

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Universitätsklinikum Düsseldorf
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Etablierung eines Modells zur funktionalen Testung neuartiger *ESR1*-Mutationen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von
Anna Sophie Eßer
2025

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Für meine Eltern Katja Scharnbeck und Frank Eßer, meine Schwester Lisa Blanke und
meine Neffen Lasse und Linus Blanke

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. In der endokrinen Langzeittherapie des hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms erleiden ca. 40 % der Patientinnen einen *Relapse* aufgrund sekundär therapieresistenter Tumorherde und Metastasen. Häufig zeichnen sich diese durch *ESR1*-Mutationen aus, die zu einer konstitutiven, östradiolunabhängigen ER α -Aktivierung führen. Ein frühzeitiges Screening auf *ESR1*-Mutationen und somit eine rechtzeitige Therapieanpassung könnte das progressionsfreie Überleben solcher Patientinnen verlängern. In Vorarbeiten wurden neben bekannten *ESR1*-Mutationen (z.B.: Y537S) auch bislang nicht-beschriebene Mutationen in zirkulierenden Tumorzellen oder zirkulierender Tumor-DNA im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen nach endokriner Therapie identifiziert, die zur Etablierung therapieresistenter Tumorzellklone führen könnten. Jedoch ist nicht bekannt, inwiefern diese *ESR1*-Mutationen die ER α -Aktivierung beeinflussen. Dies soll in dieser Arbeit im Überexpressionsmodell in ER α -abhängigen MCF-7-Mammakarzinomzellen mit einigen neuartigen *ESR1*-Mutationen untersucht werden. Dazu wurden MCF-7-Zellen mit den Überexpressionsplasmiden pCMV3 als Leervektorkontrolle, pCMV3-*ESR1* als ER α -Wildtyp-Kontrolle und pCMV3-Y537S, das die aktivierende ER α -Veränderung der Aminosäure Tyrosin zu Serin trägt, transient transfiziert. Die ER α -Expression wurde mittels Western blot über 20 Tage quantifiziert. Die FACS-Analyse erfolgte an Tag 3, 7 und 10, um den Anteil der überexprimierenden MCF-7-Zellen in der ersten Woche nach Transfektion zu quantifizieren. Verschiedene Kulturbedingungen wie mit und ohne Mediumwechsel 4 h nach Transfektion wurden getestet, um eine höhere Zellviabilität der MCF-7-Zellen zu garantieren. Als Positivkontrolle wurden MCF-7-LTED-Zellen eingeführt, die langfristig unter Östradiolentzug kultiviert wurden und sich mit der endogenen *ESR1*-Mutation Y537S auszeichnen. Das östradiolunabhängige Wachstum der MCF-7-LTED-Zellen wurde mittels MTT-Assay verifiziert. Für die Etablierung der Funktionstests wurden die transfizierten MCF-7^{Y537S}-Zellen hinzugezogen. Die transient eingeführte Y537S-Mutation wurde mit Western blot und Sanger-Sequenzierung nach Kultivierung der Zellen in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium verifiziert. Im weiteren Verlauf sollten die etablierten MCF-7-Klone unter unterschiedlichen Bedingungen, in hormonfreiem Medium und in Medien mit verschiedenen Östradiolkonzentrationen, analog untersucht werden. Mit qRT-PCRs wurde die ER α -Aktivität mittels des ER α -Zielproteins TFF1 bestimmt. Ebenfalls wurden die Effekte auf das Zellwachstum durch das Färben der Kolonien mit Kristallviolett überprüft. Die Besiedlungsfläche wurde als Surrogat für die Zellzahl eingesetzt.

Im Western blot wurde deutlich, dass nach Transfektion mit pCMV3-*ESR1* das Protein ER α in der ersten Woche in MCF-7-Zellen überexprimiert wurde. An Tag 3 war die ER α -Überexpression am stärksten. Nach Tag 7 sank die ER α -Expression auf das endogene Niveau. Im FACS war an Tag 3 nach Transfektion eine ER α -überexprimierende Zellpopulation nachweisbar, die an den Tagen 7 und 10 verschwunden war. Die Zellen wuchsen kaum adhärent und waren zunehmend apoptotisch, sodass die Transfektionsbedingungen optimiert wurden. Unter dem Mikroskop wurde eine erhöhte Zellviabilität nach einem Mediumwechsel 4 h nach Transfektion beobachtet. Trotz Mediumwechsel wurde eine ER α -Überexpression im Western blot und überexprimierende ER α -Zellpopulationen im FACS gemessen. Im Western blot wurde in MCF-7^{Y537S}-Zellen eine ER α -Überexpression in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium verifiziert. Daraufhin wurde eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Mutation im Genom nachweisbar war und transkribiert wurde. Es zeigte sich ausschließlich die Basenabfolge der Mutation (TCT) unabhängig vom Medium. In der qPCR wiesen die MCF-7^{Y537S}-Zellen eine Tendenz für eine östradiolunabhängige TFF1-Expression auf. In der Kristallviolett-färbung konnte kein erhöhtes Koloniewachstum in niedrigen Östradiolkonzentrationen bei MCF-7^{Y537S}-Zellen bestimmt werden. Zusammenfassend zeigte die Transfektion mit Plasmiden, die die bekannte aktivierende Mutation enthalten, keine messbare konstitutive Aktivität von ER α . Die Zellen mit überexprimierten *ESR1*-Varianten sind gegenüber der Depletion des ER α -Liganden Östrogen nicht resistent. Künftig sollten die *ESR1*-Varianten stabil per CRISPR-Cas in die Zelle integriert werden.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women. In long-term endocrine therapy of hormone receptor-positive breast cancer, around 40 % of patients suffer a relapse due to secondary therapy-resistant tumour foci and metastases. These are often characterised by *ESR1*-mutations that lead to constitutive, oestradiol-independent ER α activation. Early screening for *ESR1*-mutations and thus timely therapy adaptation could prolong the progression-free survival of such patients. In addition to known *ESR1*-mutations (e. g. Y537S), preliminary work has also identified previously undescribed mutations in circulating tumour cells or circulating tumour DNA in the blood of breast cancer patients following endocrine therapy, which could lead to the establishment of therapy-resistant tumour cell clones. However, it is not known how these *ESR1*-mutations influence ER α -activation.

This will be investigated in this work in the overexpression model in ER α -dependent MCF-7 mammary carcinoma cells with some novel *ESR1*-mutations. For this purpose, MCF-7-cells were transiently transfected with the overexpression plasmids pCMV3 as empty vector control, pCMV3-*ESR1* as ER α wild-type control and pCMV3-Y537S, which carries the activating ER α -change of the amino acid tyrosine to serine. ER α -expression was quantified by Western blot over 20 days. FACS analysis was performed at day 3, 7 and 10 to quantify the proportion of overexpressing MCF-7-cells in the first week after transfection. Different culture conditions such as with and without medium change 4 h after transfection, were tested to ensure increased cell viability of MCF-7-cells. As a positive control MCF-7-LTED-cells were introduced that were cultured long-term under oestradiol deprivation and characterised with the endogenous *ESR1*-mutation Y537S. The oestradiol-independent growth of the cells was verified by MTT-Assay. The transiently transfected MCF-7^{Y537S}-cells were used to establish the functional tests. The transiently introduced Y537S-mutation was verified by Western blot and Sanger-Sequencing after culturing the cells in RPMI-medium and Charcoal-stripped FCS-medium. Subsequently, the established MCF-7 clones were to be analysed analogously under different conditions, in hormone-free medium and in media with different oestradiol concentrations. The ER α -activity was determined with qRT-PCRs using the ER α -target protein TFF1. The effects on cell growth were also examined by staining the colonies with crystal violet. The colonisation area was used as a surrogate for the cell number.

Western blot analysis revealed that after transfection with pCMV3-*ESR1* the ER α -protein was overexpressed in MCF-7-cells during the first week. On day 3, ER α -overexpression was strongest. After day 7, ER α -expression decreased to endogenous levels. In FACS an ER α -overexpressing cell population was detectable on day 3 after transfection, which had disappeared on days 7 and 10. The cells grew with low adherence and were increasingly apoptotic, so the transfection conditions were optimised. Under the microscope, increased cell viability was observed after a medium change after 4 h. Despite the change, ER α -overexpression was measured in Western blot and overexpressing ER α -cell populations in FACS. In Western blot, ER α -overexpression was verified in MCF-7^{Y537S}-cells in RPMI-medium and Charcoal-stripped FCS-medium. Sanger-Sequencing was then performed to verify whether the mutation was detectable in the genome and transcribed. Only the base sequence of the mutation (TCT) was detected, regardless of the medium. In qPCR, MCF-7^{Y537S}-cells had a tendency for oestradiol-independent TFF1 expression. No increased colony growth was observed in MCF-7^{Y537S} cells at low oestradiol concentrations in the crystal violet staining assay.

In summary, transfection with plasmids containing the known activating mutation did not show any measurable constitutive activity of ER α . Cells overexpressing *ESR1*-variants are not resistant to depletion of the ER α ligand oestrogen. In the future, *ESR1*-variants should be stably integrated into the cell using CRISPR-Cas.

Abkürzungsverzeichnis

AF-1	Ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne
AF-2	Ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne
AI	Aromatase-Inhibitor
AK	Antikörper
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Konzentration
cfDNA	Zellfreie DNA
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
crRNA	CRISPR-RNA
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	DesoxyNukleosidTriPhosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
E	Östradiol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDT	Östrogenentzugstherapie
EpCAM	Epithelzell-Adhäsionsmolekül
ERα	Östrogenrezeptor α
ERE	Östrogenresponsives Element
FCS	Fetales Kälberserum
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
HDR	Homologe Rekombination
HR	Hazard Ratio
HR +	Hormonrezeptor positiv
HRP	Meerrettichperoxidase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LxxLL	Leucin-x-x-Leucin-Leucin-Motiv
LTED	Long term estrogen deprivation

LV	Leervektor
NGS	Next Generation Sequencing
NTD	Aminoterninale Domäne
PAM	Protospacer-adjacent Motif-Sequenz
pCMV	Porcines Cytomegalie Virus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFS	Progressionsfreies Überleben
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Real-Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNP	Ribonukleoprotein
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERDs	Selektive Östrogenrezeptor-Degrader
SERMs	Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
sgRNA	Single-guide-RNA
SRB	Sulforhodamin-B-Assay
TEPS	Tumor gebildete Blutplättchen
TFF1	Trefoil Factor 1
tracrRNA	Transaktivierende CRISPR-RNA
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

SI- Einheiten

°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
bp	Basenpaar
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
g	Gramm
ng	Nanogramm
M	molar
Nm	Nanomolar
nmol	Nanomol
μg	Mikrogramm
mA	Milliampere
V	Volt
min	Minute
h	Stunde
d	Tag
Rpm	revolutions per minute

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Hereditäres Mammakarzinom	1
1.1.4	TNM-Klassifikation	2
1.1.5	Symptome.....	2
1.1.6	Diagnostik	3
1.1.7	Endokrine Therapie bei HR+ Mammakarzinom	4
1.2	Der Östrogenrezeptor	5
1.3	Flüssigbiopsien	6
1.3.1	CTCs	7
1.3.2	Detektion von CTCs.....	7
1.4	Grenzen der endokrinen Therapie durch <i>ESR1</i>-Mutationen.....	8
1.4.1	Veränderungen der ER α -Struktur durch aktivierende Mutationen	9
1.4.2	Detektion von <i>ESR1</i> -Mutationen in CTCs unter Östrogenentzugstherapie.....	9
1.4.3	Klinische Relevanz der <i>ESR1</i> -Mutation für die Anpassung der endokrinen Therapie	10
1.5	Das CRISPR-Cas9-System als Werkzeug zur gezielten Gen-Editierung	11
1.6	Ziele der Arbeit	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Zelllinien.....	14
2.1.2	Zellkultur	14
2.1.3	pCMV3 Plasmid für transiente Transfektion	15
2.1.4	Verwendetes Medium	15
2.1.5	Verwendetes Material	16
2.1.6	Verwendete Chemikalien.....	17
2.1.7	Verwendete Puffer.....	19
2.1.8	Verwendete Antikörper	21
2.1.9	Verwendete Geräte.....	21
2.1.10	Mikroorganismen/Plasmid.....	23
2.1.11	Verwendete Kits.....	23

2.2	Methoden	24
2.2.1	Transiente Transfektion der MCF-7-Zellen mit pCMV3 Plasmid.....	24
2.2.2	Western blot	25
2.2.3	MTT-Assay.....	30
2.2.4	Durchflusszytometrie.....	32
2.2.5	Klonierung von DNA in Plasmiden	34
2.2.5.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	34
2.2.5.2	Transformation	34
2.2.5.3	Plasmidpräparation	35
2.2.6	RNA-Isolierung	37
2.2.7	Reverse Transkription	38
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion	39
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.10	Gelelution: Reinigung von DNA-Fragmenten zwischen 40 bp und 50 kb.....	41
2.2.11	Kristallviolett-färbung.....	42
2.2.12	Trefoil Factor 1	42
2.2.13	Real-Time Quantitative PCR.....	42
2.2.14	Sanger-Sequenzierung	44
2.2.15	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	ERα-Expression von pCMV3 und pCMV3-<i>ESR1</i> transfizierten MCF-7-Zellen	46
3.2	Durchflusszytometrie: 3, 7 und 10 Tage nach Transfektion	48
3.3	Optimierung der Transfektionsbedingungen	49
3.4	Western blot: ERα-Expression nach einem Mediumwechsel 4, 24 oder 72 h nach Transfektion	51
3.5	Durchflusszytometrie: Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h	52
3.5.1	Sechs Tage nach Transfektion	52
3.5.2	Drei Tage nach Transfektion.....	53
3.6	Western blot: ERα-Expression in MCF-7^{Y537S}-Zellen in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium	54
3.7	Sanger-Sequenzierung: MCF-7^{Y537S}-Zellen kultiviert in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium	56
3.8	qPCR: TFF1-Expression in MCF-7^{Y537S}- und MCF-7^{WT}-Zellen in 10⁻⁹ M Östradiol und unter Östradiolentzug.....	57

3.9	MTT-Assay: Vergleich der Zellviabilität von MCF-7 und MCF-7-LTED-Zellen	59
3.10	qPCR-Optimierung: TFF1-Expression in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol.....	60
3.11	Kristallviolett: prozentuale Berechnung der Besiedlungsfläche von transfizierten MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen	61
4	<i>Diskussion</i>	65
4.1	Vorbemerkung	65
4.2	Diskussion einzelner Untersuchungsaspekte.....	66
4.2.1	ER α -Expression in transfizierten MCF-7-Zellen: Western blot vs. Durchflusszytometrie...	66
4.2.2	Nachweis der Y537S-Mutation in transfizierten MCF-7-Zellen mittels cDNA-Synthese und Sanger-Sequenzierung	66
4.2.3	Kristallviolett: prozentuale Berechnung der Besiedlungsfläche mit ImageJ	67
4.2.4	Ektopische <i>ESR1</i> -Mutation: transiente Transfektion mithilfe pCMV3 Plasmid	68
4.3	Diskussion weiterer Transfektionsmethoden und funktionaler Testungen.....	70
4.3.1	Optimierung der transienten Transfektion und Etablierung des ERE-Luciferase-Assays....	70
4.3.2	Stabile Integration: lentivirale Transfektion und CRISPR-Cas9-System	73
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	78
5	<i>Literatur- und Quellenverzeichnis</i>	79
6	<i>Anhang</i>	85
6.1	Western blot: 3, 7, 10, 15 und 20 Tage nach Transfektion (n=2).....	85
6.2	Durchflusszytometrie: 3, 7, 10 Tage nach Transfektion (n=3)	86
6.3	Durchflusszytometrie: 4, 24 und 72 h nach Transfektion (n=3)	87
6.4	Optimierung der Transfektionsbedingungen: Cell Selector (n=2).....	88
6.5	MTT-Assay: Ratio von MCF-7/MCF-7-LTED-Zellen (n=3).....	89
6.6	Western blot: ER α -Expression von MCF-7- ^{Y537S} -Zellen in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium (n=2)	90
6.7	Sanger-Sequenzierung (n=2).....	91
6.8	qPCR-Optimierung: TFF1-Expression in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol (n = 3)	92
6.9	Kristallviolettfärbung (n=3).....	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Wirkprinzipien der endokrinen Therapie	5
Abb. 2: Aufbau des Östrogenrezeptors	6
Abb. 3: CellSearch-Kriterien zur CTC-Analyse	8
Abb. 4: Aufbau von dem „Transfer-Sandwich“	28
Abb. 5: Pipettierschema von MCF-7 und MCF-7-LTED für den MTT-Assay	31
Abb. 6: Vergleich der ER α -Expression innerhalb von 20 Tagen bei pCMV3 und pCMV3-ESR147	
Abb. 7: Western blot: Vergleich der ER α -Expression innerhalb von 20 Tagen bei pCMV3 und pCMV3-ESR1 (n=2)	47
Abb. 8: FlowJo Einstellung	48
Abb. 9: Durchflusszytometrie: Vergleich der ER α -Expression 3,7, und 10 Tage nach transienter Transfektion mit pCMV3-ESR1 (n=2, jeweils 2 Replikate)	49
Abb. 10: Zellmorphologie der transient transfizierten MCF-7-Zellen bei einem Mediumwechsel nach 4, 24, und 72 h (n=2)	50
Abb. 11: Vergleich der ER α -Expression sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 oder 72 h	51
Abb. 12: Western blot: ER α -Expression sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=3)	52
Abb. 13: Durchflusszytometrie: sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=1)	53
Abb. 14: Durchflusszytometrie: drei Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=3)	54
Abb. 15: Vergleich der ER α -Expression in Y537S transfizierten Zellen und Kultivierung in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion	55
Abb. 16: Western blot: ER α -Expression in pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen und Kultivierung in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion (n=2)	55
Abb. 17: Sanger-Sequenzierung: von pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen kultiviert im RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion (n=2)	57
Abb. 18: TFF1-Expression bei pCMV3-ESR1 und pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen unter Östradiol(entzug), sechs Tage nach Transfektion	58
Abb. 19: MTT-Assay: MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen kultiviert in einer Östradiolverdünnungsreihe	59
Abb. 20: TFF1-Expression in transient transfizierten MCF-7-Zellen mit Ratio Bildung $10^{-13}/10^{-9}$ M, sechs Tage nach Transfektion	61
Abb. 21: Beispiel für die Berechnung der Besiedlungsfläche mit ImageJ	62
Abb. 22: Kristallviolett Färbung: Vergleich der Besiedlungsfläche in transfizierten MCF-7-Zellen in Östradiolkonzentrationen von 10^{-13} M bis 10^{-9} M (n=3)	63

Abb. 23: Kristallviolett Färbung: mikroskopische Abbildung der Besiedlungsflächen (n=2 mit jeweils 2 Replikaten) _____ 64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendetes Medium _____	15
Tabelle 2: verwendetes Material _____	16
Tabelle 3: verwendete Chemikalien _____	17
Tabelle 4: verwendete Puffer _____	19
Tabelle 5: verwendete Antikörper _____	21
Tabelle 6: verwendete Geräte _____	21
Tabelle 7: Mikroorganismen/Plasmid _____	23
Tabelle 8: verwendete Kits _____	23
Tabelle 9: Zusammensetzung der BSA-Standardreihe _____	26
Tabelle 10: Kitgröße von dem QIAGEN Plasmid Kit _____	35
Tabelle 11: Master-Mix für die reverse Transkription _____	38
Tabelle 12: Primer _____	40
Tabelle 13: Verdünnungsreihe der Qualitätskontrolle bei qPCR _____	43
Tabelle 14: Master-Mix für die qPCR _____	43
Tabelle 15: Gegenüberstellung weiterer Transfektionsbedingungen und funktionaler Testungen _____	75

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Im Jahr 2020 sind 70.550 Neuerkrankungen erfasst worden. Unter den Neuerkrankungen sind 738 der Betroffenen männlich. Jede achte Frau erkrankt während ihrer Lebensperiode an einem Mammakarzinom (Koch-Institut, 2024a). Über 18.480 Frauen verstarben im Jahr 2021 daran (Koch-Institut, 2024b). In den Industrieländern ist das Mammakarzinom vom 35. bis zum 55. Lebensjahr die häufigste Todesursache (Uhl, 2023).

1.1.2 Risikofaktoren

Das Auftreten des Mammakarzinoms wird durch eine Vielzahl von Risikofaktoren begünstigt. Die Risikofaktoren lassen sich in nicht beeinflussbare und beeinflussbare Risikofaktoren einteilen. Zu den nicht beeinflussbaren Faktoren zählen: die familiäre Belastung, höheres Alter, Thoraxbestrahlung, frühe Menarche und späte Menopause. Ebenfalls wird das Risiko durch eine Nulliparität, eine geringe Geburtenzahl oder ein höheres Alter bei der ersten Geburt erhöht. Unter den beeinflussbaren Risikofaktoren werden Alkohol- und Nikotinabusus, verminderte körperliche Aktivität, Adipositas, Diabetes mellitus Typ II sowie die Einnahme einer Hormontherapie gezählt. Beispiele für die Hormontherapie sind die orale Einnahme von Kontrazeptiva oder eine Hormonersatztherapie mit Östrogen-/Gestagenkombination bei postmenopausalen Frauen für mindestens fünf Jahre (Uhl, 2023).

1.1.3 Hereditäres Mammakarzinom

Eine familiäre Belastung tritt bei 30 % aller Frauen auf, was ein Hinweis für eine genetische Disposition sein kann ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021; Wendt & Margolin, 2019). Jedoch lässt sich das erblich bedingte Mammakarzinom nur in 5-10 % der Fälle nachweisen (Godet & Gilkes, 2017). Beim erblich bedingten Mammakarzinom werden in 25 % der Fälle Keimbahnmutationen in den Hochrisikogenen *Breast Cancer 1 (BRCA 1)* und *Breast Cancer 2 (BRCA 2)* nachgewiesen. Dadurch erkranken die betroffenen Frauen etwa 20 Jahre früher als die Patientinnen mit einem sporadischen

Mammakarzinom ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). *BRCA 1* und *BRCA 2* sind Tumorsuppressorgene. Sie codieren für Proteine, die an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt sind. Zusätzlich arbeiten sie als Transkriptionsfaktoren, die die DNA-Synthese regulieren und kontrollieren das Zellwachstum (Varol et al., 2018). Wenn die Tumorsuppressorgene mutiert sind, teilen sich die Zellen unkontrolliert (Holinski-Feder et al., 1998). Die *BRCA*-Mutation wird autosomal-dominant mit unvollständiger Penetranz an die Nachkommen vererbt (Meindl et al., 2011). Krebsdispositionssyndrome wie das Li-Fraumeni-Syndrom begünstigen ebenfalls das prämenopausale Mammakarzinom (Correa, 2016). Zugrunde liegt eine autosomal-dominant vererbte Mutation im *p53*-Gen, die mit Brust-, Sarkom-, Leukämie- und Nebennierenkrebsyndromen assoziiert ist (Aedma & Kasi, 2024).

1.1.4 TNM-Klassifikation

Mithilfe der TNM-Klassifikation wird das Mammakarzinom histopathologisch eingeteilt. Das „T“ (Tumor) steht für die Größe des Primärtumors, „N“ (*nodes*) für die Beteiligung der Lymphknoten und „M“ für Metastasen ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). Mit der Klassifikation wird zusätzlich die Resttumorgröße (R) und die Ausbreitung in die Venen oder Lymphbahnen (V) beschrieben. Die Metastasierung erfolgt lymphogen und hämatogen. Hauptsächlich streut das Mammakarzinom in die axillären Lymphknoten. Je nach Tumorlokalisation ist eine Beteiligung der supraclaviculären und retrosternalen Lymphknoten möglich. Die hämatogene Streuung erfolgt vor allem ins Skelettsystem gefolgt von Leber, Lunge und Pleura. ZNS und die Ovarien sind selten betroffen (Goerke & Valet, 2020).

1.1.5 Symptome

Symptomatisch äußert sich das Mammakarzinom mit einer neu aufgetretenen Asymmetrie der Mammae, palpablen, harten, wenig verschiebbaren Knoten, supraclaviculär oder axillär tastbaren Lymphknoten und Galaktorrhö. Hauteinziehungen- oder Vorwölbungen werden als Jackson-Phänomen bezeichnet (Goerke & Valet, 2020).

1.1.6 Diagnostik

Um das Mammakarzinom zu diagnostizieren, werden die Brustquadranten sowie das Lymphabflussgebiet inspiziert und palpiert. Bei einem auffälligen Tastbefund wird eine Mammografie durchgeführt. Im Anschluss wird in der Regel eine Stanzbiopsie angeordnet, um das Gewebe auf molekularer Ebene zu untersuchen. Ein MRT wird nur selten verwendet. Die MRT spielt bei einem unklaren Befund oder nach Operationen bei der Frage nach In-Brust-Rezidiven oder Narben eine Rolle (Goerke & Valet, 2020).

Die molekulare Untersuchung ist unabdingbar, um die Bösartigkeit des Tumors abzuschätzen und um die Therapie individuell zu planen ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). Mit Markierungsverfahren wird kontrolliert, wie hoch die Dichte von Hormonrezeptoren auf der Brustkrebsoberfläche ist. Die Brustkrebszellen gelten als Hormonrezeptor positiv (HR+), sobald über 1 % der Zellen auf das Markierungsverfahren reagieren (Hammond et al., 2010). Bei 70 % der Krebspatientinnen werden die Brustkrebszellen positiv auf die Hormonrezeptoren für Östrogen und/oder Progesteron getestet (Lim et al., 2012). Die Hormone Progesteron und Östrogen fördern das Wachstum HR+ Mammakarzinomzellen. Deswegen wird das Tumorwachstum durch endokrine Therapien, die zu einem Hormonentzug führen, verzögert (Ascione et al., 2024). Ebenfalls wird der HER2-Rezeptor-Status mithilfe der in-situ-Hybridisierung bestimmt. Bei einem HER2-positivem Karzinom wird zusätzlich eine zielgerichtete Anti-HER2-Therapie wie Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper (AK) gerichtet gegen HER2, verabreicht ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). Die HER2-Positivität ist mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv, einen aggressiven Verlauf und Metastasen assoziiert, wodurch die Prognose schlechter ist als bei HER2-negativen Patientinnen (Rouanet et al., 2014). Mithilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 werden die Wachstumsgeschwindigkeit und das Risiko des Tumors abgeschätzt. Dabei besteht ein erhöhtes Risiko, wenn eine Positivität von 25 % erreicht wird. Bei histologisch gesicherten HR+, HER2-negativen Mammakarzinomen trägt der Proliferationsmarker Ki-67 zur Prognoseabschätzung bei und unterstützt die Entscheidung über den Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie. Das Risiko ist hoch, wenn mehr als 25 % positiv sind ("Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). Mithilfe der molekularpathologischen

Untersuchung kann das Mammakarzinom in vier Subtypen eingeteilt werden. Es werden Luminal A (HR+, HER2-negativ, Ki-67 niedrig), Luminal B (HR+, HER2-negativ, Ki-67 hoch), HER2 Subtyp (HER2-positiv) und triple negativ (HER2-negativ, HR-) unterschieden (Holowatyj et al., 2016; "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021).

1.1.7 Endokrine Therapie bei HR+ Mammakarzinom

Die Therapie des Mammakarzinoms ist vielseitig und muss patientenabhängig interdisziplinär diskutiert werden. Bei Patientinnen mit HR+ Tumoren wird eine endokrine Therapie für mindestens fünf Jahren bevorzugt (Goerke & Valet, 2020; "Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms," 2021). Das Tumorwachstum soll reduziert werden, indem die Signalkaskade des Östrogenrezeptors (ER) unterbrochen wird. Es wird entweder weniger Östrogen produziert oder die Östrogen-/Östrogenrezeptor Interaktion wird blockiert. Es gibt verschiedene Medikamentengruppen, die zu der endokrinen Therapie gezählt werden. Das schematische Wirkprinzip ist in Abb.1 illustriert.

Aromatase-Inhibitoren (AIs) wie Letrozol werden vor allem bei postmenopausalen Patientinnen eingesetzt. Die Aromatase ist ein Enzym, welches die Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen katalysiert. Die AIs unterdrücken auf diese Weise die Östrogenproduktion. Bei prämenopausalen Patientinnen können die AIs nach Ausschaltung der Ovarfunktion eingesetzt werden (Goerke & Valet, 2020). Deswegen werden als Begleittherapie Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Agonisten wie Goserelin oder Triptorelin verschrieben. Die GnRH-Agonisten erniedrigen die körpereigene GnRH-Ausschüttung im Hypothalamus, weshalb die lokale Östrogen- und Progesteronproduktion im Ovar gehemmt wird (Goerke & Valet, 2020).

Prämenopausale Patientinnen erhalten als adjuvante Erstlinientherapie Tamoxifen für eine Behandlungsdauer von fünf Jahren. Tamoxifen gehört zu den selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs). Im Brustgewebe binden sie den Östrogenrezeptor kompetitiv und bilden einen inaktiven Komplex (Goerke & Valet, 2020; Jeffreys et al., 2020).

Beim metastasierten Mammakarzinom nach erfolgloser endokriner Therapie werden die selektive Östrogenrezeptor-Degrader (SERDs) wie Fulvestrant verabreicht (Goerke & Valet, 2020). SERDs binden an den Östrogenrezeptor und kennzeichnen diesen für die proteosomale Degradation (Jeffreys et al., 2020).

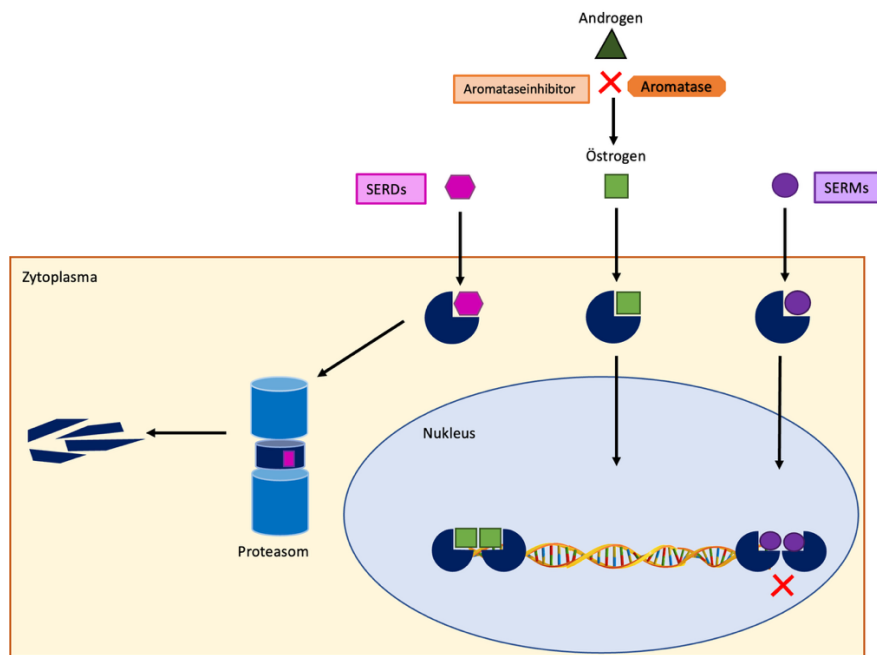


Abb. 1: Wirkprinzipien der endokrinen Therapie

Androgene werden durch das Enzym Aromatase in Östrogene umgewandelt. Östrogene diffundieren durch die Zellmembran und binden an den nukleären Rezeptor. Zwei Rezeptor-Liganden-Komplexe dimerisieren und folgend wirkt das Dimer als Transkriptionsfaktor im Kern. Als hemmen das Enzym Aromatase und somit die Umwandlung in Östrogene. SERDs markieren den Rezeptor für die proteosomale Degradation. SERMs bewirken eine gewebespezifische Modulation der Östrogenrezeptor-Signalübertragung. Im Brustgewebe wirkt der SERM-Rezeptor-Komplex antagonistisch.

Legende: Als = Aromatase Inhibitor, SERMs = Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator, SERDs = Selektiver Östrogenrezeptor-Degrader

Vorlage erstellt nach (Jeffreys et al., 2020)

1.2 Der Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor reguliert eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Einerseits beeinflusst der Rezeptor den weiblichen Zyklus sowie die Schwangerschaft und Stillzeit (Jeffreys et al., 2020). Andererseits beeinflusst der Rezeptor das vaskuläre, skelettale und neurovaskuläre System sowie die Immunabwehr (Hamilton et al., 2017).

Es sind insgesamt zwei Subtypen des Rezeptors bekannt: ER α wird durch das *ESR1*-Gen kodiert, ER β durch das *ESR2*-Gen. *ESR1* befindet sich auf Chromosom 6; *ESR2* auf Chromosom 14 (Jeffreys et al., 2020). ER α und ER β unterscheiden sich in der Expression. ER α wird vor allem in Brustdrüse, Gebärmutter, Gebärmutterhals, Vagina, Hypophyse, Leber, Hypothalamus und Knochen exprimiert. ER β wird in den Ovarien, Lunge und Prostata exprimiert. Jedoch unterscheidet sich der strukturelle Aufbau von ER α und ER β nicht.

Die Östrogenrezeptoren werden in sechs funktionellen Domänen eingeteilt (Abb.2): Die A/B-Domäne entspricht der aminoterminalen Domäne (NTD), welche die

ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-1) beinhaltet (Grinshpun et al., 2023). Die AF-1-Domäne wird mithilfe von Wachstumsfaktoren über den MAP-Kinase-Weg aktiviert (Shiau et al., 1998). Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) liegt zentral und besteht aus zwei Zinkfingerdomänen. Der Östrogenrezeptor bindet mithilfe der DBD an ein östrogenresponsives DNA-Element (ERE) des Zielgens. Über eine Scharnierregion (*hinge*) sind die Ligandenbindungsdomäne (LBD) und die C-terminal lokalisierte ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne (AF-2) mit der DBD verbunden (Arao & Korach, 2021).

Östrogenrezeptoren können auf der Plasmamembran oder im Nukleus lokalisiert sein. Auf der Plasmamembran werden biologischen Effekte wie die Migration, Proliferation und die Entwicklung von Zellen mithilfe von cAMP und MAPK-Modifikation direkt beeinflusst. Im Kern beeinflusst der Rezeptor als Transkriptionsfaktor die Genexpression (Saczko et al., 2017). Hierfür diffundiert Östrogen durch die Zellmembran und bindet im Zytoplasma an den Östrogenrezeptor ER α oder ER β . Der Liganden-Rezeptor-Komplex dimerisiert und wandert in den Nukleus, wo der Komplex an das Chromatin der ERE bindet (Fuentes & Silveyra, 2019).



