

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktion: Prof. Dr. med. Sven Mahner



*Die Bedeutung des Trace Amine- Associated Rezeptors TAAR1 und des Enzyms
L-Dopa Decarboxylase für die Biologie des Mammakarzinoms*

Kumulative Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Eileen Chiara Tremmel

aus

Mannheim

Jahr

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: *Prof. Dr. Udo Jeschke*
Mitberichterstatter: *PD Dr. med. Stefanie Corradini*
apl. Prof. Dr. med. Eva- Maria Grischke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: *PD Dr. med. Aurelia Vattai*
Dekan: *Prof. Dr. med. Thomas Gudermann*

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2022

Affidavit

Tremmel, Eileen Chiara

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

*Die Bedeutung des Trace Amine- Associated Rezeptors TAAR1 und des Enzyms
L-Dopa Decarboxylase für die Biologie des Mammakarzinoms*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.11.2022

Ort, Datum

Eileen Chiara Tremmel

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 4 a der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität München als kumulative Dissertation gestaltet

Inhaltsverzeichnis

AFFIDAVIT	3
INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	8
PUBLIKATIONSLISTE	9
PERSÖNLICHER BEITRAG ZU DEN PUBLIKATIONEN	10
BEITRAG ZU PUBLIKATION I	10
BEITRAG ZU PUBLIKATION II	10
EINLEITUNG	11
DAS MAMMAKARZINOM	11
<i>Epidemiologie</i>	11
<i>Histologie und Subgruppen</i>	11
<i>Risikofaktoren</i>	13
<i>Klinik, Diagnostik und Prävention</i>	14
<i>Therapie</i>	15
DIE SCHILDDRÜSE	17
<i>Physiologie der Schilddrüse</i>	17
<i>Dysfunktionen der Schilddrüse und die ältere Frau</i>	19
<i>Dysfunktionen der Schilddrüse und das Mammakarzinom</i>	19
DER TRACE AMINE- ASSOCIATED REZEPTOR	21
<i>Familie der Trace Amine- Associated Rezeptoren</i>	21
<i>Trace Amine- Associated Rezeptor 1</i>	21
<i>Liganden des Trace Amine- Associated Rezeptor 1</i>	22
<i>Trace Amine- Associated Rezeptor 1 und die Neoplasie</i>	24
DIE L-DOPA DECARBOXYLASE	25
<i>Das Enzym</i>	25
<i>L- Dopa Decarboxylase und die Neoplasie</i>	26
<i>L-Dopa Decarboxylase und das Mammakarzinom</i>	27
ZIELSETZUNG DER ARBEIT UND AUSBLICK	29
ZUSAMMENFASSUNG	30
SUMMARY	32
PUBLIKATIONEN	35
PUBLIKATION I.....	35
.....	35
PUBLIKATION II.....	47
.....	47
LITERATURVERZEICHNIS	62
DANKSAGUNG	76

Abkürzungsverzeichnis

(f) T ₃	(freies) Triiodothyronin
(f) T ₄	(freies) Tetraiodothyronin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT3	5- Hydroxytryptamin; Serotoninvorläufer
AADC	L-Aminosäuren Decarboxylase
ADRB2	Codierendes Gen des β_2 -Adrenozeptor
AGO	Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie
AI	Aromataseinhibitor
AR	Adrenorezeptor(en)
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated gen
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Av β 3	ein Integrin
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1
BMI	Body- Mass- Index
BRCA 1 / 2	Breast cancer Gen 1/2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDK	cyclin-dependent kinases
CHEK2	Checkpoint kinase 2
D2- like	Untergruppe der Dopamin Rezeptoren
DCIS	Ductales Carcinoma in situ
DDC	L-Dopa Decarboxylase
DIT	Diiodotyrosine
ER	Östrogen Rezeptor
G _i - Protein	inhibierendes G- Protein
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
G1- 3	Grading 1-3
H.a.	Hinweis auf
HepG2	Zellreihe; Hepatozelluläres Karzinom
HER 2	human epidermal growth factor receptor type 2
IRS	immunoreactive score
Ki67	Interphasenprotein, Marker für Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	MAP-Kinasen
MCF7	Zellreihe; human breast adenocarcinoma cell line 7
Mill./Mio.	Million
MIT	Monoiodotyrosine

ml	Milliliter (Einheit)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin; Serin/Threonin-Kinase
N-SBR- Score	Nottingham-Scarff/Bloom/Richardson-Score
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nM	Nanomolar (Einheit)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ODC	Ornithin Decarboxylase
PALB 2	Partner and localizer of BRCA2
PCR	polymerase chain reaction
PET- CT	Positronen-Emissions-Tomograph / Computertomographie
PKA	Phosphokinase A
PKC	Phosphokinase C
PLP	Pyridoxal 5- Phosphat
PR	Progesteron Rezeptor
RAD 51 C	Homologes DNA Doppelstrang Reparaturprotein
RNA	Ribonukleinsäure
SCLC	small cell lung cancer
SD	Schilddrüse
SD-H	Schilddrüsenhormon(e)
SERM	selektiven Östrogen Rezeptormodulatoren
SPP-1	Secreted Phosphoprotein 1
SPSS	statistische Softwareplattform.
T ₀ AM	Thyronamine
T ₁ AM	3-Iodthyronamin
T ₄ AM	Tetraiodthyronamine
TA	Trace Amin(e)
TAAR	Trace Amine- Associated Rezeptoren
THR α 2	thyroid hormone receptor alpha 2
TNM	Klassifikation für Tumor (T), Lymphknoten (N) und Metastasen (M).
TPO	Thyroidperoxidase
TR/THR	Thyroid hormone receptor
TRH	Thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organization (dt.: Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	Tetrazoliumsalz WST-1, ein Zellproliferationsreagenz
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Histologischer Schnitt- Mammakarzinom; 25x	12
2	Diagramm zum medikamentösen Therapie- Algorithmus	16
3	Hypothalamus- Hypophysen- Thyroid Achse	17
4	Wirkung der TAAR1 Expression im menschlichen Körper	21
5	Strukturformel eines Thyronamin, die chemischen Reste R1–R4 können mit einem H (Wasserstoff) oder I (Iod) besetzt werden z.B.: T ₁ AM : R1 =I, R2-4= H	22
6	Syntheseweg der Katecholamine mit Substraten (Circlebox) und Enzymen (Pfeile). In unserer Studie gezeigte Down- Regulation der L-Dopa Decarboxylase durch Epinephrin (roter Pfeil)	24
7	Histologischer Schnitt- Mammakarzinom (M0), gefärbt mit DDC AK; links IRS-6 (25x), rechts IRS-4 (10x)	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Überblick der Schilddrüsendiffunktionen und einige Wirkungen auf das Mammakarzinom	20

Publikationsliste

Die vorliegende Dissertation wurde als kumulative Arbeit erstellt. Grundlage dieser Arbeit sind die folgenden Publikationen:

Eileen Tremmel, Simone Hofmann, Christina Kuhn, Helene Heidegger, Sabine Heublein, Kerstin Hermelink, Rachel Wuerstlein, Nadia Harbeck, Doris Mayr, Sven Mahner, Nina Ditsch, Udo Jeschke, Aurelia Vattai

Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration

Breast Cancer- Targets and Therapy (Dove Med Press). 2019 Feb 19; 11:87-97.

doi: 10.2147/BCTT.S178721. eCollection 2019.

und

Eileen Tremmel, Christina Kuhn, Till Kaltofen, Theresa Vilsmaier, Doris Mayr, Sven Mahner, Nina Ditsch, Udo Jeschke, Aurelia Vattai

L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth *In Vitro* According to Their Different Expression of *G_i-Protein- Coupled Receptors*

International Journal of Molecular Science. 2020 Dec 15;21(24):9565.

doi: 10.3390/ijms21249565.

Persönlicher Beitrag zu den Publikationen

Beitrag zu Publikation I

Ich, Eileen Tremmel, war als Erstautorin dieser Publikation mitverantwortlich für das Design der Untersuchungen. Ich habe die Experimente durchgeführt. Diese beinhalteten die Kultivierung und Stimulation von zwei Zelllinien, die Gewinnung und Quantifizierung von TAAR1 RNA mittels eines Polymerase- Kettenreaktion Protokolls (englisch: polymerase chain reaction, PCR) und von TAAR1 Proteinen nach Western Blot Protokoll. Zusätzlich habe ich einen WST-1 Assay und einen Scratch Assay durchgeführt. Die Methode und das Protokoll des Scratch Assays wurde von mir in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Des Weiteren war ich mitverantwortlich für die Auswertung der Experimente und führte auch einen Großteil der Datenanalyse mittels SPSS durch. Weiterhin gestaltete ich die Grafiken für diese Publikation und verfasste einen Großteil des Manuskripts in Supervision.

Beitrag zu Publikation II

Als Erstautorin dieser Publikation war Ich, Eileen Tremmel, mitverantwortlich für das Design, die Konzeption und die Durchführung der Untersuchungen. Die von mir durchgeführten Experimente beinhalteten die immunhistochemische Färbung von 235 Mammakarzinom Schnitten des TA Panels des Labors der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Es wurde die L-Dopa Decarboxylase (DDC) angefärbt und mikroskopisch mittels Erhebung des IRS (immunoreactive score) quantifiziert. Ich analysierte die Ergebnisse in Zusammenhang mit den klinischen Daten des Kollektivs inklusive des Gesamtüberlebens. Statistisch wurden die Daten mit Hilfe des Programms SPSS von mir ausgewertet. Weitere Experimente beinhalteten die Kultivierung und Stimulation von Zelllinien, die Gewinnung und Quantifizierung von RNA der DDC nach PCR Protokoll und von Proteinen der DDC nach Western Blot Protokoll. Zusätzlich habe ich einen WST-1 Assay durchgeführt. Die Experimente wurden im Team ausgewertet. Die Datenanalyse mittels SPSS konnte ich selbstständig durchführen. Weiterhin habe ich die Grafiken und das Manuskript der Publikation erstellt.

Einleitung

Das Mammakarzinom

Epidemiologie

Die Diagnose Mammakarzinom ist eine große gesundheitliche und emotionale Belastung für die betroffenen Patientinnen ¹. Das Mammakarzinom als Erkrankung ist in vielen Gesundheitssystemen weltweit von Bedeutung, unabhängig des Entwicklungsgrades des Landes ². Weiterhin ist das Mammakarzinom der häufigste maligne Tumor der Frau ³. Statistisch gesehen, ist eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens von dieser Diagnose betroffen ⁴. Das Mammakarzinom hat 2021 mit 30% die höchste Inzidenz der Krebserkrankungen bei Frauen in den USA und ist weltweit das zweit häufigste Karzinom mit Todesfolge ⁵. Zunehmende Risikofaktoren, wie Adipositas, eine alternde Weltbevölkerung oder geringe Geburtenrate der Frau stellen Gründe für die steigende Inzidenz des Mammakarzinoms, sowie die dadurch bedingt steigende Mortalität dar ⁶. Laut der World Health Organization (WHO) wird die Inzidenz für Krebserkrankungen weltweit bis 2025 auf über 25 Mio. Fälle ansteigen, somit auch die Inzidenz des Mammakarzinoms ⁶. Dieser Anstieg zeigt sich bereits in der Epidemiologie des Mammakarzinoms: 2012 erhielten rund 1,7 Mio. Patientinnen die Diagnose Brustkrebs und circa 500 000 Patientinnen verstarben weltweit daran ^{6,7}. Bereits 2018 waren es über 2 Mio. Neudiagnosen und 600 000 Todesfälle ⁸. Die Prävalenz des Brustkrebses erklärt die Relevanz dieses Themas und seine Präsenz in der aktuellen Forschung ⁴.

Histologie und Subgruppen

Die Mamma besteht aus Drüsengewebe, welches sich aus Epithelzellen, Adipozyten, Fibroblasten, Gefäßendothelzellen sowie Immunzellen zusammensetzt ⁹. Die Gewebeentwicklung und -Regulation ist abhängig von Hormonzyklen und Alterungsprozessen ⁹. Vorwiegend das weibliche Brustgewebe besitzt die Fähigkeit zyklusabhängig zu proliferieren sowie sich zurückzubilden ⁹. Diese periodischen Umbauprozesse werden als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Karzinoms des Brustgewebes erachtet. Die Prognose der Betroffenen ist stark von der Biologie des Tumors und den einhergehenden Klassifikationskriterien des Mammakarzinoms abhängig. Heutzutage kann unter Berücksichtigung der Biologie ein früh erkanntes Mammakarzinom Großteils kurativ therapiert werden ¹⁰. So kann ein lokal begrenztes Mammakarzinom in fast 90% der Fälle geheilt werden ¹¹.

Perou, Sørlie und Kollegen etablierten zu Beginn des 21. Jahrhunderts neue Subgruppen des Mammakarzinoms zur Klassifikation auf Basis von histopathologischen, genomischen und transkriptionellen Erkenntnissen^{12,13}. Harbeck et al. unterteilten diese weiter und wiesen vier Gruppen aus, auf welchen wiederum verschiedene Therapiestrategien fußen³:

- **Luminal A**, mit Merkmalen eines Niedrigrisiko Karzinoms: Östrogen Rezeptor (ER) und/oder Progesteron Rezeptor (PR) positiv, HER2 negativ, geringe Proliferationsrate (Ki67)³
- **Luminal B**, mit Merkmalen eines Hochrisiko Karzinoms: ER und/oder PR positiv, HER2 negativ und hohe Proliferationsrate (Ki67)³
- **HER2 positive Karzinomidentität**: ER und PR negativ, HER2 positiv³
- **triple negative type**: ER und PR und HER2 negativ³

Die einzelnen Gruppen werden wie oben beschrieben durch verschiedene Merkmale auf der Genexpressionsebene charakterisiert^{12,13}. Zur Einteilung in die Subgruppen nach Curtis et al. gehören als Folge der verschiedenen genomischen Architektur der Tumore der Hormonrezeptorstatus für Östrogen- und Progesteron Rezeptoren (ER und PR), das Merkmal des HER 2 (human epidermal growth factor receptor type 2) sowie die Proliferationsrate¹⁰. Die Proliferationsrate der Zellen korreliert mit der Expression des Proteins und nuklearen Antigens Ki67 im Gewebe des Mammakarzinoms¹⁰. ER, PR und HER2 stellen prädiktive Faktoren dar¹⁴. HER2 Positivität und ER/PR Negativität gehen mit einer aggressiveren Tumorbiologie einher, bieten aufgrund ihrer Eigenschaften allerdings gute Therapieansätze¹⁵. Ki67 wird zur Differenzierung zwischen Luminal A und B herangezogen^{16,17}. Die Proliferation wird zusätzlich durch diverse Wachstumsfaktoren und Hormone wie zum Beispiel Sexual- und Schilddrüsenhormone beeinflusst¹⁸.

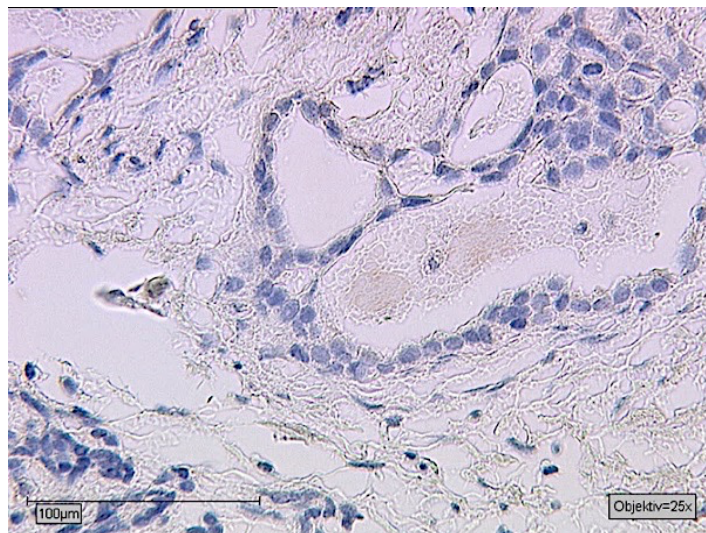


Abbildung 1: Histologischer Schnitt- Mammakarzinom (M0); 25x

Risikofaktoren

Verschiedene Faktoren begünstigen die Entstehung des Mammakarzinoms, unter anderem die Genetik. Hier sind besonders die Genmutationen BRCA 1 und BRCA 2 (BRCA steht für „breast cancer“) zu nennen, welche für ein Drittel der hereditären Brustkrebserkrankungen weltweit verantwortlich sind¹⁹. Diese Genmutationen erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken um circa 40-80%²⁰. BRCA 1 und 2 sind mit unterschiedlichen Tumorcharakteristika vergesellschaftet. Eine BRCA 1 Mutation wird häufiger bei Mammakarzinom Patientinnen im jungen Alter, bei Tumoren mit bereits ungünstiger Größe bei Erstdiagnose, bei einer erhöhten Intervalltumorraten und weniger häufig in Präkanzerosen wie DCIS gefunden. BRCA 2 Mutationen sind im Tumorcharakter dem sporadischen Mammakarzinom ähnlich^{21,22}. Nach den AGO Breast Commission Recommendations sollte eine genetische Testung auf BRCA 1 und 2 allen Patientinnen angeboten werden, welche familiäre Risikofaktoren haben, an einem triple negativen Mammakarzinom leiden oder solchen, mit einem Erkrankungsalter vor dem 35. Lebensjahr²³. Aspekte der Epigenetik (genomische DNA, Histonmodifikationen und Mikro-RNA-Veränderungen) werden bereits in der Diagnostik des Mammakarzinoms genutzt²⁴. Weiterhin gehen pathologische Varianten der Gene ATM, BARD1, CHEK2, PALB2 und RAD51C mit einem moderat bis stark erhöhtem Brustkrebsrisiko einher²⁵. Weniger als 10% der Mammakarzinome sind allerdings ausschließlich genetisch bedingt. Ein weitaus höherer Anteil der Erkrankungen geht mit Risikofaktoren wie einem fortgeschrittenen Lebensalter, dem Lebensstil, Umwelteinflüssen und auch mit der Schwangerschaftsrate einer Frau einher²⁶. So sind eine frühe Menarche, eine späte Menopause sowie eine geringe Geburtenanzahl der Frau Risikofaktoren, aufgrund der höheren Anzahl an durchlaufenen Hormonzyklen, welche Einfluss auf das Gewebe nehmen. Weitere Faktoren sind geringe körperliche Bewegung, Adipositas im Sinne eines erhöhten Body-Mass-Index (BMI) inklusive einer Ernährung mit vielen gesättigten Fettsäuren, eine Hyperinsulinämie und Alkoholkonsum, welche das Risiko an Brustkrebs zu erkranken ebenfalls deutlich erhöhen²⁶⁻²⁹. Im Gail-Modell wurde versucht das Risiko einer Frau individuell mittels nicht genetischen Risikofaktoren wie Alter, Abstammung, familiäre Erkrankungen, stattgehabter Biopsien und Alter bei der Menarche sowie ihrer Geburtenanzahl zu stratifizieren³⁰. Zusätzlich spielt die Beschaffenheit der Brustdrüse eine Rolle, dichtes Brustgewebe stellt bei postmenopausalen Frauen ebenfalls ein Risikofaktor für malignitätsverdächtige Läsionen dar³¹. Trotz noch fehlender Kausalität wurde in verschiedenen Studien ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei einer Vitamin D Defizienz gezeigt³². Ebenso werden die hormonelle Kontrazeption und die Hormonersatztherapie bezüglich ihres Risikoprofils für das Mammakarzinom untersucht³³. Die Million Women Studie zeigte eine erhöhte Inzidenz für das Mammakarzinom in Patientinnen unter Östradiol Monotherapie und auch Hormonersatzkombinationstherapien³⁴.

Folgende Frauen haben gesichert ein erhöhtes Risiko am Mammakarzinom zu erkranken²⁰:

- Frauen mit einer familiären Belastung.
- Frauen, welche bereits selbst erkrankt waren oder eine Risikoläsion aufwiesen.
- Frauen im Lebensalter über dem 50. Lebensjahr.

Klinik, Diagnostik und Prävention

Die Klinik des Mammakarzinoms reicht von Symptomlosigkeit über einen tastbaren Knoten bis hin zu Schmerzen im Bereich des Tumors und typischen klinische Hautveränderungen, wie z.B. Einziehungen oder der sogenannten Peaux d'orange³⁵. In Studien wurde gezeigt, dass es sinnvoll ist bereits symptomlose Frauen ab dem 50. Lebensjahr zu screenen, um einen möglichen Tumor in einem frühen Stadium zu detektieren und somit das relative Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken insgesamt zu senken³⁶. Dieses Screening entspricht einer sekundären Prävention. In Deutschland ist dieses Mammographie Screening für Frauen ab dem 50. bis zum 69. Lebensjahr Teil der S3- Leitlinie für die Früherkennung des Mammakarzinoms³⁷. Mit diesem Screening konnte die Mortalität des Mammakarzinoms insgesamt um bis zu 19% gesenkt werden. Die Rate an falsch positiven Ergebnissen liegt über 20 Jahre betrachtet bei 20%. Das bedeutet, dass 20% Frauen mit benignem Befund weiteren Untersuchungen und damit einhergehender psychischer Belastung ausgesetzt werden^{38,39}. Von diesen 20% erhielten circa 6% invasive Diagnostik⁴⁰. Abgesehen von der Mammographie, werden auch die Mammasonographie, die Magnetresonanztomographie sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Computertomographie zur bildgebenden Diagnostik herangezogen. Die Entscheidung welche Diagnostik bevorzugt wird, ist abhängig von Faktoren wie Brustgewebedichte, Alter der Patientin, Befunde der klinischen Untersuchung und Lokalisation der Raumforderung³⁵. Zusätzlich sollten regelmäßige Tastuntersuchung der Brust, auch eigenständig durch die Patientin, durchgeführt werden. Sport ist ein nachgewiesener Präventionsfaktor, welcher das relative Risiko senkt⁴¹. Weitere präventive Maßnahmen sind bei entsprechendem Risikoprofil die prophylaktische Mastektomie, Ovarektomie oder eine medikamentöse Prävention. Zu dieser zählt sekundär u.a. die Einnahme von Tamoxifen, welches v.a. das Rezidiv Risiko bei entsprechendem Profil um bis zu knapp 50% senken kann⁴². Weitere Medikamente die hier eine Rollen in Forschung und Praxis spielen, sind Selektive Östrogenrezeptor- Modulatoren (SERM), Aromataseinhibitoren (AI), Bisphosphonate und Retinoide²⁰.

Therapie

Die Wahl der Therapieempfehlung ist abhängig von u.a. folgenden Faktoren ⁴⁰:

- Stadium: lokal begrenzt, fortgeschrittene Erkrankung, vorhandene Fernmetastasierung
- Vorhandenen Läsionen wie z.B. DCIS
- Verhältnis von Brustvolumen zu Tumolvolumen
- Intraduktale Komponenten
- Möglichkeit einer R0- Resektion
- Genetik: BRCA1-, BRCA2- und vermutlich auch des PALB2- und RAD51C-Genmutationen
- Alter
- Histologische Klassifikation und Subtyp (Coates et al.¹⁷)
 - Hormonrezeptorstatus (ER-/PR-Status)
 - HER2-Status
 - cT- und cN-Status
- Histopathologisches Grading nach Elston und Ellis (G1–G3: gut, mäßig, schlecht differenziert)

Die Therapie eines Mammakarzinoms wird in Zentren in einer interdisziplinären Tumorkonferenz beschlossen. Hier wird das Therapieprocedere empfohlen: neoadjuvante und/oder adjuvante medikamentöse Systemtherapie, operative Versorgung und/oder Radiatio je nach obigen genannten Kriterien (s. Abbildung 2).

Zur Bestimmung des histopathologischen Gradings wird der N-SBR- Score herangezogen, welcher die Tubuli, Pleomorphie der Zellkerne und Mitosen berücksichtigt ⁴³. Zur Therapieentscheidung ist ein Staging, sowie eine histologische Sicherung nötig ¹⁰. Vereinfacht beinhaltet die Therapie bei lokal begrenztem Befund zu Beginn meist eine lokale chirurgische Therapie inklusive Entnahme des Sentinellymphknotens, des sogenannte Wächterlymphknotens, welcher präoperativ nuklear mit Technetium- 99 markiert wird. Es schließt sich meist eine systemische und/oder lokale Ergänzungstherapie an. Hier stehen medikamentöse Optionen oder eine Radiatio zur Verfügung ²⁰. Bei positivem ER/PR Status ist eine langfristige endokrine Erhaltungstherapie indiziert ¹⁰. Die Therapie kann zusätzlich, je nach Tumorbiologie, auch eine Antikörper basierte Therapie beinhalten und durch Knochenstruktur stabilisierende Medikamente ergänzt werden ¹⁰. Das Ziel der primären Therapie ist die Tumorfreiheit unter Berücksichtigung der Risikofaktoren Komorbiditäten und Metastasierung ¹⁰. Eine endokrine Therapie ist bei hoher Expression von PR/ER mit Präparaten wie den selektiven Östrogen Rezeptormodulatoren (SERM, z.B. Tamoxifen) oder Aromataseinhibitoren (AI) möglich. Hier spielt die endogene Östrogenproduktion im Sinne des Menopausenstatus eine Rolle ¹⁰. Bei einer hohen

HER2 Expression können unter anderem die Antikörper Trastuzumab oder Pertuzumab in der Adjuvanz verwendet werden. Wenn der Tumor triple negativ, HER2 positiv, nodal positiv, mit einem ungünstigen Tumormasse/Brustverhältnis oder ein Luminal B Tumor mit aggressiver Tumorbilologie ist, ist eine neoadjuvante Chemotherapie möglich. Bei einer Chemotherapie werden Anthracycline und Taxane bevorzugt ¹⁰. Eine neoadjuvante Therapie ist bei gesichertem Karzinom mit bekannter Tumorbilologie und Ausschluss einer Fernmetastasierung möglich ²⁰. Die medikamentösen Therapieoptionen sind in Abbildung 2 dargestellt ¹⁰.

