

### D.3 Wirkungsmechanismus reiner Antiestrogene in Endometriumkarzinomzellen

Nachdem eine Wachstumshemmung endometrialer Adenokarzinome *in vitro* und *in vivo* durch die Behandlung mit reinen AE beobachtet worden war, wurde der dafür zugrunde liegende Wirkungsmechanismus untersucht.

#### D.3.1 Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Antiestrogene in den endometrialen Tumoren aus den *in vivo*-Versuchen

Die Tumore der Zelllinien ECC-1, Ishikawa und MFE-280 aus den Versuchen zur Wachstumshemmung durch Behandlung mit reinen AE wurden histologisch auf apoptotische Zellen hin untersucht. Neben Faltung und Blasenbildung der Zellmembran ist Apoptose gekennzeichnet durch nukleäre Desintegration. Die DNA wird durch Proteasen, die im Rahmen des programmierten Zelltods translatiert werden, in Oligonukleotid-Fragmente mit freien 3`OH-Enden gespalten (Compton 1992). Diese freien 3`OH-Enden ermöglichen die Anlagerung von Substanzen, durch die die DNA-Fragmente und damit die apoptotischen Zellen sichtbar gemacht werden. Die Tumore des ECC-1-Endometriumkarzinommodells zeigten in allen Gruppen mit 2-6 apoptotischen Zellen/1000 Tumorzellen eine ähnliche Apoptoserate. Ishikawa- und MFE-280-Tumore der ovariectomierten und mit ZK 191703 behandelten Mäuse wiesen histologisch ungefähr 25 apoptotische Zellen/1000 Tumorzellen auf. In den mit E<sub>2</sub> und ICI 182,780 behandelten Tumoren wurden 6-13 apoptotische Zellen/1000 Tumorzellen nachgewiesen (Tab.5, S.73).

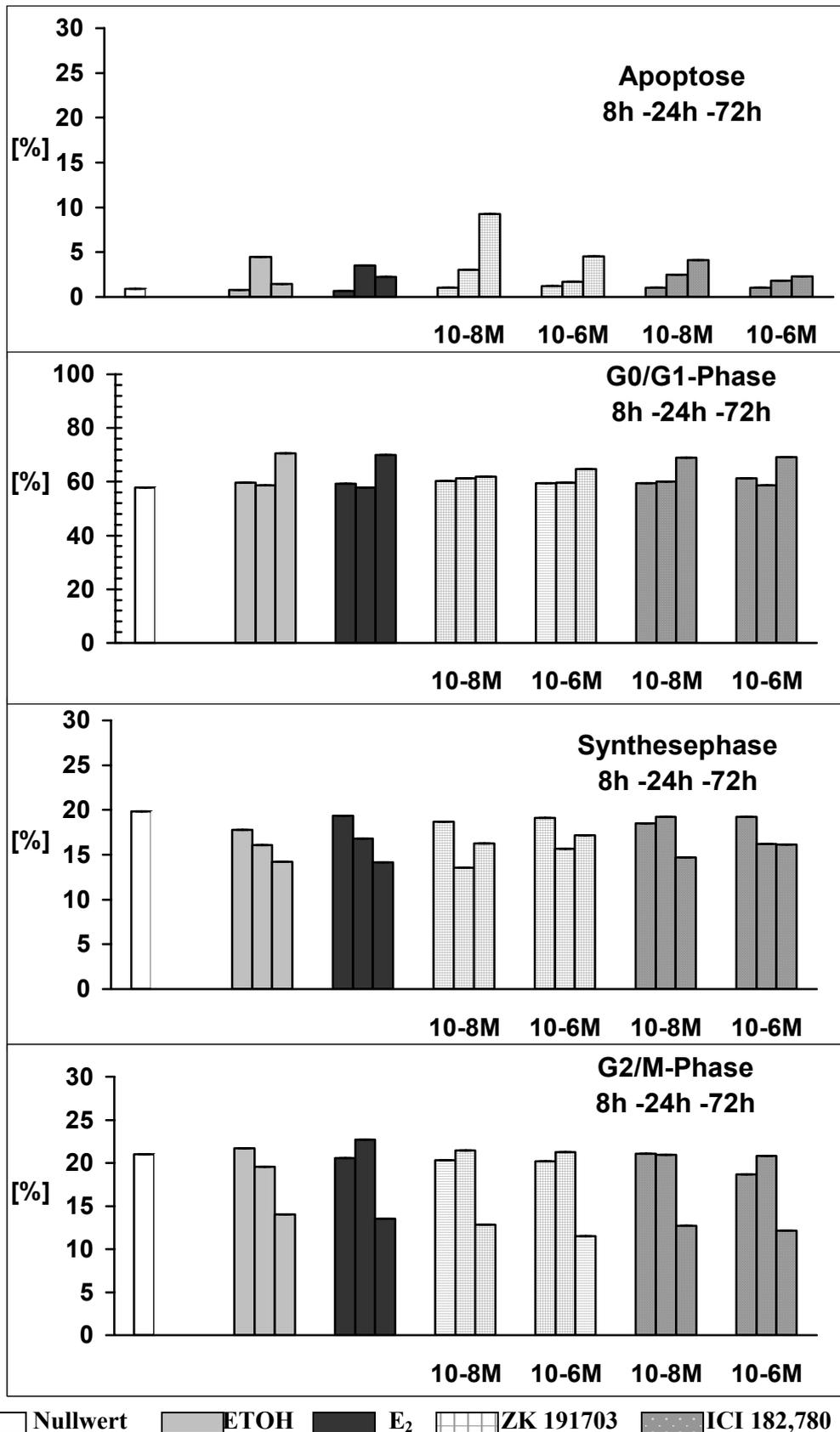
**Tab.5 Apoptotische Zellen/1000 Tumorzellen in histologischen Tumorschnitten aus den Zelllinien ECC-1, Ishikawa und MFE-280 einzelner Versuchsgruppen**

	<b>ECC-1, n=8</b> Median (25-75%Quantil)	<b>Ishikawa, n=7</b> Median (25-75%Quantil)	<b>MFE-280, n=10</b> Median (25-75%Quantil)
<b>Ovarektomie</b>	<b>2 (1-3)</b>	<b>29 (24-47)</b>	<b>26 (17-33)</b>
<b>E<sub>2</sub>-Kontrolle</b>	<b>3 (2-3)</b>	<b>13 (9-15)</b>	<b>9 (8-13)</b>
<b>ZK 191703</b> <b>30mg/kgKG p.o.tägl.</b>	<b>4 (3-5)</b>	-----	<b>22 (19-26)</b>
<b>ZK 191703</b> <b>10mg/kgKG s.c.tägl.</b>	-----	<b>19 (13-20)</b>	-----
<b>ICI 182,780</b> <b>250mg/kgKGs.c./28T</b>	<b>2 (2-3)</b>	-----	<b>13 (10-16)</b>
<b>ICI 182,780</b> <b>3mg/kgKG s.c.tägl.</b>	-----	<b>6 (5-7)</b>	-----
<b>Tamoxifen</b> <b>10mg/kgKG p.o.tägl.</b>	<b>6 (3-7)</b>	-----	-----

### D.3.2 Untersuchung des Zellzyklusses in endometrialen Adenokarzinomzellen nach Stimulation mit reinen Antiöstrogenen

Die für das Tumorstadium notwendige Zellteilung erfolgt in zyklischen Phasen. Die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zyklusphasen gibt Auskunft über den zellulären Wachstumszustand. Während viele Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zu einem bestimmten Zeitpunkt Hinweis für eine geringe Zellteilungsrate und damit wenig Wachstum sind, zeigen viele in der Synthese(S)- oder Mitose(M)phase befindliche Zellen ein verstärktes Zellwachstum an. Die Zyklusphasen-Anteile wurden in der *in vitro*-Durchflußzytometrie von Ishikawa- und ECC-1-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit den reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen der IC<sub>50</sub> (Ishikawa: 10<sup>-8</sup> M und ECC-1: 10<sup>-9</sup> M) sowie bei 10<sup>-6</sup> M behandelt und nach 8, 24 und 72 Stunden fixiert. Die wenig durch AE in ihrer Proliferation inhibierbaren Ishikawazellen zeigten in den behandelten Gruppen eine ähnliche, prozentuale Verteilung der Zellen in den Zyklusphasen wie die unbehandelten und E<sub>2</sub>-stimulierten Zellen. Mit der Erhöhung des Zellanteils in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase von ca. 60% (8h) auf ca. 70% (72h) ging eine

Reduktion der in der S- und G2/M-Phase befindlichen Zellen von je 20% (8h) auf ca. 15% (72h) einher. Als Bezugspunkt diente die Zellzyklusverteilung von Zellen zum Zeitpunkt Null mit 60% Zellen in G0/G1 und je 18% in S-, G2/M-Phase. Eine Behandlung mit  $10^{-8}$  M ZK 191703 erhöhte den Anteil apoptotischer Zellen von 1% auf 10% nach einer 72h-stündigen Inkubationszeit (Abb.28, S.75). Mit  $10^{-9}$  M ZK 191703 und ICI 182,780 behandelte ECC-1-Zellen zeigten eine den estrogenstimulierten Zellen vergleichbare, periodische Verschiebung der Zellanteile auf die Zyklusphasen innerhalb der drei Zeitpunkte. Nach acht Stunden war ein hoher Zellanteil in der G0/G1-Phase bei gleichzeitig reduziertem Zellanteil in der S- und G2/M-Phase zu beobachten. Nach 24 Stunden waren weniger Zellen in der G0/G1-Phase vorhanden und mehr Zellen in den beiden folgenden Phasen. Nach 72 Stunden war wiederum eine prozentuale Erhöhung des Zellanteils in der G0/G1-Phase zu beobachten. Im Gegensatz dazu war bei  $10^{-6}$  M die Zellzahl prozentual in der G0/G1-Phase für beide AE ZK 191703 und ICI 182,780 von 65% (0h) auf 85% (24 und 72h) gestiegen. Der prozentuale Zellanteil in der S- und G2/M-Phase war von je 10-15% (0h) auf ca. 5-8% (72h) gesunken. Im Vergleich dazu war der Anteil in der G0/G1-Phase an unstimulierten Zellen nach 72 Stunden mit 80% geringer wie auch mit 60% der Anteil estrogenstimulierter Zellen in der G0/G1-Phase. Die Inkubation der ECC-1-Zellen mit den beiden reinen AE bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M in Abwesenheit von  $E_2$  führte nach 24 und 72 Stunden zu einem auf 90% ansteigenden Zellanteil in der G0/G1-Phase verglichen mit dem Anteil von 77% in der G0/G1-Phase bei unbehandelten Zellen (Abb.29, S.76). In einem weiteren ECC-1-Zellversuch wurde nach einer sieben-tägigen Inkubationszeit mit  $10^{-9}$  M ZK 191703 ein hoher Anteil apoptotischer Zellen beobachtet (8%). Die mit  $E_2$ , ICI 182,780 und  $10^{-8}$  M ZK 191703 inkubierten Zellen waren zu diesem Zeitpunkt zu einem Anteil von 3-4% in Apoptose. Weitere Veränderungen in den anderen Zyklusphasen waren nach sieben Tagen im Vergleich zu einer Inkubation über 72 Stunden nicht festzustellen (Abb.30, S.77).