Abb. 2: Aufbau des Östrogenrezeptors

Legende: N = NH₂ terminales Ende, NTD = aminoterminal Domäne, AF-1 = N-terminale ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne, *hinge* = verbindet DBD und AF-2, DBD = DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne, AF-2: C-terminale ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne, C = COOH terminales Ende
Vorlage erstellt nach (Fuentes & Silveyra, 2019)

1.3 Flüssigbiopsien

Unter Flüssigbiopsien wird die minimal-invasive Gewinnung von Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut oder seltener Urin, Aszites- oder Pleuraflüssigkeit verstanden, um mithilfe der Flüssigkeiten Tumormerkmale zu detektieren, zu analysieren und bereits diagnostizierte Krebserkrankungen in Echtzeit zu überwachen (Nikanjam et al., 2022; Poulet et al., 2019). Flüssigbiopsien ermöglichen eine risikoarme, molekulare Analyse genetischer Veränderungen, die für die Entwicklung einer individuell angepassten Behandlungsstrategie entscheidend sind (Polasik et al., 2017; Poulet et al., 2019). Hingegen erfordern Gewebebiopsien invasive chirurgische Eingriffe, weshalb serielle Gewebenprobenanalysen ohne Weiteres nicht wiederholt durchführbar sind. Die

Tumorlokalisation schränkt den Erfolg einer Gewebebiopsie ein. Zusätzlich kann eine einzelne Gewebeprobe nicht die vollständige, intratumorale Heterogenität abbilden. Aus den Flüssigkeiten können zirkulierende zellfreie DNA (cfDNA), zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs), RNA, tumor-gebildete Blutplättchen (*tumor educated platelets*, TEPs) sowie Vesikel oder Exosome gewonnen werden. Mithilfe der Flüssigbiopsie werden vor allem CTCs und ctDNA analysiert (Poulet et al., 2019). Die CTCs gehen von verschiedenen Bereichen des Tumors ins Blut über, sodass molekulare Informationen des gesamten Tumors erfasst werden (Nikanjam et al., 2022).

1.3.1 CTCs

Bereits 1869 wurden die CTCs von Thomas Ashworth erstmalig als „*cells similar to those in the tumours were seen after death*“ beschrieben (Ashworth, 1869). Von dem Primärtumor oder von den Metastasen können sich Zellen lösen, sodass die CTCs im Blut oder Lymphsystem zirkulieren. Die CTCs haben eine Überlebenszeit von ca. 1,5-2 h bis sie vom Immunsystem eliminiert werden. Ein Teil der CTCs entgeht jedoch dieser Immunantwort und kann so zur Metastasierung des Tumors beitragen. Abzugrenzen hiervon sind ctDNA-Moleküle. CtDNA sind DNA-Bruchstücke des Tumors, die durch apoptotische Tumorzellen ins Blut, Urin oder Plasma freigesetzt werden (Gorges & Pantel, 2016; Nikanjam et al., 2022). Die CTCs und die ctDNA werden im venösen Blut bei Patientinnen mit frühem oder metastasiertem Mammakarzinom detektiert. Die Anzahl der CTCs und die Menge der ctDNA im Blut sind ein prädiktiver Marker für das Outcome und das progressionsfreie Überleben (PFS) (Polasik et al., 2017). Bei metastasiertem Mammakarzinom wurde untersucht, dass eine CTC-Anzahl von mehr als fünf pro 7,5 ml Blut mit einem reduzierten Gesamtüberleben assoziiert war (Nikanjam et al., 2022).

1.3.2 Detektion von CTCs

Das CellSearch System von Menarini wurde von der US-amerikanischen „*Food and Drug Administration*“ (FDA) als einziges System für den klinischen Einsatz zur Detektion von CTCs zugelassen und trägt zudem die CE-Kennzeichnung für den Einsatz in Europa. Hiermit werden die CTCs im peripheren Blut von Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom, aber auch vom metastasiertem Prostata- oder Kolonkarzinom, gewonnen (Nikanjam et al., 2022). Um CTCs detektieren zu können, wird die Expression vom Epithelzell-Adhäsionsmolekül (EpCAM) analysiert. EpCAM

ist ein transmembranes Glykoprotein, welches bei primären oder metastasierten Karzinomen auf der Oberfläche überexprimiert wird. EpCAM reguliert die Krebszelladhäsion, die Proliferation, die Migration sowie die epitheliale-mesenchymale Transition. Die EpCAM-Expression variiert je nach Tumortyp, weshalb beispielsweise die CTC-Analyse nicht bei Melanomen, Sarkomen oder Lymphomen eingesetzt werden kann. Das CellSearch System beruht auf immunomagnetischer Selektion und immunfluoreszenter Färbung (Abb.3). Magnetische Mikropartikel, sogenannte Ferrofluide, besitzen Antikörper gegen EpCAM, weshalb die CTCs aus Blutzellen selektiert werden. Im weiteren Verlauf werden die angereicherten Zellen mit fluoreszenzgefärbten Antikörpern gegen Cytokeratin 8, 18, 19 sowie CD45 und mit dem nukleären Farbstoff DAPI angefärbt. CTCs zeichnen sich mit EpCAM+/Cytokeratin 8/18/19 + / DAPI +/ CD45 - aus (Eslami et al., 2020).

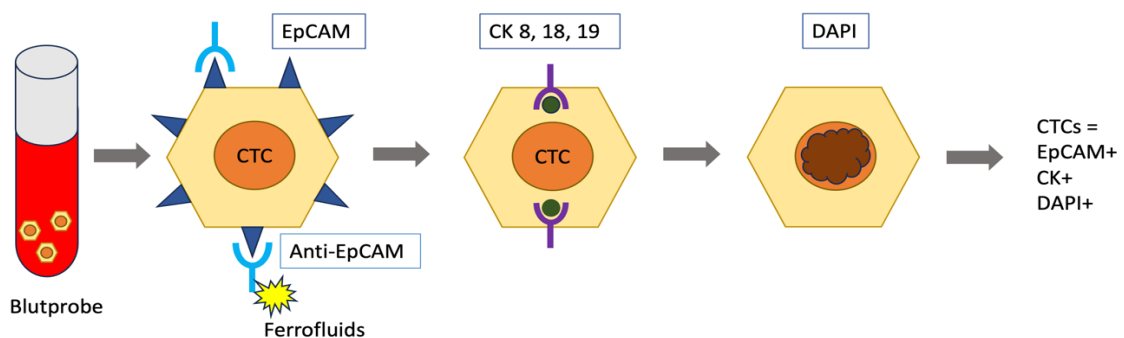


Abb. 3: CellSearch-Kriterien zur CTC-Analyse

Die CTCs werden aus den Blutproben der Patientinnen mithilfe von immunomagnetischer Selektion und immunfluoreszenter Färbung selektiert. Zuerst wird mithilfe von Ferrofluiden, die Anti-EpCAM Antikörper aufweisen, gescreent. Danach erfolgt eine Immunfluoreszenz für Cytokeratin 8, 18, 19 sowie eine DAPI-Färbung. CTCs sind demnach EpCAM +, CK+ und DAPI+. Legende: CTC = zirkulierende Tumorzelle, EpCAM = Epithelzell-Adhäsionsmolekül, CK = Cytokeratin

Vorlage erstellt nach (Eslami et al., 2020)

1.4 Grenzen der endokrinen Therapie durch *ESR1*-Mutationen

40 % der Patientinnen entwickeln eine Resistenz gegen die endokrine Langzeittherapie (Jeffreys et al., 2020). Es sind eine Vielzahl von möglichen Mechanismen der sekundären Resistenzentwicklung bekannt: eine veränderte ER α -Expression, Amplifikationen und Translokationen des *ESR1*-Gens, Aktivierungen des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, eine veränderte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Zellzyklusregulatoren, eine Überexpression von ER α -Koaktivatoren, eine hochregulierte Autophagie, eine epithelial-mesenchymale Transition oder auch die Heterogenität des Tumors (Franken et al., 2020). Der Hauptgrund für eine Resistenzentwicklung sind jedoch erworbene Punktmutationen

im *ESR1*-Gen, die zu einer östrogenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung des Östrogenrezeptors führen (Harrod et al., 2017; Jeffreys et al., 2020). Die Mutationen befinden sich vor allem in der LBD des *ESR1*-Gens (Franken et al., 2020). In 70 % der Fälle treten die häufigsten *ESR1*-Mutationen Y537S (Tyrosin an Position 537 zu Serin) und D538G (Asparaginsäure an Position 538 zu Glycin) auf. Diese Mutationen sind mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Prognose assoziiert (Chandarlapaty et al., 2016; Grinshpun et al., 2023).

1.4.1 Veränderungen der ER α -Struktur durch aktivierende Mutationen

Die Aktivität der AF-2-Domäne von ER α ist ligandenabhängig. Agonisten oder Antagonisten binden an die LBD des Gens und induzieren dadurch eine Konformationsänderung in die aktive oder inaktive Form. In diesem Prozess nimmt die Helix 12 der LBD eine entscheidende Rolle ein. Die Agonisten beeinflussen die LBD des ER α , indem Helix 3, 4, 5 und 12 eine Lücke oder eine Bindungsoberfläche für das Leucin-x-x-Leucin-Leucin-Motiv (LxxLL) des Agonisten bilden. Dadurch aktivieren die Koaktivatoren die Transkription. Wenn SERMs als Partial-Agonist/Antagonist in der Therapie eingesetzt werden, verändert sich die Position der Helix 12. Das LxxLL-Motiv des Koaktivators wird falsch ausgerichtet, weshalb die Interaktion zwischen Koaktivatoren und ER α blockiert wird. *ESR1*-Mutationen wie Y537S reduzieren die Beweglichkeit der Helix 12, sodass diese in der aktiven Form verbleibt. Dadurch zeigt ER α eine konstitutive, ligandenunabhängige Aktivität (Arao & Korach, 2021).

1.4.2 Detektion von *ESR1*-Mutationen in CTCs unter Östrogenentzugstherapie

In Vorarbeiten aus dem Labor der Frauenklinik (Franken et al., 2020) konnten in CTCs von Mammakarzinom-Patientinnen nach endokriner Therapie bislang nicht beschriebene *ESR1*-Mutationen detektiert werden. Hauptsächlich befinden sich die neuen Mutationen in der LBD des *ESR1*-Gens. Beispiele hierfür sind: N348S, D426E, L507F und D541Q. In der Studie wurde zusätzlich bestätigt, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Östrogenentzugstherapie (EDT) und dem Auftreten von *ESR1*-Mutationen vorliegt. Um zu untersuchen, ob die neuartigen *ESR1*-Mutationen zur Etablierung resistenter Tumorzellklone durch eine hormonunabhängige Aktivierung von ER α führen, sollte ein Modell zur funktionalen Testung eingeführt werden. Dies wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit angestrebt.

1.4.3 Klinische Relevanz der *ESR1*-Mutation für die Anpassung der endokrinen Therapie

Um die Wahrscheinlichkeit für eine Resistenz gegen die endokrine Therapie bei HR+ Mammakarzinomen einzuschätzen, wurde von Paoletti und seinen Kollegen ein Multiparameter CTC-endokrine-Therapie-Index (CTC-ETI) entwickelt, dessen klinische Relevanz in laufenden Studien untersucht wird. Mithilfe des CellSearch Systems werden die Indexparameter CTC-Anzahl und die Expression von ER, Bcl-2, HER2 und Ki-67 erfasst (Alix-Panabières & Pantel, 2021). Um die *ESR1*-Mutationen im metastasierten Mammakarzinom mithilfe von Flüssigbiopsien zu analysieren, werden vor allem die Methoden der droplet digital PCR-Technologie und das Next Generation Sequencing (NGS) eingesetzt. Mithilfe der NGS werden hauptsächlich größere Genpanels mit zuvor unbekanntem Mutationen analysiert (Liao et al., 2020).

Die klinische Relevanz der detektierten *ESR1*-Mutationen wurde unter anderem in der PADA-1-Studie untersucht. In dieser randomisierten Phase-III-Studie wurde geprüft, inwiefern ein rechtzeitiges Umstellen der endokrinen Therapie bei Nachweis von *ESR1*-Mutationen das PFS beeinflusst. Regelmäßig wurden die Blutproben der Patientinnen auf *ESR1*-Mutationen analysiert, um bei Nachweis die Erstlinientherapie mit AIs und CDK4/6-Inhibitoren wie Palbociclib auf Fulvestrant (SERD) und Palbociclib umzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass das Risiko für das Fortschreiten des Karzinoms unter Fulvestrant-Therapie deutlich geringer war und ein höheres PFS erzielt werden konnte. Ebenfalls wurde deutlich, dass ein verzögertes Umstellen der endokrinen Therapie zu keinem klinischen Benefit führte. Zusammenfassend konnte der klinische Nutzen einer frühzeitigen Umstellung von AIs auf SERDs nachgewiesen werden, wenn zuvor *ESR1*-Mutationen nachgewiesen worden sind (Bidard, Hardy-Bessard, et al., 2022).

Mithilfe der Emerald-Studie wurde die Wirksamkeit des neuen oralen SERD Elacestrant im Vergleich zu Fulvestrant- oder AI-Monotherapie untersucht. Die Studie prüfte, ob Elacestrant bei zuvor behandelten Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom eine neue Therapieoption darstellt (Bidard, Kaklamani, et al., 2022). Die Ergebnisse veranschaulichten, dass Elacestrant insbesondere bei Patientinnen mit *ESR1*-Mutationen, zu einer signifikanten Verbesserung des PFS führte und das Progressionsrisiko gesenkt werden konnte (Kraus, 2022; Turner et al., 2023).

Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse der Serena-6-Studie (Juni 2025) erweitern diese Erkenntnisse. In dieser randomisierten, doppelblinden Phase-III-Studie wurden

Patientinnen mit neu aufgetretenen *ESR1*-Mutationen, die zuvor mit der Erstlinientherapie AI und CDK4/6-Inhibitor behandelt wurden, entweder auf den oralen SERD Camizestrant in Kombination mit einem CDK4/6-Inhibitor umgestellt oder weiterhin mit AI und CDK4/6-Inhibitor behandelt. Camizestrant zeigte eine deutlich verbesserte Wirksamkeit, was sich in einem signifikant längeren PFS und einer verzögerten Verschlechterung des patientenberichteten Gesundheitszustands und der Lebensqualität widerspiegelte. Die Entwicklung oraler SERDs wie Camizestrant zielt zudem darauf ab, die Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit im Vergleich zu intramuskulär verabreichtem Fulvestrant zu verbessern, insbesondere bei *ESR1*-Mutationen wie Y537S, die die Wirkung von Fulvestrant reduzieren (Bidard et al., 2025).

1.5 Das CRISPR-Cas9-System als Werkzeug zur gezielten Gen-Editierung

Die Gen-Editierung ermöglicht die gezielte Modifikation von DNA, etwa durch Deletion, Insertion oder Austausch spezifischer Sequenzen. Auf diese Weise können Gene deaktiviert oder neue genetische Merkmale eingeführt werden. Um somit genetische Informationen stabil in die Zelle zu integrieren, wird häufig das CRISPR-Cas9-System eingesetzt. Dieses zeichnet sich durch ein einfaches Design, niedrige Kosten, hohe Effizienz und gute Reproduzierbarkeit aus und gehört daher weltweit zu den am weitesten verbreiteten Technologien der Genom-Editierung.

Ursprünglich gehörte CRISPR-Cas zum adaptiven Immunsystem von Bakterien und Archaeen. Es schützt die Wirtszelle vor fremder DNA, zum Beispiel von Viren oder Plasmiden, indem diese in Fragmente geschnitten und als Spacer in das CRISPR-Locus integriert werden (Rabaan et al., 2023; Xu & Li, 2020). Die Spacer werden in CRISPR-RNA (crRNA) transkribiert. Zusätzlich wird eine transaktivierende CRISPR-RNA (tracrRNA) transkribiert, die mit der crRNA hybridisiert und so einen funktionalen RNA-Komplex bildet, der die Bindung an Cas9 vermittelt. Die Cas-Gene kodieren für die Cas-Proteine, die eine Endonukleasefähigkeit besitzen (Rabaan et al., 2023). Bei erneutem Kontakt mit dem Eindringling wird dessen DNA durch die crRNA erkannt. CrRNA und Cas-Proteine bilden dann einen Komplex, der die Fremd-DNA gezielt spaltet (Xu & Li, 2020).

Für die gezielte Gen-Editierung wird das System angepasst: Hierfür werden eine RNA-geleitete Cas9-Endonuklease und eine Single-Guide-RNA (sgRNA) eingesetzt. Die sgRNA entsteht durch die Fusion von crRNA und tracrRNA. Gemeinsam mit der Cas9-Endonuklease bildet sie ein Cas9-Ribonukleoprotein. Cas9 erkennt die spezifische Ziel-

DNA nur in Anwesenheit einer Protospacer-adjacent Motif-Sequenz (PAM), bindet und spaltet danach die DNA-Sequenz. Cas9 erzeugt einen Doppelstrangbruch, der entweder durch die homologe Rekombination (HDR) oder die nicht-homologe Endverknüpfung repariert wird, wodurch gezielte Veränderungen der DNA eingeführt werden können (Xu & Li, 2020).

Das CRISPR-Cas9-System hat bereits klinische Relevanz erlangt und wird in der Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt. So können beim Glioblastom beispielsweise die verantwortlichen Gene *Nf1*, *Pten* und *Trp 53* ausgeknockt werden (Rabaan et al., 2023).

1.6 Ziele der Arbeit

Die Arbeitsgruppe für translationale Gynäkoonkologie der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikum Düsseldorf erforscht die Wirkung von bislang nicht beschriebenen *ESR1*-Mutationen, die bei Mammakarzinom-Patientinnen nach endokriner Therapie detektiert wurden. Es stellt sich die Frage, ob die Mutationen zu resistenten Tumorzellklonen durch eine hormonunabhängige Wirkung von ER α führen. In dieser Promotionsarbeit wurde angestrebt, ein Überexpressions-Modell in der hormonabhängigen Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7) zur funktionalen Testung dieser Mutationen zu etablieren.

In diesem Kontext wurden folgende Parameter getestet und optimiert:

- Bestimmung des optimalen Zeitpunktes mit maximaler ER α -Überexpression nach transienter Transfektion mit einem *ESR1*-kodierenden Plasmid.
- Optimierung des Transfektionsprotokolls mit einem *ESR1*-kodierenden Plasmid
- Validierung der Effekte von einer MCF-7-Zelllinie mit endogener *ESR1*-Mutation und von einer bekannten aktivierenden exogenen *ESR1*-Mutation (Y537S) mithilfe qPCR und Kristallviolett färbung

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die folgenden *in vitro* Experimente wurden mithilfe von zwei Zelllinien durchgeführt. Die erste Zelllinie war die MCF-7-Zelllinie (ATCC-Nummer: ATCC HTB-22). Die MCF-7-Zellen spielen in der Forschung des HR+ Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle. Die Zellen werden hauptsächlich eingesetzt, um die erworbenen Antiöstrogen-Arzneimittelresistenzen zu untersuchen. Obwohl die MCF-7-Zellen mit einer endokrinen Antihormontherapie behandelt werden, wird die ER α -Expression trotz Östrogenmangel nicht abgeschaltet. 1973 isolierte Dr. Soule, der für die Michigan Foundation arbeitete, die MCF-7-Zellen aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau. Die MCF-7-Zellen weisen einen Östrogen- sowie Progesteronrezeptor auf und gehören somit zum luminalen Mammakarzinom-Typ. Das Zellwachstum wird signifikant von Östradiol beeinflusst. Unter kurzfristigem Östrogenmangel weisen die MCF-7-Zellen eine deutlich niedrigere Proliferationsrate auf, da innerhalb dieser Zeit keine Kompensationsreaktionen aktiviert werden (Şerban et al., 2015).

Als zweite Zelllinie wurde die MCF-7 long term estrogen deprivation (LTED) Zelllinie hinzugezogen. Die MCF-7-Zellen wurden langfristig für sechs Monate unter Östrogenentzug in Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert. Dabei wurde ein Klon mit der endogenen *ESR1*-Mutation Y537S selektiert (Martin et al., 2017). Die *ESR1*-Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung von ER α , weshalb die MCF-7-LTED-Zellen ein östradiolunabhängiges Wachstum aufweisen (Hirao-Suzuki et al., 2020).

2.1.2 Zellkultur

Die MCF-7-Zelllinie wurde in 50, 250 und 550 ml Zellkulturflaschen in einem Inkubationsschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Das RPMI 1640 Medium mit L- Glutamin wurde mit den Zusätzen 10 % fetales Kälberserum (fetal calf serum, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) substituiert. Zweimal wöchentlich wurden die MCF-7-Zellen mit Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS) und 10 % Trypsin gesplittet. Das Split-Verhältnis lag zwischen 1:2-1:5 und wurde an die Wachstumsstärke und an die Konfluenz angepasst.

Die MCF-7-LTED-Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen und im Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Hierfür wurde das RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot verwendet. Das Medium wurde zusätzlich mit 1 % P/S sowie 10 % Charcoal-stripped FCS substituiert. Das Charcoal-stripped FCS-Medium weist geringere Konzentrationen von lipophilen Verbindungen wie Wachstumsfaktoren, Hormonen und Steroiden auf.

2.1.3 pCMV3 Plasmid für transiente Transfektion

Plasmide sind ringförmige, meist doppelsträngige DNA-Stücke, die sich autonom replizieren. Abhängig von der Kopienanzahl werden die Plasmide in *high copy* und *low copy* Plasmide eingeteilt (Fritsche, 2016). Plasmide weisen einen charakteristischen Aufbau auf. Sie besitzen einen Replikationsstart (*origin of replication, oriC*), an dem die autonome Replikation beginnt. Resistenzgene gegen Antibiotika sind als Selektionsmarker auf dem Plasmid vertreten. Die multiple Klonierungsstelle besteht aus Restriktionsschnittstellen, sodass fremde DNA leicht integriert werden kann (Heinrich et al., 2014). Das Plasmid pCMV3 wurde als Vektor für die transiente Transfektion verwendet. Mithilfe der transienten Transfektion werden fremde Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen eingeschleust (Chong et al., 2021). In den durchgeführten Experimenten wurde *ESR1* mit dem pCMV3 Plasmid transient in die Zellen eingeschleust, da das Plasmid in den Vorarbeiten bereits die stärkste ER α -Überexpression nach transienter Transfektion erzeugte. Das Plasmid wurde von sinobiological bezogen. Die Vektorgröße des Plasmids beträgt 6166 bp und weist eine Ampicillinresistenz auf.

2.1.4 Verwendetes Medium

Tabelle 1: verwendetes Medium

Medium	Hersteller/Zusammensetzung	Ort
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1X) 1640 Medium (G)	Gibco by Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
RPMI 1640 Medium, ohne Phenolrot	Gibco by Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
FCS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Charcoal-stripped FCS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

P/S (Penicillin/Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
S.O.C Medium	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
LB-Medium (pH 7,0-7,5)	10 g/L Trypton 5 g/ L Hefe-Extrakt 10 g/ L NaCl In Aqua destilliert	

2.1.5 Verwendetes Material

Tabelle 2: verwendetes Material

Material	Hersteller	Ort
Immun-Blot PVDF Membran	BIO-RAD	Hercules, CA, USA
Mini-Protean TGX Stain- free Gels	BIO-RAD	Hercules, CA, USA
Cellsave Konservierungsröhrchen	Menarini silicon biosystems	Huntingdon Valley, PA, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 µl, RNase-, DNase-, und DNS frei	Brand®	Wertheim, Deutschland
Pipetten 10 µl Pipetten 100 µl Pipetten 200 µl Pipetten 1000 µl	Starlab	Hamburg, Deutschland
Stripetten 5 ml (steril) Stripetten 10 ml (steril) Stripetten 25 ml (steril)	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Safe lock Tube 1,5 ml Safe lock Tube 2 ml:	eppendorf	Hamburg, Deutschland
Falconröhrchen 15 ml und 50 ml (steril)	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen, Deutschland

6- Well Kulturplatte 96- Well Kulturplatte	CELLSTAR® Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen, Deutschland
FrameStar® 384-Well Platte für Roche Lightcycler 480	4titude	Wotton-under-Edge, Vereinigtes Königreich
Zellkulturflasche - 50 ml - 250 ml - 550 ml	CELLSTAR® Greiner Bio-One international GmbH	Frickenhausen, Deutschland

2.1.6 Verwendete Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Ort
6x TriTrack DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Agarose	Sigma Aldrich	St Louis, MO, USA
Bacto™ Hefe-Extrakt	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto™ Trypton	BD Biosciences	Franklin Lakes, NJ, USA
BSA A7030-100G	Sigma Aldrich	St Louis, MO, USA
Calciumchlorid-2-hydrat (CaCl ₂ • 2 H ₂ O)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Protein Block	Dako	Glostrup, Dänemark
Antibody diluent	Dako	Glostrup, Dänemark
DMSO D8418- 500 ml	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
ECL Western blotting detection	Cytiva Amersham	Amersham, Vereinigtes Königreich
Essigsäure 100%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ethanol	VWR chemicals	Radnor, PA, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

Fluorescence Mounting Medium	Dako	Glostrup, Dänemark
Formalin	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
GeneRuler Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Glycin	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA
Human TFF1 LOT: 201901310030	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Isopropanol	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA
Kristallviolett	Honeywell Research Chemicals	Seelze, Deutschland
K2G	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	VWR chemicals	Radnor, PA, USA
MOPS	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR chemicals	Radnor, PA, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Nonidet [®] P 40 Substitue (NP-40)	Honeywell Research Chemicals	Seelze, Deutschland
OPTI-MEM	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
PDH 60 antisense	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Protease- und Phosphatase-Inhibitor	Roche diagnostics	Rotkreuz, Schweiz
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
Salzsäure 25% (HCL)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA
Triton R X-100	Merck	Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Tween 20	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA
β -Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
β -Östradiol 250 mg	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA

2.1.7 Verwendete Puffer

Tabelle 4: verwendete Puffer

Puffer	Hersteller, Ort	Zusammensetzung
Waschpuffer (10x) Code S3006 1:10 verdünnt mit destilliertem Wasser	Dako Glostrup, Dänemark	0,05 mol/l Tris HCL 0,15 mol/l NaCl 0,05 % Tween pH Wert 7,6 (+/- 0,1)
4x Laemmli protein sample Buffer	Bio-RAD Hercules, CA, USA	62.5 mM Tris-HCl 10 % Glycerol 1 % LDS 0.005% Bromophenol Blue pH Wert: 6,8 900 µl Laemmli-Puffer 100 µl β-Mercaptoethanol
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (1x) (DPBS) Ohne CaCl ₂ Ohne MgCl ₂	Gibco by Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	2,7 mM KCl 0,901 mM CaCl ₂ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 0,493 mM MgCl ₂ 137,9 mM NaCl ₂ pH-Wert: 7,4
RIPA-Puffer		150 mM NaCl 0,5 % Natriumdesoxycholat 0,1 % SDS 1 % NP-40 50 mM TRIS pH-Wert: 7,6 Protease-Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml RIPA- Puffer) Protease-Inhibitor (1 Tablette pro 10 ml RIPA- Puffer)

		In Aqua destilliert
SDS-Laufpuffer		25 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS pH-Wert: 8,3
TFB-2-Puffer		10 mM Kaliumacetat 100 mM Rubidiumchlorid 10 mM Calciumchlorid 15 % Glycerol In Aqua destilliert pH-Wert: 6,5
TBS-Puffer		20 mM TRIS 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 pH-Wert: 7,6
Blotting-Puffer		25 mM TRIS 200 mM Glycin 20 % Methanol
TAE-Puffer		40 mM TRIS 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA in Aqua destilliert
MTT- Lösung		0,25 mg/ml MTT in Charcoal-stripped FCS- Medium

2.1.8 Verwendete Antikörper

Tabelle 5: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Ort
ERSP1-AK LOT: 9101S1704B	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit AK LOT: 1797971	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Östrogenrezeptor AK (D8H8) 8644S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
β -Aktin sc-47778 mouse monoclonal IgG AK	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, TX, USA
Anti-mouse IgG HRP-linked AK 7076S	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
Anti-rabbit HRP-linked AK #7074P2	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA

2.1.9 Verwendete Geräte

Tabelle 6: verwendete Geräte

Geräte	Hersteller	Ort
Axio Observer mit Festkörperlichtquelle Colibri 7	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
CellCelector®	ALS	Jena, Deutschland
Cool Thermal Shaker Touch 230 V	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CytoFlex S Flow Cytometer	Beckman Coulter GmbH	Brea, CA, USA
MACSQuant Analyzer Flow Cytometer	Milentyi Biontec	Bergisch Gladbach, Deutschland

Heracell™150i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Labornetzgerät Power Pac 300	BIO-RAD	Hercules, CA, USA
LightCycler® 480II	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, Deutschland
Megafuge 16R Centrifuge	Thermo Scientific Heraeus	Waltham, MA, USA
Mikroskop Leica DM IRB	Leica	Wetzlar, Deutschland
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen, Deutschland
ROTOFIX 32A Zentrifuge	Hettich	Kirchlengern, Deutschland
Schüttler SM25-B SWIP	Edmund Bühler	Boldeshausen, Deutschland
SPARK® Multimode Mikroplattenreader	Tecan	Männedorf, Schweiz
Thermocycler T3	Biometra®	Jena, Deutschland
Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
Vortexmischer	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Waage	Mettler Toledo	Columbus, OH, USA
Western blot: ChemiDoc MP Imaging System	BIO-RAD	Hercules, CA, USA
Western blot: Mini PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD	Hercules, CA, USA

2.1.10 Mikroorganismen/Plasmid

Tabelle 7: Mikroorganismen/Plasmid

Mikroorganismen/Plasmid	Hersteller	Ort
One Shot™ TOP10 Chemically Competent Cells	Invitrogen by ThermoFisher Scientific	Waltham, MA, USA
pCMV3-untagged 6166bp	sinobiological	Beijing, China

2.1.11 Verwendete Kits

Tabelle 8: verwendete Kits

Kits	Hersteller	Ort
Omniscript® RT Kit (200)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Transfektion Kit	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pierce TMA BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
QIAEX®II Gel Extraktion Kit (150)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
QuantiFast®SYBR® Green PCR Kit (400)	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Transiente Transfektion der MCF-7-Zellen mit pCMV3 Plasmid

Für die Transfektion der MCF-7-Zellen wurde die Lipofektion mit dem Lipofectamine® 3000 Kit von Invitrogen eingesetzt.

Am ersten Tag wurden die MCF-7-Zellen auf einer 6-Well Platte ausgesät. Zuerst wurde die verbrauchte Nährlösung aus den mittleren Zellkulturflaschen abgenommen. Danach wurden die MCF-7-Zellen mit DPBS gewaschen. Bei einer mittleren Zellkulturflasche wurden 5-6 ml DPBS mit einer Stripette abgesaugt. 1 ml Trypsin wurde hinzugegeben, um die Zellen vom Flaschenboden der Zellkultur zu lösen. Danach wurde die Zellkulturflasche für 5 min in den Inkubator bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ zurückgestellt. Nachdem sich die MCF-7-Zellen abgelöst hatten, konnten die MCF-7-Zellen gesplittet werden. Die abgelösten MCF-7-Zellen wurden mithilfe des Nährmediums gründlich resuspendiert und ein Anteil der Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen gefüllt. Die Zellkulturflasche wurde auf das Anfangsvolumen von 12 ml mit frischer Nährlösung aufgefüllt. In die zuvor abgefüllte Zellsuspension wurden 6-7 ml Nährmedium ins Falconröhrchen hinzugegeben. Dadurch wurden die Zellen für das Auszählen unter der Neubauer Zählkammer verdünnt und die Zellklümpchen wurden reduziert. Zwischen Deckglas und Objektträger wurden 10 µl der Zellsuspension pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die vier Großquadranten der Neubauer Zählkammer ausgezählt, um die Zellzahl pro ml zu bestimmen. Die Zellen sollten auf einer 6-Well Platte mit je 550.000 Zellen pro Well ausgesät werden. In jeweils ein Well wurden 2 ml Zellsuspension pipettiert. Dies wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{gezählte Zellzahl} \div 4 \times 10^4 = x \\ & \frac{275.000 \text{ (Zellen pro ml)}}{x} \times 12,5 \text{ ml (Endvolumen)} = y \\ & 12,5 \text{ ml (Endvolumen)} - y = z \end{aligned}$$

x = Zellen pro ml; y = Zellvolumen in ml; z = Mediumvolumen in ml

Die mit der Formel ausgerechneten Volumina wurden resuspendiert und jeweils auf die 6-Well Platte aufgetragen.

Am zweiten Tag erfolgte die transiente Transfektion mit dem pCMV3 Plasmid. Hierfür sollten die Zellen zu 70-90% konfluent gewachsen sein. Für die Transfektion einer 6-Well Platte wurden insgesamt zwölf Reaktionsgefäße vorbereitet. Alle Reaktionsgefäße

wurden mit 125 μl OptiMEM-Medium befüllt. Danach wurden die zwölf Reaktionsgefäße in zwei Gruppen mit jeweils sechs Reaktionsgefäße aufgeteilt. In der Reaktionsgefäßgruppe 1 wurden zusätzlich 5 μl Lipofectamine vom Transfektion-Kit hinzugefügt. In der Reaktionsgefäßgruppe 2 wurden 5 μl P3000-Reagenz des Transfektion-Kits sowie 2,5 μg DNA pipettiert. Die Plasmidkonzentration wurde zuvor mithilfe des Nanodrop Programms bestimmt und betrug beim Leervektor (LV) 1989,6 ng/ μl (= 1,26 μl), Wildtyp (WT)-*ESR1* 769,7 ng/ μl (=3,24 μl) und Y537S 1742,7 ng/ μl (= 1,44 μl). Im Folgenden wurde das Reagenz von der Reaktionsgefäßgruppe 2 resuspendiert und in die Reaktionsgefäßgruppe 1 überführt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Inhalt aus den Reaktionsgefäßen zu den Wells hinzugefügt. Um die Reagenzien in der Nährlösung zu verteilen, wurde die Platte in Form einer Acht bewegt und danach zurück in den Inkubator gestellt.

Die MCF-7-Zellen wurden auch in T25-Zellkulturflaschen transient transfiziert, weshalb sich die verwendeten Volumina veränderten. Der Flächeninhalt einer 6-Well Platte beträgt 9,6 cm^2 . Hochgerechnet auf eine T25-Flasche mit 25 cm^2 beträgt der Faktor 2,6. $2,6 \times 550.000$ Zellen = 1.432.292 Zellen sollten pro T25-Flasche ausgesät werden. Dafür wurden die MCF-7-Zellen in insgesamt 5,2 ml Nährmedium kultiviert. Am zweiten Tag wurden 325 μl OptiMEM-Medium, 13 μl Lipofectamine und p3000-Reagenz sowie 6,5 μg DNA hinzugefügt.

2.2.2 Western blot

Um die Proteinexpression des Östrogenrezeptors in den zuvor transfizierten MCF-7-Zellen zu untersuchen, wurde der Western blot nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Die Dauer der Methode betrug insgesamt vier Tage.

