

# **Nichtgenomische Effekte von Östrogenen in östrogensensitiven Mammakarzinomzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Torsten Heimerzheim**  
aus Mülheim an der Ruhr

Düsseldorf  
August 2006

Molekulargenetisches Labor der Frauenklinik  
Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. med. P. Dall  
Korreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2006

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Genomische Östrogenwirkung .....	3
1.2	Antiöstrogene und Hormontherapien .....	7
1.2.1	Selektive Östrogen-Rezeptor Modulatoren (SERMs).....	8
1.2.2	Reine Antiöstrogene.....	11
1.2.3	Aromataseinhibitoren.....	11
1.3	Nichtgenomische Effekte .....	14
1.3.1	Nichtgenomische Effekte von Östrogenen.....	16
1.4	Der MAPK-Signalweg und seine Bedeutung im Mammakarzinom .....	17
1.5	Ziel der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material und Geräte .....	21
2.1.1	Zelllinien und Kulturmedien .....	21
2.1.2	Bakterienstämme.....	22
2.1.3	Plasmide .....	22
2.1.4	Antikörper .....	23
2.1.5	Verwendete Steroide, Steroidderivate und weitere Stimulantien .....	23
2.1.6	Oligonukleotide.....	24
2.1.7	Chemikalien und Reagenzien.....	25
2.1.8	Puffer und Lösungen .....	26
2.1.9	Reagenzien-Kits .....	27
2.1.10	Geräte .....	28
2.1.11	Software und Datenbanken .....	28
2.2	Zellbiologische und Proteinchemische Methoden.....	29
2.2.1	Kultivierung der Zellen .....	29
2.2.2	Subkultivierung von Monolayerkulturen .....	29
2.2.3	Bestimmung des Zelltiters.....	30
2.2.4	Kryokonservierung.....	30
2.2.5	Mykoplasmentest .....	30
2.2.6	Proliferationsassay (MTS-Assay) .....	31
2.2.7	Bestimmung der Östradiolkonzentration in Serum und Medium .....	32
2.2.8	Behandlung von FCS mit Aktivkohle.....	32
2.2.9	Stimulation der Zellen mit Steroiden und deren Derivaten .....	33
2.2.10	Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen.....	33
2.2.11	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	34
2.2.12	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure .....	35
2.2.13	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
2.2.14	Western-Blot und Immunologische Detektion.....	36
2.2.15	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	38

2.2.16	Stabile Transfektion eines retroviralen Expressionsplasmids in Zelllinien	38
2.3	Molekularbiologische Methoden	39
2.3.1	RNA-Isolierung aus Zelllinien	39
2.3.2	Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA	40
2.3.3	cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA	40
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
2.3.4.1	Kontrolle der cDNA-Synthese mittels $\beta$ -Actin-PCR	42
2.3.4.2	Amplifikation des ER $\alpha$ Gens aus dem Vektor pER $\alpha$	42
2.3.4.3	Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression	43
2.3.5	Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten	43
2.3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.3.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	44
2.3.6	Sequenzierung	45
2.3.7	Klonierung	46
2.3.7.1	Restriktionsanalyse von DNA	46
2.3.7.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	46
2.3.7.3	Ligation	47
2.3.7.4	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> -Zellen	47
2.3.7.5	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	47
2.3.7.6	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	48
2.3.7.7	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mittels der CaCl <sub>2</sub> -Methode	48
2.3.7.8	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i> -Zellen	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>50</b>
3.1	Östrogenabhängiges Wachstum der Brustkrebszellen	50
3.1.1	Etablierung der Zellkulturbedingungen	50
3.1.2	Etablierung des MTS-Proliferationsassays	50
3.1.3	Nachweis der östrogenabhängigen Proliferation von MCF-7 Zellen	52
3.2	Nachweis der Aktivierung der MAPK Erk1/2 durch Östradiol	54
3.2.1	Etablierung der Stimulationsmethodik	54
3.2.2	Problematik der Basis-Stimulation der MAPK Erk1/2	55
3.2.2.1	FCS im Kulturmedium – Bestimmung des Östradiolgehaltes	55
3.2.2.2	Einsatz des Aromataseinhibitors Formestan	58
3.3	Aktivierung der MAPK Erk1/2 mit EGF und Östradiol	59
3.3.1	Zeitabhängigkeit der östrogenabhängigen MAPK-Aktivierung	61
3.4	Blockierung der MAPK Erk1/2-Antwort mit dem MEK-Inhibitor PD98059	62
3.5	Einfluss des reinen Antiöstrogens ICI 182,780 auf die MAPK-Aktivierung	63
3.6	Einfluss von Selektiven Östrogen-Rezeptor Modulatoren (SERMs) auf die MAPK-Aktivierung	65
3.6.1	Einfluss von Tamoxifen auf die MAPK-Aktivierung	65
3.6.2	Einfluss von Raloxifen auf die MAPK-Aktivierung	67
3.7	Charakterisierung nichtgenomischer Effekte mit dem membranimpermeablen Konjugat E <sub>2</sub> -BSA	68
3.7.1	Stimulation der MAPK Erk 1/2 mit E <sub>2</sub> -BSA	69

3.7.2	Untersuchung der E <sub>2</sub> -BSA-Dissoziation anhand der genomischen Wirkung von Östradiol auf die Cathepsin D Expression .....	70
3.7.2.1	Etablierung der quantitativen RT-PCR für Cathepsin D.....	71
3.7.2.2	Zeitabhängige Cathepsin D Expression.....	72
3.7.3	Nachweis der Membranbindung von Östradiol in MCF-7 Zellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).....	74
3.8	Stabile retrovirale Transfektion des Östrogenrezeptors in MCF-7 Zellen .....	75
3.8.1	Klonierung des ER $\alpha$ in den retroviralen Vektor S11IN .....	76
3.8.2	E <sub>2</sub> -Stimulation ER-transfizierter Zellen .....	77
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
4.1	Etablierung und Grundlagen zum Nachweis nichtgenomischer Effekte in Mammakarzinomzellen .....	81
4.2	E <sub>2</sub> -vermittelte nichtgenomische MAPK-Aktivierung in MCF-7 Zellen .....	84
4.3	Beeinflussung der E <sub>2</sub> -vermittelten MAPK-Aktivierung durch therapeutisch relevante Antiöstrogene .....	89
4.4	Der Stellenwert des membranimpermeablen Konjugates E <sub>2</sub> -BSA zum Nachweis nichtgenomischer E <sub>2</sub> -Wirkungen.....	93
4.5	Nichtgenomischer Einfluss der stabilen, retroviralen Transfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$ in Mammakarzinomzellen .....	98
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>121</b>
8.1	Abkürzungen .....	121
8.2	Medizinische Fachbegriffe .....	123
8.3	Plasmidkarten .....	124
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>125</b>
<b>10</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>126</b>

# 1 EINLEITUNG

Die häufigste Krebserkrankung bei Frauen ist das Mammakarzinom (Brustkrebs). Allein in Deutschland erkranken jährlich 55.100 Frauen an Brustkrebs, was 26,8% aller Krebsneuerkrankungsfälle bei Frauen und 40% der Neuerkrankungen bei Frauen unter 60 ausmacht (Schätzung für 2002, siehe Tab. 1.1). Männer erkranken wesentlich seltener an Brustkrebs (etwa 1 Mann je 100 Frauen). Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 62 Jahren knapp 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Krebs gesamt. Auf Grund intensiver Vorsorge-Untersuchungen (Mammographie) und einer verbesserten Frühdiagnose ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Brustkrebspatientinnen mittlerweile auf 79% gestiegen. Weitere gynäkologische Malignome wie das Endometriumkarzinom (Gebärmutterkörper; 5,5% der Neuerkrankungen), das Ovarialkarzinom (Eierstöcke; 4,8% der Neuerkrankungen) und das Zervixkarzinom (Gebärmutterhals; 3,2% der Neuerkrankungen) sind zusammen mit knapp 28.000 Neuerkrankungen pro Jahr nur etwa halb so häufig wie Brustkrebs. Die niedrigste relative 5-Jahres-Überlebensrate der gynäkologischen Krebserkrankungen (41%) weisen auf Grund der schlechteren Prognose Patientinnen mit Ovarialkarzinom auf (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., GeKiD mit dem Robert-Koch-Institut, 2006).

**Tab. 1.1: Epidemiologie der wichtigsten gynäkologischen Malignome in Deutschland (Schätzung für 2002, GeKiD mit dem Robert-Koch-Institut, 2006)**

	<b>Mamma</b>	<b>Endometrium</b>	<b>Ovar</b>	<b>Zervix</b>
<b>Krebsneuerkrankungen p.a. (absolut)</b>	55.100	11.350	9.950	6.500
<b>Anteil an Krebsneuerkrankungen</b>	26,8%	5,5%	4,8%	3,2%
<b>Sterbefälle p.a. (absolut)</b>	17.780	2.678	5.910	1.763
<b>Anteil an Sterbefällen</b>	17,8%	2,7%	5,9%	1,8%
<b>5-Jahres-Überlebensrate</b>	79%	77%	41%	67%

Bei Brustkrebs (Mammakarzinom, Carcinoma mammae) handelt es sich um eine invasive, d.h. eine in das Gewebe eindringende maligne Tumorerkrankung. Im größten Teil der Fälle geht das Mammakarzinom aus dem Epithel hervor, das die Milchgänge

der weiblichen Brustdrüse auskleidet. Die häufigste Form ist das invasiv-duktales Karzinom (70-80% der Fälle), das aus den milchabführenden Gängen (Ductuli) hervorgeht, gefolgt vom invasiv-lobulärem Karzinom (10-20% der Fälle), das in den Drüsenlappen (Lobuli), d.h. in den milchproduzierenden Endstrukturen, seinen Ursprung hat. Neben den invasiven Formen existieren benigne nicht-invasive Frühformen wie das intraduktales und das lobuläre In-situ-Karzinom, die zwar eine beträchtliche Größe von mehreren Zentimetern erreichen können, aber die Grenzlinie zum umgebenden Drüsengewebe, d.h. die Basalmembran, definitionsgemäß nicht überschreiten. Für keinen Karzinomtyp existieren so viele Prognose- (Definition von Risiken für Rezidiv und Tod) und Prädiktivfaktoren (Aussicht auf Therapieerfolg) wie für das Mammakarzinom. Etablierte Faktoren sind Alter, histologischer Typ, TNM-Status (Einteilung nach Größe und Ausbreitung; Tumor, Nodi, Fern-Metastasen) sowie der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- und Progesteronrezeptor). Neuere Prognosefaktoren umfassen die Bestimmung des Proliferationsgrades (z.B. Mitose-Index, S-Phase, Ki-67, MIB, PCNA), von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (z.B. EGFR (z.B. Her-2), IGFR, pS2), von Faktoren, die einen Einfluss auf die Tumorentstehung (Cathepsin B, D und L, uPA, PAI-1) und Angiogenese (VEGF) haben sowie die Untersuchung von Adhäsionsproteinen (wie Chemokine, Ep-CAM, E-Cadherin), Apoptose-induzierenden Liganden (z.B. TNF, FasL, TRAIL, bcl-2, bax) und Onkogenen/Tumorsuppressorgenen (p53, c-myc, BRCA1 und BRCA2). Alle genannten Faktoren haben die Auswahl der bestmöglichen Therapie mit z.B. Antiöstrogenen und Aromatasehemmern und die Erstellung einer langfristigen Prognose zum Ziel.

Die Mehrheit der Mammakarzinome (ca. 75%) ist sporadischer Natur und kann als Effekt eines Mehrschrittprozesses verstanden werden (Beckmann *et al.*, 1997). Dieser umfasst die Stadien Hyperplasie, *In situ* Karzinom und invasives Karzinom. Die Tumorentstehung stellt sich als Zusammenspiel genetischer Faktoren und nichtgenetischer Faktoren (Hormone, Wachstumsfaktoren, Mutagene aus der Umwelt) dar. Genetische Veränderungen umfassen zum einen erbliche DNA-Schäden und eine damit verbundene genetische Prädisposition und andererseits spontan auftretende DNA-Schäden wie Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Translokation und Amplifikation (Lengauer *et al.*, 1998; Lerebours und Lidereau, 2002; Balmain *et al.*, 2003). Die durch diese genetischen Veränderungen beeinflusste Expression bestimmter

Gene verschafft Tumorzellen einen Selektionsvorteil. Die tumorassoziierten Gene haben eine bedeutende Wirkung auf das Wachstum von Zellen und werden in proliferationsfördernde Onkogene (EGFR Familie (Her-2), c-myc, c-fos, c-jun) und proliferationshemmende Tumorsuppressorgene (p53, p27, BRCA1 und BRCA2, PTEN) unterteilt (Osborne *et al.*, 2004, Futreal *et al.*, 2004).

Das Epithel ist für die Entstehung von Mammakarzinomen das häufigste Ursprungsgewebe. Das Mammaepithel steht unter hormoneller Kontrolle der Steroidhormone Östrogen und Progesteron. Östrogen ist vor allem für die Zellteilung und Proliferation von glandulärem Epithel entscheidend. Dies begründet, warum eine Vielzahl der Mammakarzinome eine östrogene Abhängigkeit aufweist und das Tumorwachstum stark von diesem Hormon geprägt ist. Die Rolle von Östrogenen und den zugehörigen Rezeptoren bei der Entstehung von Brustkrebs konnte in epidemiologischen und zellbiologischen Studien nachgewiesen werden (Dickson *et al.*, 1988; Colditz *et al.*, 1995; Platet *et al.*, 2004; Dowsett *et al.*, 2005). Während der Tumorgenese ist der Östrogenrezeptor (ER $\alpha$ ) in der Brust hochreguliert (Clarke *et al.*, 1994), weshalb der Nachweis des ER-Status ein diagnostischer Faktor ist und für die Therapie von Brustkrebs eine entscheidende Bedeutung hat.

## 1.1 Genomische Östrogenwirkung

Östrogene, mit der aktivsten Form 17 $\beta$ -Östradiol (E<sub>2</sub>), gehören neben Progesteron, Androgenen, Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden zur Familie der lipophilen Steroidhormone. Diese werden von endokrinen Zellen synthetisiert und sezerniert. Sie sind wichtig u.a. für die Entwicklung von normalen Brustdrüsen (Topper *et al.*, 1980). Mit dem Blutstrom gelangen sie zu ihren Wirkungsorten und dringen über Diffusion in Zielzellen ein. Nach dem traditionellen Modell wirken Steroidhormone ausschließlich über die Bindung an intrazelluläre Rezeptoren der Steroidrezeptor-Superfamilie, einer Klasse ligandenabhängiger Transkriptionsfaktoren (Beato und Klug, 2000). Im Falle von Östrogen kommt es nach Diffusion in die Zelle zur Bindung an den Östrogenrezeptor (ER). Dieser liegt in Abwesenheit eines Liganden zunächst gebunden an Heat-Shock-Proteine (HSP) wie Hsp90 vor (Beato, 1989; Tsai und O'Malley, 1994; Yamashita, 1998). Die durch Östrogenbindung bewirkte Konformationsänderung führt zur Dissoziation der HSPs vom ER sowie anschließender Homo- und

Heterodimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors (Hall und McDonnell, 1999; Osborne und Schiff, 2005). Der aktivierte Östrogen-Rezeptor Komplex transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern und bindet dort an palindromische DNA-Sequenzen der Zielgene, die sogenannten „Estrogen Responsive Elements“ (ERE) (Kumar *et al.*, 1988). Diese befinden sich bei den meisten Genen in der Promotorregion nahe dem Transkriptionsstart. Durch die Interaktion des Rezeptordimers mit den EREs im Promotorbereich wird die Transkription der korrespondierenden Gene herunter- oder heraufreguliert, was zu einer veränderten Expression der von diesen Genen kodierten Proteine führt (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Beato *et al.*, 1995; Beato und Klug, 2000).

Die Wirkung von Östrogenen wird auf molekularer Ebene durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) vermittelt. Die Östrogenrezeptoren (ER) gehören der Superfamilie der Steroidrezeptoren an, wozu auch die Rezeptoren für Progesteron (PR), Androgene (AR), Glukokortikoide (GR) und Mineralkortikoide (MR) zählen. Diese Gruppe liganden-abhängiger Transkriptionsfaktoren (Beato *et al.*, 1995) verbindet die Eigenschaft, die Regulation einer Vielzahl von Genen zu regulieren, welche biologische Relevanz beispielsweise in Entwicklung, Reproduktion und Homöostase haben (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

Vor knapp 40 Jahren wurden erste Modelle für die Genregulation durch Steroidhormone entwickelt, was zur Entdeckung des ER führte (Toft und Gorski, 1966; Jensen *et al.*, 1968). Der erste Östrogenrezeptor wurde 1986 kloniert und später als ER $\alpha$  bezeichnet (Green *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1986). Erst 10 Jahre später wurde ein zweiter humaner ER, genannt ER $\beta$ , beschrieben (Mosselman *et al.*, 1996), der zwar schon vorher entdeckt, aber zunächst nur für die Ratte beschrieben wurde (Kuiper *et al.*, 1996). Das Gen für ER $\alpha$  liegt auf Chromosom 6 und besteht wie die Gene aller Steroidrezeptoren aus 8 Exons (Green *et al.*, 1986). Das ER $\alpha$  Protein setzt sich aus 595 Aminosäuren zusammen, was einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa entspricht. ER $\beta$  ist auf Chromosom 14 lokalisiert und kodiert für ein 530 Aminosäuren großes Protein mit ca. 60 kDa. ER $\alpha$  und ER $\beta$  haben mit den anderen Mitgliedern der Rezeptor-Superfamilie eine gemeinsame Domänenstruktur (Evans *et al.*, 1988; Giguere *et al.*, 1988; Tsai *et al.*, 1994; Mangelsdorf *et al.*, 1995; Katzenellenbogen *et al.*, 1996) (siehe Abb. 1.1). Sie setzen sich aus drei unabhängigen aber interagierenden funktionellen

Domänen zusammen: der N-terminalen oder A/B-Domäne, der DNA-bindenden oder C-Domäne und der liganden-bindenden (LBD) oder D/E/F-Domäne. Die variable Region D wird auch Scharnierregion („hinge-region“) genannt. Der ER enthält die beiden Aktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2, die die positive Regulation der Genexpression des ER vermitteln. Während AF-1 am N-Terminus in der A/B Domäne lokalisiert ist, befindet sich AF-2 gemeinsam mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) in der C-terminalen E/F Domäne.

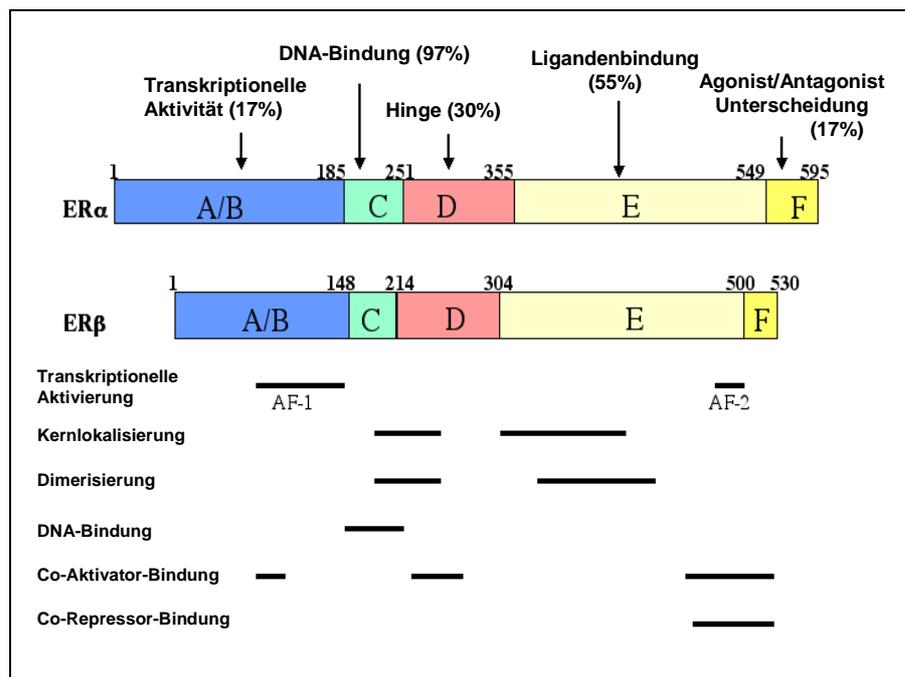


Abb. 1.1: Domänenstruktur und -homologie der humanen Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  (modifiziert nach Klinge, 2000)

Die Funktion von AF-1 wird durch Phosphorylierung reguliert und ist hormonunabhängig während AF-2 in der LBD hormon- bzw. ligandenabhängig ist. Die beiden Aktivierungsfunktionen wirken synergistisch, obwohl auch von Genpromotoren berichtet wurde, die von AF-1 und AF-2 unabhängig aktiviert werden, was weitestgehend vom jeweiligen Promotor und Zelltypus abhängig ist (Tora *et al.*, 1989; Gronemeyer, 1991; Metzger *et al.*, 1995; McInerney *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1998; Osborne *et al.*, 2001). Die Aktivität der AF-1 des ER $\alpha$  ist wesentlich höher als die des ER $\beta$ , dessen AF-1 eher eine Repressordomäne darstellt (Cowley *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1999). ER $\alpha$  erhöht die Expression von Genen, die durch AF-1 und AF-2 transaktiviert werden viel stärker als ER $\beta$ , während die Genregulation durch AF-2 Aktivität von

beiden ERs gleich stark beeinflusst wird (Cowley *et al.*, 1999). Die DNA-bindende C-Domäne von ER $\alpha$  und ER $\beta$  ist zu 97% homolog, die LBD zu 55%; die anderen Domänen sind nicht konserviert (Mosselman *et al.*, 1996). Die Bindungsaffinität von ER $\alpha$  und ER $\beta$  zu Östradiol ist ähnlich (Kuiper *et al.*, 1997). Hingegen unterscheidet sich die Expression der ERs in verschiedenen Gewebetypen. ER $\beta$  scheint ein wichtiger Östrogenrezeptor beispielsweise in Knochengewebe, Kardiovaskulargewebe, im Zentralnervensystem, Urogenitalgewebe und Immunzellen zu sein, während er häufig mit ER $\alpha$  koexprimiert wird (Byers *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996; Couse *et al.*, 1997; Gustafsson, 2000). In diesem Fall sind sie jedoch oft auf unterschiedliche Zelltypen verteilt. In Ovarien ist ER $\beta$  neunmal höher exprimiert als ER $\alpha$  (Sar und Welsch, 1999). ER $\alpha$  ist vor allem in der Brust, im Uterus und in der Leber der dominante Rezeptor, was durch unterschiedliche Phänotypen in ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -knock-out Mäusen sichtbar wurde (Couse *et al.*, 1997; 1999; 2000). Sowohl für ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  wurden zahlreiche Varianten beschrieben (Sluysers, 1995; Enmark *et al.*, 1997; Hopp und Fuqua., 1998; Murphy *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 2005), die höchstwahrscheinlich einen Einfluss auf die Pathogenese von z.B. Brusttumoren haben.

Der klassische Weg der Gentransaktivierung durch Östrogenrezeptoren ist die Stimulation der Transkription von Genen, die EREs enthalten. Diese DNA-Abschnitte bestehen aus der 15bp großen palindromischen Konsensus-Sequenz 5`-AGGTCAnnnTGACCT-3`. Die Bindung an diese Elemente durch das über Östradiolbindung aktivierte ER-Dimer wird von einer großen Anzahl von Proteinen beeinflusst, die als Co-Aktivatoren bezeichnet werden. Co-Aktivatoren werden definiert als Proteine, die direkt mit dem Steroidrezeptor interagieren und dadurch die Transkription verstärken (Horwitz *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1998; Edwards, 2000). Diese können unterschiedlich wirken und somit die Transkription unterschiedlich beeinflussen: sie können 1. den Transaktivierungskomplex in die Transkriptionsmaschinerie integrieren und spezifisch die Transaktivierung durch den Rezeptor verstärken, 2. zusätzliche Transkriptionsfaktoren in die basale Transkriptionsmaschinerie integrieren, und 3. oftmals durch eine integrierte Histonacetyl-Transferase-Aktivität, die Bindung an Histone modifizieren und die Transaktivierung verbessern. Als wichtigste Vertreter zu nennen sind die Mitglieder der p160-Familie SRC-1

(=NCoA1) (Halachmi *et al.*, 1994; Onate *et al.*, 1995), TIF2 (=transcription intermediary factor 1; SRC-2; GRIP1; NCoA2) (Voegel *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1996) und AIB1 (=amplified in breast cancer 1; SRC-3; p-CIP; RAC3; TRAM1; ACTR; NCoA3) (Anzick *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997). Des Weiteren die 300 kDa großen Co-Aktivatoren p300 und CBP (CREB-binding protein), die nicht spezifisch für Steroidrezeptoren sind, sondern auch mit anderen Faktoren wie z.B. p53 interagieren (Gu und Roeder, 1997; Gu *et al.*, 1997), bzw. die Signale verschiedener Signaltransduktionswege integrieren. In Karzinomen und Karzinomzelllinien zeigen vieler dieser Co-Aktivatoren auffällige Expressionsmuster, wie z.B. AIB1 im Mammakarzinom (Anzick *et al.*, 1997). Neben Koaktivatoren existieren außerdem Co-Repressoren wie NCoR und SMRT, die einen negativen Einfluss auf die Transkription des Zielgens haben (Horlein *et al.*, 1995; Horwitz *et al.*, 1996; Kurokawa *et al.*, 1995; Hall und McDonnell, 2005). Neben EREs werden noch weitere DNA-Elemente durch den ER reguliert. Dazu gehören das AP-1 Element, das durch die Interaktion des ER mit Activation Protein 1 (AP1) reguliert wird, sowie alternative responsive Elemente wie SFRE und das SP1-Element (Vanacker *et al.*, 1999; Saville *et al.*, 2000). Eine ligandenunabhängige Transaktivierung des ER ist darüber hinaus auch durch andere Einflüsse wie die Interaktion mit Wachstumsfaktoren oder einem erhöhten cAMP-Level (Aronica *et al.*, 1993; Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993) sowie der direkten Phosphorylierung durch die MAP-Kinase (Kato *et al.*, 1995) möglich.

## 1.2 Antiöstrogene und Hormontherapien

Die ersten Erkenntnisse, dass Östrogen einen starken Einfluss auf das Wachstum metastasierender Mammakarzinome ausübt, wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts gesammelt. Der britische Chirurg Sir George Beatson konnte zeigen, dass die Entfernung der Ovarien (Ovarektomie) bei prämenopausalen Frauen zu einer Regression von fortgeschrittenen Mammakarzinomen führen kann (Beatson, 1896). Wenige Jahre später zeigte eine weitere Studie eine Tumorregression in 30% aller Patientinnen mit Mammakarzinom nach Ovarektomie (Boyd, 1900). Als chirurgische Therapien kamen in der Mitte des 20. Jahrhunderts die Adrenal- und Hypophysektomie hinzu (Huggins und Dao, 1953; Luft und Olivecrona, 1953).

Ein Großteil der Mammakarzinome ist östrogen-abhängig, weshalb Antiöstrogene wie z.B. Tamoxifen eine große klinische Relevanz in den letzten drei Jahrzehnten erlangt haben. Sie wirken vor allem als kompetitive Inhibitoren der Östrogenbindung an den Rezeptor und haben sich zu den am weitesten verbreiteten endokrinen Wirkstoffen zur Behandlung ER-positiver Mammakarzinome entwickelt.

Antiöstrogene wurde Mitte der 50er Jahre zunächst als Fertilitätswirkstoffe entwickelt. Die ersten beschriebenen Antiöstrogene waren die nicht steroidalen Substanzen Ethamoxytriphethol (MER-25) (Lerner und Thompson, 1958) und Clomiphen (MRL41). Die Fähigkeit dieser Substanzen, Wirkungen in Brustkrebspatientinnen zu entfalten, wurde schnell offenbar (Kistner und Smith, 1960), jedoch wiesen sie eine hohe Toxizität beim Einsatz am Menschen auf (Herbst *et al.*, 1964). Clomiphene ist gegenüber MER-25 das potentere Antiöstrogen, zeigte aber *in vitro* stärkere östrogene Wirkungen (Holtkamp *et al.*, 1960) und wirkte auf manche Patientinnen ovulationsauslösend (Greenblatt *et al.*, 1961; Huppert, 1979). Clomiphen ist heutzutage ein etabliertes Medikament in der Behandlung von Unfruchtbarkeit. Antiöstrogene sind sehr wirksam in der adjuvanten, metastasierenden und chemopräventiven Behandlung und induzieren einen signifikanten Anstieg der Gesamtüberlebensrate bei Brustkrebspatientinnen (EBCTC-Group, 1992; 1998). Anfang der 70er Jahre wurde die erste Studie in Brustkrebspatientinnen mit dem neuen antiöstrogenen Wirkstoff Tamoxifen (ICI 46,474; TAM) veröffentlicht (Cole *et al.*, 1971).

### 1.2.1 Selektive Östrogen-Rezeptor Modulatoren (SERMs)

Antiöstrogene zeigen in ihrer physiologischen Wirkung häufig eine ausgeprägte Gewebespezifität. Solche Antiöstrogene, die eine gewebespezifische Wirkung zeigen, haben daher die Bezeichnung Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) bekommen. Die bekanntesten SERMs werden im Folgenden vorgestellt (Abb. 1.2).

Tamoxifen (TAM) gehört zur Gruppe der Triphenylethylene und ist die Hauptstütze der Hormontherapie als das am häufigsten eingesetzte Antiöstrogen in der Behandlung von frühen und fortgeschrittenen Mammakarzinomen (EBCTC-Group, 1998; Gradishar, 2004). Neben antiöstrogenen Effekten übt es teilweise auch agonistische Effekte aus (Harper *et al.*, 1967), wahrscheinlich deshalb, da es wie Östrogen sowohl die Östrogenrezeptor-Dimerisierung als auch die Bindung des ER-Homodimers an ein ERE

erlaubt. Tamoxifen aktiviert im Gegensatz zu Östrogen den ER nicht vollständig. Die AF-2 Aktivierungsfunktion kann nach Tamoxifenbindung nicht mehr phosphoryliert werden und bleibt inaktiv, während die AF-1 Domäne aktiv bleibt und nach Co-Aktivator-Bindung eine reduzierte Transkription bedingt. In diesem Fall spricht man von einem partiellen Agonismus. Verglichen mit einer zytotoxischen Chemotherapie sind Antiöstrogene gut verträglich und mit nur geringer Toxizität verbunden (Love, 1989). Tamoxifen senkt LDL-Cholesterin ohne HDL-Cholesterin zu steigern (Bagdade *et al.*, 1990) und reduziert letale Koronarinfarkte (Kauffman *et al.*, 1997). Eine erhebliche Nebenwirkung, die mit den östrogenen Effekten von Tamoxifen assoziiert ist, ist ein erhöhtes Risiko für die Induktion eines Endometriumkarzinoms (EBCTC-Group, 1996; Barakat, 1996; 1998). Weitere häufige Nebenwirkungen sind ein erhöhtes Risiko für Thrombose sowie Hitzewallungen, vasomotorische Symptome, gastrointestinale Störungen, Scheidenentzündungen und Depressionen (Robinson *et al.*, 1996; Day *et al.*, 1999). In Bezug auf Knochen (Steigerung der Knochendichte) (Love *et al.*, 1992; Marttunen *et al.*, 1998) und Lipide behält TAM jedoch einige der positiven Nebenwirkungen bei (Catherino und Jordan, 1993).

Mit dem Ziel potentielle Nebenwirkungen von Tamoxifen zu reduzieren, die antiöstrogenen Effekte jedoch beizubehalten, wurden weitere Antiöstrogene mit einer leicht veränderten Struktur entwickelt (Übersicht siehe Abb. 1.2):

Toremifen (Fareston<sup>®</sup>, Chloro-tamoxifen) ist ein mit Tamoxifen verwandtes Triphenylethylen-Antiöstrogen (Hard *et al.*, 1993; Potter *et al.*, 1994; Hayes *et al.*, 1995) mit einer ähnlichen Bindungsaffinität zum ER (Kallio *et al.*, 1986). Es kann wie Tamoxifen Apoptose in humanen Mammakarzinomzelllinien induzieren. Beim Mammakarzinom wurden ähnliche Ansprechraten und Nebenwirkungen beschrieben, so dass sich gegenüber Tamoxifen keine wesentlichen Vorteile ergaben.

Droloxifen (3-Hydroxy-tamoxifen) hat mit Tamoxifen verglichen eine 10fach höhere Bindungsaffinität zum ER und eine kürzere Halbwertszeit. Der Einsatz in Tierexperimenten zeigte am Uterus niedrigere östrogenagonistische und höhere östrogenantagonistische Wirkungen (Hasmann *et al.*, 1994). Ein mögliche Rolle für Droloxifen wurde in Phase-I- und -II-Studien in Aussicht gestellt (Rauschnig *et al.*, 1994).

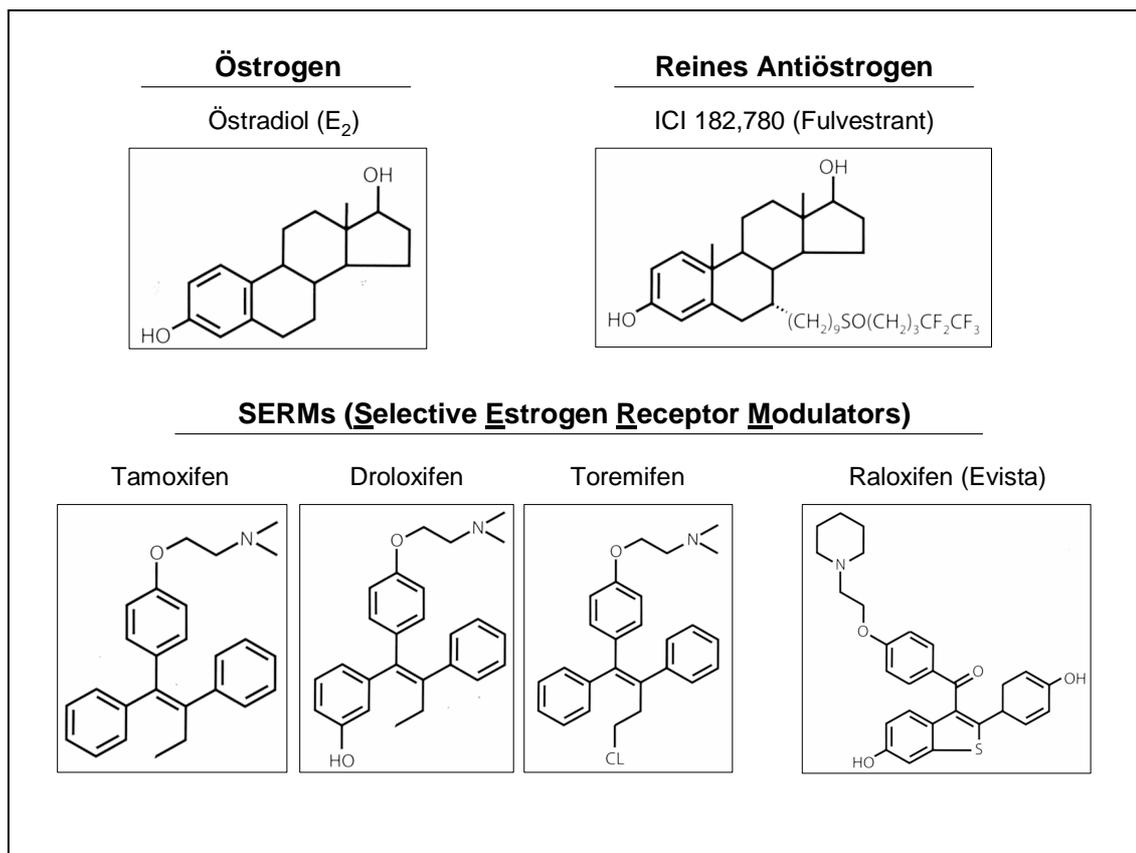


Abb. 1.2: Strukturformeln von Östrogen im Vergleich mit dem wichtigsten reinen Antiöstrogen und SERMs

Raloxifen (Keoxifen, LY 156,758, EVISTA<sup>®</sup>, Wirkstoff Raloxifen-Hydrochlorid) ist ein nichtsteroidales Benzothiophen. Es hat abhängig vom Gewebe entweder volle oder partielle antiöstrogene Wirkung. Raloxifen wurde in den USA und in Europa zur Prävention und darauf folgend auch zur Behandlung von postmenopausaler Osteoporose zugelassen (MORE-Studie) (Ettinger *et al.*, 1999). Es konnte sichergestellt werden, dass es nicht gleichzeitig das Risiko für ein Endometrium- und Mammakarzinom steigert (Cummings *et al.*, 1999; Cauley *et al.*, 2001). In einer Studie mit postmenopausalen Patientinnen konnte zuvor gezeigt werden, dass die Therapie mit Raloxifen die Knochendichte im Gesamtskelett steigerte sowie die Serumkonzentration von Gesamt- und Low-Density-Lipoprotein-(LDL)-Cholesterin senkt und das Endometrium nicht stimuliert. Es wirkt auf Knochen und den Serum-Lipid-Metabolismus als Östrogenagonist und auf Brust und Uterus als Östrogenantagonist (Draper *et al.*, 1996; Delmas *et al.*, 1997).

Aktuell werden Studien zur Evaluierung der Chemoprävention des Mammakarzinoms durchgeführt, die auf eine Reduktion der Inzidenz hindeuten (Bentrem und Jordan,

1999; Martino *et al.*, 2004). Eine Tamoxifen-Raloxifen vergleichende Studie wird ihren Bericht Ende 2006 vorlegen, wovon erwartet wird, das Raloxifen so effektiv wie Tamoxifen aber mit geringeren Nebenwirkungen abschneidet (Houssami *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Reine Antiöstrogene

Reine oder pure Antiöstrogene unterscheiden sich im Gegensatz zu partiellen Antiöstrogenen wie Tamoxifen oder Raloxifen vor allem in 3 Eigenschaften. Sie führen zu einer vollständigen Inaktivierung des ER, sie inhibieren die ER-Dimerisierung und beschleunigen zudem die Degradation des ER (Fawell *et al.*, 1990; Wijayaratne und McDonnell, 2001; Morris und Wakeling, 2002). Aufgrund dieser Eigenschaften erhielten sie den Beinamen Selective Estrogen Receptor Down-Regulators (SERDs). Der wesentliche Vorteil gegenüber partiellen Antiöstrogenen ist, dass reine Antiöstrogene keine östrogenen Effekte ausüben.

ICI 182,780 (Fulvestrant, Faslodex<sup>®</sup>) ist das bekannteste reine Antiöstrogen (siehe Abb. 1.2). Es wurde bereits 2002 von der FDA (US Food and Drug Administration) in den USA und 2004 von der EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) in Europa für die Behandlung metastasierender, Hormonrezeptor-positiver Mammakarzinome in postmenopausalen Frauen zugelassen, bei denen trotz einer früheren Antiöstrogenbehandlung mit Tamoxifen die Tumorbildung weiter voranschreitet (Robertson *et al.*, 2003; 2005). Bereits in früheren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Faslodex bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom keine unerwarteten Nebenwirkungen zeigte (DeFriend *et al.*, 1994) und bei Tamoxifen-resistenten Frauen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom eine Tumorregression erzielt werden konnte (Howell *et al.*, 1996).

### 1.2.3 Aromataseinhibitoren

Das Antiöstrogen Tamoxifen war lange Zeit der Goldstandard in der Behandlung von Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs sowohl in der adjuvanten Therapie als auch der Behandlung von Metastasen (Osborne, 1998). Die Entwicklung von Aromataseinhibitoren (AI) hat jedoch Tamoxifen diese Vormachtstellung strittig gemacht. Seit vielen Jahren werden AI nach Versagen einer antihormonellen Behandlung mit Tamoxifen eingesetzt. Mehr und mehr zeigen aktuelle

Studienergebnisse jedoch, dass AI, sich zu einem Standard in der postmenopausalen Behandlung von Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs sowohl in adjuvanten als auch metastasenbildenden Ansätzen entwickeln (Gould und Garcia, 2006). Der Grund für die Verwendung von AI in postmenopausalen Frauen liegt darin, dass Östrogen in diesen Patientinnen von der Aromatase in peripheren Geweben und im Tumor gebildet wird (Johnston und Dowsett, 2003; Lonning, 2004)

AI blockieren effektiv die Östrogenwirkung. Die Aromatase ist ein Cytochrom-P450-Hämoprotein, das über drei Hydroxylierungsschritte als Katalysator fungierend die Androgene Androstendion und Testosteron zu Östron und Östradiol umwandelt und der geschwindigkeitsbestimmende Faktor in der Biosynthese von Östrogenen ist (Brodie *et al.*, 2000). Hauptbildungsorte sind bei Männern Leydig-Zellen sowie Muskel- und Fettgewebe und bei prämenopausalen Frauen die Ovarien (McNatty *et al.*, 1979). Postmenopausal werden Östrogene vor allem extragonadal in Muskel- und Fettgewebe durch Umwandlung von adrenalen Androgenen produziert (Longcope, 1987). Die Inhibition der Aromatase ist pharmakologisch sinnvoll, da sie nur den letzten Schritt der Östrogensynthese katalysiert und somit keine Auswirkung auf die Synthese anderer Steroide hat. Die Blockade der Östrogenwirkung ist in Mammakarzinomen von besonderer Bedeutung, da dort die Östrogenkonzentration gegenüber Brustfettgewebe erhöht ist und diese die Proliferation eines Tumors fördert.

Nach Ihrer chemischen Herkunft lassen sich AI in die zwei Gruppen der steroidal und nichtsteroidal Inhibitoren einteilen (siehe Abb. 1.3). 4-Hydroxyandrostendion (4-OHA) war der erste klinisch angewendete steroidale Inhibitor (auch Formestan [Lentaron<sup>®</sup>]). Weitere steroidale Inhibitoren sind Exemestan (Aromasin<sup>®</sup>), Atamestan und 10-Propagylandrostendion. Nichtsteroidale Inhibitoren sind Aminogluthethimid (Orimeten<sup>®</sup>) und die Gruppe der Triazolsubstanzen Anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>), Letrozol (Femara<sup>®</sup>), Fadrozol und Vorozol.

In groß angelegten klinischen Studien konnten anhaltend verbesserte Bilanzen für die Behandlung von Brustkrebs in frühem und fortgeschrittenem Stadium mit AI ermittelt werden, was die Tolerierbarkeit und Wirksamkeit gegenüber Tamoxifen betrifft. Die Wirkung von Anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>) wurde in der ATAC-Studie (ATAC, Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination (über 5 Jahre, über 9000 Patienten); Baum *et al.*,

2002; Howell *et al.* 2005) untersucht, welche die erste klinische Studie zur Untersuchung eines AI in einem adjuvanten Ansatz war. Weitere Studien mit Anastrozol sind ITA (Boccardo *et al.*, 2005), und ABCSG-8/ARNO-95 (Jakesz *et al.*, 2005). Die erste große AI Studie mit Letrozol war BIG FEMTA (Breast International Group/Femara-Tamoxifen, (5 Jahre, über 8000 Patienten), Thurlimann *et al.*, 2005) gefolgt von MA-17 (Goss *et al.*, 2003, 2005). Die Wirkung von Exemestan wurde in der IES-Studie untersucht (Intergroup Exemestane Study, Coombes *et al.*, 2004). Diese Studien unterscheiden sich im Timing der AI-Gabe, sie zeigen aber alle eine signifikante Reduktion der Rezidivrate von Brustkrebs während eine Verbesserung der Überlebensrate nicht festgestellt werden konnte. Das Hauptproblem scheint jedoch das Auftreten von Osteoporose und Knochenbrüchen zu sein. Eine optimale Therapie für postmenopausale Frauen sollte die Behandlung eines AI beinhalten. Wie jedoch die optimale Abfolge von AI und Tamoxifen für eine adjuvante Therapie aussieht, ist Bestandteil aktueller Forschungsarbeiten.

