

Aus der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. Janni

# **Östradiol vermittelte Effekte auf die Proliferation östrogenrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Mareike Keiser

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. med. Bauerschmitz

Korreferent: Prof. Dr. med. Stoecklein

**Meinen Eltern**

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Östradiol	3
1.1.1	Klassischer Östrogenwirkmechanismus	4
1.1.2	Nicht-genomischer Wirkmechanismus von Östradiol	6
1.2	Tamoxifen	8
1.3	MEK-Inhibitor (PD98059)	10
1.4	Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	11
1.5	Das Thema der Dissertation	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Materialien	13
2.1.1	Bezugsquellen	13
2.1.2	Zelllinie MCF-7 (ATCC HTB 22)	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Zellkultur	14
2.2.2	Proliferationsassays	17
2.3	Statistische Auswertung	19
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Etablierung von Zellkulturbedingungen zum Nachweis einer östradiolabhängigen Zellproliferation	22
3.1.1	Zelladhaerenz und Konfluenz	22
3.1.2	Aussaat-Dichte	23
3.2	MTS-Proliferationsassays	24
3.2.1	Etablierung der Stimulationsbedingungen und des Stimulationsablaufes	24
3.2.2	Etablierung des MTS-Proliferationsassays	25
3.2.3	Definitionen	27
3.2.4	Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	29
3.2.5	Östradiol (E <sub>2</sub> )	31
3.2.6	Tamoxifen	34
3.2.7	E <sub>2</sub> + Tamoxifen	38
3.2.8	MEK-Inhibitor (PD98059)	40
3.2.9	E <sub>2</sub> + MEK-Inhibitor (PD98059)	42
3.2.10	MEK-Inhibitor 23 µM + Tamoxifen	45

---

3.2.11	MEK-Inhibitor 23 $\mu$ M + Tamoxifen + E <sub>2</sub> .....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
4.1	Etablierung der optimalen Zellkulturbedingungen.....	53
4.2	Auswirkung von Östradiol, EGF, Tamoxifen, MEK-Inhibitor und deren Kombinationen auf die Proliferation von Östrogenrezeptor-positiven MCF-7 Mammakarzinomzellen .....	54
4.2.1	Stimulation von MCF-7 Zellen mit Östradiol (E <sub>2</sub> ).....	54
4.2.2	Stimulation von MCF-7 Zellen mit Tamoxifen in Ab- und Anwesenheit von Östradiol .....	55
4.2.3	Stimulation von MCF-7 Zellen mit MEK-Inhibitor (PD98059) in Ab- und Anwesenheit von Östradiol .....	58
4.2.4	Stimulation von MCF-7 Zellen mit MEK-Inhibitor (PD98059) und Tamoxifen in Ab- und Anwesenheit von Östradiol .....	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>82</b>

## 1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich 57.970 Frauen an Brustkrebs (Zahlen der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V., 2006). Etwa jede 9. Frau entwickelt im Lauf ihres Lebens ein Mammakarzinom. Das Mammakarzinom ist die dritthäufigste Krebsart der Welt (nach Lungen- und Magenkrebs) und die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Bei Frauen zwischen dem 35. und 55. Lebensjahr ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache. Diese Zahlen machen die Relevanz der Notwendigkeit von Forschungsarbeiten im Bereich Brustkrebs, sowohl zur Verbesserung der Lebensqualität, als auch der Überlebensrate für Frauen mit Mammakarzinom deutlich.

Das Mammakarzinom ist eine maligne Erkrankung und geht in 85-90% vom Epithel der Milchgänge, der Ductus oder terminalen Ductuli, aus (duktales Karzinom). 10-15 % entwickeln sich aus dem Epithel der Lobuli (lobuläres Karzinom). Neben den invasiven Formen existieren ebenfalls nicht invasive Frühformen, man spricht von einem duktalem Karzinoma *in situ*, bzw. einem Karzinoma lobulare *in situ*. Hier ist die Basalmembran noch intakt.

Die genaue Ätiologie des Mammakarzinoms ist noch ungeklärt. Ein Zusammenspiel von endogenen und exogenen Faktoren scheint ursächlich für die Entstehung des Brustkrebs zu sein. Der wichtigste Risikofaktor ist das weibliche Geschlecht (Frau : Mann = 135 : 1). Des weiteren zählt zu den endogenen Risikofaktoren die genetische Disposition (z.B. die Mutation der BRCA-1, BRCA-2-Tumorsuppressorgene), fortschreitendes Alter, ein vorausgegangenes Karzinom und ein dichter Drüsenkörper. Zu den exogenen Faktoren zählen Umwelteinflüsse und Lebensgewohnheiten. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 79% (Angabe des deutschen Krebsregisters).

Für das Mammakarzinom existieren zahlreiche Prognose- und Prädiktivfaktoren. Zu den etablierten Prognosefaktoren zählen Alter, Tumorgröße, histologischer Tumortyp, TNM-Klassifikation, sowie der Hormonrezeptorstatus. Neuere Prognosefaktoren beziehen sich auf die Bestimmung der Proliferationsbereitschaft (Mitose-Index, S-Phase, Ki-67, MIB, PCNA, TLI), der Zellwachstums- und der Differenzierungsfaktoren (EGF, IGF1, IGF2, pS2, TSP),

der Invasionsfähigkeit (Cathepsin D, B, L, uPA, PAI-1), der Adhäsionsmoleküle (Chemokine, Ep-CAM, CD-44-kodierte Glykoproteine, E-Cadherin, Lamininrezeptor), sowie Faktoren der Angiogenese (VEGF), der Apoptose (TNF, FasI, TRAIL, bcl-2, bax) und die Bestimmung der Onkogene und Tumorsuppressorgene (p53, c-myc, BRCA-1, BRCA-2). Zu den Prädiktivfaktoren gehören der Hormonrezeptorstatus (Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor), sowie die Bestimmung des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2-Protoonkogenes, des nukleären Proliferationsmarkers Ki67, die Tumorgröße und der Lymphknotenbefall (Schneeweiss, 2009).

Die Therapie des Mammakarzinoms besteht aus drei Säulen: der Operation, Bestrahlung und medikamentösen Therapie. Die Art des therapeutischen Vorgehens hängt von der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und den prognostischen sowie prädiktiven Faktoren ab. Die Operation ist weiterhin, von wenigen Ausnahmen abgesehen, die Hauptsäule des therapeutischen Vorgehens. In den letzten Jahren wurde jedoch von radikalen operativen Eingriffen immer mehr Abstand genommen. Die Rolle der medikamentösen Therapie hingegen hat zugenommen. Sie umfasst die Chemotherapie, endokrine Therapie, Verabreichung von Antikörpern (Trastuzumab) und Immunmodulatoren (Interferone, Interleukine).

Der Ursprungsort des Mammakarzinoms ist meist das Epithel der Ductus, Ductuli und Lobuli. Es wird durch die Steroidhormone Östrogen und Progesteron beeinflusst. Östrogen führt zu einer Steigerung der Zellteilung und Proliferation der Epithelzellen und spielt somit auch in der Genese des Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle. Ziel der endokrinen Therapie ist es, das Wachstum des Tumors und das Rezidivrisiko zu verringern. Eine Östrogen- und / oder Progesteronrezeptor Expression ist die Grundvoraussetzung für eine endokrine Therapie. Zur endokrinen Therapie zählt die Verabreichung von Hormonen (GnRH-Analoga, Gestagen), selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), Aromatasehemmern oder reinen ER-Antagonisten (Fulvestrant). Meist geht der endokrinen Therapie eine Chemotherapie voraus. Das bewährteste Medikament in der endokrinen Therapie ist das Tamoxifen. Es kommt seit 35 Jahren

erfolgreich zum Einsatz. Bei prämenopausalen Patientinnen mit positivem Rezeptorstatus ist es heutzutage das Medikament der ersten Wahl. Es wird in einer Dosierung von 20 mg täglich über 5 Jahre verabreicht. Bei postmenopausalen Frauen wurde es zunehmend durch die Aromataseinhibitoren der 3. Generation (Anastrozol, Letrozol, Exemestran) verdrängt. Sie unterbrechen die Östrogensynthese, indem sie die Aromatase hemmen. Diese ist in der Lage aus androgenen Precursor-Substanzen Östrogen zu generieren. (C. Crohns *et al.*, 2009)

### 1.1 Östradiol

17 $\beta$ -Östradiol (E<sub>2</sub>) ist die aktivste Form der Östrogene. Es gehört zur Familie der lipophilen Steroidhormone und ist das wichtigste weibliche Geschlechtshormon. Es ist wichtig für die Ausbildung der weiblichen Geschlechtsmerkmale, den monatlichen Aufbau des Endometriums und das Knochenwachstum. Östradiol wird bei der Frau von den Ovarien (Graaf-Follikel, Corpus luteum) und der Plazenta gebildet. Die Östradiol-Ausschüttung wird durch den Hypothalamisch-hypophysären-ovariellen Regelkreis gesteuert und ist zyklusabhängig. Über das Blut erreichen die Hormone ihren Wirkungsort und durch Diffusion gelangen sie in die Zielzellen. Dort binden sie nach dem klassischen Modell an intrazelluläre Rezeptoren der Steroidrezeptor-Superfamilie und entfalten schließlich ihre Wirkungen.

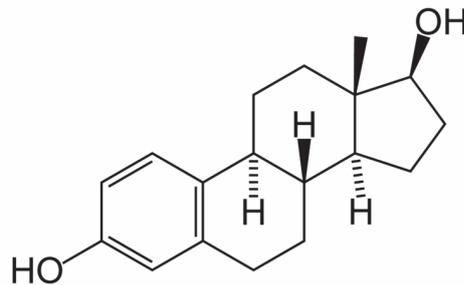


Bild 1.1 Strukturformel von Östradiol

### 1.1.1 Klassischer Östrogenwirkmechanismus

Der klassische Östrogenwirkmechanismus wird über einen intrazellulären Östrogen-Rezeptor (ER) vermittelt. Dieser Rezeptor ist, wie alle Steroidhormonrezeptoren ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor.

Östradiol diffundiert in die Zelle und bindet an den zytoplasmatischen Heat-shock-Protein (HSP)-gebundenen Östrogenrezeptor. Die Bindung von Östradiol induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors mit nachfolgender Dissoziation der HSP vom ER. Die anschließende Homo- und Heterodimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors (Hall und McDonell, 1999; Osborne und Schiff, 2005) ermöglicht die nukleäre Translokation des Östrogenrezeptors. Der aktivierte Östrogenrezeptor-Komplex bindet an seine spezifische Ziel-DNA, die östrogenresponsiven Elemente in der Promotorregion der Zielgene. Nach erfolgter DNA-Bindung stimuliert der an Koaktivatoren gebundene Rezeptor die Aktivität der Transkriptionsmaschinerie im Bereich der TATA-Box und steigert so die Transkription der Zielgene (Beato *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995).

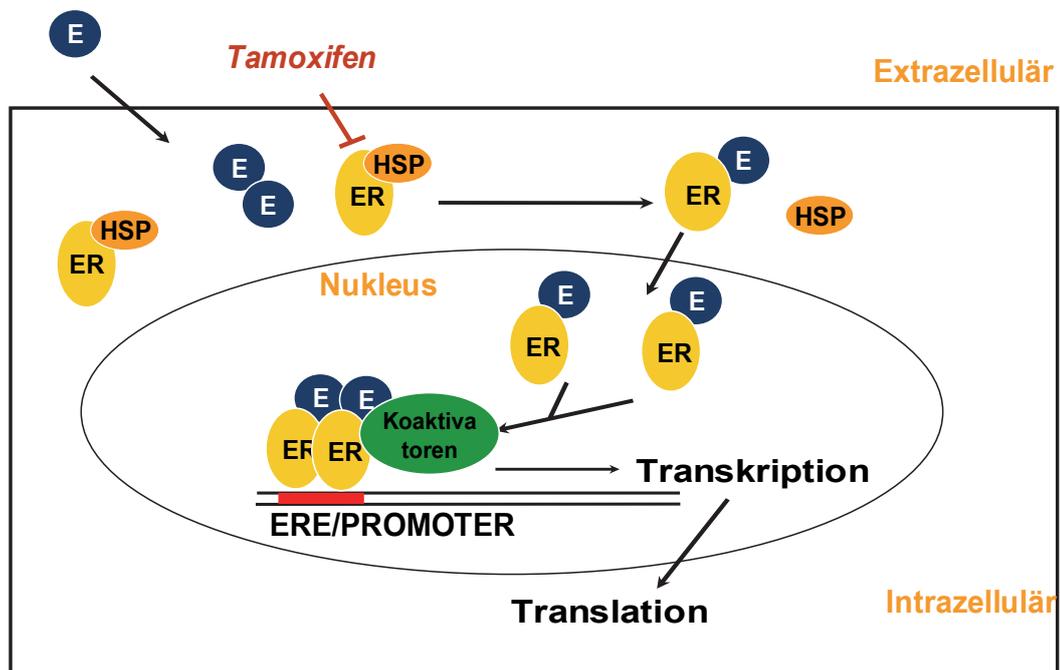


Bild 1.2 Modell des klassischen Östrogenwirkmechanismus (modifiziert nach Beckmann M.W. *et al.*: Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde. 1.Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 2001)

Man unterscheidet einen klassischen Östrogenrezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ . Der ER- $\beta$  ist ein Isotyp des ER- $\alpha$ . Der aktivierte ER- $\alpha$  hat vor allem eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung. Der ER- $\beta$  kann die ER- $\alpha$  vermittelte Östrogenwirkung antagonisieren. Die Bindung von Östrogen an ER- $\beta$  mindert in vielen Fällen die zelluläre Proliferation und wirkt pro-apoptotisch (Mitter *et al.*, 2005). Der ER- $\alpha$  fungiert als Aktivator der Transkription, während ER- $\beta$  auch in der Lage ist die Transkription zu reprimieren (Gustafsson, 1999). In der gesunden Brust dominiert der ER- $\beta$ . Er kontrolliert die proliferative Wirkung des ER- $\alpha$ . Bei der Entwicklung von Hyperplasien und in der Karzinogenese kommt es zu einem Verlust des ER- $\beta$  (Roger *et al.*, 2001).

Die Bindungsaffinität von Östradiol an ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  ist vergleichbar (Kuiper *et al.*, 1997). Die beiden ER werden gewebespezifisch exprimiert. Der ER- $\beta$  wird überwiegend im Ovar, in den Knochen, im Immun- und Kardiovaskulärsystem, sowie im zentralen Nervensystem exprimiert, der ER- $\alpha$  überwiegt im Uterus und

in der Leber. Eine Koexistenz von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  konnte in der Mamma, im Ovar und im ZNS gezeigt werden.

### 1.1.2 Nicht-genomischer Wirkmechanismus von Östradiol

Die Wirkung von Steroidhormonen entfaltet sich nach dem klassischen Modell durch die Bindung an den intrazellulären Hormonrezeptor und die anschließende Regulation der Transkription spezifischer Gene im Zellkern. Die aus neusynthetisierter mRNA hergestellten Genprodukte, die Östradiol-abhängigen Proteine, bewirken die genomische Antwort. Dieser Vorgang spielt sich in einem Zeitrahmen von mehreren Stunden ab.

In den letzten Jahren traten jedoch mehrere Hinweise auf eine nichtgenomische Wirkung der Steroide auf. So wurde beobachtet, dass es bereits wenige Sekunden oder Minuten nach der Stimulation mit einem Steroid zu einer Wirkung kommen kann, ein Zeitfenster welches für die genomische Wirkung deutlich zu eng ist. Des Weiteren sind diese Effekte durch Faktoren, welche die Proteinsynthese hemmen, z. B. Actinomycin D (Transkriptioninhibitor) oder Cycloheximid (Proteinsyntheseinhibitor), nicht unterdrückbar. Die nichtgenomischen Effekte des Östradiols sind vor allem durch seine Wirkung auf Komponenten der Signaltransduktionswege gekennzeichnet. Sie führen oft zu der Bildung intrazellulärer Second messenger und zu einer Veränderung der Aktivität von Mitogen-Activated Protein Kinasen (MAPKs), Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) und einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Über diese schnellen Effekte auf Signaltransduktionswege ist es ebenso möglich die Genexpression zu beeinflussen.

Die Existenz eines an der Plasmamembran lokalisierten Östrogen-Rezeptors (ER) und die Bedeutung der zytoplasmatischen ER-Effekte sind inzwischen weitgehend anerkannt und wird durch eine Vielzahl experimenteller Arbeiten belegt (Kelly und Levin, 2001; Song und Santen, 2006). In Hinblick auf die Therapie des Mammakarzinoms liefern diese Erkenntnisse möglicher Weise neue therapeutische Angriffspunkte.

Eine besondere Rolle spielt der Signaltransduktionsweg der MAPK. Dieser Signalweg wird durch zahlreiche Wachstumsfaktoren aktiviert, z.B. EGF, IGF-1. Die Bindung eines seiner Liganden führt zur Autophosphorylierung des Transmembranrezeptors. Anschließend phosphoryliert er das Adapterprotein Shc. Dies führt zu einer Wechselwirkung zwischen Shc, Grb2 und SOS (Son of sevenless, Guanin Nukleotid austausch Faktor). SOS katalysiert schließlich die Aktivierung des Ras-Onkogens, welches als G-Protein funktioniert und in inaktivem Zustand an der Innenseite der Zellmembran an GDP gebunden ist. Im Rahmen der Aktivierung wird das GDP in GTP umgewandelt. Das GTP-gebundene Ras-Onkogen aktiviert die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), welche über die Zwischenstufe der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) schließlich die MAP-Kinasen aktiviert (Collins und Webb, 1999, Santen *et al.*, 2002). Die aktivierten MAP-Kinasen translozieren nun in den Zellkern und aktivieren Transkriptionsfaktoren. Schließlich mündet die Kaskade in die Expression bestimmter Zielgene, welche u.a. zu einer Zellproliferation führen (siehe Bild 1.3). Es konnte nachgewiesen werden, dass auch Östradiol zu einer schnellen Aktivierung der MAPK führt (Migliaccio *et al.*, 1996). In Mammakarzinomen konnte eine erhöhte Aktivität der MAPK nachgewiesen werden.

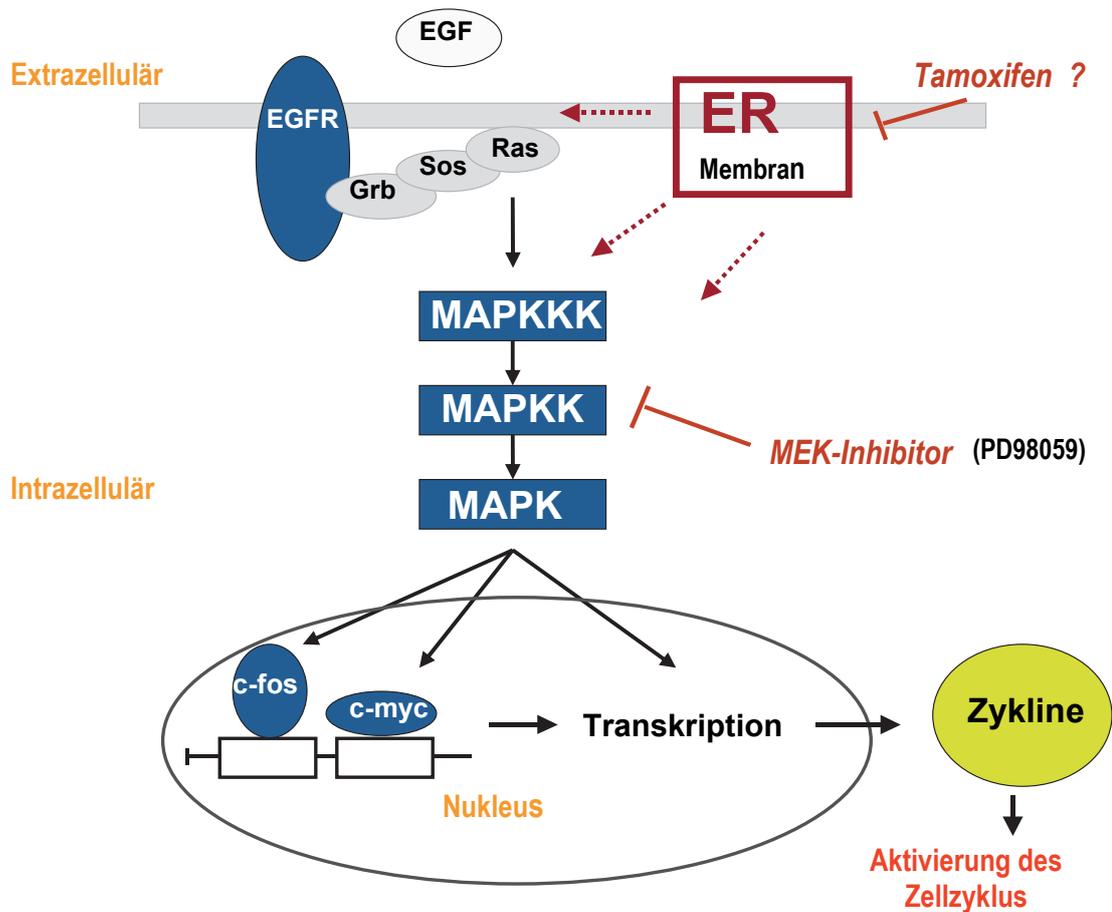


Bild 1.3 Modell des nichtgenomischen Östrogenwirkmechanismus. Eine wichtige Rolle im Signalweg des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und des nichtgenomischen Östrogenwirkmechanismus spielen die MAPK (Mitogen-activated Proteinkinasen). Auf welche Weise und genau an welchem Ort der membranständige Östrogenrezeptor in den Signalweg der MAPK eingreift bleibt noch endgültig zu klären. Ebenso ist noch ungeklärt inwiefern Tamoxifen nicht nur den klassischen, sondern auch den alternativen Östrogenrezeptor blockiert

## 1.2 Tamoxifen

Tamoxifen hat sich seit 35 Jahren in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms bewährt. Es zählt zu den Selektiven-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) und hat eine hohe Gewebespezifität. Es ist ein selektiver Antagonist am ER und blockiert somit die periphere Wirkung von Östrogenen. Durch die Bindung an den intrazellulären ER unterbindet Tamoxifen die Expression östrogenregulierter Gene und hemmt somit die Zellproliferation. Eine

geringe agonistische Aktivität ist jedoch vorhanden (Harper *et al.*, 1967). Diese wird durch ein unterschiedliches Bindungsverhalten am  $\alpha$ - und  $\beta$ -ER erklärt.

Tamoxifen gehört zur Gruppe der Triphenylethylene.

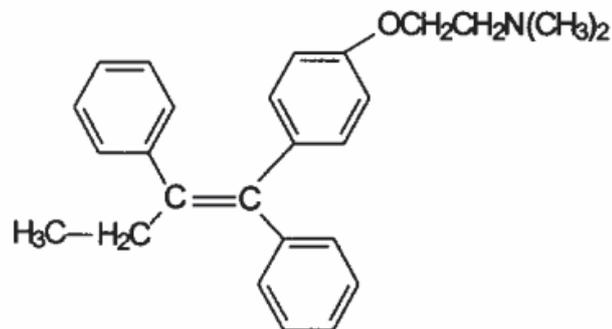


Bild 1.4 Strukturformel von Tamoxifen

Tamoxifen ist auch heute noch das Mittel der ersten Wahl in der endokrinen Therapie ER-positiver, prämenopausaler Patientinnen. Es senkt das relative Rezidivrisiko um 45% und verringert die Mortalitätsrate um 32% (C.Crohns *et al.*, 2009). In der Therapie postmenopausaler Patientinnen wird es zunehmend durch Aromataseinhibitoren der 3. Generation verdrängt, da diese eine höhere Effektivität bezüglich der rezidivfreien Zeit und weniger therapiebedingte schwere Nebenwirkungen aufweisen als Tamoxifen. Die gebräuchliche Dosierung des Tamoxifen beträgt 20 mg täglich und wird über 5 Jahre verabreicht. Es wird nach oraler Applikation gut resorbiert, extensiv in der Leber metabolisiert und über den Darm ausgeschieden. Die Behandlung mit Tamoxifen ist normalerweise gut verträglich. Allerdings können auch bei dieser Therapie Nebenwirkungen auftreten. Diese ähneln, durch den antiöstrogenen Effekt bedingt, in den meisten Fällen denen der Wechseljahre. Zu den wichtigsten Nebenwirkungen zählen Hitzewallungen (häufigste Nebenwirkung), vaginale Probleme, atrophe Kolpitis, erhöhtes Risiko für tiefe Venenthrombosen

und pulmonale Embolien, Depression bei 1 % der Frauen (Robinson *et al.*, 1996; Day *et al.*, 1999), irreguläre Menstruation, Gewichtszunahme, erhöhte Leberwerte, leichte Übelkeit, milde Thrombozytopenie und Leukopenie, sowie ein erhöhtes Risiko für die Induktion eines Endometriumkarzinoms aufgrund der östrogenen Effekte von Tamoxifen (EBCTC-Group, 1996; Barakat, 1996;1998). Eine positive Nebenwirkung des Tamoxifens ist, dass der Verlust der Knochendichte bei postmenopausalen Frauen vermieden werden konnte (Love *et al.*, 1992; Marttunen *et al.*, 1998).

