

E Diskussion

E.1 Methodendiskussion	93	E.2.2 Histologie AE-behandelter Tumore
E.1.1 AlamarBlue und Kristallviolett		E.2.3 AE-Wirkungsmechanismus
E.1.2 Ki-67-Expression im Endometriumkarzinom		E.2.4 Regulation der ER-PgR-Expression
E.1.3 Cyclin D1- und p21-Expression in endometrialen Tumorzellen		E.2.5 AE als SERD
E.2 Ergebnisdiskussion	96	E.2.6 PgR-Expression nach AE-Behandlung
E.2.1 E ₂ - und AE-Proliferation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>		E.2.7 EGFR-Expression nach AE-Behandlung

E.1 Diskussion

E.1.1 Vergleich von AlamarBlue und Kristallviolett zur Messung der Zellproliferation

Zur Messung der *in vitro*-Zellproliferation wurde eine geeignete Methode etabliert. Hierfür wurde ein Vergleich der beiden Indikatoren zur Zellzahlbestimmung AlamarBlue und Kristallviolett vorgenommen. Proliferationsversuche mit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 ergaben bei Messung der Zellzahl mit AlamarBlue und Kristallviolett unterschiedliche Ergebnisse. Mit Kristallviolett wurde eine maximale, E₂-stimulierte Zellproliferation von 2008% ermittelt im Vergleich zu 368% mit AlamarBlue. Bei der Inkubation von 10⁻⁷ M ZK 191703 wurde mit Kristallviolett eine maximale Wachstumsinhibition von 93% gemessen, mit der AlamarBlue-Messung eine Inhibition von 65%. Der Abstand der Extinktions- bzw. Fluoreszenzwerte von Positiv- oder Negativkontrolle (E₂ oder ETOH) zu den Extinktions- bzw. Fluoreszenzwerten der Behandlungsgruppen war mit Kristallviolett größer als mit AlamarBlue. Demzufolge ergab sich ein breiteres Messfenster und ein höherer Sensitivitätsbereich. Prozentuale Wachstumsangaben bezogen auf diese Kontrollen verdeutlichten diesen Unterschied. Als Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist das biologische Wachstumsverhalten anzusehen. Schnell proliferierende Zellen verbrauchen pro Zeiteinheit mehr Nährstoffe und häufen mehr toxische Stoffwechselprodukte an. Die Bedingungen hinsichtlich des Nährstoffangebots und der Ausdehnungsmöglichkeit im Loch einer 96-Loch-Platte sind somit bei zunehmender Zellzahl limitierender Faktor. Ist dieses Limit erreicht, verlangsamen die Zellen ihre Wachstumsgeschwindigkeit bis hin zum Wachstumsstillstand. Befinden sich Zellen in dieser sogenannten Verzögerungsphase, sinken auch die wachstumsbedingten Stoffwechselprozesse. Da mit AlamarBlue aber nun die Stoffwechselaktivität der Zellen durch Reduktion von Resazurin zu Resorufin gemessen wird, ist die Menge an Resorufin in Löchern mit hoher Zellzahl geringer als in Löchern mit niedriger Zellzahl. Die Zellen wachsen im nährstoffreichen und toxinarmen Milieu schnell und sind demzufolge sehr stoffwech-

selaktiv. Deshalb ergaben mit E_2 in ihrer Proliferation stimulierte Zellen vergleichsweise niedrigere Fluoreszenzwerte als im Wachstum unstimulierte Zellen. Kristallviolett färbt lediglich die DNA in den Zellkernen fixierter Zellen. Die Extinktionswerte, am Spektralphotometer aus den Intensitäten der Blaufärbung ermittelt, entsprechen der DNA-Menge pro Loch und damit der Zellkernmenge. Diese wird als indirekter Parameter der Zellzahl gleichgesetzt. Da die Stoffwechselaktivität der Zellen nicht zur Zellzahlbestimmung erforderlich ist, besteht dieser limitierende Faktor nicht bei der Kristallviolettmethode. Aus diesem Grunde ist Kristallviolett für die Bestimmung der Zellzahl besser geeignet und wurde im Rahmen dieser Arbeit für die *in vitro*-Proliferationsteste genutzt. AlamarBlue wird hauptsächlich für die Auffindung mikrobieller Kontamination in organischen Stoffen durch Messung der Stoffwechselaktivität von Bakterien und Pilzen und zur Qualitätskontrolle von Spermien eingesetzt, nicht aber zur Bestimmung rein quantitativer Parameter wie der Zellzahl (Reddy et al. 1997, Guerin et al. 2001).

E.1.2 Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in den Endometriumkarzinomen

Das *in vivo* ermittelte, unterschiedliche Tumorwachstum nach Behandlung mit den AE sollte histologisch durch Messung der Tumorproliferationsrate bestätigt werden. Hierzu wurden die Schnitte der paraffineingebetteten Tumore immunhistochemisch auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 hin untersucht. Zellen, die Ki-67 exprimieren, befinden sich in der Proliferationsphase, da das Protein Ki-67 nur während der G1-, Synthese-, G2- und Mitose-Zellzyklusphase gebildet wird, nicht aber in der G0-Phase (Gerdes et al. 1984). Die Tumorschnitte wiesen 25-50 Ki-67-positive Zellen pro 1000 Zellen auf. Durch Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde also kein Unterschied zwischen der Wachstumsrate der Tumore durch die verschiedenen Behandlungen festgestellt. Dieses Ergebnis war in allen Gruppen unabhängig von einer Behandlung mit Estrogenen oder AE ähnlich. In einer Studie an Kolorektalkarzinomen wurde ebenfalls die Wachstumsrate des Tumors durch Messung des Tumolvolumens zum Start- und Endzeitpunkt bestimmt und mit dem Ki-67-Proliferationsindex nach immunhistochemischer Färbung der Tumorschnitte verglichen (Iwashita et al. 1998). Auch hier wurde keine Korrelation des Tumolvolumens mit der Menge an Ki-67-positiven Zellen nachgewiesen. Ursächlich ist ein geringer Unterschied in der mitotischen Aktivität der behandelten Tumore zu diskutieren. Aufgrund des exponentiellen Wachstumsverhaltens von Tumoren wirkt sich auch ein gering vorhandener Unterschied in der Anzahl mitotisch aktiver Zellen zwischen estrogenstimulierten und AE-inhibierten Tumoren im Verlaufe der Zeit auf die Tumorgröße aus. Demzufolge ist mit dem immunhistochemischen

Nachweis der Expression von Ki-67 ein geringer Unterschied in der Mitoseaktivität von Tumoren nicht quantifizierbar.