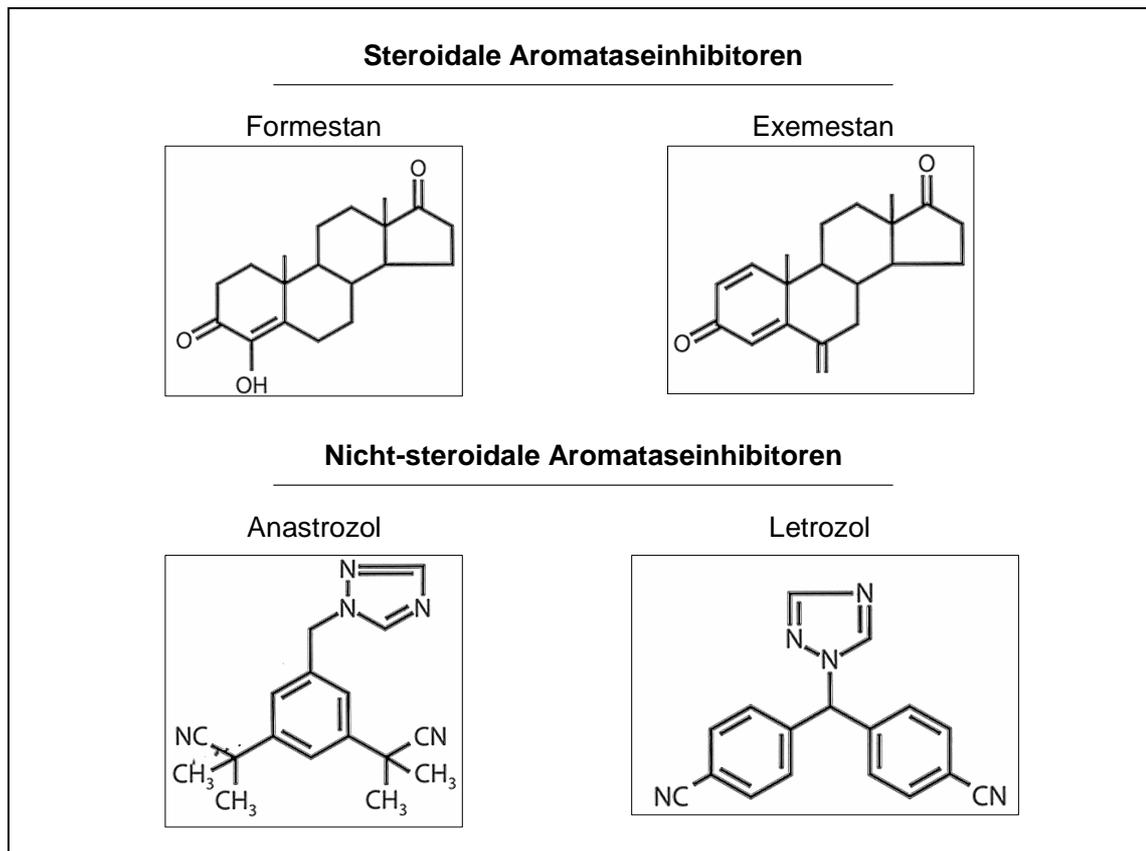


Abb. 1.3: Strukturformeln steroidaler und nicht-steroidaler Aromataseinhibitoren

### 1.3 Nichtgenomische Effekte

Die Wirkung von Steroidhormonen und SERMs entfaltet sich nach der klassischen Vorstellung durch Interaktion mit den entsprechenden Hormonrezeptoren und die anschließende Modifikation der Transkription spezifischer Gene im Zellkern. Das jeweilige aus neusynthetisierter mRNA hergestellte Protein bewirkt die genomische Antwort. Der Zeitrahmen zur Neusynthese einer relevanten Proteinmenge liegt im Bereich mehrerer Stunden.

Hans Selye fand bereits 1942 in einer Studie über Steroidhormone Hinweise auf eine Wirkung, die schon wenige Minuten nach der Applikation einsetzte und zeitlich deutlich von der sonst nach Stunden oder Tagen sichtbar werdenden Wirkung zu unterscheiden war (Selye, 1942). Zwei Jahrzehnte später wurde von auffälligen kardiovaskulären Effekten von Aldosteron bereits 5 Minuten nach Verabreichung beim Menschen berichtet (Klein und Henk, 1963). Bessere Hinweise auf eine nichtgenomische Wirkungsweise von Steroidhormonen konnte eine *in vitro* Studie über die Veränderung des Natriumionenaustauschs durch Aldosteron in Hunde-Erythrozyten erbringen, da Erythrozyten keinen Zellkern bzw. DNA enthalten, was eine genomische Wirkungsweise von vornherein ausschloss (Spach und Streeten, 1964).

Es gibt mehrere Kriterien, die auf nichtgenomische Effekte hinweisen und diese charakterisieren. Zum einen ist dies die Beobachtung der Wirkung in einem Zeitrahmen von Sekunden bis Minuten. Des Weiteren sollten diese Effekte nicht durch Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D gehemmt werden können, da dies die Genexpression ausschließt. Ebenso spricht die Insensitivität auf den Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid für einen nichtgenomischen Mechanismus. Das Nichtvorhandensein eines ‚normalen, funktionierenden‘ Zellkerns schließt eine genomische Wirkungsweise aus. Dies ist beispielsweise der Fall in Erythrozyten, Thrombozyten und Spermatozoen. Ein bekanntes Beispiel für eine nichtgenomische Wirkung ist die Akrosomen-Reaktion von Spermien, die durch Progesteron ausgelöst wird. Nur wenige Sekunden nach Kontakt des Spermiums mit dem Steroid zerreißt die Akrosomen-Membran am Kopf des Spermiums und gibt ihren Inhalt (vor allem Enzyme und Aktin) frei. Bereits in einem frühen Stadium dieser Reaktion kommt es zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration.

Beinahe alle Mitglieder der Steroidhormon-Familie von Kortikosteroiden (Glukokortikoide, Mineralkortikoide) bis zu Geschlechtshormonen (Östrogene, Progestine, Androgene) sind imstande schnelle Effekte auszulösen (Falkenstein und Wehling, 2000; Lösel und Wehling 2003). Schon früh wurden zahlreiche solcher Effekte beobachtet. Vitamin D aktiviert schnell die Phospholipase C intakter Enterozyten (Lieberherr *et al.*, 1989) und stimuliert die MAP-Kinase Aktivität in hepatischen Ito-Zellen (Beno *et al.*, 1995). Progesteron steigert die Oxytocin-Rezeptor Bindung im posterioren, ventromedialen Hypothalamus (Schumacher *et al.*, 1990), führt zu einem schnellen Calcium-Influx (Blackmore *et al.*, 1990) und induziert die Tyrosin-Phosphorylierung eines Proteins in Spermien (Mendoza *et al.*, 1995). Testosteron führt zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären freien Calcium-Konzentration in Makrophagen (Guo *et al.*, 2002). Die untersuchten schnellen Effekte von Östrogen sind in 1.3.1 beschrieben.

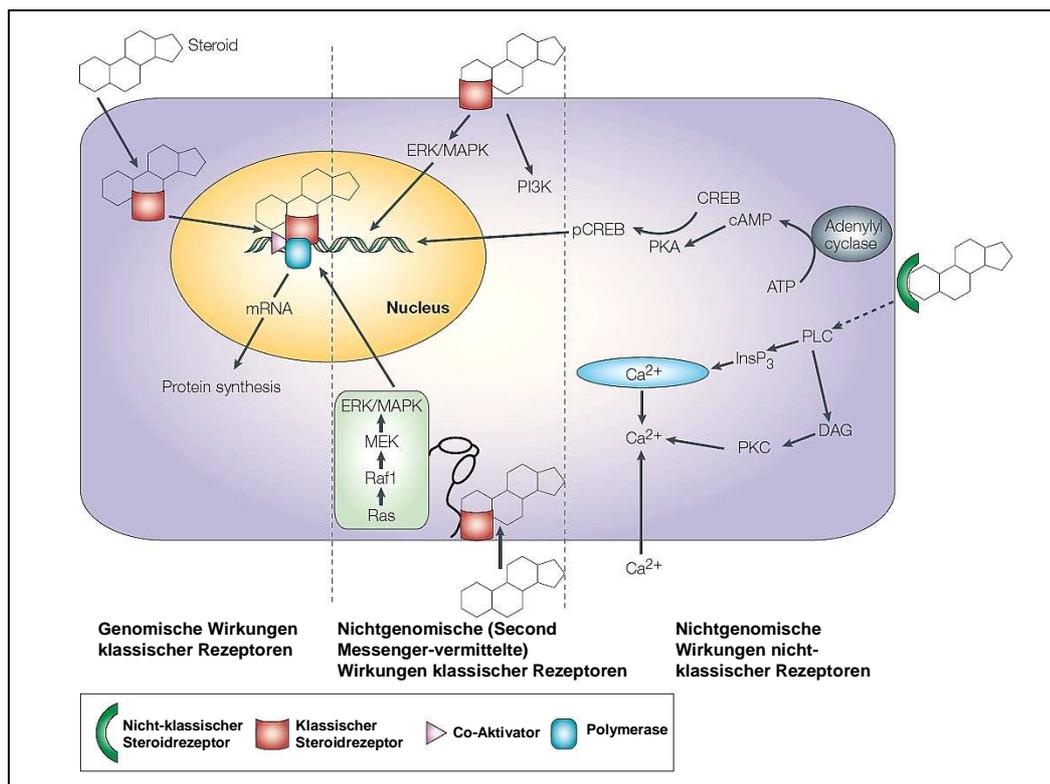


Abb. 1.4: Schema genomischer und nichtgenomischer Steroidwirkungen über verschiedene Signalwege (modifiziert nach Lösel und Wehling, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003). CREB, cAMP response element binding protein; DAG, Diacylglycerin; InsP<sub>3</sub>, Inositoltriphosphat; pCREB, phosphoryliertes CREB; PI3K, Phosphatidylinositol-3-kinase; PKA, Proteinkinase A; PKC, Proteinkinase C; PLC, Phospholipase C

Während einige dieser Effekte von klassischen Steroidrezeptoren vermittelt werden, scheinen andere von anders gearteten Rezeptoren vermittelt zu werden. Obwohl die zelluläre Antwort schneller Effekte auch Einfluss auf die Genexpression hat, kennzeichnen nichtgenomische Effekte vor allem ihre Wirkungen auf die Komponenten der Signaltransduktionswege. Diese Effekte führen oft zur Bildung intrazellulärer Second messenger und zu einer Veränderung der Aktivität von Mitogen-Activated Protein Kinasen (MAPKs), Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3K) und dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Aufgrund ihres Wirkmechanismus kann man nichtgenomische Effekte einteilen in (1) Effekte, die an der Plasmamembran auftreten, aber nicht rezeptorvermittelt sind, (2) Effekte, die über einen membrangebundenen Rezeptor vermittelt werden, der aber nicht dem klassischen Steroidrezeptor entspricht und (3) Effekte, die über einen an der Membran lokalisierten klassischen Steroidrezeptor vermittelt werden (Cato *et al.*, 2002) (siehe Abb. 1.4).

### 1.3.1 Nichtgenomische Effekte von Östrogenen

Obwohl bereits vor knapp 30 Jahren an der Plasmamembran generierte Östrogenwirkungen festgestellt wurden (Pietras und Szego, 1977), ist die intensive Erforschung dieser Vorgänge erst sehr viel später vorangetrieben worden. Mittlerweile ist die Existenz eines an der Plasmamembran lokalisierten ER und die Bedeutung von zytoplasmatischen ER-Effekten weitgehend anerkannt und wird durch zahlreiche überzeugende experimentelle Hinweise untermauert (Kelly und Levin, 2001; Song und Santen, 2006). Die schnell einsetzten Wirkungen von Östrogen können in zwei Hauptkategorien eingeteilt werden: (I) die durch den klassischen Rezeptor (ER) ausgelösten Antworten und (II) die durch andere Proteine wie z.B. GPR30 (G-Protein gekoppelter Rezeptor) vermittelten Antworten. Es konnte gezeigt werden, dass 17 $\beta$ -Östradiol, sehr schnell die Konzentration intrazellulärer „Second Messenger“ wie Calcium (Morley *et al.*, 1992; Improta-Brears *et al.*, 1999) und cAMP (Aronica *et al.*, 1994; Gu und Moss, 1996) erhöhen kann. Außerdem kann es zur Aktivierung der Mitogen-Activated Proteinkinase (MAPK) (Migliaccio *et al.*, 1996), der Phospholipase C (Le Mellay *et al.*, 1997) (Ho und Liao, 2002) sowie der endothelialen NO Synthase (eNOS) (Goetz *et al.*, 1999; Simoncini *et al.*, 2002b) kommen. Die Weiterleitung von Östrogensignalen von der Plasmamembran in die Zelle und die Rekrutierung klassischer

und nichtklassischer Rezeptoren zur Membran im Verbund mit zahlreichen anderen Proteinen ist Bestandteil aktueller Forschung (Manavathi und Kumar, 2006). Die neuen Erkenntnisse und zunehmende Komplexität der Östrogenwirkung legen nahe, dass die losgelöste Betrachtung genomischer oder nichtgenomischer Wirkungen nicht mehr zeitgemäß ist, da diese untrennbar miteinander verbunden sind und sich gegenseitig beeinflussen.

## 1.4 Der MAPK-Signalweg und seine Bedeutung im Mammakarzinom

Die tumorassoziierte Aktivierung von Onkogenen sowie Suppression von Tumorsuppressorgenen tragen zur malignen Entkopplung der Zelle bei. Diese Entwicklung zu einer übermäßig proliferierenden Zelle wird über wenige entscheidende Signalwege und Prozesse vermittelt. Dazu gehören die Zellzyklus-Regulation, die pro- und anti-apoptotischen Signalwege sowie die Phosphotyrosin-Kinase-Signalwege (PI3K, MAPK), die in einem engen Cross-Talk zueinander stehen. Mitogen-Activated Proteinkinase- (MAPK-) Kaskaden vermitteln und verstärken Signale, die an der Zellproliferation, -differenzierung und dem Zelltod (Apoptose) beteiligt sind (siehe Abb. 1.5).

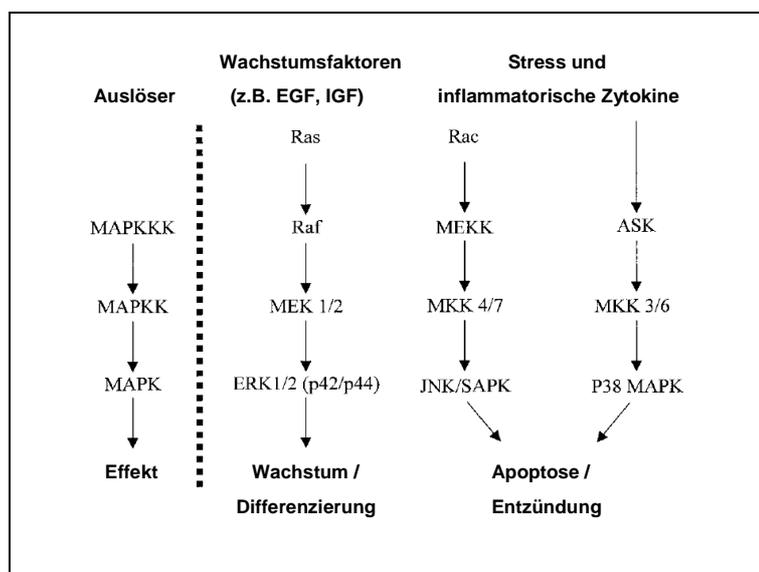


Abb. 1.5: MAPK-Module und ihre Rolle in der Signalweiterleitung in Richtung Proliferation und Apoptose (modifiziert nach Clarke *et al.*, 2001)

Bisher wurden in Säugerzellen fünf verschiedene MAPK Gruppen charakterisiert: die „extracellular regulated kinases“ (Erk 1 und 2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK 1, 2 und 3), die p38 Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), Erk 3/4 und Erk 5 (Davis, 2000; Chen *et al.*, 2001; Chang und Karin, 2001; Roux und Blenis, 2004; Qi und Elion, 2005). Die am besten studierten MAPK Module in Säugerzellen sind die Erk1/2, JNK und p38 Kinasen. Erk1/2 werden vor allem als Antwort auf Wachstumsfaktoren und Phorbolster aktiviert, während JNK und p38 Kinasen vor allem responsiv auf Stressfaktoren wie osmotischer Schock, Hitzeschock, ionisierende Strahlung oder Zytokin-Stimulation sind (Übersicht in Pearson *et al.*, 2001).

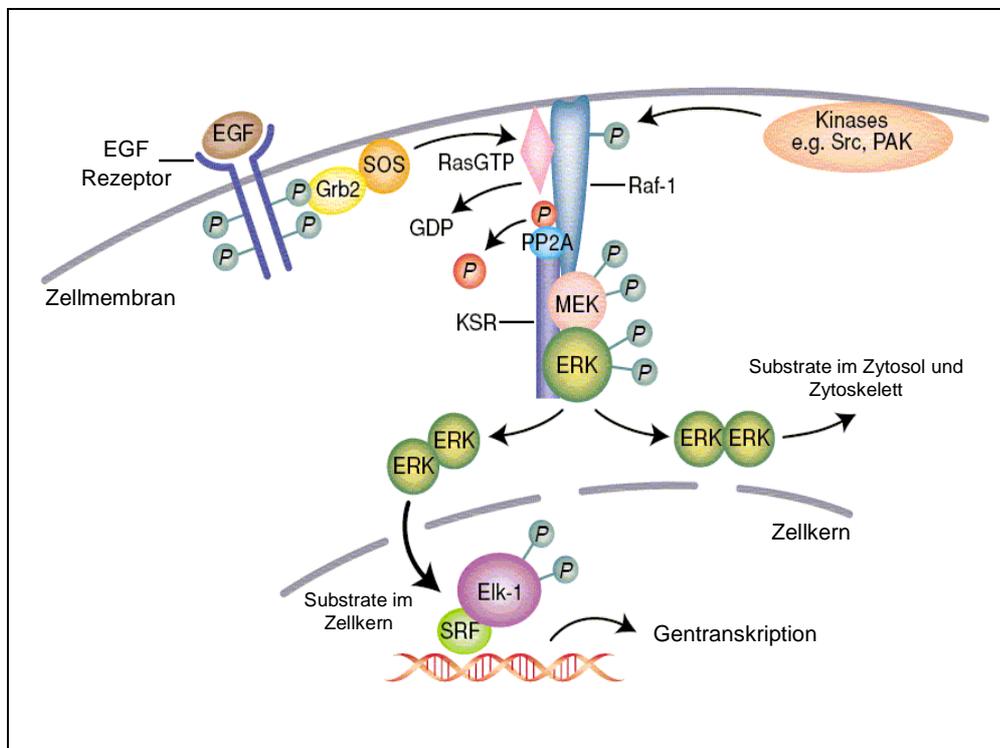


Abb. 1.6: Übersicht über die Organisation und Funktion des MAPK Erk1/2 Signalweges (modifiziert nach Kolch *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002)

Der MAPK-Erk1/2-Signalweg ist die klassische MAPK-Kaskade und hat die größte Bedeutung im Brustkrebs. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich dieser Signalweg näher untersucht, weshalb MAPK und Erk1/2 im Folgenden synonym benutzt werden. Jedem MAPK-Signalweg liegt eine Aktivierung über eine dreistufige Kaskade aus drei hochkonservierten Kinasen zugrunde: einer MAPK, einer MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK). Das Erk1/2 Modul besteht aus den MAPKKKs A-Raf, B-Raf und Raf-1, den MAPKKs MEK1 und MEK2

und den MAPKs Erk1 und Erk2. Der Aktivierung dieser Kaskade sind einige Schritte vorgeschaltet: Typischerweise leiten Zelloberflächenrezeptoren (z.B. Rezeptortyrosinkinasen=RTKs) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) nach Bindung eines Liganden (z.B. EGF→EGFR) aktivierende Signale an die Raf/MEK/Erk Kaskade weiter. Dies geschieht über Isoformen des kleinen G-Protein-bindenden Proteins Ras (Campbell *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1992). Der durch Ligandenbindung autophosphoryliert vorliegende Transmembranrezeptor phosphoryliert das Adapterprotein Shc, was zu weiteren Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Shc, Grb2 und SOS (Son of sevenless, Guanin Nukleotidaustausch Faktor) führt. SOS katalysiert nach dieser Komplexbildung die Aktivierung des membranassoziierten Proteins Ras durch Konvertierung von GDP-Ras zur GTP-Ras, was zur Weiterleitung des Signals über Phosphorylierung in die dreistufige Kaskade führt, an deren Ende Erk1/2 stehen (Schema siehe Abb. 1.6). Die beiden Isoformen Erk1 und Erk2 sind zu 85% homolog und haben ein Molekulargewicht von 42 und 44 kDa (auch als p42/p44 bezeichnet). Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung eines Tyrosin- und eines Threoninrestes durch MEK. Wenn Erk1/2 aktiviert werden, kommt es zu einer schnellen Anhäufung im Zellkern (Chen *et al.*, 1992; Lenormand, 1995) und dort zur Interaktion mit verschiedenen Faktoren, die kumulativ gesehen die Zellproliferation stimulieren. Dazu gehören wesentliche Transkriptionsfaktoren wie AP-1, SRC-1, NF-κB, c-fos, c-jun und c-myc, Elk-1, Ets sowie zahlreiche weitere Kinasen wie z.B. RSK und der Zellüberlebensregulator Bcl-2.

Die maligne Transformation einer gesunden Zelle zur Tumorzelle ist vor allem als Resultat einer Entgleisung des Gleichgewichts von wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Prozessen zu verstehen. Das entstehende Ungleichgewicht in Richtung wachstums- und teilungsfördernder Prozesse im Mammakarzinom kann verschiedenste Gründe haben. Eine große Rolle spielt dabei die Fehlregulation und häufige Hochregulation des MAPK-Signalweges im Brustkrebs (Santen *et al.*, 2002).

Häufig kommt es zur Überexpression oder konstitutiven Aktivierung von Wachstumsfaktoren (EGF, IGF-1) und deren Rezeptoren (Her2Neu, EGFR, IGFR) in Mammakarzinomen (Morris, 2002; Gschwind *et al.*, 2004). Die Überexpression des EGFR mit seinem prominentesten Vertreter erbB2 (Her2/Neu) geht mit einer reduzierten Überlebensrate und einer schlechteren Prognose einher, was die Gruppe der

EGFR zu einem therapeutischen Ziel werden ließ (z.B. Her2/Neu Blockade mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, Herceptin<sup>®</sup>). Ein weiterer äußerst kritischer Punkt ist die Regulation von Ras und Raf zur Aufrechterhaltung der Zellproliferation. Häufig sind diese beiden Proteine von aktivierenden Mutationen betroffen, die aufgrund einer veränderten MAPK Aktivität zur Onkogenese führen können (Downward, 2003; Chong *et al.*, 2003; Mercer und Pritchard, 2003). Darüber hinaus mehren sich Hinweise, dass auch Östrogen über eine nichtgenomische Wirkungsweise Einfluss auf proliferationsfördernde Signalwege wie der MAPK-Kaskade einfließen kann.

## 1.5 Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass das Wirkungsspektrum von Östrogenen weitaus komplexer ist als zunächst angenommen. Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass Östrogene über den klassischen Östrogenrezeptor nicht nur die klassische, genomische Wirkungsweise in Form einer modulierten Genexpression ausüben. Wesentlich schneller ablaufende, als nichtgenomisch oder nichtnukleär bezeichnete Effekte, die ihren Ursprung an der Plasmamembran haben und über intrazelluläre Signalkaskaden wirken, sind zunehmend in den Blickpunkt aktueller Forschung gerückt. Besonders gynäkologischen Malignomen wie dem Mammakarzinom kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da deren Proliferation häufig unter östrogenem Einfluss steht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Östrogenen auf die nichtgenomische Aktivierung des MAPK-Signalweges in einem Brustkrebszellkulturmodell untersucht werden. Dieser Signalweg führt in Mammakarzinomen zu einer gesteigerten Proliferation. Von besonderem Interesse war, neben Östradiol, die Wirkung therapeutisch relevanter Antiöstrogene wie ICI 182,780, Tamoxifen und Raloxifen auf den Status der MAPK-Aktivierung zu charakterisieren. Die membranvermittelte, nichtgenomische Hormonwirkung sollte mit dem membranimpermeablen Konjugat E<sub>2</sub>-BSA charakterisiert werden. Die Erhöhung der Östrogenrezeptormenge durch Transfektionsexperimente sollte Einsicht in die Notwendigkeit des ER für die Vermittlung nichtgenomischer Effekte erbringen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material und Geräte

#### 2.1.1 Zelllinien und Kulturmedien

##### **MCF-7 (ATCC HTB-22)**

Die verwendete humane Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Migliaccio zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine östrogenrezeptor-positive Zelllinie. Diese Zelllinie wurde durch die „American Type Culture Collection“ (ATCC) folgendermaßen charakterisiert: Diese Zelllinie wurde von H.D. Soule durch Punktion nach einem Pleuraerguß einer 69 Jahre alten Frau mit Mammakarzinom isoliert (Soule *et al.*, 1973).

Zur Kultivierung wurde DMEM Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium), phenolrothaltig mit 1000 mg/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Gibco BRL) mit folgenden Zusätzen verwendet: 10% fötales Kälberserum (FCS) (FCS Gold/Mycoplex, PAA), Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung (100x) (Gibco BRL), 0,1% Gentamycin (10 mg/ml) (Gibco BRL), 188 µl Hydrocortison (10 µg/ml), 30 µl Insulin (1:100 Verdünnung).

##### **MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)**

Diese Zelllinie wurde einer 51 Jahre alten, kaukasischen Frau mit Adenokarzinom aus der Brust entnommen. Es handelt sich um eine Östrogenrezeptor-negative Zelllinie.

Es wurde zur Kultivierung DMEM Medium (Dulbecco's Modifiziertes Eagles Medium), phenolrothaltig mit 1000 mg/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Gibco BRL) mit folgenden Zusätzen verwendet: 10% fötales Kälberserum (FCS) (FCS Gold/Mycoplex, PAA), 1% L-Glutamin (100x) (Gibco BRL), 1% MEM Vitamin-Lösung (100x) (Gibco BRL), 0,1% Gentamycin (10 mg/ml) (Gibco BRL).

### 2.1.2 Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifizierung von Plasmid DNA wurden folgende kompetente *Escherichia coli*-Stämme mit dem genannten Genotyp verwendet:

**DH5 $\alpha$** : F<sup>-</sup>  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44  $\lambda$ <sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1

**SURE**: e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>)  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

### 2.1.3 Plasmide

Der retrovirale Expressionsvektor **S11IN** (5797 bp) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hahnenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt (Plasmidkarte siehe 8.3). Dieses Vektorsystem besitzt flankierende retrovirale Long Terminal Repeat (LTR)-Sequenzen, die die Integration der innerhalb der LTR-Sequenzen liegenden DNA in das humane Genom vermitteln. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in *E.coli*, sowie das für die  $\beta$ -Lactamase kodierende Ampicillinresistenzgen (amp), welches als prokaryontischer Selektionsmarker dient. Zusätzlich befindet sich eine Multiple Cloning Site (MCS) vor der Internal Ribosomal Entry Site (IRES) mit einer Reihe singulärer Restriktionsschnittstellen, in die die vollständige kodierende Sequenz des ER $\alpha$ -Gens inseriert wurde. Als viraler Promotor dient bei diesem Konstrukt der CMV (Zytomegalie-Virus)-Promotor, da er eine hohe Expression in Säugertierzellen erlaubt. Der Vektor S11IN enthält das Neomycinresistenzgen (NeoR) als eukaryontischen Selektionsmarker hinter der IRES.

Für die Klonierung des Expressionsvektors ER $\alpha$ -S11IN wurde der retrovirale Vektor S11IN als Rückgrat verwendet und die codierende ER $\alpha$ -Sequenz von 1788 bp mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI vor die IRES eingefügt (siehe 3.8.1)

## 2.1.4 Antikörper

Tab. 2.1: Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
<b>Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (E10)</b> (Maus, monoklonal)	Cell Signaling Tech.	1:2000 (WB)
<b>p44/42 MAP Kinase</b> (Kaninchen, polyklonal)	Cell Signaling Tech.	1:1000 (WB)
<b>ER<math>\alpha</math> (MC-20)</b> (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology	1:50 (CLSM)
<b>ER<math>\alpha</math> (H-184)</b> (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology	1:50 (CLSM)
Sekundärantikörper		
<b>goat anti-mouse IgG</b> (HRP-gekoppelt)	Santa Cruz Biotechnology	1:5000 (WB)
<b>goat anti-rabbit IgG</b> (HRP-gekoppelt)	Santa Cruz Biotechnology	1:2500 (WB)
<b>Peroxidase AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L)</b> (HRP-gekoppelt)	Dianova, Jackson Immunoresearch	1:35000 (WB)
<b>Anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat</b>	Dianova, Jackson Immunoresearch	1:320 (CLSM)

## 2.1.5 Verwendete Steroide, Steroidderivate und weitere Stimulantien

Tab. 2.2: Übersicht aller eingesetzten Steroide und sonstigen Stimulantien

Substanzname	Substanztyp / Funktion	Hersteller
<b>17<math>\beta</math>-Östradiol (E<sub>2</sub>)</b>	Steroid	Sigma
<b>E<sub>2</sub>-BSA</b> ( $\beta$ -Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime:BSA)(E <sub>2</sub> :BSA=35:1)	Steroid-Konjugat	Sigma
<b>E<sub>2</sub>-BSA-FITC</b> ( $\beta$ -Estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime:BSA-fluorescein-isothiocyanate conjugate)	Steroid-Konjugat, fluoreszenzmarkiert	Sigma
<b>ICI 182,780</b> (Fulvestrant)	Reines Antiöstrogen	Tocris Bioscience
<b>Tamoxifen (TAM)</b>	Antiöstrogen, SERM	Sigma
<b>Raloxifen-Hydrochlorid (RLX-HCl)</b>	Antiöstrogen, SERM	Sigma
<b>PD 98,059</b>	MEK-Inhibitor	Calbiochem
<b>Formestan</b>	Aromatase-Inhibitor	Sigma
<b>Epidermal Growth Factor (EGF)</b> (Human recombinant)	Wachstumsfaktor	Invitrogen

### 2.1.6 Oligonukleotide

Sämtliche Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH bezogen. Die Random-Primer für die cDNA-Synthese stammten von Amersham Biosciences. Alle verwendeten Primer sind in Tab. 2.3 dargestellt. Primer sollten eine Länge zwischen 15-25 bp aufweisen, einen GC-Gehalt zwischen 40-60% besitzen und weder komplementär untereinander noch zu sich selbst sein. Idealerweise sollten sie am 3'-Ende einen „GC-Clamp“ besitzen und möglichst keine „Repeats“ bzw. Purin- oder Pyrimidin-Abschnitte aufweisen. Bei PCR-Produkten, die für die Analyse mit dem A.L.F.-Sequencer bestimmt waren, enthielt der entsprechende 5'-Primer eine Cy5-Markierung (in Tab. 2.3 mit einem \* gekennzeichnet).

Tab. 2.3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße
<b>CathepsinD-Fwd*</b>	5'-CAA CAG CGA CAA GTC CAG C-3'	166 bp
<b>CathepsinD-Rev</b>	5'-GAC CTG CCT CTC CAC TTT GA-3'	
<b>ER<math>\alpha</math>-EcoRI-Fwd</b>	5'-AGG GGC GAA TTC ATG ACC ATG ACC CTC CAC AC-3'	1788 bp
<b>ER<math>\alpha</math>-BamHI-Rev</b>	5'-AGG GGC GGA TCC TCA GAC CGT GGC AGG-3'	
<b>ER<math>\alpha</math>-1288-Rev</b>	5'-CCA GCA GCA TGT CGA AGA TC-3'	Mit ER $\alpha$ -EcoRI-Fwd 1288 bp
<b>GAPDH-CG-Fwd*</b>	5'-ATG CTG GCG CTG AGT ACG T-3'	187 bp
<b>GAPDH-CG-Rev</b>	5'-GAG GCA TTG CTG ATG ATC TTG A-3'	
<b><math>\beta</math>-Actin-Fwd</b>	5'-AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT-3'	446 bp
<b><math>\beta</math>-Actin-Rev</b>	5'-ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'	

### 2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Invitrogen

Albumin Fraktion V (BSA), Merck, Darmstadt

Ammoniumperosidisulfat, Sigma, St. Louis, USA

Bromphenolblau, Sigma, St. Louis, USA

Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Mannheim

Coomassie R250, Sigma, St. Louis, USA

DMSO Sigma, St. Louis, USA

Dulbecco's PBS mit Ca und Mg, PAA, Cölbe

dNTP Roche, Mannheim

DTT (Dithiothreitol), Sigma, St. Louis, USA

Ethidiumbromid (500 µg/ml) Sigma, St. Louis, USA

Expand High Fidelity Taq Polymerase, Roche, Mannheim

Fugene<sup>TM</sup> 6 Transfection Reagent, Roche, Mannheim

Gentamycin, Invitrogen, San Diego, USA

Geneticin (G 418), Roche, Mannheim

Isopropanol, Merck, Darmstadt

Mineralöl, Sigma, St. Louis, USA

Natriumdodecylsulfat (SDS), Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd, extra pure, Merck, Darmstadt

SeeBlue<sup>®</sup> Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe

T4-Ligase und 10x Puffer, Promega, Mannheim

Trypan-Blau, Sigma, St. Louis, USA

Trypsin, ICN Biomedicals

Tween 20, Sigma, St. Louis, USA

Vectashield Mounting Medium, Serva, Heidelberg

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Gibco BRL (Eggestein) oder Sigma (München) in höchstem Reinheitsgrad (pro analysis, p.A.) bezogen.

## 2.1.8 Puffer und Lösungen

Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>A.L.F.-Auftragspuffer</b>	100 ml Formamid, 5 g Amberlite, 600mg Dextran, 3 ml 20 mM EDTA, pH 8,3
<b>APS (10%)</b>	10% Ammoniumperoxidisulfat in H <sub>2</sub> O, aliquotiert, gelagert bei -20 °C
<b>Bindesilan</b>	4 ml Ethanol abs., 15 µl Bindesilan, 1 ml 10% Essigsäure
<b>Bromphenolblau (BPB)</b>	1 % Stammlösung, 0,1 g BPB ad 10 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Elektrophoresepuffer (1x)</b>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
<b>Elektrophoresepuffer (5x)</b>	Stammlösung: 125 mM Tris, 960 mM Glycin
<b>E<sub>2</sub>-BSA-FITC</b>	1,5x10 <sup>-3</sup> M, 5mg E <sub>2</sub> -BSA-FITC in 1,39 ml sterilem PBS <sup>+</sup>
<b>SDS-Probenpuffer (6x) (Lämmli)</b>	2% SDS, 10% Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris
<b>LB-Medium</b>	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, Aqua dest. ad 1000 ml, pH 7,3. Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurden dem LB-Medium 2% Agar-Agar zugesetzt
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)</b>	200 mM-Stammlösung, Aliquots bei -20 °C
<b>PFA-Lsg. (für CLSM)</b>	1% Paraformaldehyd in PBS <sup>+</sup>
<b>PBS<sup>+</sup> (für CLSM)</b>	8g NaCl, 0,2g KCl, 1,15g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O, 0,2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,1g MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O, 0,1g CaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O ad 1l dH <sub>2</sub> O, pH 7,2
<b>Poly-L-Lysin-Puffer</b>	0,1 mg/ml Poly-L-Lysin in sterilisiertem H <sub>2</sub> O, aliquotiert und gelagert bei -20°C
<b>Ripa-Puffer</b>	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, ad 87,5 ml dH <sub>2</sub> O; 8,75 ml-Aliquots lagern bei -20°C Nach dem Auftauen: Zugabe von 0,75 ml NaF (200 mM, Endkonz. 15 mM), 0,5 ml Glycerin, 100 µl Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (200 mM, Endkonz. 1mM) und einer Protease-Inhibitortablette Complete Mini (Roche) pro 10ml-Aliquot
<b>Sammelgelpuffer (8x)</b>	1 M Tris/HCl pH 6,8, 60,57g ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
<b>SB-Probenpuffer</b>	7 M Harnstoff, 40% (v/v) Glycerin, 50 mmol/l EDTA, 10 mmol/l Tris, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, SDS 10%

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>SDS-Stammlösung</b>	10 % Stammlösung: 10 g SDS ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
<b>SOC-Medium</b>	0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10mM MgCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O, 10mM MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O, 20mM Glucose
<b>Stripping-Puffer</b>	100 mM Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris/ HCL pH 6,8
<b>TBS (10x)</b>	80 g NaCl, 12,1 g Tris, pH 7,3, ad 1l dH <sub>2</sub> O
<b>TBST (0,1%) (Waschpuffer)</b>	5 ml 20% Tween20 ad 1l TBS (1x)
<b>TBE (1X)</b>	0,2 M Tris, 0,17 M Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
<b>TBE (6X)</b>	1,2 M Tris, 1,02 M Borsäure, 12 mM EDTA, pH 8,0
<b>TE-Puffer (1x)</b>	10 mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA
<b>Transferpuffer (1x)</b>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
<b>Trenngelpuffer</b>	1 M Tris/HCl pH 8,8, 60,57 g ad 500 ml dH <sub>2</sub> O
<b>Tween20-Stammlösung</b>	20%-Stammlösung: 4 ml Tween 20 ad 20 ml dH <sub>2</sub> O

### 2.1.9 Reagenzien-Kits

CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega)

ECL<sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences)

GFX<sup>™</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences)

QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen)

QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen)

OmniScript RT Kit (Qiagen)

Micro BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit (Pierce)

Mycoplasma Plus<sup>™</sup> PCR Primer Set (Stratagene)

### 2.1.10 Geräte

A.L.F.-Express DNA-Sequenzierautomat (Amersham Pharmacia)  
Begasungsbrutschrank BB-16 (Heraeus)  
ELISA-Platten-Reader (Anthos HTII)  
Gene Pulser™ (BioRad, München)  
Heizblock, Test tube heater, SHT2D (Stuart Scientific)  
Lamda Bio UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer)  
Magnetrührer (Ika Labortechnik)  
Mikrowellengerät (Bosch)  
Mikroskop (Zeiss)  
Mini-Protean II Cell System (Bio-Rad)  
NanoDrop™ ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies)  
pH-Meter, Modell pH96-A (WTW)  
PowerPac 300 Power Supply (Bio-Rad)  
Schüttler Vortex Genie2 (Heidolph)  
Sterilbank  
Thermocycler Omnigene (Hybaid)  
Tischzentrifuge (Eppendorf)  
Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München)  
UV-Tisch N90 MW 312nm (Faust)  
Waage LG-10D (Sartorius)  
Wasserbad B3 (Haake)

### 2.1.11 Software und Datenbanken

Entrez (PubMed/Genbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html>)  
Fragment Manager 1.1 (Pharmacia)  
Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, USA, [http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))  
Prototype P0.2 (Pharmacia)  
SPSS Version 12 (SPSS Inc.)  
UN-SCAN-IT Gel™ Version 5.1 (Silk Scientific Corp.)

## **2.2 Zellbiologische und Proteinchemische Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung erfolgte bis zum konfluenten Wachstum in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in 75, 250 und 550 ml Gewebekulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen). Bei allen Zelllinien wurde das Medium mindestens zweimal pro Woche gewechselt. Für einen Mediumwechsel wurde das alte Medium mit einer sterilen Einmalpipette entfernt und nach einem Waschschrift mit PBS durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden bei 37°C aufgetaut, zur Entfernung des DMSO mit 9 ml des jeweiligen Mediums versetzt und nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm in 1 ml Kulturmedium suspendiert. Die suspendierten Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen inkubiert. Nach 1-2 Tagen wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht.

### **2.2.2 Subkultivierung von Monolayerkulturen**

Kulturen bei denen der Boden der Gewebekulturflasche vollständig bewachsen war (konfluente Kulturen), wurden in neue Kulturflaschen überführt („passagiert“). Dazu wurde das Medium entfernt, die adhärennten Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA Lösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten (maximal 5 Minuten). Anschließend wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Zellkulturmedium die Wirksamkeit des Trypsins herabgesetzt, die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner) überführt und die Zellen bei 1000 rpm 5 min abzentrifugiert. Pelletierte Zellen wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (0,8 x 40mm) vereinzelt. Die Bestimmung des Zelltiters erfolgte mit einer Neubauerzählkammer (siehe 2.2.3). Zum Anlegen einer neuen Kultur wurde je nach Größe der Zellkulturflasche die jeweilige Zellmenge ausgesät.

### 2.2.3 Bestimmung des Zelltiters

Nach Ernte der Zellen muss für die Subkultivierung bzw. Kryokonservierung der Zelltiter bestimmt werden. Dies erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer, in der nach Zugabe der verdünnten Zellsuspension 4 Großquadrate ausgezählt wurden. Der Zelltiter berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Ausgezählte Fläche}(\text{mm}^2) \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \text{Zellen}/\mu\text{l}$$

### 2.2.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden wie beschrieben mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen, resuspendiert und der Zelltiter bestimmt. Zum Einfrieren wurde eine definierte Zellzahl in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt (Greiner, 2 ml), zunächst bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.5 Mykoplasmentest

Die saubere, experimentelle Arbeit mit Zellkulturzelllinien erfordert die Kontrolle auf Mycoplasmen-Kontaminationen. Diese kleinsten sich vermehrenden Prokaryonten stehen in der mikrobiologischen Klassifikation zwischen Bakterien und Viren und führen bei Menschen und Tieren hauptsächlich zu Erkrankungen des Bronchial- und Urogenitaltraktes. Mycoplasmen besitzen keine Zellwand, wachsen intrazellulär und ernähren sich parasitär von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten Ihrer Wirtszellen. In der Zellkultur macht sich eine Mycoplasmen-Infektion durch abgerundete Zellen mit verminderter Adhärenz, starke Vakuolisierung und körniges Aussehen bemerkbar. Ihr Befall führt zur Verarmung an basischen Aminosäuren im Zellkulturmedium. Dies hat eine Anfälligkeit der Zellen für Mutationen, Transformationen, Mikrokernabspaltungen und vorzeitige Apoptose zur Folge. Des Weiteren können Mycoplasmen Antigenpräsentation verhindern, Signaltransduktion auslösen bzw. die Rezeptorfunktionen in der Zellmembran stören. Zum Nachweis von Mycoplasmen-Kontaminationen wurde das Mycoplasma-Plus<sup>TM</sup> PCR-Primer Set (Stratagene) nach

Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion per PCR beruht auf der Amplifikation einer hoch konservierten Region der Mycoplasmen-16sRNA. Als Template diente jeweils der Zellkultur-Überstand (5µl) einer nahezu konfluenten Zellkultur. Außerdem besteht die Möglichkeit nach einer Restriktion des 874 bp großen Produkts mit Sau3A anhand des spezifischen Bandenmusters die Mycoplasmen-Art zu identifizieren. Bei Feststellung einer Mycoplasmen-Kontamination, wurden die betroffenen Zellen mehrere Wochen mit dem Antibiotikum Ciprobay (5µl/ml) behandelt, welches bei jedem Mediumwechsel erneut zugegeben wurde.

### 2.2.6 Proliferationsassay (MTS-Assay)

Diese Methode wurde zum Nachweis des östrogenabhängigen Wachstums von MCF-7 Zellen verwendet. Der verwendete CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in Proliferations- oder Zytotoxizitäts-Assays. Der MTS-Assay basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes MTS zu violetter Formazan unter Beteiligung von NADPH oder NADH in metabolisch aktiven Zellen. Der Assay besteht aus der neuartigen Tetrazolium-Verbindung MTS und dem Elektronenkupplungsreagenz PMS (Phenazin Methosulfat), die nach Herstellerangaben gemischt und direkt aliquotiert bei -20°C bis zur Verwendung gelagert wurden.

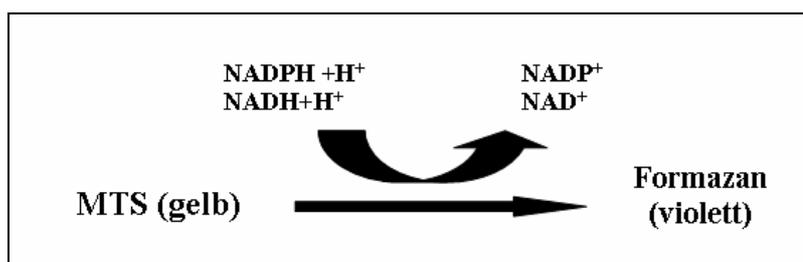


Abb. 2.1: Umsetzung des MTS-Reagenzes im Proliferationsassay

Die Durchführung des Assays erfolgte durch die Zugabe von 20 µl MTS/PMS-Lösung zu 100 µl Kulturvolumen je Well (96 Well Platte) und einer Inkubationszeit von 2-4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Menge des umgesetzten Formazan-Produktes wurde spektrometrisch im ELISA-Platten-Reader (Anthos HTII) bei 492nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm gemessen. Die Menge des Formazan-Produktes ist dabei direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen in Kultur. Die

Hintergrundabsorption von Medium bei 490nm wurde korrigiert, indem Kontrollwells (nur Kulturmedium ohne Zellen) parallel mit MTS/PMS versetzt und inkubiert wurden und deren Absorption von der der experimentellen Wells subtrahiert wurde.