### **1.3 MEK-Inhibitor (PD98059)**

Der MEK-Inhibitor PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone) ist ein äußerst selektiver, zellpermeabler Inhibitor der beiden MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK), MEK1 und MEK2 (siehe Bild 1.3). Er hemmt die Aktivierung der MAPKK und unterbindet somit die Phosphorylierung der MAP-Kinase (MAPK). Da über den Signaltransduktionsweg der MAPK die Wirkung zahlreicher wachstumsfördernder Substanzen (z.B. EGF, IGF-1) vermittelt wird, hat der MEK-Inhibitor eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation. Auch der nichtgenomische Wirkmechanismus von Östradiol wird über die MAPK vermittelt (Migliaccio *et al.*, 1996). Somit kann die These aufgestellt werden, dass durch den Einsatz des MEK-Inhibitors die schnellen Östrogeneffekte und schließlich auch die Zellproliferation gehemmt werden. Die nähere Betrachtung der Auswirkung des MEK-Inhibitors auf die Zellproliferation von Mammakarzinomzellen ist Bestandteil dieser Arbeit.

#### 1.4 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

Der Epidermale Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor, EGF) führt über die Stimulation des membranständigen EGF-Rezeptors zu einer Förderung der Zellproliferation. Der EGF-Rezeptor (EGFR) ist ein Tyrosinkinaserzeptor. Er besitzt eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne und eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne. Nach Bindung eines Liganden, z.B. EGF, kommt es zu einer Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne mit nachfolgender Autophosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren schließlich als Bindungsstelle für weitere Signalmoleküle und somit kommt es zu einer Amplifikation des Ursprungssignals im Zytoplasma. Anschließend können verschiedene weitere Signalkaskaden aktiviert werden. Diese variieren je nach Zellart und regulieren die Zellproliferation, die Differenzierung und das Überleben der Zellen. In Tumorzellen sind sie häufig dysreguliert.

Dabei ist eine der wichtigen Signaltransduktionen die Aktivierung der MAPK (Mitogen-activated-protein-kinasen) über das Ras-Onkogen (siehe Bild 1.3).

Bei Mammakarzinomen kommt es häufig zu einer Überexpression des EGFR (Morris, 2002; Geschwind *et al.*, 2004), ebenso beim Prostata-, Colon-, Larynx-, nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom und Glioblastomen. Die Überexpression des EGFR geht mit einer schlechten Prognose einher. Einer der bekanntesten Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist der Her2/Neu-Rezeptor. Er ist der Angriffspunkt für die Therapie mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper, welcher den Her2/Neu-Rezeptor blockiert.

Des Weiteren existieren Hinweise auf eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem klassischen ER und der membranständigen EGFR in Mammakarzinomzellen. Diese Interaktion der beiden Rezeptoren führt zu einer gegenseitigen Verstärkung der Östradiol- bzw. EGF-Wirkung und somit zu einer Zunahme der Zellproliferation (Levin, 2003).

## 1.5 Das Thema der Dissertation

In Deutschland erkranken jährlich ca. 58.000 Frauen an Brustkrebs. Diese Zahl verdeutlicht die dringliche Notwendigkeit zur Intensivierung von Forschungsarbeiten im Bereich des Mammakarzinoms, zur Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität von Patientinnen mit Brustkrebs. Im Rahmen dieser Dissertation sollen grundlegende Einflussfaktoren auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen untersucht werden. Hierzu zählt die Etablierung von reproduzierbaren Zellkulturbedingungen, welche zu einer möglichst hohen  $E_2$ -abhängigen Zellproliferation der MCF-7-Mammakarzinomzellen führen. Darauf aufbauend wurde die Wirkung von verschiedenen Östradiolkonzentrationen ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ M) auf die Zellproliferation der Mammakarzinomzellen beschrieben, ebenso wie die Auswirkung von Tamoxifen, MEK-Inhibitor und der Kombination von Tamoxifen und MEK-Inhibitor auf die *in vitro* Proliferation von Brustkrebszellen. Die Zellproliferation wurde mittels optischer Dichte durch das Nicht-Radioaktive-Zell-Proliferations-Assay ermittelt. Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mittels Excel und SPSS. Die Wirkmechanismen insbesondere von Östradiol und Tamoxifen auf Mammakarzinomzellen werden sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* bei wissenschaftlichen Arbeiten meist als gegeben vorausgesetzt, ohne die verschiedenen möglichen Wirkmechanismen zu differenzieren. Die Untersuchung der Auswirkung des MEK-Inhibitors PD98059 auf die Zellproliferation von Mammakarzinomzellen beschäftigt sich mit einem neueren Ansatz in der Brustkrebsforschung. Er hemmt die Signalkaskade des nichtgenomischen Östrogenwirkmechanismus indem er die Aktivierung der MAPK inhibiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Bezugsquellen

##### Zellkultur

Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot	Gibco
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) ohne Phenolrot	Gibco
Minimum Essential Medium (MEM) mit Phenolrot	Gibco
Minimum Essential Medium (MEM) ohne Phenolrot	Gibco
Ham´s F-10 Medium	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA
Pferdeserum	Sigma
Gentamycin	Gibco
Hydrocortison	Sigma
Insulin	Novo Nordisk
L-Glutamin	Gibco
Vitamine	Gibco
Phosphate Buffered Serum (PBS)	PAA
Trypanblau	Gibco
Trypsin	Gibco

##### Stimulation / Proliferationsassays

Epidermal growth factor (EGF)	Invitrogen
Ethanol	Merck
MEK-Inhibitor PD98059	Calbiochem

Zell-Proliferations-Assay	Promega
Östrogen (E <sub>2</sub> )	Sigma
Tamoxifen	Sigma

### 2.1.2 Zelllinie MCF-7 (ATCC HTB 22)

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Migliaccio zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine humane östrogenrezeptorpositive Zelllinie. Diese Zelllinie wurde durch „American Type Culture Collection“ (ATCC) folgendermaßen charakterisiert: Sie wurde von H.D. Soule nach Punktion eines Pleuraergusses bei einer 69 Jahre alten, kaukasischen Frau mit Mammakarzinom isoliert (Soule *et al.*, 1973).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Es wurde grundsätzlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet um Kontaminationen zu vermeiden. Die verwendeten Medien wurden steril geliefert und die Materialien vor Gebrauch autoklaviert (121°C, 100 kPa für 25 min) oder trockensterilisiert (200°C über Nacht). Gearbeitet wurde an einer sterilen Werkbank (Lamin Air HV 2448, Heraeus).

#### Kulturmedien und Zusätze

##### Zur Kultivierung der Zellen:

DMEM phenolrothaltig oder phenolrotfrei (500 ml) mit folgenden Zusätzen:

- 10 % FCS
- 1 % L-Glutamin
- 0,1 % Gentamycin (10 mg / ml)
- 188 µl Hydrocortison ( 10 µg / ml)
- 30 µl Insulin (1 : 10 Verdünnung)

MEM phenolrothaltig oder phenolrotfrei (500 ml) mit folgenden Zusätzen:

- 10 % FCS
- 1 % L-Glutamin
- 0,1 % Gentamycin (10 mg / ml)
- 1 % Vitamine

Ham's F-10 Medium (500 ml) mit folgenden Zusätzen:

- 4 % FCS
- 12,5 % Pferdeserum

#### **Für die Proliferationsassays:**

DMEM phenolrotfrei (500 ml) mit folgenden Zusätzen:

- 10 % charcoal stripped fetal calf serum (CSFCS)
- 0,1 % Gentamycin (10 mg / ml)

MEM phenolrotfrei (500 ml) mit folgenden Zusätzen:

- 10 % charcoal stripped fetal calf serum (CSFCS)
- 0,1 % Gentamycin (10 mg / ml)
- 

Alle Medien wurden bei 8°C aufbewahrt und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

#### **Kultivierung und Passagierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 550 und 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-one), mit 20 bzw. 10 ml Nährmedium. Inkubiert wurden die Zellen in einem Begasungsschrank (Heraeus) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Zweimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel. Direkt vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80 – 90 % erreicht, wurden sie passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das

PBS wieder entfernt und die adhärennten Zellen mit 5 ml einer 1 : 10 verdünnten Trypsin-PBS-Lösung (Trypsin: Trypsin-EDTA, 0,5 % Trypsin, 5,3 mM EDTA-4Na) versetzt und bei 37°C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach spätestens 5 Minuten hatten sich die Zellen abgelöst. Falls nötig wurde dem Ablösungsprozess durch leichtes Beklopfen der Flasche nachgeholfen. Nun wurden 5 ml Medium hinzupipettiert um das Trypsin zu inaktivieren. Die 10 ml Zelllösung wurden in ein 15 ml Geweberöhrchen (Greiner) überführt und bei 1000 Upm für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus Megafuge I.OR). Anschließend wurde der Mediumüberstand verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml Medium resuspendiert und durch mehrfaches Aufziehen mit einer Kanüle (Becton Dickinson) vereinzelt.

Nun wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension versetzt und anschließend in die Zählkammer überführt. Es wurden vier Gruppenquadrate ausgezählt. Der Zelltiter (n) wurde mit folgender Formel berechnet (ausgezählte Fläche: 4 x 0,04 mm<sup>2</sup>, Kammertiefe: 0,1 mm, Verdünnung: 0,5):

$$\frac{\text{gezählteZellen}}{\text{ausgezählteFläche}(\text{mm}^2) \times \text{Kammertiefe}(\text{mm}) \times \text{Verdünnung}} = n$$

$$\frac{\text{gezählteZellen}}{0,16\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} \times 0,5} = n \Rightarrow \frac{\text{gezählteZellen}}{8 \times 10^{-6} \text{ml}} = n$$

Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Anschließend wurde die entsprechende Zellmenge in eine neue Gewebekulturflasche überführt und je nach Flaschengröße 10 bzw. 20 ml Nährmedium hinzugegeben.

### **Kryokonservierung**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst, zentrifugiert und resuspendiert. In einem Kryoröhrchen (Greiner Bio-one, 2 ml) wurde eine 10 prozentige DMSO-Lösung hergestellt ( 100 µl DMSO und 900 µl Medium). Nun wurde 1 ml Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend unverzüglich bei – 80°C eingefroren und 24 Stunden später in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurde ein Geweberöhrchen mit 4 ml Medium vorbereitet. Die Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und unverzüglich in das vorbereitete Geweberöhrchen überführt um eine Schädigung der Zellen durch das DMSO zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 Upm für 5 Minuten zentrifugiert, resuspendiert und in eine 250 ml Gewebekulturflasche überführt.

### **Behandlung von FCS mit Aktivkohle**

500 ml FCS wurden mit 1,25 g Aktivkohle und 0,125 g Dextran 30 Minuten bei 57°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Aktivkohle für 20 Minuten bei 16000 Upm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit 1,25 g Aktivkohle und 0,125 g Dextran versetzt und für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand steril filtriert. Das CSFCS wurde bei – 20°C gelagert. Durch die Behandlung mit Aktivkohle wurde dem FCS jegliche Östrogenwirkung entzogen.

### **2.2.2 Proliferationsassays**

Die Zellen wurden wie beschrieben abgelöst, zentrifugiert und anschließend in phenolrotfreiem Medium (DMEM mit 10 % CSFCS und 0,1 % Gentamycin) resuspendiert, um alle wachstumsfördernden und Östrogeneffekte auszuschalten. Die Bestimmung des Zelltiters erfolgte nun mittels der Neubauer- Zählkammer.

Mit einer Multipipette wurden nun 500 bzw. 1000 Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Platte (TPP) ausgesät. Die Mediummenge pro Loch betrug 100 µl. Die Zellen wurden für vier Tage im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und gleichzeitig die Stimulationssubstanzen hinzugefügt. Nach 48 Stunden wurde von der ersten Hälfte und nach 96 Stunden von der zweiten Hälfte der Ansätze der Zelltiter mit Hilfe des nicht-radioaktiven-Zell-Proliferation-Assays (Promega) bestimmt. Hierzu wurden 20 µl des Reagenz ( 95,2 % MTS (Tetrazolium Verbindung), 4,7 % PMS (Phenazin Methosulfat)) zu jedem Ansatz gegeben. Das MTS wird von der metabolisch aktiven Zelle zu Formazan reduziert. Die Absorption des Formazans wurde nach 4 Stunden bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm mit dem ELISA-Reader (Anthos HTII) gemessen. Zusätzlich wurde zu Beginn des Stimulationsexperiments, zum Zeitpunkt  $t=0$ , der Zelltiter unbehandelter Zellen bestimmt, um das Ausmaß der Zellproliferation nach 48 und 96 Stunden einordnen zu können. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit EGF stimulierte Zellen. Bei Experimenten bei denen in DMSO gelöste Substanzen zum Einsatz kamen, wurde zusätzlich eine Kontrolle mit Medium und DMSO angesetzt, um Auswirkungen des zelltoxischen DMSO auf die Zellen und somit eine Verfälschung des Ergebnisses auszuschließen. Als Leerwert wurde Medium ohne Zellzusatz eingesetzt. Bei jedem Versuch wurden mindestens vierfach Bestimmungen angesetzt.

### **Die Ansätze**

Beim Nährmedium handelte es sich stets um phenolrotfreies DMEM mit 10 % CSFCS und 0,1 % Gentamycin.

- EGF 100 ng / ml Medium
- E<sub>2</sub> wurde in einer Konzentration von 10<sup>-3</sup> M in Ethanol angesetzt und bis zum Erreichen einer Molarität von 10<sup>-8</sup> bzw. 10<sup>-9</sup> M in Medium weiter verdünnt.

- Tamoxifen wurde in einer Konzentration von  $10^{-3}$  M in Ethanol angesetzt und bis zum Erreichen einer Molarität von  $10^{-6}$  –  $10^{-10}$  M in Medium verdünnt.
- MEK-Inhibitor wurde in DMSO in einer Konzentration von 20 mg / ml hergestellt und in Medium bis zum Erreichen einer Molarität von 23  $\mu$ M weiter verdünnt.

Experimente bei denen in einem Ansatz sowohl  $E_2$  als auch Tamoxifen und / oder MEK-Inhibitor verwendet wurden, wurden die Zellen stets eine halbe Stunde mit Tamoxifen und / oder MEK-Inhibitor vorinkubiert, bevor  $E_2$  hinzupipettiert wurde.

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel und SPSS wie folgt: Nach Durchführung des Proliferationsassays, wurde für jede Substanz (z.B. EGF, Tamoxifen etc.) eines Versuches der Mittelwert aus den zugehörigen Mehrfachbestimmungen ermittelt. Von diesem Mittelwert wurde der Leerwert subtrahiert. Als Leerwert wurde der Mittelwert des Mediums verwendet. Dieser Schritt wurde durchgeführt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Absorption des Mediums zu verhindern.

Tabelle 2.1 Darstellung der statistischen Auswertung der Ergebnisse mittels Excel. Für jede Substanz eines Versuches wurde der Mittelwert aus den zugehörigen Mehrfachbestimmungen ermittelt. Von diesem Mittelwert wurde der Leerwert subtrahiert. Als Leerwert wurde der Mittelwert des Mediums verwendet.

	Medium ohne Zellen	unstimulierte Zellen	Stimulation mit EGF	Stimulation mit Östradiol
<b>Ergebnisse der 4 fach Bestimmungen in optischer Dichte</b>	0,199	0,513	0,661	0,633
	0,207	0,545	0,616	0,627
	0,214	0,575	0,642	0,679
	0,220	0,539	0,656	0,564
<b>Mittelwert</b>	0,210	0,543	0,644	0,626
<b>Mittelwert-Leerwert</b>		<b>0,333</b>	<b>0,434</b>	<b>0,416</b>

Anschließend konnten die so erhaltenen Ergebnisse innerhalb eines Versuches zu einander und v.a. zu unstimulierten Zellen in Beziehung gesetzt werden und somit eine quantitative Aussage über die proliferationsfördernde oder – hemmende Wirkung einer Substanz getroffen werden. Das nächste Ziel war es nicht nur die Ergebnisse innerhalb eines Versuches mit einander zu vergleichen, sondern festzustellen ob es sich hierbei um signifikante Ergebnisse handelt (Einzelsignifikanzen oder  $p$  Einzelversuche). Dies konnte mittels SPSS, mit Hilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Test, festgestellt werden. Dieser Test wurde ausgewählt, da er sowohl auf normalverteilte, als auch auf nicht normalverteilte Daten anwendbar ist und auch für kleine Datenmengen verwertbare Ergebnisse liefert. Bezugspunkt für die Signifikanzen war der Unterschied zu unstimulierten Zellen. Ein Ergebnis wird als signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  ist. Als nächstes sollte eine Aussage getroffen werden ob nicht nur das Ergebnis des einzelnen Versuches, sondern der gesamten Versuchsreihe einer Substanz signifikant ist (Gesamtsignifikanzen oder P-Gesamt). Hierbei lag die Herausforderung in der besonderen Situation, dass die Aussage der einzelnen Versuche einer Versuchsreihe zwar übereinstimmte, aber die mittels ELISA-Reader bestimmten Messwerte, zwischen den einzelnen Versuchen, teilweise unterschiedlich hoch ausfielen. So steigerte beispielsweise EGF in zwei verschiedenen Versuchen die Zellzahl um ca. 30 % im Vergleich zu unstimulierten Zellen. In dem ersten Versuch hatten die mit EGF stimulierten Zellen eine optische Dichte (OD) von 0,241 und im zweiten Versuch eine OD von 0,434. Als Ursache für die unterschiedliche Höhe der Messwerte kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Eine Möglichkeit wäre eine unterschiedlich schnelle Proliferation der unstimulierten Zellen, aber auch eine Ungenauigkeit bei der Pipettierung der Zellen zu Beginn des Proliferationsversuches ist möglich. Durch die unterschiedliche Höhe der Messwerte war es somit nicht möglich, die einzelnen Ergebnisse einer Versuchsreihe durch simple Bildung eines Mittelwerts und anschließende Bestimmung dessen Signifikanz auszuwerten. Die Standardabweichung wäre sehr hoch ausgefallen. Zur Lösung dieser Problematik wurde der Vorzeichen-Test herangezogen. Beim Vorzeichen-Test handelt es sich ebenfalls um einen

nicht parametrischen Test, der insbesondere dann sinnvoll ist, wenn eine quantitative Messung unmöglich oder wie in diesem Fall schwierig ist. Mittels dieses Tests war es möglich aus den Einzelsignifikanzen (siehe oben) die Gesamt-Signifikanzen der jeweiligen Versuchsreihen zu bestimmen. Auch hier gilt, dass das Ergebnis einer Versuchsreihe als signifikant bezeichnet wird, wenn  $P < 0,05$  ist.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Etablierung von Zellkulturbedingungen zum Nachweis einer östradiolabhängigen Zellproliferation**

Für den Nachweis sowohl genomischer als auch nichtgenomischer Effekte von Östradiol auf Brustkrebszellen sind zahlreiche Voraussetzungen zu erfüllen.

Die Anforderungen an die Zellkultur sind optimale Kulturbedingungen, die eine gute Zelladhaerenz, die Ausbildung von Zellausläufern und Zellverbänden, welche zu einem gleichmäßigen Zellrasen konfluieren, sowie eine hohe Proliferationsrate fördern. Diese Punkte werden in der Fachliteratur als positive Kriterien für eine gut wachsende Zellkultur mit metabolisch aktiven Zellen angesehen. Sie stellen somit eine wichtige Grundlage für aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse der nachfolgenden Stimulationsversuche dar. Als negative Kriterien gelten eine mangelnde Adhaerenz, eine abgekugelte Zellform, die mangelnde Ausbildung eines Zellrasens, sowie ein langsames Zellwachstum.

Zur Etablierung der Zellkulturbedingungen wurden die ausgesäte Zellzahl, sowie die verwendeten Basalmedien variiert. Es kam DMEM, MEM, jeweils phenolrothaltig und phenolrotfrei, sowie Ham's F-10 Medium zum Einsatz. Beobachtet wurden die Zellmorphologie, Zellanordnung, Zelladhaerenz und die Dauer bis zum Erlangen einer 90 prozentigen Konfluenz. Hierfür wurden die Zellen in 6 – Lochplatten bzw. 550 ml Gewebekulturflaschen mit verschiedenen Zellzahlen von  $10^4$  –  $5 \times 10^6$ , ausgesät und alle zwei Tage bis zum Erlangen einer 90 prozentigen Konfluenz unter dem Mikroskop inspiziert.

##### **3.1.1 Zelladhaerenz und Konfluenz**

Die Zelladhaerenz und Konfluenz wurden unter Kultivierung mit verschiedenen Basalmedien wie DMEM, MEM, jeweils phenolrothaltig und phenolrotfrei, sowie

Ham's F-10 Medium untersucht (zur genauen Zusammensetzung der Medien siehe Kapitel 2.2.1).

MCF-7 Mammakarzinomzellen zeigten in phenolrothaltigem Nährmedium eine bedeutend bessere Zelladhaerenz als in phenolrotfreiem Medium. Die Zellen bildeten Ausläufer und Zellverbände und erreichten schneller eine 90 prozentige Konfluenz als unter phenolrotfreien Bedingungen. Dies ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die leicht östrogene Wirkung des Phenolrots zurückzuführen. Die phenolrothaltigen Medien untereinander zeigten keine bedeutsamen Unterschiede hinsichtlich des Wachstumsverhaltens der Zellen. Unter DMEM- und MEM-Medium zeigte sich eine bessere Zelladhaerenz als unter Ham's F-10 Medium.

### **3.1.2 Aussaat-Dichte**

Die Zellen wurden in einer Zellzahl von  $10^4 - 5 \times 10^6$  in 6 – Lochplatten bzw. 550 ml Gewebekulturflaschen ausgesät. Anschließend wurde mikroskopisch die Zellmorphologie, Zellanordnung, Zelladhaerenz und die Dauer bis zum Erlangen einer 90- prozentigen Konfluenz beobachtet.

Es konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Werden zu wenig Zellen ausgesät, kommt es zu einer mangelnden Adhaerenz oder die Zellen wachsen haufenförmig übereinander, anstatt wie erwünscht, einen gleichmäßigen Zellrasen zu bilden. Die Morphologie der Zellen ist kugelig und abgerundet und die Zellen bilden nur wenige bis gar keine Zellausläufer aus. Werden die Zellen zu dicht ausgesät, kommt es von vornherein zu einer mangelnden Adhaerenz.

Als optimale Aussaat-Menge für die 550 ml Gewebekulturflaschen konnten  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen ermittelt werden. Diese haben nach 3 – 10 Tagen eine 90 prozentige Konfluenz erreicht und können für die Folgeversuche geerntet werden.