Am ersten Tag wurden zuerst frisch gesammelte oder aus -80 °C aufgetaute Zellpellets in RIPA-Puffer resuspendiert und gelöst. Das entsprechende Volumen war abhängig von der Zellpelletgröße und lag zwischen 50-100 μl . Der RIPA-Puffer enthielt Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, welche die Serin- und Cysteinproteasen inhibieren. Dadurch sind die isolierten Proteine vor der Proteolyse geschützt. Das Zellpellet/RIPA-Puffer Gemisch wurde zehn Mal gevortext und nachfolgend wurden die Reaktionsgefäße mithilfe des Cool Thermal Shaker bei 1000 rpm für 20 min auf 4 °C gekühlt. Danach wurden die Zelltrümmer zusätzlich für 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Die Lysate befanden sich im Überstand, weshalb dieser in neue Reaktionsgefäße abgefüllt wurde. Die Pelletes konnten entsorgt werden.

Um die Proteine in den Zelllysaten quantifizieren zu können, wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific und eine 96-Well Platte verwendet. Die Quantifizierung ist relevant, damit in jedes Well dieselbe Proteinmenge aufgetragen wird und somit ein Probenvergleich möglich ist (Joppien et al., 2011). Zuerst wurde eine Standardreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 bis 2000 µg/ml in RIPA-Puffer hergestellt. Die Konzentration der im Kit beigelegten Ampulle des Albuminstandards betrug 2 mg/ml. Die Zusammensetzung der BSA-Standardreihe wurde in folgender Tabelle veranschaulicht.

Tabelle 9: Zusammensetzung der BSA-Standardreihe

Reaktionsgefäß	Volumen RIPA-Puffer [µL]	Volumen BSA [µL]	Finale BSA-Konzentration [µL]
A	0	300 vom Standard	2000
B	125	375 vom Standard	1500
C	325	325 vom Standard	1000
D	175	175 von Verdünnung B	750
E	325	325 von Verdünnung C	500
F	325	325 von Verdünnung E	250
G	325	325 von Verdünnung F	125
H	400	100 von Verdünnung G	25
I	400	0	0

Auf der 96-Well Platte wurden jeweils 5 µl von jeder Konzentration der BSA-Standardreihe (A-I) doppelt pipettiert. Die Doppelpipettierung wurde durchgeführt, um später den Mittelwert aus beiden Wells berechnen zu können. Zu der Standardreihe wurden pro Well 20 µl RIPA-Puffer hinzugegeben. Als nächstes wurden 22,5 µl RIPA-Puffer für jede Probe doppelt pipettiert. Danach wurden 2,5 µl pro Well von jeweils einer Probe hinzugefügt. Anschließend wurden zu allen Wells 200 µl Erkennungsmischung im Verhältnis von 1:50 aufgetragen. Die 96-Well Platte wurde danach bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Proteinquantifizierung wird mithilfe des BCA-Tests ermittelt und beruht auf einer Färbereaktion. Zugrunde liegt hier die Biuret-Reaktion: Die Proteine reduzieren zweiwertiges zu einwertigem Kupfer. Bicinchoninsäure reagiert hochspezifisch mit den einwertigen Kupfer-Ionen zu einem violett farbigen Komplex mit einem

Absorptionsmaximum von 562 nm. Dabei gilt, je intensiver die Farbe, desto höher ist die Proteinkonzentration. Nachdem die Platte für 30 min inkubiert, wurde die Absorption der BSA-Eichlösung gegen den gemessenen Proteingehalt der jeweiligen Probe in einem Diagramm aufgetragen. Mithilfe der entstandenen Geradengleichung konnte die Proteinkonzentration jeder einzelner Probe berechnet werden (Joppien et al., 2011). Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde anhand folgenden Beispiels visualisiert:

Ermittelte Geradengleichung aus der BSA-Standardreihe: $y = 0,0002x + 0,1091$

$y \triangleq A_{540 \text{ nm}}$, $x \triangleq \text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$

Mittelwert Duplikate Probe: $x_1 = 0,304$, $x_2 = 0,2987$, $\bar{x} = 0,301$

Proteinkonzentration (c) = $(0,301 - 0,1091) * 2 / 0,002$

$(c) = 1922,5 \mu\text{g/ml}$

\bar{x} = Mittelwert, c = Proteinkonzentration

Für die Gelelektrophorese fassten die Taschen des SDS-Gels insgesamt 16 μl . Die Proben wurden in einem Verhältnis von 3:1 mit 4x Laemmli-Puffer verdünnt, sodass jeweils 4 μl Laemmli-Puffer zu jedem 20 μg Proteinlysate pipettiert wurden. Die Volumina der Proteinlysate und des RIPA-Puffers wurden wie folgt berechnet:

$V_{\text{Probe für } 20 \mu\text{g}} = 20 / c * 1000$; $20 / 1922,5 \mu\text{g/ml} * 1000 = 10,4 \mu\text{l}$

$V_{\text{RIPA}} = 16 \mu\text{l} - V_{\text{Probe}} - V_{\text{Laemmli}}$; $16 \mu\text{l} - 10,4 \mu\text{l} - 4 \mu\text{l} = 1,6 \mu\text{l}$

c = Konzentration; V = Volumen

Um das SDS-Gel mit den einzelnen Proteinproben beladen zu können, wurden die zuvor berechneten Volumina von RIPA-Puffer, Laemmli und der Probe in neue Reaktionsgefäße pipettiert und gevortext. Danach wurden die Reaktionsgefäße bei 1000 rpm für 3 min auf 95 °C mit dem Cool Thermal Shaker erhitzt. Die Reaktionsgefäße wurden sofort auf Eis gestellt und in der Mini-Zentrifuge zentrifugiert. Nun wurde das Mini-Protean TGX Stain-free Gel vorbereitet und in die entsprechende Halterung eingebaut. Die Box wurde bis zur Markierung für zwei Gele mit SDS-Puffer aufgefüllt. Das Mini-Protean TGX Stain-free Gel wurde pro Well mit 16 μl eisgekühltem, vorbereitetem Probengemisch beladen und zusätzlich wurde in ein Well 5 μl von Precision plus Protein All Blue Standards aufgetragen. Der Indikator dient als Größenstandard, sodass nach der Gelelektrophorese die Proteingröße der Proben abgeschätzt werden kann (Joppien et al., 2011). Die Spannung wurde für die ersten 5 min auf 100 V, danach auf 150 V eingestellt.

Die Proteine wurden mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und sorgt für eine negative Gesamtladung, sodass die Geschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch von der relativen Molekülmasse abhängig ist. Es gilt, je kleiner das Protein, desto schneller wandern die Proteine von der Kathode (Negativ-Pol) zur Anode (Plus-Pol) (Joppien et al., 2011).

Das *Blotting* wird durchgeführt, damit die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen werden. Die Schwämme und das Filterpapier wurden zunächst in Blotting-Puffer eingelegt. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol äquilibriert und wurde danach für 5-10 min in Blotting-Puffer eingelegt. Das „*Transfer-Sandwich*“ wurde gemäß der Darstellung in Abb.4 zusammengebaut. Zuerst wurden beide Schwämme auf die Gelhalterkassette platziert und diese wurden jeweils mit einem Filterpapier bedeckt. Danach wurde das Gel auf die Membran gelegt. Mit einer Rolle wurde über das „*Transfer-Sandwich*“ gerollt, um potenzielle Luftblasen zu entfernen. Zum Schluss wurde das „*Transfer-Sandwich*“ fest verschlossen.

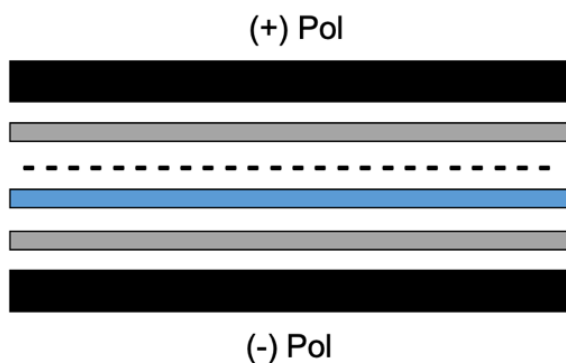


Abb. 4: Aufbau von dem „*Transfer-Sandwich*“

Legende: Schwarz: Schwamm, grau: Filterpapier, gestrichelt: Membran, blau: Gel

Die Gelhalter-Kassette wurde ins Elektrophoresesystem positioniert. In die Box wurde ein Kühlaggregat platziert und anschließend wurde die Box mit Blotting-Puffer bis zur Markierung aufgefüllt. Die gesamte Box wurde nun über Nacht für 16 h bei 10 mA bei 4 °C an die Spannung angeschlossen.

Am zweiten Tag wurde das Sandwich auseinandergelöst, um die Membran kurz in TBST-Puffer einzulegen. Danach musste die Membran eine Stunde in 5 %- igem BSA geblockt werden, damit die Antikörper (AK) nicht unspezifisch an die Membran binden (Joppien et al., 2011). Es wurden 2,5 g BSA in einem Falconröhrchen abgewogen und mit TBST-

Puffer bis zur 50 ml Markierung aufgefüllt (= 5%-iges BSA). Circa 25 ml wurden auf die Membran gegeben.

Primär- und Sekundärantikörper sind für die Proteindetektion notwendig. Der Primärantikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein. Der Sekundärkörper hingegen bindet an den Primärantikörper (Joppien et al., 2011). Als Primärantikörper wurde ER α D8H8 8644S Anti-rabbit von Cell Signaling Technology verwendet. Der primäre ER α -AK wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in 5 ml BSA verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde das AK-BSA Gemisch mit einer Stripette abgenommen. Danach folgte dreimal ein zehnminütiger Waschvorgang mit TBST-Puffer, um die ungebundenen AK zu entfernen (Joppien et al., 2011). Als sekundärer AK gegen ER α wurde der Anti-rabbit HRP-linked IgG AK #7074P2 von Cell Signaling Technology verwendet. Der Sekundärantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:2500 in 1 ml BSA und 4 ml TBST-Puffer verdünnt. Die Inkubation dauerte eine Stunde. Danach wiederholte sich der Waschvorgang dreimal für 10 min in TBST-Puffer.

Die Bildgebung beruht auf dem Meerrettichperoxidase-Luminol-System. Die sekundären AK sind mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welches mit dem chemilumineszenten Substrat Luminol reagiert. Bei dieser Reaktion entsteht ein Lichtsignal, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 428 nm von einem digitalen Imager detektiert werden kann. Für die Detektion wurde das ChemiDoc MP Imaging System von Bio-Rad verwendet. Die Membran wurde luftblasenfrei auf den Imager gelegt. Um das Signal zu verstärken, wurde die Chemilumineszenz ECLTM Western blotting Detektionsreagenzien 1 und 2 in einem Verhältnis von 1:1 auf die Membran geträufelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image lab im single channel. Folgende Parameter mussten zusätzlich eingestellt werden: Application \rightarrow Blots \rightarrow Chemi; Select gel type: BIO-RAD ready Gel; Image exposure: signal accumulation mode, set up: first 1s, last:600 und total 100 pictures. Um den Proteinstandard detektieren zu können, wurde ein Bild unter Custom-Ponceau aufgenommen. Die Aufnahmen des Proteinstandards und der Probe konnten danach übereinandergelegt werden.

Nach der Detektion wurde die Membran zurück in TBST-Puffer gelegt. Um die β -Aktin Bande nachzuweisen, wurde der primäre AK sc-47778 mouse monoclonal IgG gegen β -Aktin von Santa Cruz Biotechnology aufgetragen. Der AK wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in BSA verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wiederholten sich die Schritte, weshalb die Membran erneut dreimal in TBST gewaschen wurde. Danach wurde der sekundäre AK anti-mouse IgG HRP-linked 7076S von Cell Signaling Technology in einem Verhältnis von 1:2500 mit 1 ml BSA und 4 ml TBST verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Membran gewaschen und die Banden konnten mit dem Imager detektiert werden.

2.2.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay quantifiziert das Zellwachstum und die Zellviabilität, weshalb der Einfluss von Wachstumsfaktoren, Nährstoffen oder Zytokinen analysiert werden kann (Joppien et al., 2011). Die Methode wurde durchgeführt, um die Proliferation von MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen in unterschiedlichen Östradiolkonzentrationen zu vergleichen.

Am ersten Tag wurden die Zellen auf einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden wie im Unterkapitel 2.3.1 mittels transienter Transfektion geerntet und die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Insgesamt sollten 40.000 Zellen pro ml vorhanden sein, damit 4.000 Zellen in 100 µl pro Well ausgesät werden:

$$\begin{aligned} \text{gezählte Zellzahl} \div 4 \times 10^4 &= x \\ \frac{40.000 \text{ (Zellen pro ml)}}{x} \times 4 \text{ ml (Endvolumen)} &= y \\ 4 \text{ ml (Endvolumen)} - y &= z \end{aligned}$$

x = Zellen pro ml; y = Volumen der Zellsuspension in ml; z = Volumen des Mediums in ml

Die berechneten Volumina wurden in ein neues Falconröhrchen pipettiert und resuspendiert. 100 µl wurden von der Zellsuspension pro Well aufgetragen. Jede Zelllinie wurde auf die 96-Well Platte als ein Triplikat pipettiert, um den Mittelwert aus den drei Messungen zu berechnen. Diese Schritte mussten für alle im Versuch verwendeten Zelllinien wiederholt werden. Die mit Zellsuspension befüllten Wells wurden mit DPBS umrandet, damit die ausgesäten Zellen im Inkubator nicht austrockneten. Die Platte wurde über Nacht im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

Am zweiten Tag wurde das Medium in den Wells gewechselt. Nun wurden alle Zellen in Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert, welches eine geringe Anzahl von Wachstumsfaktoren aufweist. Dadurch wurden die Zellen synchronisiert und alle Zellen

wiesen dieselben Wachstumsbedingungen auf. Hierfür wurde bei den MCF-7-Zellen das RPMI-Medium abgenommen, mit 100 µl PBS gespült und in 100 µl Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert. Die MCF-7-LTED-Zellen, die bereits in Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert wurden, erhielten ohne DPBS-Spülung einen Mediumwechsel. Am dritten Tag wurde eine Östradiol-Verdünnungsreihe angesetzt. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe nahmen von 10^{-9} M bis 10^{-13} M in Schritten von 0,5 log(M) ab. Zusätzlich wurde eine Nullprobe pipettiert. Zuerst wurden die Reaktionsgefäße mit Charcoal-stripped FCS-Medium befüllt. Ein Reaktionsgefäß enthielt 1 ml, acht Reaktionsgefäße 1368 µl und ein Falconröhrchen 10 ml Charcoal-stripped FCS-Medium. Der 10^{-2} M Östradiol Stock wurde auf 10^{-5} M verdünnt, indem 1 µl 10^{-2} M Östradiol in 1ml Medium resuspendiert wurde. Von 10^{-5} M Östradiol wurde 1 µl in 10 ml Medium übertragen, um 10^{-9} M Östradiol zu erhalten. Von 10^{-9} M wurden 632 µl in die nächste Verdünnung von $10^{-9,5}$ M resuspendiert. Dies wurde bis 10^{-13} M wiederholt. Das Charcoal-stripped FCS-Medium wurde abgenommen und durch die Verdünnungsreihe ersetzt. Das Auftragen der Verdünnungsreihe wurde in Abb. 5 visualisiert. In die erste Reihe jeder Zelllinie wurde Charcoal-stripped FCS-Medium ohne Östradiol pipettiert. Danach wurde die Verdünnungsreihe von der niedrigsten Konzentration 10^{-13} M bis zur höchsten 10^{-9} M von links nach rechts aufgetragen. Zusätzlich wurde kontrolliert, ob noch genug DPBS in der Umrandung vorhanden war. Die nächsten zwei Tage wurde die 96-Well Platte bei 37 °C inkubiert.

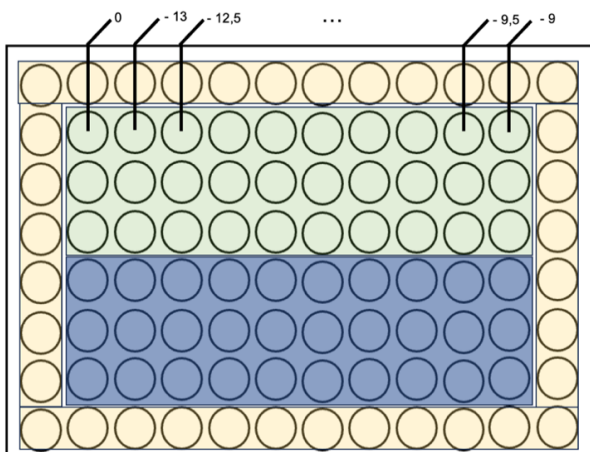


Abb. 5: Pipettierschema von MCF-7 und MCF-7-LTED für den MTT-Assay

MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen wurden auf einer 96-Well Platte ausgesät, am nächsten Tag in Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert und folglich mit einer Östradiolverdünnungsreihe mit einer Konzentration von 10^{-9} M bis 10^{-13} M behandelt. Die Kultivierungsdauer betrug zwei Tage, sodass insgesamt fünf Tage nach dem Aussäen der MTT-Assay mithilfe des spark® Mikroplatten Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm durchgeführt wurde.

Legende: grün: MCF-7-Zellen; dunkelblau: MCF-7-LTED-Zellen; gelb: DPBS; Östradiolkonzentration: 10^{-9} M - 10^{-13} M abnehmend in 0,5 log(M) Schritten.

Am fünften Tag wurde das MTT-Reagenz aufgetragen. Dafür musste das MTT-Reagenz mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/ml in einem Verhältnis von 1:20 mit Charcoal-stripped FCS-Medium verdünnt werden. Die Östradiolkonzentrationen wurden mithilfe einer 1000 µl Pipette abgenommen. 100 µl von dem MTT-Reagenz wurden pro Well aufgetragen. Für die MTT-Kontrolle wurden drei Wells, die mit DPBS gefüllt waren, abgenommen und mit 100 µl MTT-Reagenz gefüllt. Danach musste die Platte für 3 h bei 37 °C inkubieren. Nach der Inkubationszeit wurde das MTT-Reagenz erneut abgenommen und in jedes Well wurden 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert. Danach wurde die Platte für 30 min bei 37 °C und 300 rpm auf dem Cool Thermal Shaker gestellt. Das MTT-Reagenz besteht aus Tetrazoliumsalze wie 3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)2,5-di-phenyltetrazoliumbromid. In metabolisch aktiven Zellen wird Tetrazolium im endoplasmatischen Retikulum NADH-abhängig gespalten, sodass wasserunlösliches dunkelblaues Formazan entsteht. DMSO ist nötig, damit das Formazan löslich wird und photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm mit dem spark® Mikroplatten Reader gemessen werden kann. Die Farbintensität ist proportional zur Zellviabilität (Joppien et al., 2011).

Beispielhaft wurde die MTT-Auswertung folglich durchgeführt:

Mittelwert MTT-Kontrolle: $x_1 = 0,0854$, $x_2 = 0,0862$, $x_3 = 0,0865$ $\bar{x} = 0,086$

Abzug MTT-Kontrolle: MCF-7 – 0,086

$x_1 = 0,2892 - 0,086 = 0,203$, $x_2 = 0,2976 - 0,086 = 0,2112$, $x_3 = 0,3052 - 0,086 = 0,219$

Mittelwert Proben: $\bar{x} = 0,211$

Standardabweichung Proben: $s = 0,008$

Normalisierung auf die höchste Östradiolkonzentration (10^{-9} M): $0,364/0,211 = 0,581$

2.2.4 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie werden die zuvor transient transfizierten MCF-7-Zellen charakterisiert und quantifiziert. Die Methode beruht auf einer Antigen-AK-Reaktion mit primär und sekundär fluoreszenzmarkierten AK (Joppien et al., 2011). In den Experimenten wurde die Expression von ER α in pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transient transfizierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Zuerst wurden die Pellets von den transient transfizierten MCF-7-Zellen mit DPBS, Trypsin und RPMI-Medium gesammelt. Die Zentrifuge wurde für alle folgenden Durchgänge auf 1300 rpm bei 8 °C für 8 min eingestellt. Das Pellet wurde in 500 µl DPBS

resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Vor Versuchsbeginn musste der 10x Waschpuffer mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt werden. In ein CellSave Konservierungsröhrchen wurden 9,7 ml Waschpuffer gefüllt. Davon wurden 100 µl CellSave auf die Zellpellets pipettiert, welches für 15 min inkubieren musste. CellSave ist nötig, damit die Zellen während der Experimentendauer stabil bleiben. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden 400 µl Waschpuffer in die Reaktionsgefäße pipettiert und die Reaktionsgefäße wurden zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen. Zu jedem Pellet wurden 100 µl Triton für 7 min hinzugefügt. Triton wurde auf 0,1 % verdünnt, indem 10 µl Triton in 10 ml Waschpuffer pipettiert wurde. Dieses Reagenz macht die Zellmembran löchrig, damit die AK leicht eindringen können. Im Anschluss wurden 400 µl Waschpuffer hinzugegeben, zentrifugiert und abgenommen. Diese Schritte wurden mit 500 µl Waschpuffer wiederholt. Danach wurden jeweils 100 µl Protein Block für 15 min auf das Zellpellet gegeben, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Im Anschluss wurde das Pellet erneut mit 400 µl Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einem spezifischen primären ERSP1-AK gegen ER α und einem sekundären Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit AK gefärbt, um die (Über-)Expression von ER α mithilfe der Durchflusszytometrie zu quantifizieren. Zuerst wurde der Primärantikörper ERSP1 in 100 µl Antibody Diluent in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers betrug 60 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 400 µl Waschpuffer hinzugefügt und die Reaktionsgefäße wurden erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Der sekundäre AK Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit wurde in 100 µl Antibody Diluent in einem Verhältnis von 1:200 verdünnt. Der sekundäre AK ist ein Fluoreszenzstoff, weshalb dieser für 30 min im Dunkeln inkubieren musste. Danach wurden wieder 400 µl Waschpuffer zu den Reaktionsgefäßen hinzugefügt, um die Reaktionsgefäße erneut zu zentrifugieren. Der Waschvorgang wurde zweimal mit 500 µl Waschpuffer wiederholt. Das Zellpellet wurde in 100-200 µl PBS resuspendiert.

Die Messung wurde am FACS-Gerät im FITC-Kanal durchgeführt. Vor jeder einzelnen Messung mussten die Proben gevortext werden. Dadurch bildete sich in der Zwischenzeit kein Zellpellet, welches die Messergebnisse verfälschen könnte.

2.2.5 Klonierung von DNA in Plasmiden

2.2.5.1 Herstellung kompetenter Zellen

Um chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien herzustellen, wurde eine Kultur von *E. coli* One Shot™ TOP 10 Chemically Competent Cells von Invitrogen angesetzt. Hierfür wurden die Bakterien über Nacht in 5 ml flüssigen LB-Medium in einem autoklavierten Kulturröhrchen bei 37 °C unter Schütteln bei 150 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur zu 200 ml LB-Medium in einem autoklavierten Kulturkolben hinzugegeben. Die Kultivierung der Bakterienkultur wurde so lange bei 37 °C bei 150 rpm durchgeführt, bis eine optische Dichte bei 550 nm von 0,6 registriert werden konnte. Die Messung erfolgte am Spektralphotometer in Küvetten. Als Leerwert wurde das LB-Medium ausgewählt. Danach wurden die Bakterien auf Eis gesetzt und in 50 ml Falconröhrchen überführt. Diese wurden für 10 min bei 4 °C für 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden jeweils in 2 ml TFB-2 Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension inkubierte für 15 min auf Eis. Die Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße zu 100 µl Aliquoten aufgeteilt. Diese wurden sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Transformation

Das Ziel dieser Methode war, das bereits in ein Plasmid integrierte DNA-Fragment mithilfe von *E. coli* Bakterien zu vermehren. Dafür mussten jeweils 100 µl kompetente *E. coli* Bakterienzellen aus dem -80 °C Gefrierschrank auf Eis aufgetaut werden. Danach wurden 50 ng transformierende Plasmid-DNA zu den *E. coli* Zellen hinzugegeben. Außerdem wurden zusätzlich eine Positivkontrolle mit einer bekannten Plasmid vermittelten Ampicillin Resistenz sowie eine Negativkontrolle ohne DNA angesetzt. Die Proben wurden vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Hitzeschock-Transformation, sodass die Proben bei 45 °C für 45 s auf dem Cool Thermal Shaker erhitzt wurden. Es wurde jeweils 1 ml vom S.O.C Medium hinzugegeben, um eine maximale Transformationseffizienz zu garantieren. Danach wurden die *E. coli* Bakterien bei 37 °C für 1 h bei 600 rpm auf dem Cool Thermal Shaker inkubiert. Die Proben wurden auf Ampicillin-resistenten Agarplatten mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 µg/mL ausplattiert. Die transformierten Bakterienzellen mussten selektiert werden, da nicht alle Bakterien das Plasmid aufnehmen. Das Plasmid vermittelt eine Antibiotikumresistenz gegen Ampicillin, sodass nur die transformierten Bakterien auf

den Agarplatten wachsen (Joppien et al., 2011). Die Ampicillin-resistenten Agarplatten wurden nun über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Platten in einem Autoklavierbeutel aufbewahrt und in den Kühlraum bei 4 °C gestellt. Dort konnten die Platten monatelang gelagert werden.

2.2.5.3 Plasmidpräparation

Am Folgetag wurde das QIAGEN® Plasmid Kit verwendet, um die Plasmide zu präparieren. In der Promotionsarbeit wurde das Maxi Kit bei *high-copy* Plasmiden verwendet, sodass 100 ml LB-Medium in autoklavierte Kulturkolben mit Aludeckel gefüllt wurden. In Tabelle 10 wurden die entsprechenden Volumina bei unterschiedlicher Kitgröße aufgelistet.

Tabelle 10: Kitgröße von dem QIAGEN Plasmid Kit

Kit	High-copy Plasmid	Low-copy Plasmid
QIAGEN Plasmid Mini	3 ml	Nicht empfohlen
QIAGEN Plasmid Midi	25 ml	100 ml
QIAGEN Plasmid Maxi	100 ml	500 ml

Um das LB-Medium mit einer Bakterienkolonie anzupflanzen, wurde mithilfe einer 1000 µl Pipettenspitze eine einzige Bakterienkolonie der Agarplatten aufgenommen. Danach wurde die Spitze ins Medium hineingeworfen. Über Nacht wurden Kulturkolben von pCMV3, pCMV3-*ESRI* Plasmid und der Negativkontrolle auf einem Schüttler Inkubator bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das LB-Medium in den Zylindern trüb, wenn sich die *E. coli* Zellen vermehrt hatten. Die Negativkontrolle (ohne Plasmid) musste nach der Inkubationszeit weiterhin ein klares Medium aufweisen, damit eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte. Zuerst wurden die Reagenzien aus dem Plasmid Kit vorbereitet. Die RNA-Solution musste zu Puffer P1 hinzugegeben, gemixt und bei 2-8 °C aufbewahrt werden. Zu Puffer P1 wurde außerdem LyseBlue in einem Verhältnis von 1:1000 hinzugegeben. Prechill-Puffer P3 sollte bei 4 °C aufbewahrt werden. Danach wurde die Bakterienkultur in neue Reaktionsgefäße umgefüllt. Die Falconröhrchen wurden bei 6000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Zu dem Pellet wurden 10 ml Resuspensionspuffer P1 pipettiert. Zusätzlich wurden 10 ml Lysepuffer P2 hinzugegeben, um die bakterielle Zellwand zu lysieren und

dadurch den Bakterieninhalt freizulegen (Joppien et al., 2011). Durch 4-6-mal kräftiges Umschwenken wurden die Reagenzien vermischt. Danach wurden die Proben bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die Flüssigkeit in den Falconröhrchen wurde blau, da zuvor LyseBlue zu Puffer P1 hinzugefügt wurde. Es wurden 10 ml von Puffer P3 ins Falconröhrchen hinzugegeben und das Falconröhrchen wurde so lange geschwenkt, bis ein Farbumschlag von blau zu weiß detektiert wurde. Danach wurde das Gemisch für 20 min auf Eis inkubiert. Die Falconröhrchen wurden bei >20.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Bakterienbestandteile und das Zelldetritus bildeten das Pellet am Falconröhrchenboden. Die Plasmid-DNA befand sich im Überstand, weshalb dieser abgenommen und in neue Reaktionsgefäße umgefüllt wurde. Die Reaktionsgefäße wurden erneut bei 20.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert.

Die isolierte DNA muss gereinigt werden, da unerwünschte Substanzen an den isolierten Nukleinsäuren gebunden sind. Die Säulen sind Schwerkraftfluss-Anionenaustauschspritzen, die aufgrund der enthaltenen Cellulose oder Dextran positiv geladen sind. Die Nukleinsäuren sind negativ geladen und binden an die Säulen, weshalb die unerwünschten Substanzen den Filter passieren (Joppien et al., 2011). Zwei Säulen wurden mit jeweils 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Der Überstand mit der genomischen DNA wurde von den Reaktionsgefäßen in die Säulen gefüllt. Daraufhin wurden die Filter der Säulen zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die gereinigte DNA befand sich in dem Filter und musste mit 15 ml Elutionspuffer QF-Puffer aus der Säule eliminiert werden, sodass die gelöste DNA in einem sauberen Falconröhrchen aufgefangen wurde. In das Falconröhrchen wurden zusätzlich 10,5 ml Isopropanol gefüllt. Die Falconröhrchen wurden bei 15.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet setzte sich am Boden ab, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen, um die Salze aus den Nukleinsäuren zu entfernen (Joppien et al., 2011). Die Reaktionsgefäße wurden bei >15.000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet trocknete für 5-10 min an der Luft. Als letztes wurde das Pellet in destilliertem Wasser gelöst.

Um die DNA-Konzentration zu messen, wurde das NanoDrop Programm verwendet. Zuerst wurde 1 µl Wasser zur Äquilibrierung auf die Messsonde gegeben. Danach wurde die Messung mit 1 µl Plasmid-DNA wiederholt. Das Ergebnis wird in ng/µl angezeigt. Die Plasmide konnten bei -20 °C gelagert werden.

2.2.6 RNA-Isolierung

Die RNA der transfizierten MCF-7-Zellen wurde isoliert, um anschließend die cDNA zu synthetisieren. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN verwendet. Die Zellpellets wurden entweder frisch geerntet oder aus dem -80 °C Gefrierschrank verwendet. Alle Schritte wurden entweder auf Eis durchgeführt oder bei 4 °C zentrifugiert.

Zuerst mussten die Zellen lysiert werden, sodass zu jeder Probe 350 µl RLT-Puffer pipettiert und suspendiert wurde. Der Inhalt der Reaktionsgefäße wurde auf die QIAshredder-Säulen überführt und diese wurden bei maximaler Stufe für 1 min zentrifugiert. Die Lysate befanden sich im Collection Tube Reaktionsgefäß. Der Filter von der QIAshredder-Säule wurde entfernt und es wurden jeweils 350 µl 70 %-iges Ethanol in jedes Reaktionsgefäß pipettiert. Der Inhalt wurde in die RNeasy Mini Spin-Säulen übertragen und diese wurden bei 10.000 rcf für 20 s zentrifugiert. Die RNA bindet an die RNeasy-Kieselsäulemembran, sodass die Verunreinigungen als Filtrat die Membran passieren. Es wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Kieselsäulemembran pipettiert, bei 10.000 rcf für 20 s zentrifugiert und das Filtrat wurde entfernt. Der Waschvorgang wurde noch zweimal mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt. Hierfür wurden die Säulen ebenfalls bei 10.000 rcf für 20 s zentrifugiert. Die Säule wurde ohne Puffer für 2 min bei 10.000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und eine weitere Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 10.000 rcf. Die Säule wurde in ein 1,5 ml DNA-LoBind-Tube umgesetzt, damit die Membran für 5 min bei Raumtemperatur trocknete. Zum Schluss wurde die RNA aus der Säule eluiert, indem 30 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und die Reaktionsgefäße für eine Minute bei 10.000 rcf zentrifugiert wurde. In dem Filtrat befand sich nun die isolierte RNA (QIAwave RNA Mini Handbook, 2023). Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem Spektralphotometer und mit dem LV destilliertem Wasser gemessen. Danach wurde die RNA für die Reverse Transkription weiterverarbeitet.

2.2.7 Reverse Transkription

Das Omniscript Reverse-Transkriptase-Kit wurde verwendet, um die Sequenzfolge der RNA in die komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Das Omniscript enthält die Reverse-Transkriptase, DesoxyNukleosidTriPhosphate (dNTPs) und einen optimierten Reaktionspuffer (Omniscript Reverse Transcription Handbook, 2010). Die Reverse-Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Als Primer fungieren Thymin-Oligonukleotide, die an das Poly-(A) Ende der mRNA binden (Heinrich et al., 2014).

Zuvor wurde die RNA, wie im Unterkapitel 2.3.6 beschrieben, isoliert und gereinigt. Die Konzentration wurde mithilfe des Spektralphotometers bestimmt. Die RNA sollte eine Konzentration von 100 ng/μl aufweisen, weshalb Folgendes berechnet wurde:

$$\frac{\text{Soll-Wert} \left(100 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)}{\text{Ist-Wert}} * \text{Endvolumen} (50 \mu\text{l}) = \text{Probenvolumen}$$

Endvolumen – Probenvolumen = Volumen von RNase-freiem Wasser

Das berechnete Probenvolumen und das RNase-freie Wasser wurden in neue Reaktionsgefäße pipettiert. Von jeder Probe wurden jeweils 10 μl in ein PCR-Tube Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße inkubierten für 5 min bei 65 °C im Thermocycler, sodass die RNA denaturierte. Der Master-Mix wurde hergestellt, sodass für jede Probe folgende Volumina benötigt wurden. Die entsprechenden Volumina sind in Tabelle 11 zu finden:

Tabelle 11: Master-Mix für die reverse Transkription

	1 x V (μl)
10x Puffer	2
dNTP-Mix	2
Random Primer	2
RNAsin	0,25
H ₂ O	2,75
Total Volume	10

Insgesamt wurden 10 μl Master-Mix pro Probe in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden gevortext, zentrifugiert und wieder in den Thermocycler gestellt. Dort wurden die Proben nach dem folgenden Protokoll behandelt:

- 1) Deckel wird auf 40 °C erhitzt
- 2) Temperatur auf 37 °C für 1 h
- 3) Deckel wird auf 37 °C erhitzt
- 4) Temperatur auf 93 °C für 5 min
- 5) Lagern bei 4 °C

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden die kleinsten DNA-Fragmente millionenfach amplifiziert, damit diese nachgewiesen und weiter sequenziert werden können. Um eine DNA-Sequenz amplifizieren zu können, werden zwei Primer benötigt. Die Primer sind Oligonukleotide und begrenzen den DNA-Abschnitt (Heinrich et al., 2014). In dieser Promotionsarbeit wurden die Primer *ESR1*-Exon 1B vorwärts und *ESR1*-Exon 8 rückwärts verwendet, deren Sequenzen in Tabelle 12 dokumentiert worden sind. Zusätzlich wird ein Ready-to-use PCR-Reagenz namens K2G verwendet. Das K2G-Reagenz enthält die DNA-Basen sowie die DNA-Polymerase. Es wurde die Taq-Polymerase eingesetzt, die aus dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus* synthetisiert wird. Die Polymerase denaturiert bei 100 °C nicht, da der Organismus in sehr heißen Gewässern überleben kann (Joppien et al., 2011).