### **2.2.7 Bestimmung der Östradiolkonzentration in Serum und Medium**

Die quantitative Bestimmung der Östradiolkonzentration mittels des Östradiol IMMULITE<sup>®</sup>-Assay (DPC Biermann, Bad Nauheim) wurde freundlicherweise von Mitarbeitern des Endokrinologischen Labors der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen kompetitiven Festphasen-Chemiluminiszenz-Immunoassay. Die feste Phase (Kugel) ist mit Kaninchen Anti-Östradiol polyklonalem Antikörper beschichtet. Das Reagenz enthält alkalische Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiert mit Östradiol. Das Östradiolenzymkonjugat konkurriert mit Östradiol aus der Probe um die limitierten Antikörperbindungsstellen auf der Kugel. Der Überschuss der Probe und des Reagenzes wird durch zentrifugales Waschen beseitigt. Zum Schluss wird das Chemiluminiszenzsubstrat zu den Kugeln zugegeben und ein Signal (Counts) in Proportion zum gebundenen Enzym generiert. Der Messbereich liegt zwischen 20-2000 pg/ml. Die Durchführung des Assays erfolgte mit dem Immulite<sup>®</sup>, einem vollautomatischen Random Access Immunoassay Analyzer (DPC Biermann, Bad Nauheim).

### **2.2.8 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 und anschließend bei 4000 g für 1 Stunde 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 Zentrifugation bei 4000 g für 1 Stunde wurde der Überstand durch eine Sterilfilterflasche filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C aliquotiert gelagert.

### 2.2.9 Stimulation der Zellen mit Steroiden und deren Derivaten

Zur Vorbereitung der Stimulationsexperimente wurden die in großen Zellkulturflaschen angezüchteten Zellen trypsiniert und auf 10 cm Zellkulturplatten in einer Dichte von  $1-1,5 \times 10^6$  in phenolrotfreiem Medium (DMEM, 10% charcoal-stripped FCS, 0,1% Gentamycin) ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und für weitere 3 Tage phenolrotfreies Medium (DMEM) unter Zusatz von lediglich 1% charcoal-stripped FCS und 0,1% Gentamycin zugegeben, um die Zellen in einen Hungerzustand zu versetzen.

Direkt vor der Stimulation wurden die wie beschrieben vorbereiteten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Folgenden mit dem gelösten Stimulanz (Östradiol, EGF, etc.) in DMEM-Medium (ohne Zusätze) für die angegebene Dauer inkubiert. Die Stimulation wurde auf Eis gestoppt und die Proteinextraktion wie beschrieben durchgeführt (siehe 2.2.10).

Bei Stimulationsexperimenten mit SERMs (Tamoxifen, ICI 182,780, Raloxifen) und MEK-Inhibitor bzw. Co-Inkubation von Östradiol mit diesen Substanzen wurden die Zellen mit den gelösten Stimulantien stets 30 min vorinkubiert und dann lysiert bzw. im Falle von Co-Inkubationen das Steroid im Gemisch mit einem SERM bzw. MEK-Inhibitor in neuem Zellkulturmedium für die angegebene Stimulationszeit zugegeben.

Für die Untersuchung der Beeinflussbarkeit des endogenen Östradiols durch den Aromataseinhibitor Formestan wurden die Zellen während der gesamten 3-tägigen Hungerphase in Medium mit 1% charcoal-stripped FCS unter Zugabe des Aromataseinhibitors inkubiert und im Anschluss daran lysiert.

### 2.2.10 Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen

Zur Extraktion des Gesamtproteins aus Zellen nach Stimulationsexperimenten wurde ein modifizierter RIPA Puffer verwendet (siehe 2.1.8). Das darin enthaltene Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) wurde zuvor nach einem speziellen Protokoll aktiviert, um eine maximale Inhibierung der Protein-Phosphotyrosyl-Phosphatasen zu erreichen. Dazu wurde eine 200 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  Lösung hergestellt und der pH-Wert mit 1N NaOH auf 10 eingestellt. Die gelbe Lösung wurde erhitzt bis sie farblos wurde und der pH nach Abkühlen auf Raumtemperatur wiederum auf 10 eingestellt. Diese Prozedur wurde

wiederholt bis die Lösung dauerhaft farblos blieb und der pH-Wert sich bei 10 stabilisierte. Die aktivierte  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ -Lösung wurde aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Stimulation der Zellen wurde auf Eis gestoppt und das Medium abgenommen. Es folgten drei Waschschrte mit eiskaltem PBS, dem zuvor 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  zugesetzt wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe eiskalten RIPA-Puffers, die daraufhin mit einem Zellschaber von den Zellkulturplatten abgekratzt und in vorgekühlte 1,5 ml Zentrifugationsgefäße überführt wurden. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate für 15 Minuten bei 14.000g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Nach Überführung der Überstände in neue, vorgekühlte Zentrifugationsgefäße wurde ein Aliquot davon für eine Bestimmung des Proteingehaltes verwendet wie in 2.2.11 und 2.2.12 beschrieben. Der Rest der Zelllysate wurde für 5 Minuten nach Zusatz von 6X Laemmli-Probenpuffers bei  $95^\circ\text{C}$  aufgeköcht, auf Eis abgekühlt und bis zur Durchführung der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.2.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinmenge einer Lösung wurde unter Verwendung eines Farbstoffkonzentrats der Firma BioRad (München) nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. In diesem Konzentrat ist der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue G 250“ enthalten, der mit Proteinen einen farbigen Komplex bildet. Durch die Komplexbildung wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (rot) nach 595 nm (blau) verschoben. Die Proteinlysate wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 1:3 bis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Je 10  $\mu\text{l}$  bzw. 20  $\mu\text{l}$  der Verdünnung wurden mit 790  $\mu\text{l}$  bzw. 780  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 595 nm in einem Lamda Bio UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer) gegen eine Nullprobe (nur  $\text{H}_2\text{O}$ ). Als Kalibrierstandard diente Rinderserum-Albumin (BSA) in Ausgangskonzentrationen von 0,5 mg/ml und 0,05 mg/ml.

### 2.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninsäure

Der detergenten-kompatible Micro-BCA™ Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt. Die Bicinchoninsäure (BCA) Rezeptur dient der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteins in verdünnten wässrigen Lösungen. Das Prinzip basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die vorhandenen Proteine Kupferionen von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduzieren. Die Bicinchoninsäure reagiert als wasserlösliches Natriumsalz sehr sensitiv und spezifisch mit den  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen zu einem wasserlöslichen, stabilen Komplex, der eine starke Absorption bei 562 nm aufweist. Das Arbeitsreagenz wird durch Mischung der Puffer MA, MB und MC im Verhältnis 25:24:1 hergestellt und zu gleichem Volumen mit den Proben gemischt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 60°C im Wasserbad wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Die  $\text{OD}_{562}$  Werte wurden mit einem Lambda Bio UV/VIS Spectrometer (Perkin Elmer) gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer BSA-Standard-Kalibrierkurve bestimmt.

### 2.2.13 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden mit dem Mini-Protean II System der Fa. Bio-Rad nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinextrakte mit 1/5 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C hitzedenaturiert. Zur Herstellung der Gele (7x8 cm) diente der zugehörige Gießstand. Die Trenn- und Sammelgele wurden wie in Tab. 2.5 aufgeführt hergestellt. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in die Mini-Protean II Elektrophoresekammer eingesetzt und der SDS-PAGE Laufpuffer eingefüllt. Die Kämme wurden vorsichtig entfernt und die Probentaschen mit Laufpuffer durchspült, um unpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Die vorbereiteten Proteinproben (max. 30µl) sowie der SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Proteinstandard (5µl) (Invitrogen) wurden in die Probentaschen pipettiert und der Gellauf bei 150 V unter Verwendung eines PowerPac 300 Power Supply (Bio-Rad) gestartet. Nachdem die Proteinlauffront das Sammelgel durchlaufen hatte, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die gesamte Laufzeit betrug ca. 1h bei Raumtemperatur unter Verwendung gekühlten Laufpuffers.

Tab. 2.5: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>4%</b>
<b>40% AA/BA</b>	3,750 ml	5,625 ml	<b>40% AA/BA</b>	500 µl
<b>Trenngelpuffer</b>	5,625 ml	5,625 ml	<b>Sammelgelpuffer</b>	625 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5,340 ml	3,468 ml	<b>H<sub>2</sub>O</b>	3,795 ml
<b>10% SDS</b>	150 µl	150 µl	<b>10% SDS</b>	50 µl
<b>10% APS</b>	120 µl	120 µl	<b>10% APS</b>	25 µl
<b>TEMED</b>	12 µl	12 µl	<b>TEMED</b>	5 µl

### 2.2.14 Western-Blot und Immunologische Detektion

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit der Trans-Blot<sup>®</sup> SD Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München) durch Elektro-Blotting (Towbin *et al.*, 1979) im Semi-Dry Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Hybond ECL, Amersham Biosciences). Dazu wurden pro Minigel 6 Blatt auf Gelgröße zugeschnittenes Filterpapier (Whatman / Schleicher & Schuell) sowie die Trenngele (Sammelgele werden abgeschnitten) und die Nitrocellulosemembranen in Transferpuffer 15 min vorinkubiert. Der Zusammenbau des Blotsandwiches in der horizontalen Blotapparatur erfolgte in dieser Reihenfolge: Anode, 3 Blatt Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Trenngel, 3 Blatt Filterpapier, Kathode. Durch Rollen einer Glaspipette über den Blotsandwich können überschüssiger Transferpuffer sowie vorhandene Luftblasen entfernt werden. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 15V für 30 min bei Raumtemperatur mit einem PowerPac 300 Power Supply (Bio-Rad). Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurden die Nitrocellulosemembranen im Anschluss mit Ponceau-S-Lösung (Sigma) 5min angefärbt, das Bandenmuster kontrolliert und mit 0,1N NaOH wieder entfärbt.

Um die unspezifischen Bindungsstellen auf den Nitrocellulosemembranen zu blockieren, d.h. unerwünschte Antikörper-Protein-Wechselwirkungen zu vermeiden, wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Block-Lösung (5% Magermilchpulver in 0,1% TBST) auf einem Kippschüttler inkubiert und im Anschluss daran 3-5 mal 5 min mit Waschpuffer 0,1% TBST bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membranen mit dem für das nachzuweisende Protein spezifischen Primäntikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung

in Blocklösung (je nach Antikörper 5% Magermilchpulver oder BSA in 0,1% TBST) für 1-2 h bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C über Nacht auf einem Kippschüttler. Nach 3-5 Waschschritten bei Raumtemperatur mit 0,1% TBST wurden die Membranen mit Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern in einer zuvor experimentell ermittelten Konzentration in Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Sekundärantikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit 0,1% TBST für 5 min auf einem Kippschüttler entfernt. Vor der Detektion wurde der überschüssige Waschpuffer von den Membranen durch Abtupfen mit Filterpapier entfernt und die Membranen mit der Proteinseite nach oben auf durchsichtiger Folie platziert. Die Proteindetektion fand mit dem ECL<sup>TM</sup>-Detektionssystem (ECL<sup>TM</sup>-Western Blotting Reagents, Amersham Biosciences) statt. Lösung 1 und 2 wurden zu gleich Anteilen gemischt, auf die Membranen aufgetragen und für exakt 1 min in der Detektionslösung inkubiert ohne die Membranen in dieser Zeit Bewegungen auszusetzen. Die Detektionslösung wurde nach Ablauf der Minute sofort entfernt und die Membranen mit Filterpapier trocken getupft. Für die Signalentwicklung auf Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurden die Membranen zwischen zwei Lagen Transparenzfilm positioniert und mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenfilmcassette gelegt. Nach Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membranen wurden diese je nach Signalstärke für unterschiedliche Zeitspannen in der geschlossenen Cassette exponiert und im Anschluss in Entwickler- und Fixierbad (Kodak Dental Readymatic) zur Entwicklung gebracht.

Nach der ersten Detektion ist es möglich eine zweite Detektion mit einer anderen Primär-Sekundärantikörperkombination auf denselben Nitrocellulosemembranen durchzuführen. Für den Fall der MAP-Kinase bedeutete dies, dass im ersten Durchgang die phosphorylierte Form und im zweiten Durchgang die Totalkinase detektiert wurde. Dieser als „Stripping“ bezeichnete Prozess beruht auf der Ablösung der Detektionskomplexe (Antikörper, Peroxidase) unter Zufuhr von Hitze in Anwesenheit von Detergenz. Die auf der Membran immobilisierten Proteine bleiben bei diesem Vorgang nahezu vollständig auf der Membran erhalten. Die Membranen wurden dazu direkt nach der ersten Entwicklung für 1 h bei 50°C bei permanenter Bewegung in Stripping-Puffer (enthält SDS und Mercaptoethanol) inkubiert. Nach 5 x 5-minütigem Waschen in 0,1% TBST wurde der beschriebene Prozess der Immunodetektion

beginnend mit dem Abblocken der Membranen unter Verwendung einer anderen Antikörperkombination erneut durchgeführt.

### **2.2.15 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)**

Die Vorbereitung der Deckgläschen erfolgte am Vortag durch Beschichtung mit Poly-L-Lysin, was die Adhäsion der Zellen optimiert. Auf jedem Deckgläschen wurden  $2 \times 10^5$  MCF-7 Zellen ausgesät, über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauf folgenden Morgen 2x mit PBS<sup>+</sup> gewaschen. Anschließend wurde jedes Deckglas mit 100 µl E<sub>2</sub>-BSA-FITC Lösung (5 min oder 1 h) oder den ER-Antikörpern MC-20 und H-184 (gelöst in PBS<sup>+</sup>) (1h) überschichtet und inkubiert. Nach der Inkubation wurde überschüssige Flüssigkeit durch zweimaliges Waschen mit PBS<sup>+</sup> entfernt. Im Falle der Antikörperbehandlung folgte zusätzlich die 45-minütige Inkubation mit dem FITC-markierten Anti-Kaninchen IgG-Zweitantikörper (100 µl), der im Anschluss durch zweimaliges Waschen mit PBS<sup>+</sup> entfernt wurde. Die Zellen wurden dann für 30 min mit 2 ml 1% PFA-Lösung fixiert. 5µl Vectashield wurden auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen mit der beschichteten Seite nach unten auf diesen Tropfen überführt. Die Deckgläser wurden zum Abschluss mit Nagellack abgedichtet. Zur Untersuchung fixierter Zellen mit den ER-Antikörpern unterscheidet sich das Protokoll insofern, dass die Zellen vor der AK Inkubation mit 2 ml 1% PFA-Lösung für 30 min fixiert wurden. Der weitere Ablauf erfolgte wie beschrieben. Zur Analyse der FITC-markierten Zellen wurde ein Leica CLSM (Confocal Laserscanning Microscope) TCS NT, Version 1.5.451 (Leica Lasertechnik, Heidelberg) verwendet, wobei die Fluoreszenz durch einen Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wurde. Es wurden optische Schnitte durch die Zellen in 0,5 µm-Intervallen aufgenommen.

### **2.2.16 Stabile Transfektion eines retroviralen Expressionsplasmids in Zelllinien**

Die S2-Arbeiten zur viralen Transfektion des ER $\alpha$ -S11IN Expressionsplasmids in die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden freundlicherweise von Frau Dr. B. Betz durchgeführt. Für die Virusproduktion wurden zunächst 293T-Zellen in mit 0,1%

Gelatine beschichtete 10cm-Zellkulturschalen ausgesät ( $4,5 \times 10^6$  Zellen). Am Folgetag wurden die Zellen nach erfolgtem Mediumwechsel mit dem Expressionsplasmid, Helferplasmid (pHIT 60) und Hüllenplasmid (VSV-G) mit Hilfe des FUGENE™-6-Transfektionsreagenzes (Roche) kotransfiziert. In 200  $\mu$ l Medium wurden hierzu 60  $\mu$ l des FUGENE-Reagenzes sowie 7  $\mu$ g des jeweiligen Plasmids gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48h wurde der Zellüberstand mit den produzierten Viren abgenommen und durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45  $\mu$ m) filtriert. Für die Virus-Transfektion wurden die beiden Zelllinien in 6-well-Platten ausgesät und entweder nur am Folgetag (1x) oder an den 3 Folgetagen (3x) mit je 1 ml Virus-Überstand transfiziert. Den Transfektionen folgte jeweils ein Mediumwechsel und die Zellen wurden dann für weitere 5-7 Tage mit Geneticin (G-418, Roche) behandelt zur Selektion der transfizierten Zellen. Durch das Expressionsplasmid S11IN wurde in transfizierte Zellen eine Neomycin-Resistenz eingeführt, die diese gegenüber untransfizierten Zellen bei Behandlung mit G418 überleben lässt, so dass schließlich zu 100% transfizierte Zellen vorliegen. Diese wurden bis zu den Stimulationsexperimenten in Kultur gehalten und vermehrt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 RNA-Isolierung aus Zelllinien

Die zur RNA-Isolierung eingesetzten Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), um Kontaminationen durch RNAsen zu vermeiden. DEPC wurde hierzu im Verhältnis 1:10 mit absolutem Ethanol gemischt und anschließend im Verhältnis 1:100 den Gebrauchslösungen zugesetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde das DEPC durch Autoklavierung zerstört.

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von TRIzol™ (Gibco, Karlsruhe). Diese Verfahren stellt eine Weiterentwicklung der Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) dar und basiert auf einer monophasischen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung, die während des Homogenisierens und der Lyse die Integrität der RNA schützt. Adhärenente Zellen wurden durch Trypsin/EDTA Behandlung abgelöst und zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde erneut abzentrifugiert und das Zellpellet

durch Zugabe von 1 ml TRIzol™ lysiert. Die lysierten Zellen können direkt zur RNA-Isolierung eingesetzt oder in dieser Form bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für mehrere Wochen gelagert werden. Um die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen zu ermöglichen, wurden die Proben für ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Chloroform wurden die Proben ca. 15 sec von Hand geschüttelt und für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 12000 rpm. Die wässrige RNA-haltige Oberphase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch Zentrifugation (10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 12000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% (v/v) Ethanol gewaschen und für 5 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 9500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde danach bei  $55^{\circ}\text{C}$  im Thermoblock getrocknet und je nach Ausbeute in 20-100  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser aufgenommen. Mit Hilfe dieser Methode wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die gewonnene RNA wurde nach der Quantifizierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert

### 2.3.2 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA

Die Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch nach Lambert-Beer bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Lambda Bio UV/Vis Spectrometer (Perkin-Elmer) oder einem NanoDrop™ ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Zusätzlich wurde zur Reinheitskontrolle der Absorptionsquotient der Wellenlängen 260 nm/280 nm bestimmt, der im Bereich zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ergibt sich die Konzentration der Nukleinsäuren aus folgender Formel:  $c = E \times 1/\epsilon \times 1/d$  ( $c$ : Konzentration in mg/ml;  $E$ : Extinktion bei 260 nm;  $d$ : Schichtdicke der Küvette = 1 cm). Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  beträgt bei 260 nm für RNA und einzelsträngige DNA 25  $\text{cm}^2/\text{mg}$ , für doppelsträngige DNA 20  $\text{cm}^2/\text{mg}$  und für Oligonukleotide 30  $\text{cm}^2/\text{mg}$ .

### 2.3.3 cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus Zelllinien wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Omniscript RT Kit, Qiagen). Der Einsatz unspezifischer Random-Primer (Hexanukleotide) ermöglicht es, statistisch gesehen, die gesamte RNA-

Population zu erfassen und ausgehend von einer einzigen cDNA-Synthese mehrere Transkripte im Anschluss gleichzeitig zu untersuchen.

Dazu wurden pro Ansatz 500 ng RNA auf ein Endvolumen von 12,5 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und nach 5-minütiger Denaturierung bei 65°C auf Eis abgekühlt. Zu der vorbereiteten RNA wurden je 7,25 µl des nach Herstellerangaben vorbereiteten Reaktionsansatzes pipettiert. Folgende Konzentrationen lagen im Endvolumen von 20µl pro Ansatz vor: 50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, 7,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1mg/ml BSA, 15mM DTT, je 1mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1 U/µl RNasin, 1000pmol Random-Primer und 9,5 U (0,5 µl) Reverse Transkriptase. Die Ansätze wurden für 60 min bei 37°C inkubiert mit anschließender Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 min bei 95°C. Die Proben wurden nach Abkühlung auf Eis bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymeraseketten-Reaktion diente zur gezielten Amplifikation spezifischer Gensequenzen. Für jedes zu untersuchende Gen wurden die jeweiligen Reaktionsbedingungen wie Annealing-Temperatur, Primer- und Nukleotidkonzentration, Zyklenzahl sowie Template-Menge (cDNA, DNA) entsprechend optimiert. Das Reaktionsvolumen für eine PCR betrug grundsätzlich 50 µl. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in 2.1.1 Tab. 2.3 aufgeführt. Ein PCR-Ansatz enthielt cDNA/DNA als Template, PCR-Reaktionspuffer, dNTPs (Nukleotide, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5'- und 3'-Primer sowie das Enzym Taq-Polymerase. Falls die PCR-Produkte im Anschluss mit Hilfe des A.L.F-Sequenziergerätes analysiert werden sollten, waren die 5'-Primer Cy5-markiert. Die Wahl der Taq-Polymerase hing von der Zielsetzung ab. Für den Großteil der PCR-Ansätze wurde die Taq DNA Polymerase (Amersham Biosciences) verwendet und die PCR Ansätze in einem Hybaid Omnigene PCR-Cycler ohne beheizbaren Deckel amplifiziert, was die Überschichtung der Proben mit 2 Tropfen Mineralöl erforderte. Zur Vermeidung unerwünschter Nebenreaktionen wurden die PCR Reaktionen mit einem „Hot-Start“ gestartet, d.h. die Polymerase wurde während einer Vorlaufphase von 10 Minuten bei 94 °C zugegeben. Nach Beendigung der PCR wurde die wässrige Phase vom Mineralöl durch die unterschiedliche Trägheit auf Parafilm M (American National Can) getrennt. PCR-Ansätze, die nach der

Amplifikation sequenziert werden sollten, mussten, um die Fehlerrate möglichst gering zu halten, mit der Expand High Fidelity Taq Polymerase (Roche) amplifiziert werden, die über eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität verfügt. Um Ölrückstände in diesen Proben von vornherein auszuschließen wurden diese Ansätze in Thermocyclern mit beheizbarem Deckel (Fa. Biometra) amplifiziert. Am Schluss jeder PCR Reaktion ein „final extension“-Schritt angehängt, um einen vollständigen Abschluss der Reaktionen zu ermöglichen.

### 2.3.4.1 Kontrolle der cDNA-Synthese mittels $\beta$ -Actin-PCR

Zur Qualitätskontrolle der synthetisierten cDNA auf Kontaminationen durch genomische DNA dient die  $\beta$ -Actin-PCR. Aufgrund der speziell gewählten Primer ergeben zusätzliche Intronsequenzen bei genomischer DNA ein größeres Fragment (652 bp) als cDNA (446 bp), so dass nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel Verunreinigungen deutlich detektierbar sind.

Tab. 2.6: Reaktionsansatz und -bedingungen zur Durchführung einer  $\beta$ -Actin PCR

PCR-Reaktionsansatz	Volumen [ $\mu$ l]	Reaktionsbedingungen	
H <sub>2</sub> O	30,5		
10x Puffer	5,0	94°C 10 min	
5'-Primer	2,5 (25 pmol)	94°C 1 min	
3'-Primer	2,5 (25 pmol)	60°C 1 min	35 Zyklen
dNTPs	4,0 (10 nmol)	72°C 1 min	
Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	72°C 8 min	

### 2.3.4.2 Amplifikation des ER $\alpha$ Gens aus dem Vektor pER $\alpha$

Zur Klonierung des ER $\alpha$  in den Expressionsvektor S11IN wurde das ER $\alpha$  Gen zunächst aus dem vorliegenden Vektor pER $\alpha$  (ER $\alpha$  in pcDNA3.1-) herausamplifiziert (siehe 3.8.1). Die zugehörigen Reaktionsbedingungen zeigt die Tab. 2.7.

Tab. 2.7: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des ER $\alpha$  Gens aus dem Vektor pER $\alpha$

PCR-Reaktionsansatz	Volumen [ $\mu$ l]	Reaktionsbedingungen	
H <sub>2</sub> O	29,9		
10x Puffer	4,5	94°C 10 min	
ER $\alpha$ -EcoRI-Fwd-Primer	5,0 (50 pmol)	94°C 1 min	
ER $\alpha$ -BamHI-Rev-Primer	5,0 (50 pmol)	64°C 1 min	32 Zyklen
dNTPs	4,0 (10 nmol)	72°C 2 min	
HighFidelity Taq-Polymerase	0,4 (2 U)	72°C 8 min	

### 2.3.4.3 Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression

Zur Bestimmung der mRNA Expression des Gens Cathepsin D in der Zelllinie MCF-7 wurde die quantitative RT-PCR verwendet. Das Prinzip liegt in einer simultanen Koamplifikation des zu untersuchenden Gens mit einem stabil exprimierten Referenzgen in einem PCR-Reaktionsansatz (Multiplex-PCR). Dieses Referenzgen (meist ein „housekeeping“-Gen) dient als interner Standard und erlaubt den direkten Vergleich der Genexpression unterschiedlich stimulierter Zellen. Als Referenzgen diente in den Versuchen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase). Die Bedingungen müssen so gewählt sein, dass die Menge des gebildeten PCR Produktes unabhängig von der eingesetzten Menge an Primer, Nukleotiden und Taq-Polymerase ist und die Reaktion im logarithmischen Bereich abläuft. Die fluoreszenz-markierten (Cy5) Primer ermöglichen die Quantifizierung der PCR-Produkte mit dem A.L.F.-Express (Automated Laser Fluorescence) DNA-Sequenzierautomaten (Funktionsweise siehe 2.3.5.2). Im Anschluss daran wurden die Signalpeaks mit der Fragment Manager Software (Pharmacia) ausgewertet. Die von den Signalpeaks eingeschlossene Fläche gilt als Maß für die Expressionsstärke. Das Verhältnis der Signalstärke des Zielgens zu der des Referenzgens ergibt die relative Expression.

Tab. 2.8: RT-PCR zur Quantifizierung der mRNA-Expression von Cathepsin D

PCR-Reaktionsansatz	Volumen [ $\mu$ l]	Reaktionsbedingungen	
H <sub>2</sub> O	15,9		
10x Puffer	5,0		
Cathepsin D 5'-Primer	5,0 (50 pmol)	94°C 10 min	
Cathepsin D 3'-Primer	5,0 (50 pmol)	94°C 1 min	
GAPDH CG 5'-Primer	5,0 (50 pmol)	56°C 1 min	25 Zyklen
GAPDH CG 3'-Primer	5,0 (50 pmol)	72°C 1 min	
dNTPs	4,0 (10 nmol)	72°C 8 min	
Taq-Polymerase	0,4 (2 U)		

Der 5'-Primer von GAPDH wurde sowohl Cy5-markiert als auch unmarkiert in einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt.

## 2.3.5 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten

### 2.3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen. Aufgrund der negativen Ladungen

des Phosphatrückrates haben Nukleinsäuren die Eigenschaft im elektrischen Feld in Richtung Anode zu wandern. Der Siebeffekt des Agarosenetzwerks hat zur Folge, dass kleine DNA-Fragmente im Gel bei Anlegen einer Spannung schneller wandern als große. Die Trennschärfe von Agarosegelen lässt sich durch Variation der Konzentration beeinflussen, so dass DNA-Fragmente verschiedenster Größen aufgetrennt werden können. Zur Auftrennung wurden 0,7%-2%ige (w/v in TBE-Puffer) Agarosegele verwendet. Es wurden Probenvolumen von 5-10 µl, die mit SB-Probenpuffer (7 M Harnstoff, 40% Glycerin, 50mM EDTA pH8, 10mM TRIS pH8, 0,1% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 vermischt wurden, aufgetragen. Die Fragmentgrößenbestimmung wurde durch Mitführung des SmartLadder-Größenstandards (Eurogentec) oder der 1kb-DNA-Ladder (Gibco BRL) ermöglicht. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde eine Spannung von 70 bis 120 V für 30 bis 200 min unter Verwendung eines PowerPac 300 Power Supply (Bio-Rad) angelegt. Die DNA-Fragmente wurden nach Inkubation der Gele für mindestens 30 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) unter UV-Licht ( $\lambda=312\text{nm}$ ) sichtbar gemacht. Das zwischen DNA-Basen interkalierende Ethidiumbromid wird unter UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt.

### 2.3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Quantifizierung von PCR-Produktmengen für die Expressionsanalyse von Cathepsin D wurden die DNA-Fragmente in Polyacrylamidgelen mit Hilfe von DNA-Sequenzierautomaten (A.L.F. und A.L.F.-Express, Amersham Pharmacia) detektiert. Die Auftrennung der mit Cy-5 markierten DNA-Fragmente erfolgt in 9%-igen Polyacrylamidgelen, die eine hohe Auflösung von Fragmenten bis zu 1000 bp und die Quantifizierung geringster Produktmengen ermöglichen. Die Fluoreszenz der markierten PCR-Produkte wird durch einen Laserstrahl (Helium-Neon-Laser, 632,8 nm, A.L.F.-Express) im unteren Drittel der vertikalen Gelapparatur angeregt und die Intensität der emittierten Strahlung von senkrecht zum Laserstrahl befindlichen Photodioden direkt während des Gellaufs detektiert. Die Daten werden durch die Steuerungssoftware direkt erfasst und können nach Beendigung mit einer speziellen Software (P2) ausgewertet werden.

Zur Herstellung der Gellösung wurden 25,2 g Harnstoff und 9 ml Acrylamidlösung (Sigma) in 25,5 ml Aqua dest. gelöst und mit 5 g Amberlite für 10 min gerührt. Für eine Fragmentanalyse wird eine 29:1 Acrylamidlösung (Acrylamid:Bisacrylamid) verwendet. Nach dem Filtrieren von 6 ml 6xTBE und der angesetzten Gellösung wurde der gesamte Ansatz entgast. Die Polymerisation des Acrylamids wurde mit 40 µl TEMED und 200 µl 10%-igem APS (Ammoniumperoxidisulfat) gestartet und die Lösung als dünner Film zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch 0,5 mm dünne Abstandhalter (Spacer) voneinander getrennt sind. Nach ca. 2 h war das Acrylamid vollständig zu einem Gel auspolymerisiert und die Gelkammer konnte in den Automaten eingesetzt werden.

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden die PCR-Produkte mit Aqua dest. verschieden stark (1:2 bis 1:50) verdünnt, was sich nach einer vorherigen Auftragung und Abschätzung der Produktmenge in einem Agarosegel richtete. 6,5 µl der PCR-Verdünnung wurden mit 6,5 µl mit A.L.F.-Probenauftragungspuffer versetzt, bei 95°C für 5min denaturiert und bis zur Auftragung auf Eis gelagert. Die Gelelektrophorese erfolgte je nach Fragmentgröße für 180 bis 360 min unter folgenden Bedingungen (Tab. 2.9).

**Tab. 2.9: Bedingungen für A.L.F.-Polyacrylamid-Elektrophoresen**

Parameter	Fragmentanalyse
Spannung	1500 Volt
Stromstärke	34 mA
Leistung	38 Watt
Temperatur	40 °C
Laufpuffer	0,6xTBE

### 2.3.6 Sequenzierung

Da die Amplifikation von Genabschnitten für die Sequenzierung eine möglichst geringe Polymerase-Fehlerrate erfordert, wurde die Expand High Fidelity Taq Polymerase (Roche) benutzt, welche über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Bei der PCR-Reaktion nicht verbrauchte Primer und dNTPs könnten zu Störsignalen führen und um diese zu vermeiden, mussten die PCR-Produkte vor der Sequenzierung aufgereinigt werden. Das wurde mit MicroSpin™-S400-Säulen (Amersham Biosciences)

bewerkstelligt. Diese Säulen sind mit TE-Puffer voräquilibriert und werden zunächst 1 min bei 3000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Darauf folgt die Beladung mit 50 µl PCR Produkt und eine erneute Zentrifugation für 3 min bei 3000 rpm. Das erhaltene Eluat kann direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden. Die Sequenzierreaktionen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

### **2.3.7 Klonierung**

#### **2.3.7.1 Restriktionsanalyse von DNA**

Restriktionen von DNA wurden nach den vorgegebenen Bedingungen und mit den mitgelieferten Puffern der Restriktionsenzym-Hersteller (Roche, New England Biolabs) durchgeführt. Zum Einsatz kamen 0,4 µg bis 5 µg DNA und 1 bis 5 Units Enzym in 20 µl Reaktionsansätzen. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden diese entweder gleichzeitig oder aufeinander folgend unter Verwendung des jeweils optimalen Puffers eingesetzt. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte für 2 h oder über Nacht bei 37°C im Heizblock.

#### **2.3.7.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die zugrunde liegende Methode ist die Auflösung des Agarosegels durch Natriumperchlorat und die Anbindung an eine Anionenaustauschersäule, von der die DNA im Anschluss eluiert wird.

Nach der Auftrennung wurden die gewünschten Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach der Gewichtsbestimmung der Agarosestücke wurden je 100 mg Agarose 300 µl Puffer QG zugesetzt und die Agarose durch 10-minütige Inkubation im 50°C-Heizblock aufgelöst. Nach Zugabe eines Volumens Isopropanol wurde das Gemisch auf die Aufreinigungssäule aufgetragen und diese für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die an die Siliconmembran der Säule gebundene DNA wurde mit PE-Puffer (Waschlösung) behandelt und wiederum 1 min bei 13000 rpm

abzentrifugiert. Mit TE-Puffer bzw. Aqua dest. wurde die DNA durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von der Säule eluiert.

### 2.3.7.3 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase der Firma Roche verwendet. Zur Anwendung kamen die mitgelieferten Reaktionspuffer in Gegenwart von 1 Unit der Ligase in einem Gesamtreaktionsansatz von 20  $\mu$ l. Die molare Menge des Insertionsfragmentes soll das 4-fache der Vektor DNA ausmachen, wobei aber auch weitere Vektor-Insert-Verhältnisse gewählt wurden. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4°C bzw. 15°C inkubiert und die Ligase im Anschluss für 10 min bei 75°C inaktiviert. Die DNA-Fragmente liegen nach der Behandlung mit Ligase als zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Vektor) vor, die zur Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet werden kann. Nach folgender Gleichung wurde die einzusetzende Menge an Insert-DNA berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{Insert} - \text{Vektor} - \text{Verhältnis} \times \left[ \frac{\text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}]}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}]} \right]$$

### 2.3.7.4 Herstellung elektrokompenter *E.coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37°C angezüchtet. Mit dieser Vorkultur wurden dann 500 ml LB-Medium angeimpft. Das Zellwachstum wurde photometrisch bei  $\lambda = 600$  nm verfolgt. Bei einer optischen Dichte von ca. OD<sub>600nm</sub>=0,6 wurden die Zellen geerntet, in Zentrifugenröhrchen 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 g für 15 min pelletiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit eiskaltem Wasser (500 ml und 250 ml) gewaschen und zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml 10%igem Glycerin und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1,5 ml 10%-igem Glycerin resuspendiert, á 40  $\mu$ l in Eppendorf-Cups auf Eis aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3.7.5 Transformation von *E.coli*-Zellen mittels Elektroporation

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der kompetente *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  durch Elektroporation transformiert. Dafür wurden die kompetenten *E.coli*-Zellen auf

Eis aufgetaut, mit 1-2  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, Elektrodenabstand 2mm) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser (BioRad, München) durch einen exponentiell abfallenden Spannungspuls bei 2,5 kV, 25  $\mu\text{F}$ , 200  $\Omega$  und  $\tau = 4,0$ . Nach dem Puls wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette herausgespült und in einem Eppendorf Cup für 1 h bei 37 °C, 180 rpm geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resultierenden Einzelkolonien wurden in je 4 ml LBamp-Medium angeimpft, über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert und im folgenden für die Plasmid-DNA-Isolierung geerntet.

### **2.3.7.6 Herstellung $\text{CaCl}_2$ -kompetenter *E.coli*-Zellen**

100 ml LB-Medium wurden mit 1ml einer frischen Vorkultur des *E.coli*-Stamms SURE versetzt und bei 37°C bis zu einer Extinktion von etwa 0,6 (gemessen bei 600 nm) geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt, abzentrifugiert (15 min bei 4°C) und das Zellpellet vorsichtig in 30 ml eiskalter 100 mM Magnesiumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren in der Kälte (3000 Upm) wurden die Zellen vorsichtig in 30 ml kalter 100 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert und 20 min im Eisbad gelagert. Schließlich wurde wiederum abzentrifugiert und das Zellpellet vorsichtig in 5 ml eiskalter 100 mM Calciumchlorid-Lösung (in 15% Glycerin) suspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots in sterile vorgekühlte Eppendorf-Cups pipettiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

### **2.3.7.7 Transformation von *E.coli*-Zellen mittels der $\text{CaCl}_2$ -Methode**

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der  $\text{CaCl}_2$ -kompetente *E.coli*-Stamm SURE mittels der  $\text{CaCl}_2$ -Methode transformiert. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten  $\text{CaCl}_2$ -kompetenten Zellen (je Ansatz 100 $\mu\text{l}$ ) auf Eisbadtemperatur gebracht und dann die Ligationsansätze (5-20  $\mu\text{l}$ ) hinzu gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation im Eisbad folgte eine zweiminütige Inkubation im Wasserbad bei 42°C. Nach einer weiteren Inkubation für 5 min auf Eis wurde je Ansatz 1ml SOC-Medium zugegeben und das Gemisch für 90 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert zur Expression der

Antibiotikaresistenzen. Nach Beendigung der Expressionsphase wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, nach Suspension in 100 µl LB-Medium auf Agar-Platten mit Selektionsmedium (LB-Ampicillin (100µg/ml)) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die resultierenden Einzelkolonien wurden in je 4 ml LB-Amp-Medium angeimpft, über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert und im folgenden für die Plasmid-DNA-Isolierung geerntet.

#### **2.3.7.8 Plasmid-Präparation aus *E.coli*-Zellen**

Die Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus 2 ml Übernachtskulturen erfolgte mit dem GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers.

Die Isolation aus größeren Bakterienkulturen, d.h. Midi- bzw. Maxi-Präparationen von Plasmid DNA, erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) (Ausbeute bis 100µg Plasmid) bzw. dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) (Ausbeute bis 500µg Plasmid).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Östrogenabhängiges Wachstum der Brustkrebszellen

#### 3.1.1 Etablierung der Zellkulturbedingungen

Für den Nachweis nichtgenomischer Effekte in Brustkrebszelllinien, im Speziellen für den Nachweis der Aktivierung bzw. des Aktivierungsstatus der Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Erk1/2 sind zahlreiche Anforderungen zu erfüllen. Diese betreffen die durchgehende Kultivierung der verwendeten Zellen unter optimierten Bedingungen sowie eine optimale Kultivierung der Zellen in der direkten Vorbereitung auf die Stimulationsexperimente nach Aussaat auf 10cm-Zellkulturplatten. Die angesprochenen Bedingungen umfassen Parameter wie die Zusammensetzung des Zellkulturmediums, Zelldichte sowie Zelladhärenz und -konfluenz nach bestimmten Wachstumszeiten.

Für die Durchführung der Stimulationsexperimente in 10cm-Zellkulturplatten wurden die Zellen vorbereitend in Zellkulturflaschen kultiviert. Um möglichst schnell die erforderlichen Zellmengen zu erhalten, wurden  $10-1,5 \times 10^6$  MCF-7 Zellen in 550 ml Zellkulturflaschen in phenolrothaltigem Medium ausgesät. Ein konfluenten Zellrasen wurde nach 5-8 Tagen erreicht. Phenolrotfreies Medium eignete sich nicht zur Anzucht, da die Konfluenz erst nach mehr als 10 Tagen oder gar nicht erreicht wurde.

#### 3.1.2 Etablierung des MTS-Proliferationsassays

Eine Grundvoraussetzung für erfolgreiche MAPK-Erk1/2-Stimulationsexperimente ist ein östrogenabhängiges Wachstum der verwendeten Brustkrebszellen (Migliaccio *et al.*, 1996). Die Bedingungen für ein solches Wachstum schafft man durch die Verwendung eines phenolrotfreien Mediums unter Zusatz eines Aktivkohle-behandelten fötalen Kälberserums (Charcoal-Stripped FCS, im Folgenden CSFCS). Die Kultivierung der Zellen muss bereits mehrere Tage vor den Experimenten unter diesen östrogenverarmten Bedingungen stattfinden.

Zunächst wurde versucht in einem relativ zeitsparenden Verfahren eine östrogenabhängige Proliferationserhöhung der Zellen festzustellen. Nach Aussaat definierter Zellmengen auf 6-Well Testplatten wurde das Wachstum über die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden den Zellen am Tag nach der Aussaat verschiedene Dosen Östradiol zugesetzt und die Zellzahl pro Well an den Folgetagen bestimmt. Aufgrund der geringen Zellzahlen in den Testlöchern war eine zuverlässige Messung einer Proliferationssteigerung jedoch nicht möglich. Die Schwankungen der Zellzahlbestimmungen fielen untolerierbar hoch aus, so dass keine Systematik bezüglich des Proliferationsverhaltens in Abhängigkeit von Östrogen erkennbar wurde.

Um zuverlässige Daten zum östrogenabhängigen Wachstum der Brustkrebszellen zu erlangen, wurde als experimenteller Ansatz der MTS-Proliferationsassay gewählt. Zur Etablierung dieses Tests, der auf 96-Loch-Testplatten durchgeführt wurde, war ebenfalls eine sorgsame Etablierung der Parameter Zelldichte pro Testloch, Art des verwendeten Serums im Zellkulturmedium sowie der Kultivierungsdauer bis zur Endpunktmessung mit dem MTS-Reagenz notwendig. Anhaltspunkte zur Größenordnung dieser Parameter wurden aus einer Veröffentlichung zur Untersuchung der Regulation des an der Membran lokalisierten Anteils des Östrogenrezeptors in einer Rattenhypophysentumorzelle gewonnen, in der in einem 96-well Immunoassay die genannten Parameter systematisch untersucht wurden (Campbell *et al.*, 2002).

Nach Austestung der genannten Parameter ergaben sich Optimalbedingungen (siehe Tab. 3.1), die eine östrogenabhängige Zellproliferation am besten detektierbar machten. Es stellte sich eine der Stimulanzienzugabe vorausgehende 4-tägige Hungerphase in phenolrotfreiem DMEM-Kulturmedium (versetzt mit 10% CSFCS und Antibiotikum) als am geeignetsten heraus. Geringere CSFCS Konzentrationen führten zu herabgesetzter Zelladhärenz und Ablösung der Zellen. Alternative Kulturmedien wie Minimum Essential Medium (MEM) (Phenolrotfrei) und DMEM/MEM Medien mit Phenolrotzusatz waren ebenfalls ungeeignet. Der Verzicht auf Phenolrot in den Assays ist aufgrund der östrogenen Wirkung unablässlich. Eine Zelldichte von 500 Zellen/Well stellte sich als optimal heraus, da bis zur Messung der optischen Dichte, die Wells noch nicht überwachsen waren und die optische Dichte im linearen Bereich lag.