E.1.3 Expression der zellzyklusrelevanten Proteine Cyclin D1 und p21 in endometrialen Adenokarzinomzellen nach Behandlung mit reinen Antiöstrogenen

Der Mechanismus der wachstumshemmenden Eigenschaft reiner, steroidaler AE in endometrialen Tumorzelllinien sollte evaluiert werden. Da im Mammakarzinom eine geringe Expression des zellzyklusfördernden Proteins Cyclin D1 und/oder eine hohe Expression des Zellzyklusinhibitors p21 eine Proliferationshemmung von Zellen bewirken (Wilcken et al. 1997, Carroll et al. 2000), wurden mögliche Effekte reiner, steroidaler AE auf die Expression dieser beiden Proteine im Endometriumkarzinom untersucht. Hierfür wurde nach Inkubation der endometrialen Adenokarzinomzellen ECC-1 mit den reinen AE die Expression der Proteine Cyclin D1 und p21 in den Zellen in Westernblotanalysen bestimmt. Beide Proteine wurden jedoch nicht detektiert. Eine sehr geringe Expression der Proteine ist ursächlich für diese fehlende Detektion zu diskutieren. Gering exprimierte Proteine können nachgewiesen werden, wenn große Mengen an Gesamtprotein im Westernblot eingesetzt werden. Um aber eine vollständige Auftrennung der Proteine zu gewährleisten, ist die einsetzbare Proteinmenge auf maximal 5 µg Gesamtprotein pro Tasche begrenzt. Somit besteht für die Detektion von Proteinen in der Westernblotanalyse eine Nachweisbarkeitsgrenze. Alternativ kann man auf Northernblotanalysen zurückgreifen, um auf messenger RNA(mRNA)-Ebene die Expression der beiden Proteine zu untersuchen. Diese Methode ist jedoch in ihrer Aussagekraft dadurch limitiert, daß nicht alle mRNA auch wirklich translatiert werden muß. Northernblotanalysen liefern keinen endgültigen Beweis über die Menge tatsächlich exprimierter Proteine. Ein in der Literatur beschriebener Nachweis von Cyclin D1 in endometrialen Zellen vom Rattenuterus ist durch Messung der mRNA erfolgt (Altucci 1997). Es ist zu vermuten, daß in humanen, endometrialen Tumorzellen Cyclin D1 ebenfalls in so geringer Menge exprimiert wird, daß die Westernblotanalyse zu keinem positiven Ergebnis führt. Über die Expression von p21 in endometrialen Zellen ist nichts beschrieben worden.

E.2 Ergebnisdiskussion

E.2.1 Estrogenstimulierte und antiestrogeninhibierte Proliferation von humanen Endometriumkarzinomen *in vitro* und *in vivo*

In dieser Arbeit wurde der beim Mammakarzinom beschriebene, wachstumsinhibierende Effekt von AE (Furr and Jordan 1984) am Endometriumkarzinom untersucht. Infolge Estrogenstimulierung vermehrtes, endometriales Tumorwachstum ist möglicherweise durch AE hemmbar, vergleichbar mit der Tumorwachstumshemmung, die beim Mammakarzinom durch die AE-Therapie erreicht wird (Lower et al. 1999). Die Wirksamkeit einer solchen AE-Therapie am Endometriumkarzinom sollte in präklinischen Modellen evaluiert werden. Hierfür wurden die reinen, steroidalen AE ZK 191703 und ICI 182,780 und die partialagonistischen, nichtsteroidalen AE Tamoxifen und Raloxifen vergleichend getestet. Die E₂-stimulierten *in vivo*-Modelle sollten dabei die Situation von Frauen vor der Menopause mit endogener Estrogenaktivität oder von Frauen nach der Menopause unter Estrogensersatztherapie bei vorhandenem, endometrialen Adenokarzinom wiedergeben. Das tamoxifenstimulierte *in vivo*-Modell wurde etabliert, um in der Situation eines präexistenten, durch eine Tamoxifen-Langzeittherapie im Wachstum stimulierten Endometriumkarzinoms die Wirksamkeit einer Therapie mit reinen AE überprüfen zu können. Die Versuche wurden an sechs humanen, endometrialen Adenokarzinom-Zelllinien durchgeführt. Eine Charakterisierung der Zelllinien in Bezug auf ihren Estrogenrezeptor-Status ermöglichte die Einteilung in ER-negative und ER-positive Zelllinien. In den endometrialen Adenokarzinomzellen der Linien MFE-296, MFE-319, MFE-280 und KLE wurden proteinbiochemisch und immunhistochemisch keine ER detektiert. Im Gegensatz dazu exprimierten die Zelllinien Ishikawa und ECC-1 ER in unterschiedlicher Menge. Die ER-negativen Zelllinien der MFE-Gruppe und KLE waren in ihrem Wachstum nach E₂-Stimulation *in vitro* und *in vivo* nicht beeinflussbar. Auch ein antiproliferativer Effekt durch Behandlung mit reinen oder partialagonistischen AE war nicht zu beobachten. Berichte über antiestrogene Bindungsstellen im Endoplasmatischen Retikulum, die Tamoxifen und andere AE binden und dadurch proliferationshemmend auch auf ER-negative Zellen wirken sollen (Friedl and Jonat 1989), ließen sich in den Versuchen nicht nachvollziehen. Aufgrund des fehlenden, antiproliferativen Effekts von reinen und partialagonistischen AE in den ER-negativen Zelllinien ist ein anderer Angriffspunkt als der ER in diesen Modellen für AE nicht vorhanden. ER-negative, endometriale Tumore sprachen in klinischen Studien ebenfalls nicht auf konventionelle Endokrintherapien an, sondern wuchsen kontinuierlich invasiv weiter, neigten zu Metastasierungen und hatten schlechte Prognosen (Emons and Heyl 2000). Dem-

gegenüber wurde in einer Studie an einer ER-negativen Ovarialkarzinom-Zelllinie der antiproliferative Effekt sowohl von ICI 182,780 als auch von Tamoxifen beschrieben (Ercoli et al. 1998). In einer weiteren Untersuchung wurde die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen an einer ER-negativen Mammakarzinom-Zelllinie beobachtet (Furr and Jordan 1984). An den getesteten, endometrialen Adenokarzinom-Zelllinien wurden diese Resultate nicht bestätigt.

