleich zu den unstimulierten T-47-D Zellen (=LMK). So lag an Tag 4 die relative Proliferationsrate der T-47D nach Zugabe von 1nM ICI 182,780 bei 99% ($p = 0,35$), von 3nM bei 95% ($p = 0,15$), von 10nM bei 88% ($p = 0,002$), von 30nM bei 87%

($p=0,01$), von 100nM bei 79% ($p=0,004$), von 300nM bei 75% ($p=0,0006$) und von 1 μ M bei nur 66% ($p=0,000008$) der LMK. Der gleiche Effekt der konzentrationsabhängigen proliferationshemmenden Wirkung von ICI 182,780 zeigte sich auch für die Messtage 5 und 6 mit ähnlichen Zahlenwerten wie für Tag 4. [Tabelle 4]

In Bezug auf den Einfluss des *icb-1 knockdowns* auf die Wirkung von ICI 182,780 bei den T-47-D Zellen ist generell bedeutsam, dass für nahezu alle eingesetzten Konzentrationen an ICI 182,780 (3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M) eine signifikante ($p>0,01$) Proliferationshemmung der T47D/icbKD gegenüber der LMK verzeichnet werden konnte. Werden nun die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen in Vergleich zu den Kontrollzellen gesetzt, wird deutlich, dass sich klare Differenzen im Proliferationsverhalten der T47D/icbKD und der T47D/con nach Zugabe von ICI 182,780 ergaben. So zeichnete sich eine signifikant stärkere proliferationshemmende Wirkung von ICI 182,780 bei den Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression (T47D/icbKD) gegenüber der LMK (=unstimulierte Zellen) im Vergleich zu den Kontrollzellen (T47D/con) ab. Für die ICI 182,780 Konzentrationen 30nM, 100nM, 300nM und 1 μ M war dieser Unterschied an allen Messtagen 4, 5 und 6 signifikant ($p<0,05$). Repräsentativ für alle Tage wird im Folgenden der Effekt der differenten signifikanten Antiproliferation durch ICI 182780 bei den T47D/icbKD und T47D/con an Tag 4 präzise beschrieben. So unterschied sich an Tag 4 nach Zugabe von 30nM ICI 182,780 die relative Anzahl aktiver Zellkerne der T47D/con mit 87% der LMK signifikant ($p=0,008$) von derjenigen der T47D/icbKD mit nur 74% der LMK. Nach Zugabe von 100nM ICI 182, 780 betrug die relative Proliferationsrate an Tag 4 bei den *icb-1 knockdown* Zellen 66% der LMK, bei den Kontrollzellen 79% der LMK mit einem signifikanten Wachstumsunterschied von $p=0,02$. Ausgeprägt war dieser Proliferationsunterschied ($p=0,0008$) auch für die ICI 182,780 Konzentration von 300 nM mit einer relativen durchschnittlichen Proliferationsrate von nur 59% der LMK bei den T47D/icbKD und 75% der LMK bei den Kontrollzellen. Der selbe signifikante Wachstumsunterschied ($p=0,03$) zeigte sich auch für die höchst eingesetzte Konzentration von ICI 182, 780 (1 μ M) mit relativen Wachstumswerten von 56% der LMK bei den *icb-1* transfizierten Zellen und 66% der LMK bei den Kontrollzellen. Wie in der zugehörigen Graphik deutlich wird, bewirkte der *icb-1 knockdown* an allen Messtagen (4, 5, 6) eine verstärkte Proliferationshemmung der T-47-D Zellen

gegenüber der LMK nach Zugabe des Antiöstrogens ICI 182,780. Übersichtshalber sind die entsprechenden Einzelwerte der jeweiligen Tage den folgenden Tabellen zu entnehmen. [Abbildung 14; Tabelle 4]

Tabelle 4 Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit ICI 182,780

Aufgeführt ist die durchschnittliche Proliferationsrate der T47D/icb1KD und T47D/con in % der LMK (=T47D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium) 4,5,6 Tage nach Behandlung mit ICI 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM. Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Messzeitpunkt		ICI 182,780 1nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p	
4	93	99	0,13	
5	95	93	0,36	
6	100	100	0,45	
Messzeitpunkt		ICI 182,780 3nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p	
4	88	95	0,07	
5	89	91	0,23	
6	88	96	0,009	
Messzeitpunkt		ICI 182,780 10nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p	
4	81	88	0,02	

5	78	88	0,008
6	78	84	0,16
Messzeitpunkt	ICI 182,780 30nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
4	74	87	0,008
5	63	78	0,004
6	56	74	0,0004
Messzeitpunkt	ICI 182,780 100nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
4	66	79	0,02
5	54	67	0,02
6	47	66	0,0007
Messzeitpunkt	ICI 182,780 300nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
4	59	75	0,0008
5	47	67	0,0002
6	46	60	0,005
Messpunkt	ICI 182,780 1µM		

[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
4	56	66	0,03
5	37	55	0,007
6	41	54	0,03

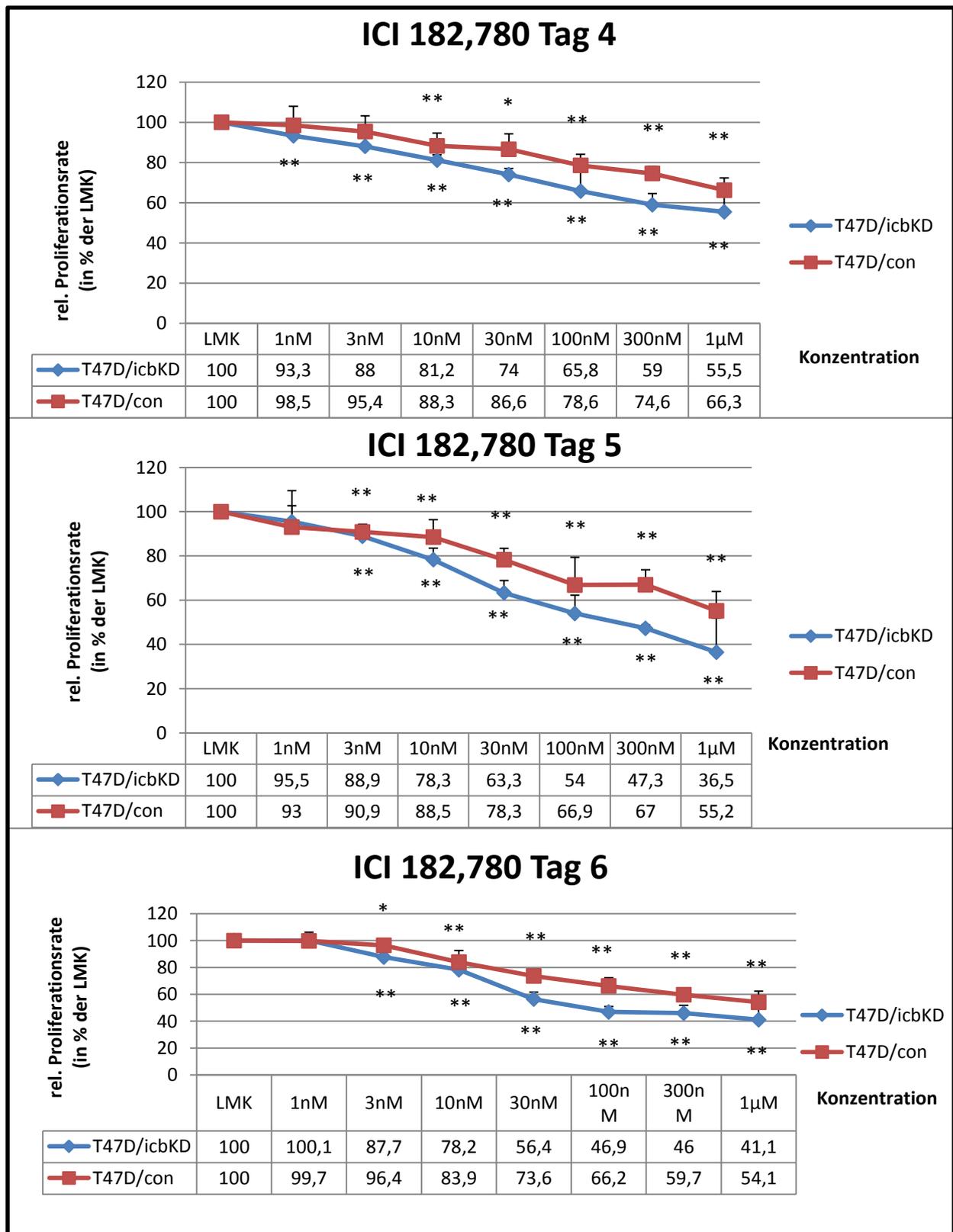


Abbildung 14 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen ICI 182,780

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Anzahl vitaler T-47-D Zellen 4, 5 und 6 Tage nach Zugabe von ICI 182,780 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1µM. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=T-47-D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus LMK.

Um den unterschiedlich starken Effekt von E2 auf die Proliferation von T47D/icbKD und T47D/con (siehe Absatz E2-Effekt) und die daraus folgende Beeinflussung der antiöstrogenen Wirkung von ICI 182,780 auf die Zellen herausrechnen zu können, wurde hierfür eine eigene Auswertung generiert. So konnte der von E2 unbeeinflusste Unterschied in der Wirkung von ICI 182,780 auf T47D/icbKD und T47D/con ermittelt werden. Dies gelang, indem die Differenz der östrogenhaltigen Lösungsmittelkontrollen T47D/icbKD und T47D/con (in % zum Zellwachstum von T47D/icbKD und T47D/con ohne E2) im Zellwachstum bestimmt wurde. Das Ergebnis dieser Differenz galt als Faktor (=Ratio der LMK), durch den anschließend die Ratio des prozentualen Effektes der verschiedenen Konzentrationen ICI 182,780 auf T47D/icbKD im Vergleich zu T47D/con (in % zu T47D/icbKD und T47D/con ohne E2) dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert wurde. Daraus ergab sich das relative Wachstum von T47D/icbKD in % zu T47D/con nach Zugabe der entsprechenden Konzentrationen ICI 182,780 unabhängig von der Proliferation durch E2. Lag die Ratio unter 100%, bedeutete dies, dass das Antiöstrogen ICI 182,780 auf die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen eine stärkere antiproliferative Wirkung hatte als auf die Kontrollzellen (T47D/con).

Es ergab sich an den Messtagen 4, 5 und 6 für nahezu alle ICI 182,780 Konzentrationen eine Ratio <100% (in % T47D/icbKD zu T47D/con) im Sinne einer stärkeren proliferationshemmenden Effekt von ICI 182,780 auf T47D/icbKD im Vergleich zu T47D/con. Die Ergebnisse galten an den Tagen 4 und 5 für alle Konzentrationen ICI 182,780 (1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM) als signifikant ($p < 0,05$). Am Tag 6 ergaben sich Signifikanzen ($p < 0,05$) für ICI 182,780 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM. Vor allem bei Tag 5 zeigte sich konzentrationsabhängig eine abnehmende Ratio der T47D/icbKD (in % zu T47D/con) als Ausdruck für die relative proliferative Wachstumsrate. So betrug diese am Tag 5 für 1nM 93% ($p = 0,03$), für 3nM 96% ($p = 0,01$), für 10nM 89% ($p = 0,007$), für 30nM 83% ($p = 0,03$), für 100nM 72% ($p = 0,0003$), für 300nM 68% ($p = 0,0009$) und für 1µM 43% ($p = 0,003$). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Tag 4 und 6 und sind der entsprechenden Tabelle zu entnehmen. Diese zusätzliche Auswertung verdeutlicht, dass der Effekt der durch *icb-1 knockdown* verstärkten antiproliferativen Wirkung von ICI 182,780 auf die Zelllinie T-47-D auch nach Ausschalten des Östrogeneinflusses existiert. [Tabelle 5; Abbildung 15]

Tabelle 5 relative Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit ICI 182,780 (nach Herausrechnung des E2-Effektes)

Aufgeführt ist die prozentuale Ratio der relativen Wachstumsrate T47D/icb1KD (in % zu icbKD ohne E2) zu T47D/con (in % zu con ohne E2) 4,5,6 Tage nach Behandlung mit ICI 182,780 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM nach Herausrechnung des E2-Effektes. Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Messzeitpunkt		ICI 1nM		ICI 3nM		ICI 10nM	
[d]	Ratio [% icbKD/ con]	p	Ratio [% icbKD / con]	p	Ratio [% icbKD /con]	p	
4	91	0,05	90	0,02	86	0,02	
5	93	0,03	96	0,01	89	0,007	
6	101	0,38	91	0,02	87	0,02	
Messzeitpunkt		ICI 30nM		ICI 100nM		ICI 300nM	
[d]	Ratio [% icbKD/ con]	p	Ratio [% icbKD/ con]	p	Ratio [% icbKD/ con]	p	
4	88	0,04	78	0,002	80	0,01	
5	83	0,03	72	0,0003	68	0,0009	
6	78	0,01	77	0,02	80	0,009	
Messzeitpunkt		ICI 1µM					
[d]	Ratio [% icbKD/ con]	p					
4	76	0,003					

5	43	0,003
6	76	0,01

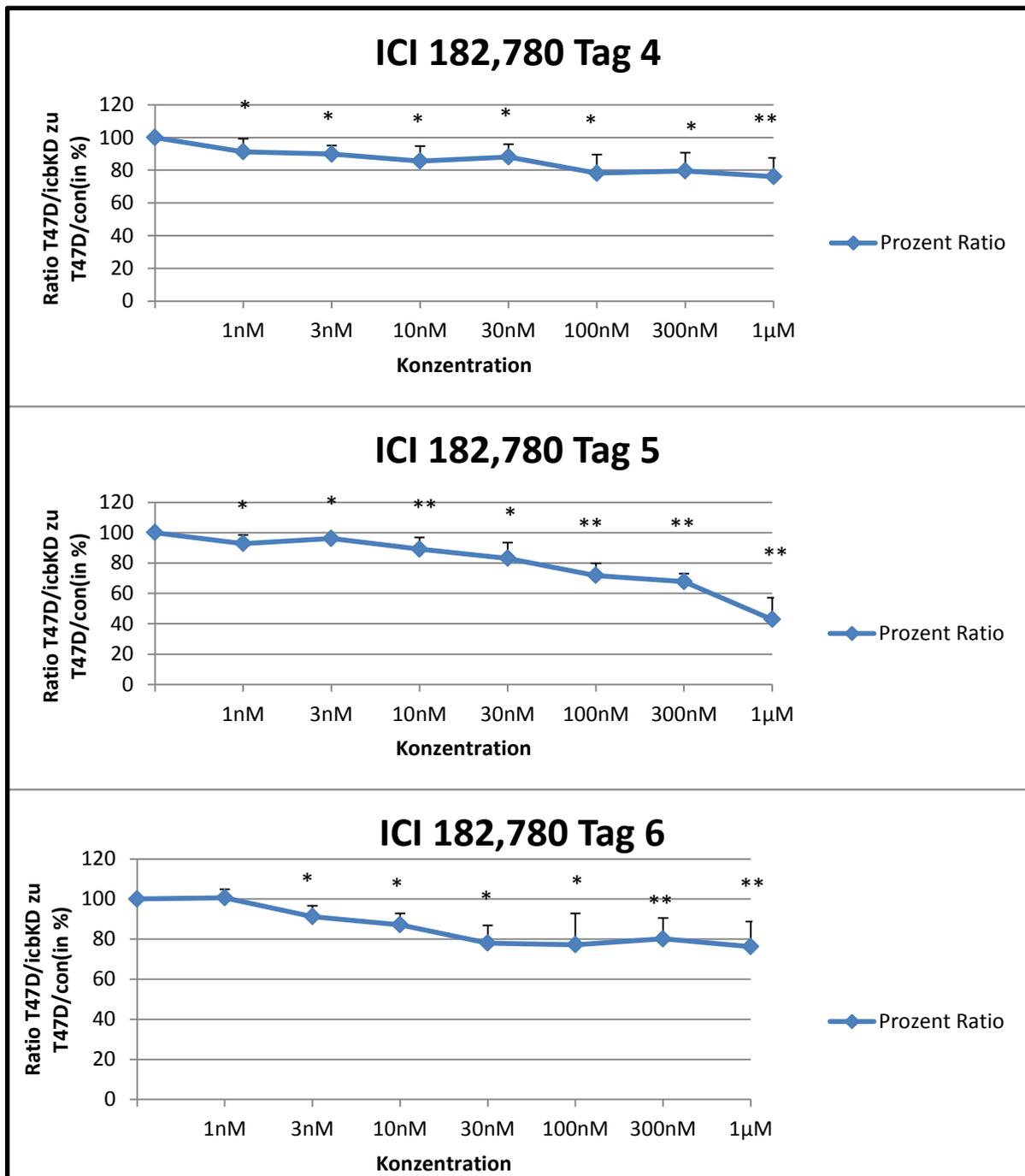


Abbildung 15 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 (nach Herausrechnung des E2-Effekts)

Gezeigt wird die durchschnittliche prozentuale Ratio der relativen Wachstumsrate T47D/icb1KD (in % zu T47D/icbKD ohne E2) zu T47D/con (in % zu T47D/con ohne E2) 4, 5 und 6 Tage nach Zugabe von ICI 182,780 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM und 1µM nach Herausrechnung des E2 Effektes auf die Zellen. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus T47D/con