Tab. 3.1: Optimierte Bedingungen für den MTS-Proliferationsassay in MCF-7 Zellen

Parameter	Optimum
Medium	Phenolrotfreies Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)
Serum	CSFCS (10%)
Zelldichte	500 Zellen/Well
Zeitlicher Ablauf (Stimulationsrhythmus)	Tag 0: Aussaat der Zellen Tag 4: Mediumwechsel + Zusätze Tag 6: 48h Werte (MTS) Tag 8: 96h Werte (MTS)

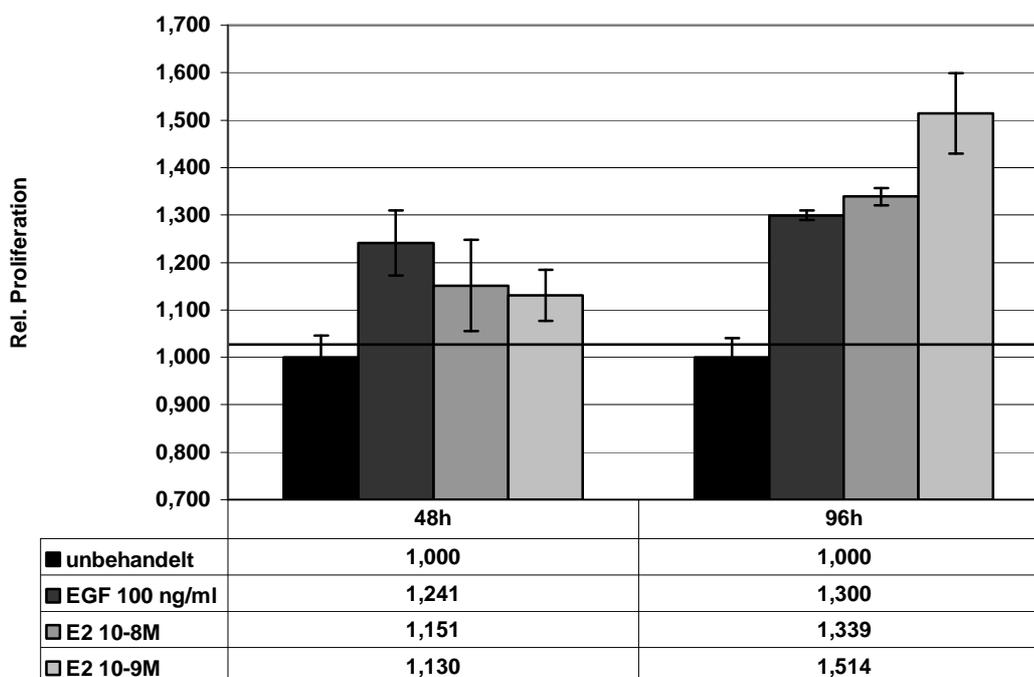
Eine Erhöhung der Proliferations- (Zellteilungs-) rate durch die Zugabe eines Stimulanzes wie Östrogen lässt sich in der Auswertung eines MTS-Assays durch den rechnerischen Vergleich von unbehandelten Zellen und Zellen, denen ein Stimulanz zugesetzt wurde, feststellen. Ist der Quotient der Absorptionen (nach Abzug der Hintergrundabsorption von Zellkulturmedium) aus behandelten und unbehandelten Zellen größer als 1, handelt es sich um eine erhöhte Zellteilungsrate. Ein Quotient der kleiner als 1 ausfällt, weist auf eine herabgesetzte Proliferation hin.

### 3.1.3 Nachweis der östrogenabhängigen Proliferation von MCF-7 Zellen

Zum experimentellen Nachweis einer gesteigerten Zellteilungsrate von MCF-7 Zellen unter Östrogeneinfluss im MTS-Assay wurde als Positivkontrolle stets Epidermal Growth Factor (EGF) mitgeführt. EGF führt nach Bindung an seinen membranären Rezeptor zur Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade an deren Ende eine erhöhte MAPK-vermittelte Zellproliferation steht. EGF wurde in Konzentrationen von 10-100 ng/ml in den Assay eingesetzt während Östrogen in seiner aktiven Form Östradiol in einer Konzentration von  $10^{-8}$ M bis  $10^{-10}$ M verwandt wurde.

Erwartungsgemäß führte in fast allen durchgeführten Assays sowohl die 48- als auch 96-stündige Inkubation mit EGF als Positivkontrolle zu einer erhöhten Zellteilungsrate der MCF-7 Zellen. Die deutlichsten proliferationssteigernden Effekte mit Östradiol wurden mit einer Konzentration von  $10^{-9}$ M ermittelt. Die 96-stündige führte gegenüber der 48-stündigen Östradiol-Inkubation in einer Vielzahl der Ansätze zu einer höheren Proliferation. Die  $E_2$ -Konzentration  $10^{-8}$ M führte nach beiden Zeitintervallen (48 und 96 h) zu geringeren Proliferationssteigerungen als  $10^{-9}$ M während  $10^{-10}$ M keine merkliche

Steigerung der Proliferation verursachte. Abb. 3.1 zeigt exemplarisch einen MTS-Assay mit gesteigerter Proliferation durch EGF und Östradiol, wobei nach 96 h  $E_2$  ( $10^{-9}M$ ) in diesem Fall mit einer 51%igen Steigerung gegenüber unbehandelten Zellen EGF in seiner Wirkung sogar übertraf.



**Abb. 3.1: Relative Proliferation von MCF-7 Zellen nach 48 bzw. 96 stündiger Inkubation mit Östradiol ( $E_2$ ) und EGF im MTS-Proliferationsassay (500 Zellen/Well ausgesät). Angabe der relativen Proliferation normiert auf unbehandelte Zellen.**

Ein proliferationssteigernder Effekt durch Östradiol konnte nicht in allen durchgeführten Assays gezeigt werden. Auch bei der Testung aufeinander folgender Passagen einer Zellpopulation bewirkte die Inkubation mit Östradiol sowohl eine Förderung der Proliferation als auch ein unverändertes Wachstum. Des Weiteren konnte keine positive oder negative Tendenz der östrogenabhängigen Proliferation in Abhängigkeit von der Passagenanzahl gezeigt werden. Die Inkubation von 500 Zellen/Well mit  $E_2$  ( $10^{-9}M$ ) für 96h führte in 14 von 18 Assays zu einer erhöhten Proliferation gegenüber unbehandelten Zellen; 12 Assays davon zeigten eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ). Die Signifikanz wurde mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests bezogen auf nicht stimulierte Zellen ermittelt. Die Werte wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (Ver.12) berechnet.

Das nachgewiesene östrogenabhängige Wachstum der verwendeten MCF-7 Zellen stellte den Grundstein für die im Folgenden beschriebenen Stimulationsexperimente zur Untersuchung der nichtgenomischen Wirkungen, d.h. der Aktivierung der MAPK Erk1/2, dar.

## **3.2 Nachweis der Aktivierung der MAPK Erk1/2 durch Östradiol**

### **3.2.1 Etablierung der Stimulationsmethodik**

Die verwendete Strategie zum Nachweis der MAPK-Aktivierung setzt sich aus einer Reihe von Einzelmethoden zusammen, die sehr gut aufeinander abgestimmt sein müssen.

1. Die stimulationsvorbereitende Zellkultivierung musste stets unter östrogenarmen Bedingungen bis zur Stimulation erfolgen in phenolrotfreiem Kulturmedium mit aktivkohlebehandeltem Serum unter Verwendung einer Zelldichte  $\leq 1,5 \times 10^6 / 10\text{cm}$  Platte, die ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der Zellen hat (Campbell *et al.*, 2002). Zudem müssen die Zellen mit einer geringen Serumkonzentration (1%) in den Tagen direkt vor der Stimulation kultiviert werden, um sie in einen östrogenfreien Zustand zu versetzen, ohne jedoch deren Vitalität zu beeinträchtigen (siehe auch 3.2.2).

2. Während der (Vor-)Inkubation mit den verwendeten Stimulanzien und der damit verbundenen Waschschrte und Mediumwechsel war darauf zu achten die Zellen möglichst wenig mechanischem Stress auszusetzen, um den Stimulationsprozess nicht negativ zu beeinflussen. Zudem war es von Vorteil Kulturmedium und PBS ebenfalls (wie die Zellen bis zur Lyse) auf 37°C erwärmt zu halten, um den Stimulationseffekt nicht durch zusätzlichen externen Temperaturstress zu beeinflussen.

3. Als klarer Vorteil erwies sich, den zur Lyse verwendeten Ripa-Puffer mit 5% Glycerin zu versetzen. Dies führte beim Abkratzen der Zellen von den 10cm-Platten zur Bildung eines viskosen Filmes, was die Ausbeute erhöhte und die Überführung des Lysats in die Zentrifugationsgefäße wesentlich vereinfachte. Der Ripa-Puffer zur Zelllyse wurde in den Stimulationsversuchen mit den Detergentien Triton X-100 und Nonidet P-40, später nur noch mit Triton X-100 verwendet. Da sich diese Detergentien

in der Proteinbestimmung nach Bradford (Bio-Rad Reagenz) störend auswirken (Triton X-100 ab 0,05%, Nonidet P-40 ab 0,25%) wurde der Micro-BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL) verwendet, der bei Triton X-100- und Nonidet P-40-Konzentrationen von bis zu 5% anwendbar ist.

4. Zur Detektion der phosphorylierten Form der MAPK Erk1/2 per Western Blot wurde anfänglich der Antikörper Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) (Cell signaling) in Kombination mit dem Zweitantikörper Peroxidase AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L) (1:35.000-1:70.000) (Jackson ImmunoResearch, Dianova) verwendet. Ab einem gewissen Zeitpunkt verschlechterte sich die Signalqualität der Detektion und eine starke unspezifische Hintergrundfärbung trat auf. Der Einsatz einer neuen Charge des genannten Zweitantikörpers änderte nichts an der schlechteren Qualität. Möglicherweise hatte der Hersteller des Erstantikörpers die Produktion des Antikörpers geändert, so dass die Kombination mit dem verwendeten Zweitantikörper nicht mehr optimal war. Zur Detektion wurde dann als Zweitantikörper der Goat anti-mouse IgG (HRP-gekoppelt) (1:2500) (Santa Cruz Biotech.) eingesetzt, der keine unspezifischen Reaktionen zeigte.

### **3.2.2 Problematik der Basis-Stimulation der MAPK Erk1/2**

Eines der anfänglich wesentlichen Probleme bei der Darstellung der Aktivierung der MAPK Erk1/2 mit der Western Blot Technik war die Signalintensität bei unbehandelten Zellen. Unbehandelte Zellen wiesen eine relativ deutliche Basisstimulation auf, deren Signalstärke in Zellen, die mit Stimulantien wie Östradiol behandelt wurden, kaum zu unterscheiden war bzw. übertroffen werden konnte. Mögliche Ursachen für eine Basisstimulation der MAPK in unstimulierten Zellen sind 1. Restmengen im Kulturmedium (3.2.2.1) oder 2. die Produktion von endogenem Östradiol durch die Zellen selbst (3.2.2.2).

#### **3.2.2.1 FCS im Kulturmedium – Bestimmung des Östradiolgehaltes**

Einerseits bestand die Möglichkeit, dass die selbst durchgeführte hitzeinaktivierende Aktivkohlebehandlung (charcoal-stripping) von FCS (siehe 2.2.8) nicht ausreichend effizient war. Daraus würde resultieren, dass dem Serum nicht entzogenes Östradiol auf diesem Wege dem phenolrotfreien DMEM-Medium und somit den ausgesäten Zellen zugeführt wurde. Um dieser Vermutung auf den Grund zu gehen, wurde der

Östradiolgehalt in dem verwendeten charcoal-stripped FCS (CSFCS) mit Hilfe eines Enzymimmunoassays quantitativ bestimmt (Abb. 3.2). Da dieser kommerziell erhältliche Immunoassay (Immulite, DPC Biermann) eigentlich für eine E<sub>2</sub>-Bestimmung in reinem Serum ausgelegt ist, Zellen aber in Medium mit einem geringen Serumanteil von 10% kultiviert werden, wurde das selbst hergestellte CSFCS sowohl pur (100%) als auch verdünnt mit Medium (50%, 25%, 0%) in den Immulite-Assay eingesetzt. Der Messbereich liegt zwischen 20 und 2000 pg/ml Östrogen, was einer Konzentration von  $7,3 \times 10^{-11}$ - $7,3 \times 10^{-9}$  M entspricht.

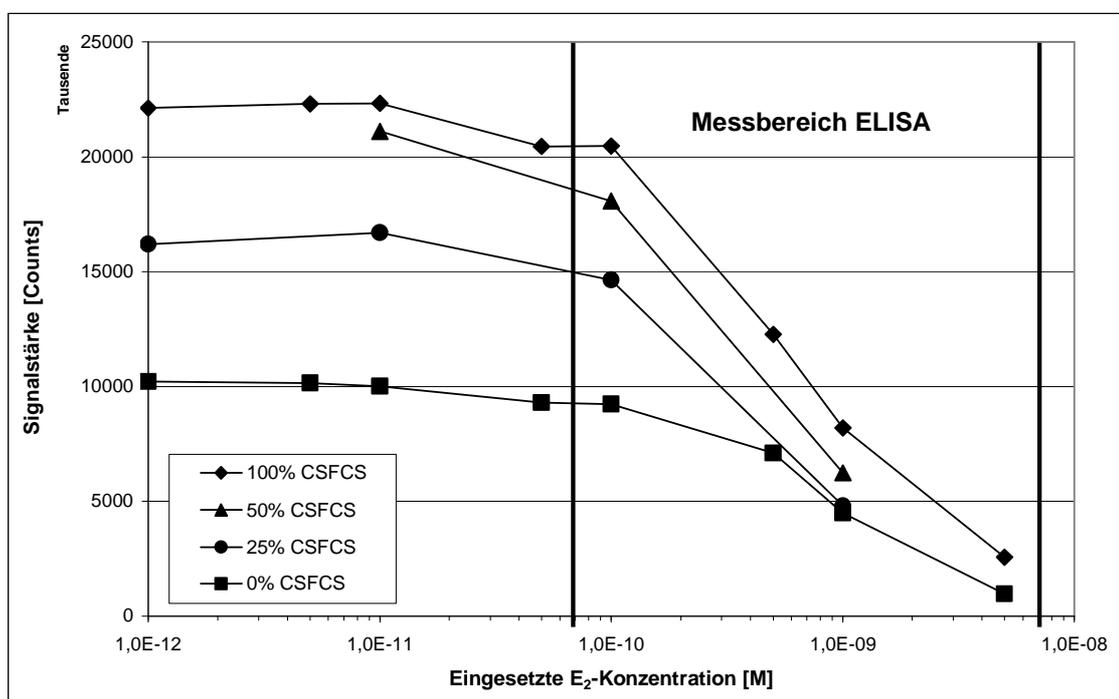


Abb. 3.2: Abhängigkeit der E<sub>2</sub>-Gehaltsbestimmung vom FCS-Anteil (selbst aktivkohlebehandeltes (charcoal-stripped) fötales Kälberserum) (Östradiol-ELISA).

Bei Durchführung des Assays im Immulite Analyzer (näheres siehe 2.2.7) wird nach Substratzugabe die Farbentwicklung des Konjugates gemessen (in Counts, siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.2), was der Grund dafür ist, dass die Intensität der gebildeten Farbe umgekehrt proportional zur Östradiol-Konzentration in der Probe ist. Die Gegenüberstellung der theoretisch eingesetzten E<sub>2</sub>-Verdünnungen und der ermittelten Konzentrationen/ Signalstärken (in Counts) ist in Tab. 3.2 dargestellt. Die in Counts gemessene Farbentwicklung wurde vom Immulite Analyzer direkt in eine E<sub>2</sub>-Konzentration in pg/ml umgerechnet.

Es zeigte sich eine klare Abhängigkeit des Assays von der Serumkonzentration (Abb. 3.2). Die Messung von E<sub>2</sub> in reinem CSFCS kam den theoretisch eingesetzten Konzentrationen der Verdünnungsreihe am nächsten. Eine zuverlässige Messung war nur in reinem CSFCS (100%) möglich, während Verdünnungen auf 50%, 25% bzw. die Abwesenheit von CSFCS Verschiebungen zu höheren Konzentrationen in pg/ml bewirkten, die sich in einem geringeren Signal (weniger Counts) äußerten. Außerdem ist klar zu erkennen, dass bei unterschreiten des Messbereiches ( $<7,3 \times 10^{-11} \text{M}$ ) des ELISA die Graphen keinen linearen Zusammenhang mehr erkennen lassen und in ein Plateau übergehen (Abb. 3.2).

**Tab. 3.2:** Messdaten der Bestimmung des Östradiolgehaltes mittels ELISA in unverdünntem Charcoal-Stripped-FCS (CSFCS) (100%)

Theoretisch		Gemessen	
E <sub>2</sub> -Konz.[M]in CSFCS	pg/ml	pg/ml	Counts
0	0,00	31,80	21436800
1x10 <sup>-12</sup>	0,27	26,50	22127930
5x10 <sup>-12</sup>	1,36	25,20	22309650
1x10 <sup>-11</sup>	2,72	25,10	22327030
5x10 <sup>-11</sup>	13,62	40,00	20460000
1x10 <sup>-10</sup>	27,24	40,00	20461210
5x10 <sup>-10</sup>	136,20	165,00	12261480
1x10 <sup>-9</sup>	272,40	334,00	8197750
5x10 <sup>-9</sup>	1362,00	1878,00	2570370
FCS (PAA, unbehandelt)		55,50	18849600
DMEM (phenolrot)		218,00	10560550
CSFCS (Biowest)		<20 pg/ml	23000000

Bei den drei verdünntesten Proben (10<sup>-12</sup>-10<sup>-11</sup>M) lagen die E<sub>2</sub>-Konzentrationen innerhalb des Nachweisbereiches (>20pg/ml), obwohl diese theoretisch hätten darunter liegen sollen (Tab. 3.2). Behandeltes CSFCS ohne Zusatz von E<sub>2</sub> enthielt ebenfalls noch knapp 32pg/ml, was darauf hindeutet, dass die selbst durchgeführte Aktivkohlebehandlung von FCS nicht ausreichend effektiv gewesen sein kann. Das kommerziell erhältliche charcoal-stripped FCS (Biowest) zeigte von allen eingesetzten Lösungen das höchste Signal (23x10<sup>6</sup> Counts), was dem niedrigsten E<sub>2</sub>-Gehalt im Test unterhalb der Assay-Nachweisgrenze entspricht (<20pg/ml). Laut Herstellerangaben liegt der E<sub>2</sub>-Gehalt in diesem Serum <2pg/ml. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Einsatz des selbst aktivkohlebehandelten Serums die Basisstimulation der MAPK zumindest unterstützt wenn nicht sogar verursacht haben kann. Die gemessenen

Konzentrationen in reinem CSFCS lagen bei ca.  $10^{-10}$ M, was bei einem Zellkultureinsatz von 1% CSFCS in Medium immer noch einen permanenten  $E_2$ -Stimulus von ca.  $10^{-12}$ M für die Zellen bedeuten würde. Mit dieser Erkenntnis wurde für die Aussaat der Zellen und die Hungerphase das kommerziell erhältliche Charcoal-stripped FCS (Biowest, Ursprung Süd-Amerika) verwendet.

### 3.2.2.2 Einsatz des Aromataseinhibitors Formestan

Um die Beteiligung endogen gebildeten Östradiols bei der vorhandenen Basisstimulation der MAPK Erk1/2 nach der 3-tägigen Hungerphase der Zellen näher zu untersuchen, wurde der Aromatasehemmer Formestan eingesetzt. Aromatasehemmer inhibieren die Östrogenproduktion, indem sie die Umwandlung von Androstendion zu Östron unterdrücken. Typ I Wirkstoffe wie das Androstendion-Derivat Formestan (4-Hydroxyandrostendion) binden irreversibel an die Substratbindungsstelle des Enzyms und hemmen die Aromatase kompetitiv, ohne dabei selbst aromatisiert, d.h. in Östrogen umgewandelt werden zu können. Einsatz finden Aromataseinhibitoren seit vielen Jahren für die Behandlung von Metastasen nach Versagen einer antihormonellen Behandlung mit Tamoxifen.

MCF-7 Zellen wurden wie bei den Stimulationsexperimenten üblich auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät und nach dem Wechsel des Mediums von 10% auf 1% CSFCS-Anteil für die 3 Folgetage zusätzlich mit verschiedenen Formestan-Konzentrationen inkubiert. Es zeigte sich, dass diese 3-tägige Inkubation der Zellen einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf das Ausmaß der Erk1/2 Aktivierung hatte (Abb. 3.3). Eine steigende Formestan-Konzentration führte zu einer Abnahme der relativen MAPK-Aktivierung. Konzentrationen unterhalb von  $10^{-6}$ M ergaben eine relative MAPK-Aktivierung, die leicht (10-20 %) oberhalb der von unbehandelten Zellen lag. Bei einer eingesetzten Konzentration von  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  M sank die MAPK-Aktivierung auf 70 bzw. 40% des Levels von unbehandelten Zellen. Diese Befunde sprechen dafür, dass von den Zellen endogen gebildetes Östrogen in einem Zeitraum mehrerer Tage für die Basisstimulation der MAPK Erk1/2 verantwortlich sein kann.

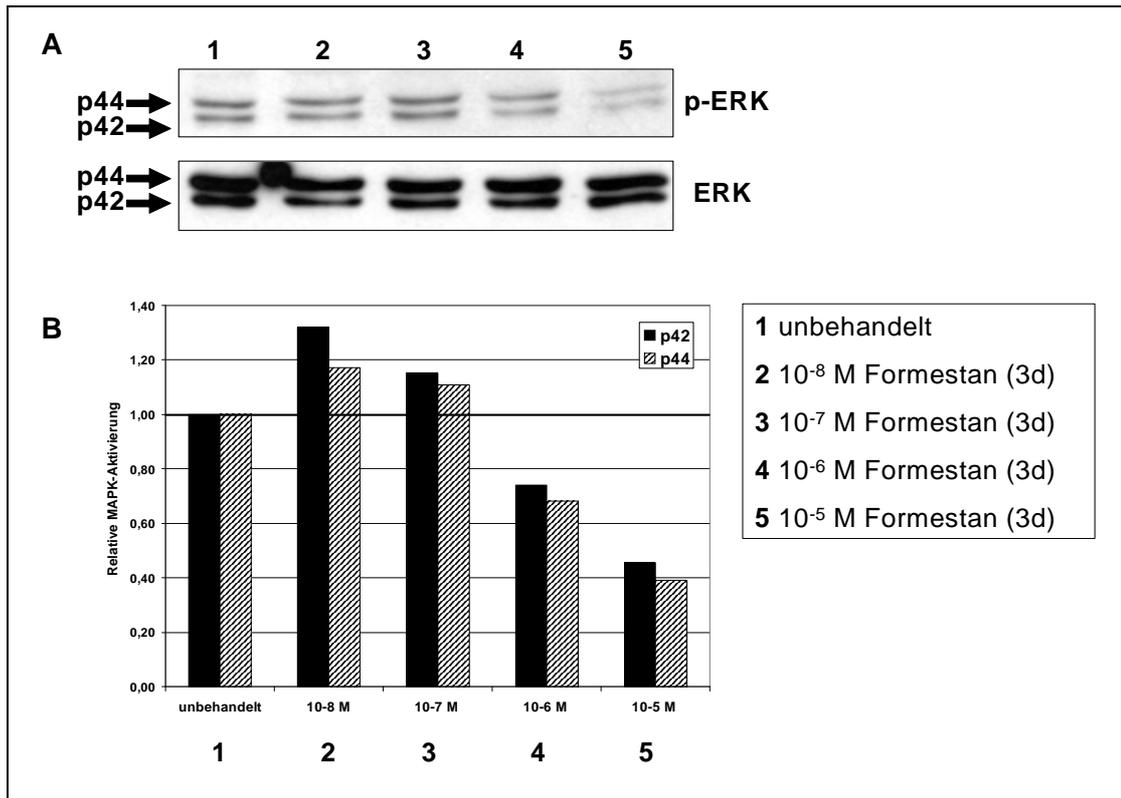


Abb. 3.3: Status der MAPK Erk1/2 in MCF-7 Zellen nach 3-tägiger Behandlung mit dem Aromatase-Inhibitor Formestan im Vergleich zu unbehandelten Zellen. (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.

### 3.3 Aktivierung der MAPK Erk1/2 mit EGF und Östradiol

Nach Optimierung der beschriebenen Parameter war der Nachweis einer östrogenabhängigen Aktivierung der MAPK Erk1/2 möglich. Bei den in den folgenden Kapiteln beschriebenen Stimulationsversuchen wurde der Nachweis des Phosphorylierungsstatus mit Hilfe der Western-Blot Technik durchgeführt. Als Referenz zur Ermittlung einer relativen Veränderung des MAPK Status dienten stets unbehandelte Zellen. Die Peakflächen der im Western-Blot ermittelten Banden wurden densitometrisch mit der Software UN-SCAN-IT Gel<sup>TM</sup> (Version 5.1, Silk Scientific Corp.) ermittelt und von allen Inkubationen der Quotient der Peakflächen aus phospho-MAPK (p-Erk) und total-MAPK (Erk) gebildet. Normiert wurden alle Quotienten auf unbehandelte Zellen des jeweiligen Versuches, deren relative Aktivierung gleich 1 gesetzt wurde.

Als Positivkontrolle wurde in allen Stimulationsexperimenten Epidermal Growth Factor (EGF) mitgeführt. Dieser Wachstumsfaktor führt nach Bindung an seinen zugehörigen Membranrezeptor (EGFR) durch Phosphorylierungsreaktionen zur raschen Signalweiterleitung über das G-Protein Ras und die Kinasen, Raf und MEK zur Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 (MAP-Kinase-Kaskade).

Die Stimulationen mit EGF als Positivkontrolle zeigten im Western-Blot eine Besonderheit. Die Detektion der phosphorylierten Form der MAPK war unproblematisch, jedoch führte die Anwendung des Total-Kinase Antikörpers zu einer sehr eingeschränkten Detektion der Isoform p42 der MAPK während die Isoform p44 uneingeschränkt auswertbar war. Die Bande der p42 war in diesem Fall nur sehr schwach bzw. gar nicht mehr erkennbar. Da zur Bestimmung der relativen MAPK-Aktivierung gegenüber unbehandelten Zellen, aber immer phospho- und Total-Kinase aufeinander bezogen werden, wurde in den gezeigten Abbildungen für die Stimulation mit EGF nur die Aktivierung der MAPK Isoform p44 angegeben. EGF zeigte bezogen auf die Isoform p44 eine 6-15 fache Erhöhung des Phosphorylierungsstatus der MAPK gegenüber unbehandelten Zellen (bei Konzentrationen von 20-100 ng/ml).

Östradiolstimulationen wurden in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-12}$ - $10^{-9}$ M durchgeführt und erbrachten deutliche Erhöhungen des Phosphorylierungsstatus gegenüber unbehandelten Zellen. Das Ausmaß der MAPK-Aktivierung unterschied sich in den verschiedenen Stimulationsexperimenten und es konnten Aktivierungen von Faktor 3-10 gegenüber unbehandelten Zellen gemessen werden. Die Aktivierung der MAPK durch  $E_2$  und EGF ist den Abbildungen der verschiedenen Stimulationsexperimente in den folgenden Kapiteln zu entnehmen. Die Unterschiede im MAPK-Aktivierungsniveau bei EGF- und  $E_2$ -Stimulationen sind möglicherweise auf einen unterschiedlichen Zustand der Zellen zum Zeitpunkt des jeweiligen Versuches zurückzuführen. Andererseits kann ein unterschiedliches MAPK-Aktivierungsniveau unbehandelter Zellen, auf die alle anderen Stimulationsansätze in jedem Versuch normiert wurden, die Schwankungen der  $E_2$  und EGF-Aktivierung zwischen den einzelnen Versuchen verursacht haben

### 3.3.1 Zeitabhängigkeit der östrogenabhängigen MAPK-Aktivierung

Nichtgenomische Effekte wie die Aktivierung der MAP-Kinase Erk1/2 treten bereits sehr schnell im Rahmen von Sekunden bis Minuten nach Zugabe eines Stimulus auf, da sie sich über membranvermittelte Kaskaden entfalten. Klassische ‚genomische‘ Wirkungen hingegen treten erst ab etwa 1h in Erscheinung, da sie auf der Transkription spezifischer Zielgene und der Biosynthese der kodierten Proteine beruhen. Um den zeitlichen Verlauf des Phosphorylierungsstatus der MAPK nach Östradiolzugabe zu dokumentieren, wurden MCF-7 Zellen für unterschiedliche Zeiträume mit Östradiol in einer Konzentration von  $10^{-10}$ M inkubiert und der Phosphorylierungsstatus der MAPK Erk1/2 der Zellen verglichen (Abb. 3.4). Es stellte sich eine Zeitabhängigkeit der Aktivierung heraus. Die optimale Aktivierung der MAPK war bereits nach 5 Minuten Inkubationszeit erreicht. Zellen, die längere Zeit (15 und 30 min) dem Östradiolstimulus ausgesetzt waren, zeigten eine deutlich verminderte Aktivierung, die im Falle des 30 Minuten Wertes nur noch unwesentlich über dem Level unbehandelter Zellen lag.

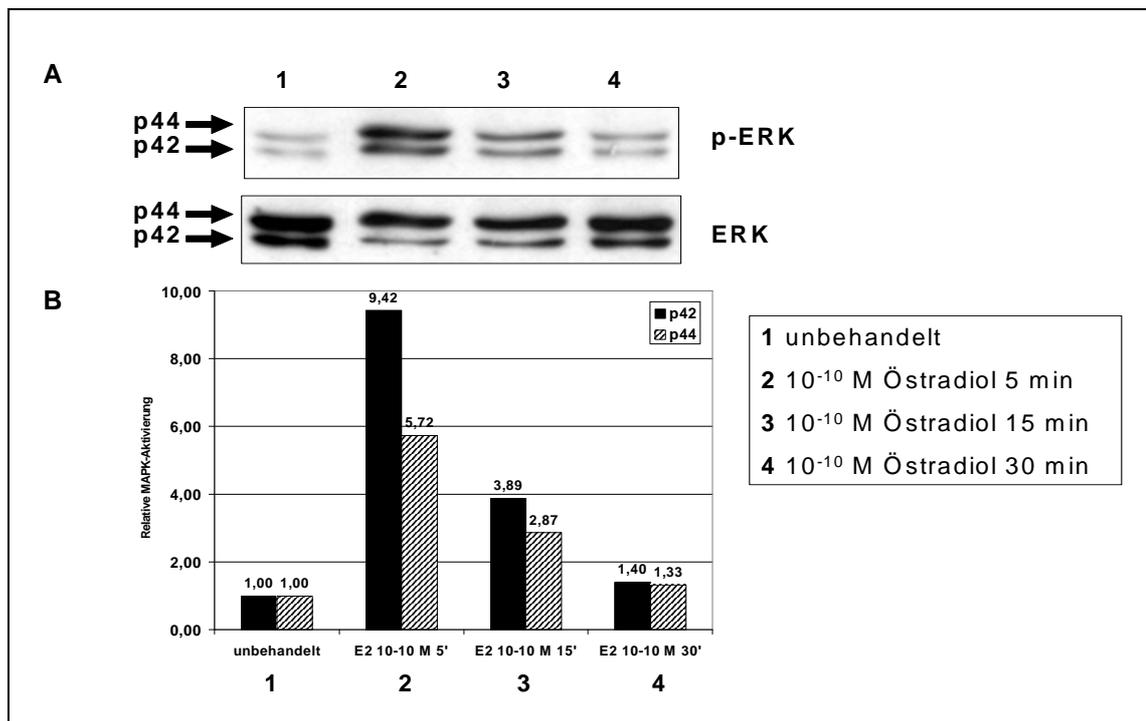


Abb. 3.4: Zeitabhängige Aktivierung der MAPK Erk1/2 in MCF-7 Zellen bei einer Östradiol-Konzentration von  $10^{-10}$ M. (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.

### 3.4 Blockierung der MAPK Erk1/2-Antwort mit dem MEK-Inhibitor PD98059

Die Substanz PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone) ist ein spezifischer, zellpermeabler Inhibitor der MAP Kinase Kinase (MEK). Sie blockiert selektiv die Aktivierung der MEK womit gleichzeitig die Phosphorylierung der MAP-Kinase unterbunden wird. Mit Hilfe dieses selektiven Inhibitors sollte gezeigt werden, dass in den durchgeführten Stimulationsexperimenten die Aktivierung der MAP-Kinase durch EGF und Östradiol über den MAPK-Signaltransduktionsweg erfolgt und ein erhöhter Phosphorylierungsstatus der MAPK aufgrund anderer Ursachen ausgeschlossen werden kann. Zu diesem Zweck wurden MCF-7 Zellen für 30 min mit dem MEK-Inhibitor vorbehandelt und im Anschluss lysiert bzw. zusätzlich 5 min mit EGF bzw. Östradiol inkubiert und dann lysiert.

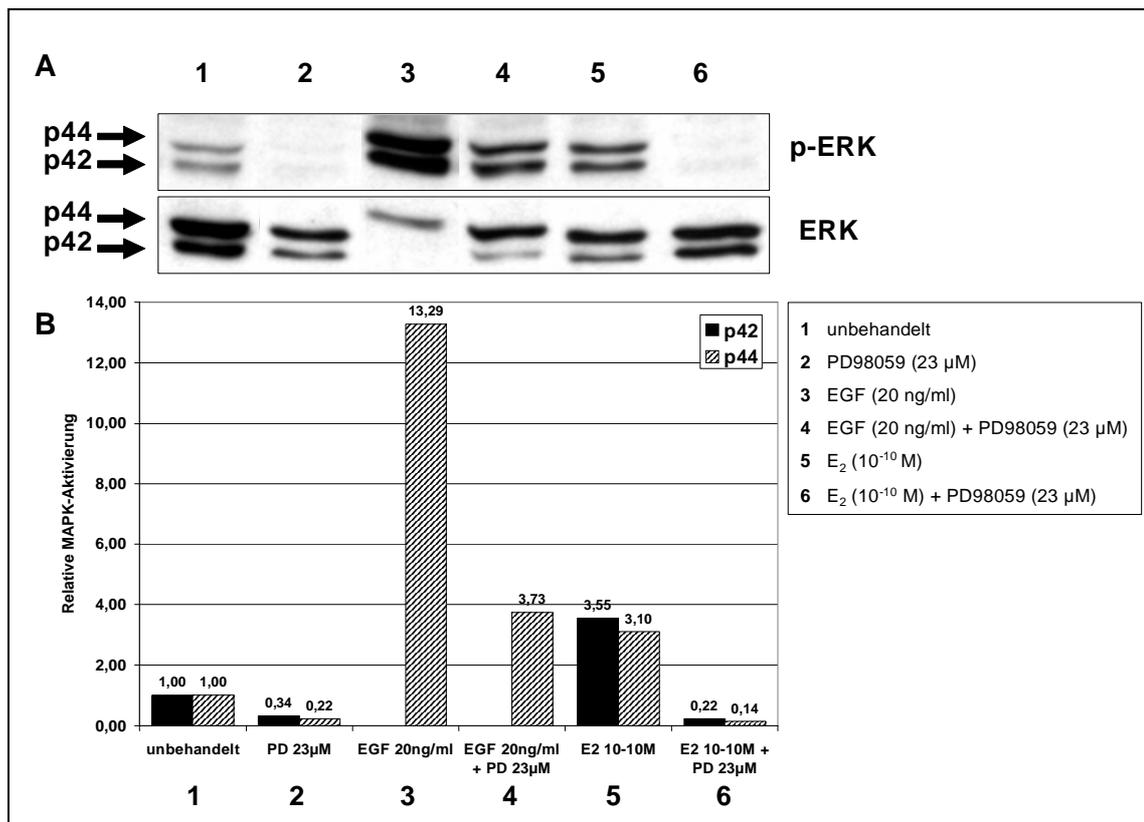


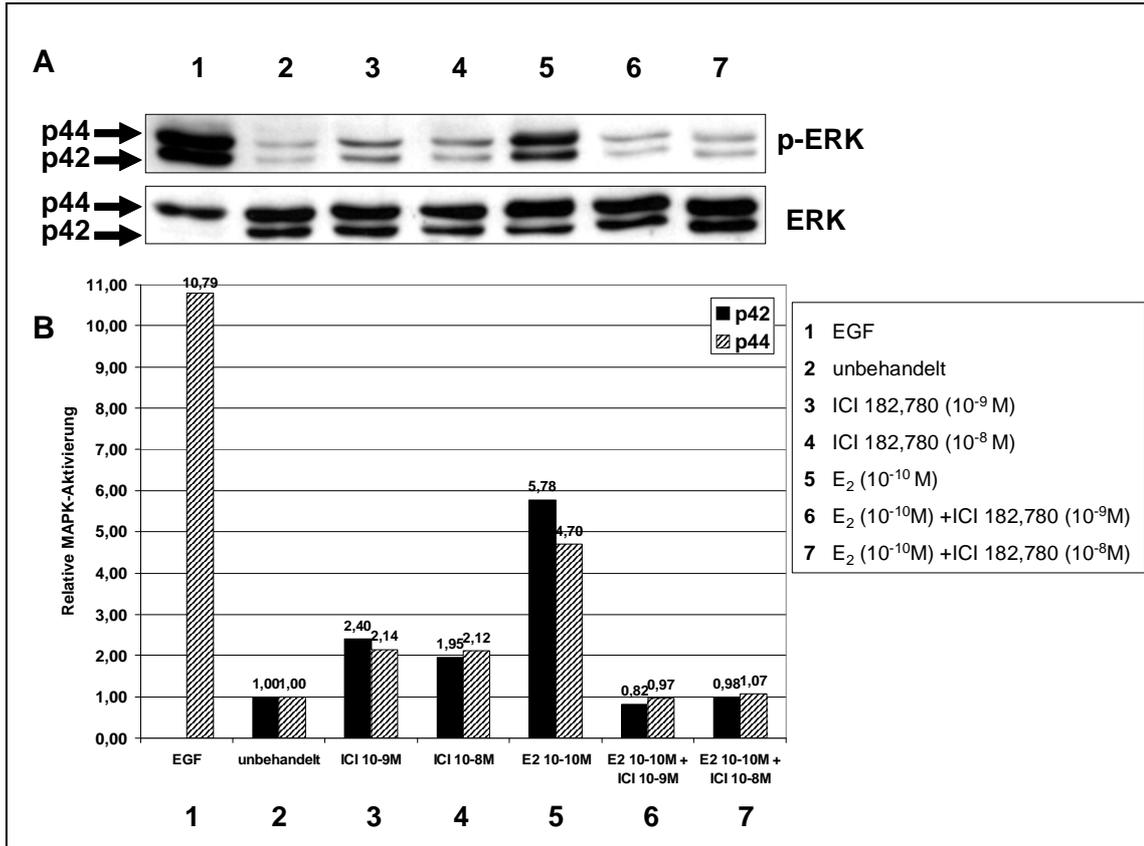
Abb. 3.5: Blockierung der MAPK-Antwort mit dem MEK Inhibitor PD98059 in MCF-7 Zellen. (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen

In den Stimulationsansätzen, denen eine Behandlung mit PD98059 vorausging, wurde der Phosphorylierungsstatus der MAPK sehr stark auf ein Niveau herabgesetzt, das weit unterhalb dem von unbehandelten Zellen lag und kaum noch zu detektieren war (Bande 2 und 6, Abb. 3.5). Lediglich der Phosphorylierungsstatus der Positivkontrolle EGF, die immer im Überschuss zugegeben wurde und daher eine enorme MAPK Aktivierung verursachte, konnte nie durch Vorbehandlung mit MEK-Inhibitor unter das Level unbehandelter Zellen gedrückt werden, sondern nur um den Faktor 3-4 vermindert werden (Bande 3 und 4, Abb. 3.5). Diese Befunde basierend auf der Hemmung der MEK belegen, dass die Inkubation der Zellen mit Östradiol die MAP-Kinase nur auf dem bekannten MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert bzw. phosphoryliert haben kann.

### **3.5 Einfluss des reinen Antiöstrogens ICI 182,780 auf die MAPK-Aktivierung**

Der Wirkstoff Fulvestrant oder auch ICI 182,780 (ICI) genannt ist ein steroidaler Östrogenrezeptorantagonist. Er gehört zu einer neueren Generation von Wirkstoffen, die als reine Östrogen-Rezeptor-Antagonisten bezeichnet werden. Diesen Wirkstoffen ist zu Eigen, dass sie den Östrogenrezeptor vollständig blockieren, dessen Dimerisierung verhindern sowie den Abbau beschleunigen. Dies sind Eigenschaften, die Wirkstoffe der früheren Generation herkömmlicher Antiöstrogene wie Tamoxifen noch nicht in die Therapie des Mammakarzinoms eingebracht haben, weshalb sie immer eine Rest-Rezeptorwirkung aufweisen.

Um die Reaktion der Zellen auf einen kurzzeitigen Östrogenstimulus bei vollständig blockierten Östrogenrezeptoren zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen 30 min mit verschiedenen Konzentrationen ICI vorinkubiert und im Anschluss daran entweder direkt lysiert oder zusätzlich einem 5-minütigen Östrogenstimulus in Gegenwart von ICI ausgesetzt und dann lysiert. Diese Versuche sollten einen Nachweis erbringen, ob der klassische ER an der schnellen Aktivierung der MAPK beteiligt ist.



**Abb. 3.6: Blockierung der östrogenabhängigen MAPK-Aktivierung mit dem Östrogenrezeptor-antagonist Fulvestrant (ICI 182,780) in MCF-7 Zellen. (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.**

Es konnte gezeigt werden, dass ein Östrogenstimulus von 10<sup>-10</sup>M über 5 Minuten bei blockierten Östrogenrezeptoren (ICI 10<sup>-9</sup>M und 10<sup>-8</sup>M) den Phosphorylierungsstatus der MAPK gegenüber unbehandelten Zellen nicht erhöhen konnte (Bande 6 und 7, Abb. 3.6). Der gleiche Östrogenstimulus bewirkte bei Zellen, deren Östrogenrezeptoren nicht blockiert waren, eine 5-fache Erhöhung gegenüber unbehandelten Zellen (Bande 5, Abb. 3.6). Auffallend war außerdem, dass die alleinige 30-minütige Inkubation der Zellen mit beiden verwendeten ICI-Konzentrationen gegenüber unbehandelten Zellen (Bande 2, Abb. 3.6) eine Erhöhung des MAPK-Phosphorylierungsstatus um den Faktor 2 verursachte (Bande 2 und 3, Abb. 3.6).

### **3.6 Einfluss von Selektiven Östrogen-Rezeptor Modulatoren (SERMs) auf die MAPK-Aktivierung**

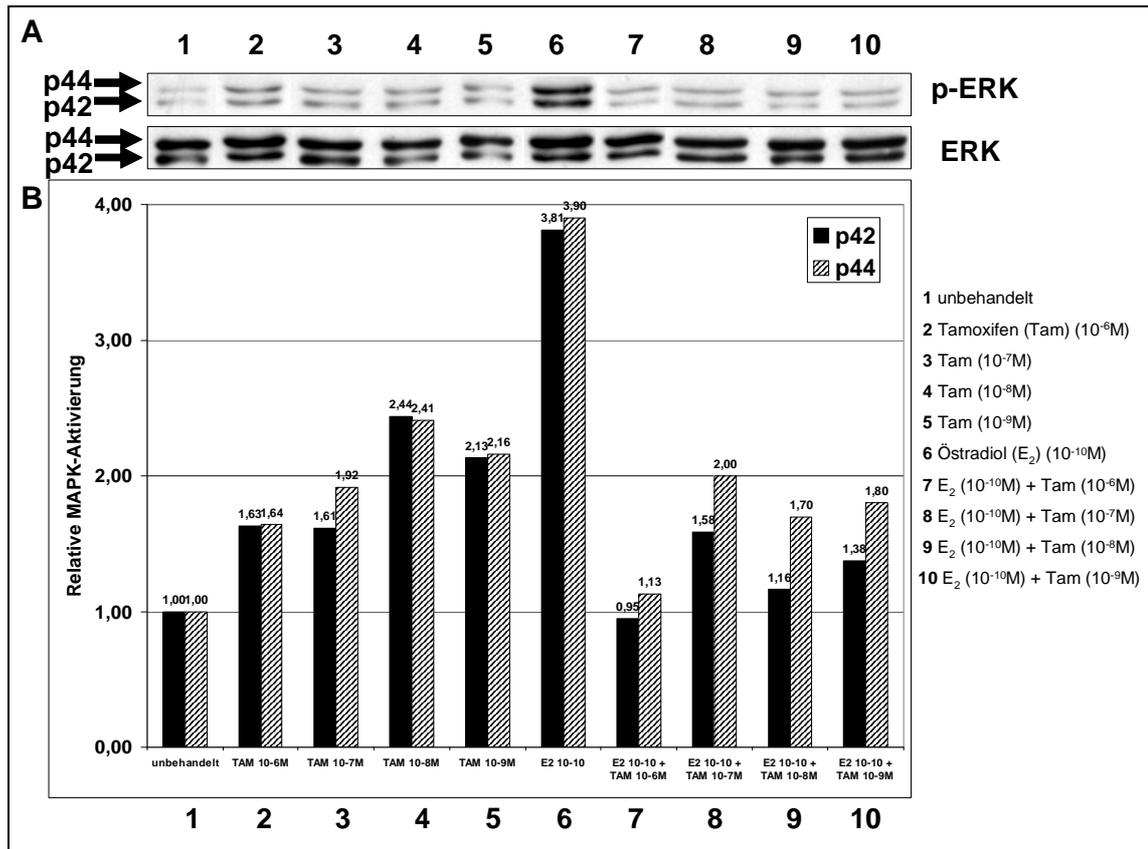
Die zentrale Rolle, die Östrogen für die Progression des Mammakarzinoms einnimmt, hat in der Vergangenheit dazu geführt, dass Antiöstrogene eine große klinische Bedeutung als effektive Therapeutika u.a. in der Behandlung des Mammakarzinoms erlangt haben. Antiöstrogene wirken als kompetitive Inhibitoren der Östrogenbindung am Rezeptor. Solche, die in ihrer physiologischen Wirkung eine ausgeprägte Gewebespezifität zeigen werden als „Selective Estrogen Receptor Modulators“ (SERMs) bezeichnet. Die Wirkungen, die SERMs auf die klassische Wirkungsweise von Östrogenen in verschiedenen Gewebetypen haben, sind in den letzten Jahrzehnten ausgiebig untersucht worden. Weniger jedoch die Einflüsse, die die Blockierung des Östrogenrezeptors auf die erst in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gelangten nichtgenomischen Effekte beim Mammakarzinom hat.