In den ER-positiven, endometrialen Adenokarzinomzelllinien wurde *in vitro* eine Expression von 187 fmol ER/mg Protein bei ECC-1 und von 24 fmol ER/mg Protein bei Ishikawa beobachtet. Beide Zelllinien waren *in vitro* und *in vivo* in ihrer Proliferation durch Estrogene sowie durch AE beeinflussbar. Die Wirksamkeit von Estrogenen oder AE nur in ER-positiven, endometrialen Zelllinien wurde auch von anderen Gruppen berichtet (Satyaswaroop et al. 1984). Der proliferative Effekt von E₂ und der antiproliferative Effekt der AE waren in den beiden Zelllinien Ishikawa und ECC-1 unterschiedlich stark zu beobachten. *In vitro* wurde die Proliferation durch E₂ in Ishikawazellen auf 133%, in ECC-1-Zellen auf 421% stimuliert. Das AE ZK 191703 hemmte das Zellwachstum um 37% in der Zelllinie Ishikawa und um 91% in der Zelllinie ECC-1. Das Wachstum der Ishikawazellen wurde insgesamt in geringerem Maße stimuliert und inhibiert. Diese Ergebnisse lassen auf eine positive Korrelation zwischen ER-Menge und Estrogen- bzw. AE-Wirkung schließen. Ishikawazellen, die den ER in niedriger Anzahl exprimierten, zeigten gegenüber Estrogenen oder AE in ihrem Wachstum eine geringere Beeinflussbarkeit als ECC-1-Zellen, die den ER in fast 8-facher Menge exprimierten. Auch *in vivo*-Ergebnisse bestätigten diese positive Beziehung zwischen ER-Menge und E₂- bzw. AE-Wirkung. In Versuchen zur Untersuchung einer estrogenstimulierten Tumorpheriferation wurde in den ECC-1-Tumoren eine 3-5fache, proliferative Wirkung durch E₂-Gabe beobachtet verglichen mit der vollständigen Tumorregression bei Estrogenablation oder Tamoxifenbehandlung. Diese ECC-1-Tumore exprimierten 225 fmol ER/mg Protein. Der proliferative Effekt von E₂ in der Zelllinie Ishikawa bezogen auf eine unstimulierte Kontrolle war geringer. Verglichen mit den unstimulierten Tumoren waren die estradiolstimulierten Tumore nur dreimal so groß. Mit 110 fmol ER/mg Protein exprimierten die Ishikawatumore weniger Rezeptoren. Diese positive Korrelation zwischen ER-Menge und E₂- oder AE-Wirkung läßt sich damit begründen, daß mehr ER-Bindungsstellen für die Liganden in einer stärkeren Wirkung resultieren. Klinisch erleichtert eine positive Korrelation zwischen ER-Expression und AE-Wirkung die Bewertung einer effektiven AE-Therapie. Mit Ermittlung des aktuellen ER-Status kann der Erfolg einer endokrinen AE-Therapie beurteilt werden und der Patientin eine zuverlässige Prognose gestellt werden. Endometriumkarzinome früher Stadien und Gradtei-

lungen sprechen stark auf eine derartige Therapie an, da in diesen Tumoren die ER-Expression sehr hoch ist (Emons et al. 2000). Eine Analyse der *Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group* (EBCTCG) ergab ebenfalls, daß die Tamoxifen-Therapie bei Patientinnen mit geringer ER-Expression im Mammakarzinom zu einem sehr viel geringeren Erfolg führte als bei Patientinnen mit deutlich positiver ER-Expression (Wyld et al. 1998). In einer weiteren Studie wurde der Therapieerfolg einer Endokrinbehandlung in Abhängigkeit von der ER-Expression im Mammakarzinom untersucht. Es wurde eine Therapieansprechrates von 6% bei nicht detektierbarem ER-Gehalt ermittelt, von über 46% bei einem ER-Gehalt von 3-100 fmol ER/mg Protein und von 80% bei mehr als 100 fmol ER/mg Protein (Becher 1986). Auch bei Endometriumkarzinomen ist das Ansprechen der palliativen Gestagentherapie abhängig vom PgR-Status (AWMF-Leitlinien-Register 2000). Patientinnen mit Endometriumkarzinomen, die nur 0-30 fmol PgR/mg Protein exprimierten, hatten in einer Studie mit 230 Patientinnen eine schlechte Prognose und während der Progesterontherapie schon Rezidiventwicklungen im Gegensatz zu Patientinnen mit über 30 fmol PgR/mg Protein exprimierenden Endometriumkarzinomen (Kauppila et al. 1986). Ursächlich wird für die geringe, antiproliferative *in vitro*-Wirkung der AE in Ishikawazellen neben einer geringen ER-Expression aber auch eine starke, autokrine TGF α -Wachstumsstimulation diskutiert. Der E₂-ER-Komplex aktiviert eine verstärkte Expression von TGF α (Reynolds et al. 1998, Murphy 1994). TGF α wiederum stimuliert über autokrine Loops durch Bindung an den EGFR und Aktivierung der Phospholipase C-Inositoltriphosphat-Kaskade erneut das Zellwachstum. Für Tamoxifen und ICI 164,384, der Vorläufersubstanz von ICI 182,780, ist beschrieben worden, daß sie keine antagonistische Wirkung auf die durch Estrogene aktivierte Transkription des TGF α -Gens haben. Wegen der autokrinen Wachstumsstimulierung sind ihre antiproliferativen Effekte durch Bindung an andere ERE in Anwesenheit von E₂ nicht erkennbar (Gong et al. 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von TGF α nicht untersucht, aber eine autokrine Wachstumsstimulation wurde durch den alle zwei bis drei Tage stattfindenden Mediumwechsel *in vitro* minimiert.

Die Ergebnisse beider Zelllinien Ishikawa und ECC-1 wurden für einen Vergleich der Hemmung der Tumorzellproliferation durch AE herangezogen. Das reine AE ZK 191703 bewirkte im Vergleich zur Estrogenstimulation *in vitro* in Ishikawazellen eine Proliferationshemmung von 37%, in ECC-1-Zellen von 91%. *In vivo* wurde das Tumorwachstum durch ZK 191703 um 51% (Ishikawa) und um 66% (ECC-1) gehemmt. Tamoxifenstimulierte Ishikawatumore wurden durch ZK 191703 um 65% in ihrem Wachstum gehemmt. Die Behandlung mit ICI 182,780 führte *in vitro* zu einer 25%-igen Proliferationshemmung in Ishikawazellen und

einer 80%-igen Proliferationshemmung in ECC-1-Zellen. *In vivo* wurden alle Tumore durch die Behandlung mit ICI 182,780 nicht statistisch signifikant im Wachstum gehemmt. Nur estrogenstimulierte Ishikawatumore, die täglich mit ICI 182,780 in hoher Dosierung behandelt wurden, zeigten Wachstumshemmung von 44%. Das partialagonistische AE Tamoxifen war *in vitro* mit einer 22%-igen Wachstumshemmung (Ishikawa) und einer 71%-igen Wachstumshemmung (ECC-1) weniger antiproliferativ wirksam. *In vivo* zeigten nur die ECC-1-Tumore durch die Behandlung mit Tamoxifen eine statistisch signifikante Wachstumshemmung von 75%. Ishikawatumore ohne Estrogenstimulierung wurden durch die Tamoxifenbehandlung im Wachstum um 136% stimuliert. Das partialagonistische AE Raloxifen hemmte *in vivo* das Tumorwachstum beider Zelllinien nicht statistisch signifikant.