Zuerst musste der Master-Mix angesetzt werden. Pro Probe wurden 8 µl nuklease-freies Wasser, 10 µl K2G-Reagenz und jeweils 0,5 µl Primer verwendet. Nun wurden insgesamt 19 µl von dem Master-Mix in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Zusätzlich wurde 1 µl von der jeweiligen cDNA-Probe hinzugefügt und resuspendiert. Als Negativkontrolle wurde 1 µl Wasser zum Master-Mix pipettiert. Die Proben wurden in den Thermocycler gestellt und folgendes Programm wurde ausgewählt:

- 1) Deckel wird auf 110 °C erhitzt
- 2) Initiale Denaturierung: Temperatur auf 95 °C für 3 min
- 3) Zyklus insgesamt 30 x (Schritte a-c):
 - a. Denaturierung: Temperatur auf 95 °C für 30 s
 - b. Primerhybridisierung: Temperatur auf 58 °C für 30 s
 - c. Elongation: Temperatur auf 72 °C für 1 min
- 4) Ende des Zyklus
- 5) Finale Elongation: Temperatur auf 72 °C für 10 min
- 6) Lagern bei 4 °C

Tabelle 12: Primer

<i>ESR1</i> -Exon 1B vorwärts	5' AAGACTCGGCAGCATCTCCAAAGCCCGCCGTTACA ACTAC 3'
<i>ESR1</i> -Exon 8 rückwärts	5' GCGATCGTCACTGTTCTCCAAATGCGATGAAGTAGAGCCC 3'

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese trennt die Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe auf. Zuerst wurde das Gel selbst gegossen. Für eine kleine Kammer und ein 1 %- iges Gel wurden 0,5 g Agarose abgewogen und in 50 ml 1x TAE-Puffer gelöst. Für eine große Kammer wurden dementsprechend 100 ml 1x TAE-Puffer und 1 g Agarose benötigt. Das Gemisch wurde für 3-5 min in der Mikrowelle erhitzt, bis keine Agarose Rückstände zu sehen waren. Der Farbstoff GelRed wurde in einem Verhältnis von 1: 10.000 in das flüssige Gel pipettiert. Der Kamm wurde in die Kammer gesteckt, um danach das Gel ohne Luftblasen hineingießen zu können. Das Agarose-Gel musste für 30 min aushärten. Danach wurde 1x TAE-Puffer in die Kammer und auf das Gel gegossen und der Kamm konnte herausgezogen werden.

Um das Gel mit den cDNA-Proben beladen zu können, wurde der TriTrac DNA-Ladefarbstoff in einem Verhältnis von 1:5 mit der DNA-Probe vermischt. Hierfür wurden 1 µl TriTrac und 5 µl DNA pipettiert und in die Kammern des Agarose-Gels aufgetragen. TriTrac ist ein DNA-Ladefarbstoff, der insgesamt drei Farbstoffe enthält. Die Farbstoffe Bromphenolblau, Xylencyanol FF und Orange G ermöglichen eine visuelle Verfolgung der DNA-Gelelektrophorese. In eine Kammer wurden 5 µl des Indikators GeneRuler Low Range DNA Ladder, aufgetragen, um die Größe der DNA quantifizieren zu können. Die Kammer wurde an das Spannungsgerät bei 120 V angeschlossen. Ein kleines Gel benötigte 30 min, ein großes Gel 60 min. Das Ergebnis wurde mithilfe des ChemiDoc MP Imaging System unter der GelRed-Einstellung der ImageLab Software detektiert.

2.2.10 Gelelution: Reinigung von DNA-Fragmenten zwischen 40 bp und 50 kb

Das Ziel dieser Methode war, die DNA aus dem Agarose-Gel zu extrahieren. Das Endprodukt wurde verwendet, um eine Sanger-Sequenzierung durchzuführen. Hierfür wurde das QIAEX II Gel Extractation Kit (150) von QIAGEN verwendet.

Der gelbe QX1-Puffer sollte einen pH-Wert unter 7,5 aufweisen. Zu dem PE-Puffer mussten 80 ml absolutes Ethanol hinzugegeben werden. Alle Zentrifugierungsschritte wurden bei Raumtemperatur (15-25 °C) und bei 13.000 rpm durchgeführt.

Das Gel wurde unter das ChemiDoc MP Imaging System gelegt, weil durch das UV- Licht die DNA-Banden sichtbar wurden. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufbewahrt und gewogen. Das Volumen des QX1-Puffers ist abhängig vom Gewicht und Größe des herausgeschnittenen DNA-Fragmentes. Bei einem DNA-Fragment < 100 bp wurde ein 6-faches Volumen vom QX1-Puffer hinzugegeben, sodass insgesamt 1,8 ml QX1 als Löslichkeits- und Bindungspuffer in jedes Reaktionsgefäß pipettiert wurde. 10 µl QIAEX II wurden bei < 2 µg DNA hinzugegeben, um die DNA von Salzen, Agarose, Proteinen oder Farbstoffen trennen zu können. Die Proben wurden für 10 min bei 50 °C inkubiert. Alle 2 min wurden die Proben gevortext, damit sich die Agarose auflöste, die Proben sich gelb färbten und die DNA gebunden werden konnte. Die aufgelöste Agarose wurde für 30 s zentrifugiert, damit sich das DNA-Pellet am Reaktionsgefäßboden absetzte. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 500 µl QX1-Puffer gewaschen, um die letzten Agarose-Rückstände zu entfernen. Dafür wurden die Proben erneut für 30 s zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Danach wurde das Pellet zweimal mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, um die Salzbestandteile zu entfernen. Hierfür wurden die Pellets erneut unter den bekannten Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, damit das DNA-Pellet für 5-10 min an der Luft trocknen konnte. Die Pellets wurden in 20 µl DNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Reaktionsgefäße wurden gevortext und erneut für 30 s zentrifugiert. Die extrahierte DNA befand sich nun im Überstand, sodass die DNA in neue PCR-Reaktionsgefäße umgefüllt wurde. Die DNA-Konzentration wurde mithilfe des Spektralphotometers und dem LV DNase-freiem Wasser gemessen.

2.2.11 Kristallviolett färbung

Das Ziel der Kristallviolett färbung war, die Besiedlungsdichte von transient transfizierten Zellen in den Östradiolkonzentrationen von 0, 10^{-13} , 10^{-11} und 10^{-9} M zu visualisieren. Zuvor erfolgte die in 2.3.1 beschriebene transiente Transfektion der MCF-7-Zellen mit pCMV3, pCMV3-*ESR1* und pCMV3-Y537S. Danach wurden die Schritte wie beim MTT-Assay verfolgt. Die Zellen wurden auf einer 96-Well Platte ausgesät, ein Tag auf Charcaol-stripped FCS-Medium gesetzt und danach in Östradiolkonzentrationen von 0, 10^{-13} , 10^{-11} und 10^{-9} M für zwei Tage kultiviert. Am sechsten Tag nach Transfektion wurde der Überstand der Östradiolverdünnungsreihe abgenommen und jedes Well wurde mit 100 μ l DPBS gespült. Um die Zellen zu fixieren, mussten 100 μ l 4 % -iges Formalin für 30 min einwirken. 5 mg Kristallviolett wurden in 50 ml Wasser gelöst, sodass die Zellen mit 50 μ l 0,01 % -igem Kristallviolett für 30 min gefärbt wurden. Die Wells wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Bilder wurden mit dem Axio Observer mit der Festkörperlichtquelle Colibri 7 aufgenommen.

2.2.12 Trefoil Factor 1

Der Trefoil Factor 1 (TFF1) gehört zu der Trefoil Factor Family. Hierunter werden insgesamt drei Proteine zusammengefasst: TFF1 (auch bekannt als pS2) TFF2 und TFF3. Die Faktoren spielen in der Schleimhautabwehr und -heilung des Magens eine Rolle, da diese mit muzinsekretierenden Epithelzellen exprimiert werden. Nach einer Schädigung der Schleimhaut durch Viren, Bakterien oder Ulzera helfen die Faktoren bei der Regeneration (Mathelin et al., 2005). In vielen Karzinomen, unter anderem Mammakarzinomen, wird das TFF1 Protein exprimiert. Das Gen enthält ERE, sodass die Proteinbiosynthese von Östrogen abhängig ist (Pelden et al., 2013). Die TFF1-Expression steigt mit zunehmender Östradiolkonzentration. Eine TFF1-Überexpression führt zu einer günstigeren Prognose und kann als prädiktiver Faktor auf das Ansprechen der Hormontherapie in Betracht gezogen werden (Mathelin et al., 2005).

In der Promotionsarbeit wurde die TFF1-Expression in unterschiedlich transfizierten Zellen mithilfe der qPCR verglichen.

2.2.13 Real-Time Quantitative PCR

Mithilfe der Real-Time Quantitative PCR (qPCR) wird die neu gebildete DNA nach jedem Zyklus in Echtzeit detektiert (Joppien et al., 2011). Das Ziel der Methode war, die

Expression des ER α -Zielproteins TFF1 in den transient transfizierten Zellen mit pCMV3, pCMV3-*ESR1* und pCMV-Y537S mit der Negativ- und Positivkontrolle zu vergleichen. Die transiente Transfektion wurde wie in 2.3.1 durchgeführt. Die Zellen wurden für 48 h in den Östradiolkonzentrationen 0, 10⁻¹³ und 10⁻⁹ M kultiviert. Danach wurde die RNA nach 2.3.6 isoliert und die cDNA wie in 2.3.7 synthetisiert. Die qPCR wurde mit dem Quanti Fast SYBR Green PCR Kit (400) durchgeführt. SYBR Green ist ein fluoreszierender Farbstoff. Wenn dieser mit der doppelsträngigen DNA interagiert und durch Licht angeregt wird, wird die Fluoreszenz gemessen. Dabei verhalten sich das Fluoreszenzsignal und die Zunahme der DNA proportional (Joppien et al., 2011). Um eine reine Arbeitsumgebung zu gewährleisten, wurden die Fläche sowie die Utensilien mit Natriumchlorid gereinigt. Der TFF1- und PDH-Primer wurden mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Qualitätskontrolle der qPCR wurde nach dem folgenden Schema angesetzt, welches in Tabelle 13 zu finden ist. Hierfür wurden 5 μ l einer Probe mit 15 μ l Wasser verdünnt:

Tabelle 13: Verdünnungsreihe der Qualitätskontrolle bei qPCR

	V (RNA) μ l	V (H ₂ O) μ l
1:4	5 μ l 100 ng/ μ l	15
1:16	5 μ l 1:4	15
1:64	5 μ l 1:16	15
1:256	5 μ l 1:64	15

Der Master-Mix wurde für die Primer PDH und TFF1 jeweils einmal pro Probe nach Tabelle 14 angesetzt. Die Volumina wurden an die Probenanzahl inklusive drei Samples als Überschuss angepasst.

Tabelle 14: Master-Mix für die qPCR

	1 x V [μ l]	25 (Probenanzahl) x V [μ l]
SYBR Green	5	125
H ₂ O	3	75
Primer 1:10	1	25
total	9	225

In die Wells der 384-Well Platte wurde 1 μ l der cDNA pipettiert. Jede Probe wurde als Quadruplikat aufgetragen. 1 μ l von der Verdünnungsreihe und 1 μ l Wasser als Negativkontrolle wurden als Duplikat pipettiert. In jedes Well wurden 9 μ l Master-Mix pipettiert, um ein Gesamtvolumen von 10 μ l zu erreichen. Die Platte wurde mit einer Folie dicht abgeklebt und danach für 1 min bei 1000 g zentrifugiert. Zuletzt wurde die Platte in den LightCycler® 480 II gestellt und die DNA wurde amplifiziert.

Das Programm der qPCR läuft in drei verschiedenen Phasen ab. In der Startphase liegen geringe DNA-Mengen vor. Danach folgt die exponentielle Phase, in der sich die Sequenz bei konstanten Reaktionsbedingungen verdoppelt. Die letzte Phase wird als Plateauphase definiert. Die vermehrten Zielsequenzen hybridisieren miteinander, weshalb die qPCR gestoppt wird. Für die Auswertung ist der CT-Wert relevant. Dieser gibt den Amplifikationszyklus an, um in die exponentielle Phase zu gelangen (Holzapfel & Wickert, 2007). Die Auswertung der qPCR erfolgte exemplarisch wie folgt. Hierfür wurde das *Housekeeping* Gen *PDH* hinzugezogen:

TFF1-Primer:

Probe: x_1 : 15,04, x_2 : 15,01, x_3 : 15,11,

Mittelwert von x_1 - x_3 : \bar{x} : 15.05, Standardabweichung: 0,0513

PDH-Primer:

Probe: x_1 :22,03, x_2 : 22,15, x_3 : 22,15

Mittelwert von x_1 - x_3 : \bar{x} : 22,11, Standardabweichung: 0,069

Differenz: \bar{x} TFF1 - \bar{x} PDH; 15,05-22,11 = -7,06

2^{Δ} (Differenz); $2^{\Delta}(-7,06) = 133,13$

2.2.14 Sanger-Sequenzierung

Um die jeweiligen DNA-Proben zu sequenzieren, wurde freundlicherweise mit dem Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf zusammengearbeitet. Die Proben und der laboreigene Primer *ESR1*-Exon 8 rückwärts und *ESR1*-Exon 5 vorwärts (50 ng/ μ l; 10 μ l) wurden abgefüllt und dem GTL zugestellt. Die Basenabfolge der Primer kann aus Tabelle 12 entnommen werden. Die Sanger-Sequenzierung wurde anhand der Nukleinsäuresequenzen ausgewertet.

2.2.15 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm PRISM 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) erstellt. Bei $n > 2$ wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Bei Versuchsansätzen mit zwei unabhängigen Faktoren wurde eine Two-Way ANOVA durchgeführt. Zur Kontrolle des Fehlerniveaus bei multiplen paarweisen Vergleichen wurde anschließend der Post-hoc-Test mit dem Sidak's multiple comparisons Test angewendet. In ausgewählten Analysen wurde ausschließlich der Haupteffekt des Spaltenfaktors („Column factor“) ausgewertet.

Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit einem Einflussfaktor wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way ANOVA; Column factor) durchgeführt. Bei einem signifikanten Haupteffekt erfolgte eine Post-hoc-Analyse mittels Tukey's multiple comparisons test.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzniveaus sind in den Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

Die erlangten Forschungsergebnisse sind im folgenden Kapitel wiedergegeben.

3.1 ER α -Expression von pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfizierten MCF-7-Zellen

Das Ziel des Versuches war, die ektopische ER α -Expression in transient transfizierten MCF-7-Zellen über einen Zeitraum von 20 Tagen zu analysieren. Die hormonabhängigen MCF-7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. Nach 3, 7, 10, 15 und 20 Tagen wurden die Zellpellets gesammelt. Die Proteinsignale wurden mithilfe der Signalintensitäten für das stabil exprimierte „housekeeping protein“ β -Aktin normalisiert und quantifiziert. Das Proteinsignal für ER α wird im Western blot bei 66 kDa und für β -Aktin bei 42 kDa detektiert (Abb. 7). Die Western blot Analysen zeigten, dass die ER α -Überexpression innerhalb einer Woche nach Transfektion messbar war. Am Tag drei wurde die stärkste Überexpression in MCF^{WT}-Zellen gemessen. Nach sieben Tagen sank die ER α -Expression auf das normale, endogene Expressionsniveau ab. In MCF-7^{LV}-Zellen wurde das normale, endogene Expressionsniveau unabhängig vom Zeitraum erreicht (Abb. 6). Aus diesem Ergebnis wurde geschlossen, dass innerhalb der ersten Woche nach Transfektion ER α durch das im Plasmid enthaltene *ESR1*-Gen überexprimiert wurde. Danach fiel die Expression auf das endogene Niveau ab. Deswegen wurden die folgenden Experimente innerhalb der ersten sieben Tage nach Transfektion geplant, damit das in die Zellen eingeschleuste Plasmid einen Einfluss auf die Zellfunktion hatte.

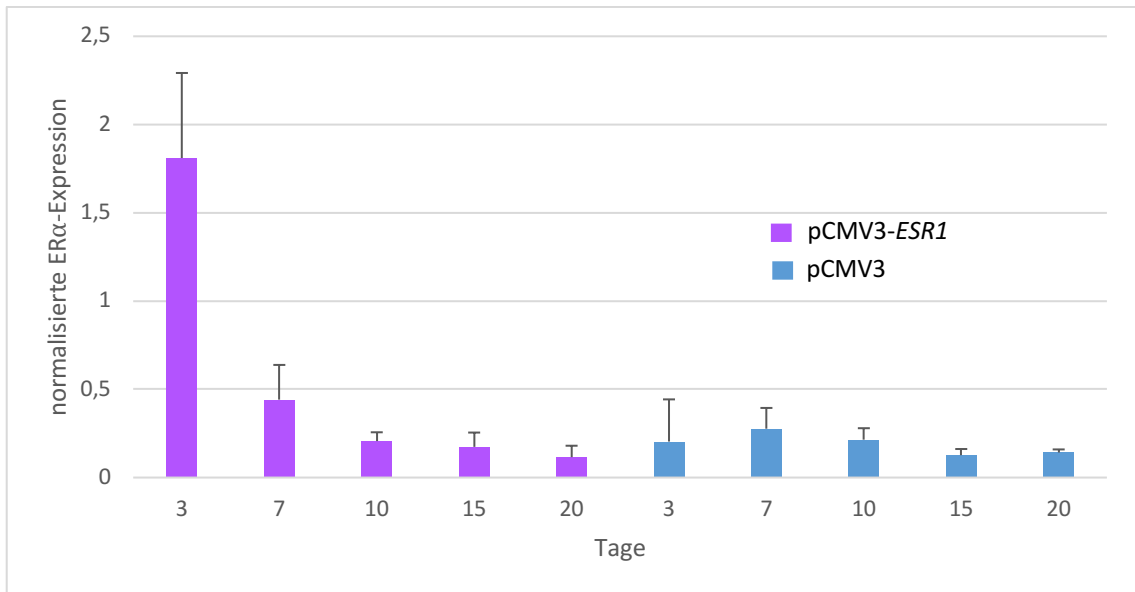


Abb. 6: Vergleich der ER α -Expression innerhalb von 20 Tagen bei pCMV3 und pCMV3-ESR1

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3 und pCMV3-ESR1 transfiziert. 3, 7, 10, 15 und 20 Tage nach Transfektion wurden die Pellets gesammelt, um die ER α -Expression mithilfe des Western blots darzustellen. Der Western blot wurde mit ImageJ quantifiziert, indem jede ER α -Bande auf den zugehörigen β -Aktin Wert normalisiert wurde. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung aus n = 2.

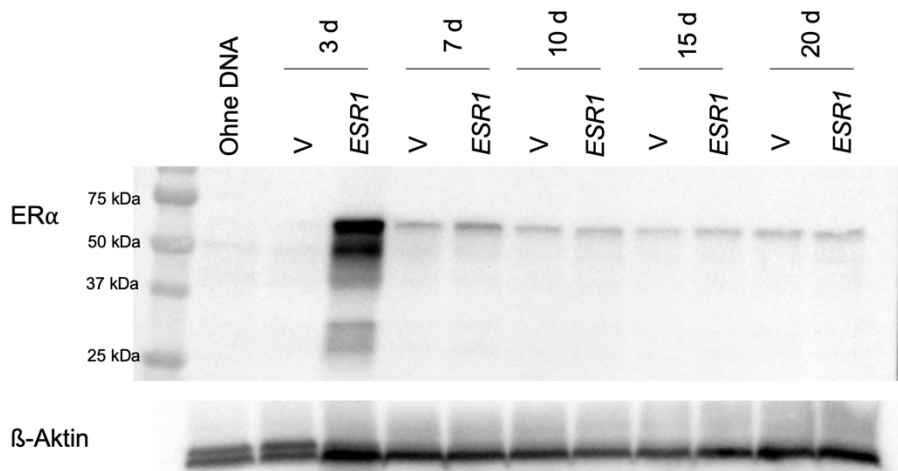


Abb. 7: Western blot: Vergleich der ER α -Expression innerhalb von 20 Tagen bei pCMV3 und pCMV3-ESR1 (n=2)

Legende: V = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, ESR1 = pCMV3-ESR1 transfizierte MCF-7-Zellen, kDa = Kilodalton, d = Tage

3.2 Durchflusszytometrie: 3, 7 und 10 Tage nach Transfektion

Die Durchflusszytometrie wurde durchgeführt, um den Anteil der ER α -überexprimierenden MCF-7-Zellen in der ersten Woche nach Transfektion zu quantifizieren. Hierfür wurden die MCF-7-Zellen transient mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. Danach wurden nach 3, 7 und 10 Tagen Pellets für die Durchflusszytometrie gesammelt. Die Einstellungen können aus Abb. 8 entnommen werden. Die Durchflusszytometrie zeigte, dass an Tag drei die Hälfte der MCF-7^{WT}-Zellen ER α überexprimierten. Es wurde eine Signalverschiebung von 10^3 bis 10^5 nach 10^5 bis 10^6 gemessen. Zusätzlich bildete das ER α -Signal im Histogramm eine „Schulter“ aus wenigen Zellen, die ER α hoch exprimierten. Die statistischen Werte Mean und Median wurden von MCF-7^{WT} und MCF-7^{LV} berechnet, um sie danach ins Verhältnis zu setzen. MCF-7^{WT}-Zellen zeichneten sich mit einer 6-fach höheren Mean als MCF-7^{LV}-Zellen aus. An Tag sieben und zehn war keine Signalverschiebung mehr sichtbar. Das Verhältnis von pCMV3-*ESR1*/pCMV3 unterschied sich an Tag sieben mit 1,28 und an Tag zehn mit 0,95 kaum (Abb.9). Da die transfizierten Zellen sieben und zehn Tage nach Transfektion kaum noch adhärent wuchsen, wurde geschlossen, dass sie vermehrt apoptotisch wurden, weshalb die Transfektionsbedingungen optimiert werden mussten.

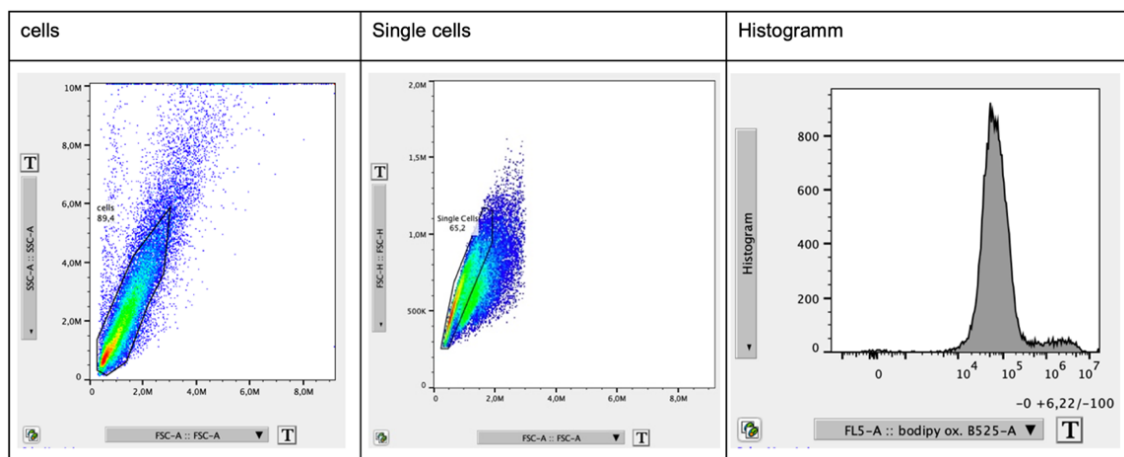


Abb. 8: FlowJo Einstellung

Einstellung:

1. Cells: x-Achse: FSC-A:: FSC-A, y-Achse: SSC-A::SSC-A
2. Single cells: x-Achse: FSC-A:: FSC-A, y-Achse: FSC-H::FSC-H
3. Histogramm: x-Achse: FL5-A:: bodipy ox. B525-A, y-Achse: Histogramm

Zuerst wurden die intakten Zellen von Zelltrümmern und Detritus im FSC-A/SSC-A Kanal abgegrenzt. Anschließend erfolgte eine Selektion der Einzelzellen, um Doppelzellen oder Zellaggregate auszuschließen. Die definierte Zellpopulation wurde im Anschluss hinsichtlich der Fluoreszenzintensität im Kanal FL5-A:: bodipy ox. B525-A untersucht. Das resultierende Histogramm veranschaulicht die Fluoreszenzverteilung in den Einzelzellen. Eine Verschiebung des *Peaks* nach rechts entspricht einer erhöhten Fluoreszenzintensität und weist auf eine stärkere Expression von ER α hin.

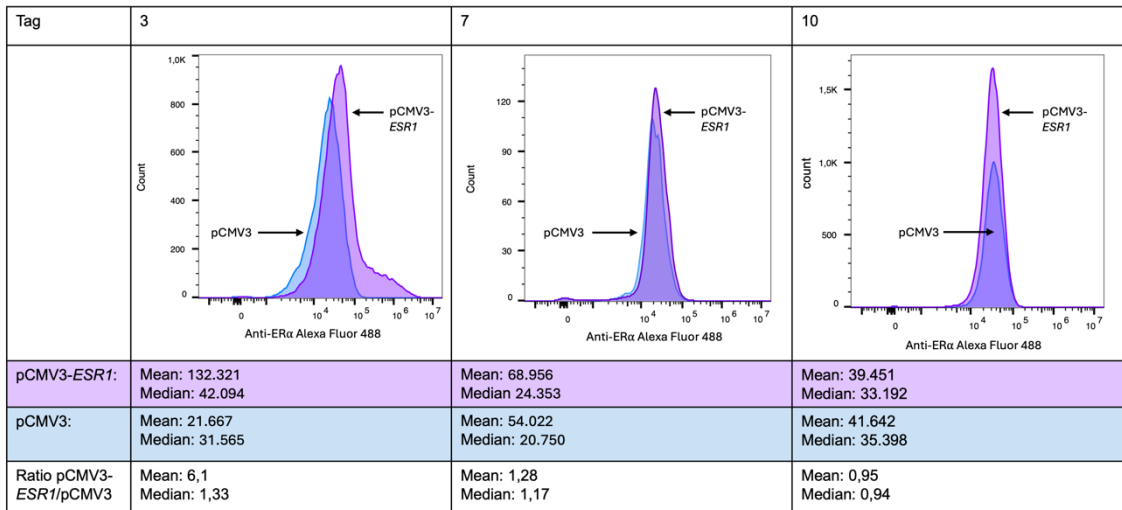


Abb. 9: Durchflusszytometrie: Vergleich der ER α -Expression 3,7, und 10 Tage nach transienter Transfektion mit pCMV3-ESR1 (n=2, jeweils 2 Replikate)

Die MCF-7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV3 und pCMV3-ESR1 transfiziert. Nach 3, 7 und 10 Tagen wurden die Pellets für die Durchflusszytometrie gesammelt. AK: primär: ERSP1; sekundär: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit
Legende: lila = pCMV3-ESR1 transfizierte MCF-7-Zellen, blau = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen

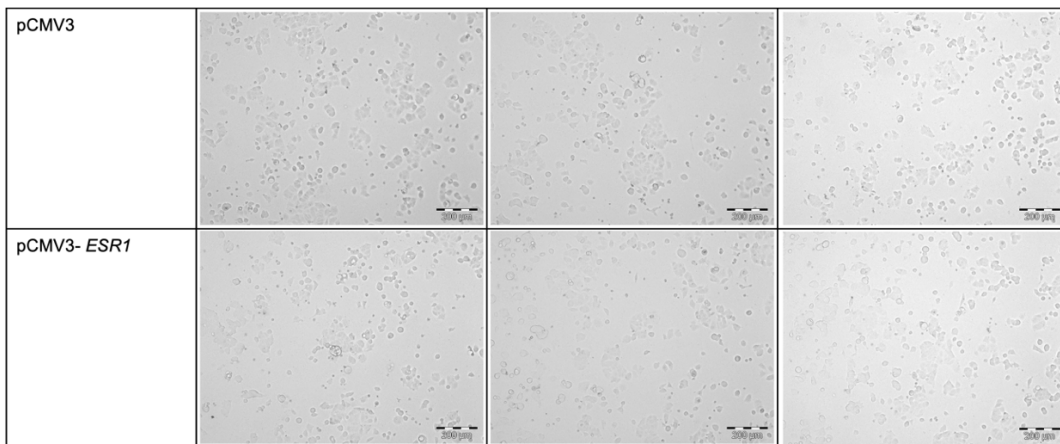
3.3 Optimierung der Transfektionsbedingungen

Um die Zellviabilität der transfizierten Zellen zu steigern, wurde 4, 24 oder 72 h nach transienter Transfektion das Zellkulturmedium erneuert. Die Zellmorphologie wurde vor jedem Mediumwechsel mit dem Mikroskop am CellCelector untersucht. Die Analysen zeigten, dass die Zellviabilität bei einem Mediumwechsel nach 4 h höher war als bei einem Mediumwechsel nach 24 oder 72 h. Bildmorphologisch konnten nach einem späteren Mediumwechsel deutlich mehr apoptotische, nicht adhärente transfizierte Zellen unter dem Mikroskop erkannt werden (Abb. 10).

Es stellte sich nun die Frage, ob der frühe Mediumwechsel 4 h nach Transfektion die Transfektionseffizienz beeinträchtigt hat. Die Plasmid- und Transfektionsreagenzien wurden durch den Wechsel frühzeitig entfernt, weshalb möglicherweise das Plasmid noch nicht vollständig von den MCF-7-Zellen aufgenommen wurde. Eine reduzierte Plasmidaufnahme könnte somit zu einer geringen ER α -Expression führen.

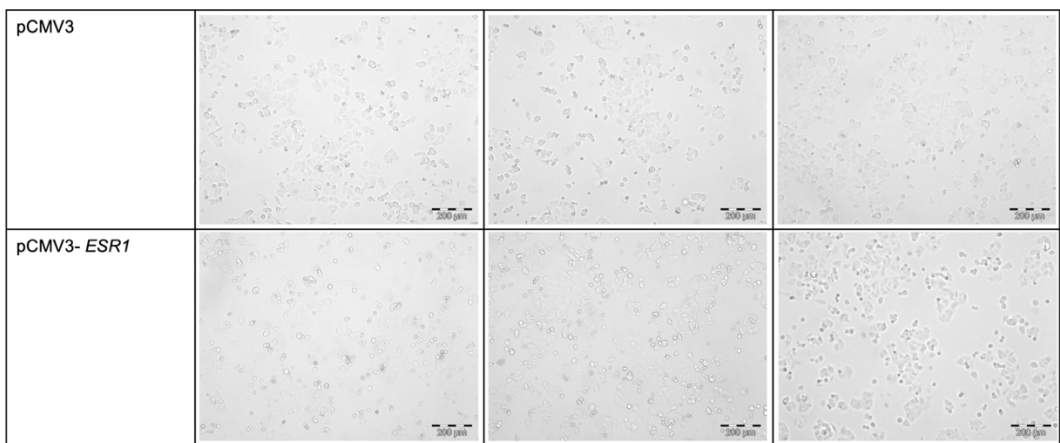
MW nach:	4 h	24 h	72 h
----------	-----	------	------

Dokumentation vor vierstündigen MW:



MW nach:	4 h	24 h	72 h
----------	-----	------	------

Dokumentation vor 24 stündigem MW:



MW nach:	4 h	24 h	72 h
----------	-----	------	------

Dokumentation vor 72 stündigem MW:

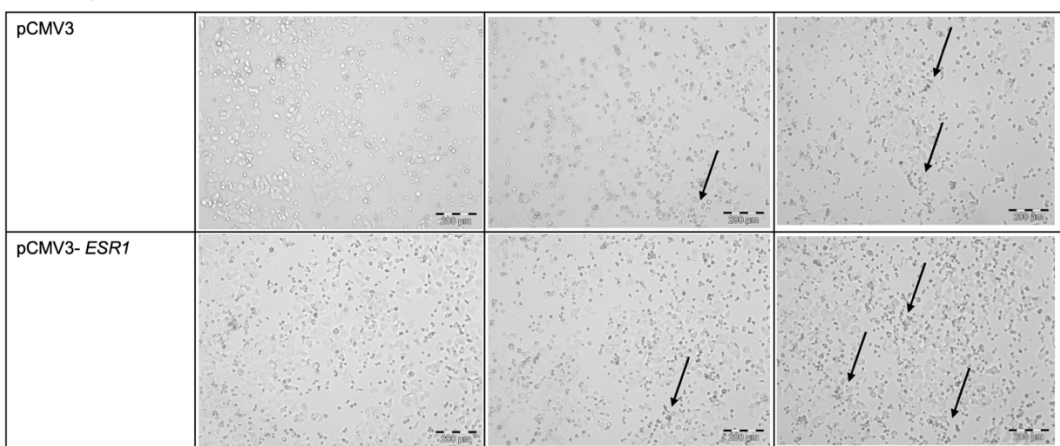


Abb. 10: Zellmorphologie der transient transfizierten MCF-7-Zellen bei einem Mediumwechsel nach 4, 24, und 72 h (n=2)

Fortführung siehe Seite 51

Zu Abb. 10:

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert und auf einer 6-Well Platte kultiviert. Hierfür wurde das RPMI-Zellkulturmedium verwendet. 4, 24 und 72 h nach Transfektion wurde das Medium erneuert. Vor jedem Mediumwechsel wurde die Zellmorphologie mit dem CellCelector dokumentiert. Die Pfeile zeigen repräsentativ auf abgerundete, nicht adhärenente und apoptotische Zellen.

Legende: pCMV3 = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, pCMV3-*ESR1* = pCMV3-*ESR1* transfizierte MCF-7-Zellen, MW = Mediumwechsel; h = Stunde; μm = Mikrometer

Einstellung: 2.000 light, 8x Brightfield Maßstab: 200 μm

3.4 Western blot: ER α -Expression nach einem Mediumwechsel 4, 24 oder 72 h nach Transfektion

Um zu untersuchen, ob der frühzeitige Mediumwechsel die Überexpression von ER α negativ beeinflusste, wurden die MCF-7-Zellen auf einer 6-Well Platte ausgesät und mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. Danach wurde das Medium nach 4, 24 oder 72 h gewechselt. Im Anschluss wurde die Platte für zwei Tage kultiviert und die Pellets wurden insgesamt sechs Tage nach Transfektion für den Western blot geerntet. Im Western blot konnte unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels eine ER α -Überexpression dargestellt werden. Der Unterschied zwischen MCF-7^{LV}- und MCF-7^{WT}-Zellen war signifikant (Abb.11,12). Daher scheint der Mediumwechsel nach 4 h die Überexpression von ER α im Western blot nicht negativ zu beeinflussen.