## 3.2 MTS-Proliferationsassays

### 3.2.1 Etablierung der Stimulationsbedingungen und des Stimulationsablaufes

Ziel der Etablierung der Stimulationsbedingungen und des Stimulationsablaufes war der Nachweis eines möglichst hohen östrogenabhängigen Wachstums der verwendeten Brustkrebszelllinie. Dies ist gleichzeitig Grundvoraussetzung für die Folgeversuche. Denn nur so können in den Folgeexperimenten, die Auswirkung anderer Stimulanzen (Tamoxifen, MEK-Inhibitor und deren Kombination) auf die Zellproliferation, durch Interaktion mit der Östradiolsignalkaskade, untersucht werden.

Um die optimalen Voraussetzungen für eine möglichst hohe E<sub>2</sub>-induzierte Steigerung der Zellproliferation zu ermitteln, wurden verschiedene Basalmedien (DMEM, MEM), unterschiedliche Aussaat-Dichten (500 und 1000 Zellen / Loch), sowie verschieden lange Östrogen-Hungerperioden variiert. Für die Stimulationsversuche wurde stets phenolrotfreies DMEM bzw. MEM verwendet, um den Einfluss von wachstumsstimulierenden Substanzen auf ein Minimum zu reduzieren. Auf den Zusatz von CSFCS konnte nicht verzichtet werden, da es unter CSFCS-freiem bzw. reduziertem (CSFCS Anteil von 2%) Medium zu einer mangelnde Zelladhaerenz mit Zellablösung kommt. Des Weiteren ist inzwischen bekannt, dass die proliferationsfördernde Wirkung von E<sub>2</sub> durch vorherige Kultivierung der Zellen unter östrogenfreien Bedingungen, zu einem erhöhten Ansprechen der Karzinomzellen auf Östradiol führt. Dieser Effekt ist auf eine Hochregulation der Östrogenrezeptoren zurückzuführen. Daher wurden, für Stimulationsversuche mit E<sub>2</sub>, die Zellen zuvor stets in einen Östrogenhungerzustand versetzt.

48 bzw. 96 Stunden nach Hinzufügen des Östradiols wurde die Zellzahl mittels Zellproliferations-Assay bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2).

Das stärkste Ansprechen der Karzinomzellen auf Östradiol konnte nachgewiesen werden, nachdem die Zellen in einer Dichte von 500 Zellen pro Loch in 96-Lochplatten ausgesät wurden, für vier Tage unter östrogenfreien

Bedingungen ausgehungert und anschließend mit E<sub>2</sub> inkubiert wurden. Die höchsten Proliferationsraten nach Stimulation mit E<sub>2</sub> erbrachten Zellen, welche in phenolrotfreiem DMEM kultiviert wurden, welches lediglich mit 10 % CSFCS und Antibiotikum versetzt war. Eine Inkubationszeit von 96 Stunden führte, wie zu erwarten, in einer Vielzahl der Ansätze zu einer höheren Zellzahl im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

Tabelle 3.1 Optimierte Bedingungen für die Stimulationsversuche

Parameter	Optimum
Medium	Phenolrotfreies Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)
Serum	CSFCS (10%)
Zelldichte	500 Zellen / Well
Zeitlicher Ablauf	Tag 0: Aussaat der Zellen Tag 4: Mediumwechsel + Stimulanz (z.B. E <sub>2</sub> ) Tag 6: 48 Stunden Werte (MTS) Tag 8: 96 Stunden Werte (MTS)

Da in Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) kultivierte Zellen nach Stimulation mit Östradiol eine höhere Proliferationsrate zeigten, als in Minimum Essential Medium (MEM), wurde fortan DMEM als Standardmedium eingesetzt.

### 3.2.2 Etablierung des MTS-Proliferationsassays

Zunächst wurde versucht in einem relativ zeitsparenden Verfahren die östrogenabhängige Proliferationssteigerung der Mammakarzinomzellen zu ermitteln. Hierfür wurde eine definierte Zellzahl in 6-Loch Wellplatten ausgesät und am Tag nach der Aussat mit verschiedenen Östradioldosen stimuliert. Die

Proliferation wurde an den Folgetagen über eine Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerzählkammer festgestellt. Aufgrund der geringen Zellzahl in den Wells war eine zuverlässige Bestimmung der Zellzahl nicht möglich. Die Schwankungen der Zellzahlbestimmungen fielen untolerierbar hoch aus, so dass dieses Verfahren zur Ermittlung der Zellproliferation verworfen werden musste.

Um zuverlässige Ergebnisse zum östrogenabhängigem Wachstum der Karzinomzellen zu erhalten, wurde zur Zellzahlbestimmung das MTS-Proliferationsassay etabliert. Hierbei handelt es sich um ein Zellproliferations-Assay, bei dem zugesetztes MTS (Tetrazolium Verbindung) von metabolisch aktiven Zellen zu Formazan reduziert wird. Die Absorption des Formazans konnte nach 4 Stunden bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm mittels ELISA-Reader gemessen werden. Die Werte wurden in optischer Dichte angegeben. Die quantitative Bestimmung der Zellzahl ermöglichte die Bestimmung der Proliferationssteigerung, nach Zugabe von Östradiol, durch den rechnerischen Vergleich von nichtstimulierten Zellen und stimulierten Zellen (siehe 3.2.3).

Nach Etablierung der Methodik und erfolgtem Nachweis einer östradiolabhängigen Zellproliferation der MCF-7 Zellen, wurden weitere Stimulationsversuche mit Tamoxifen und MEK-Inhibitor durchgeführt. Auch bei diesen Versuchen wurde die Zellzahl stets mittels MTS-Proliferationsassay bestimmt. Nichtstimulierte Zellen wurden bei allen Versuchen als Negativ- und mit Epidermal Growth Factor (EGF) stimulierte Zellen als Positivkontrolle mitgemessen. EGF führt nach Bindung an seinen Rezeptor über den MAPK-Signaltransduktionsweg zu einer Steigerung der Zellproliferation. Die Zellzahl wurde stets 48 und 96 Stunden nach Zugabe von EGF, E<sub>2</sub>, MEK-Inhibitor und Tamoxifen bestimmt. Um ein breiteres Wirkspektrum abzudecken kamen verschiedene Konzentrationen der Substanzen zum Einsatz.

In einem nächsten Schritt wurde analysiert welche Auswirkung eine Kombination von Tamoxifen und MEK-Inhibitor auf die Proliferation der Brustkrebszellen hat, da beide Substanzen an unterschiedlichen Stellen in die Signalkaskade des Östradiols eingreifen. Um zu analysieren wie stark die

beobachtete Proliferationsstimulation durch Östradiol von Tamoxifen, MEK-Inhibitor und deren Kombination beeinflussbar ist, wurden die Versuche in Anwesenheit von Östradiol, im Vergleich zu analogen Ansätzen ohne Östradiol durchgeführt. Die Bedingungen für den Stimulationsablauf entsprechen bei den Versuchen mit MEK-Inhibitor, Tamoxifen und EGF denen in Tabelle 3.1. Bei Stimulationsversuchen mit  $E_2$ , Tamoxifen und/oder MEK-Inhibitor wurden die Zellen, nach dem Mediumwechsel an Tag 4, stets für eine halbe Stunde mit Tamoxifen und/oder MEK-Inhibitor vorinkubiert bevor  $E_2$  hinzupipettiert wurde.

### 3.2.3 Definitionen

Die Auswirkung einer Substanz (z. B. Östradiol) auf die Proliferation der Mammakarzinomzellen, lässt sich bei der Auswertung eines MTS-Assays durch den rechnerischen Vergleich, von unbehandelten Zellen und behandelten Zellen (Zellen denen eine Substanz zugesetzt wurde), feststellen. Eine Substanz wird als proliferationsfördernd bezeichnet, wenn der Quotient der Absorption (nach Abzug der Hintergrund Absorption vom Zellkulturmedium) aus behandelten und unbehandelten Zellen  $> 1$  ist. Als proliferationshemmend wird demnach eine Substanz bezeichnet deren Quotient  $< 1$  ist. Ist der Quotient 1, so hat die Substanz keinen Effekt auf die Zellproliferation.

stimulierte Zellen / nicht stimulierte Zellen  $> 1 \Rightarrow$  proliferationsfördernd  
stimulierte Zellen / nicht stimulierte Zellen = 1  $\Rightarrow$  keinen Effekt  
stimulierte Zellen / nicht stimulierte Zellen  $< 1 \Rightarrow$  proliferationshemmend

Zur statistischen Auswertung wurden der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test und der Vorzeichen-Test verwendet. Der Mann-Whitney U-Test wurde eingesetzt um zu ermitteln, ob sich die Zellzahl der stimulierten Zellen innerhalb eines Versuches signifikant von der unstimulierten Zellen unterschied. Im nächsten Schritt diente der Vorzeichen-Test dazu, zu analysieren ob nicht nur das Ergebnis eines einzelnen Versuches, sondern der gesamten Versuchsreihe

einer Substanz sich signifikant von nichtstimulierten Zellen unterschied. Bei beiden Tests wurde ein Ergebnis als signifikant bezeichnet, wenn  $p < 0,05$  war.

$p < 0,05 = \text{signifikant}$
---------------------------------

Der genaue Ablauf der Proliferationsassays wurde unter Material und Methoden Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die untenstehenden Angaben beziehen sich, falls nicht anders vermerkt, stets auf Zellen in phenolrotfreiem DMEM mit 10 % CSFCS und Antibiotikum, welche in einer Dichte von 500 Zellen pro Loch ausgesät wurden.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung werden in den folgenden Kapiteln jeweils nur knapp zusammengefasst. Für eine ausführliche Einsicht in die Statistik wird auf die Tabellen im Anhang verwiesen. Zum besseren Verständnis der folgenden Kapitel, sollen die Begriffe Einzelsignifikanz und Gesamtsignifikanz kurz erläutert werden. Die Einzelsignifikanz (p Einzelversuche) besagt, ob sich die Zellzahl der mit EGF, Östradiol, Tamoxifen oder MEK-Inhibitor stimulierten Zellen, innerhalb eines Versuches, signifikant von der nicht stimulierten Zellen unterscheidet. Sie wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney U-Tests ermittelt. Die Gesamtsignifikanz (P-Gesamt) ergibt sich aus den Einzelsignifikanzen aller Einzelversuche einer Versuchsreihe. Sie besagt, ob sich das Ergebnis der gesamten Versuchsreihe einer Substanz signifikant von nichtstimulierten Zellen unterscheidet. Sie wurde mittels des Vorzeichen-Tests bestimmt (exemplarisch siehe Tabelle 3.2).

### 3.2.4 Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)

EGF führt nach Bindung an seinen zugehörigen, membranständigen EGF-Rezeptor durch Phosphorylierungsreaktionen zur raschen Signalweiterleitung über das G-Protein Ras und die Kinasen, Raf und MEK zur Phosphorylierung der MAP-Kinase. Als Resultat kommt es zu einer Steigerung der Zellproliferation (siehe Kapitel 1.4).

Da die Stimulation mit EGF stets zu einer Zunahme der Zellproliferation führt, wurde EGF bei jedem Versuch als Positivkontrolle mit durchgeführt. Es wurde stets in einer Konzentration von 100 ng / ml eingesetzt.

Wie erwartet führte EGF sowohl nach 48- als auch nach 96-stündiger Stimulation in allen Versuchen, mit einer einzigen Ausnahme, zu einer Steigerung der Zellproliferation ( $p_{48h} = 0,04$ ,  $p_{96h} = 0,119$ ). In Bild 3.1 sind die Ergebnisse aller Versuche graphisch dargestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse der jeweiligen MTS-Assays (Zellzahl gemessen in optischer Dichte) prozentual auf unbehandelte Zellen bezogen.

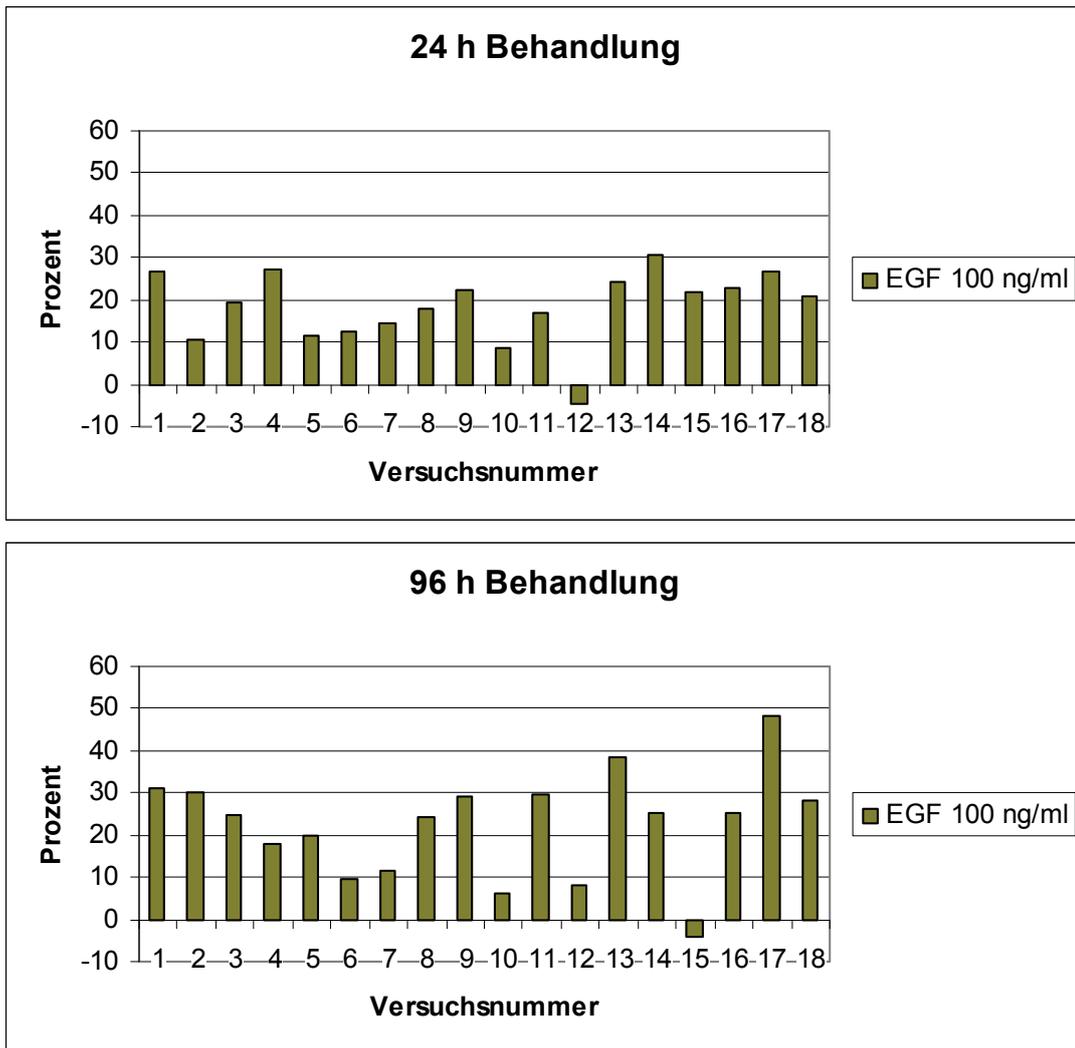


Bild 3.1 Darstellung der Zunahme der Zellproliferation (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay prozentual bezogen auf unbehandelte Zellen) in den jeweiligen Assays nach Stimulation mit EGF (100 ng/ml) über 48 bzw. 96 Stunden

Bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse fiel auf, dass bei isolierter Betrachtung derjenigen Versuche, bei denen neben der EGF induzierten Zellproliferation ebenfalls eine  $E_2$ -abhängige Zellproliferation nachweisbar war, sich nach Stimulation mit EGF mehr signifikante Ergebnisse zeigten als bei Versuchen ohne  $E_2$  induzierte Zellproliferation (siehe Tabelle 3.2). Möglicherweise ist eine vorhandene Östradiol-abhängige Zellproliferation ein

Hinweis für einen besonders guten und somit auch proliferationsfreudigen Zustand der Mammakarzinomzellen.

Tabelle 3.2 Isolierte Darstellung derjenigen EGF-Stimulationsversuche, bei denen zusätzlich eine östradiol-abhängige Zellproliferation nachweisbar war. Nach 48 Stunden zeigte sich in 8/8 und nach 96 Stunden in 12/14 Versuchen eine signifikant proliferationsfördernde Wirkung im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Sowohl das Ergebnis nach 48 als auch nach 96 Stunden war signifikant erhöht gegenüber nicht stimulierten Zellen. ( $p_{48h} = 0,004$ ,  $p_{96h} = 0,006$ )

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	2	3
0,02 – 0,03	6	9
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	0	0
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	0	2
<b>n-Gesamt</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>

### 3.2.5 Östradiol (E<sub>2</sub>)

Östradiol führt über den genomischen Weg, durch Stimulation des klassischen, intrazellulären Östrogen-Rezeptors, zu einer Zunahme der Zellproliferation (siehe Kapitel 1.1.1). Des weiteren wird in der Literatur diskutiert, dass Östradiol ebenfalls durch Stimulation eines membranständigen Rezeptors und anschließender Aktivierung einer nichtgenomischen und dadurch schnelleren Signalkaskade, welche über die MAPK vermittelt wird, zu einer Zunahme der Zellproliferation führt (siehe Kapitel 1.1.2).

Östradiol wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) eingesetzt. Sowohl E<sub>2</sub>  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M führten zu einer östrogeninduzierten Proliferation der Mammakarzinomzellen. Die Ergebnisse aller MTS Assays dieser Versuchsreihe werden in Bild 3.2 und Bild 3.3 dargestellt. Hierfür wurde die Zellzahl (gemessen in optischer Dichte) prozentual auf unbehandelte Zellen bezogen.

Die Zunahme der Zellzahl nach 96-stündiger Inkubation mit Östradiol  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M ist höher als nach 48 Stunden. Dies lässt sich durch den längeren Kontakt der Karzinomzellen mit Östradiol erklären.

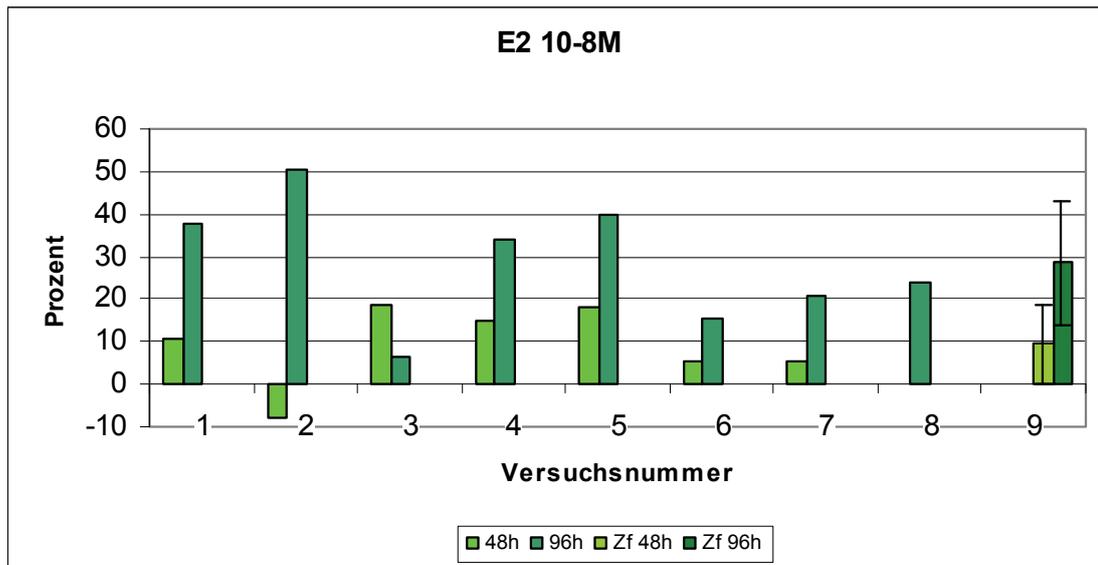


Bild 3.2 Darstellung der prozentualen Steigerung der Zellproliferation (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay, prozentual bezogen auf unbehandelte Zellen) in den jeweiligen Assays nach Stimulation mit  $E_2 10^{-8}$  M über 48 bzw. 96 Stunden. Ein proliferationsfördernder Effekt zeigte sich für  $E_2 10^{-8}$  M nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in 6 von 7 Versuchen und nach 96 Stunden in allen 8 Versuchen. (Der Wert nach einer Behandlungsdauer von 48 h in Versuch 8 konnte nicht in die Auswertung einbezogen werden). Unter Versuch 9 wird der Mittelwert aus allen Versuchen dieser Versuchsreihe mit Standardabweichung dargestellt (Zusammenfassung (Zf))

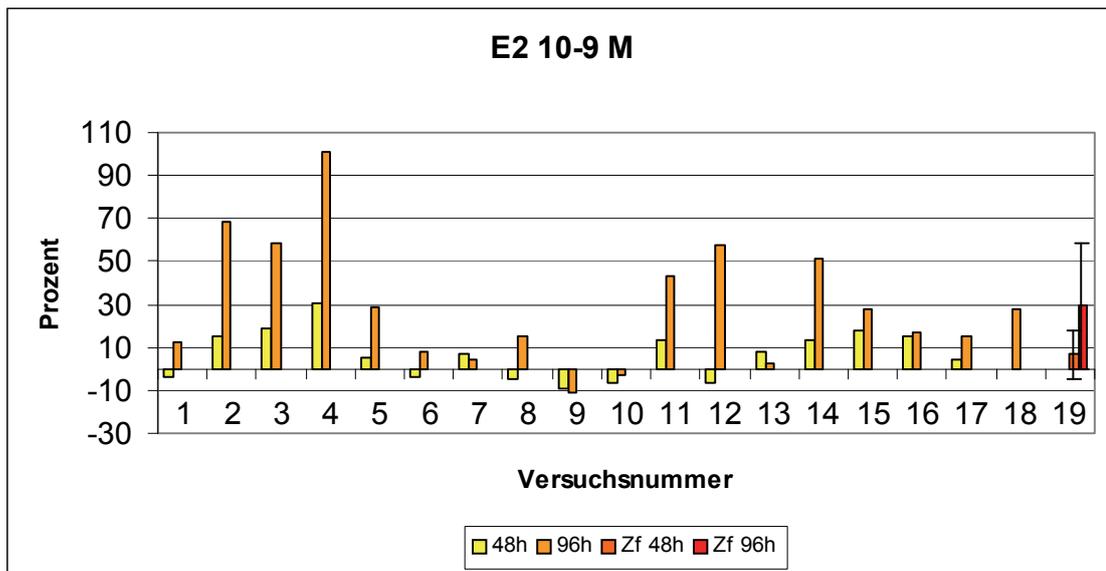


Bild 3.3 Darstellung der prozentualen Steigerung der Zellproliferation (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay, prozentual bezogen auf unbehandelte Zellen) in den jeweiligen Assays nach Stimulation mit  $E_2 10^{-9}$  M über 48 bzw. 96 Stunden. Ein proliferationsfördernder Effekt zeigte sich für  $E_2 10^{-9}$  M nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden in 11 von 17 Versuchen und nach 96 Stunden in 16 von 18 Versuchen. (Der Wert nach einer Behandlungsdauer von 48 h in Versuch 18 konnte nicht in die Auswertung einbezogen werden). Unter Versuch 19 wird der Mittelwert aus allen Versuchen dieser Versuchsreihe mit Standardabweichung dargestellt (Zusammenfassung (Zf))

Die deutlichste proliferationssteigernde Wirkung zeigte sich nach der Stimulation mit Östradiol  $10^{-9}$  M. In Bild 3.4 sind die Ergebnisse nach Stimulation mit  $E_2 10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M vergleichend dargestellt.