**Abb.28 Zellzyklusanalyse in Ishikawazellen**

Ishikawazellen wurden mit ZK 191703 und ICI 182,780 ( $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M) in Anwesenheit von Estradiol ( $10^{-10}$  M) inkubiert und zu den Meßzeitpunkten 8, 24 und 72 Stunden fixiert, n= 3.

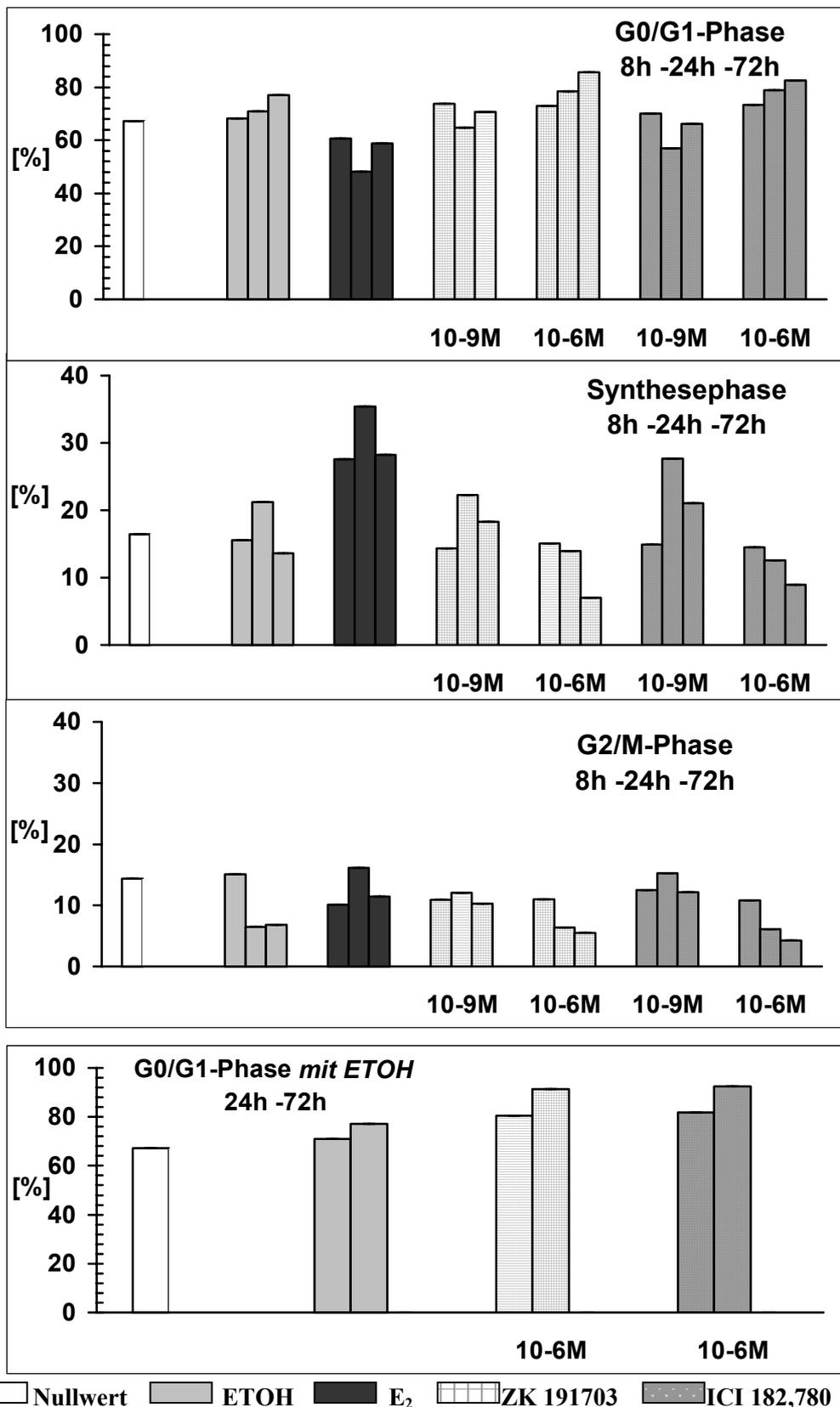
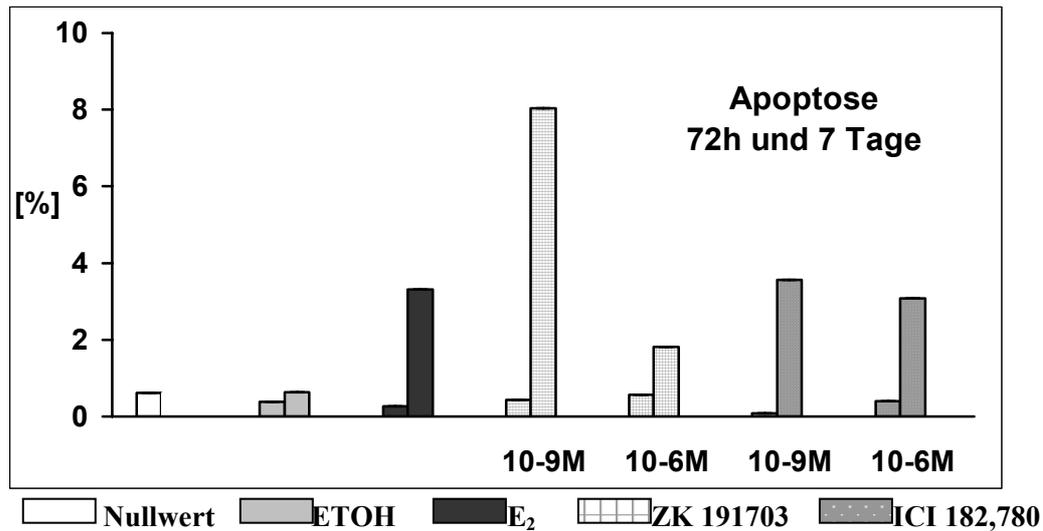


Abb.29 Zellzyklusanalyse in ECC-1-Zellen

ECC-1-Zellen wurden mit ZK 191703 und ICI 182,780 ( $10^{-9}$  M und  $10^{-6}$  M) in Anwesenheit von Estradiol ( $10^{-10}$  M) inkubiert und zu den Meßzeitpunkten 8, 24 und 72 Stunden (OBEN) sowie in Abwesenheit von Estradiol zu den Meßzeitpunkten 24 und 72 Stunden (UNTEN) fixiert, n=3.



**Abb.30 Apoptosephase der Zellzyklusanalyse in ECC-1-Zellen**

ECC-1-Zellen wurden mit ZK 191703 und ICI 182,780 in Anwesenheit von Estradiol ( $10^{-10}$ M) inkubiert und zu den Meßzeitpunkten 72 Stunden und 7 Tagen fixiert, n=3.

### D.3.3 Bestimmung der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin D1 und p21 in den ER-positiven endometrialen Adenokarzinomzellen

In Westernblotanalysen wurden die regulatorisch auf den Zellzyklus wirkenden Proteine Cyclin D1 und p21 bestimmt. Ein möglicher Einfluß reiner AE auf die Expression dieser Proteine in den Zellen sollte untersucht werden. Deshalb wurden ECC-1-Zellen mit ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen von  $10^{-9}$  M und  $10^{-6}$  M in Anwesenheit von  $E_2$  für 8, 24 und 72 Stunden und in Abwesenheit von  $E_2$  für 24 und 72 Stunden inkubiert. Drei unabhängig voneinander durchgeführte Westernblotanalysen ergaben im Bereich 36kD für Cyclin D1 und im Bereich 21kD für p21 keine detektierbaren Banden.

#### D.4 Wirkung reiner Antiöstrogene auf die Expression von Östrogen-, Progesteron- und epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in endometrialen Adenokarzinomzellen