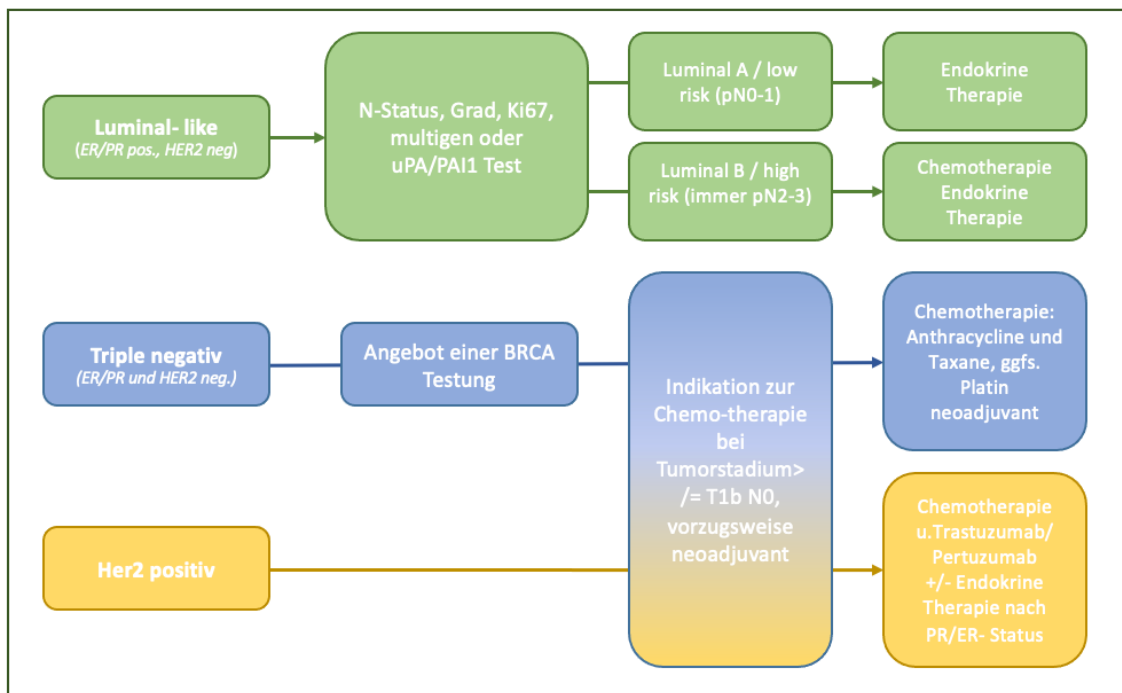


Abbildung 2: Diagramm zum medikamentösen Therapie- Algorithmus

Modifiziert nach "Breast Cancer" (Nadia Harbeck, Michael Gnant, The Lancet, 2017)

Eine weitere Option vor allem in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms mit Ziel eines progressionsfreien Überlebens stellt der Einsatz von mTor-Inhibitoren (z.B. Everolimus) und CDK 4/6 Inhibitoren (z.B. Palbociclib) dar ¹⁰. Zusätzlich gibt es aktuell bereits epigenetische Therapieansätze, welche die Methylierung oder Histonmodifikation berücksichtigen. Man hofft, in Zukunft weitere Therapiemöglichkeiten auf Basis der Epigenetik zu erhalten ²⁴.

Die Schilddrüse

Es besteht eine Korrelation zwischen der Erkrankung Mammakarzinom und Schilddrüsendysfunktionen in den erkrankten Patientinnen ⁴⁴. Diese impliziert, dass eine Gruppe von Patientinnen, welche unter einer Schilddrüsendysfunktion leiden, eine höhere Inzidenz hat an Brustkrebs zu erkranken als Frauen ohne Schilddrüsendysfunktion ⁴⁵⁻⁴⁷.

Physiologie der Schilddrüse

Die Schilddrüse produziert Schilddrüsenhormone (SD-H) ^{48,49}. Diese SD-H beeinflussen und steuern eine Vielzahl von Zellprozessen ⁵⁰. SD-H sind das Tetraiodothyronin ((f) T₄) und das Triiodothyronin ((f) T₃). Die SD-H sowie das Thyrotropin releasing hormone (TRH) aus dem Hypothalamus und das Thyroidea stimulierende Hormon (TSH) aus dem vorderen Hypophysen Lappen sind Teil der Hypothalamus-Hypophysen-Thyroid Achse ⁴⁹. Über eine negative Feedbackschleife werden Hypothalamus und Hypophyse bei ausreichender Menge an SD-H retrograd gehemmt (s. Abbildung 3).

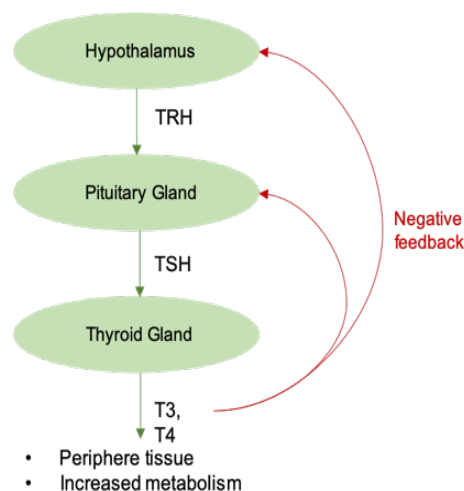


Abbildung 3: Hypothalamus- Hypophysen- Thyroid Achse

Auf diese Weise werden metabolische und proliferative Prozesse der Schilddrüse gesteuert ⁴⁹. Für die Synthese bindet TSH an einen G-protein gekoppelten Rezeptor der Schilddrüsenzellen und startete eine Kaskade, welche über folgende Schritte zur Synthese der SD-H führt:

1. Synthese von Thyroglobulin in speziellen Follikeln
2. Jodid Aufnahme über einen Natrium-Iodid-Sympporter
3. Iodination des Thyroglobulins mittels des Enzyms Thyroidperoxidase (TPO)
4. Oxidation durch die TPO

5. Organifikation mittels TPO, welche Monoiodotyrosine (MIT) und Diiodotyrosine (DIT) produziert
6. Paarungsreaktion aus einem MIT Molekül und einem DIT Molekül zu T₃ oder zwei DIT Molekülen zu T₄ ⁴⁹.

Über nukleare Rezeptoren (TR α , TR β) oder auch über nicht-genome Membranintegrine ($\alpha\beta$ 3) können SD-H den Metabolismus peripher gelegener Zellen beeinflussen ^{49,51,52}. Zu diesen Zellen gelangen die SD-H über das Blut, wo sie vorwiegend an Proteine gebunden vorliegen. Liegen SD-H ungebunden vor werden sie als fT3 (freies T3) oder fT4 (freies T4) bezeichnet ⁴⁹. SD-H regulieren nicht nur den physiologischen Zellzyklus sondern können auch in pathologischer Weise Tumorzellen beeinflussen ⁵³. Zu den physiologischen Effekten der SD-H gehören: Die Steigerung der basalen Zellaktivität, die Induktion von Lipolyse oder Lipid Synthese je nach Stoffwechsellage, der Anabolismus von Proteinen, der permissive Effekt von Katecholaminen, die Stimulation von Wachstum bei Kindern, der Einfluss auf die neuronale Entwicklung sowie Einflussnahme auf die Fertilität, insbesondere die Ovulation und Menstruation bei Frauen ⁴⁹. T₃ ist die aktive Form der SD-H. Es hat eine Halbwertszeit von ca. 30 Stunden. T₄ mit seiner längeren Halbwertszeit von mehreren Tagen wird erst bei Bedarf peripher zu T₃ dejodiert ⁴⁹. Es gibt zwei typische Arten der Schilddrüsendysfunktion. Der Hyperthyreodismus ist als Erhöhung der SD-H und verringertes TSH im Blutserum definiert. Der Hypothyreodismus weist erniedrigte SD-H Werte und erhöhtes TSH auf. Die Dysfunktionen gehen jeweils mit typischer Klinik einher ⁵⁰. Der Hypothyreodismus wird durch Lethargie, Gewichtszunahme, einem erhöhten Kälteempfinden, trockener Haut, einer Neigung zu Depressionen, einer Hyperlipidemie oder Bradykardie symptomatisch ⁵⁴. Ein Hyperthyreodismus zeigt sich dagegen klinisch mit einer erhöhten Nervosität, Neigung zur Transpiration, Palpitationen und Tachykardien, Fatigue, Dyspnoe, Ödemen sowie der Neigung zu einer emotionalen Instabilität ⁵⁵. SD-H werden zu aktiven Substanzen verstoffwechselt, ein wichtiges Enzym in diesem Vorgang der Reduktion der SD-H ist die Ornithine Decarboxylase (ODC) ⁵⁶.

Die ODC katalysiert die Deiodisation und Decarboxylierung der SD-H. So entstehen Thyronamine (TA) oder endogene Amine (3- T₁AM, T₀AM) ^{57, 56}. Ein wichtiges Charakteristikum der TA ist, dass sie eine kürzere Halbwertszeit und damit eine schnellere Wirkweise als SD-H haben ⁵⁸.

Dysfunktionen der Schilddrüse und die ältere Frau

Insgesamt sind Frauen fünf- bis zwanzigmal häufiger von Dysfunktionen der Schilddrüse betroffen als Männer⁴⁸. Wie Veröffentlichungen zu dieser Thematik zeigen, scheinen vor allem ältere Frauen nach der Menopause für eine Dysfunktion der Schilddrüse prädisponiert zu sein^{48,59-61}. Die Wickham Survey zeigte in ihren Daten, dass vor allem der TSH Spiegel in weiblichen Probanden über 45 Jahren deutlich anstieg, während bei männlichen Probanden keine derartige Entwicklung gezeigt werden konnte⁶². Allerdings wird die Diagnosestellung eines Hypothyreodismus in Frauen erschwert, da die typischen Symptome unspezifisch sind und denen der (Peri-)Menopause ähnlich⁴⁸. Der Grund für den Anstieg des TSH kann in generellen Alterungsprozessen und einer Degeneration der Schilddrüse gesehen werden. Diese These wird durch die Volumenabnahme des Schilddrüsengewebes im Alter und die damit einhergehende Funktionsminderung unterstützt^{48,63}. Studien zeigen, dass neben dem Risiko für die Entstehung eines Hypothyreodismus auch das Risiko für ein Schilddrüsenkarzinom in der postmenopausalen Frau erhöht ist^{48,64}. Frauen über 45 Jahre scheinen ein erhöhtes TSH Level und SD-Antikörper Level zu haben, beides kann mit Dysfunktionen einhergehen⁶¹.

Dysfunktionen der Schilddrüse und das Mammakarzinom

SD-H beeinflussen, wie bereits erwähnt, auch den Metabolismus von malignen Zellen⁵⁰. In der Rotterdam Studie konnte gezeigt werden, dass hohe T₄ Spiegel mit einem erhöhten Auftreten von verschiedenen soliden Tumoridentitäten vergesellschaftet sind wie z.B. dem Lungenkarzinom und dem Mammakarzinom⁶⁵. Ein wichtiger Faktor scheint die Angiogenese zu sein, welche in Tumorzellen durch SD-H zusätzlich stimuliert wird⁵⁹. Tosovic et al. zeigte, dass SD-H Einfluss auf die Differenzierung und auch die Proliferation von Brustkrebszellen haben³⁹. Weiter wurde gezeigt, dass ein vermehrtes T₃ Aufkommen im Blutserum positiv mit der Inzidenz von Brustkrebserkrankungen insbesondere bei postmenopausalen Frauen korreliert ist^{59,66}. Es werden auch die noduläre Hyperplasie⁶⁷, der Hyperthyreodismus⁶⁸, der Hypothyreodismus, die Autoimmunthyroiditiden⁴⁵ und auch Schilddrüsenkarzinome mit dem Mammakarzinom assoziiert⁶⁹. Es liegen dennoch in der aktuellen Literatur widersprüchliche Aussagen zur Assoziation von Mammakarzinom mit Schilddrüsenfunktionen vor^{45,46,70}. TSH und T₄ Level scheinen prädiktive Faktoren für den therapeutischen Erfolg und sogar die Prognose von Patientinnen im Rezidiv zu sein⁷¹. Ein erhöhter T₄ Wert wird mit einem höheren Risiko für das Entstehen eines Mammakarzinoms in Verbindung gebracht, während ein erhöhtes Level des TPO Antikörpers das relative Risiko senkt. T₃ sowie TSH zeigen keine Assoziation mit dem Risiko für ein Mammakarzinom⁵⁹. Ditsch et al. haben gezeigt, dass diverse Blutwerte, wie Schilddrüsenhormone, TSH und auch TPO Antikörper signifikant erhöht sind in

Brustkrebspatientinnen zum Zeitpunkt der primären Diagnose ⁷². Bereits 2013 zeigte die Arbeitsgruppe, dass eine Isoform des SD-H Rezeptors (THR α 2) signifikant mit Prognosefaktoren der Histopathologie in Zusammenhang steht. Hierzu zählen z.B. Tumorgröße, Befall der axillären Lymphknoten, Tumorgrad und Hormonrezeptorstatus ⁴⁴. Eine hohe Expression von THR α 2 war mit einem besseren Langzeitüberleben vergesellschaftet ⁴⁴. Heublein et al. stellten 2015 die These auf, dass die SD-H Rezeptoren, THR α und THR β , neue Targets in der Therapie des triple negativen Mammakarzinoms sein können ⁷³. Allgemein konnten abnorme Schilddrüsencharakteristika in Patientinnen mit Mammakarzinom häufiger detektiert werden, als in den Kontrollgruppen ⁴⁵. Nicht zu unterschätzen ist auch die teils simultane Wirkung von SD-H und Östrogen und somit die Einflussnahme auf Risikofaktoren wie Übergewicht und Menopausenstatus ^{74,75}. Die Bedeutung der SD-H und ihrer Abbauprodukte für die Biologie des Mammakarzinoms ist somit nachweisbar. Um den genaueren Zusammenhang von SD-H und deren Degradationsprodukte auf Mammakarzinomzellen zu ergründen, sind noch weitere Untersuchungen von Nöten ⁷³.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick der Schilddrüsendysfunktionen und einige ihrer bisher in Studien gezeigten Wirkungen auf die Klinik und das klinische Outcome von Mammakarzinom Patientinnen:

Schilddrüsenstatus	Klinischer Outcome
Hyperthyreodismus	<ul style="list-style-type: none"> - erhöhtes Brustkrebsrisiko⁶⁵ - erhöhte Mortalität ⁷⁶ - erhöhte Level von T₃ und T₄ in Brustkrebspatienten ^{66,72} - erhöhtes T₃ Level: erhöhtes Risiko für Krebs, größere Tumore, Lymphknotenmetastasen, ⁶⁶ für Tod durch Krebsleiden⁷⁷ - kein Effekt auf das Krebsrisiko⁷⁸
Hypothyreodismus	<ul style="list-style-type: none"> - geringeres Krebsrisiko⁷⁹ - längeres progressionsfreies Überleben⁸⁰ - spätere Diagnose ⁷⁹ - eher multilokuläre Erkrankung ⁷⁹ - geringerer Lymphknotenbefall ⁷⁹ - geringere Mortalität ⁸¹ - vermindertes Risiko für triple negatives Mammakarzinom ⁸² - erhöhtes Tumorrisiko ⁴⁷ - kein Effekt auf das Karzinomrisiko ⁷⁸

Tabelle 1: Überblick der Schilddrüsendysfunktionen und einige Wirkungen auf das Mammakarzinom

Der Trace Amine- Associated Rezeptor

Familie der Trace Amine- Associated Rezeptoren

Unter den sogenannten Trace Aminen (TA) waren zu Beginn der Forschung im Jahr 1974 alle endogenen (Mono-) Amine zusammengefasst worden, deren Konzentration unter 100ng/g Gewebe physiologischer Weise lagen⁸³. Weitere Untersuchungen wurden vor allem ab 2001 durchgeführt als die Trace Amine- Associated Rezeptoren (TAAR) von Borowsky et al. auf der Suche nach neuen Serotoninrezeptoren entdeckt wurden⁸⁴⁻⁸⁶. Nach anfänglich verschiedenen Nomenklaturen wurde 2005 eine einheitliche Nomenklatur der TAAR nach Lindemann et al. eingeführt^{85,87}. TAAR sind in Wirbeltieren vorhandene Rhodopsine-like, type A, G-Protein gekoppelte Rezeptoren⁸⁴. Es gibt 26 verschiedene Subtypen welche sich wiederum zu neun verschiedenen Subfamilien zuordnen lassen⁸⁷. Die Rezeptoren kommen vor allem intrazellulär vor und steigern nach Aktivierung den intrazellulären cAMP Spiegel, aktivieren den β -Arrestin 2 Signalweg und sollen auch eine Wirkung auf die Kaliumkanäle der Zelle haben. Nach einer Heterodimerization wird TAAR auf der Plasmamembran exprimiert⁸⁸.

Trace Amine- Associated Rezeptor 1

Für die Publikation I von besonderem Interesse ist der Trace Amine- Associated Rezeptor 1 (TAAR1). TAAR1, ein Subtyp der TAAR, ist bisher besonders im Bereich der Neurologie und Psychiatrie untersucht worden zum Beispiel in Zusammenhang mit Schizophrenie und affektiven Störungen⁸⁹. Dieser Rezeptor findet sich allerdings auch in vielen weiteren Geweben und Zellen des menschlichen Körpers. Hierzu zählen: Mamma, Plazenta, Gehirn, Rückenmark, Magen, Niere, Lunge, β -Zellen Pankreas, Makrophagen, Leukozyten und dendritische Zellen aber auch maligne Gewebe^{84 90-93}. In bisherigen Forschungsergebnissen konnte bereits gezeigt werden, dass TAAR1 in der Lage ist das serotonerge und dopaminerge System auf neuronaler Ebene zu beeinflussen⁹⁰. Die Aktivierung von TAAR1 verhindert hier zum Beispiel eine dopaminerge Hyperaktivität^{94,95}. Es konnte weiter gezeigt werden, dass TAAR1 D2-like Dopamin Rezeptoren reguliert⁹⁵. Auch eine Regulation von NMDA Rezeptoruntereinheiten durch TAAR1 wurde beschrieben⁸⁸. TAAR1 trägt hier zu einem Anstieg des exzitatorischen postsynaptischen Potentials bei⁸⁸.

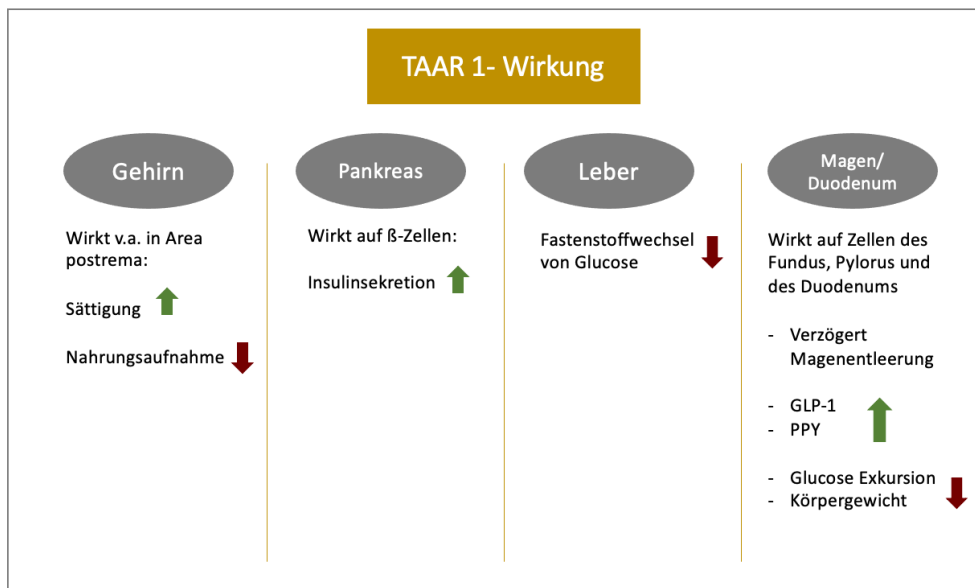


Abbildung 4: Wirkung der TAAR1 Expression im menschlichen Körper.

Weiteren Einfluss hat TAAR1 auf das gastrointestinale System. Hier reguliert er die Insulinsekretion aus den Pankreaszellen über den Signalweg einer cAMP Erhöhung⁹⁶ und zum anderen wurde der G-Protein gekoppelte Rezeptor ebenfalls im Magen nachgewiesen⁹⁷. Dort wurde eine Wirkung von TAAR1 auf die Deltazellen des Magens erkannt.

Er reguliert die Somatostatin Ausschüttung aus den Deltazellen⁹⁸. Die vielseitige physiologische Wirkung von TAAR1 ist in Ausschnitten in Abbildung 4 dargestellt⁸⁷.

Liganden des Trace Amine- Associated Rezeptor 1

Die Trace Amine binden als Liganden an TAAR. TAAR1 ist der einzige Rezeptortyp, welcher spezifisch über klassische TAs wie 2- Phenylethylamin, p-Tyramin und Tryptamine agonisiert wird⁸⁴. Zusätzlich wird TAAR1 durch endogene aminerge Verbindungen wie p-Octopamine oder 3-Iodothyronamin, ein SD-H Metabolit, und auch katecholaminerge Metaboliten agonisiert^{99,100}. Außerdem gibt es partielle Agonisten wie Serotonin und Dopamin^{85,99}. Betrachtet man TAAR1 im Feld der Psychiatrie und Neurologie kommt eine große Anzahl an psychoaktiven Verbindungen und Designdrogen wie beispielsweise „Ecstasy“ zur Liste der Liganden hinzu. Aus diesem Grund war TAAR1 bislang vor allem im pharmazeutischen Bereich für die Therapie des Substanzabusus von Interesse⁹⁹. Scanlan et al. haben die Synthese der TAs durch die aromatische Aminosäuredecarboxylase sowie ihre Funktion genauer untersucht. TAs als Metabolite der SD-H zeichnen sich durch eine kurzfristige und schnellere Wirkung als die SD-H aus. Vor allem T_0AM und T_1AM haben Einfluss auf TAAR1, welcher von ihnen agonisiert wird¹⁰⁰. Allerdings binden die TAs nicht nur an TAAR1. Es konnte eine Affinität für den

Dopamin Rezeptor (D1) und auch Adrenorezeptor (β_2) gezeigt werden ¹⁰⁰. Über diese Rezeptoren führen die TAs dosisabhängig zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP Niveaus ¹⁰⁰. *In vivo* konnten die schnellen und auch aber reversiblen Reaktionen des Organismus auf die Substitution von T_0 AM und T_1 AM beobachtet werden. Hierzu zählen: ein rascher Temperaturabfall, Ptosis, Bradykardie und Inaktivität ^{58,100}. Langzeitfolgen konnten in den *in vivo* Versuchen nicht nachgewiesen werden. Hier besteht eine Diskrepanz der Stimulation mit T_0 AM und T_1 AM zu der bisher bekannten Wirkung der SD-H, welche vorwiegend epigenetisch und damit langfristig wirken ^{58,100}. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen werden als Folge der Metabolisierung der SD-H gesehen ¹⁰⁰. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass T_0 AM und T_1 AM die Expression von TAAR1 erhöht ¹⁰¹.

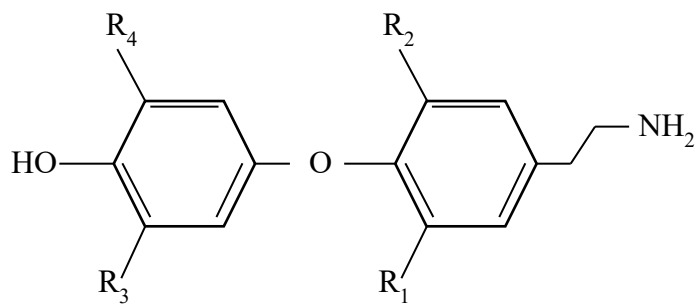


Abbildung 5: Strukturformel eines Thyronamin, die chemischen Reste R1–R4 können mit einem H (Wasserstoff) oder I (Iod) besetzt werden z.B.: T_1 AM : R1 =I, R2-4= H.