In der statistischen Auswertung der Ergebnisse zeigte sich nach der Stimulation mit  $E_2 10^{-8}$  M, nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden, in 25 % und nach einer Behandlungsdauer von 96 Stunden in 50 % der Versuche ein signifikant ( $p < 0,05$ ) proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach Stimulation mit  $E_2 10^{-9}$  M war dies in 33 % (48h) bzw. 56 % (96h) der Versuche der Fall. Somit ergab die Stimulation mit  $E_2 10^{-9}$  M häufiger eine signifikante Steigerung der Zellproliferation gegenüber unbehandelten Zellen, als nach der Inkubation mit  $E_2 10^{-8}$  M. Ebenso waren nach 96-stündiger Behandlung mit Östradiol Ergebnisse mit einer signifikanten Steigerung der Zellzahl häufiger als nach 48-stündiger.

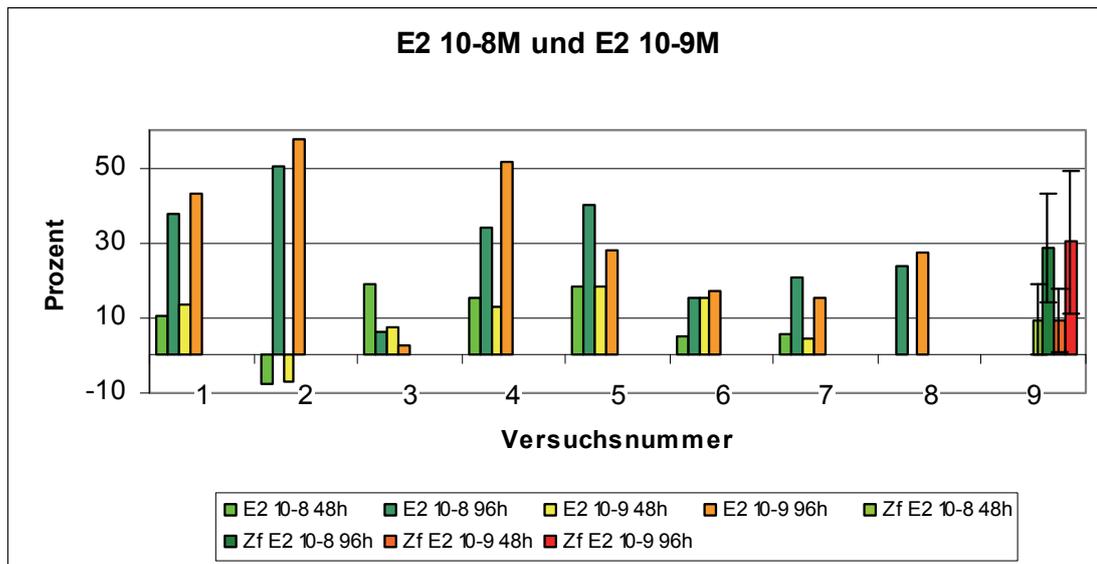


Bild 3.4 Darstellung der prozentualen Steigerung der Zellproliferation (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay, prozentual bezogen auf unbehandelte Zellen) in den jeweiligen Assays nach Stimulation mit  $E_2$   $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  M über 48 bzw. 96 Stunden. Östradiol  $10^{-9}$  M führte nach einer Stimulationsdauer von 96 h insgesamt zu einer stärker proliferationssteigernden Wirkung als  $E$   $10^{-8}$  M. Unter Versuch 9 wird der Mittelwert aus allen Versuchen dieser Versuchsreihe mit Standardabweichung dargestellt (Zusammenfassung (Zf))

### 3.2.6 Tamoxifen

Tamoxifen ist ein selektiver Antagonist am klassischen Östrogenrezeptor, besitzt jedoch auch eine agonistische Restaktivität. Ziel dieser Versuchsreihe war es, den agonistischen proliferationsstimulierenden Effekt in Bezug auf die eingesetzten Tamoxifen Konzentrationen nachzuweisen.

Tamoxifen wurde zur Abdeckung eines breiteren Wirkungsspektrums in fünf verschiedenen Konzentrationen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Konzentrationen die in der Literatur häufig Anwendung finden (z.B. Katzenellenbogen *et al.* 1987)

Für die Tamoxifen Konzentrationen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M konnte mehrheitlich ein agonistischer und somit proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden war in 66,7 %

und nach 96 Stunden in 87,5 % der Versuche ein proliferationsfördernder Effekt zu sehen. In 6 der insgesamt 14 Versuche war dieser signifikant erhöht gegenüber nicht stimulierten Zellen. Die Zunahme der Zellzahl durch Stimulation mit Tamoxifen ist nach 96 Stunden Inkubation höher als nach 24 Stunden. Die Konzentration  $10^{-6}$  M entfaltet einen stärkeren agonistischen und somit proliferationsfördernden Effekt auf die Mammakarzinomzellen als  $10^{-7}$  M. In Bild 3.5 sind die Ergebnisse der MTS-Assays dieser Versuchsreihe dargestellt.

Mit abnehmender Konzentration des Tamoxifen zeigte sich eine Abnahme des agonistischen Effekts. Eine weitere Reduktion der Konzentration führt schließlich zu einer mehrheitlich antagonistischen Wirkung des Tamoxifen und somit zu einer proliferationshemmenden Wirkung auf die Mammakarzinomzellen. Nach Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-8}$  M zeigt sich nach 48 stündiger Stimulation nur noch in 37,5 % und nach 96 Stunden in 60 % der Versuche ein proliferationsfördernder Effekt (siehe Bild 3.6). 2 der 18 Versuche ergaben in der statistischen Auswertung ein signifikant proliferationsförderndes Ergebnis bezogen auf unbehandelte Zellen.

Für die niedrigeren Tamoxifen Konzentrationen  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M (siehe Bild 3.6) ergab sich in einem einzigen Versuch ein fördernder Effekt auf die Zellproliferation. Dieser war signifikant erhöht bezogen auf unbehandelte Zellen.

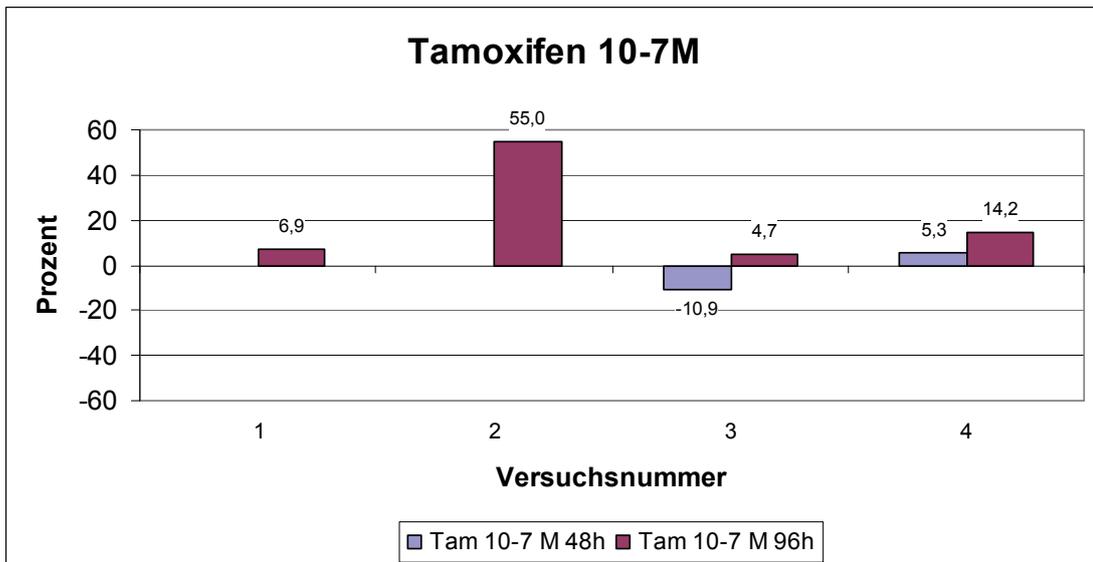
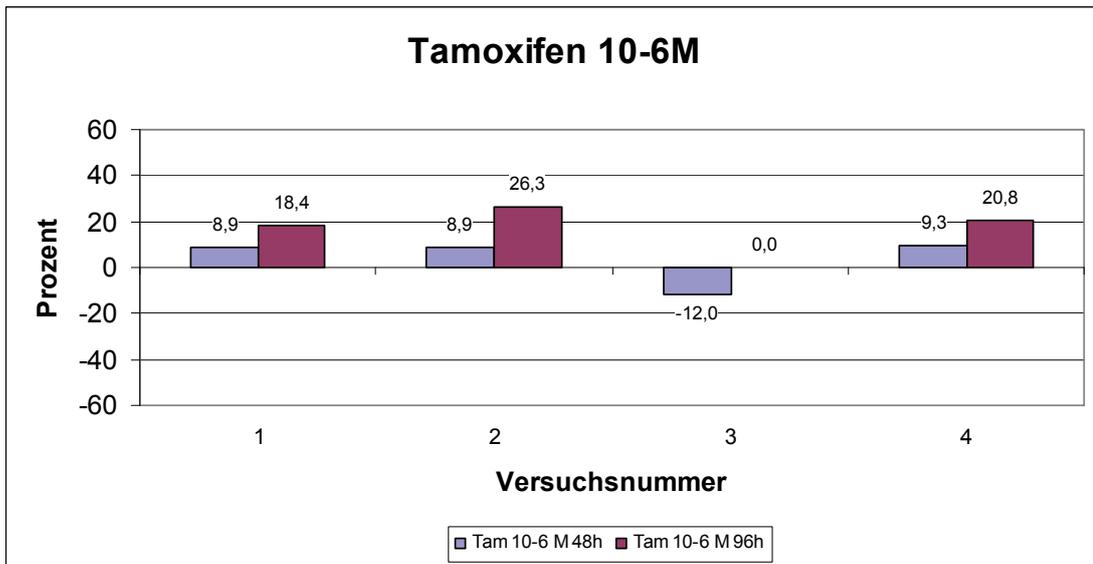


Bild 3.5 Darstellung des prozentualen agonistischen proliferationsfördernden Effekts von Tamoxifen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  M auf die Mammakarzinomzellen, bezogen auf unbehandelte Zellen (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Assay), nach einer Stimulationsdauer von 48 bzw. 96 Stunden. Es zeigt sich in 4 von 6 Versuchen nach 48 h und in 7 von 8 nach 96 h ein proliferationsfördernder Effekt auf die MCF-7 Zellen. (Die 48 Stunden Werte nach Stimulation mit  $10^{-7}$  M in Versuch 1 und 2 konnten nicht in die Auswertung mit einbezogen werden)

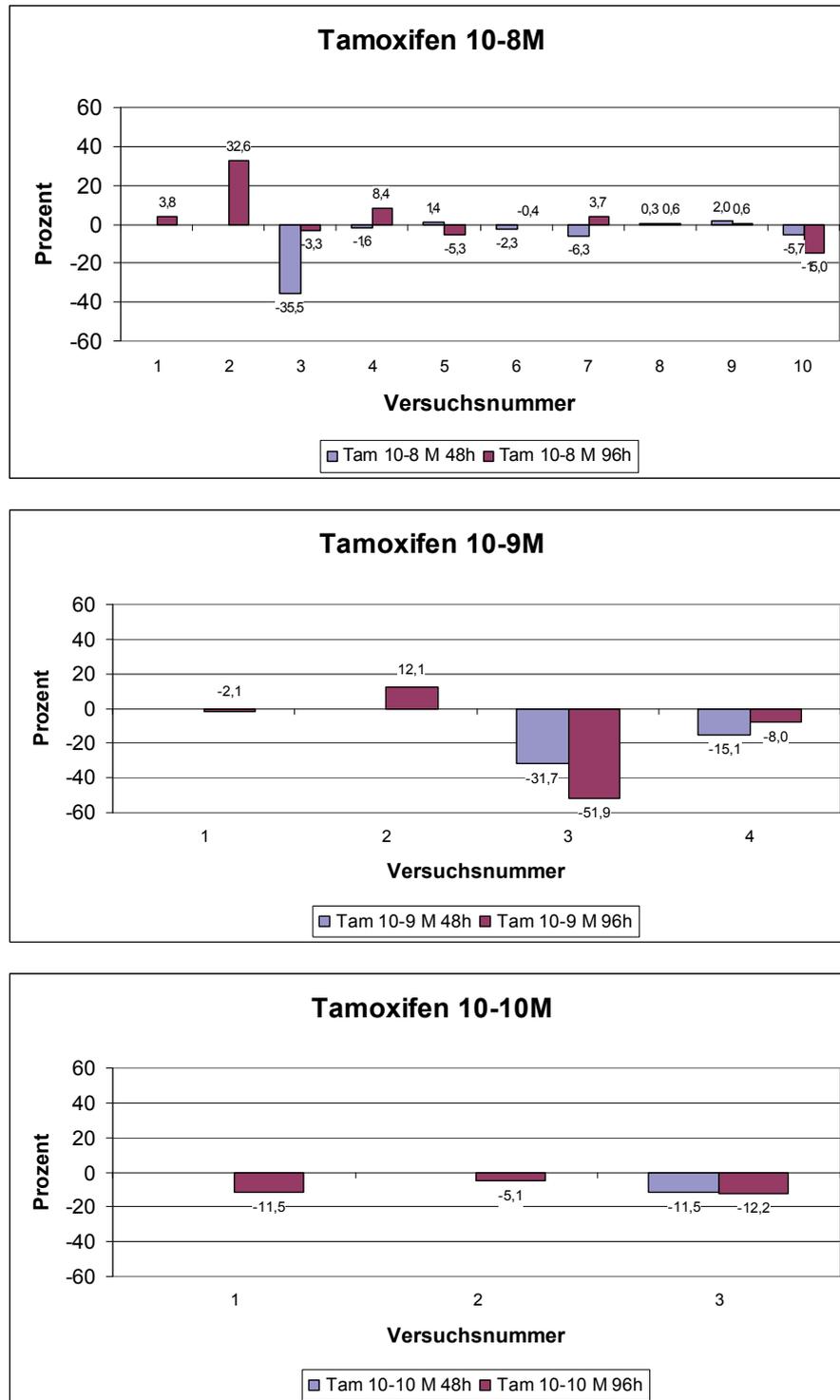


Bild 3.6 Prozentuale Darstellung des Effekts von Tamoxifen  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen, bezogen auf unbehandelte Zellen (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Assay), nach einer Stimulationsdauer von 48 bzw. 96 Stunden. Mit abnehmender Tamoxifen Konzentration zeigt sich ebenfalls eine Reduktion des agonistischen Effekts auf die Zellproliferation und schließlich eine mehrheitlich antagonistische Wirkung des Tamoxifen. (Die 48 Stunden Werte nach Stimulation mit  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M in Versuch 1 und 2 konnten nicht in die Auswertung mit einbezogen werden)

### 3.2.7 E<sub>2</sub> + Tamoxifen

Tamoxifen ist das am häufigsten in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzte Antiöstrogen. Es ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator, welcher die periphere Wirkung von Östrogenen durch Bindung an den klassischen Östrogenrezeptor hemmt. Tamoxifen unterbindet die Expression Östrogen-regulierter Gene. Bereits in den Vorversuchen konnte die agonistische Restaktivität gezeigt werden. Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, zu untersuchen ob und wie stark sich der proliferationsfördernde Effekt von Östradiol auf Mammakarzinomzellen durch den Einsatz von Tamoxifen hemmen lässt.

Für diesen Versuch wurden die Zellen vor Zugabe von Östradiol zunächst für eine halbe Stunde mit Tamoxifen vorinkubiert. Tamoxifen wurde erneut in den fünf Konzentrationen ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M) eingesetzt. Östradiol wurde in der Konzentration  $10^{-9}$  M eingesetzt, da diese in den Vorversuchen den stärksten E<sub>2</sub>-induzierten proliferationsfördernden Effekt gezeigt hatte. Es wurden ausschließlich Versuche ausgewertet in denen eine Östradiol abhängige Zellproliferation nachweisbar war.

Der proliferationsfördernde Effekt von Östradiol konnte durch den Einsatz von Tamoxifen reduziert werden. Die am stärksten hemmende Wirkung auf die E<sub>2</sub>-induzierte Zellproliferation zeigte sich nach Behandlung der Zellen mit Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-10}$  M. Für die anderen Tamoxifen Konzentrationen war ein Zusammenhang zwischen Konzentration und Ausmaß der antagonistischen Wirkung nicht klar erkennbar. Die Reduktion der E<sub>2</sub>-induzierten Zellproliferation zeigte sich am deutlichsten nach 96-stündiger Behandlung.

Insgesamt war es durch den Einsatz von Tamoxifen möglich in 84,4 % der durchgeführten Versuche die proliferationsstimulierende Wirkung von E<sub>2</sub> auf die MCF-7 Zellen zu reduzieren. Es war jedoch nur in 18,8 % der Versuche möglich sie ganz aufzuheben. In Bild 3.7 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe

dargestellt. Hierfür wurde die mittels MTS-Assay bestimmte Zellzahl jeweils prozentual auf unbehandelte Zellen bezogen.

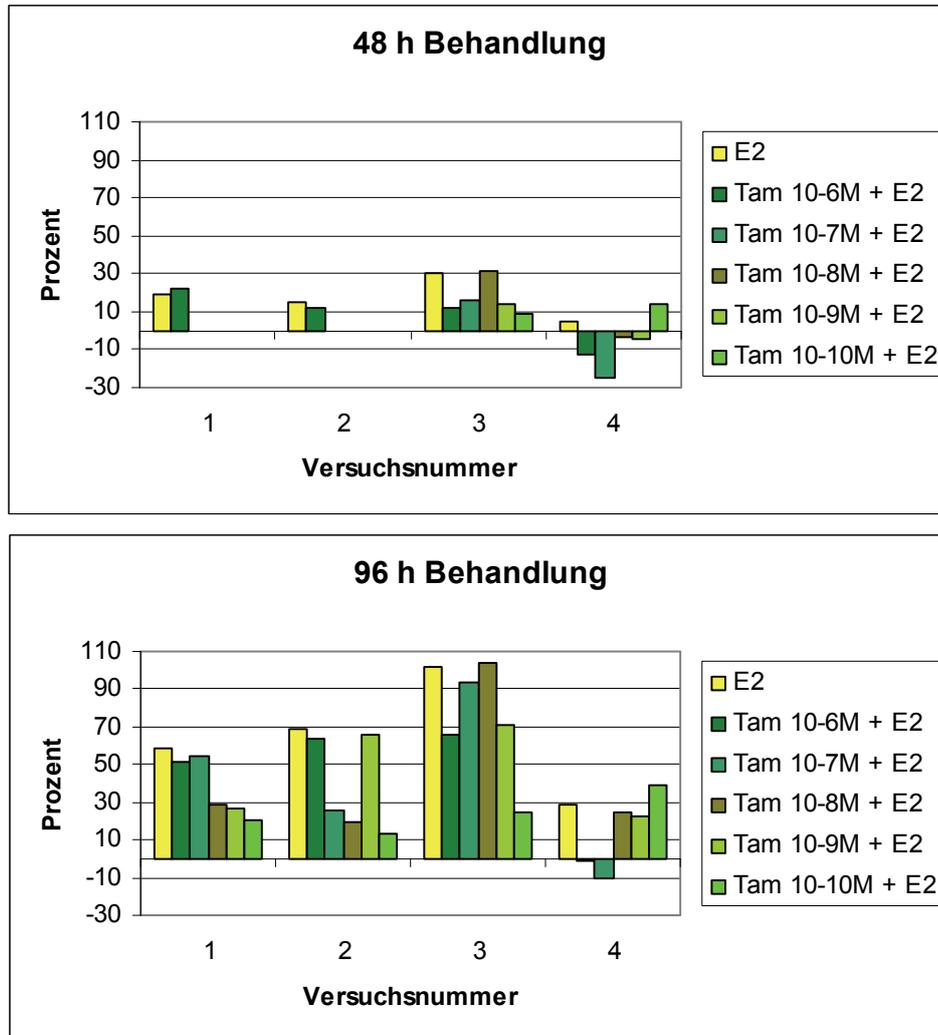


Bild 3.7 Darstellung des prozentualen Effekts (bezogen auf unbehandelte Zellen) von Tamoxifen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M auf die Östradiol induzierte Zellproliferation von Mammakarzinomzellen (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Assay) nach einer Stimulationsdauer von 48 bzw. 96 Stunden. Der stärkste antagonistische Effekt auf die Östradiol induzierte Zellproliferation zeigte sich nach Behandlung mit Tamoxifen  $10^{-10}$  M. Der antiproliferative Effekt von Tamoxifen stellte sich nach einer Behandlungsdauer von 96 Stunden deutlicher dar als nach 48 Stunden. (Die 48 Stunden Werte nach Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  und  $10^{-10}$  M in Versuch 1 und 2 konnten nicht in die Auswertung mit einbezogen werden)

### 3.2.8 MEK-Inhibitor (PD98059)

Der MEK-Inhibitor ist ein spezifischer, zellpermeabler Inhibitor der Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinasen (siehe Kapitel 1.3) und unterbindet somit einen wichtigen intrazellulären Signaltransduktionsweg. Über diese Signalkaskade wird die Wirkung zahlreicher Substanzen vermittelt, u. a. von EGF. Somit ist davon auszugehen, dass der Einsatz des MEK-Inhibitors die proliferationsfördernde Wirkung von EGF reduziert. Des Weiteren liegen Daten vor, die besagen, dass die nichtgenomische Wirkung von Östrogenen über einen alternativen membranständigen Östrogenrezeptor ebenfalls durch die MAPK vermittelt wird. Somit könnte der Einsatz des MEK-Inhibitors ebenfalls einen Einfluss auf die Wirkung von Östradiol auf Mammakarzinomzellen haben und den proliferationsfördernden Effekt von Östradiol hemmen.

In diesem Versuch wurde der MEK-Inhibitor zunächst als Monosubstanz eingesetzt, um das Ausmaß seines antiproliferativen Effekts auf die Mammakarzinomzellen zu beobachten und zu beurteilen.

Der MEK-Inhibitor wurde stets in einer Konzentration von 23  $\mu\text{M}$  eingesetzt.<sup>1</sup>

Nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor zeigte sich ein deutlicher antiproliferativer Effekt auf die Mammakarzinomzellen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Bild 3.8 zu sehen. In der Abbildung wurde die prozentuale Zellzahl (gemessen in optischer Dichte) nach Stimulation mit dem MEK-Inhibitor bezogen auf unbehandelte Zellen (entsprechen 100%) dargestellt. In Bild 3.9 sind alle Versuche dieser Versuchsreihe zusammengefasst dargestellt.

---

<sup>1</sup> In der Auswertung konnten Versuche in unterschiedlichen Medien (DMEM, MEM) sowie mit unterschiedlicher Zelldichte (500 bzw. 1000 Zellen pro Loch) zusammengefasst werden, da diese Parameter keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse zeigten.