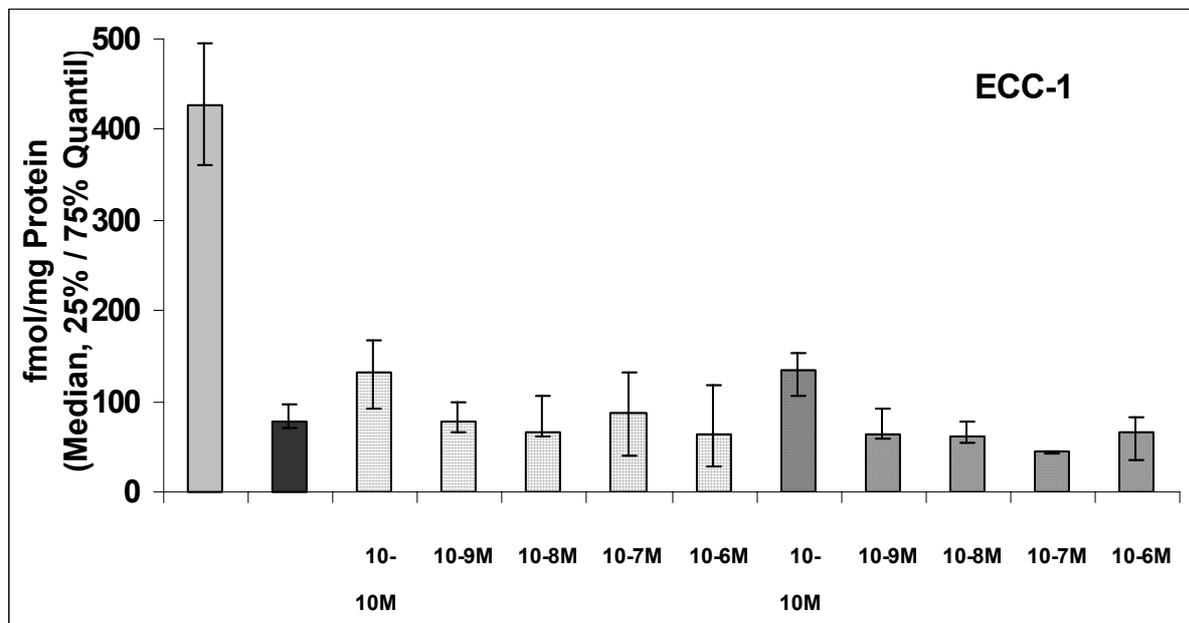
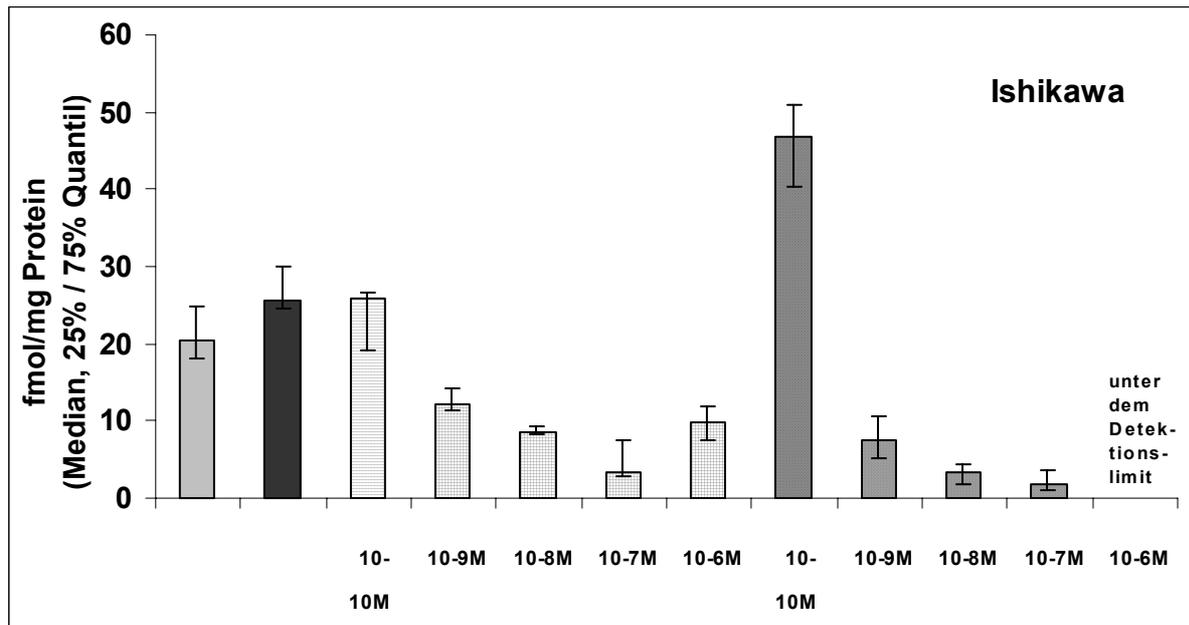
Die Expression von ER, PgR und EGFR in den Zelllinien ECC-1, Ishikawa, MFE-296, MFE-280, MFE-319 und KLE wurde zunächst *in vitro* unter Standardbedingungen untersucht. Die Zelllinie ECC-1 exprimiert 187 fmol ER/mg Protein. Die Expression von ER in Ishikawazellen war mit 24 fmol/mg Protein fast 8-fach geringer. MFE-296, MFE-280, MFE-319 und KLE exprimierten keine mit dem ER-EIA detektierbaren ER. PgR wurden in der Zelllinie ECC-1 in einer Menge von 235 fmol/mg Protein detektiert. Ishikawazellen exprimierten dagegen nur 35 fmol PgR/mg Protein, während in allen ER-negativen Zelllinien ungefähr 20 fmol PgR/mg Protein bestimmt wurden. Die Expression von EGFR war in ECC-1 Zellen mit 26 fmol/mg Protein im Vergleich zu Ishikawazellen mit 518 fmol/mg Protein sehr gering. Die meisten EGFR wurden in der Zelllinie MFE-319 mit 1629 fmol/mg Protein nachgewiesen. Während die Zelllinie MFE-296 keine mit dem EGFR-EIA detektierbaren Rezeptoren exprimiert, wurde in KLE-Zellen eine Expression von 146 fmol EGFR/mg Protein und in MFE-280-Zellen eine Expression von 59 fmol/mg Protein beobachtet (Tab.6).

**Tab.6 *In vitro*-Expression der Östrogen(ER)-, Progesteron(PgR)- und Epidermalen Wachstumsfaktor(EGFR)-Rezeptoren in humanen, endometrialen Adenokarzinomzelllinien unter Standardbedingungen (Median)**

	<b>ECC-1</b>	<b>Ishikawa</b>	<b>MFE-296</b>	<b>MFE-280</b>	<b>MFE-319</b>	<b>KLE</b>
<b>ER</b> [fmol/mg Protein]	187 n= 12	24 n= 14	unter dem Detektions- limit n= 8	unter dem Detektions- limit n= 9	unter dem Detektions- limit n= 9	unter dem Detektions- limit n= 9
<b>PgR</b> [fmol/mg Protein]	235 n= 14	35 n= 18	24 n= 15	19 n= 15	21 n= 14	20 n= 15
<b>EGFR</b> [fmol/mg Protein]	26 n= 6	518 n= 6	unter dem Detektions- limit n= 6	59 n= 6	1629 n= 6	146 n= 6

#### D.4.1 Nachweis der Estrogenrezeptor-Destabilisierung durch Antiestrogene in den endometrialen Adenokarzinomen der ER-positiven Zelllinien Ishikawa und ECC-1

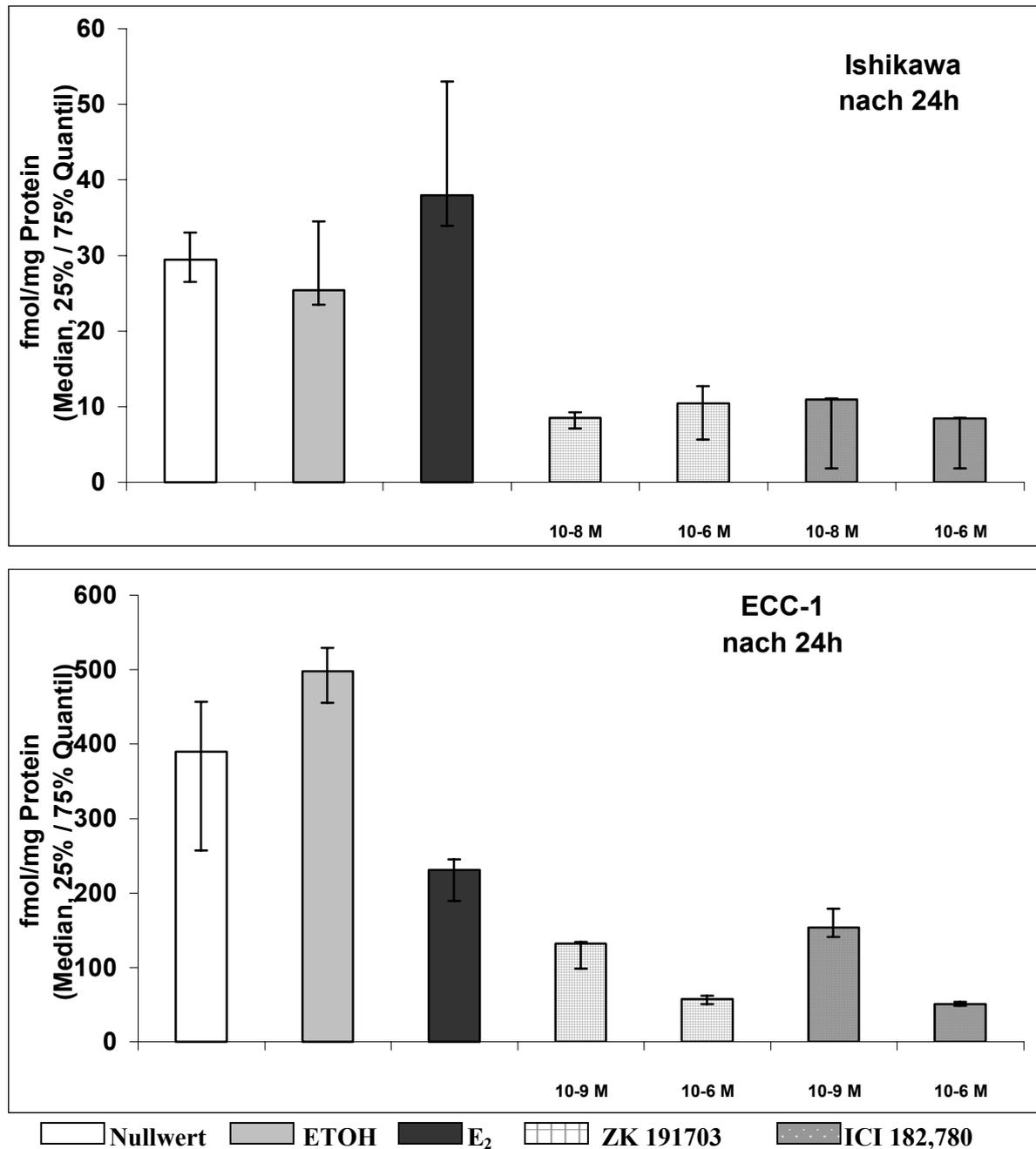
Nach dreitägiger Estrogenablation wurden Ishikawazellen fünf und ECC-1-Zellen sieben Tage lang mit ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen von  $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M  $E_2$  inkubiert. In beiden Zelllinien war die ER-Expression durch Inkubation mit den reinen, steroidal AE verringert. Diese geringere ER-Expression war in Ishikawazellen deutlich von der Konzentration des AE abhängig. Die Menge an detektierbaren Rezeptoren verringerte sich in diesen Zellen von 30 fmol ER/mg Protein bei  $10^{-10}$  M ZK191703 auf ungefähr 10 fmol ER/mg Protein bei  $10^{-6}$  M. Bei Inkubation mit  $10^{-10}$  M ICI 182,780 waren in den Zellen mit 50 fmol ER/mg Protein signifikant mehr ER exprimiert als bei Inkubation mit höheren ICI 182,780-Konzentrationen. In ECC-1-Zellen waren die ER durch  $10^{-10}$  M ZK 191703 oder ICI 182,780 von 135 fmol ER/mg Protein auf 60-80 fmol ER/mg Protein bei  $10^{-6}$  M ZK 191703 oder ICI 182,780 verringert. Ein Vergleich der ER-Expression zwischen unstimulierter (ETOH)- und estrogenstimulierter ( $E_2$ )-Kontrolle ergab für die beiden Zelllinien unterschiedliche Resultate. Ishikawazellen exprimierten in der  $E_2$ -Kontrolle mit 28 fmol ER/mg Protein mehr ER als in der ETOH-Kontrolle mit 20 fmol/mg Protein. Dagegen wurden in ECC-1-Zellen in der  $E_2$ -Kontrolle signifikant weniger ER detektiert (80 fmol ER/mg Protein) als in der ETOH-Kontrolle (430 fmol ER/mg Protein) (Abb.31, S.80). In weiteren Versuchen wurde die ER-Expression nach 24 Stunden untersucht. Ishikawa- und ECC-1-Zellen wurden mit den reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen der  $IC_{50}$  (Ishikawa:  $10^{-8}$  M und ECC-1:  $10^{-9}$  M) sowie bei  $10^{-6}$  M in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M  $E_2$  inkubiert. Die Expression der Rezeptoren in beiden Zelllinien war nach 24-stündiger Behandlung mit  $10^{-6}$  M bei beiden AE auf 10 fmol ER/mg Protein (Ishikawa) und auf 60-80 fmol ER/mg Protein (ECC-1) vermindert. Somit wurde nach einem Tag eine ähnlich verminderte ER-Expression erreicht wie nach fünf bzw. sieben Tagen. In Ishikawazellen war diese ER-Expression nach AE-Behandlung im Vergleich zur ER-Expression in der  $E_2$ -Kontrolle statistisch signifikant verringert. Die ER-Expression in den unstimulierten und estrogenstimulierten Zellen war nach 24 Stunden in den beiden Zelllinien wiederum unterschiedlich. Mit  $E_2$  inkubierte Ishikawazellen exprimierten mit 40 fmol ER/mg Protein mehr Rezeptoren als unstimulierte Zellen mit 25 fmol ER/mg Protein. Im Gegensatz dazu exprimierten ECC-1-Zellen unter  $E_2$ -Stimulation weniger ER (230 fmol ER/mg Protein) als ohne Estrogenstimulierung (500 fmol ER/mg Protein) (Abb.32, S.81).