Trace Amine- Associated Rezeptor 1 und die Neoplasie

TAAR1 könnte einen Therapieansatz in der Tumorthherapie bieten⁷³. Bereits in vielen Tumorgeweben wurde die Expression von TAAR1 untersucht¹⁰². In der BioXpress Studie konnten vor allem in Tumoren des Ösophagus und der Prostata signifikante Ergebnisse aufgezeigt werden¹⁰³. Auf mRNA Ebene konnte eine erhöhte Expression von TAAR1 in Tumoren des Ösophagus, der Lunge und des Magens gezeigt werden, während TAAR1 in Tumoren des restlichen Kopf-Hals- Bereichs, der Niere, der Leber, des Pankreas, der Hypophyse, der Prostata, des Uterus und der Blase eher niedrig exprimiert wird¹⁰³. Eine besonders geringe TAAR1 Expression konnte in anderen Studien in Tumoren des Gehirns, Pankreas, Prostata, Nebennierenrinde, Sexualorganen und B-Zellen gefunden werden¹⁰⁴.

Eine TAAR1 Überexpression ist v.a. in Magenkarzinom, Ovarialkarzinom, Blasenkarzinom, Leukämie, Kolorektalem Karzinom sowie Knochentumoren mit einem längeren medianen Überleben der Patienten*innen assoziiert¹⁰⁴. Vogelsang et al. zeigten, dass die Expression von TAAR1 zusätzlich als positiv prognostischer Faktor für das epitheliale Ovarialkarzinom gewertet werden kann¹⁰⁵. Kontrovers dazu steht ein verlängertes Überleben bei Kopf-Halstumoren bei gering exprimiertem TAAR1¹⁰⁴.

TAAR 1 wirkt über verschiedene Signalwege in den Tumorzellen. Zum einen reguliert TAAR1 das tumorfördernde Gen Secreted Phosphoprotein 1 (SPP-1) herunter⁹². Diese Kaskade wurde besonders in T-Zellen des Immunsystems untersucht⁹². Gegenätzlich dazu steigert TAAR1 über die Phosphokinase C (PKC) die Expression von SPP-1¹⁰⁶. Über die Phosphokinase A (PKA) nimmt TAAR1 einen aktivierenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells). NF- κ B ist vornehmlich an Inflammationsreaktionen beteiligt. Ein erhöhtes Level von NF- κ B steigert sowohl das Krebsrisiko als auch die Malignität¹⁰⁷.

Ein Zusammenhang zwischen Amphetaminkonsum und erhöhtem Tumorrisiko, v.a. Non Hodgkin Lymphome, konnte nachgewiesen werden. Da Amphetamine Liganden des TAAR1 sind, kann der Rezeptor hier als Tumorpromotor verstanden werden¹⁰⁸. Der Ligand T_1 AM inhibiert signifikant das Tumorwachstum von Adenokarzinomzellen des Mammakarzinoms (MCF7) und hemmt ebenso die Proliferation des hepatozellulären Karzinoms (HepG2) *in vitro*¹⁰⁹.

Mit Blick auf die Publikation I ist besonders der Zusammenhang zwischen der Expression von TAAR1 im Mammakarzinom und dem Überleben der Patientinnen zu erwähnen. Die Expression von TAAR1 in Mammakarzinomzellen ist geringer als in gesunden Brustdrüsenzellen¹¹⁰. Vattai et al. konnten zeigen, dass eine Überexpression von TAAR1 in Mammakarzinomzellen mit einem signifikant längeren Überleben bei nicht metastasiertem Mammakarzinomen (M0) vergesellschaftet ist⁹³. Hier korreliert eine hohe TAAR1 Expression in der Immunhistochemie (IRS \geq 6) mit einem signifikant längeren Überleben in primären Mammakarzinom Patientinnen im 14 Jahres Follow- up⁹³. Damit stellt TAAR1 einen positiven prognostischen Marker für das Mammakarzinom dar⁹³. Wir konnten erstmalig zeigen,

dass die Stimulation mit T_1AM , mit einer signifikant reduzierten Zellvitalität von MCF7 Tumorzellen *in vitro* einhergeht ¹⁰⁹. In Konkordanz dazu zeigten Kovács et al., dass Rezeptoren der TAAR- Familie eine positive Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Patientinnen bei Mammakarzinom haben ¹¹¹. Aufgrund dieser Relevanz für die Tumorbilogie stellt TAAR1 ein Objekt weiterer Tumorforschung dar, insbesondere in Bezug auf mögliche Therapieoptionen.

Die L-Dopa Decarboxylase

Das Enzym

Die L-Dopa Decarboxylase (DDC) ist ein Pyridoxal 5- Phosphat (PLP)- abhängiges Enzym ¹¹². Dieses Enzym wurde bereits 1989 in neuronalem und im Anschluss auch in nicht- neuronalem Gewebe nachgewiesen ¹¹². Je nach Vorkommen wurden verschiedene Isoformen von der DDC mRNA in den Geweben gefunden, sowie weitere splicing Varianten ¹¹³. Die DDC ist ubiquitär in Geweben nachgewiesen worden, einige Beispiele hierfür sind Leber, Niere, Pankreas oder auch Plazenta ¹¹⁴⁻¹¹⁶. Sie katalysiert eine Decarboxylierungsreaktion ihrer Substrate. Zu den Substraten zählen unter anderem L-Dopa oder Setrone, wie 5-HT3. Auf diese Weise entstehen daraus die Neurotransmitter, Dopamin oder Serotonin (5-HT) ¹¹⁷⁻¹¹⁹. Die DDC rückte in den Fokus unserer Forschung für Publikation II aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus wie die ODC, welche für die TA Synthese verantwortlich ist (s. oben) ¹²⁰. Zudem binden ihre Substrate an TAAR1 und beeinflussen den Stresshaushalt des menschlichen Körpers. Häufig wird die DDC auch als AADC bezeichnet, was für aromatische L- Aminosäuren Decarboxylase steht und darauf verweist, dass auch Reaktionen mit anderen L- Aminosäuren katalysiert werden ¹²¹. Das Produkt Dopamin induziert die Synthese von Transmittern wie Adrenalin und Noradrenalin. Somit beeinflusst die DDC auch die Expression der Katecholamine, der „Stresshormone“ ^{122,123}. Der Syntheseweg ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

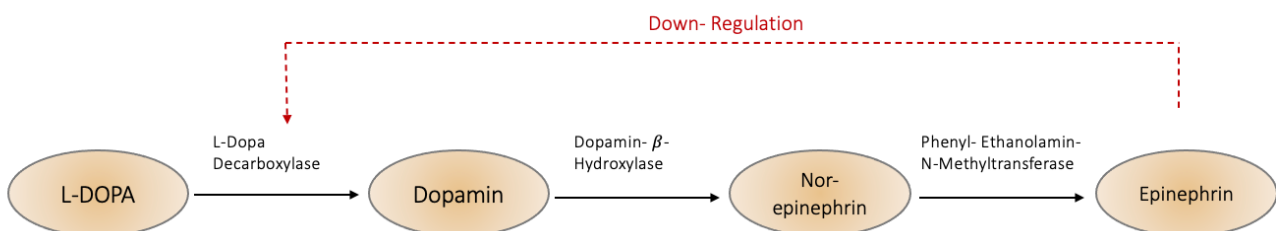


Abbildung 6: Syntheseweg der Katecholamine mit Substraten (Circlebox) und Enzymen (Pfeile). In unserer Studie gezielte Down- Regulation der L-Dopa Decarboxylase durch Epinephrin (roter Pfeil)

Die Aktivität der DDC wird unter anderem über Dopamin wie auch Dopaminrezeptorantagonisten und -rezeptoragonisten moduliert. Hier agieren D1 und D2 Rezeptoren synergistisch. Weitere Modulatoren der Expression der DDC sind die Adrenorezeptorantagonisten ¹²⁴⁻¹²⁶. Die beteiligten Signalwege verlaufen über die PKA und PKC. Diese produzieren cAMP. Damit ist die DDC vom intrazellulären cAMP Level abhängig und das cAMP Level wiederum für die Katecholaminsynthese relevant ¹²⁷.

Tritt ein angeborener Mangel der DDC im Körper auf, leiden die Patienten bereits innerhalb der ersten Lebensmonate abhängig vom Schweregrad des Mangels an folgenden Symptomen: Hypotonie der Muskeln, okulogyre Krisen, Ptosis, Dystonie, Hypokinese und weiteren Fehlfunktionen in der allgemeinen Entwicklung sowie des autonomen Nervensystems ¹²⁸. Dieses vorwiegend neurologische, aber auch autonome Krankheitsbild in Zusammenhang mit der DDC bestätigt das ubiquitäre Vorkommen der DDC im menschlichen Körper. Die DDC wurde, ähnlich zu TAAR1, bisher vornehmlich in Zusammenhang mit neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen gesetzt ¹²². Dabei wurde erstmals gezeigt, dass die DDC auf genetischer Ebene modifizierend wirkt und ihr eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie z.B. Morbus Parkinson, Demenz, Depressionen, Schizophrenie und affektiven Störungen zukommt ¹²⁸. Diese Erkenntnisse werden in diesem Fachbereich als Therapieansätze genutzt. So z.B. werden L-Dopa Decarboxylaseinhibitor zur Therapie von Morbus Parkinson eingesetzt ¹²⁹.

L- Dopa Decarboxylase und die Neoplasie

Die DDC wurde zunächst als neuroendokriner Tumormarker entdeckt ¹³⁰. Vor allem Lungenkarzinome, wie das SCLC (small cell lung cancer), das Neuroblastom und das Phäochromozytom weisen eine erhöhte DDC Expression auf ¹³¹. Hier wurde gezeigt, dass eine Therapie mit einem L-Dopa Decarboxylaseinhibitor zum Zelltod der Krebszellen mit erhöhter DDC Expression führt ¹³¹. Die DDC Aktivität wird als Biomarker der Wirkung einer mit L-Dopa Decarboxylaseinhibitor induzierten Zytotoxizität gesehen und beeinflusst diese positiv. Im Neuroblastom oder dem Rhabdomyosarkom zeigte sich eine eingeschränkte Proliferation der Tumorzellen nach Gabe eines L-Dopa Decarboxylaseinhibitors *in vitro* ¹³². Bei Gastrointestinalen Tumoren, dem Prostatakarzinom oder bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals- Bereich spielt die DDC in der Karzinogenese eine Rolle ^{118,133}. Weiter wird die DDC Expression als positiver prognostischer Faktor für das kolorektale Adenokarzinom gesehen ¹¹⁸. Die Deutung der Expression der DDC ist nicht in allen Tumoren unbedingt einheitlich. Eine erhöhte Expression der DDC wurde zunächst auch in Zusammenhang mit aggressivem Wachstumsverhalten in Brust- und Prostatakrebs gebracht und zu einem negativen prognostischen Biomarker erklärt ^{134,135}.

Die DDC wird in Tumorzellen koexprimiert zu α und β Adrenorezeptoren (AR) ¹¹⁹. Diese Rezeptoren wurden von Lüthy et al. im Jahr 2009 besonders in Mammakarzinomzellen beschrieben (siehe Abschnitt „DDC und das Mammakarzinom“) ¹³⁶.

Wafa et al. haben die Ko-Aktivität von DDC und AR in Prostatakarzinomzellen gezeigt und hier eventuell durch die AR- Suppression eine Möglichkeit zur Therapie und Progressionsabschwächung gefunden ¹³⁷.

L-Dopa Decarboxylase und das Mammakarzinom

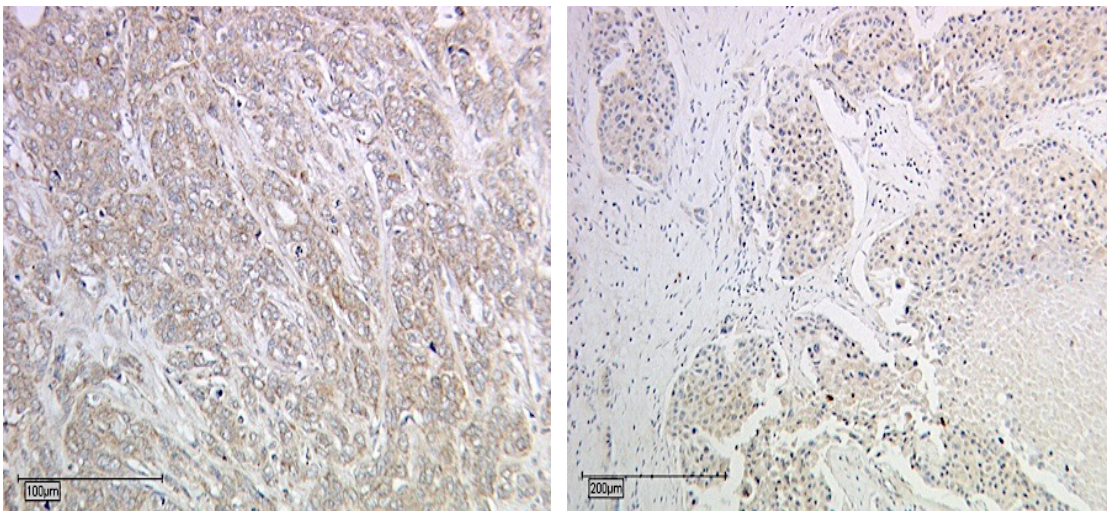


Abbildung 7: Darstellung der unterschiedlichen Expression der DDC in Mammakarzinom Zellen. Histologischer Schnitt-
Mammakarzinom (M0), gefärbt mit DDC AK; links IRS-6 (25x), rechts IRS-4 (10x)

Wie in den Neoplasien, welche im vorigen Kapitel beschrieben wurden, scheint die DDC für die Tumorbilogie des Mammakarzinoms eine Rolle zu spielen. Bisherige Untersuchungen zeigten eine Korrelation der Expressionshöhe der DDC mit einer Zunahme der Aggressivität des Mammakarzinoms und die allgemeine Beteiligung der DDC an der Tumorzelltoxizität ^{134,138}. Zusätzlich wurde eine erhöhte DDC mRNA- Expression der neuronalen Isoform in Mammakarzinomzellen gesehen ¹²⁶. Diese kann durch Chemotherapeutika reguliert werden. Hier zeigt sich die Komplexität der verschiedenen biochemischen Mechanismen und die damit einhergehende Bedeutung der DDC für das Überleben von Mammakarzinom Patientinnen unter Therapie ¹³⁸. Hierzu sind weitergehende Untersuchungen nötig. Wir konnten erstmalig die DDC als positiven Prognosefaktor des Mammakarzinoms identifizieren ¹³⁹. Für die Klärung des Zusammenhangs zwischen DDC und Mammakarzinom könnten die Katecholamine von Interesse sein, welche über die DDC reguliert werden und wiederum Einfluss auf diese nehmen ^{140,141}.

Katecholamine, sogenannte "Stresshormone", können Einfluss auf Krankheitsverläufe nehmen. Ouyang et al. zeigten eine gesteigerte Malignität der Mammakarzinomzellen, wenn Patientinnen chronischem Stress ausgesetzt waren¹⁴². Das Katecholamin Epinephrin ist unter anderem eine Ligand des D2R und anderer AR¹⁴³. Epinephrin agiert über G_i - Protein- gekoppelte Rezeptoren mit einem inhibierenden G- Protein¹⁴⁴. Die DDC wird in Tumorzellen mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren wie α und β AR co-exprimiert¹¹⁹. Eben diese AR und ihre Funktion wurden von Lüthy et al. im Brustgewebe und speziell im Mammakarzinom beschrieben. Je nach Unterform der AR konnte ein aggressiveres oder milderer Tumorverhalten gezeigt werden. Eine Überexpression des β AR (genauer bezeichnet mit ADRB2) ist beispielsweise mit kleineren, ER positiven Tumoren vergesellschaftet. Zusätzlich beeinflusst Epinephrin das cAMP Niveau intrazellulär. Hier ist eine weitere Verbindung zur DDC zu sehen, welche vom cAMP Level abhängig ist. cAMP beeinflusst die Hormonsynthese von Steroiden und Östrogen über den Transkriptionsfaktor CREB. Diese Hormonsyntheseprodukte nehmen wiederum Einfluss auf die Biologie des Mammakarzinoms^{145,146}. Andere Untersuchungen zeigen einen Epinephrin induzierten Signalweg über p53 MAPK auf, welcher die Malignität des Mammakarzinoms vor allem bei einer begleitenden Depression erhöhen soll¹⁴². Andere Forschungsgruppen postulieren Gegenzugliches, nämlich dass sowohl Epinephrin als auch Norepinephrin inhibierend auf die Zellaktivität und das Wachstum des Mammakarzinoms wirken, da sie den transkriptionalen Hippo- Tumorsuppressor Signalweg aktivieren¹⁴⁷.

Zusammenfassend lässt sich nach unserer erstmaligen Untersuchung feststellen, dass die DDC in einer erhöhten immunhistochemischen Expression im Mammakarzinom nachweisbar ist und hier mit einem längeren Überleben korreliert¹³⁹. Es resultieren nun Erkenntnisse über die Wirkung von Epinephrin und von SD-H auf das Mammakarzinom über bisher unbekanntes Signalkaskaden, welche zukünftig nach weiteren Untersuchungen eventuell therapeutisch oder diagnostisch genutzt werden könnten.

Zielsetzung der Arbeit und Ausblick

Das Mammakarzinom ist bei Frauen weltweit das häufigste Karzinom. Aufgrund der hohen Inzidenz und Relevanz der Erkrankung gibt es zahlreiche Studien auf diesem Gebiet². Immer detaillierter werden auf Molekular- und Zellebene Einflussfaktoren und Angriffspunkte zur Früherkennung, Diagnostik und Therapie erforscht. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeiten haben das Ziel die Biologie des Mammakarzinoms weiter zu ergründen und damit eventuelle therapeutische Möglichkeiten zu erweitern. Die Basis der Veröffentlichungen bildeten frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, welche TAAR1 als positiven Prognosefaktor und die Schilddrüsendifunktion in Zusammenhang mit der Erkrankung gebracht hatten^{72,93}.

Zielsetzung der Arbeit war es nun, den G-Protein gekoppelten Rezeptor TAAR1 inklusive seiner Modulatoren und das Enzym L-Dopa Decarboxylase genauer zu untersuchen. Die DDC rückte in den Fokus der Untersuchung, da Sie zum einen eine ähnliche Wirkungsweise zur Ornithin Decarboxylase aufweist, welche wiederum in Zusammenhang mit den TAAR1 Liganden steht, und zum anderen eine Rolle im hormonellen Stresshaushalt spielt, welcher Einfluss auf Tumore nehmen kann.

Mittels immunhistochemischer Analysen wurde die Expression von DDC und TAAR1 analysiert. Des Weiteren wurden die Ergebnisse mit klinischen Variablen korreliert. Die Expression von TAAR1 und DDC wurde unabhängig voneinander als Einflussgröße auf das Gesamtüberleben erkannt. Weitere Experimente wurden *in vitro* zur Spezifikation durchgeführt. Zelllinien des Mammakarzinoms wurden mit verschiedenen Modulatoren der obigen neuen Prognosefaktoren wie T₁AM, T3, Tetrac und Epinephrin stimuliert, teils mit einer Kostimulation von Estradiol je nach Charakteristika der Zelllinie. Die Wirkung der Stimulanzen auf die Zellen wurde mittels etablierter Methoden wie PCR, Western Blot, Scratch Assay und MTT Assay analysiert. Die Ergebnisse wurden 2019 in der eCollection des Dove Medical Press (Breast Cancer) unter dem Titel: "Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration"¹⁰¹ und 2020 im International Journal of Molecular Science unter dem Titel: "L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth *In Vitro* According to Their Different Expression of G_i- Protein- Coupled Receptors" veröffentlicht.

Die Zielsetzung unsere erstmaligen Untersuchungen war es, die Biologie des Mammakarzinoms im Zusammenhang mit Schilddrüsendifunktionen und hormonellen Stressoren besser zu verstehen.

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom der Frau. Ungefähr jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom⁴. Circa 2 Mio. Frauen erhielten im Jahr 2018 die Erstdiagnose „Brustkrebs“ und 600.000 Frauen verstarben weltweit daran³. Zunehmende Risikofaktoren wie Adipositas oder geringe Geburtenrate der Frau stellen wichtige Gründe für die steigende Inzidenz des Mammakarzinoms sowie die dadurch bedingt steigende Mortalität dar. Aufgrund des Fortschritts der angewandten Systemtherapie ist die Mortalität seit den 90er Jahren in Deutschland insgesamt deutlich zurückgegangen^{6,20}. Für die Entscheidungsfindung über die bestmögliche Therapie bedarf es u.a. der Beurteilung der bekannten tumorbiologischen Charakteristika, wie die Expression von Östrogenrezeptoren (ER) oder Progesteronrezeptoren (PR), den Proliferationsmarker ki67 und den Rezeptorstatus HER2¹⁰. Je nach Tumorbiologie und Tumorcharakteristika wie z.B. Größe und gegebenenfalls Metastasierung wird über das Therapieprocedere entschieden. Hier wird aus lokalen (operative Therapie oder Radiatio) und systemisch medikamentösen (adjuvant, neoadjuvant) Therapieoptionen gewählt und kombiniert²⁰.

