

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss der Oestrogenrezeptor- β -Isoformen,
ER β 2 und ER β 5,
auf die Proliferation und Tamoxifensensitivität des
Mammakarzinoms, *in vitro*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christiane Feldmann, geb. Boeckh

aus Ludwigshafen am Rhein

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. Kurt Possinger
 2. Prof. Dr. med. Jens-Uwe Blohmer
 3. Prof. Dr. med. Josef Köhrle

Datum der Promotion: 23.06.2013

Meinem Mann
Marc
und meinem Sohn
Fynn
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	1
1.1.3 Die Rolle der Oestrogene beim Mammakarzinom.....	2
1.2 Oestrogenrezeptoren	2
1.2.1 Wirkung des E2 an Oestrogenrezeptoren	2
1.2.2 Aufbau der Oestrogenrezeptoren	5
1.2.3 Regulierung von Zielgenen durch Oestrogenrezeptoren	6
1.3 Tamoxifentherapie.....	7
1.3.1 Pharmakodynamik und – kinetik des Tamoxifens	7
1.3.2 Klinischer Einsatz des Tamoxifens beim MaCa	8
1.3.3 Tamoxifenresistenz	11
1.4 Der ER β	11
1.4.1 Die ER β -Isoformen	11
1.4.2 Die Rolle des ER β 1 beim MaCa.....	12
1.4.3 Die Rolle des ER β 2 und des ER β 5	14
2 Fragestellung	16
3 Materialien und Methoden	18
3.1 Geräte und Materialien	18
3.2 Antikörper.....	19
3.3 Primer	19
3.4 Vektoren.....	19
3.5 Reagenzien.....	19
3.6 Lösungen und Puffer	20
3.7 Kits	21
3.8 Zelllinien und Kultivierung	22
3.9 Lösung und Aufbewahrung der verwendeten Substanzen	22
3.10 MTT-Test.....	23
3.11 RNA-Isolierung	23
3.12 Reverse Transkription	24

3.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
3.14	Real-time quantitative PCR.....	25
3.15	Green-fluorescent-protein (GFP)-reporter-Assay.....	26
3.16	Präparation chemo-kompetenter E. coli.....	26
3.17	Transformation mit der Hitzeschock-Methode.....	27
3.18	Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten E.Coli.....	28
3.19	Enzymverdau	28
3.20	Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion.....	29
3.21	Transfektion.....	29
3.22	Selektion stabil transfizierter MCF-7- bzw. MTR-3-Zellen.....	29
3.23	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse.....	30
3.24	Proteinisolierung.....	31
3.25	Messung der Proteinkonzentration.....	31
3.26	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	32
3.27	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Expression von ERs in verschiedenen MaCa-Zelllinien	34
4.2	Effekt von ER β -Agonisten auf die Proliferation von MaCa-Zelllinien.....	35
4.3	Genistein verstärkt die Tamoxifenwirkung in MCF-7-Zellen	40
4.4	Effekt des Genisteins auf die Tamoxifen-resistente Zelllinie MTR-3	41
4.5	Beeinflussung der ER α -Aktivität am ERE durch Genistein.....	43
4.5	Regulierung von ER β 1, ER β 2 und ER β 5 durch 4-OHT bzw. Genistein	46
4.6	Einfluss der ER β 2- bzw. ER β 5-Überexpression auf MCF-7-Zellen	50
4.7	Effekt von 4-OHT bzw. Genistein auf ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierende MCF-7-Zellen	51
4.8	Einfluss der ER β 2- bzw. ER β 5-Überexpression auf MTR-3-Zellen	53
4.9	Verstärkung der Sensitivität gegenüber 4-OHT durch ER β 2 bzw. ER β 5 in MTR-3-Zellen	54
4.10	Verstärkung der 4-OHT-Wirkung in ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden MTR-3-Zellen durch Genistein.....	55
4.11	Beeinflussung des Zellzyklus durch die ER β -Isoformen	56
5	Diskussion	59
5.1	ER β -Agonisten hemmen die Proliferation ER α /ER β co-exprimierender Zellen.....	60
5.2	Genistein hemmt die Proliferation auf Transkriptionsebene	63
5.3	Genistein verstärkt die proliferationshemmende Wirkung des 4-OHT	64
5.4	Genistein re-sensitiviert resistente MaCa-Zellen gegenüber Tamoxifen	65

5.5 Hochregulierung von ERβ5 bzw. ERβ2 vermittelt antiproliferative Effekte durch 4-OHT bzw. Genistein.....	67
5.6 Die Überexpression von ERβ2 und ERβ5 inhibiert die Proliferation von MCF-7-Zellen	69
5.7 Die Überexpression von ERβ2 bzw. ERβ5 erhöhen die Tam-Sensitivität in MCF-7- und MTR-3-Zellen.....	70
5.8 Verstärkung der antiproliferativen 4-OHT-Wirkung durch Genistein in ERβ2- bzw. ERβ5-überexprimierenden Zellen.....	71
5.9 Inhibitorischer Einfluss des ERβ2 und des ERβ5 auf den Zellzyklus	74
6 Zusammenfassung.....	77
7 Literaturverzeichnis	80
Danksagung	VI
Erklärung an Eides Statt	VII
Lebenslauf.....	VIII
Publikationen und Auszeichnungen	X

Abkürzungsverzeichnis

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
AF	Activating Function
AI	Aromataseinhibitoren
AP-1	Activating Protein-1
BRCA	Breast Cancer Susceptibility Gene
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
Co-A	Co-Aktivator
Co-R	Co-Repressor
DBD	DNA-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPN	2,3- <i>bis</i> (4-Hydroxyphenyl)-propionitrile
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
E2	17 β -Estradiol
ER	Oestrogenrezeptor
ERE	Estrogen response element
FKS	Fetales Kälberserum
Geni	Genistein
GFP	Green Fluorescent Protein
GF-R	Growth Factor Receptor (Wachstumsfaktorrezeptor)
GPR	G-protein coupled receptor
Her-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HET	Hormonersatztherapie
IGF-R	Insulin Growth Factor Receptor
LBD	Liganden-bindende Domäne
MaCa	Mammakarzinom
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
N-CoR	Nuclear Receptor Co-Repressor
NHR	Nukleohormonrezeptor
PBS	Phosphate buffered saline

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PCR	Polymerase chain reaction
P/S	Penicillin / Streptomycin
SERM	Selektive Estrogen Receptor Modulators
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMRT	Silencing Mediator of retinoid and thyroid responsive transcription
Tam	Tamoxifen
TF	Transkriptionsfaktor
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
ZKM	Zellkulturmediu

1 Einleitung

1.1 *Das Mammakarzinom*

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom (**MaCa**) ist mit einem Anteil von 22,9% aller Malignome die verbreitetste Krebserkrankung und mit 13,7% auch die häufigste Krebstodesursache weltweit (nicht eingerechnet Hautkrebserkrankungen, exklusive Maligner Melanome; Stand 2008) bei Frauen. Die Inzidenz variiert zwischen 19,3 / 100.000 / Jahr in Ostafrika und 89,7 / 100.000 / Jahr in Westeuropa. In Deutschland macht das MaCa mit einem Anteil von 29,3% sogar rund ein Drittel der Krebserkrankungen aller Frauen aus und ist mit 17,6% nicht nur die häufigste Krebstodesursache sondern in der Gruppe der 35 – 54-jährigen Frauen auch die häufigste Einzeltodesursache überhaupt [1].

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Das MaCa ist ätiologisch eine heterogene Erkrankung. In rund 10% aller Erkrankungsfälle liegt der malignen Transformation eine Keimbahnmutation im Bereich von Tumorsuppressorgenen bzw. Protoonkogenen zugrunde. Zu diesen zählen vor allem Allelveränderungen mit hoher Penetranz im Bereich der Breast Cancer Susceptibility Gene, BRCA1 und BRCA2, die das Erkrankungsrisiko um das 10- bis 20-fache erhöhen. Der Anteil der BRCA1/2-Mutationen entfällt auf rund 16% der familiären Brustkrebserkrankungen [2-5]. Weitaus seltener aber mit hoher Penetranz findet sich eine Mutationen im Bereich des TP53-Gens. Eine Reihe von Mutationen mittlerer Penetranz führt zu Syndromen, die eine Prädisposition zum MaCa mit sich führen. Dazu zählen z.B. Veränderungen der Gene STK11/LKB1 (Peutz-Jeghers-Syndrom), PTEN (Cowden-Syndrom) oder ATM (Ataxia teleangiectatica). Mehrheitlich codieren die genannten Gene für Enzyme, die direkt oder indirekt in die DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrolle involviert sind [5-10]. Der größte Anteil der Brustkrebserkrankungen entsteht jedoch sporadisch und ist multifaktoriell bedingt. Unter den Risikofaktoren, die in besonderer Weise zum MaCa prädisponieren, finden sich neben dem Zigarettenrauchen, der Exposition gegenüber

ionisierender Strahlung oder fibrozystischer Mastopathie vor allem solche Faktoren, die ein körperliches Oestrogenübergewicht bedingen. Endogen erhöht sind Oestrogenspiegel bei Nulliparität, später Erstparität, früher Menarche (vor dem 12. Lebensjahr), später Menopause (nach dem 52. Lebensjahr), Adipositas oder erhöhtem Alkoholkonsum. Zu den exogenen Oestrogenquellen zählt in besonderer Weise die Hormonersatztherapie oder die Hormontherapie im Rahmen der Fertilitätsbehandlung [11].

1.1.3 Die Rolle der Oestrogene beim Mammakarzinom

Der Zusammenhang zwischen der Wirkung von Oestrogenen und dem MaCa ist seit über 100 Jahren bekannt: 1896 publizierte George Beaton, dass er durch die bilaterale Ovariectomie eine vorübergehende Remission des MaCa bei prämenopausalen Frauen erwirken konnte [12]. Seitdem konnte in unzähligen Studien dargelegt werden, dass die Wirkung von Oestrogenen, insb. dem 17 β -Estradiol (**E2**) deutlich mit einer Erhöhung des Brustkrebsrisikos sowie mit dessen Initiation und Progression korreliert. So beträgt das relative Risiko einer Brustkrebserkrankung bei Frauen postmenopausal 2,00 – 2,58, wenn die endogene E2-Konzentration im Plasma erhöht ist. Dieses Risiko erhöht sich bei Adipositas zusätzlich, bedingt durch eine erhöhte Aromataseaktivität im Fettgewebe [13, 14]. Auch erhöhte Plasmaspiegel von Androgenen können durch aromatische Konversion zu E2 das Brustkrebsrisiko erhöhen [11]. Neben endogen erhöhten Hormonspiegeln verursachen insbesondere exogen zugeführte Oestrogene ein erhöhtes Risiko, am MaCa zu erkranken. Dabei stellt die Hormonersatztherapie (**HET**) einen besonderen Risikofaktor dar. So beträgt das relative Risiko, am MaCa zu erkranken nach vierjähriger HET zwischen 1,4 – 1,64 [15].

1.2 Oestrogenrezeptoren

1.2.1 Wirkung des E2 an Oestrogenrezeptoren

E2 vermittelt Tumorwachstum durch agonistische Wirkung an Oestrogenrezeptoren (**ER**). Das MaCa wird als Hormonrezeptor-positiv bzw. ER-positiv klassifiziert, wenn es ER exprimiert – dies betrifft rund 75% aller sporadischen MaCas [16]. Dabei

bezieht sich diese Charakterisierung auf nur einen von zwei ER-Typen: Den ER α . Dieser vermittelt in Abhängigkeit von E2 sowohl Proliferation, Differenzierung und Wachstum als auch Apoptose des Drüsengewebes der gesunden Brust. Jedoch gilt auch der direkte Zusammenhang zwischen der Wirkung des E2 am ER α und der Initiation und Progression des MaCa als erwiesen [17-20]. ERs gehören zur Superfamilie intrazellulärer Nukleohormonrezeptoren (**NHR**). Ihre Funktionsweise entspricht der von Liganden-aktivierbaren Transkriptionsfaktoren (**TF**) [21]. Man unterscheidet zwei Typen von ERs, ER α und ER β – heute eher als ER β 1 bezeichnet [22, 23]. Bindet E2 an einen ER, kommt es zur Bildung funktioneller ER-Homo- oder Heterodimere sowie zur Translokation des dimeren Rezeptorkomplexes in den Zellkern. Unter dem Einfluss von Co-Aktivatoren (**Co-A**) bzw. Co-Repressoren (**Co-R**) binden die ER-Dimere an Estrogen-Response-Elemente (**ERE**) im Bereich der Promotoren ER-regulierter Gene [24]. ERs sind dabei in der Lage, Zielgene zu induzieren oder zu reprimieren. Ob Gene durch ERs induziert bzw. reprimiert werden, hängt dabei sowohl vom zellulären Kontext als auch vom jeweiligen Promotor ab. Der genomische Effekt wird jedoch entscheidend durch die Konstellation der Co-A bzw. Co-R determiniert [25]. Große Bedeutung kommt den Co-A der p160-Familie (z.B. SRC-1 oder AIB1) zu: Diese modulieren die Chromatinstruktur durch eine Aktivierung von Histon-Acetyl- und Methyl-Transferasen und erleichtern die Rekrutierung der RNA-Polymerase II, was die transkriptionelle Aktivität an Zielgenen erhöht [25-28]. Co-R unterdrücken hingegen die transkriptionelle Aktivität. Zu diesen zählen der Nuclear Receptor Co-Repressor (**N-CoR**) sowie der Silencing Mediator of retinoid and thyroid responsive transcription (**SMRT**) [29, 30]. Die transkriptionelle Aktivität der ERs wird jedoch nicht nur in Abhängigkeit von ER-Liganden und Co-Faktoren sondern auch unter dem Einfluss anderer zellulärer Signalwege bestimmt (**Abb.1**). Neben dem zuvor beschriebenen klassischen genomischen Signalweg wurden mindestens drei weitere Wege beschrieben, die ERs involvieren. Dazu gehört die Rekrutierung von ERs an andere Response Elements durch TF wie AP-1, SP-1, CREB, oder NF- κ B [31-34]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktorrezeptoren (**GF-R**) der Zellmembran über eine Aktivierung von Kinasekaskaden zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERs beitragen können. Diese Liganden-unabhängige Aktivierung wurde vor allem im Zusammenhang mit dem Insulin-Growth-Factor-

Rezeptor (**IGF-R**) und dem Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (**Her-2/neu**) beschrieben [35, 36]. Daneben existieren nicht-genomische ER-Signalwege, die durch membranöse G-Protein-gekoppelte ERs vermittelt werden. Einer dieser Rezeptoren ist der G-Protein-coupled-Receptor 30 (**GPR30**), der mittels Kinasenaktivierung eine schnelle Hochregulierung von TF, wie z.B. c-fos, vermitteln kann [37, 38]. Dem kommt insofern eine Bedeutung zu, als dass es sich dabei um Quervernetzungsinstrumente zwischen NHR-vermittelter Genregulation und schnellen zytosolischen Antworten der Tumorzelle auf Stimuli handelt.

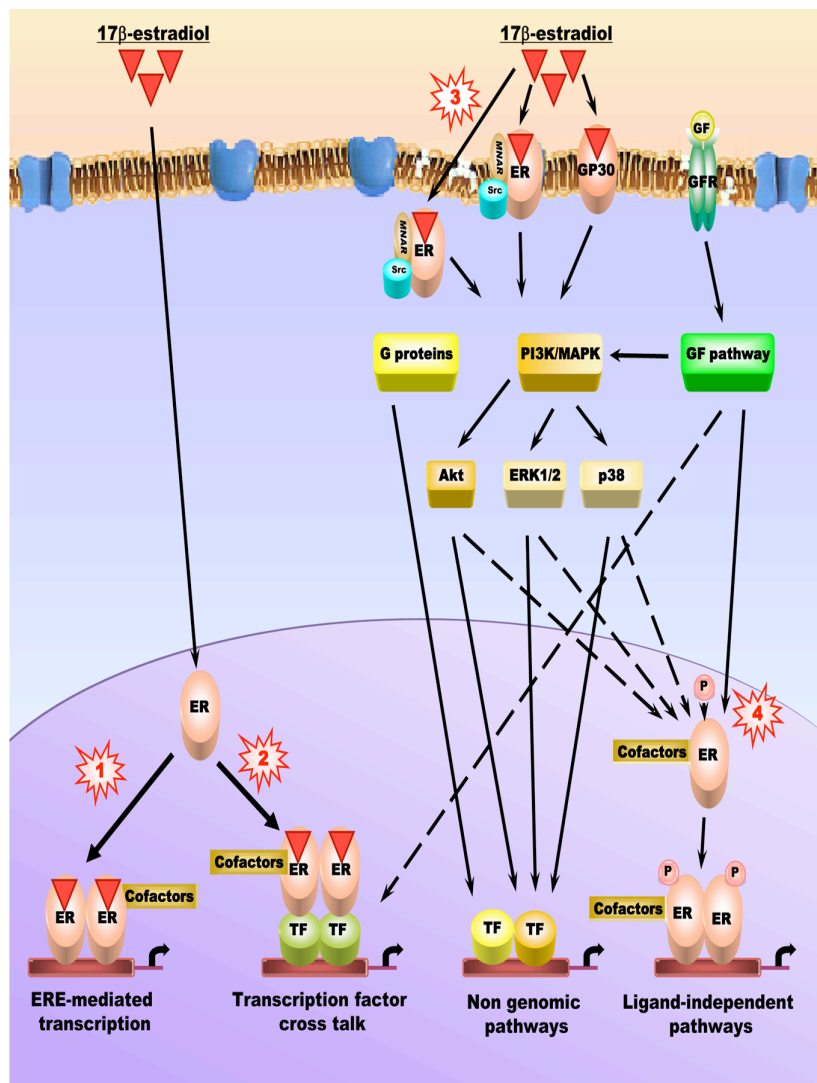


Abbildung 1: ER-abhängige Signalwege. 1) Klassische Aktivierung der ERs durch E2 und Translokation an EREs. 2) Rekrutierung von ERs durch TF an andere Response elements. 3) Aktivierung von ERs durch Kinasen bzw. Membran-ständige ERs. 4) GF-R beeinflussen ERs durch Second Messenger. Moduliert wird die Aktivität dabei in allen Fällen durch das Gleichgewicht von Co-A bzw. Co-R [39].

1.2.2 Aufbau der Oestrogenrezeptoren

Sowohl der ER α als auch der ER β 1 haben den für NHRs typischen Aufbau (**Abb. 2**): N-terminal befindet sich die A/B-Region, die eine Transaktivierungsdomäne einschließt, bezeichnet als Activating Function 1 (**AF-1**). Die AF-1 ermöglicht eine Regulierung des Rezeptors durch Phosphorylierung an Serinresten. Die zentral gelegene C-Domäne ist der DNA-bindende Bereich (**DBD**) des Rezeptorproteins. Die E-Domäne entspricht dem Ort der Ligandenbindung (**LBD**) und wird auch als Activating Function 2 (**AF-2**) bezeichnet. Sie vermittelt neben der Hormon-abhängigen Rezeptoraktivierung auch die Bildung funktioneller Homo- oder Heterodimere [40, 41]. Essenziell für die Ligandenbindung ist eine hoch konservierte, amphiphile α -Helix 12, deren Schlüsselfunktion die Wechselwirkung mit Co-A der Steroid-Receptor-Co-Activator-Familie ist. Tritt ein Agonist in Wechselwirkung mit dem ER, gibt die Rotation der Helix 12 eine hydrophobe Bindungstasche für die Co-As frei. Die Bindung erfolgt dabei über ein LXXLL-Motiv (L = Leucin; X = jegliche andere Aminosäure) [42, 43]. Zwischen der DBD und der LBD befindet sich, ähnlich einem flexiblen Gelenk, die D-Domäne. Diese scheint für den Transport des Rezeptors in den Nucleus von Bedeutung zu sein [44]. Die Funktion der C-terminal gelegenen F-Domäne konnte bislang noch nicht hinreichend aufgeklärt werden [45].

ER α	A/B: AF-1	C: DBD	D	E: LBD/AF-2	F	
NH2	179	89	38	251	43	COOH

ER β	A/B: AF-1	C: DBD	D	E: LBD/AF-2	F	
NH2	142	84	28	248	28	COOH

Sequenzhomologien

18%	97%	24%	58%	12%
-----	-----	-----	-----	-----

Abbildung 2: Funktionelle Domänen der ERs, Anzahl der Aminosäuren und Sequenzhomologien in % [45].

Das für den ER α codierende Gen, ESR1, findet sich auf Chromosom 6 q24-q27, während das Gen ESR2, welches für ER β 1 codiert, auf Chromosom 14 q21-q22 lokalisiert ist [23]. Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass der ER β 1 vor rund 450 Millionen Jahren durch Genduplikation entstanden ist. Dabei wird vermutet, dass sich der ER α und der ER β lange Zeit unterschieden hatten. Unter Selektionsdruck seien überlappende Funktionen jedoch von Vorteil gewesen [46].

Tatsächlich existieren große Sequenzhomologien innerhalb der DBD (96%) der beiden Rezeptortypen. Alle anderen Domänen weisen jedoch eine außerordentliche Variabilität auf [15]. So sind die LBD beider Rezeptoren einander nur zu 58% homolog [43, 47]. Die größten Unterschiede finden sich innerhalb der Aminosäuresequenzen der AF-1 (<20%), der D-Domäne (30%) sowie innerhalb der F-Domäne (ca. 20%) [41, 43, 44]. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass beide Rezeptortypen zu einem erheblichen Anteil ganz unterschiedliche biologische Funktionen ausüben.

1.2.3 Regulierung von Zielgenen durch Oestrogenrezeptoren

ERs kontrollieren eine außerordentlich große Anzahl von Genen, deren Schlüsselfunktionen die Regulierung des Zellzyklus, der Apoptose und der transkriptionellen Aktivität ist. Bislang konnten alleine in der MaCa-Zelllinie MCF-7 weit über 3.665 DNA-Bindestellen für ER identifiziert werden. Dabei sind die meisten ER-Bindestellen im Genom hoch konserviert und bei nahezu allen Vertebraten zu finden [48]. Zu den Kandidatengenen, deren Regulierung durch ER bislang einwandfrei aufgeklärt werden konnte, gehören u.a. TFF-1 (pS2), EBAG9, CCND1, Cathepsin D, MYC, IGF-I, PR, GRBE1, PDZK1, TRIM-25, XBP-1, DSCAM-1, NRIP-1, SOD-1, EREG, KRT19, RARA oder HSPB1 (Hsp27), Kollagenase, und humane Cholinacetyltransferase [48-50]. Die Fortschritte auf dem Gebiet der Microarray-Technologie und der Chromatin-Immunoprecipitation (**ChIP**) haben entscheidend zu einer umfassenderen Aufklärung ER-regulierter Gene beigetragen. Die meisten ER-Bindestellen konnten so im Bereich cis-regulatorischer Elemente, distal des Transkriptionsstartes identifiziert werden. Viele Gene weisen dabei gleich mehrere ER-Bindestellen auf [26, 48]. So hat z.B. das E2-regulierte Gen GREB1 sowohl eine ER-Bindestelle in der Promotorregion als auch fünf weitere Bindestellen in Richtung des 3'-Endes. Die ER-Bindung korreliert daher nicht mit der Anzahl der durch ERs regulierten Gene [48]. ChiP-on-chip-Analysen der Zelllinie MCF-7, die als gut untersuchter Prototyp einer hormonsensitiven MaCa-Zelllinie bezeichnet werden kann, haben gezeigt, dass der ER α und der ER β 1 dabei sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Funktionen ausüben. Tatsächlich gibt es eine Vielzahl von ER-Bindestellen, die selektiv den ER α binden – allerdings nur in Anwesenheit des ER β 1.

Es wurde vermutet, dass ER β 1 an diesen Stellen die Funktion hat, den ER α zu rekrutieren. Andere Bindestellen binden hingegen nur den ER α oder den ER β 1 in Abwesenheit des jeweils anderen Rezeptortyps. Die ER β 1-bindenden Regionen befinden sich dabei insgesamt näher am Transkriptionsstart und zeigen hinsichtlich ihrer DNA-Sequenz eine Dominanz GC-reicher Motive, während die ER α -Bindestellen eine Überrepräsentanz an TA-reichen Motiven zeigen, die sich insgesamt weiter distal des Transkriptionsstartes befinden [51]. Erstaunlich war die Entdeckung, dass ein Großteil der durch den ER β 1 regulierten Gene gemeinsame EREs und AP-1-Response-Elements enthält und nicht nur reine EREs. AP-1 ist ein dimerer TF-Komplex, bestehend aus Faktoren der Jun- bzw. Fos-Familie. AP-1-Response Elements befinden sich in den Promotorregionen von Genen für Kollagenase, Humanem Insulin Growth Factor Rezeptor 1 und Cholinacetyltransferase [26]. AP-1 ist außerdem eine Schlüsselkomponente zahlreicher Signaltransduktionskaskaden. Mit Reporter-Assays konnte gezeigt werden, dass der ER α und der ER β in Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von E2 nicht nur gegensätzliche Effekte an EREs, sondern auch an AP-1-Response Elements erzeugen können: ER α erhöht dabei die Transkription von Zielgenen, während ER β 1 deren Transkription hemmt. Zu den Zielgenen, für welche diese Form der Regulierung durch ER nachgewiesen werden konnte, gehören u.a. p2S, PKIN, MYC, GREB1, EREG oder PDZK1 [26].

1.3. Tamoxifentherapie

1.3.1 Pharmakodynamik und – kinetik des Tamoxifens

Um die E2-vermittelte Aktivierung des ER α zu blockieren, wurden seit den 1970er Jahren in der Therapie des MaCa Pharmaka eingesetzt, die kompetitiv die Bindung des E2 an ERs antagonisieren können: Die Selektiven ER-Modulatoren (**SERM**) [52]. Die Leitsubstanz der SERM ist das Tamoxifen (**Tam**). Tam leitet sich strukturell nicht vom Steroidgerüst ab, vermag aber in seiner Tertiärstruktur an ERs zu binden [53]. Die Bezeichnung SERM verdeutlicht die Eigenschaft des Tam als Pharmakon mit dualem Wirkprofil. Dabei entfaltet Tam in Abhängigkeit verschiedener Gewebe sowohl agonistische bzw. oestrogenische als auch antagonistische Eigenschaften. In seiner antagonistischen Eigenschaft verdrängt Tam kompetitiv das E2 vom ER

und bewirkt die Rekrutierung von Co-R, welche die Aktivität des Rezeptors unterbinden. Tam bewirkt damit vor allem einen Arrest der Tumorzelle im G1-Stadium des Zellzyklus [52]. Das duale Wirkprinzip hingegen beruht hauptsächlich auf drei Zusammenhängen. Erstens, variiert in verschiedenen Geweben die Zusammensetzung der verschiedenen ER-Isoformen und damit die Variabilität entsprechender funktioneller ER-Homo- und Heterodimere [53, 54]. Zweitens, variieren die relativen und absoluten Spiegel verschiedener Co-Regulatoren innerhalb der Gewebe. Mindestens 20 co-regulatorische Proteine wurden bislang identifiziert [55, 56]. An ERs gebundenes Tam rekrutiert in MaCa-Zellen Co-R, während sich in Endometriumzellen vor allem eine Rekrutierung von Co-A zeigt. In der Konsequenz findet sich eine erhöhte ER α -Aktivität im Endometrium, was schließlich in einer endometrialen Hyperplasie mit maligner Entartungstendenz resultieren kann – einer unerwünschten Nebenwirkung der Tam-Therapie [57].

Hinsichtlich seiner Pharmakokinetik ist Tam eine Prodrug mit niedriger Affinität zu ERs. Die durch hepatische Biotransformation entstehenden Metabolite, 4-Hydroxytamoxifen (**4-OHT**), 3-Hydroxytamoxifen, 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen (Endoxifen) und alpha-Hydroxytamoxifen besitzen eine bis zu 100-fach höhere Affinität zu ERs. Die Metabolisierung wird dabei vor allem durch Enzyme der Cytochrom P450-Familie vermittelt [58].

1.3.2 Klinischer Einsatz des Tamoxifens beim MaCa

Das MaCa unterscheidet sich von anderen Karzinomen unter anderem durch die Tatsache, dass die Krankheit bereits im lokoregionären Stadium als systemisch betrachtet werden muss. Lokal begrenzte Tumoren können zwar radiochirurgisch und durch Polychemotherapie gut behandelt werden, mögliche Filiae können jedoch lange Zeit unentdeckt schlummern. MaCa-Zellen besitzen dabei die sich von anderen Tumoren unterscheidende Eigenschaft, auch noch 20 Jahre nach Ersterkrankung ein lebensbedrohliches Rezidiv entstehen zu lassen [59]. Dies verdeutlicht die Bedeutung einer langfristigen, adjuvanten, systemischen, antioestrogenen Therapie. Tam hat als Adjuvans in den letzten 30 Jahren entscheidend zu einer Verringerung der Mortalität in allen Altersgruppen beigetragen. Dabei reduzierte sich die Rezidivrate nach fünfjähriger Tam-Therapie um 47% und die proportionale Mortalitätsrate um 26% nach zehnjähriger Behandlung. Die 10-

Jahresüberlebensrate konnte um 10,9% bzw. 5,6% bei Patientinnen mit positivem Nodalstatus bzw. negativem Nodalstatus verbessert werden [60]. Eine im Jahr 2005 veröffentlichte Metaanalyse der Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, auf Basis 194 randomisierter Tests, durchgeführt mit einem Kollektiv von 160.000 Patientendaten seit dem Jahr 1995, ergab, dass die Gabe von Tam über einen Zeitraum von fünf Jahren zu einer jährlichen Reduktion der Mortalitätsrate um 31% führte. Von allen untersuchten Faktoren konnte der ER-Status als einziger wichtiger prädiktiver Marker in der Reduktion des Rezidivrisikos dargestellt werden (RR = 0,53 – 0,68), während vorangegangene Chemotherapie, PR-Status, Nodalstatus oder Alter beim ER-positiven MaCa kaum Einfluss auf die Verhinderung eines Rezidivs hatten [59]. Interessanterweise verhindert die Tam-Therapie zu einem erheblichen Anteil auch bei solchen Patientinnen ein Rezidiv, die nur sehr niedrige ER-Spiegel (10-19 fmol/mg Zytosolprotein) aufweisen [59]. Dabei hatte sich im Rahmen der zu Grunde liegenden Studien gezeigt, dass vor allem prä-menopausale Frauen von einer fünfjährigen Tam-Therapie profitierten, während sich das Therapieergebnis im Falle postmenopausaler Frauen durch einer zwei- bis dreijährigen Gabe von Als, gefolgt von einer zwei- bis dreijährigen Tam-Therapie, verbessert [59, 61]. Die anlässlich der 11. St. Gallener Konsensuskonferenz im Jahre 2009 ausgesprochene Empfehlung schlug daher auf Basis der bisher veröffentlichten Studien die in **Tabelle 1** zusammengefassten Therapie-Algorithmen für eine adjuvante endokrine Therapie vor. Je nach Risikoprofil, erhalten Patientinnen im Anschluss an eine chirurgische/radiologische Therapie eine möglichst individuell angepasste adjuvante Therapie, bestehend aus endokriner und/oder Chemotherapie [62].