#### **3.6.1 Einfluss von Tamoxifen auf die MAPK-Aktivierung**

Tamoxifen ist für die Therapie des Mammakarzinoms zugelassen und das am häufigsten eingesetzte Antiöstrogen. Es wirkt in der Mamma als Östrogen-Antagonist, lässt aber eine Rezeptordimerisierung noch zu und inaktiviert lediglich eine der beiden Aktivierungsfunktionen des Östrogenrezeptors (AF2 inaktiv).

Zur Untersuchung der Wirkung auf die MAPK-Aktivierung in der Brustkrebszelllinie MCF-7 wurden die Zellen immer mit dem Antiöstrogen vorinkubiert, um eine vorhandene Bindung an den Östrogenrezeptor bei anschließender Zugabe von Östrogen voraussetzen zu können.

MCF-7 Zellen wurden 30 min mit TAM in Konzentrationen von  $10^{-9}\text{M}$ - $10^{-6}\text{M}$  inkubiert und dann lysiert. Bei Co-Inkubationen wurden die Zellen für 30 min mit TAM vorbehandelt und nach einem Mediumwechsel eine Inkubation für 5min mit  $\text{E}_2$  ( $10^{-10}\text{M}$ ) in Gegenwart der gleichen TAM-Konzentration angeschlossen.



**Abb. 3.7:** Einfluss von Tamoxifen auf den MAPK Phosphorylierungsstatus von MCF-7 Zellen (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.

Die alleinige Inkubation mit TAM zeigte in den verwendeten Konzentrationen gegenüber unbehandelten Zellen eine Erhöhung des Phosphorylierungsstatus der Erk1/2 um einen Faktor 1,6-2,4. Dabei stieg mit abnehmender TAM-Konzentration die MAPK-Aktivierung tendenziell an (Bande 2-5, Abb. 3.7). In dieser Stimulationsreihe zeigte  $E_2$  ( $10^{-10}$ M) eine 4fache relative MAPK-Aktivierung. Die zusätzliche Vorinkubation mit TAM für 30 min bewirkte, dass diese Erhöhung je nach Konzentration auf ein unverändertes bis zweifach erhöhtes Niveau gegenüber unbehandelten Zellen vermindert wurde (Bande 7-10, Abb. 3.7). Somit konnte die Blockierung des ER durch 30 min TAM Einwirkung die Aktivierung der MAPK nicht vollständig verhindern. Dies stellt einen abweichenden Befund zu ICI und Raloxifen dar, deren Vorbehandlung die  $E_2$ -abhängige MAPK-Aktivierung vollständig verhindern konnte. Bei Rezeptorblockierung mit diesen beiden Substanzen war der MAPK-Phosphorylierungsstatus höchstens auf dem Niveau von unbehandelten Zellen oder darunter.

### 3.6.2 Einfluss von Raloxifen auf die MAPK-Aktivierung

Das nichtsteroidale Raloxifen (RLX) ist als SERM vom Pharmaunternehmen Eli Lilly entwickelt worden (EVISTA<sup>TM</sup>, Wirkstoff RLX-HCl) und ist zur Osteoporoseprävention und -therapie bei postmenopausalen Frauen zugelassen. Als Nebeneffekt konnte in der MORE-Studie (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) (Cummings *et al.*, 1999; Cauley *et al.*, 2001) und der daran angeschlossenen CORE-Studie (Continuing Outcomes Relevant to Evista®) eine signifikante Senkung des Risikos für invasive Mammakarzinome festgestellt werden. Raloxifen übt auf Mamma- und Endometriumgewebe antiöstrogene Effekte aus. Um die Auswirkung von Raloxifen auf die MAPK-Antwort in Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen mit dem SERM für 30 min vorinkubiert, um die optimale Bindung an den Rezeptor zu gewährleisten, und dann der Status der MAPK untersucht.

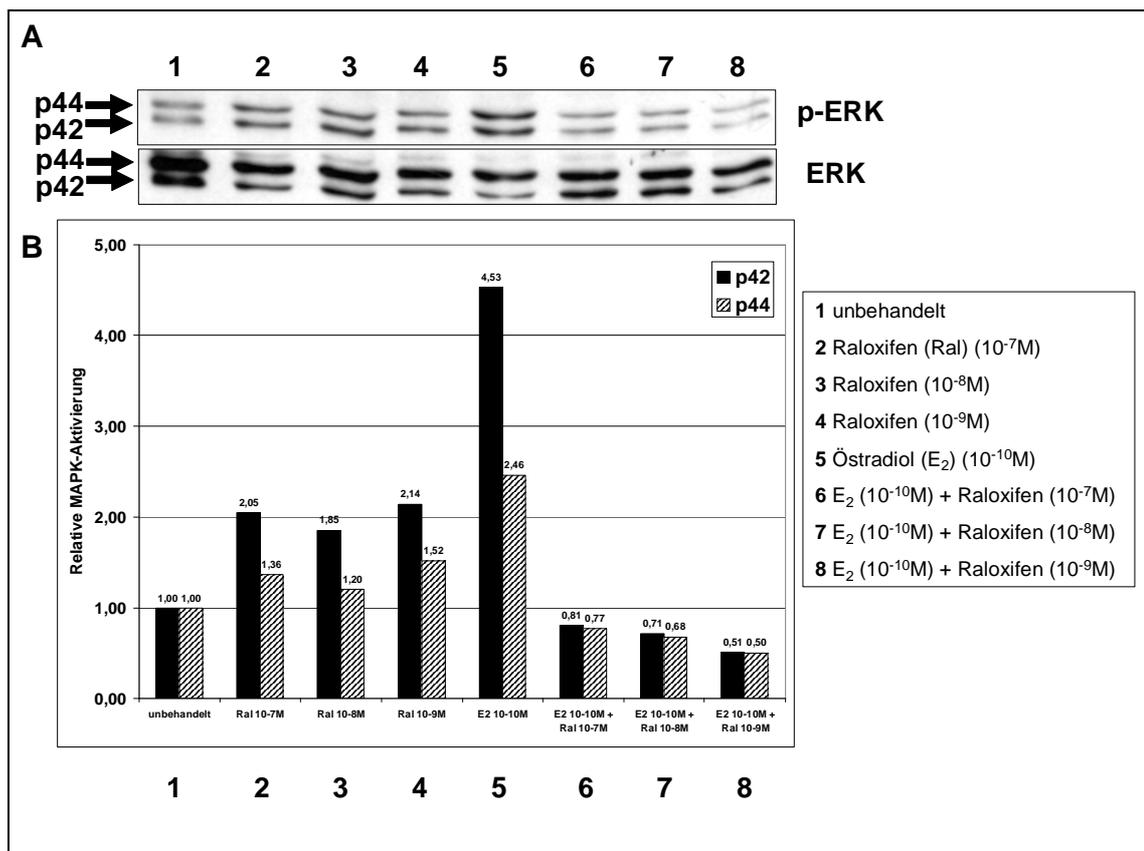


Abb. 3.8: Einfluss von Raloxifen auf den MAPK Phosphorylierungsstatus von MCF-7 Zellen (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.

Die nach dem Stimulationsprotokoll vorbereiteten MCF-7 Zellen wurden für 30 min mit Raloxifen in einem Spektrum von  $10^{-9}$ M- $10^{-7}$ M vorbehandelt und dann lysiert. Zudem wurden Co-Inkubationen mit  $E_2$  ( $10^{-10}$ M) durchgeführt. In diesem Fall wurde den mit Raloxifen vorbehandelten Zellen nach einem Mediumwechsel für 5 min Östradiol in Gegenwart der jeweiligen Raloxifen-Konzentration zugesetzt und dann die Zellen lysiert.

Die alleinige halbstündige Inkubation der Zellen mit Raloxifen ergab einen leicht erhöhten Phosphorylierungsstatus der MAPK gegenüber unbehandelten Zellen, der in den verwendeten Konzentrationen auf ähnlichem Niveau zwischen 1,5 und 2 lag (Bande 2-4, Abb. 3.8). Die 5-minütige Stimulation mit  $E_2$  ( $10^{-10}$ M) erreichte in diesem Experiment eine ca. 3,5 fache Aktivierung der MAPK (Mittel aus p44 und p42). Ging dieser  $E_2$  Inkubation eine 30-minütige Inkubation mit Raloxifen voraus, so war keinerlei Aktivierung mehr feststellbar. Der Phosphorylierungsstatus der MAPK erreichte nur 50-80 % des Niveaus unbehandelter Zellen mit leicht abnehmender Tendenz zu geringeren Raloxifen-Konzentrationen. Raloxifen verhinderte in diesem Experiment somit vollständig die Induktion einer MAPK Antwort durch Östradiol. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Co-Inkubationen ein niedrigeres Niveau aufwiesen als reine Raloxifen-Inkubationen.

### **3.7 Charakterisierung nichtgenomischer Effekte mit dem membranimpermeablen Konjugat $E_2$ -BSA**

Ein Ansatzpunkt, der bei der Erforschung nichtgenomischer Effekte eine wesentliche Bedeutung hat, ist die räumliche Trennung des Steroids vom Zellinneren. Auf diese Weise soll dessen Wirkung, losgelöst von der klassischen intrazellulären Wirkung, über Bindungsstellen an der Membran transparenter gemacht werden können. Zur räumlichen Trennung vom Cytoplasma wurde für das Steroid Östradiol durch kovalente Bindung ein Konjugat mit Rinderserumalbumin entwickelt ( $E_2$ -BSA). Dieses Konjugat ist aufgrund der räumlichen Ausmaße des Albumins nicht imstande die Membran lebender Zellen zu durchdringen (Zheng *et al.*, 1996) und deshalb ein potentiell Werkzeug um membranvermittelte Wirkungen von Östradiol zu untersuchen.

### 3.7.1 Stimulation der MAPK Erk 1/2 mit E<sub>2</sub>-BSA

E<sub>2</sub>-BSA wurde auch zur kurzzeitigen Inkubation der MCF-7 Zellen eingesetzt. Ein Unsicherheitsfaktor bei diesem Konjugat ist die mögliche Dissoziation des Östradiols (Stevis *et al.*, 1999). Sollte E<sub>2</sub> vom Konjugat dissoziieren, könnte es zur Stimulation der MAPK in den Zellen führen, so dass eine Aussage über einen Einfluss des impermeablen Konjugats auf nichtgenomische Vorgänge nicht mehr möglich wäre. Da das Ausmaß und die Anfälligkeit des Konjugats für Dissoziation nicht bekannt sind, wurde es stets frisch vor den Versuchen angesetzt, um unnötige Einfrier-Auftau-Zyklen zu vermeiden. Des Weiteren wurde in PBS gelöstes E<sub>2</sub>-BSA, bevor es zur Inkubation der Zellen eingesetzt wurde, über ein Aufkonzentrierungsröhrchen (Filter devices 10000 MW, Millipore) gefiltert. Auf diese Weise sollte gebundenes Konjugat aufgrund seiner Größe als Retentat im Röhrchen verbleiben und dissoziiertes E<sub>2</sub> den Filter passieren (Filtrat). Sowohl Retentat als auch Filtrat wurden vergleichend für Stimulationsexperimente eingesetzt.

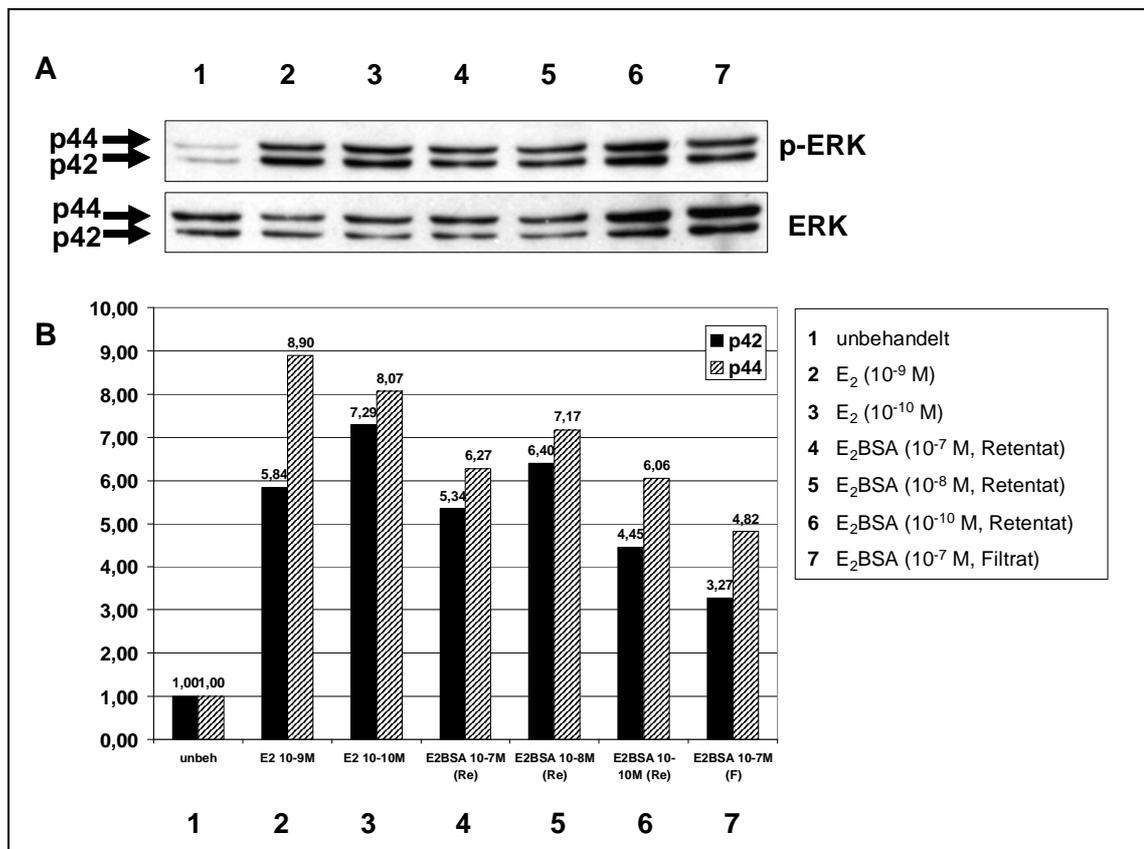


Abb. 3.9: Einfluss von E<sub>2</sub>-BSA auf den MAPK Phosphorylierungsstatus von MCF-7 Zellen nach 5-minütiger Stimulation (A) Western-Blot, (B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots normiert auf unbehandelte Zellen.

Abb. 3.9 zeigt, dass sowohl das Retentat (Bande 4-6) als auch das Filtrat (Bande 7) der E<sub>2</sub>-BSA-Lösung zu einem erhöhten Phosphorylierungsstatus der MAPK Erk1/2 führten in einer Größenordnung nur gering unterhalb der Stimulationen mit E<sub>2</sub> (Bande 2 und 3). Die Inkubation mit dem Filtrat der E<sub>2</sub>-BSA-Lösung in einer Verdünnung, die 10<sup>-7</sup>M E<sub>2</sub>-BSA der Retentatlösung entsprach (Bande 7), zeigte eine deutliche Stimulation, die mit einer vierfachen Erhöhung gegenüber unbehandelten Zellen nur etwas niedriger war als die Retentat-Inkubation (5-7fache Erhöhung, Bande 4-6). Dies bedeutet, dass E<sub>2</sub> vor bzw. während der Stimulation in starkem Maße abdissoziiert vorgelegen haben muss und den Filter während der beschriebenen Aufkonzentrierung passieren konnte. Eine zuverlässige Bestimmung der MAPK-Aktivierung durch E<sub>2</sub>-BSA ist somit in Frage zu stellen, da die Anwesenheit von dissoziiertem E<sub>2</sub> nicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grunde wurde die Dissoziation von E<sub>2</sub>-BSA über Expressionsexperimente eingehender untersucht.

### **3.7.2 Untersuchung der E<sub>2</sub>-BSA-Dissoziation anhand der genomischen Wirkung von Östradiol auf die Cathepsin D Expression**

Die Western Blot Analyse der mit E<sub>2</sub>-BSA stimulierten MCF-7 Zellen erbrachte keine schlüssigen Ergebnisse, da die Dissoziation von E<sub>2</sub> nicht ausgeschlossen werden konnte. Aus diesem Grund wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die mögliche Dissoziation von E<sub>2</sub> sichtbar zu machen. Die klassische, genomische Wirkung von E<sub>2</sub> kann man sich in diesem Zusammenhang sehr gut zu Nutze machen. Sollte E<sub>2</sub> wirklich in erheblichem Maße abdissoziieren, so müsste es imstande sein das Zytoplasma zu erreichen und über seine klassische Wirkung die Aktivierung eines östrogenabhängigen Gens zu bewirken.

So wurde als Strategie zur Untersuchung dieser Fragestellung der Expressionsstatus des Gens für Cathepsin D gewählt. Cathepsin D ist eine lysosomale Protease, die in Brustkrebszellen hoch exprimiert wird und mit einer erhöhten Invasivität und Metastasierung bei Brustkrebs assoziiert ist. Bioaktiv ist dieses Protein im Extrazellulärraum, in den es über Lysosomen sekretiert wird. Geeignet ist Cathepsin D deshalb so gut für die beschriebene Fragestellung, weil in Östrogenrezeptor-positiven (ER+) Zellen die Anwesenheit von E<sub>2</sub> zur Überexpression dieses Proteins führt (Rochefort, 1990; 1995; Couissi *et al.*, 1997).

Der experimentelle Ansatz bestand nun darin, den Expressionsstatus von Cathepsin D in MCF-7 Zellen nach E<sub>2</sub>-BSA Inkubation zu bestimmen. Dafür wurden Zellen wie in den MAPK Stimulationsexperimenten in 10 cm Zellkulturplatten und östrogenfreien Bedingungen ausgesät. Nach 3 Tagen erfolgte die Inkubation mit E<sub>2</sub>-BSA für Zeiträume zwischen 0 und 24 h bzw. vergleichsweise die Inkubation mit E<sub>2</sub> und Tamoxifen. Nach Durchführung der zeitlich unterschiedlichen Inkubationen wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert und diese im Folgeschritt in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expression wurde dann unter Einsatz der erhaltenen cDNA über quantitative RT-PCR ermittelt. Die Koamplifikation von Cathepsin D mit dem stabil exprimierten Referenzgen GAPDH als internem Standard erlaubt den direkten Vergleich der Genexpression unterschiedlich stimulierter/inkubierter Zellen. Die Quantifizierung der fluoreszenz-markierten PCR-Produkte erfolgte über einen DNA-Sequenzierautomaten (A.L.F.-Express).

#### **3.7.2.1 Etablierung der quantitativen RT-PCR für Cathepsin D**

Zur Etablierung der quantitativen RT-PCR, deren Grundlage die so genannte Multiplex-PCR darstellt, bei der das Zielgen und ein Referenzgen koamplifiziert werden, müssen diverse Parameter wie die Zyklenzahl, die Primerkonzentration, die dNTP-Menge, die annealing-Temperatur, die Enzymmenge sowie die Laufzeiten des PCR-Programms eingestellt werden. Zunächst musste ein Primerpaar für das Zielgen Cathepsin D gefunden werden. Das Primerdesign erfolgt mit Hilfe des Programms „Primer 3“ des “Whitehead Institute for Biomedical Research” in Cambridge, Massachusetts, USA, welches per Internet ([http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) zugänglich ist, wobei darauf geachtet wurde, ein Primerpaar zu wählen, das ein Produkt unterhalb von 200 bp generiert und gleichzeitig keine Homologien zu anderen Genen aufweist. Die Primer, die schließlich gewählt wurden, sind in Exon 4 (CathD fwd) und Exon 5 (CathD rev) der 9 Exon umfassenden mRNA Sequenz von Cathepsin D lokalisiert und generieren ein PCR-Produkt von 166 bp. Bei der Austestung der PCR-Bedingungen unter Verwendung von cDNA aus T47D Zellen als Template ergab sich eine optimale Annealing-Temperatur von 56°C, eine Temperatur bei der auch die PCR-Reaktion des Referenzgens GAPDH optimal abläuft. Die Zahl der Zyklen, die die PCR-Reaktion durchlaufen soll, muss so gewählt sein, dass sie bei logarithmischer Auftragung im linearen Bereich liegt. Zu diesem Zweck wurde eine zyklenabhängige

PCR mit den Cathepsin D Primern durchgeführt zwischen 20 und 40 Zyklen (Abb. 3.10). Der lineare Bereich lag zwischen 22 und 26 Zyklen, so dass für die Multiplex-PCR 25 Zyklen gewählt wurden. Diese Anzahl lag auch bei der bereits etablierten PCR-Reaktion für GAPDH im linearen Bereich, was das Ansetzen der PCR-Reaktionen vereinfachte, da alle Primer gleichzeitig pipettiert werden konnten (genaue Angaben zu Primer und PCR-Bedingungen siehe Material und Methoden).

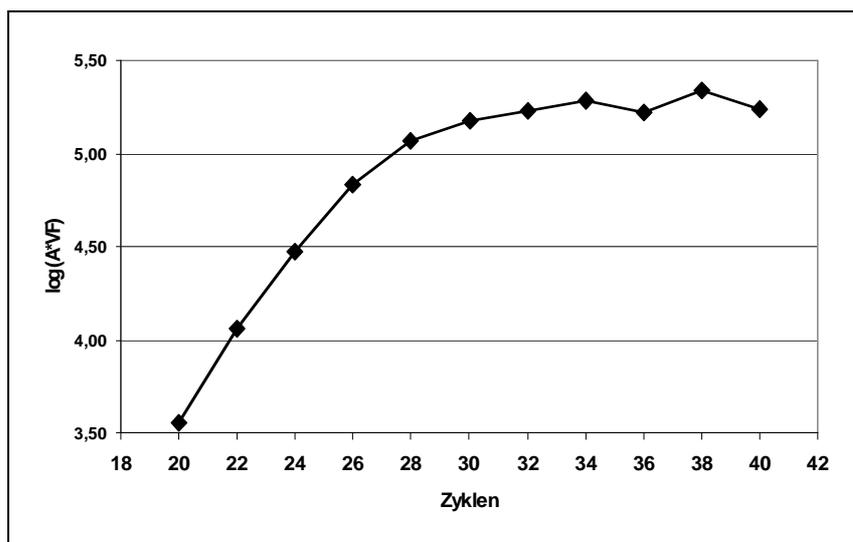


Abb. 3.10: Abhängigkeit der PCR-Produktmenge (Signalfläche, y-Achse) von der Anzahl an PCR-Zyklen in der Cathepsin D PCR-Reaktion

Bei der folgenden Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe des A.L.F.-DNA-Sequenzierers wurden die Signale der in der Reaktion amplifizierten Sequenzen von Cathepsin D und GAPDH nebeneinander detektiert. Dafür mussten die Signale der PCR-Produkte einen ähnlichen Größenbereich bzw. eine ähnliche Peakhöhe haben, weshalb der Cy5-fluoreszenz-markierte Cathepsin D Fwd-Primer probenspezifisch mit unmarkiertem Fwd-Primer verdünnt werden musste. Das Ausmaß der Verdünnung konnte aus dem Agarosegel der Multiplex-PCR abgeschätzt werden und lag bei einem Verhältnis von 1:2-1:20 (markierter Primer zu unmarkierter Primer).

### 3.7.2.2 Zeitabhängige Cathepsin D Expression

Die Expression von Cathepsin D wurde ermittelt für Inkubationszeiträume von 0, 2, 5, 9, 14, 18 und 24 h. Neben E<sub>2</sub>-BSA in zwei Konzentrationen wurden die Zellen auch zu vergleichenden Zwecken mit Östradiol (E<sub>2</sub>) und Tamoxifen inkubiert (Abb. 3.11). Es stellte sich heraus, dass die Inkubation der MCF-7 Zellen mit E<sub>2</sub>-BSA zu einer zeitlich

abhängigen Erhöhung der Cathepsin D Expression führte, die teilweise sogar die Expression der  $E_2$ -Inkubation überstieg (Abb. 3.11,  $E_2$ -BSA  $10^{-8}M$ , 14 und 18h). Dies legt den Schluss nahe, dass sich in der  $E_2$ -BSA-Lösung bereits zu Beginn der Inkubation ausreichend dissoziiertes Östradiol befand bzw. dass es während der Inkubationszeit zur fortlaufenden Ablösung des Steroids gekommen sein muss. Nur so ist ein Anstieg der Cathepsin D Expression zu erklären. Hätte sich kein freies Östradiol in der  $E_2$ -BSA Lösung befunden, so sollte man einen zeitlichen Verlauf der Expression erwarten wie er bei Tamoxifen zu beobachten war. Während des beobachteten Zeitraums pendelt die relative Expression von Tamoxifen-behandelten Zellen nahe derer unbehandelter Zellen (0h, Rel.Expression=1).

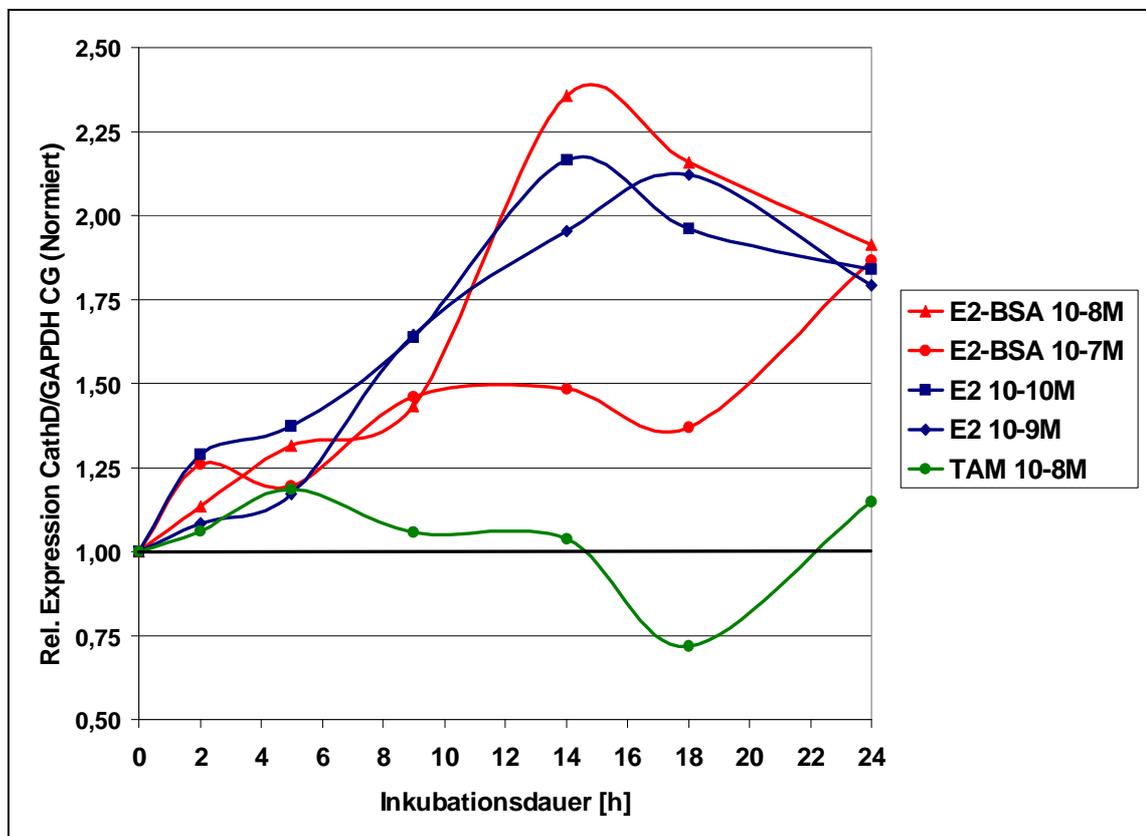


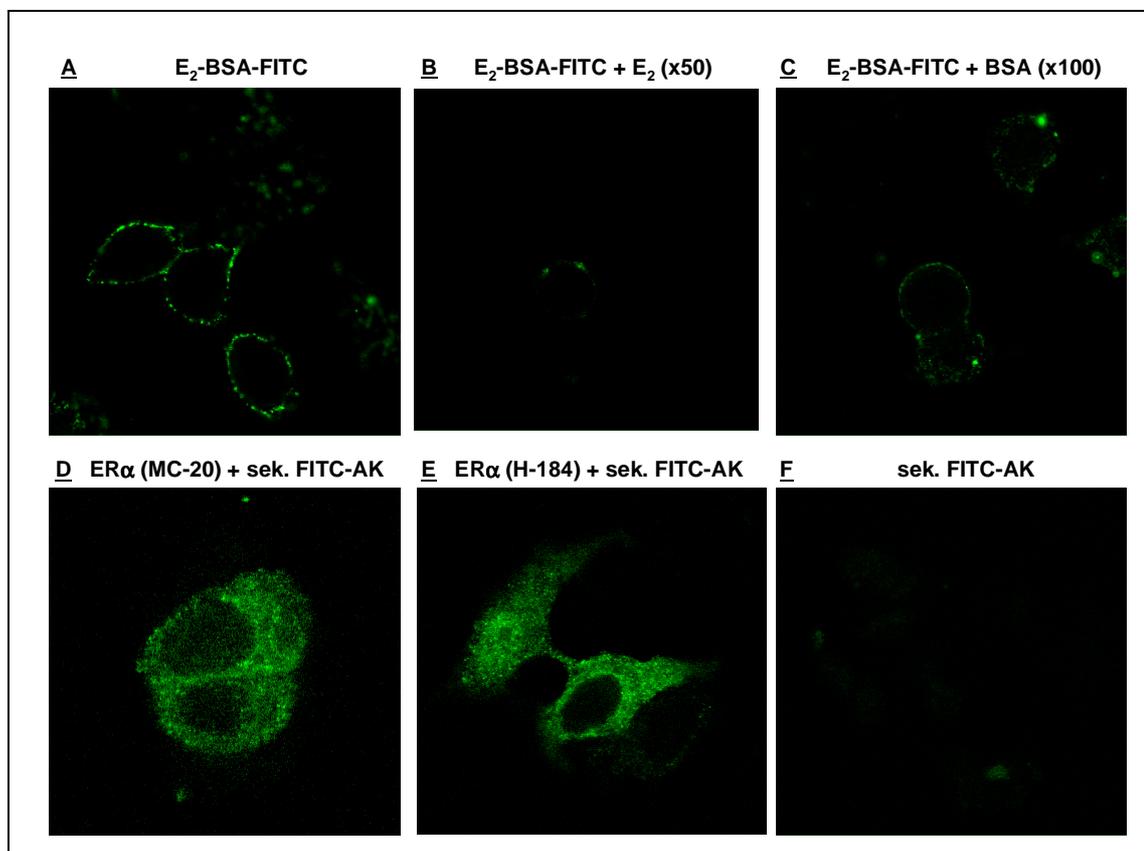
Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression von Cathepsin D nach Inkubation von MCF-7-Zellen mit  $E_2$ -BSA,  $E_2$  und Tamoxifen für einen Zeitraum von 0 bis 24h. Die relative Cathepsin D Expression der verschiedenen Zeitwerte zum Referenzgen GAPDH wurde jeweils normiert auf die relative Expression von Zellen, die nicht mit einem Stimulanz inkubiert wurden (0h-Wert).

Die Inkubation der Zellen mit Östradiol zeigte einen gleichmäßigen, zeitlich ansteigenden Verlauf der Cathepsin D Expression mit Gipfelwerten zwischen 14 und 18h nach Inkubationsbeginn und einer etwa verdoppelten Expression. Dies stellt

zugleich auf anschauliche Weise die klassische genomische Wirkung von Östradiol dar, die sich über die Aktivierung und anschließende Transkription/Translation östrogenspezifischer Gene entfaltet.

### 3.7.3 Nachweis der Membranbindung von Östradiol in MCF-7 Zellen mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesäten MCF-7 Zellen wurden mit E<sub>2</sub>-BSA-FITC und den ER $\alpha$  Antikörpern MC-20 und H-184 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einem Objektträger fixiert, um mögliche Bindungsstellen per Analyse am konfokalen Laser Scanning Mikroskop nachzuweisen.



**Abb.3.12: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM).** (A-C) Oberflächenbindung des Konjugates E<sub>2</sub>-BSA-FITC ( $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) nach 1h Inkubation von MCF-7 Zellen. Kompetitive Inkubation mit einem Überschuss von E<sub>2</sub> (x50) (B) und BSA (x100) (C). (D-F) Anfärbung des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  in permeabilisierten MCF-7 Zellen. 1h Inkubation mit den ER $\alpha$ -Antikörpern MC-20 (D) und H-184 (E) (1:50) sowie Kontrollinkubation mit dem sek. FITC-Antikörper (F) (1:320).

Die Inkubation von MCF-7 Zellen für 1h mit dem Konjugat E<sub>2</sub>-BSA-FITC ( $1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) zeigte im Laser Scanning Mikroskop (CLSM) bei einem Teil der Zellen eine Anfärbung

der Zelloberfläche (Abb.3.12, A) während eine Bindung im Zellinneren nicht detektiert werden konnte. Dies weist darauf hin, dass das Konjugat aufgrund seiner Größe nicht in die Zellen eindringen konnte. Die kompetitive Inkubation mit einem 50fachen Überschuss von  $E_2$  (Abb.3.12, B) konnte das Fluoreszenzsignal weitestgehend verdrängen während die Membranfärbung bei einem zusätzlichen 100fachen Überschuss von BSA (Abb.3.12, C) größtenteils erhalten blieb. Dies weist auf eine spezifische Bindung an der Membran hin, belegt jedoch nicht ob das Konjugat an den klassischen ER oder andere Bindungspartner gebunden hat.

Des Weiteren wurden die Zellen mit Antikörpern gegen den klassischen Östrogenrezeptor  $ER\alpha$  (MC-20/H-184) (Verdünnung 1:50) in Kombination mit einem sekundären FITC-Antikörper (1:320) inkubiert. Im Gegensatz zu  $E_2$ -BSA-FITC konnten mit den Antikörpern keine Membranbindungsstellen an intakten Zellen nachgewiesen werden. Die Permeabilisierung der Zellen ermöglichte die Detektion des intrazellulären  $ER\alpha$ . CLSM zeigte bei beiden Antikörpern eine deutliche intrazelluläre Anfärbung des  $ER\alpha$  (Abb.3.12, D/E), wobei der Zellkern ausgespart blieb, da er für Antikörper unzugänglich ist. Die Kontrollinkubation mit dem sekundären FITC-Antikörper allein (Abb.3.12, F) ergab keine Fluoreszenzsignale, was belegt, dass die detektierte Fluoreszenz auf der Bindung der  $ER\alpha$ -Erstantikörper beruht.

### **3.8 Stabile retrovirale Transfektion des Östrogenrezeptors in MCF-7 Zellen**

Für die Entfaltung der schnellen nichtgenomischen Wirkungen von Östradiol ist ein kleiner Anteil der Östrogenrezeptoren verantwortlich. Dieser ist an der Zellmembran lokalisiert und macht einen Anteil an der Gesamtöstrogenrezeptormenge aus, der wahrscheinlich im einstelligen Prozentbereich liegt. Um der Frage nachzugehen, ob die absolute Menge des ER an der Zellmembran eine Auswirkung auf die Stimulierbarkeit der MAPK in Abhängigkeit von  $E_2$  hat, liegt es nahe, die Menge an ER künstlich zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien MDA-MB-231 (ER negativ) und MCF-7 (ER positiv) mit dem retroviralen Expressionsvektor  $ER\alpha$ -S11IN transfiziert, um eine stabile erhöhte Expression des ER in den Zellen zu erreichen.

### 3.8.1 Klonierung des ER $\alpha$ in den retroviralen Vektor S11IN

Als Ausgangsmaterial für die Klonierung lag die codierende Sequenz des ER $\alpha$  (1788 bp) im Expressionsplasmid pcDNA3.1- (5432 bp) vor, genannt pER $\alpha$  (7248 bp). Dieses Expressionsplasmid fand während der Doktorarbeit von Dr. T. Flötotto Anwendung und stand für weitere Experimente freundlicherweise zur Verfügung (Plasmidkarten im Anhang). Es lagen allerdings keine exakten Angaben vor, wie genau die ER $\alpha$  Sequenz in den Vektor pcDNA3.1- kloniert wurde. Die Differenz zwischen pcDNA 3.1- und pER $\alpha$  beträgt 1816 bp, was zur codierenden ER $\alpha$  Sequenz eine Abweichung von 28 bp darstellt.

Deshalb wurden spezielle Primer kreiert, die für das 5'- und das 3'-Ende des ER $\alpha$  codieren, um die codierende Sequenz (1788bp) aus dem Vektor pER $\alpha$  herauszuamplifizieren. Als Überhang erhielten der Fwd-Primer die Erkennungssequenz für EcoRI und der Rev-Primer für BamHI. Dies sind die beiden Restriktionsschnittstellen, mit denen die ER $\alpha$ -Sequenz später in den retroviralen Vektor S11IN kloniert werden sollte. Nach erfolgreicher Amplifikation der ER $\alpha$ -Sequenz aus dem Vektor pER $\alpha$  erfolgte als nächster Schritt die Ligation der codierenden ER $\alpha$ -Sequenz in den retroviralen Vektor S11IN als Rückgrat. Dies geschah mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI vor die IRES-Site des Vektors. Der problematischste Schritt war die erfolgreiche Transformation des Expressionsvektors in *E.coli*-Zellen, um die Plasmid-DNA zu amplifizieren. Zunächst wurde versucht den Vektor über Elektroporation in die *E.coli*-Zellen (DH5 $\alpha$ ) einzubringen. Nach zahlreichen Versuchen, konnten aber keine positiven Klone aus den ausplattierten transformierten Zellen gewonnen werden, was über Restriktionsverdau nach Plasmidpräparation der erhaltenen Bakterienkolonien ermittelt wurde. Den erhofften Erfolg erbrachte schließlich die Transformation in *E.coli*-Zellen (SURE) mittels der CaCl<sub>2</sub>-Methode. Auf diese Weise konnten 4 Klone identifiziert werden, die nach Restriktionsverdau der präparierten Plasmide mit Eco RI und Bam HI im Agarosegel Fragmentgrößen von 5,8 kb (S11IN) und 1,8 kb (ER $\alpha$ ) aufwiesen. Bevor das Expressionsplasmid in die Zelllinien transfiziert werden konnte, musste sichergestellt werden, dass die klonierte Sequenz des Inserts zu 100% der Sequenz des ER $\alpha$ -Gens entsprach und kein Basenaustausch oder Amplifikationsfehler stattgefunden hatte. Zu

diesem Zweck wurden die Inserts aus den klonierten Plasmiden herausamplifiziert und diese Produkte mit denselben Primern ER $\alpha$ -EcoRI-Fwd und ER $\alpha$ -BamHI-Rev vom 5'- und 3'-Ende her sequenziert. Um auch den mittleren Bereich des ER $\alpha$ -Gens abzudecken wurde zusätzlich noch ein Reverse-Primer eingesetzt, der die Sequenzierung ab der Position 1288 des Gens ermöglichte. Einer der genannten 4 Klone wurde zur retroviralen Transfektion ausgewählt, da er die eindeutigsten Sequenzierergebnisse lieferte und nach Sequenzabgleich keine Basenfehler aufwies. Die Transfektion wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

### 3.8.2 E<sub>2</sub>-Stimulation ER-transfizierter Zellen

Es wurden zwei Zelllinien mit dem ER $\alpha$  retroviral transfiziert. Zum einen die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231 und zum anderen die ER-positive Zelllinie MCF-7. Die Zielsetzung war, durch die Einführung des ER in die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231 eine MAPK-Antwort durch Östradiol zu induzieren und die in MCF-7 vorhandene E<sub>2</sub>-abhängige MAPK-Antwort auf Veränderungen zu untersuchen, die auf einer veränderten Rezeptormenge basieren. MDA-MB-231 Zellen stellten sich bei der Auswertung des Phosphorylierungsstatus der MAPK Erk1/2 problematisch dar. Die Stimulationsansätze unterschieden sich untereinander, d.h. unbehandelte Zellen zu EGF- bzw. E<sub>2</sub>-Stimulationen in keiner Weise in ihrer Intensität. Die Signalintensitäten waren jedoch überaus hoch und lagen weit über denen der MCF-7 Zellen. Die bereits etablierten MCF-7 Zellen konnten bezüglich der ER $\alpha$ -Transfektion ausgewertet werden.

Abb. 3.13 zeigt, dass die Transfektion des ER $\alpha$  in MCF-7 Zellen mittels des retroviralen Vektors S11IN deutlich sichtbare Veränderungen im Phosphorylierungsstatus der MAPK Erk1/2 nach Stimulation mit E<sub>2</sub> bewirkte. In allen drei Transfektionsvarianten zeigte die Kontrollstimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF eine deutliche Aktivierung der MAPK. Leervektor-transfizierte (S11IN) Zellen wiesen mit einer 9-fachen Erhöhung die höchste EGF-Stimulation auf während die beiden ER $\alpha$ -Transfektionsvarianten gegenüber unbehandelten Zellen eine etwa 5-6fache Aktivierung zeigten. Zellen, die einmal mit Virusüberstand infiziert worden waren (Abb. 3.13, rote Säulen), zeigten eine 2-3fach erhöhte Aktivität nach 5-minütiger E<sub>2</sub>-Stimulation gegenüber unbehandelten Zellen. Verglichen mit Zellen, in die nur der Leervektor S11IN transfiziert wurde, konnte in den 1x mit ER $\alpha$  transfizierten Zellen ein

etwa verdoppelte MAPK-Aktivierung nach 5-minütiger  $E_2$ -Inkubation detektiert werden.

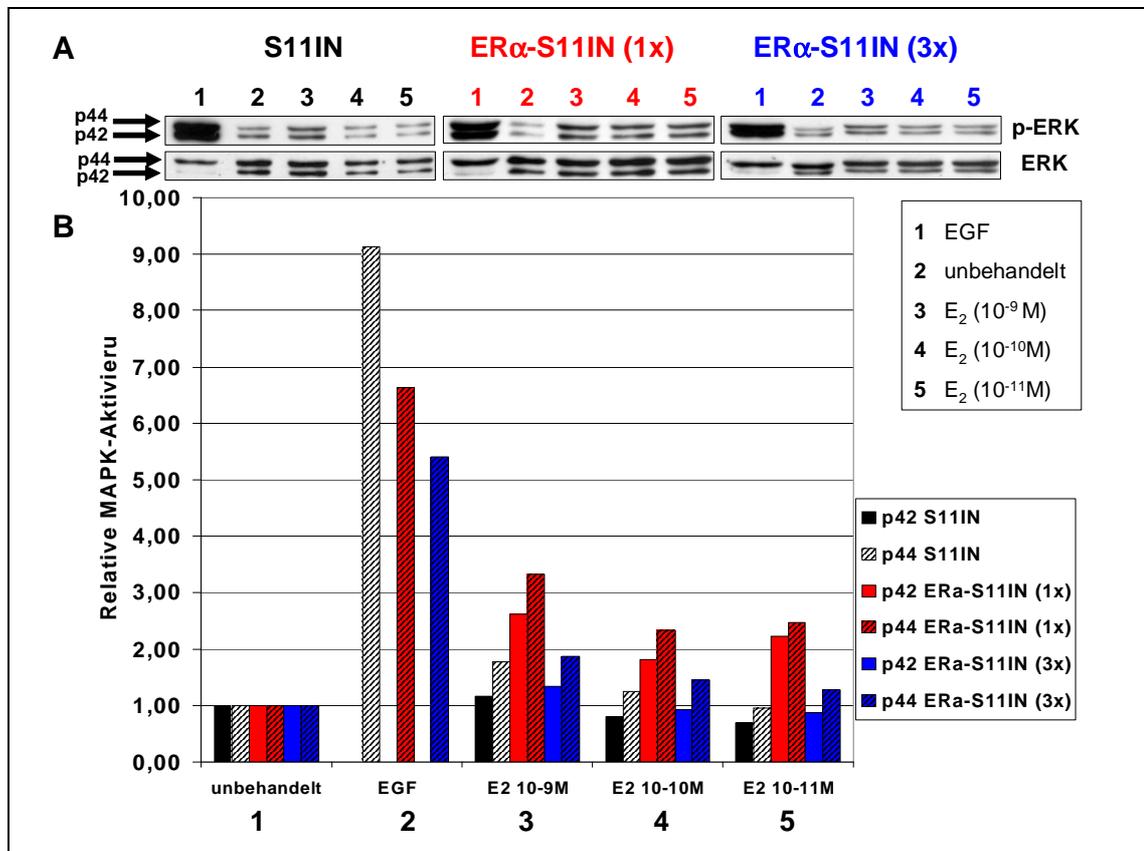


Abb. 3.13: Einfluss von 5-minütiger Östrogenstimulation auf die MAPK Erk1/2 in MCF-7 Zellen, die stabil retroviral mit ER $\alpha$  transfiziert wurden (A) Western Blot Analyse von Zellen, die mit Leervektor (S11IN), einmal mit Virusüberstand (ER $\alpha$ -S11IN (1x)) und dreimal mit Virusüberstand (ER $\alpha$ -S11IN (3x)) transfiziert wurden. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots, wobei pro Stimulationsvariante die drei genannten Transfektionsvarianten nebeneinander angeordnet wurden.