In allen estrogenstimulierten Modellen *in vitro* und *in vivo* sowie im tamoxifenstimulierten Modell *in vivo* war das reine AE ZK 191703 verglichen mit den partialagonistischen AE Tamoxifen und Raloxifen und dem reinen AE ICI 182,780 in der Wirkung stärker. Diese stärkere, antiproliferative Wirkung von ZK 191703 ist durch die Einführung eines Fluoridsubstituenten an der 11beta-Position des Moleküls sowie durch die Aminogruppierung in der Seitenkette zu begründen (siehe Abb.7, S.14). Die Substitutionen bewirken eine metabolische Stabilisierung des Komplexes mit dem Resultat einer längeren Wirkdauer (unveröffentlichte Ergebnisse der Schering AG). Die Eigenschaft reiner AE, den ER zu destabilisieren (Lichtner et al. 1999, DeFriend et al. 1994) und so die Bindung von Estrogenen an den Rezeptor zu verhindern, führt zusätzlich zu einem langsameren oder gar gehemmten Wachstum estrogenempfindlicher Tumore bei Behandlung mit ZK 191703.

Die Versuchsergebnisse zur proliferationshemmenden Wirkung von ICI 182,780 auf humane Endometriumkarzinome zeigen, daß ICI 182,780 nur in sehr hohen Konzentrationen wachstumshemmend in diesen Tumoren wirkt. In anderen Studien wurde in tamoxifenstimulierten Endometriumkarzinomen bei einer viermal höheren Dosierung von ICI 182,780 als die in dieser Arbeit verwendete Dosierung von 250 mg/kg KG für 28 Tage ein antiproliferativer Effekt beobachtet (O'Regan et al. 1998, Jamil et al. 1991, Gottardis et al. 1990). In einer Studie wurde das Gewicht von Schafuteri nach ICI 182,780-Behandlung und Estrogenbehandlung gemessen (Robertson et al. 2001-a). Die Behandlung mit ICI 182,780 in Anwesenheit, aber auch in Abwesenheit von E₂ führte zu vergleichbar hohen Uterusgewichten wie durch Behandlung mit E₂. Also zeigte auch hier ICI 182,780 keine estrogenantagonistischen Effekte auf die Proliferation von endometrialen Zellen. In Arbeiten mit tamoxifenresistenten Mammarkarzinomzelllinien in Nacktmäusen wurde ein wachstumsstimulierender Effekt durch die Behandlung mit ICI 182,780 beobachtet (Kurebayashi et al. 1998, McLeskey et al. 1998). In

Arbeiten an anderen Mammakarzinomzelllinien wurde eine wachstumshemmende Wirkung durch ICI 182,780 beobachtet (Wakeling 1993, DeFriend et al. 1994, Howell et al. 2000). Deshalb lassen die Ergebnisse dieser Arbeit in Zusammenhang mit den anderen Studien auf eine teils wachstumshemmende, teils wachstumsstimulierende Wirkung von ICI 182,780 schließen, je nach verabreichter Dosis und in Abhängigkeit von der behandelten Spezies, Tumorentität und Tumorgenität (Robertson et al. 2001-b).

Das partialagonistische AE Tamoxifen zeigte mit zum Teil wachstumshemmender und zum Teil wachstumsfördernder Wirkung in den endometrialen Adenokarzinomzelllinien ECC-1 und Ishikawa eine unterschiedliche Wirkung. Auch in anderen Arbeiten wirkte Tamoxifen teilweise antiproliferativ auf in Ratten transplantierte Endometriumkarzinomzellen (Horn et al. 1993) oder auf in Nacktmäusen transplantierte ECC-1-Adenokarzinomzellen (Dardes et al. 2001), teilweise aber auch proliferationsfördernd auf in Mäuse transplantierte Endometriumkarzinomzellen (Satyaswaroop et al. 1984, Tonetti et al. 1998). Als Ursache für diese unterschiedlichen Wirkungen sind Mutationen im ER zu diskutieren. In einer Studie war die estrogenagonistische Wirkung von Tamoxifen in Mammakarzinomzellen durch Bindung an einen mutierten ER verstärkt (Liu et al. 2001, Catherino et al. 1995). Es handelte sich dabei um eine natürlich entstandene Punktmutation der Aminosäure 351 des ER eines im Wachstum durch Tamoxifen stimulierten Mammakarzinoms. Eine Mutation in den zur Proliferation wichtigen ERE der DNA ist ebenfalls als Ursache der unterschiedlichen Tamoxifenwirkung zu diskutieren. Denn in einer Studie in Ishikawazellen wurde die fehlende, estrogenaktivierte Transkription der lysosomalen Protease Cathepsin D auf eine Mutation im Cathepsin D-ERE zurückgeführt (Miralles et al. 1994).

Das partialagonistische AE Raloxifen zeigte keine proliferationshemmende, aber auch keine proliferationsstimulierende Wirkung auf Endometriumkarzinome. Diese Beobachtungen wurden ebenfalls an ECC-1-Tumoren in Nacktmäusen gemacht (Dardes et al. 2002). Weiterhin wurden in einer klinischen Studie im Bereich des Endometriums keine Proliferationen nach Gabe von Raloxifen beobachtet (Holst 2000). Im Gegensatz dazu führte Arzoxifen, mit einer Raloxifen vergleichbaren SERM-Aktivität, in ECC-1-Tumoren in Nacktmäusen zu einer vollständigen Tumorregression (Dardes et al. 2001).