**Algorithmus adjuvanter internistischer Erstlinientherapie beim
MaCa**

<i>Kliniko-pathologische Eigenschaften</i>	<i>Relative Indikation für chemo-endokrine Therapie</i>	<i>Faktoren mit nicht eindeutiger Zuordnung</i>	<i>Relative Indikation für alleinige endokrine Therapie</i>
ER- und PR-Status	Niedrige ER/PR-Level		Hohe ER/PR-Level
Histologischer Grad	Grad 3	Grad 2	Grad 1
Proliferation	Hoch*	Intermediär	Niedrig
N-Status	>4 befallene N	1-3 befallene N	N0
V-Status (peritumoral)	> V1		V0 oder nur geringe Invasion
pT-Status	> 5cm	2,1 – 5 cm	<2cm
Patientenpräferenz	Nutzung aller Optionen		Verzicht auf Chemo-assoziierte Nebenwirkungen
Gensignatur/Multigen-Assays	Hoher Score	Intermediärer Score	Niedriger Score

Tabelle 1: Darstellung des auf der 11. St. Galler Konsensuskonferenz vorgeschlagenen Therapiealgorithmus für die Anwendung adjuvanter internistischer Therapie beim MaCa. Die Proliferation wurde dabei anhand des Ki67-Index (niedrig ≤ 15%; intermediär = 16 – 30%; hoch > 30%) und der Mitoserate festgelegt. Die Gensignatur umfasst die ER- und Her2/neu-Expression sowie die Expression proliferativer Signalwege. [62]

1.3.3 Tamoxifenresistenz

Ein gefürchtetes Szenario in der Therapie des MaCa besteht in der primären und sekundären Tam-Resistenz. Während der primären Tam-Resistenz häufig Polymorphismen Tam-metabolisierender Enzyme zu Grunde liegen [58], finden sich bei sekundärer Tam-Resistenz Hochregulierungen zellulärer Signalwege, welche die Tumorzellen von ihrer E2-Abhängigkeit entkoppeln. Dadurch verliert die Blockierung des ER α ihre Effektivität und es kommt zum Rezidiv und Progress der Erkrankung. Tatsächlich tritt eine sekundäre Tam-Resistenz bei rund 40% der Patientinnen sowie annähernd bei allen Patientinnen im metastasierten Stadium auf [63]. Einige der Mechanismen, die zur Tam-Resistenz führen können wurden bereits identifiziert. Zu diesen Mechanismen gehören zum Beispiel Veränderungen in den Konzentrationen verschiedener Co-A oder Co-R der ERs [64, 65], die Überexpression bzw. Überaktivität von GF-R [35, 63], Neumutationen des ER α -Gens [66] oder die Hochregulierung von MAPK- und PI3K/AKT-aktivierenden Signalwegen [67-69]. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die zunehmende Überexpression des GPR30, eines membranständigen ER, während der Tam-Therapie [70]. Neben E2 wirkt auch Tam an diesem Rezeptor agonistisch und führt zur Stimulation sowohl des MAPK- als auch des PI3K-Signalweges. Auf diese Weise wird die antagonisierende Wirkung des Tam am ER α umgangen. Mehr noch - Tam vermittelt durch seine agonistische Eigenschaft am GPR30 sogar einen proliferationsfördernden Effekt in diesen Zellen. Denn in der Folge findet nicht nur eine Kinasen-abhängige Aktivierung zahlreicher TF statt, sondern auch die Phosphorylierung der AF-1 des ER α [39, 71]. Unklar ist jedoch, welche Rolle der zweite ER-Rezeptortyp, nämlich der ER β 1, im Hinblick auf Tam-Resistenz spielt. Zum Zeitpunkt der Entwicklung des Tam war dieser Rezeptortyp noch nicht bekannt. Tam bindet jedoch auch an den ER β 1 und beeinflusst damit dessen Funktionalität [29, 56].

1.4 Der ER β

1.4.1 Die ER β -Isoformen

Im Gewebe der gesunden Mamma wird der ER β 1 weitaus häufiger exprimiert als der ER α : Während der ER α im Wesentlichen nur in epithelialen Zellen zu finden ist, wird

der ER β 1 auch in Myoepithelien, Fibroblasten, Endothelzellen und Adipozyten der Mamma gebildet [72]. Zu einer Neubewertung der ER-Biologie führte im Verlauf der weiteren Jahre die Entdeckung vier weiterer ER β -Isoformen, von denen der ER β 2 (auch als ER β cx bezeichnet) und der ER β 5 in beträchtlichem Maße im Mammagewebe exprimiert werden [73-76]. Die Synthese dieser vier ER β -Isoformen beruht auf Insertion [77-79], C-terminalem Splicing [75] bzw. Exon-Deletion [77, 80]. Die DBD aller fünf Isoformen sind einander zu 96% homolog. Zwischen den Aminosäureketten der LBD gibt es jedoch nur zu 53% Homologien und die höchste Variabilität findet sich innerhalb der genregulatorischen D-Domäne sowie der A/B-Domäne, welche die AF-1 trägt (**Abb. 3**) [81].

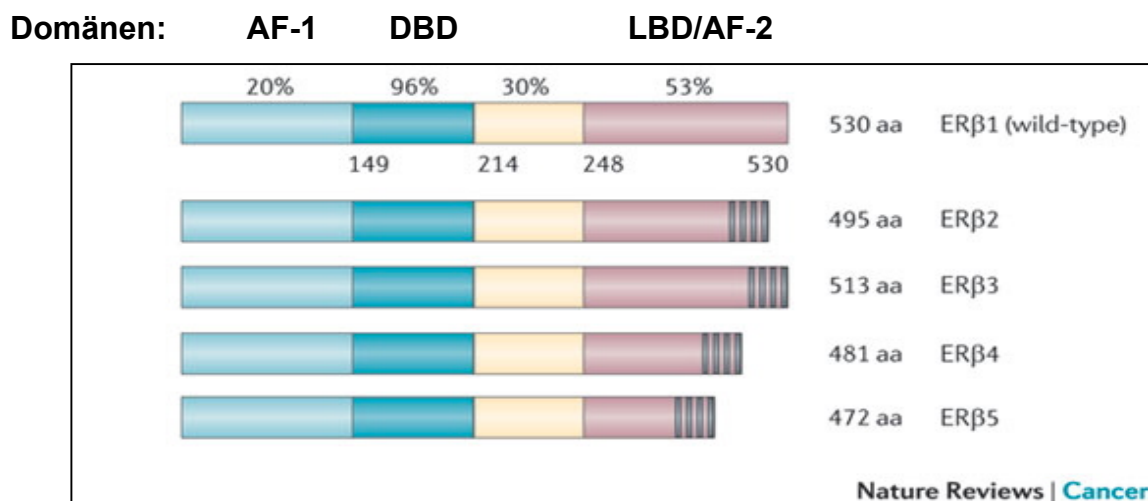


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aminosäureketten der ER β -Isoformen mit Angabe der Anzahl der Aminosäuren und Homologien in % (aa= Aminosäuren) [81].

1.4.2 Die Rolle des ER β 1 beim MaCa

Die Rolle des ER β 1 wurde seit dessen Entdeckung in zahlreichen Arbeiten untersucht. Epidemiologische Studien liefern interessante Erkenntnisse zur Korrelation einer ER β 1-Aktivierung mit einem niedrigeren MaCa-Risiko. So konnte gezeigt werden, dass asiatische Populationen, die sich Soja-reich ernähren, ein signifikant niedrigeres Risiko haben, am MaCa zu erkranken. Ursächlich dafür ist unter Anderem die hohe Konzentration des Phyto-Oestrogens Genistein (**Geni**) in der Soja-Pflanze [82-84]. Geni ist strukturell mit E2 verwandt und gehört zur Gruppe der Isoflavone. Es kann sowohl am ER β 1 als auch am ER α binden, besitzt jedoch

eine rund 70-fach höhere Affinität zu ER β 1 als zu ER α [85]. Dies macht Geni zu einem relativ selektiven ER β 1-Agonist. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Geni den Zellzyklus von Tumorzellen inhibieren kann [86] und im Rattenmodell das Tumorstadium unterbindet [87]. Einige Gruppen demonstrierten anschaulich *in vivo* [88, 89] und *in vitro* [87] dass Geni die Expression von BRCA1 und BRCA2 modulieren kann. Aus diesen Zusammenhängen kann gefolgert werden, dass ein hohes Maß an ER β 1-Aktivierung durch Geni-reiche Ernährung zu der um das Siebenfache niedrigeren MaCa-Inzidenz in asiatischen Ländern führt [82]. Zahlreiche klinische Arbeiten, dargestellt in **Tabelle 2**, weisen darauf hin, dass die Expression des ER β 1 im Tumorgewebe zu einem verbesserten Ansprechen auf endokrine Therapie führt [90-93] während niedrige ER β 1-Levels eher mit Tam-Resistenz korrelieren. Eine Auflistung wichtiger laborexperimenteller Arbeiten zur Aufklärung möglicher Funktionen des ER β 1 ist der **Tabelle 3** zu entnehmen.

Die Rolle des ER β 1 in der klinischen Forschung

ER β 1-Expression korreliert signifikant mit Gesamtüberleben, auch in ER/PR-negativen und Her2/neu-überexprimierenden MaCa-Zellen	[90]
Niedrige ER β -Spiegel sagen Tam-Resistenz voraus	[91]
ER β bewirkt besseres Ansprechen auf endokrine Therapie und erhöht krankheitsfreie Intervalle, korreliert aber mit aggressiverem Wachstum in PR-negativen, nodal-positivem MaCa	[93]
Das Verhältnis zwischen ER α und ER β verändert sich während MaCa-Tumorgenese	[94]
Relative Abnahme von ER β in prä-invasivem Carcinoma in situ (Cis)	[95]
ER β -Expression verbessert die Prognose beim MaCa	[96]

Tabelle 2: Auflistung klinischer Arbeiten zur Untersuchung der Korrelation des ER β 1 mit Tumorgenese, Prognose beim MaCa bzw. Ansprechen auf Tam-Therapie.

Experimentelle Untersuchungen des ER β 1

ER β hemmt in vitro und in vivo die Proliferation von MaCa-Zellen durch Verursachung eines G2-Arrestes des Zellzyklus	[97]
ER β erhöht die Effizienz von Antioestrogenen durch Beeinflussung von Apoptose und Zellzyklus	[98]
ER β reprimiert Cyklin B1, GADDA45A und BTG2 und hemmt die CDK1	[99]
ER β erhöht die Spiegel von Integrin alpha-1 und Integrin beta-1	[100]
Methylierung des ER β -Gens führt zu dessen Abbau und ist ein Frühmarker der malignen Transformation	[101]
Inhibition der Proliferation von T47D-MaCa-Zellen hängt vom Verhältnis ER α :ER β ab.	[102]
Einfluss des Verhältnisses von ER α zu ER β in T47D-Zellen auf die Proliferation nach Behandlung mit ER α -Agonisten	[103]
Genomweite Studie der repressiven Effekte von ER β auf die transkriptionelle Aktivität von ER α	[104]
Behandlung mit Geni bzw. Überexpression von ER β inhibiert die Proliferation von BRCA1-mutierten MaCa-Zellen	[105]
ER β beeinflusst die transkriptionelle Aktivität von ER α durch veränderte Rekrutierung von c-Fos und c-Jun an EREs.	[106]
Geni verstärkt den inhibitorischen Effekt von Tam auf ER-exprimierende und Her2-überexprimierende Zellen	[107]
Genomweite Kartierung von ER β -Bindestellen der DNA sowie Aufklärung eines Crosstalks zwischen ER β und AP-1-Sites	[26]

Tabelle 2: Auflistung wichtiger laborexperimenteller Arbeiten zur Untersuchung der Funktion des ER β 1.

1.4.3 Die Rolle des ER β 2 und des ER β 5

Von allen fünf ER β -Isoformen ist nur der ER β 1 in der Lage, in relevantem Maße Liganden zu binden und ist damit die einzige voll funktionsfähige Isoform im Sinne eines NHR. ER β 2 und ER β 5 scheinen keine intrinsische Transaktivierungsdomäne zu haben, können jedoch Heterodimere mit ER α oder ER β 1 bilden und damit deren

Aktivität modulieren. Leung et. al. konnten zeigen, dass der ER β 5 als dominant positiver Regulator des ER β 1 auftritt [42]. Im Gegensatz dazu scheint der ER β 2 die Funktion des ER α dominant negativ zu beeinflussen [108]. Die Studienlage bezüglich klinischer Ergebnisse bei Expression dieser beiden Isoformen ist bis heute widersprüchlich. Während einige Autoren beobachteten, dass die zytoplasmatische Expression des ER β 2 mit einem insgesamt schlechteren Therapieergebnis korrelierte, fanden Honma et. al. keine Korrelation zwischen der ER β 2-Expression und klinischen Parametern. Andere Autoren wiederum zeigten, dass die nukleäre Expression des ER β 2 und des ER β 5 signifikant mit weniger Metastasierung und Gefäßinvasion korrelierte [90, 93, 109]. Insgesamt steht die Erforschung dieser beiden ER β -Isoformen noch am Anfang. Insbesondere ist unklar, welche Rolle der ER β 2 und der ER β 5 hinsichtlich der zellulären Antwort auf die Behandlung mit Tamoxifen spielen.

2 Fragestellung

Der Zusammenhang zwischen der agonistischen Wirkung des E2 am ER α und der Initiation und Progression des MaCa ist gut untersucht. In der Folge finden an ER α kompetitiv wirkende Pharmaka, wie Tam, seit Jahren Einsatz in der Therapie des MaCa. Jedoch ist ein Problem dabei das Entstehen einer Resistenz gegenüber Tam.

Seit 1996 wurden insgesamt fünf Isoformen eines zweiten Typs des ER, des ER β , identifiziert [23, 74, 75, 77, 78], von denen im Gewebe der Mamma neben dem ER β 1 vor allem die Isoformen ER β 2 und ER β 5 von Bedeutung sind [76, 77, 80]. Seit der Entdeckung des ER β wurde dessen Rolle in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien untersucht, z.T. mit widersprüchlichen Ergebnissen [97-102, 104, 106]. Jedoch bezieht sich die Mehrheit der aufgeführten Arbeiten auf den ER β 1. Es ist bis heute unklar, welche Rolle die Isoformen des ER β 1, nämlich der ER β 2 und der ER β 5, im Hinblick auf die Tumorbilogie des MaCa und das Ansprechen bzw. die Resistenzbildung gegenüber Tam spielen. Aufbauend auf den laborexperimentellen und klinischen Studien sollte in der vorliegenden Arbeit folgender Frage nachgegangen werden:

Wie beeinflussen der ER β 2 und der ER β 5 die Proliferation und Sensitivität von MaCa-Zelllinien gegenüber Tam *in vitro*?

Um dies zu ermitteln, sollte zunächst das Expressionsmuster der genannten Isoformen in verschiedenen MaCa-Zelllinien untersucht und in Zusammenhang mit deren proliferativem Verhalten gebracht werden. Aufbauend darauf sollte die Inkubation mit ER β -Agonisten, wie Genistein und DPN bzw. dem Antagonisten Tam, Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen dem ER-Expressionsmuster und dem Effekt dieser Substanzen auf die untersuchten MaCa-Zellen liefern. Da ERs Bestandteil zahlreicher zellulärer Signalwege sind, sollte mittels eines GFP-Reporter-Assays untersucht werden, ob der ER β -Agonist Geni die transkriptionelle Aktivität des ER α beeinflussen kann.

Im Anschluss sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Aktivierung des ER β 1 durch einen Agonisten *in vitro* die Effektivität von Tam verändern kann. Von besonderem Interesse war dabei, ob die Inkubation mit den genannten Substanzen zu Veränderungen im Expressionsmuster des ER β 2 bzw. des ER β 5 führt und welche

Relevanz diese Expression für das Proliferationsverhalten der MaCa-Zellen haben könnte. Mittels konventioneller und quantitativer PCR sollte daher die Regulierung des ER β 1, ER β 2 und des ER β 5 analysiert werden. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Expression dieser Isoformen auf die Proliferation ausgewählter MaCa-Zellen *in vitro* ausübt. Dazu sollten sowohl Tam-sensitive als auch Tam-resistente MaCa-Zelllinien im stabilen Verfahren mit Expressionsvektoren für den ER β 2 bzw. den ER β 5 transfiziert werden. Von herausragendem Interesse war dabei die Frage, ob der ER β 2 bzw. der ER β 5 die Sensitivität der MaCa-Zellen gegenüber Tam, insbesondere in Tam-resistenten Zellen, beeinflussen kann und ob ER β -Agonisten diesen Effekt verstärken können.

Insgesamt ist es das Ziel dieser Arbeit, ein besseres Verständnis der biologischen Funktion der ER β und seine Isomeren beim MaCa zu erhalten, um diese Erkenntnisse zur Optimierung der Therapie des MaCa, auch bei Tam-Resistenz zu nutzen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

Blot	Trans-Blot SD SEMI-DRY Transfer Cell, BIO-RAD
Brutschrank	CO2 UNITHERM 150
Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply-EPS 601, Amersham Pharmacia, BIO-RAD PP4000
ELISA-Reader	Anthos ht2, Software WinRead
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop	Leica, Leitz DMIL
Protein-Elektrophoresekammer	BIORAD Mini Protean Electrophoresis System
Nukleinsäure-Elektrophoresekammer	BIORAD Subcell GT, mini Subcell GT
Photokammer (Agarosegel)	Bio Rad
Schüttler	IKA KS130 Basic
Thermoblock	Trio-Thermoblock, Biometra
Thermocycler	Biometra, Taqman, Applied Biosystems
Thermomixer	Thermomixer 4536, Eppendorf
Vortexer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF-2
Magnetrührer	Ikamag RCT
Wasserbad	UNITHERM, Model 1225PC
Zentrifugen	Haereus Instruments Zentrifuge, Biofuge Primo, Rotina 46 R, Hettich Instruments
Fluorescence Activated Cell Sorting-Gerät (FACS)	Calibur, BD Immunocytometry Systems
Photometer	Nano-Drop
Stickstofftank	Cryo 2000, Thermo Scientific
Waagen	Sartorius Basic, Chyo MP-300
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr Instruments, Bosch Instruments
Extra dickes Blotpapier	BIO-RAD
15 ml, 50 ml Röhrchen	Polypropylene Conical Tube, BLUE MAX™ Jr. BD Falcon
Film	Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences
Filter	Filter Cards, Thermo Shandon
Kassetten	Hypercassette™, Amersham Life Sciences
PVDF-Membran	ImmunBlot™ PVDF-Membrane, BIO-RAD
Multikanalpipette	Transferpipette-8, 20-200µl, Eppendorf
Multistep-Pipette	MultipipettePlus, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor
Polystyrol-Röhrchen	5ml Polysterene Round Bottom Tube, BD Falcon
1-, 6-, 12-, 24-, 96-Well-Platte (Zellkultur)	Becton Dickinson
Optical Pates	Applied Biosystems
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ²	BD Falcon
Chamber Slides	Lab-Tek® II Chamber Slide™ System, Nalge Nunc International, Naperville, USA

3.2 Antikörper

Primär	200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Serotec oder Cell Signaling
Actin	(I-19) sc-1616, goat polyclonal IgG
ER α	sc-543, rabbit polyclonal IgG
ER β	sc-6822, rabbit polyclonal IgG
ER β 2	MCA2279ST, mouse monoclonal IgG
ER β 5	MCA4676T, mouse monoclonal IgG
Sekundär	
ECLTM Anti-mouse-IgG	HRP-linked whole antibody (from sheep), 1ml, NA931V, GE Healthcare
Goat-anti-rabbit-IgG-HRP	Sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, 200µg/0,5ml
Donkey-anti-goat-IgG-HRP	Sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, 200µg/0,5ml

3.3 Primer

	TIB MOLBIOL
ER-beta1U	5'-cga tgc ttt ggt ttg ggt gat
ER-beta1L	5'-gcc ctc ttt gct ttt act gt
ER-beta2L	5'-ctt tag gcc acc gag ttg att
ER β 1	Forward: gtcctgtcccacgtcag Reverse: tgggcattcagcatctcc
ER β 2	Forward: tgggtgattgccaagagc Reverse: gttgagaggcctttctgc
ER β 5	Forward: gtcctgtcccacgtcag Reverse: cacataatcccatccaagc

3.4 Vektoren

Die Expressionsvektoren für ER β 2, ER β 5 und der Leervektor sowie pRc/CMV wurden freundlicherweise durch Frau Dr. Yoko Omoto, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, zur Verfügung gestellt.

3.5 Reagenzien

Albumin	BSA & BGG Protein Assay Standard Sets, PIERCE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DMEM (mit und ohne Phenolrot)	Biochrom AG
DMEM Ham's F12 1:1	Biochrom AG
FCS	Gibco
CDS	Gibco
G418	Sigma Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
L-Glutamin	Biochrom AG
Trypsin	Biochrom AG
Phospho-Safe-Extraction-Buffer	Roche
BCA	Pierce
ECL Advanced Detection System	Amersham

Blocking-Reagenz	5% non-fat dry milk in 0,05% PBS-Tween
10x Stripping Buffer	Re-Blot Plus Strong, Pierce
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich
Genistein	Sigma-Aldrich
DPN	Tocris
17 β -Estradiol	Sigma Aldrich
LipofectamineTM2000 Transfection Reagent	Invitrogen
PCR-Marker	Smart Ladder, Eurogentech
PCR-Loading Buffer	Novagen
PCR-Nucleotide-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerase	Gold Taq / Roche Diagnostics, Platinum Taq / Invitrogen
10x PCR-Buffer	Roche Diagnostics Mannheim
MgCl ₂	Roche Diagnostics Mannheim
OligoDT	Invitrogen
M-MLV	Invitrogen
RNasin	Invitrogen
Propidiumiodid	Carl Roth, Karlsruhe
Protein Marker	Bio Rad Blue
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Pierce

3.6 Lösungen und Puffer

MTT 1-Reagenz labeling reagent	3-(4,5)-Dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid (Sigma), 5mg/ml PBS (PAA)
MTT 2-Reagenz solubilization solution	10 % SDS (Roth) in 0,01 M HCl (Merck) 1:200 mit Aqua dest. verdünnen
Lösung B für Zellzyklusanalyse (pH 7,6)	1 g Trisodiumcitrat-2 H ₂ O (Merck) 1 % Igepal (Sigma) 522 mg Sperminhydrochlorid (Sigma) 61 mg Tris(Hydromethyl)aminomethan (Merck) 100 mg RNase A (Sigma) mit Aqua dest. auf 1000 ml
Lösung C für Zellzyklusanalyse (pH 7,6)	1 g Trisodiumcitrat-2 H ₂ O 1 % Igepal 522 mg Sperminhydrochlorid 61 g Tris(Hydromethyl)aminomethan 208 mg Propidiumjodid mit Aqua dest. auf 1000 ml
Lysispuffer, 50ml	20 mM Tris-HCl (SAFC), pH 8

	137 mM NaCl (Merck) 10 % Glycerol (Sigma) 1 % Triton X-100 (Sigma) 2 mM EDTA 1 mM Sodium-Orthovanadat 1x EDTA-free Protease Inhibitor (Roche)
10% Trenngel, 10ml	4,8 ml Aqua dest. 2,5 ml Acrylamid (40%ig, Roth) 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS (Sigma) 5 µl TEMED (Roth)
4% Sammelgel, 5ml	3,2 ml Aqua dest. 0,5 ml Acrylamid 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 50 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 10 µl TEMED
2x SDS, 10ml	0,2 ml (250 mM) 0,5 M Tris-HCl 8 ml (4 % SDS) 10 % SDS 2 ml (10 %) Glycerol
Ladepuffer 4x	1,25 ml 0,5 M Tris HCl 2,5 ml Glycerol 5 ml 20 % SDS 1,25 ml 1 % Bromphenolblau (Sigma) 20 % β-Mercaptoethanol (Sigma)
Elektrophoresepuffer 10x	125 mM Tris-Base 960 mM Glycin (Roth) 4 mM SDS
Transferpuffer 10x	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin In 900 ml Aqua dest. lösen, vor Gebrauch 10 % Methanol (Merck) dazugeben
Waschpuffer PBST 0,05%	1l PBS mit 500 µl Tween 20 (Sigma)

3.7 Kits

RNEasy Kit	Qiagen
MiniPrep	Qiagen
MaxiPrep	Qiagen
Proteinbestimmung BCA	Reagenz A (BCATM Protein Assay Reagent A, PIERCE) Reagenz B (BCATM Protein Assay Reagent B, PIERCE)
PCR Mycoplasma Test Kit	AppliChem
QuantiFast SYBR Green Mastermix	Qiagen

3.8 Zelllinien und Kultivierung

Es wurden die MaCa-Zelllinien MCF-7, T47D, BT-474, BT-20, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-435 und SKBR-3 verwendet, bezogen über ATCC (Manassas, VA, USA). Die Zelllinie MCF-E10 wurde freundlicherweise überlassen durch Dr. Y. Yamaguchi [110]. Die Tam-resistente Zelllinie MTR-3 wurde freundlicherweise überlassen durch Dr. M. D. Planas-Silva (Department of Pharmacology, Penn State College of Medicine, Hershey, PA, USA). Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in Wasserdampf-gesättigter, 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C in Kulturflaschen kultiviert. Für die Zelllinien MCF-7, T47D, BT-20, BT-474, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-436 und SKBR-3 wurde als Zellkulturmedium DMEM, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (**FKS**) und 1% Penicillin/Streptomycin (**P/S**), verwendet. Die Zelllinien MTR-3 sowie alle transfizierten MTR-3-Zellen und die mit Green-Fluorescent Protein (**GFP**) - transfizierte Zelllinie MCF-E10 wurden in DMEM-Kulturmedium ohne Phenolrot kultiviert, ergänzt durch 4 mM Glutamin, 5% Charcoal-depleted Serum (**CDS**) sowie 1% P/S. Die stabil transfizierten MCF-7-Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 1:1-Medium kultiviert, dem 10% FKS und 1% P/S zugesetzt worden waren. Die Passage der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage in einem Verhältnis 1:5. Die Zelllinie MTR-3 wurde zusätzlich bei jeder Passage mit 1µM 4-OHT behandelt, um die Resistenz aufrecht zu erhalten. Allen transfizierten Zellen wurde jeweils 500 µg/ml Geneticin (**G418**) als Antibiotikum zugesetzt um die stabile Transfektion aufrecht zu erhalten. Für Passagen und Experimente wurden die Zellen mit 2ml eiskaltem Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37°C inkubiert, wodurch eine Lösung der Adhärenz in der Kulturflasche sowie der Zell-Zell-Kontakte erreicht werden konnte. Anschließend wurde das Trypsin bei 900 rpm abzentrifugiert und die Zellen in Kulturmedium re-suspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Alle vier Wochen wurden die Zellen auf Mycoplasmen mittels eines PCR-basierten Mycoplasmentests getestet. Mycoplasmen-haltige Zellen wurden verworfen.

3.9 Lösung und Aufbewahrung der verwendeten Substanzen

4-OHT, Geni und DPN wurden in DMSO gelöst und in Form einer 10⁻² M Stammlösung bei -80°C aufbewahrt. E2 wurde in 96%igem Ethanol gelöst und in Form einer 10⁻³ M

Stammlösung bei -20°C aufbewahrt. Für Experimente wurden die Substanzen jeweils frisch aufgetaut und sofort verwendet.

3.10 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Assay zur Überprüfung der Zellvitalität und Proliferation [111]. Der Nachweis vitaler Zellen basiert auf einer optisch-enzymatischen Reaktion durch mitochondriale Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen. Dabei wird das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT-Reagenz 1) in wasserunlösliche violette Formazankristalle umgesetzt. Durch mittels 10mM HCl angesäuertes SDS, 10-fach verdünnt in Isopropanol, (MTT-Reagenz 2) können diese Kristalle gelöst werden. Mittels eines ELISA-Readers kann die Extinktion durch das gelöste Formazan quantitativ bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden. Die gemessene Extinktion ist dabei der Anzahl lebender Zellen direkt proportional. Zur Durchführung wurden 96-Well-Platten mit $5-10 \times 10^4$ Zellen/ml, suspendiert in jeweils 90µl Phenolrot-freiem ZKM, bestückt. Nach 24 h wurden die jeweiligen Substanzen in jeweils 10 µl gelöst und dazu pipettiert. Als Negativkontrolle wurde ZKM verwendet. Ebenso wurde eine Kontrolle, nur die Verdünnungsreihe der entsprechenden Lösungsmittel enthaltend, mitgeführt. Die Platten wurden über Zeiträume von 48h bis 96h bei 37°C, 5%iger CO₂-Athmosphäre und Wasserdampfsättigung im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten für vier Stunden mit MTT-Reagenz 1 zu 10 µl/Well und anschließend für 24h mit MTT-Reagenz 2 zu 100 µl/Well behandelt. Es folgte die Messung der Extinktion am ELISA-Reader.