ETOH    
  E<sub>2</sub>    
  ZK 191703    
  ICI 182,780

**Abb.31 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawa- und ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M Estradiol**

Die Zellen wurden fünf (Ishikawa) und sieben (ECC-1) Tage lang mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem ER-Enzymimmunoassay, n= 6, p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).

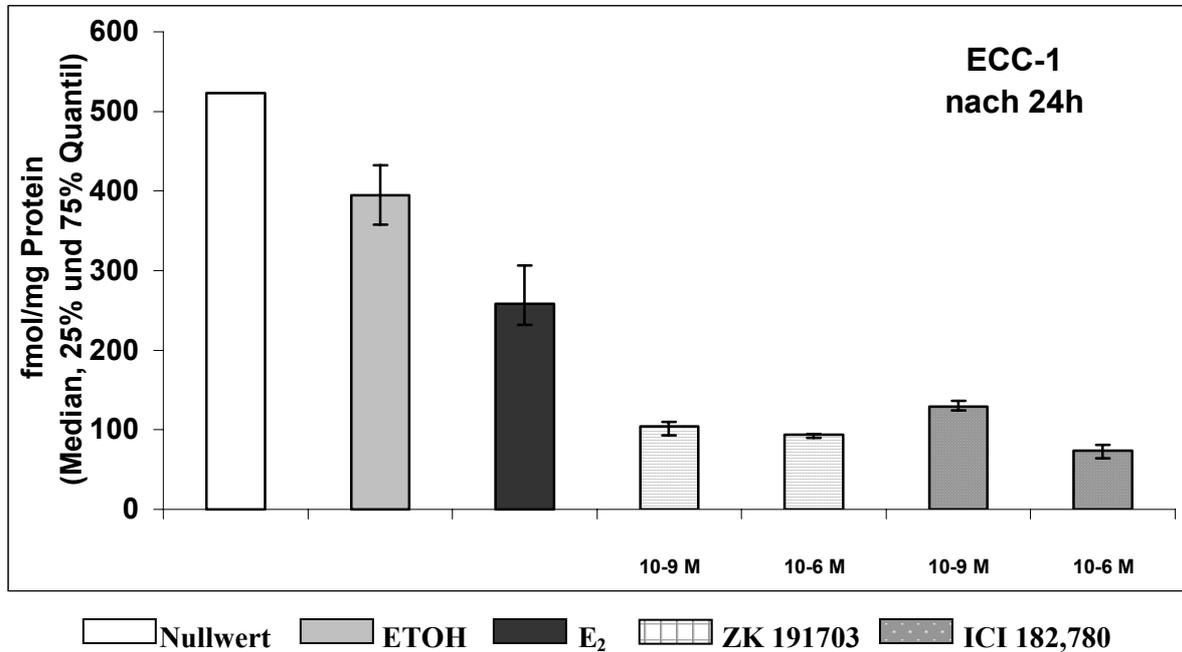


**Abb.32 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawa- und ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M Estradiol**

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem ER-Enzymimmunoassay, n= 6, p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).

In ECC-1-Zellen war die ER-Expression bei Inkubation mit E<sub>2</sub> so verringert, dass die rezeptordestabilisierende Wirkung reiner AE in Anwesenheit von E<sub>2</sub> nicht sicher beobachtet werden konnte. Zur Trennung der estrogeninduzierten Rezeptorunterregulation von der AE-induzierten Rezeptordestabilisierung wurde ein weiterer Versuch mit ECC-1-Zellen in Abwesenheit von E<sub>2</sub> durchgeführt. Die Zellen wurden mit ZK 191703 und ICI 182,780 in den Kon-

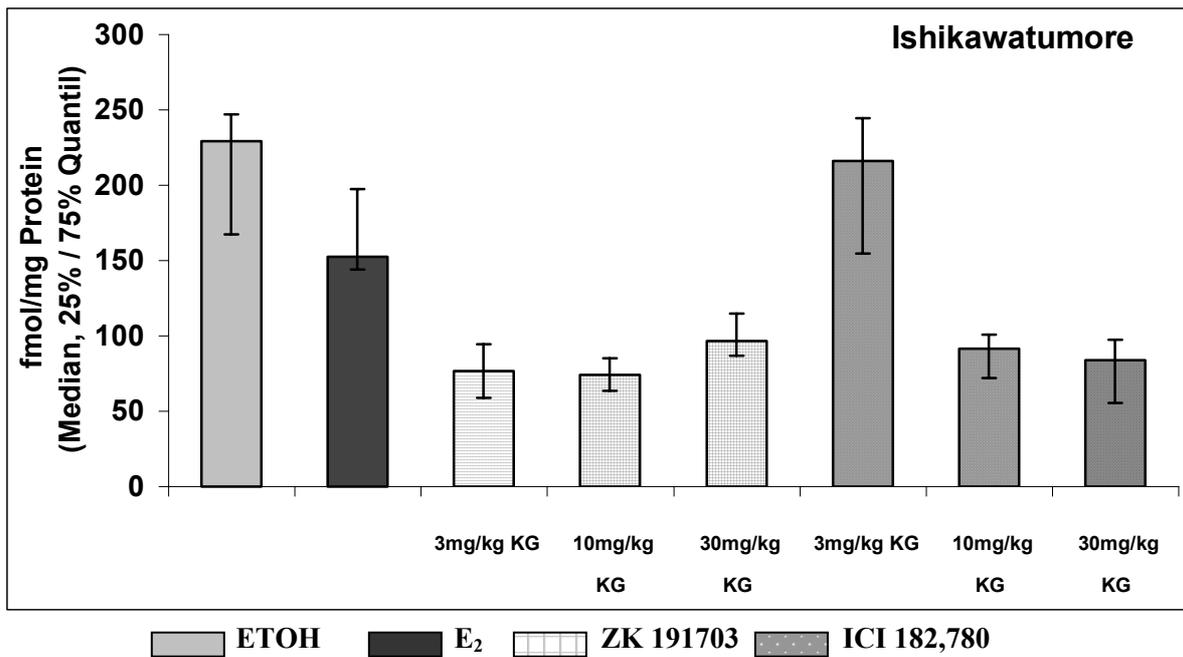
zentrationen der  $IC_{50}$  bei  $10^{-9}$  M sowie bei  $10^{-6}$  M für 24 Stunden inkubiert. Für beide reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 wurden in den ECC-1-Zellen in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M und  $10^{-6}$  M ungefähr 100 fmol ER/mg Protein detektiert. In der vergleichbaren ETOH-Kontrolle exprimierten die ECC-1-Zellen 400 fmol ER/mg Protein (Abb.33).



**Abb.33 Expression der Estrogenrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen ohne Estradiol**

Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem ER-Enzymimmunoassay, n= 3.