Schilddrüsendysfunktionen korrelieren mit der Inzidenz des Mammakarzinoms⁷². Diese werden bei älteren Frauen häufiger diagnostiziert als in entsprechenden Vergleichsgruppen⁴⁸. Die Schilddrüsenhormone (freies) Triiodothyronin (f)T₃ und (freies) Tetraiodothyronin (f)T₄ werden über ein Enzym, die Ornithindecaboxylase (ODC), zu Trace aminen (TA) metabolisiert⁵⁶. Die TAs binden an den Trace- Amine Associated Rezeptor 1 (TAAR1) und regulieren über dessen ubiquitäre Expression im menschlichen Körper unter anderem das serotonerge und dopaminerge System¹⁴⁸. Bereits etabliert und Prognose verbessernd ist die präventive hormonelle Therapie von Schilddrüsendysfunktionen bei älteren Frauen⁷². Weiterhin konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress Einfluss auf die Erkrankung nehmen kann¹⁴². Hier spielen Katecholamine wie z.B. Serotonin, Dopamin oder auch Epinephrin eine entscheidende Rolle sowie das Enzym DDC, welches an der Synthese der Hormone beteiligt ist. Die DDC katalysiert ähnliche Schritte wie die ODC, nämlich eine Decarboxylierung ihrer Substrate¹¹⁷. Die Publikationen untersuchen die Regulation von zwei positiven Prognosefaktoren des Mammakarzinoms. Der bereits bekannte positive Prognosefaktor TAAR1 wird durch Liganden wie TA moduliert, was unter anderem zum Anstieg von L-Dopa führt und damit zum Anstieg des synthetisierenden Enzyms, dem in unseren Studien gezeigten zweiten positiven Prognosefaktor: Der L-Dopa Decarboxylase (DDC)¹³⁹. Dies agiert in einer Art positiver Feedbackschleife. TAAR1 ist bereits als positiver prognostischer Faktor des Mammakarzinoms von Rogowski et al. beschrieben worden¹⁰⁹. Methodisch wurde der Effekt von Schilddrüsenhormonen (SD-H) und deren Abbauprodukten TAs mit ihrer Wirkung auf die TAAR1 Expression *in vitro* in Paper I untersucht. Hierzu wurden die Zelllinien

MCF7 und T47D kultiviert, stimuliert und anschließend die Expression von TAAR1 mittels PCR und Western Blot analysiert. Die Publikation „Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration“¹⁰¹ 2019 zeigte, dass mit 10nM T₁AM stimulierte MCF7 Zellen eine erhöhte Expression von TAAR1 auf Proteinebene hatte (p= 0,008). T47D Zellen zeigten ein gleiches Verhalten auf T₁AM nach einer Ko- Stimulation mit 10 µg/mL Estradiol (p= 0,008). Auch die Vitalität der Zellen war durch Stimulation mit T1AM und Estradiol signifikant reduziert (p=0,028). Dies unterstützt die Hypothese, dass TAAR1 ein positiver Faktor des Mammakarzinoms ist. In MCF7 Zellen hatte die Stimulation mit T₁AM ebenso Einfluss auf die Migration der Zellen¹⁰¹. Die DDC ist ein Enzym, das ähnlich der ODC, welche TAs bildet, wirkt und auf den adrenergen Hormonhaushalt Einfluss nimmt. Katecholamine als Stresshormone stellen eine Konnektion zwischen der DDC und dem Stresslevel der Patientin her. Die Expression der DDC wurde mittels immunhistochemischer Färbung in einem Patientinnenkollektiv von 235 Proben untersucht und mikroskopisch mittels IRS ausgewertet. Die Publikation „L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth *In Vitro* According to Their Different Expression of G_i- Protein- Coupled Receptors“¹³⁹ aus dem Jahr 2020 konnte die DDC als positiven prognostischen Faktor für das allgemeine Überleben in primären Mammakarzinom Patientinnen detektieren (p= 0.03)¹³⁹. MCF7 und T47D wurden mit Epinephrin stimuliert und im Anschluss wurde die Expression der DDC und von inhibierenden G-Proteinen (G_i- Proteinen) mittels PCR und Western Blot auf mRNA und Proteinebene quantifiziert. Eine Stimulation der Zellreihen (MCF7 und T47D) mit Epinephrin zeigte eine signifikante Regression der DDC in T47D Zellen (p= 0,038) sowie eine erhöhte Vitalität dieser Zellen (p= 0,028). Gegenätzlich dazu tendiert Epinephrin in MCF7 Zellen die DDC Expression zu steigern (p= 0,051) und senkte die Vitalität (p= 0,028). Es konnte eine vermehrte Expression von G_i- Proteinen nach Stimulation mit Epinephrin gesehen werden (p= 0,008). Epinephrin wirkt über G_i- Proteine. Die Vitalität und Migration der Zelllinien MCF7 und T47D wurde in allen Versuchsreihen mittels MTT Assay und in einigen auch mittels Scratch Assay untersucht. Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte mittels SPSS (Spearman`s Rangkorrelationskoeffizienten, nicht parametrische Testverfahren sowie Kaplan- Meier Kurven, log-rank-Test und Cox Regression). Die untersuchten Strukturen TAAR1, DDC, TAs und Epinephrin sind indirekt in die Expression von Östrogen und Östrogenrezeptoren (ER) involviert und modulieren so einen wichtigen bekannten Einflussfaktor des Mammakarzinoms^{149,150}. Mit dem erstmalig gezeigten partiellen Signalwegen und der prognoseverbessernden Eigenschaft der DDC und von TAAR1 könnte hier mit Hilfe von weiteren in vivo Untersuchungen die Therapiemöglichkeiten optimiert und individualisiert werden. Es könnte die hemmende Wirkung von TAs und Epinephrin auf Zellvitalität und Migration gezielt genutzt werden. O`Mahony et al. zeigten bereits die hemmende Wirkung von Epinephrin auf die Vitalität der Tumorzellen und auf die reduzierende Wirkung von

Östrogen, welches in Fällen von Tumoren mit einer hohen Expression von ER, einen hormonellen Antrieb für die Tumorgenese darstellt ¹⁴⁹. Hier könnte die in der vorliegenden Arbeit detektierte Wirkung von Epinephrin zur Hemmung der Tumorproliferation und Aggressivität berücksichtigt werden ¹³⁹. Eine weitere Erkenntnis unserer Forschung konnte Unterschiede der Tumorzelllinien MCF7 und T47D aufzeigen. Die Tumorzellen differieren in der Expression der ER und PR sowie der G_i - Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Charakteristika der Zelllinien können sich positiv auf zukünftige Forschungsergebnisse auswirken. Insgesamt lässt sich durch die Arbeiten die These einer Einflussnahme von Schilddrüsendifunktionen auf das Mammakarzinom bestärken und weiter spezifizieren. Des Weiteren konnte der Einfluss von Stressoren, wie dem Epinephrin verdeutlicht und die Bedeutung der L-Dopa Decarboxylase im Mammakarzinom quantifiziert und erläutert werden.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide. Approximately one in eight women will receive this diagnosis during her lifetime ⁴. About 2 million women received a first diagnosis of breast cancer and 600,000 died of breast cancer worldwide in 2018 ³. Increasing risk factors, such as obesity or low parity, are important reasons for the rising incidence and mortality of breast cancer. Overall, however, mortality has decreased since the 1990s in Germany most likely due to the progress of systemic drug therapy ^{6,20}. The treatment guidelines for this oncologic disease involves the assessment of the common tumor biological characteristics such as the expression of estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), the proliferation marker ki67 and the receptor status HER2 among others ¹⁰. Depending on the tumor biology, tumor characteristics and, if applicable, metastasis, the therapy procedure is decided. Here, local (surgical therapy or radiotherapy) and systemic drug therapy options (adjuvant, neoadjuvant) are selected or combined ²⁰. One factor influencing the incidence of breast carcinoma is the presence of thyroid dysfunction ⁷². Thyroid dysfunctions are more often diagnosed in elderly women compared to control groups ⁴⁸.

The thyroid hormones (free)Triiodothyronine (f)T3 and (free)Tetraiodothyronine (f)T4 are metabolized to Trace Amines (TAs) via an enzyme called ornithine decarboxylase (ODC) ⁵⁶. The TAs bind to the trace amine associated receptor 1 (TAAR1) and, via its ubiquitous expression in the human body, regulate the serotonergic and dopaminergic systems ¹⁴⁸. Already established is the preventive and prognostic hormonal therapy of thyroid dysfunction in older women ⁷². Furthermore, it could be shown that chronic stress can have an influence on those dysfunction ¹⁴². Here, the catecholamines such as serotonin, dopamine or epinephrine and the enzyme DDC, which is involved in the synthesis of these hormones and shows a similar function as the ODC, play a decisive role ¹¹⁷. The publications describe the modulation of two positive prognostic factors of breast carcinoma and their correlation. The

already known positive prognostic factor TAAR1 is modulated by ligands like TAs, which lead to an increase of L-dopa and thus to the increase of its synthesizing enzyme L-dopa decarboxylase (DDC), which is the second positive prognostic factor in our study¹³⁹. TAAR1 has been previously described as a positive prognostic factor of breast carcinoma by Rogowski et al.¹⁰⁹. Methodologically, the effect of thyroid hormones (SD-H) and their degradation products, TAs, with their effect on TAAR1 expression was investigated in vitro in Paper I. For this purpose, MCF7 and T47D cell lines were cultured, stimulated, and then TAAR1 expression was analyzed by PCR and Western blot. The publication "Thyronamine Regulation of TAAR1 Expression in Breast Cancer cells and Investigation of Its Influence on Viability and Migration"¹⁰¹ 2019 showed that MCF7 cells stimulated with 10nM T1AM showed an increased expression of TAAR1 at the protein level ($p= 0.008$). T47D showed the same behavior on T1AM by co-stimulation with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estradiol ($p= 0.008$). Viability was also significantly reduced by stimulation with T1AM and estradiol ($p=0.028$). This supports the hypothesis that TAAR1 is a positive prognostic factor.

In MCF7 cells the stimulation with T1AM has an influence on the migration of cells¹⁰¹. The DDC is an enzyme, which is similar to the ODC and further influences the adrenergic hormone balance. Catecholamines as stress hormones establish a connection between the DDC and the stress level of the patients. The expression of DDC was investigated by immunohistochemical staining in a patient collective of 235 samples and evaluated microscopically by IRS. The 2020 publication "L-Dopa Decarboxylase (DDC) is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth In Vitro According to Their Different Expression of G_i -Protein - Coupled Receptors"¹³⁹ was able to detect DDC as a positive prognostic factor for overall survival in primary breast cancer patients ($p= 0.03$)¹³⁹. MCF7 and T47D were stimulated with epinephrine and subsequently the expression of the DDC and G_i -Protein was quantified by PCR and Western blot on mRNA and protein level. Stimulation of the cell series (MCF7 and T47D) with epinephrine showed a significant downregulation of DDC in T47D cells ($p= 0.038$) as well as an increased viability of these cells ($p= 0.028$). In contrast, epinephrine increased DDC expression in MCF7 cells by trend ($p= 0.051$) and decreased viability ($p= 0.028$). Increased expression of G_i -proteins was seen after stimulation with epinephrine ($p= 0.008$). Epinephrine acts via G_i -proteins. The viability and migration of the MCF7 and T47D cell lines were examined in all experimental series by MTT assay and in some also by scratch assay. Statistical analysis of all results was performed using SPSS (Spearman's rank correlation coefficients, non-parametric test procedures as well as Kaplan-Meier curves, log-rank test and Cox regression). The investigated structures such as TAAR1, DDC, TAs and epinephrine are indirectly involved in the expression of estrogen and estrogen receptors (ER) and thus modulate an important influencing factor of breast carcinoma^{149,150}. With the partial signaling pathways shown for the first time and the prognosis-improving property of DDC and TAAR1, further in vivo investigations

could be used to further optimize and individualize therapeutic options. For example, the inhibitory effects of TAs and epinephrine on cell viability and migration could be targeted. O'Mahony et al. already showed the inhibitory effect of epinephrine on tumor cell viability and reducing effect on estrogen, which in cases of tumors with high expression of ER, is a driver of tumorigenesis¹⁴⁹. Here, the inhibiting effect on tumor proliferation and aggressiveness of epinephrine detected in the present work could be taken into account¹³⁹. Another finding of our research could reveal further differences of the tumor cell lines MCF7 and T47D. The tumor cells differ in the expression and amount of ER, PR and G_i - protein- coupled receptors. These characteristics of the cell lines may have a positive impact on future research results.

Overall, our investigations strengthened the thesis of the diverse influence of thyroid dysfunction on breast carcinoma and it can be further specified about the importance of trace amines and the expression of TAAR1. Furthermore, the influence of stressors such as epinephrine could be clarified and the importance of L-Dopa decarboxylase in breast carcinoma could be quantified and explained. Further research should be done.

Publikationen

Publikation I

Eileen Tremmel, Simone Hofmann, Christina Kuhn, Helene Heidegger, Sabine Heublein, Kerstin Hermelink, Rachel Wuerstlein, Nadia Harbeck, Doris Mayr, Sven Mahner, Nina Ditsch, Udo Jeschke, Aurelia Vattai

Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration

Breast Cancer- Targets and Therapy (Dove Med Press). 2019 Feb 19; 11:87-97.

doi: 10.2147/BCTT.S178721. eCollection 2019.

Eingereicht: 29.07.2018

Akzeptiert: 17.08.2018

Veröffentlicht: 19.02.2019

Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration

Eileen Tremmel¹
 Simone Hofmann¹
 Christina Kuhn¹
 Helene Heidegger¹
 Sabine Heublein²
 Kerstin Hermelink¹
 Rachel Wuerstlein¹
 Nadia Harbeck¹
 Doris Mayr³
 Sven Mahner¹
 Nina Ditsch¹
 Udo Jeschke¹
 Aurelia Vattai¹

¹Breast Center, Department of Gynecology and Obstetrics and CCC Munich, University of Munich (LMU), 81377 Munich, Germany; ²Department of Gynecology and Obstetrics, University of Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany; ³Department of Pathology, Ludwig-Maximilians University of Munich, 81337 Munich, Germany

Correspondence: Udo Jeschke
 LMU Munich, University Hospital,
 Department of Obstetrics and
 Gynecology, Marchioninist. 15, 81377
 Munich, Germany
 Tel +49 4 4005 4234
 Email udo.jeschke@med.uni-muenchen.
 de

Objectives: A correlation exists between breast cancer and thyroid disorders, which are common in elderly women. Thyroid hormones are degraded into trace amines, which can bind to the G-protein-coupled receptor trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) and thereby activate it. The transformation of thyroid hormones into trace amines is carried out by the ornithine decarboxylase. Previously, we showed that TAAR1 overexpression (IRS ≥ 6) was associated with a significantly longer OS in primary breast cancer patients during a long-term follow-up of up to 14 years. Aim of the present study was to analyze the regulation of TAAR1 in breast cancer cell lines and the influence of triiodothyronine (T₃), thyronamines, and tetraiodothyroacetic acid (Tetrac) on the expression of TAAR1 in breast cancer cells.

Methods: The effect of T₃, thyronamines, and Tetrac on the expression of TAAR1 in breast cancer cell lines MCF-7 and T47D was analyzed via PCR and Western blot. A MTT assay was performed to test the metabolic cell viability. A scratch assay was performed to analyze cell migration.

Results: Stimulation of MCF-7 cells with 10 nM 3-iodothyronamine (T₁AM) significantly increased TAAR1 protein expression ($P=0.008$). In T47D cells, TAAR1 expression was significantly upregulated after the addition of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estradiol to 10 nM T₁AM ($P=0.008$). A significant ($P=0.028$) reduction in MCF-7 cell viability through the incubation with T₁AM could be detected. Cell migration of MCF cells was significantly reduced through incubation with 10 nM T₁AM.

Conclusion: A significant upregulation of TAAR1 induced by stimulation with T₁AM may be a sign for an increased decarboxylation of thyroid hormones in breast cancer cells. In addition, there seems to be an influence of estradiol for the T₁AM-induced upregulation of TAAR1 in T47D cells. TAAR1-related cell transduction mechanisms seem to be an interesting target for endocrine treatment options of breast cancer patients.

Keywords: breast cancer, TAAR1, 3-iodothyronamine, Tetrac, MCF7, T47D

Introduction

Breast cancer is the most common malignant tumor in women worldwide.¹ In 2012, about 1.7 million patients worldwide were diagnosed with breast cancer and almost half a million people died from it.^{2,3} There is evidence that a correlation exists between breast cancer and thyroid disorders, and patients with thyroid dysfunctions have higher breast cancer incidences in comparison to healthy women.⁴⁻⁶ The specific role of thyroidal hormones in breast cancer is still unclear, and future investigations are required to clarify it.⁷ Thyrotrophin (TSH) and fT₄ levels seem to be predictive for therapeutic response and prognosis of patients with recurrent breast cancer.⁸ Ditsch et al⁹ observed that blood levels of the thyroid hormones fT₃ and fT₄ and concentrations of TSH and antibodies against


submit your manuscript | www.dovepress.com

Dovepress    

<http://dx.doi.org/10.2147/BCTT.178721>

Breast Cancer - Targets and Therapy 2019;11: 87-97

87

 © 2019 Tremmel et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution - Non Commercial (unported, v2.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing this work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<http://www.dovepress.com/terms.php>).

thyroidal peroxidase are significantly elevated at the time of primary diagnosis in breast cancer patients. Especially in elderly women, those thyroid markers show a thyroid disorder.¹⁰

In our study, we investigated the influence of thyroid hormones and their degradation products on breast cancer cells. Dysfunction of the thyroid gland is common in elderly women,¹⁰ especially after the menopause.^{11–13} The highest occurrence of hypothyroidism and cancer of the thyroid gland takes place in postmenopausal women.¹³ The occurrence of dysfunction is 5–20 times higher in women than in men.¹³ Alteration in the amount of thyroid hormones is associated with aging. Especially TSH and thyroid antibodies are increasing in women over the age of 45 years.¹⁰ Thyroid hormones influence normal breast cell differentiation as well as breast cancer cell proliferation. Thyroid hormones in general stimulate the angiogenesis of various cancer cells. Thyroid dysfunctions, especially high levels of FT4 or antibodies, are associated with the development of breast cancer. In a previous study, it could be shown that triiodothyronine (T₃) levels are positively related to the incidence of breast cancer in postmenopausal women.¹¹

Thyroid hormones are degraded into trace amines (TAs), also referred to as thyronamines or endogenous amines.¹⁴ The enzyme ornithine decarboxylase (ODC) is a rate-limiting enzyme for the biosynthesis of polyamines, and it is probably responsible for the transformation of thyroid hormones into endogenous thyronamines (3-iodothyronamine [T₁AM] and T₀AM) through a deiodization process and a decarboxylation process.¹⁵ Compared to classical thyroid hormones, which act epigenetically, decarboxylated thyroid hormones are able to act through rapid actions such as rapid lowering of body temperature and heart rate.¹⁶ T₁AM and its metabolites T₀AM and TA₁ are able to modify the brain, heart, pancreatic islets, and other tissues via the trace amine-associated receptor 1 (TAAR1),¹⁵ which is a G-protein-coupled receptor.¹⁶ Upon activation of adenylyl cyclase, TAAR1 leads to a rise of the intracellular cAMP level.^{13,14} TAAR1 is expressed by various tissues including breast, cancer tissue, placenta, brain, spinal cord, stomach, pancreatic β cells, and immune cells such as macrophages, leukocytes, and dendritic cells.^{17–20} Different compounds, including adrenergic, dopaminergic, and serotonergic classes, and a wide spectrum of agonists can activate TAAR1.^{21–23}

TAAR1 has mostly been investigated in the neurological field, and it was shown that TAAR1 is able to modulate the serotonergic and dopaminergic systems in the brain.¹⁷ Current clinical studies analyze TAAR1 in schizophrenia and other psychiatric disorders.²⁴ The TAAR1 agonist T₁AM is being tested in numerous experimental animal studies including its cardiac effects, prevention of ischemia-associated insults such as strokes, and many other functions.^{21,22}

In a recently published study, we analyzed the regulation of TAAR1 in tumor tissue of primary breast cancer patients (M0) and identified that TAAR1 is an independent predictor for OS in early breast cancer.²⁰ TAAR1 overexpression (IRS ≥6) was associated with a significantly longer OS in primary breast cancer patients ($P=0.02$) during long-term follow-up of up to 14 years.²⁰ Therefore, TAAR1 has a favorable effect on OS in early breast cancer.²⁰

The aim of our present study was to analyze the influence of thyronamines and T₃ on TAAR1 expression in different breast cancer cells and to assess its influence on the viability and migration of breast cancer cell lines.

Methods

Cell culturing and stimulation

Ductal breast cancer cell lines MCF7 and T47D (both ECACC, Salisbury, UK) were used for the experiments. The cells were cultured in DMEM (3.7 g/L NaHCO₃, 4.5 g/L D-glucose, 1.028 g/L stable glutamine, and Na-pyruvate; Biochrom, Berlin, Germany) adding 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Biochrom) to the medium, and the solution was incubated at an atmospheric CO₂ concentration of 5% and at a temperature of 37°C.

For the PCR and Western blot stimulation, MCF7 and T47D cells were separately grown on sterile 12 multiwell slides at a density of 500,000 cells/mL DMEM with 10% FCS. Medium was changed after 4 hours to pure DMEM without FCS. After 16 hours, each group of cells was stimulated with 0.01 or 0.1 nM T₁AM (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), T₃ (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA), and tetraiodothyroacetic acid (Tetrac) (Sigma-Aldrich Co.) for 2 hours in case of TaqMan® PCR experiments. For Western blot lysates, each group of cells was stimulated with 1 or 10 nM T₁AM, T₃, and Tetrac for 24 hours. 10 µg/mL of estradiol (Sigma-Aldrich Co.) was added to T47D cells, which were stimulated with 10 nM T₁AM.

Control cells were incubated under the same conditions without stimulants.

TaqMan® Real-time PCR

The NucleoSpinRNAII (Macherey-Nagel, Düren, Germany) was used for RNA isolation of MCF7 and T47D cells. RNA samples were quantified and analyzed with the NanoPhotometer (Implen, Munich, Germany). Reverse transcription was performed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a temperature protocol of 25°C for 10 minutes, 37°C for 2 hours, 85°C for 5 seconds, followed by final cooling at 4°C.

TaqMan® PCR took place in 96-well reaction plates holding a volume of 20 µL in each well. The mixture consisted of 1 µL of TaqMan® Gene Expression Assay 20× (Thermo Fisher Scientific), 10 µL of TaqMan® Universal PCR Master Mix 2× (Thermo Fisher Scientific), 8 µL of H₂O (containing 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated distilled water; Sigma-Aldrich Co.), and 1 µL of RNA sample. For the PCR assay, ABI Prism 7500 Fast (Thermo Fisher Scientific) was used with the thermal cycling conditions of 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of amplification with 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. The 2^{-ΔΔCT} method was used for quantification of the relative RNA expression applying β-actin as the housekeeping gene. Each experiment was validated three times (n=3).

Western blot

Stimulated and control cells were lysed for 30 minutes at 4°C with 200 µL buffer solution, consisting of a 1:100 dilution of protease inhibitor (Sigma-Aldrich Co.) in RIPA buffer (Sigma-Aldrich Co.). After centrifugation of the lysates with thermo centrifuge, a Bradford protein assay was performed to identify the protein amount. The proteins were separated according to their molecular weight using SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The membrane was blocked for 1 hour in a receptacle consisting of 1× casein solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), to prevent nonspecific binding of the antibodies. The primary antibodies anti-β-actin (clone AC-15, mouse IgG; Sigma-Aldrich Co.) and anti-TAAR1 (PA5-23141, rabbit IgG; Thermo Fisher Scientific) were equally rarefied in a 1× casein solution and then applied onto the membrane for 16 hours at 4°C. Afterward, the membrane with the β-actin antibody was incubated with biotinylated anti-mouse IgG antibody and ABC-AmP reagent (both VECTASTAIN ABC-AmP Kit for rabbit IgG; Vector Laboratories) and the TAAR1 antibody membrane was incubated with biotinylated anti-rabbit IgG antibody and ABC-AmP reagent (both VECTASTAIN ABC-AmP Kit for rabbit IgG; Vector Laboratories), according to the manufacturer's protocol. Staining was performed using the 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitroblue tetrazolium chromogenic substrate (Vectastain ABC-AmP Kit; Vector Laboratories). Detection was performed with Bio-Rad Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), and the findings were quantified using the Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories Inc.). Each Western blot experiment was validated nine times (n=9, three times in three lanes).

MTT assay

MCF7 and T47D cells were separately grown on sterile 96 multiwell slides at a density of 10,000 cells/mL DMEM containing 10% FCS. The medium was changed after 4 hours to pure DMEM. After 16 hours, cells were stimulated for 48 hours with 0.01, 0.1, or 10 nM T₁AM. Control groups were incubated in pure DMEM or in a predilution of DMSO, in which T₁AM was liquidated. After the stimulation period, the MTT reagent (Sigma-Aldrich Co.) was applied in order to specify the mitochondrial succinate-tetrazolium dehydrogenase system of the stimulated cells. After 30 minutes of incubation with MTT in the incubator, cell viability was measured with a multiwell spectrophotometer at a wavelength of 420–480 nm. Each experiment was validated three times (n=3).

Wound healing assay

MCF7 and T47D cells were grown on 48 multiwell plates at a density of 200,000 cells/mL DMEM with 10% FCS. After 4 hours, DMEM with FCS was substituted by pure DMEM and the incubation was lasted for another 20 hours until the well contained a confluent cell layer. Next, a straight line was scratched into the middle of the monolayer with a p100 pipet tip (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany). Afterward, the well was carefully rinsed with 1 mL of PBS to remove the debris and the well was again filled with pure DMEM. Stimulation of the cells with 10 nM T₁AM followed and the control group was incubated without stimulants. The dish was placed in a culture incubator at 37°C and 5% CO₂. Digital images of the scratch assays were taken exactly at 0, 24, 48, 72, and 96 hours after stimulation. The recording contained always the same area of the scratched cells. Digital images were taken until the scratch was nearly closed. The acquired images were evaluated using the ImageJ software (Laboratory for Optical and Computational Instrumentation [LOCI] of the University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA; <http://imagej.net/>). Each experiment was validated three times (n=3).

Statistics

Data collection, processing, and analysis of statistical data were transacted with IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). A two-sided significance level of 5% was used for all statistical tests. Two sample *t*-tests were performed for statistical analysis of cell culture experiments. For the real-time PCR analysis, we used the 2^{-ΔΔCT} formula to calculate relative values. The bar charts show the mean of relative expression and not the

raw data. Therefore, the presentation of error bars is not applicable in this case.²⁵

Results

Influence of T₁AM, Tetrac, and T₃ on TAAR1 mRNA expression in MCF7 and T47D breast cancer model cells

Incubation of MCF7 cells with 0.01 nM T₁AM for 2 hours induced a significantly ($P=0.043$) increased TAAR1 mRNA expression compared to the control condition (Figure 1A). In T47D cells, 0.1 nM T₁AM led to a significant ($P=0.028$) upregulation of TAAR1 mRNA expression after an incubation time of 2 hours (Figure 1B). The other concentrations of T₁AM, which had been tested, had no significant influence on TAAR1 expression (Figure S1).

Tetrac induced a significant upregulation of TAAR1 mRNA expression in MCF7 cells ($P=0.017$) (Figure 2A) and in T47D ($P=0.043$) (Figure 2B) after an incubation time of 2 hours and at a concentration of 0.1 nM. Other tested concentrations of Tetrac had no significant influence on TAAR1 expression (Figure S2).

Stimulation with T₃ had a significant influence on TAAR1 mRNA expression neither in MCF7 cells ($P=0.249$ for 0.01 nM T₃; $P=0.345$ for 0.1 nM T₃) nor in T47D cells ($P=0.917$ for 0.01 nM T₃; $P=0.068$ for 0.1 nM T₃).

Influence of T₁AM, Tetrac, and T₃ on TAAR1 protein expression in MCF7 and T47D breast cancer model cells

Incubation of MCF7 cells with 10 nM T₁AM for 24 hours induced a significant upregulation of TAAR1 protein expression ($P=0.008$) (Figures 3A and 4A, B). Stimulation with 1 nM T₁AM did not have a significant influence on TAAR1 expression (Figure S3). In T47D cells, no significant change in TAAR1 protein expression could be observed through the incubation with 10 nM T₁AM for 24 hours ($P=0.678$) (Figures 3B and 4C, D).