Diese präklinischen Versuche zeigen eine sehr gute Wachstumshemmung reiner AE am Endometriumkarzinom, insbesondere für ZK 191703. Die antiproliferative Wirkung von ZK 191703 im Vergleich zu dem in der Klinik eingesetzten Tamoxifen war sowohl *in vitro* als auch *in vivo* besser. Nur das reine AE ZK 191703 zeigte im Tiermodell bei oraler Verabreichung in einer Dosierung von 30 mg/kg KG eine wachstumshemmende Eigenschaft. We-

gen der oralen Verfügbarkeit und der niedrigen, wirksamen Dosierung ist ZK 191703 dem reinen AE ICI 182,780 als Therapeutikum überlegen. Voraussetzung für den Einsatz von ZK 191703 zur Behandlung von Endometriumkarzinomen ist jedoch die Estrogensensitivität der Tumore. Deshalb muß vor Therapiebeginn der ER-Status ermittelt werden, um einen Therapieerfolg zu gewährleisten. Die Wirksamkeit von ZK 191703 in den estrogen- und tamoxifenstimulierten Tumoren im Tiermodell zeigt, daß ZK 191703 bei hormonsensitiven, präexistenten, idiopathisch entstandenen Endometriumkarzinomen in Patientinnen eingesetzt werden kann, die unter Tamoxifen-Langzeittherapie stehen und die sich vor der Menopause mit endogener Estrogenaktivität oder nach der Menopause mit Estrogen-Ersatztherapie befinden. Innerhalb dieser Patientinnengruppen sollte nun das reine, steroidale AE ZK 191703 klinisch am Endometriumkarzinom geprüft werden.

E.2.2 Pathologisch-histologische Veränderungen der Tumore nach Antiestrogenbehandlung

Um die histologischen Veränderungen des Tumorgewebes infolge einer AE-Behandlung zu evaluieren, wurden die Tumore der endometrialen Adenokarzinomzelllinien MFE-296, MFE-280, ECC-1 und Ishikawa nach einer HE-Färbung in Bezug auf das Tumorgewebe/Stroma-Verhältnis (TSV) und in Bezug auf den Differenzierungsgrad des endometrialen Adenokarzinoms ausgewertet. ECC-1-Tumore bildeten schwach differenzierte, drüsige Strukturen aus, nachdem sie als Zellsuspension in die Mäuse transplantiert wurden. Diese Struktur des schwach differenzierten Adenokarzinoms war nach dreimaliger Passage von Tumorstücken von Tier zu Tier nicht mehr zu beobachten. MFE-280-Tumore zeigten in den mit 0,36 mg E₂ und mit ICI 182,780 behandelten Tumoren Anfänge von Drüsenbildung. Die Tumore von Ishikawa- und MFE-296-Zellen, die ebenfalls aus endometrialen Adenokarzinomen etabliert wurden, zeigten zu keinem Untersuchungszeitpunkt histomorphologisch drüsige Strukturen. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß mit der Xenotransplantation der untersuchten, endometrialen Adenokarzinomzelllinien und mit der Tumoradaption an die Verhältnisse im Tier ursprünglich vorhandene, histomorphologische Eigenschaften verloren gehen oder gar nicht bzw. nur unter bestimmten Bedingungen sichtbar werden. Die AE-Behandlung führte jedoch zu keiner Veränderung des Differenzierungsgrades der Tumore.

Bei Untersuchung des TSV wurde in estrogenstimulierten, ER-positiven Tumoren pathologisch-histologisch mehr Tumorgewebe als Stroma pro Fläche beobachtet. In nicht estrogenstimulierten Tumoren war das TSV in Richtung Stroma verschoben. Je geringer die estrogene Stimulierung war, desto mehr Stroma war pro Fläche vorhanden. In ER-negativen Tumoren bewirkte eine Estrogenstimulierung genau gegenteilig eine Verschiebung des TSV in

Richtung Stroma. Je geringer die estrogene Stimulierung war, desto mehr Tumorgewebe war pro Fläche sichtbar. ZK 191703 wirkte vergleichbar zu den *in vitro*- und *in vivo*-Proliferationsversuchen stärker antiestrogen als ICI 182,780. In ER-positiven Tumoren war durch die ZK 191703-Behandlung mehr Stromagewebe, in ER-negativen Tumoren mehr Tumorgewebe vorhanden. Da in keinen anderen Studien das TSV in Tumoren nach AE-Behandlung untersucht wurde, können die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht vergleichend diskutiert werden. Die Beobachtungen deuten aber auf eine estrogensensitive Proliferation des den Tumor durchsetzenden Stromagewebes hin. Da die ER-negativen Tumorzellen nicht durch Estrogene im Wachstum beeinflusst werden, entsprechend den Beobachtungen aus den *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen, wird das Wachstum der Stromazellen durch Estrogene stimuliert worden sein, so daß eine Verschiebung des TSV in Richtung Stroma zu beobachten war. Die Proliferationsrate der Tumorzellen ist höher als die der Stromazellen, da in ER-positiven Tumoren nach Estrogenstimulation das TSV nicht gleich geblieben war, sondern in Richtung Tumor verschoben war. Nach den Versuchsergebnissen zu urteilen, wirken reine AE, insbesondere ZK 191703, in ER-negativen Tumoren antiproliferativ auf die estrogensensitiven Stromazellen, in ER-positiven Tumoren jedoch stärker wachstumshemmend auf die Tumorzellen, so daß pro Fläche mehr Stroma vorhanden ist.

E.2.3 Wirkungsmechanismus reiner Antiestrogene in Endometriumkarzinomen

Um den Wirkungsmechanismus antiproliferativ wirkender, reiner AE in Endometriumkarzinomen zu evaluieren, wurden endometriale Adenokarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* nach einer AE-Behandlung auf das Auftreten von Apoptosen und auf die Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase innerhalb des Zellzyklus hin untersucht. Histologisch zeigten die *in vivo*-Tumore der Zelllinien Ishikawa und MFE-280 doppelt so viele apoptotische Zellen in den unstimulierten und in den ZK 191703-behandelten Tumoren wie in den E₂- und ICI 182,780-behandelten Tumoren. Am Durchflußzytometer wurden in Ishikawazellen nach drei Tagen 9% apoptotische Zellen bei Inkubation mit 10⁻⁸ M ZK 191703 gesehen und in ECC-1-Zellen nach sieben Tagen 4% apoptotische Zellen bei Inkubation mit 10⁻⁹ M ZK 191703. Diese Versuchsergebnisse weisen nicht auf eine durch ZK 191703 vermittelte, wachstumshemmende Wirkung auf endometriale Tumorzellen durch Apoptoseinduktion hin. Denn in der histologischen Auswertung wurde in den stark durch ZK 191703 im Wachstum inhibierten ECC-1-Tumoren keine erhöhte Apoptoserate gesehen. Aber andererseits wurden in den nicht durch ZK 191703 im Wachstum inhibierten, ER-negativen MFE-280-Tumoren apoptotische Zellen gesehen. In den Zellzyklusanalysen wurden bei der höheren ZK 191703-Konzentration von