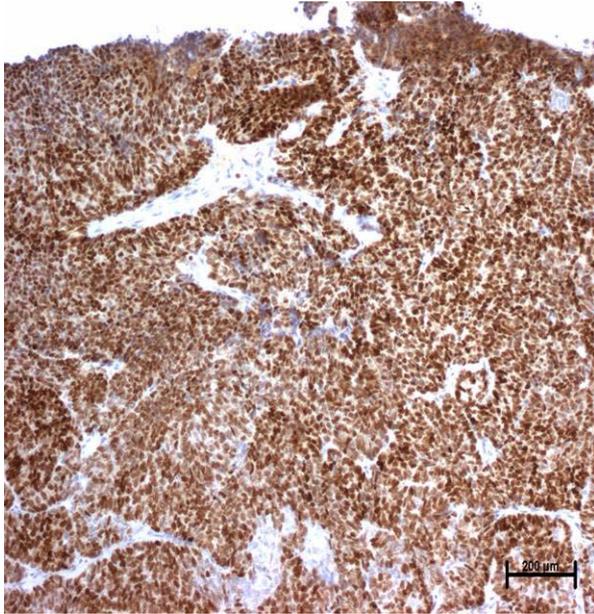
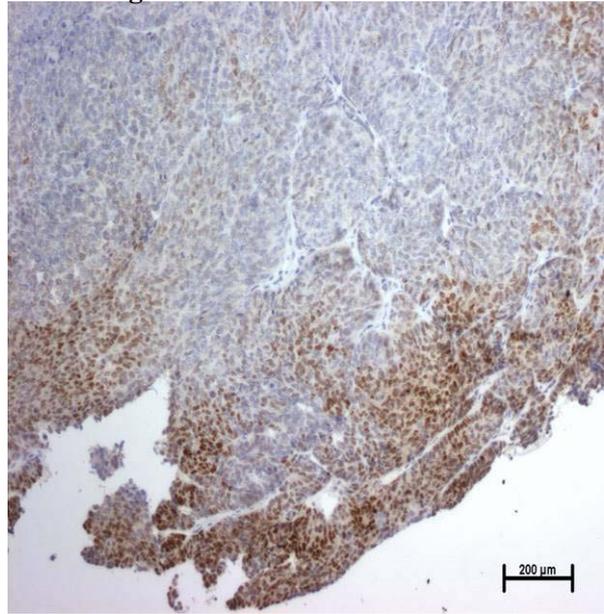
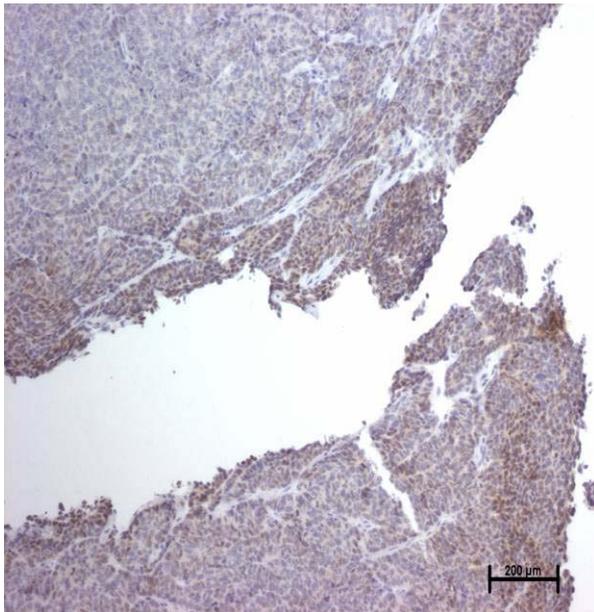
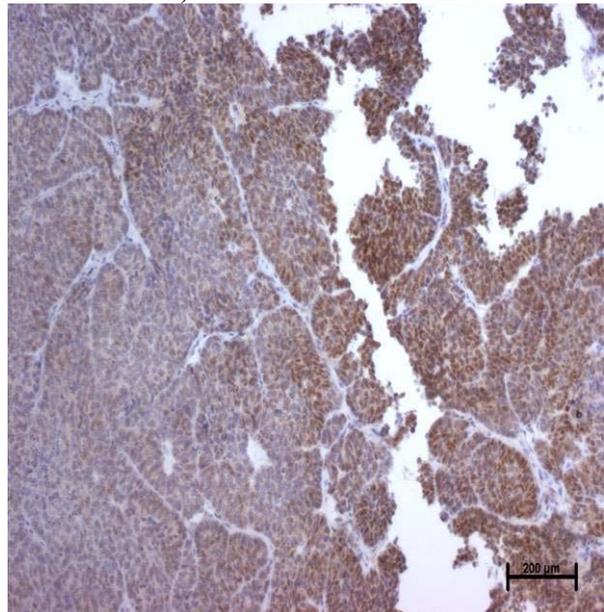
In einem Tierversuch am Ishikawamodell wurden die reinen, steroidalen AE ZK 191703 und ICI 182,780 täglich subkutan in einer Dosierung von 3 mg, 10 mg und 30 mg/kg KG appliziert (siehe Abb.23, S.66). Es wurde ebenfalls eine verringerte ER-Expression im Tumor in Abhängigkeit von der Dosierung des verabreichten AE beobachtet. Diese Dosisabhängigkeit war bei ICI 182,780 deutlicher. Bei 3mg/kg KG ICI 182,780 wurden 230 fmol ER/mg Protein und bei 10mg und 30mg/kg KG ICI 182,780 wurden 80-90 fmol ER/mg Protein exprimiert. Nach Behandlung mit ZK 191703 wurden in den Tumoren für alle Dosierungen 80-90 fmol ER/mg Protein detektiert. Die hohe ER-Expression in mit ICI 182,780 (3mg) behandelten Tumoren war statistisch signifikant von der geringen ER-Expression in mit ZK 191703 (3 mg und 10 mg) und mit ICI 182,780 (30 mg) behandelten Tumoren zu unterscheiden. Unter Estrogenstimulation wurden in den Ishikawatumoren weniger ER exprimiert (150 fmol ER/mg Protein) als in den hormonell unbehandelten Tumoren (230 fmol ER/mg Protein) (Abb.34, S.83).



**Abb.34 Expression der Estrogenrezeptoren in Ishikawatumoren**

Mit E<sub>2</sub>-Pellets (0,36mg/Pellet) supplementierte SCID Mäuse wurden nach subkutaner Ishikawazelltransplantation mit den reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 verschiedener Konzentrationen täglich subkutan behandelt. Die Rezeptorbestimmung erfolgte in den exstirpierten Tumoren im ER-Enzymimmunoassay, n= 7, p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).

Zur Bestätigung der proteinbiochemisch beobachteten ER-Destabilisierung nach AE-Behandlung wurde die Expression von ER $\alpha$  immunhistologisch an Paraffinschnitten von Ishikawatumoren untersucht. Es wurden die Tumore der Zelllinie Ishikawa aus dem Versuch zur Tumorstillung bei täglicher, subkutaner AE-Applikation untersucht (siehe Abb.23, S.66). Der Primärantikörper entstammt dem Klon 1D5 (Maus, monoklonal) und bindet an den N-Terminus des ER (Jazaeri et al. 1999). Es wurden vergleichbare Ergebnisse wie mit der proteinbiochemischen Methode erzielt. In den insgesamt heterogenen Tumoren war eine ER-Färbung epithelialer Tumorzellkerne in der Ovariectomiegruppe (I) wesentlich häufiger und intensiver als in der E<sub>2</sub>-Kontrolle (II) zu beobachten. ER-positive Zellkerne in den AE-behandelten Gruppen waren im Vergleich zu diesen Kontrollen in deutlich geringerer Anzahl vorhanden. Bei einem Vergleich der ER-Färbung in den Tumorschnitten der ICI 182,780-behandelten Tumore (IV) mit den ZK 191703-behandelten Tumoren waren in den mit ZK 191703 behandelten Tumoren (III) weniger Zellkerne ER-positiv (Ab.35, S.84).

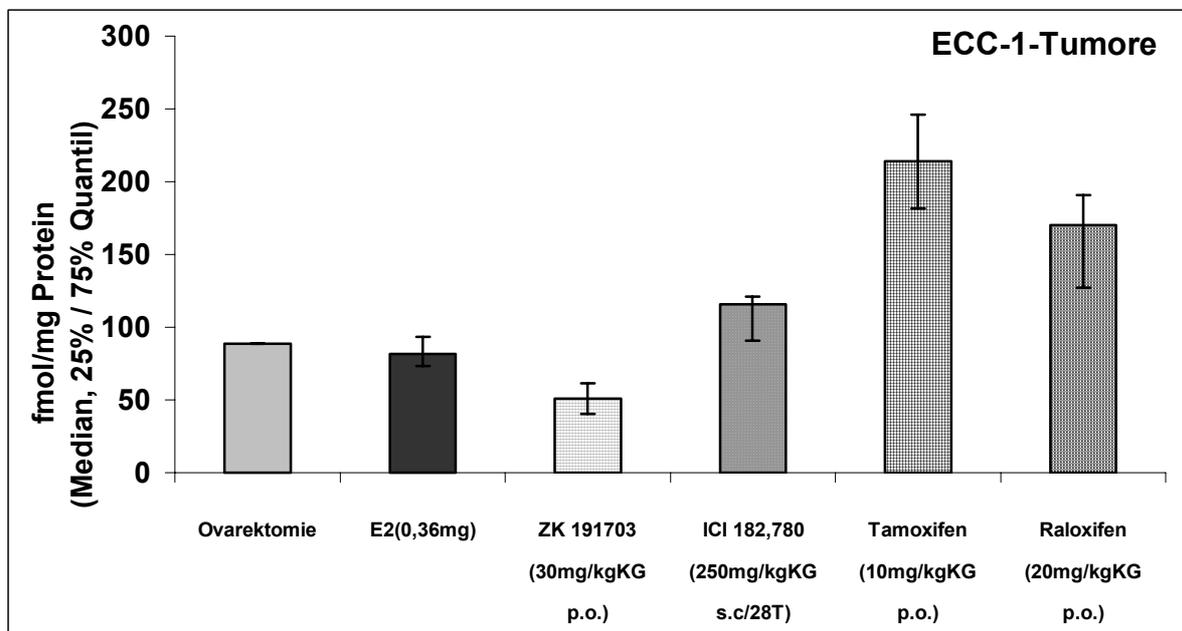
**I unbehandelter Tumor****II estrogenstimulierter Tumor****III ZK 191703-behandelter Tumor****IV ICI 182,780-behandelter Tumor**

**Immunohistochemische ER $\alpha$ -Färbung (Klon 1D5), Vergrößerung 5x**

**Abb.35 Expression der Estrogenrezeptoren alpha (ER $\alpha$ ) in Tumoren der Zelllinie Ishikawa**

Reine, steroidale AE wurden estrogensupplementierten SCID Mäusen mit subkutan implantierten Ishikawazellen täglich subkutan appliziert. Die immunohistochemische ER $\alpha$ -Färbung der heterogenen Tumore ergab in der Ovariectomie-Gruppe(I) mehr und intensiver gefärbte ER $\alpha$ -positive Tumorzellkerne als in den Tumorzellkernen der estrogenstimulierten Kontrollgruppe(II) und der ICI 182,780-behandelten Gruppe(IV). In den mit ZK 191703 behandelten Tumoren(III) waren wenige Zellkerne ER $\alpha$ -positiv.

Im Endometriumkarzinom-Modell ECC-1 wurde die ER-Expression in den Tumoren nach Behandlung mit den partialagonistischen, nichtsteroidalen AE Tamoxifen und Raloxifen sowie mit den reinen, steroidalen AE ZK 191703 und ICI 182,780 im ER-EIA untersucht (siehe Abb.21, S.65). Die Tumore waren hinsichtlich ihrer ER-Expression heterogen. Insgesamt exprimierten die Tumore der Ovariectomie- und E<sub>2</sub>-Gruppe beide 90 fmol ER/mg Protein. In ZK 191703-behandelten Tumoren (30 mg/kg KG p.o.) wurden 50 fmol ER/mg Protein detektiert. In den ICI 182,780-behandelten Tumoren (250 mg/kg KG s.c./28Tage) wurden mit 120 fmol ER/mg Protein mehr ER exprimiert. Mit 170-220 fmol ER/mg Protein exprimierten die Tumore, die mit Raloxifen (20 mg/kg KG p.o.) oder mit Tamoxifen (10 mg/kg KG p.o.) behandelt wurden, mehr ER (Abb.36).