The addition of 10 µg/mL of estradiol to T47D cells co-stimulated with T₁AM led to a significant upregulation of TAAR1 protein expression ($P=0.008$) (Figures 3C and 4E, F). TAAR1 protein expression in MCF7 and T47D cells was not influenced by either T₃ or Tetrac.

Viability and migration of MCF7 and T47D after stimulation with T₁AM and T₃ MTT test

Stimulation of both cell lines (MCF7 and T47D) with 0.1 nM T₁AM for 48 hours led to a significantly decreased viability of MCF7 cells ($P=0.028$) in comparison to unstimulated control MCF7 cells (Figure 5A). Other tested concentrations of T₁AM showed no influence.

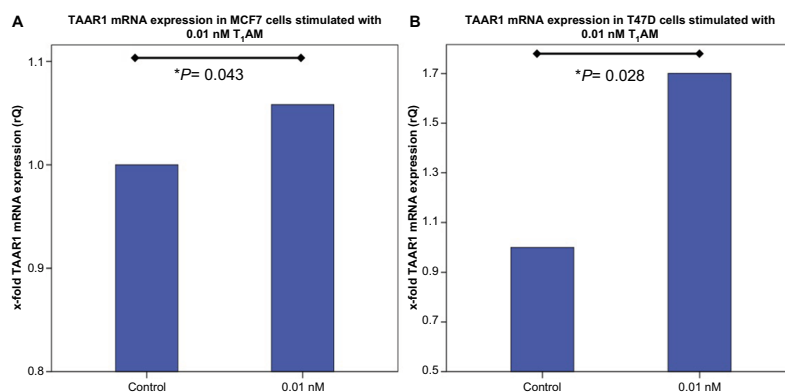


Figure 1 TaqMan[®] Real-time PCR in MCF7 and T47D cells after stimulation with T₁AM. **Notes:** (A) Bar chart as a relative representation of TAAR1 mRNA expression in MCF7 cells after incubation with T₁AM for 2 hours detected via TaqMan[®] Real-time PCR. 0.01 nM T₁AM induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.043$). (B) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in T47D cells after incubation with T₁AM for 2 hours detected via TaqMan[®] Real-time PCR. 0.1 nM T₁AM induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.028$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate. * $P<0.05$. **Abbreviation:** T₁AM, 3-iodothyronamine.

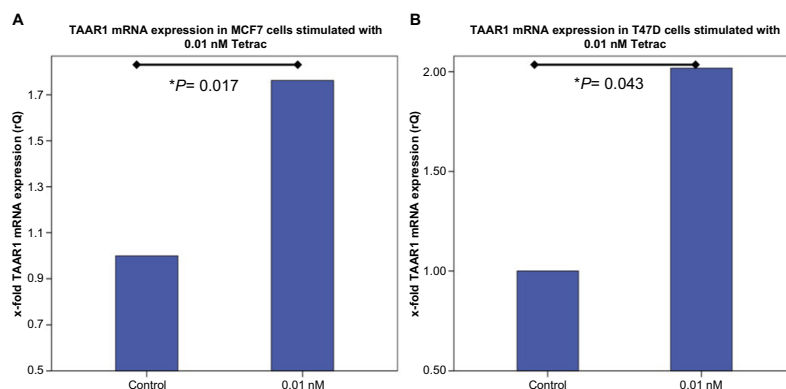


Figure 2 TaqMan® Real-time PCR in MCF7 and T47D cells after stimulation with Tetrac.

Notes: (A) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in MCF7 cells after incubation with Tetrac detected via TaqMan® Real-time PCR. 0.1 nM Tetrac for 2 hours led to a significant increase in TAAR1 expression in MCF7 cells ($P=0.017$). (B) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in T47D cells after incubation with Tetrac for 2 hours detected via TaqMan® Real-time PCR. 0.1 nM Tetrac induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.043$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate. * $P<0.05$.

Abbreviation: Tetrac, tetraiodothyroacetic acid.

The stimulant T_3 at a concentration of 0.1 nM induced a significantly increased viability of MCF7 cells ($P=0.027$) (Figure 5B).

No effect of T_1AM and T_3 could be observed in T47D cells.

Wound healing assay

Cell migration of MCF cells was significantly reduced through incubation with 10 nM T_1AM for 12 hours ($P=0.004$) (Figure 6A) and 24 hours ($P=0.016$) (Figure 6B). The scratch was closed more slowly through stimulated cells in comparison to unstimulated cells (Figure 7). T_1AM had no influence on the migration of T47D cells after 24, 48, 72, or 96 hours. No effect could be observed in T47D cells.

Discussion

In this study, the influence of T_3 and thyronamines (T_1AM) on TAAR1 expression has been analyzed in MCF-7 and T47D breast cancer cell lines. In a previous study, we found that TAAR1 overexpression ($IRS \geq 6$) was favorably associated with OS in primary breast cancer; therefore, TAAR1 is a positive prognostic marker for OS in early breast cancer. Decarboxylation of thyroid hormones through the ODC leads to an excess of thyronamines, which presumably leads to the upregulation of TAAR1. Hence, the results of our MTT test, which detects the metabolic cell activity and showed a

reduced cell viability of MCF7 cells through T_1AM , are in line with our former findings as enhanced TAAR1 expression has a positive predictive effect on OS in breast cancer patients. Those findings are in line with recent results of Rogowski et al (2017),²⁶ who showed that incubation of MCF7 cells with T_1AM resulted in a significant reduction in cell viability.

T_1AM directly stimulates the G-protein-coupled membrane receptor TAAR1, which is expressed by breast cancer cells. T_1AM can be synthesized from T_3 through decarboxylation and deiodation, and also Tetrac can be synthesized from T_3 through deamination. Therefore, there might be an indirect influence of T_3 and Tetrac on the signal transduction processes stimulated by TAAR1. Therefore, the aim of our study was to find out a potential influence of T_3 or Tetrac on T_1AM signal transduction in breast cancer cells in vitro. Based on the results of our study, we can rule out a direct influence of T_3 or Tetrac on T_1AM signaling.

TAAR1 belongs to the group of G-protein-coupled receptors.²⁰ In some cases, antibodies produced against these targets are not very immunogenic. Therefore, Berry et al (2017)²⁴ proposed that the commercially available anti-TAAR1 antibodies are not optimal as specific antibodies for some of the experiments they had been employed in. In this study, the antibody anti-TAAR1 (PA5-23141, rabbit IgG), which has been used for cell culture experiments showed to

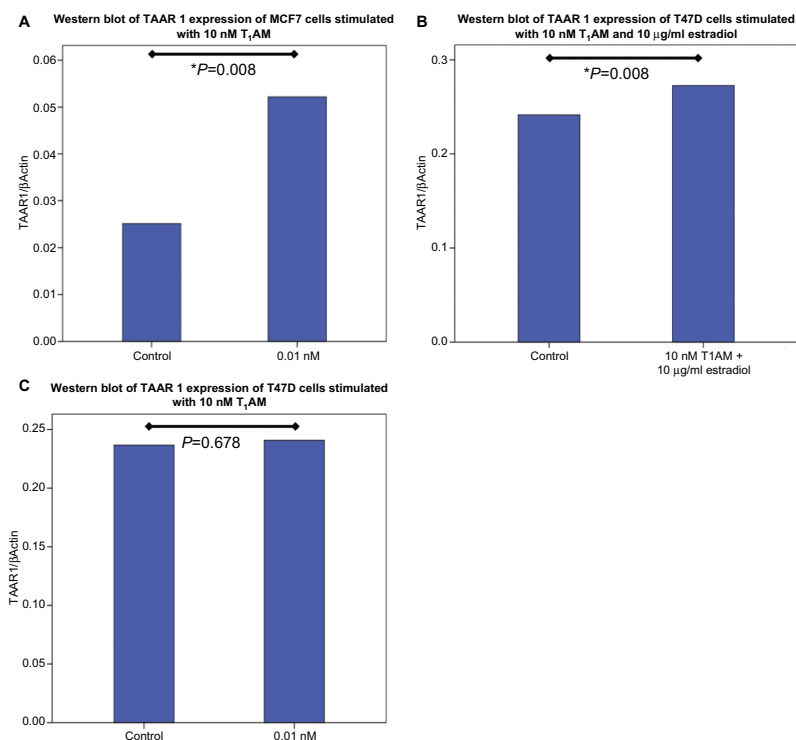


Figure 3 Western blot analysis of TAAR1 protein expression in MCF7 and T47D cells after stimulation with T₁AM.

Notes: (A) Bar chart of TAAR1 expression in MCF7 cells after incubation with 10 nM T₁AM for 2 hours. T₁AM induced a significant upregulation of TAAR1 protein expression ($P=0.008$). (B) Bar chart of TAAR1 expression in T47D cells after incubation with 10 nM T₁AM and 10 µg/mL estradiol for 2 hours. T₁AM led to a significant increase in TAAR1 protein expression ($P=0.008$). (C) Bar chart of TAAR1 expression in T47D cells after incubation with 10 nM T₁AM for 2 hours. No significant change in TAAR1 protein expression could be observed after stimulation with T₁AM ($P=0.678$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate. * $P<0.05$.

Abbreviation: T₁AM, 3-iodothyronamine.

be more specific in comparison to the monoclonal mouse IgG TAAR1 antibody (sc-514311; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) and the polyclonal rabbit IgG antibody (ab65633; Abcam, Cambridge, UK).

In recent years, a keen research interest could be observed for thyroid hormone derivatives in the therapy of breast cancer. Bharali et al (2013)²⁷ examined Tetrac, a thyroid hormone analog of L-thyroxin, conjugated to poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (T-PLGA-NPs) both in vitro and in vivo for the treatment of drug-resistant breast cancer. They showed that Tetrac T-PLGA-NPs enhanced the inhibition of tumour-cell proliferation; and in in vivo studies, treatment with either Tetrac or T-PLGA-NPs resulted in a three- to fivefold inhibition of tumour weight.²⁷

In our investigation, we could show that T₁AM has a different effect on TAAR1 expression in MCF7 compared to T47D cells. T47D cells seem to function only in comparison to MCF7 cells after estrogen supplementation. Stimulation with T₁AM induced a significant upregulation of TAAR1 in MCF7 cells, whereas no impact could be observed for T₁AM on TAAR1 expression in T47D cells. TAAR1 mRNA expression was significantly increased in T47D cells after additional co-stimulation with estradiol. Sex steroids, such as estrogen, regulate the growth and development of the mammary gland as well as the development of breast neoplasms.²⁸ In vitro studies showed that stimulation with estrogen induces the proliferation of hormone-dependent breast cancer cells.^{24,25} T47D and MCF7 cell lines vary in

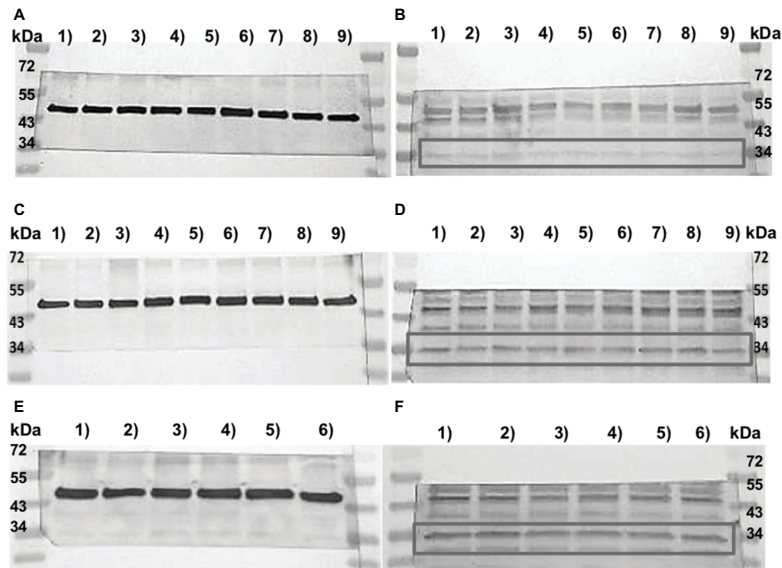


Figure 4 Western blot analysis of TAAR I protein expression in MCF7 and T47D cells after stimulation with T₃AM.

Notes: Image of Western blot membranes with standard protein ladder (Page Ruler Prestained Protein ladder; # 26616; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); (A, C, and E) (left) Control membrane with b-actin. (B, D, and F) (right) Membrane incubated with TAAR I. Gray boxes mark the binding region of the TAAR I antibody according to its molecular weight. (A and B) Nine samples of MCF7 cells: MCF7 cell control groups in columns 1), 4), and 7) and MCF7 cells stimulated with 1 nM T₃AM in columns 2), 5), and 8) and stimulated with 10 nM T₃AM in columns 3), 6), and 9). (C and D) Nine samples of T47D cells: T47D cell control groups in columns 1), 4), and 7) and T47D cells stimulated with 1 nM T₃AM in columns 2), 5), and 8) and stimulated with 10 nM T₃AM in columns 3), 6), and 9). (E and F) Six samples of T47D: T47D cell control groups in columns 1), 3), and 5) and cells stimulated with 10 nM T₃AM and 10 µg/mL estradiol in columns 2), 4), and 6).

Abbreviation: T₃AM, 3-iodothyronamine.

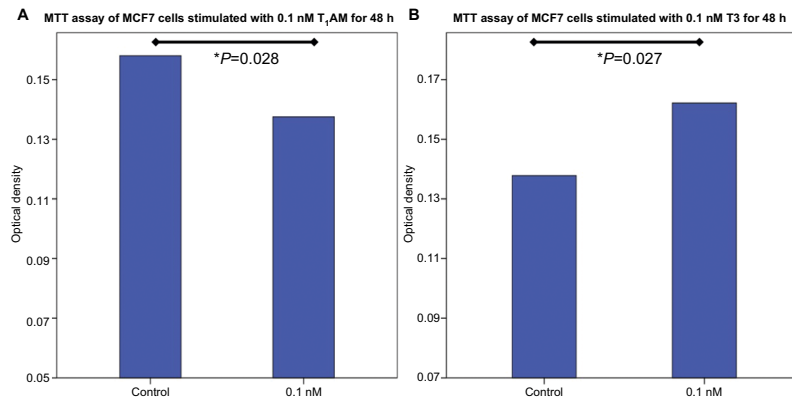


Figure 5 MTT assay of MCF7 cells stimulated with T₃AM and T₃.

Notes: (A) Bar chart of OD of MCF7 cells after incubation with 0.1 nM T₃AM for 24 hours. T₃AM induced a decrease in cell proliferation ($P=0.028$). (B) Bar chart of OD of MCF7 cells after incubation with 0.1 nM T₃ for 24 hours. T₃ induced an increase in cell proliferation ($P=0.027$). This bar graph shows the mean of relative OD; therefore, the presentation of error bars is not appropriate.

Abbreviations: OD, optical density; T₃AM, 3-iodothyronamine.

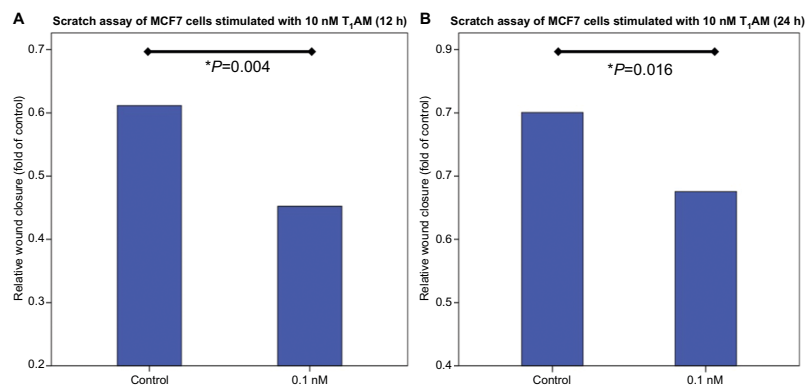


Figure 6 Wound healing assay of MCF7 cells stimulated with T₁AM.

Notes: (A) Bar chart of the scratch area of MCF7 cells after incubation with 10 nM T₁AM for 12 hours. T₁AM induced a significant downregulation of cell migration ($P=0.004$) in comparison to control cells. (B) Bar chart of the scratch area of MCF7 cells after incubation with 10 nM T₁AM for 24 hours. T₁AM induced a significant downregulation of cell migration ($P=0.016$) in comparison to unstimulated control cells. This bar graph shows the mean of relative wound closure; therefore, the presentation of error bars is not appropriate.

Abbreviation: T₁AM, 3-iodothyronamine.

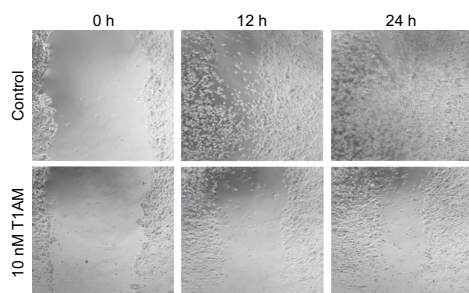


Figure 7 Wound healing assay of MCF7 control and stimulated cells.

Notes: Images show cell migration into the scratch in control and stimulated cells. Migration of MCF7 cells is significantly inhibited through incubation with 10 nM T₁AM for 12 hours ($P=0.004$). Migration of MCF7 cells is significantly inhibited through incubation with 10 nM T₁AM for 24 hours ($P=0.016$).

Abbreviation: T₁AM, 3-iodothyronamine.

their expression of progesterone receptor (PR) and estrogen receptor (ER). MCF7 cells express a higher level of ER than PR, whereas T47D cells express a higher level of PR.^{24,25} Estrogen in itself is able to up- or downregulate the ER. The direction of regulation depends on the interaction of the estrogen-response elements (ERE) at the DNA strand with the three available ER DNA promoters.^{29,30} As shown in numerous studies, estrogen leads to a downregulation of ER in MCF7 cells and to an upregulation of ER in T47D.^{26,27} This fact could explain the diversity of responses observed for the

same stimulant in different breast cancer tumor cell lines.²⁹ Our results verify the evidence of Zaretsky et al showing that, for T47D cells, an exogenous additional supplement of estrogen is necessary to activate the expression of proteins.²⁶ In our case, the additional estrogen stimulation induced an upregulation of TAAR1 expression in T₁AM-stimulated T47D cells.

Modulation of TAAR1 may represent a novel targeting strategy for breast cancer prevention and therapy. Hoefig et al. (2016)¹⁵ claim that one of the most important points for future thyronamine research is the development of a quantitative assay for T₁AM and its derivatives in blood and other body fluids to gain a better understanding of T₁AM metabolism and signal transduction. Before clinical implications are being considered, the complexity of the field and the technical challenges need to be mastered.

Aims of future studies include further investigation of the functional interaction between TAAR1 and the ODC in breast cancer tissue and cells. TAAR1 may represent a novel target for the prevention and treatment of breast cancer. Further studies are required to analyze the signaling pathways of the endogenous ligands of TAAR1 and to possibly re-examine thyroid hormone signaling in breast cancer.³¹

Acknowledgments

In memory, we thank Sandra Schulze for her excellent technical assistance in this article. The study was funded by the

Bayerische Gleichstellungsförderung grant (2016/2017) of Bavaria, Germany, and by the Foundation of the Frankfurter Allgemeinen Zeitung (FAZIT) foundation grant (2017/2018) of Germany.

Author contributions

AV, UJ, ET, and ND conceived and designed the experiments. ET, CK, and SiH performed the experiments. AV, UJ, ET, CK, SiH, and KH analyzed the data. ET, AV, UJ, and KH wrote the research article. SM, KH, SH, HH, DM, NH, RW, and ND interpreted the results and revised the manuscript. All authors contributed to data analysis, drafting and revising the article, gave final approval of the version to be published, and agree to be accountable for all aspects of the work.

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10074):1134–1150.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–E386.
- Turken O, Narin Y, Demirbas S, et al. Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast Cancer Res*. 2003;5(5):R110–113.
- Rasmussen B, Feldt-Rasmussen U, Hegedüs L, Perrild H, Bech K, Hoier-Madsen M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23(5):553–556.
- Kuijpers JL, Nyklictek I, Louwman MW, Weetman TA, Pop VJ, Coebergh JW. Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women. *Thyroid*. 2005;15(11):1253–1259.
- Heublein S, Mayr D, Meindl A, et al. Thyroid Hormone Receptors Predict Prognosis in BRCA1 Associated Breast Cancer in Opposing Ways. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127072.
- Yokoe T, Iino Y, Takei H, et al. Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res*. 1996;16(4A):2069–2072.
- Ditsch N, Liebhardt S, von Koch F, et al. Thyroid function in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1713–1717.
- Bensener IM, Olmos RD, Lotufo PA. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. *Clin Interv Aging*. 2012;7:97–111.
- Tosovic A, Becker C, Bondeson AG et al. Prospectively measured thyroid hormones and thyroid peroxidase antibodies in relation to breast cancer risk. *Int J Cancer*. 2012;131(9):2126–33.
- Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol*. 1991;34(1):77–83.
- Gietka-Czernel M. The thyroid gland in postmenopausal women: physiology and diseases. *Prz Menopauzalny*. 2017;16(2):33–37.
- Harmeier A, Obermueller S, Meyer CA, et al. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3 β signaling of TAAR1 and D2R heteromers. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(11):2049–2061.
- Hoefig CS, Zucchi R, Köhrle J. Thyronamines and Derivatives: Physiological Relevance, Pharmacological Actions, and Future Research Directions. *Thyroid*. 2016;26(12):1656–1673.
- Brix K, Führer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Res*. 2011;4(Suppl 1):S9.
- Lam VM, Espinoza S, Gerasimov AS, Gainetdinov RR, Salahpour A. In-vivo pharmacology of Trace-Amine Associated Receptor 1. *Eur J Pharmacol*. 2015;763(Pt B):136–142.
- Gozal EA, O'Neill BE, Sawchuk MA, et al. Anatomical and functional evidence for trace amines as unique modulators of locomotor function in the mammalian spinal cord. *Front Neural Circuits*. 2014;8:134.
- Babusyte A, Kotthoff M, Fiedler J, Krautwurst D. Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2. *J Leukoc Biol*. 2013;93(3):387–394.
- Vattai A, Akyol E, Kuhn C, et al. Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017;143(9):1637–1647.
- Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med*. 2004;10(6):638–642.
- Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol*. 2001;60(6):1181–1188.
- Sotnikova TD, Caron MG, Gainetdinov RR. Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets. *Mol Pharmacol*. 2009;76(2):229–235.
- Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacol Ther*. 2017;180:161–180.
- Kolben TM, Rogatsch E, Vattai A, Hester A, et al. PPAR γ Expression Is Diminished in Macrophages of Recurrent Miscarriage Placentas. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):E1872.
- Zaretsky JZ, Barnea I, Aylon Y, Gorivodsky M, Wreschner DH, Keydar I. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1 promoter and role of estrogen receptor alpha (ER α) in regulation of the MUC1 gene expression. *Mol Cancer*. 2006;5:57.
- Bharali DJ, Yalcin M, Davis PI, Mousa SA. Tetraiodothyroacetic acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomedicine*. 2013;8(12):1943–1954.
- King RJ. A discussion of the roles of oestrogen and progesterin in human mammary carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;39(5B):811–818.
- Donaghue C, Westley BR, May FE, Feb M. Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen. *Mol Endocrinol*. 1999;13(11):1934–1950.
- Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(14):2905–2919.
- Grandy DK. Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? *Pharmacol Ther*. 2007;116(3):355–390.

Supplementary materials

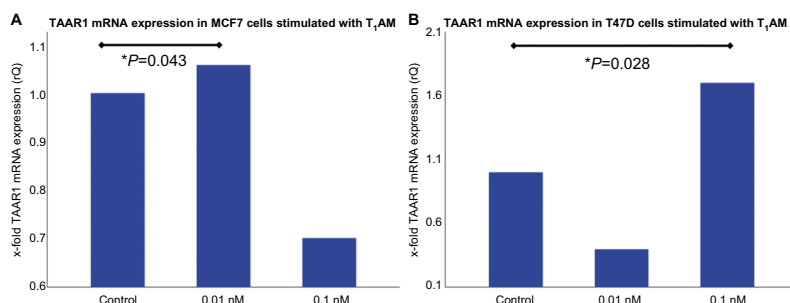


Figure S1 Real-time TaqMan[®] PCR in MCF7- and T47D- cells after stimulation with TIAM.

Notes: (A) Bar chart as a relative representation of TAAR1 mRNA expression in MCF7 cells after incubation with TIAM for 2h detected via Real-time TaqMan[®] PCR. 0.01nM TIAM induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.043$). 0.1nM TIAM showed no significant influence on TAAR1 expression ($P=0.398$). (B) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in T47D cells after incubation with TIAM for 2h detected via Real-time TaqMan[®] PCR. 0.1nM TIAM induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.028$). 0.01nM TIAM showed no significant influence on TAAR1 expression ($P=0.144$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate. * $P<0.05$.

Abbreviation: TIAM, 3-iodothyronamine.