3.11 RNA-Isolierung

Zur Untersuchung der Regulation von mRNA-Levels in den MaCa-Zellen wurden 1×10^6 Zellen zunächst in 12-Well-Platten ausgesät. Als Kulturmedium wurde DMEM ohne Phenolrot, ergänzt durch 5% CDS, 1% P/S und 4 mM Glutamin verwendet. Es erfolgte die Behandlung der Zellen mit 1 µM 4-OHT bzw. 1 pM Geni über einen Zeitraum von 1 – 24 Stunden. Zur Negativkontrolle dienten Zellen, die nur in ZKM kultiviert worden waren. Eine DMSO-Kontrolle wurde mitgeführt. Es erfolgte das Absaugen des Mediums und das zweimalige Waschen der Zellen in PBS. In jedes Well wurden 350 µl RLT

Lysispuffer inklusive 1% Mercaptoethanol (**ME**) pipettiert. Das Lysat wurde in die im Kit enthaltenen Shredder Columns überführt und für 30 Sekunden bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die entstandene Suspension wurde mit jeweils 350 µl Ethanol (70%) vermischt. Dieses Gemisch wurde in die im Kit enthaltenen Mini Spin Columns gegeben und für die Dauer einer Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Columns mit 700 µl des RW1-Puffers sowie zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl des RPE-Puffers. Beim letzten Waschen wurden die Columns für eine Dauer von 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurden die Columns in Eppendorf-Gefäße mit einem Volumen von 1,5 ml überführt. Auf jede Column wurden 50 µl RNase-freies Wasser pipettiert und die RNA durch 1 – minütiges Zentrifugieren bei 14.000 rpm eluiert. Im Anschluss wurde die Konzentration der RNA spektralphotometrisch gemessen. Alle Proben wurden anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.12 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription in cDNA wurde jeder Probe ein Volumen entsprechend 1µg mRNA entnommen und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 12,5 µl verdünnt. Anschließend wurden die Proben jeweils mit einem Master-Mix vermischt, bestehend aus: 5 µl 5x Puffer, 2,5 µl DTT (0,1 M), 0,5 µl Oligo DT, 2,5 µl dNTP (10 mM), 0,75 µl RNAsin (40 U/µl) und 1,25 µl M-MLV. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und anschließend für 60 Minuten bei 42°C in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde bei -20°C für weitere Experimente aufbewahrt.

3.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung wurden für je Probe 24 µl eines Master-Mixes angesetzt. Dieser enthielt jeweils 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl₂, jeweils 1,25 µl des Forward- bzw. Backward-Primers (10µM), 0,375 µl dNTPs (10 mM), 0,125 µl Taq Gold und 17µl Aqua dest.. Die 24µl des Master-Mixes wurden mit je 1 µl cDNA vermischt. Zur Herstellung einer Negativkontrolle wurde Master-Mix mit 1 µl Aqua dest. vermischt. Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler zu folgenden Bedingungen:

	β-Actin:	ERβ1, ERβ2, ERβ5
Initiales Melting: <i>40 Zyklen aus</i>	95°C, 10 Min.	94°C, 10 Min.
Melting:	95°C, 1 Min.	94°C, 30 Sek.
Annealing:	56°C, 1 Min.	56°C, 30 Sek.
Elongation:	72°C, 1 Min	72°C, 30 Sek.
Finale Elongation:	72°C, 10 Min.	72°C, 7 Min.

Alle PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel, 0,5 μ l Ethidiumbromid enthaltend, bei 100 Volt und einer Laufzeit von 70 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Ergebnis der Elektrophorese unter der UV-Kamera ausgewertet.

3.14 Real-time quantitative PCR

Die Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) ist eine Amplifizierungsmethode für DNA, mittels welcher es gelingt, quantitative Aussagen über die gewonnenen PCR-Produkte zu treffen. Das Prinzip beruht auf dem Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes in doppelsträngige DNA sowie dessen Erfassung durch einen Detektor während der einzelnen PCR-Zyklen. In der Exponentialphase der PCR ist das Fluoreszenzsignal der gewonnenen DNA-Menge direkt proportional. Ermittelt wird der sog. Ct-Wert (*Cycle of threshold*), welcher dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der PCR entspricht, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte gemäß den Empfehlungen des QuantiFast™ SYBR Green-Protokolls. Dazu wurden jeweils 500 ng DNA, gelöst in 1 μ l Aqua dest. mit 12,5 μ l SYBR Green PCR Master Mix, 0,75 μ l forward primer, 0,75 μ l reverse primer (primer zu je 0,3 μ M) und RNase freiem Wasser versetzt. Zur Messung wurden optische 96-well-Platten mit je 25 μ l Probenvolumen bestückt. Zur Herstellung einer Negativkontrolle wurde der Mastermix mit 1 μ l RNase-freiem Wasser vermischt. Als interne Kontrolle wurde für jede Einzelprobe eine qRT-PCR mit β -Actin-Primern durchgeführt. Die qRT-PCR wurde am ABI™ Prism 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Die Bedingungen waren: Initiales Warming für 2 min bei 50°C, initiales Melting für 10 min bei 95°C, Amplifikation und Annealing für 15 sec bei 95°C und 1 min

bei 60°C mit 40 Zyklen. Die rechnerische Analyse wurde durch die Sequence Detection System Software durchgeführt. Die Auswertung basierte auf der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der die in der qRT-PCR gemessene relative Expression des Zielgenes in Form des C_T -Wertes auf den C_T -Wert eines konstant exprimierten Gens (hier: β -Actin) normalisiert und anschließend auf den C_T -Wert der unbehandelten Kontrolle bezogen wurde.

3.15 Green-fluorescent-protein (GFP)-reporter-Assay

Die Zelllinie MCF-E10 weist ein an das ERE gekoppeltes Reporter-Gen für das GFP auf. Transkriptionelle Aktivität am ERE induziert automatisch GFP. Dieses emittiert grün fluoreszierendes Licht, welches sich unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren lässt und damit indirekt auf eine Aktivierung des ERE schließen lässt. MCF-E10 wurden 14 Tage in DMEM ohne Phenolrot, versetzt mit 5% CDS, 1% P/S, 4mM Glutamin und 500 μ g/ml G418 vorbehandelt. Jeweils 1×10^5 Zellen wurden in Chamber Slides ausgesät. Dann erfolgte die Behandlung der Zellen mit jeweils 1nM E2 und 0,01 pM, 1 pM bzw. 1 nM Geni. Mit 1nM E2 behandelte Zellen dienten als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wurde nur Kulturmedium verwendet. Die Chamber Slides wurden für 24h bzw. 48h im Brutschrank inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und ausgewertet.

3.16 Präparation chemo-kompetenter *E. coli*

In Vorbereitung auf die stabile Transfektion des ER β 2, ER β 5 bzw. Leervektors in MaCa-Zellen sollten die Expressionsvektoren in schnell proliferierende Bakterien transformiert werden, um Amplifikate des Expressionsvektors zu erhalten. Als Expressionsvektoren dienten in diesem Fall Plasmide, die uns freundlicherweise von Frau. Dr. Yoko Omoto (Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden) überlassen worden waren. *Escherichia coli* des Stammes DH5 α wurden zunächst mit der CaCl₂-Methode chemo-kompetent gemacht. Dazu wurde eine 1M CaCl₂ - Lösung mit Aqua bidest. angesetzt, steril filtriert (Porengröße des Sterilfilters = 0,45 μ m) und auf 0°C abgekühlt. Anschließend wurde ein Gemisch aus einer 80 M MgCl₂ - Lösung und einer 20 M CaCl₂ - Lösung hergestellt und ebenfalls auf 0°C gekühlt. Dann erfolgte das Ansetzen einer *E.coli*-Vorkultur. Dazu wurden 6 ml flüssiges LB-Medium mit *E.coli* beimpft und bei 37°C

über Nacht auf dem Schüttler kultiviert. Am folgenden Morgen erfolgte das Ausstreichen der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten. Die Agarplatten wurden über einen Zeitraum von 18 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Anschließend erfolgte das Beimpfen von 200 ml flüssigen LB-Mediums in einem großvolumigen Erlenmeyerkolben durch eine zuvor aufgezoogene Bakterienkolonie. Die Bakterien wurden nun für rund drei Stunden bei 37°C auf einem Schüttler bebrütet. Dabei wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe entnommen und photometrisch bei 600nm Wellenlänge die Bakteriendichte ermittelt. Zur Eichung des Photometers wurde reines LB-Medium verwendet. Bei einer Optischen Dichte von 0,35 wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Bakterien in eisgekühlte, sterile 50 ml-Tubes überführt und für die Dauer von 10 Minuten bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden das Kulturmedium bei 4100 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das verbleibende Bakterien-Pellet wurde nun vorsichtig in 30 ml eiskalter MgCl₂-CaCl₂-Lösung re-suspendiert. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 4100 rpm für 10 Minuten und das Verwerfen des Überstandes. Nun wurde das Pellet in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung re-suspendiert und bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt.

3.17 Transformation mit der Hitzeschock-Methode

Entsprechend den drei Expressionsvektoren wurden je drei eisgekühlte Eppendorfgefäße mit 100µl der chemo-kompetenten E.coli-Suspension befüllt. Anschließend wurde in jedes Gefäß 1µl der Plasmidlösung (entsprechend maximal 50ng DNA pro 10µl) pipettiert und das Gemisch für eine Dauer von 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße in ein auf 42°C erhitztes Wasserbad überführt und dort für 90 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Gefäße wurden danach sofort für einige Minuten in Eiswasser gekühlt. Nachfolgend wurden jeweils 400 µl LB-Medium in jedes der Gefäße pipettiert und die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Im Anschluss wurden jeder Kultur 200 µl Volumen entnommen, auf einer mit 20 mM MgSO₄ versetzten LB-Agarplatte ausgestrichen und für rund 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Da das Plasmid, welches als Expressionsvektor diente, ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthielt, konnten durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zum LB-Agar, sicher transformierte Bakterien selektiert werden.

3.18 Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E.Coli*

Das Gewinnen von Plasmid-DNA aus transformierten *E.Coli* erfolgte gemäß dem Protokoll des „QiaPrep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen). Zunächst wurden drei Tubes, enthaltend 150 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, mit transformierten *E.coli* beimpft und für 16 Stunden bei 37°C auf dem Schüttler bebrütet. Im Anschluss wurden jeweils 2ml der Bakteriensuspension in Eppendorfgefäße gegeben und bei Raumtemperatur mit 8.300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl RNase A enthaltendem P1-Puffer resuspendiert. Dieser Suspension wurden zunächst 250 µl P2-Puffer und anschließend 350 µl N3-Puffer zugesetzt. Nach vorsichtigem Mischen der Suspension erfolgte 10-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde in QIAprep spin columns pipettiert und erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 0,75ml PE-Puffer zum Waschen der Säulen musste sämtliche Flüssigkeit in mehreren Zentrifugationsschritten bei 13.000 rpm entfernt werden. Schließlich konnte die Plasmid-DNA mit jeweils 50µL 10mM Tris-HCL (pH = 8,5) eluiert werden. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde erneut spektralphotometrisch gemessen.

3.19 Enzymverdau

Nach erfolgter Amplifikation des Plasmids in den transformierten Bakterien sollte zunächst die Korrektheit des Amplifikates überprüft werden. Dazu wurde das isolierte Plasmid mit Hilfe des Enzyms BamH1 geschnitten. Dabei handelt es sich um eine Restriktionsendonuclease, die ursprünglich aus *Bacillus amyloliquefaciens* spec. isoliert worden war und die doppelsträngige DNA spezifisch an einer G'GATCC-Sequenz schneidet. Für jeden Expressionsvektor wurden 50 µL eines Reaktionsgemisches, bestehend aus 5x-Puffer, 1 µg Plasmid-DNA, 2 µL BamH1 und Aqua bidest. angesetzt und in 0,5 µL-Eppendorfgefäßen über Nacht im bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Am folgenden Tag wurden die geschnittenen DNA-Produkte in einem 1%igen, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzten Agarosegel elektrophoretisch bei 100 Volt aufgetrennt und anschließend unter einer UV-Kamera überprüft.

3.20 Isolierung von Plasmid-DNA für die Transfektion

Die Isolierung der in den E.coli amplifizierten Plasmid-DNA wurde gemäß dem QIAgen™-MaxiPrep-Protokoll isoliert und entsprach den in 3.18 aufgeführten Arbeitsschritten.

3.21 Transfektion

Die Transfektion wurde mit einer chemische Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Fremd-DNA an das Transfektionsreagenz gebunden.

Mittels kationischer Peptide erfolgt die Bildung von Poren in der Zellmembran der Zielzellen, durch welche die zu transfizierende DNA in die Zellen aufgenommen werden kann. Alle Zellen waren zunächst in ZKM kultiviert worden. Für die Transfektion wurden sie in 6-well Platten, mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/Well, ausgesät und so lange im Brutschrank kultiviert, bis die Zellen zu 90% konfluent waren. 12h vor der Transfektion wurde das Medium gegen ein Antibiotikum-freies ZKM ausgetauscht. Um ein geeignetes Mischungsverhältnis zwischen DNA und Transfektionsreagenz zu finden, wurden zunächst verschiedene Testansätze aus jeweils 4µg DNA und sechs unterschiedlichen Testdosen (4µl, 10µl, 12µl, 16µl und 20µl) der Transfektionslösung Lipofectamin 2000™, gelöst in Opti-MEM I Reduced Serum Medium, hergestellt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 500µl des Reaktionsgemisches wurden in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium gegen normales ZKM ausgetauscht und die Zellen für weitere 24h im Brutschrank aufbewahrt. Zur Kontrolle des Transfektionserfolges wurde eine RT-PCR mit mRNA der transfizierten Zellen durchgeführt und das PCR-Produkt in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und fotografiert. Für weitere Transfektionsexperimente wurde schließlich die Lipofectaminkonzentration gewählt, die zum besten Transfektionsergebnis geführt hatte.

3.22 Selektion stabil transfizierter MCF-7- bzw. MTR-3-Zellen

Zum Zweck der Selektion stabil transfizierter Zellen wurden diese zunächst mit einer Dichte von 1 Zelle/Well in 96-Well-Platten ausgesät. Als Kulturmedium wurde

DMEM/Ham's F12 1:1, unter der Zugabe von 10% FCS, 1% P/S und 4 mM Glutamin verwendet. Bei Vorhandensein eines G418-Resistenzgens auf dem Plasmid, wurden die Zellen dann mit steigenden Konzentrationen von G418 behandelt, wobei eine Startdosis von 100 µg/ml verwendet wurde. Das Kulturmedium wurde alle 4 Tage gewechselt. Bei jedem zweiten Mediumwechsel erfolgte eine Verdopplung der G418-Dosis bis zu einer Maximaldosis von 1mg/ml. Es wurden dann jeweils die Kolonien für die weitere Kultur ausgewählt, die unter G418-Selektion die größten Kolonien gebildet hatten. Der Erfolg der Transfektion wurde durch RT-PCR überprüft.

3.23 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Propidiumiodid (PI) ist eine fluoreszierende Substanz, die stöchiometrisch zwischen Basenpaaren der DNA interkaliert. Diesen Zusammenhang macht man sich für die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie zunutze, indem man mit PI gefärbte Zellen maschinell an einem Laserstrahl vorbeileitet. Trifft der Laserstrahl auf den Fluoreszenzfarbstoff, führt dies zur Anregung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Bei der Rückkehr auf das Ursprungsniveau emittieren die Elektronen diese Energie in Form von Photonen, deren Konzentration durch einen Photodetektor ermittelt wird. Dabei verhält sich die gemessene Photonenkonzentration direkt proportional zur Menge des an die DNA gebundenen PI. Da die Menge des Fluoreszenzfarbstoffes wiederum direkt proportional der Konzentration doppelsträngiger DNA entspricht, kann mit Hilfe der PI-Färbung rechnerisch auf das Zellzyklus-Stadium der Zellen geschlossen werden. Die spezifische Exzitationswellenlänge beträgt 535 nm und eine Emissionswellenlänge 617 nm. Für die graphische und statistische Auswertung wurde das Programm CellQuestPro verwendet. Für die Kalibrierung des Gerätes wurden MCF-7-Zellen als Standard verwendet, um spezifische Fluoreszenz- und Streulichtwerte zuordnen zu können. In Vorbereitung auf die Zellzyklusanalyse wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und für 36h in DMEM ohne Phenolrot + 1% P/S + 1% CDS inkubiert. Dabei bewirkt die Kultur in nährstoffarmem Medium einen Entzug wichtiger Wachstumsfaktoren, was eine Synchronisierung aller Zellen im G0/G1-Stadium ermöglicht. Dann wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen, verdünnt in ZKM, behandelt und für 24h bzw. 48h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, bei 900 rpm zentrifugiert und in PBS re-suspendiert. Es erfolgte die Fixierung der Zellen in

eiskaltem, 70%igen, Ethanol. In fixiertem Zustand können die Zellen bei -20°C aufbewahrt oder weiterverarbeitet werden. Zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und anschließend mit jeweils $500\mu\text{l}$ Propidiumiodid gefärbt. Dazu wurden die Zellen mit dem lichtempfindlichen Farbstoff für 40 Minuten bei 37°C auf einem abgedunkelten Schüttler behandelt. Im Anschluss wurde überschüssiger Farbstoff, unter Belassung einer Restmenge von ca. $300\mu\text{l}$, abzentrifugiert. Da es sich bei MaCa-Zellen um adhärente Zellen mit der Tendenz zur Aggregation handelt, mussten die Zellen vor der eigentlichen Durchflusszytometrie zur Gewährleistung der Einzelzelldetektion noch aufgeschüttelt und durch einen Filter pipettiert werden.

3.24 Proteinisolierung

Pro Ansatz wurden 2×10^6 Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus der Kulturflasche geschabt. Die Zellsuspension wurde mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen, in $1,5\text{ ml}$ -Eppendorfgefäße überführt und mehrmals für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und in PBS re-suspendiert. Anschließend erfolgte – in Abhängigkeit der Größe des Zellpellets – die Zugabe von $80 - 200\mu\text{l}$ Lysispuffer. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur, unter mehrmaligem Vortexen, erfolgte die Zentrifugation für 30 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C und damit das Auftrennen der Proteinlösung vom restlichen Zelldetritus.

3.25 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit der BCA-Methode entsprechend den Angaben des Herstellers (Pierce). Zur Messung wurden jeweils $2\mu\text{l}$ des Proteinlysates im Verhältnis von 1:50 mit PBS vermischt. Davon wurden je $30\mu\text{l}$ zusammen mit je $200\mu\text{l}$ der BCA-Reagenz in eine Mikrotiterplatte gegeben. Es wurden jeweils Dreifachansätze pipettiert. Dann erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatte für 60 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler und die kolorimetrische Messung am ELISA-Reader. Dabei wurde die Konzentration mit Hilfe eines mitgeführten Albuminstandards berechnet.

3.26 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurden jeweils 50µg Protein mit 10µl Ladepuffer (+ME, Verhältnis 1:5) vermischt und mit SDS (+ ME, Verhältnis 1:50) auf ein Probenvolumen von 20 µl verdünnt. Das erwünschte Denaturieren der Proteine erfolgte bei 95°C und 700U/min für 10 Minuten auf einem Thermomixer. Sofortiges Überführen der Proben auf Eis verhinderte eine Renaturierung. Anschließend erfolgte die Elektrophorese von je 17µl Probenlösung sowie einem Protein-Marker in einem 10 – 12%igen Acrylamidgel (die Dichte des Gels wurde der Größe des gesuchten Proteins angepasst) für 90 – 120 Minuten bei 100 Volt und 25 mA. Zur Aktivierung vor dem Blot wurden PVDF-Membranen für 1 Minute in Methanol inkubiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Acrylamidgele zusammen mit den Membranen und Blotting-Papier für 30 Minuten in Transferpuffer gelegt. Anschließend erfolgte die Schichtung des Blots in folgender Reihenfolge (von unten nach oben): Blot-Papier, PVDF-Membran, Acrylamidgel, Blot-Papier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte unter der Anlage von 15 V für 90 Minuten. Zur Kontrolle des Blot-Erfolges wurden die Membranen kurz in 0,1% Ponceau-S-Lösung geschwenkt, was eine Rotfärbung der Proteinbanden bewirkt. Nach mehrmaligem Waschen der Membranen in 0,05% PBS-Tween-Lösung wurden diese zum Blockieren unspezifischer Bindungen auf einem Schüttler für 60 Minuten mit je 10 ml eines 5%igen Blockierungspuffers behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation über Nacht mit einem gewünschten Primärantikörper, gelöst in 5% Blocking-Buffer, welcher jeweils spezifisch gegen das gesuchte Protein gerichtet war. Am nächsten Tag wurde nach mehrmaligem Waschen in PBS-Tween schließlich der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper, gelöst in 1% Milch, für 90 Minuten zu den Membranen gegeben. Die Zugabe einer Elektrochemilumineszenz-Lösung (ECL) als Substrat der Meerrettich-Peroxidase für 5 Minuten, bewirkte eine Aussendung von Lichtquanten in den, durch spezifische Antikörper markierten Regionen der Membranen. Mittels dieser Lichtreaktion wurden in einer Dunkelkammer Röntgenfilme belichtet. Zur Wiederverwendung der Membranen wurden diese für 20 Minuten in Stripping-Buffer geschüttelt, in PBS-Tween gewaschen und für 45 Minuten in 5% Milch geblockt.

3.27 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in drei bzw. sechs unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel bzw. SPSS. Alle Ergebnisse sind durch einen Mittelwert unter Angabe der Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung statistischer Signifikanzniveaus wurde der Student's T-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von ERs in verschiedenen MaCa-Zelllinien

Wie mittels Western Blot (**Abb. 1**) und RT-PCR (**Abb. 2**) nachgewiesen werden konnte, zeigen alle untersuchten MaCa-Zelllinien ein unterschiedliches Expressionsmuster für den ER α , ER β 1, ER β 2 bzw. den ER β 5. Der ER α wird in allen Zelllinien außer MDA-MB-231, MDA-MB-436 und SKBR-3 exprimiert. Die Ausbildung des ER β 1-Proteins reflektiert die Expression der ER β 1-mRNA: mit Ausnahme der Zelllinie SKBR-3 findet es sich in allen untersuchten Zelllinien. Hinsichtlich der Expression von ER β 2 und ER β 5 zeigen sich große Unterschiede: Die Zelllinien MCF-7, MTR-3, ZR75-1 und T47D exprimieren sowohl ER β 2- als auch ER β 5-mRNA. Jedoch weisen die Zelllinien MCF-7 und ZR75-1 in Relation mehr ER β 5 auf, während MTR-3- und T47D-Zellen in Relation mehr ER β 2 ausbilden. BT-20-Zellen exprimieren nur den ER β 5, während MDA-MB436-Zellen nur den ER β 2 aufweisen. SKBR-3-Zellen weisen relativ gleiche Konzentrationen der verkürzten Isoformen ER β 2 und ER β 5 auf.

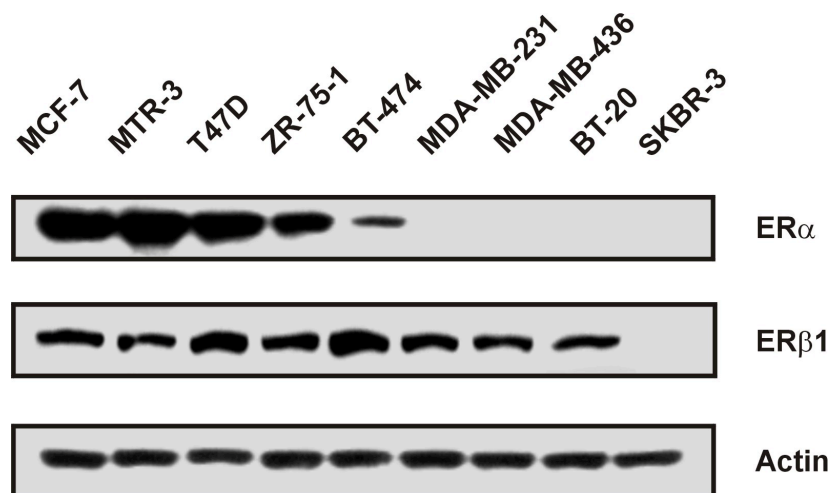


Abbildung 1: Darstellung der Proteinexpression von ER α und ER β 1 in neun verschiedenen MaCa-Zelllinien, nachgewiesen durch Western Blot. β -Actin diente als Kontrolle der jeweils verwendeten Gesamtproteinmenge.

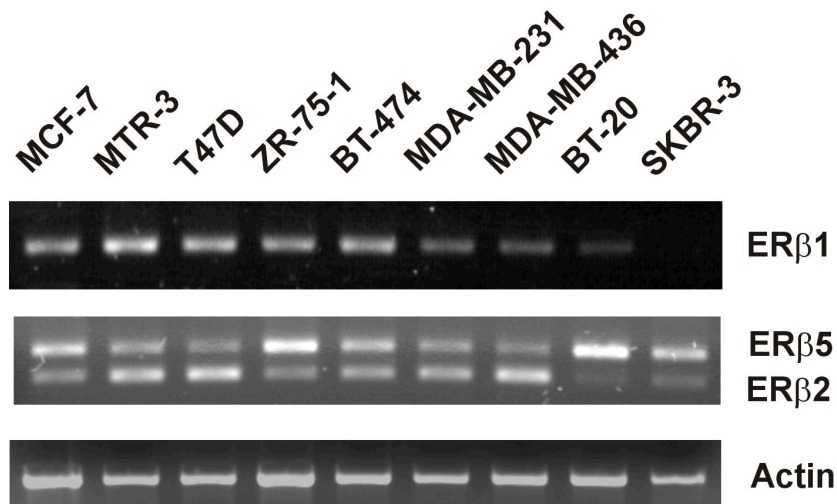
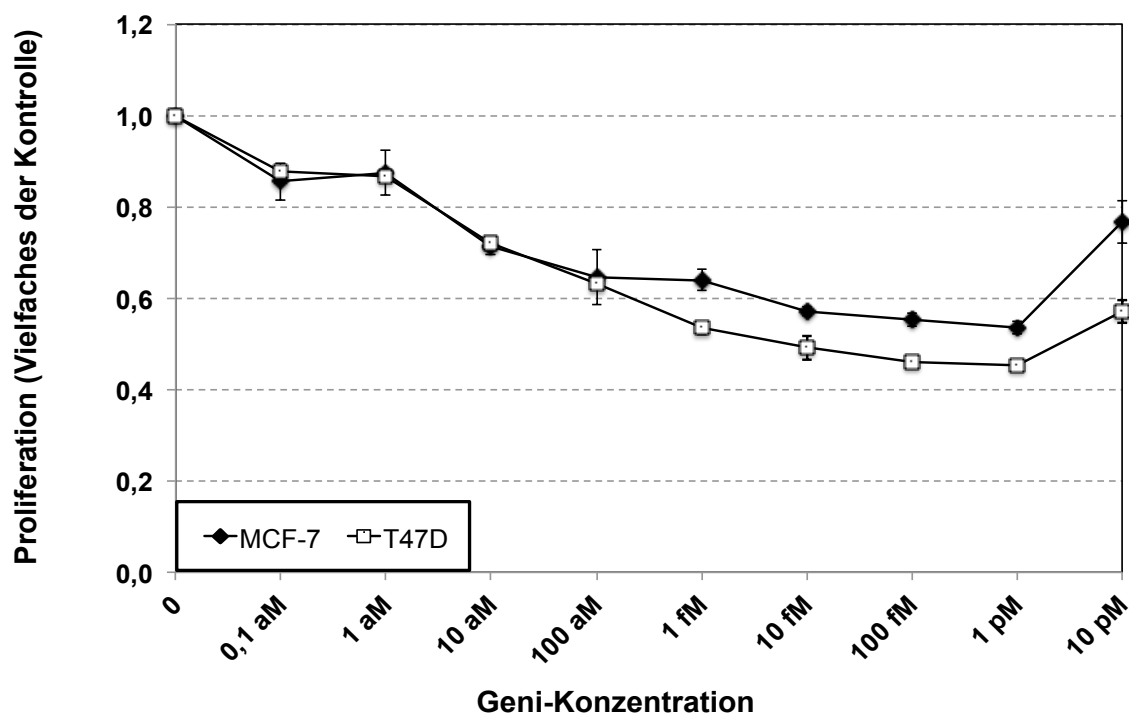


Abbildung 2: mRNA-Expression der ER β -Isoformen ER β 1, ER β 2 und ER β 5, nachgewiesen mittels RT-PCR. β -Actin diente der internen Kontrolle.

4.2 Effekt von ER β -Agonisten auf die Proliferation von MaCa-Zelllinien

Nachdem bereits gezeigt worden war, dass die Aktivierung des ER β 1 eine Hemmung der Proliferation in MCF-7-Zellen verursachen kann [97], sollte mittels MTT-Test untersucht werden, inwieweit ER β -Agonisten die Proliferation verschiedener Zelllinien beeinflussen können. Sowohl das Phyto-Oestrogen Geni als auch der synthetische ER β -Agonist DPN verursachten nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden eine dosis-abhängige Hemmung der Proliferation in MCF-7- und T47D-Zellen (**Abb. 3**). Insbesondere für Geni fand diese Hemmung im Bereich homöopathischer Konzentrationen von 1 aM bis 1 pM statt. Interessanterweise bewirkte sowohl die Konzentrationssteigerung von Geni als auch von DPN in beiden Zelllinien eine Zunahme der Proliferation. Auch eine Zeit-abhängige Wirkung der Substanzen konnte nachgewiesen werden. Dabei stellte sich ein sichtbar Proliferations-hemmender Effekt erst nach ca. 3 Tagen ein (**Abb. 4**).