10^{-6} M bei Ishikawazellen und bei ECC-1-Zellen keine erhöhten Apoptoseraten festgestellt — obwohl die wachstumshemmende Wirkung entsprechend den *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen mit steigender Konzentration zunahm. Die Wachstumshemmung endometrialer Adenokarzinome durch die reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 beruhte also in diesen Modellen nicht auf einer apoptoseinduzierenden Wirkung. Vergleichbare Studien am Endometriumkarzinom existieren nicht. Im Mammakarzinom wird die Wachstumshemmung durch reine AE über den Wirkungsmechanismus der Apoptoseinduktion kontrovers diskutiert. Exstirpierte Mammakarzinome wurden auf die Apoptoserate hin untersucht (Robertson et al. 2001-b). Bei ICI 182,780- und tamoxifenbehandelten Tumoren wurden keine veränderten Apoptoseraten im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren gesehen. Andererseits ergaben Untersuchungen in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine erhöhte Apoptoserate in der mit ICI 182,780 behandelten Gruppe (Diel et al. 1999). In einer Studie an MCF-7-Tumoren in Nacktmäusen wurde ebenfalls nach einer Woche eine hohe Apoptoserate in den unbehandelten und tamoxifenbehandelten Tumoren gesehen (Johnston et al. 1999). Diese Beobachtungen wurden jedoch nicht in den humanen, endometrialen Adenokarzinomzelllinien gemacht.

Die Zellzyklusanalysen am Durchflußzytometer ergaben nur für ECC-1-Zellen bei Inkubation mit 10^{-6} M ZK 191703 und ICI 182,780 in Anwesenheit von E_2 eine erhöhte Zellfraktion in der G0/G1-Phase nach 72 Stunden von 65% (0h) auf 85% und in Abwesenheit von E_2 auf 90%. Die Zellfraktion in der Synthese- und G2/M-Phase war von 10-15% auf 5-8% verringert. Diese Beobachtungen deuten auf eine G0/G1-Arretierung der Zellen durch Behandlung mit reinen AE hin. Der fehlende, hohe Zellanteil von Ishikawazellen in der G0/G1-Phase kann durch die gering vorhandene *in vitro*-Wachstumshemmung durch ZK 191703 und ICI 182,780-Inkubation erklärt werden. In der Literatur sind keine vergleichbaren Untersuchungen an Endometriumkarzinomen mit reinen AE beschrieben worden. Jedoch bestätigen einige Beobachtungen in Mammakarzinomzelllinien diese Versuchsergebnisse. In MCF-7-Zellen wurde durch die Inkubation mit Tamoxifen nach 72-96 Stunden eine auf 90% erhöhte Zellfraktion in der G0/G1-Phase beobachtet (Osborne et al. 1984). Auch bei ICI 182,780-Inkubation wurde diese Arretierung der Zellen in MCF-7-Zellen gesehen (Wilcken et al. 1996). Die Ergebnisse sprechen für denselben Wirkungsmechanismus von reinen AE in den Endometriumkarzinomen, das Wachstum durch Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase zu hemmen.

E.2.4 Effekte von Estrogen auf die Regulation von Estrogen- und Progesteronrezeptor-Expression in endometrialen Adenokarzinomen

Die Expression von ER und PgR in endometrialen Zellen wird überwiegend durch Estrogene reguliert. Hohe Konzentrationen an E₂ bewirken eine Runterregulation des ER und eine Hochregulation des PgR. Niedrige Konzentrationen an E₂ haben den gegenteiligen Effekt. Auch im Mammakarzinom ist diese estrogenregulierte ER- und PgR-Expression beobachtet worden (Horwitz and McGuire 1978). Um diese Regulation im Endometriumkarzinom zu überprüfen, wurde die Rezeptorexpression in estrogenstimulierten und in unstimulierten Ishikawa- und ECC-1-Zellen und auch –tumoren miteinander verglichen. Die Inkubation mit E₂ bewirkte in Ishikawazellen *in vitro* nach 24 Stunden eine 1,1-fach so hohe ER-Expression wie in den unstimulierten Zellen. Nach fünf Tagen war die ER-Expression in estrogenstimulierten Zellen nur noch geringgradig höher. *In vivo* wurde zum Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen proteinbiochemisch und immunhistochemisch eine zu den unbehandelten Tumoren 1,5-fach geringere ER-Expression in den estrogenbehandelten Ishikawatumoren beobachtet. Estrogenstimulierte ECC-1-Zellen exprimierten *in vitro* nach 24 Stunden zweimal und nach sieben Tagen fünfmal weniger ER als unstimulierte Zellen. *In vivo* war die ER-Expression in estrogenbehandelten ECC-1-Tumoren vergleichbar mit der ER-Expression in unbehandelten Tumoren. Die Tumore beider Zelllinien exprimierten *in vivo* bei Behandlung mit unterschiedlichen Estrogenkonzentrationen (in Pelletform) umso weniger ER je höher die Estrogenkonzentration war. Die PgR-Expression war in beiden Zelllinien Ishikawa und ECC-1 *in vitro* bei Inkubation mit E₂ nach 5-7 Tagen 7-10-fach höher als bei Inkubation ohne E₂. Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass die ER- und PgR-Expression auch in endometrialen Adenokarzinomen durch Estrogene reguliert wird. Als Erklärung für die höhere *in vitro*-ER-Expression in Ishikawazellen ist eine zeitlich verzögerte Wirkung von Estrogenen auf diese Expression zu diskutieren. Nach fünf Tagen waren schon weniger ER exprimiert als nach 24 Stunden. Nach vier Wochen war dann die ER-Expression in den estrogenstimulierten Ishikawatumoren geringer als die ER-Expression in den unbehandelten Tumoren. Diese estrogenregulierte ER- und PgR-Expression wurde auch in anderen Studien am Endometriumkarzinom (Lessey et al. 1996) und am Rattenuterus (Kraus and Katzenellenbogen 1993) beobachtet.