3.2.4.2 4-OH-Tamoxifen

Hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Antiöstrogen 4-OH-Tamoxifen ergab sich größtenteils keine signifikante Wachstumshemmung der T47D/con gegenüber der LMK (=Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium) ($p > 0,05$). Nur an Tag 3 nach Zugabe von 100nM 4-OH-Tamoxifen konnten signifikant ($p = 0,02$) weniger vitale Zellen T47D/con (82% der LMK) gemessen werden, nach Zugabe von höheren Konzentrationen wie 1 μ M und 10 μ M 4-OH-Tamoxifen sank die prozentuale Anzahl vitaler Zellen jedoch lediglich auf 97% ($p = 0,36$) bzw. 90% ($p = 0,22$) der LMK. An Tag 4 stieg die Proliferationsrate der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Antiöstrogen 4-OH-Tamoxifen 100nM, 1 μ M und 10 μ M paradoxerweise sogar leicht an auf 101% ($p = 0,9$), 110% ($p = 0,3$) und 117% ($p = 0,001$) der LMK. Ähnlich wie an Tag 3 konnte auch an Tag 5 für die niedrigste Konzentration an 4-OH-Tamoxifen (100nM) mit einem Absinken der vitalen Kontrollzellen T47D/con auf 89% ($p = 0,39$) die noch deutlichste Proliferationshemmung verzeichnet werden. Für 1 μ M und 10 μ M konnte mit 94% ($p = 0,68$) und 98% ($p = 0,87$) der LMK kaum eine Wachstumshemmung beobachtet werden. Signifikanz ergab sich jedoch für keinen der prozentualen Proliferationswerte an Tag 5. [Abbildung 16; Tabelle 6]

Bei Analyse des *icb-1 knockdown* Effektes auf die Proliferationshemmung von 4-OH-Tamoxifen bei den T-47-D Zellen wird ersichtlich, dass für fast keine Konzentration des Antiöstrogens an den Messtagen 3, 4 und 5 ein signifikanter Unterschied der T47D/*icb*KD und T47D/con im Proliferationsverhalten festgestellt werden kann ($p > 0,05$). Tendenziell schienen im Vergleich zur LMK die Zellen nach *knockdown* von *icb-1* (T47D/*icb*KD) im Sinne einer Proliferationshemmung besser auf das Antiöstrogen anzusprechen als die Zellen mit vorhandenem Gen *icb-1* (T47D/con). So sank beispielsweise an Tag 5 nach Behandlung der Zellen mit 4-OH-Tamoxifen 10 μ M die relative Anzahl vitaler Zellen bei den T47D/*icb*KD signifikant auf 82% der LMK. Bei den T47D/con ergab sich hingegen mit 98% der LMK nahezu keine Wachstumshemmung. Der Wachstumsunterschied war aber nicht signifikant für diese Werte ($p = 0,24$). Am 5. Tag nach Zugabe von 4-OH-Tamoxifen ergaben sich auch bei den Konzentrationen 100nM und 1 μ M keine signifikant unterschiedlichen Messwerte für die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen und die Kontrollzellen

($p > 0,05$). An Tag 3 nach Zugabe des Antiöstrogens lag das relative Wachstum der T47D/icbKD Zellen für 100nM und 1 μ M 4-OH-Tamoxifen bei jeweils 96% der LMK, für 10 μ M 4-OH-Tamoxifen sank es ab auf 90% LMK. Für diese Werte konnten weder Signifikanzen gegenüber der LMK festgestellt werden ($p > 0,05$), noch ergab sich eine signifikante Differenz der T47D/icbKD zu den T47D/con ($p > 0,05$). Gegensätzlich zu der tendenziell eher proliferationssteigernden Wirkung von 4-OH-Tamoxifen auf die T47D/con an Tag 4 zeigte sich für die T47D/icbKD eine leichte prozentuale Wachstumshemmung gegenüber der LMK mit 89% für 100nM ($p = 0,12$), 92% für 1 μ M ($p = 0,27$) und 89% für 10 μ M ($p = 0,18$). Während sich für die beiden niedrigen Konzentrationen 100nM ($p = 0,3$) und 1 μ M ($p = 0,25$) noch kein signifikanter Wachstumsunterschied bei den Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression und den Kontrollzellen ergab, war die prozentuale Anzahl vitaler Zellen (T47D/icbKD) für 10 μ M 4-OH-Tamoxifen signifikant ($p = 0,04$) unter derjenigen der Kontrollzellen. [Tabelle 6; Abbildung 16]

Tabelle 6 Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen

Aufgeführt ist die durchschnittliche Proliferationsrate der T47D/icb1KD und T47D/con in % der LMK (=T-47-D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium) 3,4,5 Tage nach Behandlung mit 4-OH-Tamoxifen 100nM, 1 μ M und 10 μ M. Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen.

Messzeitpunkt	4-OH-Tamoxifen 100nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
3	96	82	0,64
4	89	101	0,3
5	89	89	0,96
Messzeitpunkt	4-OH-Tamoxifen 1 μ M		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p

3	96	97	0,96
4	92	110	0,25
5	86	94	0,62
Messzeitpunkt	4-OH-Tamoxifen 10μM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
3	90	90	0,94
4	89	117	0,04
5	82	98	0,24

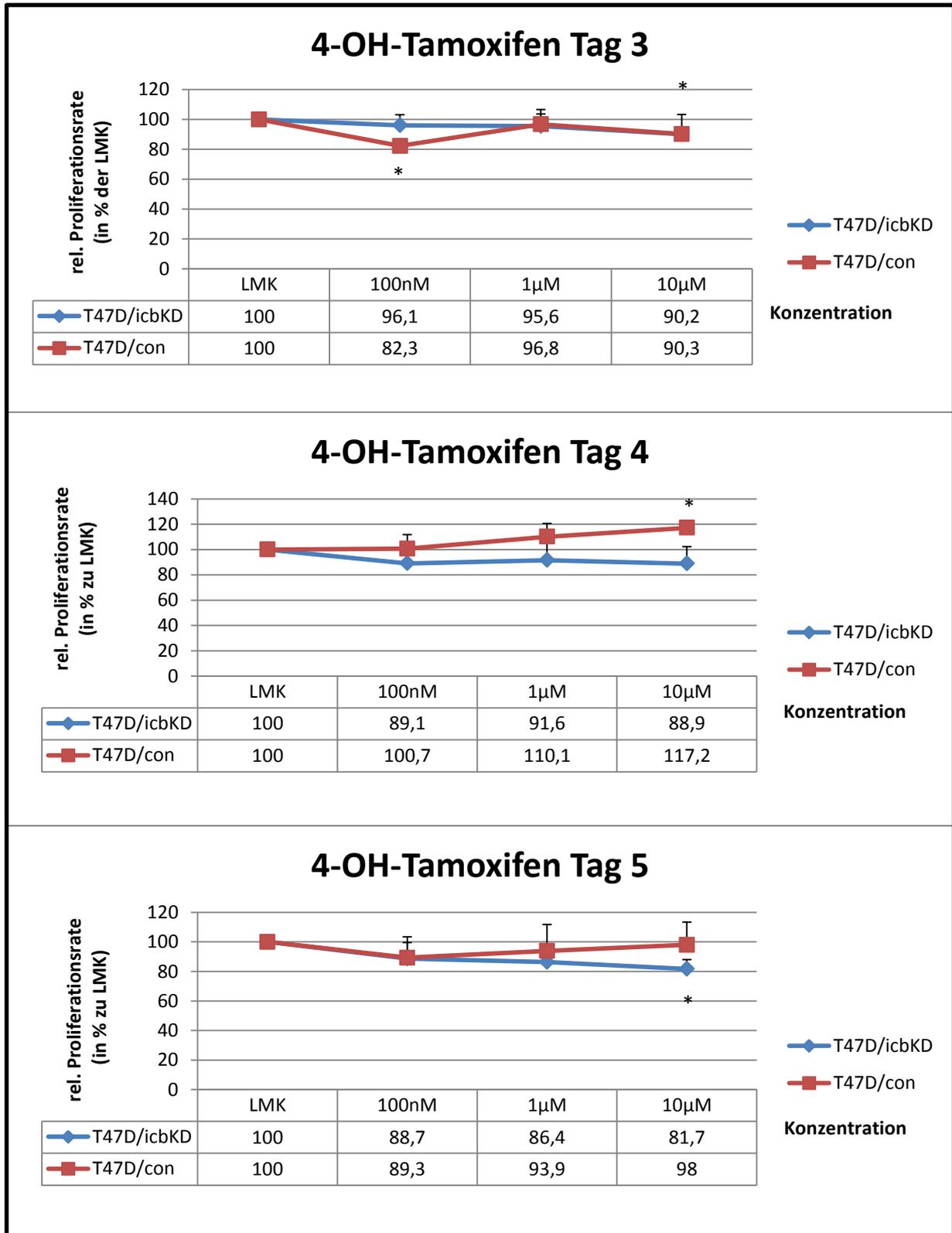


Abbildung 16 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Antiöstrogen 4-OH-Tamoxifen

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Anzahl vitaler T-47-D Zellen 3, 4 bzw. 5 Tage nach Zugabe von Tamoxifen 100nM, 1µM und 10µM. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=T-47-D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium). * $p < 0,05$ versus LMK.

3.2.4.3 Endoxifen

Endoxifen, aktiver Metabolit von Tamoxifen, wirkte im Sinne eines Antiöstrogens in den Proliferationsversuchen (CTB-Assay) überwiegend wachstumshemmend auf die T-47-D Zellen. Je höher die Endoxifenkonzentration, desto stärker war die antiproliferative Wirkung des Antiöstrogens. Nach der Zugabe von 5nM Endoxifen konnte bereits eine leichte Proliferationshemmung der T47D/con im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (=LMK) beobachtet werden. So betrug die prozentuale durchschnittliche Wachstumsrate der T47D/con am 3.Tag 87% ($p=0,07$) der LMK, am 4.Tag 92% ($p=0,18$) der LMK und am 5. Tag 93% ($p=0,35$) der LMK. Jedoch war für diese niedrigste Konzentration an Endoxifen die Antiproliferation der T-47-D Zellen gegenüber der LMK an noch keinem der Messtage signifikant ($p>0,05$). Nach Zugabe von 25nM Endoxifen ergab sich eine signifikante Wachstumshemmung für die beiden Messtage 3 und 4. Die relative durchschnittliche prozentuale Anzahl vitaler Zellen T47D/con entsprach am 3.Tag 74% ($p=0,04$) und am 4.Tag 85% ($p=0,04$) derjenigen der LMK. Einzig an Tag 5 nach Zugabe von 25nM Endoxifen war die relative Proliferationsrate der Zellen mit 81% ($p=0,13$) der LMK nicht signifikant niedriger als die LMK. Der Einsatz der höchsten Konzentration (100nM) an Endoxifen führte schließlich an allen Messtagen zu einer signifikanten antiöstrogenen Proliferationshemmung mit 67% ($p=0,05$) der LMK an Tag 3, 76% ($p=0,01$) der LMK an Tag 4 und 61% ($p=0,02$) der LMK an Tag 5. [Tabelle 7; Abbildung 17]

Es zeigte sich ein hemmender Einfluss des *icb-1 knockdowns* auf die Wirkung von Endoxifen (5nM, 25nM, 100nM). So ergab sich eine Wirkungsabschwächung des Antiöstrogens bei den T47D/icbKD im Vergleich zu den Kontrollzellen an allen Messtagen 4, 5 und 6. Wenn gleich sich auch bei den *icb-1* transfizierten Zellen teilweise eine signifikante Proliferationshemmung durch Endoxifen gegenüber der LMK einstellte, war dieser hemmende Effekt jedoch insgesamt etwas schwächer ausgeprägt als bei den Kontrollzellen. An Tag 3 lag die relative prozentuale Proliferationsrate der Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression für alle Konzentrationen über derjenigen der Kontrollzellen. An diesem Tag sank die relative Anzahl aktiver Zellen (T47D/icbKD) nach Zugabe von Endoxifen zwar signifikant ab auf 98% der LMK bei 5nM ($p=0,05$), auf 88% ($p=0,02$) der LMK für 25nM und auf 72% ($p=0,001$) der LMK für 100nM. Allerdings betrug die relative Proliferationsrate bei den

Kontrollzellen nur 74% der LMK für 5nM, 74% der LMK für 25nM und 67% der LMK für 100nM. Dieser Proliferationsunterschied zwischen den *icb-1* transfizierten Zellen und den Kontrollzellen war jedoch nicht signifikant ($p>0,05$). Während sich für die Konzentrationen 5nM und 25nM auch an Tag 4 dieser Effekt der abschwächenden Wirkung von Endoxifen auf die T-47-D Zellen durch den *icb-1 knockdown* zeigte, konnte dieser hemmende Effekt für 100nM Endoxifen nicht festgestellt werden. Auch für diesen Tag war die Differenz der Antiproliferation der T47D/*icb*KD und T47D/con durch Endoxifen ohne Signifikanz ($p>0,05$). Der Tendenz der Vortage entsprechend lag die relative durchschnittliche Anzahl vitaler Zellen der mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen auch an Tag 5 über derjenigen der Kontrollzellen. So betrug beispielsweise die relative Proliferationsrate der T47D/*icb*KD 94% ($p=0,04$) der LMK, die der Kontrollzellen hingegen nur 81% ($p>0,05$) der LMK. Signifikant erwiesen sich die Ergebnisse einer Wirkungssteigerung des *icb-1* Gens auf Antiöstrogen Endoxifen im Sinne einer verstärkten Proliferationshemmung gegenüber der LMK jedoch auch an diesem Tag nicht ($p>0,05$). [Tabelle 7; Abbildung 17]

Tabelle 7 Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit Endoxifen.

Aufgeführt ist die durchschnittliche Proliferationsrate der T47D/*icb*1KD und T47D/con in % der LMK (=T-47-D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium) 3, 4, 5 Tage nach Behandlung mit Endoxifen 5nM, 25nM und 100nM. Signifikanz wurde für $p<0,05$ angenommen.

Messzeitpunkt	Endoxifen 5nM		
[d]	T47D/ <i>icb</i> KD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
3	98	87	0,12
4	107	92	0,22
5	109	93	0,38
Messzeitpunkt	Endoxifen 25nM		
[d]	T47D/ <i>icb</i> KD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p

3	88	74	0,17
4	93	85	0,53
5	94	81	0,38
Messzeitpunkt	Endoxifen 100nM		
[d]	T47D/icbKD [in % zur LMK]	T47D/con [in % zur LMK]	p
3	72	67	0,66
4	71	76	0,60
5	68	61	0,47

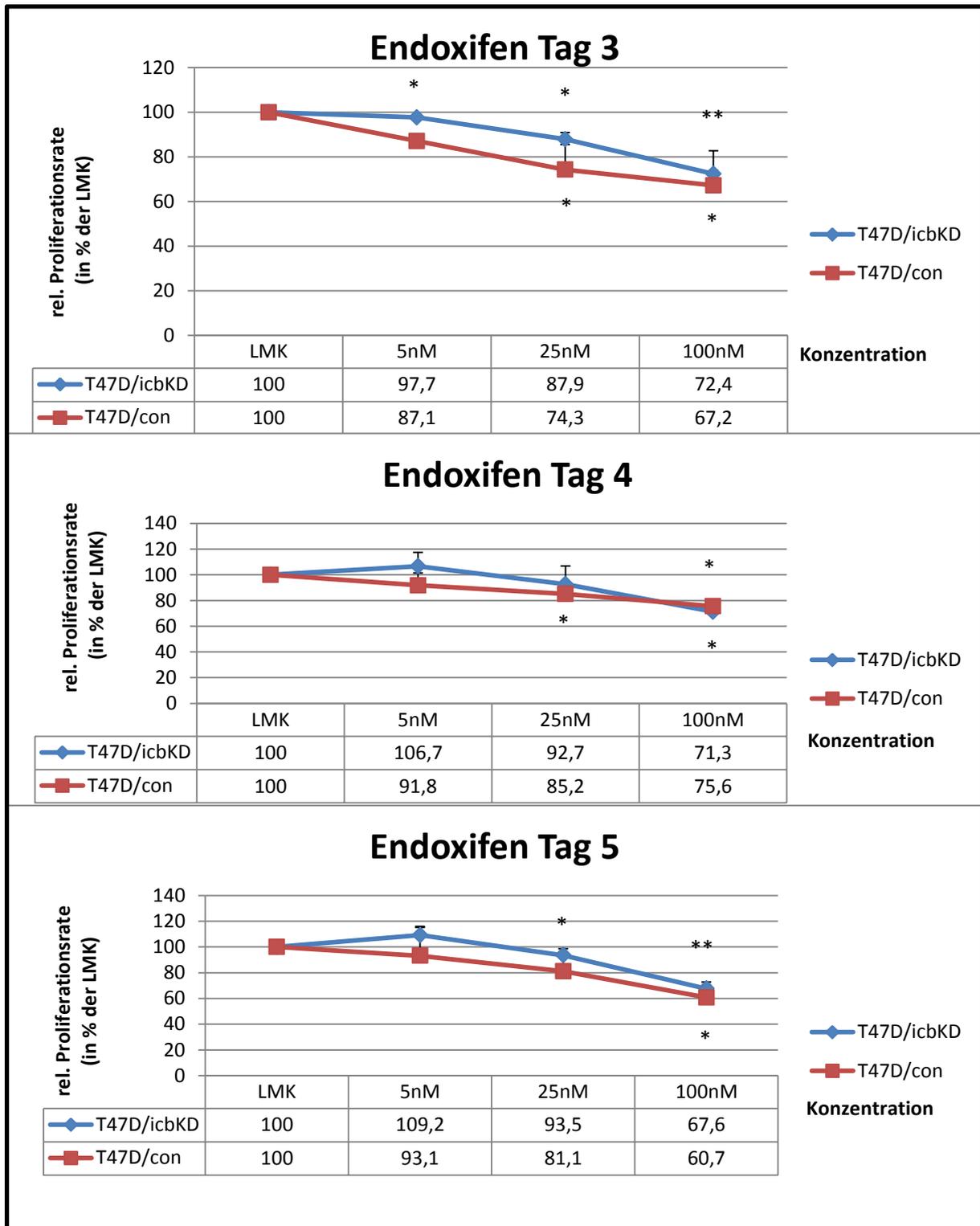


Abbildung 17 Graphische Darstellung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation der T-47-D Zellen nach Behandlung mit dem Antiöstrogen Endoxifen

Gezeigt wird die durchschnittliche relative Anzahl vitaler T-47-D Zellen 3, 4 bzw. 5 Tage nach Zugabe von Endoxifen 5nM, 25nM und 100nM. Die Werte sind angegeben in % der LMK (=T-47-D Zellen mit Lösungsmittel in östrogenhaltigem 1xSR2-Medium). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus LMK.