Es ist zu bemerken, dass Leervektor-transfizierte Zellen (S11IN) keine nennenswerte Aktivierung aufwiesen und in etwa auf dem Niveau un behandelter Zellen lagen (Abb. 3.13, schwarze Säulen). Die dreifache Transfektion mit Virusüberstand (Abb. 3.13, blaue Säulen) konnte keine Erhöhung der Aktivierung gegenüber der einfachen Transfektion bewirken und zeigte nur eine sehr geringe bzw. keine Erhöhung der MAPK-Aktivität durch Östradiol sowohl gegenüber un behandelten Zellen als auch gegenüber Leervektor-transfizierten Zellen. Dieses Experiment zeigt, dass eine durch retrovirale Transfektion erzeugte Erhöhung der intrazellulären Menge des Östrogenrezeptors ER $\alpha$  in MCF-7 Zellen zu einer erhöhten Aktivierung der MAPK

Erk1/2 führt. Diese Tatsache spricht für die Mitwirkung des ER $\alpha$  bei der Weiterleitung von schnellen membranvermittelten Östrogensignalen zur MAPK.

## 4 DISKUSSION

In zunehmendem Maß wurden in der jüngeren Vergangenheit Hinweise gesammelt, dass Steroide ihre Wirkung nicht nur durch genomische, sondern auch durch nichtgenomische bzw. nichtnukleäre Signalwege entfalten (Falkenstein *et al.*, 2000; Lösel und Wehling, 2003; Simoncini *et al.*, 2003). Der klassische, genomische Signalweg wirkt normalerweise über die transkriptionelle Regulation der Genregulation, während schnelle nichtgenomische Wirkungen sich beispielsweise im Anstieg von intrazellulärem Calcium ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ), der Modulation von cAMP sowie der Einbeziehung weiterer Second Messenger und Proteinkinase-Signalwege äußern (Lösel und Wehling, 2003). Diese Wirkungen laufen zu schnell ab, als dass sie durch Aktivierung von RNA und Proteinsynthese erklärt werden könnten. Die Hormongruppe der Östrogene mit Östradiol ( $\text{E}_2$ , 17- $\beta$ -Östradiol) als dem wichtigsten physiologischen Vertreter spielt eine spezifische Rolle in der Progression von Mamma- und Endometriumkarzinomen. Die Interaktion von  $\text{E}_2$  mit der zugehörigen Familie der Östrogenrezeptoren (ER) ist seit mehreren Jahrzehnten ein therapeutisches Ziel in der Behandlung von hormonabhängigen Mammakarzinomen. Die Expression des ER ist ein sehr dynamischer Prozess, der eine Rolle in der Entwicklung, dem weiblichen Hormonzyklus, beim Verhalten und bei der Progression von endokrinen Tumoren spielt. Wenn Mammakarzinome zunehmend invasiv werden, werden Wachstum und Metastasierung üblicherweise hormonunabhängig, so dass nur noch 40% dieser nicht- $\text{E}_2$ -responsiven Karzinome ER-positiv bleiben (Brunner *et al.*, 1993). Die erfolgreiche Behandlung dieser Karzinome mit dem Antiöstrogen Tamoxifen (EBCTCG, 1998; Gradishar, 2004), das in die Interaktion zwischen Östrogen und dem ER eingreift, hat jedoch den gravierenden Nachteil der häufigen Entstehung einer Resistenz während des Therapieverlaufs (Clarke *et al.*, 2003). Diese Form der endokrinen Behandlung ist in ihrer Wirkung auf die genomische Wirkungsweise der Östrogene ausgerichtet, die in der Lage sind, die Proliferation von Tumorzellen gynäkologischer Malignome zu aktivieren (Gadducci *et al.*, 1999). Die Resistenzentwicklung hat die endokrine Therapie mit Antiöstrogenen jedoch wesentlich komplexer gemacht als man es anfänglich vermuten konnte. Bei der Erforschung der molekularen Grundlagen der

Resistenzentstehung sind zunehmend alternative Mechanismen der E<sub>2</sub>/ER-Wirkung in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, die sich nur wenig auf die klassische nukleäre Wirkung beziehen, sondern vielmehr auf die Interaktion des ER und seiner Co-Regulatoren mit Wachstumsfaktor-Signalwegen und den daraus resultierenden nichtgenomischen Wirkungen (Gururaj *et al.*, 2006). Die von der Plasmamembran ausgehenden Wirkungen von Östrogen wurden zwar bereits vor fast drei Jahrzehnten erkannt (Pietras und Szego, 1977), aber die intensive Erforschung dieser Phänomene setzte erst Jahrzehnte später ein. Einer der beteiligten Signalwege, der zur Aktivierung der MAPK führt, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf seine Beeinflussbarkeit durch Östrogen und Antiöstrogene näher untersucht. Die MAP-Kinasen Erk1/2 regulieren die Zellproliferation, die Differenzierung und das Überleben von Zellen und sind häufig in Tumorzellen fehlreguliert. Zur Untersuchung dieser nichtgenomischen Wirkungen eignen sich Karzinomzelllinien aus dem entsprechenden Karzinomtyp als Modellsystem. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verfügt über eine intakte ER-Transaktivierungsmaschinerie und ihre Proliferationsrate kann nachweislich durch Inkubation mit Östradiol gesteigert werden (Edwards *et al.*, 1981).

#### **4.1 Etablierung und Grundlagen zum Nachweis nichtgenomischer Effekte in Mammakarzinomzellen**

Da die Responsivität von MCF-7 Zellen gegenüber E<sub>2</sub> eine Grundvoraussetzung für die MAPK-Aktivierung darstellt (Migliaccio *et al.*, 1996), wurde dies initial über einen MTS-Proliferationsassay erfolgreich nachgewiesen (siehe 3.1.3). Um nichtgenomische Effekte in den verwendeten Mammakarzinomzellen nachweisbar zu machen, wurde Wert darauf gelegt, die Zellen bis zu den Stimulationsexperimenten unter Bedingungen zu kultivieren, die die bestmögliche Aktivierbarkeit gewährleisten. Die Datenlage spricht zunehmend dafür, dass ein an der Membran lokalisierter Anteil des ER (mER) als Vermittler für nichtgenomische Antworten von Östrogenen verantwortlich ist (Razandi *et al.*, 1999; Song und Santen, 2006). Deshalb wurden die Zellkulturbedingungen dahingehend angepasst, dass ein maximaler Anteil der intrazellulären ER-Population an der Membran lokalisiert sein sollte. Als Leitfaden diente eine Veröffentlichung, die die Regulation des mER $\alpha$  in Bezug auf diverse Parameter in einer Rattenhypophysentumorzelllinie thematisierte (Campbell *et al.*, 2002). Die erhaltenen

Hinweise wurden als Anhaltspunkte zur experimentellen Durchführung in den MCF-7 Mammakarzinomzellen verwendet. Zu diesen Parametern zählt zum einen die Dichte der ausgesäten Zellen. Die Autoren der genannten Veröffentlichung konnten zeigen, dass vermehrte Zell-Zell-Interaktionen, d.h. eine zu hohe Zelldichte, einen stark negativen Einfluss speziell auf die Menge des membrannahen ER haben. In älteren Untersuchungen konnte zwar eine Korrelation von erhöhter Zelldichte zu erhöhter ER Expression festgestellt werden (Gerschenson *et al.*, 1981; Nakhla *et al.*, 1984), jedoch bezogen sich diese Studien ausschließlich auf den intrazellulären ER. In den eigenen Versuchen zur Proliferation der MCF-7 Zellen im 96Well-MTS-Assay kam es zu einem besseren E<sub>2</sub>-abhängigen Wachstum bei der geringsten Aussaatmenge von 500 Zellen/Well, was die These der möglichst geringen Zell-Zellinteraktion unterstützt. Ein weiterer wichtiger Faktor in der Kultivierung, das stark herabgesetzte Angebot an Serum (Serumhunger – „serum starvation“), maximiert laut Campbell *et al.* (2002) nach bereits 48h die Menge an mER. Von einer erhöhten Expression des ER bei Serumhunger wurde schon vor längerer Zeit in den selbst verwendeten MCF-7 Zellen berichtet (Katzenellenbogen *et al.*, 1987). Der Anstieg des mER Levels bei Serumhunger liegt wahrscheinlich an chronisch herunterregulierten Einflüssen durch Entzug verschiedener Serumkomponenten. Zu diesen Komponenten zählen nicht nur Steroide, sondern auch zahlreiche andere Regulatoren, deren Entzug nachweislich die mER $\alpha$ -vermittelten Antworten verbessern konnte (Pappas *et al.*, 1994; 1995b; Norfleet *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 1999a). Zudem führt der Entzug von E<sub>2</sub> *in vivo* (Aromatase Knock-out Mäuse) zu einer erhöhten ER Expression (Agarwal *et al.*, 2000). Aus den genannten Gründen wurde in den Tagen vor der Stimulation das Charcoal-Stripped FCS Level auf 1% gesenkt. Eine Kultivierung ohne Zugabe von FCS führte nicht zum Erfolg, da die Zellen zu Grunde gingen. Außerdem wichtig ist, dass die Zellen nicht zu oft passagiert werden bzw. sich nicht zu lange kontinuierlich in Kultur befinden. In GH3/B6 (Rattenhypophysen-Tumor-) Zellen konnte mehrfach eine starke Abnahme der mER $\alpha$  Expression über einen Zeitraum von 10 Wochen nachgewiesen werden (Pappas *et al.*, 1995a; Campbell *et al.*, 2002); des Weiteren zeigte man, dass ER Transkripte teilweise und vielleicht vollständig nach wiederholter Passagierung verloren gehen können (Iruela-Arispe *et al.*, 1999). Durch die genannten Parameter sollte die mER $\alpha$  Expression in den verwendeten MCF-7 Zellen kurzzeitig (3-4 Tage) möglichst stark

angehoben werden und die Zellen in einen Zustand der erhöhten Sensitivität für  $E_2$  befördern. Das Phänomen einer erhöhten  $E_2$ -Sensitivität ist klinisch in wesentlich größeren Zeiträumen bei der Behandlung von postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs von starker Bedeutung. Tumore, die nach Ovariectomie bzw. anschließender Gabe eines Aromatase-Inhibitors aufgrund des Östrogenentzuges zunächst eine Regression zeigen, beginnen häufig nach 12-18 Monaten erneut zu wachsen, was ebenfalls für eine Variante von MCF-7 Zellen, die unter Langzeitentzug von  $E_2$  standen, gezeigt werden konnte (Santen *et al.*, 2004). Die selbst untersuchten nichtgenomischen Effekte der MAPK-Aktivierung spielen in dem genannten Zusammenhang wahrscheinlich eine wesentliche Rolle (Santen *et al.*, 2004; 2005).

Wie zuvor erwähnt werden Aromataseinhibitoren immer erfolgreicher zum Entzug von  $E_2$  bzw. der Verhinderung der  $E_2$ -Synthese in der Therapie von hormonabhängigem Brustkrebs eingesetzt (Mokbel, 2002; Gould und Garcia, 2006). Während der Etablierung der MAPK-Aktivierung in MCF-7 Zellen traten zunächst Probleme in Form einer erhöhten Basisstimulation bei unbehandelten Zellen auf (siehe 3.2.2). Da endogen gebildetes  $E_2$  neben Restmengen im Charcoal-Stripped FCS als Ursache für die Basisstimulation in Frage kamen, wurden den Zellen während der 3-tägigen Hungerphase vor der Stimulation bzw. Lyse verschiedene Konzentrationen des Aromatase-Inhibitors Formestan zugesetzt. Dies konnte den Phosphorylierungslevel der MAPK bei Einsatz einer ausreichenden Konzentration ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$ M) deutlich unter das Niveau von Zellen ohne diesen Zusatz drücken (siehe Abb. 3.3). Die erhaltenen Resultate unter Einsatz des Aromatase-Inhibitors Formestan sprechen dafür, dass zumindest ein Anteil der Basisstimulation aus der intrazellulären Neusynthese von  $E_2$  während der 3-tägigen Inkubation (vor Stimulation) unter östrogenfreien Bedingungen (nur 1% Charcoal-stripped FCS, kein Phenolrot) stammen kann. Ein weiterer Anteil resultiert wahrscheinlich aus Restmengen von Östradiol im Kulturmedium bzw. Kälberserum. Auch unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen aktivkohlebehandelten Produktes (FCS), das nachweislich in der  $E_2$ -Gehaltsbestimmung per ELISA eine geringere Restmenge freien Östradiols enthielt (siehe 3.2.2.1), können Östradiol-Restmengen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Santen *et al.* (2003) nehmen auf die Restmengen von Östradiol in Kulturmedium (Charcoal-Stripped) einen klaren Bezug. Sie machen diese Restmengen für die Entwicklung des Phänomens der

adaptiven Hypersensivität gegenüber  $E_2$  verantwortlich, das bereits von mehreren Gruppen für Zellen und Tumore beschrieben wurde (Santen, 1996; Masamura *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1999; Shim *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002). Es äußert sich darin, dass MCF-7 Zellen (LTED Zellen, „Long Term  $E_2$  Deprivation“), die unter andauerndem  $E_2$  Entzug kultiviert werden, ihr Wachstum zunächst einstellen, aber nach 3-6 Monaten adaptiert sind und dann so schnell wie Wildtyp MCF-7 Zellen mit maximaler  $E_2$  Stimulation wachsen (Santen *et al.*, 2003). Ein weiterer unerwarteter Faktor für die Entstehung einer erhöhten MAPK Basisstimulation ist die östrogene Aktivität, die aus der Benutzung von Polystyrol-Zellkulturschalen hervorgehen kann. Es konnte demonstriert werden, dass Restmengen von  $E_2$  aus den Plastikkulturschalen verschiedenster Hersteller austreten können, was aus Weichmachern wie p-Nonyl-Phenol-Derivaten resultiert (Ishikawa *et al.*, 2001; Yue, Wang, Santen, unpublizierte Beobachtungen). Dies verdeutlicht wie komplex und anfällig die Detektion der beschriebenen Signale aufgrund nicht kalkulierbarer Faktoren sein kann. Die Basisstimulation konnte in den durchgeführten Versuchen durch die Verwendung von kommerziellem Charcoal-Stripped FCS (Biowest) erniedrigt werden und die Signalqualität mit einem anderen Zweitantikörper (goat anti-IgG HRP, Santa Cruz) gegen den phospho-Erk1/2-Antikörper verbessert werden.

## 4.2 $E_2$ -vermittelte nichtgenomische MAPK-Aktivierung in MCF-7 Zellen

Nach der aufwändigen und langwierigen Etablierungsarbeit konnte die Aktivierung der MAPK Erk1/2 in der Brustkrebszelllinie MCF-7 mit verschiedenen  $E_2$ -Konzentrationen nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Erk1/2 unter Verwendung der Western-Blot Technik. Die höchste Stimulation konnte in den Versuchen mit dem Epidermal Growth Factor (EGF) erreicht werden, der als Positivkontrolle für den Nachweis der MAPK-Aktivierung eingesetzt wurde. Jedoch konnte nur die Aktivierung der Isoform Erk2 (p44) berücksichtigt werden, da Erk1 (p42) aus ungeklärten Gründen bei der Detektion mit dem total-Erk1/2-Antikörper Signalausfälle generierte. EGF aktiviert nach Bindung an seinen Transmembranrezeptor (EGF-Rezeptor, EGFR) den MAPK Erk1/2 Signalweg, was wiederum zur Translokation der Erk1/2 in den Zellkern führt. Der Einfluss auf die Zellproliferation

wird im Anschluss durch die Transkriptionsaktivierung verschiedener Onkogene wie c-fos und c-myc erreicht, die als Induktoren von Cyclin D fungieren und somit den Zellzyklus in Gang setzen können. Dieser mitogene Effekt von EGF konnte im Rahmen der durchgeführten MTS-Assays zum E<sub>2</sub>-vermittelten Wachstum der MCF-7 Zellen nachgewiesen werden (siehe 3.1.3). In Abhängigkeit vom jeweiligen Experiment und dem Zustand der Zellen zeigte sich bei einer verwendeten Konzentration von 10<sup>-10</sup>M E<sub>2</sub> und einer Stimulationsdauer von 5 Minuten eine Erhöhung des MAPK-Phosphorylierungsstatus um einen Faktor 3-10 gegenüber unbehandelten Zellen. Der Nachweis der schnellen E<sub>2</sub>-vermittelten MAPK-Aktivierung in der ER-positiven Zelllinie MCF-7 wurde erstmalig von Migliaccio *et al.* (1996) erbracht. In der genannten Arbeit wurde die MAPK Erk2 aus Zelllysaten mit einem anti-Erk-2 Antikörper immunpräzipitiert und deren Aktivität als MBP-Phosphorylierung gemessen (MBP= Myelin Basic Protein, dient als Substrat für Phosphorylierungsreaktionen). Es wurde eine Aktivierung bereits nach 2 Minuten gezeigt, die nach 60 Minuten wieder den Basislevel erreichte. Ein Maß für die Stärke der Aktivierung wurde nicht angegeben. Die Ergebnisse einer weiteren Arbeit (Filardo *et al.*, 2000) sind mit der erzielten MAPK-Aktivierung in dieser Arbeit methodisch besser zu vergleichen. Ebenfalls mit der Western-Blot Technik wurde mit 10<sup>-9</sup>M E<sub>2</sub> nach 5 Minuten Stimulation eine 5-10 fache Erhöhung der MAPK-Aktivität gemessen (dort phospho-Erk1/2 bezogen auf total-Erk2), die nach 10 min stark auf nur ein Viertel abnahm, was sich mit den beschriebenen Ergebnissen deckt. Song *et al.* (2002) konnte ebenfalls die Aktivierung von p44 und p42 nach Induktion mit 10<sup>-10</sup>M nachweisen. Die Gruppe zeigte in ihrer Arbeit des Weiteren eine zeitabhängige MAPK-Aktivierung (0-30 min), wobei der Peak bei einer Stimulationsdauer von 15 min lag. Bei den selbst durchgeführten Stimulationen hingegen lag der Peak der Aktivierung bei einer Stimulationsdauer von 5 min während eine längere E<sub>2</sub>-Inkubation zu einer wesentlich geringeren Aktivierung führte (Abb. 3.4). Die unterschiedlichen Zeitpunkte der bestmöglichen Stimulierbarkeit der MAPK können verschiedene Gründe haben. In Frage kommen beispielsweise die Verwendung unterschiedlicher Zellkulturmedien, der Zustand der Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation (Hungerphase), die Kultivierungsdauer einer Zellpopulation (Passagenanzahl) oder die Expression des ER bzw. mER, die wie bereits beschrieben von vielen Faktoren beeinflussbar ist.

Zur Blockierung der MAP-Kinase-Kinase MEK wurde der MEK-Inhibitor PD98059 verwendet. Dieses Kontrollexperiment sollte belegen, dass die Aktivierung von Erk1/2 über den bekannten Signalweg Ras/Raf/MEK/Erk1/2 abläuft und nicht über einen abweichenden, möglicherweise unbekanntem MAPK Aktivierungsmechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation der MCF-7 Zellen mit 23 $\mu$ M PD98059 keine anschließende E<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung von Erk1/2 ermöglichte und der Phosphorylierungsstatus weit unter dem ausschließlich E<sub>2</sub>-behandelter Zellen und auch unter dem unbehandelter Zellen lag (Abb. 3.5). Auch die Aktivierung mit EGF wurde durch PD98059 stark eingedämmt. Trotz ähnlicher Methodik zeigte die Vorbehandlung mit PD98059 in der Arbeit von Song *et al.* (2002) keine so deutliche und auffallend inhibitorische Wirkung. Die ausschließliche Behandlung mit dem MEK-Inhibitor führte nicht zu einer Herabsetzung gegenüber unbehandelten Zellen und die anschließende E<sub>2</sub>-Stimulation erreichte ein Niveau nur wenig unterhalb der alleinigen E<sub>2</sub>-Behandlung. Dass die MEK-Inhibitor-Behandlung das MAPK-Phosphorylierungsniveau in den selbst durchgeführten Versuchen weit unter das Niveau der Basisstimulation der unbehandelten Kontrollzellen bis zur Detektionsgrenze herabsetzte (Abb. 3.5, Bande 2 und 6), ist ein Hinweis darauf, dass die Basisstimulation auch über den gängigen Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg entstehen muss und nicht etwa über andere zelluläre Mechanismen.

Vorstellungen über die Signalweiterleitung zur Aktivierung der MAPK durch Östrogen

Zur Aufklärung und Erstellung von Modellen über welche Mechanismen und Proteinwechselwirkungen es zur Signalweiterleitung ausgehend von der E<sub>2</sub>-Bindung an bzw. nahe der Plasmamembran bis hin zur Aktivierung der MAPK kommt, wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen. Es wird angenommen, dass die Bildung eines großen membrannahen Proteinkomplexes, in dessen Zentrum der Östrogenrezeptor ER $\alpha$  steht, eine entscheidende Rolle in der Entstehung E<sub>2</sub>-vermittelter nichtgenomischer Effekte in Brustkrebszellen spielt (Song und Santen, 2006). Die E<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung vieler Signalwege wird durch die Bildung großer Multiproteinkomplexe reguliert, die zur nachfolgenden Aktivierung der MAPK und AKT1 führen. Bezüglich der Bildung des ER-zentrierten Multiproteinkomplexes wurde von der Einbindung zahlreicher Proteine berichtet, die als Bestandteile großer Komplexe interagierender Proteine fungieren. Zur Bildung dieses Multiproteinkomplexes, dem

sogenannten „Activating Particle“, soll zu Anfang die Bindung des ER an die c-Src-Tyrosinkinase (Src) stehen (Migliaccio *et al.*, 2000; 2002; Barletta *et al.*, 2004), worauf die Interaktion mit weiteren Proteinen wie Shc1 (Song *et al.*, 2002), PELP1 (Modulator Nichtgenomischer Aktivität des ER, auch MNAR genannt) (Barletta *et al.*, 2004), PIK3R1 (auch bekannt als p85 $\alpha$  Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase) (Simoncini *et al.*, 2000), Caveolinen (Razandi *et al.*, 2002) und G-Proteinen (Wyckhoff *et al.*, 2001) folgt (Song *et al.*, 2005). Es wurde auch der Terminus „Signalsome“ vorgeschlagen, der die Bildung von Proteinkomplexen beschreibt, die sich aus IGF1-Rezeptor/Shc1/ER $\alpha$  oder EGF-Rezeptor/G-Protein/Src zusammensetzen und sich in MCF-7 Zellen als Antwort auf E<sub>2</sub> schnell bilden (Levin, 2005). Vermittelt über die genannten Proteine aktiviert E<sub>2</sub> die Shc1/MAPK- und PI3-Kinase/AKT1-Signalwege, die wahrscheinlich die Hauptverursacher der Zellproliferation und des Zellüberlebens sind. Eine Übersicht über die möglichen Interaktionen zeigt die Abb. 4.1. Studien, die sich mit dem Mechanismus der E<sub>2</sub>-induzierten MAPK und AKT Aktivierung in Brustkrebszellen beschäftigen, haben ihre Bemühungen zunehmend auf die Involvierung der klassischen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem EGF- und IGF1-Rezeptor, konzentriert. E<sub>2</sub> kann demnach durch Hinzunahme bzw. Transaktivierung der EGF- oder IGF1-Rezeptor-Signalwege, deren Downstream-Adapterproteine nutzen, um Signale zu übermitteln, die in der Aktivierung von MAPK und AKT münden (Kahlert *et al.*, 2000; Levin, 2003). Die Einbindung des EGF-Rezeptors konnte dadurch nachgewiesen werden, dass das Ausschalten des Adaptermoleküls Shc1 die E<sub>2</sub>-induzierte MAPK-Aktivierung blockierte (Song *et al.*, 2002). Nach wie vor besteht die Frage warum die ER-vermittelten, nichtgenomischen E<sub>2</sub>-Wirkungen die Bildung eines solch großen Proteinkomplexes erfordern. Wenn es Substanzen gäbe, die imstande wären diese Komplexe aufzuspalten, könnten sie dazu dienen, die membranvermittelten E<sub>2</sub>-Effekte zu beeinträchtigen. Da sowohl genomische als auch nichtgenomische Wirkungen Einfluss auf die Proliferation und Apoptose haben, könnten die beschriebenen Proteininteraktionen therapeutische Relevanz in der Behandlung von östrogenabhängigem Brustkrebs bekommen.

Kontrovers diskutiert wird weiterhin die Frage wie es zur Lokalisation des klassischen ER an der Plasmamembran kommen kann. Der klassische ER besitzt weder transmembranäre Domänen noch intrinsische Kinase- oder Phosphataseaktivität und

auch keine Myristoylierungsstellen, um in die Membran rekrutiert zu werden. Einige Hinweise auf posttranslationale ER $\alpha$  Modifikationen konnten vor kurzem erbracht werden, die die membrannahe Lokalisierung begünstigen könnten. Razandi *et al.* (2003) fanden heraus, dass der Serinrest 522 in der Östrogenbindungsdomäne des ER $\alpha$  ein kritischer Faktor bei der Membrantranslokation in Interaktion mit dem Protein Caveolin-1 ist. Einschränkend war jedoch die Erkenntnis, dass nach Expression einer ER $\alpha$  Serin-522-Alanin Mutante in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary), die Membranlokalisierung und MAPK-Stimulation nicht gänzlich aufgehoben werden konnte, was schließen lässt, dass das Serin 522 nicht die alleinige Basis für die Membranlokalisierung sein kann. Caveolin-1 wurde zuvor für den reversiblen Transport des ER vom Cytosol zur Membran vorgeschlagen (Razandi *et al.*, 2002) und Caveolen wurden bereits mehrfach als Orte erwähnt, an denen Signalwirkungen bzw. Proteinkomplexe bevorzugt entstehen können. Zudem konnten in den Caveolen und der Zellmembran von Endothelzellen endogene ER $\alpha$ - und ER $\beta$ - Rezeptoren von 67 und 54kDa mit Antikörpern gegen den klassischen, nukleären ER $\alpha$  und ER $\beta$  identifiziert werden (Chambliss *et al.*, 2002). Diese Arbeit gibt einen der wenigen Hinweise auf die Einbindung des ER $\beta$  in nichtgenomische Zusammenhänge. Die Erkenntnisse von Razandi *et al.* wurden kurze Zeit später durch die Entdeckung übertroffen, dass der ER $\alpha$  durch Palmitoylierung am Cystein 447 modifiziert wird. Die Modifikation durch Palmitoylierung soll ein bestimmender Faktor sowohl bei der Lokalisation des ER $\alpha$  an der Plasmamembran als auch der Interaktion mit Caveolin-1 sein. Darüber hinaus soll diese Modifikation verantwortlich sein für die E<sub>2</sub>-induzierte Aktivierung der MAPK/Erk und PI3K/AKT Signaltransduktionswege. Östradiol selbst soll zur Depalmitoylierung des ER $\alpha$  und seiner Dissoziation von Caveolin-1 führen, was ihn zur Relokation in andere bekannte Partner-Proteinkomplexe (wie beschrieben) freigeben würde (Acconcia *et al.*, 2004; 2005).

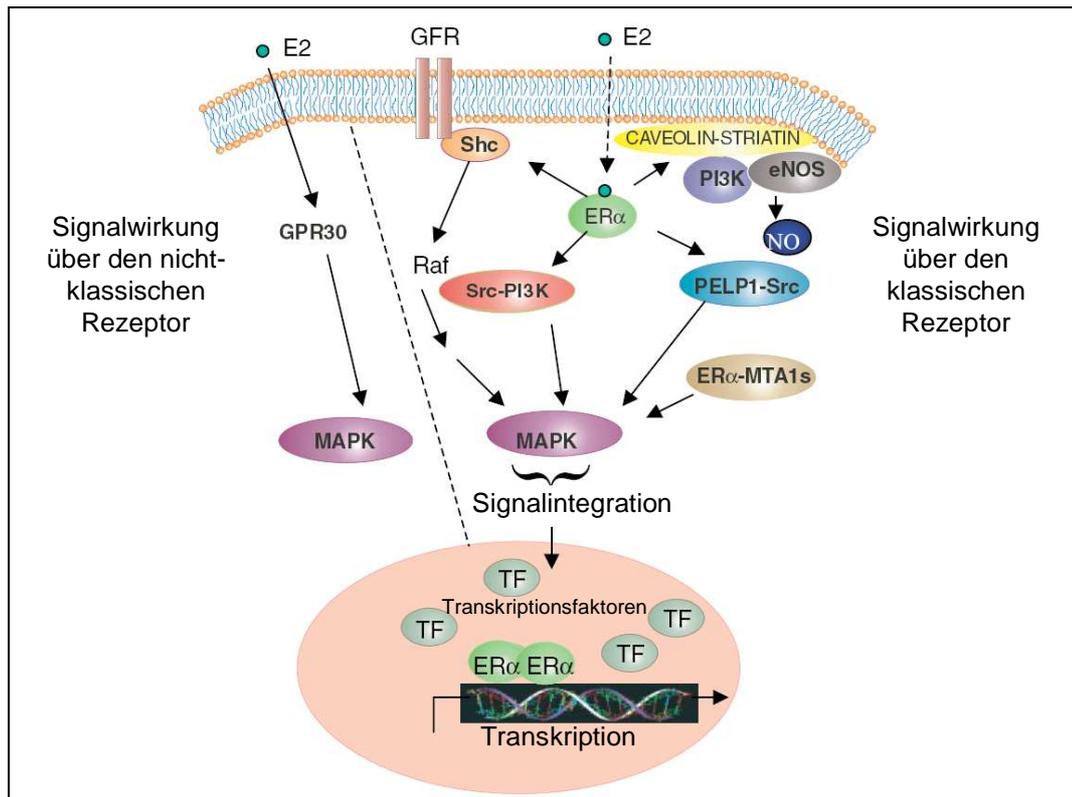


Abb. 4.1: Modell zur derzeitigen Vorstellung der Östrogenwirkung unter Einbeziehung der möglichen Signalkomplexe, in die der Östrogenrezeptor ER involviert sein kann. Sowohl klassischer als auch nicht-klassischer Rezeptor sowie genomische und nichtgenomische Wirkungen sind berücksichtigt. (GFR, Wachstumsfaktorrezeptor, TF, Transkriptionsfaktor) (modifiziert nach Manavathi und Kumar, Journal of Cellular Physiology, 2006)

### 4.3 Beeinflussung der E<sub>2</sub>-vermittelten MAPK-Aktivierung durch therapeutisch relevante Antiöstrogene

Der seit langem etablierte klinische Einsatz von Antiöstrogenen in der Behandlung von östrogenabhängigen Brustkrebs und postmenopausalen Beschwerden, basiert auf der Blockierung des Östrogenrezeptors als therapeutischem Ziel. Der ER Status ist daher seit langem ein prognostischer Faktor für die Anwendung und den Erfolg einer endokrinen Therapie. Während nur 6-10% normaler Mammaepithelzellen den ER exprimieren, sind es in primären Mammatumoren 60% (Dickson *et al.*, 1988; Jacquemier *et al.*, 1990). Zwar sprechen zwei Drittel der fortgeschrittenen ER-positiven Mammakarzinome auf eine Therapie mit Antiöstrogenen wie Tamoxifen an, aber die Mehrheit dieser Tumore entwickelt trotz anfänglichem Ansprechen eine Resistenz (Harris *et al.*, 1991). Die Gründe der Resistenzentstehung sind noch nicht gut verstanden und Bestandteil intensiver Forschung. Ein kritischer Faktor scheint jedoch

der Cross-Talk zwischen dem ER und Wachstumsfaktor-Signalwegen zu sein (Gururaj *et al.*, 2006), womit die Involvierung nichtgenomischer Wirkungen von wesentlicher Bedeutung wird. Das bekannteste reine Antiöstrogen (Fulvestrant) und die beiden prominentesten SERMs (Tamoxifen und Raloxifen) wurden auf ihre Wirkung auf die E<sub>2</sub>-vermittelte MAPK-Aktivierung in MCF-7 Zellen untersucht.

Es gibt schnelle Östrogeneffekte, die sensitiv sind auf eine Behandlung mit dem reinen Antiöstrogen Fulvestrant (ICI 182,780 (ICI)) während andere Effekte insensitive auf ICI reagieren. Beispielsweise werden die MAPK-Aktivierung in Adipozyten (Dos Santos, 2002) und die Freisetzung von NO (Stickstoffmonoxid) aus Endothelzellen (Chambliss *et al.*, 2000) von ICI 182,780 aufgehoben. Keinen Einfluss hat der Antagonist auf die MAPK-Aktivierung in Granulozyten (Stefano *et al.*, 2000) und in Hirnzellen (Singh *et al.*, 1999). Die Calcium-Mobilisierung in Osteoblasten (Le Mellay *et al.*, 1997; Lieberherr *et al.*, 1993) wird ebenfalls nicht von ICI beeinflusst. In den MCF-7 Mammakarzinomzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein deutlicher Effekt von ICI 182,780 (10<sup>-9</sup>-10<sup>-8</sup>M) auf die MAPK-Aktivierung gemessen werden (siehe Abb. 3.6). Die E<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung von Erk1/2 konnte in diesen Zellen durch Vorinkubation mit ICI vollständig blockiert werden auf einen Phosphorylierungslevel wie es unbehandelte Zellen aufwiesen. Dies ist ein starkes Indiz für die Einbindung und Notwendigkeit des klassischen Östrogenrezeptors zur Vermittlung der E<sub>2</sub>-abhängigen MAPK-Antwort in diesem Zelltyp, da ICI im Gegensatz zu SERMs keinerlei östrogene Wirkung besitzt, die Dimerisierung des ER verhindert und dessen Abbau fördert. Song *et al.* (2002) konnten ebenfalls eine Blockierung der E<sub>2</sub>-vermittelten MAPK Aktivierung zeigen, die aber augenscheinlich (densitometrische Quantifizierung liegt dort nicht vor) nicht so stark ausfiel und noch deutlich über dem Aktivierungslevel unbehandelter Zellen lag. Migliaccio *et al.* (1996) und Improta-Brears *et al.* (1999) zeigten auch eine Blockierung in MCF-7 Zellen, die aber aufgrund der unterschiedlichen Methodik schlecht verglichen werden kann. Bezüglich der alleinigen Inkubation der Zellen mit ICI (Abb. 3.6, Bande 3 und 4) zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen dem eigenen Resultat und den verschiedenen Quellen untereinander. Während bei Song *et al.* (2002) 10<sup>-9</sup>M ICI (30 min Inkubation) keine Veränderung zur Kontrolle zeigte, erbrachte bei Filardo *et al.* eine 5-minütige ICI-Inkubation (mit allerdings 10<sup>-6</sup>M) von MCF-7 Zellen eine neunfache Erk1/2-

Aktivierung gegenüber unbehandelten Zellen, die sogar das Signal von E<sub>2</sub> übertraf. Diese unwahrscheinliche Aktivierung wurde aber bisher nicht von anderen Gruppen verifiziert. In den eigenen Versuchen war der MAPK-Aktivierungslevel gegenüber unbehandelten Zellen leicht erhöht (2x), lag aber weit unterhalb der E<sub>2</sub>-Stimulation (5x). Da Filardo *et al.* (2000; 2002a) dieses Resultat auch in der ER-negativen Zelllinie SKBR3 erhielten, schlossen sie daraus, dass bei der Aktivierung der MAPK, die sie mit E<sub>2</sub> und ICI erreichten, der ER nicht involviert ist. Eine Vorbehandlung mit ICI und anschließender E<sub>2</sub>-Stimulation führten sie jedoch nicht durch. Sie schlugen vor, dass E<sub>2</sub> G-Proteine über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPR30) aktiviert, was aber zumindest für Brustkrebszellen entkräftet werden konnte, da Antisensenukleotide gegen GPR30 die E<sub>2</sub>-vermittelte Erk1/2 Antwort nicht unterdrücken konnten (Ahola *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde die gleichzeitige Aktivierbarkeit durch sowohl E<sub>2</sub> als auch ICI als atypisch bezeichnet und in Frage gestellt (Levin, 2005). Dennoch hat der alternative nicht-ER-Rezeptor GPR30 in jüngster Vergangenheit als membranständiger, nonnukleärer Vermittler von E<sub>2</sub>-Signalen großes Interesse geweckt (Manavathi und Kumar, 2006), obwohl sich ein Großteil der Befunde auf Beobachtungen in der ER $\alpha$ -negativen Zelllinie SKBR-3 stützt. Darauf wird in 4.5 noch näher eingegangen.

Die gleichen Inkubationsvarianten (Antiöstrogen allein und in Kombination mit E<sub>2</sub>) wurden auch mit den beiden SERMs Tamoxifen (TAM) und Raloxifen (RAL) durchgeführt. Beide SERMs konnten wirkungsvoll die Aktivierung der MAPK Erk1/2 durch E<sub>2</sub> unterbinden (Abb. 3.7 und 3.8). Nach Vorinkubation der MCF-7 Zellen mit den SERMs war trotz 5-minütigem E<sub>2</sub>-Stimulus der MAPK-Phosphorylierungsstatus gegenüber unbehandelten Zellen im Falle von Raloxifen unverändert bzw. sogar leicht abgesenkt und bei Tamoxifen-Inkubation war er leicht erhöht gegenüber unbehandelten Zellen. Die 30-minütige Blockierung des ER durch die SERMs unterbindet somit die schnelle Erk1/2 Aktivierung durch einen 5-minütigen E<sub>2</sub>-Stimulus, was ebenfalls ein Indiz für die Notwendigkeit des klassischen ER zur schnellen MAPK-Aktivierung darstellt. Die Unterschiede in der Ausprägung dieser Inhibition der E<sub>2</sub>-vermittelten MAPK-Aktivierung können an der unterschiedlichen Art der Bindung SERM-ER liegen, die zu unterschiedlichen Konformationen führen (Paige *et al.*, 1999). Die Bindung von Raloxifen an den ER führt gegenüber E<sub>2</sub> beispielsweise zu einer stark veränderten Position der Helix 12 in der Ligandenbindungsdomäne (Brzozowski *et al.*,

1997; Pike *et al.*, 1999). Für die Einbindung des ER in einen Multiproteinkomplex und die Signalweiterleitung nahe der Plasmamembran kann dies Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der MAPK erklären.

Die alleinige 30-minütige Inkubation der Zellen mit TAM und RAL zeigte eine leicht agonistische Wirkung auf die MAPK, die jedoch weit unterhalb der Stimulation durch  $E_2$  lag. Da es sich um relative, densitometrisch bestimmte Aktivierungswerte gegenüber unbehandelten Zellen handelt, besteht die Möglichkeit, dass die leichte Erhöhung darauf beruht, dass der Basislevel der unbehandelten Zellen in diesem Fall besonders niedrig ausfiel und die darauf bezogenen Werte der anderen Proben dementsprechend größer erscheinen. Derartige Unterschiede aufgrund des Basislevels der Erk1/2 fanden bereits zuvor Erwähnung in ähnlichen Untersuchungen (Filardo *et al.*, 2000). Eine direkt stimulierende Wirkung von Tamoxifen auf die MAPK ist eher unwahrscheinlich und wird als kontrovers angesehen, obwohl bereits ein solcher Bericht veröffentlicht wurde (Duh *et al.*, 1997). Raloxifen hingegen konnte eine schnelle, stimulierende Wirkung, wie sie auch  $E_2$  ausübt, in Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden. Bereits nach einer Inkubation von 5 Minuten führte es zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Simoncini *et al.*, 2002a). Es war zu diesem Zeitpunkt bereits bekannt, dass die eNOS von Östrogen über den MAPK-Erk1/2-Signalweg (Chen *et al.*, 1999), sowie den PI3K/AKT-Signalweg (Simoncini *et al.*, 2000; Hisamoto *et al.*, 2001; Haynes *et al.*, 2000) aktiviert werden kann. Die durch Simoncini *et al.* (2002a) nachgewiesene schnelle eNOS-Aktivierung durch Raloxifen war jedoch hemmbar durch den MEK-Inhibitor PD98059 und das reine Antiöstrogen ICI 182,780, was eine Involvierung der MAPK und eine Signalleitung über den ER nahe legt. Daher ist es durchaus möglich, dass es sich bei der gezeigten leichten Erhöhung der MAPK-Aktivität nach 30-minütiger Inkubation mit RAL um eine echte Stimulationswirkung (Faktor 1,5 bis 2) handelt (Abb. 3.8, Bande 2-4). Zumindest bei der höchsten eingesetzten RAL Konzentration von  $10^{-7}$  M dürfte die Besetzung des ER durch RAL bei optimalen 80-100% gelegen haben. Dieser Wert wurde in MCF-7 Zellen bereits für die RAL Konzentrationen von  $10^{-7}$  bis  $10^{-6}$  M belegt (Wijayaratne *et al.*, 1999).

Alle drei verwendeten Antiöstrogene konnten nach Vorbehandlung der Zellen eine schnelle  $E_2$ -vermittelte MAPK Aktivierung aufheben. Das spricht stark für die Einbindung des klassischen ER in die nichtgenomische Weiterleitung von Signalen zur

MAPK Erk1/2. Die hier gezeigte Inhibition beruht auf der antagonistischen Wirkung der Antiöstrogene auf die E<sub>2</sub>-Signalwirkung zur MAPK. Da SERMs im Gegensatz zu reinen Antiöstrogenen jedoch keine vollständige Inhibition der ER Wirkung bzw. beider Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 bedingen, weisen sie nicht nur eine Gewebespezifität auf, sondern können auch im gleichen Zell-/Gewebetyp antagonistisch und agonistisch wirken. So kann Tamoxifen bei Brustkrebs auch als Agonist wirken, was zur Entstehung der problematischen Resistenz auf Tamoxifen beitragen könnte. Der bereits angesprochene Cross-Talk zwischen dem ER und Mitgliedern der EGFR-Familie insbesondere ErbB2 (HER-2) spielt dabei eine Rolle. Im Falle der Überexpression von ErbB2 in Brustkrebszellen (MCF-7) konnte gezeigt werden, dass TAM durch einen gesteigerten Crosstalk sowohl den ER als auch ErbB2 aktiviert, was zu einer nachfolgenden Signalwirkung über Erk und PI3K zur Phosphorylierung des Co-Aktivators AIB1 führt (Shou *et al.*, 2004). Die Hemmung des Rezeptor-Cross-Talks konnte die antagonistische Wirkung von TAM wiederherstellen. Dieses Beispiel veranschaulicht die integrative Signalwirkung von der Membran zur kinaseinduzierten Transkription, was zu tumorfördernden Wirkungen von Östrogen *in vivo* und sogar zur Resistenz gegenüber SERMs beitragen könnte. Die Weiterentwicklung von SERMs könnte daher eine Zukunft in der effektiven, zielgerichteten Wirkung auf bestimmte Rezeptor pools (nukleär oder membranständig) haben.