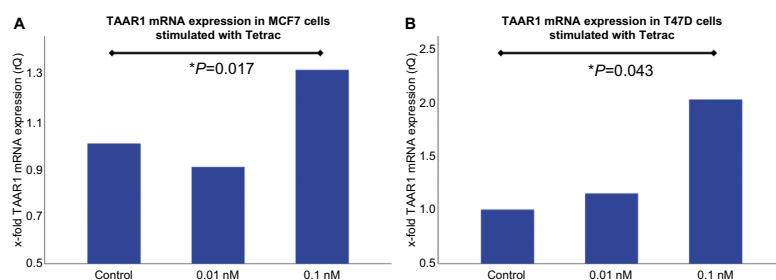


Figure S2 Real-time TaqMan[®] PCR in MCF7- and T47D- cells after stimulation with Tetrac.

Notes: (A) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in MCF7 cells after incubation with Tetrac detected via Real-time TaqMan[®] PCR. 0.1nM Tetrac for 2h led to a significant increase of TAAR1 expression in MCF7 cells ($P=0.017$). 0.01nM Tetrac showed no significant influence on TAAR1 expression ($P=0.345$). (B) Bar chart of TAAR1 mRNA expression in T47D cells after incubation with Tetrac for 2h detected via Real-time TaqMan[®] PCR. 0.1nM Tetrac induced a significant upregulation of TAAR1 expression ($P=0.043$). 0.01nM Tetrac showed no significant influence on TAAR1 expression ($P=0.917$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate. * $P<0.05$.

Abbreviation: Tetrac, tetraiodothyroacetic acid.

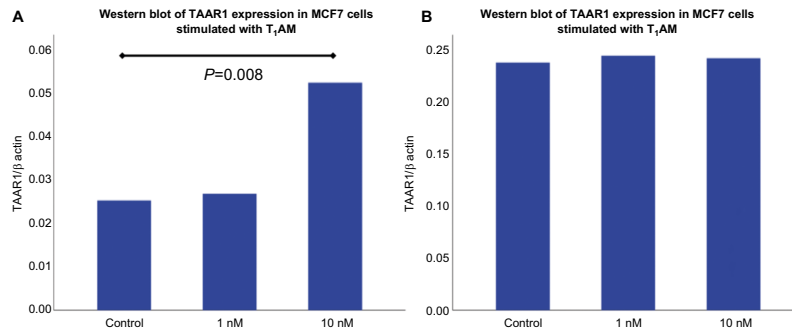


Figure S3 Western Blot analysis of TAAR1 protein expression in MCF7 and T47D cells after stimulation with TIAM.

Notes: (A) Bar chart of TAAR1 expression in MCF7 cells after incubation with 10nM TIAM for 2h. TIAM induced a significant upregulation of TAAR1 protein expression ($P=0.008$). 1 nM TIAM showed no significant influence on TAAR1 protein expression ($P=0.767$). (B) Bar chart of TAAR1 expression in T47D cells after incubation with 1nM and 10nM TIAM for 2h. No significant change in TAAR1 protein expression could be observed (1nM: $P=0.441$; 10nM: $P=0.678$). This bar graph shows the mean of relative TAAR1 expression; therefore, the presentation of error bars is not appropriate.

Abbreviation: TIAM, 3-iodothyronamine.

Breast Cancer - Targets and Therapy

Publish your work in this journal

Breast Cancer - Targets and Therapy is an international, peer-reviewed open access journal focusing on breast cancer research, identification of therapeutic targets and the optimal use of preventative and integrated treatment interventions to achieve improved outcomes, enhanced survival and quality of life for the cancer patient.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/breast-cancer---targets-and-therapy-journal>

Dovepress

The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Eileen Tremmel, Christina Kuhn, Till Kaltofen, Theresa Vilsmaier, Doris Mayr, Sven Mahner, Nina Ditsch, Udo Jeschke, Aurelia Vattai

L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth *In Vitro* According to Their Different Expression of G_i - Protein- Coupled Receptors

International Journal of Molecular Science. 2020 Dec 15;21(24):9565.

doi: 10.3390/ijms21249565.

Eingereicht: 29.10.2020

Akzeptiert: 13.12.2020

Veröffentlicht: 15.12.2020



Article

L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer Cell (MCF7 and T47D) Growth In Vitro According to Their Different Expression of G_i - Protein- Coupled Receptors

Eileen Tremmel¹, Christina Kuhn², Till Kaltofen¹ , Theresa Vilsmaier¹, Doris Mayr³, Sven Mahner¹, Nina Ditsch², Udo Jeschke^{1,2,*} and Aurelia Vattai¹

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, LMU Munich, Marchioninstraße 15, 81377 Munich, Germany; E.Tremmel@campus.lmu.de (E.T.); Till.Kaltofen@med.uni-muenchen.de (T.K.); Theresa.Vilsmaier@med.uni-muenchen.de (T.V.); Sven.Mahner@med.uni-muenchen.de (S.M.); Aurelia.Vattai@med.uni-muenchen.de (A.V.)

² Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital Augsburg, Stenglinstr. 2, 86156 Augsburg, Germany; Christina.Kuhn@med.uni-muenchen.de (C.K.); nina.ditsch@uk-augsburg.de (N.D.)

³ Department of Pathology, LMU Munich, Thalkirchner Straße 36, 80337 Munich, Germany; doris.mayr@med.uni-muenchen.de

* Correspondence: Udo.Jeschke@med.uni-muenchen.de or udo.jeschke@uk-augsburg.de; Tel.: +49-821-400-165505

Received: 29 October 2020; Accepted: 11 December 2020; Published: 15 December 2020



Abstract: A coherence between thyroid dysfunction and breast cancer incidence exists. Thyroid hormone metabolites bind to TAAR1 (trace amine-associated receptor 1) and through that modulate the serotonergic and dopaminergic system. Catecholamines themselves are synthesized by the L-dopa decarboxylase (DDC). The aim of our study was to analyze the influence of catecholamines on the DDC expression in primary breast cancer patients and the role of DDC concerning overall survival (OS). DDC expression was analyzed by immunohistochemistry. The effect of epinephrine on the expression of DDC and the G_i - protein was analyzed on the protein level via Western blot. A viability assay was performed to test the metabolic cell viability. The overexpression of DDC in the primary tumor was associated with longer OS ($p = 0.03$). Stimulation with epinephrine induced the downregulation of DDC ($p = 0.038$) and significantly increased viability in T47D cells ($p = 0.028$). In contrast, epinephrine induced an upregulation of DDC and decreased the proliferation of MCF7 cells ($p = 0.028$). Epinephrine led to an upregulation of G_i protein expression in MCF7 cells ($p = 0.008$). DDC is a positive prognostic factor for OS in breast cancer patients, and it is regulated through epinephrine differently in MCF7 and T47D. DDC may represent a novel target for the treatment of breast cancer, especially concerning its interaction with epinephrine.

Keywords: breast cancer; L-dopa decarboxylase; epinephrine

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignant cancer type in women worldwide [1]. In 2018, over two million patients were newly diagnosed with breast cancer, and more than 600,000 women died from it [2,3].

Various comorbidities can influence the biology and development of breast cancer. A correlation between breast cancer and thyroid disorders could be found [4]. The incidence of breast cancer in women with thyroid dysfunction is higher in comparison to normothyroidal women [4–6].

Sogaard et al. (2016) found a coherence between hyperthyroidism and an increased breast cancer incidence as well as a coherence between hypothyroidism and a lower breast cancer incidence [7]. Furthermore, Ditsch et al. (2017) described significantly elevated blood levels of thyroid hormones (fT₃ and fT₄), and high concentrations of TSH and thyroidal antibodies in breast cancer patients at the moment of primary diagnosis [8]. Thyroid hormones are metabolized by the enzyme ornithine decarboxylase (ODC) into the derivatives called trace-amines (TAs) [9,10].

In recently published studies, investigations were made on the degradation products of thyroid hormones can bind to the trace amine-associated receptor 1 (TAAR1), which is a G-protein coupled receptor that influences the viability and migration of breast cancer cells [11–14]. Additionally, this receptor has been identified as an independent prognostic positive factor for breast cancer [15].

Further an enzyme called, L-dopa dopa decarboxylase (DDC), is a pyridoxal 5-phosphate (PLP)-dependent enzyme that converts L-dopa into dopamine, which is expressed ubiquitarily and similar to the ODC concerning its operation mode [16–18]. Additionally, DDC influences the synthesis of serotonin, tryptamine, phenylethylamine, and histamine [19]. In a former study, we could show that TAs have an influence on the expression of DDC in healthy pregnancies [19].

The degradation process of TAs is similar to the degradation and the synthesis of dopamine and serotonin [10,20]. Dopamine itself induces the synthesis of amines such as epinephrine and norepinephrine. DDC can influence the levels of catecholamines, epinephrine, and norepinephrine [21]. The enzyme DDC so far was investigated especially in neurological and psychiatric diseases due to its neurotransmitter building character [21]. DDC may act as a genetic modifier of the response to neurological treatment with L-dopa during Parkinson's disease [22]. For different tumors such as neuroendocrine tumors, neuroblastoma, or prostate cancer, DDC is regarded as a biomarker [17]. High DDC expression has been observed in small-cell lung carcinoma (SCLC), neuroblastoma, pheochromocytoma, and in peritoneal dissemination of gastric carcinoma [17]. DDC is also known as a positive prognostic factor in colorectal adenocarcinoma, where the overall survival rate is higher in patients with a higher level of DDC expression [17].

DDC further influences the expression of dopaminergic D2 receptor (D2R) [23]. D2R is especially examined in neurological diseases such as Parkinson's disease, dementia, or depression [24].

Epinephrine is a ligand that binds to D2R. It is an amine induced by dopamine, which is synthesized by the DDC. A defect of DDC causes a minor amount of catecholamines and neurotransmitters, such as dopamine and hence a minor amount of epinephrine [25,26]. Epinephrine is a physiological transmitter of the sympathetic nerve system [27]. This transmitter can bind to adrenoreceptors [28]. DDC is co-expressed with G-protein coupled receptors such as α and β adrenoreceptors (AR) in tumor cells [18].

Lüthy et al. (2009) described the function of α - and β -AR in breast structures and breast cancer, as well as their occurrence in other cancer identities [29]. Increased epinephrine levels can inhibit apoptosis in prostate cancer and stimulate tumor growth through the cAMP pathway in mice [30].

The binding of epinephrine onto the G-protein coupled ARs can stimulate or inhibit the adenylylase (PKA) depending on the G-protein, which is bound. PKA influences the cAMP levels of the cell, which regulate the hormones syntheses of steroids and estrogen on a nuclear level through a cAMP-responsive element binding protein (CREB) [31,32].

The aim of our study was to analyze the influence of DDC expression in breast cancer cells *in vivo* and *in vitro* and to specify the interaction of G-protein coupled receptors with epinephrine. Additionally, we further investigated the signaling pathway of the DDC for the viability of breast cancer cells.

2. Results

2.1. DDC Protein Expression in Primary Breast Cancer

Via immunohistochemical analysis of 235 samples of breast cancer, a significant upregulation of DDC protein expression could be observed in primary breast cancer with a tumor size below pT2 ($r = -0.147$; $p = 0.032$) (Figure 1). Additionally, an upregulation of DDC expression could be analyzed via immunohistochemistry with higher tumor grading (G1–G2 $p = 0.013$; G1–G3 $p = 0.008$) (Figure 2). An overexpression of DDC protein expression (intensity ≥ 2 , $n = 109$) in the primary tumor was associated with a significantly longer overall survival ($p = 0.03$) of patients in the cohort compared to patients without a DDC overexpression ($n = 126$) dependent on the size of the tumor (Figure 3). A high expression of DDC is correlated with the tumor size and is a positive factor for the overall survival of breast cancer patients. Additionally, we detected a negative correlation with nuclear TAAR1 ($cc = -0.175$; $p = 0.010$) (Table S1). No correlation could be observed between DDC expression in primary breast carcinoma and the histological subtypes, luminal A or B classification, progesterone receptor status (PR), estrogen receptor status (ER), HER-2 status, HER-4 status, age, or lymph node status.

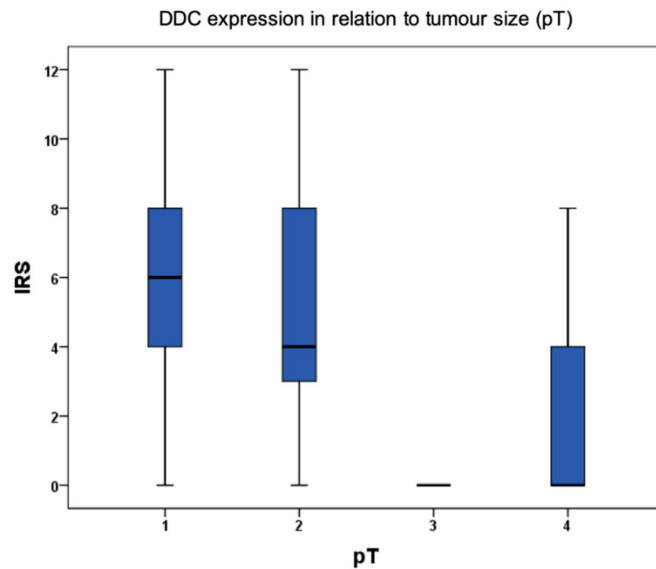


Figure 1. Dopa decarboxylase (DDC) protein expression in breast cancer cells according to tumor size. Boxplot of DDC protein expression in breast cancer in relation to tumor size and correspondent immunoreactive score (IRS) ($r = -0.147$; $p = 0.032$).

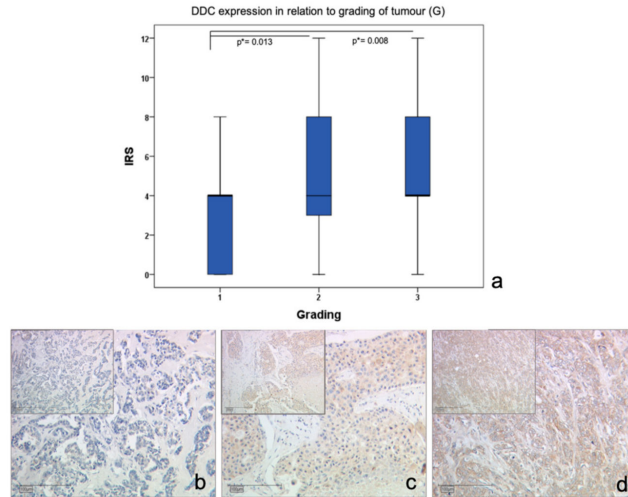


Figure 2. DDC protein expression in breast cancer cells according to tumor grading. (a) Boxplot of DDC protein expression in breast cancer according to their grading (* significant p -value), (b) DDC staining in breast cancer (grading 1) with IRS = 2, 10 \times and 25 \times magnification, (c) DDC staining in breast cancer (G2) with IRS = 4, 10 \times and 25 \times magnification, (d) DDC staining in breast cancer (G3) with IRS = 6, 10 \times and 25 \times magnification.

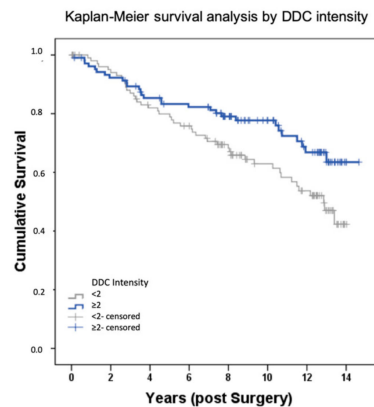


Figure 3. Influence of DDC expression on overall survival (OS) of patients with early breast cancer. Kaplan–Meier curve showing the association between an increased DDC expression (Intensity ≥ 2 , $n = 109$; Intensity < 2 , $n = 126$) and a longer overall survival ($p = 0.03$).

2.2. Influence of Epinephrine on DDC Protein Expression in MCF7 and T47D Breast Cancer Model Cells

The incubation of T47D cells with 10 μM epinephrine induced a significant downregulation of DDC protein expression ($p = 0.038$) in our Western blot analysis (Figure 4). In MCF7 cells, an upregulation trend in DDC protein expression could be observed ($p = 0.051$) that is not significant through the incubation with 10 μM epinephrine after 6 h (Figure 4).

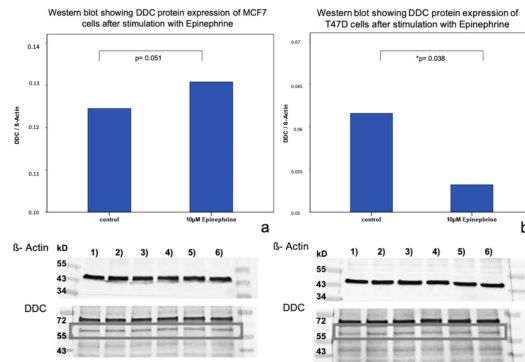


Figure 4. Western Blot analysis of DDC protein expression in MCF7 and T47D cells after stimulation with epinephrine. (a) Bar chart of DDC expression in MCF7 cells after incubation with 10 μ M epinephrine. Epinephrine led to an increase of DDC protein expression ($p = 0.051$) that was not significant. 1)–6) Western blot membranes after incubation with β -actin and DDC antibodies (marked with gray box). 1) 3) 5): control samples. 2) 4) 6): stimulated samples with 10 μ M epinephrine. (b) Bar chart of DDC expression in T47D cells after incubation with 10 μ M epinephrine (* significant p -value). Epinephrine induced a significant downregulation of DDC protein expression ($p = 0.038$). 1)–6) show Western blot membranes after incubation with β -actin and DDC antibodies (marked with a gray box). 1) 3) 5): control samples. 2) 4) 6): stimulated samples with 10 μ M epinephrine.

2.3. Viability of MCF7 and T47D Cells after Stimulation with Epinephrine

WST-1 Assay. Stimulation of both cell lines (MCF7, T47D) with 1 μ M epinephrine for 48 h led to a significantly decreased proliferation of MCF7 cells ($p = 0.028$) in comparison to unstimulated MCF7 control cells (Figure 5). In contrast, T47D cells showed a significantly increased viability ($p = 0.028$) after stimulation with epinephrine in comparison to unstimulated T47D control cells (Figure 5).

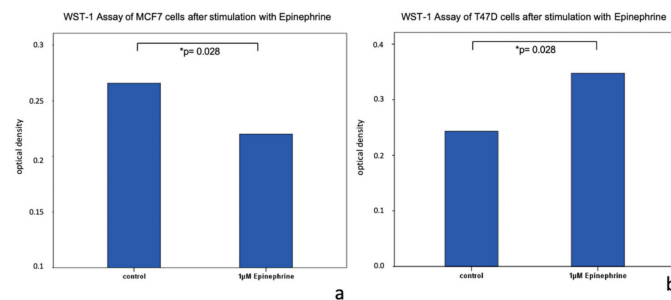


Figure 5. WST-1 assay of MCF7 and T47D cells stimulated with epinephrine. (a) Bar chart of optical density of MCF7 cells after incubation with 1 μ M epinephrine for 48 h. Epinephrine induced a decrease of cell proliferation ($p = 0.028$; * significant p -value). (b) Bar chart of optical density of T47D cells after incubation with 1 μ M epinephrine for 48 h. Epinephrine induced an increase of cell proliferation ($p = 0.028$; * significant p -value).

2.4. Influence of Epinephrine on G_i - Protein -Expression in MCF7 and T47D Breast Cancer Model Cells

Incubation of T47D cells with 10 μ M epinephrine for 6 h induced no significant difference in G_i - protein expression ($p = 0.859$). In contrast, MCF7 cells showed a significant change in G_i - protein

expression. After an incubation with 10 μ M epinephrine for 6 h, a significant upregulation of G_i - protein expression was observed ($p = 0.008$) (Figure 6). Furthermore, unstimulated MCF7 and T47D cells differed in their total expression of G_i - protein. MCF7 unstimulated cells expressed significantly less G_i - protein than unstimulated T47D cells ($p = 0.008$) (Figure 7). A trend of enhanced G_i - protein expression ($p = 0.051$) could be observed between MCF7 and T47D stimulated cells (Figure 7).

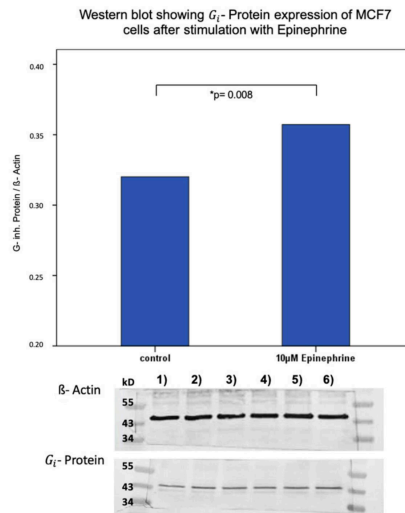


Figure 6. Western blot analysis of G_i -protein expression in MCF7 cells after stimulation with epinephrine. Bar chart of G_i - protein expression in MCF7 cells after incubation with 10 μ M epinephrine. Epinephrine induced a significant upregulation of G_i - protein expression ($p = 0.008$; * significant p -value). 1)–6) Western blot membranes after incubation with β -actin and G_i - protein antibodies. 1) 3) 5): control samples. 2) 4) 6): stimulated samples with 10 μ M epinephrine (Figure S1).

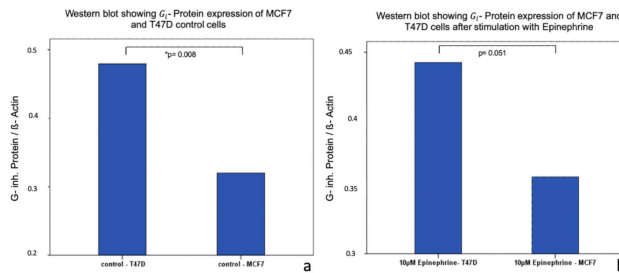


Figure 7. Western blot analysis of G_i - protein expression in MCF7 and T47D cells after stimulation with epinephrine. (a) Bar chart of G_i - protein expression in T47D and MCF7 control cells. There is a significant lower of expression of G_i - protein ($p = 0.008$; * significant p -value). (b) Bar chart of G_i - protein expression in MCF7 and T47D cells after incubation with 10 μ M epinephrine have a tendency for a higher expression of G_i - protein in T47D cells after stimulation than in MCF7 cells after stimulation with 10 μ M epinephrine ($p = 0.051$).

3. Discussion

In this study, DDC expression has been analyzed *in vivo* and *in vitro* in MCF7 and T47D breast cancer cells. Additionally, the influence of epinephrine on the DDC expression has been analyzed. We focused on the signaling pathway of the G_i -protein coupled receptor (G_i -PcR) of the adrenergic system to analyze the effect of epinephrine in breast cancer cells. In a previous study, we investigated that TAAR1 overexpression ($IRS \geq 6$) is a positive prognostic marker for the OS in early breast cancer. TAAR1 is regulated by trace amines (Tas) [14]. The synthesis of TAs and catecholamines such as epinephrine is processed by similar enzymes, ODC and DDC. The latter is a positive prognostic factor for the overall survival of breast cancer patients. This prognostic factor *in vivo* is regulated through stimulation with epinephrine, which we could analyze via Western blot analysis. Zhang et al. (2018) already described the influence of TAs on TAAR1 and the dopaminergic release in neuronal cells. The different effect on the different locations of TAAR1 (intra- and extracellular) is explained through the specific interaction and location of the D_2 receptors. In cells stimulated with TAs, L-Dopa seems to be upregulated through the signaling pathway via TAAR1, increasing cAMP and PKA. There is a negative correlation between DDC in cytoplasm, which metabolizes L-Dopa and nuclear TAAR1 through a feedback loop or shuttling process [33,34].

We detected a difference in the two investigated cell lines MCF7 and T47D on their reaction on epinephrine stimulation. Radde et al. (2014) already described bioenergetic differences for MCF7 and T47D by their estrogen receptor (ER) positivity concerning their behavior under stimulation with estrogen and tamoxifen [35]. According to Radde et al., the cell lines differ in their oxygen consumption rate, ATP level, proton leak, and the relation between mitochondrial and nuclear DNA. Furthermore, the reaction on 4-hydroxytamoxifen, an ER targeted therapy, diverged from increasing or decreasing the tolerance in oxygenic stress [35]. Both cell lines vary in their expression of progesterone (PR) and ER. MCF7 cells express a higher level of ER than PR, whereas T47D cells express a higher level of PR [36]. Additionally, the cells differ in their amount of G_i -PcR, as our results showed. This finding could be seen in a context with other G-PcRs such as the G-PcR 81. This receptor modulates the biology and microenvironment of breast cancer and was identified as a tumor-promoting receptor in breast cancer progression by Lee et al [37].