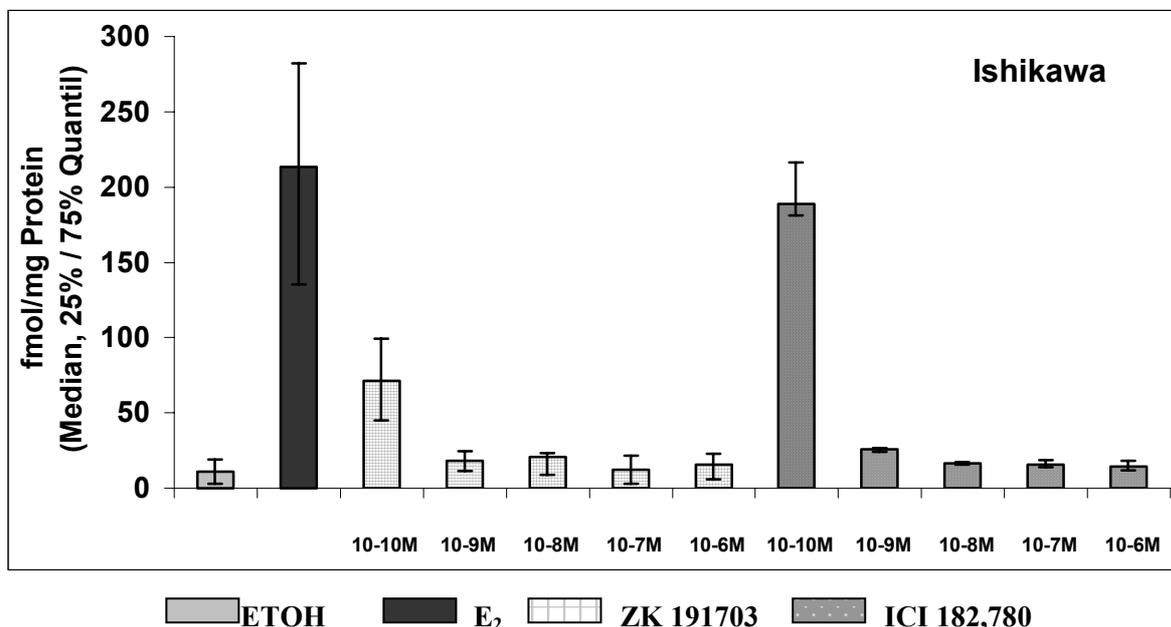


**Abb.36 Expression der Estrogenrezeptoren in ECC-1-Tumoren**

ECC-1-Tumorstücke wurden nach dreimaliger Tierpassage in SCID Mäuse transplantiert, die mit E<sub>2</sub>-Pellets (0,36mg/Pellet) supplementiert wurden. Die Tiere wurden mit partialagonistischen und reinen AE täglich oral bzw. bei ICI 182,780 alle 28 Tage subkutan behandelt. Die Rezeptorbestimmung wurde in den exstirpierten Tumoren im ER-Enzymimmunoassay durchgeführt.

#### D.4.2 Wirkung reiner Antiestrogene auf die Progesteronrezeptor-Expression in endometrialen Adenokarzinomen

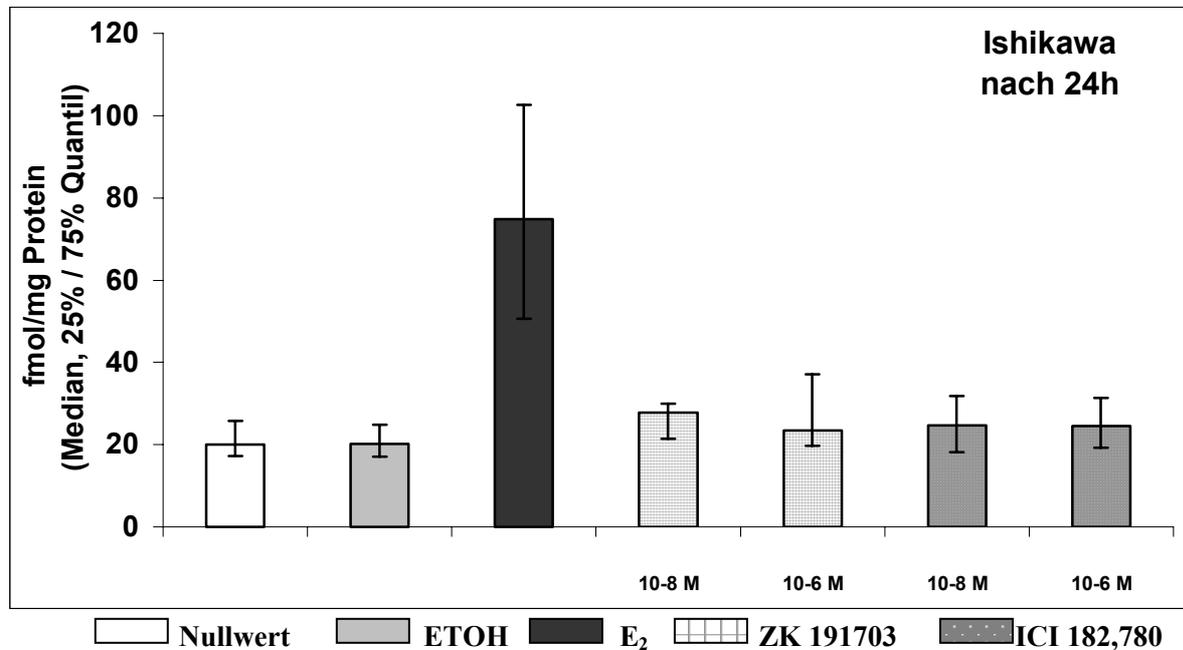
Die durch den E<sub>2</sub>-ER-Komplex induzierte PgR-Expression wurde parallel zur ER-Expression (siehe unter D.4.1 beschriebene Versuche, S.79) untersucht. Die PgR wurden proteinbiochemisch im PgR-EIA bestimmt. Nach dreitägiger Estrogenablation wurden Ishikawazellen fünf Tage lang mit ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen von 10<sup>-10</sup> M-10<sup>-6</sup> M in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M E<sub>2</sub> inkubiert. In den Ishikawazellen wurden 200 fmol PgR/mg Protein nach Estrogenstimulus und nach Behandlung mit 10<sup>-10</sup> M ICI 182,780 180 fmol PgR/mg Protein exprimiert. Bei Inkubation mit 10<sup>-10</sup> M ZK 191703 wurden mit 80 fmol/mg Protein weniger Rezeptoren detektiert. Zellen beider Behandlungsgruppen in den anderen Konzentrationen von 10<sup>-9</sup> M-10<sup>-6</sup> M und in der ETOH-Kontrolle exprimierten 15-20 fmol PgR/mg Protein. Die PgR-Expression in E<sub>2</sub>-stimulierten Zellen war statistisch signifikant höher als in den Zellen nach Inkubation ohne E<sub>2</sub> oder mit den AE in den Konzentrationen 10<sup>-7</sup> M-10<sup>-6</sup> M ZK 191703 sowie 10<sup>-8</sup> M-10<sup>-6</sup> M ICI 182,780. Ebenso exprimierten die Zellen nach 10<sup>-10</sup> M ICI 182,780-Inkubation statistisch signifikant mehr PgR als die mit höheren ICI-Dosierungen behandelten Zellen (Abb.37).



**Abb.37 Expression der Progesteronrezeptoren in Ishikawazellen bei Inkubation mit reinen Antiestrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M Estradiol**

Die Zellen wurden fünf Tage lang mit den Substanzen inkubiert. Danach erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem PgR-Enzymimmunoassay, n= 6, p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).

In einem weiteren Versuch mit den Ishikawazellen betrug die Inkubationszeit 24 Stunden. Es wurden in den unterschiedlich mit AE behandelten Zellen vergleichbar viele PgR detektiert wie in der unstimulierten Kontrolle. Im Vergleich zur Messung nach fünf Tagen exprimierten  $E_2$ -stimulierte Zellen mit 80 fmol PgR/mg Protein weniger PgR und unbehandelte oder AE-behandelte Zellen mit 20-30 fmol PgR/mg Protein mehr PgR (Abb.38).

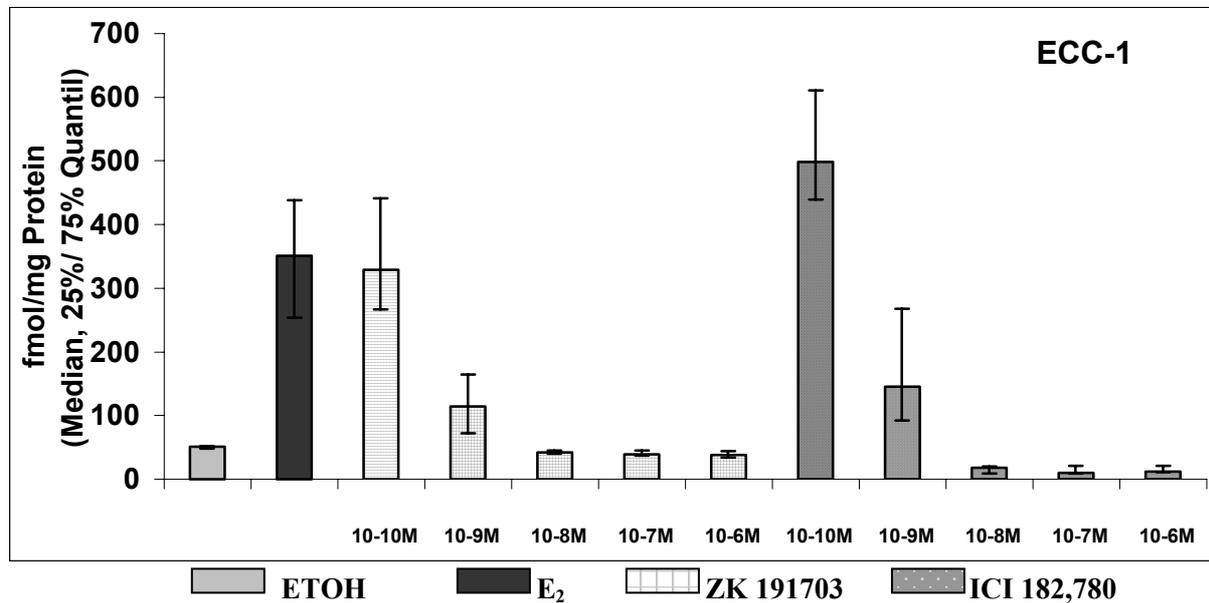


**Abb.38 Expression der Progesteronrezeptoren in Ishikawazellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M Estradiol**

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem PgR-Enzymimmunoassay, n= 6.