#### **4.4 Der Stellenwert des membranimpermeablen Konjugates E<sub>2</sub>-BSA zum Nachweis nichtgenomischer E<sub>2</sub>-Wirkungen**

Ob der Östrogenrezeptor die Plasmamembran durchdringen kann oder eine extrazelluläre Ligandenbindungsregion enthält, ist umstritten. E<sub>2</sub>-BSA ist ein membranimpermeables Östrogenkonjugat, das dazu verwendet werden kann, die Wirkung von Östradiol auf membran-nahe ERs zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von E<sub>2</sub>-BSA auf die Aktivierung der MAPK Erk1/2 untersucht und mit der Wirkung von E<sub>2</sub> verglichen. Einige Labore haben bereits die Meinung vertreten, dass das Konjugat nicht in Zellen eindringen kann und auch nicht den nukleären ER binden bzw. aktivieren kann (genomische Wirkung) (Watters *et al.*, 1997; Razandi *et al.*, 1999; 2000). Es wurde bereits zuvor von nichtgenomischen Effekten von E<sub>2</sub>-BSA berichtet. In Granulozyten führt es zur Freisetzung von NO (Stefano *et al.*, 2000) und in T-Zellen zur

Calcium-Freisetzung (Benten *et al.*, 1998); in Adipozyten (Dos Santos *et al.*, 2002) sowie Neuroblastom-Zellen (Watters *et al.*, 1997) konnte eine Aktivierung der MAPK mit E<sub>2</sub>-BSA nachgewiesen werden.

Die Stabilität des Konjugates wurde indes bereits stark angezweifelt. Es wurde berichtet, dass kommerziell hergestelltes E<sub>2</sub>-BSA wesentlich in BSA und E<sub>2</sub> dissoziiert (Stevis *et al.*, 1999), was Filtration und einen sorgsamem Umgang erfordert. Darüber hinaus ist bekannt, dass BSA in die Caveolen der Plasmamembran aufgenommen werden kann (Tiruppathi *et al.*, 2004). Auf diese Weise könnte E<sub>2</sub>-BSA Zugang zum ER über diese Plasmamembran-Invaginationen bekommen und würde seinen rein extrazellulären Aspekt verlieren. Für die Verwendung in MAPK-Stimulationsexperimenten wurde E<sub>2</sub>-BSA, wie es bei Stevis *et al.* (1999) nahe gelegt wird, direkt vor den Versuchen über Aufkonzentrierungsröhrchen filtriert. Sowohl das Konjugat enthaltende Retentat als auch das Filtrat wurden zur Stimulation von MCF-7 Zellen vergleichend mit E<sub>2</sub> eingesetzt (siehe 3.7.1). Zwar erreichten die verwendeten Konzentrationen des E<sub>2</sub>-BSA Retentats annähernd das Stimulationsniveau von E<sub>2</sub> allein, allerdings bewirkte die Inkubation mit dem Filtrat eine Erk1/2 Aktivierung, die nur gering darunter lag. Der dissoziierte Anteil von E<sub>2</sub> muss demnach erheblich gewesen sein, da er gegenüber unbehandelten Zellen eine 4fache MAPK-Aktivierung bewirkte. Die Aktivierung durch das Filtrat kann nur durch dissoziiertes, abfiltriertes E<sub>2</sub> verursacht worden sein, was den Bericht von Stevis *et al.* (1999) untermauert. Somit kann beim Einsatz von E<sub>2</sub>-BSA die Anwesenheit von freiem E<sub>2</sub> selbst nach vorhergehender Filtration nicht ausgeschlossen werden.

Das fluoreszenzmarkierte Konjugat E<sub>2</sub>-BSA-FITC wurde mit MCF-7 Zellen inkubiert, um mögliche Bindungsstellen für Östradiol an der Zellmembran sichtbar zu machen (siehe 3.7.3). Die Auswertung über konfokale Laserscanning Mikroskopie (CSLM) zeigte keine intrazelluläre Fluoreszenz, was nahe legt, dass das Konjugat die Zellmembran nicht durchdringen konnte. An der Zelloberfläche konnte in einem Teil der Zellen eine E<sub>2</sub>-BSA-Bindung detektiert werden. Aufgrund der Konkurrenzexperimente mit E<sub>2</sub> und BSA scheint es sich dabei tatsächlich um spezifische Bindungsstellen für Östradiol zu handeln. Ob diese direkt außen an der Zellmembran vorhanden sind oder nach der einstündigen Inkubation die Detektion durch eine mögliche Bindung nach Internalisation in Caveolen verursacht wurde, ist aus

diesem Befund ebenso wenig abzuleiten, wie die Tatsache, ob es sich bei den Bindungspartnern um den klassischen ER $\alpha$  handelt. Es konnte auch von anderen Arbeitsgruppen der Nachweis von Bindungsstellen für Östradiol an der Zellmembran in MCF-7 Zellen (Berthois *et al.*, 1986; Tassignon *et al.*, 1997; Taguchi *et al.*, 2004) und anderen Zelllinien (Pappas *et al.*, 1995b; Razandi *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2000) mit dem Konjugat E<sub>2</sub>-BSA-FITC erbracht werden. Zur näheren Charakterisierung der Bindungsstellen an der Membran wurde versucht mit Antikörpern gegen den klassischen ER $\alpha$ , Bindungsstellen auf der Oberfläche von MCF-7 Zellen nachzuweisen. Sowohl mit einem C-terminalen (MC-20) als auch einem N-terminalen (H-184) Antikörper konnte mit konfokaler Laser Scanning Mikroskopie an intakten Zellen jedoch keinerlei Membranbindung detektiert werden. Nach Permeabilisierung der Zellen waren hingegen die Östrogenrezeptoren im Zytoplasma mit einem starken Fluoreszenzsignal detektierbar. Das größte Problem beim Versuch mit Antikörpern Bindungsstellen für Östradiol an der Zellmembran nachzuweisen, ist die Tatsache, dass es umstritten ist, ob der ER trotz fehlender Transmembranstruktur in die Plasmamembran ein- bzw. sie durchdringen kann und somit überhaupt von außerhalb der Zelle zugänglich ist. Andererseits ist unklar, ob Zellen möglicherweise doch permeable Bereiche für Antikörper aufweisen oder Antikörper den ER bei längerer Inkubation innerhalb von Membraneinstülpungen detektieren können. Zwar berichteten einige Autoren (Pappas *et al.*, 1995b; Watson *et al.*, 1999b) von einem speziellen Antikörper mit dem sie den ER an der Membran von GH3/B6 Zellen detektieren können, es wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert auf welche Weise dies genau möglich ist. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Antikörper MC-20 und H-184 waren in MCF-7 Zellen nicht in der Lage, den ER an der Membran zu detektieren.

Die Untersuchung auf mögliche Dissoziationseffekte des membranimpermeablen Konjugates E<sub>2</sub>-BSA in E<sub>2</sub> und BSA ist bedeutend für die Aussagekraft E<sub>2</sub>-BSA-induzierter Effekte. Wenn es darum geht, diese Effekte der membranannalen Signalweiterleitung über den ER zuzuordnen, muss sichergestellt werden, dass E<sub>2</sub> von der Zellmembran ausgehend agiert und nicht ungehindert das Zellinnere erreichen kann. Um die E<sub>2</sub>-Dissoziation, die wie oben beschrieben im Western-Blot zu einer deutlichen Aktivierung der MAPK durch das E<sub>2</sub>-BSA Filtrat führte, eingehender zu erforschen, wurde die genomische Wirkung von E<sub>2</sub>-BSA experimentell untersucht. Als Indikator für

die klassische E<sub>2</sub>-vermittelte Genaktivierung wurde der Expressionsstatus des Cathepsin D (Cath D) Gens gewählt. Das proteolytische Enzym Cath D (Aspartat-Protease) ist in Lysosomen lokalisiert und wird in den Extrazellulärraum sekretiert. Es wird in MCF-7 Brustkrebszellen exprimiert und seine Sekretion durch 17β-Östradiol (E<sub>2</sub>) induziert (Morisset *et al.*, 1986; Biegel and Safe, 1990). Die Expression von Cath D steht unter komplexer hormonaler und mitogener Kontrolle, die zell- und gewebespezifisch ist. Die proteolytische Aktivität von Cath D fördert die Tumorinvasion und –metastasierung bei Brustkrebs, weshalb Cath D bereits als prognostischer Indikator für Rezidive und Metastasierung vorgeschlagen wurde (Spyratos *et al.*, 1989; Westley *et al.*, 1996; Rochefort, 1990). Um sich weiterzuerbreiten, überexprimieren Tumorzellen Proteasen, die die Invasion von Krebszellen durch Verdauung der extrazellulären Matrix des umgebenden gesunden Gewebes ermöglichen (Duffy *et al.*, 1992). Menschliche Brustkrebszellen exprimieren bis zu 30fach mehr Cath D mRNA als normale Brustzellen (Rochefort, 1990). In MCF-7 Zellen induziert E<sub>2</sub> einen bis zu 10fachen Anstieg des Cath D mRNA Levels, der durch Cycloheximid nicht hemmbar ist, was auf eine erhöhte Transkriptionsrate hinweist (Cavaillès *et al.*, 1988). Die durch mehrere Publikationen abgesicherte starke Anhebung des Cath D Expressionsstatus in MCF-7 Zellen durch E<sub>2</sub> war eine geeignete Voraussetzung zur Ermittlung der genomischen Wirkung von E<sub>2</sub>-BSA auf diese Zellen. Der mRNA Expressionsstatus wurde in einem Zeitrahmen von 0 bis 24 h mittels RT-PCR ermittelt. Wie zu erwarten war, konnte durch E<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup> und 10<sup>-10</sup> M) die relative Cath D Expression in diesem Zeitraum mehr als verdoppelt werden, was nahe legt, das E<sub>2</sub> über seine genomische Wirkungsweise die Transkriptionsaktivierung ausgelöst hat (Abb. 3.11). Ein deutlicher Unterschied war zur Inkubation mit dem ER-Antagonisten Tamoxifen auszumachen, der sich während des gesamten Inkubationszeitrahmens um eine relative Expression von 1 (unbehandelte Zellen) bewegte. Tamoxifen, das partiell agonistisch auf den ER in Brustkrebszellen wirkt, zeigte eine weitgehend unveränderte Cath D Expression gegenüber unbehandelten Zellen. Gegensätzliche Beobachtungen wiesen nach, dass Tamoxifen eine östrogene Wirkung auf die Cath D Expression ausübte (Johnson *et al.*, 1989; Maudelonde *et al.*, 1989; Chalbos *et al.*, 1993; Dabrosin *et al.*, 2004). Jedoch stehen diese Befunde im Widerspruch zur Wirksamkeit von Tamoxifen in der klinischen Anwendung als Adjuvanz bei östrogenabhängigem Brustkrebs. Des Weiteren konnte

auch eine Induktion der Cathepsin D Expression durch Wachstumsfaktoren (IGF-I und EGF) (Cavaillès *et al.*, 1988; 1989; Wang *et al.*, 2000) gezeigt werden.

Die Inkubation mit E<sub>2</sub>-BSA steigerte ebenfalls die Cath D Expression, wobei sich ein Verlauf sowohl unterhalb (10<sup>-7</sup>M E<sub>2</sub>-BSA) als oberhalb (10<sup>-8</sup>M E<sub>2</sub>-BSA) der beiden eingesetzten E<sub>2</sub>-Konzentrationen zeigte (Abb. 3.11). Obwohl E<sub>2</sub>-BSA vor dem experimentellen Einsatz mit einem Aufkonzentrierungsröhrchen von potentiell dissoziiertem E<sub>2</sub> getrennt worden war, zeigte es eine Aktivierung des Cath D Gens, was auf eine genomische Wirkungsweise hinweist. Es ist demnach wahrscheinlich, dass E<sub>2</sub> in dem hier untersuchten Zeitrahmen vom Konjugat abdissoziiert und intrazellulär seine klassische, nukleäre Wirkung entfaltet. Im Gegensatz dazu zeigten Razandi *et al.* (2000), dass E<sub>2</sub>-BSA (nicht wie E<sub>2</sub>) die Reporter-Aktivität von Zellen stimulierte, die zuvor mit einem Estrogen-Responsive-Element (ERE)-Luziferase-Reporter-Konstrukt transfiziert worden waren, was in diesem Fall gegen die Theorie der Dissoziation spricht.

Der Vermutung, dass die gemessene erhöhte Cath D Expression von E<sub>2</sub>-BSA auf eine durch dissoziiertes E<sub>2</sub> herbeigeführte rein genomische Wirkung zurückzuführen ist, sind laut neuerer Daten folgende Argumente entgegenzusetzen. Aktuelle Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass keine klare Abgrenzung zwischen genomischen und nichtgenomischen Wirkungen gemacht werden kann, sondern vielmehr, dass diese Varianten der Östrogenwirkung untrennbar miteinander verknüpft sind. So ist es eventuell möglich, dass eine Signalweiterleitung von der Plasmamembran zum ER und dann in den Zellkern erfolgen kann. Dieser neue als „Nongenomic-to-genomic signaling“ bezeichnete Modus der Transkriptions-Regulation wird in aktuellen Übersichtsartikeln zur Östrogenwirkung behandelt (Levin, 2005; Björnström und Sjöberg, 2005; Manavathi und Kumar, 2006). Da zahlreiche Daten existieren, die eine Verknüpfung von Signaltransduktionsprozessen an nachfolgende Kontrollmechanismen der Gentranskription herstellen, sei exemplarisch ein genau in diesen Zusammenhang passendes Beispiel für den Wachstumsfaktor EGF genannt. Es konnte gezeigt werden, dass membrannahes Östrogen (E<sub>2</sub>) zur Transaktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) oder IGF-Rezeptors (IGFR) führen kann (Kahlert *et al.*, 2000; Filardo, 2002; Keshamouni *et al.*, 2002), was wiederum zur Aktivierung des PI3K-, AKT- oder MAPK-Signalweges führt. Die Wachstumsfaktor-induzierte Stimulation von MAPKs

führt zur direkten Phosphorylierung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  (Kato *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996; Endoh *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 1999), was zur Modulierung der Expression zahlreicher E<sub>2</sub>-responsiver Gene führen kann. Spezifisch für MCF-7-Zellen wurde bereits von einer Transkriptionsaktivierung der Cath D Genexpression durch Wachstumsfaktoren berichtet (Wang *et al.*, 2000). Auf die beschriebene Weise können die nichtgenomischen Wirkungen von Östrogen die Funktionen des ER selbst verändern und den klassischen Mechanismus der E<sub>2</sub> Wirkung erweitern. Zusammenfassend bedeutet dies, das E<sub>2</sub>-BSA unter Umständen durch Anwesenheit im Zellkulturmedium auch ohne Dissoziationserscheinungen und allein durch Anwesenheit von E<sub>2</sub> in Membrannähe die Expression des Zielgens Cath D erhöhen kann. Die bereits erwähnte mögliche Internalisierung von BSA in Caveolen (Tiruppathi *et al.*, 2004) würde überdies die membrannahe Präsenz von E<sub>2</sub> unterstützen (Dissoziation nicht berücksichtigt). Vor dem Hintergrund aller genannten Argumente und Ergebnisse ausgehend von der möglichen Dissoziation, über die mögliche Internalisierung von E<sub>2</sub>-BSA bis hin zur Signalweiterleitung von der Membran (nichtgenomisch) in den Zellkern (genomisch) erscheint E<sub>2</sub>-BSA als ungeeignete Substanz, um die schnellen Wirkungen von E<sub>2</sub> zuverlässig untersuchen zu können.

#### **4.5 Nichtgenomischer Einfluss der stabilen, retroviralen Transfektion des Östrogenrezeptors ER $\alpha$ in Mammakarzinomzellen**

Es wird postuliert, dass eine an der Zellmembran lokalisierte Population des Östrogenrezeptors (ER) für die Weiterleitung schneller, nichtgenomischer Antworten verantwortlich ist. Diese Vorstellung basiert zum einen auf immunhistochemischen Untersuchungen des endogenen membrannahen ER (mER) in GH3/B6/F10-Hypophysentumorzellen aus Ratten unter Verwendung von Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope des nukleären ER gerichtet sind (Pappas *et al.*, 1995b). Zum anderen konnte im gleichen Zelltyp gezeigt werden, dass in Zellen, die mit einem gegen den nukleären ER gerichteten Antisense Oligonukleotid behandelt wurden, keine Detektion des endogenen ER Proteins an der Membran mehr möglich war (Norfleet *et al.*, 1999). Immunhistochemische Analysen neueren Datums mit einer Reihe von Antikörpern gegen verschiedene Epitope des nukleären ER scheinen ebenfalls dafür zu

sprechen, dass der nukleäre und der membranlokalisierte Rezeptor ein und dasselbe Protein sind (Ropero *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2002).

Um die Beteiligung des klassischen Östrogenrezeptors an nichtgenomischen Effekten in Brustkrebszellen zu untersuchen, wurde der Ansatz verfolgt, den ER $\alpha$  über retrovirale Transfektion stabil in die bereits ER-positive Brustkrebszelllinie MCF-7 einzubringen. Durch die Transfektion sollte die ER Population in der ER-positiven Zelllinie künstlich über das normale Maß hinaus erhöht werden. Die Erhöhung der Rezeptoranzahl, die auch die membranlokalisierte Population des ER betreffen würde, sollte sich in einer gesteigerten Aktivierung der MAPK Erk1/2 äußern. Tatsächlich konnte bei der Inkubation von MCF-7 Zellen, die mit dem Expressionsplasmid ER $\alpha$ -S11IN 1x mit Virusüberstand transfiziert worden waren, eine deutliche Steigerung der MAPK Erk1/2 Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Gegenüber dem Leervektor S11IN bewirkte die Inkubation mit  $10^{-9}$ M E<sub>2</sub> für 5 Minuten eine Verdopplung der MAPK-Aktivität. Diese Erhöhung der MAPK-Aktivität war auch bei den geringeren Konzentrationen ( $10^{-10}$  und  $10^{-11}$ M) auszumachen, jedoch zeigten Zellen, die mit Leervektor transfiziert worden waren, dort keine MAPK-Aktivierung gegenüber unbehandelten Zellen. Diese Resultate unterstützen die Annahme, dass der klassische ER mit nichtgenomischen Effekten, in diesem Fall der Signalvermittlung zur MAPK Erk1/2, assoziiert ist. Obwohl die Gesamtzeptormenge künstlich erhöht wurde, ist anzunehmen, dass der membran nahe Anteil für die erhöhte Signalwirkung verantwortlich ist. Für den klassischen ER $\alpha$  als Vermittler von E<sub>2</sub>-Signalen an der Zellmembran sprechen auch neueste massenspektrometrische Daten. Fraktionierte membran- und kernlokalisierte E<sub>2</sub>-bindende Proteine in MCF-7 Brustkrebszellen konnten als ein und dasselbe Protein, den klassischen Östrogenrezeptor ER $\alpha$ , identifiziert werden (Pedram *et al.*, 2006). Die Transfektion des ER wurde bereits in verschiedenen Zelltypen durchgeführt (Razandi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002; Chambliss *et al.*, 2002; Ahola *et al.*, 2002). Dabei wurden vor allem ER-negative Zelltypen ausgewählt. Durch Integration des ER in diese sonst nicht durch E<sub>2</sub> schnell stimulierbaren Zellen, zeigte sich die Induzierbarkeit schneller Effekte, was die Notwendigkeit des ER als Vermittler schneller, nichtgenomischer Wirkungen unterstützt. Dem Gedanken der Integration der ER-Wirkung in ER-Null-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls nachgegangen. Es wurde versucht, den ER $\alpha$  nicht

nur in die ER-positive Zelllinie MCF-7, sondern auch in die ER-negative Zelllinie MDA-MB-231 über retrovirale Transfektion einzubringen, um die schnell vermittelte MAPK Aktivierung in diesen Zellen zu induzieren bzw. zu beeinflussen. Untransfizierte MDA-MB-231 Zellen zeigten nach 5-minütiger  $E_2$ -Stimulation einen sehr hohen Grundaktivierungslevel der MAPK, der wesentlich stärker als bei MCF-7 Zellen war. Der hohe Grad der Aktivierung ermöglichte keine Unterscheidung der MAPK Levels von unbehandelten Zellen, der EGF-Kontrolle und  $E_2$ -Stimulationen. Da auch unbehandelte Zellen diese hohe MAPK-Aktivierung zeigten, ist es möglich, dass sich die Zellen in einem dauerhaften Aktivierungszustand befanden und die Zugabe zusätzlicher Stimulantien eine Erhöhung des MAPK-Phosphorylierungsstatus nicht mehr detektierbar machte. Die mögliche MAPK Daueraktivierung in den ER-negativen MDA-MB-231 Zellen kann nicht durch den ER sondern muss durch einen alternativen Rezeptor vermittelt worden sein. Die durchgeführte Transfektion der Zellen mit dem  $ER\alpha$  konnte daher auch keine sichtbare Veränderung der hohen MAPK Levels gegenüber den untransfizierten Zellen bewirken.

Neben dem klassischen Rezeptor  $ER\alpha$  sind inzwischen eine Reihe weiterer Kandidaten für die Bindung von  $E_2$  in bzw. an der Plasmamembran in zahlreichen Arbeiten vorgeschlagen worden (Song und Santen, 2006). Dazu zählen eine verkürzte, 46kDa große Variante des ER in Endothelzellen (Li *et al.*, 2003), ein einzigartiges Membranprotein mit einer abweichenden Ligandenaffinität, bezeichnet als ER-X, in Neuronen (Toran-Allerand *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2003), das Sex Steroid Binding Protein (SBP) in Interaktion mit dem Membranprotein Megalin (Catalano *et al.*, 1997; Hammes *et al.*, 2005) sowie der G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR30 (Thomas *et al.*, 2005). Letztgenannter GPR30 (Carmeci *et al.*, 1997) wurde als alternativer ER vorgeschlagen. Eine Reaktion auf  $E_2$  konnte sowohl an der Plasmamembran (Filardo *et al.*, 2000) als auch im Endoplasmatischen Retikulum (Revankar *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Interessant ist dieser Rezeptor deshalb, da ihm schnelle  $E_2$ -Wirkungen auch in der in dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7 nachgewiesen werden konnten (Ahola *et al.*, 2002), sowie in Endometriumkarzinomzellen (Vivacqua *et al.*, 2005) und Keratinozyten (Kanda und Watanabe, 2004) und anfänglich vor allem in ER-negativen Zelllinien (Filardo *et al.*, 2000; 2002; Thomas *et al.*, 2005; Revankar *et al.*, 2005). Somit könnte GPR30 eventuell eine

alternative Rolle der E<sub>2</sub> Signalvermittlung *in vivo* zukommen. Bezogen auf MCF-7 Zellen wird GPR30 laut neuesten Erkenntnissen jedoch keine relevante Rolle für die schnellen Wirkungen von E<sub>2</sub> zugesprochen. Der Knock-down von ER mittels siRNA führte zu einem starken Rückgang schneller Wirkungen, während ein 80%iges Silencing von GPR30 die schnellen E<sub>2</sub> Wirkungen in diesen Zellen nicht negativ beeinflusste (Pedram *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse unterstützen ebenfalls die eigenen Ergebnisse, dass eine erhöhte Menge an ER, die E<sub>2</sub>-vermittelte MAPK Aktivität anheben kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Steroidhormon Östrogen entfaltet nach der klassischen Lehrmeinung genomische Wirkungen über die Interaktion mit dem intrazellulären Östrogenrezeptor (ER), was in einer modifizierten Expression spezifischer Gene im Zellkern resultiert. Neuere Befunde weisen zunehmend darauf hin, dass Östrogene auch schnelle, membranvermittelte, als nichtgenomisch bezeichnete Wirkungen innerhalb weniger Minuten hervorrufen können. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Östrogenen sowie Antiöstrogenen auf die nichtgenomische Aktivierung des MAPK-Signalweges in Brustkrebszellen sowie der möglichen Beteiligung des klassischen Östrogenrezeptors ER $\alpha$  an diesen Wirkungen.

In allen Experimenten wurde die ER-positive Zelllinie MCF-7 verwendet. Mit Hilfe des MTS-Proliferationsassays wurden diese Zellen positiv auf östrogenresponsives Wachstum hin getestet. Auf eine 5-minütige Stimulation mit 17 $\beta$ -Östradiol (E<sub>2</sub>) sowie dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF als Positivkontrolle antworteten diese Zellen laut Analyse per SDS-PAGE und Western-Blot mit einer deutlichen Aktivierung der MAPK Erk1/2. Die Aktivierung bei längeren Stimulationen mit E<sub>2</sub> nahm stark ab. Das Ausmaß einer vorhandenen Basisaktivierung der MAPK ohne Zugabe eines externen Stimulanzes konnte auf intrazellulär gebildetes E<sub>2</sub> sowie E<sub>2</sub>-Restmengen im fötalen Kälberserum des Zellkulturmediums zurückgeführt werden. Die schnelle MAPK-Aktivierung durch E<sub>2</sub> war mit dem MEK-Inhibitor PD 98,059 vollständig blockierbar. Die Antiöstrogene ICI 182,780, Tamoxifen und Raloxifen (Blocker für den intrazellulären ER) konnten die E<sub>2</sub>-vermittelte MAPK-Aktivierung aufheben, was für die Notwendigkeit des klassischen ER in der Vermittlung dieser membran nahen Signalwirkung spricht.

Das membranimpermeable Konjugat E<sub>2</sub>-BSA ist ein Hilfsmittel, membranvermittelte E<sub>2</sub>-Wirkungen zu charakterisieren. Die 5-minütige Stimulation der Zellen mit dem Konjugat als auch dessen Filtrat führte zu einer deutlichen MAPK-Aktivierung. Diese Aktivierung konnte somit nicht eindeutig auf das extrazellulär vorhandene Konjugat zurückgeführt werden und wurde möglicherweise durch dissoziiertes E<sub>2</sub> ausgelöst. Eine nähere Untersuchung auf Dissoziationseffekte wurde durch Expressionsanalyse des östrogenabhängig exprimierten Gens Cathepsin D mittels RT-PCR vorgenommen. Die vergleichende Inkubation der Zellen mit E<sub>2</sub> und E<sub>2</sub>-BSA für 0-24 h zeigte für beide Substanzen eine ähnlich erhöhte relative Genexpression für Cathepsin D. Die erhöhte Cathepsin D Expression durch E<sub>2</sub>-BSA deutet auf die genomische Wirksamkeit von dissoziiertem E<sub>2</sub> hin, was den Einsatz von E<sub>2</sub>-BSA zur Untersuchung extrazellulär ausgelöster, nichtgenomischer Effekte in Frage stellt.

Die molekulare Struktur membran naher bzw. intramembranärer Rezeptoren für E<sub>2</sub> ist noch nicht ausreichend aufgeklärt, jedoch konnten durch die Inkubation von intakten MCF-7 Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Konjugat E<sub>2</sub>-BSA-FITC mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) spezifische Bindungsstellen für E<sub>2</sub> an der Plasmamembran (PM) dargestellt werden. Die Behandlung der Zellen mit Antikörpern gegen den klassischen ER $\alpha$  konnte keinen Nachweis der extrazellulären Zugänglichkeit dieses Rezeptors erbringen. Eine künstliche Erhöhung der intrazellulären Menge des klassischen Östrogenrezeptors ER $\alpha$  in MCF-7 Zellen wurde durch stabile Transfektion mit Hilfe eines retroviralen Expressionsvektors erreicht. Die Transfektion der Zellen führte zu einer gesteigerten Aktivierung der MAPK Erk1/2 nach 5-minütiger E<sub>2</sub>-Stimulation. Da nur der an der PM lokalisierte ER-Anteil für die Weiterleitung nichtgenomischer Signale relevant ist, weist die durch Überexpression des ER hervorgerufene Veränderung auf dessen Beteiligung an der schnellen, E<sub>2</sub>-vermittelten MAPK-Aktivierung hin und zeigt die Beeinflussbarkeit dieser Wirkungen auf.

## 6 SUMMARY

According to the prevailing view, the steroid hormone estrogen unfolds genomic actions through interaction with the intracellular estrogen receptor (ER) resulting in a modified expression of specific genes in the nucleus. Recent reports point out that estrogens also cause rapid membrane-mediated so-called nongenomic effects within a few minutes. This study was aimed at investigating the influences of estrogens and antiestrogens on the nongenomic activation of the MAPK signalling pathway in breast cancer cells as well as the possible involvement of the classical estrogen receptor ER $\alpha$  in these actions.

The ER positive cell line MCF-7 was used in all experiments. These cells were tested positive for estrogen responsive cell growth using the MTS proliferation assay. Cell stimulation for 5 minutes with 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and epidermal growth factor (EGF) as a positive control led to a distinct activation of MAPKs Erk1/2 in these cells according to SDS-PAGE and Western blot analysis. The activation decreased strongly when stimulation periods were extended. The degree of a present basal MAPK activation without adding an external stimulant was ascribed to intracellularly generated E<sub>2</sub> as well as remaining quantities of E<sub>2</sub> in the fetal calf serum included in the cell culture medium. The rapid MAPK activation mediated through E<sub>2</sub> was completely blocked with the MEK inhibitor PD 98,059. Antiestrogens ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene (intracellular ER blockers) were able to eliminate the E<sub>2</sub> mediated MAPK activation. This speaks for the necessity of the classical ER in mediating these membrane-located signalling processes.

The membrane-impermeable conjugate E<sub>2</sub>-BSA is a helpful tool for characterizing membrane-mediated E<sub>2</sub> actions. Cell stimulation with this conjugate and even with its filtrate for 5 minutes led to a distinct MAPK activation. Therefore this activation could not be clearly ascribed to the extracellularly located conjugate and was possibly elicited through dissociated E<sub>2</sub>. The effects of dissociation were investigated more detailed via expression analysis of the estrogen-dependent expressed gene Cathepsin D by using RT-PCR. The comparing incubation of cells with E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>-BSA for 0-24 h revealed a similarly increased relative gene expression of Cathepsin D for both substances. The increased expression of Cathepsin D caused by E<sub>2</sub>-BSA indicates genomic action of dissociated E<sub>2</sub>, thus questioning the usage of E<sub>2</sub>-BSA in investigations aimed at extracellularly elicited nongenomic effects.

Although the molecular structure of near- or intra-membrane E<sub>2</sub> receptors is not sufficiently characterized the incubation of intact MCF-7 cells with the fluorescent ligand E<sub>2</sub>-BSA-FITC allowed the detection of specific surface binding sites on the plasma membrane (PM) using confocal laser scanning microscopy (CLSM). The treatment of cells with antibodies directed against the classical ER $\alpha$  did not provide evidence for the extracellular accessibility of these receptors. The artificial increase of the intracellular abundance of the classical receptor ER $\alpha$  was accomplished through stable transfection of MCF-7 cells using a retroviral expression vector. The transfection of cells led to an increased MAPK Erk1/2 activation after 5 minute cell stimulation with E<sub>2</sub>. Given that only the PM located fraction of ER is relevant to nongenomic signalling, the ER overexpression-caused changes point out the involvement of ER in rapid E<sub>2</sub>-mediated MAPK activation and show the interference of these effects.

## 7 LITERATUR

**Acconcia,F., Ascenzi,P., Fabozzi,G., Visca,P., and Marino,M.** (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- $\alpha$  functions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **316**:878-883.

**Acconcia,F., Ascenzi,P., Bocedi,A., Spisni,E., Tomasi,V., Trentalance,A., Visca,P., and Marino,M.** (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor  $\alpha$  membrane localization: regulation by 17 $\beta$ -estradiol. *Mol.Biol.Cell* **16**:231-237.

**Agarwal,V.R., Sinton,C.M., Liang,C., Fisher,C., German,D.C., and Simpson,E.R.** (2000) Upregulation of estrogen receptors in the forebrain of aromatase knockout (ArKO) mice. *Mol.Cell Endocrinol.* **162**:9-16.

**Ahola,T.M., Manninen,T., Alkio,N., and Ylikomi,T.** (2002) G protein-coupled receptor 30 is critical for a progesterin-induced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **143**:3376-3384.

**Anzick,S.L., Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., Trent,J.M., and Meltzer,P.S.** (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**:965-968.

**Aronica,S.M. and Katzenellenbogen,B.S.** (1993) Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol.Endocrinol.* **7**:743-752.

**Aronica,S.M., Kraus,W.L., and Katzenellenbogen,B.S.** (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**:8517-8521.

**Bagdade,J.D., Wolter,J., Subbaiah,P.V., and Ryan,W.** (1990) Effects of tamoxifen treatment on plasma lipids and lipoprotein lipid composition. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **70**:1132-1135.

**Balmain,A., Gray,J., and Ponder,B.** (2003) The genetics and genomics of cancer. *Nat.Genet.* **33** Suppl:238-244.

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

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

**Barletta,F., Wong,C.W., McNally,C., Komm,B.S., Katzenellenbogen,B., and Cheskis,B.J.** (2004) Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol.Endocrinol.* **18**:1096-1108.

**Baum,M., Buzdar,A., Cuzick,J., Forbes,J., Houghton,J., Howell,A., and Sahmoud,T.** (2003) Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* **98**:1802-1810.

**Beato,M.** (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56**:335-344.

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

**Beato,M. and Klug,J.** (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum.Reprod.Update.* **6**:225-236.

**Beatson** (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet* **2**:104-107.

- Beckmann,M.W., Niederacher,D., Schnurch,H.G., Gusterson,B.A., and Bender,H.G.** (1997) Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J.Mol.Med.* **75**:429-439.
- Beno,D.W., Brady,L.M., Bissonnette,M., and Davis,B.H.** (1995) Protein kinase C and mitogen-activated protein kinase are required for 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-stimulated Egr induction. *J.Biol.Chem.* **270**:3642-3647.
- Benten,W.P., Lieberherr,M., Giese,G., and Wunderlich,F.** (1998) Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett.* **422**:349-353.
- Bentrem,D.J. and Jordan,V.C.** (1999) Targeted antiestrogens for the prevention of breast cancer. *Oncol.Res.* **11**:401-407.
- Berthois,Y., Pourreau-Schneider,N., Gandilhon,P., Mittre,H., Tubiana,N., and Martin,P.M.** (1986) 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.* **25**:963-972.
- Biegel,L. and Safe,S.** (1990) Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on cell growth and the secretion of the estrogen-induced 34-, 52- and 160-kDa proteins in human breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **37**:725-732.
- Bjornstrom,L. and Sjoberg,M.** (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol.Endocrinol.* **19**:833-842.
- Blackmore,P.F., Beebe,S.J., Danforth,D.R., and Alexander,N.** (1990) Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J.Biol.Chem.* **265**:1376-1380.
- Boccardo,F., Rubagotti,A., Puntoni,M., Guglielmini,P., Amoroso,D., Fini,A., Paladini,G., Mesiti,M., Romeo,D., Rinaldini,M., Scali,S., Porpiglia,M., Benedetto,C., Restuccia,N., Buzzi,F., Franchi,R., Massidda,B., Distante,V., Amadori,D., and Sismondi,P.** (2005) Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial. *J.Clin.Oncol.* **23**:5138-5147.
- Boyd,S.** (1900) On oophorectomy in cancer of the breast. *Br.Med.J.* **2**:1161-1167.
- Bradford,M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.
- Brodie,A.M. and Njar,V.C.** (2000) Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment\*. *Steroids* **65**:171-179.
- Brunner,N., Boulay,V., Fojo,A., Freter,C.E., Lippman,M.E., and Clarke,R.** (1993) Acquisition of hormone-independent growth in MCF-7 cells is accompanied by increased expression of estrogen-regulated genes but without detectable DNA amplifications. *Cancer Res.* **53**:283-290.
- Brzozowski,A.M., Pike,A.C., Dauter,Z., Hubbard,R.E., Bonn,T., Engstrom,O., Ohman,L., Greene,G.L., Gustafsson,J.A., and Carlquist,M.** (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**:753-758.
- Bunone,G., Briand,P.A., Miksicek,R.J., and Picard,D.** (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* **15**:2174-2183.
- Byers,M., Kuiper,G.G., Gustafsson,J.A., and Park-Sarge,O.K.** (1997) Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol.Endocrinol.* **11**:172-182.
- Campbell,C.H., Bulayeva,N., Brown,D.B., Gametchu,B., and Watson,C.S.** (2002) Regulation of the membrane estrogen receptor-alpha: role of cell density, serum, cell passage number, and estradiol. *FASEB J.* **16**:1917-1927.
- Campbell,S.L., Khosravi-Far,R., Rossman,K.L., Clark,G.J., and Der,C.J.** (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**:1395-1413.

- Carmeci,C., Thompson,D.A., Ring,H.Z., Francke,U., and Weigel,R.J.** (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* **45**:607-617.
- Catalano,M.G., Comba,A., Fazzari,A., Benedusi-Pagliano,E., Sberveglieri,M., Revelli,A., Massobrio,M., Frairia,R., and Fortunati,N.** (1997) Sex steroid binding protein receptor (SBP-R) is related to a reduced proliferation rate in human breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* **42**:227-234.
- Catherino,W.H. and Jordan,V.C.** (1993) A risk-benefit assessment of tamoxifen therapy. *Drug Saf* **8**:381-397.
- Cato,A.C., Nestl,A., and Mink,S.** (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci.STKE.* **2002**:RE9.
- Cauley,J.A., Norton,L., Lippman,M.E., Eckert,S., Krueger,K.A., Purdie,D.W., Farrerons,J., Karasik,A., Mellstrom,D., Ng,K.W., Stepan,J.J., Powles,T.J., Morrow,M., Costa,A., Silfen,S.L., Walls,E.L., Schmitt,H., Muchmore,D.B., Jordan,V.C., and Ste-Marie,L.G.** (2001) Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res.Treat.* **65**:125-134.
- Cavaillès,V., Augereau,P., Garcia,M., and Rochefort,H.** (1988) Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52K-pro-cathepsin-D secreted by breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **16**:1903-1919.
- Cavaillès,V., Garcia,M., and Rochefort,H.** (1989) Regulation of cathepsin-D and pS2 gene expression by growth factors in MCF7 human breast cancer cells. *Mol.Endocrinol.* **3**:552-558.
- Chalbos,D., Philips,A., Galtier,F., and Rochefort,H.** (1993) Synthetic antiestrogens modulate induction of pS2 and cathepsin-D messenger ribonucleic acid by growth factors and adenosine 3',5'-monophosphate in MCF7 cells. *Endocrinology* **133**:571-576.
- Chambliss,K.L., Yuhanna,I.S., Mineo,C., Liu,P., German,Z., Sherman,T.S., Mendelsohn,M.E., Anderson,R.G., and Shaul,P.W.** (2000) Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ.Res.* **87**:E44-E52.
- Chambliss,K.L., Yuhanna,I.S., Anderson,R.G., Mendelsohn,M.E., and Shaul,P.W.** (2002) ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol.Endocrinol.* **16**:938-946.
- Chang,L. and Karin,M.** (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**:37-40.
- Chen,H., Lin,R.J., Schiltz,R.L., Chakravarti,D., Nash,A., Nagy,L., Privalsky,M.L., Nakatani,Y., and Evans,R.M.** (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**:569-580.
- Chen,R.H., Sarnecki,C., and Blenis,J.** (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol.Cell Biol.* **12**:915-927.
- Chen,Z., Yuhanna,I.S., Galcheva-Gargova,Z., Karas,R.H., Mendelsohn,M.E., and Shaul,P.W.** (1999) Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J.Clin.Invest* **103**:401-406.
- Chen,Z., Gibson,T.B., Robinson,F., Silvestro,L., Pearson,G., Xu,B., Wright,A., Vanderbilt,C., and Cobb,M.H.** (2001) MAP kinases. *Chem.Rev.* **101**:2449-2476.
- Chomczynski,P. and Sacchi,N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
- Chong,H. and Guan,K.L.** (2003) Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. *J Biol.Chem.* **278**:36269-36276.
- Clarke,R., Skaar,T., Baumann,K., Leonessa,F., James,M., Lippman,J., Thompson,E.W., Freter,C., and Brunner,N.** (1994) Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Res.Treat.* **31**:237-248.

- Clarke,R., Leonessa,F., Welch,J.N., and Skaar,T.C.** (2001) Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol.Rev.* **53**:25-71.
- Clarke,R., Liu,M.C., Bouker,K.B., Gu,Z., Lee,R.Y., Zhu,Y., Skaar,T.C., Gomez,B., O'Brien,K., Wang,Y., and Hilakivi-Clarke,L.A.** (2003) Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene* **22**:7316-7339.
- Colditz,G.A., Hankinson,S.E., Hunter,D.J., Willett,W.C., Manson,J.E., Stampfer,M.J., Hennekens,C., Rosner,B., and Speizer,F.E.** (1995) The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N.Engl.J.Med.* **332**:1589-1593.
- Cole,M.P., Jones,C.T., and Todd,I.D.** (1971) A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br.J.Cancer* **25**:270-275.
- Coombes,R.C., Hall,E., Gibson,L.J., Paridaens,R., Jassem,J., Delozier,T., Jones,S.E., Alvarez,I., Bertelli,G., Ortmann,O., Coates,A.S., Bajetta,E., Dodwell,D., Coleman,R.E., Fallowfield,L.J., Mickiewicz,E., Andersen,J., Lonning,P.E., Cocconi,G., Stewart,A., Stuart,N., Snowdon,C.F., Carpentieri,M., Massimini,G., and Bliss,J.M.** (2004) A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **350**:1081-1092.
- Costa,L.A., Kopreski,M.S., Demers,L.M., Chinchilli,V.M., Santen,R.J., Harvey,H.A., and Lipton,A.** (1999) Effect of the potent aromatase inhibitor fadrozole hydrochloride (CGS 16949A) in postmenopausal women with breast carcinoma. *Cancer* **85**:100-103.
- Couissi,D., Dubois,V., Remacle,C., Schonke,E., and Trouet,A.** (1997) Western immunoblotting and enzymatic activity analysis of cathepsin D in human breast cancer cell lines of different invasive potential. Regulation by 17beta-estradiol, tamoxifen and ICI 182,780. *Clin.Exp.Metastasis* **15**:349-360.
- Couse,J.F., Lindzey,J., Grandien,K., Gustafsson,J.A., and Korach,K.S.** (1997) Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* **138**:4613-4621.
- Couse,J.F. and Korach,K.S.** (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr.Rev.* **20**:358-417.
- Couse,J.F., Curtis,H.S., and Korach,K.S.** (2000) Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **74**:287-296.
- Cowley,S.M. and Parker,M.G.** (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **69**:165-175.
- Cummings,S.R., Eckert,S., Krueger,K.A., Grady,D., Powles,T.J., Cauley,J.A., Norton,L., Nickelsen,T., Bjarnason,N.H., Morrow,M., Lippman,M.E., Black,D., Glusman,J.E., Costa,A., and Jordan,V.C.** (1999) The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* **281**:2189-2197.
- Dabrosin,C., Johansson,A.C., and Ollinger,K.** (2004) Decreased secretion of Cathepsin D in breast cancer in vivo by tamoxifen: mediated by the mannose-6-phosphate/IGF-II receptor? *Breast Cancer Res.Treat.* **85**:229-238.
- Davis,R.J.** (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**:239-252.
- Day,R., Ganz,P.A., Costantino,J.P., Cronin,W.M., Wickerham,D.L., and Fisher,B.** (1999) Health-related 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.* **17**:2659-2669.
- DeFriend,D.J., Howell,A., Nicholson,R.I., Anderson,E., Dowsett,M., Mansel,R.E., Blamey,R.W., Bundred,N.J., Robertson,J.F., Saunders,C., and .** (1994) Investigation of a new pure antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* **54**:408-414.

- Delmas,P.D., Bjarnason,N.H., Mitlak,B.H., Ravoux,A.C., Shah,A.S., Huster,W.J., Draper,M., and Christiansen,C.** (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N.Engl.J.Med.* **337**:1641-1647.
- Dickson,R.B. and Lippman,M.E.** (1988) Control of human breast cancer by estrogen, growth factors, and oncogenes. *Cancer Treat.Res.* **40**:119-165.
- Dos Santos,E.G., Dieudonne,M.N., Pecquery,R., Le,M., V, Giudicelli,Y., and Lacasa,D.** (2002) Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. *Endocrinology* **143**:930-940.
- Downward,J.** (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* **3**:11-22.
- Dowsett,M., Folklerd,E., Doody,D., and Haynes,B.** (2005) The biology of steroid hormones and endocrine treatment of breast cancer. *Breast* **14**:452-457.
- Draper,M.W., Flowers,D.E., Huster,W.J., Neild,J.A., Harper,K.D., and Arnaud,C.** (1996) A controlled trial of raloxifene (LY139481) HCl: impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women. *J.Bone Miner.Res.* **11**:835-842.
- Duffy,M.J.** (1992) The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin.Exp.Metastasis* **10**:145-155.
- Duh,J.L., Yu,R., Jiao,J.J., Matwysyn,G.A., Li,W., Tan,T.H., and Kong,A.N.** (1997) Activation of signal transduction kinases by tamoxifen. *Pharm.Res.* **14**:186-189.
- EBCTC-Group** (1992) Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **339**:1-15.
- EBCTC-Group** (1996) 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.* **53**:197-199.
- EBCTC-Group** (1998) Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* **351**:1451-1467.
- Edwards,D.P., Adams,D.J., and McGuire,W.L.** (1981) Estrogen regulation of growth and specific protein synthesis in human breast cancer cells in tissue culture. *Adv.Exp.Med.Biol.* **138**:133-149.
- Edwards,D.P.** (2000) The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **5**:307-324.
- Endoh,H., Maruyama,K., Masuhiro,Y., Kobayashi,Y., Goto,M., Tai,H., Yanagisawa,J., Metzger,D., Hashimoto,S., and Kato,S.** (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol.Cell Biol.* **19**:5363-5372.
- Enmark,E., Peltto-Huikko,M., Grandien,K., Lagercrantz,S., Lagercrantz,J., Fried,G., Nordenskjöld,M., and Gustafsson,J.A.** (1997) Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin.Endocrinol.Metab* **82**:4258-4265.
- Ettinger,B., Black,D.M., Mitlak,B.H., Knickerbocker,R.K., Nickelsen,T., Genant,H.K., Christiansen,C., Delmas,P.D., Zanchetta,J.R., Stakkestad,J., Gluer,C.C., Krueger,K., Cohen,F.J., Eckert,S., Ensrud,K.E., Avioli,L.V., Lips,P., and Cummings,S.R.** (1999) Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* **282**:637-645.
- Evans,R.M.** (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**:889-895.