A



B

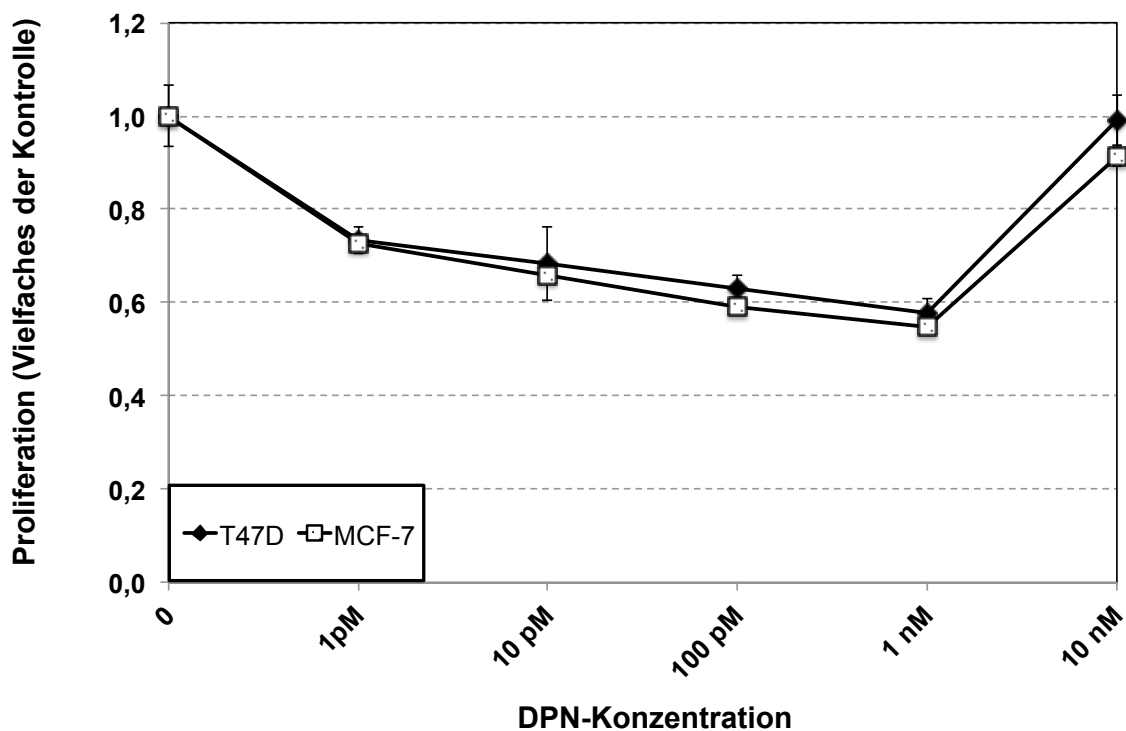


Abbildung 3: Zell-Proliferationskurven, dargestellt als Vielfaches Kontrolle für die MaCa-Zelllinien MCF-7 und T47D nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen **(A)** Geni bzw. **(B)** DPN. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils Sechsfachansätzen.

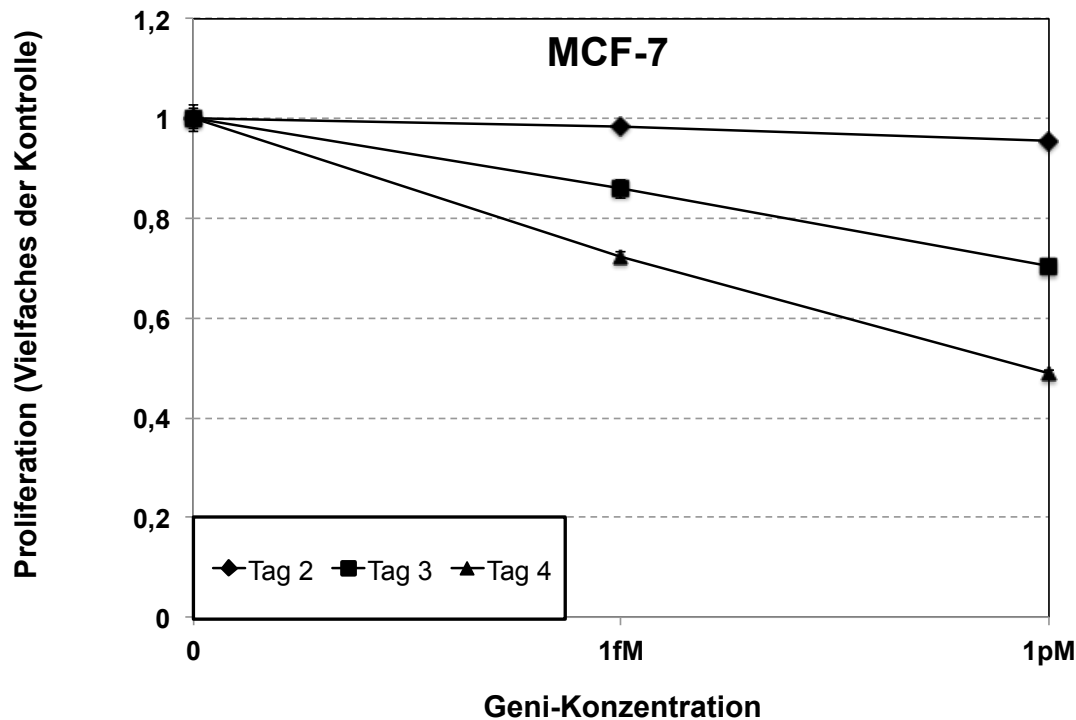
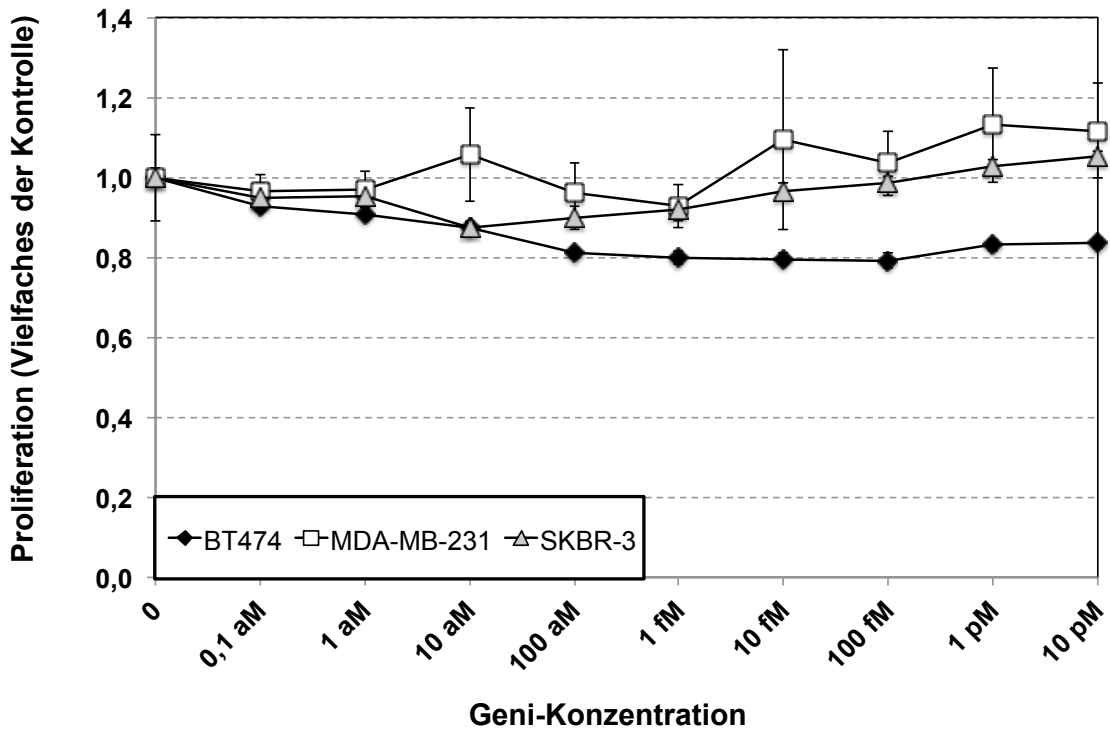


Abbildung 4: Darstellung der im MTT-Test gemessenen Proliferation als Vielfaches der Kontrolle für die MaCa-Zelllinie MCF-7 nach Inkubation über 48h, 72h und 96h mit verschiedenen Konzentrationen Geni (0,1 fM und 1 pM). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils Sechsfachansätzen.

Zelllinien, die keinen ER α exprimieren, wie z.B. MDA-MB-231-Zellen, reagierten nicht auf die Behandlung mit Geni. Auch BT-474-Zellen zeigten keine Reaktion auf die Inkubation. Diese Zelllinie weist zwar ER α -Protein auf, gehört jedoch zu den Her2/neu über-exprimierenden Zellen, was eine Entkopplung der Proliferation von ER bedeutet. Um eine unspezifische, ER-unabhängige Wirkung des Geni auszuschließen, wurde die ER α /ER β Zelllinie SKBR-3 ebenfalls mit Geni behandelt. Die eingesetzten Geni-Konzentrationen bewirkten jedoch keine Veränderung der Proliferation in dieser Zelllinie (**Abb. 5A**) Die MaCa-Zelllinien MDA-MB-231, BT-474 und SKBR-3 wurden auch mit DPN über einen Zeitraum von 96h behandelt. Hier zeigte sich ein der Inkubation mit Geni vergleichbarer Effekt (**Abb. 5B**).

A



B

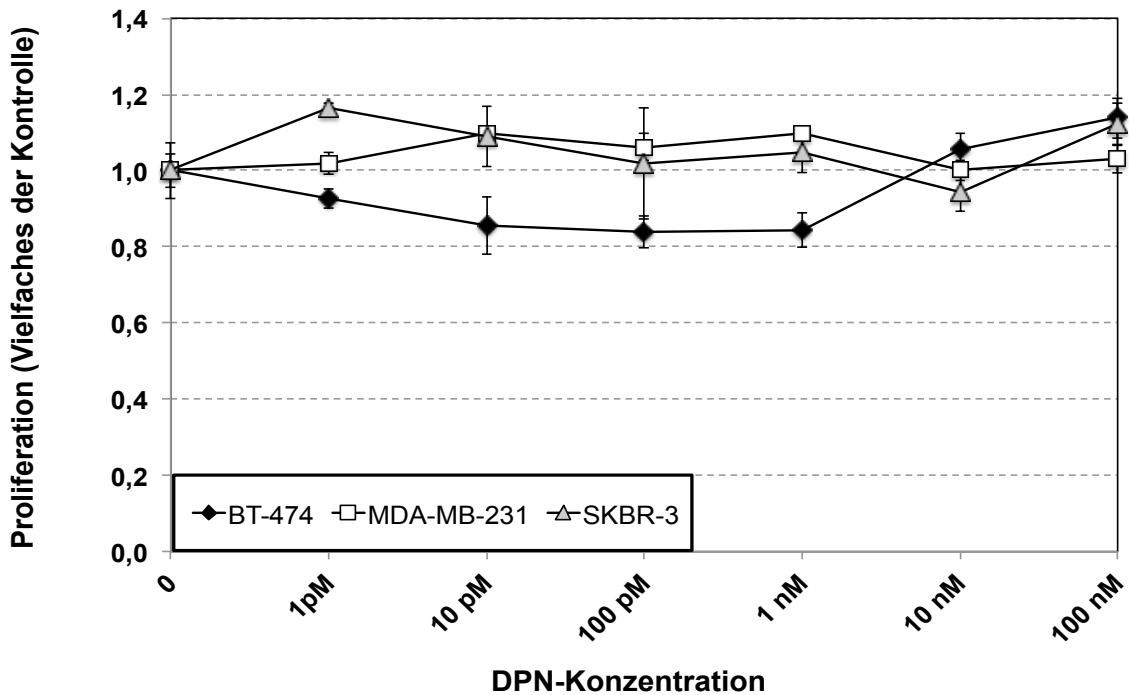


Abbildung 5: Gezeigt ist die Proliferation der MaCa-Zelllinien BT-474, MDA-MB-231 und SKBR-3 nach 4-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen **(A)** Geni bzw. **(B)** DPN als Vielfaches der Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei Experimenten mit jeweils Sechsfachansätzen.

Der Vergleich der untersuchten Zelllinien nach 4-tägiger Inkubation mit 1pM Geni zeigt, dass sich ein Proliferations-hemmender Effekt durch diesen ER β -Agonisten nur in den Zelllinien einstellt, die sowohl einen intakten ER α als auch einen intakten ER β 1 exprimieren (**Abb. 6**)

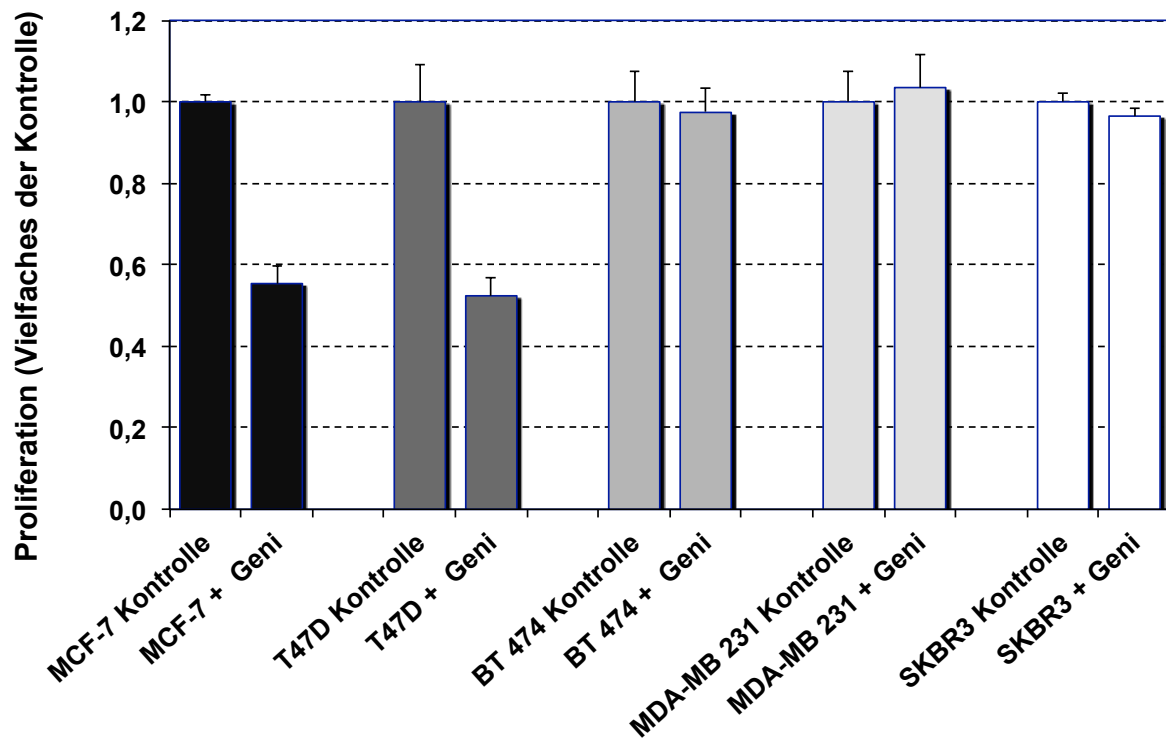


Abbildung 6: Darstellung der Proliferation der MaCa-Zelllinien MCF-7, T47D, BT-474, MDA-MB-231 und SKBR-3 nach 4-tägiger Inkubation mit jeweils 1pM Geni. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei Experimenten zu jeweils Sechsfachansätzen.

Um zu gewährleisten, dass die Hemmung der Proliferation nicht auf einer zytotoxischen Wirkung des Lösungsmittels Ethanol bzw. DMSO beruht, wurde zur Kontrolle eine Ethanol- bzw. DMSO-Konzentrationsreihe hergestellt und ein MTT-Test durchgeführt. Weder Ethanol noch DMSO beeinflussten die Proliferation der untersuchten Zellen. Außerdem wurde zum Ausschluss unspezifischer, zytotoxischer Wirkungen die humane duktal-epitheliale Mamma-Zelllinie MCF-10A über 96

Stunden mit Geni bzw. DPN Substanzen behandelt. Die Auswertung des MTT-Testes zeigte, dass die Vitalität dieser Zellen durch die Substanzen unbeeinflusst blieb (Daten nicht gezeigt).

4.3 Genistein verstärkt die Tamoxifenwirkung in MCF-7-Zellen

Die positive Korrelation der ER β 1-Expression mit einer besseren Prognose unter der Tam-Therapie war in mehreren klinischen Studien dargelegt worden [90-96]. Ob es auf zellulärer Ebene eine Intensivierung der Tam-Wirkung durch ER β 1-Agonisten gibt, sollte mit Hilfe der Zelllinie MCF-7 ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 4 Tagen mit einer Kombination aus 1000 nM 4-OHT, 1 pM Geni bzw. mit einer Kombination beider Substanzen behandelt. Wie zu erwarten, hemmten 1000 nM 4-OHT alleine deutlich das Zellwachstum, um rund 40%. Auch Geni verursachte eine Hemmung der Proliferation um etwa den gleichen Prozentsatz wie 4-OHT. Die Kombination aus 4-OHT und Geni bewirkte jedoch eine signifikant stärkere Hemmung der Proliferation als die Monobehandlung mit 4-OHT oder Geni alleine (**Abb. 7**) ($p < 0,05$).

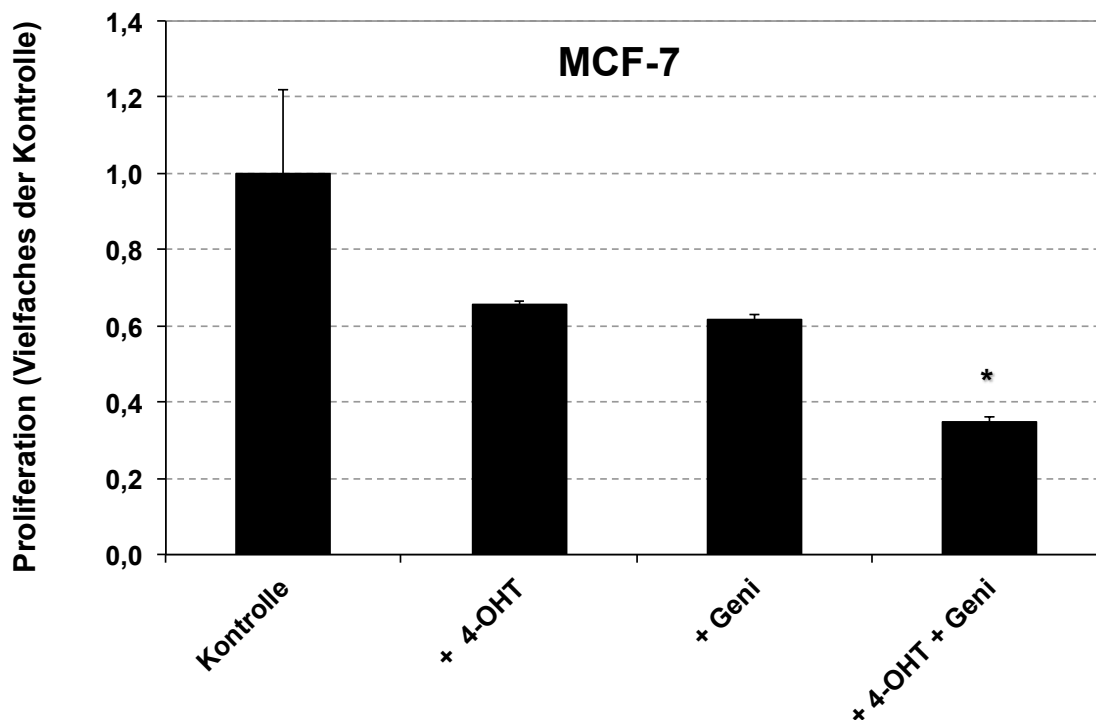


Abbildung 7: Gezeigt ist die Proliferation der Zelllinie MCF-7 als Vielfaches der Kontrolle nach 4-tägiger Inkubation mit 1000 nM 4-OHT, 1 pM Geni bzw. einer Kombination aus 1000nM 4-OHT + 1pM Geni. Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.4 Effekt des Genisteins auf die Tamoxifen-resistente Zelllinie MTR-3

Erworbene Resistenz ist eine große Herausforderung in der Tam-Therapie. Verschiedene Arbeiten legten einen Zusammenhang zwischen der Tam-Resistenz und Veränderungen der ER β 1-Expression dar. Daher galt es zu ermitteln, wie sich die Agonisierung von ER β 1 durch Geni auf die Proliferation und die Tam-Wirkung resistenter MaCa-Zellen auswirken. Zu diesem Zweck wurden Tam-resistente MTR-3-Zellen verwendet. Diese Zelllinie leitet sich von MCF-7-Zellen ab, die über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr gegen Tam resistant gemacht worden waren. Resistente MTR-3-Zellen reagieren auf die Behandlung mit Tam mit einer Zunahme der Proliferation. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Zellen wirklich resistent

gegen Tam sind, wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen 4-OHT behandelt. Die Auswertung des MTT-Testes ergab tatsächlich eine Dosis-abhängige Zunahme der Proliferation der Zellen nach 96-stündiger Inkubation (**Abb. 8**).

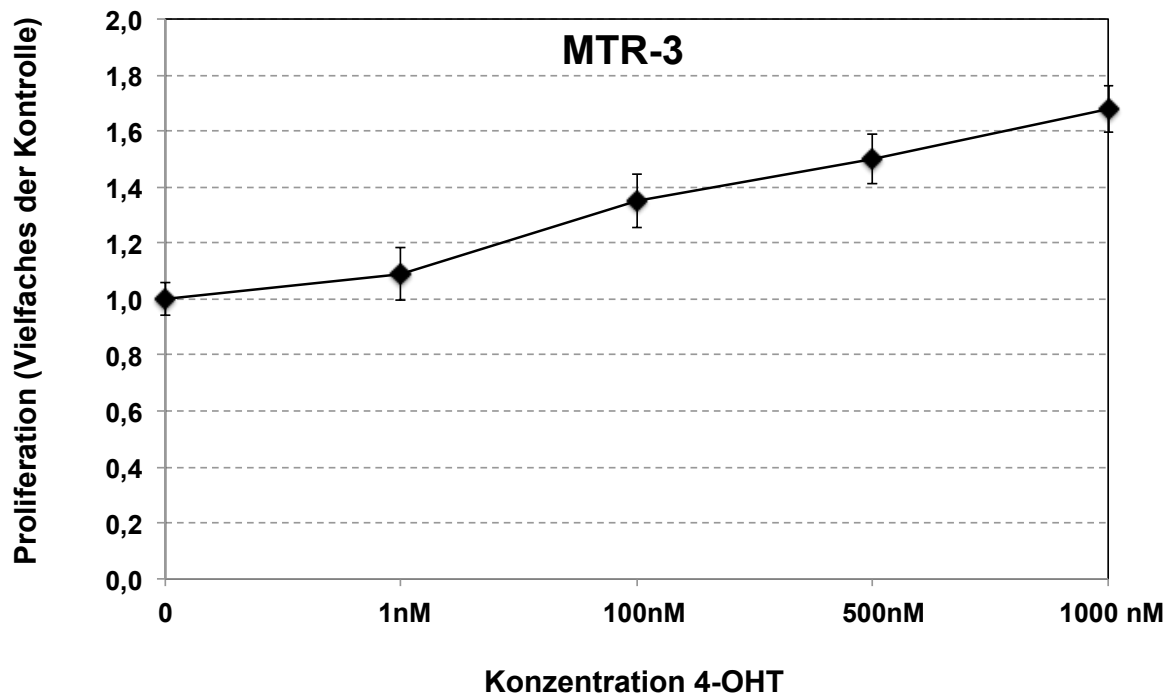


Abbildung 8: Gezeigt ist die im MTT-Test gemessene Proliferation als Vielfaches der Kontrolle der Tam-resistenten MaCa-Zelllinie MTR-3 nach 4-tägiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen 4-OHT. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) mit jeweils sechs Ansätzen.

Nach Bestätigung der Tam-Resistenz wurden die MTR-3-Zellen über 96h mit 1µM 4-OHT, 1pM Geni bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt. Wie zu erwarten, bewirkte 4-OHT eine Zunahme der Proliferation. Interessanterweise rief auch Geni alleine eine Zunahme der Proliferation hervor. Jedoch bewirkte die Kombination aus 4-OHT und Geni eine signifikante Hemmung ($p < 0,05$) der Proliferation, verglichen mit der Kontrolle (**Abb. 9**).

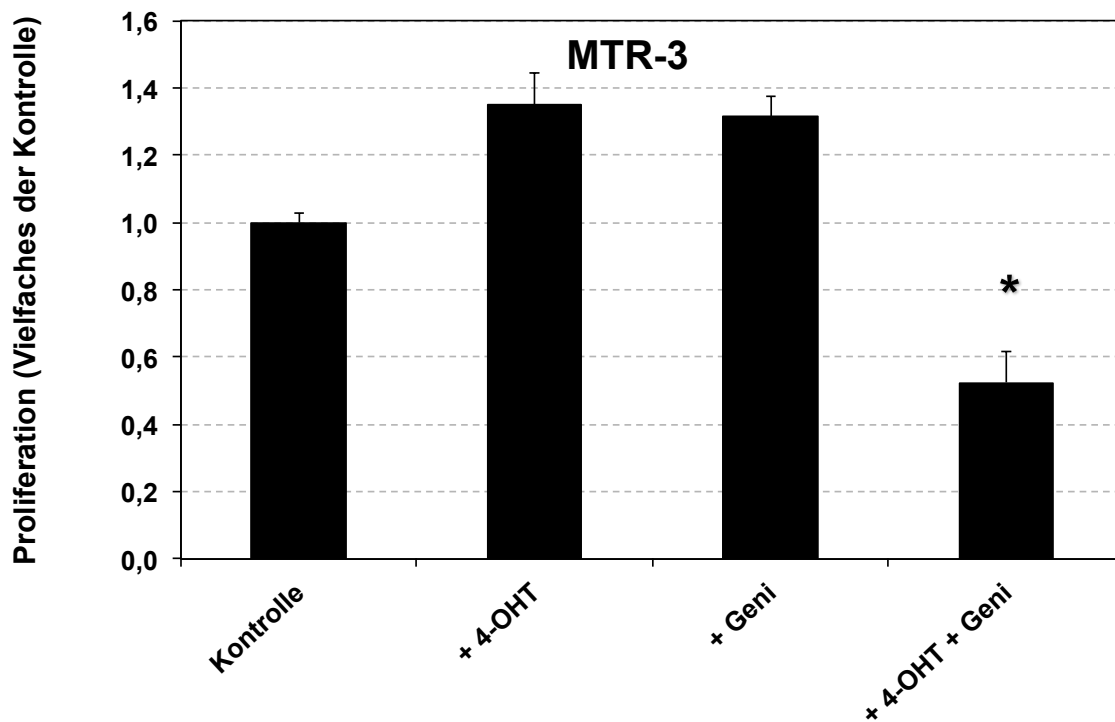
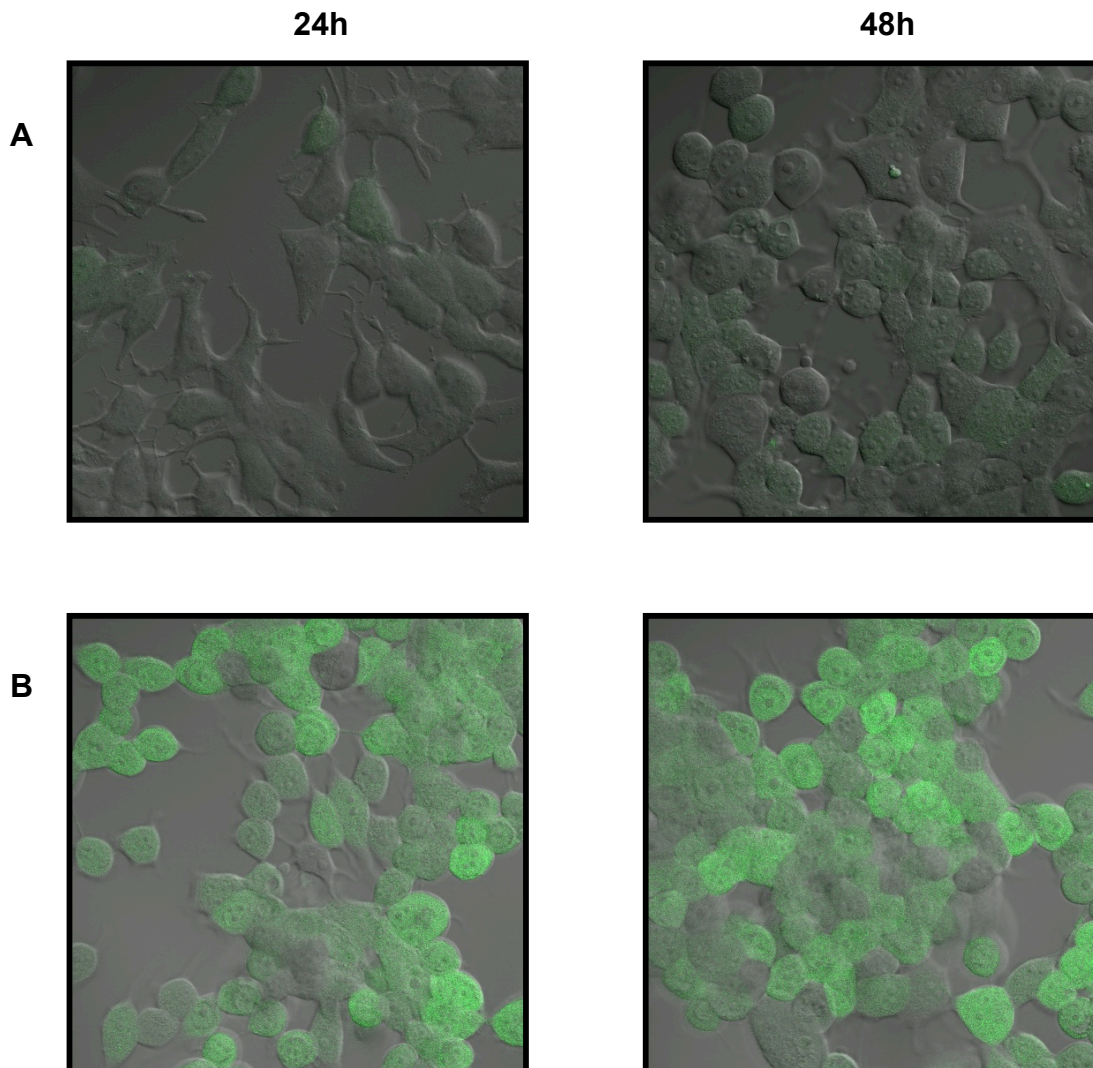


Abbildung 9: Gezeigt ist die Proliferation als Vielfaches der Kontrolle der Tam-resistenten MaCa -Zelllinie MTR-3 nach 4-tägiger Inkubation mit 1 μ M 4-OHT, 1pM Geni bzw. einer Kombination aus 1 μ M 4-OHT + 1pM Geni. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) zu jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.5 Beeinflussung der ER α -Aktivität am ERE durch Genistein

Von ER β 1 ist bekannt, dass dieser Rezeptor die transkriptionelle Aktivität von ER α am ERE hemmen kann [104]. Um herauszufinden, ob Geni nach Bindung an ER β 1 den genomischen ER α -Signalweg beeinflusst, wurde ein GFP-Reporter-Assay mittels der GFP-exprimierenden Zelllinie MCF-E10 durchgeführt. In diesen Zellen ist GFP an das ERE gekoppelt, so dass sich transkriptionelle Aktivität am ERE durch eine Emission grünen Lichts unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt [110]. MCF-E10 wurden zunächst über einen Zeitraum von 14 Tagen in Phenolrot- und E2-freiem Kulturmedium, versetzt mit 500 μ g/ml G418 vorbehandelt. Dann wurden die Zellen in Chamber-Slides ausgesät und für 24 bzw. 48h mit einer Kombination aus 1 nM E2 und zwei verschiedenen Konzentrationen Geni, 0,01 pM, 1 pM bzw. 1 nM, inkubiert.