E.2.5 Reine Antiestrogene als selektive Estrogenrezeptor-Destabilisatoren in endometrialen Adenokarzinomen

Um die am Mammakarzinom beschriebene Eigenschaft reiner AE als selektive Estrogenrezeptor-Destabilisatoren (SERD) (DeFriend et al. 1994, Lichtner et al. 1999) am Endometriumkarzinom zu untersuchen, wurde die ER-Expression auf Proteinebene studiert. In den ER-positiven Zelllinien Ishikawa und ECC-1 wurde bei Inkubation mit den reinen AE ZK 191703 und ICI 182,780 *in vitro* konzentrationsabhängig eine verringerte ER-Expression sowohl nach 24 Stunden als auch nach 5-7 Tagen beobachtet. Proteinbiochemische und immunhistochemische Untersuchungen der *in vivo* exstirpierten Tumore bestätigten auch nach vier Wochen diese konzentrationsabhängige, verminderte ER-Expression durch Behandlung mit reinen AE. In den *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten mit Ishikawazellen wurden bei der jeweils niedrigsten, verwendeten Dosierung von ICI 182,780 (10^{-10} M *in vitro* und 3 mg/kg KG s.c.täglich *in vivo*) ER in einer Menge exprimiert, die *in vitro* 100% und *in vivo* 53% höher war als die der jeweiligen, estrogenstimulierten Kontrolle. Diese Versuchsergebnisse zeigen, daß reine AE auch in Endometriumkarzinomen als selektive Estrogenrezeptor-Destabilisatoren wirken. Die ER-Destabilisierung war bereits nach 24 Stunden zu beobachten und war nach fünf bis sieben Tagen bzw. vier Wochen immer noch vorhanden. Eine im Endometriumgewebe ER-destabilisierende Wirkung wurde auch für ICI 164,384, der Vorläufersubstanz von ICI 182,780, in der Literatur beschrieben (Gibson et al. 1991). Den Ergebnissen zufolge destabilisierten reine AE den ER innerhalb von 24 Stunden. In Mammakarzinomzellen wurden vergleichbare Resultate durch Untersuchungen mit ICI 164,384 beobachtet (Dauvois et al. 1992). Westernblotanalysen von ECC-1-Zellen, inkubiert mit 10^{-7} M ICI 182,780, zeigten ebenfalls die destabilisierende Wirkung des reinen AE (Dardes et al. 2001). Als Ursache für die hohe ER-Expression in Ishikawazellen bei Inkubation mit niedrig dosiertem ICI 182,780 ist ein dosisabhängiges *escape*-Phänomen zu diskutieren. Die Zellen exprimieren durch die ICI 182,780-Inkubation gegenregulatorisch überproportional viele ER. Dieses *escape*-Phänomen wäre auch eine Erklärung für das Wachstum der mit ICI 182,780-behandelten Ishikawatumoren über das Wachstum der estrogen- und tamoxifenstimulierten Kontrolltumore hinaus. Die in großer Menge exprimierten ER binden mehr E₂ oder Tamoxifen aufgrund des kompetitiven Verhaltens von AE gegenüber Estrogenen am ER. Dadurch werden die Tumorzellen auf transkriptionaler Ebene in ihrer Proliferation stärker stimuliert. Die nicht erhöhte ER-Expression nach 24 Stunden in Ishikawazellen zeigt, daß es sich bei diesem *escape*-Phänomen um ein zeitlich verzögertes Ereignis handelt. Auch in einer anderen klinischen Studie wurden keine SERD-Effekte durch die ICI 182,780-Behandlung beobachtet (Dowsett et al. 1995). Patientinnen vor

der Menopause wurden täglich mit 12 mg ICI 182,780 sieben Tage lang behandelt. Das exstirpierte, nicht tumorös entartete Endometriumgewebe wurde auf die Expression von ER hin untersucht. Zu anderen Beobachtungen führten Studien an Mammakarzinomen. In dieser Tumorentität wurde bei keiner Dosierung von ICI 182,780 eine erhöhte ER-Expression gesehen. Es wurde sowohl nach sieben Tagen bei 6 mg bzw. 18 mg ICI 182,780-Behandlung eine zur unbehandelten Kontrollgruppe verringerte ER-Expression in den Tumoren beobachtet (DeFriend et al. 1994), als auch nach 14-21 Tagen bei einmaliger, intramuskulärer Applikation von 50 mg, 125 mg oder 250 mg ICI 182,780 (Robertson et al. 2001-b). Westernblotanalysen von MCF-7-Tumoren nach ICI 182,780-Behandlung ergaben ebenfalls keine detektierbare ER-Expression (Dardes et al. 2002). Beim Endometriumkarzinom hingegen scheint ICI 182,780 nur in hohen Konzentrationen in der Lage zu sein, als SERD zu wirken. In niedrigen Konzentrationen hat es den umgekehrten Effekt, die ER-Expression über einen längeren Zeitraum hin zu stimulieren. Das reine AE ZK 191703 bewirkte konzentrationsabhängig eine ER-Destabilisierung bereits nach 24 Stunden und zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine ER-expressionsstimulierende Wirkung in endometrialen Adenokarzinomen, was auf eine potentere Wirkung schließen läßt.

E.2.6 Expression des Progesteronrezeptors nach Antiestrogenbehandlung in endometrialen Adenokarzinomen

Die PgR-Expression wird beim Mammakarzinom durch den E₂-ER-Komplex reguliert (Horwitz and McGuire 1978). Da jedoch unter der Einwirkung von reinen AE die ER destabilisiert werden, ist die Menge an E₂-ER Komplexen verringert. Aus diesem Grunde ist die Expression der PgR ebenfalls verringert, wie beim Mammakarzinom beschrieben wurde (DeFriend et al. 1994, Howell et al. 2000). Diese indirekte Wirkung reiner AE auf die PgR-Expression wurde am Endometrium untersucht. Unter Standardbedingungen exprimierte von den beiden ER-positiven Zelllinien Ishikawa 35 fmol PgR/mg Protein und ECC-1 235 fmol PgR/mg Protein. Nach 5-7-tägiger AE-Inkubation wurde in beiden Zelllinien Ishikawa und ECC-1 *in vitro* eine konzentrationsabhängige, verringerte PgR-Expression beobachtet. Diese PgR-Expression war bei 10⁻⁸ M-10⁻⁶ M ZK 191703 und ICI 182,780 in beiden Zelllinien der Expression in unstimulierten Zellen vergleichbar. Nach 24 Stunden war bei 10⁻⁶ M ZK 191703- und ICI 182,780-Inkubation die nach 5-7 Tagen beobachtete, verminderte PgR-Expression noch nicht festzustellen. In ECC-1-Tumoren wurde bei ZK 191703 eine um 87% und bei Tamoxifen eine um 70% verminderte PgR-Expression beobachtet, verglichen mit estrogenstimulierten Tumoren. Bei Behandlung mit ICI 182,780 war die PgR-Expression nicht verringert. Die-