3.3 mRNA-Level E2- und Proliferations-assoziiierter Gene bei T-47-D Zellen

3.3.1 Überblick

Es wurde eine zweite Versuchsreihe mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss von *icb-1* auf das Ansprechen von E2 bzw. auf die Proliferation der T-47-D Zellen auf RNA-Ebene zu untersuchen. Dies gelang, indem das mRNA-Level der E2-Zielgene PR, ER α , pS2 und der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1, Ki67 mittels *Real-Time* qPCR bestimmt und die *icb-1* siRNA transfizierten Zellen mit den Kontrollzellen der Zelllinie T-47-D verglichen wurden. Im ersten Versuchsteil blieben die Zellen unbehandelt, um den *knockdown* Effekt von *icb-1* auf die in der Tabelle aufgeführten Gene zu erforschen. Anschließend wurden im zweiten Versuchsabschnitt T-47-D Zellen mit E2 stimuliert und die Auswirkungen von *icb-1* auf die Expression der Gene nach Behandlung mit E2 erforscht.

Die Herstellung der RNA und anschließend der cDNA erfolgten gemäß Protokoll (Abschnitt Methodenteil). Für die *Real-Time* qPCR wurden für den Master-Mix die für die entsprechenden Gene spezifischen Primer verwendet. [Tabelle 8]

Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten, gab es mindestens 3 Läufe pro Primer.

Tabelle 8 Verwendete Primer und deren Zielgene

Aufgeführt sind die in der *Real-Time* qPCR verwendeten Primer und deren Zielgene. Bei den oben aufgelisteten Genen PR, ER α und pS2 handelt es sich um Zielgene für E2 (rot dargestellt), die drei unteren Gene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 sind Proliferationsgene (blau dargestellt).

Gen	Primer
PR	PR-ABC 2. for/rev
ER α	ER α OA_for/rev

pS2	PS2 1 / 2
CyclinA2	CYCA2 1 / 2
CyclinD1	CYCD1 1 / 2
Ki67	Ki-67_for/rev

3.3.2 Ergebnisse der Genanalyse

3.3.2.1 Effekt von *icb-1* auf die Expression der Gene

Hinsichtlich der Expression der E2-Zielgene PR, ER α und pS2 als Gene, die bekanntermaßen unter dem Einfluss von Östrogen stehen, waren unterschiedliche Effekte durch den *knockdown* von *icb-1* zu erkennen.

Die Expression der Gene ER α und pS2 stieg durch den *icb-1 knockdown* (T47D/*icb*KD) im Vergleich zu den Kontrollzellen (T47D/con) signifikant an. So lag das relative durchschnittliche ER α mRNA-Level der mit *icb-1* siRNA transfizierten T-47-D Zellen mit 160,7% signifikant ($p=0,01$) über demjenigen der Kontrollzellen. Das mRNA-Level von pS2 bei den T47D/*icb*KD betrug sogar 237,2% desjenigen der T47D/con ($p=0,01$). [Tabelle 9; Abbildung 18]

Hingegen bewirkte der *knockdown* von *icb-1* eine signifikante Reduktion ($p=0,03$) der Expression des Gens PR mit einem relativen durchschnittlichen mRNA-Level von 75,8% gegenüber den Kontrollzellen.

Bezüglich der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 hatte der *icb-1 knockdown* einen einheitlichen Einfluss auf die Expression der Gene im Sinne einer signifikanten Expressionsreduktion.

So lagen bei den T-47-D Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression die relativen durchschnittlichen mRNA-Level von CyclinA2 mit 64,6% ($p=0,002$), von CyclinD1

($p=0,02$) mit 72,9% und von Ki67 ($p=0,02$) mit 66,7% signifikant unter dem der Kontrollzellen. [Tabelle 9; Abbildung 18]

Tabelle 9 Expression von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach *icb-1 knockdown*

Aufgeführt sind die relativen durchschnittlichen mRNA-Level von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 (rot dargestellt) und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen (blau dargestellt) nach *icb-1 knockdown* (T47D/*icb*KD) in % der Kontrollzellen (T47D/con). Signifikanz wird für $p<0,05$ angenommen.

Gen	T47D/ <i>icb</i> KD [in % der Kontrollzellen]	p
PR	75,8	0,03
ER α	160,7	0,01
pS2	237,2	0,01
CyclinA2	64,6	0,002
CyclinD1	72,9	0,02
Ki67	66,9	0,02

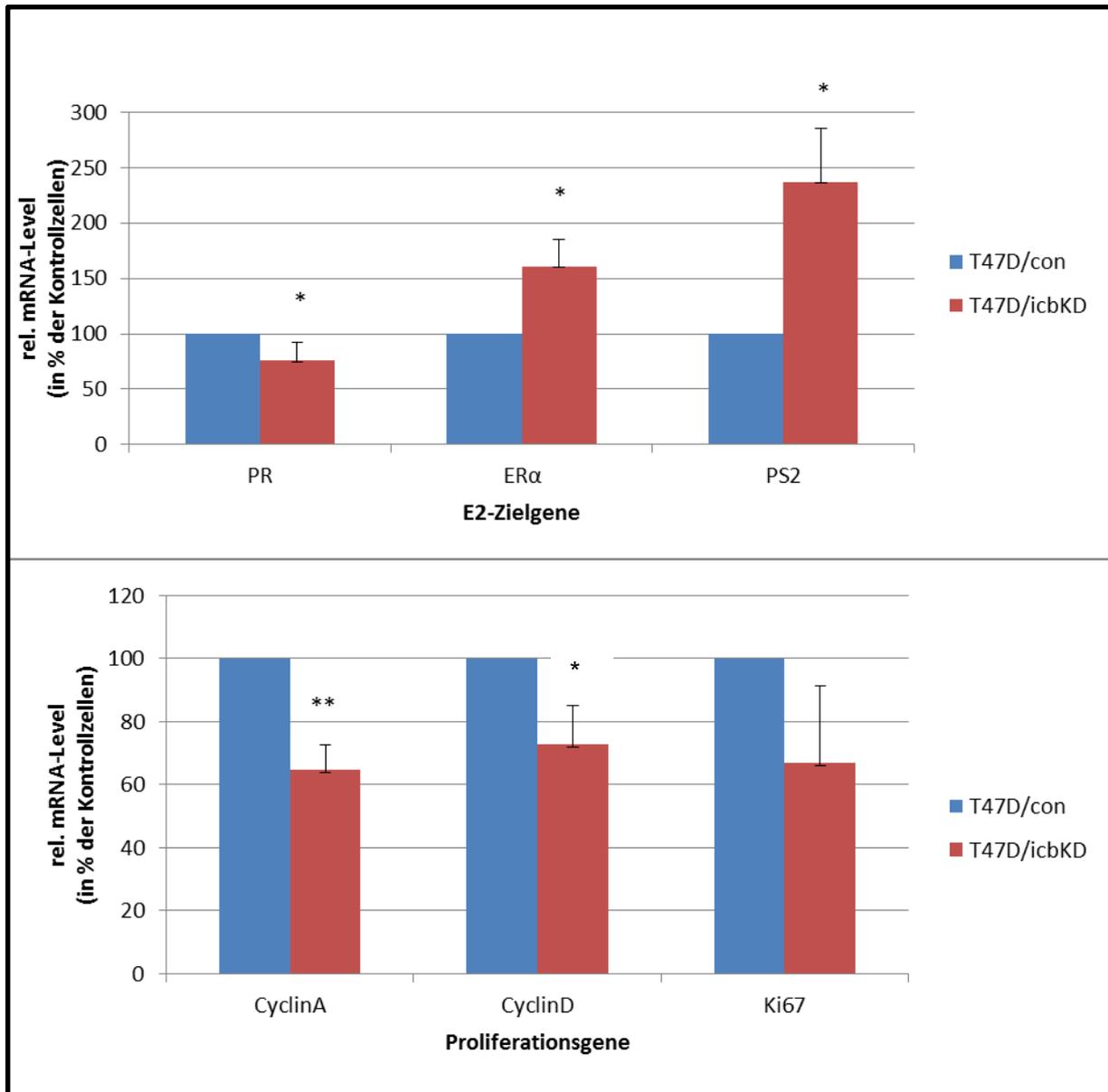


Abbildung 18 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1 knockdowns* auf die Expression der E2-Zielgene PR, ERα, PS2 und der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 der T-47-D Zellen.

Dargestellt sind die durchschnittlichen mRNA-Level von PR, ERα, pS2 und CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T47D/icbKD in % der T47D/con. Die Zellen T47D/icbKD und T47D/con blieben unbehandelt (kein E2-Zusatz). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus T47D/con.

3.3.2.2 Effekt von *icb-1* auf die Expression der Gene nach Stimulation mit E2

Für die E2-Zielgene PR und pS2 zeigte sich eine Steigerung des mRNA-Levels sowohl der T47D/con als auch der T47D/*icb*KD nach Stimulation mit E2 im Sinne einer höheren Expressionsrate der Gene im Vergleich zur LMK (=Zellen ohne E2-Zusatz). Signifikanzen hierfür ergaben sich für das Gen PR mit 236% bei T47D/con ($p=0,02$) und mit 191% bei T47D/*icb*KD ($p=0,01$) und für das Gen pS2 mit 1922% bei T47D/*icb*KD ($p=0,02$) der LMK. Die Expression von ER α veränderte sich nach Stimulation mit E2 nicht wesentlich. Bei den T47D/con ergab sich mit 112% ($p=0,06$) tendenziell eher ein gesteigertes mRNA-Level gegenüber der LMK, bei den T47D/*icb*KD mit 85% ($p=0,05$) eher ein reduziertes. [Tabelle 10 und 11; Abbildung 19]

icb-1 knockdown der T-47-D Zellen bewirkte eine relative Reduktion der Expression der Gene PR und ER α nach Stimulation mit E2. So betrug das relative durchschnittliche PR mRNA-Level der T47D/*icb*KD nur 83,8% ($p=0,15$) desjenigen der Kontrollzellen T47D/con. Der relative ER α mRNA-Level der T-47-D Zellen nach *icb-1 knockdown* lag mit 85,1% ($p=0,05$) der T47D/con signifikant unter dem der Kontrollzellen. Die relative durchschnittliche Expression von pS2 hingegen stieg mit 163,3% der Kontrollzellen durch den *knockdown* von *icb-1* an ($p=0,1$). [Tabelle 10 und 11; Abbildung 19]

Wie auch bei den E2-Zielgenen resultierte die Stimulation mit E2 in einer gesteigerten Expression der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 bei den mit *icb-1* siRNA transfizierten T-47-D Zellen und den T47D/con gegenüber der LMK (=Zellen ohne E2). So zeigte sich ein signifikant höheres durchschnittliches relatives mRNA-Level im Vergleich zur LMK für CyclinA2 mit 198% bei T47D/*icb*KD ($p=0,0005$) und mit 309% bei den T47D/con ($p<0,01$), für CyclinD1 mit 176% bei T47D/*icb*KD ($p=0,02$) und mit 254% bei den T47D/con ($p=0,002$) und für Ki67 mit 339% bei T47D/*icb*KD ($p=0,02$). Das durchschnittliche mRNA-Level des Gens Ki67 erhöhte sich auch bei den T47D/con (192% der LMK) deutlich durch die östrogene Stimulation gegenüber den unstimulierten Zellen. Allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant [Tabelle 10 und 11; Abbildung 19].

Der *icb-1 knockdown* der T-47-D Zellen bewirkte ein erhöhtes mRNA-Level der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 gegenüber den Kontrollzellen nach Behandlung mit E2 im Sinne einer gesteigerten Genexpression. Signifikanzen ergaben sich entsprechend für alle drei Proliferationsgene. So betrug nach Behandlung der T-47-D Zellen mit E2 die relative durchschnittliche Expression von CyclinA2 für T47D/icbKD 195,5% derjenigen der Kontrollzellen ($p=0,01$), von CyclinD1 für T47D/icbKD 151,0% derjenigen der Kontrollzellen ($p=0,04$) und von Ki67 für T47D/icbKD sogar 607,4% derjenigen der Kontrollzellen ($p=0,007$). [Tabelle 10 und 11; Abbildung 19]

Tabelle 10 Expression der E2-Zielgene PR, ER α , PS2 und der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2

Aufgeführt sind die relativen durchschnittlichen mRNA-Level von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 (rot dargestellt) und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 (blau dargestellt) der T47D/con und T47D/icbKD nach Behandlung mit E2 in % der LMK (=Zellen ohne E2-Stimulation). Signifikanz wird für $p<0,05$ angenommen.

Gen	T47D/con [in %der LMK]	p	T47D/icbKD [in % der LMK]	p
PR	236,0	0,02	191,0	0,01
ER α	112,4	0,06	85,4	0,05
pS2	1096,3	0,06	1922,2	0,02
CyclinA2	198,3	0,0005	309,4	0,002
CyclinD1	176,0	0,02	254,1	0,002
Ki67	192,1	0,09	339,0	0,02

Tabelle 11 Expression von E2-Zielgenen PR, ER α , pS2 und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 der T-47-D Zellen nach Stimulation mit E2

Aufgeführt sind die relativen durchschnittlichen mRNA-Levels von E2-Zielgenen PR, ER α , PS2 (rot dargestellt) und Proliferationsgenen CyclinA2, CyclinD1, Ki67 (blau dargestellt) der T47D/icbKD in % der Kontrollzellen (T47D7/con) nach Behandlung mit E2 (T47D/icbKD). Signifikanz wird für $p < 0,05$ angenommen.

Gen	T47D/icbKD [in % der Kontrollzellen]	p
PR	83,8	0,15
ER α	85,1	0,05
pS2	163,3	0,1
CyclinA2	159,5	0,01
CyclinD1	151,0	0,04
Ki67	607,4	0,007

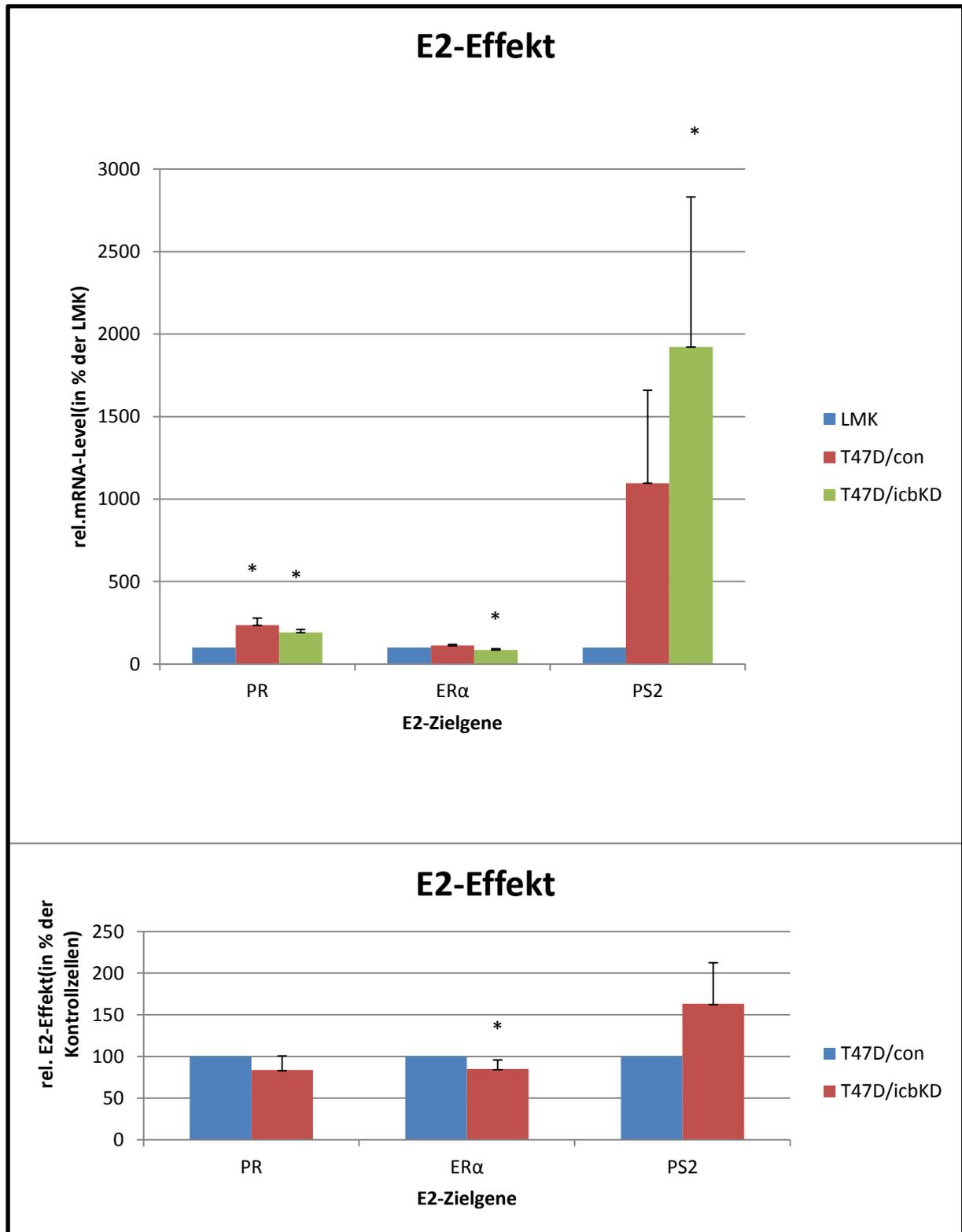


Abbildung 19 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1* knockdowns auf die Expression der E2-Zielgene PR, ER α , pS2 der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2.

Oben sieht man die durchschnittliche relative Expression von PR, ER α , PS2 der mit *icb-1* siRNA transfizierten T-47-D Zellen und der T47D/con nach Stimulation mit E2 in % der LMK (=Zellen ohne E2-Stimulation). Unten dargestellt sind die durchschnittlichen mRNA-Level von PR, ER α , PS2 der T47D/icbKD in % der T47D/con. Die Zellen T47D/icbKD und T47D/con wurden mit E2 stimuliert. Oben * $p < 0,05$ vs. LMK(=Zellen ohne E2); unten * $p < 0,05$ versus T47D/con.