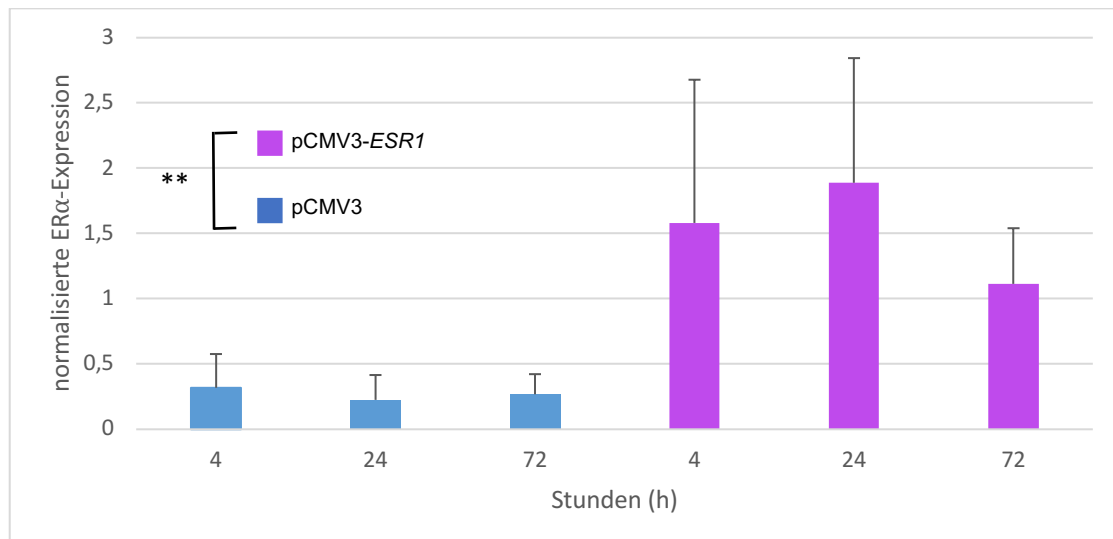


Abb. 11: Vergleich der ER α -Expression sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 oder 72 h

Die MCF-7-Zellen wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät und erneut mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. Danach wurde das Medium jeweils nach 4, 24 oder 72 h gewechselt. Die Pellets wurden sechs Tage nach Transfektion für den Western blot gesammelt. Der Western blot wurde mit ImageJ quantifiziert, sodass ER α auf β -Aktin normalisiert wurde. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung aus n = 3

Legende: blau = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, lila = pCMV3-*ESR1* transfizierte MCF-7-Zellen h = Stunde; Statistik: Two-Way ANOVA, Column Factor; ** = $p < 0,01$

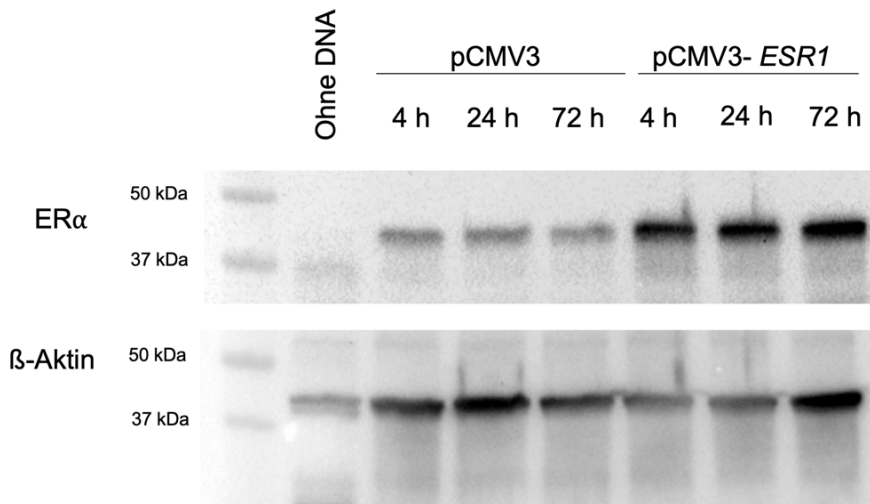


Abb. 12: Western blot: ER α -Expression sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=3)

Legende: pCMV3 = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, pCMV3-ESR1 = pCMV3-ESR1 transfizierte MCF-7-Zellen, h = Stunde, kDa = Kilodalton

3.5 Durchflusszytometrie: Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h

3.5.1 Sechs Tage nach Transfektion

Die MCF-7-Zellen wurden wie in 3.4 vorbereitet und die Durchflusszytometrie wurde sechs Tage nach Transfektion durchgeführt. Es wurde untersucht, wie viele MCF-7-Zellen ER α nach Transfektion mit pCMV3 und pCMV3-ESR1 und einem Mediumwechsel nach 4, 24 oder 72 h überexprimierten. In der Auswertung der ER α -Expression waren pCMV3 und pCMV3-ESR1 transfizierte MCF-7-Zellen unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels sechs Tage nach Transfektion kaum zu unterscheiden. Es konnte keine relevante Signalverschiebung von MCF-7^{WT}-Zellen gemessen werden. Die Signalstärke lag zu jedem Zeitpunkt zwischen 10^{-3} und 10^1 (Abb.13). Erneut wurde das Verhältnis von Mean und Median von MCF-7^{WT}- und MCF-7^{LV}-Zellen berechnet. Die Verhältnisse von Mean lagen bei einem Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h bei 1,23, 0,64 und 2,22. Es konnte geschlussfolgert werden, dass sich die Expression von ER α sechs Tage nach Transfektion von MCF-7^{WT}- und MCF-7^{LV}-Zellen kaum unterschied. Insgesamt war die Versuchsdauer des Experimentes vermutlich zu lang, um die Überexpression von ER α zu quantifizieren.

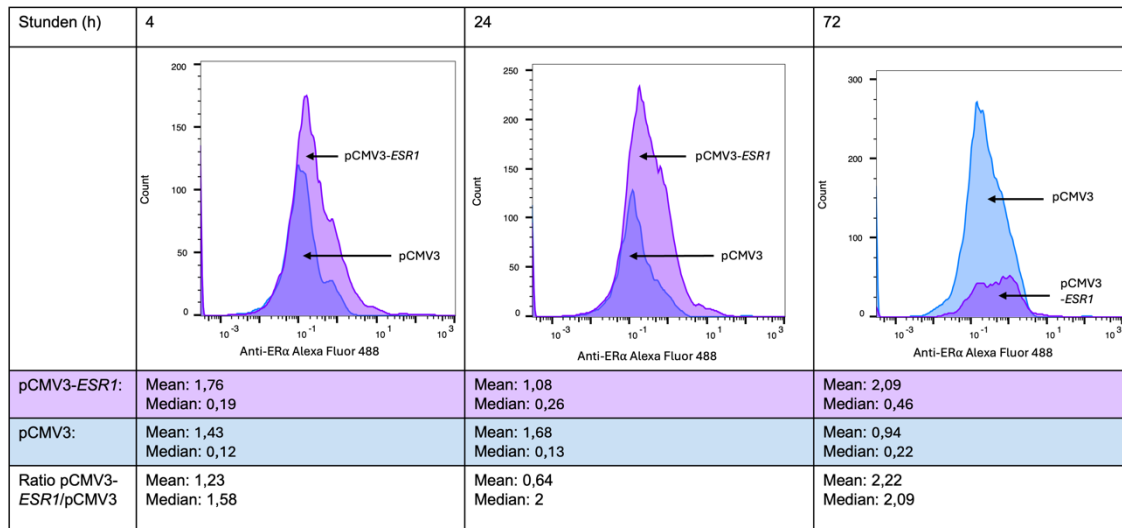


Abb. 13: Durchflusszytometrie: sechs Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=1)

Die MCF-7-Zellen wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät und am nächsten Tag wurde diese mit pCMV3 und pCMV3-ESR1 transfiziert. Das Medium wurde nach 4, 24 oder 72 h gewechselt. Sechs Tage nach Transfektion wurde die Durchflusszytometrie mit den ERSP1-AK und Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit AK durchgeführt.

Legende: lila = pCMV3-ESR1 transfizierte MCF-7-Zellen, blau = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen

3.5.2 Drei Tage nach Transfektion

Um zu untersuchen, ob eine Signalverschiebung drei Tage nach Transfektion mit pCMV3-ESR1 nachweisbar war, wurde die Durchflusszytometrie erneut durchgeführt. Die Analysen zeigten, dass in den MCF-7^{WT}-Zellen eine Signalverschiebung zur höheren Signalstärke unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels gemessen werden konnte. Die Signalstärke lag hauptsächlich bei 10^4 bis 10^5 . Ein Zellanteil bildete eine „Schulter“ aus, sodass eine Signalstärke von 10^6 - 10^7 gemessen wurde und wenige MCF-7-Zellen ER α am stärksten exprimierten. Das Verhältnis von Mean wurde wie in den vorherigen Experimenten zuvor bestimmt. Nach dem vierstündigen Mediumwechsel wurde ein Verhältnis von 4,38 quantifiziert. Nach dem 24 und 72 h Mediumwechsel stieg das Verhältnis bis auf 9,81 und 8,65 an. Als Negativkontrolle wurden die transfizierten Zellen ungefärbt gemessen, sodass die Signalstärke bei 10^0 bis 10^3 lag (Abb.14). Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass der Mediumwechsel 4 h nach Transfektion zu einer ER α -Überexpression in MCF-7^{WT}-Zellen führte. Da zuvor mikroskopisch eine deutliche Steigerung der Zellviabilität sichtbar wurde und im Western blot sowie in der Durchflusszytometrie eine Überexpression quantifiziert werden konnte, wurde in den folgenden Experimenten ein Mediumwechsel 4 h nach Transfektion eingeführt.

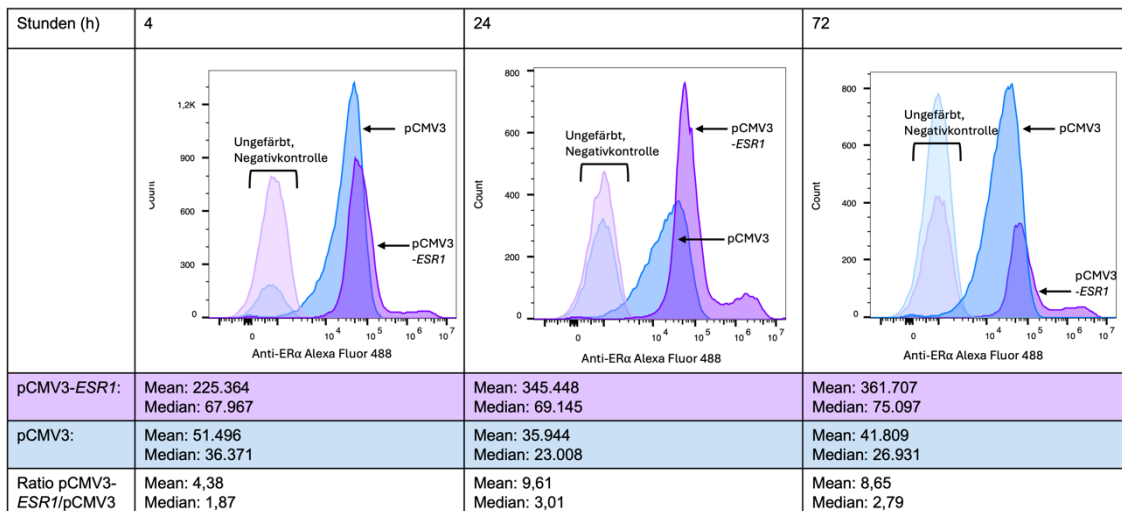


Abb. 14: Durchflusszytometrie: drei Tage nach transienter Transfektion und Mediumwechsel nach 4, 24 und 72 h (n=3)

Die MCF-7-Zellen wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät und mit pCMV3-*ESR1* und pCMV3 transfiziert. Jeweils nach 4, 24 oder 72 h wurde das Medium gewechselt. Nach drei Tagen wurden die Pellets für die Durchflusszytometrie gesammelt. Folgende AK wurde für die Anfärbung verwendet: primär: ERSP1, sekundär: Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit
 Legende: lila = pCMV3-*ESR1* transfizierte MCF-7-Zellen, blau = pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, hellblau = ungefärbte pCMV3 transfizierte MCF-7-Zellen, hell-lila = ungefärbte pCMV3-*ESR1* transfizierte MCF-7-Zellen

3.6 Western blot: ER α -Expression in MCF-7^{Y537S}-Zellen in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium

Um die ER α -Expression in MCF-7^{Y537S}-Zellen zu untersuchen, wurde ein Western blot durchgeführt. Hierfür wurden die MCF-7-Zellen in drei Gruppen eingeteilt. In der ersten Gruppe wurden die MCF-7-Zellen mit Transfektionsreagenz ohne Plasmid behandelt (=Negativkontrolle). Das RPMI-Medium wurde nach 4, 24 oder 72 h gewechselt. In der zweiten Gruppe (=Positivkontrolle) wurden die MCF-7-Zellen mit pCMV3-Y537S transfiziert. Das RPMI-Medium wurde jeweils nach 4, 24, oder 72 h durch Charcoal-stripped FCS-Medium ersetzt. In der dritten Gruppe wurden die MCF-7-Zellen mit pCMV3-Y537S transfiziert. Das RPMI-Medium wurde jeweils nach 4, 24 oder 72 h erneuert. Die Pellets wurden sechs Tage nach Transfektion gesammelt. Das Western blot Ergebnis zeigte, dass MCF-7^{Y537S}-Zellen eine relevante Überexpression von ER α unabhängig von der Mediumzusammensetzung und dem Zeitpunkt des Mediumwechsels im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen. In der Negativkontrolle wurde ER α unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels schwach exprimiert (Abb.15, 16). Es scheint, dass die exogen exprimierte *ESR1*-Mutation Y537S sowohl im RPMI-Medium

als auch im Charcoal-stripped FCS-Medium unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels ER α überexprimierte.

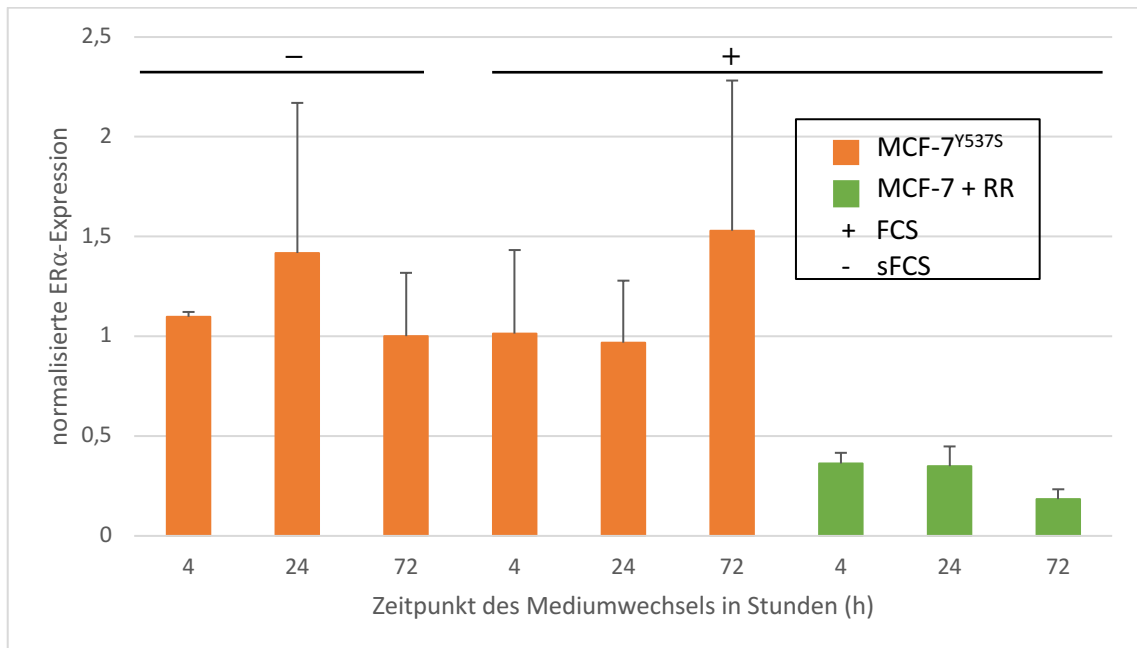


Abb. 15: Vergleich der ER α -Expression in Y537S transfizierten Zellen und Kultivierung in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion

Die MCF-7-Zellen wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät und am Folgetag mit pCMV3-Y537S transfiziert. Das Medium wurde 4, 24, und 72 h nach der Transfektion gewechselt. In einer Gruppe wurde weiterhin das RPMI-Medium verwendet. Die anderen pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen wurden zu diesen Zeitpunkten auf Charcoal-stripped FCS-Medium gesetzt. Als Negativkontrolle wurden MCF-7-Zellen ausgesät, ausschließlich mit den Reaktionsreagenzien aus dem Lipofectamine® 3000 Kit behandelt und in RPMI-Medium kultiviert. Sechs Tage nach Transfektion wurden die Pellets für den Western blot gesammelt. Dargestellt sind Mittelwert + Standardabweichung aus n = 2

Legende: sFCS = Charcoal-stripped FCS-Medium, FCS = FCS-haltiges RPMI-Medium, RR = Reaktionsreagenz

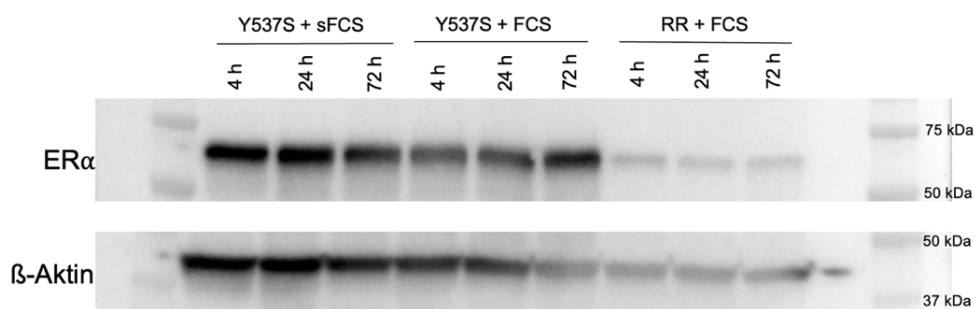


Abb. 16: Western blot: ER α -Expression in pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen und Kultivierung in RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion (n=2)

Legende: Y537S = pCMV3-Y537S transfizierte MCF-7-Zellen, sFCS = Charcoal-stripped FCS-Medium, FCS = FCS-haltiges RPMI-Medium, RR = Reaktionsreagenz, h = Stunde; kDa = Kilodalton

3.7 Sanger-Sequenzierung: MCF-7^{Y537S}-Zellen kultiviert in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium

Mithilfe der Sanger-Sequenzierung wurde überprüft, ob die Y537S-Mutation nach transienter Transfektion transkribiert wurde. Dabei wurde evaluiert, ob der Nachweis von der Mediumzusammensetzung (Charcoal-stripped FCS-Medium, RPMI-Medium) und von der Inkubationszeit (Mediumwechsel nach 4, 24 oder 72 h) abhängig ist.

Hierfür wurden die Zellen wie in 3.6 vorbereitet und die Pellets wurden sechs Tage später gesammelt. Danach wurde die RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und eine PCR zur Amplifikation der Zielsequenz durchgeführt. Die DNA wurde aus dem Gel für die Sanger-Sequenzierung extrahiert. Im *ESR1*-Gen in Exon 8 codiert die WT-cDNA-Sequenz TAT an Position c.1609-1611 für die Aminosäure Tyrosin. Bei der Y537S-Mutation ist das Codon zu TCT verändert, was für Serin codiert.

In allen Proben der Negativkontrolle wurde -wie erwartet- unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels die Basenabfolge TAT der WT-Sequenz identifiziert. In den MCF-7-Zellen, die mit Y537S transfiziert und im RPMI-Medium sowie im Charcoal-stripped FCS-Medium kultiviert wurden, konnte die Basenabfolge der Mutation TCT nachgewiesen werden. Unabhängig vom Zeitpunkt des jeweiligen Mediumwechsels wurde die Mutation in den transfizierten Zellen bestätigt. An der Position der Y537S-Mutation sind klare Einzelpeaks sichtbar (Abb.17).

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, dass die Y537S-Mutation unabhängig von der Zusammensetzung des Mediums in den transfizierten Zellen transkribiert wurde. Die Mutation wurde ohne Hinweise auf gemischte Sequenzen, wie beispielsweise Doppelpeaks, detektiert, sodass die Sequenzen des WT in den transfizierten Zellen nicht erkennbar waren.

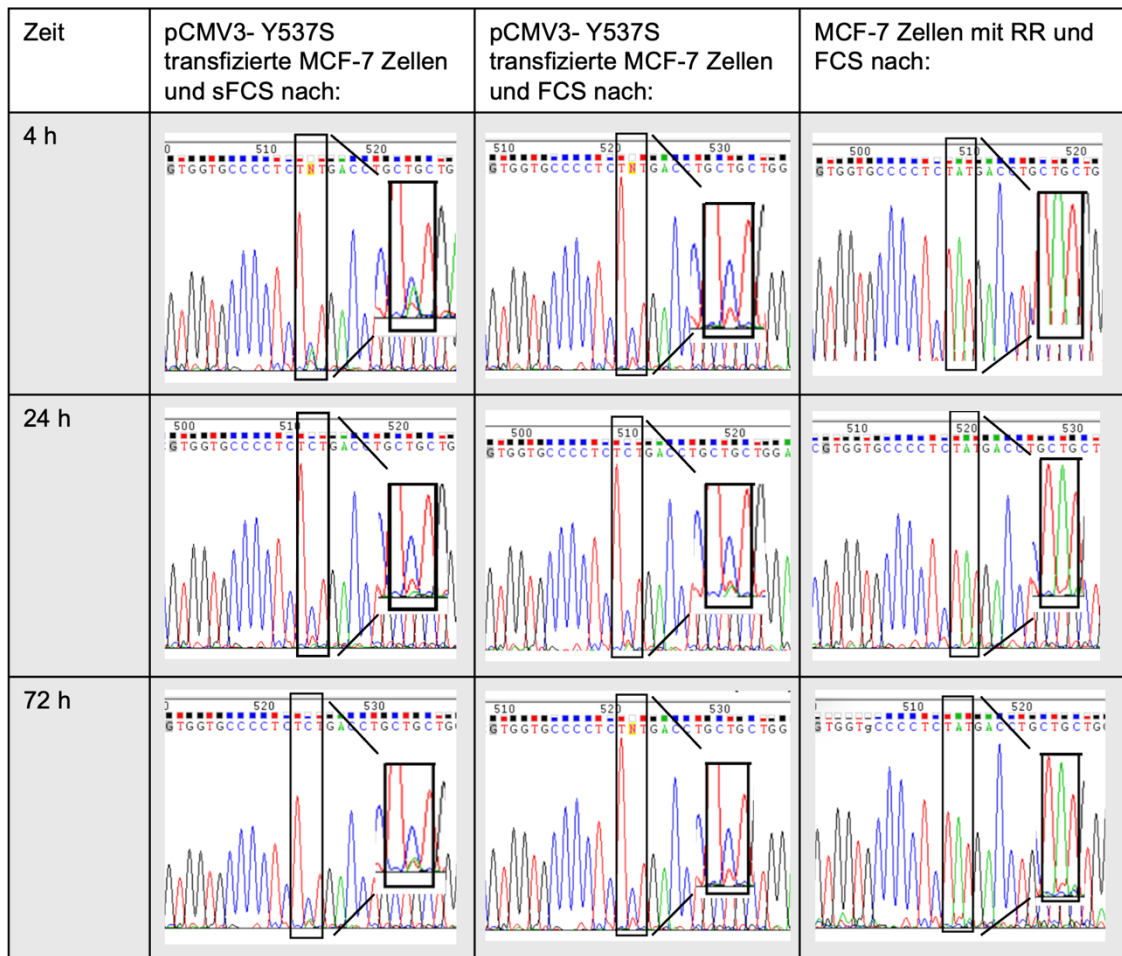


Abb. 17: Sanger-Sequenzierung: von pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen kultiviert im RPMI-Medium und Charcoal-stripped FCS-Medium, sechs Tage nach Transfektion (n=2)

Die MCF-7-Zellen wurden auf einer 6-Well Platte ausgesät und am Folgetag mit pCMV3-Y537S transfiziert. Das Medium wurde 4, 24, und 72 h nach Transfektion gewechselt. In einer Gruppe wurde weiterhin das RPMI-Medium verwendet. Die anderen pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen wurden zu diesen Zeitpunkten auf Charcoal-stripped FCS-Medium gesetzt. Sechs Tage nach Transfektion wurden die Pellets geerntet. Danach wurde die RNA isoliert, die cDNA synthetisiert, zwei PCRs durchgeführt und die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert
Legende: sFCS = Charcoal-stripped FCS-Medium; FCS = FCS-haltiges RPMI-Medium; RR = Reaktionsreagenz, h = Stunde

3.8 qPCR: TFF1-Expression in MCF-7^{Y537S}- und MCF-7^{WT}-Zellen in 10⁻⁹ M Östradiol und unter Östradiolentzug

Die etablierten MCF-7-Klone wurden unter Östradiolentzug sowie in Anwesenheit von 10⁻⁹ M Östradiol kultiviert, um die konstitutive ER α -Aktivierung durch die Y537S-Mutation zu überprüfen. Die Expression des ER α -Zielgens *TFF1* wurde in MCF-7^{WT}- und MCF-7^{Y537S}-Zellen mithilfe der qPCR gemessen. Unsere Hypothese war, dass die Y537S-Mutation aufgrund ihrer ligandenunabhängigen Aktivität auch unter Östradiolentzug eine erhöhte TFF1-Expression aufweist. Hierfür wurden die transient transfizierten Zellen

insgesamt für zwei Tage in 10^{-9} M Östradiol oder unter Östradiolentzug kultiviert. Nach RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qPCR-Analyse zeigte sich, dass sowohl in MCF-7^{WT}- als auch in MCF-7^{Y537S}-Zellen die TFF1-Expression durch die Östradiolgabe signifikant induziert wurde (Abb.18). Die erwartete ligandenunabhängige Aktivität der Y537S-Mutation konnte unter den gewählten Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Für nachfolgende Experimente wurde geschlussfolgert, dass die Methodik optimiert werden sollte, indem die Zellen in 10^{-13} M Östradiol kultiviert werden, um eine mögliche Sensitivität der MCF-7^{Y537S}-Zellen für sehr niedrige Hormonzusätze zu prüfen. Zusätzlich sollte eine Positivkontrolle etabliert werden.

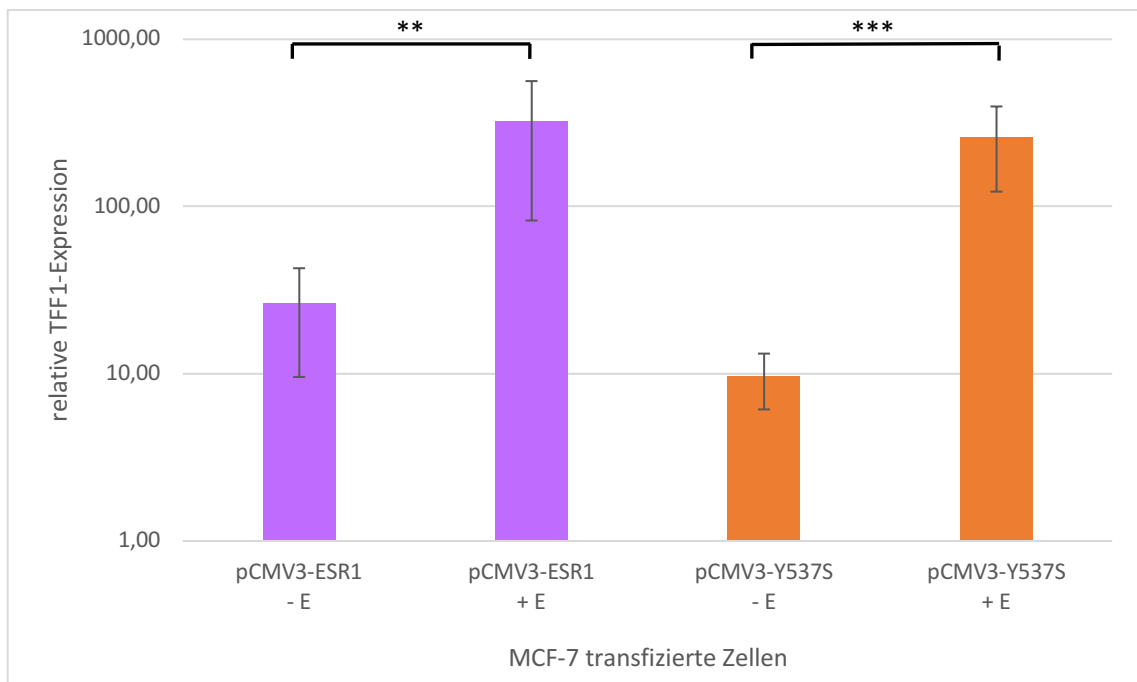


Abb. 18: TFF1-Expression bei pCMV3-ESR1 und pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen unter Östradiol(entzug), sechs Tage nach Transfektion

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3-ESR1 und pCMV3-Y537S transfiziert. Die Zellen wurden auf Charcoal-stripped FCS-Medium gesetzt und danach in 10^{-9} M Östradiol und unter Östradiolentzug für zwei Tage kultiviert. Am sechsten Tag wurden die Pellets gesammelt, um die RNA zu isolieren, die cDNA zu synthetisieren und die qPCR durchzuführen. Aus den Ergebnissen vom TFF1- und PDH-Primer wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet, sodass die Differenz und 2^{Δ} (Differenz) bestimmt werden konnte. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus $n = 3$.

Legende: + E = 10^{-9} M Östradiol, - E = Östradiolentzug; Statistik: Die Analyse wurde mit logarithmierten Werten durchgeführt. Two-Way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

3.9 MTT-Assay: Vergleich der Zellviabilität von MCF-7 und MCF-7-LTED-Zellen

Um für die folgenden Versuche eine Positivkontrolle einzuführen, wurde die Zelllinie MCF-7-LTED ausgewählt. Diese sind durch eine endogene Y537S-Mutation charakterisiert. Aufgrund der mutationsbedingten konstitutiven Aktivierung von ER α wurde ein Wachstumsvorteil unter niedrigen Östradiolkonzentrationen erwartet. Zur Verifizierung dieses Vorteils wurde ein MTT-Assay durchgeführt, bei dem die MCF-7-Zellen mit den MCF-7-LTED-Zellen verglichen wurden. Die Zelllinien wurden insgesamt für zwei Tage in Östradiolkonzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-13} M kultiviert. Am fünften Tag des Experiments wurde die Zellviabilität gemessen. Die Auswertung zeigte, dass die MCF-7-LTED-Zellen einen Wachstumsvorteil in niedrigen Östradiolkonzentrationen von 0 bis $10^{-11,5}$ M aufwiesen. Im Charcoal-stripped FCS und $10^{-12,5}$ M Östradiol wiesen die MCF-7-LTED-Zellen einen signifikanten Vorteil gegenüber den MCF-7-Zellen auf. In hohen Konzentrationen näherten sich die beiden Graphen der Zelllinien an, sodass MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen in hohen Östradiolkonzentrationen gleich stark wuchsen (Abb. 19).

Aus diesem Ergebnis konnte geschlussfolgert werden, dass die MCF-LTED-Zellen östradiolunabhängig wuchsen. Aus diesem Grund wurden die Zellen für die folgenden Experimente als Positivkontrolle eingeführt.

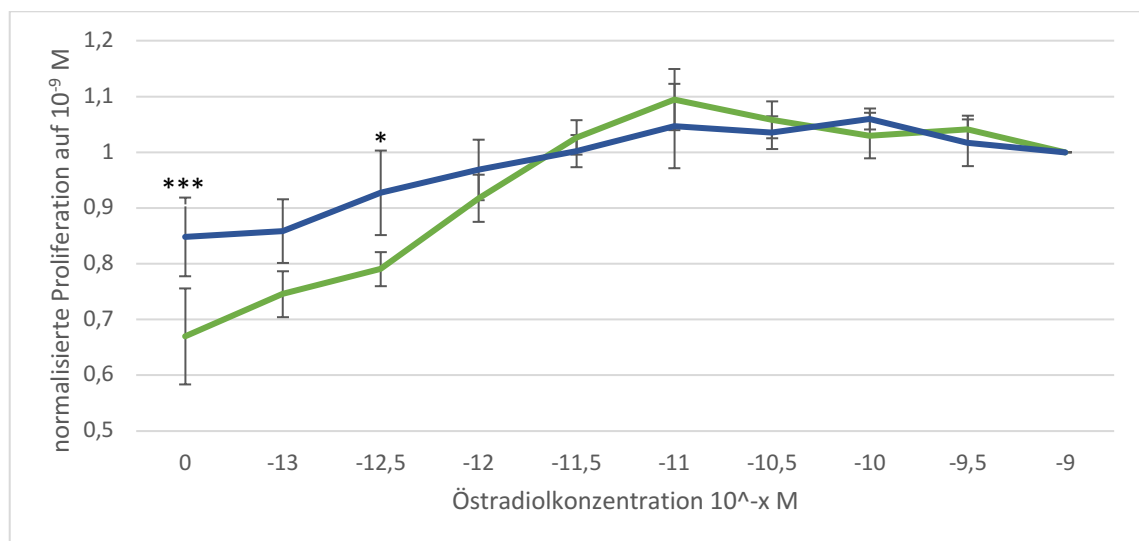


Abb. 19: MTT-Assay: MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen kultiviert in einer Östradiolverdünnungsreihe

Die MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen wurden auf einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden in Östradiolkonzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-13} M kultiviert. Die einzelnen Ergebnisse wurden auf 10^{-9} M Östradiol normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus $n = 3$

Legende: blau = MCF-Zellen, grün = MCF-7-LTED-Zellen, LTED = *longterm estrogen deprivation*
M = molar; Statistik: Two-Way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test *** = $p < 0,001$, * = $p < 0,05$

3.10 qPCR-Optimierung: TFF1-Expression in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol

Um die qPCR von 3.8 zu optimieren, wurden die transfizierten Zellen in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol kultiviert. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Y537S-Mutation geringe Östradiolkonzentrationen benötigt, um konstitutiv aktiv zu sein. pCMV3-*ESR1*, pCMV3 und pCMV3-Y537S Plasmide wurden für dieses Experiment hinzugezogen. Die transfizierten Zellen wurden in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol für zwei Tage kultiviert. Zusätzlich wurden die MCF-7-LTED-Zellen und die MCF-7-Zellen als Positiv- und Negativkontrolle hinzugezogen. Die Ratio zwischen 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol wurde berechnet, um die Ergebnisse auszuwerten. Die MCF-7^{LV}-, MCF-7^{WT}-Zellen und die Negativkontrolle MCF-7-Zellen zeigten bei Reduktion des Östradiolspiegels jeweils einen signifikanten Rückgang der TFF1-Expression. Bei der Y537S-Mutation zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol ($p = 0,14$), was mit der erwarteten konstitutiven Aktivierung des Rezeptors übereinstimmt. Im Vergleich dazu zeigte die Positivkontrolle MCF-7-LTED-Zellen ebenfalls keinen signifikanten Rückgang der TFF1-Expression bei abnehmender Östradiolkonzentration ($p = 0,69$). Wie erwartet sind die MCF-7-LTED-Zellen an die hormonarmen Bedingungen angepasst, sodass die die TFF1-Expression unabhängig von Östradiol reguliert wird (Abb.20). In den MCF-7^{Y537S}-Zellen ließ sich somit eine Tendenz zur östradiolunabhängigen TFF1-Expression beobachten, die deutlich schwächer als in der Positivkontrolle der MCF-7-LTED-Zellen ausfiel. Die endogen und exogen eingeführte ER α -Mutation Y537S könnte daher eine östrogenunabhängige TFF1-Expression begünstigen.