In our study, the cell lines showed different results of DDC expression on protein level and different viability levels after stimulation with epinephrine. Brandie et al. and Barzegar et al. already showed in their investigation that MCF7 and T47D cell lines differ in various bioenergetic or apoptosis characteristics [35,38]. In accordance with their results, we could show that MCF7 and T47D as well differ in their viability depending on the stimulus of epinephrine. The exact interesting pathway stimulated by epinephrine is part of further investigations. So far, Jahanafrooz et al. showed similar interesting results with a natural polyphenol, Silibinin, which caused a cell cycle arrest that was equal with the viability in MCF7 cells but not in T47D cells [39]. Tremmel et al. showed in their latest study that MCF7 and T47D cells show different effect after T1AM stimulation on TAAR1 expression and that T47D cells seem to need estrogen supplementation in this case. [14] We further focused on G_i -PcR, which interacts with epinephrine [40]. Our results showed a higher reaction of MCF7 cells after stimulation with epinephrine, as the G_i -PcR expression after stimulation with epinephrine increased significantly in MCF7 cells.

Additionally, DDC protein expression in MCF7 cells was increased compared to T47D cell expression after stimulation with epinephrine.

Earlier studies showed that the viability of MCF7 cells is sensitive on estrogen level, whereas T47D cells are estrogen resistant [14,41]. The estrogen level is regulated through G_i -PcR similar to the α -AR, which is expressed in breast cancer cells [29].

Meta-analysis already showed a better clinical outcome depending on the AR status for breast carcinoma patients [42]. In ER-positive breast cancer cells, AR confers to be a good prognostic factor [43]. In ER-negative cases, the involvement of AR in promoting cell proliferation has also been observed [44].

Through stimulation with epinephrine, which acts via ARs, MCF7 cell viability and metabolism was reduced. MCF7 cell viability and metabolism is estrogen dependent [45]. The level of estrogen seems to drop under stimulation with epinephrine. Less estrogen leads to a reduction of the MCF7 cell viability and metabolism. This finding is in line with the investigation of O' Mahony et al. (2012), who focused on the impact of estradiol on the metabolism of glycolysis of MCF7 cells and showed that in a setting of low extracellular glucose levels, *17-estradiol* rescues cell viability through the upregulation of ATP and the activity of pyruvate dehydrogenase, which induces the tricarboxylic acid cycle and suppresses glycolysis [46].

Ouyang et al. showed an increased malignancy in breast cancer cells after chronic stress, which indicates that there is a difference between the chronic and acute effect of epinephrine and a difference in vivo and in vitro [47]. Furthermore, the viability of MCF7 cells compared with the viability of T47D cells seems to be more influenced by the epinephrine stimulation. Epinephrine acts through the G_i-PcR. Both cell lines have a different sensitivity for the stimulation with epinephrine, which is in accordance with the different expression levels of G_i-PcR after stimulation. Steroids, such as estrogen or catecholamines, regulate the growth and development of the mammary gland as well as the development of breast neoplasms [41]. Stimulation with estrogen induces an in vitro proliferation of hormone-dependent breast cancer cells [48,49]. Epinephrine is able to downregulate the steroid and estrogen syntheses [50]. This is in line with our research results, indicating that epinephrine seems to induce a downregulation of estrogen synthesis and an upregulation of G_i-PcR in MCF7 cells. This signaling pathway should be part of further investigations. The signaling latter known so far involves the cAMP-nuclear binding element (CREB), which is regulated through the cAMP level [33]. cAMP is a product of the adenylate cyclase, which is inhibited through G_i-PcR. Aims of future studies include further investigation of the functional interaction between G_i-PcR and the DDC in breast cancer tissue and cells. Analyses of the signaling pathways of the endogenous ligands and a possible re-examination of adrenergic signaling in breast cancer need to be done.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

Breast cancer samples were collected from 235 patients, who underwent surgery due to a malignant breast tumor at the Department of Gynaecology and Obstetrics of the Ludwig-Maximilians University hospital, Munich, Germany. Patient data were taken from patient charts or the Munich Cancer Registry. No positive family history nor metastases were recorded in any of those cases. Over 50% of the patients were diagnosed with a tumor size smaller than 2 cm (n(pT1) = 153 (68%); n(pT2) = 66 (29.3%); n(pT3) = 1 (0.4%); n(pT4) = 5 (2.2%)). No lymph node metastases at the point of diagnosis were recorded in 56.7% of the patients. Further grading, Her2 status, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and luminal classification was performed on the samples (Table 1). The mean age was 58.2 ± 13.3 years. The mean survival was 12.2 years (95% CI: 11.6–12.8 years), and 49 deaths were documented, while a mean follow-up of 9.8 years was reached.

Table 1. Patient's characteristics.

Patient's Characteristics		n=
<i>size</i>		
	pT1	135 (68%)
	pT2	66 (29.3%)
	pT3	1 (0.4%)
	pT4	5 (2.2%)
<i>grading</i>		
	G1	16
	G2	84
	G3	57
<i>receptor status</i>		
Her2	positive	26
	negative	208
ER	positive	192
	negative	43
PR	positive	141
	negative	94
<i>luminal</i>		
	A	103
	B	74
<i>mean age</i>		
	58.2 years ± 13.3	

4.2. Ethical Approval and Informed Consent

All procedures involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the Helsinki declaration of 1964 and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the local ethics committee of the Ludwig-Maximilians University of Munich (reference number of approvals: 337-06, approval date: 26 January 2010).

4.3. Immunohistochemistry

Tissue samples were fixed in 3.7% formalin and embedded with paraffin. Formalin-fixed paraffin-embedded sections (3 µm) were deparaffinized in Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), rehydrated, and blocked with 6% H₂O₂/methanol for 20 min to deactivate the endogenous peroxidase. For rehydration of the slides, an alcohol gradient up to distilled water was used. In sodium citrate (pH = 6.0), the slides were cooked under pressure. A blocking solution was used to prevent the primary antibody from binding unspecifically (Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin, Germany). After preparing the tissue sections, they were incubated with the primary DDC antibody for 16 h at 4 °C (Table 2). Reactivity was detected by using the ZytoChem Plus HRP Polymer System (mouse/rabbit) (Zytomed, catalog-ID: POLHRP-100, Source BioScience, Nottingham, UK) in accordance to the manufacturer's protocol, and staining and counterstaining were carried out with DAB and hemalum, respectively. Appropriate positive controls (placenta tissue) were included in each experiment. Each slide was evaluated with the semi-quantitative immunoreactive score (IRS) using a Leitz Diaplan microscope (Leitz, Wetzlar, Germany). The IRS calculation works by multiplying the intensity of cell staining (0: none; 1: weak; 2: moderate; 3: strong) with the percentage of positively stained cells (0: no staining; 1: <10% of the cells; 2: 11–50%; 3: 51–80%; 4: >80%).

Table 2. Features of the antibodies used for staining.

Antibody	Incubation	Blocking Solution	Blocking Condition
DDC, Polyclonal (Rabbit IgG, LSBio)	1:300 in PBS 16 h at 4 °C	Reagent I (Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin, Germany)	5 min

4.4. Cell Culturing and Cell Stimulation

The cell lines MCF7 and T47D were used as models for the ductal breast carcinoma. The cells were cultured in DMEM (3.7 g/L NaHCO₃, 4.5 g/L D-glucose, 1.028 g/L stable glutamine, and Na-Pyruvate; Biochrom, Berlin, Germany). After adding 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Biochrom) to the medium the solution was incubated at an atmospheric CO₂ concentration of 5% and at 37 °C in an incubator to lyse.

MCF7 and T47D cells were separately grown in sterile 12 multi-well slides at a density of 500,000 cells/mL DMEM with 10% FCS. The medium was changed after 4 h to pure DMEM without any FCS. After 20 h, the cells were stimulated with 1 µM epinephrine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany). The cells were stimulated for 6 h with 10 µM epinephrine in the case of Western blot samples. Control cells were incubated in parallel without any stimulants.

4.5. Western Blot

Stimulated cells were lysed for 30 min at 4 °C with 200 µL buffer solution consisting of a 1:100 dilution of protease inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in RIPA buffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer, Sigma-Aldrich). Afterwards, the lysates were centrifugated, and a Bradford protein assay of the supernatant was performed. During Western blot, the proteins were separated according to their molecular weight using SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The membrane was blocked for 1 h in a receptacle containing Marvel-TBST for DDC-staining or containing of 1× Casein Solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for β-actin and G_i- staining (a Gα- protein inhibitor staining), against unspecific binding. The primary antibody Anti-DDC (polyclonal Rabbit IgG, LSBio) was diluted in a 1:1000 in Marvel-TBST (TBS + TWEEN and milk powder). The antibody Anti-β-Actin (Clone AC-15, Mouse IgG, Sigma) was diluted in 1:1000, the antibody Anti- (polyclonal Rabbit IgG, Novus biological, Littleton, CO, USA) was diluted in 1:500 in casein, each according to the suggestion of the producer. The antibody Anti-DDC was applied for 1 h at room temperature. The antibodies for Anti-β-Actin and Anti-G_i- were applied for 16 h at 4 °C. After rinsing with TBST, the membrane was incubated with biotinylated Anti-Rabbit IgG antibody and ABC-AmP reagent (both VECTASTAIN ABC-AmP Kit for rabbit IgG, Vector Laboratories) for DDC, β-Actin, and G_i- Protein following the manufacturer's protocol. BCIP/NBT chromogenic substrate (Vectastain ABC-AmP Kit, Vector Laboratories) showed specific bands on the membrane. Detection was performed with Bio-Rad Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the bands were quantified using Bio-Rad Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). Each Western blot experiment was validated nine times (*n* = 9).

4.6. WST-1 Assay

MCF7 and T47D cells were separately grown on sterile 96 multi-well slides at a density of 10.000 cells/mL DMEM containing 10% FCS. The medium was changed after 4 h to pure DMEM. After 16 h, cells were stimulated for 48 h with 1 µM epinephrine. The stimulants were renewed every 12 h. Control groups were incubated in pure DMEM. After stimulation, the reagent WST-1 water soluble tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was applied in order to specify the mitochondrial succinate-tetrazolium dehydrogenase system of the stimulated cells. After 30 min of incubation with WST-1 in the incubator, cell viability was measured with a multi-well spectrophotometer at a wavelength of 420–480 nm. Each WST-1 Assay was validated nine times (*n* = 9).

4.7. Statistics

Data collection, processing, and analysis of statistical data were transacted with IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp. A significance level two-sided of 5% was used for all statistical tests. Kaplan–Meier curve analyses was performed to detect the overall survival rate. Non-parametric Mann–Whitney U test, Kruskal–Wallis one-way analysis of variance, or a two-sample *t*-test were performed to compare the central tendency. A Wilcoxon signed-rank test was used for statistical analysis of cell culture experiments. For DDC immunohistochemistry, an immunoreactive score (IRS) was used for each stained sample. The score obtains the values of the counted most perceived cells (IS = color intensity) multiplied by the positive cells (PP = percentage points).

5. Conclusions

L-dopa-decarboxylase could be identified as one positive prognosticator for breast cancer patients with primary tumors. Epinephrine, as a substrate of the DDC, influences the viability of breast cancer cells in vitro. DDC may represent a novel target for the prevention and treatment of breast cancer.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9565/s1>.

Author Contributions: A.V., U.J., E.T., and N.D. conceived and designed the experiments. E.T. and C.K. performed the experiments. A.V., U.J., E.T., C.K., and T.K. analyzed the data. E.T., A.V. and U.J. wrote the research article. S.M., T.K., T.V., D.M. and N.D. interpreted the results and revised the manuscript. All authors contributed toward data analysis, drafting and revising the paper and agree to be accountable for all aspects of the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded by the Bayerische Gleichstellungsförderung grant (2016/2017) of Bavaria, Germany, and by the Foundation of the Frankfurter Allgemeinen Zeitung (FAZIT) foundation grant (2017/2018) of Germany.

Acknowledgments: We thank Simone Hofmann for technical assistance.

Conflicts of Interest: Research support, advisory board, honoraria, and travel expenses from AstraZeneca, Clovis, Medac, MSD, Novartis, PharmaMar, Roche, Sensor Kinesis, Tesaro, Teva have been received by S.M. The other authors report no conflicts of interest in this work.

Abbreviations

DDC	L-dopa decarboxylase
TAAR1	trace amine-associated receptor 1
OS	overall survival
TAs	trace-amines
AR	adrenoreceptors
PKA	adenylcyclase
CREB	cAMP-responsive element binding protein
G _i -PcR	G _i - protein coupled receptor
ER	estrogen receptor
PR	progesterone receptor
WST-1	water soluble tetrazolium
D2R	dopaminergic D2 receptor

References

1. Harbeck, N.; Gnant, M. Breast cancer. *Lancet* **2017**, *389*, 1134–1150. [[CrossRef](#)]
2. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Turken, O.; NarIn, Y.; DemIrbas, S.; Onde, M.E.; Sayan, O.; KandemIr, E.G.; Yaylac, I.M.; Ozturk, A. Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast Cancer Res. BCR* **2003**, *5*, R110–R113. [[CrossRef](#)]
5. Rasmussen, B.; Feldt-Rasmussen, U.; Hegedus, L.; Perrild, H.; Bech, K.; Hoier-Madsen, M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1987**, *23*, 553–556. [[CrossRef](#)]
6. Kuijpers, J.L.; Nyklictek, I.; Louwman, M.W.; Weetman, T.A.; Pop, V.J.; Coebergh, J.W. Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **2005**, *15*, 1253–1259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sogaard, M.; Farkas, D.K.; Ehrenstein, V.; Jorgensen, J.O.; Dekkers, O.M.; Sorensen, H.T. Hypothyroidism and hyperthyroidism and breast cancer risk: A nationwide cohort study. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, 409–414. [[CrossRef](#)]
8. Ditsch, N.; Liebhardt, S.; Von Koch, F.; Lenhard, M.; Vogeser, M.; Spitzweg, C.; Gallwas, J.; Toth, B. Thyroid function in breast cancer patients. *Anticancer Res.* **2010**, *30*, 1713–1717.
9. Hoefig, C.S.; Zucchi, R.; Kohrle, J. Thyronamines and Derivatives: Physiological Relevance, Pharmacological Actions, and Future Research Directions. *Thyroid* **2016**, *26*, 1656–1673. [[CrossRef](#)]
10. Harmeyer, A.; Obermueller, S.; Meyer, C.A.; Revel, F.G.; Buchy, D.; Chaboz, S.; Dernick, G.; Wettstein, J.G.; Iglesias, A.; Rolink, A.; et al. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3beta signaling of TAAR1 and D2R heteromers. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2015**, *25*, 2049–2061. [[CrossRef](#)]
11. Brix, K.; Fuhrer, D.; Biebertmann, H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action-known facts and future perspectives. *Thyroid Res.* **2011**, *4* (Suppl. 1), S9. [[CrossRef](#)]
12. Borowsky, B.; Adham, N.; Jones, K.A.; Raddatz, R.; Artymyshyn, R.; Ogozalek, K.L.; Durkin, M.M.; Lakhani, P.P.; Bonini, J.A.; Pathirana, S.; et al. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8966–8971. [[CrossRef](#)]
13. Barak, L.S.; Salahpour, A.; Zhang, X.; Masri, B.; Sotnikova, T.D.; Ramsey, A.J.; Violin, J.D.; Lefkowitz, R.J.; Caron, M.G.; Gainetdinov, R.R. Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 585–594. [[CrossRef](#)]
14. Tremmel, E.; Hofmann, S.; Kuhn, C.; Heidegger, H.; Heublein, S.; Hermelink, K.; Wuerstlein, R.; Harbeck, N.; Mayr, D.; Mahner, S.; et al. Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration. *Breast Cancer Targets Ther.* **2019**, *11*, 87–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vattai, A.; Akyol, E.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Heidegger, H.; von Koch, F.; Hermelink, K.; Wuerstlein, R.; Harbeck, N.; Mayr, D.; et al. Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
16. Vassiliou, A.G.; Fragoulis, E.G.; Vassilacopoulou, D. Detection, purification and identification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human placenta. *Neurochem. Res.* **2009**, *34*, 1089–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Kontos, C.K.; Papadopoulos, I.N.; Fragoulis, E.G.; Scorilas, A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of L-DOPA decarboxylase in colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1384–1390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wafa, L.A.; Cheng, H.; Plaa, N.; Ghaidi, F.; Fukumoto, T.; Fazli, L.; Gleave, M.E.; Cox, M.E.; Rennie, P.S. Carbidopa abrogates L-dopa decarboxylase coactivation of the androgen receptor and delays prostate tumor progression. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2835–2844. [[CrossRef](#)]
19. Gratz, M.J.; Stavrou, S.; Kuhn, C.; Hofmann, S.; Hermelink, K.; Heidegger, H.; Hutter, S.; Mayr, D.; Mahner, S.; Jeschke, U.; et al. Dopamine synthesis and dopamine receptor expression are disturbed in recurrent miscarriages. *Endocr. Connect.* **2018**, *7*, 727–738. [[CrossRef](#)]
20. Guenter, J.; Lenartowski, R. Molecular characteristic and physiological role of DOPA-decarboxylase. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* **2016**, *70*, 1424–1440. [[CrossRef](#)]
21. Portaro, S.; Gugliandolo, A.; Scionti, D.; Cammaroto, S.; Morabito, R.; Leonardi, S.; Fraggetta, F.; Bramanti, P.; Mazzon, E. When dysphoria is not a primary mental state: A case report of the role of the aromatic L-aminoacid decarboxylase. *Medicine* **2018**, *97*, e10953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Devos, D.; Lejeune, S.; Cormier-Dequaire, F.; Tahiri, K.; Charbonnier-Beaupel, F.; Rouaix, N.; Duhamel, A.; Sablonniere, B.; Bonnet, A.M.; Bonnet, C.; et al. Dopa-decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to L-dopa in Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* **2014**, *20*, 170–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Vallar, L.; Muca, C.; Magni, M.; Albert, P.; Bunzow, J.; Meldolesi, J.; Civelli, O. Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types. Stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in LtK- fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca²⁺ concentration decrease in GH4C1 cells. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10320–10326. [[PubMed](#)]
24. Kaczor, A.A.; Jorg, M.; Capuano, B. The dopamine D2 receptor dimer and its interaction with homobivalent antagonists: Homology modeling, docking and molecular dynamics. *J. Mol. Model.* **2016**, *22*, 203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hyland, K.; Clayton, P.T. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J. Inherit. Metab. Dis.* **1990**, *13*, 301–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pons, R.; Ford, B.; Chiriboga, C.A.; Clayton, P.T.; Hinton, V.; Hyland, K.; Sharma, R.; De Vivo, D.C. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: Clinical features, treatment, and prognosis. *Neurology* **2004**, *62*, 1058–1065. [[CrossRef](#)]
27. Sensenbach, W.; Madison, L.; Ochs, L. A comparison of the effects of 1-norepinephrine, synthetic 1-epinephrine, and U.S.P. epinephrine upon cerebral blood flow and metabolism in man. *J. Clin. Investig.* **1953**, *32*, 226–232. [[CrossRef](#)]
28. Taylor, B.N.; Cassagnol, M. Alpha Adrenergic Receptors. In *StatPearls*; StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island, FL, USA, 2019.
29. Luthy, I.A.; Bruzzone, A.; Pinero, C.P.; Castillo, L.F.; Chiesa, I.J.; Vazquez, S.M.; Sarappa, M.G. Adrenoceptors: Non Conventional Target for Breast Cancer? *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1850–1862. [[CrossRef](#)]
30. Hassan, S.; Karpova, Y.; Flores, A.; D'Agostino, R.; Danhauer, S.C.; Hemal, A.; Kulik, G. A pilot study of blood epinephrine levels and CREB phosphorylation in men undergoing prostate biopsies. *Int. Urol. Nephrol.* **2014**, *46*, 505–510. [[CrossRef](#)]
31. Karamouzis, M.V.; Konstantinopoulos, P.A.; Papavassiliou, A.G. Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Res.* **2007**, *17*, 324–332. [[CrossRef](#)]
32. Shaywitz, A.J.; Greenberg, M.E. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 821–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhang, X.; Mantas, I.; Alvarsson, A.; Yoshitake, T.; Shariatgorji, M.; Pereira, M.; Nilsson, A.; Kehr, J.; Andr n, P.E.; Millan, M.J.; et al. Striatal Tyrosine Hydroxylase Is Stimulated via TAAR1 by 3-Iodothyronamine, But Not by Tyramine or β -Phenylethylamine. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, Y.; Tu, K.; Liu, D.; Guo, L.; Chen, Y.; Li, Q.; Maiers, J.L.; Liu, Z.; Shah, V.H.; Dou, C.; et al. p300 Acetyltransferase Is a Cytoplasm-to-Nucleus Shuttle for SMAD2/3 and TAZ Nuclear Transport in Transforming Growth Factor β -Stimulated Hepatic Stellate Cells. *Hepatology* **2019**, *70*, 1409–1423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Radde, B.N.; Ivanova, M.M.; Mai, H.X.; Salabei, J.K.; Hill, B.G.; Klinge, C.M. Bioenergetic differences between MCF-7 and T47D breast cancer cells and their regulation by oestradiol and tamoxifen. *Biochem. J.* **2015**, *465*, 49–61. [[CrossRef](#)]
36. Kalkhoven, E.; Kwakkenbos-Isbr cker, L.; de Laat, S.W.; van der Saag, P.T.; der Burg, B.v. Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1994**, *102*, 45–52. [[CrossRef](#)]
37. Lee, Y.J.; Shin, K.J.; Park, S.A.; Park, K.S.; Park, S.; Heo, K.; Seo, Y.K.; Noh, D.Y.; Ryu, S.H.; Suh, P.G. G-protein-coupled receptor 81 promotes a malignant phenotype in breast cancer through angiogenic factor secretion. *Oncotarget* **2016**, *7*, 70898–70911. [[CrossRef](#)]
38. Barzegar, E.; Fouladdel, S.; Movahhed, T.K.; Atashpour, S.; Ghahremani, M.H.; Ostad, S.N.; Azizi, E. Effects of berberine on proliferation, cell cycle distribution and apoptosis of human breast cancer T47D and MCF7 cell lines. *Iran. J. Basic Med Sci.* **2015**, *18*, 334–342.
39. Jahanafrooz, Z.; Motameh, N.; Bakhshandeh, B. Comparative Evaluation of Silibinin Effects on Cell Cycling and Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 and T47D Cell Lines. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2016**, *17*, 2661–2665.

40. Gargiulo, L.; May, M.; Rivero, E.M.; Copsel, S.; Lamb, C.; Lydon, J.; Davio, C.; Lanari, C.; Lüthy, I.A.; Bruzzone, A. A Novel Effect of β -Adrenergic Receptor on Mammary Branching Morphogenesis and its Possible Implications in Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2017**, *22*, 43–57. [[CrossRef](#)]
41. King, R.J. A discussion of the roles of oestrogen and progestin in human mammary carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *39*, 811–818. [[CrossRef](#)]
42. Vera-Badillo, F.E.; Templeton, A.J.; de Gouveia, P.; Diaz-Padilla, I.; Bedard, P.L.; Al-Mubarak, M.; Seruga, B.; Tannock, I.F.; Ocana, A.; Amir, E. Androgen receptor expression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *106*, dji319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Elebro, K.; Bendahl, P.O.; Jernstrom, H.; Borgquist, S. Androgen receptor expression and breast cancer mortality in a population-based prospective cohort. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *165*, 645–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fujii, R.; Hanamura, T.; Suzuki, T.; Gohno, T.; Shibahara, Y.; Niwa, T.; Yamaguchi, Y.; Ohnuki, K.; Kakugawa, Y.; Hirakawa, H.; et al. Increased androgen receptor activity and cell proliferation in aromatase inhibitor-resistant breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *144*, 513–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Stanislawska-Sachadyn, A.; Sachadyn, P.; Limon, J. Transcriptomic Effects of Estrogen Starvation and Induction in the MCF7 Cells. The Meta-analysis of Microarray Results. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2015**, *17*, 161–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. O'Mahony, F.; Razandi, M.; Pedram, A.; Harvey, B.J.; Levin, E.R. Estrogen modulates metabolic pathway adaptation to available glucose in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **2012**, *26*, 2058–2070. [[CrossRef](#)]
47. Ouyang, X.; Zhu, Z.; Yang, C.; Wang, L.; Ding, G.; Jiang, F. Epinephrine increases malignancy of breast cancer through p38 MAPK signaling pathway in depressive disorders. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, *12*, 1932–1946.
48. van der Burg, B.; van Selm-Miltenburg, A.J.P.; de Laat, S.W.; van Zoelen, E.J.J. Direct effects of estrogen on c-fos and c-myc protooncogene expression and cellular proliferation in human breast cancer cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1989**, *64*, 223–228. [[CrossRef](#)]
49. Patel, S. Breast cancer: Lesser-known facets and hypotheses. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *98*, 499–506. [[CrossRef](#)]
50. Li, J.; Zhou, Q.; Ma, Z.; Wang, M.; Shen, W.-J.; Azhar, S.; Guo, Z.; Hu, Z. Feedback inhibition of CREB signaling by p38 MAPK contributes to the negative regulation of steroidogenesis. *Reprod. Biol. Endocrinol. RB&E* **2017**, *15*, 19. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Literaturverzeichnis

1. Schäffeler N, Enck P, Riessen I, et al. [Screening for mental stress and the wish for psychological support in patients with breast cancer]. *Zeitschrift für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie*. 2010;56(2):207-219.
2. Arnold M, Karim-Kos HE, Coebergh JW, et al. Recent trends in incidence of five common cancers in 26 European countries since 1988: Analysis of the European Cancer Observatory. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2015;51(9):1164-1187.
3. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet (London, England)*. 2016.
4. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015;24(10):1495-1506.
5. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(1):7-33.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-386.
7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015;65(2):87-108.
8. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
9. Inman JL, Robertson C, Mott JD, Bissell MJ. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development*. 2015;142(6):1028-1042.
10. Harbeck N, Gnant M. Breast cancer. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10074):1134-1150.
11. Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten.

12. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
13. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10869-10874.
14. Ravi R, Haider G, Ahmed K, Zahoor S, Sami A, Lata R. Frequency Of Hormone Receptors And Her-2/Neu Receptor Positivity In Different Histology In Breast Cancer Patients. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC*. 2020;32(3):323-326.
15. Dutta V, Chopra GS, Sahai K, Nema SK. Hormone Receptors, Her-2/Neu and Chromosomal Aberrations in Breast Cancer. *Medical journal, Armed Forces India*. 2008;64(1):11-15.
16. Kim KI, Lee KH, Kim TR, Chun YS, Lee TH, Park HK. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Journal of breast cancer*. 2014;17(1):40-46.
17. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2015;26(8):1533-1546.
18. R. Talamini SF, A. Favero, E. Negri, F. Parazzini, and C. La Vecchia. Selected medical conditions and risk of breast cancer
. *British journal of cancer*. 1997;75(11): 1699–1703. :1699–1703.
19. Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, Schleutker J, Sallinen S-L. Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. *Breast Cancer Research*. 2011;13(1):R20.
20. Bauerfeind I. *Manual Mammakarzinome*. Vol 17. Auflage: München, W. Zuckschwerdt Verlag, 2019; 2019.
21. Rijnsburger AJ, Obdeijn IM, Kaas R, et al. BRCA1-associated breast cancers present differently from BRCA2-associated and familial cases: long-term follow-up of the Dutch MRISC Screening Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(36):5265-5273.

22. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(9):2310-2318.
23. AGO Breast Commission Recommendations. Diagnosis and therapy of primary and metastatic breast cancer, 2016. <http://www.ago-online.de/en/guidelines-mamma/>.
24. Bhat SA, Majid S, Wani HA, Rashid S. Diagnostic utility of epigenetics in breast cancer – A review. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2019;19:100125.
25. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA oncology*. 2017;3(9):1190-1196.
26. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2016;59(4):651-672.
27. Titus-Ernstoff L, Longnecker MP, Newcomb PA, et al. Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1998;7(9):783-789.
28. Makarem N, Chandran U, Bandera EV, Parekh N. Dietary fat in breast cancer survival. *Annual review of nutrition*. 2013;33:319-348.
29. Kang C, LeRoith D, Gallagher EJ. Diabetes, Obesity, and Breast Cancer. *Endocrinology*. 2018;159(11):3801-3812.
30. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *Journal of the National Cancer Institute*. 1989;81(24):1879-1886.
31. Yaghjian L, Colditz GA, Collins LC, et al. Mammographic breast density and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women according to tumor characteristics. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(15):1179-1189.
32. Kim Y, Je Y. Vitamin D intake, blood 25(OH)D levels, and breast cancer risk or mortality: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2014;110(11):2772-2784.
33. White ND. Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. *American journal of lifestyle medicine*. 2018;12(3):224-226.
34. Speroff L. The Million Women Study and breast cancer. *Maturitas*. 2003;46(1):1-6.

35. Jafari SH, Saadatpour Z, Salmaninejad A, et al. Breast cancer diagnosis: Imaging techniques and biochemical markers. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(7):5200-5213.
36. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(4):R245-262.
37. Schünemann HJ, Lerda D, Quinn C, et al. Breast Cancer Screening and Diagnosis: A Synopsis of the European Breast Guidelines. *Annals of internal medicine*. 2020;172(1):46-56.
38. Wellings E, Vassiliades L, Abdalla R. Breast Cancer Screening for High-Risk Patients of Different Ages and Risk - Which Modality Is Most Effective? *Cureus*. 2016;8(12):e945.
39. Brodersen J, Siersma VD. Long-term psychosocial consequences of false-positive screening mammography. *Annals of family medicine*. 2013;11(2):106-115.
40. Albert US, Schreer I. [S3 guideline breast cancer: update on early detection, and mammography screening]. *Der Radiologe*. 2019;59(1):13-18.
41. Lofterød T, Frydenberg H, Flote V, et al. Exploring the effects of lifestyle on breast cancer risk, age at diagnosis, and survival: the EBBA-Life study. *Breast cancer research and treatment*. 2020;182(1):215-227.
42. Fisher B, Dignam J, Wolmark N, et al. Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 1999;353(9169):1993-2000.
43. Christgen M, Länger F, Kreipe H. [Histological grading of breast cancer]. *Der Pathologe*. 2016;37(4):328-336.
44. Ditsch N, Toth B, Himsl I, et al. Thyroid hormone receptor (TR)alpha and TRbeta expression in breast cancer. *Histology and histopathology*. 2013;28(2):227-237.
45. Turken O, NarIn Y, Demlrbas S, et al. Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast cancer research : BCR*. 2003;5(5):R110-113.
46. Rasmusson B, Feldt-Rasmussen U, Hegedus L, Perrild H, Bech K, Hoier-Madsen M. Thyroid function in patients with breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23(5):553-556.
47. Kuijpers JL, Nyklictek I, Louwman MW, Weetman TA, Pop VJ, Coebergh JW. Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(11):1253-1259.

48. Gietka-Czernel M. The thyroid gland in postmenopausal women: physiology and diseases. *Menopause Review*. 2017:33-37.
 49. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
50. Krashin E, Piekietko-Witkowska A, Ellis M, Ashur-Fabian O. Thyroid Hormones and Cancer: A Comprehensive Review of Preclinical and Clinical Studies. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10(59).
 51. Davis PJ, Goglia F, Leonard JL. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12.
 52. Davis PJ, Leonard JL, Lin H-Y, Leinung M, Mousa SA. Chapter Four - Molecular Basis of Nongenomic Actions of Thyroid Hormone. In: Litwack G, ed. *Vitamins and Hormones*. Vol 106. Academic Press; 2018:67-96.
 53. Wondisford TMOCMICCCPMFE. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. In: *Comprehensive Physiology*.
 54. Redmond GP. Hypothyroidism and women's health. *International journal of fertility and women's medicine*. 2002;47(3):123-127.
 55. McDermott MT. Hyperthyroidism. *Annals of internal medicine*. 2020;172(7):itc49-itc64.
 56. Hoefig CS, Zucchi R, Köhrle J. Thyronamines and Derivatives: Physiological Relevance, Pharmacological Actions, and Future Research Directions. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2016;26(12):1656-1673.
 57. Harmeier A, Obermueller S, Meyer CA, et al. Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3beta signaling of TAAR1 and D2R heteromers. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(11):2049-2061.
 58. Brix K, Fuhrer D, Biebermann H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid Res*. 2011;4 Suppl 1:S9.
 59. Ada Tosovic¹ CB, Anne-Greth Bondeson¹, Lennart Bondeson³, Ulla-Britt Ericsson⁴, Johan Malm² and Jonas Manjer^{1,5}. Prospectively measured thyroid hormones and thyroid peroxidase antibodies in relation to breast cancer risk. *International journal of cancer*. 2012.

60. J. V. Parle JAF, ' K. W. Cross,t S. C. Jones\$ and M. C. Sheppard'. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clinical endocrinology*. 1991;34:77-83.
61. Isabela M Bensenor¹ RDO, ² Paulo A Lotufo^{1,2}. Hypothyroidism in the elderly: diagnosis and management. *DOVE Press*. 2012;7:97–111.
62. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. *Clinical endocrinology*. 1995;43(1):55-68.
63. Mariotti S, Franceschi C, Cossarizza A, Pinchera A. The aging thyroid. *Endocrine reviews*. 1995;16(6):686-715.
64. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Archives of internal medicine*. 2000;160(4):526-534.
65. Khan SR, Chaker L, Peeters RP, et al. Thyroid Function and Cancer Risk: The Rotterdam Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016;101(12):5030-5036.
66. Tosovic A, Bondeson A-G, Bondeson L, Ericsson U-B, Manjer J. T3 levels in relation to prognostic factors in breast cancer: a population-based prospective cohort study. *BMC Cancer*. 2014;14(1):536.
67. Smyth PP, Smith DF, McDermott EW, Murray MJ, Geraghty JG, O'Higgins NJ. A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(3):937-941.
68. Goldman MB. Thyroid diseases and breast cancer. *Epidemiologic reviews*. 1990;12:16-28.
69. Ron E, Curtis R, Hoffman DA, Flannery JT. Multiple primary breast and thyroid cancer. *British journal of cancer*. 1984;49(1):87-92.
70. Anker GB, Lønning PE, Aakvaag A, Lien EA. Thyroid function in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1998;58(2):103-107.
71. Yokoe T, Iino Y, Takei H, et al. Relationship between thyroid-pituitary function and response to therapy in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res*. 1996;16(4A):2069-2072.
72. Ditsch N, Liebhardt S, Von Koch F, et al. Thyroid function in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2010;30(5):1713-1717.

73. Heublein S, Mayr D, Meindl A, et al. Thyroid Hormone Receptors Predict Prognosis in BRCA1 Associated Breast Cancer in Opposing Ways. *PLoS One*. 2015;10(6):e0127072.
74. Hall JM, McDonnell DP, Korach KS. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*. 2002;16.
75. Hall LC, Salazar EP, Kane SR, Liu N. Effects of thyroid hormones on human breast cancer cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109.
76. M.Y. JN, Marie-Odile B, M. DM, H. AB, S. LM, M. KC. Hyperthyroidism, Hypothyroidism, and Cause-Specific Mortality in a Large Cohort of Women. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2017;27(8):1001-1010.
77. Tseng F-Y, Lin W-Y, Li C-I, Li T-C, Lin C-C, Huang K-C. Subclinical Hypothyroidism Is Associated with Increased Risk for Cancer Mortality in Adult Taiwanese—A 10 Years Population-Based Cohort. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0122955.
78. Hardefeldt PJ, Eslick GD, Edirimanne S. Benign thyroid disease is associated with breast cancer: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(3):1169-1177.
79. Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, et al. Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005;103(6):1122-1128.
80. Cao J, Zhang J, Wang Z, et al. Hypothyroidism as a potential biomarker of efficacy of famitinib, a novel VEGFR-2 inhibitor in metastatic breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 2014;74(2):389-398.
81. Goldman MB, Monson RR, Maloof F. Benign Thyroid Diseases and the Risk of Death from Breast Cancer. *Oncology*. 1992;49(6):461-466.
82. Villa NM, Li N, Yeh MW, Hurvitz SA, Dawson NA, Leung AM. SERUM THYROTROPIN CONCENTRATIONS ARE NOT PREDICTIVE OF AGGRESSIVE BREAST CANCER BIOLOGY IN EUTHYROID INDIVIDUALS. *Endocrine Practice*. 2015;21(9):1040-1045.
83. Boulton AA. Letter: Amines and theories in psychiatry. *Lancet (London, England)*. 1974;2(7871):52-53.
84. Borowsky B, Adham N, Jones KA, et al. Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):8966-8971.

85. Lindemann L, Ebeling M, Kratochwil NA, Bunzow JR, Grandy DK, Hoener MC. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*. 2005;85(3):372-385.
86. Lindemann L, Hoener MC. A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends in pharmacological sciences*. 2005;26(5):274-281.
87. Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*. 2017;180:161-180.
88. Espinoza S, Lignani G, Caffino L, et al. TAAR1 Modulates Cortical Glutamate NMDA Receptor Function. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(9):2217-2227.
89. John J, Kukshal P, Bhatia T, et al. Possible role of rare variants in Trace amine associated receptor 1 in schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2017;189:190-195.
90. Kamalapurkar D, Pang TC, Siriwardhane M, et al. Index cholecystectomy in grade II and III acute calculous cholecystitis is feasible and safe. *ANZ J Surg*. 2015;85(11):854-859.
91. Gozal EA, O'Neill BE, Sawchuk MA, et al. Anatomical and functional evidence for trace amines as unique modulators of locomotor function in the mammalian spinal cord. *Front Neural Circuits*. 2014;8:134.
92. Babusyte A, Kotthoff M, Fiedler J, Krautwurst D. Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2. *Journal of leukocyte biology*. 2013;93(3):387-394.
93. Vattai A, Akyol E, Kuhn C, et al. Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2017.
94. Revel FG, Moreau JL, Pouzet B, et al. A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Molecular psychiatry*. 2013;18(5):543-556.
95. Bradaia A, Trube G, Stalder H, et al. The selective antagonist EPPTB reveals TAAR1-mediated regulatory mechanisms in dopaminergic neurons of the mesolimbic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(47):20081-20086.

96. Cripps MJ, Bagnati M, Jones TA, et al. Identification of a subset of trace amine-associated receptors and ligands as potential modulators of insulin secretion. *Biochemical pharmacology*. 2020;171:113685.
97. Chiellini G, Erba P, Carnicelli V, et al. Distribution of exogenous [125I]-3-iodothyronamine in mouse in vivo: relationship with trace amine-associated receptors. *The Journal of endocrinology*. 2012;213(3):223-230.
98. Adriaenssens A, Lam BYH, Billing L, et al. A Transcriptome-Led Exploration of Molecular Mechanisms Regulating Somatostatin-Producing D-Cells in the Gastric Epithelium. *Endocrinology*. 2015;156(11):3924-3936.
99. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, et al. Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol Pharmacol*. 2001;60(6):1181-1188.
100. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat Med*. 2004;10(6):638-642.
101. Tremmel E, Hofmann S, Kuhn C, et al. Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2019;11:87-97.
102. Liberles SD, Buck LB. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*. 2006;442(7103):645-650.
103. Wan Q, Dingerdissen H, Fan Y, et al. BioXpress: an integrated RNA-seq-derived gene expression database for pan-cancer analysis. *Database : the journal of biological databases and curation*. 2015;2015.
104. Fleischer LM, Somaiya RD, Miller GM. Review and Meta-Analyses of TAAR1 Expression in the Immune System and Cancers. *Front Pharmacol*. 2018;9:683.
105. Vogelsang TLR, Vattai A, Schmoeckel E, et al. Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Is a Positive Prognosticator for Epithelial Ovarian Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(16).
106. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2008;27(1):103-118.
107. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular cancer*. 2013;12:86.

108. Chao C, Jacobson LP, Tashkin D, et al. Recreational amphetamine use and risk of HIV-related non-Hodgkin lymphoma. *Cancer causes & control : CCC*. 2009;20(5):509-516.
109. Rogowski M, Gollahon L, Chellini G, Assadi-Porter FM. Uptake of 3-iodothyronamine hormone analogs inhibits the growth and viability of cancer cells. *FEBS Open Bio*. 2017;7(4):587-601.
110. Pitts MS, McShane JN, Hoener MC, Christian SL, Berry MD. TAAR1 levels and sub-cellular distribution are cell line but not breast cancer subtype specific. *Histochemistry and cell biology*. 2019;152(2):155-166.
111. Kovács T, Mikó E, Vida A, et al. Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors. *Scientific reports*. 2019;9(1):1300.
112. Henry DP, Bowsher RR. An improved radioenzymatic assay for plasma norepinephrine using purified phenylethanolamine N-methyltransferase. *Life sciences*. 1986;38(16):1473-1483.
113. Guenter J, Lenartowski R. Molecular characteristic and physiological role of DOPA-decarboxylase. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2016;70(0):1424-1440.
114. Krieger M, Coge F, Gros F, Thibault J. Different mRNAs code for dopa decarboxylase in tissues of neuronal and nonneuronal origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(6):2161-2165.
115. Tanaka T, Horio Y, Taketoshi M, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA of rat dopa decarboxylase: partial amino acid homologies with other enzymes synthesizing catecholamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(20):8142-8146.
116. Siaterli MZ, Vassilacopoulou D, Fragoulis EG. Cloning and expression of human placental L-Dopa decarboxylase. *Neurochemical research*. 2003;28(6):797-803.
117. Vassiliou AG, Fragoulis EG, Vassilacopoulou D. Detection, purification and identification of an endogenous inhibitor of L-Dopa decarboxylase activity from human placenta. *Neurochemical research*. 2009;34(6):1089-1100.
118. Kontos CK, Papadopoulos IN, Fragoulis EG, Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of L-DOPA decarboxylase in colorectal adenocarcinoma. *British journal of cancer*. 2010;102(9):1384-1390.

119. Wafa LA, Cheng H, Plaa N, et al. Carbidopa abrogates L-dopa decarboxylase coactivation of the androgen receptor and delays prostate tumor progression. *International journal of cancer*. 2012;130(12):2835-2844.
120. Bertoldi M, Carbone V, Borri Voltattorni C. Ornithine and glutamate decarboxylases catalyse an oxidative deamination of their alpha-methyl substrates. *The Biochemical journal*. 1999;342 Pt 3(Pt 3):509-512.
121. Ichinose H, Sumi-Ichinose C, Ohye T, Hagino Y, Fujita K, Nagatsu T. Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochemistry*. 1992;31(46):11546-11550.
122. Portaro S, Gugliandolo A, Scionti D, et al. When dysphoria is not a primary mental state: A case report of the role of the aromatic L-aminoacid decarboxylase. *Medicine*. 2018;97(22):e10953.
123. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological reviews*. 2004;56(3):331-349.
124. Rossetti ZL, Silvia CP, Krajnc D, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Aromatic L-amino acid decarboxylase is modulated by D1 dopamine receptors in rat retina. *Journal of neurochemistry*. 1990;54(3):787-791.
125. Rossetti Z, Krajnc D, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Modulation of retinal aromatic L-amino acid decarboxylase via alpha 2 adrenoceptors. *Journal of neurochemistry*. 1989;52(2):647-652.
126. Zhu MY, Juorio AV, Paterson IA, Boulton AA. Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat striatal synaptosomes: effects of dopamine receptor agonists and antagonists. *British journal of pharmacology*. 1994;112(1):23-30.
127. Young EA, Neff NH, Hadjiconstantinou M. Evidence for cyclic AMP-mediated increase of aromatic L-amino acid decarboxylase activity in the striatum and midbrain. *Journal of neurochemistry*. 1993;60(6):2331-2333.
128. Brun L, Ngu LH, Keng WT, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 2010;75(1):64-71.
129. Devos D, Lejeune S, Cormier-Dequaire F, et al. Dopa-decarboxylase gene polymorphisms affect the motor response to L-dopa in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20(2):170-175.

130. Vachtenheim J, Novotná H. Expression of the aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in human tumour cell lines of neuroendocrine and neuroectodermal origin. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1997;33(14):2411-2417.
131. Jensen SM, Gazdar AF, Cuttitta F, Russell EK, Linnoila RI. A comparison of synaptophysin, chromogranin, and L-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer research*. 1990;50(18):6068-6074.
132. Gilbert JA, Frederick LM, Ames MM. The aromatic-L-amino acid decarboxylase inhibitor carbidopa is selectively cytotoxic to human pulmonary carcinoid and small cell lung carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(11):4365-4372.
133. Sakakura C, Takemura M, Miyagawa K, et al. [Utility of dopa decarboxylase as a novel marker for the detection of peritoneal micro-metastases of gastric cancer with realtime RT-PCR]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy*. 2004;31(11):1906-1908.
134. Michaelidou K, Tzouvaras A, Missitzis I, Ardavanis A, Scorilas A. The expression of the CEACAM19 gene, a novel member of the CEA family, is associated with breast cancer progression. *International journal of oncology*. 2013;42(5):1770-1777.
135. Shelley M, Harrison C, Coles B, Staffurth J, Wilt TJ, Mason MD. Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2006(4):Cd005247.
136. Luthy IA, Bruzzone A, Pinerio CP, et al. Adrenoceptors: Non Conventional Target for Breast Cancer? *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(15):1850-1862.
137. Wafa LA, Palmer J, Fazli L, et al. Comprehensive expression analysis of l-dopa decarboxylase and established neuroendocrine markers in neoadjuvant hormone-treated versus varying Gleason grade prostate tumors. *Human Pathology*. 2007;38(1):161-170.
138. Evangelos DK, Andreas S, Dido V. Evidence for L-Dopa Decarboxylase Involvement in Cancer Cell Cytotoxicity Induced by Docetaxel and Mitoxantrone. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2018;19(13):1087-1096.
139. Tremmel E, Kuhn C, Kaltofen T, et al. L-Dopa-Decarboxylase (DDC) Is a Positive Prognosticator for Breast Cancer Patients and Epinephrine Regulates Breast Cancer

- Cell (MCF7 and T47D) Growth In Vitro According to Their Different Expression of G(i)-Protein- Coupled Receptors. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(24).
140. Hyland K, Clayton PT. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1990;13(3):301-304.
141. Pons R, Ford B, Chiriboga CA, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. *Neurology*. 2004;62(7):1058-1065.
142. Ouyang X, Zhu Z, Yang C, Wang L, Ding G, Jiang F. Epinephrine increases malignancy of breast cancer through p38 MAPK signaling pathway in depressive disorders. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2019;12(6):1932-1946.
143. Taylor BN, Cassagnol M. Alpha Adrenergic Receptors. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.; 2019.
144. King RJ. A discussion of the roles of oestrogen and progestin in human mammary carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;39(5b):811-818.
145. Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Papavassiliou AG. Roles of CREB-binding protein (CBP)/p300 in respiratory epithelium tumorigenesis. *Cell Res*. 2007;17(4):324-332.
146. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry*. 1999;68:821-861.
147. Dethlefsen C, Hansen LS, Lillelund C, et al. Exercise-Induced Catecholamines Activate the Hippo Tumor Suppressor Pathway to Reduce Risks of Breast Cancer Development. *Cancer research*. 2017;77(18):4894-4904.
148. Zhang X, Mantas I, Alvarsson A, et al. Striatal Tyrosine Hydroxylase Is Stimulated via TAAR1 by 3-Iodothyronamine, But Not by Tyramine or β -Phenylethylamine. *Front Pharmacol*. 2018;9:166.
149. O'Mahony F, Razandi M, Pedram A, Harvey BJ, Levin ER. Estrogen modulates metabolic pathway adaptation to available glucose in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2012;26(12):2058-2070.
150. Zaretsky JZ, Barnea I, Aylon Y, Gorivodsky M, Wreschner DH, Keydar I. MUC1 gene overexpressed in breast cancer: structure and transcriptional activity of the MUC1

promoter and role of estrogen receptor alpha (ER α) in regulation of the MUC1 gene expression. *Molecular cancer*. 2006;5(1):57.

Danksagung

Es ist mir ein großes Anliegen, mich an dieser Stelle bei allen Menschen zu bedanken, die das Gelingen dieser Arbeit gefördert und möglich gemacht haben.

Ich möchte an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke danken. Die Chance in seinem Labor promovieren zu können, bedeutet mir sehr viel. Er stand einem jederzeit mit gutem Rat und neuen Ideen zur Seite. Vielen Dank, für das unermüdlich Beantworten meiner Fragen. Zusätzlich wurde ich stets durch seine kritischen Fragen motiviert die Thematik tiefer zu durchdringen. Durch seine Begeisterung für Forschung allgemein sowie im Speziellen und sein Knowhow, hat er mich immer wieder motiviert und maßgeblich bei den Publikationen und zahlreichen Proof Readings unterstützt.

Mein Dank gilt auch meiner Betreuerin PD Dr. med. Aurelia Vattai, deren Forschungsdrang auch mich begeisterte. Sie war ambitioniert und scheute auch keinen Aufwand um mein Vorhaben zu unterstützen. Sie half mir meine Fragen zu beantworten und Lösungen auf aufkommende Probleme schnell zu finden. Sie stärkte mein Selbstvertrauen und nahm sich Zeit, um mich auf Kongresse und dortige Präsentationen vorzubereiten und zu unterstützen.

Besonders möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Labors bedanken, für die herzliche Aufnahme und sehr gute Betreuung. Mein Dank gilt insbesondere Frau Christina Kuhn und Frau Simone Hofmann für die großartige Einweisung in die Immunhistochemie und Zellkultur. Bei der Durchführung und Planung der Experimente waren Sie immer sehr hilfsbereit und sind mir bei Fragen und Problemen stets ruhig und gewissenhaft zur Seite gestanden.

Ich danke der FAZIT Stiftung, welche mich insbesondere finanziell im Rahmen ihres Promotionsstipendiums unterstützte. Somit hatte ich die Möglichkeit meine volle Konzentration und Engagement meiner Forschungsarbeit zu widmen.

Nicht zuletzt gilt mein größter Dank vor allem meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, und meinen Freunden, für ihre Motivation, ihre guten Worte sowie „offenen Ohren“ in Stunden, in denen die Arbeit endlos scheint. Ohne ihre Unterstützung und Zuwendung wäre mir diese Arbeit erheblich schwerer gefallen.

Vielen Dank!