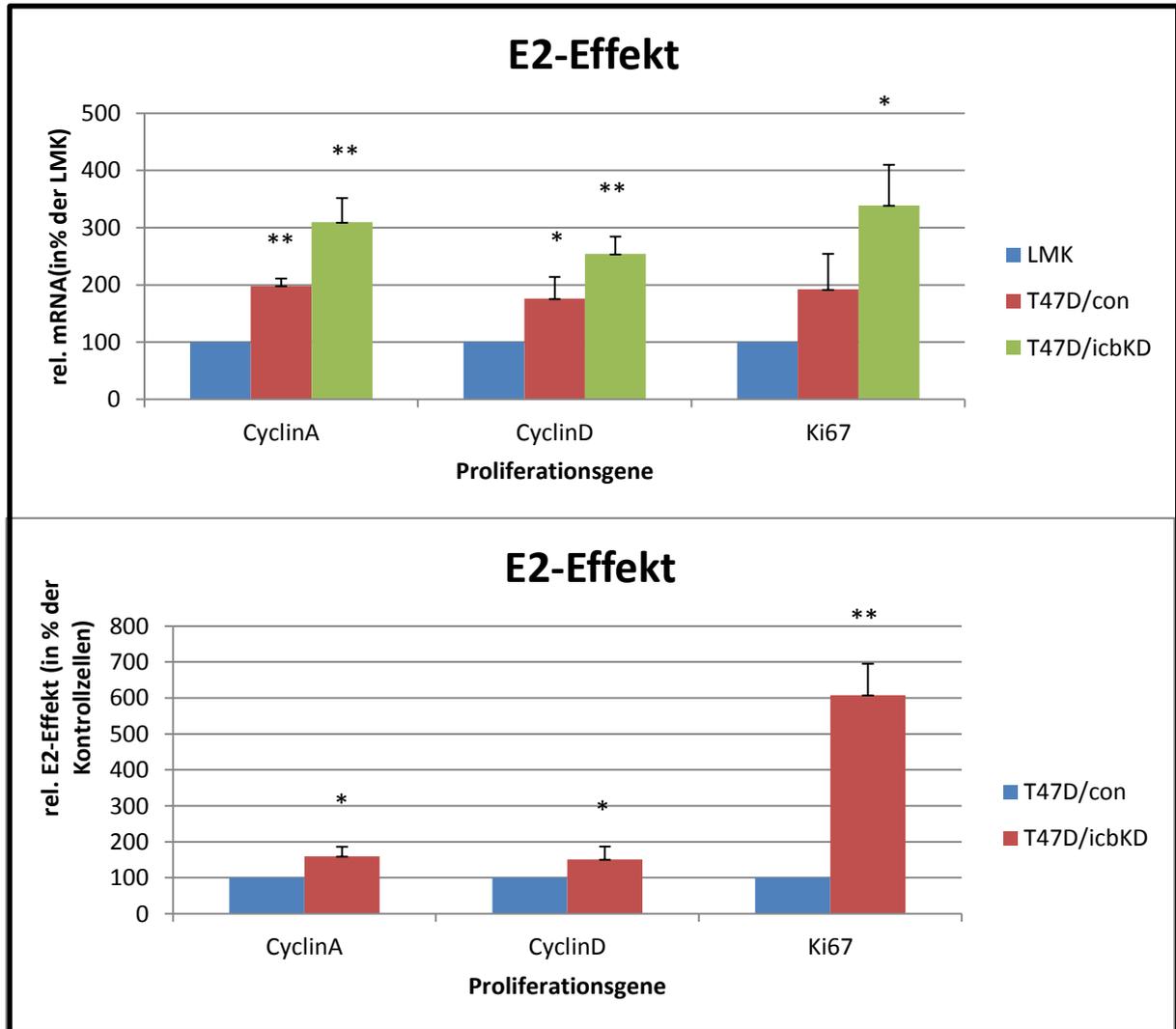


Abbildung 20 Graphische Darstellung des Einflusses des *icb-1 knockdowns* auf die Expression der Proliferationsgene CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 der T-47-D Zellen nach Behandlung mit E2.

Oben sieht man die durchschnittliche relative Expression von CyclinA2, CyclinD1 und Ki67 der mit *icb-1* siRNA transfizierten T-47-D Zellen und der T47D/con nach Stimulation mit E2 in % der LMK (=Zellen ohne E2-Stimulation). Unten dargestellt sind die durchschnittlichen mRNA-Level von CyclinA, CyclinD, Ki67 der T47D/icbKD in % der T47D/con. Die Zellen T47D/icbKD und T47D/con wurden mit E2 stimuliert. Oben * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. LMK(=Zellen ohne E2); unten * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ versus T47D/con.

4 Diskussion

4.1 Inhibierender Einfluss des Gens *icb-1* auf zelluläre Proliferation und das Östrogenansprechen der T-47-D Zellen

Erste Forschungsarbeiten zur Bedeutung von *icb-1* für das östrogene Ansprechen von Krebszellen ließen dem Gen bereits eine entscheidende Rolle einer inhibierenden Komponente der östrogen-getriggerten Proliferation und Genexpression zukommen. Durch den transienten *knockdown* des Gens konnte ein gesteigerter E2-Effekt im Sinne einer verstärkten östrogenabhängigen Genexpression und Zellproliferation bei der östrogen-responsiblen Brustkrebszelllinie MCF-7 erzielt werden. Überraschend war, dass der *knockdown* von *icb-1* auch bei der hormonell nicht-responsiblen Ovarialkrebszelllinie SK-OV-3 eine Östrogenantwort auslöste, östrogenabhängige Genexpression veranlasste und mit einer gesteigerten Zellproliferation einherging. Bei beiden Zelllinien bewirkte der *icb-1 knockdown* eine gesteigerte Expression des Östrogenzielgens ER α . Diese Hochregulation des durch das Gen regulierten ER α -Rezeptors bot einen grundlegenden Erklärungsansatz für das gesteigerte Östrogenansprechen auf molekularer Ebene (129). Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurde in dieser Forschungsarbeit im ersten Versuchsteil untersucht, ob *icb-1* auch bei der östrogen-responsiblen Brustkrebszelllinie T-47-D (119) einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten im Sinne einer veränderten Östrogenantwort hat.

Die Ergebnisse bestätigten die Rolle von *icb-1* als Inhibitor der Zellproliferation und der Östrogensensibilität auch bei den T-47-D Zellen. Der *knockdown* von *icb-1* verstärkte das Wachstum der Zellen in 1xSR2-Medium signifikant gegenüber den Kontrollzellen an den Tagen 4 und 5 nach Proliferationsbeginn. Dass die Anzahl vitaler Zellen (CTB-Assay) bei den T47D/*icb*KD an Tag 6 im Vergleich zu den Vortagen sank, obwohl eine konstante Wachstumssteigerung zu erwarten wäre, lag vermutlich an der zu hohen Zelldichte der T-47-D Zellen in den 96-Wellplatten mit konsekutiver Messfehlerhaftigkeit. Weiterhin war die Proliferationsrate der T-47-D Zellen nach Zugabe von Östrogen signifikant höher als diejenige der nicht stimulierten Zellen und somit Ausdruck der wachstumssteigernden Wirkung von Östrogen auf die Krebszellen. Interessant ist diesbezüglich, dass der *knockdown* von

icb-1 eine gesteigerte, östrogeninduzierte Proliferation im Sinne einer erhöhten Östrogensensibilität auslöste. So proliferierten nach Zugabe von E2 die T47D/*icb*KD deutlich schneller als die Kontrollzellen.

Eindeutige Erklärungsansätze für diese östrogenabhängige Proliferationssteigerung infolge des *icb-1 knockdowns* bieten die via *LightCycler* durchgeführten Genexpressionsanalysen. Auf molekulargenetischer Ebene bewirkte der *knockdown* von *icb-1* eine Hochregulierung des mRNA-Levels an Östrogenrezeptor ER α im Sinne einer signifikant gesteigerten Gen-Expression [Tabelle 9 und 10; Abbildung 19]. Das Gen ER α kodiert für den Östrogenrezeptor ER α , welcher bekanntermaßen verantwortlich ist für die östrogenvermittelte Stimulation der Proliferation von Brustkrebszellen (98). Der durch Östrogen ausgelöste Anstieg der PR- und pS2-Expression, zweier ER α -vermittelter E2-Zielgene, weist eindeutig auf die gesteigerte Aktivität von ER α hin [Tabelle 10, 11; Abbildung 19] (134, 135). Somit scheint ER α als Hauptauslöser für die verstärkte Östrogenantwort als Ergebnis einer neu erlangten Genexpression durch Östradiol verantwortlich zu sein. Die Expression von ER α selbst blieb nach Stimulation mit Östrogen nahezu unverändert. Während hierbei bei den Kontrollzellen ein geringer Anstieg des Expressionslevels verzeichnet werden konnte, sank bei den *icb-1* transfizierten Zellen das mRNA-Level an ER α nach Östrogenzugabe sogar leicht [Tabelle 10; Abbildung 19]. Diese im Gegensatz zu PR und pS2 fehlende Hochregulierung von ER α nach Stimulation mit Östrogen macht umso deutlicher, dass die Östrogenantwort vorwiegend durch ER α bedingt ist und die Expression der E2-Zielgene PR und pS2 ER α -vermittelt reguliert wird.

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Östrogen ER α -vermittelt eine gesteigerte Expression von Proliferationsgenen veranlasst, welche eine Progression des Zellzyklus und somit ein beschleunigtes Wachstum der Krebszellen bewirken (73, 97, 98). Die durch den *icb-1 knockdown* erhöhte ER α -Expression führte somit im Sinne eines gesteigerten Östrogenansprechens zu einem verstärkten Zellwachstum der T-47-D Zellen.

Im Folgenden werden der generelle Aufbau und die Regulationsmechanismen des Zellzyklus beschrieben. Darauf aufbauend wird die ER α -vermittelte beschleunigende Wirkung von 17- β -Östradiol auf den Zyklus erklärt und ein präziser Bezug zu den Ergebnissen dieser Studie hergestellt. Als Zellzyklus wird der Mechanismus

bezeichnet, der die DNA-Replikation der Zelle und die Zellteilung beinhaltet und folglich die Proliferation von Zellgewebe bewirkt. Innerhalb dieses Zyklus werden verschiedene Phasen unterschieden: die vorbereitende G_1 -Phase, die S-Phase mit der DNA-Synthese, die G_2 -Phase und schließlich die Phase der Mitose (M-Phase). Zellen in der G_0 -Phase befinden sich in einem ruhenden Modus, können aus diesem Modus jedoch zurückkehren in den Zellzyklus. Die Transition der Zellen zwischen diesen Phasen wird streng reguliert durch die wechselnde Aktivität spezifischer Cyclin-abhängiger Kinasen, den CDKs. Der Aktivitätszustand dieser CDKs wird bestimmt durch die fluktuierenden Levels an Bindungspartnern, den sogenannten Cyclinen, und an posttranslationalen Modifikationskomponenten, bestehend aus Kinasen und Phosphatasen. Durch die Akkumulation von Cyclinen werden spezifische Cyclin-CDK-Komplexe gebildet, deren Zielsubstrate den Übergang zwischen den Zellzyklusphasen auslösen. In der G_1 -Phase sind die Komplexe CyclinD-Cdk4/6 und CyclinE-Cdk2 von Bedeutung, in der anschließenden S-Phase der Komplex CyclinA-Cdk2 und in der G_2 -Phase und M-Phase gelten CyclinA-Cdk1 und CyclinB-Cdk1 als die entscheidenden Regulatoren (98, 99, 102, 136, 137).

Östrogen führt $ER\alpha$ -vermittelt zu einer erheblichen Expressionssteigerung von CyclinD1 und wirkt durch dieses erhöhte CyclinD1-Level stimulierend auf den Zellzyklusvorgang (98, 99, 102). Bei den T-47-D Zellen lag das relative mRNA-Level an CyclinD1 nach Stimulation mit E2 deutlich über dem der unstimulierten Zellen [Tabelle 10; Abbildung 20]. Dieses erhöhte CyclinD1-Level beschleunigt den Zellzyklusvorgang elementar, da CyclinD1 eine Schlüsselrolle zukommt in der Transition von G_1/S -Phase, indem es die Komplexbildung CyclinD1-Cdk4/6 induziert. Dieser aktivierte Komplex führt zu einer Phosphorylierung des Retinoblastom-Tumorsuppressor-Proteins (Rb). Dieser phosphorylierte Zustand setzt E2F frei und initiiert daraufhin die E2F-vermittelte Transkription von Genen inklusive CyclinE. Die Expression von CyclinE führt zur finalen Komplexbildung CyclinE-Cdk2, wodurch der Übergang in die S-Phase erfolgt. Dies gelingt, indem durch den aktiven Proteinkomplex CyclinE-Cdk2 Zielproteine, die eine direkte Wirkung auf die DNA-Synthese haben, als auch das Protein Rb im Sinne einer positiven Rückkopplung der CyclinE-Synthese phosphoryliert werden. Als ein wichtiger Kontrollmechanismus wird der Aktivitätszustand des für den Übergang in die S-Phase entscheidenden Komplexes CyclinE-Cdk2 durch die Bindung der CDK-Inhibitoren p21 und p27

reguliert. Dabei handelt es sich um wichtige Proteine, die die Kinaseaktivität inhibieren und dadurch CyclinE stabilisieren. Entscheidend ist, dass der Komplex CyclinD-Cdk4/6 eine Sequestrierung dieser Cdk-Inhibitoren auslöst und somit deren Verfügbarkeit reduziert (98, 99, 136). Weiterhin ist bekannt, dass das Gen *c-myc* die p21-Synthese reduziert. Beide Mechanismen führen zu einer verstärkten Aktivität des Schlüsselkomplexes CyclinE-Cdk2 und letztendlich zu einer beschleunigten Progression des Übergangs von der G₁- in die S-Phase, ausgelöst durch CyclinD1 (98, 102, 137). Interessant ist nun in Bezug auf den Einfluss von *icb-1* auf die Östrogenwirkung, dass nach dem *icb-1 knockdown* die CyclinD1-Expression der T-47-D mit 254% der unstimulierten Zellen signifikant stärker war als die der Kontrollzellen mit nur 176% der unbehandelten Zellen [Tabelle 10; Abbildung 20]. Dieses erhöhte CyclinD1-Level aufgrund des *icb-1 knockdowns* bewirkt durch den eben beschriebenen Mechanismus eine stärkere Zellzyklusbeschleunigung und infolgedessen ein verstärktes Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis des erhöhten CyclinD1 mRNA-Levels steht in engem Zusammenhang mit der Hochregulierung von ER α durch den *knockdown* von *icb-1* und kann demnach als Resultat der durch den *knockdown* verstärkten ER α -vermittelten Östrogenantwort angesehen werden. Diese Hochregulierung von CyclinD1 durch den *icb-1 knockdown* ist auf molekularer Ebene schlussfolgernd mit verantwortlich für die östrogenabhängige Wachstumszunahme der Zellen infolge eines beschleunigten Zellzyklus.

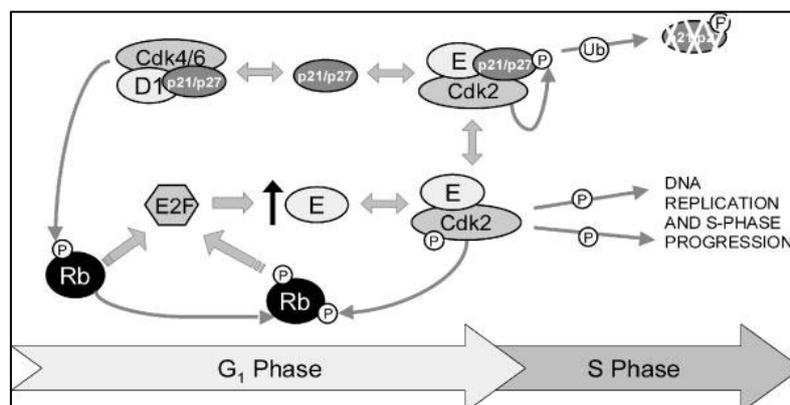


Abbildung 21 Schematische Darstellung der Kontrolle der Zellzyklusprogression von der G₁ in die S-Phase

Sequentielle Phosphorylierung von Rb durch CyclinD1-Cdk4/6 und CyclinE-Cdk2 resultiert in einer E2F-vermittelten Transkription der Zielgene (inklusive CyclinE) und konsekutiv in einer Progression des Zellzyklus in die S-Phase. Die Verteilung von CDK Inhibitoren p21 und p27 zwischen diesen

Komplexen liefert eine zusätzliche Kontrolle über deren Aktivität. Die Levels dieser CDK Inhibitoren werden reguliert durch deren Ubiquitin-vermittelten Degradierung. (D1: cyclin D1; E: cyclin E; Ub: ubiquitin) (98)

Wie mehrere Studien zeigen, wirkt Östrogen neben der verstärkten Expression von CyclinD1 zudem progressiv auf den Zellzyklus durch rapide Induktion des Gens *c-myc* (98, 99, 102, 136). Dieses Gen war zwar kein Bestandteil der Genexpressionsanalyse dieser Forschungsarbeit, die bisherigen Ergebnisse machen eine verstärkte *c-myc* Expression durch den *knockdown* von *icb-1* jedoch wahrscheinlich. Diese Fragestellung könnte Gegenstand weiterer Studien über den Einfluss des Gens *icb-1* auf die Proliferation von Krebszellen sein.