se Versuchsergebnisse zeigen, daß auch im Endometriumkarzinom die PgR-Expression durch den E₂-ER-Komplex reguliert wird. Auch am Endometriumkarzinom ist eine indirekte Wirkung reiner AE auf die PgR-Expression zu diskutieren. In anderen Studien wurde ebenfalls diese Regulation der PgR-Expression durch Estrogene am Endometriumkarzinom beobachtet (Gottardis et al. 1988, Kraus and Katzenellenbogen 1993, Satyaswaroop et al. 1987). Untersuchungen an Ishikawazellen ergaben auch eine geringe PgR-Expression durch die Inkubation der Zellen mit ICI 164,384, der Vorläufersubstanz von ICI 182,780 (Jamil et al. 1991). Die in beiden Zelllinien beobachtete AE-konzentrationsabhängige, verminderte PgR-Expression weist auf die Eigenschaft reiner AE hin, kompetitiv an den ER zu binden. In Anwesenheit geringer AE-Mengen binden auch mehr Estrogene an den ER als in Anwesenheit hoher AE-Mengen. Die Versuchsergebnisse mit ECC-1-Zellen in Abwesenheit von E₂ bestätigten diese Eigenschaft. Ohne Estrogeninkubation wurde in ECC-1-Zellen in derselben, niedrigen Konzentration an reinen AE eine geringere PgR-Expression beobachtet als mit Estrogeninkubation. Weiterhin war in Ishikawa- und ECC-1-Zellen durch Inkubation mit den reinen AE nach 24 Stunden die PgR-Expression nicht auf die Werte gesunken, die nach fünf bis sieben Tagen beobachtet wurden. Diese Versuchsergebnisse lassen sich durch eine indirekte Wirkung reiner AE auf die PgR-Expression erklären. Zu Versuchsbeginn haben auch Estrogene an die ER gebunden und aktivierten so auf transkriptionaler Ebene die PgR-Expression. Kompetitiv an den ER bindende, reine AE destabilisierten den ER, so daß zeitverzögert keine E₂-ER-Komplexe mehr vorhanden waren, um die PgR-Expression zu induzieren. Als Ursache für die hohe PgR-Expression in ECC-1-Tumoren nach ICI 182,780-Behandlung ist wiederum das *escape*-Phänomen in Bezug auf eine höhere ER-Expression zu diskutieren. Denn diese hohe ER-Expression führt auch zu mehr E₂-ER-Komplexen, die die PgR-Expression induzieren. Die weniger verringerte PgR-Expression in tamoxifenbehandelten ECC-1-Tumoren im Vergleich zu den mit ZK 191703 behandelten Tumoren ist mit einer antiestrogenen Wirkung, aber fehlenden ER-destabilisierenden Wirkung zu diskutieren. Auch nach einer Zeitverzögerung aktivieren E₂-ER-Komplexe die Transkription des PgR. In anderen Arbeiten wurde jedoch nach Behandlung mit Tamoxifen eine im Vergleich zur E₂-Kontrolle verstärkte PgR-Expression beobachtet (Gottardis et al. 1988, Satyaswaroop et al. 1984). Deshalb wird diskutiert, Tamoxifen in einer Kombinationstherapie mit Progesteronen bei Endometriumkarzinomen einzusetzen (White et al. 1993, Zaino et al. 1985). Die in der Progesterontherapie aufgrund Ligandenüberschuß runterregulierten PgR sollen durch die Kombination mit Tamoxifen wieder exprimiert werden. Dadurch wird eine bessere Ansprechbarkeit der Endometriumkarzinome auf Progesteron erwartet. Die Versuchsergebnisse dieser Arbeit deuten nicht

auf eine derartige Wirkung hin. Im Gegensatz dazu weisen die durchgeführten Untersuchungen darauf hin, daß reine AE für eine Kombinationstherapie mit Progesteron ungeeignet sind. Beide reinen, steroidalen AE ZK 191703 und ICI 182,780 senken die E₂-ER-induzierte PgR-Expression durch Destabilisierung des ER.

E.2.7 Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors nach Antiestrogenbehandlung in endometrialen Adenokarzinomen

Studien in Mammakarzinomen ergaben eine negative Korrelation für die Expression von ER und EGFR (Fitzpatrick et al. 1984, Sainsbury et al. 1985). Um eine negative Korrelation zwischen ER und EGFR auch im Endometriumkarzinom zu evaluieren, wurde die EGFR-Expression proteinbiochemisch in den ER-positiven Zelllinien Ishikawa und ECC-1 und in den ER-negativen Zelllinien MFE-296, MFE-319, MFE-280 und KLE untersucht. Von den ER-positiven Zelllinien exprimierte Ishikawa 518 fmol EGFR/mg Protein und ECC-1 26 fmol EGFR/mg Protein. In den ER-negativen Zelllinien wurde eine unterschiedliche EGFR-Expression beobachtet. MFE-319 exprimierte 1629 fmol EGFR/mg Protein, MFE-280 59 fmol EGFR/mg Protein und KLE 146 fmol EGFR/mg Protein. MFE-296 exprimierte keine proteinbiochemisch detektierbaren EGFR. In Ishikawazellen wurde im Vergleich zu den Kontrollen keine veränderte EGFR-Expression nach Inkubation mit den reinen AE beobachtet. In ECC-1-Zellen war die EGFR-Expression nach Inkubation mit den reinen AE vergleichbar mit der Expression in den unstimulierten Zellen. Estrogenstimulierte und mit 10⁻⁶ M ZK 191703 behandelte Zellen exprimierten weniger EGFR bzw. keine im EGFR-EIA detektierbaren Rezeptoren. Aufgrund der nicht vorhandenen, moderaten, aber auch hohen EGFR-Expression in ER-negativen, endometrialen Adenokarzinomzellen ist auf keine Korrelation zwischen ER- und EGFR-Expression in diesen Zellen zu schließen. Die EGFR-Expression der ER-positiven Ishikawazellen bestätigt diese Schlußfolgerung, da in diesen Zellen die EGFR-Expression trotz ER-Expression nicht geringer war als in ER-negativen Zellen. Ebenso zeigten die mit den ER destabilisierenden, reinen AE inkubierten Ishikawazellen keine Veränderung in der EGFR-Expression. Die geringe EGFR-Expression in den estrogenstimulierten ECC-1-Zellen weist im Vergleich zu der hohen EGFR-Expression in den unstimulierten Zellen ebenfalls nicht auf eine negative ER-EGFR-Korrelation hin. Denn in dieser Arbeit wurden in ECC-1-Zellen genau umgekehrt mehr ER in den unstimulierten als in den estrogenstimulierten Zellen beobachtet. Die Versuchsergebnisse stehen also kontrovers zu den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen an endometrialen Klinikmaterial (Llorens et al. 1989, Wang et al. 1993). In dieser Studie wurde eine negative Korrelation zwischen ER und EGFR beobachtet. Die Er-

gebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Befunden anderer Gruppen überein, die einen Zusammenhang zwischen ER und EGFR ausschließen (Khalifa et al. 1994, Niikura et al. 1995, Zarcone et al. 1995). Denn die Behandlung mit den reinen AE hatte in diesen Modellen keine Wirkung auf die EGFR-Expression.