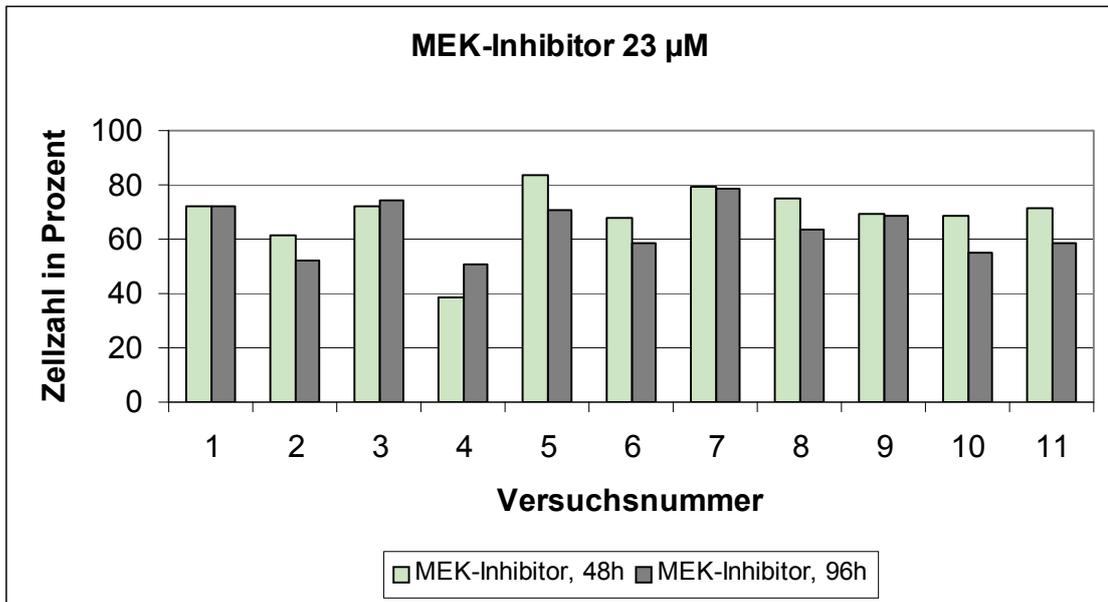


Bild 3.8 Darstellung der prozentualen Zellzahl (gemessen in optischer Dichte) nach Behandlung mit MEK-Inhibitor 23 µM, bezogen auf unbehandelte Zellen (entsprechen 100%), nach einer Inkubation von 48 bzw. 96 Stunden. Der MEK-Inhibitor führt zu einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen

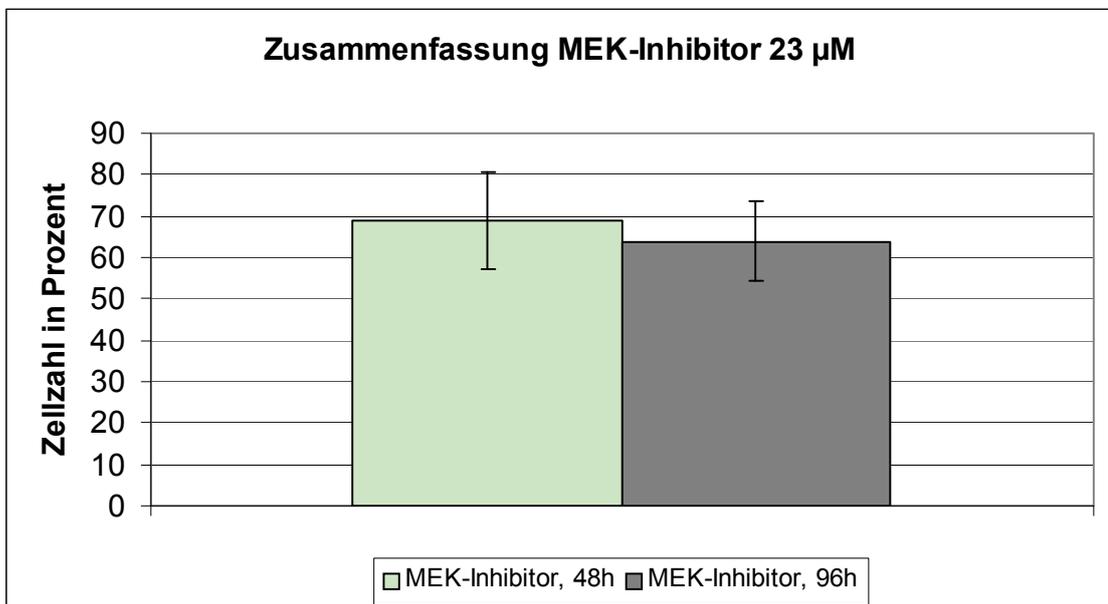


Bild 3.9 Darstellung der prozentualen Minderung der Zellzahl (gemessen in optischer Dichte) nach Behandlung mit MEK-Inhibitor 23 µM, bezogen auf nicht stimulierten Zellen (entsprechen 100%), nach einer Inkubation von 48 bzw. 96 Stunden. Der MEK-Inhibitor führt zu einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen

Der hemmende Effekt des MEK-Inhibitor, auf die Proliferation der MCF-7 Zellen, erwies sich in der statistischen Auswertung als signifikant (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Zusammenfassende Darstellung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit MEK-Inhibitor 23  $\mu\text{M}$  erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in 11 von 12 und nach 96 Stunden in allen 12 Versuchen ein wachstumshemmender Effekt. Sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden waren jeweils 11 dieser Versuche signifikant proliferationshemmend.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	11	11
0,03 – 0,50	0	0
0,50 – 1,00	1	1
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	12	12
<b>proliferationsfördernd</b>	1	0
<b>proliferationshemmend</b>	11	12
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	11	11
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>

### 3.2.9 E<sub>2</sub> + MEK-Inhibitor (PD98059)

In dieser Versuchsreihe wurde eine Kombinationsstimulation mit E<sub>2</sub> und MEK-Inhibitor durchgeführt. Ziel war es zu beobachten ob und wie stark die proliferationsfördernde Wirkung von E<sub>2</sub> durch Einsatz des MEK-Inhibitors reduzierbar ist.

Zur Durchführung dieser Versuche wurden die Zellen zunächst für eine halbe Stunde mit dem MEK-Inhibitor vorinkubiert und anschließend mit Östradiol stimuliert. E<sub>2</sub> wurde in der Konzentration 10<sup>-9</sup> M eingesetzt, da diese sich in den Vorversuchen als am stärksten proliferationsfördernd erwiesen hatte. Der MEK-

Inhibitor wurde stets in einer Konzentration von 23  $\mu\text{M}$  eingesetzt<sup>2</sup>. Es wurden ausschließlich Versuche gewertet in denen eine Östradiol abhängige Zellproliferation nachweisbar war.

In allen durchgeführten Versuchen, von einer einzigen Ausnahme abgesehen, ist es möglich durch Einsatz des MEK-Inhibitors die Zellzahl, der mit Östradiol stimulierten Zellen, unter die der nur mit Östradiol stimulierten Zellen zu senken. Allerdings zeigt sich bei den mit Östradiol und MEK-Inhibitor behandelten Mammakarzinomzellen stets eine höhere Zellzahl, als bei den Zellen welche nur mit dem MEK-Inhibitor behandelt wurden. In Bild 3.10 ist das Ergebnis eines der MTS-Assays exemplarisch dargestellt.

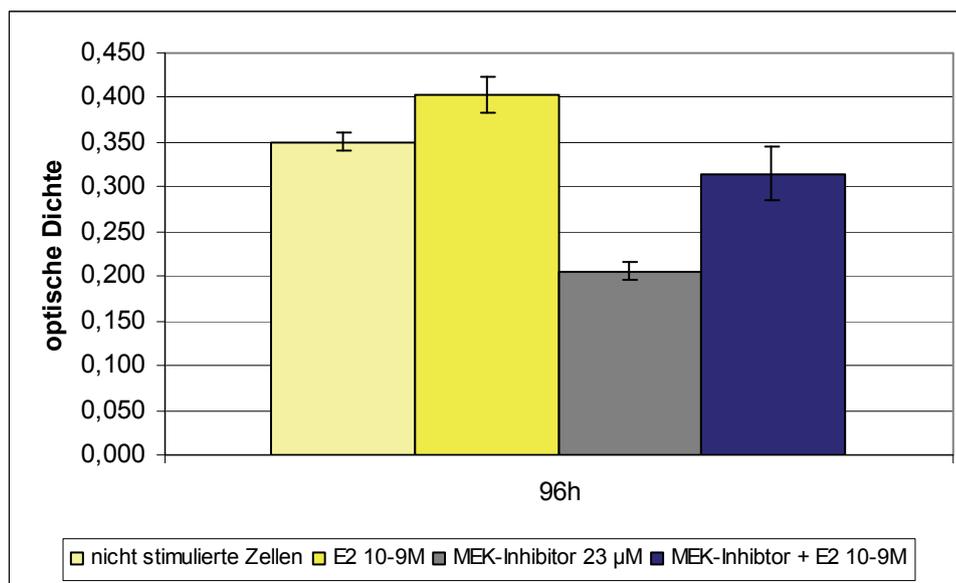


Bild 3.10 Exemplarisches Ergebnis eines MTS-Assays: Darstellung der Wirkung des MEK-Inhibitors in Anwesenheit von  $\text{E}_2$   $10^{-9}\text{M}$ , im Vergleich zur Stimulation mit  $\text{E}_2$   $10^{-9}\text{M}$ , MEK-Inhibitor 23  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit von  $\text{E}_2$  und nicht stimulierten Zellen nach 96 Stunden. (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS- Zellproliferations-Assay, bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm). Der MEK-Inhibitor ermöglicht eine Reduktion der Zellzahl in Anwesenheit von  $\text{E}_2$ . Allerdings liegt diese oberhalb der nur mit MEK-Inhibitor behandelten Zellen

<sup>2</sup> In der Auswertung konnten Versuche in unterschiedlichen Medien (DMEM, MEM) sowie mit unterschiedlicher Zelldichte (500 bzw. 1000 Zellen pro Loch) zusammengefasst werden, da diese Parameter keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse zeigten.

Der MEK-Inhibitor ist ein Inhibitor der Mitogen-Aktivierten-Protein-Kinasen und unterbindet somit einen wichtigen intrazellulären Signaltransduktionsweg. Über diesen Signaltransduktionsweg wird die Wirkung zahlreicher Substanzen vermittelt (z. B. von EGF). Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche in denen eine Monobehandlung mit dem MEK-Inhibitor erfolgte, mit denen in welchen zusätzlich eine Stimulation mit E<sub>2</sub> erfolgt, so liegen die Zellzahlen der zusätzlich mit Östradiol stimulierten Zellen meist deutlich über den nur mit MEK-Inhibitor behandelten. Folglich senkt der MEK-Inhibitor zwar in Anwesenheit von E<sub>2</sub> die Zellzahl, dieser antiproliferative Effekt ist jedoch nicht auf die Hemmung der östradiolinduzierten Zellproliferation zurückzuführen. Die proliferative Wirkung von Östradiol auf die Mammakarzinomzellen wird somit nicht über den alternativen Östrogenrezeptor und die MAP-Kinasen vermittelt. Dies wird nochmals in Bild 3.11 veranschaulicht. Hier wurden alle MTS-Assays dieser Versuchsreihe zusammengefasst und die Zellzahlen (gemessen in optischer Dichte) zur besseren Vergleichbarkeit prozentual auf nicht stimulierte Zellen (entsprechen 100%) bezogen.

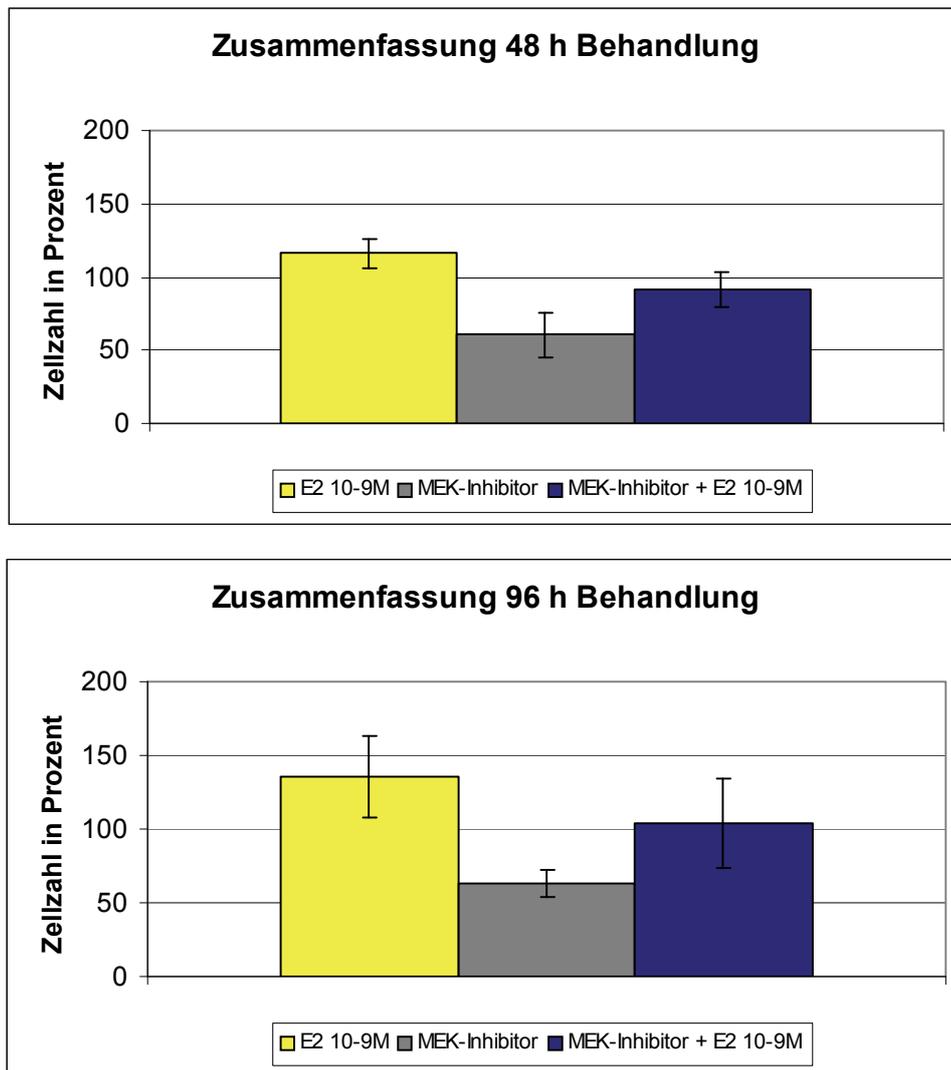


Bild 3.11 Darstellung der prozentualen Auswirkung des MEK-Inhibitors auf die durch  $E_2$   $10^{-9}M$  induzierte Zellproliferation, im Vergleich zur Stimulation mit  $E_2$   $10^{-9}M$ , MEK-Inhibitor  $23 \mu M$  in Abwesenheit von  $E_2$ , bezogen auf nicht stimulierte Zellen (entsprechen 100%), nach 48 und 96 Stunden Behandlungsdauer. (Zellzahl gemessen in optischer Dichte). Der MEK-Inhibitor senkt zwar in Anwesenheit von  $E_2$  die Zellzahl, dieser antiproliferative Effekt ist jedoch nicht auf eine Hemmung der östradiolinduzierten Zellproliferation zurückzuführen

### 3.2.10 MEK-Inhibitor $23 \mu M$ + Tamoxifen

In den Vorversuchen bestätigte sich der antiproliferative Effekt des MEK-Inhibitors auf die Mammakarzinomzellen. Nach Monostimulation mit Tamoxifen zeigte sich hingegen ein agonistischer und damit zellproliferationsfördernder Effekt auf die Karzinomzellen. Ziel dieser Versuchsreihe war es zu untersuchen

wie sich die Kombination von MEK-Inhibitor und Tamoxifen auf die Proliferation der MCF-7 Zellen auswirkt und ob der agonistische Effekt von Tamoxifen durch den MEK-Inhibitor hemmbar ist.

Tamoxifen wurde in der Konzentration  $10^{-6}$  M eingesetzt, da sich in den Vorversuchen für diese Konzentration der höchste agonistische Effekt gezeigt hatte. Der MEK-Inhibitor wurde stets in der Konzentration 23  $\mu$ M verwendet.<sup>3</sup> Es wurden ausschließlich Versuche ausgewertet, in denen eine agonistische Wirkung des Tamoxifen nachweisbar war.

Unter der Stimulation mit dem MEK-Inhibitor und Tamoxifen zeigte sich eindeutig eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Allerdings ist zu beobachten, dass der Einsatz von Tamoxifen und MEK-Inhibitor zu einer höheren Zellzahl führt als die alleinige Behandlung mit dem MEK-Inhibitor. Folglich ist davon auszugehen, dass Tamoxifen weiterhin eine agonistische, proliferationsfördernde Wirkung zeigt und diese durch den MEK-Inhibitor nicht hemmbar ist. Die proliferationsfördernde Wirkung des Tamoxifen wird somit nicht über die MAP-Kinasen vermittelt, sondern ist am ehesten auf die agonistische Restaktivität am klassischen Östrogenrezeptor zurückzuführen. In Bild 3.12 ist das Ergebnis eines MTS-Assays exemplarisch dargestellt.

---

<sup>3</sup>In der Auswertung konnten Versuche in unterschiedlichen Medien (DMEM, MEM) sowie mit unterschiedlicher Zelldichte (500 bzw. 1000 Zellen pro Loch) zusammengefasst werden, da diese Parameter keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse zeigten.

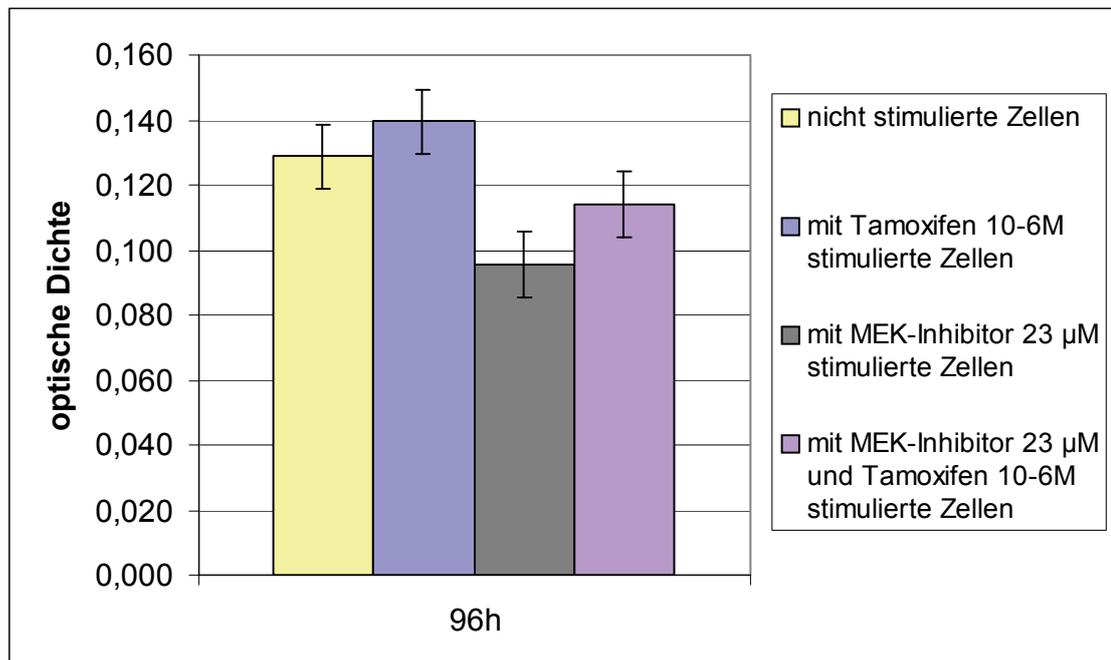


Bild 3.12 Exemplarisches Ergebnis eines MTS-Assays: Vergleich der proliferationshemmenden Wirkung der mit einer Kombination aus Tamoxifen  $10^{-6}$  M und MEK-Inhibitor  $23 \mu\text{M}$  stimulierten Zellen, zu nicht stimulierten oder nur mit einer der beiden Substanzen behandelten Zellen nach 96 Stunden. (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay, bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm). Es zeigt sich, dass durch die Behandlung mit Tamoxifen und dem MEK-Inhibitor die Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen zwar gehemmt werden konnte, die Zellzahl aber weiterhin über der nach Monostimulation mit dem MEK-Inhibitor liegt. Folglich kann der agonistische, proliferationsfördernde Effekt von Tamoxifen durch den MEK-Inhibitor nicht gehemmt werden

In Bild 3.13 sind alle MTS-Assays dieser Versuchsreihe zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten wurde diese wieder prozentual auf nicht behandelte Zellen (entsprechen 100 %) bezogen. Die Zellzahl wurde in optischer Dichte bestimmt.

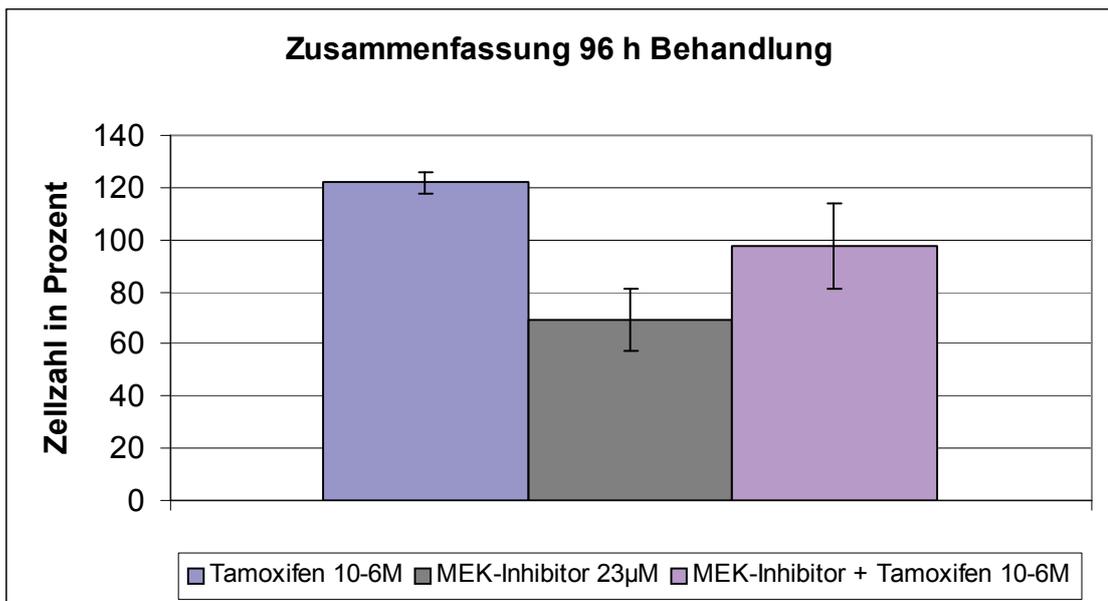
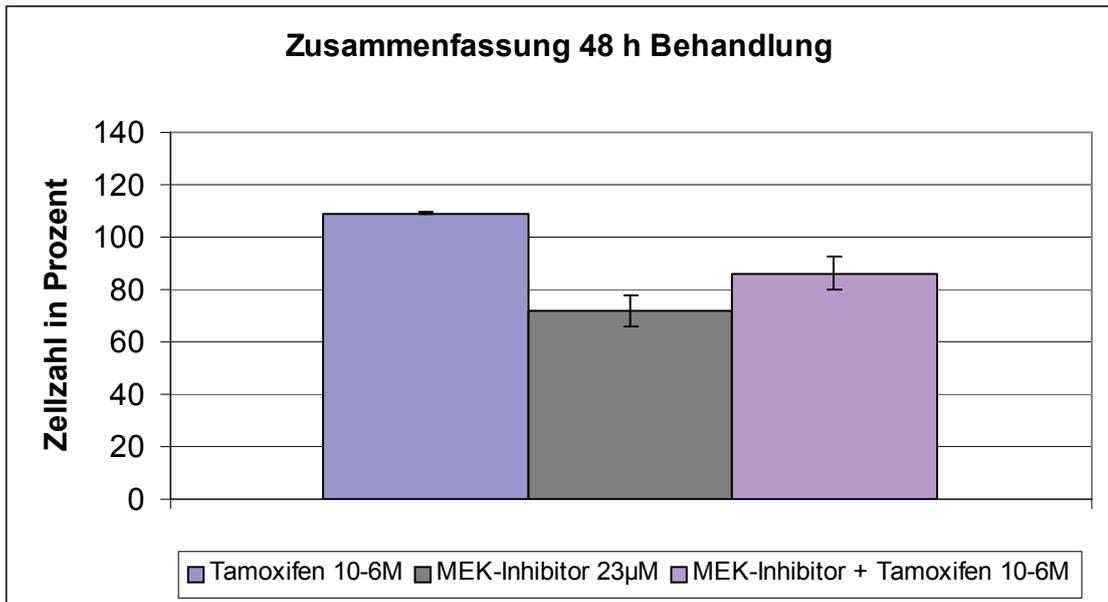


Bild 3.13 Darstellung der prozentualen Zellzahl (Zellzahl gemessen in optischer Dichte) nach Behandlung mit MEK-Inhibitor und Tamoxifen und einer Behandlungsdauer von 48 bzw. 96 Stunden, bezogen auf unbehandelte Zellen (entsprechen 100%), im Vergleich zu nur mit Tamoxifen oder MEK-Inhibitor behandelten Zellen. Es wird ersichtlich, dass es durch die Kombination zwar möglich ist die Zellproliferation zu reduzieren, jedoch der agonistische proliferationsfördernde Effekt von Tamoxifen durch den MEK-Inhibitor nicht hemmbar ist

### 3.2.11 MEK-Inhibitor 23 $\mu$ M + Tamoxifen + E<sub>2</sub>

In den Vorversuchen zeigte sich, dass es durch Hemmung des nichtgenomischen Wirkmechanismus von E<sub>2</sub> über die MAP-Kinasen mittels MEK-Inhibitor, nicht möglich war die östradiolinduzierte Zellproliferation aufzuheben. Tamoxifen hingegen wirkt als Antagonist am klassischen Östrogenrezeptor und blockiert somit den genomischen Östrogen Wirkmechanismus. Ziel dieses Versuches war es zu untersuchen, ob die durch den MEK-Inhibitor nicht blockierbare östradiolinduzierte Proliferationssteigerung durch Tamoxifen gehemmt werden kann.