Neben der verstärkten CyclinD1-Expression der T-47-D Zellen durch den *icb-1 knockdown* als Folge einer verbesserten Östrogenantwort ergab die Genexpressionsanalyse zudem, dass Östrogenzugabe auch eine vermehrte Expression von CyclinA2 zufolge hat. Die Stimulation mit Östrogen bewirkte nahezu eine Verdopplung des mRNA-Levels an CyclinA2. Auch bei diesem für den Zellzyklus bedeutenden Gen CyclinA2 führte der *icb-1 knockdown* nochmals zu einer Steigerung der Expression um ca. 60% gegenüber den mit E2 stimulierten Kontrollzellen. Eine eindeutige Erklärung für diesen Effekt ist -wie auch bei CyclinD1- das verstärkte Ansprechen auf Östrogen durch Hochregulierung des Östrogenrezeptors ER α nach Ausschalten von *icb-1*. [Tabelle 10, 11; Abbildung 20] Dieses erhöhte Level an CyclinA2 durch östrogene Stimulation insbesondere bei den mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen löst wie auch CyclinD1 eine signifikante Beschleunigung des Zellzyklus mit konsekutiv schnellerem Zellwachstum der T-47-D Zellen aus. Der zugrundeliegende Zellmechanismus besteht darin, dass CyclinA2 ein essentieller Regulator des Zellzyklus ist und die Eigenschaft besitzt, zwei verschiedene CDKs aktivieren zu können. So kommt CyclinA2 eine wichtige Funktion zu für die Progression des Zellzyklus, sowohl in der S-Phase als auch in der M-Phase des Zellzyklus (138, 139). Während des Übergangs in die S-Phase wird die Synthese von CyclinA2 transkriptionell initiiert durch E2F und weitere Transkriptionsfaktoren. CyclinA2 beginnt in der S-Phase zu akkumulieren und ist entscheidend für die Initiierung und Progression der DNA-Replikation in dieser Phase, indem es den CyclinA2-Cdk2-Komplex bildet. Resultierend werden entscheidende Komponenten des DNA-Replikationskomplexes wie beispielsweise CDC6 durch Phosphorylierung aktiviert. In der G₂/M-Phase wird ein Peak an

CyclinA2-Level erreicht. An dieser Stelle ist CyclinA2 verantwortlich für die Aktivierung von CDK1 durch Bildung des CyclinA2-CDK1-Komplexes. Während der Mitose findet schließlich die Degradierung von CyclinA2 durch Proteasome statt, ein Prozess, welcher entscheidend ist für die Fortführung der Mitose (139–141).

Dieser beschriebene Mechanismus verdeutlicht die Rolle von CyclinA2 für die Tumorgenese. Eine verstärkte Expression des CyclinA2 mRNA-Levels geht demnach mit einer verstärkten Tumorproliferation im Sinne eines beschleunigten Zellzyklus einher. So konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass in Tumoren ein erhöhtes Level an CyclinA2 im Vergleich zu normal proliferierendem Gewebe vorhanden ist (140–142). Die aktuelle Studie zeigt als neue Erkenntnis die Erhöhung der Östrogenresponse von T-47-D Zellen durch *icb-1 knockdown* auf, wodurch das CyclinA2-Level im Sinne eines beschleunigten Zellzyklus signifikant gesteigert wird. Sie liefert einen weiteren wichtigen Erklärungsansatz für die gesteigerte östrogenabhängige Proliferationssteigerung der Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression gegenüber den Kontrollzellen.

Die Genexpressionsanalyse dieser Studie konnte zudem zeigen, dass durch den *knockdown* von *icb-1* in den Zellen die Ki67-Expression als Resultat eines verstärkten Östrogenansprechens und einer konsekutiven Beschleunigung des Zellzyklus nach Östrogenzugabe im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant um das 6-fache gesteigert wurde. [Tabelle 11; Abbildung 20] Dieses Ergebnis liefert den molekularen Nachweis einer deutlich verstärkten Proliferation der T-47-D Brustkrebszellen infolge der verbesserten Östrogenantwort bedingt durch den *knockdown* des Gens *icb-1*. Das nukleare Protein Ki67 stellt nämlich einen robusten Marker für Zellproliferation in Brustkrebszellen dar, welches durch das Gen *MK167* codiert wird. Wenn gleich die genaue Funktion von Ki67 noch nicht gänzlich geklärt ist, etablierte sich das Protein aufgrund seiner bestimmten Regulation während der Zellzyklusphasen und seiner kurzen Halbwertszeit als ein wichtiger Proliferationsmarker von Krebszellen. Während ruhende Zellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden, keine Ki67-Expression aufweisen, wird das Protein in proliferativen Zellen universell exprimiert (143, 144). Während in der G₁-Phase und der frühen S-Phase das Level an Ki67 noch gering ist, steigt die Expression in der M-Phase progressiv an und erreicht schließlich seinen maximalen Spiegel. Generell ist

die Fraktion von Ki67-positiven Tumorzellen assoziiert mit dem klinischen Outcome von Brustkrebszellen und wird als prognostischer Parameter im klinischen Alltag verwendet (143–146).

Wie die Ergebnisse dieser Studie zusammenfassend verdeutlichen, scheint sich die Rolle von *icb-1* als inhibierende Komponente der östrogen-getriggerten Proliferation und Genexpression auch für die Zelllinie T-47-D zu bestätigen. Demnach wirkt das Gen eindeutig proliferationshemmend auf die Tumorzellen und scheint somit weiterführend eine Schlüsselfunktion als Inhibitor der Tumorgenese und Progression von Brustkrebs einzunehmen.

Interessant ist, dass in einer neuen Studie um die Rolle des Rezeptors ERR β , einem *estrogen related receptor*, gezeigt werden konnte, dass dieser ER α abhängig exprimiert wird, jedoch vermutlich eine tumorsuppressive Wirkung auf Brustzellen besitzt, indem er den Zellzyklus mitreguliert und inhibierend auf östrogeninduziertes Zellwachstum wirkt. Es steht folglich zur Diskussion, ob der Rezeptor möglicherweise als therapeutisches *target* in der Behandlung von Brustkrebs infrage kommt (147). Gegenstand weiterer Forschungen um das Gen *icb-1* könnte sein, inwieweit *icb-1* die Expression dieses suppressiv wirkenden Rezeptors ERR β beeinflusst.

4.2 Einfluss des Gens *icb-1* auf das Ansprechen der T-47-D Zellen auf Antiöstrogene

4.2.1 Antiöstrogen ICI 182,780

4.2.1.1 Hintergründe zur Forschung von ICI 182,780

Wie bereits einleitend beschrieben, gehört ICI 182,780 (FulvestrantTM) der Gruppe der Östrogenrezeptor-Down-Regulatoren (SERDs) an und fungiert als pures Antiöstrogen ohne jegliche partial agonistische Aktivität (114). ICI 182,780 bewirkt eine komplette Unterdrückung der Östrogeneffekte infolge einer gestörten Kernlokalisierung von Ligand-ER-Komplexen, einer gesteigerten proteolytischen Degradierung von ER und einer Herabregulierung von ER-regulierten Proteinen

(148). Das Antiöstrogen ICI 182,780 besitzt eine wesentlich stärkere Bindungsaffinität zu ER als das seit Jahrzehnten gut etablierte und weltweit eingesetzte partial-agonistisch wirkende Antiöstrogen Tamoxifen (149, 150) und konnte bereits potentielle therapeutische Vorteile gegenüber Tamoxifen aufweisen (150). Bedeutsam ist, dass das Antiöstrogen FulvestrantTM keine Kreuzresistenzen gegenüber Tamoxifen aufweist (151). So zeigte ICI 182,780 antiöstrogene Wirkung bei postmenopausalen ER⁺-Brustkrebspatientinnen, die Resistenzen gegenüber Tamoxifen und nichtsteroidalen Aromataseinhibitoren hatten (152, 153), und findet seitdem für diese Indikation Anwendung in der adjuvanten Antiöstrogentherapie von Mammakarzinomen (117). Seit den frühen 1990ern ist ICI 182,780 Gegenstand intensiver Forschung und repräsentiert vermutlich einen wichtigen Fortschritt in der endokrinen Therapie von Brustkrebs (114). Die klinische Signifikanz für ICI 182,780 stieg umso mehr, seit Studien wie FIRST (*Fulvestrant First-Line Study Comparing Endocrine Treatments*) und NEWEST (*Neoadjuvant Endocrine Therapy for Women with Estrogen-Sensitive Tumours*) gezeigt haben, dass das Antiöstrogen Potenzial als neoadjuvantes und First-Line Medikament der endokrinen Therapie bei fortgeschrittenen ER⁺-Mammakarzinomen postmenopausaler Frauen besitzt (154–156).

Trotz Aufschwung von FulvestrantTM in seiner klinischer Bedeutung stellen von Beginn an vorhandene und im Laufe der Therapie erworbene Resistenzen ein signifikantes, bislang weitgehend unerforschtes Problem dar (153). Da es von großer therapeutischer Wichtigkeit ist, diese resistenten Subgruppen an ER⁺-Brusttumoren genau zu identifizieren und eine für diese Gruppe angepasste, wirksamere Therapie einzuleiten, entwickelten Knudsen et al einen Genexpressions-Score, welcher als sogenannter Prädiktionsmarker das Ansprechen auf FulvestrantTM 500mg zu Therapiebeginn vorhersagt. Die Genexpressionsanalyse ergab die positive Korrelation zwischen 311 Genen und einer FulvestrantTM-Resistenz, sprich diese Gene waren höher exprimiert in Zelllinien mit Resistenzen gegenüber FulvestrantTM als in sensitiven Zelllinien. 103 Gene hingegen korrelierten positiv mit der Sensitivität gegenüber ICI 182,780 und waren höher exprimiert in Zelllinien, die auf FulvestrantTM angesprochen hatten. Interessant ist nun, dass das *icb-1* Gen (C1orf38) in der Genexpressionsanalyse von Knudsen et al als ein FulvestrantTM sensitives Gen detektiert wurde und demzufolge ein höheres mRNA-Level an *icb-1* in Fulvestrant-

sensitiven als in -resistenten Zelllinien zu verzeichnen war (133). Aufbauend auf diese Identifizierung des Gens *icb-1* als Teil einer Signatur zur Prädiktion des Ansprechens auf FulvestrantTM (Faslodex ICI 182,780) ist Ziel dieser aktuellen Studie, den Effekt von *icb-1* auf die Response von ICI 182,780 auf Brustkrebszellen im Sinne einer antiproliferativen Wirkung genauer zu erforschen.

4.2.1.2 Ansprechen von T-47-D Zellen auf ICI 182,780

Für die Zelllinie T-47-D zeigte sich ein deutliches Ansprechen auf das Antiöstrogen ICI 182,780 in Form von Antiproliferation. Bereits für Konzentrationen ab 3nM FulvestrantTM ergaben sich Signifikanzen in der Proliferationshemmung der Zellen. Je höher die eingesetzte Konzentration an ICI 182,780 war, desto stärker erwies sich dieser antiöstrogene Effekt, was die konzentrationsabhängige Wirksamkeit von ICI 182,780 als kompetitiver Gegenspieler zu Östrogen bestätigt (150). Allein für die am geringsten eingesetzte Konzentration (1nM) konnte noch keine signifikante Antiproliferation der T-47-D Zellen verzeichnet werden. Vermutlich war die Konzentration von 1nM ICI 182,780 zu gering gewählt, als dass hierfür schon signifikante antiproliferative Effekte erkennbar wären (157). Die Anzahl vitaler Zellen sank nach Zugabe der Antiöstrogene nahezu für alle Konzentrationen an FulvestrantTM mit der Zeit konstant ab [Tabelle 4; Abbildung 14]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen von Forschungsgruppen wie Jansen et al und Diehl et al, welche aufzeigten, dass T-47-D Zellen stark auf Faslodex im Sinne einer deutlichen Antiproliferation der Zellen ansprechen (158, 159). So zeigten auch Knudsen et al, dass die Zelllinie T-47-D eine für ER⁺-Brustkrebszelllinien überdurchschnittlich hohe Sensitivität gegenüber ICI 182,780 besitzt (133). Einen eindeutigen Erklärungsansatz hierfür liefert die überdurchschnittlich starke ER-Expression der Zelllinie T-47-D (133), da ICI 182,780 die Degradierung des Östrogenrezeptors ER α bewirkt und dadurch die ER α -vermittelte östrogene proliferative Wirkung auf die Krebszellen komplett inhibiert, wie Parker et al bereits 1993 eruierten (148, 160). Die Tatsache, dass ICI 182,780 die Proliferation von T-47-D Zellen signifikant hemmte, bestätigt folglich die im obigen Abschnitt (4.2) diskutierte Abhängigkeit des Wachstums der Brustkrebszelllinie von ER α deutlich.

4.2.1.3 Vermindertes Ansprechen von ICI 182,780 auf T-47-D durch *icb-1*

Wie die Forschungsergebnisse von Knudsen et al um das Ansprechen von ICI 182,780 bereits nahelegten, scheint *icb-1* einen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit des Antiöstrogens bei der Brustkrebszelllinie T-47-D zu haben. So ergaben die Daten dieser Studie einen durch den *knockdown* von *icb-1* verstärkten konzentrationsabhängigen antiöstrogenen Effekt von ICI 182,780 auf die Zellen im Sinne einer erhöhten antiproliferativen Wirkung. Demnach lag für nahezu alle Konzentrationen und Messzeitpunkte die relative Anzahl vitaler Zellen der mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen durchschnittlich signifikant unter derjenigen von Kontrollzellen. Einzig für niedrig eingesetzte Konzentrationen an ICI 182,780 (1nM und 3nM) erwies sich der antiproliferative Unterschied weitgehend noch nicht als signifikant. [Tabelle 4; Abbildung 14] Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, wie im Abschnitt zuvor bereits ausgeführt wurde, die generell noch zu schwache Wirksamkeit des Antiöstrogens auf T-47-D Zellen in diesen geringen Konzentrationen, da ICI 182,780 dosisabhängig kompetitiv antagonistisch zu Östrogen wirkt (157).

Diese Studie um den Effekt von *icb-1* auf das Ansprechen von ICI 182,780 bestätigt die Ergebnisse des Genexpressions-Score von Knudsen et al dahingehend, dass *icb-1* deutlichen Einfluss auf die Wirkung von FulvestrantTM auf Brustkrebszellen zu haben scheint und weiterführend potentiell als Prädiktionsmarker für das antiöstrogene Ansprechen eingesetzt werden könnte. Jedoch wäre durch die Identifizierung von *icb-1* als FulvestrantTM-sensitives Gen im Sinne eines erhöhten mRNA-Levels in FulvestrantTM-sensitiven Krebszelllinien ein verstärkter antiöstrogener Effekt von ICI 182,780 durch *icb-1* zu erwarten gewesen, kein abgeschwächter. Entsprechend scheint *icb-1* in FulvestrantTM-sensitiven Brustkrebslinien prinzipiell zwar stärker exprimiert zu werden als in resistenten, jedoch kommt dem Gen eine ICI 182,780 abschwächende Wirkung bei T-47-D Zellen zu. Die prädiktive Aussagekraft des Gens *icb-1* ist somit nach derzeitigem Forschungsstand nicht eindeutig geklärt, da ein hohes *icb-1* mRNA-Level im Gesamtzusammenhang des Genexpressions-Scores scheinbar eher für Sensitivität von FulvestrantTM auf Brustkrebszellen spricht (133). Das Gen an sich bewirkt jedoch bei T-47-D Zellen eine abgeschwächte Antiöstrogenantwort auf die Krebszellen im

Sinne einer verminderten Antiproliferation und stellt somit einen negativen Prädiktionsmarker für den Erfolg einer Therapie mit FulvestrantTM dar.

Erklärungsmöglichkeiten für die durch den *icb-1 knockdown* ausgelösten starken Diskrepanzen in der Wirkung von ICI 182,780 auf T-47-D Zellen mit dem deutlich antiproliferativen Effekt bei den Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression und im Vergleich dazu geringer Wirkung bei den Kontrollzellen liefern zwei bekannte Wirkmechanismen von Faslodex: eine gesteigerte Proliferationshemmung der Zellen (148, 149) und eine verstärkte Apoptoseinduktion. Einleuchtend erscheint die Erklärung dieser Diskrepanz in der durch den *icb-1 knockdown* gesteigerten ER-abhängigen Proliferationshemmung durch ICI 182,780. Wie bereits erläutert, wirkt das Antiöstrogen antiproliferativ, indem es durch eine rapide Degradierung des Östrogenrezeptors ER mit konsekutiver kompletter Inhibierung der ER-vermittelten Transkription die östrogene Proliferation der Krebszellen antagonisiert (149). Wie diese Studie zeigt, geht der *knockdown* von *icb-1* einher mit einer gesteigerten proliferativen Östrogenantwort auf T-47-D Zellen durch vermehrte Expression von Östrogenrezeptor ER α . Dieser klare Wachstumsvorteil der T47D/*icb*KD nach Stimulation mit E2 gegenüber den Kontrollzellen hatte vermutlich den deutlicheren wachstumshemmenden Effekt des Östrogenantagonisten ICI 182,780 auf die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen zur Folge. Die Kontrollzellen hatten hingegen nach E2-Zugabe einen weniger ausgeprägten proliferativen Effekt auf T-47-D Zellen und konsekutiv auch einen schwächeren antiproliferativen Effekt von FulvestrantTM. Schon Konwisorz et al konnten zeigen, dass *icb-1* einen hemmenden Einfluss auf das Ansprechen der Krebszellen auf ICI 182,780 hat. Damit ermöglichte der *icb-1 knockdown* bei der normalerweise östrogenunabhängigen Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 eine Östrogenantwort im Sinne einer verstärkten Proliferation durch veränderte Genexpression und bewirkte eine ausgeprägte antiproliferative Wirkung von ICI 182,780 auf die SK-OV-3/*icb*KD im Gegensatz zu den Kontrollzellen (129).