Als Positivkontrolle wurden 1nM E2, und als Negativkontrolle wurde Phenolrot- und E2-freies Kulturmedium verwendet. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte, dass bereits nach 24h eine deutliche Aktivität am ERE in der mit E2 behandelten Probe zu verzeichnen war. Geni bewirkte bereits in einer Konzentration von 0,01 pM eine partielle Unterdrückung der E2-vermittelten Wirkung am ER α . Jedoch zeigte sich eine noch stärkere Reduktion der Aktivität am ERE bei einer Geni-Konzentration von 1 pM, sichtbar an einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz in dieser Probe. Interessanterweise nahm die Fluoreszenz bei einer Erhöhung der Geni-Konzentration auf 1 nM wieder zu. Hinsichtlich aller Proben zeigten sich kaum zeitabhängige Unterschiede zwischen den über 24 Stunden bzw. über 48 Stunden behandelten Ansätzen (**Abb. 10**).



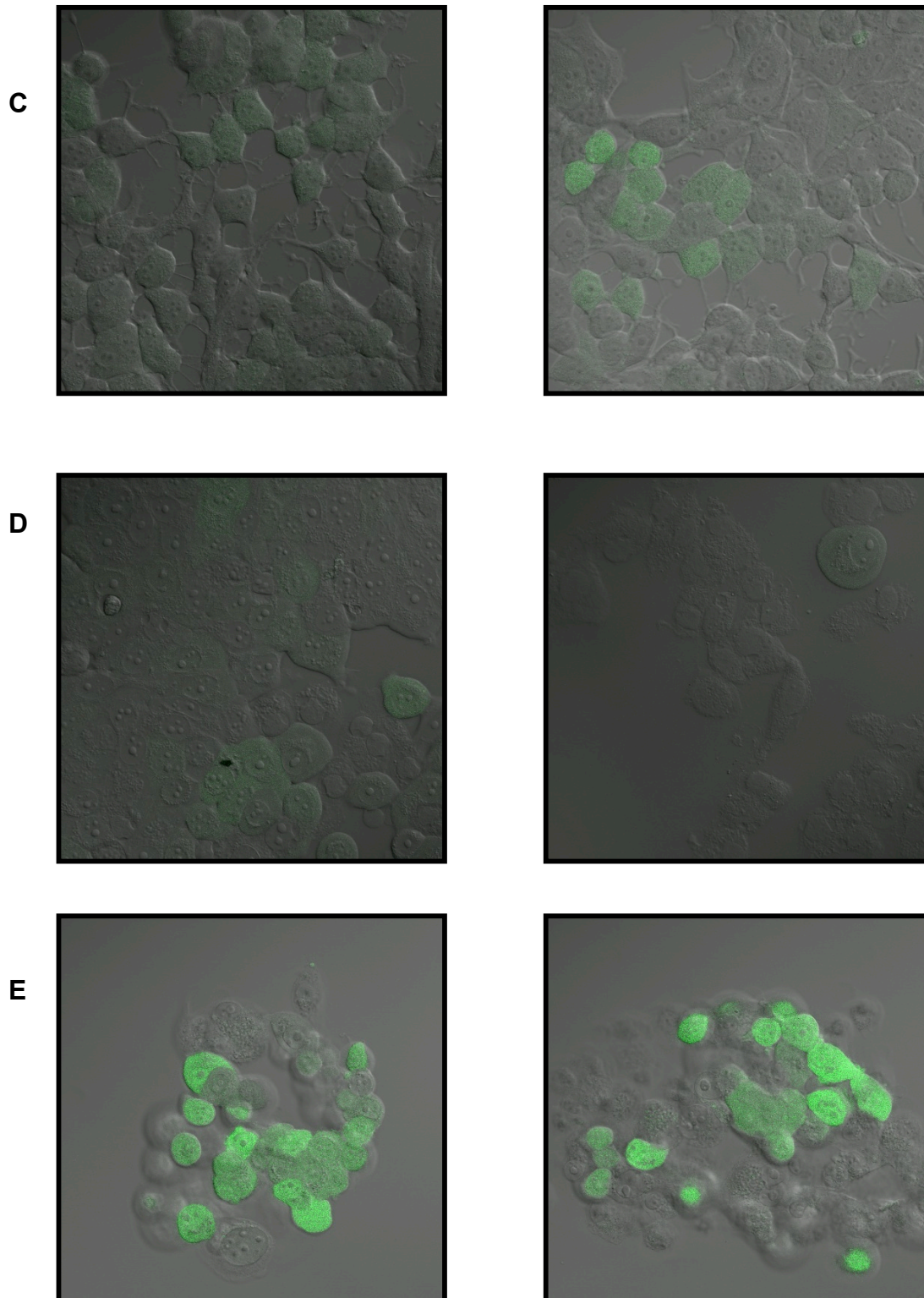
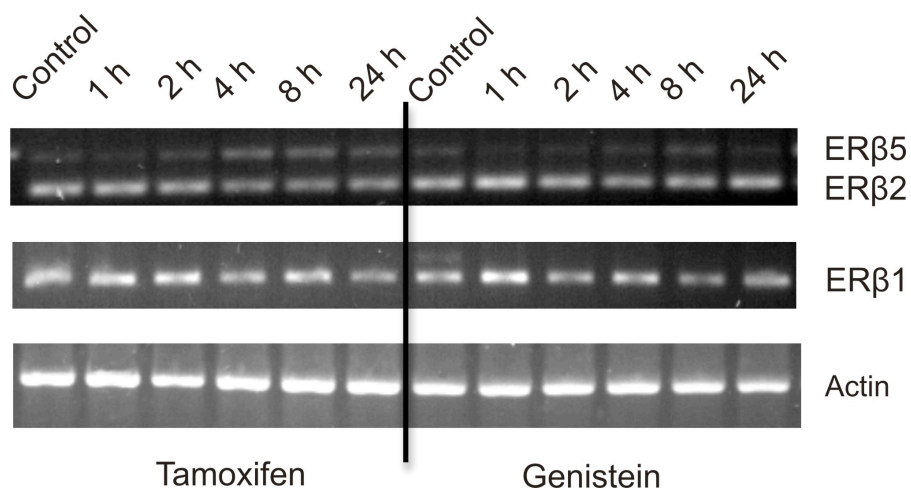


Abbildung 10: Mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografierte GFP-Expression in MCF-E10-Zellen nach 24h bzw. 48h Inkubation mit 1nM E2 oder 1nM E2 + verschiedenen Konzentrationen Geni. **(A)** Negativkontrolle (E2-reduziertes ZKM); **(B)** Positivkontrolle (1 nM E2); **(C)** 1nM E2 + 0,01 pM Geni; **(D)** 1 nM E2 + 1pM Geni; **(E)** 1nM E2 + 1nM Geni.

4.5 Regulierung von ER β 1, ER β 2 und ER β 5 durch 4-OHT bzw. Genistein

Auf Grundlage der bisher zitierten Arbeiten ist zu vermuten, dass die zelluläre Antwort von MaCa-Zellen auf 4-OHT bzw. Geni durch den ER β 1 beeinflusst wird. Gänzlich unklar ist, welche Rolle in diesem Zusammenhang die Isoformen ER β 2 bzw. ER β 5 spielen. Um herauszufinden, ob 4-OHT oder Geni die Expression von ER β 1, ER β 2 bzw. ER β 5 verändern, wurden MCF-7-Zellen sowie zum Vergleich die resistenten MTR-3-Zellen mit 1 μ M 4-OHT bzw. 1 pM Geni behandelt. Anschließend wurde in definierten Zeitabständen, nach 1h, 2h, 4h, 8h bzw. 24h, die mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde die Regulierung der drei Rezeptor-Isoformen analysiert. Zur Kontrolle wurde eine RT-PCR mit β -Actin-Primern durchgeführt.

In keiner der drei Zelllinien ließ sich ein definierbares Regulierungsmuster für ER β 1 feststellen. Jedoch erzeugte die Behandlung mit 4-OHT in MCF-7-Zellen eine Hochregulierung der ER β 5-mRNA und eine Herunterregulierung der ER β 2-mRNA, während Geni ein nahezu gegenläufiges Ergebnis erzeugte. Diese Form der Regulierung fand in den resistenten MTR-3-Zellen nicht statt (**Abb. 11**).

A

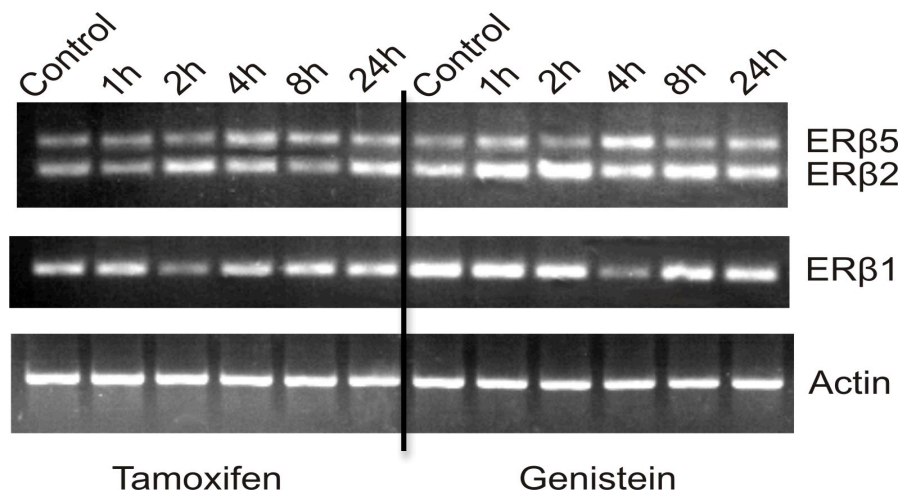
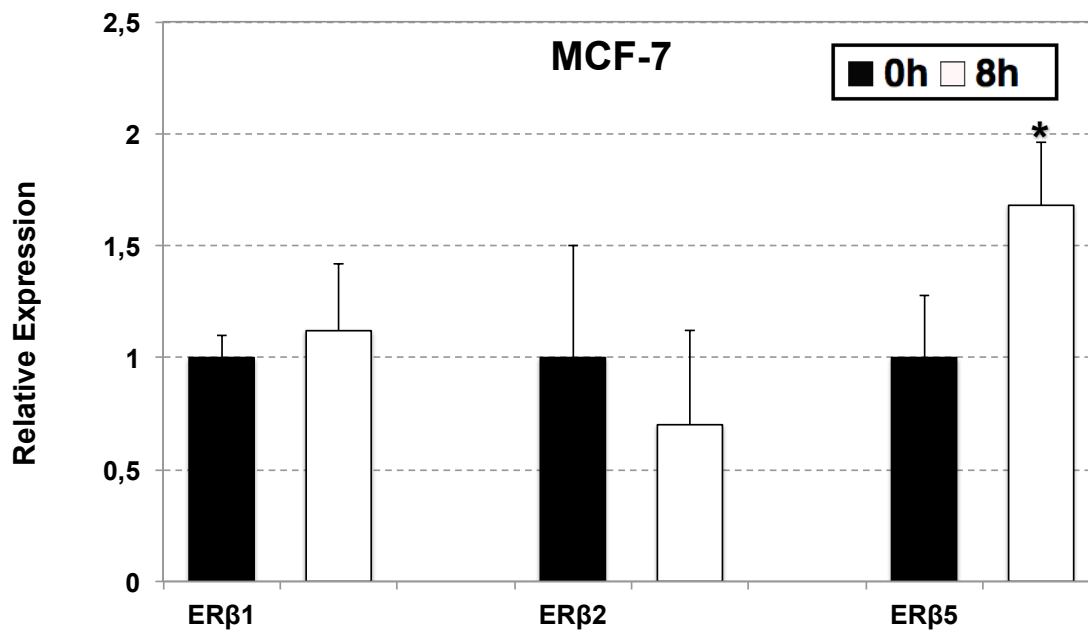
B

Abbildung 11: Regulierung der mRNA von ERβ1, ERβ2 und ERβ5 nach Behandlung mit Tam bzw. Geni in **(A)** MCF-7-Zellen und **(B)** MTR-3-Zellen, über einen Zeitraum von 1h – 24h. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die in der RT-PCR ermittelte Regulierung der ERβ-Isoformen sollte nun durch quantitative Real-Time-PCR validiert werden. Dazu wurden MCF-7-Zellen und MTR-3-Zellen für jeweils 8h mit 4-OHT bzw. Geni behandelt und einer unbehandelten Kontrolle gegenüber gestellt. 4-OHT verursachte in den MCF-7-Zellen eine signifikante Hochregulierung der ERβ5-mRNA ($p < 0,05$). Geni hingegen verursachte eine Hochregulierung der ERβ2-mRNA in diesen Zellen (**Abb. 12**). Diese Form der Regulierung konnte in den resistenten MTR-3-Zellen nicht beobachtet werden (**Abb. 13**).

A



B

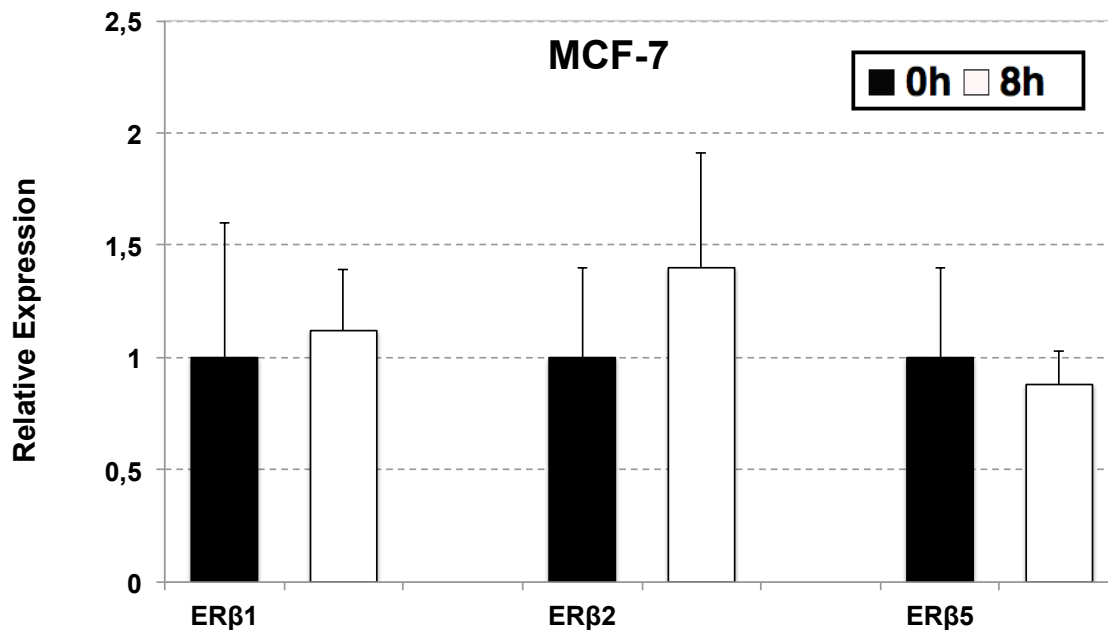
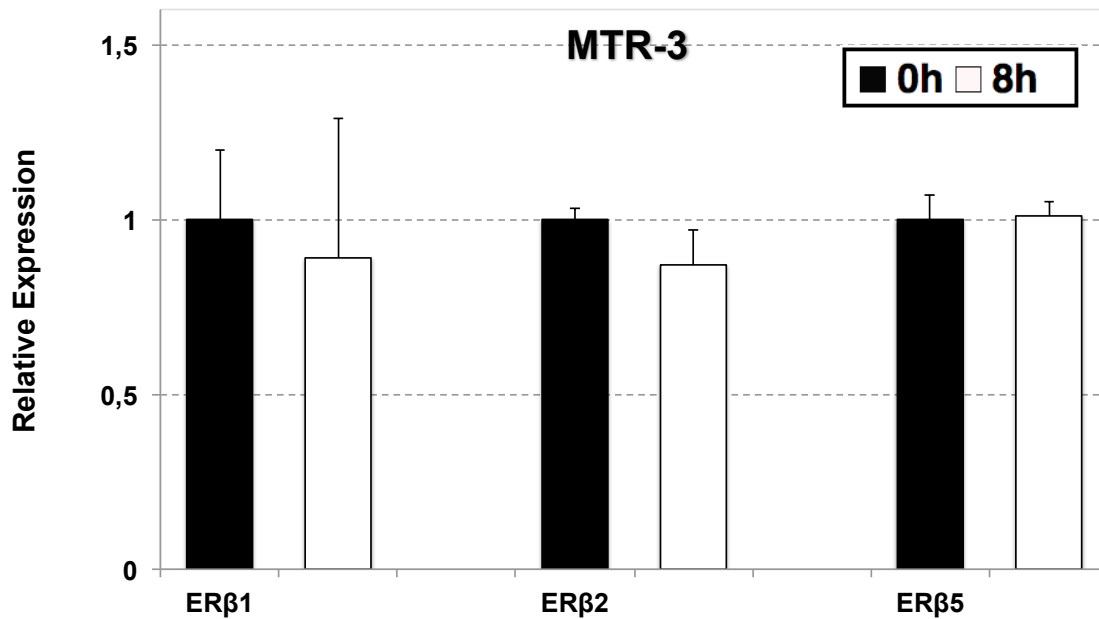


Abbildung 12: Relative Expression der mRNA des ERβ2 bzw. ERβ5 in MCF-7-Zellen nach 8h Inkubation mit (A) 4-OHT bzw. (B) Geni als Vielfaches der Kontrolle, ermittelt durch quantitative Real-Time PCR. Alle Werte wurden auf eine interne β-Actinkontrolle normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes aus drei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen. * $p < 0,05$

A



B

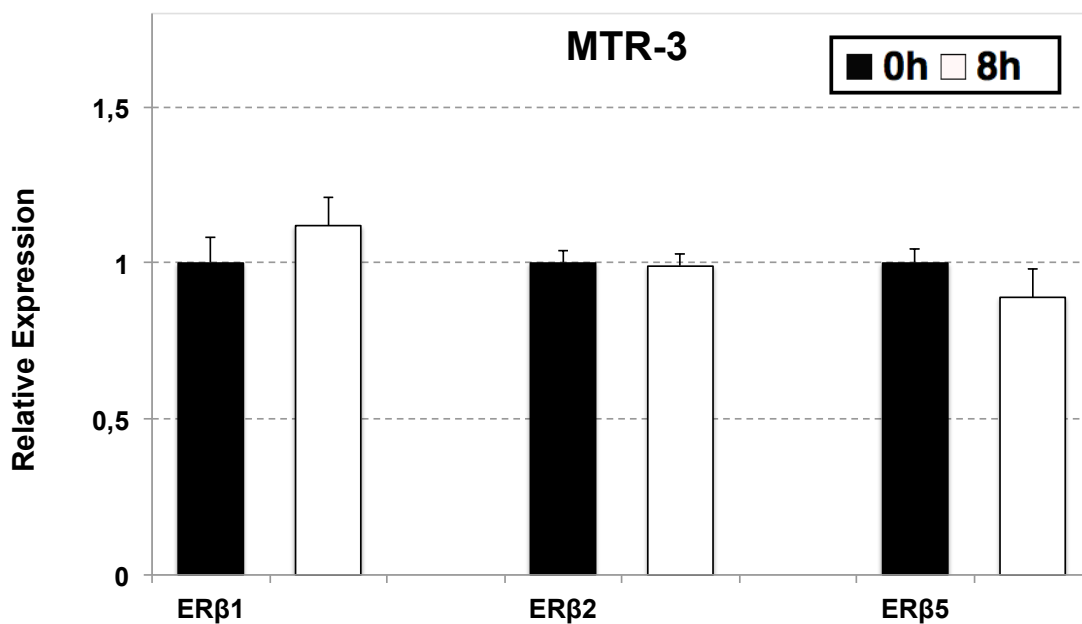


Abbildung 13: Relative Expression der mRNA des ERβ2 bzw. ERβ5 in MTR-3-Zellen nach 8h Inkubation mit (A) 4-OHT bzw. (B) Geni als Vielfaches der Kontrolle, ermittelt durch quantitative Real-Time PCR. Alle Werte wurden auf eine interne β-Actinkontrolle normalisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) aus drei unabhängigen Experimenten mit je Dreifachansätzen.

4.6 Einfluss der ER β 2- bzw. ER β 5-Überexpression auf MCF-7-Zellen

Basierend auf den Ergebnissen der PCR-Analysen war zu vermuten, dass die Expression von ER β 2 bzw. ER β 5 in Zusammenhang mit der zellulären Antwort auf die Behandlung durch 4-OHT steht. Zur Aufklärung dieses Zusammenhanges wurden MCF-7-Zellen im stabilen Verfahren mit Expressionsvektoren für ER β 2 bzw. ER β 5 transfiziert. Um unspezifische Wirkungen des Transfektionsprozesses auf die Zellen ausschließen zu können, wurde eine Kultur mit MCF-7 angelegt, die mit einem Leervektor transfiziert worden waren. Nach einmonatiger Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von G418 wurden die stabilsten Zellklone selektiert. Zur Kontrolle der Überexpression wurde eine RT-PCR mit ER β 2- bzw. ER β 5-Primern durchgeführt (**Abb. 14**).

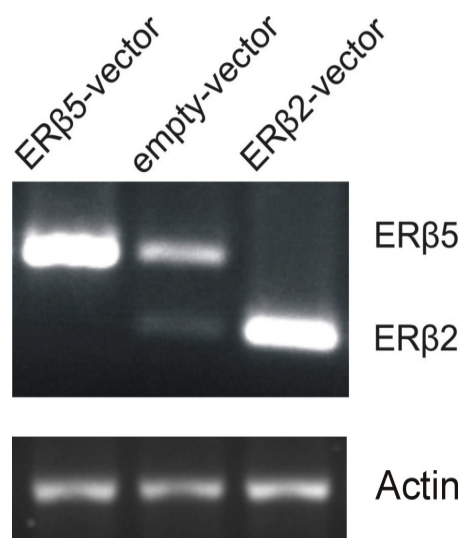


Abbildung 14: Kontrolle der erfolgreichen Transfektion mit Expressionsvektoren für ER β 2, ER β 5 bzw. einen Leervektor in MCF-7-Zellen. Darstellung des RT-PCR-Produktes mit ER β 2- und ER β 5-Primern, elektrophoretisch aufgetrennt in 2%igem Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid.

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss ER β 2 bzw. ER β 5 auf die Proliferation von MCF-7-Zellen ausüben. Dazu wurden die transfizierten Zellen sowie zum Vergleich wt-MCF-7-Zellen über einen Zeitraum von 96 Stunden in ZKM (DMEM/Ham's F12 1:1, versetzt mit 10% FBS, 1% P/S, 2mM L-Glutamin) inkubiert.

Zur Messung der Zellviabilität wurde ein MTT-Test durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass sich die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren, wie wt-MCF-7-Zellen verhielten. Jedoch bewirkte die Überexpression von ER β 2- bzw. ER β 5 eine signifikante Hemmung der Proliferation, verglichen mit der wt-MCF-7-Kontrolle. Dabei war ein geringfügig größerer Effekt in den ER β 5-überexprimierenden Zellen festzustellen (**Abb. 15**).

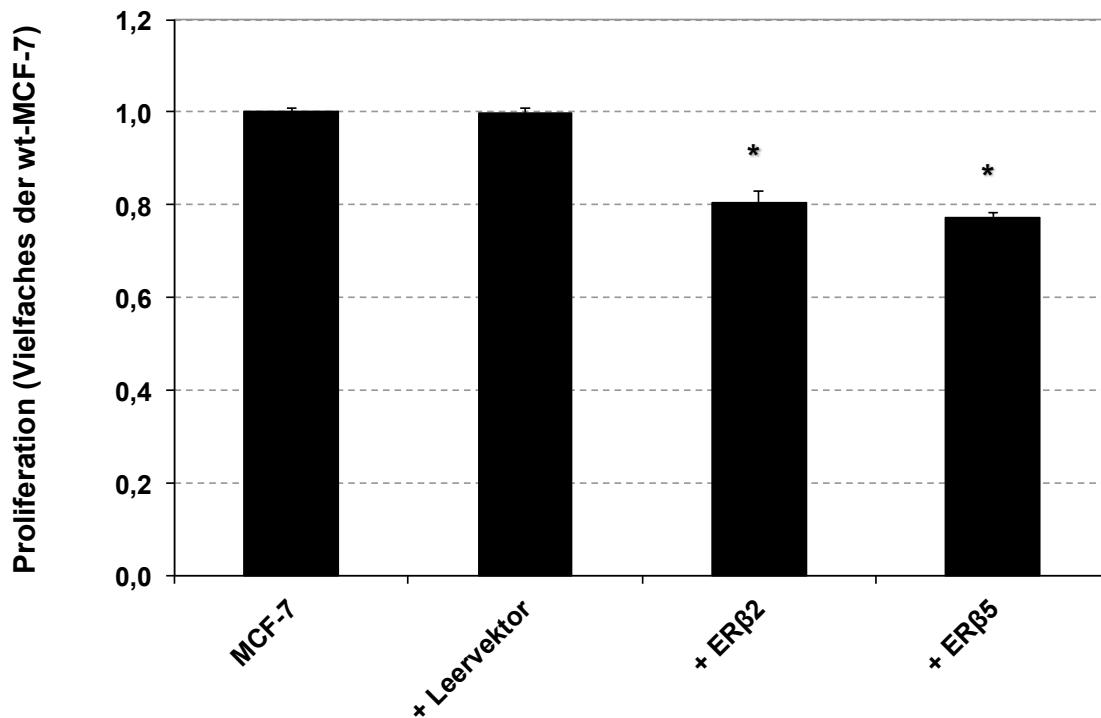


Abbildung 15: Gezeigt ist die Proliferation als Vielfaches der Kontrolle der mit Leervektor, ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden MaCa-Zelllinie MCF-7 nach 4-tägiger Inkubation in ZKM. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) mit jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.7 Effekt von 4-OHT bzw. Genistein auf ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierende MCF-7-Zellen

Um zu testen, ob die stabile Überexpression von ER β 2 bzw. ER β 5 einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegenüber 4-OHT bzw. Geni hat, wurden die transfizierten Zellen mit jeweils 1 μ M 4-OHT oder mit einer Kombination aus 4-OHT + 1 pM Geni über einen Zeitraum von 96 Stunden inkubiert. Die Auswertung des MTT-Tests ergab

eine diskrete Erhöhung der Sensitivität gegenüber 4-OHT in den ER β 2-überexprimierenden Zellen, verglichen mit der Kontrolle bzw. verglichen mit den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren (**Abb. 16**). Eine signifikant stärkere Hemmung der Proliferation zeigte sich jedoch in den ER β 5-überexprimierenden Zellen. Hier war die Inhibition um 27,2 % stärker als in der mit 4-OHT behandelten Leervektor-Kontrolle. Jedoch bewirkte die Kombination aus 4-OHT und Geni eine noch stärkere Inhibition der Proliferation. Sie betrug im Fall der ER β 5 überexprimierenden MCF-7-Zellen rund 75% der unbehandelten Kontrolle. Verglichen mit der Monobehandlung durch 4-OHT bewirkte die Kombinationsbehandlung damit eine um 48% stärkere Inhibition. In den ER β 2 überexprimierenden Zellen betrug die Inhibition durch 4-OHT + Geni rund 60% der unbehandelten Kontrolle. Sie war damit um 32% stärker als durch die mit 4-OHT alleine erreichte Hemmung..