Tamoxifen wurde in der Konzentration 10<sup>-6</sup> M eingesetzt, da diese auf die Zellkulturbedingungen gerechnet, der üblichen therapeutischen Dosierung von 20 mg pro Tag für eine erwachsene Frau entspricht. Da in den Vorversuchen sich jedoch zeigte, dass niedrigere Konzentrationen einen höheren antagonistischen Effekt auf die östradiolinduzierte Zellproliferation haben, wurde zusätzlich eine Konzentration von 10<sup>-8</sup> M verwendet. E<sub>2</sub> kam in der Konzentration 10<sup>-9</sup> M und der MEK-Inhibitor in 23  $\mu$ M zum Einsatz.

Durch den Einsatz von Tamoxifen war es möglich die durch den MEK-Inhibitor nicht blockierbare Östradiol induzierte Proliferation der Mammakarzinomzellen zu hemmen. In Bild 3.14 ist das Ergebnis eines MTS-Assays nach Stimulation mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M, MEK-Inhibitor und Tamoxifen 10<sup>-6</sup> M nach 96 Stunden Behandlungsdauer zur Veranschaulichung dargestellt. In der Hälfte aller Versuche war es sogar möglich die Östradiol induzierte Zellproliferation der MCF-7 Zellen vollständig zu blockieren.

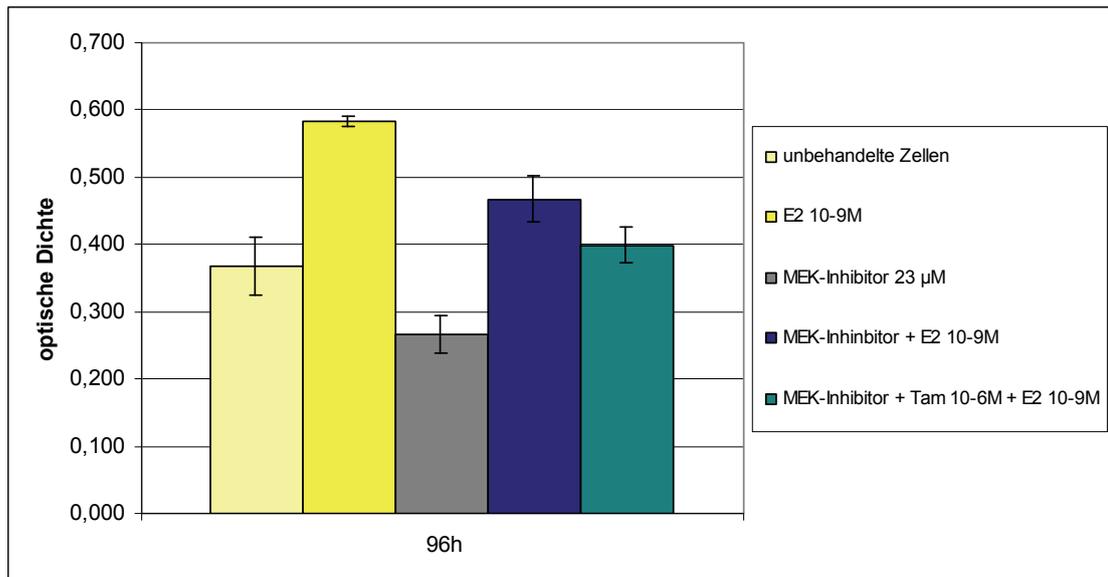


Bild 3.14 Exemplarisches Ergebnis eines MTS-Assays: Darstellung der Wirkung von Tamoxifen und MEK-Inhibitor auf die  $E_2$   $10^{-9}M$  induzierte Zellproliferation. (Zellzahl gemessen in optischer Dichte, mittels MTS-Zellproliferations-Assay, bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm). Die Werte wurden nach 96 Stunden bestimmt. Es zeigt sich, dass die durch den MEK-Inhibitor nicht blockierbare Östradiol induzierte Proliferationssteigerung durch den Einsatz von Tamoxifen gehemmt werden kann

Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-6}$  M wirkte weniger stark hemmend auf die östradiolinduzierte Zellproliferation als  $10^{-8}$  M.

In Bild 3.15 werden alle Versuche dieser Versuchsreihe zusammengefasst dargestellt. Hierzu wurde die Zellzahl prozentual auf nicht behandelte Zellen (entsprechen 100%) bezogen.

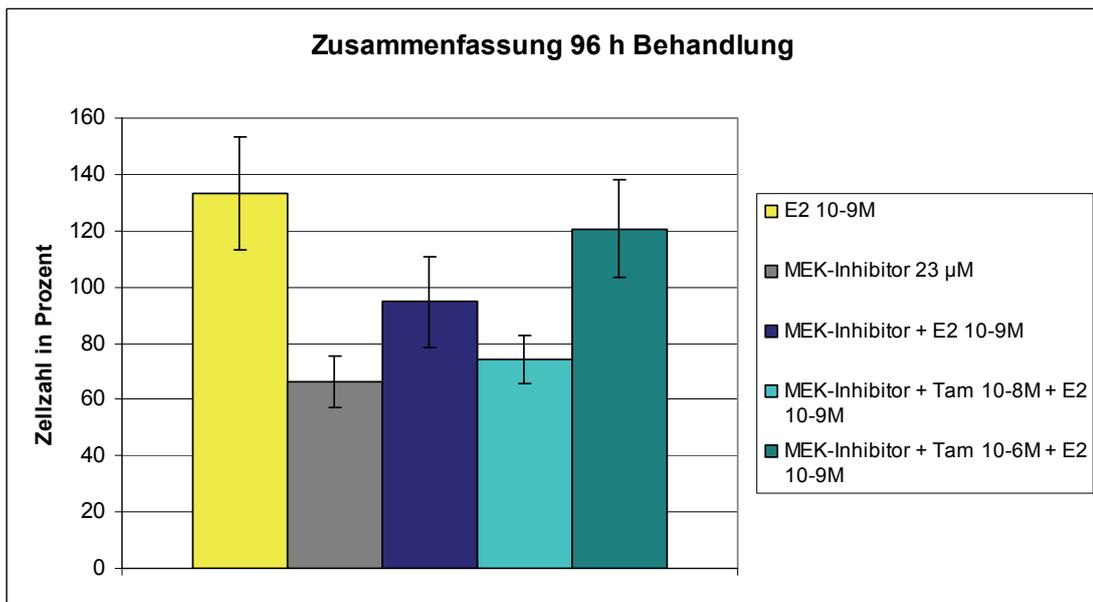
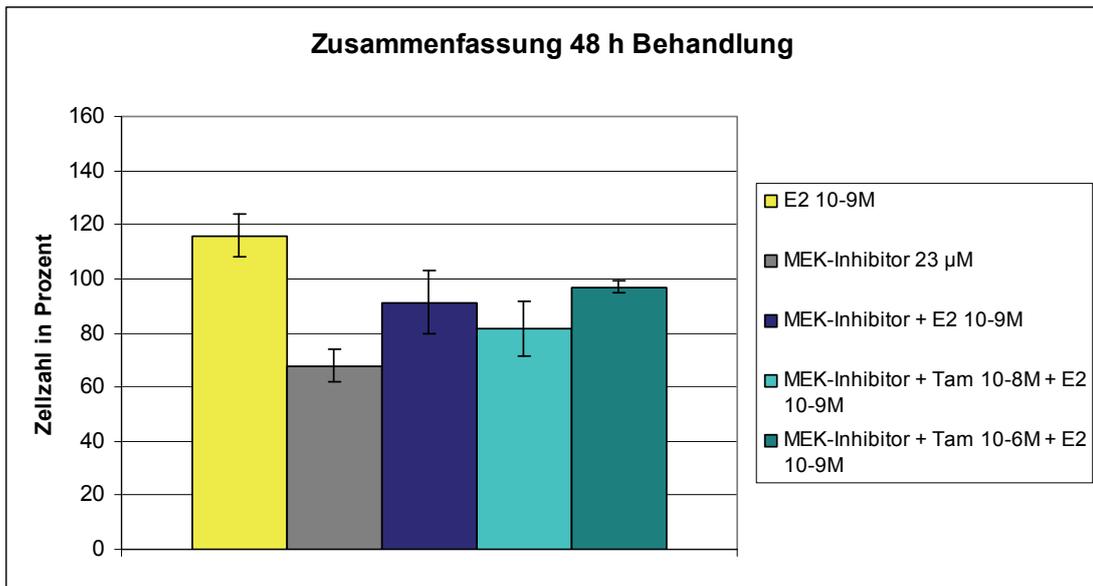


Bild 3.15 Darstellung der prozentualen Auswirkung von Tamoxifen und MEK-Inhibitor auf die  $E_2$   $10^{-9}M$  induzierte Zellproliferation (Zellzahl gemessen in optischer Dichte) bezogen auf nicht behandelte Zellen (entsprechen 100%). Hierzu wurden alle Versuche dieser Versuchsreihe zusammengefasst. Die Werte wurden nach 48 und 96 Stunden bestimmt. Es zeigt sich, dass die durch den MEK-Inhibitor nicht blockierbare Östradiol induzierte Proliferationssteigerung durch den Einsatz von Tamoxifen gehemmt werden kann. Die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen 10-8 M ist stärker als die von Tamoxifen in der Konzentration 10-6 M

## 4 Diskussion

Die Wirkung des Östradiols entfaltet sich über den klassischen Östrogenwirkmechanismus. Dies geschieht durch Bindung an den intrazellulär lokalisierten Östrogenrezeptor (ER) und führt zur Aktivierung der Transkription spezifischer Gene im Zellkern. Das aus neusynthetisierter mRNA hergestellte Protein bewirkt die genomische Antwort. Dieser Vorgang dauert mehrere Stunden. In den letzten Jahren wurden zunehmend Hinweise gesammelt, dass Östradiol seine Wirkung neben dem klassischen (genomischen) zusätzlich über einen alternativen (nichtgenomischen) Wirkmechanismus ausübt (Falkenstein *et al.*, 2000; Lösel und Wehling, 2003; Simoncini *et al.*; 2003). Die nichtgenomische Wirkung wird über Signaltransduktionswege vermittelt. Eine wichtige Rolle kommt hierbei den Proteinkinasen (z.B. der MAPK), der Veränderung des cAMP, dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, sowie der Modulation weiterer Second Messenger zu (Lösel und Wehling, 2003). Der Effekt zeigt sich bereits nach wenigen Sekunden oder Minuten und ist somit nicht durch den klassischen Wirkmechanismus erklärbar. Die Existenz eines membranständigen Östrogen-Rezeptors und die Bedeutung der zytoplasmatischen ER-Effekte sind inzwischen weitgehend anerkannt und durch eine Vielzahl experimenteller Arbeiten belegt (Kelly und Levin, 2001; Song und Santen, 2006).

Diese Dissertation ist aus einem Forschungsprojekt heraus entstanden, welches sich mit den nichtgenomischen Wirkungen von Östradiol auf MCF-7-Mammakarzinomzellen beschäftigte. Ziel dieser Dissertation war zunächst die Etablierung von Zellkulturbedingungen, die eine gute Zelladhaerenz, die Ausbildung von Zellausläufern und Zellverbänden, welche zu einem gleichmäßigen Zellrasen konfluieren, sowie eine hohe Proliferationsrate fördern. Diese Punkte wurden als positive Kriterien für eine gut wachsende Zellkultur mit metabolisch aktiven Zellen angesehen. Sie stellen somit eine wichtige

Grundlage für aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse der nachfolgenden Proliferationsversuche dar.

In den Proliferationsversuchen wurde die Auswirkung von verschiedenen Östradiolkonzentrationen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) auf die Zellproliferation der MCF-7 Mammakarzinomzellen untersucht. Darauf aufbauend wurde die Wirkung von Tamoxifen ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M), einem seit vielen Jahren erfolgreich in der endokrinen Therapie von Mammakarzinomen verwendeten Selektiven-Östrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) und des MEK-Inhibitors PD98059 (23  $\mu$ M), einem Inhibitor der nichtgenomischen Östradiol-Signalkaskade, auf die Zellproliferation untersucht. Es wurde ebenfalls beobachtet, wie sich die Kombination aus Tamoxifen und MEK-Inhibitor auf die Zellproliferation auswirkt. Die Versuche wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Östradiol durchgeführt.

#### 4.1 Etablierung der optimalen Zellkulturbedingungen

Zur Durchführung der genannten Versuche wurden Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 verwendet. Es handelt sich dabei um Mammakarzinomzellen einer etablierten Zelllinie, die in zahlreichen Studien zur Erforschung und Analyse der Auswirkung und Wirkmechanismen von Hormonen und deren Antagonisten, sowie Inhibitoren auf die Zellproliferation verwendet wurde (Katzenellenbogen *et al.* 1987).

Zur Beurteilung der optimalen Zellkulturbedingungen wurden die Zellmorphologie, -anordnung, -adhaerenz, sowie die Dauer bis zum Erlangen einer 90-prozentigen Konfluenz beobachtet. Es zeigte sich, dass Zellen, welche in phenolrothaltigem Medium kultiviert wurden, eine bedeutend bessere Zelladhaerenz aufwiesen. Die Zellen bildeten Ausläufer und erreichten schneller eine 90-prozentige Konfluenz als Zellen, welche in phenolrotfreiem Medium kultiviert wurden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Forschungsgruppen (Katzenellenbogen *et al.* 1987). Das Phenolrot fungiert als pH-Indikator im Zellkulturmedium. Die höhere Zellproliferationsrate im Vergleich zu

phenolrotfreiem Medium ist auf die leichte östrogene Wirkung des Phenolrots zurückzuführen (Berthois *et al.* 1986). Die optimale Aussaatdichte lag bei  $10^6 - 5 \times 10^6$  Zellen pro 550 ml Gewebekulturflasche.

Für die Stimulationsversuche wurden die Zellen stets für eine Dauer von 4 Tagen unter östrogenfreien Bedingungen gehalten. Es wurde stets phenolfreies Medium verwendet, welches mit CSFCS versetzt war, um den Einfluss von wachstumsstimulierenden Substanzen auf ein Minimum zu beschränken. In diesem ausgehungerten Zustand wurden die MCF-7 Zellen schließlich mit der entsprechenden Stimulanz inkubiert. Der Entzug von Östradiol führt zu einer Hochregulation der MAP-Kinasen (Santen *et al.*, 2002), sowie einer Hypersensibilität der Mammakarzinomzellen für Östrogen (Santen *et al.*, 2005). Ein Serumentzug führt bereits nach 48 Stunden zu einer Hochregulation des membranständigen Östrogenrezeptors. Der intrazelluläre ER ist dabei nicht signifikant verändert (Campell *et al.*, 2002).

## **4.2 Auswirkung von Östradiol, EGF, Tamoxifen, MEK-Inhibitor und deren Kombinationen auf die Proliferation von Östrogenrezeptor-positiven MCF-7 Mammakarzinomzellen**

### **4.2.1 Stimulation von MCF-7 Zellen mit Östradiol ( $E_2$ )**

Die ausgeprägteste Proliferationssteigerung der MCF-7 Zellen erfolgte nach Stimulation mit Östradiol in der Konzentration  $10^{-9}$  M. Diese Beobachtung deckt sich mit der anderer Forschungsarbeiten (Martin *et al.*, 2005). Östrogen-Rezeptoren gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und sind im Nukleus lokalisiert. Sie fungieren als hormonabhängige Transkriptionsfaktoren. Außer durch direkte DNA-Bindung ist es Östrogenrezeptoren (ERs) möglich die Genexpression und damit auch die Zellproliferation durch zwei weitere Mechanismen zu regulieren. (I) durch Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Signalkaskaden („tethering“), z.B. den MAP-Kinasen,

und (II) über einen möglichen membranständigen Rezeptor („nichtgenomischer Wirkmechanismus“). Dieser nichtgenomische Wirkmechanismus entfaltet seine schnelle Östrogenwirkung über eine durch Kinasen vermittelte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, welche wiederum die Genexpression regulieren (Bourdeau *et al.*, 2008). Alle drei Wege führen zu einer Stimulation der Zellproliferation. Des Weiteren besteht die Theorie, dass Wachstumsfaktoren in der Lage sind die Östrogen-signalwege zu aktivieren und dadurch die Wirkung endokriner Therapien zu beeinflussen. Eine solche östrogenunabhängige Aktivierung des ERs kann etwa durch EGF, TGF- $\alpha$  oder IGF-1 erfolgen und wird über die MAP-Kinasen vermittelt (Treeck *et al.*, 2003.).

In den nachfolgenden Versuchen wurde die Signalkaskade des Östrogens an verschiedenen Stellen gehemmt und anschließend die Auswirkung auf die Zellproliferation beobachtet.

#### **4.2.2 Stimulation von MCF-7 Zellen mit Tamoxifen in Ab- und Anwesenheit von Östradiol**

Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM) und konkurriert mit Östradiol um die Ligandenbindungsdomäne des ERs. Der Hauptmetabolit des Tamoxifens ist das 4-Hydroxytamoxifen. Es wirkt partial agonistisch und antagonistisch am ER $\alpha$  und rein antagonistisch am ER $\beta$ . Der ER $\alpha$  bewirkt v.a. eine proliferationsfördernde und antiapoptotische Wirkung, wohingegen der ER $\beta$  die ER $\alpha$  vermittelte Östrogenwirkung antagonisiert. In der gesunden Brust dominiert der ER $\beta$ . Im Rahmen der Karzinogenese kommt es zu einem Verlust des ER $\beta$  und somit zu einer fehlenden Kontrolle des ER $\alpha$  (Murphy *et al.* 2005, Leidenberger *et al.* 2009).

Ob Tamoxifen neben der Hemmung des klassischen ER ebenfalls in der Lage ist den membranständigen ER zu hemmen wird diskutiert. Nachgewiesen sind bereits nichtgenomische antiproliferative Effekte durch Tamoxifen, welche über Signalproteine, z.B. die MAP-Kinasen vermittelt werden (Mandlekar *et al.* 2001, Zhou *et al.* 2007, Zheng *et al.* 2007).

Der SERM wurde in Konzentrationen von  $10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  M eingesetzt. Es wurden Versuche in Abwesenheit, ebenso wie in Anwesenheit von  $E_2$  durchgeführt.

Die Versuche in Abwesenheit von Östradiol dienten der Untersuchung des agonistischen und damit proliferationsfördernden Effekts von Tamoxifen ( $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M) am ER. Dieser war am ausgeprägtesten für Tamoxifen  $10^{-6}$  M und nahm mit sinkender Tamoxifen Konzentration ab. Dass die Wirkungsweise des Tamoxifen, ob agonistisch oder antagonistisch, u.a. dosisabhängig ist, beschrieben ebenfalls Göretzlehner *et al.* (2007). Katzenellenbogen *et al.* (1987) beobachteten einen proliferationsstimulierenden Effekt bei niedrigeren Transhydroxy-Tamoxifen und Tamoxifenkonzentrationen ( $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  M). Der Stimulationseffekt war jedoch stets niedriger als nach der Stimulation mit entsprechenden  $E_2$ -Konzentrationen. Auch Murphy *et al.* (2005) beschrieben einen proliferationsfördernden Effekt durch Tamoxifenkonzentration  $< 5 \times 10^{-9}$  M. Ab höheren Tamoxifenkonzentrationen war kein proliferierender Effekt mehr nachweisbar. Bei Martin *et al.* (2005) zeigte sich ein agonistischer Effekt auch noch bei Konzentrationen in der Höhe von  $10^{-6}$  M. Im Rahmen einer Langzeitbehandlung mit Tamoxifen (1-5 Monate) wurde von Berstein *et al.* (2003) eine Zunahme des agonistischen Effekts, als Vorstufe zur Entwicklung einer Tamoxifenresistenz beobachtet. Zunächst wirkte Tamoxifen als Antiöstrogen, im zweiten Schritt kam es zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber den agonistischen Tamoxifeneffekten und schließlich zur einem verstärkten Ansprechen auf Östradiol und somit zu einer Tamoxifenresistenz. Hierdurch erklärt sich das klinisch beobachtete erneute Tumorwachstum nach anfänglicher Regression unter einer Tamoxifenbehandlung. In einer weiteren Studie zeigten Berstein *et al.* (2004) und Santen *et al.* (2005) erneut, dass eine Langzeitbehandlung mit Tamoxifen die Sensibilität gegenüber dem agonistischen Tamoxifeneffekt erhöht und gleichzeitig auch das Ansprechen auf Östradiol verstärkt. Dies konnte bereits nach einer Behandlungsdauer von 4 Monaten gezeigt werden. Insgesamt handelt es sich bei der agonistischen Wirkung von Tamoxifen um einem komplexen, aber durchaus klinisch

relevanten Vorgang, der durch eine Vielzahl von Faktoren, wie Tamoxifenkonzentration und Behandlungsdauer beeinflusst wird.

Die Versuche mit Tamoxifen, in Anwesenheit von  $E_2$  wurden jeweils mit  $E_2$  in der Konzentration  $10^{-9}$  M durchgeführt, da diese in den Vorversuchen die stärkste proliferationsfördernde Wirkung gezeigt hatte. Die Zellen wurden hierfür stets eine halbe Stunde mit Tamoxifen vorinkubiert, bevor  $E_2$  hinzugegeben wurde. Durch den Einsatz von Tamoxifen war es möglich die proliferationsfördernde Wirkung von Östradiol in 84,4% der Versuche zu reduzieren und in 18,8 % der Versuche sie ganz aufzuheben. Die stärkste antagonistische Wirkung zeigte sich nach der Behandlung mit Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-10}$  M.

Eine Erklärung, weshalb es nur in 18,8 % der Versuche möglich war die  $E_2$  induzierte Zellproliferation durch Tamoxifen vollständig zu hemmen, ist die bereits in den Vorversuchen nachgewiesene agonistische Wirkung von Tamoxifen. Der agonistische Effekt war am höchsten bei einer Tamoxifenkonzentration von  $10^{-6}$  M und nahm mit sinkender Konzentration ab. Dies würde erklären weshalb die ausgeprägteste Hemmung der Östradiol induzierten Zellproliferation nach der Behandlung mit Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-10}$  M nachweisbar war. Tamoxifen  $10^{-10}$  M hatte in den Vorversuchen die geringste agonistische Wirkung gezeigt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die  $E_2$  induzierte Zellproliferation u.a. über Signalkaskaden vermittelt wird, welche durch Tamoxifen nicht hemmbar sind, z.B. die MAP-Kinasen. In den Folgeversuchen wurde daher die Wirkung des MEK-Inhibitors auf die östradiolinduzierte Zellproliferation untersucht.