Diese verstärkte antiproliferative Wirkung von ICI 182,780 als Ausdruck der Antagonisierung der gesteigerten Östrogenantwort durch den *icb-1 knockdown* reicht als alleinige Erklärung für die Diskrepanzen in der Wirkung von Faslodex auf die T-47-D Zellen jedoch nicht aus. Dies geht hervor aus der Berechnung der prozentualen Ratio T47D/*icb*KD zu T47D/con (siehe Auswertung 3.2.4.1), die generiert wurde, um

den unterschiedlich starken proliferativen Effekt von Östrogen auf die Zellen und die daraus resultierende Abhängigkeit der antiöstrogenen Wirkung von ICI 182,780 auf T-47-D Zellen herausrechnen zu können. Das Rechenergebnis offenbarte unabhängig vom östrogenen Ansprechen einen stärkeren proliferationshemmenden Effekt von FulvestrantTM auf die mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen für alle eingesetzten Konzentrationen. Dies lässt vermuten, dass durch den *knockdown* von *icb-1* neben der Proliferationshemmung durch die Antagonisierung der Östrogenantwort auch die Induktion der Apoptose von Zellen als ein weiterer bekannter Wirkmechanismus von ICI 182,780 verstärkt wurde. Schon früh wurde ICI 182,780 als Wachstumsinhibitor von ER⁺-Brustkrebszellen detektiert, der sogar in Abwesenheit von Östrogenstimulation antiproliferativ wirkt (161). Zu Apoptoseinduktion von ICI 182,780 bei den ER⁺-Brustkrebszellen findet sich einige Literatur für MCF-7 Zellen, weniger für die Zelllinie T-47-D. Jansen et al konnten zeigen, dass die Behandlung der ER⁺-Zelllinien MCF-7 und T-47-D mit FulvestrantTM Apoptose initiiert und das Wachstum der Tumorzellen deutlich reduziert (159). Generell sind apoptotische Prozesse in der Brustdrüse assoziiert mit Veränderungen in der Genexpression der pro-apoptischen Proteine Bax und Bad (162) und der anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L (163, 164). Lim et al stellten fest, dass die Behandlung der MCF-7 mit FulvestrantTM in vitro und in vivo auf molekularer Ebene mit einem erhöhten Level an Bax und Bad und einem erniedrigten Level an Bcl-2 und Bcl-x_L einhergeht (162). In Diskussion steht die Inaktivierung von ER durch ICI 182,780 (148) als potentieller Auslöser der veränderten Genexpression mit konsekutiver Induktion von Apoptose (162). Diese Vermutung würde für eine verstärkte Apoptose der Zellen durch den *icb-1 knockdown* sprechen, da dieser in einem erhöhten Level an ER resultiert und somit die Behandlung mit ICI 182,780 eine verstärkte Inaktivierung des Östrogenrezeptors zufolge hat. Desweiteren wird in der Literatur beschrieben, dass die durch Faslodex verminderte Expression von IGF-1R, einem Rezeptor, der durch seine mitogenen und apoptotischen Eigenschaften wichtig ist für das epitheliale Brustwachstum (165), mit verantwortlich zu sein scheint für das veränderte Expressionslevel an Apoptoseproteinen mit konsekutiver Apoptoseinduktion der Tumorzellen (162, 166). Eine verstärkte Apoptoseinduktion durch den *icb-1 knockdown* könnte theoretisch neben der gesteigerten antiöstrogenen Wirkung von ICI 182,780 einen weiteren potentiellen Erklärungsansatz für die verstärkte Antiproliferation von FulvestrantTM auf T-47-D

Zellen darstellen. Diese Überlegungen scheinen jedoch in Kontroverse zu stehen zu den kürzlichen Forschungen von Trecek, Belgutay et al, welche dem Gen *icb-1* eine pro-apoptotische Rolle bei gynäkologischen Tumoren zukommen ließen. So führte der *knockdown* von *icb-1* zu einer Verringerung der Sensitivität gegenüber verschiedenen Apoptoseinduktoren bei den MCF-7 Zellen, vermutlich aufgrund einer veränderten Expression der Apoptose-assoziierten Gene *XAF1*, *XIAP* und *AIF* (132). Ob der *icb-1 knockdown* bei FulvestrantTM eine verstärkte Apoptose indiziert durch veränderte Genexpression der apoptotischen Elemente, kann letztlich nicht gänzlich geklärt werden und gibt Anlass für eine spezifische Genexpressionsanalyse von Apoptoseproteinen nach Behandlung mit FulvestrantTM bei den T47D/*icb*KD im Vergleich mit Kontrollzellen.

4.2.2 Tamoxifen

Neben den Einflüssen von *icb-1* auf den puren Östrogenantagonisten ICI 182,780 bei T-47-D Zellen waren auch die potentiellen Effekte dieses Gens auf das Ansprechen des selektiven Östrogenrezeptor-modulators Tamoxifen bei selbiger Zelllinie Teil dieser Studie. Wie einleitend ausgeführt, wirkt Tamoxifen auf verschiedene östrogensensible Zielgewebe selektiv agonistisch oder antagonistisch (107). Bei der Brustdrüse weist Tamoxifen den erwünschten antagonistischen Effekt zu Östrogen auf (112) und gilt aktuell als Goldstandard in der endokrinen Therapie für Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor-positive Brusttumore bei prämenopausalen Frauen (5). Da Tamoxifen auf den Uterus neben anderen Organen hingegen im Sinne einer Proliferation der Endometriumzellen agonistisch wirkt und somit bei längerfristiger Einnahme das Risiko für Endometrialkarzinome signifikant erhöht (167), weist diese Form der endokrinen Therapie enorme Nebenwirkungen auf. Auch die Tatsache, dass viele Frauen von Beginn an nicht auf Tamoxifen ansprechen oder im Laufe der 5-jährigen Therapie Resistenzen gegenüber Tamoxifen entwickeln (168), verdeutlicht die Grenzen dieser Therapiemöglichkeit. Welche genauen Mechanismen für die Entwicklung dieser Resistenzen der Brustkrebszellen gegenüber Tamoxifen verantwortlich sind, ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Nicht zuletzt aufbauend auf diese Problematik um die Resistenzentwicklung der Krebszellen gegenüber Tamoxifen soll in dieser aktuellen Studie geklärt werden, ob

das Gen *icb-1* möglicherweise beeinflussend wirkt auf die Wirkung von Tamoxifen bei T-47-D Zellen.

Als Substanzen für die Versuchsreihen wurden die beiden aktiven Metaboliten von Tamoxifen eingesetzt: der primäre Metabolit 4-OH-Tamoxifen und der sekundäre Metabolit 4-OH-N-desmethyl-Tamoxifen, besser bekannt als Endoxifen. Jordan et al sowie viele weitere erkannten, dass diese beiden Metaboliten eine sehr hohe Bindungsaffinität aufweisen und ein bis zu 100-fach höheres Potenzial als Tamoxifen besitzen, östrogenabhängige Zellproliferation zu unterdrücken (110, 169). Interessant ist diesbezüglich auch die Fragestellung, ob und inwiefern die beiden Metaboliten sich in ihrer antiöstrogenen Wirkung bei den Brustkrebszellen T-47-D unterscheiden.

4.2.2.1 4-OH-Tamoxifen

4.2.2.1.1 Unzureichendes Ansprechen der T-47-D auf 4-OH-Tamoxifen

Dem Antiöstrogen Tamoxifen wird für Brustkrebszellen im Allgemeinen eine östrogen-antagonistische Wirkung in Form von Proliferationshemmung zugesprochen (107). 4-OH-Tamoxifen, aktiver Metabolit von Tamoxifen, besitzt hierbei ein 30 bis 100-fach höheres Potenzial östrogenabhängige Zellproliferation zu unterdrücken (110, 111, 169). Diese proliferationshemmende Eigenschaft von 4-OH-Tamoxifen konnte jedoch in der aktuellen Studie für die Brustkrebszelllinie T47D nicht bestätigt werden. 4-OH-Tamoxifen wirkte in den eingesetzten Konzentrationen (100nM, 1µM, 10µM) zusammenfassend nicht signifikant antiproliferativ bei T-47-D Zellen. Es konnte nahezu für keine eingesetzte Konzentration zu den bestimmten Messzeitpunkten eine eindeutige Wachstumshemmung beobachtet werden. [Tabelle 6; Abbildung 16] Knudsen et al zeigten, dass T-47-D Zellen prinzipiell eine für ER+-Brustkrebszelllinien überdurchschnittlich hohe Sensitivität gegenüber Tamoxifen aufweisen, jedoch sprachen die T-47-D Zellen deutlich weniger gut auf den partiellen Antagonisten Tamoxifen als auf das pure Antiöstrogen ICI 182,780 an (133). Weitere Studien um Tamoxifen bestätigten das schlechtere Ansprechen der T-47-D auf Tamoxifen im Sinne einer schwächeren antiproliferativen Wirkung im Vergleich zu FulvestrantTM (158). Als möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz in der Effizienz der Antiöstrogene zur Antiproliferation der Tumorzellen wurde die unterschiedlich starke Apoptoseinduktion der Substanzen in der Literatur

beschrieben (158). Während FulvestrantTM den Spiegel an Bcl-2-Protein, welches antiapoptotisch wirkt (170), langfristig effizient senkt und dadurch Apoptose induziert, löst Tamoxifen nur in den ersten 8 h eine bedeutsame Herabregulierung dieses Proteins aus mit erneutem Anstieg nach dieser Zeit. Somit ist die Apoptoseinduktion bei Tamoxifen schwächer ausgeprägt und zeitlich limitiert im Gegensatz zu FulvestrantTM (158). Darin vermuten Diehl et al die Ursache für den geringeren antiproliferativen Effekt des Antiöstrogens auf die Zellen. Diese unterschiedlich stark ausgeprägte Genregulierung der beiden Antiöstrogene scheint Folge der differentiellen Auswirkung auf die ER-Expression zu sein (158). Während ICI 182,780 das ER-Level auf molekularer Ebene durch Herabregulierung des Rezeptors nachhaltig reduziert (148), führt Tamoxifen nur zu einer Blockierung des Rezeptors (103). Studien zufolge korreliert das BCL-2-Protein-Level positiv mit der ER-Expression (171). Dadurch erklärt sich die höhere Effizienz von ICI 182,780 in der Senkung des Bcl-2-Levels und der Apoptoseinduktion im Vergleich zu Tamoxifen. Für die geringere apoptotische Wirkung von Tamoxifen spricht weiterhin, dass die Substanz zwar das Expressionslevel von Bcl-2 mRNA vorübergehend senkt, jedoch anders als bei FulvestrantTM die Expression anderer apoptose-assoziiierter Gene wie Bcl-X_L nicht beeinflusst wird (172).

Am vierten Tag nach Behandlung der T-47-D Zellen mit 4-OH-Tamoxifen setzte sich bei den eingesetzten Konzentrationen paradoxerweise sogar eine unerwartete Proliferationssteigerung der Zellen um bis zu 17% der östrogenhaltigen Lösungsmittelkontrollen. Dies erscheint zunächst kontrovers zu den im Allgemeinen beschriebenen proliferationshemmenden Eigenschaften von Tamoxifen auf Brustkrebszellen (173). In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass das Antiöstrogen zelluläre Proliferation stimulieren kann. Grund hierfür ist das Einwirken in verschiedene Signalwege mit *c-myc* und MAPKs als Ergebnis eines veränderten Östrogenmechanismus (174, 175). Weiterhin sind für Brustkrebszellen mit einem hohen Level an ERs und Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) Mechanismen bekannt, die zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung von ER führen und somit proliferationssteigernd wirken. Dies ist Folge aus der Interaktion zwischen den ERs und den Signalwegen mit Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) wie HER2, EGFR und PI3K, welche erleichtert wird durch die nicht-genomische Aktivität membranassoziierter ERs (176, 177). Die Wachstumssteigerung der T-47-D Zellen

durch 4-OH-Tamoxifen könnte zudem eine potentielle, möglicherweise rezeptorunabhängige Zellantwort vermuten lassen. Da der proliferationssteigernde Effekt von 4-OH-Tamoxifen auf T-47-D Zellen nicht signifikant ausgeprägt war und nur an einem der drei Messzeitpunkte nach Zugabe des SERMs einsetzte, sollte dieser leicht agonistischen Aktivität von Tamoxifen vermutlich nicht zu viel Bedeutung beigemessen werden.

4.2.2.1.2 Mangelnder Effekt des *icb-1 knockdowns* auf das Ansprechen der T-47-D Zellen auf 4-OH-Tamoxifen

Der *knockdown* von *icb-1* bewirkte keinen signifikanten Unterschied in der Antiproliferation der T-47-D Zellen als Ausdruck einer veränderten Wirkung von 4-OH-Tamoxifen. Tendenziell schienen die Zellen mit reduzierter *icb-1* Expression eine leicht verbesserte Tamoxifenantwort aufzuweisen im Sinne einer etwas stärkeren Wachstumshemmung im Vergleich zu den Kontrollzellen. [Tabelle 6; Abbildung 16] Eine plausible Erklärung ist auch hierfür wie schon für ICI 182,780 die verstärkte ER-abhängige Proliferationshemmung durch das Antiöstrogen bei den mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen. *Knockdown* von *icb-1* bei T-47-D führte auf molekularer Ebene zu einer gesteigerten Expression von ER α und somit zu einem deutlichen Wachstumsvorteil der Zellen durch die verbesserte Östrogenresponse. Tamoxifen löst bekanntlich als Antiöstrogen bei den Brustkrebszellen eine Blockierung von ER α aus und antagonisiert somit die rezeptorvermittelte Östrogenwirkung, den stärksten Wachstumsstimulus bei den ER+-Brustkrebszellen (107). Bei den *icb-1 knockdown* T-47-D Zellen führte diese Tamoxifen-induzierte ER α -Hemmung folglich zu einer verstärkten Antiproliferation im Vergleich zu den weniger östrogensensitiven Kontrollzellen, wenn auch dieser Effekt für 4-OH-Tamoxifen nur gering zu beobachten war und nicht als signifikant bewertet werden konnte. Die Ursache für den kaum vorhandenen Einfluss von *icb-1* auf die Zellen liegt möglicherweise auch in der mangelnden 4-OH-Tamoxifenantwort bei den T-47-D Zellen im Allgemeinen. So erschwerte die vernachlässigbar geringe Wachstumshemmung durch fehlendes 4-OH-Tamoxifen-Ansprechen der T-47-D Kontrollzellen offenbar den direkten, gültigen Vergleich mit den mit *icb-1* siRNA transfizierten Zellen.

Bisherige Forschungen um die Auswirkungen von *icb-1* auf die antiproliferative Wirkung von 4-OH-Tamoxifen bei diversen Zelllinien ließen dem Gen keine

einheitliche Rolle zukommen. Bei der östrogen-unabhängigen Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 initiierte der *knockdown* von *icb-1* überraschenderweise eine Östrogensensibilität und verstärkte, wie auch bei den T-47-D Zellen, die antiproliferative Wirkung von 4-OH-Tamoxifen. Folglich scheint *icb-1* bei den Zelllinien T-47-D und SK-OV-3 den antiproliferativen Effekt des SERMs Tamoxifen abzuschwächen. Hingegen verstärkte das Gen *icb-1* bei der Endometriumzelllinie HEC-1B die Wachstumshemmung durch Vermittlung der proapoptotischen Wirkung von 4-OH-Tamoxifen. Bei der ER+-Brustkrebszelllinie MCF-7 blieb der proliferationshemmende Effekt von 4-OH-Tamoxifen durch den *knockdown* von *icb-1* unbeeinflusst (129). Wenngleich *icb-1* die Wirkung der Antiöstrogene bei verschiedenen Zelllinien unterschiedlich zu beeinflussen scheint, kommt dem Gen *icb-1* bei den T-47-D Zellen eine einheitliche Rolle als Dämpfungsglied der antiproliferativen Wirkung der Antiöstrogene Tamoxifen und ICI 182,780 zu. Demnach scheint das Gen *icb-1* bei den T-47-D Zellen potenziell ein negativer prädiktiver Marker für das Ansprechen des endokrinen Brustkrebsmedikamentes ICI 182,780 und in geringem Maße auch für Tamoxifen zu sein.

4.2.2.2 4-OH-N-desmethyl-Tamoxifen (Endoxifen)

4.2.2.2.1 Signifikantes Ansprechen der T-47-D auf Endoxifen

Das Antiöstrogen Endoxifen wirkte dosisabhängig eindeutig wachstumshemmend auf die T-47-D Zellen. So konnte bei den höher eingesetzten Konzentrationen (25nM und 100nM) an Endoxifen an nahezu allen Messzeitpunkten eine signifikante Antiproliferation verzeichnet werden. [Tabelle 7; Abbildung 17] Interessant ist bei diesen Daten insbesondere, dass eine eindeutige Differenz der beiden Tamoxifenmetaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen in der Effizienz der Antiproliferation besteht. Während Endoxifen auf T-47-D Zellen signifikant proliferationshemmend wirkte, sprachen die Zellen auf 4-OH-Tamoxifen kaum an im Sinne einer Antiproliferation. Stearns et al, Johnson et al und weitere zeigten, dass die beiden Metaboliten ähnlich starke Bindungsaffinität zu ER besitzen, auf vergleichbare Weise die Genexpression beeinflussen und mit gleicher Potenz östrogenabhängiges Zellwachstum inhibieren (178, 179). Diese äquivalente Wachstumshemmung durch die beiden Metaboliten konnte von Johnson et al unter

anderem auch für die Brustkrebszelllinie T-47-D festgestellt werden (178). Insofern erscheinen die Ergebnisse dieser aktuellen Studie kontrovers zu den bisherigen Forschungserkenntnissen zur antiproliferativen Wirkung der Tamoxifen-Metaboliten. Da in der Literatur unumstritten die Wirkung von 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen als äquivalent beschrieben wird, könnte die Ursache für die unterschiedliche Wirkung der beiden Metaboliten in der aktuellen Versuchsreihe vermutlich darin liegen, dass für die beiden antiöstrogenen Substanzen verschiedene Konzentrationen verwendet wurden und somit ein direkter Vergleich nicht gänzlich möglich ist. Die eingesetzten Konzentrationen von 4-OH-Tamoxifen waren möglicherweise zu gering für eine Antiproliferation.