ECC-1-Zellen wurden in einem ersten Versuch nach dreitägiger Estrogenablation sieben Tage lang mit ZK 191703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen von  $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M  $E_2$  inkubiert. Die Verringerung der PgR-Expression nach AE-Inkubation war konzentrationsabhängig. Mit der niedrigsten Konzentration von  $10^{-10}$  M ZK 191703 behandelte Zellen exprimierten 350 fmol PgR/mg Protein. Nach Inkubation mit  $10^{-10}$  M ICI 182,780 wurden in den Zellen 500 fmol PgR/mg Protein nachgewiesen. Zellen, die mit  $10^{-9}$  M ZK 191703 oder ICI 182,780 inkubiert wurden, exprimierten 120-150 fmol PgR/mg Protein. Nach Inkubation mit den reinen AE in den Konzentrationen von  $10^{-8}$  M- $10^{-6}$  M exprimierten die Zellen 20-40 fmol PgR/mg Protein. Diese PgR-Expression war bei Behandlung mit ICI 182,780 signifikant niedriger als bei Behandlung mit  $10^{-10}$  M ICI 182,780. Vergleichbar niedrige PgR-Werte wurden auch in der unstimulierten ETOH-Kontrolle detektiert.

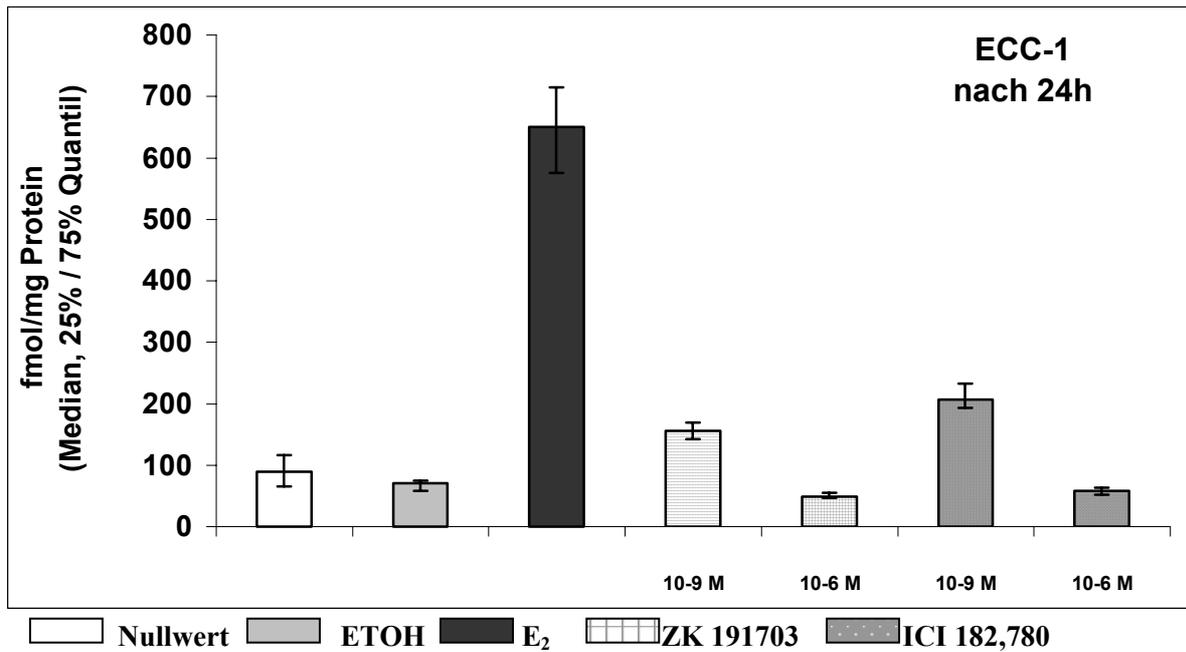
Die estrogenstimulierten ECC-1-Zellen exprimierten mit 350 fmol PgR/mg Protein signifikant mehr Rezeptoren als die Zellen, die mit  $10^{-8}$  M- $10^{-6}$  M ICI 182,780 behandelt wurden (Abb.39).



**Abb.39 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen bei Inkubation mit reinen AE verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M Estradiol**

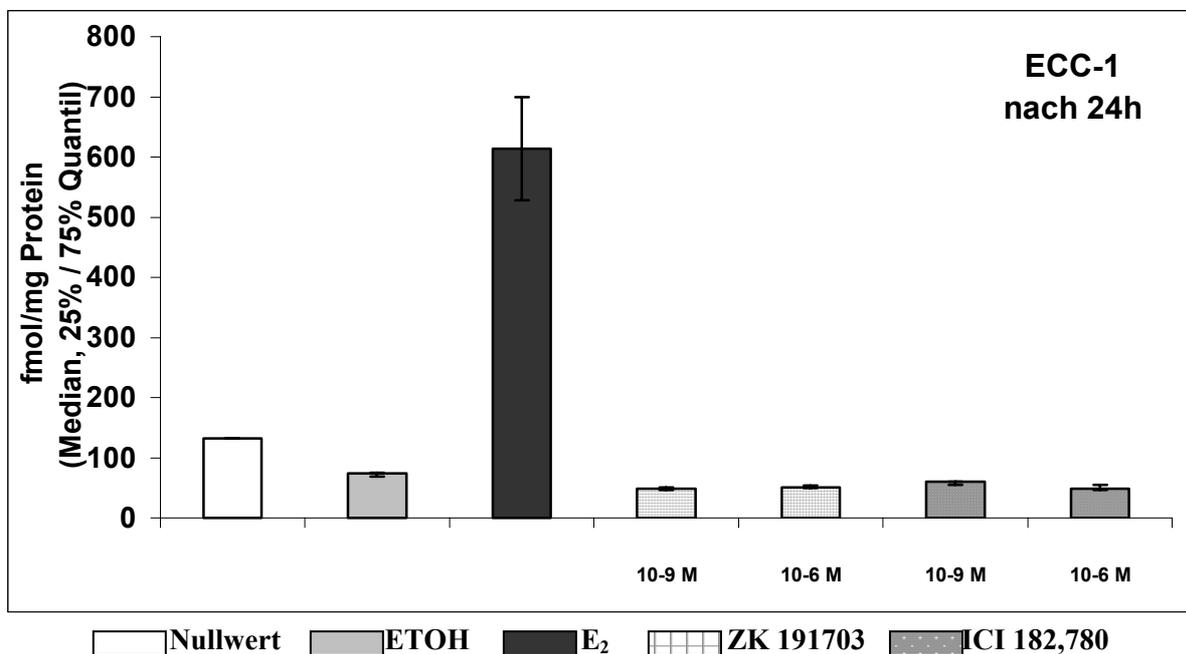
Die Zellen wurden sieben Tage lang mit den Substanzen inkubiert. Danach erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem PgR-Enzymimmunoassay, n= 6, p<0,05 (weitere Erläuterungen siehe Text).

In einem zweiten Versuch betrug die Inkubationszeit 24 Stunden. In den estrogenstimulierten ECC-1-Zellen wurden statistisch signifikant höhere PgR-Werte nachgewiesen (650 fmol PgR/mg Protein) als in der unstimulierten Kontrolle mit 70 fmol PgR/mg Protein, als in der mit  $10^{-6}$  M ZK 191703- und als in der mit  $10^{-6}$  M ICI 182,780 behandelten Gruppe (50 fmol PgR/mg Protein). Bei Behandlung mit  $10^{-9}$  M ZK 191703 und ICI 182,780 exprimierten die Zellen 150 fmol PgR/mg Protein (Abb.40, S.89). In einem weiteren Versuch wurden ECC-1-Zellen für 24 Stunden mit den AE ZK 1091703 und ICI 182,780 in den Konzentrationen von  $10^{-9}$  M und  $10^{-6}$  M in Abwesenheit von E<sub>2</sub> inkubiert. Die Inkubation mit den AE in beiden Konzentrationen bewirkte eine PgR-Expression von 50-60 fmol PgR/mg Protein in den Zellen (Abb.41, S.89). Im Vergleich dazu wurden in Anwesenheit von E<sub>2</sub> 150-200 fmol PgR/mg Protein nach Inkubation von  $10^{-9}$  M reinem, steroidalem AE sowohl nach sieben Tagen, als auch nach 24 Stunden nachgewiesen (siehe Abb.39–40, S.88-89).



**Abb.40** Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von  $10^{-10}$  M Estradiol

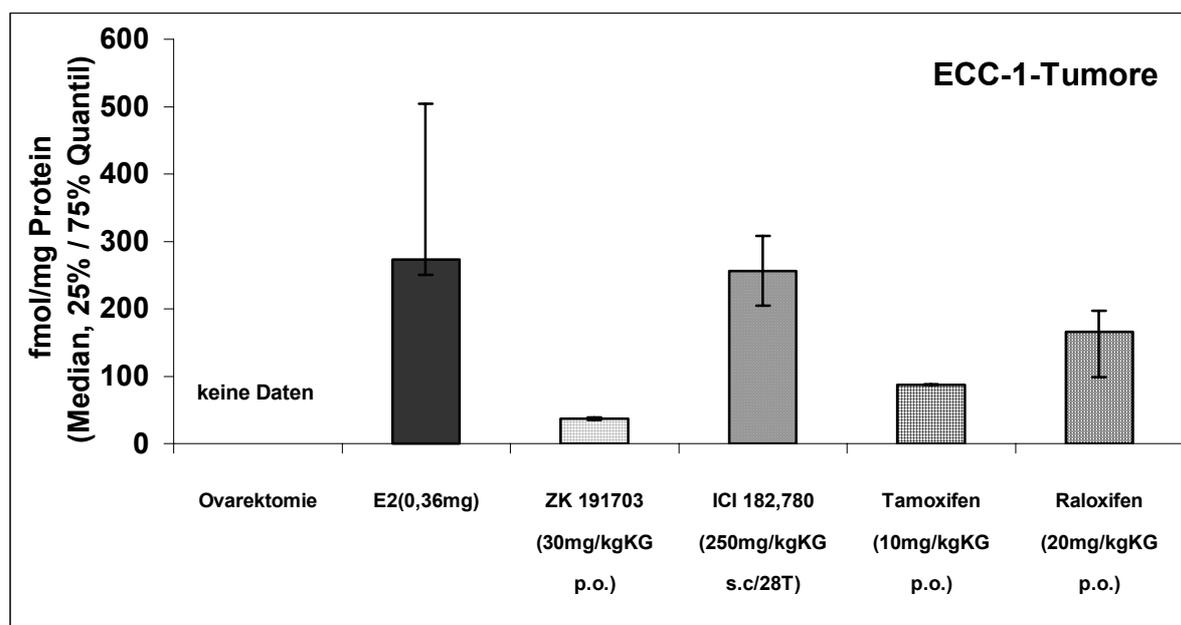
Die Zellen wurden für 24 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem PgR-Enzymimmunoassay,  $n=6$ ,  $p<0,05$  (weitere Erläuterungen siehe Text).