Nach Langzeit-Östrogen-Deprivation wurde eine Östrogen-Hypersensibilität, mit einer Hochregulation des ER- $\alpha$ , einer vermehrten Aktivierung der MAPK, einer Zunahme der nichtgenomischen Östrogeneffekte, sowie einer Zunahme der Interaktion zwischen membranständigem Östrogenrezeptor und IGF-1-Rezeptor beobachtet (Santen *et al.* 2005, Martin *et al.* 2005). All diese Faktoren führen zu einem verminderten ansprechen auf Tamoxifen. Bei kurzzeitig östrogengehungerten Zellen war die proliferationssteigernde Wirkung von  $E_2$ ,

jedoch durch Tamoxifen Konzentrationen über  $10^{-7}$  M stets antagonisierbar. Ebenfalls Horner-Glister *et al.* (2005) zeigten eine signifikante Hemmung der durch  $E_2$   $10^{-8}$  M stimulierten Zellproliferation durch Tamoxifen  $10^{-6}$  M.

#### **4.2.3 Stimulation von MCF-7 Zellen mit MEK-Inhibitor (PD98059) in Ab- und Anwesenheit von Östradiol**

Der MEK-Inhibitor greift in den Signaltransduktionsweg der MAP-Kinasen ein, indem er die MAPKK inhibiert. Der letzte Schritt in der MAPK-Kaskade besteht in einer Translokation der MAPK in den Zellkern. Dort erfolgt die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Zykline (z.B. Zyklin D1) induzieren. Die Zykline wiederum setzen den Zellzyklus in Gang (Musgrove *et al.*, 1993 und 1994; Lobenhofer *et al.*, 2000) und resultieren somit in einer Zunahme der Zellproliferation. Der MAPK-Kaskade wird somit eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Zellproliferation, des Zellüberlebens und der Differenzierung zugesprochen (Roberts *et al.* 2007). Diese Mechanismen werden durch die Inhibierung der MAP-Kinasen durch den MEK-Inhibitor unterbunden, so dass dieser einen proliferationshemmenden Effekt auf die Zellen entfaltet. Da die Aktivierung der MAP-Kinasen von zahlreichen Botenstoffen (z.B. EGF, Östradiol) genutzt wird, blockiert der MEK-Inhibitor die Signaltransduktionswege mehrerer Botenstoffe zugleich.  $E_2$  hat die Möglichkeit einerseits durch Interaktion des intrazellulären ER mit anderen Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionswegen oder über einen membranständigen ER eine Aktivierung der MAP-Kinasen herbeizuführen (Bourdeau *et al.*, 2008, Migliaccio *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Silva *et al.* (2010) zeigte eine partielle Unterdrückung der Transkriptionsfaktoren nach Stimulation mit  $E_2$ , durch den MEK-Inhibitor PD98059. Auch existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass östrogenunabhängig Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung des ERs führen können. Diese Aktivierung erfolgt u.a. über die MAP-Kinasen (Treeck *et al.*, 2003). Ebenfalls Santen *et al.* (2002) beschreiben eine Stimulation der Zellproliferation durch Östradiol über den

Signaltransduktionsweg der MAPK, entweder über den nichtgenomischen Wirkmechanismus oder über eine erhöhte Stimulation von Wachstumsfaktoren, welche wiederum die MAP-Kinasen stimulieren. Die MAP-Kinasen haben die Fähigkeit entweder direkt oder indirekt den ER zu phosphorylieren und somit seine Transkriptionseffektivität zu steigern. Castoria *et al.* (1999) postulierten sogar, dass der primäre Effekt von Östradiol auf die Zellproliferation möglicher Weise über den nichtgenomischen Östrogenmechanismus, durch die MAP-Kinasen vermittelt werde.

Der MEK-Inhibitor wurde stets in der Konzentration 23  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Vor dem Hintergrund des Wirkmechanismus des MEK-Inhibitors zeigte sich wie erwartet, dass der MEK-Inhibitor in den durchgeführten Versuchen, in Abwesenheit von  $\text{E}_2$ , einen eindeutig signifikanten proliferationshemmenden Effekt auf die MCF-7 Zellen hat. Nun stellte sich die Frage inwiefern es durch Einsatz des MEK-Inhibitors möglich ist, die positive Wirkung von  $\text{E}_2$  ( $10^{-9}$  M) auf die Zellproliferation zu antagonisieren. Hierfür wurden die MCF-7 Zellen für eine halbe Stunde mit dem MEK-Inhibitor vorinkubiert, bevor  $\text{E}_2$  hinzugegeben wurde. Durch den Einsatz des MEK-Inhibitors ist es in den durchgeführten Versuchen nicht möglich die proliferationsfördernde Wirkung von  $\text{E}_2$  zu hemmen. Die Zellzahl wird zwar nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor unter die unbehandelten Zellen gesenkt, ist jedoch stets höher als nach einer Monobehandlung mit dem MEK-Inhibitor. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass die proliferationsfördernde Wirkung von Östradiol hauptsächlich über die ER-abhängige genomische Signaltransduktion und nicht über die MAP-Kinasen vermittelt wird.

#### **4.2.4 Stimulation von MCF-7 Zellen mit MEK-Inhibitor (PD98059) und Tamoxifen in Ab- und Anwesenheit von Östradiol**

In den Versuchen in Abwesenheit von  $\text{E}_2$  stellte sich die Frage ob es möglich ist die agonistische Wirkung von Tamoxifen durch den Einsatz des MEK-Inhibitors zu hemmen. Tamoxifen wurde in der Konzentration  $10^{-6}$  M eingesetzt, da diese

in den Vorversuchen den größten agonistischen Effekt gezeigt hatte. Der MEK-Inhibitor wurde wie gewohnt in der Konzentration 23  $\mu\text{M}$  verwendet.

Es zeigte sich, dass es durch die Behandlung mittels MEK-Inhibitor nicht möglich war den agonistischen und somit proliferationsfördernden Effekt von Tamoxifen zu hemmen. Dies lässt darauf schließen, dass die agonistische Wirkung von Tamoxifen nicht durch die MAP-Kinasen vermittelt wird. Möglicherweise ist die proliferationsfördernde Wirkung des Tamoxifen auf eine agonistische Restaktivität am klassischen Östrogenrezeptor zurückzuführen. Die Arbeitsgruppe um Wang (2002) zeigte, dass Tamoxifen die Genexpression der humanen Telomerase Reverse Transkriptase beeinflusst und hierüber z. T. seine agonistische und antagonistische Wirkung entfaltet. Frasor *et al.* (2006) stellten fest, dass es Tamoxifen möglich ist, selektiv mehr als 60 Gene zu regulieren, welche nur minimal durch Östradiol beeinflusst werden. Diese Ergebnisse zeigen wie facettenreich die Wirkungsweise des Tamoxifen ist. Über welche Mechanismen genau der SERM seine agonistische Wirkung entfaltet bleibt noch zu klären.

Da Tamoxifen und der MEK-Inhibitor an unterschiedlichen Stellen in die Signaltransduktionswege des Östradiols eingreifen, stellte sich als nächstes die Frage, ob es durch Tamoxifen möglich ist, die durch den MEK-Inhibitor nicht blockierbare Östradiol induzierte Zellproliferation zu hemmen. Mandlekar *et al.* (2001) beschreiben, dass neben der hauptsächlich über den antagonistischen Effekt am Östrogenrezeptor vermittelten Wirkung von Tamoxifen, der SERM seine antiproliferative Wirkung zusätzlich über die Modulation von Signalproteinen, z. B. den MAP-Kinasen entfaltet. Zhou *et al.* (2007) stellten fest, dass die durch Tamoxifen und Hydroxytamoxifen über den ER vermittelte Apoptose von Karzinomzellen über die MAP-Kinasen Kaskade vermittelt und durch den MEK-Inhibitor PD98059 blockiert werden kann. Auch die Forschungsgruppe um Zheng (2007) beschreibt durch Tamoxifen vermittelte nichtgenomische, zur Apoptose von Mammakarzinomzellen führende Effekte. Diese sind durch den MEK-Inhibitor PD98059 hemmbar. Somit wäre es durch den Einsatz der Kombination von MEK-Inhibitor und Tamoxifen in Gegenwart

von Östradiol durchaus möglich, dass der MEK-Inhibitor die antiproliferative Wirkung des Tamoxifen mindert.

Tamoxifen wurde in den Konzentration  $10^{-8}$  und  $10^{-6}$  M eingesetzt,  $E_2$  in  $10^{-9}$  M und der MEK-Inhibitor in 23  $\mu$ M. Die MCF-7 Zellen wurden eine halbe Stunde mit Tamoxifen und dem MEK-Inhibitor vorinkubiert, bevor Östradiol hinzugegeben wurde.

Durch den Einsatz von Tamoxifen war es möglich die Östradiol induzierte Zellproliferation, welche durch den MEK-Inhibitor nicht aufgehoben werden konnte, zu reduzieren und in 50 % der Versuche ganz aufzuheben. Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-8}$  M zeigte eine stärkere antagonistische Wirkung als  $10^{-6}$  M. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Vorversuche überein, in denen die stärkste antagonistische Wirkung bei der niedrigsten Tamoxifenkonzentration ( $10^{-10}$  M) nachgewiesen wurde. Die Wirkung des Tamoxifen war somit durch den MEK-Inhibitor nicht gemindert. Dies spricht dafür, dass Tamoxifen seine antagonistische Wirkung über die ER-abhängigen genomischen  $E_2$ -Effekte entfaltet.

## 5 Zusammenfassung

Östradiol ( $E_2$ ) entfaltet seine Wirkung zum einen über den klassischen genomischen Wirkmechanismus. Dies geschieht durch Interaktion mit dem intrazellulären Östrogenrezeptor (ER) und nachfolgender Regulation der Transkription  $E_2$ /ER-abhängiger Gene im Zellkern. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass neben dem genomischen Wirkmechanismus zusätzlich eine schnelle nichtgenomische Östradiol-Wirkung existiert, welche über intrazelluläre Signaltransduktionswege (z.B. die MAPK-Kaskade) vermittelt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung von reproduzierbaren Zellkulturbedingungen, welche zu einer möglichst hohen  $E_2$ -abhängigen Zellproliferation führen. Anschließend wurde in Proliferationsversuchen die Auswirkung von Östradiol, Tamoxifen (einem selektiven Östrogenrezeptormodulator) und dem MEK-Inhibitor PD98059 (als Inhibitor des nichtgenomischen Östradiolwirkmechanismus), sowie deren Kombination auf die Proliferation von ER-positiven Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 untersucht.

Die Etablierung der Zellkulturbedingungen führte zu folgendem Ergebnis: Die Zellen wurden in phenolrothaltigem Nährmedium kultiviert. Als optimale Aussaat-Menge in 550 ml Gewebekulturflaschen erwiesen sich  $1-5 \times 10^6$  Zellen. Für die Proliferationsversuche wurden 500 Zellen / Loch in 96 Lochplatten pipettiert und über 4 Tage unter östrogenfreien Bedingungen in phenolrotfreiem Medium gehungert. Dies führte zu einem besonders starken Ansprechen der Zellen auf  $E_2$ . Am 4. Tag wurden die jeweiligen Wachstumsbedingungen eingestellt und 48 bzw. 96 Stunden später die Zellzahl mittels MTS-Proliferationsassay bestimmt.

Östradiol wurde in den Stimulationsversuchen in den Konzentrationen  $10^{-9}$  M und  $10^{-8}$  M eingesetzt.  $E_2$   $10^{-9}$  M induzierte eine höhere Zellproliferation als  $E_2$   $10^{-8}$  M. In den Folgeversuchen wurde  $E_2$  daher stets in der Konzentration  $10^{-9}$  M eingesetzt.

Nach der Behandlung der Zellen mit Tamoxifen ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M) wurde der agonistische und somit proliferationsfördernde Effekt des Tamoxifen beobachtet. Dieser war bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M am höchsten und nahm mit sinkender Konzentration ab. In Kombination mit  $E_2$  zeigte Tamoxifen einen antagonistischen Effekt und hemmt somit die  $E_2$  induzierte Zellproliferation der Mammakarzinomzellen. Die stärkste Wirkung diesbezüglich zeigte Tamoxifen in der Konzentration  $10^{-10}$  M.

Der MEK-Inhibitor PD98059 wurde stets in der Konzentration 23  $\mu$ M eingesetzt. Er ist ein spezifischer Inhibitor der MAPK und unterbindet somit den Signaltransduktionsweg zahlreicher Substanzen (z.B. EGF). Sein Einsatz führte, wie erwartet, zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation. In Kombinationsversuchen mit  $E_2$ , war es mittels MEK-Inhibitor jedoch nicht möglich die  $E_2$ -induzierte Zellproliferation zu hemmen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die  $E_2$ -induzierte Zellproliferation hauptsächlich über den klassischen genomischen Signalweg vermittelt wird.

Durch die Kombination von Tamoxifen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  M) mit dem MEK-Inhibitor war es nicht möglich den agonistischen Effekt von Tamoxifen zu hemmen. Die Zellzahl der mit MEK-Inhibitor und Tamoxifen behandelten Zellen, lag stets über den nur mit MEK-Inhibitor behandelten Mammakarzinomzellen.

In den Kombinationsversuchen von Tamoxifen ( $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$  M) und MEK-Inhibitor in Anwesenheit von  $E_2$  wurde die durch den MEK-Inhibitor nicht hemmbare,  $E_2$ -induzierte Zellproliferation durch Tamoxifen reduziert, in 50% der Versuche war es sogar möglich sie ganz aufzuheben.

## 6 Literatur

**Abukhdeir, A.M.; Vitolo, M.I.; Argani, P.; De Marzo, A.M.; Karakas, B.; Konishi, H.; Gustin, J.P.; Lauring, J.; Garay, J.P.; Pendleton, C.; Konishi, Y., Blair, B.G.; Brenner, K.; Garrett-Mayer, E.; Carraway, H., Bachman, K.E.; Park, B.H.:** Tamoxifen-stimulated growth of breast cancer due to p21 loss. *PNAS* (2008). 105 (1): 288-293

**Barakat, R.R.:** Tamoxifen and endometrial neoplasia. *Clin. Obstet. Gynecol.* (1996). 39: 629-640

**Barakat, R.R.:** Tamoxifen and the endometrium. *Cancer Treat. Res.* (1998). 94: 195-207

**Beato M.; Herrlich P.; Schulz G.:** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* (1995) 83:851-857

**Beckmann, M. W.; Dall, P.; Fasching, P.A.; Krüssel, J.-S.; Niederacher, D.; Tutschek, B.:** *Molekulare Medizin in der Frauenheilkunde: Diagnostik und Therapie*. 1. Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag, 2001. – ISBN 3798513015

**Berstein, L.M.; Zheng, H.; Yue, W.; Wang, J-P.; Lykkesfeldt, A.E.; Naftolin, F.; Harada, N.; Shanabrough, M.; Santen, R.J.:** New approaches to the understanding of tamoxifen action and resistance. *Endocrine-Related Cancer* (2003). 10: 267-277

**Berstein, Lev, M.; Wang, Ji-Ping; Zheng, Hong; Yue, Wei; Conaway, Mark; Santen, Richard, J.:** Long-Term Exposure to Tamoxifen Induces Hypersensitivity to Estradiol. *Clinical Cancer Research* (2004). 10: 1530-1534

**Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A.; Katzenellenbogen, B.S.:** Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986). 83: 2496-2500

**Berthois, Y.; Pourreau-Schneider, N.; Gandilhon, P.; Mitre, H.; Tubiana, N.; Martin, P.M.:** Estradiol membrane binding sites on human breast cancer cell lines. Use of a fluorescent estradiol conjugate to demonstrate plasma membrane binding systems. *J. Steroid Biochem.* (1986). 25: 963-972

**Bourdeau, Véronique; Deschênes, Julie; Laperrière, David; Aid, Malika; White, John, H.; Mader, Sylvie:** Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research* (2008). 36 (1): 76-93

**Boyan, B.D.; Sylvia, V.L.; Frambach, T.; Lohmann, C.H.; Dietl, J.; Dean, D.D.; Schwartz, Z.:** Estrogen-Dependent Rapid Activation of Protein Kinase C in Estrogen Receptor-Positive MCF-7 Breast Cancer Cells and Estrogen Receptor-Negative HCC38 Cells Is Membrane-Mediated and Inhibited by Tamoxifen. *Endocrinology* (2003). 144(5): 1812-1824

**Brodie, A.; Sabins, G.; Jelovac, D.:** Aromatase and Breast Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (2006). 102 (1-5): 97-102

**Campbell, Celeste, H.; Bulayeva, Nataliya; Brown, David, B.; Gametchu, Bahiru; Watson, Cheryl, S.:** Regulation of the membrane estrogen receptor- $\alpha$ : role of cell density, serum, cell passage number, and estradiol. *FASEB Journal* (2002). 16: 1917-1927

**Castoria, G.; Barone, M.V.; Di Domenico, M.; Bilancio, A.; Ametrano, D.; Migliaccio, A.; Auricchio, F.:** Non-transcriptional action of oestradiol and progesterin triggers DNA synthesis. *EMBO J.* (1999). 18: 2500-2510

**Collins, P.; Webb, C.:** Estrogen hits the surface. *Nature Med* (1999). 1130-1131

**Crohns, C.; Bauerschlag, D.; Maass, N.:** Endokrine Therapie des Mammakarzinoms: Neue Entwicklungen. *Gynäkologe* (2009). 42: 164-169

**Day, R.; Ganz, P.A.; Costantino, J.P.; Cronin, W.M.; Wickerham, D.L.; Fischer, B.:** Healthrelated quality of life and tamoxifen in breast cancer prevention: a report from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Clin. Oncol.* (1999). 17: 2659-2669

**Djahansouzi, S.; Hanstein, B.; Bender, H.G.; Dall, P.:** Wachstumsfördernde Signalübertragungswege: Rezeptorblockaden als Therapieprinzip. *Der Gynäkologe* (2004), 3: 215 - 220

**EBCTC-Group:** ACOG committee opinion. Tamoxifen and endometrial cancer. Number 169, February 1996. Committee on Gynecologic Practice. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*(1996). 53: 197-199

**Falkenstein, E.; Wehling, M.:** Nongenomically initiated steroid actions. *Eur. J. Clin. Invest.* (2000). 30 Suppl 3: 51-54

**Fan, Ping; Wang, Jiping; Santen, Richard, J.; Yue, Wei:** Long-term Treatment with Tamoxifen Facilitates Translocation of Estrogen Receptor  $\alpha$  out of the Nucleus and Enhances its Interaction with EGFR in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Cancer Research* (2007). 67: 1352-1360

**Frasor, J.; Chang, E.C.; Komm, B.; Lin, C.Y.; Vega, V.B.; Liu, E.T.; Miller, L.D.; Smeds, J.; Bergh, J.; Katzenellenbogen B.S.:** Gene expression preferentially regulated by tamoxifen in breast cancer cells and correlations with clinical outcome. *Cancer Res.* (2006). 66(14): 7334-7340

**Geschwind, A.; Fischer, O.M.; Ullrich A.:** The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* (2004). 4: 361-370

**Göretzlehner, G.; Lauritzen, Ch.; Göretzlehner, U.:** *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. 5. Auflage. Berlin: Gruyter 2007. – ISBN 3110190443

**Gustafsson JÄ.:** Estrogene receptor beta – an new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endokrinol.* (1999). 163: 379-383

**Hall, JM. and Mc Donnell DP.:** The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* (1999). 140: 5566-5578

**Harper, M.J.; Walpole, A.L.:** A new derivative of triphenylethylene: Effect on implantation and mode of action in rats. *J. Reprod. Fertil* (1967), 13: 101-119

**Horner-Glister, E.; Maleki-Dizaji, M., Guerin, C.J.; Johnson, S.M.; Styles, J.; White, I.N.H.:** Influence of oestradiol and tamoxifen on oestrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$  protein degradation and non-genomic signalling pathways in uterine and breast carcinoma cells. *J. o. Molecular Endocrinology* (2005). 35: 421-432

**Katzenellenbogen, Benita, S.; Kendra, Kari, L.; Norman, Mary Jane; Berthois, Yolande:** Proliferation, Hormonal Responsiveness, and Estrogen Receptor Content of MCF-7 Human Breast Cancer cells Grown in the Short-Term and Long-Term Absence of Estrogens. *Cancer Research* (1987). 47: 4355-4360

**Kelly, M.J.; Levin, E.R.:** Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* (2001), 12: 152-156

**Kuiper, G.G.; Carlson B.; Grandien K.; Enmark, E.; Haggblad J.; Nilsson, S.; Gustafsson J.A.:** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* (1997). 138: 863-870

**Leidenberger, F.; Strowitzki, T.; Ortmann, O.:** *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. 4. Auflage. Berlin: Springer, 2009. – ISBN 3540897593

**Levin, E.R.:** Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Molecular Endocrinology* (2003). 17: 309-317

**Lösel, R.; Wehling M.:** Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2003). 4: 46-56

**Lobenhofer E.K.; Huper, G.; Iglehart, J.D.; Marks, J.R.:** Inhibition of Mitogene-activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in MCF-7 Cells Prevents Estrogen-induced Mitogenesis. *Cell Growth Differ.* (2000). 11(2): 99-110

**Love, R.R.; Mazess, R.B.; Barden, H.S.; Epstein, S.; Newcomb, P.A.; Jordan, V.C.; Carbone, P.P.; DeMets, D.L.:** Effect of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N. Engl. J. Med.* (1992). 326: 852-856

**Mandelkar S.; Kong, A.N.:** Mechanisms of tamoxifen induced apoptosis. *Apoptosis* (2001). 6(6): 469-477

**Mangelsdorf, DJ.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P. et al.:** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* (1995). 83: 835-839

**Martin, L-A.; Pancholi, S.; Chan, C.M.W.; Farmer, I.; Kimberley, C.; Dowsett, M.; Johnston, S.R.D.:** The anti-oestrogen ICI 182,780, but not tamoxifen, inhibits the growth of MCF-7 breast cancer cells refractory to long-term oestrogen deprivation through down-regulation of oestrogen receptor and IGF signalling. *Endocrine-Related Cancer* (2005). 12: 1017-1036

**Marttunen, M.B.; Hietanen, P.; Tiitinen, A.; Ylikorkala, O.:** Comparison of effects of tamoxifen and toremifene on bone biochemistry and bone mineral density in postmenopausal breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1998). 83: 1158-1162

**Migliaccio, A.; Di Domenico, M.; de Falco, A.; Bontempo, P.; Nola, E.; Auricchio, F.:** Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* (1996). 15: 1292-1300

**Mitter, D.; Ortmann, O.; Treeck, O.:** Estrogen receptor Beta isoforms – functions and clinical relevance in breast cancer. *Zentralbl.* (2005). 127(4): 228-34

**Morris, C.:** The role auf EGFR-directed therapy in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* (2002). 75 Suppl 1: S51-S55

**Murphy, L.C.; Peng, B.; Lewis, A.; Davie, J.R.; Leygue, E.; Kemp, A.; Ung, K.; Vendetti, M.; Shiu, R.:** Inducible upregulation of oestrogen receptor- $\beta$ -1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells. *J. o. Mol. Endocrinology* (2005). 34: 553-566

**Musgrove E.A.; Hamilton J.A.; Lee, C.S.; Sweeney K.J.; Watts C.K.; Sutherland R.L.:** Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* (1993). 13(6): 3577-3587

**Musgrove E.A.; Sutherland, R.L.:** Cell cycle control by steroid hormones. *Semin Cancer Biol.* (1994). 5(5): 381-389

**Nichols, Mark:** The Fight Against Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Therapy: A New Target in the Battle? *Molecular Interventions* (2007). 7: 13-16

**Osborne, C.K, and Schiff R.:** Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* (2005). 23: 1616-1622

**Patel, Roshani, R.; Sharma, Cathrine, G., N.; Jordan, V., Craig:** Optimizing the Antihormonal Treatment and Prevention of Breast Cancer. *Breast Cancer* (2007). 14: 113-122

**Plotkin, D.; Lechner, J.J.; Jung, W.E.; Rosen, P.J.:** Tamoxifen flare in advanced breast cancer. *Journal of American Medical, Association* (1978). 240: 2644-2646

**Reddy, K.B.; Glaros, S.:** Inhibition of the MAP kinase activity suppresses estrogen-induced breast tumor growth both in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* (2007).