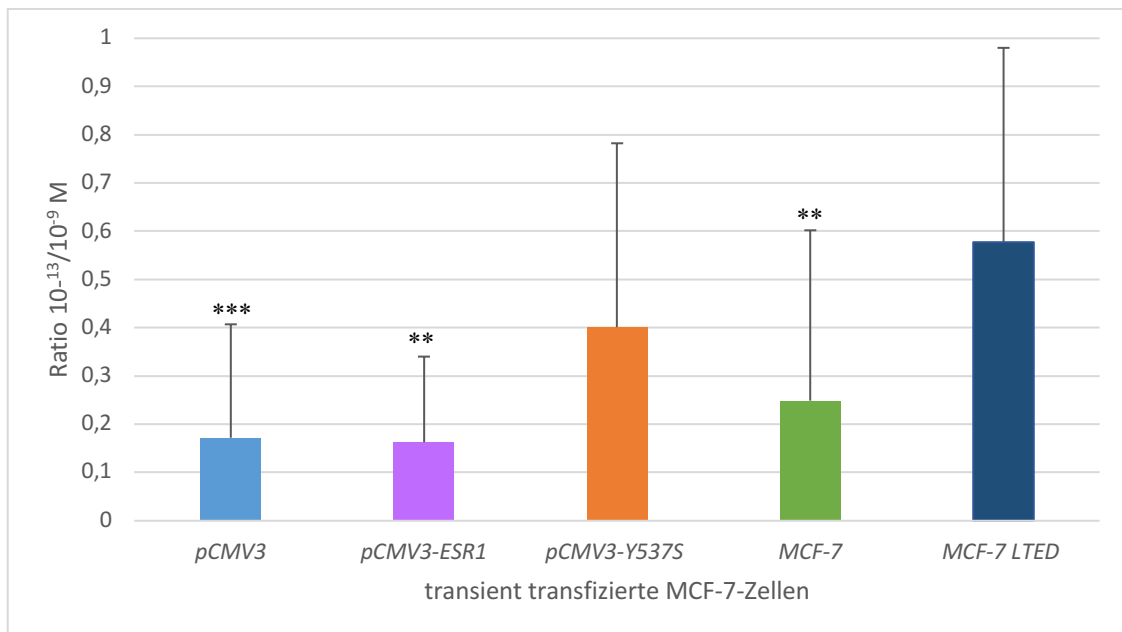


Abb. 20: TFF1-Expression in transient transfizierten MCF-7-Zellen mit Ratio Bildung 10⁻¹³/10⁻⁹ M, sechs Tage nach Transfektion

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3-ESR1 und pCMV3-Y537S transfiziert. Die Zellen wurden auf Charcoal-stripped FCS-Medium gesetzt und danach in 10⁻⁹ M und in 10⁻¹³ M Östradiol für zwei Tage kultiviert. Am sechsten Tag wurden die Pellets gesammelt, um die RNA zu isolieren, die cDNA zu synthetisieren und die qPCR durchzuführen. Aus den Ergebnissen vom TFF1- und PDH-Primer wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus n = 3 bestimmt, sodass die Differenz und 2^{ΔΔ} (Differenz) berechnet werden konnte. Danach wurden die Mittelwerte aller drei Replikate gebildet, sodass die Ratio zwischen 10⁻¹³ und 10⁻⁹ M und die Standardabweichung bestimmt werden konnte.

Legende: MCF-7-LTED = MCF-7 *longterm estrogen deprivation*; Statistik: Die Analyse wurde mit logarithmierten Werten durchgeführt. Two-Way ANOVA mit Sidak's multiple comparisons test *** = p < 0,001, ** = p < 0,01

3.11 Kristallviolett: prozentuale Berechnung der Besiedlungsfläche von transfizierten MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen

Das Ziel war weiterhin, die etablierten MCF-7-Zellklone unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen wie einem hormonfreien Medium und Medien mit unterschiedlichen Östradiolkonzentrationen analog zu untersuchen. Dabei sollte die Besiedlungsfläche als Surrogat für die Zellzahl eingesetzt werden. Die Besiedlungsfläche von pCMV3, pCMV3-ESR1, pCMV3-Y537S transfizierten MCF-7-Zellen, MCF-7-Zellen und MCF-7-LTED-Zellen wurde in den Östradiolkonzentrationen von 0, 10⁻¹³, 10⁻¹¹ und 10⁻⁹ M verglichen. Es wurde vermutet, dass bei niedrigen Östradiolkonzentrationen die Besiedlungsfläche der MCF-7^{Y537S}-Zellen dichter als bei MCF-7^{LV}- und MCF-7^{WT}-Zellen war. Die MCF-7-Zellen wurden wie bei dem MTT-Assay vom Unterkapitel 3.9 transfiziert und kultiviert. Am sechsten Tag wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt. Die Besiedlungsfläche wurde mit ImageJ berechnet. Die Einstellungen können

aus Abb. 21 entnommen werden. Die Auswertung zeigte folgenden Trend: Bei niedrigen Östradiolkonzentrationen war die Besiedlungsfläche der Positivkontrolle MCF-7-LTED deutlich dichter als von den transfizierten MCF-7-Zellen einschließlich den MCF-7^{Y537S}-Zellen und der Negativkontrolle MCF-7. In niedrigen Östradiolkonzentrationen wiesen die transfizierten MCF-7-Zellen, einschließlich MCF-7^{Y537S}, eine geringe Besiedlungsdichte auf, mit steigender Östradiolkonzentration wurde die Besiedlungsfläche dichter. Der Main column effect zwischen MCF-7 und MCF-7-LTED ist signifikant. Es zeigte sich somit ein signifikanter Unterschied der Besiedlungsfläche von MCF-7 und MCF-7-LTED über alle Östradiolkonzentrationen hinweg. Jedoch ließ sich auch ein signifikanter Main column effect zwischen MCF-7-LTED und Y537S berechnen (Abb. 22, Abb. 23). Deswegen konnte aus diesem Ergebnis geschlussfolgert werden, dass mit dieser Methode der Wachstumsvorteil durch die exogen eingeführte Y537S-Mutation in niedrigen Östradiolkonzentrationen nicht gezeigt werden konnte.

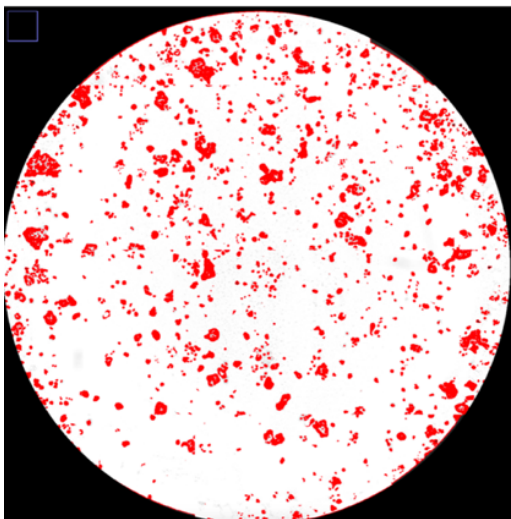


Abb. 21: Beispiel für die Berechnung der Besiedlungsfläche mit ImageJ

ImageJ Einstellungen: *Type 8 bit; Brightness: 50-255; Area: mean gray value, area fraction; Treshold: Red area 70-200*

Die einzelnen Bilder wurden in 8-Bit-Graustufen konvertiert und die Helligkeitswerte auf 50-255 begrenzt, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren. Die Zellbesiedlung wurde mit *mean gray value* und der *area fraction* gemessen. Pixel mit den Grauwerten zwischen 70-200 wurden als positiv gefärbt definiert und visuell als rote Fläche dargestellt. Die *area fraction* diente dabei als Surrogat für die Zellzahl, während der *mean gray value* die Färbeintensität widerspiegelt.

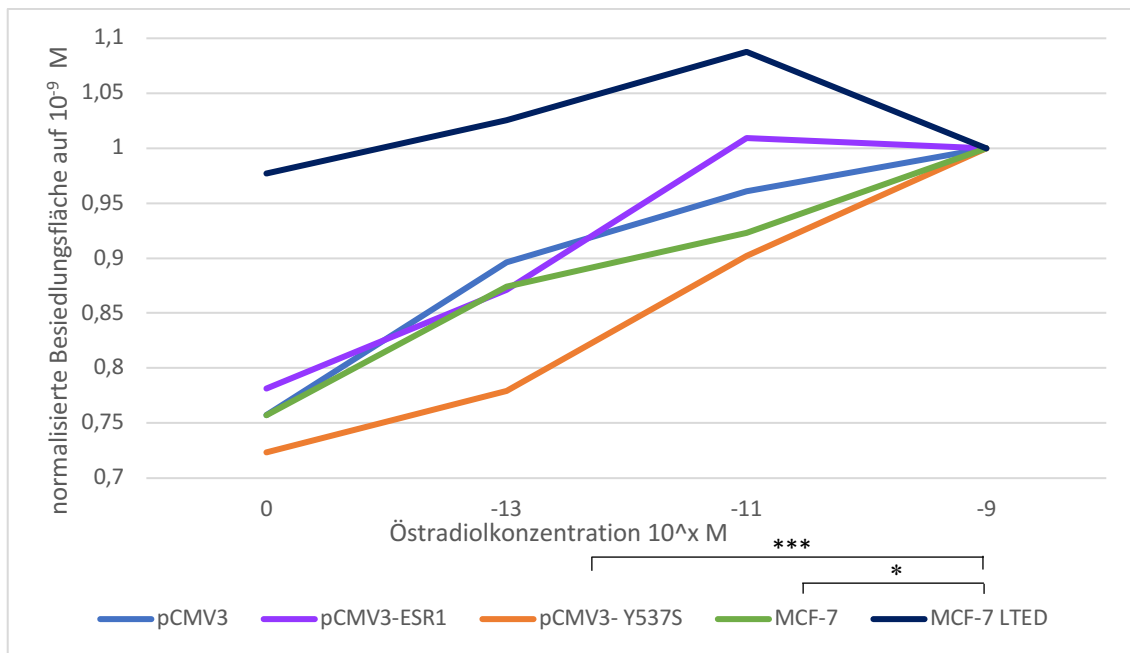


Abb. 22: Kristallviolett Färbung: Vergleich der Besiedlungsfläche in transfizierten MCF-7-Zellen in Östradiolkonzentrationen von 10^{-13} M bis 10^{-9} M (n=3)

Die MCF-7-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pCMV3, pCMV3-*ESR1* und pCMV3-Y537S transfiziert. 4 h später erfolgte ein Mediumwechsel. Die MCF-7-Zellen wurden auf Charcoal-stripped FCS gesetzt und danach mit einer Östradiolverdünnungsreihe von 10^{-13} M bis 10^{-9} M für zwei Tage kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Kristallviolett. Bei der Auswertung wurden die Werte auf eine Östradiolkonzentration von 10^{-9} M normalisiert.

Legende: MCF-7-LTED = *longterm estrogen deprivation*; M = molar; Statistik: Tukey's multiple comparisons test; Main column effect, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$

Die Standardabweichungen der einzelnen Ergebnisse sind im Anhang einsehbar.

Zelllinie	Östradiolkonzentration 10 ⁻ M					Östradiolkonzentration 10 ⁻ M			
	0	-13	-11	-9		0	-13	-11	-9
pCMV3					pCMV3-Y537S				
pCMV3- ESR1					MCF-7				

Zelllinie	Östradiolkonzentration 10 ⁻ M			
	0	-13	-11	-9
MCF-7 LTED				

Abb. 23: Kristallviolett Färbung: mikroskopische Abbildung der Besiedlungsflächen (n=2 mit jeweils 2 Replikaten)

Die MCF-7-Zellen wurden transient mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach 4 h erfolgte der erste Mediumwechsel. Die MCF-7-Zellen wurden auf Charcoal-stripped FCS gesetzt und danach mit einer Östradiolverdünnungsreihe von 10⁻¹³ M bis 10⁻⁹ M für zwei Tage kultiviert. Am Folgetag erfolgte die Färbung mit Kristallviolett. Danach wurden die 96-Well Platten unter dem Mikroskop Axio Observer mit der Festkörperlichtquelle Colibri 7 betrachtet. Nachfolgend wurde die Besiedlungsfläche der Zellen mithilfe von ImageJ berechnet.

Legende: MCF-7-LTED = *long term estrogen deprivation*; M = molar

4 Diskussion

4.1 Vorbemerkung

Unter der endokrinen Langzeittherapie entwickeln die meisten Patientinnen mit HR+ Mammakarzinomen Rezidive mit sekundären Therapieresistenzen. Der häufigste Grund hierfür sind *ESR1*-Mutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung von ER α führen. Studien wie PADA-1 und Serena-6 zeigen bereits deutlich, dass eine frühzeitige Intervention durch eine Therapieumstellung bei Detektion von *ESR1*-Mutationen mit einem höheren PFS einhergeht. Hierfür werden die CTCs oder die zirkulierende TumordNA als Flüssigbiopsien aus dem Blut der Patientinnen auf *ESR1*-Mutationen analysiert. Für die Gewinnung sind keine invasiven, chirurgischen Eingriffe nötig, sodass die Analysen repetitiv und mit einer geringen Belastung des Patientenwohls durchgeführt werden. Neben den bereits bekannten und am häufigsten detektierten *ESR1*-Mutationen Y537S und D538G, wurden in der Vorarbeit von Franken et al. 2020 bislang unbekannte *ESR1*-Mutationen mithilfe der *ESR1*-Sequenzierung in CTCs nach endokriner Therapie detektiert. Diese wurden zuvor noch nicht mit dem Mammakarzinom assoziiert. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, ein Modell zur funktionalen Testung dieser neuartigen Mutationen zu entwickeln. Zur Positivkontrolle wurden MCF-7-LTED-Zellen herangezogen, die über mehrere Monate unter Östradiolentzug kultiviert und dabei ein Klon mit endogener Y537S-Mutation selektiert wurde (Hirao-Suzuki et al., 2020; Martin et al., 2017). Zur Etablierung des Testsystems wurde das *ESR1*-Gen mithilfe des pCMV3 Plasmids exogen in MCF-7-Zellen transient transfiziert.

Unsere Daten zeigen, dass nach Transfektion mit *ESR1*, exogenes ER α innerhalb der ersten Woche überexprimiert wurde. Um den Anteil der ER α -überexprimierenden MCF-7-Zellen in der ersten Woche nach Transfektion zu quantifizieren, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Bereits sieben und zehn Tage nach Transfektion konnte keine ER α -Überexpression gemessen werden. Die transfizierten Zellen wuchsen kaum noch adhärent. Daher wurde geschlossen, dass die Transfektionsbedingungen optimiert werden mussten. Das Transfektionsprotokoll wurde optimiert, indem ein Mediumwechsel 4 h nach Transfektion eingeführt wurde. Unter dem Mikroskop konnte eine erhöhte Zellviabilität beobachtet werden. Der Western blot und die Durchflusszytometrie bestätigten, dass der frühzeitige Mediumwechsel keinen negativen Einfluss auf die Proteinexpression hatte. Ein wichtiger Schritt war die Hinzunahme der MCF-7-LTED-Zellen als Positivkontrolle für den Effekt der Y537S-Mutation. Mit der

MCF-7-LTED-Zelllinie konnten wir den MTT-Assay zur Wachstumsmessung, die qPCR für das starke ER α -abhängige Zielgen *TFF1* und das Zellwachstum unter Berechnung der Besiedlungsfläche via Kristallviolett einstellen.

Obwohl die Transfektion und die Nachweissysteme zu funktionieren scheinen - die erfolgreiche Transfektion des Überexpressionskonstruktes pCMV3-Y537S konnte im Western blot und der Sanger-Sequenzierung bestätigt werden – ließ sich für die bekannte aktivierende Mutante nach Transfektion keine messbare konstitutive Überexpression von ER α nachweisen. Daher wachsen diese Zellen auch nicht unabhängig vom ER-Liganden Östrogen. Ebenso war dessen Auswirkung auf eine ligandenunabhängige Expression von TFF1 in der qPCR im besten Fall auch nur tendenziell nachweisbar.

4.2 Diskussion einzelner Untersuchungsaspekte

4.2.1 ER α -Expression in transfizierten MCF-7-Zellen: Western blot vs. Durchflusszytometrie

Im Western blot war eine signifikante ER α -Überexpression 4, 24 und 72 h nach transienter Transfektion mit pCMV3-*ESR1* nachweisbar. Dies konnte mittels Durchflusszytometrie drei Tage nach Transfektion bestätigt werden. Insgesamt erschien die Expressionsstärke bei einem Großteil der transfizierten MCF-7^{WT}-Zellen im Vergleich zur MCF-7^{LV}-Kontrolle gesteigert zu sein. Zudem gab es eine kleine Zellpopulation mit extrem gesteigerter ER α -Expression. Der Signalunterschied fiel im Western blot deutlich stärker aus als in der Durchflusszytometrie, weil im Western blot die Gesamtproteinmenge aus Proteinlysaten von ER α erfasst wurden. Mithilfe der Durchflusszytometrie wird hingegen die Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle gemessen und analysiert. Somit werden wahrscheinlich wenige MCF-7-Zellen ER α stark über exprimieren, sodass ein hohes Gesamtprotein im Western blot bei einer geringen Signalverschiebung in der Durchflusszytometrie gemessen wurde.

4.2.2 Nachweis der Y537S-Mutation in transfizierten MCF-7-Zellen mittels cDNA-Synthese und Sanger-Sequenzierung

Des Weiteren wurden die MCF-7-Zellen mit pCMV3-Y537S transfiziert und das Medium wurde entweder mit RPMI-Medium oder Charcoal-stripped FCS-Medium nach 4, 24 und 72 h gewechselt. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgten PCRs mit Gel-Extraktion für die Sanger-Sequenzierung. Mithilfe der Sequenzierung wurden in den

MCF-7^{Y537S}-Zellen unabhängig vom Zeitpunkt des Mediumwechsels und der Mediumzusammensetzung die Basenabfolge der Mutation TCT nachgewiesen.

Für die cDNA-Analyse gelten dieselben Limitationen wie beim Western blot. Ein Mutationsnachweis in der cDNA weist nicht zwangsläufig darauf hin, dass alle Zellen der Probe diese Mutation exprimieren. Eine kleine Zellpopulation mit hoher ektopischer ER α -Expression trägt aufgrund der hohen Transkriptmenge erheblich zur cDNA-Menge bei. Demgegenüber kann eine größere Zellpopulation mit niedriger ER α -Expression nur geringe RNA-Mengen liefern, was ihren Einfluss auf die Gesamtheit der cDNA und somit auf die *ESRI*-Analyse reduziert.

4.2.3 Kristallviolett: prozentuale Berechnung der Besiedlungsfläche mit ImageJ

Unterschiedlich transfizierte MCF-7-Zellen wurden in einer Östradiolverdünnungsreihe kultiviert, um mithilfe der Kristallviolettfärbung und ImageJ die Besiedlungsfläche zu berechnen. Dabei sollte die Besiedlungsfläche als Surrogat für die Zellzahl fungieren. Mithilfe der Färbung konnte bei der Positivkontrolle MCF-7-LTED-Zellen ein starkes östradiolunabhängiges Wachstum nachgewiesen werden. Bei MCF-7, MCF-7^{WT} und MCF-7^{LV}-Zellen war das Wachstum wie erwartet in niedrigen Östradiolkonzentrationen schwach. Ebenfalls wurde erwartet, dass die MCF-7^{Y537S}-Zellen aufgrund der eingeführten *ESRI*-Mutation eine erhöhte Besiedlungsfläche in niedrigen Östradiolkonzentrationen im Vergleich zu MCF-7^{WT}- oder MCF-7^{LV}-Zellen aufwiesen. Jedoch konnte kein verstärktes Wachstum nachgewiesen werden.

Die Kristallviolettfärbung ist eine Methode, mit der schnell und kostengünstig die Auswirkungen von Chemotherapeutika oder Chemikalien, die einen Einfluss auf das Zellwachstum oder Überleben haben, gemessen werden (Sanjai et al., 2024). Mit Kristallviolett werden die Proteine oder die DNA von anhaftenden Zellen auf der Zellkulturplatte angefärbt. Beim Zelltod lösen sich die Zellen von der Platte ab und werden nicht mit angefärbt. Somit wird der Zelltod indirekt quantifiziert und Aussagen über die Proliferation können getroffen werden (Feoktistova et al., 2016).

Die Auswertung erfolgte manuell und gestaltete sich als sehr zeitaufwendig. Ebenfalls wurden folgende Herausforderungen und die Gefahr folgender Artefaktmessungen festgestellt, die bei der Beurteilung berücksichtigt werden müssen. In den Bereichen mit vielen, dicht besiedelten und daher kleinen Zellen, wurde die Zellzahl unterschätzt. In locker besiedelten Flächen repräsentieren sich die Zellen größer, sodass die Zellzahl überschätzt werden könnte. *Thresholding*-Artefakte führten dazu, dass ein niedriger

Schwellenwert zu Hintergrundpixel führt, die fälschlicherweise als Zellen identifiziert werden können. Zu hohe Schwellenwerte führen dazu, dass Zellen nicht erkannt oder nicht vollständig in die Berechnung der Besiedlungsfläche einbezogen werden. Durch zum Teil überlappende Zellmembranen kann das Programm die Zellgrenzen nicht sicher differenzieren, sodass zu große Flächen berechnet werden.

Ravikumar et al. beleuchtete kritisch die quantitative zellmorphologische Bewertung mittels ImageJ. Es wurde dokumentiert, dass hier die Kerngröße fehlerhaft eingeschätzt wurde. Bei geringer Kerndichte wurden die Grenzen genau differenziert. Je höher die Zelldichte war, desto ungenauer wurde die Darstellung der Kerngröße. Obwohl die Schwellenwertalgorithmen optimiert wurden, konnten die genauen Grenzen schwer detektiert werden. Die Zellgrenzen wurden nicht optimal repräsentiert. Einzelne Zellen wurden meistens überschätzt, wohingegen ungelöste Zellen unterschätzt wurden (Ravikumar et al., 2021). Die durch ImageJ berechnete Besiedlungsfläche kann somit nur näherungsweise als Surrogat für die Zellzahl eingesetzt werden.

Um diese Herausforderungen zu umgehen, könnte die Kristallviolett färbung mithilfe der Spektrophotometrie ausgewertet werden. Mithilfe der Kristallviolett färbung wurden zum Beispiel die *in vitro* Effekte eines neuartigen Östradiol Analogons auf die Zellproliferation und Morphologie von humanen, epithelialen Gebärmutterhalskarzinomen gemessen. Boyed et al. färbte die Zellen mit Kristallviolett an, löste den absorbierten Farbstoff mit Triton x-100 auf, sodass folglich die Absorptionsfähigkeit mithilfe eines Universal Mikroplatten Reader gemessen werden konnte. Hiermit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang nach Exposition mit dem Östradiol Analogon in den menschlichen Gebärmutterhalskrebszellen nachgewiesen werden (Boyd et al., 2018).

4.2.4 Ektopische *ESR1*-Mutation: transiente Transfektion mithilfe pCMV3 Plasmid

Um das *ESR1*-Gen oder die Y537S-Mutation exogen in die MCF-7-Zellen einzuschleusen, wurden die Zellen transient mithilfe des Plasmids pCMV3 transfiziert. Jedoch sind eine Vielzahl von Nachteilen bekannt, die zu einer Reduktion der Transfektionseffizienz führen und dadurch den fehlenden Einfluss der Y537S-Mutation in den durchgeführten Experimenten erklären. Diese werden im Folgenden diskutiert: Ektopisch eingeführte Gene können in das Wirtsgenom unspezifisch integriert werden und zu einer genomischen Instabilität führen (Stepanenko & Heng, 2017). Insgesamt wird

ein fremder Bestandteil in die Zelle eingeschleust, sodass die Zelle als Selbstschutz in Apoptose gehen kann. Es entwickelt sich eine heterogene Zellpopulation, da sich die neu eingeführten Gene nur in einem Subpool der Zellen befinden.

Die transiente Transfektion ist zeitlich begrenzt, da mit laufender Zellteilung das eingeschleuste DNA-Fragment verloren geht. Die transfizierte DNA befindet sich temporär im Zellkern, sodass die Genaktivität innerhalb der ersten 24 h, optimal nach 48-96 h, beeinflusst wird. (Sheikh et al., 2017). Daher kann nicht von einer andauernden, konstitutiven Genexpression ausgegangen werden (Chong et al., 2021), weshalb die Experimente in einem kurzen Zeitfenster durchgeführt werden müssen, um die Proteinexpression zu beurteilen. In unseren Western blot Experimenten wurde gezeigt, dass die ER α -Überexpression innerhalb der ersten Woche nach Transfektion messbar war, weshalb die Experimente bis zu sechs Tage andauerten. Jedoch konnte der erwartete Vorteil der Y537S-Mutation in den durchgeführten Experimenten nicht dargestellt werden, weshalb kürzere Zeiträume bis zu 96 h nach Transfektion angestrebt werden sollten. Dies wird in Kapitel 4.3 tiefergehend diskutiert.

Um eine maximale Transfektionseffizienz zu erreichen, müssen die folgenden Bedingungen eingehalten werden: Die Passagenanzahl sollte unter 50 liegen. Je höher die Passagenzahl beim Zellsplitting, desto weniger Zellen lassen sich transfizieren. Eine Zellkonfluenz von 80% sollte vor Transfektion erreicht sein, damit eine optimale Proliferation gewährleistet ist. Ist die Zelldichte zu gering, so wird der Zellkontakt oder die Übertragung von parakrinen Signalen, also die Sekretion von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen durch benachbarte Zellen, eingeschränkt. Wenn die Zelldichte zu hoch ist, ist die Aufnahme von Nukleinsäuren erschwert und es kommt zu einer Kontakthemmung (Heng et al., 2011; Sheikh et al., 2017). Während der gesamten Laborarbeit wurden die Rahmenbedingungen für eine optimale transiente Transfektion eingehalten.

Die transiente Transfektion wurde mit dem Plasmid pCMV3 durchgeführt. Plasmide können nur in sich teilende Zellen aufgenommen werden, da Plasmide über Endosome in die Zelle geschleust werden, ins Zytoplasma gelangen und in den Kern eindringen. Im Zytoplasma von eukaryotischen Zellen kann Plasmid-DNA eine zelluläre Stress- und Entzündungsreaktion auslösen, da normalerweise keine freie DNA im Zytoplasma aufzufinden ist. Wenn die DNA ins endosomale Kompartiment eintritt, kann es zu einer Aktivierung von Toll-like Rezeptoren führen. Folglich werden in der intrazellulären Signalkaskade der Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) und mitogen aktivierende

Proteinkinasewege aktiviert (Andreev et al., 2016). Nicht virale Vektoren zeichnen sich generell mit einer geringen Transfektionseffizienz aus, indem die Plasmid-DNA häufig in Lysosomen eingeschleust und abgebaut wird (Lechardeur & Lukacs, 2002).

Ein weiterer Nachteil der Plasmid-DNA Transfektion ist, dass aberrante mRNA-Isoformen aus der Expressionskassette entstehen können. Gründe hierfür sind kryptisches oder alternatives Spleißen und alternative Promotoren in der 5'UTR. Im Reporter gen selbst, im Vektor Rückgrat oder auch im eingefügten DNA-Fragment können kryptische Promotoren vorhanden sein. Aufgrund der kryptischen Promotoren und Spleißstellen können Reporter mRNAs entstehen, die ein unerwartetes 5'UTR besitzen. Somit können ursprünglich vorhandene regulatorische Eigenschaften verloren oder neue Eigenschaften gewonnen werden. Bereits kleine Mengen dieser fehlerhaften Transkripte können die Ergebnisse erheblich beeinflussen, obwohl die Transkripte noch nicht einmal im Northern Blot nachgewiesen werden können (Andreev et al., 2016).

Da zahlreiche Nachteile der Plasmid-Transfektion nicht beeinflusst werden können, ist die Aussagekraft zur ER α -Expression nach Einführung der Y537S-Mutation nur begrenzt möglich. Obwohl Kontrollzelllinien mit LV mitgeführt wurden, zeigen Stepaneko et al., dass die alleinige Anwendung des Transfektionsprotokolls zu Stressreaktionen und zur genomischen Instabilität führt. Die Annahme, dass transfizierte LV zytogenetisch und phänotypisch unverändert bleiben, ist nicht universell gültig (Stepanenko & Heng, 2017). Vor diesem Hintergrund sollten weitere Transfektionsmethoden oder auch kürzere Untersuchungszeiträume in Betracht gezogen werden, um den Einfluss der *ESR1*-Mutationen adäquat testen zu können.

4.3 Diskussion weiterer Transfektionsmethoden und funktionaler Testungen

4.3.1 Optimierung der transienten Transfektion und Etablierung des ERE-Luciferase-Assays

Trotz transienter Transfektion mit Plasmiden, die die bereits bekannte aktivierende Y537S-Mutation enthalten, ist kein östradiolunabhängiges Wachstum mit der Kristallviolett färbung nachweisbar. Ebenfalls konnte in der qPCR ausschließlich ein Trend für eine östradiolunabhängige TFF1-Expression illustriert werden. Die Zellen sind gegenüber der Depletion des Liganden Östrogen nicht unabhängig. Die Experimentendauer wurde durch den Western blot in 3.1 festgelegt. Hier konnte eine ER α -Überexpression innerhalb der ersten Woche nach Transfektion gemessen werden. Jedoch wurde bereits diskutiert, dass die Genaktivität optimal nach transienter

Transfektion innerhalb von 48-96 h beeinflusst wird. Daher ist es möglich, dass die Resistenz gegenüber der Östradiol-Depletion aufgrund der Versuchsdauer von fünf bis sechs Tagen nicht erfasst werden konnte. Um die Intervalle zu verkürzen und somit den Einfluss der Y537S-Mutation darzustellen, sollte in Zukunft ein neuer Readout eingeführt werden. Die Methoden und die Readout Testungen wurden in Tabelle 15 gegenübergestellt.

Mithilfe des ERE-Luciferase-Assays beschrieb Barua et al. bereits den Vorteil der Mutation durch eine erhöhte ERE-Transporteraktivität bei allen mutierten *ESR1*-Konstrukten im Vergleich zum WT. Die MCF-7-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden transient transfiziert: pcDNA-HA-ER WT, pcDNA-HA-ER Y537S, pcDNA-HA-ER D538G, ERE-Luciferase-Reporterplasmid und β -Galactosidase-Plasmid. Als Transfektionsreagenz wurde Turbofect von Thermo Fisher verwendet. Bereits 24 h nach Transfektion wurde die Glühwürmchen-Luciferase-Aktivität mit dem Promega-Luciferase-Testsystem gemessen (Barua et al., 2020). Im Vergleich zu den selbst durchgeführten Experimenten konnte die Auswertung bereits 24 h nach Transfektion erfolgen. Ebenfalls wurde als Transfektionsreagenz Turbofect verwendet. Turbofect zeichnet sich mit einer höheren Zellviabilität durch geringe Toxizität aus. Somit könnte zusätzlich in Betracht gezogen werden, die Transfektionsreagenzien für eine optimale Effizienz anzupassen.

Um die Wirkung von Fulvestrant bei Patientinnen mit aktivierenden *ESR1*-Mutationen zu untersuchen, verwendeten Kingston et al. eine transiente Transfektion von MCF-7-Zellen mit pcDNA3.1+/C-DYK-Plasmiden mit oder ohne *ESR1*-Mutationen (Y537S/C) sowie einen ERE-Luciferase-Assay. Nach Transfektion mit FuGENE, Östrogenrezeptorkonstrukten, Östrogenantwort-Elementen gekoppelt mit der Glühwürmchen-Luciferase und der Renilla-Luciferase wurden die Zellen für mit Östradiol und Fulvestrant behandelt. Bereits nach 48 h zeigte der ERE-Luciferase Assay, dass Y537S eine höhere Resistenz gegenüber Fulvestrant verursachte als Y537C. Die *in vitro* Ergebnisse standen im Einklang mit den klinischen Daten, da das PFS unter Fulvestrant-Therapie bei Y537C-Mutationen 3,1-fach höher lag als bei Y537S-Mutationen (Kingston et al., 2024). Kingston et al. säte die MCF-7-Zellen für die transiente Transfektion auch auf einer 6-Well Platte aus. Dabei wurden 250.000 Zellen pro Well ausgezählt. Im Vergleich zu den eigenen Experimenten wurde somit nur die Hälfte der Zellzahl pro Well ausgesät. Da die Transfektionseffizienz auch von der Zelldichte abhängig ist (Sheikh et al., 2017), könnten 550.000 Zellen pro Well in den

eigenen Versuchen bereits zu hoch gewesen sein. Daher besteht die Möglichkeit, die Zellzahl in Zukunft zu reduzieren.

Darüber hinaus wurde der ERE-Luciferase-Assay nicht nur beim Mammakarzinom erfolgreich angewendet. Prämenopausale Frauen zeichnen sich mit einem erhöhten Risiko für papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome aus. Aufgrund dessen sollte die Rolle von Östrogenen in der Krebsentstehung sowie die Wirkung von SERMs und die ER α /ER β -Expression in drei Schilddrüsenzelllinien untersucht werden. Die Transfektion für den ERE-Luciferase-Assay erfolgte unter anderem mit FuGENE 6 und pcDNA3.1 Plasmide für ER α / β . 18 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Östradiol, Fulvestrant, 4-Hydroxytamoxifen und Raloxifen behandelt. Nach 30 h wurde die Messung durchgeführt. Die Ergebnisse präsentierten keinen Einfluss von Östradiol auf die Luciferase-Aktivität in den Schilddrüsenkarzinomzellen. Hingegen wurde eine 2-fache Erhöhung in MCF-7-Zellen gemessen. In MCF-7-Zellen hemmten Fulvestrant und 4-Hydroxytamoxifen die östrogeninduzierte Aktivität (Kumar et al., 2010).