**Abb.41** Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen ohne Estradiol

Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem PgR-Enzymimmunoassay,  $n=3$ .

Zusätzlich zu den *in vitro*-Versuchen wurde die Regulation der PgR durch AE in dem *in vivo*-Tumormaterial untersucht. Tumorstücke der endometrialen Adenokarzinomzelllinie ECC-1 nach Behandlung mit den partialagonistischen, nichtsteroidalen AE Tamoxifen und Raloxifen sowie mit den reinen, steroidalen AE ZK 191703 und ICI 182,780 (siehe Abb.21, S.65) wurden proteinbiochemisch auf ihre PgR-Expression hin untersucht. In der E<sub>2</sub>-Gruppe wurden 300 fmol PgR/mg Protein exprimiert. Nach Behandlung mit ICI 182,780 (250 mg/kg KG s.c./28Tage) war die PgR-Expression mit 250 fmol PgR/mg Protein verringert. Nach der Raloxifenbehandlung (20 mg/kg KG p.o.täglich) exprimierten die Tumore 170 fmol PgR/mg Protein, nach der Tamoxifenbehandlung (10 mg/kg KG p.o.täglich) nur noch 90 fmol PgR/mg Protein. Zur E<sub>2</sub>-Kontrolle signifikant niedrigere PgR-Werte wurden in den mit ZK 191703 (30 mg/kg KG p.o.täglich) behandelten Tumoren detektiert (40 fmol PgR/mg Protein) (Abb.42).



**Abb.42 Expression der Progesteronrezeptoren in ECC-1-Tumoren**

ECC-1-Tumorstücke wurden nach dreimaliger Tierpassage in SCID Mäuse transplantiert, die mit E<sub>2</sub>-Pellets (0,36mg/Pellet) supplementiert wurden. Die Mäuse wurden mit partialagonistischen und reinen AE täglich oral bzw. bei ICI 182,780 alle 28 Tage subkutan behandelt. Die Rezeptorbestimmung erfolgte in den exstirpierten Tumoren im PgR-Enzymimmunoassay,  $p < 0,05$  (weitere Erläuterungen siehe Text).

#### D.4.3 Wirkung reiner Antiestrogene auf die Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in endometrialen Adenokarzinomen

Die beim Mammakarzinom beschriebene, negative Korrelation von ER- und EGFR-Expression (Fitzpatrick et al. 1984, Sainsbury et al. 1985) wird in endometrialen Adenokarzinomen kontrovers diskutiert (Wang et al. 1993, Llorens et al. 1989, Zarcone et al. 1995). Der Einfluß reiner, steroidal AE, die den ER destabilisieren, ist in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht worden. Aus diesem Grund wurde die EGFR-Expression in den Ishikawa- und ECC-1-Zellen aus den bereits unter D.4.1 und D.4.2 beschriebenen Versuchen (S.79-90) untersucht. Die Rezeptorbestimmung erfolgte proteinbiochemisch im EGFR-Enzymimmunoassay. Die EGFR-Expression war in den unstimulierten Ishikawazellen mit 280 fmol EGFR/mg Protein am niedrigsten. In der E<sub>2</sub>-Kontrolle wurden 340 fmol EGFR/mg Protein exprimiert. Mit 10<sup>-6</sup> M ICI 182,780 inkubierte Zellen exprimierten mit 560 fmol EGFR/mg Protein die meisten Rezeptoren. In Zellen, die mit 10<sup>-8</sup> M und 10<sup>-6</sup> M ZK 191703 und mit 10<sup>-8</sup> M ICI 182,780 inkubiert wurden, wurden EGFR in einer Menge zwischen 380 und 450 fmol/mg Protein detektiert (Abb.43, S.92). ECC-1-Zellen exprimierten geringere Mengen an EGFR. Nach Inkubation mit 10<sup>-9</sup> M ZK 191703 wurde mit 40 fmol EGFR/mg Protein die höchste EGFR-Expression beobachtet. Eine vergleichbare EGFR-Expression wurde nach Inkubation mit ICI 182,780 in den Zellen beobachtet. Nur nach Inkubation mit 10<sup>-6</sup> M ZK 191703 wurden in den ECC-1 Zellen keine EGFR nachgewiesen. Im Gegensatz zu Ishikawazellen waren in den estrogenstimulierten ECC-1-Zellen mit 10 fmol EGFR/mg Protein weniger Rezeptoren exprimiert als in den unstimulierten Zellen (25 fmol EGFR/mg Protein) (Abb.44, S.92).

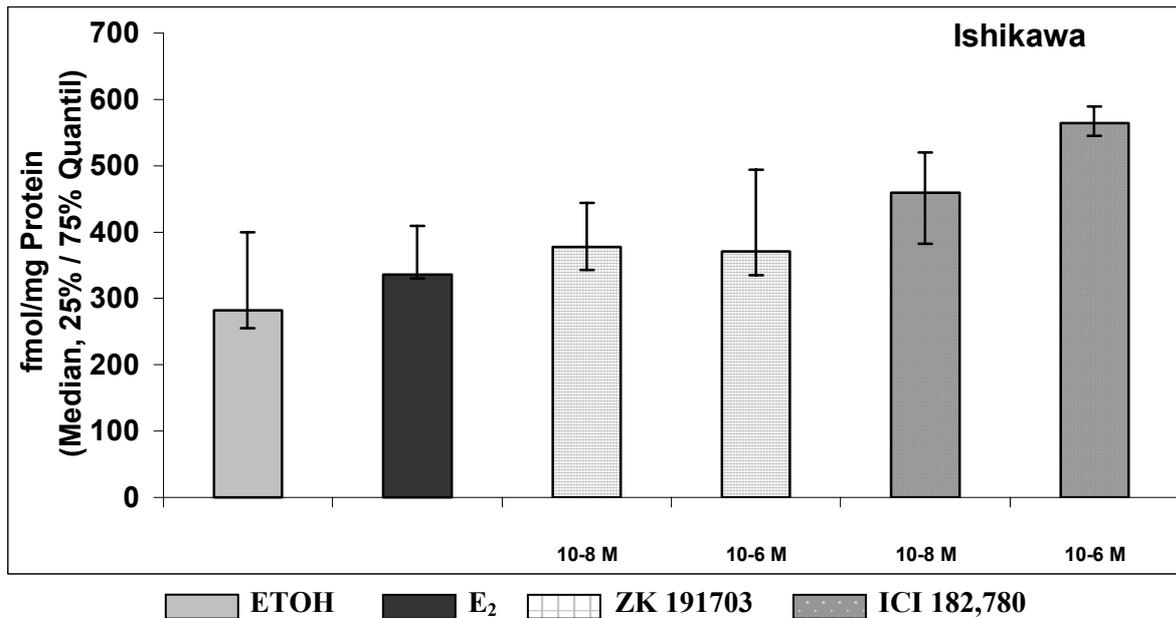


Abb.43 Expression der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Ishikawazellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M Estradiol

Die Zellen wurden fünf Tage mit den Substanzen inkubiert. Danach erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem EGFR-Enzymimmunoassay, n=3.

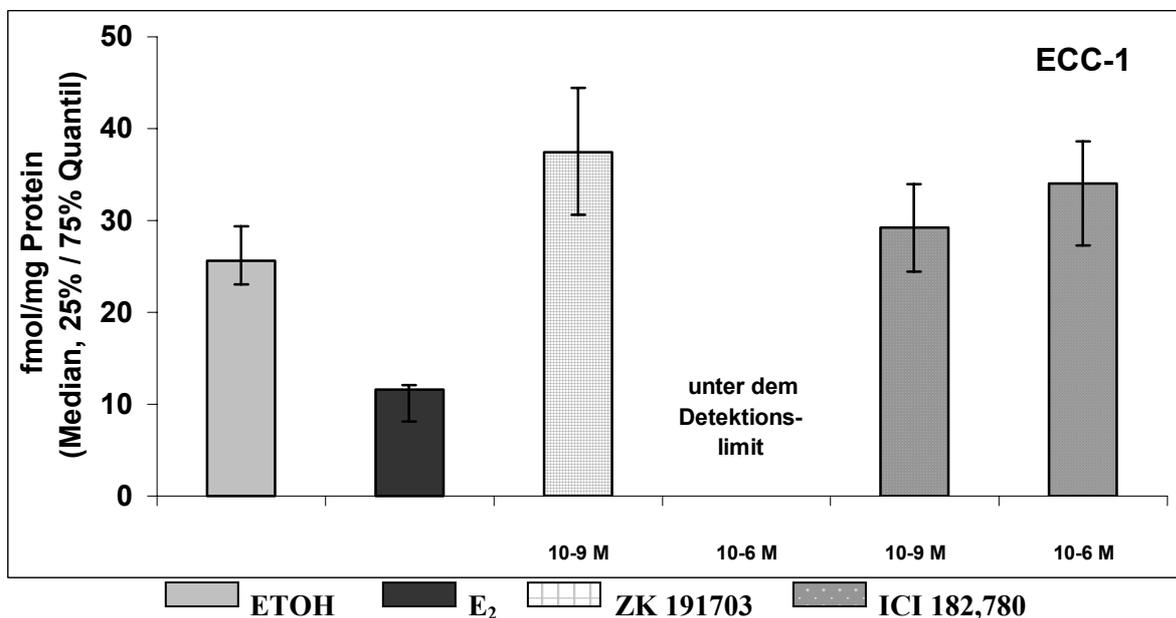


Abb.44 Expression der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren in ECC-1-Zellen nach Inkubation mit reinen Antiöstrogenen verschiedener Konzentrationen in Anwesenheit von 10<sup>-10</sup> M Estradiol

Die Zellen wurden sieben Tage mit den Substanzen inkubiert. Danach erfolgte die Rezeptorbestimmung mit dem EGFR-Enzymimmunoassay, n=3.