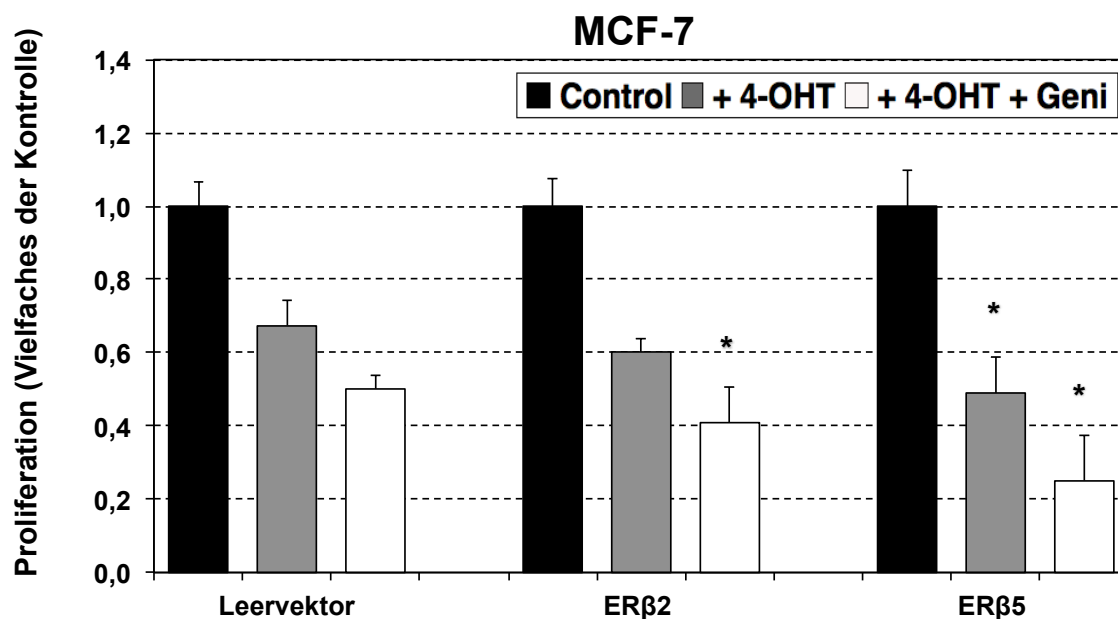


Abbildung 16: Gezeigt ist die Proliferation als Vielfaches der Kontrolle der Zelllinie MCF-7, transfiziert mit einem Leervektor, ER β 2 oder ER β 5 nach 4-tägiger Inkubation mit 1 μ M 4-OHT, 1pM Geni bzw. einer Kombination aus 1 μ M 4-OHT + 1pM Geni. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) mit jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.8 Einfluss der ER β 2- bzw. ER β 5-Überexpression auf MTR-3-Zellen

Von besonderem Interesse war nun, ob die Überexpression des ER β 2 bzw. des ER β 5 auch die Proliferation der Tam-resistenten Zelllinie MTR-3 hemmen würde. Zur Klärung der Frage wurden diese Zellen ebenfalls stabil mit Expressionsvektoren für ER β 2 und ER β 5 bzw. mit einem Leervektor zur Kontrolle transfiziert. Es wurde dabei das Verfahren angewendet, welches bereits bei der stabilen Transfektion der Zelllinie MCF-7 eingesetzt worden war. Der Erfolg der Transfektion wurde abermals durch PCR ermittelt (**Abb. 17**).

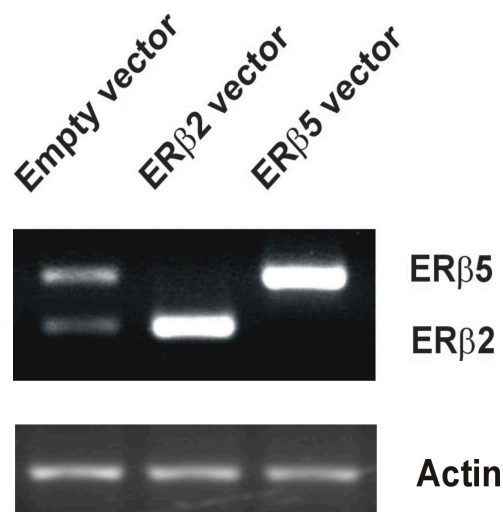


Abbildung 17: Kontrolle der erfolgreichen Transfektion mit Expressionsvektoren für ER β 2, ER β 5 bzw. einen Leervektor in MTR-3-Zellen. Darstellung des RT-PCR-Produktes mit einem gemeinsamen Primerpaar für ER β 2 und ER β 5, elektrophoretisch aufgetrennt in 2%igem Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid.

Nach 96-Stündiger Inkubationszeit in ZKM zeigte die Auswertung des MTT-Tests, dass die Überexpression von ER β 2 bzw. ER β 5 auch in MTR-3-Zellen zu einer Hemmung der Proliferation, verglichen mit der wt-MTR-3-Kontrolle führt (**Abb. 18**). Im Falle von ER β 5 betrug diese Inhibition rund 25% und war signifikant ($*p < 0,05$).

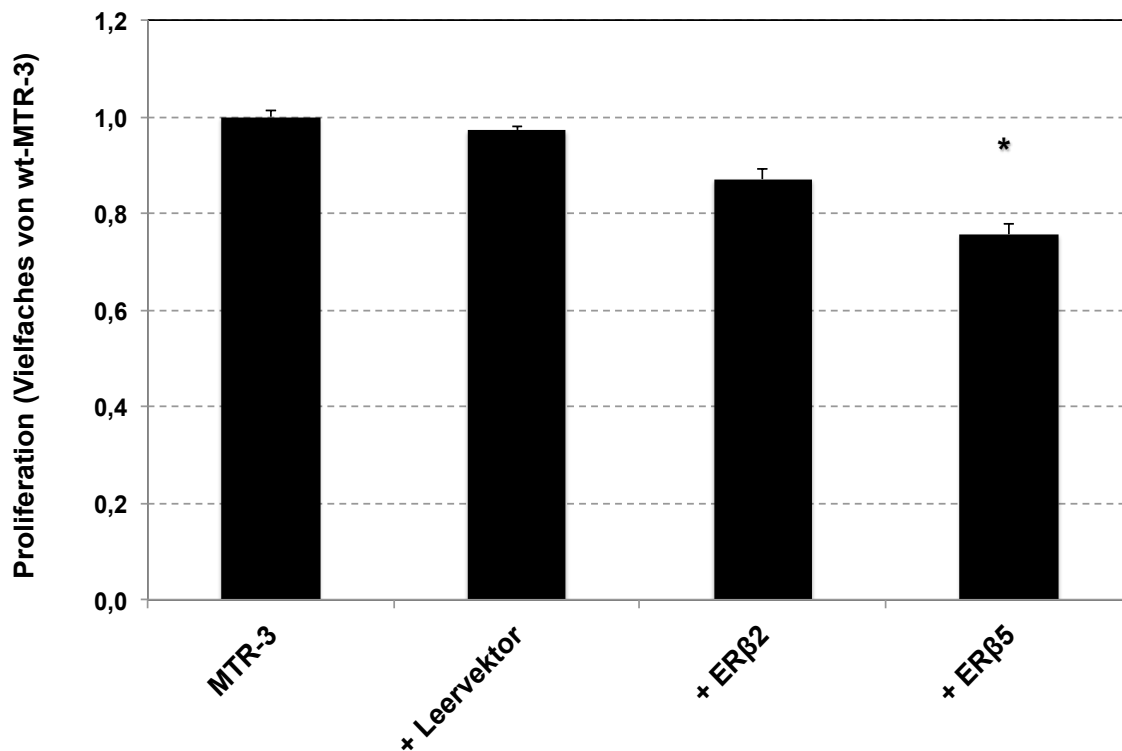


Abbildung 18: Darstellung der Proliferation stabil mit ERβ2-, ERβ5- bzw. Leervektoren transfizierten MTR-3-Zellen als Vielfaches der wt-MTR-3-Kontrolle nach 96h Inkubation mit ZKM. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) zu jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.9 Verstärkung der Sensitivität gegenüber 4-OHT durch ERβ2 bzw. ERβ5 in MTR-3-Zellen

Nun war vor allem die Frage von Interesse, ob die beiden Rezeptorisoformen in Tam-resistenten MTR-3-Zellen zu einer Re-Sensitivierung führen können. Dazu wurden die stabil transfizierten MTR-3-Zellen über einen Zeitraum von sechs Tagen mit unterschiedlichen 4-OHT-Konzentrationen behandelt. Die Auswertung des anschließend durchgeführten MTT-Assays zeigte eine deutliche Zunahme der Sensitivität gegenüber 4-OHT in den ERβ2- und in den ERβ5-überexprimierenden Zellen, verglichen mit der Leervektor-Kontrolle (**Abb. 19**). Signifikant war die Inhibition der Proliferation auch hier in den mit ERβ5 transfizierten Zellen. Sie betrug

bei einer 4-OHT-Konzentration von 0,5 μM rund 40% und bei einer Konzentration von 1 μM 51% der Kontrolle ($p < 0,05$).

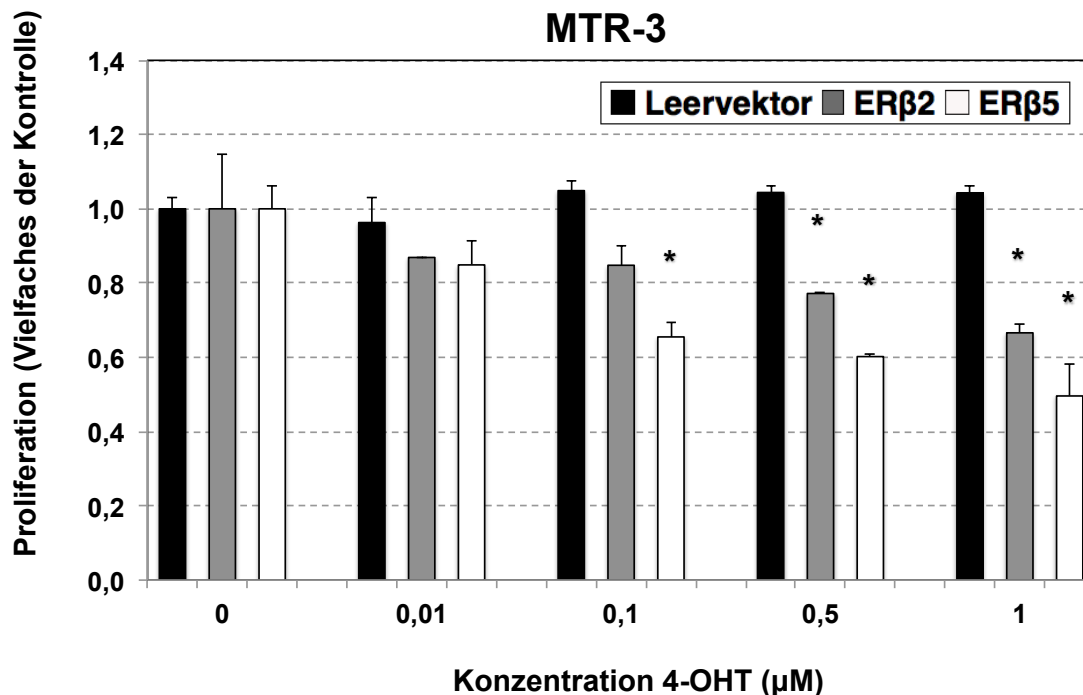


Abbildung 19: Darstellung der Proliferation stabil mit ER β 2 bzw. ER β 5 transfizierter MTR-3-Zellen als Vielfaches der Leervektor-Kontrolle nach 96h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen 4-OHT. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) zu jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.10 Verstärkung der 4-OHT-Wirkung in ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden MTR-3-Zellen durch Genistein

Es ist bekannt, dass weder der ER β 2 noch der ER β 5 einen Liganden binden können. Jedoch sind diese ER β -Varianten Liganden-abhängig in der Lage, Heterodimere mit ER β 1 zu bilden und somit dessen Aktivität zu beeinflussen [42]. Auf Grundlage dieser Erkenntnis sollte geprüft werden, ob der ER β -Agonist Geni den anti-

proliferativen Effekt von ER β 2 bzw. ER β 5 nach 4-OHT-Behandlung verstärken kann. Zu diesem Zweck wurden die transfizierten MTR-3-Zellen mit 1 μ M 4-OHT bzw. 1pM Geni bzw. einer Kombination aus 1 μ M 4-OHT und 1pM Geni über einen Zeitraum von sechs Tagen behandelt. Tatsächlich erzeugte die Kombination von 4-OHT und Geni eine stärkere Hemmung der Proliferation als die Monobehandlung mit 4-OHT (**Abb. 20**). Für die ER β 5-transfizierten Zellen war diese Hemmung signifikant ($p < 0,05$).

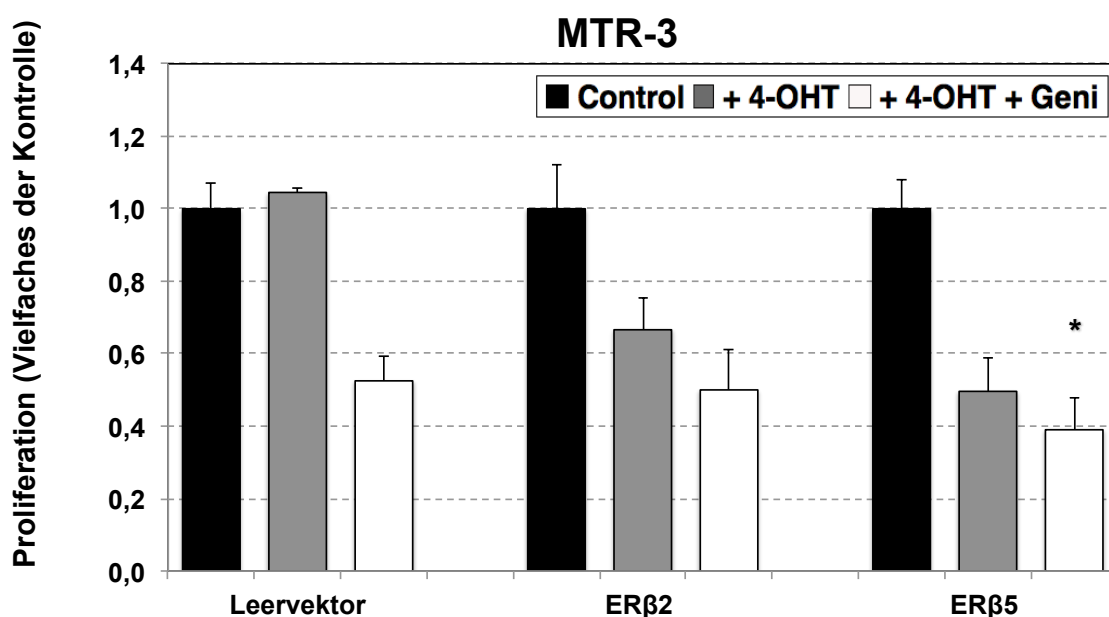


Abbildung 20: Gezeigt ist die Proliferation der stabil mit ER β 2 bzw. ER β 5 transfizierten MTR-3-Zellen als Vielfaches der Leervektor-Kontrolle nach 96h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen 4-OHT bzw. 4-OHT + Geni. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes) zu jeweils sechs Ansätzen. * $p < 0,05$

4.11 Beeinflussung des Zellzyklus durch die ER β -Isoformen

ERs üben eine Schlüsselfunktion in der Regulierung des Zellzyklus aus. Nun galt es, einen möglichen Mechanismus zu finden, der einen Erklärungsansatz für die Inhibition durch den ER β -Agonisten Geni bieten könnte. Von außerordentlichem

Interesse war in diesem Zusammenhang die Frage, auf welchem Wege der ER β 2 bzw. der ER β 5 eine Inhibition verursachen könnten. Aus diesem Grund wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie (**FACS**) durchgeführt. Dazu waren wt-MCF-7, wt-MTR-3 und die entsprechenden ER β 2- bzw. ER β 5-Transfektanten nach 24-stündiger G1-Synchronisation mit ZKM, 1 μ M 4-OHT, 1pM Geni bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen über einen Zeitraum von 24h inkubiert und anschließend mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid angefärbt worden. Die FACS-Messung ergab eine Zunahme des prozentualen Anteils der sich in der G0/G1-Phase befindenden MCF-7-Zellen nach Transfektion mit ER β 2 bzw. ER β 5. Unter den gezählten MTR-3-Zellen zeigten die ER β 5-überexprimierenden Zellen einen deutlichen Zuwachs des G2 -Anteiles. Die Inkubation mit 4-OHT bewirkte in allen MCF-7-Zellen eine Vergrößerung des G0/G1-Anteiles. Am stärksten war dieser Prozess dabei in den ER β 5-überexprimierenden Zellen. Geni alleine bewirkte eine weniger starke Erhöhung des G0/G1-Anteiles als 4-OHT. Jedoch bewirkte die Kombinationsbehandlung in wt-MCF-7-Zellen eine deutliche Abnahme der S-Phase zugunsten der G0/G1-Phase. Dieser Prozess war noch stärker in den ER β 5-überexprimierenden MCF-7-Zellen ausgeprägt. In wt-MTR-3-Zellen verursachten sowohl 4-OHT als auch Geni eine Zunahme des Anteils der S-Phase. Die Kombinationsbehandlung führte hingegen zu einem G1-Arrest. Interessanterweise spiegelte sich die bereits im MTT-Assay beobachtete Sensitivitätserhöhung gegenüber 4-OHT in den transfizierten Zellen auch in der Durchflusszytometrie wider: Während die ER β 2-Überexpression nur zu einer diskreten Erhöhung der G0/G1-Phase führte, zeigte sich in den ER β 5-überexprimierenden MTR-3-Zellen nach Inkubation mit 4-OHT eine deutliche Erhöhung des G1-Phasenanteils. Noch stärker war dieser Effekt nach Inkubation mit 4-OHT + Geni. Die in der Durchflusszytometrie gemessenen Prozentwerte sind in der **Tabelle 4** aufgeführt:

wt-MCF-7	Substanz	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
	Kontrolle	49,31	36,13	14,56
	+ 1µM 4-OHT	66,28	22,65	11,07
	+ 1 pM Geni	50,87	23,00	26,13
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	62,06	17,59	20,35
MCF7+ERβ2	Kontrolle	55,36	23,79	18,49
	+ 1µM 4-OHT	60,94	19,33	19,74
	+ 1 pM Geni	42,65	21,52	21,27
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	58,76	16,23	25,01
MCF7+ERβ5	Kontrolle	57,11	19,73	22,56
	+ 1µM 4-OHT	67,57	13,25	19,18
	+ 1 pM Geni	56,10	20,57	23,33
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	73,07	9,25	17,69
wt-MTR-3	Kontrolle	57,11	28,37	14,25
	+ 1µM 4-OHT	25,08	40,00	34,87
	+ 1 pM Geni	43,31	31,52	25,93
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	62,02	20,94	19,28
MTR3+ERβ2	Kontrolle	46,44	25,09	28,47
	+ 1µM 4-OHT	35,27	22,68	23,55
	+ 1 pM Geni	51,12	20,83	28,05
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	54,17	18,71	27,12
MTR3+ERβ5	Kontrolle	51,49	23,22	25,28
	+ 1µM 4-OHT	63,47	18,44	18,08
	+ 1 pM Geni	60,17	22,41	17,42
	+ 1 µM 4-OHT + 1pM Geni	65,70	17,00	17,30

Tabelle 4: Prozentuale Zellzahlverteilung der Zellzyklusphasen nach Inkubation von wt-MCF-7 und -MTR-3 bzw. ERβ2- und ERβ5-Transfektanten mit 4-OHT, Geni bzw. 4-OHT + Geni. Gezeigt ist die Auswertung eines repräsentativen Ergebnisses einer Durchflusszytometer-Analyse.

5 Diskussion

Basierend auf der Erkenntnis, dass es einen Zusammenhang zwischen der Initiation und Progression des MaCa und der agonistischen Wirkung des E2 am ER α gibt, wurde vor rund 40 Jahren das Tam zur pharmakologischen Blockade des ER α entwickelt. Eingesetzt in der adjuvanten Therapie des HR-positiven MaCa, führte Tam zu einer deutlichen Verringerung der Rezidive, einer Verlängerung Rezidivfreier Intervalle und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens [59-61]. Eine der großen Herausforderungen, die während der Therapie auftreten können, ist die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Tam, welches 1967 unter der Annahme entwickelt wurde, es gäbe nur einen ER, den 1962 identifizierten ER α . Die Entdeckung eines weiteren ER-Typus, des ER β 1, sowie dessen verkürzter Isoformen, ER β 2 bis ER β 5, haben Fragen bezüglich deren Rolle beim MaCa und insb. bezüglich neuer Therapiekonzepte aufgeworfen. Grundlage dieser Arbeit bildeten aus klinischen Untersuchungen gewonnene Erkenntnisse, die zeigten, dass Patientinnen, die Tam erhalten hatten, prognostisch von einer hohen ER β 1-Konzentration profitieren konnten [91-94]. So hatte sich bei diesen Patientinnen ein weniger aggressives Tumorwachstum, eine geringere Wahrscheinlichkeit der Metastasierung sowie ein besseres Ansprechen auf Tam mit niedrigeren Resistenzraten gezeigt. Laborexperimentelle Arbeiten konnten diese Erkenntnis u.a. durch die Entdeckung stützen, dass der ER β 1 *in vitro* und *in vivo* die Proliferation von MaCa-Zellen hemmen und die Aktivität des proliferativ wirkenden ER α unterdrücken kann. Insbesondere dieser Zusammenhang hatte zu dem Vorschlag einiger Autoren geführt, den ER β 1 als Tumorsuppressorgen zu bezeichnen [72, 97, 106]. Trotz umfangreicher Untersuchungen bleibt die Rolle des ER β 1 besonders im Hinblick auf die Tam-Therapie nur unzureichend aufgeklärt. In noch größerem Maße gilt dies für die zwei ER β -Isoformen, die ebenfalls in hoher Konzentration im Mamma-Gewebe exprimiert werden: ER β 2 und ER β 5. In der vorliegenden Arbeit wurde nun untersucht, welchen Einfluss diese ER β -Isoformen auf die Proliferation von MaCa-Zellen *in vitro* sowie auf deren Sensitivität gegenüber Tam haben.

5.1 ER β -Agonisten hemmen die Proliferation ER α /ER β co-exprimierender Zellen

Um den Zusammenhang zwischen dem ER-Expressionsmuster und der Proliferation von MaCa-Zelllinien untersuchen zu können, waren zunächst neun verschiedene Zelllinien mit RT-PCR und Western Blot untersucht worden: Die zwei Zelllinien MCF-7 und T47D, die annähernd gleiche Verhältnisse von ER α zu ER β 1 aufwiesen sowie die Tam-resistente Zelllinie MTR-3, die eine stärkere Expression von ER α bei geringerer ER β 1-Expression zeigte, als MCF-7-Zellen. Des Weiteren wurden die Zelllinie ZR-75-1, welche relativ mehr ER α exprimiert, MDA-MB-231-, MDA-MB-436- und BT-20-Zellen, die nur ER β 1 exprimieren, die Zelllinie BT474, die zwar beide ER-Typen aufweist, jedoch eine deutliche Her2/neu-Überexpression zeigt sowie die Zelllinie SKBR-3, die weder ER α noch ER β 1 aufweist und ebenfalls zu den Her2/neu-überexprimierenden Zelllinien zählt, untersucht. Die Expression der verkürzten ER β -Isoformen, ER β 2 bzw. ER β 5, erwies sich als sehr heterogen. MCF-7-Zellen, ZR-57-1-Zellen sowie BT-20-Zellen zeigten eine deutlich stärkere Expression des ER β 5 während die Zelllinien MTR-3, T47D und MDA-MB-436 eine relativ stärkere ER β 2-Expression aufwiesen.

Die Grundexpression der genannten Rezeptoren bildete eine wichtige Information für weitere Versuche: Basierend auf der Kenntnis der jeweiligen Expressionsmuster sollte nun der Effekt von ER β -Agonisten auf diese Zelllinien untersucht werden. Unter den vorhandenen ER β -Agonisten war das Phyto-Oestrogen Geni gewählt worden, da es sowohl zur Epidemiologie als auch zur Pharmakodynamik dieser Substanz eine übersichtliche Studienlage gibt. [82-84, 102]. Zur Kontrolle wurde der synthetische ER β -Agonist DPN gewählt.

Eine Übersicht der Zusammenhänge zwischen ER-Expression und antiproliferativer Wirkung durch ER β -Agonisten ist in der **Tabelle 5** dargestellt:

	ER α [112]	ER β 1**	ER β 2*	ER β 5*	Her- 2/neu [112]	Hemmung durch Geni/DPN	Tam- Sensitivität
MCF-7	+++	++	++	+++	(+)	X	X
T47D	++	+++	+++	+	+	X	X
MDA- MB-231	-	++	+	+	-	-	-
BT-474	+	+++	+	+	++	-	-
SKBR- 3	-	-	+	++	+++	-	-

Tabelle 5: Darstellung des Zusammenhanges zwischen ER α -Expressionsmuster und Her2/neu-Expression [112] sowie Expressionsmuster der ER β -Isoformen, basierend auf eigenen PCR*- bzw. Western Blot**-Analysen. Inhibition durch Geni/DPN und Sensitivität gegenüber Tam in verschiedenen MaCa-Zelllinien. (+ geringe Expression, ++ mittelstarke Expression, +++ starke Expression)

Die Behandlung der Zelllinien MCF-7 und T47D zeigte für beide Substanzen eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation. Bezogen auf Geni wurde für eine 50%ige Wachstumshemmung der MCF-7-Zellen rund 1 pM Geni benötigt. Die Zelllinie T47D reagierte vergleichsweise sensibler: Es wurden hier nur 0,01 pM für eine 50%ige Hemmung verwendet. Die größere Sensitivität ist durch eine vergleichsweise höhere Konzentration des ER β 1 in dieser Zelllinie zu erklären. Während das Verhältnis ER α zu ER β 1 in MCF-7 Zellen annähernd äquimolar ist, beträgt es in der Zelllinie T47D 0,7:1 [102]. DPN zeigte eine geringere spezifische Breite als Geni: Der proliferationshemmende Bereich lag zwischen 1 pM und 1 nM wobei auch DPN nach 96h Inkubationszeit zu einer Hemmung von annähernd 50% führte. Insgesamt zeigte sich eine erkennbare Wirkung erst nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Tagen. Signifikant war das Ergebnis jedoch erst nach einer Zeit von rund 96h. Dieser Sachverhalt stützt die Annahme, dass sich die Wirkung der ER β -Agonisten eher über den genomischen ER-Signalweg vermittelt als über schnell transduzierende Kinasen oder toxischer Effekte. Die Untersuchung der

anderen Zelllinien zeigte keine Reaktion auf die Inkubation mit den Substanzen. Aus diesem Grund lässt sich folgern, dass ER β -Agonisten die Proliferation nur in solchen Zelllinien hemmen können, die sowohl ER α als auch ER β 1 exprimieren. Diese Erkenntnisse sind gut in Einklang zu bringen mit der Arbeit von Sotoca et al., die gezeigt hatten, dass die durch ER β 1 vermittelte Hemmung auf einem bestimmten Verhältnis von ER α zu ER β 1 beruht. Im Transfektionsexperiment an T47D-Zellen hatte sich gezeigt, dass Geni umso stärker antiproliferativ wirkte, je mehr ER β 1 exprimiert wurde. Allerdings entfaltete sich diese Wirkung nur in Anwesenheit des ER α [102]. Auch die Zelllinie BT-474 reagierte nicht auf die Behandlung mit den ER β -Agonisten. Zwar exprimieren BT-474-Zellen ER, sie weisen jedoch auch ein relativ hohes Maß an Her2/neu auf, was bedeuten könnte, dass diese Zellen in der Lage sind, unabhängig vom ER-Signalweg zu proliferieren.

Auch die ER α /ER β 1⁻ Zelllinie SKBR-3 zeigte keine Reaktion auf die Inkubation mit Geni bzw. DPN. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Grundexpression der verkürzten ER β -Isoformen alleine in keinem direkten Zusammenhang mit der proliferationshemmenden Wirkung der Substanzen steht, wenn nicht sowohl der ER β 1 als auch der ER α co-exprimiert werden. Des Weiteren konnten mit Hilfe der SKBR-3-Zellen ausgeschlossen werden, dass die ER β -Agonisten in den verwendeten Konzentrationen unspezifische Effekte in den untersuchten Zellen verursachen.

Als problematisch erwies sich, dass Inkubationszeiten von maximal sechs Tagen nicht überschritten werden konnten, was den Beobachtungszeitraum einengte. Längere Inkubationszeiten erforderten einen Wechsel des Kulturmediums und eine Nachbehandlung mit den Substanzen. Im Anschluss war jedoch in vielen Fällen eine Zunahme der Proliferation zu beobachten. Diese beruhte vermutlich auf einer Übersättigung der intrazellulären Geni-/DPN-Konzentration. So zeigte sich in den MTT-Tests für beide Substanzen eine Zunahme der Proliferation bei Konzentrationen über 5 nM. Die Kumulation beider Substanzen führte dabei vermutlich zu einer unselektiven Bindung der Substanzen an ER α . Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Transaktivierungsstudien von Sotoca et al. Die Gruppe beschreibt eine starke Aktivierung des ER α durch Geni im höheren

nanomolaren Bereich mit einer starken Proliferation der untersuchten Zellen. Aus diesem Grund betrug die maximale Inkubationszeit in allen Experimenten je nach Zelllinie 4-6 Tage. Da Geni insgesamt einen größeren spezifischen Wirkungsbereich aufwies als DPN, wurden alle weiteren Experimente mit Geni durchgeführt.

Ein weiteres Problem bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse bestand in der Tatsache, dass es bislang nicht möglich war, die Proteinexpression von ER β 2 und ER β 5 in den untersuchten Zellen nachzuweisen. Die Ursache hierfür ist, dass spezifische Antikörper für die Western Blot – Methode erst seit kurzer Zeit verfügbar sind. Bei diesen Antikörpern handelt es sich bislang um polyklonale Antikörper, die in der Testung für diese Arbeit kein spezifisches Signal zeigten. Aus diesem Grund basieren die Aussagen zur Expression dieser Rezeptor-Isoformen nur auf der Basis von mRNA-Daten unter der Annahme einer vollständigen Translation. Eine genaue Analyse der entsprechenden Proteinexpression steht demnach aus, sobald spezifischere Anti-ER β 2- bzw. Anti-ER β 5-Antikörper für die Western Blot-Technik verfügbar sind.