Des Weiteren bleibt zu diskutieren, ob in den durchgeführten Experimenten bereits die optimale Dosierung des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 3000 verwendet wurde. Mahmoudian et al. untersuchte die Transfektionseffizienz und die Zellsterblichkeit in humanen Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen mithilfe der GFP-Expression unter der Verwendung von Lipofectamine 3000. Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektionseffizienz mit höherer Plasmid-DNA Konzentration und geringer Menge von Lipofectamine 3000 anstieg. Es wurde eine Transfektionseffizienz von 95 % bei 1,5 μ g Plasmid-DNA und 1 μ l Lipofectamine 3000 erreicht. Jedoch wurde ein Zelltod von 58 % der Zellen gemessen, weshalb Lipofectamine aufgrund der erhöhten Zellsterblichkeit vermutlich nicht geeignet für die Transfektion von Ösophaguskarzinomzellen ist (Mahmoudian et al., 2020). In Anbetracht dessen könnte die Dosis von Lipofectamine oder der Plasmid-DNA experimentell angepasst werden, um zu untersuchen, ob bereits die optimalen Transfektionsbedingungen in den durchgeführten Experimenten angewendet wurden.

Zusammenfassend sollte in Zukunft der ERE-Luciferase-Assay als neue Readout-Methode eingesetzt werden, da hiermit bereits erfolgreich die Vorteile der Y537S-Mutation nachgewiesen wurden. Der Assay ermöglicht deutlich kürzere Untersuchungszeiträume, was für die Analyse transient eingeschleuster Mutationen entscheidend ist. Die Literaturvergleiche legen nahe, dass die Transfektionsbedingungen

weiterhin verbesserungsfähig sind und den fehlenden Nachweis der Y537S-Mutation begünstigt haben könnten. Zur Optimierung könnten beispielsweise die Zellzahl der ausgesäten MCF-7-Zellen reduziert, die Dosis von Lipofectamine 3000 angepasst oder alternative Reagenzien wie Turbofect oder FuGene eingesetzt werden.

In den selbst durchgeführten Proliferationsassays konnte die konstitutive Aktivierung von ER α mithilfe der Positivkontrolle MCF-7-LTED bewiesen werden. Die MCF-7-LTED-Zellen wurden langfristig unter Östradiolentzug kultiviert. Es konnte ein Klon selektiert werden, der ein östradiolunabhängiges Wachstum aufgrund der konstitutiven Aktivierung von ER α zeigte. Die konstitutive Aktivierung wird durch die stabil exprimierte *ESR1*-Mutation Y537S erreicht (Hirao-Suzuki et al., 2020; Martin et al., 2017).

Der Unterschied zur transienten Transfektion besteht darin, dass die Y537S-Mutation in den MCF-7-LTED-Zellen stabil und dauerhaft exprimiert wird. Um exogene Mutationen des *ESR1*-Gens in das Genom dauerhaft zu integrieren, muss eine stabile Transfektion mit lentiviralen Vektoren oder mithilfe des CRISPR-Cas9-System erfolgen. Um die stabil integrierten Zellen zu filtern, werden häufig Selektionsmarker wie Antibiotikaresistenzen eingesetzt (Sheikh et al., 2017).

4.3.2 Stabile Integration: lentivirale Transfektion und CRISPR-Cas9-System

Die lentivirale Transfektion hat sich als etablierte Methode zur stabilen Integration von Mutationen in MCF-7-Zellen bewährt. Zum Beispiel untersuchte bereits Taya et al., dass *ESR1*-Mutationen wie Y537S und D538G zu einer erhöhten Koloniebildung führen. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit den *ESR1*-Mutationen zu HEK-Zellen hinzugegeben, das konditionierte Medium auf MCF-7-Zellen übertragen und die stabil transfizierten Zellen wurden anschließend mit Puromycin selektiert (Zinger et al., 2019). Funktionelle Analysen mittels Kristallviolett färbung bestätigten den proliferativen Vorteil von mutierten MCF-7-Zellen im Vergleich zum WT nach zweiwöchiger Behandlung mit Paclitaxel und Doxorubicin (Taya et al., 2025).

Dennoch weist die lentivirale Integration methodische Einschränkungen auf, die berücksichtigt werden müssen. Die virale DNA inseriert meist zufällig im Wirtsgenom, wodurch beispielsweise Tumorsuppressorgene oder Onkogene unbeabsichtigt inaktiviert oder aktiviert werden können. Zudem ist die Effizienz der HDR gering, was eine gezielte Gen-Editierung erschwert und die Kontrolle über die resultierenden Mutationen limitiert (Li et al., 2017; Schlimgen et al., 2016). Diese Faktoren können nicht nur unerwünschte

genetische Effekte verursachen, sondern auch die systematische Untersuchung neuartiger Mutationen verhindern.

Neben der lentiviralen Integration stellt das CRISPR-Cas9-System eine weltweit etablierte Methode dar, um DNA gezielt zu verändern und genetische Modifikationen präzise und stabil in MCF-7-Zellen zu integrieren. Mit CRISPR-Cas9 haben bereits Harrod et al. den Einfluss von *ESR1*-Mutationen auf die endokrine Resistenz bestimmt, indem die *ESR1*-Mutationen mithilfe der HDR erzeugt und die Y537S-Mutation in MCF-7-luc-Zellen integriert wurden. Das *ESR1*-Exon-8-Plasmid, das CRISPR-Plasmid und das hCas9-Expressionsplasmid wurden mithilfe des Amaxa Type II Nucleofactors in die Zelle eingefügt und der *Knock in* wurde mit einem PCR-Screening bestätigt. Es wurden insgesamt vier CRISPR-Sequenzen verwendet. Mithilfe der Sanger-Sequenzierung 96 h nach Transfektion wurde erkannt, dass die CRISPR058819 am effizientesten war. Funktionelle Analysen mit dem Sulforhodamin B (SRB) Assay zeigten ein Y537S vermitteltes, östradiolunabhängiges Wachstum sowie eine Antiöstrogen-Resistenz nach einer zwölf-tägigen Behandlung mit Östradiol, Antiöstrogen oder Ethanol (Harrod et al., 2017).

CRISPR-Cas9 sowie der SRB-Assay sind bereits in weiteren Fragestellungen etabliert, indem der Einfluss der neuartigen Mutation F404 auf die Antiöstrogentherapie quantifiziert wurde. Die F404-Mutation tritt in Kombination mit aktivierenden *ESR1*-Mutationen unter der Fulvestrant-Therapie auf. Die *ESR1*-Mutationen wurden erneut mit CRISPR-Cas9 und der HDR erzeugt. Die funktionellen Analysen mittels SRB-Assay zeigten, dass D538G- sowie D538G+F404L-Mutationen nach 14-tägiger Kultivierung sowohl in Anwesenheit von Östradiol als auch unter Östradiolentzug proliferierten, was auf eine Fulvestrant-Resistenz hinweist (Kingston et al., 2024).

Durch die stabile Integration der *ESR1*-Mutation Y537S mit CRISPR-Cas9 oder lentiviraler Integration wurde erreicht, dass die resultierenden Zellen gegenüber der Depletion des ER-Liganden Östrogen resistent sind. Die stabile Integration ist somit essenziell, um Langzeiteffekte auf Zellproliferation und Medikamentenresistenz zuverlässig zu untersuchen. Dabei bietet CRISPR-Cas9 den Vorteil einer präzisen Gen-Editierung. Um die Effekte der neuartigen Mutationen erfassen zu können, sollten die etablierten Proliferationsassays wie die qPCR oder auch die Bestimmung der Besiedlungsfläche durch Kristallviolett-Färbung mit stabil integrierten Zellen wiederholt werden. Zusätzlich könnte als neue Readout-Methode der SRB-Assay in Betracht gezogen werden. Die Kombination aus stabiler Integration und funktionellen Tests erlaubt

es, Limitationen der transienten Transfektion, wie kurze Beobachtungszeiträume, zu überwinden und langfristige, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Tabelle 15: Gegenüberstellung weiterer Transfektionsbedingungen und funktionaler Testungen

Ziel	Methode	Readout
Transiente Transfektion		
Bestimmung des Einflusses von der An- und Abwesenheit von XBP1 (Transkriptionsfaktor) auf somatische <i>ESR1</i> -Mutationen (Barua et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsprotokoll für ERE-Luciferase-Assay: - 24 h nach Aussäen: Transfektion mit pcDNA-HA-ER WT, pcDNA-HA-ER Y537S), pcDNA-HA-ER D538G, ERE-Luciferase-Reporterplasmid, β-Galactosidase Plasmid - Transfektionsreagenz: Turbofect (Thermo Fisher) - 24 h nach Transfektion: Sammeln von Zelllysaten für Luciferase-Reporterassay 	<ul style="list-style-type: none"> - Messung der Glühwürmchen-Luciferase (ERE-Aktivität) und die Renilla-Luciferase - Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
Untersuchung der Wirkung von Fulvestrant bei Patientinnen mit aktivierenden <i>ESR1</i> -Mutationen in ctDNA (Kingston et al., 2024)	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsprotokoll für ERE-Luciferase-Assay: - pcDNA3.1+/C-DYK-Plasmide mit und ohne Mutationen von <i>ESR1</i> (Y537S, Y537N), Östrogenrezeptorkonstrukten, ein Östrogenantwort-Element gekoppelt mit Glühwürmchen-Luciferase, Renilla-Luciferase - Transfektionsreagenz: FuGENE - 24 h nach Transfektion: Behandlung mit 0.01, 0.1 und 1.0 μmol/l Fulvestrant mit 1 nmol/L Östradiol für weitere 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> - Messung der Glühwürmchen-Luciferase (ERE-Aktivität) und die Renilla-Luciferase - Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
Untersuchung, inwieweit Mutationen eine östrogenunabhängige Aktivierung des ER α -Rezeptors bewirken und die Empfindlichkeit gegenüber ER-Antagonisten (Fulvestrant) beeinflussen (Toy et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsprotokoll für ERE-Luciferase-Assay: - 2,5 μg HA-ERα WT oder Mutanten, 6,3 μg 3x-ERE-TATA-Luciferase-Reporter und 1,2 μg pRL-TK Renilla-Luciferase-Plasmid - Transfektionsreagenz: XtremeGENE™ HP (Sigma-Aldrich) - 24 h später: 10 nmol/L Östradiol für 24h, danach Auswertung 	<ul style="list-style-type: none"> - Messung der Glühwürmchen-Luciferase (ERE-Aktivität) und die Renilla-Luciferase - Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
Untersuchung der Wirkung von Östrogen und SERMs sowie die Expression von ER α / β in Schilddrüsenkrebs-	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsprotokoll für ERE-Luciferase-Assay: - pcDNA3.1/ Plasmide für ERα/β und pGL3-2 ERE-pro-Luciferase-Reporter, pRL-tk (Renilla Luciferase-Reporter 	<ul style="list-style-type: none"> - Messung der Glühwürmchen-Luciferase (ERE-Aktivität) und die Renilla-Luciferase

Zellen (Kumar et al., 2010)	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsreagenz: FuGENE 6 - 18 h nach Transfektion: Behandlung mit Östradiol, Fulvestrant, 4-Hydroxytamoxifen, Raloxifen - Nach 30 h: Auswertung 	<ul style="list-style-type: none"> - Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
Quantifizierung der Transfektionseffizienz und Zellsterblichkeit in humanen Ösophagus-Plattenepithelkarzinomen (Zelllinie KYSE 30 unter Verwendung von Lipofectamine 3000 (Mahmoudian et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none"> - Transfektionsprotokoll mit Lipofectamine 3000 Reagenz: - 24 h nach Aussäen: Transfektion von KYSE 30 Zellen mit pCDH-513b Plasmid-DNA, - Dosierung: 1,5 µg Plasmid 1 µl Lipofectamine 	<ul style="list-style-type: none"> - 36 h nach Transfektion: Analyse der Transfektionseffizienz: GFP Assay und Durchflusszytometrie - Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschlusstest
Stabile Integration		
Einfluss der <i>ESR1</i> -Mutationen auf die endokrine Resistenz mit einem CRISPR-Cas-Modell (Harrod et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none"> - Erzeugung der <i>ESR1</i>-Mutationen mithilfe CRISPR-Cas und der homologen Rekombination: - Amplifikation eines 1.803 bp langen DNA-Abschnittes des <i>ESR1</i>-Gens, um Exon 8 gelegen - Gezielte Mutagenese: Einfügen der Y537S-Mutation - Transfektion durch Amaxa Type II Nucleofector: <i>ESR1</i>-Exon-8-Plasmid, das CRISPR058819-Plasmid und das hCas9-Expressionsplasmid - 96 h später: Sanger-Sequenzierung: höchste Effizienz mit CRISPR058819 	<ul style="list-style-type: none"> - Funktionstest: Sulforhodamin B Assay (SRB): - Aussäen von 4.000 Zellen pro Well einer 96-Well Platte - Nach 16 h: Behandlung mit Östrogen, Antiöstrogen oder Ethanol → Wechsel alle drei Tage - Kultivierungszeitraum: 12 Tage
Einfluss der neuartigen <i>ESR1</i> -Mutation F404 auf die Antiöstrogentherapie (Kingston et al., 2024)	<ul style="list-style-type: none"> - Erzeugung der <i>ESR1</i>-Mutationen mithilfe CRISPR-Cas und der homologen Rekombination: - Entwicklung von RNP-Komplexen durch Inkubation von gRNA-Komplexe, Cas9, HDR-Vorlage, CAS9 Plus Reagenz und Optimem - Mischen der RNP-Komplexen mit Lipofectamin CRISPMAX → hinzugeben zu Zellen und Inkubation - 48 h später: Sanger-Sequenzierung zum Mutationsnachweis 	<ul style="list-style-type: none"> - Funktionstest SRB-Assay: - Inkubation von MCF-7 + <i>ESR1</i>-Mutation mit 1 nmol/l Östradiol und unter Östradiolentzug - Kultivierungszeitraum: 14 Tage - Färbung mit Sulforhodamin, Absorptionmessung bei 565 nm

<p>Hypothese, ob <i>ESR1</i>-Mutationen zu einer Chemoresistenz durch Aktivierung des JNK/MDR1-Signalwegs führen (Taya et al., 2025)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Erzeugung der <i>ESR1</i>-Mutationen durch stabile lentivirale Transfektion mittels Protokoll von (Zinger et al., 2019): - Zur Herstellung von Viruspartikeln: Mischen von Plasmid-DNA und Kalziumphosphat → Kultivierung mit HEK-Zellen - Auftragen des konditionierten Mediums auf MCF-7-Zellen → 8 h Inkubation - Selektion der stabil transfizierten Zellen via Puromycin - Koloniebildung 14 Tage nach Transfektion in 96-Well Platten - Nachweis der Mutation durch Sequenzierung 	<ul style="list-style-type: none"> - Funktionstest: Kristallviolett-färbung: - Aussäen von WT und Mutation auf 6-Well Platte (1500 pro Well) - Behandlung mit 0,5 Nm Paclitaxel; 5 Nm Doxorubicin - Kultivierungszeitraum: 14 Tage - Quantifizierung nach Anfärben mit Mikroplattenreader bei 560 nm
--	---	--

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die MCF-7-Zellen mit überexprimierten *ESR1*-Varianten sind gegenüber der Depletion des ER-Liganden Östrogen nicht resistent. Nach transienter Transfektion mit pCMV3-*ESR1* erreichte die ER α -Expression nach drei Tagen ihren Höhepunkt und fiel nach dem siebten Tag auf das endogene Expressionsniveau ab. In den durchgeführten funktionalen Testungen konnten bei MCF-7-Zellen mit überexprimierten *ESR1*-Varianten keine konstitutive, messbare ER α -Überexpression detektiert werden. Die Versuchsdauer von fünf bis sechs Tagen nach Transfektion war vermutlich zu lang. Kürzere Readout-Methoden, wie der ERE-Luciferase-Assay, ermöglichen bereits eine Auswertung 24-48 h nach Transfektion und sollten daher in Zukunft eingeführt werden.

Die Transfektionsbedingungen wurden optimiert, indem ein Mediumwechsel 4 h nach Transfektion eingeführt wurde. Dadurch konnte die Zellviabilität deutlich gesteigert werden. Um die Bedingungen weiter zu optimieren, sollte in Betracht gezogen werden, die ausgesäte Zellzahl der MCF-7-Zellen bei transienter Transfektion zu reduzieren, oder auch die Menge der Transfektionsreagenzien anzupassen.

Jedoch sind auch relevante Nachteile der Transfektion mit Plasmiden wie Apoptose, Auslösen einer Stress- und Entzündungsreaktion oder aberrantes Spleißen bekannt, die zu einer reduzierten Transfektionseffizienz führen. Um zusätzlich den kurzen Untersuchungszeitraum nach Plasmid-Transfektion zu überwinden, sollten die Mutationen stabil in die MCF-7-Zellen integriert werden. In den durchgeführten Proliferationsassays konnte das östradiolunabhängige Wachstum der Positivkontrolle MCF-7-LTED-Zellen, die die endogene *ESR1*-Mutation besitzen, im MTT-Assay, in der qPCR und auch in der Kristallviolett-färbung deutlich illustriert werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Effekte der neuartigen *ESR1*-Mutationen in den durchgeführten Experimenten dargestellt werden können, wenn die Mutationen stabil mittels lentiviraler Transfektion oder mit dem CRISPR-Cas-9-System integriert werden. Nach stabiler Integration könnte der SRB-Assay als neuer Readout eingesetzt werden.

Um die Besiedlungsfläche nach Kristallviolett-färbung zu objektivieren, sollte die Auswertung mit einem Mikroplattenreader und mit der Berechnung des Absorptionsspektrums erfolgen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aedma, S. K., & Kasi, A. (2024). Li-Fraumeni Syndrome. *StatPearls*.
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2021). Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discovery*, 11(4), 858-873. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-20-1311>
- Andreev, D. E., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., & Shatsky, I. N. (2016). Pros and cons of pDNA and mRNA transfection to study mRNA translation in mammalian cells. *Gene*, 578(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.008>
- Arao, Y., & Korach, K. S. (2021). The physiological role of estrogen receptor functional domains. *Essays in Biochemistry*, 65(6), 867-875. <https://doi.org/10.1042/ebc20200167>
- Ascione, L., Castellano, G., Curigliano, G., & Zagami, P. (2024). Endocrine therapy for early breast cancer in the era of oral selective estrogen receptor degraders: challenges and future perspectives. *Current Opinion in Oncology*, 36(6), 465-473. <https://doi.org/10.1097/coo.0000000000001085>
- Ashworth, T. (1869). A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. 14:146–147.
- Barua, D., Abbasi, B., Gupta, A., & Gupta, S. (2020). XBP1 increases transactivation of somatic mutants of ESR1 and loss of XBP1 reverses endocrine resistance conferred by gain-of-function Y537S ESR1 mutation. *Heliyon*, 6(10), e05217. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05217>
- Bidard, F.-C., Mayer, E. L., Park, Y. H., Janni, W., Ma, C., Cristofanilli, M., Bianchini, G., Kalinsky, K., Iwata, H., Chia, S., Fasching, P. A., Brufsky, A., Nowecki, Z., Pascual, J., Moreau, L., Chen, S.-C., Karadurmus, N., Gal-Yam, E. N., Jung, K. H.,...Turner, N. C. (2025). First-Line Camizestrant for Emerging *ESR1*-Mutated Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 0(0). <https://doi.org/doi:10.1056/NEJMoa2502929>
- Bidard, F. C., Hardy-Bessard, A. C., Dalenc, F., Bachelot, T., Pierga, J. Y., de la Motte Rouge, T., Sabatier, R., Dubot, C., Frenel, J. S., Ferrero, J. M., Ladoire, S., Levy, C., Mouret-Reynier, M. A., Lortholary, A., Grenier, J., Chakiba, C., Stefani, L., Plaza, J. E., Clatot, F.,...Delalogue, S. (2022). Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncology*, 23(11), 1367-1377. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(22\)00555-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(22)00555-1)
- Bidard, F. C., Kaklamani, V. G., Neven, P., Streich, G., Montero, A. J., Forget, F., Mouret-Reynier, M. A., Sohn, J. H., Taylor, D., Harnden, K. K., Khong, H., Kocsis, J., Dalenc, F., Dillon, P. M., Babu, S., Waters, S., Deleu, I., García Sáenz, J. A., Bria, E.,...Bardia, A. (2022). Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 40(28), 3246-3256. <https://doi.org/10.1200/jco.22.00338>
- Boyd, L. S., Gozuacik, D., & Joubert, A. M. (2018). The in vitro effects of a novel estradiol analog on cell proliferation and morphology in human epithelial cervical carcinoma. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 23, 10. <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0079-z>

- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*, 9, e11165. <https://doi.org/10.7717/peerj.11165>
- Correa, H. (2016). Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet*, 5(2), 84-88. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579759>
- Eslami, S. Z., Cortés-Hernández, L. E., & Alix-Panabières, C. (2020). Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081836>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Franken, A., Honisch, E., Reinhardt, F., Meier-Stiegen, F., Yang, L., Jaschinski, S., Esposito, I., Alberter, B., Polzer, B., Huebner, H., Fasching, P. A., Pancholi, S., Martin, L. A., Ruckhaeberle, E., Schochter, F., Tzschaschel, M., Hartkopf, A. D., Mueller, V., Niederacher, D.,...Neubauer, H. (2020). Detection of ESR1 Mutations in Single Circulating Tumor Cells on Estrogen Deprivation Therapy but Not in Primary Tumors from Metastatic Luminal Breast Cancer Patients. *Journal of Molecular Diagnostics*, 22(1), 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.09.004>
- Fritsche, O. (2016). *Kompaktissen Biologie: Mikrobiologie* Springer Verlag
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116, 135-170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Godet, I., & Gilkes, D. M. (2017). BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr Cancer Sci Ther*, 4(1). <https://doi.org/10.15761/icst.1000228>
- Goerke, K., & Valet, A. (2020). Gynäkologie und Geburtshilfe hoch2 professional In (pp. 332-345). Elsevier
- Gorges, T. M., & Pantel, K. (2016). Zirkulierende Tumorzellen: Ist die Metastasierung bald vorhersagbar? *Dtsch Arztebl International*, 113(39), -8-. <https://doi.org/10.3238/PersOnko/2016.09.30.02>
- Grinshpun, A., Chen, V., Sandusky, Z. M., Fanning, S. W., & Jeselsohn, R. (2023). ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1878(1), 188830. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188830>
- Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. *Current Topics in Developmental Biology*, 125, 109-146. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J.,...Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2784-2795. <https://doi.org/10.1200/jco.2009.25.6529>
- Harrod, A., Fulton, J., Nguyen, V. T. M., Periyasamy, M., Ramos-Garcia, L., Lai, C. F., Metodieva, G., de Giorgio, A., Williams, R. L., Santos, D. B., Gomez, P. J., Lin, M. L., Metodiev, M. V., Stebbing, J., Castellano, L., Magnani, L., Coombes, R. C., Buluwela, L., & Ali, S. (2017). Genomic modelling of the ESR1 Y537S mutation for evaluating function and new therapeutic approaches for metastatic

- breast cancer. *Oncogene*, 36(16), 2286-2296.
<https://doi.org/10.1038/onc.2016.382>
- Heinrich, P. C., Müller, M., & Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* Springer
- Heng, B. C., Bezerra, P. P., Preiser, P. R., Alex Law, S. K., Xia, Y., Boey, F., & Venkatraman, S. S. (2011). Effect of cell-seeding density on the proliferation and gene expression profile of human umbilical vein endothelial cells within ex vivo culture. *Cytotherapy*, 13(5), 606-617.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3109/14653249.2010.542455>
- Hirao-Suzuki, M., Takeda, S., Kodama, Y., Takiguchi, M., Toda, A., & Ohara, M. (2020). Metalloestrogenic effects of cadmium are absent in long-term estrogen-deprived MCF-7 cells: Evidence for the involvement of constitutively activated estrogen receptor α and very low expression of G protein-coupled estrogen receptor 1. *Toxicology Letters*, 319, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.10.018>
- Holinski-Feder, E., Brandau, O., Nestle-Krämling, C., Derakhshandeh-Peykar, P., Murken, J., Untch, M., & Meindl, A. (1998). Genetik des erblichen Mammakarzinoms: Grundlagen - Forschung - Diagnostik. *Dtsch Arztebl International*, 95(11), 600-. <https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=9859>
- Holowatyj, A. N., Ruterbusch, J. J., Ratnam, M., Gorski, D. H., & Cote, M. L. (2016). HER2 status and disparities in luminal breast cancers. *Cancer Med*, 5(8), 2109-2116. <https://doi.org/10.1002/cam4.757>
- Holzapfel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2), 120-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biuz.200610332>
- Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. (2021). In (pp. 58, 113, 169, 170, 171, 172). AWMF online. (Zugriffsdatum: 11.07.2025)
- Jeffreys, S. A., Powter, B., Balakrishnar, B., Mok, K., Soon, P., Franken, A., Neubauer, H., de Souza, P., & Becker, T. M. (2020). Endocrine Resistance in Breast Cancer: The Role of Estrogen Receptor Stability. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092077>
- Joppien, S., Maier, S. L., & Endling, D. (2011). *BASICS Experimentelle Doktorarbeit* Urban & Fischer/ Elsevier GmbH.
- Kingston, B., Pearson, A., Herrera-Abreu, M. T., Sim, L. X., Cutts, R. J., Shah, H., Moretti, L., Kilburn, L. S., Johnson, H., Macpherson, I. R., Ring, A., Bliss, J. M., Hou, Y., Toy, W., Katzenellenbogen, J. A., Chandarlapaty, S., & Turner, N. C. (2024). ESR1 F404 Mutations and Acquired Resistance to Fulvestrant in ESR1-Mutant Breast Cancer. *Cancer Discovery*, 14(2), 274-289. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-22-1387>
- Koch-Institut, R. (2024a). *Brustkrebs: Inzidenz Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. https://www.gbe.rki.de/DE/Themen/Gesundheitszustand/KoerperlicheErkrankungen/Krebs/BrustkrebsInzidenz/brustkrebsInzidenz_node.html?darstellung=0&ke mnzahl=1&zeit=2020&geschlecht=1&standardisierung=3 (Zugriffsdatum: 10.07.2025)
- Koch-Institut, R. (2024b). *Brustkrebs: Sterblichkeit. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. https://www.gbe.rki.de/DE/Themen/Gesundheitszustand/KoerperlicheErkrankungen/Krebs/BrustkrebsSterblichkeit/brustkrebsSterblichkeit_node.html?darstellung

[g=0&kennzahl=1&zeit=2021&geschlecht=1&standardisierung=3](#)

(Zugriffsdatum: 10.07.2025)

- Kraus, D. (2022). Mammakarzinom: Elacestrant als neue Option? *gynäkologie + geburtshilfe*, 27(1), 21-21. <https://doi.org/10.1007/s15013-022-4473-2>
- Kumar, A., Klinge, C. M., & Goldstein, R. E. (2010). Estradiol-induced proliferation of papillary and follicular thyroid cancer cells is mediated by estrogen receptors α and β . *International Journal of Oncology*, 36(5), 1067-1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000588>
- Lechardeur, D., & Lukacs, G. L. (2002). Intracellular Barriers to Non-Viral Gene Transfer. *Current Gene Therapy*, 183-194.
- Li, G. L., Zhong, C. L., Mo, J. X., Quan, R., Wu, Z. F., Li, Z. C., Yang, H. Q., & Zhang, X. (2017). Advances in site-specific integration of transgene in animal genome. *Yi Chuan*, 39(2), 98-109. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.16-367>
- Liao, H., Huang, W., Pei, W., & Li, H. (2020). Detection of ESR1 Mutations Based on Liquid Biopsy in Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical Impacts and Prospects [Mini Review]. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.587671>
- Lim, E., Metzger-Filho, O., & Winer, E. P. (2012). The natural history of hormone receptor-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 26(8), 688-694, 696.
- Mahmoudian, R. A., Farshchian, M., & Abbaszadegan, M. R. (2020). Evaluation and Optimization of Lipofectamine 3000 Reagents for Transient Gene Expression in KYSE-30 Esophagus Cancer Cell Line. *Archives of Medical Laboratory Sciences*. <https://doi.org/Archives of Medical Laboratory Sciences>
- Martin, L. A., Ribas, R., Simigdala, N., Schuster, E., Pancholi, S., Tenev, T., Gellert, P., Buluwela, L., Harrod, A., Thornhill, A., Nikitorowicz-Buniak, J., Bhamra, A., Turgeon, M. O., Pouligiannis, G., Gao, Q., Martins, V., Hills, M., Garcia-Murillas, I., Fribbens, C.,...Dowsett, M. (2017). Discovery of naturally occurring ESR1 mutations in breast cancer cell lines modelling endocrine resistance. *Nat Commun*, 8(1), 1865. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01864-y>
- Mathelin, C., Tomasetto, C., & Rio, M. C. (2005). [Trefoil factor 1 (pS2/TFF1), a peptide with numerous functions]. *Bulletin du Cancer*, 92(9), 773-781. (Le facteur en trèfle 1 (pS2/TFF1), un peptide aux multiples facettes.)
- Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K., & Schmutzler, R. K. (2011). Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. *Dtsch Arztebl International*, 108(19), 323-330. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0323>
- Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
- Omniscript Reverse Transcription Handbook*. (2010). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=7f8feb09-5115-40cd-a6a7-cf72149e172a&lang=en> (Zugriffsdatum: 24.09.2023)
- Pelden, S., Insawang, T., Thuwajit, C., & Thuwajit, P. (2013). The trefoil factor 1 (TFF1) protein involved in doxorubicin-induced apoptosis resistance is upregulated by estrogen in breast cancer cells. *Oncology Reports*, 30(3), 1518-1526. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2593>
- Polasik, A., Tzschaschel, M., Schochter, F., de Gregorio, A., Friedl, T. W. P., Rack, B., Hartkopf, A., Fasching, P. A., Schneeweiss, A., Müller, V., Huober, J., Janni, W., & Fehm, T. (2017). Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma - What is the Role of

- Liquid Biopsy in Breast Cancer? *Geburtshilfe Frauenheilkunde*, 77(12), 1291-1298. <https://doi.org/10.1055/s-0043-122884>
- Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytologica*, 63(6), 449-455. <https://doi.org/10.1159/000499337>
- QIAwave RNA Mini Handbook*. (2023). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=bf60203f-291d-48ae-8206-86b0696b28c0&lang=en> (Zugriffsdatum: 24.09.2023)
- Rabaan, A. A., AlSaihati, H., Bukhamsin, R., Bakhrebah, M. A., Nassar, M. S., Alsaleh, A. A., Alhashem, Y. N., Bukhamseen, A. Y., Al-Ruhimy, K., Alotaibi, M., Alsubki, R. A., Alahmed, H. E., Al-Abdulhadi, S., Alhashem, F. A., Alqatari, A. A., Alsayyah, A., Farahat, R. A., Abdulal, R. H., Al-Ahmed, A. H.,... Mohapatra, R. K. (2023). Application of CRISPR/Cas9 Technology in Cancer Treatment: A Future Direction. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, 30(2), 1954-1976. <https://doi.org/10.3390/curroncol30020152>
- Ravikumar, K., Voigt, S. P., Kalidindi, S. R., & Basu, B. (2021). Critical comparison of image analysis workflows for quantitative cell morphological evaluation in assessing cell response to biomaterials. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 16(3). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/abcf5e>
- Rouanet, P., Roger, P., Rousseau, E., Thibault, S., Romieu, G., Mathieu, A., Cretin, J., Barneon, G., Granier, M., Maran-Gonzalez, A., Dures, J. P., Boissiere, F., & Bibeau, F. (2014). HER2 overexpression a major risk factor for recurrence in pT1a-bN0M0 breast cancer: results from a French regional cohort. *Cancer Med*, 3(1), 134-142. <https://doi.org/10.1002/cam4.167>
- Saczko, J., Michel, O., Chwiłkowska, A., Sawicka, E., Mączyńska, J., & Kulbacka, J. (2017). Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 227, 93-105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9_6
- Sanjai, C., Hakkimane, S. S., Guru, B. R., & Gaonkar, S. L. (2024). A comprehensive review on anticancer evaluation techniques. *Bioorganic Chemistry*, 142, 106973. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106973>
- Schlimgen, R., Howard, J., Wooley, D., Thompson, M., Baden, L. R., Yang, O. O., Christiani, D. C., Mostoslavsky, G., Diamond, D. V., Duane, E. G., Byers, K., Winters, T., Gelfand, J. A., Fujimoto, G., Hudson, T. W., & Vyas, J. M. (2016). Risks Associated With Lentiviral Vector Exposures and Prevention Strategies. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 58(12), 1159-1166. <https://doi.org/10.1097/jom.0000000000000879>
- Șerban, C., Anca Maria, C., & Marius, R. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147. <http://ar.iiarjournals.org/content/35/6/3147.abstract>
- Sheikh, S., Coutts, A. S., & La Thangue, N. B. (2017). Chapter 11 - Transfection. In M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 191-209). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00011-4>
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81717-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81717-1)
- Stepanenko, A. A., & Heng, H. H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation*