4.2.2.2 Einfluss von *icb-1* auf die Wirkung von Endoxifen bei T-47-D Zellen

Wie für 4-OH-Tamoxifen ergaben sich auch für Endoxifen keine signifikanten Diskrepanzen in der antiproliferativen Wirkung auf die mit *icb-1* siRNA transfizierten T-47-D Zellen und die Kontrollzellen. Während das Vorhandensein des Gens *icb-1* jedoch bei 4-OH-Tamoxifen tendenziell ein vermindertes Ansprechen der Zellen auf das Antiöstrogen im Sinne einer leicht abgeschwächten Wachstumshemmung bewirkte, konnte für das Antiöstrogen Endoxifen tendenziell der gegenteilige Effekt beobachtet werden. So deuten die aktuellen Daten beim Gen *icb-1* eher auf eine die Wirkung von Endoxifen steigernde Komponente hin. [Tabelle 7; Abbildung 17] Da die Daten jedoch nicht signifikant waren, kann eine gewisse Zufallswahrscheinlichkeit dieses Ergebnisses nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Studien über den Einfluss von *icb-1* auf die antiproliferative Wirkung von Endoxifen. Jedoch wäre ein ähnlicher Effekt von *icb-1* auf die beiden Metaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen zu erwarten. Vermutlich ist der Vergleich der Daten in dieser Studie um den Einfluss von *icb-1* auf die Response der beiden Metaboliten auch nur bedingt möglich, da das Ansprechen der T-47-D Zellen auf 4-OH-Tamoxifen unzureichend war.

4.3 Klinische Relevanz der Daten

Die endokrine Therapie stellt weltweit eine elementare Säule in der Behandlung von Brusttumoren dar. So gilt die endokrine Therapie mit Antiöstrogenen als Goldstandard für Patientinnen und Patienten mit Östrogenrezeptor- und/oder

Progesteronrezeptor-positivem Mammakarzinom (5). Trotz der großen Bedeutung dieser Substanzen sind von Beginn an vorhandene sowie im Laufe der langjährigen Therapie entwickelte Resistenzen der Tumore gegenüber Antiöstrogenen ein grundlegendes klinisches Problem (107, 153). Die Identifizierung dieser resistenten Subgruppen von ER⁺ und/oder PR⁺-Brusttumoren ist von großer therapeutischer Wichtigkeit, um bei diesen Patientinnen und Patienten eine angepasste, wirksamere Behandlung entwickeln und einleiten zu können. Zudem könnte die Entdeckung und folglich der Einsatz von geeigneten Prädiktionsmarkern zur Erleichterung der Vorhersage des endokrinen Therapieerfolges von Mammakarzinomen beitragen (133). Aufbauend auf diese Problematik beschäftigt sich die aktuelle Arbeit mit der Frage, ob das humane Gen *icb-1* die Wirkung von Antiöstrogenen (ICI 182,780, 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen) möglicherweise beeinflusst und somit weiterführend als potentieller Prädiktionsmarker, welcher das Ansprechen der Krebszellen auf die Antiöstrogene vorhersagt, eingesetzt werden könnte. Die Ergebnisse zeigen tatsächlich, dass *icb-1* eine bedeutende Rolle als abschwächendes Element der antiöstrogenen Wirkung von ICI 182,780 einnimmt. Dies ist durchaus von klinischer Relevanz, indem das Vorhandensein von *icb-1* sich vermutlich negativ auf das Ansprechen der endokrinen Antiöstrogentherapie bei Brustkrebspatientinnen und -patienten auswirkt. Das Gen *icb-1* wäre demzufolge ein negativer Prädiktionsmarker für den Erfolg einer Therapie mit Antiöstrogenen.

Klinisch interessant ist außerdem die aktuelle Bestätigung der Erkenntnis, dass das *icb-1* Gen eine Rolle als inhibierende Komponente der östrogen-getriggerten Proliferation und Genexpression bei Brustkrebszellen einnimmt. Indem das Gen eindeutig proliferationshemmend auf die Tumorzellen wirkt, kommt ihm vermutlich eine Schlüsselfunktion als Suppressor der Tumorgenese und Progression von Brustkrebs zu. Diese Erkenntnis könnte neue Anhaltspunkte im Rahmen einer targetspezifischen gynäkologischen Tumorthherapie schaffen und gibt Anlass für weiterführende Studien zur Rolle von *icb-1* bei der Entwicklung und Progression von Brustkrebs.

4.4 Ausblick

Um den Einfluss von *icb-1* auf den Effekt von Antiöstrogenen bei gynäkologischen Krebszellen noch näher zu erforschen, besteht aufbauend auf die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen Anlass für weitere experimentelle Untersuchungen.

Weiterhin wäre die Durchführung dieses Zellkulturexperimentes mit anderen gynäkologischen Krebszelllinien von Interesse, um zusammenfassend einen Vergleich der Zelllinien ziehen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Tumoridentitäten überprüfen zu können.

Zudem wäre es sinnvoll, die Rolle von *icb-1* auf die Expression weiterer proliferationsassoziierter und östrogeninduzierter Gene bei den T-47-D Zellen sowie bei anderen gynäkologischen Krebszelllinien zu untersuchen und in Zusammenhang zu den Ergebnissen dieser Arbeit zu stellen. Neben der Erforschung des Einflusses von *icb-1* auf die Proliferation und Östrogeninduktion der Zellen auf molekularer Ebene, wäre der Einfluss von *icb-1* auf die Expression Apoptose-assoziiierter Gene von Interesse. Diesbezüglich steht in dieser Arbeit bereits die Relevanz eines möglicherweise durch den *icb-1 knockdown* veränderten Levels an den Apoptose-assoziierten Proteinen Bcl-2, Bcl-x_L, Bax und Bad für die Wirkung der Antiöstrogene in Diskussion. So könnten durch das transiente Ausschalten von *icb-1* entstandene Levelveränderungen dieser Apoptose-assoziierten Proteine potentiell als Ursache für die veränderten Antiöstrogeneffekte auf die Krebszellen in Betracht kommen (siehe 4.3.1.3).

5 Zusammenfassung

Das Gen *icb-1* („*induced by contact to basement membrane 1*“) ist in Differenzierungsprozesse von Krebszellen involviert und nimmt eine wichtige Rolle in Proliferationsprozessen, Apoptoseverhalten und Progression gynäkologischer Tumore ein.

Aufbauend auf eine aktuelle Studie von Knudsen et al, welche das Gen *icb-1* als Teil einer Signatur zur Prädiktion des Ansprechens auf das Antiöstrogen Fulvestrant (Faslodex, ICI 182,780) identifizierte (133), wurde in dieser Arbeit nun die Bedeutung von *icb-1* für östrogenabhängige Zellproliferation und die Wirkung von Antiöstrogenen bei Brustkrebszellen genauer untersucht. Hierfür wurde repräsentativ die östrogensensitive Brustkrebszelllinie T-47-D verwendet. Verglichen wurden jeweils *knockdown* Zellen, bei denen mittels Transfektion einer spezifischen siRNA das *icb-1* Gen transient ausgeschaltet wurde, und Zellen mit normaler *icb-1* Expression. Die Zellen wurden mit einer Kombination aus 17- β Östradiol und Antiöstrogenen ICI 182,780, 4-OH-Tamoxifen bzw. Endoxifen behandelt. An den entsprechenden Messtagen wurde die Proliferationsrate der Zellen direkt via CTB-Assay detektiert. Auf molekularer Ebene wurde die Expression proliferations- und östrogenassoziierter Gene bei den *knockdown*- und den Kontrollzellen mittels *RealTime* qPCR im *LightCycler* bestimmt.

Das Ausschalten von *icb-1* wirkte eindeutig proliferationssteigernd auf die Brustkrebszellen. Zudem konnte ein signifikant verbessertes Östrogenansprechen im Sinne einer verstärkten Proliferation bei den *icb-1 knockdown* Zellen beobachtet werden. Eine Erklärung für diesen östrogenassozierten proliferationssteigernden Effekt bietet vermutlich die Hochregulation der ER α mRNA-Expression durch den *knockdown* von *icb-1*. Dieses verstärkte ER α -vermittelte Östrogenansprechen führte nämlich auf molekularer Ebene zu einer gesteigerten Expression der Proliferationsgene nach Behandlung mit 17- β Östradiol. Weiterhin ergaben die Versuchsreihen dieser Arbeit, dass der *icb-1 knockdown* mit einem signifikant gesteigerten antiproliferativen Effekt von ICI 182,780 auf die T-47-D Zellen einhergeht. Im Falle von 4-OH-Tamoxifen konnte generell kein ausreichendes Ansprechen der T-47-D Zellen erzielt werden und somit ergab sich auch kein signifikanter Unterschied in der Wirkung des Antiöstrogens bei den *icb-1 knockdown*

Zellen und den Zellen mit normaler *icb-1* Expression. Obwohl sich für Endoxifen, Metabolit von Tamoxifen, ein leicht verbessertes Ansprechen der Zellen im Allgemeinen zeigte, war auch für dieses Antiöstrogen kein signifikanter Unterschied in der Wirkung bei den *knockdown*- und den Kontrollzellen zu erkennen.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Studie die Rolle des Gens *icb-1* als inhibierende Komponente zellulären Östrogenansprechens bei den Brustkrebszellen T-47-D und lassen *icb-1* antiproliferationshemmende Eigenschaften für ICI 182,780 bei den Zellen zukommen. Die Identifizierung des Gens *icb-1* als essentielles Element für das Ansprechen von Brustkrebszellen auf Antiöstrogene gibt Anlass für weiterführende Studien, um die Bedeutung von *icb-1* für die endokrine Krebstherapie mit Antiöstrogenen genauer zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

1. DIMDI - ICD-10-GM Version 2018; 2019 [cited 2019 Jul 3]. Available from: URL: <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2018/block-c50-c50.htm>.
2. Petru E, Jonat W, Fink D. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. 5., vollst. überarb. u. erw. Aufl. 2019. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
3. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016; 2016. Available from: URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile.
4. Haag P. Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. 8.Auflage. Breisach, Rh: Medizinische Verl.- u. Informationsdienste; 2016.
5. Onkologie L. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms(Kurzversion): Langversion 4.1–September2018; 2018.
6. Moss SM, Wale C, Smith R, Evans A, Cuckle H, Duffy SW. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality in the UK Age trial at 17 years' follow-up: A randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(9):1123–32.
7. Bleyer A, Welch HG. Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N Engl J Med* 2012; 367(21):1998–2005.
8. Beral V RG. Childbearing, oral contraceptive use, and breast cancer. *The Lancet* 1993; 341(8852):1102. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014067369392469A/pdf?md5=c2a3192b3bbdb3b3358f9fa84fda881b&pid=1-s2.0-014067369392469A-main.pdf>.
9. Hoel DG, Wakabayashi T, Pike MC. Secular trends in the distributions of the breast cancer risk factors--menarche, first birth, menopause, and weight--in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Am J Epidemiol* 1983; 118(1):78–89.

10. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology* 2001 [cited 2016 Dec 6]; 2(3):133–40.
11. Hiddemann W, editor. *Die Onkologie (Teil 2: Spezieller Teil) solide Tumoren, Lymphome, Leukämien*. 2. Auflage. Berlin [u.a.]: Springer; 2010.
12. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: Hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001; 38(1):103–13.
13. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347(9017):1713–27.
14. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ et al. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1995; 332(24):1589–93.
15. University of Pennsylvania, Philadelphia, USA. M A Blackwood, B L Weber. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. *J Clin Onkol*. 1998 [cited 2016 Dec 7]; (16(5)):1969–77.
16. Thompson DW. Genetic epidemiology of breast cancer. *Cancer* 1994 [cited 2016 Dec 7]; 74(S1):279–87.
17. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378(6559):789–92.
18. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266(5182):66–71.
19. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994; 343(8899):692–5.
20. Fischer U, Baum F, Emons G. *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*. Stuttgart [u.a.], Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2014.

21. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5):1117–30.
22. Leach MO, Boggis CRM, Dixon AK, Easton DF, Eeles RA, Evans DGR et al. Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: A prospective multicentre cohort study (MARIBS). *Lancet* 2005; 365(9473):1769–78.
23. Kriege M, Brekelmans CTM, Boetes C, Besnard PE, Zonderland HM, Obdeijn IM et al. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med* 2004; 351(5):427–37.
24. Warner E, Plewes DB, Shumak RS, Catzavelos GC, Di Prospero LS, Yaffe MJ et al. Comparison of breast magnetic resonance imaging, mammography, and ultrasound for surveillance of women at high risk for hereditary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(15):3524–31.
25. Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(21):1633–7.
26. Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, Henzen-Logmans SC, Seynaeve C, Menke-Pluymers MB et al. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001; 345(3):159–64.
27. Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van 't Veer L, Garber JE et al. Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: The PROSE Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1055–62.
28. Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? *Breast Cancer Research* 1999; 1(1):14–7.
29. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LFA et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008; 216(2):141–50.

30. Bancej C, Decker K, Chiarelli A, Harrison M, Turner D, Brisson J. Contribution of clinical breast examination to mammography screening in the early detection of breast cancer. *J Med Screen* 2003; 10(1):16–21.
31. Provencher L, Hogue JC, Desbiens C, Poirier B, Poirier E, Boudreau D et al. Is clinical breast examination important for breast cancer detection? *Curr Oncol* 2016; 23(4):e332-9.
32. Haakinson DJ, Stucky C-CH, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, Apsey HA et al. A significant number of women present with palpable breast cancer even with a normal mammogram within 1 year. *Am J Surg* 2010; 200(6):712-7; discussion 717-8.
33. Cserni G. The impact of axillary lymphadenopathy on further treatment in breast cancer? A model for clinical staging. *Pathol Oncol Res* 1998; 4(4):301–3.
34. Duffy SW, Dibden A, Michalopoulos D, Offman J, Parmar D, Jenkins J et al. Screen detection of ductal carcinoma in situ and subsequent incidence of invasive interval breast cancers: A retrospective population-based study. *Lancet Oncol* 2016; 17(1):109–14.
35. Mayor S. Screening for early breast cancer reduces invasive cancer, study finds. *BMJ* 2015; 351:h6576. Available from: URL: <https://www.bmj.com/content/bmj/351/bmj.h6576.full.pdf>.
36. Malmgren JA, Parikh J, Atwood MK, Kaplan HG. Impact of mammography detection on the course of breast cancer in women aged 40-49 years. *Radiology* 2012; 262(3):797–806.
37. Buchberger W, Geiger-Gritsch S, Knapp R, Gautsch K, Oberaigner W. Combined screening with mammography and ultrasound in a population-based screening program. *Eur J Radiol* 2018; 101:24–9.
38. Bennani-Baiti B, Bennani-Baiti N, Baltzer PA. Diagnostic Performance of Breast Magnetic Resonance Imaging in Non-Calcified Equivocal Breast Findings: Results from a Systematic Review and Meta-Analysis. United States; 2016.

39. Hahn M, Krainick-Strobel U, Toellner T, Gissler J, Kluge S, Krapfl E et al. Interdisciplinary consensus recommendations for the use of vacuum-assisted breast biopsy under sonographic guidance: First update 2012. *Ultraschall Med* 2012; 33(4):366–71.
40. Crystal P, Koretz M, Shcharynsky S, Makarov V, Strano S. Accuracy of sonographically guided 14-gauge core-needle biopsy: Results of 715 consecutive breast biopsies with at least two-year follow-up of benign lesions. *J Clin Ultrasound* 2005; 33(2):47–52.
41. Rakha EA, Ellis IO. An overview of assessment of prognostic and predictive factors in breast cancer needle core biopsy specimens. *J Clin Pathol* 2007; 60(12):1300–6.
42. Andrade VPd, Gobbi H. Accuracy of typing and grading invasive mammary carcinomas on core needle biopsy compared with the excisional specimen. *Virchows Arch* 2004; 445(6):597–602.
43. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract* 2010; 6(4):195–7.
44. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO). AGO-Online - Mamma; 2019 [cited 2019 Jul 4]. Available from: URL: <http://www.ago-online.de/de/infothek-fuer-aerzte/leitlinienempfehlungen/mamma/>.
45. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology* 2002; 41(3A):151-2, discussion 152-3.
46. Tan PH, Ellis IO. Myoepithelial and epithelial–myoepithelial, mesenchymal and fibroepithelial breast lesions: Updates from the WHO Classification of Tumours of the Breast 2012. *J Clin Pathol* 2013; 66(6):465–70. Available from: URL: <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/66/6/465.full.pdf>.

47. Isasi CR, Moadel RM, Blafox MD. A meta-analysis of FDG-PET for the evaluation of breast cancer recurrence and metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90(2):105–12.
48. Gerber B, Seitz E, Muller H, Krause A, Reimer T, Kundt G et al. Perioperative screening for metastatic disease is not indicated in patients with primary breast cancer and no clinical signs of tumor spread. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 82(1):29–37.
49. Diagnostik und Therapie von Patientinnen mit primärem und metastasiertem Brustkrebs; 2016 [cited 2016 Dec 8]. Available from: URL: http://www.ago-online.de/fileadmin/downloads/leitlinien/mamma/Maerz2016/de/Alle_aktuellen_Empfehlungen_2016.pdf.
50. O'Higgins N, Linos DA, Blichert-Toft M, Cataliotti L, Wolf C de, Rochard F et al. European guidelines for quality assurance in the surgical management of mammographically detected lesions. *Eur J Surg Oncol* 1998; 24(2):96–8.
51. Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME et al. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer* 2010; 46(18):3219–32.
52. NZGG- New Zealand Guidelines Group 2009. Management of Early Breast Cancer - Evidence-based Best Practice Guideline; 2009. Available from: URL: <https://www.health.govt.nz/system/files/documents/publications/mgmt-of-early-breast-cancer-aug09.pdf>.
53. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A et al. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16):1227–32.
54. Kuehn T, Bembenek A, Decker T, Munz DL, Sautter-Bihl M-L, Untch M et al. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* 2005; 103(3):451–61. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.20786/full>.

55. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Am Brown, Harlow SP, Costantino JP et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(10):927–33.
56. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(9):599–609.
57. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M et al. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011; 378(9804):1707–16.
58. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A et al. Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2016; 14(3):324–54.
59. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011; 378(9793):771–84.
60. Burstein HJ, Griggs JJ, Prestrud AA, Temin S. American society of clinical oncology clinical practice guideline update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Oncol Pract* 2010; 6(5):243–6.
61. Eisen A, Fletcher GG, Gandhi S, Mates M, Freedman OC, Dent SF et al. Optimal systemic therapy for early breast cancer in women: A clinical practice guideline. *Curr Oncol* 2015; 22(Suppl 1):S67-81.
62. Bria E, Nistico C, Cuppone F, Carlini P, Ciccarese M, Milella M et al. Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Cancer* 2006; 106(11):2337–44. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.21886/full>.