5.2 Genistein hemmt die Proliferation auf Transkriptionsebene

Um den Wirkmechanismus des Geni zu verifizieren, wurde ein Reporter-Assay mit der GFP exprimierenden Zelllinie MCF-E10 durchgeführt. Diese Zelllinie ist ein Derivat der Zelllinie MCF-7 und zeichnet sich durch eine Kopplung des ERE an ein GFP-Reportergen aus. Tatsächlich konnte mittels dieses Experimentes gezeigt werden, dass Konzentrationen von 1 pM Geni die durch E2 ausgelöste transkriptionelle Aktivität am ERE reduzieren konnten. Während 1 nM E2 eine starke grüne Fluoreszenz bewirkte, war nach Inkubation mit 1 pM Geni ein deutlicher Rückgang dieser Fluoreszenz zu beobachten. Nach Behandlung mit 1 nM Geni zeigte sich hingegen eine zunehmende Fluoreszenz, hinweisend auf eine Zunahme der Aktivität am ERE. Da die durch E2 ausgelöste transkriptionelle Aktivität vor allem durch den ER α vermittelt wird, ist anzunehmen, dass der durch Geni aktivierte ER β 1 diese Aktivität unterdrückt.

Eine interessante Entdeckung im Rahmen der MTT-Assays war, dass die Hemmung der Proliferation durch Geni im Bereich niedriger Konzentrationen, nämlich zwischen

1 aM und 1 pM stattfand. Die Verwendung von Konzentrationen oberhalb 1 nM führte zu einer Zunahme der Proliferation, die sich möglicherweise durch eine unspezifische Aktivierung des ER α bei Kumulation der Substanz erklären lässt. Diese Daten stehen in Einklang mit den aus dem GFP-Reporterassay gewonnenen Erkenntnissen. Damit waren die genomisch wirksamen Geni-Konzentrationen weitaus niedriger als die zuvor durch einige Autoren beschriebenen Konzentrationen. In einigen Arbeiten war eine paradoxe Dosis-Wirkungskurve für Geni beschrieben worden, wonach die Substanz in vermeintlich niedrigen Konzentrationen (bis max. 1 μ M) zu einer Proliferation der Zellen geführt hatte und erst in höheren Konzentrationen von mindestens 10 μ M bis 50 μ M zu einer Inhibition geführt hatte [113, 114]. Jedoch zeigte sich im hier vorliegenden Experiment eine deutliche Zunahme der Proliferation im Bereich zwischen 1 nM und 10 μ M Geni. Bei Konzentrationen über 10 μ M entfaltete Geni innerhalb von 24 Stunden sichtbar zytotoxische Effekte. Diese waren lichtmikroskopisch erkennbar an zytolytischen Prozessen (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Prozesse durch eine Aktivierung des ER β 1 eingeleitet wurden. Dafür gibt es zwei Gründe: Zum Einen ist aus Transaktivierungsstudien bekannt, dass Geni-Konzentrationen bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich zu einer Aktivierung des ER α und damit zur Proliferation führen können [114]. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit sowohl mittels MTT-Test als auch durch den GFP-Assay bestätigt werden. Zum Anderen zeigten sich die durch hohe Geni-Konzentrationen (> 10 μ M) ausgelösten Effekte im hier durchgeführten Experiment auch in solchen Zellen, die weder ER α noch ER β 1 exprimieren, wie z.B. SKBR-3 Zellen. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die sicher spezifische Wirkung des Geni am ER β 1 bei Konzentrationen > 1 nM stattfindet.

5.3 Genistein verstärkt die proliferationshemmende Wirkung des 4-OHT

Aus den zitierten klinischen Untersuchungen ist bekannt, dass MaCa-Patientinnen, die eine hohe Konzentration des ER β 1 im Tumorgewebe aufweisen, besser auf die Tam-Therapie ansprechen als Patientinnen mit geringer oder mit fehlender ER β 1-Expression [90-92]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von

Geni zu einer signifikanten Verstärkung ($p < 0,05$) der antiproliferativen Wirkung des Tams in MCF-7 Zellen führt. Demnach lässt sich mittels dieses Experimentes *in vitro* demonstrieren, dass eine Aktivierung des ER β 1 in Kombination mit einer Antagonisierung des ER α zu einer besseren Inhibition dieser MaCa-Zellen führt als eine reine Antagonisierung des ER α durch Tam.

Andersherum zeigte dieses Experiment, dass Geni-Konzentrationen von 1 nM keinen Anstieg der Proliferation verursachten, wenn Geni mit 4-OHT kombiniert wurde. Dazu kam es erst ab einer Geni-Konzentration von 10 nM. Dies beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass 4-OHT stärker am ER α bindet als Geni und dadurch die LBD so lange blockiert, bis es bei höheren Geni-Konzentrationen zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle kommt.

Die Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des 4-OHT durch Geni lässt sich möglicherweise durch die unterschiedliche Interferenz dieser Substanzen mit dem Zellzyklus erklären. Für 4-OHT wurde vor allem eine Arretierung des Zellzyklus am G1-Restriktionspunkt beschrieben [52]. Eine Aktivierung des ER β 1 führt hingegen zu einem Zellzyklus-Arrest sowohl am G1- als auch am G2-Restriktionspunkt. Ursache hierfür ist die Repression von Cyklin D1, Cyklin A und Cyklin E sowie die Induktion von p21 und p27 durch ER β 1 [97]. Es ist demnach eine additive Wirkung beider Substanzen zu vermuten.

5.4 Genistein re-sensitiviert resistente MaCa-Zellen gegenüber Tamoxifen

Tam-Resistenz ist eine der großen Herausforderungen der endokrinen Therapie des MaCa. Klinische Untersuchungen konnten darlegen, dass die Tam-Resistenz seltener auftritt, wenn die Tumorzellen ER β 1 exprimieren [90-92]. Im MTT-Test konnte bereits gezeigt werden, dass MCF-7-Zellen sensitiver gegenüber 4-OHT reagieren, wenn sie gleichzeitig mit dem ER β -Agonisten Geni inkubiert werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sollte *in vitro* geprüft werden, ob die Sensitivität gegenüber Tam in engem Zusammenhang mit der Aktivität des ER β 1 steht. Zu

diesem Zweck waren MTR-3- Zellen mit 4-OHT, Geni bzw. einer Kombination aus beiden Substanzen behandelt worden. MTR-3-Zellen sind ein Derivat der Zelllinie MCF-7, die über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren durch kontinuierliche Behandlung mit Tam sekundär resistent gemacht worden sind. MTR-3-Zellen proliferieren in Abwesenheit von E2 und in Anwesenheit von 4-OHT [115]. Wie zu erwarten, führte die Inkubation mit 1 μ M 4-OHT in dieser Zelllinie zu einer dosis-abhängigen Zunahme der Proliferation um fast 40% der unbehandelten Kontrolle. Die Kombination von 4-OHT mit Geni führte jedoch zu einer Inhibition um fast 50% der unbehandelten Kontrolle. Damit wurde deutlich, dass die Aktivität des ER β 1 einen großen Einfluss auf die Sensitivität der resistenten MaCa-Zellen hat.

Ursache dafür könnte die Interaktion des ER β 1 mit dem ER α sein. In resistenten Zellen blockiert Tam zwar die LBD des ER α . Diese Blockade ist jedoch wirkungslos, da in Tam-resistenten Zellen GF-R und Kinase-abhängige Signalwege hochreguliert sind. Dies führt dazu, dass der ER α an Serinresten der AF-1 durch Phosphorylierung aktiviert werden kann – unabhängig von der Blockade durch Tam [35, 63, 70]. Dabei scheint das Tumorwachstum dennoch über den ER α vermittelt zu bleiben, denn Tam-resistente Karzinome reagieren in vielen Fällen sensitiv gegenüber Fulvestrant, einer Substanz die den ER α herunterreguliert [116]. In dieser Arbeit konnte anhand des GFP-Reporterassays gezeigt werden, dass der ER β 1 die transkriptionelle Aktivität des ER α am ERE supprimieren kann (**Abb. 21**) und dass möglicherweise diese Interaktion des ER β 1 mit dem ER α in den resistenten Zellen zu einer Resensitivierung gegenüber Tam führt.

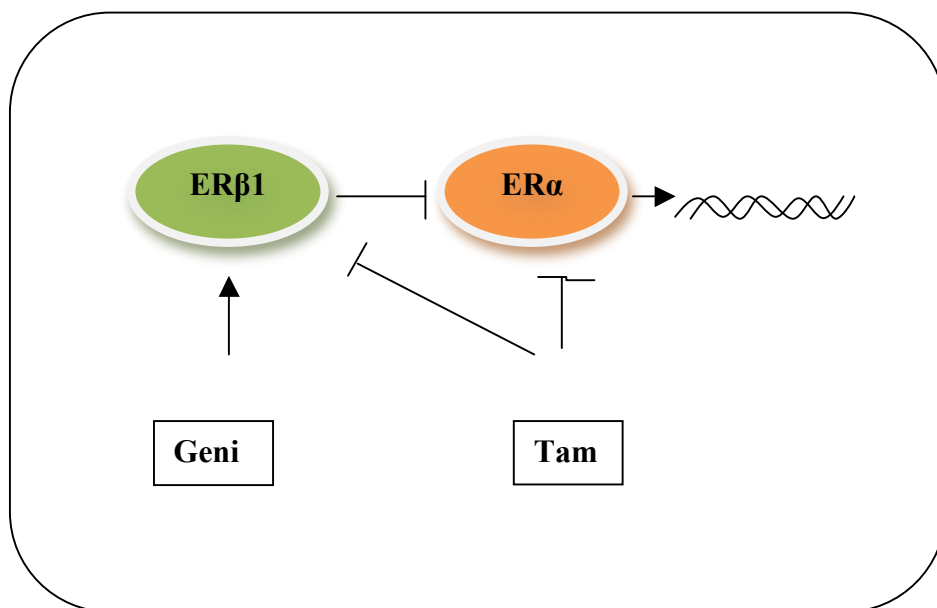


Abbildung 21: Möglicher Einfluss von Tam bzw. Geni auf den genomischen ER-Signalweg.

5.5 Hochregulierung von ERβ5 bzw. ERβ2 vermittelt antiproliferative Effekte durch 4-OHT bzw. Genistein

Die RT-PCR hatte gezeigt, dass sensitive MCF-7-Zellen ein anderes Grundexpressionsmuster für ERβ1, ERβ2 und ERβ5 aufweisen als resistente MTR-3-Zellen. So war vor allem ERβ5 in MCF-7-Zellen stärker exprimiert als in MTR-3-Zellen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, welchen Effekt die Behandlung mit Geni bzw. 4-OHT auf die Regulierung der ERβ-Isoformen ausübt. Die zu diesem Zweck durchgeführte RT-PCR-Analyse zeigte dabei ein interessantes Regulierungsmuster: Die relative Expression des ERβ1 zeigte keine wesentlichen Veränderungen auf die Behandlung. Jedoch erzeugte 4-OHT eine Erhöhung der ERβ5-mRNA-Expression und eine Herunterregulierung der ERβ2-mRNA in den MCF-7-Zellen. Dabei zeigte sich eine maximale ERβ5-Expression nach einer Inkubationszeit von ca. 8 Stunden. Geni hingegen bewirkte eine Hochregulierung der ERβ2-mRNA. Jedoch war dieses Regulierungsmuster in den resistenten MTR-3-Zellen nicht zu erkennen.

Um diese Beobachtung zu verifizieren wurde eine quantitative Real-Time-PCR mit derselben Fragestellung durchgeführt. Als problematisch erwies sich dabei die Bildung von Dimeren aus den verwendeten Primern. Da diese Dimere den zur Detektion amplifizierter cDNA verwendeten Fluoreszenzfarbstoff ebenso einlagerten, führte dies zu unspezifischen Signalen mit der Folge z.T. erheblicher Standardabweichungen. Mittels neuer qPCR-Technologien wäre es zukünftig möglich, solche unspezifischen Signale zu unterdrücken. Dennoch konnte durch die qRT-PCR bestätigt werden, dass die Inkubation von MCF-7-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der ER β 5-mRNA um rund 60% geführt hatte, während die ER β 2-mRNA um rund 25% abgenommen hatte. Die durch Geni verursachte Hochregulierung der ER β 2-mRNA betrug rund 30% der Kontrolle, war jedoch nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu zeigte sich in den MTR-3-Zellen kein erkennbares Reaktionsmuster auf die Behandlung mit den Substanzen. Dies bedeutet, dass der Regulationsmechanismus der ER β -Isoformen in den resistenten MaCa-Zellen verändert ist und dass der ER β 2 bzw. der ER β 5 eine wichtige Rolle für die Sensitivität der MaCa-Zellen gegenüber Tam spielen könnte.

Diese Vermutung wird durch verschiedene Publikationen unterstützt: Nach den Erkenntnissen von Leung et. al. haben weder der ER β 2 noch der ER β 5 eine intrinsische Transaktivierungsdomäne. Der Grund dafür ist die Modifikation bzw. das Fehlen des die LBD enthaltenden Exons 8. Jedoch sind beide Rezeptorisoformen in der Lage, den ER α bzw. den ER β 1 Liganden-abhängig durch Heterodimerisation zu aktivieren. Ein Reporter-Assay mit HEK293-Zellen zeigte, dass eine steigende Co-Expression des ER β 5 zu einer signifikant ansteigenden ER β 1-Transaktivierung führte. Desweiteren war das ER β 1-ER β 5-Heterodimer 50-fach häufiger zu finden als das ER β 1-ER β 1-Homodimer [42]. Die Erkenntnisse dieser Gruppe stützen die Theorie, dass der ER β 5 der präferierte Bindungspartner des ER β 1 sein könnte und dass eine fehlerhafte Hochregulierung des ER β 5, z.B. durch epigenetisches Silencing, im Zusammenhang mit einem vermehrten Verlust der antiproliferativen Funktion des ER β 1 stehen könnte. Park et. al. konnten hingegen zeigen, dass der ER β 2 als dominant negativer Regulator des ER α auftreten kann. Nach der Bildung eines ER α /ER β 2-Heterodimers war die Funktion des ER α stark unterdrückt [108]. Beide ER β -Isoformen scheinen also eine außerordentlich wichtige regulatorische

Funktion auszuüben und eine Dysregulation der beiden Isoformen könnte demnach maßgeblich zum Tam-refraktären Verhalten der resistenten Zellen beitragen.

Als Ursache dieser Dysregulation kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht: Zum Einen, könnte in den resistenten MTR-3-Zellen eine Neumutation des ER β 2- bzw. des ER β 5-Gens bestehen. Diese Fragestellung könnte durch eine Gensequenzierung beantwortet werden. Zum Anderen wäre es denkbar, dass die langfristige Behandlung mit Tam zu einer Repression der entsprechenden Gene führt. Ein bereits identifizierter Mechanismus in diesem Zusammenhang ist die epigenetische Herunterregulierung von des ER β 1 durch Methyltransferasen [101]. In der Tat konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass MTR-3-Zellen insgesamt weniger ER β 5-mRNA ausbilden als MCF-7-Zellen.

5.6 Die Überexpression von ER β 2 und ER β 5 inhibiert die Proliferation von MCF-7-Zellen

Die PCR-Analyse hatte gezeigt, dass sensitive und resistente Zellen unterschiedlich auf die Inkubation mit 4-OHT bzw. Geni reagieren. Aus diesem Grund war anzunehmen, dass die Expression der verkürzten ER β -Isoformen ein wichtiger Faktor des ER-Signalweges darstellt und in engem Zusammenhang mit der Proliferation steht. Um die Rolle der beiden ER β -Isoformen näher zu untersuchen, wurden zunächst MCF-7-Zellen im stabilen Verfahren mit ER β 2 bzw. ER β 5-Expressionsvektoren transfiziert. Zu beobachten war dabei, dass alleine die Überexpression von ER β 2 bzw. ER β 5 in MCF-7-Zellen zu einer Inhibition der Proliferation führte - mit einem etwas besseren Ergebnis in den ER β 5-überexprimierenden Zellen. Nach einer 96-stündigen Inkubationszeit in Zellkulturmedium betrug die Hemmung in den ER β 5-überexprimierenden Zellen rund 30% der Wildtyp-Kontrolle. Die Verwendung einer Leervektor-Kontrolle ergab außerdem, dass der inhibitorische Effekt Folge der Überexpression der ER β -Isoformen und nicht ein toxischer Nebeneffekt des Transfektionsprozesses war.

Ein ähnliches Ergebnis war nach stabiler Transfektion von ER β 2 bzw. ER β 5 in Tam-resistenten MTR-3-Zellen zu beobachten: Auch in dieser Zelllinie verursachten beide Rezeptorisoformen eine Hemmung der Proliferation, verglichen mit der Wildtyp-Kontrolle. Und auch hier war der Effekt durch die Überexpression des ER β 5 größer.

Eine interessante Beobachtung war außerdem, dass sich die Morphologie der ER β 5-überexprimierenden MTR-3-Zellen im lichtmikroskopischen Bild zu verändern schien. So nahm die Kern-Plasma-Relation dieser Zellen zugunsten einer plasmatischen Volumenzunahme sichtbar ab (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt könnte das Resultat einer herabgesetzten Proliferativität der Zellen und einer dadurch verstärkt ermöglichten Reifung bzw. Differenzierung sein. Dies weist darauf hin, dass der ER β 5 nicht nur in die Zellproliferation sondern auch in andere zelluläre Prozesse, wie Reifung und Differenzierung, eingreift.

Mittels dieser Ergebnisse konnte zum ersten Mal *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression des ER β 5 in engem Zusammenhang mit der Proliferationshemmung von MaCa-Zellen steht. Als problematisch erwies sich jedoch auch hier, dass die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion nur auf Basis von mRNA-Analysen durchgeführt werden konnte. Mangels valider Antikörper konnte eine vollständige Translation der exprimierten ER β 2- bzw. ER β 5-mRNA in ein intaktes Protein nur vermutet werden.

5.7 Die Überexpression von ER β 2 bzw. ER β 5 erhöhen die Tam-Sensitivität in MCF-7- und MTR-3-Zellen

Mit PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der ER β 2 und der ER β 5 in sensitiven MaCa-Zellen durch 4-OHT bzw. Geni unterschiedlich reguliert werden und dass dieser Regulierungsmechanismus in den resistenten Zellen nicht vorhanden ist. Des Weiteren wurde mit Hilfe stabiler Transfektion deutlich gemacht, dass die Überexpression beider ER β -Isoformen die Proliferation von MaCa-Zellen hemmen kann. Basierend darauf sollte daher nun der Frage nachgegangen werden, ob die

Überexpression des ER β 2 bzw. des ER β 5 die Tam-Sensitivität dieser Zellen beeinflusst.

In der Tat zeigte die Auswertung des zu diesem Zweck durchgeführten MTT-Assays, dass 4-OHT eine signifikant stärkere Hemmung der Proliferation in den transfizierten MCF-7-Zellen verursachte, als in der wt-Kontrolle. In den ER β 2-transfizierten MCF-7-Zellen war die Inhibition rund 10% stärker ausgeprägt als in den wt-MCF-7. Im Falle der ER β 5-überexprimierenden Zellen war das Ergebnis besonders deutlich: Hier fiel die Hemmung durch 4-OHT rund 20% stärker aus als in den wt-MCF-7 und war damit signifikant ($p < 0,05$).

Von außerordentlichem Interesse war nun, ob die Überexpression des ER β 2 bzw. des ER β 5 zu einer Re-Sensitivierung Tam-resistenter MaCa-Zellen führen kann. Die Auswertung des MTT-Tests zeigte, dass die Überexpression des ER β 2 bzw. des ER β 5 eine deutliche Hemmung der Proliferation nach Inkubation mit 4-OHT bewirkte, während die mit dem Leervektor transfizierten Zellen wie wt-MTR-3-Zellen mit einer Zunahme der Proliferation reagierten. Dabei reagierten die Zellen auch in diesem Experiment mit einer stärkeren Inhibition auf die ER β 5-überexprimierenden Zellen.

Das Experiment zeigt demnach, dass sowohl der ER β 2 als auch der ER β 5 maßgeblich an der Sensitivität der MaCa-Zellen gegenüber Tam beteiligt sind. Es zeigt jedoch auch, dass der ER β 5 sowohl hinsichtlich Antiproliferation als auch hinsichtlich der Tam-Sensitivität einen größeren Einfluss zu haben scheint, als der ER β 2 – setzt man eine vollständige Proteinexpression nach Transfektion voraus.

5.8 Verstärkung der antiproliferativen 4-OHT-Wirkung durch Genistein in ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden Zellen

Weder der ER β 5 noch der ER β 2 sind in der Lage einen Liganden zu binden. Es ist jedoch bekannt, dass beide Isoformen Liganden-abhängig in der Lage sind, Heterodimere mit ER α bzw. ER β 1 zu bilden und deren Aktivität ähnlich einem Co-A bzw. Co-R zu beeinflussen. Insbesondere für den ER β 5 wurde eine aktivierende

Wirkung auf den ER β 1 beschrieben [42]. Da der ER β 1 die Funktion des ER α unterdrücken kann, sollte untersucht werden, ob die Stimulation des ER β 1 durch Geni zu einer stärkeren Sensitivität gegenüber 4-OHT in den ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden Zellen führt. Aus diesem Grund wurden ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierende MCF-7- und MTR-3-Zellen mit einer Kombination aus 4-OHT und Geni behandelt und mit der Leervektor-Kontrolle verglichen.

Tatsächlich bewirkte die Kombination von 1 μ M 4-OHT mit 1 pM Geni eine stärkere Inhibition als die Behandlung mit 4-OHT alleine. Die Inhibition war für beide ER β -Isoformen signifikant stärker ($p < 0,05$). Es zeigte sich aber auch hier ein den anderen MTT-Assays vergleichbares Muster: Die Hemmung war im Falle der ER β 5-überexprimierenden Zellen am stärksten.

Mit Hilfe dieses Experimentes konnte also bestätigt werden, dass eine Aktivierung des ER β 1 durch Geni zu einer verstärkten antiproliferativen Tam-Wirkung in ER β 2- bzw. ER β 5-überexprimierenden Zellen führt und resistente MTR-3-Zellen wieder re-sensitiviert.

Die Ursache für die Wirkung, die durch eine Kombination von 4-OHT und Geni hervorgerufen wird, könnte der additive Effekt einer Blockade des ER α bei gleichzeitiger Aktivierung des ER β 1 sein. Tam blockiert nicht nur den ER α sondern auch den ER β 1 [117]. Im Falle des ER α ist dies gewollt, um die durch ER α vermittelte Proliferation des ER-positiven MaCa zu unterdrücken. Die Blockade des ER β 1 scheint jedoch auch unerwünschte Wirkungen zu erzeugen, da der ER β 1 wichtige regulatorische Funktionen ausübt. Zu diesen Funktionen gehört die Repression der Cykline D1, A und E sowie die Induktion von p21 und von p27. Dies bedeutet, dass dieser Rezeptor eine wichtige Regulierung des Zellzyklus vermittelt [97, 99, 117]. Des Weiteren scheint der ER β 1 auch regulierend auf schnelle Kinase-vermittelte Signalwege zu wirken. Levy et.al. konnten darlegen, dass der ER β 1 die Dual specificity phosphatase (DUSP6) induziert. [117]. Dabei handelt es sich um eine Phosphatase, die pERK1/2 MAPK inaktiviert und damit eine wichtige antiproliferative Rolle spielt. Blockiert Tam den ER β 1, wird die DUSP6 nicht mehr exprimiert, was zu einer starken Aktivierung der MAPK führt [118]. Dabei ist bekannt, dass diese

Kinase-Signalwege in Tam-resistenten Zellen besonders aktiviert sind [63]. Durch Geni ist jedoch eine Aktivierung des ER β 1 denkbar, die sich additiv zur ER α -Blockade durch Tam auswirken könnte.

In den vorliegenden Transfektionsexperimenten wurde nun gezeigt, dass bereits die Überexpression des ER β 5 zu einer verstärkten Abnahme der Zellviabilität führt. In MCF-7-Zellen hatte die Inkubation mit 4-OHT eine Hochregulierung des ER β 5 bewirkt. Aus laborexperimentellen Arbeiten der Gruppe Leung et al. ist bekannt, dass der ER β 5 den ER β 1 durch Heterodimerisierung dominant positiv beeinflussen kann [42]. Die signifikante Verstärkung der Sensitivität gegenüber 4-OHT in den ER β 5-überexprimierenden Zellen lässt also den Schluss zu, dass die Expression des ER β 5 wichtig für die Funktion des ER β 1 in Anwesenheit eines Antagonisten sein könnte.

Geni hingegen hatte eine Hochregulierung des ER β 2 bewirkt, wie die PCR-Analyse zeigen konnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Erkenntnis einiger Autoren, dass der ER β 2 als dominant negativer Regulator des ER α auftreten kann. Nach der Bildung eines ER α /ER β 2-Heterodimers war die Funktion des ER α stark unterdrückt [108]. Darüber hinaus war zu beobachten, dass der ER β 2 durch Heterodimerisierung mit dem ER α dessen Abbau am Proteasom einleiten konnte [119].

Im hier vorliegenden Experiment hatte sowohl die Überexpression des ER β 2 als auch des ER β 5 in den resistenten Zellen zu einer Hemmung des Wachstums geführt. Berücksichtigt man die hier zitierten Arbeiten, könnte die Überexpression des ER β 5 zu einer verstärkten Aktivierung des durch Geni ligierten ER β 1 bei gleichzeitiger Blockade des ER α durch 4-OHT führen. Die verstärkte Tam-Sensitivität bei Überexpression des ER β 2 könnte hingegen auf der, in den oben zitierten Arbeiten erwähnten Blockade des ER α beruhen. Es ist denkbar, dass der ER β 2 auf diesem Weg die Kinasen-vermittelte Aktivierung des ER α unterdrücken kann.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass sich der additive Effekt des ER α -Antagonisten Tam und des ER β -Agonisten Geni auch auf die Regulierung der ER β -Isoformen auswirkt.

5.9 Inhibitorischer Einfluss des ER β 2 und des ER β 5 auf den Zellzyklus

Zwar greifen ERs auch in die Regulierung der Apoptose ein, jedoch vermittelt sich die proliferative bzw. antiproliferative Funktion der ERs vor allem in der Kontrolle des Zellzyklus [48, 49, 97, 99]. Setzt man die Annahme voraus, dass die Überexpression von ER β 2 bzw. ER β 5 zu einer verstärkten Inhibition von ER α bzw. Aktivierung von ER β 1 führt, müsste sich dies in einem verstärkten Arrest der Zellen in der G1- bzw. G2-Phase des Zellzyklus ausdrücken. Noch deutlicher müsste dieses Ergebnis nach der Inkubation mit den bereits erwähnten Substanzen ausfallen. Um diesen Mechanismus aufzuklären, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Diese Analyse ermöglicht eine Zuteilung der untersuchten Zellen zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, den proliferierende Zellen durchlaufen.

Bereits die Überexpression des ER β 2 bzw. des ER β 5 erwies sich sowohl in MCF-7-Zellen als auch in MTR-3-zellen als inhibitorisch. Während der Anteil der sich in der S-Phase befindenden wt-MCF-7-Zellen rund 36% betrug, war er im Falle der ER β 2-überexprimierenden Zellen auf rund 24% und im Falle der ER β 5-überexprimierenden Zellen auf rund 20% gesunken. Bezüglich der transfizierten MTR-3-Zellen war die inhibitorische Wirkung durch den ER β 5 stärker. Auch hier war nach stabiler Überexpression eine Reduktion des S-Phasenanteils von 28,37% auf rund 23% zu messen. Dabei verursachte die Transfektion mit dem ER β 5 in MCF-7-Zellen eine Erhöhung des G0/G1- sowie des G2-Phasenanteiles. In den MTR-3-Zellen imponierte vor allem eine relative Erhöhung des G2-Anteiles. Dies könnte ein weiteres Indiz für die bereits zitierte dominant positive Aktivierung des ER β 1 durch den ER β 5 sein und den damit verbundenen Arrest des Zellzyklus am G1- und am G2-Restriktionspunkt. Ursache dafür könnte eine Repression der Cykline D1, A und E sowie eine Induktion von p21 und p27 durch den ER β 1 sein [42, 97, 99].

Wie zu erwarten, verursachte die Inkubation der wt-MCF-7-Zellen mit 4-OHT eine Erhöhung des sich in der G1-Phase befindlichen Anteils der Zellen. Dies ist eine logische Konsequenz der Antagonisierung des proliferativ wirkenden ER α . In den transfizierten Zellen jedoch bewirkte die Inkubation mit 4-OHT eine stärkere Reduktion des S-Phasenanteils der Zellen als in den wt-MCF-7-Zellen. Vor allem in

den ER β 5-überexprimierenden Zellen zeigte sich eine deutliche Erhöhung des G1-Phasenanteils auf rund 67%. Dieses Ergebnis spiegelt eindeutig die im MTT-Test ermittelte Inhibition der Proliferation wider: Auch dort hatte sich eine stärkere Hemmung durch 4-OHT in ER β 5-überexprimierenden Zellen gezeigt, wodurch sich die Vermutung bestätigt, dass der ER β 5 eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Tam-Sensitivität spielt. Von herausragendem Interesse war allerdings, inwieweit ER β 2 bzw. ER β 5 den Zellzyklus resistenter Zellen nach 4-OHT-Behandlung beeinflussen könnten. Im an wt-MTR-3-Zellen durchgeführten MTT-Test hatte die Behandlung mit 4-OHT zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation geführt. Tatsächlich war der in der Durchflusszytometrie ermittelte S-Phasenanteil der wt-MTR-3-Zellen in diesem Fall auch doppelt so hoch wie der, der unbehandelten Kontrolle. Jedoch zeigte sich nach stabiler Transfektion eine signifikante Inhibition durch 4-OHT, insbesondere in den ER β 5-überexprimierenden Zellen: Hier war eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung des G1-Anteiles bei Reduktion des S-Phasenanteiles von 40% auf 18,44% zu verzeichnen. Dies bestätigt die Vermutung, dass beide ER β -Isoformen, jedoch insbesondere der ER β 5, eine bedeutende Rolle für die Sensitivität gegenüber 4-OHT spielen.