- Falkenstein,E. and Wehling,M.** (2000) Nongenomically initiated steroid actions. *Eur.J.Clin.Invest* **30** Suppl 3:51-54.
- Fawell,S.E., White,R., Hoare,S., Sydenham,M., Page,M., and Parker,M.G.** (1990) Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:6883-6887.
- Filardo,E.J., Quinn,J.A., Bland,K.I., and Frackelton,A.R., Jr.** (2000) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol.Endocrinol.* **14**:1649-1660.
- Filardo,E.J., Quinn,J.A., Frackelton,A.R., Jr., and Bland,K.I.** (2002) Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol.Endocrinol.* **16**:70-84.
- Filardo,E.J.** (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **80**:231-238.
- Futreal,P.A., Coin,L., Marshall,M., Down,T., Hubbard,T., Wooster,R., Rahman,N., and Stratton,M.R.** (2004) A census of human cancer genes. *Nat.Rev.Cancer* **4**:177-183.
- Gadducci,A. and Genazzani,A.R.** (1999) Endocrine therapy for gynecological cancer. *Gynecol.Endocrinol.* **13**:441-456.
- Gerschenson,L.E., Depaoli,J.R., and Murai,J.T.** (1981) Inhibition of estrogen-induced proliferation of cultured rabbit uterine epithelial cells by a cell density-dependent factor produced by the same cells. *J.Steroid Biochem.* **14**:959-969.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., GeKiD mit dem Robert-Koch-Institut** (2006). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, [www.gekid.de](http://www.gekid.de)
- Giguere,V., Yang,N., Segui,P., and Evans,R.M.** (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* **331**:91-94.
- Goetz,R.M., Thatte,H.S., Prabhakar,P., Cho,M.R., Michel,T., and Golan,D.E.** (1999) Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:2788-2793.
- Goss,P.E., Ingle,J.N., Martino,S., Robert,N.J., Muss,H.B., Piccart,M.J., Castiglione,M., Tu,D., Shepherd,L.E., Pritchard,K.I., Livingston,R.B., Davidson,N.E., Norton,L., Perez,E.A., Abrams,J.S., Therasse,P., Palmer,M.J., and Pater,J.L.** (2003) A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **349**:1793-1802.
- Goss,P.E., Ingle,J.N., Martino,S., Robert,N.J., Muss,H.B., Piccart,M.J., Castiglione,M., Tu,D., Shepherd,L.E., Pritchard,K.I., Livingston,R.B., Davidson,N.E., Norton,L., Perez,E.A., Abrams,J.S., Cameron,D.A., Palmer,M.J., and Pater,J.L.** (2005) Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J.Natl.Cancer Inst.* **97**:1262-1271.
- Gould,R.E. and Garcia,A.A.** (2006) Update on aromatase inhibitors in breast cancer. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* **18**:41-46.
- Gradishar,W.J.** (2004) Tamoxifen--what next? *Oncologist.* **9**:378-384.
- Green,S., Walter,P., Kumar,V., Krust,A., Bornert,J.M., Argos,P., and Chambon,P.** (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**:134-139.
- Greenblatt,R.B., Barfield,W.E., Jungck,E.C., and Ray,A.W.** (1961) Induction of ovulation with MRL/41. Preliminary report. *JAMA* **178**:101-104.

- Greene,G.L., Gilna,P., Waterfield,M., Baker,A., Hort,Y., and Shine,J.** (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* **231**:1150-1154.
- Gronemeyer,H.** (1991) Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu.Rev.Genet.* **25**:89-123.
- Gschwind,A., Fischer,O.M., and Ullrich,A.** (2004) The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer* **4**:361-370.
- Gu,Q. and Moss,R.L.** (1996) 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. *J.Neurosci.* **16**:3620-3629.
- Gu,W. and Roeder,R.G.** (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**:595-606.
- Gu,W., Shi,X.L., and Roeder,R.G.** (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**:819-823.
- Guo,Z., Benten,W.P., Krucken,J., and Wunderlich,F.** (2002) Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages. *J.Biol.Chem.* **277**:29600-29607.
- Gururaj,A.E., Rayala,S.K., Vadlamudi,R.K., and Kumar,R.** (2006) Novel mechanisms of resistance to endocrine therapy: genomic and nongenomic considerations. *Clin.Cancer Res.* **12**:1001s-1007s.
- Gustafsson,J.A.** (2000) Novel aspects of estrogen action. *J Soc.Gynecol.Investig.* **7**:S8-S9.
- Halachmi,S., Marden,E., Martin,G., MacKay,H., Abbondanza,C., and Brown,M.** (1994) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* **264**:1455-1458.
- Hall,J.M. and McDonnell,D.P.** (1999) 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* **140**:5566-5578.
- Hall,J.M. and McDonnell,D.P.** (2005) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol.Interv.* **5**:343-357.
- Hammes,A., Andreassen,T.K., Spoelgen,R., Raila,J., Hubner,N., Schulz,H., Metzger,J., Schweigert,F.J., Luppia,P.B., Nykjaer,A., and Willnow,T.E.** (2005) Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* **122**:751-762.
- Hard,G.C., Iatropoulos,M.J., Jordan,K., Radi,L., Kaltenberg,O.P., Imondi,A.R., and Williams,G.M.** (1993) Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats. *Cancer Res.* **53**:4534-4541.
- Harper,M.J. and Walpole,A.L.** (1967) A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J.Reprod.Fertil.* **13**:101-119.
- Harris J.R, Hellman S., and Henderson I.C.** (1991) Breast diseases. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hasmann,M., Rattel,B., and Loser,R.** (1994) Preclinical data for Droloxifene. *Cancer Lett.* **84**:101-116.
- Hayes,D.F., Van Zyl,J.A., Hacking,A., Goedhals,L., Bezwoda,W.R., Mailliard,J.A., Jones,S.E., Vogel,C.L., Berris,R.F., Shemano,I., and .** (1995) Randomized comparison of tamoxifen and two separate doses of toremifene in postmenopausal patients with metastatic breast cancer. *J.Clin.Oncol.* **13**:2556-2566.
- Haynes,M.P., Sinha,D., Russell,K.S., Collinge,M., Fulton,D., Morales-Ruiz,M., Sessa,W.C., and Bender,J.R.** (2000) Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ.Res.* **87**:677-682.

- Herbst,A.L., Griffiths,C.T., and Kistner,R.W.** (1964) clomiphene citrate (NSC-35770) in disseminated mammary carcinoma. *Cancer Chemother.Rep.* **43**:39-41.
- Hisamoto,K., Ohmichi,M., Kurachi,H., Hayakawa,J., Kanda,Y., Nishio,Y., Adachi,K., Tasaka,K., Miyoshi,E., Fujiwara,N., Taniguchi,N., and Murata,Y.** (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J.Biol.Chem.* **276**:3459-3467.
- Ho,K.J. and Liao,J.K.** (2002) Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**:1952-1961.
- Holtkamp,D.E., Greslin,J.G., Root,C.A., and Lerner,L.J.** (1960) Gonadotrophin inhibiting and anti-fecundity effects of chloramiphene. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **105**:197-201.
- Holtenkötter,R., Heimi, T.** (1997) Rischard, isch will net in de Seekiste, isch will in de Inselkeller. *Borkum Biol. Fitfitfit. Res.* **105**:197-201.
- Hong,H., Kohli,K., Trivedi,A., Johnson,D.L., and Stallcup,M.R.** (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:4948-4952.
- Hopp,T.A. and Fuqua,S.A.** (1998) Estrogen receptor variants. *J Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* **3**:73-83.
- Horlein,A.J., Naar,A.M., Heinzl,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Soderstrom,M. and Glass,C.K.** (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**:397-404.
- Horwitz,K.B., Jackson,T.A., Bain,D.L., Richer,J.K., Takimoto,G.S., and Tung,L.** (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol.Endocrinol.* **10**:1167-1177.
- Houssami,N., Cuzick,J., and Dixon,J.M.** (2006) The prevention, detection, and management of breast cancer. *Med.J.Aust.* **184**:230-234.
- Howell,A., DeFriend,D.J., Robertson,J.F., Blamey,R.W., Anderson,L., Anderson,E., Sutcliffe,F.A., and Walton,P.** (1996) Pharmacokinetics, pharmacological and anti-tumour effects of the specific anti-oestrogen ICI 182780 in women with advanced breast cancer. *Br.J.Cancer* **74** :300-308.
- Howell,A., Cuzick,J., Baum,M., Buzdar,A., Dowsett,M., Forbes,J.F., Hocht-Boes,G., Houghton,J., Locker,G.Y., and Tobias,J.S.** (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* **365**:60-62.
- Huggins,C. and Dao,T.L.** (1953) Adrenalectomy and oophorectomy in treatment of advanced carcinoma of the breast. *J.Am.Med.Assoc.* **151**:1388-1394.
- Huppert,L.C.** (1979) Induction of ovulation with clomiphene citrate. *Fertil.Steril.* **31**:1-8.
- Ignar-Trowbridge,D.M., Teng,C.T., Ross,K.A., Parker,M.G., Korach,K.S., and McLachlan,J.A.** (1993) Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol.Endocrinol.* **7**:992-998.
- Improta-Brears,T., Whorton,A.R., Codazzi,F., York,J.D., Meyer,T., and McDonnell,D.P.** (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:4686-4691.
- Iruela-Arispe,M.L., Rodriguez-Manzanaque,J.C., and Abu-Jawdeh,G.** (1999) Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors. *Microcirculation.* **6**:127-140.
- Ishikawa,T., Takano,K., Yasufuku-Takano,J., Fujita,T., Igarashi,T., Miura,M., and Hata,K.** (2001) Estrogenic impurities in labware. *Nat.Biotechnol.* **19**:812.

- Jacquemier,J.D., Hassoun,J., Torrente,M., and Martin,P.M.** (1990) Distribution of estrogen and progesterone receptors in healthy tissue adjacent to breast lesions at various stages--immunohistochemical study of 107 cases. *Breast Cancer Res.Treat.* **15**:109-117.
- Jakesz,R., Jonat,W., Gnant,M., Mittlboeck,M., Greil,R., Tausch,C., Hilfrich,J., Kwasny,W., Menzel,C., Samonigg,H., Seifert,M., Gademann,G., Kaufmann,M., and Wolfgang,J.** (2005) Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* **366**:455-462.
- Jensen,E.V., Suzuki,T., Kawashima,T., Stumpf,W.E., Jungblut,P.W., and DeSombre,E.R.** (1968) A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **59**:632-638.
- Johnson,M.D., Westley,B.R., and May,F.E.** (1989) Oestrogenic activity of tamoxifen and its metabolites on gene regulation and cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Br.J.Cancer* **59**:727-738.
- Johnston,S.R. and Dowsett,M.** (2003) Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat.Rev.Cancer* **3**:821-831.
- Kahlert,S., Nuedling,S., van Eickels,M., Vetter,H., Meyer,R., and Grohe,C.** (2000) Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J.Biol.Chem.* **275**:18447-18453.
- Kallio,S., Kangas,L., Blanco,G., Johansson,R., Karjalainen,A., Perila,M., Pippo,I., Sundquist,H., Sodervall,M., and Toivola,R.** (1986) A new triphenylethylene compound, Fc-1157a. I. Hormonal effects. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **17**:103-108.
- Kanda,N. and Watanabe,S.** (2004) 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J.Invest Dermatol.* **123**:319-328.
- Kato,S., Endoh,H., Masuhiro,Y., Kitamoto,T., Uchiyama,S., Sasaki,H., Masushige,S., Gotoh,Y., Nishida,E., Kawashima,H., Metzger,D., and Chambon,P.** (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**:1491-1494.
- Katzenellenbogen,B.S., Kendra,K.L., Norman,M.J., and Berthois,Y.** (1987) 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 Res.* **47**:4355-4360.
- Katzenellenbogen,J.A., O'Malley,B.W., and Katzenellenbogen,B.S.** (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol.Endocrinol.* **10**:119-131.
- Kauffman,R.F., Bensch,W.R., Roudebush,R.E., Cole,H.W., Bean,J.S., Phillips,D.L., Monroe,A., Cullinan,G.J., Glasebrook,A.L., and Bryant,H.U.** (1997) Hypocholesterolemic activity of raloxifene (LY139481): pharmacological characterization as a selective estrogen receptor modulator. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **280**:146-153.
- Kelly,M.J. and Levin,E.R.** (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol.Metab* **12**:152-156.
- Keshamouni,V.G., Mattingly,R.R., and Reddy,K.B.** (2002) Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. *J.Biol.Chem.* **277**:22558-22565.
- Kistner,R.W. and Smith,O.W.** (1960) Observations on the use of a non-steroidal estrogen antagonist: MER-25. *Surg.Forum* **10**:725-729.
- Klein,K. and Henk,W.** (1963) Klinisch-experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Aldosteron auf Hämodynamik und Gerinnung. *Z.Kreisl.Forsch.* **52**:40-53.

- Klinge, C.M.** (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**:227-251.
- Kolch, W., Kotwaliwale, A., Vass, K., and Janosch, P.** (2002) The organisation and function of the Ras-Raf-MEK-ERK pathway, (<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/02004404h.htm>). *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A.** (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:5925-5930.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A.** (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**:863-870.
- Kumar, V. and Chambon, P.** (1988) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**:145-156.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K.** (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**:451-454.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods* **10**:203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Le, M., V, Grosse, B., and Lieberherr, M.** (1997) Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J.Biol.Chem.* **272**:11902-11907.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**:643-649.
- Lenormand, P.** (1995) The mammalian mitogen activated protein kinase network. *Clin.Mol.Pathol.* **48**:M292-M301.
- Lerebours, F. and Lidereau, R.** (2002) Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **44**:121-141.
- Lerner, L.J., Holthaus, F.J., Jr., and Thompson, C.R.** (1958) A non-steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol. *Endocrinology* **63**:295-318.
- Levin, E.R.** (2003) Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol.Endocrinol.* **17**:309-317.
- Levin, E.R.** (2005) Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol.Endocrinol.* **19**:1951-1959.
- Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D.** (1997) RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:8479-8484.
- Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R.** (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**:4807-4812.
- Lieberherr, M., Grosse, B., Duchambon, P., and Druke, T.** (1989) A functional cell surface type receptor is required for the early action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the phosphoinositide metabolism in rat enterocytes. *J.Biol.Chem.* **264**:20403-20406.
- Lieberherr, M., Grosse, B., Kachkache, M., and Balsan, S.** (1993) Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J.Bone Miner.Res.* **8**:1365-1376.

- Longcope,C.** (1987) Peripheral aromatization: studies on controlling factors. *Steroids* **50**:253-267.
- Lonning,P.E.** (2004) Aromatase inhibitors in breast cancer. *Endocr.Relat Cancer* **11**:179-189.
- Losel,R. and Wehling,M.** (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**:46-56.
- Love,R.R.** (1989) Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J.Clin.Oncol.* **7**:803-815.
- Love,R.R., Mazess,R.B., Barden,H.S., Epstein,S., Newcomb,P.A., Jordan,V.C., Carbone,P.P., and DeMets,D.L.** (1992) Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **326**:852-856.
- Luft,R. and Olivecrona,H.** (1953) Experiences with hypophysectomy in man. *J.Neurosurg.* **10**:301-316.
- Manavathi,B. and Kumar,R.** (2006) Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: Two sides of the coin. *J.Cell Physiol* **207**:594-604.
- Mangelsdorf,D.J., Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P., Schutz,G., Umesono,K., Blumberg,B., Kastner,P., Mark,M., Chambon,P., and Evans,R.M.** (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**:835-839.
- Martino,S., Cauley,J.A., Barrett-Connor,E., Powles,T.J., Mershon,J., Disch,D., Secrest,R.J., and Cummings,S.R.** (2004) Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl.Cancer Inst.* **96**:1751-1761.
- Marttunen,M.B., Hietanen,P., Tiitinen,A., and Ylikorkala,O.** (1998) Comparison of effects of tamoxifen and toremifene on bone biochemistry and bone mineral density in postmenopausal breast cancer patients. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**:1158-1162.
- Masamura,S., Santner,S.J., Heitjan,D.F., and Santen,R.J.** (1995) Estrogen deprivation causes estradiol hypersensitivity in human breast cancer cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **80**:2918-2925.
- Maudelonde,T., Domergue,J., Henquel,C., Freiss,G., Brouillet,J.P., Simony,J., Pujol,H., and Rochefort,H.** (1989) Tamoxifen treatment increases the concentration of 52K-cathepsin D and its precursor in breast cancer tissue. *Cancer* **63**:1265-1270.
- McInerney,E.M., Tsai,M.J., O'Malley,B.W., and Katzenellenbogen,B.S.** (1996) Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:10069-10073.
- McNatty,K.P., Makris,A., DeGrazia,C., Osathanondh,R., and Ryan,K.J.** (1979) The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **49**:687-699.
- Mendoza,C., Soler,A., and Tesarik,J.** (1995) Nongenomic steroid action: independent targeting of a plasma membrane calcium channel and a tyrosine kinase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **210**:518-523.
- Mercer,K.E. and Pritchard,C.A.** (2003) Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim.Biophys.Acta* **1653**:25-40.
- Metzger,D., Ali,S., Bornert,J.M., and Chambon,P.** (1995) Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol.Chem.* **270**:9535-9542.
- Migliaccio,A., Di Domenico,M., Castoria,G., de Falco,A., Bontempo,P., Nola,E., and Auricchio,F.** (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* **15**:1292-1300.

- Migliaccio,A., Castoria,G., Di Domenico,M., de Falco,A., Bilancio,A., Lombardi,M., Barone,M.V., Ametrano,D., Zannini,M.S., Abbondanza,C., and Auricchio,F.** (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* **19**:5406-5417.
- Migliaccio,A., Castoria,G., Di Domenico,M., de Falco,A., Bilancio,A., and Auricchio,F.** (2002) *Src* is an initial target of sex steroid hormone action. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **963**:185-190.
- Mitter,D., Ortmann,O., and Trecek,O.** (2005) [Estrogen receptor Beta isoforms -- functions and clinical relevance in breast cancer]. *Zentralbl.Gynakol.* **127**:228-234.
- Mokbel,K.** (2002) The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. *Int.J.Clin.Oncol.* **7**:279-283.
- Morisset,M., Capony,F., and Rochefort,H.** (1986) Processing and estrogen regulation of the 52-kilodalton protein inside MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* **119**:2773-2782.
- Morley,P., Whitfield,J.F., Vanderhyden,B.C., Tsang,B.K., and Schwartz,J.L.** (1992) A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* **131**:1305-1312.
- Morris,C. and Wakeling,A.** (2002) Fulvestrant ('Faslodex')--a new treatment option for patients progressing on prior endocrine therapy. *Endocr.Relat Cancer* **9**:267-276.
- Morris,C.** (2002) The role of EGFR-directed therapy in the treatment of breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* **75 Suppl 1**:S51-S55.
- Mosselman,S., Polman,J., and Dijkema,R.** (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* **392**:49-53.
- Murphy,L.C., Dotzlaw,H., Leygue,E., Coutts,A., and Watson,P.** (1998) The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **65**:175-180.
- Nakhla,A.M., Mather,J.P., Janne,O.A., and Bardin,C.W.** (1984) Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid, and epithelial cells: effects of time in culture and cell density. *Endocrinology* **115**:121-128.
- Norfleet,A.M., Thomas,M.L., Gametchu,B., and Watson,C.S.** (1999) Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* **140**:3805-3814.
- Norfleet,A.M., Clarke,C.H., Gametchu,B., and Watson,C.S.** (2000) Antibodies to the estrogen receptor-alpha modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. *FASEB J* **14**:157-165.
- Onate,S.A., Tsai,S.Y., Tsai,M.J., and O'Malley,B.W.** (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**:1354-1357.
- Osborne,C., Wilson,P., and Tripathy,D.** (2004) Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist.* **9**:361-377.
- Osborne,C.K.** (1998) Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N.Engl.J.Med.* **339**:1609-1618.
- Osborne,C.K., Schiff,R., Fuqua,S.A., and Shou,J.** (2001) Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin.Cancer Res.* **7**:4338s-4342s.
- Osborne,C.K. and Schiff,R.** (2005) Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J.Clin.Oncol.* **23**:1616-1622.
- Paige,L.A., Christensen,D.J., Gron,H., Norris,J.D., Gottlin,E.B., Padilla,K.M., Chang,C.Y., Ballas,L.M., Hamilton,P.T., McDonnell,D.P., and Fowlkes,D.M.** (1999) Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:3999-4004.

- Pappas,T.C., Gametchu,B., Yannariello-Brown,J., Collins,T.J., and Watson,C.S.** (1994) Membrane estrogen receptors in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin. *Endocrine* **2**:813-822.
- Pappas,T.C., Gametchu,B., and Watson,C.S.** (1995a) Membrane estrogen receptor-enriched GH3/B6 cells have an enhanced non-genomic response to estrogen. *Endocrine* **3**:743-749.
- Pappas,T.C., Gametchu,B., and Watson,C.S.** (1995b) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J.* **9**:404-410.
- Pearson,G., Robinson,F., Beers,G.T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H.** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* **22**:153-183.
- Pedram,A., Razandi,M., and Levin,E.R.** (2006) Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Mol.Endocrinol.*
- Pietras,R.J. and Szego,C.M.** (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**:69-72.
- Pike,A.C., Brzozowski,A.M., Hubbard,R.E., Bonn,T., Thorsell,A.G., Engstrom,O., Ljunggren,J., Gustafsson,J.A., and Carlquist,M.** (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* **18** :4608-4618.
- Platet,N., Cathiard,A.M., Gleizes,M., and Garcia,M.** (2004) Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* **51**:55-67.
- Potter,G.A., McCague,R., and Jarman,M.** (1994) A mechanistic hypothesis for DNA adduct formation by tamoxifen following hepatic oxidative metabolism. *Carcinogenesis* **15**:439-442.
- Qi,M. and Elion,E.A.** (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci.* **118**:3569-3572.
- Qiu,J., Bosch,M.A., Tobias,S.C., Grandy,D.K., Scanlan,T.S., Ronnekleiv,O.K., and Kelly,M.J.** (2003) Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J.Neurosci.* **23**:9529-9540.
- Rauschnig,W. and Pritchard,K.I.** (1994) Droloxifene, a new antiestrogen: its role in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* **31**:83-94.
- Razandi,M., Pedram,A., Greene,G.L., and Levin,E.R.** (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol.Endocrinol.* **13**:307-319.
- Razandi,M., Pedram,A., and Levin,E.R.** (2000) Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol.Endocrinol.* **14**:1434-1447.
- Razandi,M., Oh,P., Pedram,A., Schnitzer,J., and Levin,E.R.** (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol.Endocrinol.* **16**:100-115.
- Razandi,M., Alton,G., Pedram,A., Ghonshani,S., Webb,P., and Levin,E.R.** (2003) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol.Cell Biol.* **23**:1633-1646.
- Revankar,C.M., Cimino,D.F., Sklar,L.A., Arterburn,J.B., and Prossnitz,E.R.** (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**:1625-1630.
- Robertson,J.F., Osborne,C.K., Howell,A., Jones,S.E., Mauriac,L., Ellis,M., Kleeberg,U.R., Come,S.E., Vergote,I., Gertler,S., Buzdar,A., Webster,A., and Morris,C.** (2003) Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. *Cancer* **98**:229-238.

- Robertson,J.F., Come,S.E., Jones,S.E., Beex,L., Kaufmann,M., Makris,A., Nortier,J.W., Possinger,K., and Rutqvist,L.E.** (2005) Endocrine treatment options for advanced breast cancer--the role of fulvestrant. *Eur.J.Cancer* **41**:346-356.
- Robinson,E., Kimmick,G.G., and Muss,H.B.** (1996) Tamoxifen in postmenopausal women a safety perspective. *Drugs Aging* **8**:329-337.
- Rochefort,H.** (1990) Cathepsin D in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.* **16**:3-13.
- Rochefort,H.** (1995) Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer. *Ciba Found.Symp.* **191** :254-265.
- Ropero,A.B., Soria,B., and Nadal,A.** (2002) A nonclassical estrogen membrane receptor triggers rapid differential actions in the endocrine pancreas. *Mol.Endocrinol.* **16**:497-505.
- Roux,P.P. and Blenis,J.** (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **68**:320-344.
- Russell,K.S., Haynes,M.P., Sinha,D., Clerisme,E., and Bender,J.R.** (2000) Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**:5930-5935.
- Santen,R.J.** (1996) Long-term tamoxifen therapy: can an antagonist become an agonist? *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**:2027-2029.
- Santen,R.J., Song,R.X., McPherson,R., Kumar,R., Adam,L., Jeng,M.H., and Yue,W.** (2002) The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **80**:239-256.
- Santen,R.J., Song,R.X., Zhang,Z., Kumar,R., Jeng,M.H., Masamura,S., Yue,W., and Berstein,L.** (2003) Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for superiority of aromatase inhibitors over selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment and prevention. *Endocr.Relat Cancer* **10**:111-130.
- Santen,R.J., Song,R.X., Zhang,Z., Yue,W., and Kumar,R.** (2004) Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for sequential responses to hormonal therapy in breast cancer. *Clin.Cancer Res.* **10**:337S-345S.
- Santen,R.J., Song,R.X., Zhang,Z., Kumar,R., Jeng,M.H., Masamura,S., Lawrence,J., Jr., MacMahon,L.P., Yue,W., and Berstein,L.** (2005) Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanisms and clinical relevance to aromatase inhibitor therapy in breast cancer treatment. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **95**:155-165.
- Sar,M. and Welsch,F.** (1999) Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* **140**:963-971.
- Saville,B., Wormke,M., Wang,F., Nguyen,T., Enmark,E., Kuiper,G., Gustafsson,J.A., and Safe,S.** (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol.Chem.* **275**:5379-5387.
- Schumacher,M., Coirini,H., Pfaff,D.W., and McEwen,B.S.** (1990) Behavioral effects of progesterone associated with rapid modulation of oxytocin receptors. *Science* **250**:691-694.
- Selye,H.** (1942) Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* **30**:437-453.
- Shim,W.S., Conaway,M., Masamura,S., Yue,W., Wang,J.P., Kmar,R., and Santen,R.J.** (2000) Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. *Endocrinology* **141**:396-405.

- Shou,J., Massarweh,S., Osborne,C.K., Wakeling,A.E., Ali,S., Weiss,H., and Schiff,R.** (2004) Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **96**:926-935.
- Simoncini,T., Hafezi-Moghadam,A., Brazil,D.P., Ley,K., Chin,W.W., and Liao,J.K.** (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**:538-541.
- Simoncini,T., Genazzani,A.R., and Liao,J.K.** (2002a) Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* **105**:1368-1373.
- Simoncini,T., Varone,G., Fornari,L., Mannella,P., Luisi,M., Labrie,F., and Genazzani,A.R.** (2002b) Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator. *Endocrinology* **143**:2052-2061.
- Simoncini,T. and Genazzani,A.R.** (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur.J Endocrinol.* **148**:281-292.
- Singh,M., Setalo,G., Jr., Guan,X., Warren,M., and Toran-Allerand,C.D.** (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J.Neurosci.* **19**:1179-1188.
- Sluysen,M.** (1995) Mutations in the estrogen receptor gene. *Hum.Mutat.* **6**:97-103.
- Song,R.X., McPherson,R.A., Adam,L., Bao,Y., Shupnik,M., Kumar,R., and Santen,R.J.** (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol.Endocrinol.* **16**:116-127.
- Song,R.X., Zhang,Z., and Santen,R.J.** (2005) Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol.Metab* **16**:347-353.
- Song,R.X. and Santen,R.J.** (2006) Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol.Reprod.* **75**:9-16.
- Soule,H.D., Vazquez,J., Long,A., Albert,S., and Brennan,M.** (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* **51**:1409-1416.
- Spach,C. and Streeten,D.H.** (1964) Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, *in vitro*. *J.Clin.Invest* **43**:217-227.
- Spyratos,F., Maudelonde,T., Brouillet,J.P., Brunet,M., Defrenne,A., Andrieu,C., Hacene,K., Desplaces,A., Rouesse,J., and Rochefort,H.** (1989) Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* **2**:1115-1118.
- Stefano,G.B., Cadet,P., Breton,C., Goumon,Y., Prevot,V., Dessaint,J.P., Beauvillain,J.C., Roumier,A.S., Welters,I., and Salzet,M.** (2000) Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. *Blood* **95**:3951-3958.
- Stavis,P.E., Deecher,D.C., Suhadolnik,L., Mallis,L.M., and Frail,D.E.** (1999) Differential effects of estradiol and estradiol-BSA conjugates. *Endocrinology* **140**:5455-5458.
- Taguchi,Y., Koslowski,M., and Bodenner,D.L.** (2004) Binding of estrogen receptor with estrogen conjugated to bovine serum albumin (BSA). *Nucl.Recept.* **2**:5.
- Takeshita,A., Cardona,G.R., Koibuchi,N., Suen,C.S., and Chin,W.W.** (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol.Chem.* **272**:27629-27634.

- Tassignon, J., Haeseleer, F., and Borkowski, A.** (1997) Natural antiestrogen receptor autoantibodies in man with estrogenic activity in mammary carcinoma cell culture: study of their mechanism of action; evidence for involvement of estrogen-like epitopes. *J Clin. Endocrinol. Metab* **82**:3464-3470.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J.** (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**:624-632.
- Thurlimann, B., Keshaviah, A., Coates, A.S., Mouridsen, H., Mauriac, L., Forbes, J.F., Paridaens, R., Castiglione-Gertsch, M., Gelber, R.D., Rabaglio, M., Smith, I., Wardly, A., Price, K.N., and Goldhirsch, A.** (2005) A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**:2747-2757.
- Tiruppathi, C., Naqvi, T., Wu, Y., Vogel, S.M., Minshall, R.D., and Malik, A.B.** (2004) Albumin mediates the transcytosis of myeloperoxidase by means of caveolae in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**:7699-7704.
- Toft, D. and Gorski, J.** (1966) A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **55**:1574-1581.
- Topper, Y.J. and Freeman, C.S.** (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* **60**:1049-1106.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P.** (1989) The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* **59**:477-487.
- Toran-Allerand, C.D., Guan, X., MacLusky, N.J., Horvath, T.L., Diano, S., Singh, M., Connolly, E.S., Jr., Nethrapalli, I.S., and Tinnikov, A.A.** (2002) ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J. Neurosci.* **22**:8391-8401.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G.** (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**:677-684.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**:4350-4354.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V.** (1999) Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell* **3** :513-519.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W.** (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:451-486.
- Vanacker, J.M., Pettersson, K., Gustafsson, J.A., and Laudet, V.** (1999) Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO J* **18**:4270-4279.
- Vivacqua, A., Bonfiglio, D., Recchia, A.G., Musti, A.M., Picard, D., Ando, S., and Maggiolini, M.** (2006) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **20**:631-646.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H.** (1996) TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* **15**:3667-3675.
- Wang, F., Duan, R., Chirgwin, J., and Safe, S.H.** (2000) Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by growth factors. *J. Mol. Endocrinol.* **24**:193-202.

- Watson,C.S., Campbell,C.H., and Gametchu,B.** (1999a) Membrane oestrogen receptors on rat pituitary tumour cells: immuno-identification and responses to oestradiol and xenoestrogens. *Exp.Physiol* **84**:1013-1022.
- Watson,C.S., Norfleet,A.M., Pappas,T.C., and Gametchu,B.** (1999b) Rapid actions of estrogens in GH3/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor-alpha. *Steroids* **64**:5-13.
- Watson,C.S., Campbell,C.H., and Gametchu,B.** (2002) The dynamic and elusive membrane estrogen receptor-alpha. *Steroids* **67**:429-437.
- Watters,J.J., Campbell,J.S., Cunningham,M.J., Krebs,E.G., and Dorsa,D.M.** (1997) Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**:4030-4033.
- Webb,P., Nguyen,P., Shinsako,J., Anderson,C., Feng,W., Nguyen,M.P., Chen,D., Huang,S.M., Subramanian,S., McKinerney,E., Katzenellenbogen,B.S., Stallcup,M.R., and Kushner,P.J.** (1998) Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol.Endocrinol.* **12**:1605-1618.
- Westley,B.R. and May,F.E.** (1996) Cathepsin D and breast cancer. *Eur.J.Cancer* **32A**:15-24.
- Wijayaratne,A.L., Nagel,S.C., Paige,L.A., Christensen,D.J., Norris,J.D., Fowlkes,D.M., and McDonnell,D.P.** (1999) Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens. *Endocrinology* **140**:5828-5840.
- Wijayaratne,A.L. and McDonnell,D.P.** (2001) The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J.Biol.Chem.* **276**:35684-35692.
- Wood,K.W., Sarnecki,C., Roberts,T.M., and Blenis,J.** (1992) ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**:1041-1050.
- Wyckoff,M.H., Chambliss,K.L., Mineo,C., Yuhanna,I.S., Mendelsohn,M.E., Mumby,S.M., and Shaul,P.W.** (2001) Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J.Biol.Chem.* **276**:27071-27076.
- Yamashita,S.** (1998) Localization and functions of steroid hormone receptors. *Histol.Histopathol.* **13**:255-270.
- Zhang,Z., Maier,B., Santen,R.J., and Song,R.X.** (2002) Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **294**:926-933.
- Zheng,J., Ali,A., and Ramirez,V.D.** (1996) Steroids conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steroid neuronal membrane binding sites. *J.Psychiatry Neurosci.* **21**:187-197.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μM	mikromolar (μmol/l)
A	Adenin (in Sequenzen)
Abb.	Abbildung
AF	Aktivierungsfunktion
AI	Aromatase-Inhibitor
AP-1	Activating protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
BCA	Bicinchoninic acid, Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
bzgl.	bezüglich
C	Cytosin (in Sequenzen)
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin 3', 5', -monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
cm	Zentimeter
CSFCS	Charcoal-Stripped FCS (Aktivkohlebehandeltes FCS)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
E <sub>2</sub>	Östradiol, 17β-Estradiol
E <sub>2</sub> -BSA	Östradiol-BSA (Konjugat)
E <sub>2</sub> -BSA-FITC	β-estradiol 6-(o-carboxymethyl)oxime:BSA-fluorescein isothiocyanate conjugate
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylene diaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor, Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor, Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor

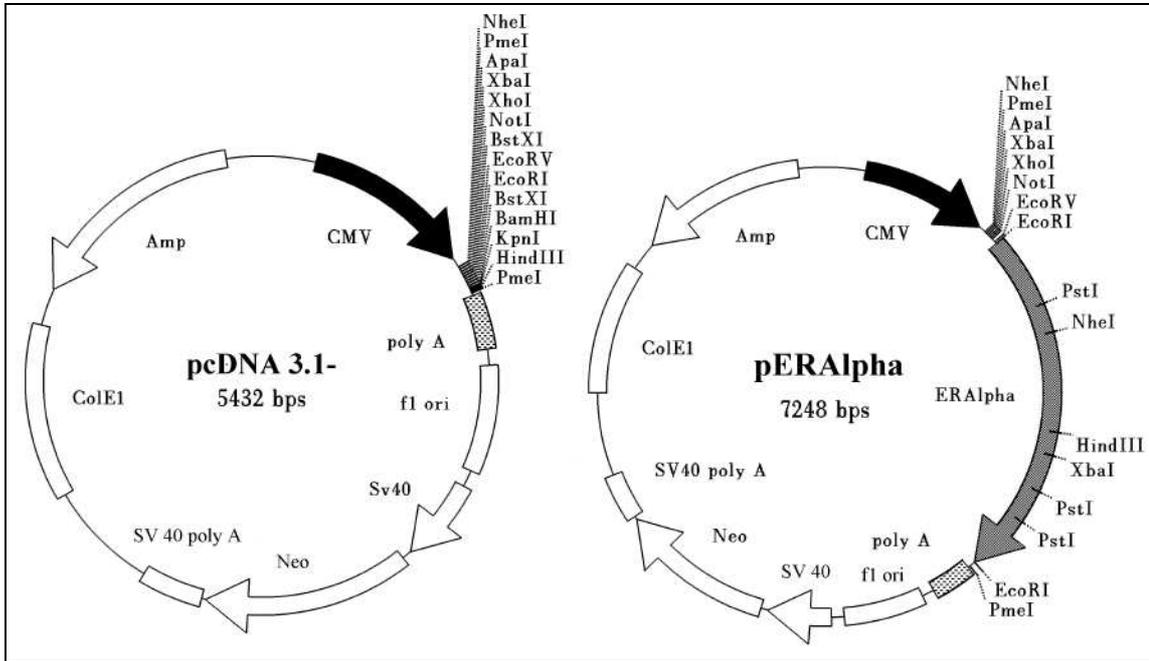
EGTA	Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Estrogen Receptor (Östrogenrezeptor)
ERE	estrogen responsive element
Erk1/2	Extracellular regulated kinases 1/2 (MAP-Kinase)
et al.	und andere
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin (in Sequenzen)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GPCR	G protein-coupled receptor, G-Protein gekoppelter Rezeptor
GR	Glucokortikoidrezeptor
h	hours (Stunden)
HRE	Hormone responsives Element
ICI	Pures Antiöstrogen (ICI 182780)
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-1R	IGF1-Rezeptor
IGFR	Insulin-like Growth Factor Receptor
IP3	Inositol 1, 4, 5-triphosphat
JNK	Jun N-terminale Kinase
kb	Kilo Basenpaare (kilo basepairs)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LBD	Liganden-bindende Domäne
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
max.	maximal
MEK	MAP Kinase Kinase
mER	membrannaher Anteil des Östrogenrezeptors (ER)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mM	millimolar (mmol/l)
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	messenger RNA
NCoR	nuclear receptor corepressor
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	nitric oxide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PR	Progesteronrezeptor
RAL	Raloxifen (verwendet als Raloxifen-Hydrochlorid)
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
s, sec	second(s), Sekunde(n)
SAPK	stress-activated protein kinase, Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat
SERD	Selective Estrogen Receptor Down-Regulator
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
T	Thymin (in Sequenzen)
Tab.	Tabelle
TAM	Tamoxifen
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
U	unit (s)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Medizinische Fachbegriffe

Angiogenese	Neubildung von Blutgefäßen
Ductuli	kleine Gänge, Kanälchen
Endometrium	Gebärmutter schleimhaut
invasiv	eindringend
Karzinom	bösartiges Geschwulst epithelialer Herkunft
Lobulus	Drüsenlappen
maligne	bösartig
Mamma	Brust
Menopause	letzte Regelblutung
Ovar	Eierstock
Ovarektomie	Operative Entfernung der Eierstöcke
pre-/postmenopausal	vor/nach der letzten Regelblutung
Zervix	Gebärmutterhals

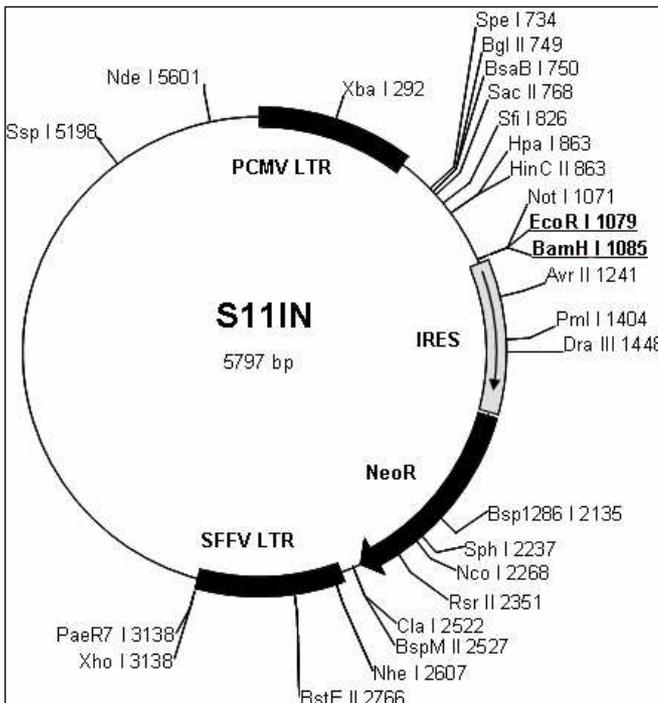
### 8.3 Plasmidkarten



#### Expressionsplasmide für den Östrogenrezeptor ER $\alpha$

Das ER $\alpha$  Gen wurde aus dem Expressionsplasmid pER $\alpha$  mittels PCR herausamplifiziert.

SV40: SV40 3'untranslated Region; Amp:  $\beta$ -lactamase; ColE1: ColE1 Plasmid-Replikationsursprung; f1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; CMV: CMV-Promotor; Neo: Neomycin-Resistenz; ERA $\alpha$ : hER $\alpha$ ; ER $\alpha$



#### Retrovirales Expressionsplasmid S11IN für das ER $\alpha$ -Gen.

Das ER $\alpha$  Gen wurde über die Schnittstellen EcoRI und BamHI in das Plasmid kloniert. S11IN wurde konstruiert von Kerstin Goettsche und freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. H. Hahnenberg (Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Immunologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

IRES: internal ribosomal entry site; LTR: long terminal repeat; NeoR: Neomycinresistenzgen

## 9 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.G. Bender für die Möglichkeit im molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Universität Düsseldorf wissenschaftlich arbeiten zu können. Herrn Prof. Dr. P. Dall danke ich für die Betreuung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich danke ich für die Übernahme des Korreferates und für die Vertretung meiner Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn Dr. D. Niederacher danke ich besonders für die stets kritische Auseinandersetzung mit meinem Thema und der Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Dr. S. Djahansouzi danke ich für die Anregung zu diesem Thema und der wissenschaftlichen Diskussion.

Herrn Dr. Hirschenhain und den Mitarbeitern des Endokrinologischen Labors der Frauenklinik danke ich für die Durchführung der Östradiolbestimmung.

Herrn Prof. Dr. A. Migliaccio danke ich für die Bereitstellung der MCF-7 Zellen.

Prof. Dr. Hahnenberg und Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung des retroviralen Expressionsvektors.

Frau Dr. B. Betz danke ich für die Durchführung der retroviralen Transfektionen und der Unterstützung in molekularbiologischen Fragen und der Klonierungsstrategie.

Mareike Reinhardt danke ich besonders für die gute und engagierte Zusammenarbeit bei den Experimenten zur Proliferation von MCF-7 Zellen.

Dagmar Hohmann danke ich besonders für die Unterstützung in der Zellkultur, der Durchführung der CLSM-Experimente und der uneigennütigen Arbeitsweise.

Ein besonderer Dank geht an Isabell Herrmann für die hervorragende Zusammenarbeit, die motivierenden Gespräche, ein immer offenes Ohr und die gute Freundschaft.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des MolGenLabs, insbesondere Artur, Beate, Dagmar, Gosia, Isa und Nora danke ich für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und das ein oder andere Kaffee-, Kuchen- oder Grillevent.

Herrn Ralf Holtmann danke ich für die Aufrechterhaltung der körperlichen Fit(fitfit)ness durch die Hunderte von Kilometern, die wir hinter uns gebracht haben und die dicke Freundschaft seit Anbeginn des Studiums.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei:

meiner Freundin Sandra Müller für die Geduld und Unterstützung während der letzten Jahre und insbesondere für die Besonnenheit während der Fertigstellung dieser Arbeit. Zudem ein Dank an das Team hinter den Kulissen als da wären Tikki, B-Meise und Kunifunze.

meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung in jeglicher Hinsicht und dem äußerst angenehmen und freundschaftlichen Verhältnis.

## 10 ERKLÄRUNG

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in vorgelegter oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 18.08.2006

Torsten Heimerzheim