**Roberts, P.J.; Der, C.J.:** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogene-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* (2007). 26(22): 3291-3310

**Robinson, E.; Kimmick, G.G; Muss, H.B.:** Tamoxifen in postmenopausal women a safety perspective. *Drugs Aging* (1996), 8: 329-337

**Roger, P.; Sahla, ME.; Mäkelä, S.; Gustafsson, JA.; Baldet, P.; Rochefort, H.:** decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* (2001). 61(6): 2537-41

**Santen, R.J.; Song, R.X.; McPherson, R.; Kumar, R.; Adam, L.; Jeng, M.-H.; Yue, W.:** The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* (2002). 80: 239-256

**Santen, R.J.; Song, R.X.; Zhang, Z.; Kumar, R.; Jeng, M.-H.; Masamura, A.; Lawrence, J.; Berstein, L.; Yue, W.:** Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity. *Endocrine-Related Cancer* (2005). 12: 61-73

**Schneeweiss, A.:** Mammakarzinom: Prädiktive Marker für die Therapieoptimierung. *Gynäkologe* (2009). 42: 841-846

**Silva E.; Kabil, A.; Kortenkamp A.:** Cross-talk between non-genomic signaling pathways—distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2010). 245(2): 160-170

**Silva, Orlando, E.; Zurrída, Stefano:** *Brustkrebs: Diagnostik und Therapie* / Ortmann, O.; Görse, R.. 3. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2007. – ISBN 978-3-437-24260-1

**Simoncini, T.; Genazzani, A.R.:** Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur. J. Endocrinol.* (2003). 148: 281-292

**Song, R.X.; Santen, R.J.:** Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol. Reprod.* (2006), 75: 9-16

**Soule, H.D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M.:** A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* (1973). 51: 1409 – 1416

**Stauber, Manfred; Weyerstahl, Thomas:** *Gynäkologie und Geburtshilfe / Bob, Alexander; Bob, Konstantin.* 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2001. - ISBN 3-13-125341

**Treeck, O.; Diedrich, K.; Ortmann, O.:** Neue Perspektiven in der endokrinen Therapie gynäkologischer Malignome. *Der Gynäkologe* (2003). 36: 117-124

**Wang, Z.; Kyo, S.; Maida, Y.; Takakura, M.; Yatabe, N.; Kanaya, T.; Nakamura, M.; Koike, K.; Hisamoto, M.; Inoue, M.:** Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene* (2002). 21(22): 3517-3524

**Zheng A.; Kallio, A.; Härkönen P.:** Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrinology* (2007). 148 (6): 2764-2777

**Zhou, J.H.; Yu, D.V.; Cheng, J.; Shapiro D.J.:** Delayed and persistent ERK1/2 activation is required for 4-hydroxytamoxifen-induced cell death. *Steroids* (2007). 72 (11-12): 765-777

## 7 Anhang

Um den Text im Kapitel Ergebnisse fließender zu gestalten wurden die Tabellen der statistischen Auswertung als Anhang eingefügt.

Die Grundlagen der statistischen Auswertung werden im Kapitel Material und Methoden erläutert. Einige Begriffe sollen hier nochmals kurz erläutert werden:

**Einzelsignifikanzen (p Einzelversuche):** Hierbei handelt es sich um die Signifikanz einer bestimmten Substanz in einem Versuch. Bezugspunkt für die Signifikanzen war stets der Unterschied zu unstimulierten Zellen. Die Einzelsignifikanz wurde mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney U-Tests ermittelt.

**Gesamtsignifikanzen (P-Gesamt):** Die Gesamtsignifikanz ergibt aus den Einzelsignifikanzen aller Versuche einer Versuchsreihe. Sie fasst somit die Einzelsignifikanzen zusammen und wurde mittels des Vorzeichen-Tests bestimmt.

Bei der Auswahl der statistischen Tests wurde darauf geachtet, dass diese auch auf kleinere Datenmengen anwendbar sind. Dennoch ergab sich bei der Ermittlung der Gesamtsignifikanzen mittels des Vorzeichentests, in einigen Fällen die Problematik, dass die vorhandenen Datenmengen (Anzahl durchgeführter Versuche) trotzdem zu gering waren, so dass sich trotz mehrheitlich vorhandener Einzelsignifikanzen keine Gesamtsignifikanz ergab.

## 7.1 Stimulation mit EGF 100 ng/ml

Tabelle 7.1 Zusammenfassung aller Versuche bei denen die Zellen mit EGF 100 ng/ml stimuliert wurden. Es zeigte sich insgesamt ein proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen, dieser ist nach 48 Stunden signifikant erhöht gegenüber nicht stimulierten Zellen. Nach 96 Stunden zeigt sich hingegen keine Gesamtsignifikanz.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	2	2
0,02 – 0,03	13	10
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	1	0
0,06 – 0,10	1	0
0,10 – 0,20	0	3
0,20 – 0,50	0	2
0,50 – 1,00	1	1
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>18</b>	<b>17</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>15</b>	<b>12</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,04</b>	<b>0,119</b>

Tabelle 7.2 Isolierte Darstellung derjenigen Versuche, bei denen zusätzlich eine östradiol-abhängige Zellproliferation nachweisbar war. In allen Versuchen war eine Steigerung der Zellproliferation nachweisbar, sowohl das Ergebnis nach 48 als auch nach 96 Stunden war signifikant erhöht gegenüber nicht stimulierten Zellen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	2	3
0,02 – 0,03	6	9
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	0	0
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	0	2
0,20 – 0,50	0	0
0,50 – 1,00	0	0
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,004</b>	<b>0,006</b>

## 7.2 Stimulation mit Östradiol

### 7.2.1 E<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M

Tabelle 7.3 Zusammenfassung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit Östradiol 10<sup>-8</sup> M erfolgte. In fast allen Versuchen war eine östradiol-abhängige Zellproliferation nachweisbar. Nach 48 Stunden zeigten 2 und nach 96 Stunden 4 von 8 Versuchen einen signifikanten proliferationsfördernden Effekt auf die Mammakarzinomzellen, bezogen auf nicht stimulierte Zellen. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	2
0,02 – 0,03	2	2
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	2	1
0,06 – 0,10	0	1
0,10 – 0,20	3	0
0,20 – 0,50	1	2
0,50 – 1,00	0	0
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>1,00</b>

### 7.2.2 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M

Tabelle 7.4 Zusammenfassung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit Östradiol 10<sup>-9</sup> M erfolgte. In den meisten Versuchen war eine östradiol-abhängige Zellproliferation nachweisbar. Nach 48 Stunden zeigten 6 und nach 96 Stunden 10 von 18 Versuchen einen signifikanten proliferationsfördernden Effekt auf Mammakarzinomzellen bezogen auf nicht stimulierte Zellen. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	2
0,02 – 0,03	5	8
0,03 – 0,05	1	0
0,05 – 0,06	1	0
0,06 – 0,10	1	0
0,10 – 0,20	2	1
0,20 – 0,50	7	4
0,50 – 1,00	1	3
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>13</b>	<b>16</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>6</b>	<b>10</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>0,407</b>

### 7.3 Stimulation mit Tamoxifen

#### 7.3.1 Tamoxifen $10^{-6}$ M

Tabelle 7.5 Zusammenfassung all derjenigen Versuche bei denen eine Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-6}$  M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in 2 von 3 Versuchen ein agonistischer, proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen, wovon einer signifikant war. Einer der 3 Versuche zeigte einen signifikant proliferationshemmenden Effekt (in der Tabelle nicht dargestellt). Nach 96 Stunden zeigten weiterhin 2 von 3 Versuchen einen fördernden Effekt auf die Zellproliferation, beide waren signifikant. Signifikanzen bezüglich einer Hemmung der Proliferation waren nicht nachweisbar. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	1	2
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	0
0,20 – 0,50	0	0
0,50 – 1,00	0	1
> 1,00	1	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>0,5</b>

#### 7.3.2 Tamoxifen $10^{-7}$ M

Tabelle 7.6 Zusammenfassung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-7}$  M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in 2 von 3 Versuchen ein agonistischer, proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen, wovon beide signifikant war. Nach 96 Stunden zeigten alle 3 Versuche einen fördernden Effekt auf die Zellproliferation, wovon einer signifikant war. Signifikanzen für bezüglich eines proliferationshemmenden Effekts zeigten sich weder nach 48 noch nach 96 Stunden. Gesamtsignifikanzen gab es keine.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	2	1
0,03 – 0,20	0	0
0,20 – 0,50	1	2
> 0,50	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,500</b>	<b>&gt; 1,00</b>

### 7.3.3 Tamoxifen $10^{-8}$ M

Tabelle 7.7 Zusammenfassung all derjenigen Versuche bei denen eine Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-8}$  M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigten 5 Versuche einen agonistischen, proliferationsfördernden und 5 einen hemmenden Effekt auf die Karzinomzellen, wovon einer signifikant fördernd und einer signifikant hemmend (in der Tabelle nicht dargestellt) war. Nach 96 Stunden zeigten 6 von 10 Versuchen einen fördernden und 4 einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Einer dieser Versuche war signifikant fördernd. Ein signifikant hemmendes Ergebnis gab es nicht. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	1	1
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	0	1
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	0
0,20 – 0,50	2	2
0,50 – 1,00	5	6
> 1,00	1	0
<b>n-Gesamt</b>	10	10
<b>proliferationsfördernd</b>	5	6
<b>proliferationshemmend</b>	5	4
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	1	1
<b>P-Gesamt</b>	> 1,00	> 1,00

### 7.3.4 Tamoxifen $10^{-9}$ M

Tabelle 7.8 Zusammenfassung all derjenigen Versuche bei denen eine Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-9}$  M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in 2 von 3 Versuchen ein agonistischer, proliferationsfördernder Effekt auf die Mammakarzinomzellen, wovon einer signifikant war. Einer der 3 Versuche zeigte einen signifikant proliferationshemmenden Effekt (in der Tabelle nicht dargestellt). Nach 96 Stunden zeigte einer von 3 Versuchen einen fördernden und 2 einen hemmenden Effekt. Es gab jeweils ein signifikant hemmendes (in der Tabelle nicht dargestellt) und ein signifikant proliferationsförderndes Ergebnis. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	1	1
0,03 – 0,20	0	0
0,20 – 0,50	1	0
0,50 – 1,00	0	1
> 1,00	1	1
<b>n-Gesamt</b>	3	3
<b>proliferationsfördernd</b>	2	1
<b>proliferationshemmend</b>	1	2
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	1	1
<b>P-Gesamt</b>	> 1,00	> 1,00

### 7.3.5 Tamoxifen $10^{-10}$ M

Tabelle 7.9 Zusammenfassung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit Tamoxifen  $10^{-10}$  M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich jeweils ein hemmendes und ein förderndes Ergebnis auf die Zellproliferation. Nach 96 Stunden zeigten 2 von 2 Versuchen einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Signifikante Ergebnisse gab es nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	1
0,20 – 0,50	1	1
> 0,50	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>&gt; 1,00</b>

## 7.4 Stimulation mit Östradiol + Tamoxifen

### 7.4.1 $E_2$ $10^{-9}$ M + Tamoxifen $10^{-6}$ M

Tabelle 7.10 Zusammenfassung aller Versuche bei denen die Mammakarzinomzellen zunächst mit Tamoxifen  $10^{-6}$  M vorinkubiert und schließlich mit  $E_2$   $10^{-9}$  M stimuliert wurden. Nach 48 Stunden war es in 2 von 3 Versuchen nicht möglich mittels Tamoxifen den östradiolinduzierten proliferationsfördernden Effekt vollständig zu hemmen, einer der Versuche zeigte trotz Tamoxifen eine signifikant erhöhte Zellproliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach 96 Stunden war es in keinem Versuch möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation vollständig zu hemmen. In allen 3 Versuchen war die Zellproliferation weiterhin signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	1	3
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	1	0
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	0
> 0,20	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b><math>E_2</math>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b><math>E_2</math>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>&gt; 1,00</b>

### 7.4.2 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + Tamoxifen 10<sup>-7</sup> M

Tabelle 7.11 Zusammenfassung all derjenigen Versuche bei denen die Mammakarzinomzellen zunächst mit Tamoxifen 10<sup>-7</sup> M vorinkubiert und schließlich mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M stimuliert wurden. Weder nach 48 noch nach 96 Stunden war es möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation vollständig zu hemmen. Nach 48 Stunden war in allen 3 Versuchen und nach 96 Stunden in 2 von 3 Versuchen der proliferationsfördernde Effekt auf die Mammakarzinomzellen trotz Tamoxifen signifikant erhöht im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	3	2
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	0	1
> 0,06	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,125</b>	<b>0,500</b>

### 7.4.3 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + Tamoxifen 10<sup>-8</sup> M

Tabelle 7.12 Zusammenfassung aller Versuche bei denen die Mammakarzinomzellen zunächst mit Tamoxifen 10<sup>-8</sup> M vorinkubiert und schließlich mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M stimuliert wurden. Nach 48 Stunden war es in der Hälfte der Versuche mittels Tamoxifen möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation zu hemmen. 4 von 12 Versuchen zeigten eine signifikant hemmende Wirkung auf die Zellproliferation. Nach 96 Stunden war es in einem von 12 Versuchen möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation vollständig zu hemmen. 5 der Versuche zeigten weiterhin eine signifikant fördernde Wirkung auf die Zellproliferation. Signifikanzen für eine proliferationshemmende Wirkung gab es nicht. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	4	5
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	2	2
0,20 – 0,50	3	2
0,50 – 1,00	2	3
> 1,00	1	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>7</b>	<b>10</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>6</b>	<b>11</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>6</b>	<b>1</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>&gt; 1,00</b>

Tabelle 7.13 Zusammenfassung derjenigen Versuche aus Tabelle 7.12 bei denen die Mammakarzinomzellen eine signifikant proliferationsfördernde Wirkung nach Monostimulation mit Östradiol zeigten. Nach Vorinkubation mit Tamoxifen  $10^{-8}$  M und anschließender Stimulation mit  $E_2$   $10^{-9}$  M war es sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden nicht möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation vollständig zu hemmen. Nach 48 Stunden waren alle erhaltenen Ergebnisse, trotz Tamoxifen, weiterhin signifikant proliferationsfördernd. Nach 96 Stunden lag bei 6 von 10 Versuchen weiterhin ein signifikant proliferationsförderndes Ergebnis vor. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	4	6
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	0	1
0,20 – 0,50	0	2
0,50 – 1,00	0	1
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	4	10
<b>proliferationsfördernd</b>	4	10
<b>proliferationshemmend</b>	0	0
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	4	6
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,063</b>	<b>0,377</b>

#### 7.4.4 $E_2$ $10^{-9}$ M + Tamoxifen $10^{-9}$ M

Tabelle 7.14 Zusammenfassung aller Versuche bei denen die Mammakarzinomzellen zunächst mit Tamoxifen  $10^{-9}$  M vorinkubiert und schließlich mit  $E_2$   $10^{-9}$  M stimuliert wurden. Sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden konnte mittels Tamoxifen die proliferationsfördernde Wirkung von Östradiol nicht vollständig gehemmt werden. In allen 3 Versuchen war nach 48 Stunden und in 2 von 3 nach 96 Stunden weiterhin eine signifikant erhöhte Zellproliferation, im Vergleich zu nicht behandelten Zellen, zu beobachten. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	3	2
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	0	1
> 0,20	0	0
<b>n-Gesamt</b>	3	3
<b><math>E_2</math>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	3	3
<b><math>E_2</math>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	0	0
<b>proliferationsfördernd</b>	3	3
<b>proliferationshemmend</b>	0	0
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	3	2
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,125</b>	<b>0,500</b>

### 7.4.5 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + Tamoxifen 10<sup>-10</sup> M

Tabelle 7.15 Zusammenfassung all derjenigen Versuche bei denen die Mammakarzinomzellen zunächst mit Tamoxifen 10<sup>-10</sup> M vorinkubiert und schließlich mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M stimuliert wurden. Weder nach 48 noch nach 96 Stunden konnte mittels Tamoxifen die proliferationsfördernde Wirkung von Östradiol vollständig gehemmt werden. In 2 von 3 Versuchen war nach 48 Stunden und in 1 von 3 nach 96 Stunden weiterhin eine signifikant erhöhte Zellproliferation, im Vergleich zu nicht behandelten Zellen, zu beobachten. Gesamtsignifikanzen waren nicht zu verzeichnen.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	2	1
0,03 – 0,20	0	0
0,20 – 0,50	0	2
0,50 – 1,00	1	0
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>signifikant proliferationsfördernd (p &lt; 0,05)</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,500</b>	<b>&gt; 1,00</b>

### 7.5 Stimulation mit MEK-Inhibitor 23 µM

Tabelle 7.16 Zusammenfassende Darstellung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit MEK-Inhibitor 23 µM erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in 11 von 12 und nach 96 Stunden in allen 12 Versuchen ein wachstumshemmender Effekt. Sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden waren jeweils 11 dieser Versuche signifikant proliferationshemmend.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	11	11
0,03 – 0,50	0	0
0,50 – 1,00	1	1
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>

## 7.6 Stimulation mit Östradiol + MEK-Inhibitor

### 7.6.1 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + MEK-Inhibitor 23 µM

Tabelle 7.17 Darstellung aller Versuche bei denen nach Vorinkubation mit dem MEK-Inhibitor eine Stimulation mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M erfolgte. Nach 48 Stunden zeigte sich in einem der 18 Versuche ein proliferationsfördernder Effekt, die restlichen Resultate ergaben alle eine wachstumshemmende Wirkung. Signifikant hemmend waren nach 48 Stunden 13 und nach 96 Stunden 7 der Ergebnisse. Eine Gesamtsignifikanz ergab sich für die 48 Stundenwerte. Nach 96 Stunden ergab sich keine Gesamtsignifikanz.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	13	7
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	1	3
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	3
0,20 – 0,50	0	1
0,50 – 1,00	3	1
> 1,00	0	3
<b>n-Gesamt</b>	<b>18</b>	<b>18</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>11</b>	<b>15</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>7</b>	<b>3</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>13</b>	<b>7</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,048</b>	<b>&gt; 1,00</b>

## 7.7 Stimulation mit MEK-Inhibitor + Tamoxifen

### 7.7.1 MEK-Inhibitor 23 µM + Tamoxifen 10<sup>-6</sup> M

Tabelle 7.18 Darstellung aller Versuche bei denen eine Stimulation mit MEK-Inhibitor 23 µM und Tamoxifen 10<sup>-6</sup> M durchgeführt wurde. Nach 48 Stunden zeigte sich in allen Versuchen ein proliferationshemmender Effekt, wovon einer signifikant war. Nach 96 Stunden war jeweils ein Versuch wachstumshemmend und einer fördernd, Signifikanzen ergaben sich nicht. Gesamtsignifikanzen ergaben sich keine.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	1	0
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	1
0,20 – 0,50	0	0
0,50 – 1,00	0	1
> 1,00	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,750</b>	<b>&gt; 1,00</b>

## 7.8 Stimulation mit Östradiol + MEK-Inhibitor + Tamoxifen

### 7.8.1 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + MEK-Inhibitor 23 µM + Tamoxifen 10<sup>-6</sup> M

Tabelle 7.19 Darstellung derjenigen Versuche bei denen, nach einer Vorinkubation mit MEK-Inhibitor und Tamoxifen 10<sup>-6</sup> M, eine Stimulation mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M erfolgte. Nach 48 zeigte sich in beiden Versuchen eine proliferationshemmende Wirkung. Nach 96 Stunden war es durch die Kombination des MEK-Inhibitors mit Tamoxifen nicht möglich die östradiolinduzierte Zellproliferation vollständig zu hemmen. Nach 96 Stunden zeigte sich in einem Versuch weiterhin ein signifikant proliferationsförderndes Ergebnis. Gesamtsignifikanzen zeigten sich nicht.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	0	1
0,03 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	1	0
0,20 – 0,50	1	1
> 0,50	0	0
<b>n-Gesamt</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>&gt; 1,00</b>	<b>0,750</b>

### 7.8.2 E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M + MEK-Inhibitor 23 µM + Tamoxifen 10<sup>-8</sup> M

Tabelle 7.20 Zusammenfassung aller Versuche bei denen, nach einer Vorinkubation mit MEK-Inhibitor und Tamoxifen 10<sup>-8</sup> M, eine Stimulation mit E<sub>2</sub> 10<sup>-9</sup> M erfolgte. In 15 von 16 Versuchen zeigte sich sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation. Einer von 16 Versuchen ergab eine proliferationsfördernde Wirkung. Nach 48 Stunden ergaben 13 und nach 96 Stunden 12 Versuche eine signifikant proliferationshemmende Wirkung auf die Mammakarzinomzellen. Die proliferationsfördernde Wirkung von Östradiol konnte somit durch die Kombination des MEK-Inhibitors mit Tamoxifen erfolgreich gehemmt werden. Gesamtsignifikanzen zeigten sich sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden.

p (Einzelversuche)	n Anzahl Versuche	
	48 Stunden	96 Stunden
< 0,01	0	0
0,02 – 0,03	13	12
0,03 – 0,05	0	0
0,05 – 0,06	0	1
0,06 – 0,10	0	0
0,10 – 0,20	2	2
0,20 – 0,50	1	0
> 0,50	0	1
<b>n-Gesamt</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation vorhanden</b>	<b>7</b>	<b>12</b>
<b>E<sub>2</sub>-abhängige Zellproliferation nicht vorhanden</b>	<b>9</b>	<b>4</b>
<b>proliferationsfördernd</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>proliferationshemmend</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
<b>signifikant (p &lt; 0,05)</b>	<b>13</b>	<b>12</b>
<b>P-Gesamt</b>	<b>0,011</b>	<b>0,038</b>

## 8 Danksagung

Mein Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. Gerd Bauerschmitz für seine Unterstützung im entscheidenden Augenblick und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Dieter Niederacher für seine gute und kompetente Betreuung, sowie die besondere Fähigkeit einen in Momenten der Euphorie auf den Boden der Tatsachen zurückzuholen und in Phasen in denen „es mal nicht so klappte“ wieder aufzubauen. So befand man sich stets auf einem gesunden Mittelweg. Vielen Dank für die Unterstützung.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des molekulargenetischen Labors der Frauenklinik für die schöne Zeit und die hilfreichen Tipps. Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Torsten Heimerzheim für die gute und engagierte Zusammenarbeit – es hat Spaß gemacht.

Bedanken möchte ich mich bei Christoph Keiser – vielen lieben Dank.

Mein ganz großer Dank gilt meinen Eltern Christina und Horst Reinhardt. Vielen Dank Ihr Lieben für alles – ihnen widme ich diese Arbeit.

## 9 Lebenslauf

**Name:** Mareike Keiser  
**Geburtsdatum:** 16. 12. 1978  
**Geburtsort:** Hessisch Lichtenau, Deutschland  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### Schulausbildung:

1985-1987 Deutsche Fernschule  
1987-1988 Kanadische Schule, Khon-Kaen, Thailand  
1988-1998 Deutschsprachige Schweizer Schule Bangkok, Thailand  
Abschluss Matura

### Studium:

04/2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
03/2002 Ärztliche Vorprüfung  
03/2003 1. Staatsexamen  
03/2005 2. Staatsexamen  
2005-2006 Praktisches Jahr  
05/2006 3. Staatsexamen

### Berufserfahrung:

2006-2008 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und  
Jugendmedizin der Euregioklinik Nordhorn  
2008-2011 Assistenzärztin in der Kinder- und Jugendklinik  
Gelsenkirchen Buer  
seit 06/2011 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin in der Kinder-  
und Jugendklinik Gelsenkirchen Buer