Die Behandlung mit Geni alleine bewirkte in allen untersuchten Zellen, außer in den wt-MTR-3-Zellen, eine relative Erhöhung des G1- und des G2-Phasenanteiles bei gleichzeitiger Reduktion des Anteiles der S-Phase. Auch diese Beobachtung steht in Einklang mit den von Paruthiyil et. al. beschriebenen Erkenntnissen, dass die Aktivierung des ER β 1 einen Arrest der MCF-7-Zellen sowohl am G1- als auch am G2-Restriktionspunkt verursacht [97, 101]. In wt-MTR-3-Zellen bewirkte Geni zwar eine weniger ausgeprägte Erhöhung des S-Phasenanteiles als 4-OHT, jedoch konnte mittels FACS-Analyse bestätigt werden, was zuvor auch im MTT-Test beobachtet worden war: Dass sowohl 4-OHT als auch Geni alleine in MTR-3-Zellen die Proliferation verstärken.

Die Kombination von 4-OHT und Geni führte in allen untersuchten Zellen zu einer stärkeren Abnahme des S-Phasenanteils als die Inkubation mit 4-OHT und Geni alleine, was die Vermutung eines Kombinationseffektes durch die beiden Substanzen bestätigt. Am stärksten war dieser Effekt in den ER β 5-überexprimierenden MCF-7-

und MTR-3-Zellen. In den ER β 5-überexprimierenden MCF-7-Zellen sank der S-Phasenanteil sogar unter 10%. Mit den in der FACS-Analyse gewonnenen Erkenntnissen lässt sich somit bestätigen, dass die Wirkung von 4-OHT und Geni nicht nur auf einem Kombinationseffekt beruht, sondern auch auf der Expression der verkürzten ER β -Isoformen, ER β 2 bzw. ER β 5. Ein Schema der möglichen Zusammenhänge ist in der **Abbildung 22** dargestellt. Die vollständige Aufklärung dieser Zusammenhänge erfordert jedoch eine Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse zu verkürzten Isoformen des ER α . Bislang wurden zwei im MaCa exprimierte Isoformen identifiziert: ER α 36 und ER α 46, benannt nach dem jeweiligen Molekulargewicht [120, 121]. Die Aufklärung der Funktion und Regulierung dieser Isoformen steht erst am Anfang und es ist anzunehmen, dass eine vollständige Beurteilung der Rolle von ER β 2 und von ER β 5 nur im Gesamtkontext mit allen ER-Isoformen vorgenommen werden kann.

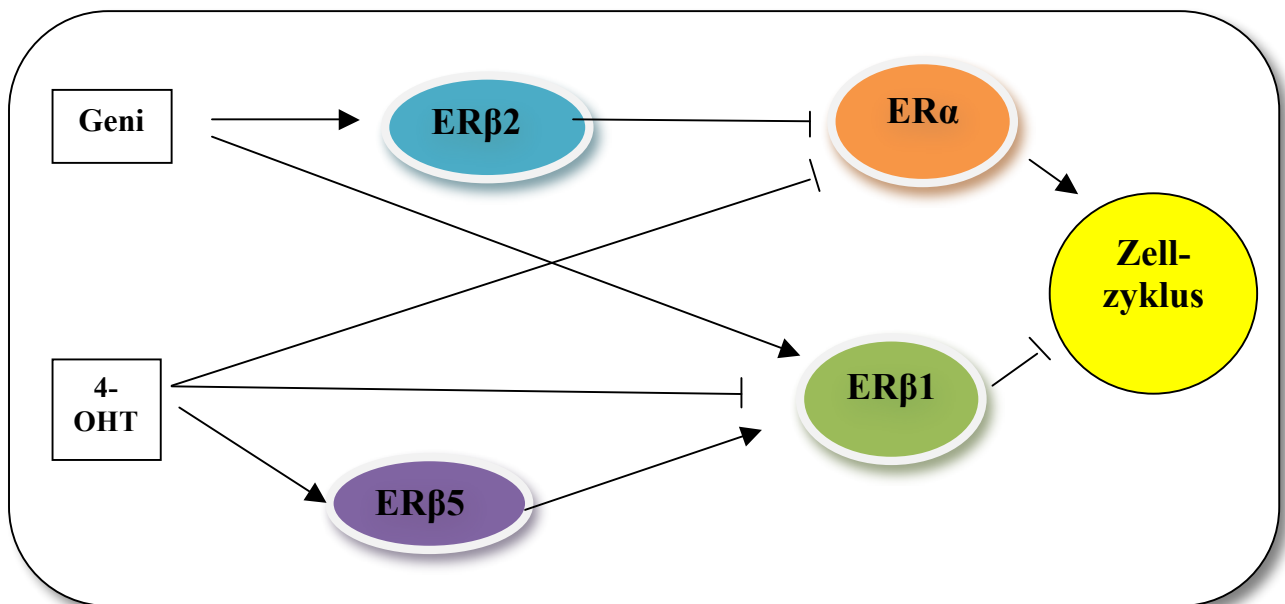


Abbildung 22: Mögliche Regulierung des durch Tam bzw. Geni hervorgerufenen Effektes in sensitiven MCF-7-Zellen durch ER β 2 bzw. ER β 5.

6 Zusammenfassung

Das MaCa ist das verbreitetste Malignom und die häufigste Krebstodesursache unter Frauen weltweit. In mehr als 75% aller Fälle beruht die Initiation und Progression der Erkrankung auf der Wirkung von Oestrogenen an ERs im Brustgewebe. ERs gehören zur Superfamilie der Liganden-aktivierbaren NHR, deren Funktion vor allem in der Steuerung der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zielgeweben besteht. Es gibt zwei ER-Typen: ER α und ER β . Die Entdeckung des ER α führte zur Entwicklung des Tam, welches Oestrogene kompetitiv am ER α verdrängt. Seitdem findet Tam Anwendung in der adjuvanten Therapie des MaCa.. Ein großes Problem ist dabei jedoch die Tam-Resistenz, die zur Progression und zum Rezidiv des MaCa führt. Die Entdeckung des ER β im Jahre 1996 hat die MaCa-Forschung revolutioniert. Bis heute wurden fünf ER β -Isoformen identifiziert, von denen vor allem der ER β 1, der ER β 2 und der ER β 5 im Gewebe der Mamma exprimiert werden und deren Struktur auf unterschiedliche biologische Funktionen hinweist, die bis jetzt jedoch nicht genau bekannt sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die Isoformen des ER β hinsichtlich der Proliferation und der Tam-Sensitivität des MaCas spielen.

Im Rahmen dieser *in vitro* Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Aktivierung des ER β 1 durch spezifische Agonisten die Proliferation von MaCa-Zellen signifikant hemmt. Dabei ist wichtig zu unterstreichen, dass es nur dann zu einer Hemmung der Proliferation kommt, wenn die Zellen sowohl den ER α als auch den ER β 1 exprimieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diejenigen MaCa-Zelllinien, in denen eine ER β 1-Aktivierung antiproliferativ wirkt, auch sensitiv gegenüber Tam sind. In diesen Zelllinien wurde die Wirkung des Tams durch eine Agonisierung des ER β 1 mit dem spezifischen Liganden Geni signifikant verstärkt.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des ER β 1 durch Geni zur Resensitivierung gegenüber Tam in Tam-resistenten MaCa-Zellen führt. Als Ursache für diesen Effekt wurde die additive Wirkung einer ER α -Blockade durch Tam bei gleichzeitiger Agonisierung des ER β 1 identifiziert. Die spezifische Wirkung des

Geni wurde mittels eines GFP-Reporter-Assays belegt. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser ER β 1-Agonist die Aktivität des ER α am ERE reduziert.

In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle der Isoformen ER β 2 und ER β 5 untersucht. Die zu diesem Zweck durchgeführten RT-PCR- und qRT-PCR-Analysen lieferten dabei die wichtige Erkenntnis, dass es in sensitiven MCF-7-Zellen einen Regulierungsmechanismus gibt, der in resistenten MTR-3-Zellen fehlt: In MCF-7-Zellen führte die Inkubation mit Tam zu einer Hochregulierung des ER β 5 und zu einer Herunterregulierung des ER β 2. Geni bewirkte hingegen eine Hochregulierung des ER β 2. Dieser Mechanismus fehlte in den Tam-resistenten Zellen. Dies zeigt, dass Tam-resistente MaCa-Zellen eine fehlerhafte Regulierung dieser ER β -Isoformen aufweisen.

Um zu überprüfen, ob ER β 2 bzw. ER β 5 wichtig für die Sensitivität der Zellen gegenüber Tam sind, wurden MCF-7-Zellen und MTR-3-Zellen im stabilen Verfahren mit Expressionsvektoren für ER β 2 bzw. ER β 5 transfiziert. Die Untersuchung der Proliferation mittels MTT-Assay zeigte, dass die Überexpression beider Isoformen zu einer Hemmung führte.

Darüber hinaus konnte vor allem für den ER β 5 eine signifikante Erhöhung der Sensitivität gegenüber Tam festgestellt werden. In den resistenten MTR-3-Zellen führte die Überexpression des ER β 5 zu einer Resensitivierung. Damit konnte zum ersten Mal *in vitro* nachgewiesen werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression von ER β 5 und der Wirkung von Tam gibt.

Die Proliferationshemmende Wirkung von Tam konnte sowohl in den stabil transfizierten MCF-7- als auch in MTR-3-Zellen noch durch Geni verstärkt werden. Dabei war der Effekt in den ER β 5-überexprimierenden Zellen signifikant.

Zur Aufklärung eines möglichen Wirkmechanismus wurde sowohl mit wt-MCF-7- bzw. wt-MTR3-Zellen sowie mit den ER β 2- und ER β 5-Transfektanten eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Mit Hilfe dieser konnte bestätigt werden, dass Tam in wt-MCF-7-Zellen eine Arretierung des Zellzyklus am G1-Restriktionspunkt verursacht, während Geni vor allem einen G2-Arrest bewirkte. In

den ER β 2- und den ER β 5-überexprimierenden Zellen war hingegen eine deutlich stärkere Abnahme des S-Phasenanteils der Zellen zu verzeichnen. Dabei führte die ER β 2-Überexpression tendenziell zu einem G0/G1-Arrest, während der ER β 5 eher zu einem G2-Arrest führte. Die Kombination beider Substanzen führte zu einer stärkeren Abnahme des S-Phasenanteils als Tam bzw. Geni alleine. Damit konnte die additive Wirkung der beiden Substanzen auf der Ebene der Zellzyklusregulierung bestätigt werden.

In den resistenten MTR-3-Zellen löste die Inkubation mit 4-OHT, dem aktiven Metaboliten des Tam, einen deutlichen Zellzyklusarrest aus, wenn diese den ER β 5 überexprimierten. Verstärkt wurde dieser Effekt noch durch die zusätzliche Behandlung mit Geni. Dies zeigt, dass die untersuchten ER β -Isoformen – aber insbesondere der ER β 5 – die Sensitivität resistenter MaCa-Zellen durch eine Hemmung des Zellzyklus erhöhen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die untersuchten ER β -Isoformen einen wichtigen Einfluss auf das Wachstum des MaCa ausüben. Während bislang vor allem der ER α als prognostischer Marker gebraucht wurde, könnte die Untersuchung der ER β -Isoformen möglicherweise zu einer verbesserten prognostischen Abschätzung führen.

Des Weiteren weist der Einfluss der untersuchten ER β -Isoformen auf die Tam-Wirkung auf die Notwendigkeit hin, das aktuelle Konzept einer totalen Blockade der ERs zu überdenken. So konnte mit Hilfe dieser Arbeit gezeigt werden, dass MaCa-Patientinnen möglicherweise therapeutisch von einer zusätzlichen ER β -Aktivierung profitieren könnten.

7 Literaturverzeichnis

1. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
2. Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*. 1994;266(5182):120-2. Epub 1994/10/07.
3. Gayther SA, Russell P, Harrington P, et al. The contribution of germline BRCA1 and BRCA2 mutations to familial ovarian cancer: no evidence for other ovarian cancer-susceptibility genes. *American journal of human genetics*. 1999;65(4):1021-9. Epub 1999/09/16.
4. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002;108(2):171-82. Epub 2002/02/08.
5. Stratton MR, Rahman N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature genetics*. 2008;40(1):17-22. Epub 2007/12/29.
6. Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics*. 2006;38(11):1239-41. Epub 2006/10/13.
7. Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nature genetics*. 2006;38(8):873-5. Epub 2006/07/13.
8. Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nature genetics*. 2007;39(2):165-7. Epub 2007/01/04.
9. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nature genetics*. 2002;31(1):55-9. Epub 2002/04/23.
10. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. *DNA repair*. 2004;3(8-9):1039-47. Epub 2004/07/29.
11. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(3):270-82. Epub 2006/01/20.
12. Love RR, Philips J. Oophorectomy for breast cancer: history revisited. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002;94(19):1433-4. Epub 2002/10/03.
13. Key TJ. Endogenous oestrogens and breast cancer risk in premenopausal and postmenopausal women. *Steroids*. 2011;76(8):812-5. Epub 2011/04/12.
14. Key TJ, Appleby PN, Cairns BJ, et al. Dietary fat and breast cancer: comparison of results from food diaries and food-frequency questionnaires in the UK

- Dietary Cohort Consortium. The American journal of clinical nutrition. 2011;94(4):1043-52. Epub 2011/08/26.
15. Schairer C, Lubin J, Troisi R, et al. Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2000;283(4):485-91. Epub 2000/02/05.
 16. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, et al. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast cancer research and treatment*. 2002;76(1):27-36. Epub 2002/11/01.
 17. Korach KS. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*. 1994;266(5190):1524-7. Epub 1994/12/02.
 18. Bocchinfuso WP, Korach KS. Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 1997;2(4):323-34. Epub 2000/08/10.
 19. Yoshidome K, Shibata MA, Couldrey C, et al. Estrogen promotes mammary tumor development in C3(1)/SV40 large T-antigen transgenic mice: paradoxical loss of estrogen receptor α expression during tumor progression. *Cancer research*. 2000;60(24):6901-10. Epub 2001/01/13.
 20. Miermont AM, Parrish AR, Furth PA. Role of ER α in the differential response of Stat5a loss in susceptibility to mammary preneoplasia and DMBA-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1124-31. Epub 2010/02/26.
 21. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989;56(3):335-44. Epub 1989/02/10.
 22. Green S, Walter P, Kumar V, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986;320(6058):134-9. Epub 1986/03/13.
 23. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5925-30. Epub 1996/06/11.
 24. Heldring N, Pike A, Andersson S, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews*. 2007;87(3):905-31. Epub 2007/07/07.
 25. Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(2):222-32. Epub 1997/04/01.
 26. Zhao C, Gao H, Liu Y, et al. Genome-wide mapping of estrogen receptor-beta-binding regions reveals extensive cross-talk with transcription factor activator protein-1. *Cancer research*. 2010;70(12):5174-83. Epub 2010/05/27.

27. Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*. 2005;122(1):33-43. Epub 2005/07/13.
28. Chen D, Ma H, Hong H, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science*. 1999;284(5423):2174-7. Epub 1999/06/26.
29. Webb P, Valentine C, Nguyen P, et al. ERbeta Binds N-CoR in the Presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus. *Nuclear receptor*. 2003;1(1):4. Epub 2003/08/09.
30. Murphy LC, Leygue E, Niu Y, et al. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *British journal of cancer*. 2002;87(12):1411-6. Epub 2002/11/28.
31. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19(4):833-42. Epub 2005/02/08.
32. Biswas DK, Singh S, Shi Q, et al. Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2005;2005(288):pe27. Epub 2005/06/16.
33. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids*. 2009;74(7):622-7. Epub 2008/11/11.
34. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;74(5):311-7. Epub 2001/02/13.
35. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer research*. 2008;68(3):826-33. Epub 2008/02/05.
36. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 1998;76(7):469-79. Epub 1998/07/11.
37. Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, et al. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;346(3):904-10. Epub 2006/06/20.
38. Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(26):27008-16. Epub 2004/04/20.

39. Roman-Blas JA, Castaneda S, Largo R, et al. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(5):241. Epub 2009/10/07.
40. Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein profile*. 1995;2(11):1173-308. Epub 1995/01/01.
41. Tora L, White J, Brou C, et al. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 1989;59(3):477-87. Epub 1989/11/03.
42. Leung YK, Mak P, Hassan S, et al. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(35):13162-7. Epub 2006/08/30.
43. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389(6652):753-8. Epub 1997/10/24 21:29.
44. Picard D, Kumar V, Chambon P, et al. Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell regulation*. 1990;1(3):291-9. Epub 1990/02/01.
45. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear receptor signaling*. 2008;6:e003. Epub 2008/02/28.
46. Kelley ST, Thackray VG. Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. *Journal of molecular evolution*. 1999;49(5):609-14. Epub 1999/11/07.
47. Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, et al. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO journal*. 1999;18(17):4608-18. Epub 1999/09/02.
48. Carroll JS, Meyer CA, Song J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature genetics*. 2006;38(11):1289-97. Epub 2006/10/03.
49. Dubik D, Shiu RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene*. 1992;7(8):1587-94. Epub 1992/08/01.
50. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, et al. Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells. *Cancer research*. 2009;69(15):6100-6. Epub 2009/07/16.
51. Liu Y, Gao H, Marstrand TT, et al. The genome landscape of ERalpha- and ERbeta-binding DNA regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(7):2604-9. Epub 2008/02/15.
52. Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*. 1998;339(22):1609-18. Epub 1998/11/26.

53. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *The New England journal of medicine*. 2003;348(7):618-29. Epub 2003/02/14.
54. Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, et al. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Current topics in medicinal chemistry*. 2006;6(3):181-202. Epub 2006/03/07.
55. McKenna NJ, O'Malley BW. Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;949:3-5. Epub 2002/01/25.
56. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*. 1997;11(6):657-66. Epub 1997/06/01.
57. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002;295(5564):2465-8. Epub 2002/03/30.
58. Desta Z, Ward BA, Soukhova NV, et al. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2004;310(3):1062-75. Epub 2004/05/26.
59. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-717. Epub 2005/05/17.
60. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*. *Lancet*. 1998;351(9114):1451-67. Epub 1998/05/30.
61. Higgins MJ, Davidson NE. What is the current status of ovarian suppression/ablation in women with premenopausal early-stage breast cancer? *Current oncology reports*. 2009;11(1):45-50. Epub 2008/12/17.
62. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2009;20(8):1319-29. Epub 2009/06/19.
63. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):643-58. Epub 2004/12/23.
64. Louie MC, Zou JX, Rabinovich A, et al. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(12):5157-71. Epub 2004/06/01.
65. Girault I, Lerebours F, Amarir S, et al. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal*

- of the American Association for Cancer Research. 2003;9(4):1259-66. Epub 2003/04/10.
66. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocrine reviews*. 2004;25(6):869-98. Epub 2004/12/08.
67. Masri S, Phung S, Wang X, et al. Genome-wide analysis of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant, and long-term estrogen-deprived cells reveals a role for estrogen receptor. *Cancer research*. 2008;68(12):4910-8. Epub 2008/06/19.
68. Sun M, Paciga JE, Feldman RI, et al. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer research*. 2001;61(16):5985-91. Epub 2001/08/17.
69. Miller TW, Balko JM, Fox EM, et al. ERalpha-dependent E2F transcription can mediate resistance to estrogen deprivation in human breast cancer. *Cancer discovery*. 2011;1(4):338-51. Epub 2011/11/04.
70. Ignatov A, Ignatov T, Weissenborn C, et al. G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2011;128(2):457-66. Epub 2011/05/25.
71. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, et al. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO journal*. 2009;28(5):523-32. Epub 2009/01/21.
72. Speirs V, Carder PJ, Lane S, et al. Oestrogen receptor beta: what it means for patients with breast cancer. *The lancet oncology*. 2004;5(3):174-81. Epub 2004/03/09.
73. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, et al. Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue. *Cancer research*. 1999;59(6):1175-9. Epub 1999/03/30.
74. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic acids research*. 1998;26(15):3505-12. Epub 1998/07/22.
75. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;247(1):75-8. Epub 1998/06/24.
76. Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2000;88(5):733-6. Epub 2000/11/10.

77. Lu B, Leygue E, Dotzlaw H, et al. Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Molecular and cellular endocrinology*. 1998;138(1-2):199-203. Epub 1998/07/31.
78. Chu S, Fuller PJ. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Molecular and cellular endocrinology*. 1997;132(1-2):195-9. Epub 1997/11/05.
79. Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, et al. Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol*. 1999;13(1):129-37. Epub 1999/01/19.
80. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, et al. Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer research*. 1998;58(2):210-4. Epub 1998/01/27.
81. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(8):597-608. Epub 2011/07/23.
82. Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2007;57(5):260-77. Epub 2007/09/15.
83. Lamartiniere CA. Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71(6 Suppl):1705S-7S; discussion 8S-9S. Epub 2000/06/06.
84. Rowell C, Carpenter DM, Lamartiniere CA. Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland. *The Journal of nutrition*. 2005;135(12 Suppl):2953S-9S. Epub 2005/12/01.
85. Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10(6):629-36. Epub 2010/10/19.
86. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139(10):4252-63. Epub 1998/09/29.
87. Vissac-Sabatier C, Coxam V, Dechelotte P, et al. Phytoestrogen-rich diets modulate expression of Brca1 and Brca2 tumor suppressor genes in mammary glands of female Wistar rats. *Cancer research*. 2003;63(20):6607-12. Epub 2003/10/30.
88. Bernard-Gallon DJ, Maurizis JC, Rio PG, et al. Influence of genistein and daidzein on Brca1 protein levels in human breast cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(11):862-3. Epub 1998/06/13.
89. Fan S, Meng Q, Auburn K, et al. BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer cells. *British journal of cancer*. 2006;94(3):407-26. Epub 2006/01/26.

90. Honma N, Horii R, Iwase T, et al. Clinical importance of estrogen receptor-beta evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(22):3727-34. Epub 2008/08/02.
91. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, et al. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(22):7490-9. Epub 2004/12/01.
92. Gruvberger-Saal SK, Bendahl PO, Saal LH, et al. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(7):1987-94. Epub 2007/04/04.
93. Novelli F, Milella M, Melucci E, et al. A divergent role for estrogen receptor-beta in node-positive and node-negative breast cancer classified according to molecular subtypes: an observational prospective study. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(5):R74. Epub 2008/09/06.
94. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, et al. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer research*. 1998;58(15):3197-201. Epub 1998/08/12.
95. Roger P, Sahla ME, Makela S, et al. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer research*. 2001;61(6):2537-41. Epub 2001/04/06.
96. Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(5):523-8. Epub 2004/04/29.
97. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, et al. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer research*. 2004;64(1):423-8. Epub 2004/01/20.
98. Hodges-Gallagher L, Valentine CD, El Bader S, et al. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2008;109(2):241-50. Epub 2007/07/20.
99. Paruthiyil S, Cvorovic A, Tagliaferri M, et al. Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2. *Breast cancer research and treatment*. 2011;129(3):777-84. Epub 2010/12/02.
100. Lindberg K, Strom A, Lock JG, et al. Expression of estrogen receptor beta increases integrin alpha1 and integrin beta1 levels and enhances adhesion of breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 2010;222(1):156-67. Epub 2009/09/26.

101. Rody A, Holtrich U, Solbach C, et al. Methylation of estrogen receptor beta promoter correlates with loss of ER-beta expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(4):903-16. Epub 2005/12/03.
102. Sotoca AM, Ratman D, van der Saag P, et al. Phytoestrogen-mediated inhibition of proliferation of the human T47D breast cancer cells depends on the ERalpha/ERbeta ratio. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2008;112(4-5):171-8. Epub 2008/10/29.
103. Sotoca AM, van den Berg H, Vervoort J, et al. Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2008;105(2):303-11. Epub 2008/07/23.
104. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, et al. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008;27(7):1019-32. Epub 2007/08/19.
105. Privat M, Aubel C, Arnould S, et al. Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;379(3):785-9. Epub 2009/01/08.
106. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, et al. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Mol Endocrinol*. 2006;20(3):534-43. Epub 2005/11/19.
107. Mai Z, Blackburn GL, Zhou JR. Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. 2007;46(7):534-42. Epub 2007/02/14.
108. Park BW, Kim KS, Heo MK, et al. The changes of estrogen receptor-beta variants expression in breast carcinogenesis: Decrease of estrogen receptor-beta2 expression is the key event in breast cancer development. *Journal of surgical oncology*. 2006;93(6):504-10. Epub 2006/04/15.
109. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(16):5228-35. Epub 2008/08/14.
110. Yamaguchi Y, Takei H, Suemasu K, et al. Tumor-stromal interaction through the estrogen-signaling pathway in human breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(11):4653-62. Epub 2005/06/03.
111. Zang C, Liu H, Posch MG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce growth inhibition and apoptosis of human B lymphocytic leukemia. *Leukemia research*. 2004;28(4):387-97. Epub 2004/04/28.

112. Elstner E, Williamson EA, Zang C, et al. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*. 2002;74(2):155-65. Epub 2002/08/21.
113. Cappelletti V, Miodini P, Di Fronzo G, et al. Modulation of estrogen receptor-beta isoforms by phytoestrogens in breast cancer cells. *International journal of oncology*. 2006;28(5):1185-91. Epub 2006/04/06.
114. Chrzan BG, Bradford PG. Phytoestrogens activate estrogen receptor beta1 and estrogenic responses in human breast and bone cancer cell lines. *Molecular nutrition & food research*. 2007;51(2):171-7. Epub 2007/02/03.
115. Kilker RL, Hartl MW, Rutherford TM, et al. Cyclin D1 expression is dependent on estrogen receptor function in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2004;92(1-2):63-71. Epub 2004/11/17.
116. Howell A, DeFriend D, Robertson J, et al. Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet*. 1995;345(8941):29-30. Epub 1995/01/07.
117. Levy N, Paruthiyil S, Zhao X, et al. Unliganded estrogen receptor-beta regulation of genes is inhibited by tamoxifen. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;315(1-2):201-7. Epub 2009/09/12.
118. Cui Y, Parra I, Zhang M, et al. Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer research*. 2006;66(11):5950-9. Epub 2006/06/03.
119. Zhao C, Matthews J, Tujague M, et al. Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer research*. 2007;67(8):3955-62. Epub 2007/04/19.
120. Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, et al. Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;323(2):268-76. Epub 2010/03/23.
121. Zhang X, Ding L, Kang L, et al. Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PloS one*. 2012;7(1):e30174. Epub 2012/01/26.

Danksagung

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch ein Promotionsstipendium der Berliner Krebsgesellschaft e.V. sowie durch die Universitäre Forschungsförderung der Charité Universitätsmedizin, Berlin.

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Kurt Possinger für die freundliche Überlassung des Themas und das Vertrauen in meine Arbeit.

An nächster Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Dr. Elena Elstner bedanken, ohne die dieses Projekt nicht hätte realisiert werden können. Als Leiterin der Forschungsgruppe *Liganden der Nukleohormonrezeptoren und Krebs* setzte sie sich nicht nur unermüdlich für gute Arbeitsbedingungen ein - ich konnte auch zu jeder Zeit auf ihren vertrauensvollen Rat zählen. Es war eine wichtige und wertvolle Erfahrung für mich, von ihr in die Forschung eingeführt worden zu sein.

Genauso möchte ich Herrn Dr. Chuanbing Zang meinen großen Dank für die Weitergabe seiner ausgezeichneten zell- und molekularbiologischen Expertise aussprechen. Als Betreuer dieses Themas führte er mich in die methodische Grundlagen ein. Dabei stand mir seine Tür selbst in den arbeitsreichsten Zeiten in allen Belangen stets offen.

Des Weiteren geht mein Dank an Frau Dr. Hongyu Liu, deren Fachkenntnis auf dem Gebiet der Mammakarzinom-Forschung mir eine große Hilfe war und die mir in freundlicher Weise immer wieder mit Rat zur Seite stand.

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. Maren Mieth aussprechen. Beginnend mit dem ersten Tag meiner Forschungstätigkeit war sie immer bereit, mich zu unterstützen. Die Zusammenarbeit war mir eine große Freude.

Auch Frau Dr. Britta Lamottke möchte ich herzlich danken. Neben ihren freundlichen Ratschlägen fand ich dank ihrer Anwesenheit eine wirklich freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre vor.

Herrn Dr. Andreas Hocke möchte in besonderer Weise für sein herzliches Entgegenkommen sowie für die Überlassung von Materialien und Geräten seiner Forschungsgruppe danken.

Frau Dr. Yoko Omoto vom Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden, spreche ich meinen Dank für die freundliche Überlassung der ER β 2-, ER β 5- und Leer-Expressionsvektoren aus.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Christiane Feldmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der Einfluss der Oestrogenrezeptor- β -Isoformen, ER β 2 und ER β 5, auf die Proliferation und Tamoxifensensitivität des Mammakarzinoms, *in vitro*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Christiane Feldmann

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen und Auszeichnungen

Vorträge

1. ERβ2 and ERβ5 inhibit proliferation and promote Tamoxifen-sensitivity in breast cancer cells

Feldmann, C., Liu, H., Kratz, A., Mieth, M., Eucker, J., Possinger, K., Elstner, E., Zang, C.

DGHO-Jahrestagung 2011, Basel, Schweiz

2. Enhancement of TRAIL-induced growth inhibition and apoptosis in human SKBR3 breast cancer cells by retinoids.

Kratz, A.; Liu, H.; Feldmann, C.; Mieth, M.; Eucker, J.; Possinger, K.; Elstner, E.; Zang, C.

DGHO-Jahrestagung 2010, Berlin

Auszeichnungen

1. Young Investigator's Award 2011

Im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie für den Beitrag „ERβ2 und ERβ5 hemmen die Proliferation und verstärken die Sensitivität gegenüber Tamoxifen in Brustkrebszellen.“

2. Promotionsstipendium

Verliehen durch die Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Einzureichende Publikation

ERβ2 and ERβ5 inhibit proliferation and promote sensitivity to Tamoxifen in MCF7 breast cancer cells

Christiane Feldmann, Hongyu Liu, Kurt Possinger, Elena Elstner and Chuanbing Zang.