63. Kaufmann M, Minckwitz G von, Bear HD, Buzdar A, McGale P, Bonnefoi H et al. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol* 2007; 18(12):1927–34.
64. Kaufmann M, Minckwitz G von, Mamounas EP, Cameron D, Carey LA, Cristofanilli M et al. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(5):1508–16.
65. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999; 97(2):161–3.
66. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:451–86.
67. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83(6):835–9.
68. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000; 6(3):225–36.
69. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(14):2905–19.
70. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors☆. *Steroids* 2000; 65(5):227–51.
71. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 1999; 64(5):310–9.
72. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 2006; 7(8):497–508.
73. Singh RR, Kumar R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem* 2005; 96(3):490–505.

74. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(23):7889–93.
75. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243(1):122–6.
76. Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(12):4258–65.
77. Tee MK, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvoro A, an J, Christy RJ et al. Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta. *Mol Biol Cell* 2004; 15(3):1262–72.
78. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2000; 2(5):335. Available from: URL: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/bcr78?site=breast-cancer-research.biomedcentral.com>.
79. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138(3):863–70.
80. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen Receptors Alpha (ER α) and Beta (ER β): Subtype-Selective Ligands and Clinical Potential. *Steroids* 2014; 0:13–29.
81. Omoto Y, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor β in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci* 2015 [cited 2017 Jun 8]; 106(4):337–43. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4409875/pdf/cas0106-0337.pdf>.

82. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 2005; 67:335–76.
83. Vrtacnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrac S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; 24(3):329–42.
84. Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PGV, Montano M et al. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000; 74(5):279–85.
85. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology* 2012; 153(7):2953–62.
86. Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol Endocrinol* 2005; 19(4):833–42. Available from: URL: <https://academic.oup.com/mend/article-pdf/19/4/833/8950364/mend0833.pdf>.
87. Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: [http://www.regensburger-katalog.de/InfoGuideClient.ubrsis/start.do?Login=igubr&Query=540="978-3-642-17971-6"](http://www.regensburger-katalog.de/InfoGuideClient.ubrsis/start.do?Login=igubr&Query=540=).
88. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 102(1-5):89–96.
89. Yue W, Yager JD, Wang JP, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013; 78(2):161–70.
90. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* 2015; 356(2 Pt A):231–43.

91. Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N et al. Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer* 2010; 127(8):1748–57.
92. Chang M. Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. *BMB Rep* 2011; 44(7):423–34.
93. Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(20):10937–42.
94. Liehr JG, Roy D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(4):415–23.
95. Schneider J, Huh MM, Bradlow HL, Fishman J. Antiestrogen action of 2-hydroxyestrone on MCF-7 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1984; 259(8):4840–5.
96. van Aswegen CH, Purdy RH, Wittliff JL. Binding of 2-hydroxyestradiol and 4-hydroxyestradiol to estrogen receptors from human breast cancers. *J Steroid Biochem* 1989; 32(4):485–92.
97. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 1999; 163(3):379–83.
98. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2006; 97(2):261–74.
99. Prall OW, Sarcevic B, Musgrove EA, Watts CK, Sutherland RL. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 1997; 272(16):10882–94.
100. Bindels EMJ, Lallemand F, Balkenende A, Verwoerd D, Michalides R. Involvement of G1/S cyclins in estrogen-independent proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(53):8158–65.

101. Saha Roy S, Vadlamudi RK. Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis. *International Journal of Breast Cancer* 2012; 2012. Available from: URL: <http://downloads.hindawi.com/journals/ijbc/2012/654698.pdf>.
102. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10(2):179–86.
103. Jordan VC. New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids* 2007; 72(13):829–42.
104. Lee W-L, Cheng M-H, Chao H-T, Wang P-H. The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2008; 47(1):24–31.
105. McDonnell. The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10(8):301–11.
106. Riggs BL, Hartmann LC. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med* 2003; 348(7):618–29.
107. Lewis JS, Jordan VC. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res* 2005; 591(1-2):247–63.
108. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, Flockhart DA. Comprehensive Evaluation of Tamoxifen Sequential Biotransformation by the Human Cytochrome P450 System in Vitro: Prominent Roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(3):1062–75. Available from: URL: <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/310/3/1062.full.pdf>.
109. JORDAN VC, COLLINS MM, ROWSBY L, PRESTWICH G. A MONOHYDROXYLATED METABOLITE OF TAMOXIFEN WITH POTENT ANTIOESTROGENIC ACTIVITY. *J Endocrinol* 1977; 75(2):305–16. Available from: URL: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/75/2/305.full.pdf>.

110. JORDAN VC. Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2(2):123–38.
111. Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Long DJ, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem* 1982; 16(1):1–13.
112. Maximov PY, Lee TM, Jordan VC. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol* 2013; 8(2):135–55.
113. Pollak MN, Huynh HT, Lefebvre SP. Tamoxifen reduces serum insulin-like growth factor I (IGF-I). *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22(1):91–100.
114. Robertson JF. ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data. *Br J Cancer* 2001; 85 Suppl 2:11–4.
115. Robertson JF. Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator--future possibilities in breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2001; 79(1-5):209–12.
116. Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A et al. Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1997; 72(4):608–13.
117. Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L et al. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast* 2014; 23(3):201–8.
118. Agrawal A, Robertson JFR, Cheung KL, Gutteridge E, Ellis IO, Nicholson RI et al. Biological effects of fulvestrant on estrogen receptor positive human breast cancer: short, medium and long-term effects based on sequential biopsies. *Int J Cancer* 2016; 138(1):146–59.

119. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M et al. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 1979; 15(5):659–70.
120. Savouret JF, Fridlanski F, Atger M, Misrahi M, Berger R, Milgrom E. Origin of the high constitutive level of progesterone receptor in T47-D breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 75(2):157–62.
121. Yu S, Kim T, Yoo KH, Kang K. The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 486(3):752–8.
122. Treack O, Strunck E, Vollmer G. A novel basement membrane-induced gene identified in the human endometrial adenocarcinoma cell line HEC1B. *FEBS Lett* 1998; 425(3):426–30.
123. Treack O, Odani T, Itoh N, Imai H, Fujita S, Kohroki J et al. Detection of increased *icb-1* transcript levels in maturing HL-60 cells: a novel marker for granulocytic and monocytic in vitro differentiation. *Leuk Res* 2002; 26(8):765–9.
124. Muraoka S, Kume H, Adachi J, Shiromizu T, Watanabe S, Masuda T et al. In-depth membrane proteomic study of breast cancer tissues for the generation of a chromosome-based protein list. *J Proteome Res* 2013; 12(1):208–13.
125. Treack O, Kindzorra I, Pauser K, Treack L, Ortmann O. Expression of *icb-1* gene is interferon-gamma inducible in breast and ovarian cancer cell lines and affects the IFN gamma-response of SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Cytokine* 2005; 32(3-4):137–42.
126. Bollmann J, Ortmann O, Treack O. Expression of differentiation-associated gene *icb-1* is estrogen-responsive in ovarian and breast cancer cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2008; 109(1-2):16–21.
127. Springwald A, Lattrich C, Seitz S, Ortmann O, Treack O. Single nucleotide polymorphisms in human gene *icb-1* and breast cancer susceptibility. *Cancer Invest* 2009; 27(6):669–72.

128. Schuler S, Lattrich C, Skrzypczak M, Fehm T, Ortmann O, Treeck O. Icb-1 gene polymorphism rs1467465 is associated with susceptibility to ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2014; 7:42.
129. Konwisorz A, Springwald A, Haselberger M, Goerse R, Ortmann O, Treeck O. Knockdown of ICB-1 gene enhanced estrogen responsiveness of ovarian and breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17(1):147–57.
130. Haselberger M, Springwald A, Konwisorz A, Lattrich C, Goerse R, Ortmann O et al. Silencing of the icb-1 gene inhibits the induction of differentiation-associated genes by vitamin D3 and all-trans retinoic acid in gynecological cancer cells. *Int J Mol Med* 2011; 28(1):121–7.
131. Treeck O, Schuler S, Haring J, Skrzypczak M, Lattrich C, Ortmann O. icb-1 Gene counteracts growth of ovarian cancer cell lines. *Cancer Lett* 2013; 335(2):441–6.
132. Treeck O, Belgutay D, Haring J, Schuler S, Lattrich C, Ortmann O. Network analysis of icb-1 gene function in human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2012; 113(9):2979–88.
133. Knudsen S, Jensen T, Hansen A, Mazin W, Lindemann J, Kuter I et al. Development and validation of a gene expression score that predicts response to fulvestrant in breast cancer patients. *PLoS One* 2014; 9(2):e87415.
134. Brisken C, Hess K, Jeitziner R. Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology* 2015; 156(10):3442–50.
135. Pichon MF, Milgrom E. Clinical significance of the estrogen regulated pS2 protein in mammary tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 15(1):13–21.
136. Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12(7):320–7.
137. Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 2016; 15(2):196–212.

138. Loukil A, Cheung CT, Bendris N, Lemmers B, Peter M, Blanchard JM. Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World J Biol Chem* 2015; 6(4):346–50.
139. Bendris N, Lemmers B, Blanchard J-M, Arsic N. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements. *PLoS One* 2011; 6(7):e22879.
140. Bukholm IR, Bukholm G, Nesland JM. Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93(2):283–7.
141. Yam CH, Fung TK, Poon RYC. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(8):1317–26.
142. Gopinathan L, Tan SLW, Padmakumar VC, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Loss of Cdk2 and cyclin A2 impairs cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res* 2014; 74(14):3870–9.
143. Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol* 2013; 66(6):512–6.
144. Basu S, Combe K, Kwiatkowski F, Caldefie-Chezet F, Penault-Llorca F, Bignon Y-J et al. Cellular Expression of Cyclooxygenase, Aromatase, Adipokines, Inflammation and Cell Proliferation Markers in Breast Cancer Specimen. *PLoS One* 2015; 10(10):e0138443.
145. Mansouri H, Mnango LF, Magorosa EP, Sauli E, Mpolya EA. Ki-67, p53 and BCL-2 Expressions and their Association with Clinical Histopathology of Breast Cancer among Women in Tanzania. *Sci Rep* 2019; 9.
146. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139(2):539–52.

147. Madhu Krishna B, Chaudhary S, Mishra DR, Naik SK, Suklabaidya S, Adhya AK et al. Estrogen receptor α dependent regulation of estrogen related receptor β and its role in cell cycle in breast cancer. *BMC Cancer* 2018; 18.
148. Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE. ICI 182,780 (Faslodex™). *Cancer* 2000; 89(4):817–25. Available from: URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(20000815\)89:4<817::AID-CNCR14>3.0.CO;2-6/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(20000815)89:4<817::AID-CNCR14>3.0.CO;2-6/full).
149. Wakeling AE. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7(1):17–28.
150. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential. *Cancer Res* 1991; 51(15):3867–73. Available from: URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/51/15/3867.full.pdf>.
151. Lykkesfeldt AE, Madsen MW, Briand P. Altered expression of estrogen-regulated genes in a tamoxifen-resistant and ICI 164,384 and ICI 182,780 sensitive human breast cancer cell line, MCF-7/TAMR-1. *Cancer Res* 1994; 54(6):1587–95.
152. Chia S, Gradishar W, Mauriac L, Bines J, Amant F, Federico M et al. Double-blind, randomized placebo controlled trial of fulvestrant compared with exemestane after prior nonsteroidal aromatase inhibitor therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive, advanced breast cancer: results from EFECT. *J Clin Oncol* 2008; 26(10):1664–70.
153. Agrawal A, Robertson JFR, Cheung KL, Gutteridge E, Ellis IO, Nicholson RI et al. Biological effects of fulvestrant on estrogen receptor positive human breast cancer: short, medium and long-term effects based on sequential biopsies. *Int J Cancer* 2016; 138(1):146–59.
154. Ellis MJ, Llombart-Cussac A, Feltl D, Dewar JA, Jasiowka M, Hewson N et al. Fulvestrant 500 mg Versus Anastrozole 1 mg for the First-Line Treatment of Advanced Breast Cancer: Overall Survival Analysis From the Phase II FIRST Study. *J Clin Oncol* 2015; 33(32):3781–7.

155. Kuter I, Gee JMW, Hegg R, Singer CF, Badwe RA, Lowe ES et al. Dose-dependent change in biomarkers during neoadjuvant endocrine therapy with fulvestrant: results from NEWEST, a randomized Phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(1):237–46.
156. Robertson JFR, Llombart-Cussac A, Rolski J, Feltl D, Dewar J, Macpherson E et al. Activity of fulvestrant 500 mg versus anastrozole 1 mg as first-line treatment for advanced breast cancer: results from the FIRST study. *J Clin Oncol* 2009; 27(27):4530–5.
157. Robertson JF, Nicholson RI, Bundred NJ, Anderson E, Rayter Z, Dowsett M et al. Comparison of the short-term biological effects of 7alpha-9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)-nonylestra-1,3,5, (10)-triene-3,17beta-diol (Faslodex) versus tamoxifen in postmenopausal women with primary breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61(18):6739–46.
158. Diel P, Smolnikar K, Michna H. The pure antiestrogen ICI 182780 is more effective in the induction of apoptosis and down regulation of BCL-2 than tamoxifen in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 58(2):87–97.
159. Jansen GH, Franke HR, Wolbers F, Brinkhuis M, Vermes I. Effects of fulvestrant alone or combined with different steroids in human breast cancer cells in vitro. *Climacteric* 2008; 11(4):315–21.
160. Parker MG. Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Treat* 1993; 26(2):131–7.
161. Vignon F, Bouton MM, Rochefort H. Antiestrogens inhibit the mitogenic effect of growth factors on breast cancer cells in the total absence of estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146(3):1502–8.
162. Lim KB, Ng CY, Ong CK, Ong CS, Tran E, Nguyen TT et al. Induction of apoptosis in mammary gland by a pure anti-estrogen ICI 182780. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 68(2):127–38.

163. Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; 80(4):879–86. Available from: URL: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/80/4/879.full.pdf>.
164. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74(4):597–608.
165. Liu Y, Lehar S, Corvi C, Payne G, O'Connor R. Expression of the insulin-like growth factor I receptor C terminus as a myristylated protein leads to induction of apoptosis in tumor cells. *Cancer Res* 1998; 58(3):570–6.
166. Chan TW, Pollak M, Huynh H. Inhibition of insulin-like growth factor signaling pathways in mammary gland by pure antiestrogen ICI 182,780. *Clin Cancer Res* 2001; 7(8):2545–54.
167. Ellis AJ, Hendrick VM, Williams R, Komm BS. Selective estrogen receptor modulators in clinical practice: a safety overview. *Expert Opin Drug Saf* 2015; 14(6):921–34.
168. Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 418 Pt 3:220–34.
169. Borgna JL, Rochefort H. Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. *J. Biol. Chem.* 1981; 256(2):859–68. Available from: URL: <http://www.jbc.org/content/256/2/859.full.pdf>.
170. Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(2).
171. Leek RD, Kaklamanis L, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69(1):135–9.
172. Zhang GJ, Kimijima I, Onda M, Kanno M, Sato H, Watanabe T et al. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not

bax and bcl-X(L), without alteration of p53 protein levels. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10):2971–7.

173. Jordan VC. Tamoxifen as the first targeted long-term adjuvant therapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21(3):R235-46.

174. Notas G, Pelekanou V, Kampa M, Alexakis K, Sfakianakis S, Laliotis A et al. Tamoxifen induces a pluripotency signature in breast cancer cells and human tumors. *Mol Oncol* 2015; 9(9):1744–59.

175. Rondon-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, Sanchez MC, Zaphiropoulos PG. Tamoxifen Resistance: Emerging Molecular Targets. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8).

176. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(12):926–35.

177. Parisot JP, Hu XF, DeLuise M, Zalcborg JR. Altered expression of the IGF-1 receptor in a tamoxifen-resistant human breast cancer cell line. *Br J Cancer* 1999; 79(5-6):693–700.

178. Johnson MD, Zuo H, Lee K-H, Trebley JP, Rae JM, Weatherman RV et al. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 85(2):151–9.

179. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P et al. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23):1758–64.

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 15.10.2019

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen für die große Unterstützung und die stetige Begleitung während der Durchführung und Ausarbeitung dieser Arbeit sehr herzlich danken.

Ich bedanke mich bei Lehrstuhlinhaber Herrn Prof. Dr. med. Olaf Ortmann für die Überlassung des interessanten Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien.

Mein ganz besonderer, herzlicher Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Treeck, der mich sowohl bei der Planung und der Durchführung der Zellexperimente, als auch später bei der Auswertung und der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertationsarbeit stets begleitet und sehr unterstützt hat. Seine fortwährende Motivation und Begeisterung für die Wissenschaft, sein fachkundiger Rat, die ermutigenden Worte während meiner Arbeit im Labor und die stetige zuverlässige Betreuung in allen Phasen meiner Arbeit haben den erfolgreichen Abschluss meiner Dissertationsarbeit ermöglicht.

Außerordentlich herzlich möchte ich mich zudem bei Frau Bettina Federhofer für die professionelle Einarbeitung in die labortechnischen Methoden und die stetige fachkundige und zugleich sehr menschliche Unterstützung während meiner Zeit im Labor danken. Ihre andauernde Hilfsbereitschaft, Motivation und die stetige Bemühung um neue Ideen und Lösungsansätze haben sehr wesentlich zum Gelingen meiner Experimente beigetragen.

Vielen Dank an alle Mitglieder des Laborteams für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die angenehme gemeinsame Zeit im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich zuletzt bei meinen Freunden, meiner Schwester, und vor allem meinen Eltern bedanken, die mich während meiner Zeit der Dissertation sehr liebevoll unterstützt, ermutigt und begleitet haben.