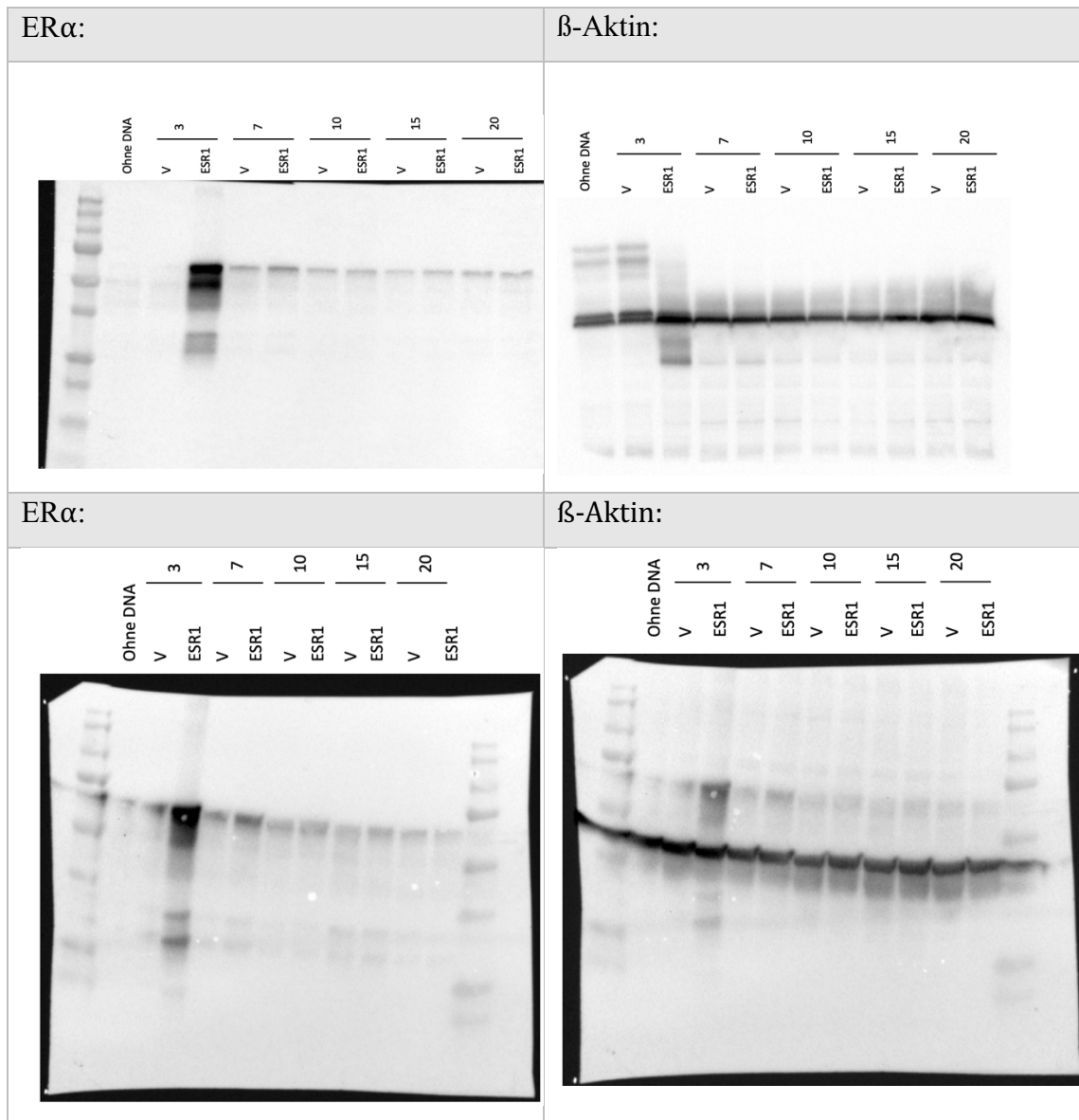
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.002>

- Taya, M., Merenbakh-Lamin, K., Zubkov, A., Honig, Z., Kurolap, A., Mayer, O., Shomron, N., Wolf, I., & Rubinek, T. (2025). Beyond endocrine resistance: estrogen receptor (ESR1) activating mutations mediate chemotherapy resistance through the JNK/c-Jun MDR1 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 209(2), 431-449. <https://doi.org/10.1007/s10549-024-07507-3>
- Toy, W., Weir, H., Razavi, P., Lawson, M., Goepfert, A. U., Mazzola, A. M., Smith, A., Wilson, J., Morrow, C., Wong, W. L., De Stanchina, E., Carlson, K. E., Martin, T. S., Uddin, S., Li, Z., Fanning, S., Katzenellenbogen, J. A., Greene, G., Baselga, J., & Chandarlapaty, S. (2017). Activating ESR1 Mutations Differentially Affect the Efficacy of ER Antagonists. *Cancer Discovery*, 7(3), 277-287. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-15-1523>
- Turner, N., Huang-Bartlett, C., Kalinsky, K., Cristofanilli, M., Bianchini, G., Chia, S., Iwata, H., Janni, W., Ma, C. X., Mayer, E. L., Park, Y. H., Fox, S., Liu, X., McClain, S., & Bidard, F.-C. (2023). Design of SERENA-6, a phase III switching trial of camizestrant in ESR1-mutant breast cancer during first-line treatment. *Future Oncology*, 19(8), 559-573. <https://doi.org/10.2217/fon-2022-1196>
- Uhl, B. (2023). Gynäkologie und Geburtshilfe compact. In Thieme.
- Varol, U., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Somali, I., Altun, Z., Aktas, S., & Oktay Tarhan, M. (2018). BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2. *Journal of B.U.ON.*, 23(4), 862-866.
- Wendt, C., & Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes – a review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncologica*, 58(2), 135-146. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1529428>
- Xu, Y., & Li, Z. (2020). CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 2401-2415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.08.031>
- Zinger, L., Merenbakh-Lamin, K., Klein, A., Elazar, A., Journo, S., Boldes, T., Pasmanik-Chor, M., Spitzer, A., Rubinek, T., & Wolf, I. (2019). Ligand-binding Domain-activating Mutations of ESR1 Rewire Cellular Metabolism of Breast Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 25(9), 2900-2914. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-18-1505>

6 Anhang

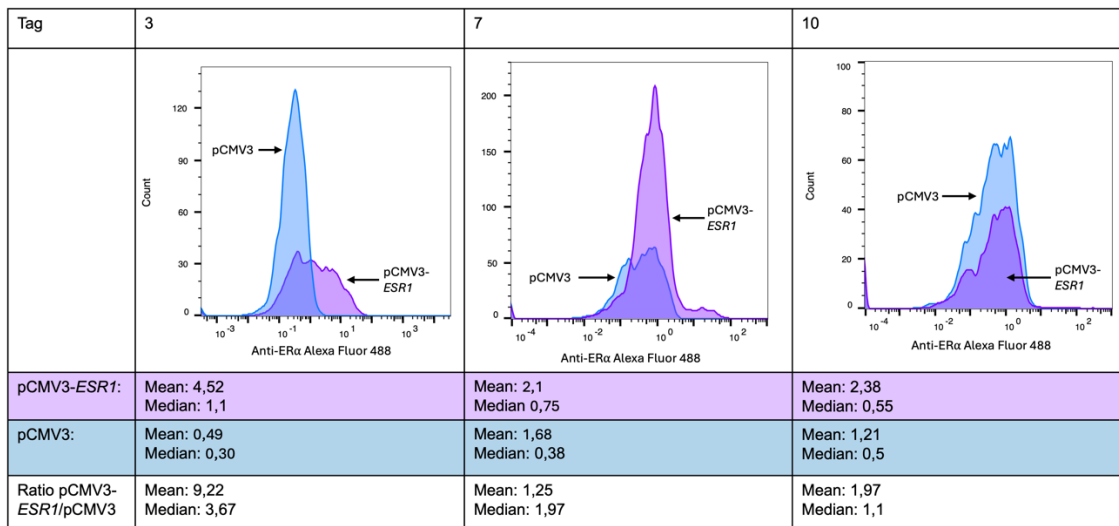
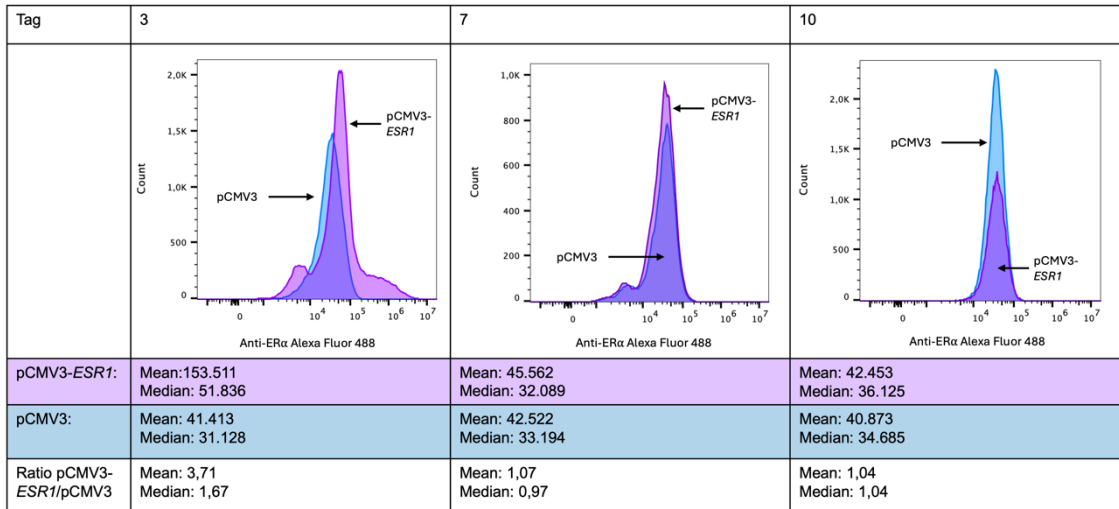
6.1 Western blot: 3, 7, 10, 15 und 20 Tage nach Transfektion (n=2)

Die MCF-7-Zellen wurden transient mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert, um die ER α -Expression innerhalb eines Zeitraums von 20 Tagen zu analysieren.



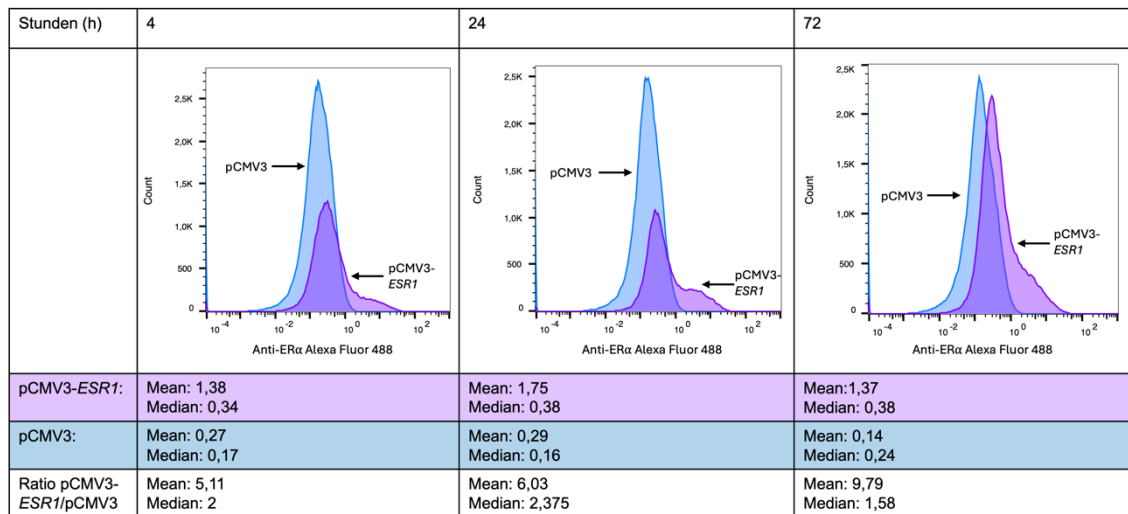
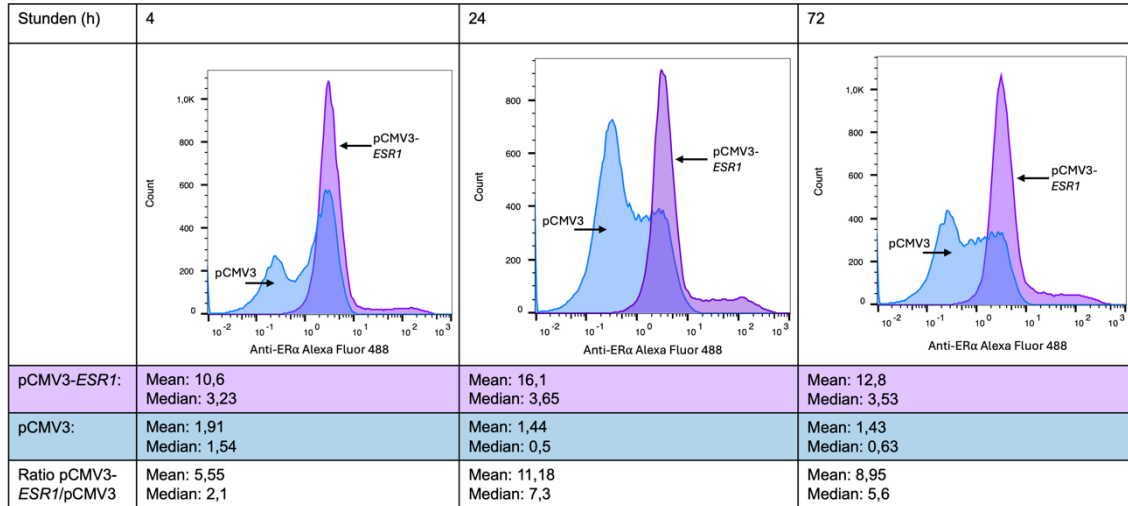
6.2 Durchflusszytometrie: 3, 7, 10 Tage nach Transfektion (n=3)

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. 3, 7 und 10 Tage nach Transfektion wurde eine Durchflusszytometrie mit den AK ERSP1 und Alexa Fluor 488 goat anti rabbit durchgeführt.



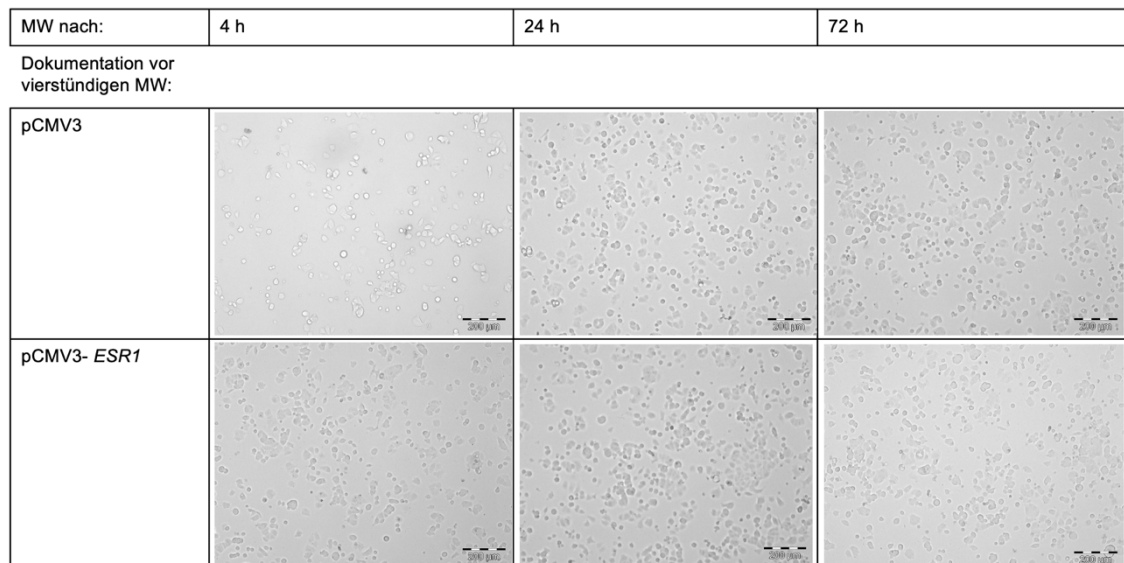
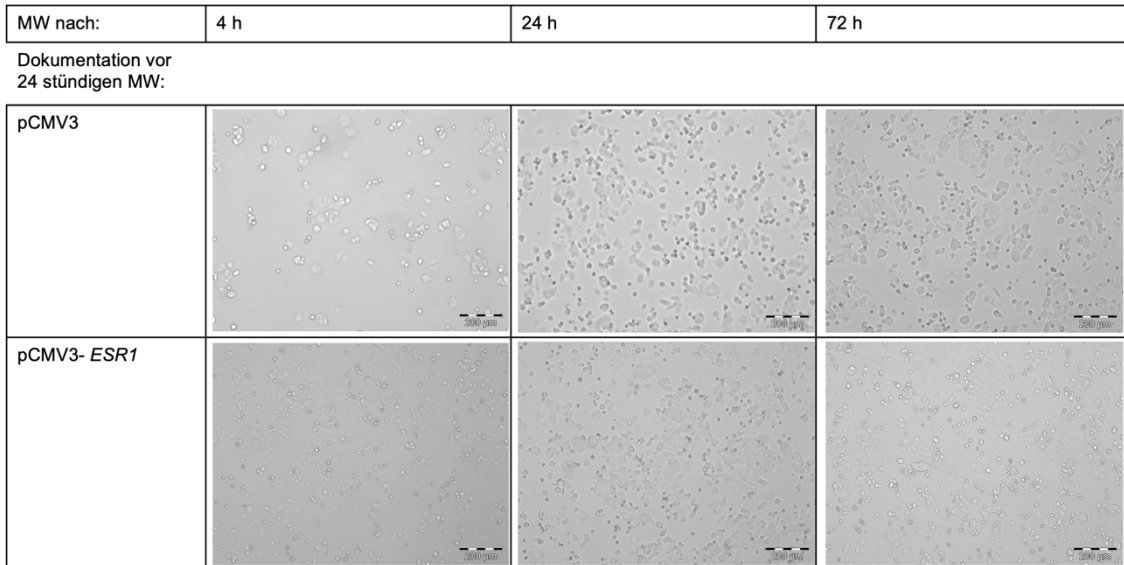
6.3 Durchflusszytometrie: 4, 24 und 72 h nach Transfektion (n=3)

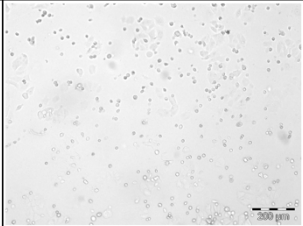
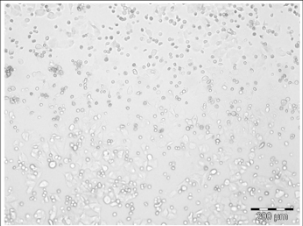
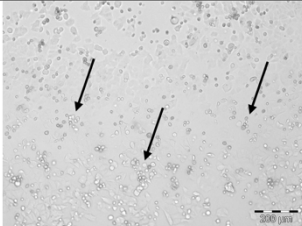
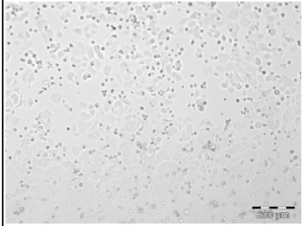
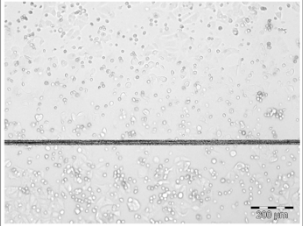
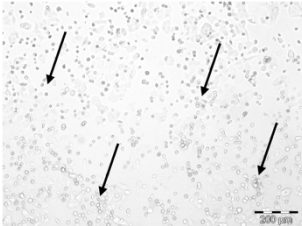
Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. 4, 24 und 72 h nach Transfektion wurde das Medium erneuert. Drei Tage nach Transfektion wurde die Durchflusszytometrie mit den AK ERSP1 und Alexa Fluor 488 goat anti rabbit durchgeführt.



6.4 Optimierung der Transfektionsbedingungen: Cell Selector (n=2)

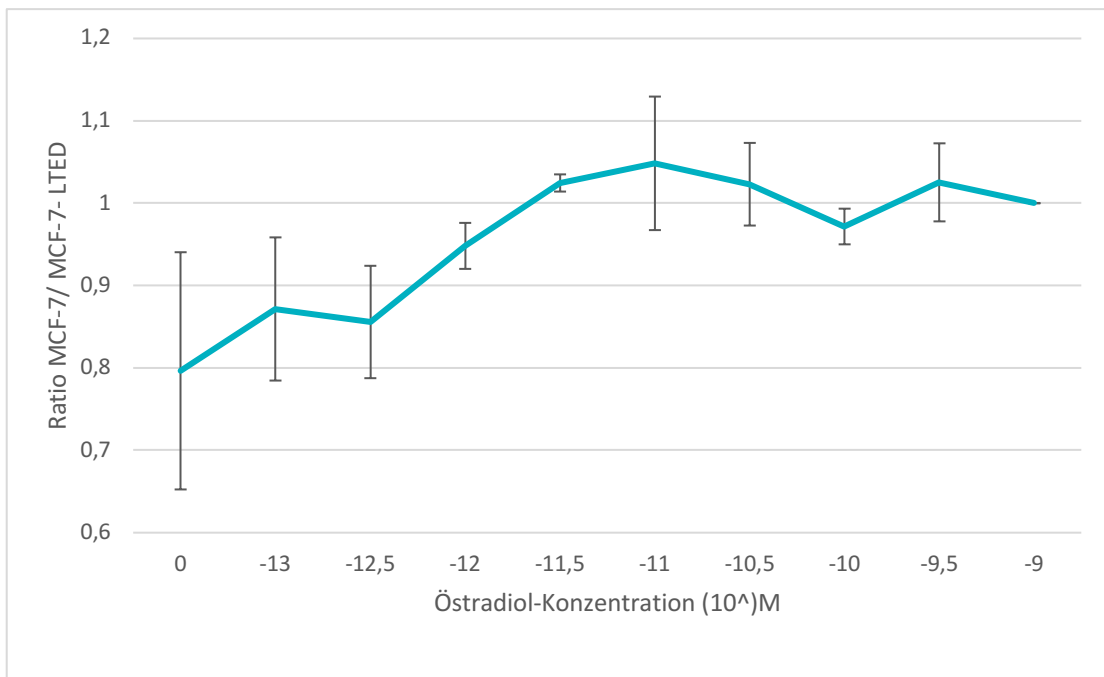
Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3 und pCMV3-*ESR1* transfiziert. 4, 24 und 72 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Vor jedem Mediumwechsel wurde die Zellmorphologie mithilfe des CellSelectors mikroskopisch untersucht.



MW nach:	4 h	24 h	72 h
Dokumentation vor 72 stündigen MW:			
pCMV3			
pCMV3- ESR1			

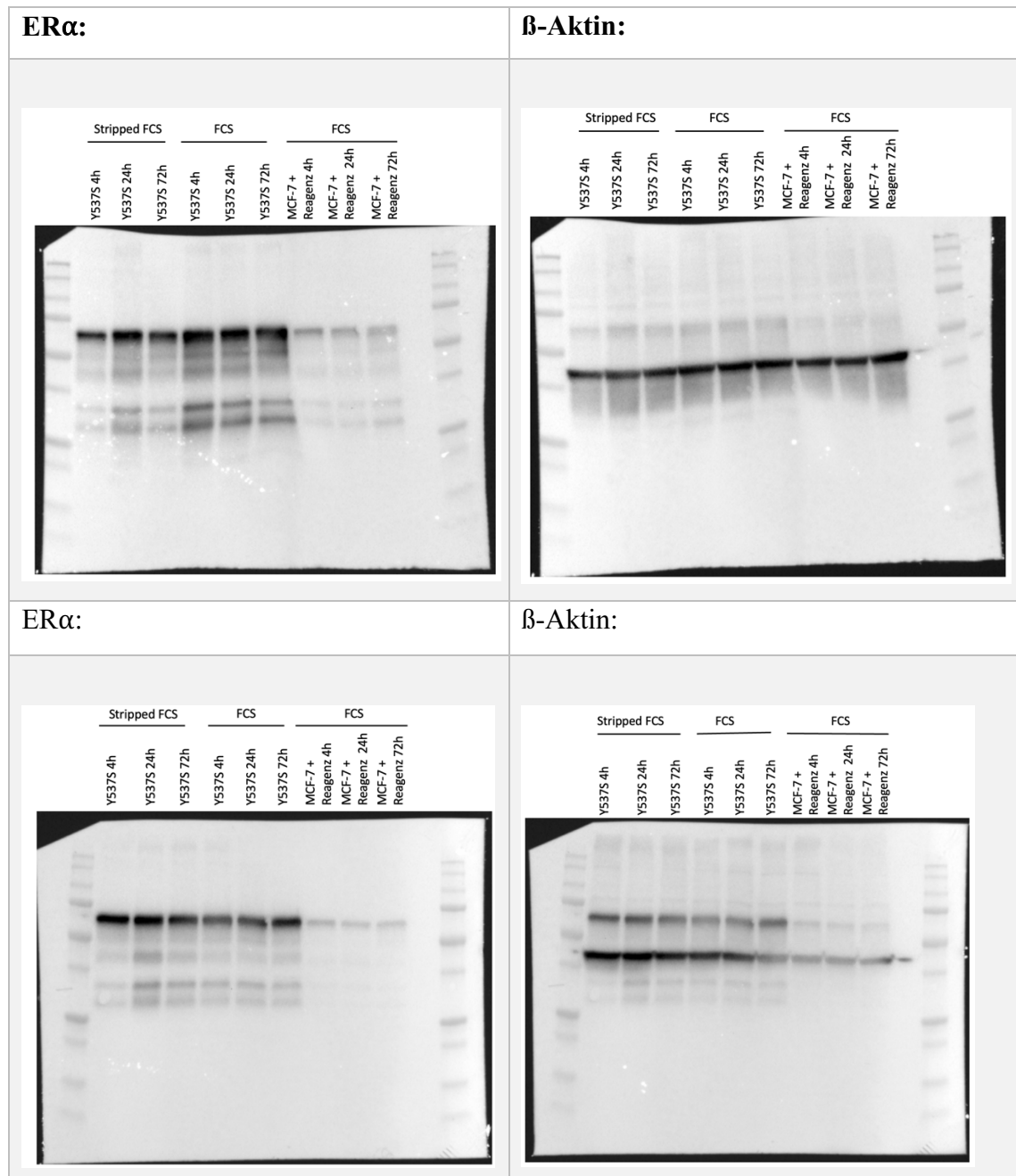
6.5 MTT-Assay: Ratio von MCF-7/MCF-7-LTED-Zellen (n=3)

Die MCF-7-LTED-Zellen und die MCF-7-Zellen wurden auf einer 96-Well Platte ausgesät und in einer Östradiolverdünnungsreihe von 10^{-13} M und 10^{-9} M für zwei Tage kultiviert. Danach erfolgte die Auswertung mithilfe des spark® Mikroplatten Reader bei einer Wellenlänge von 540 nm.



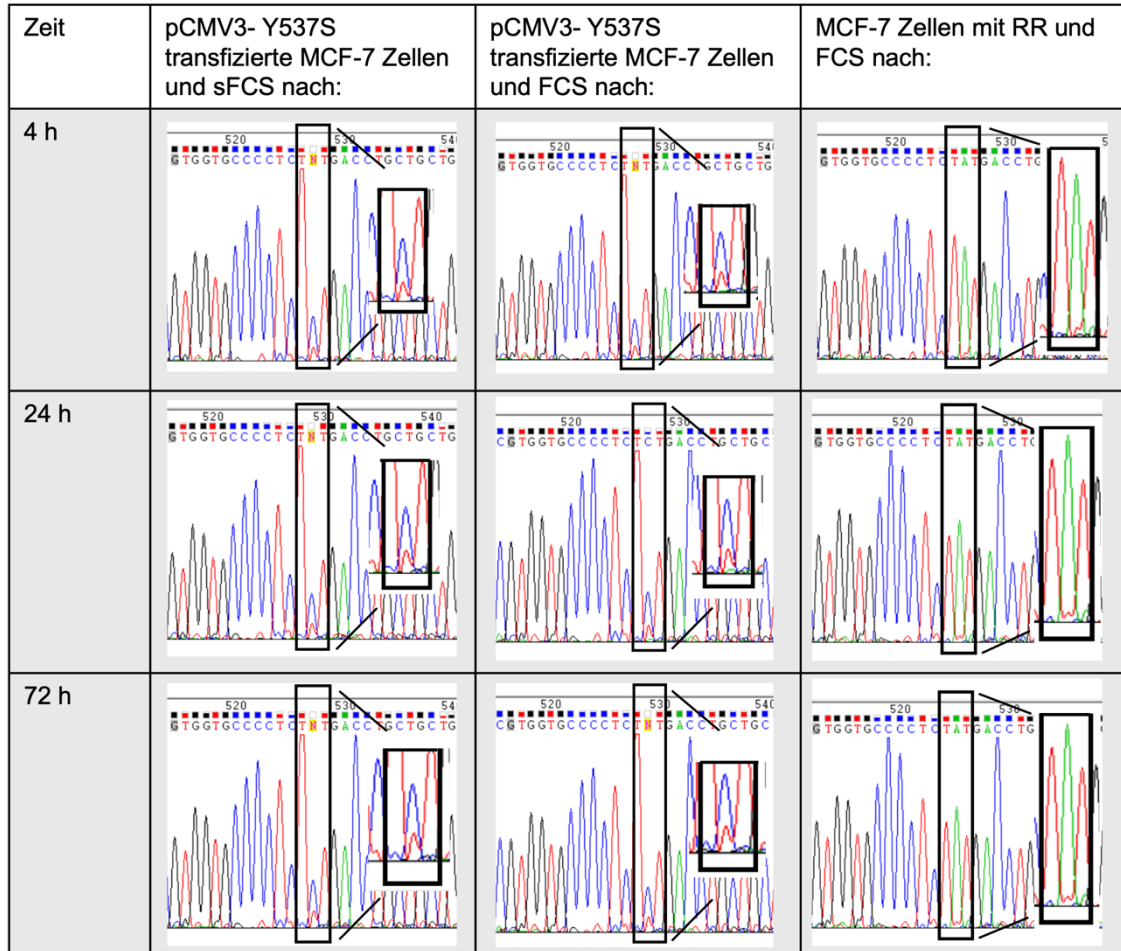
6.6 Western blot: ER α -Expression von MCF-7-Y537S-Zellen in Charcoal-stripped FCS-Medium und RPMI-Medium (n=2)

Die MCF-7-Zellen wurden mit pCMV3-Y537S transient transfiziert. 4, 24 und 72 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Hierfür wurde entweder das RPMI-Medium oder das Charcoal-stripped FCS-Medium verwendet. Sechs Tage nach Transfektion wurde der Western blot durchgeführt.



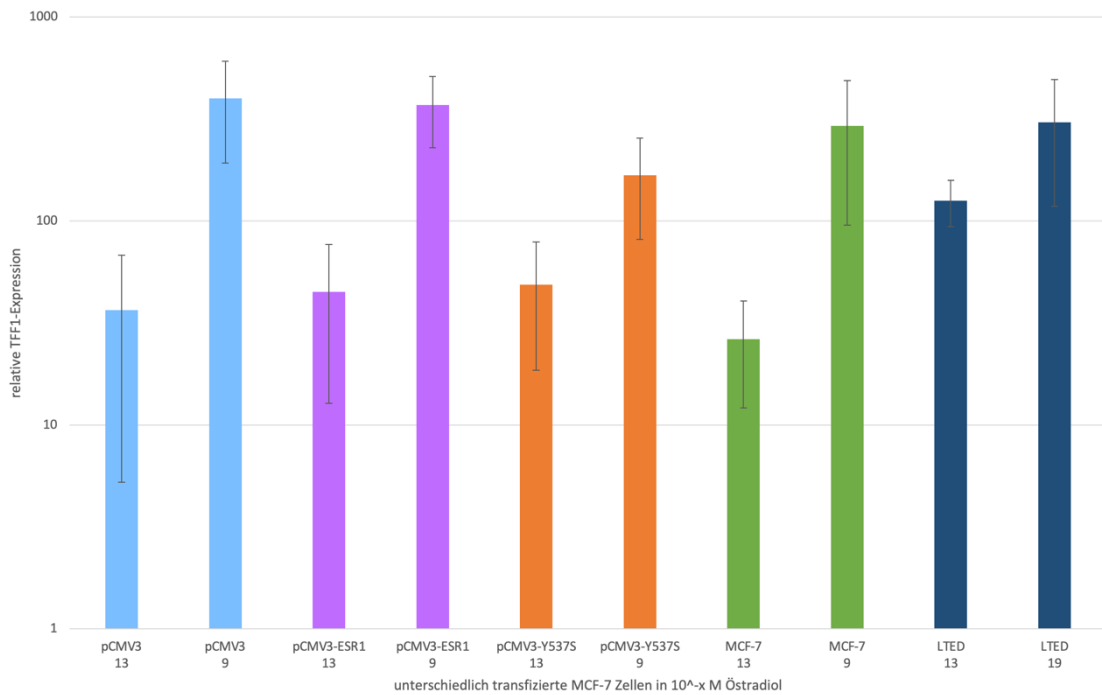
6.7 Sanger-Sequenzierung (n=2)

Die Zellen wurden wie in 6.6 vorbereitet. Sechs Tage nach Transfektion wurden die Pellets für die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese gesammelt. PCR-Analysen wurden durchgeführt, um danach eine Gel-Extraktion zu planen. Folgende Primer wurden verwendet: *ESR1*-Exon 1B und *ESR1*-Exon 8 rückwärts.



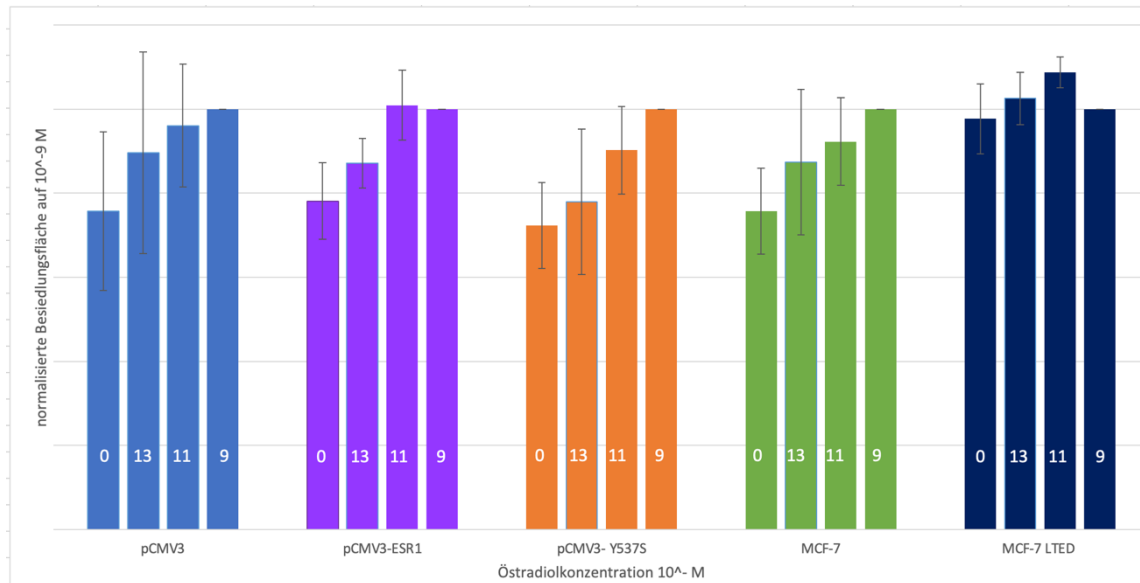
6.8 qPCR-Optimierung: TFF1-Expression in 10^{-13} M und 10^{-9} M Östradiol (n = 3)

Die MCF-7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV3, pCMV3-*ESR1* und pCMV3-Y537S transfiziert. Das Medium wurde 4 h nach Transfektion gewechselt und ein Tag später auf Charcoal-stripped FCS-Medium gesetzt. Danach wurden die Zellen für zwei Tage in 10^{-9} M und 10^{-13} M Östradiol kultiviert. Sechs Tage nach Transfektion wurde die TFF1-Expression mittels qPCR bestimmt.



6.9 Kristallviolettffärbung (n=3)

Die MCF-7-Zellen wurden mit den Plasmiden pCMV3, pCMV3-*ESR1* und pCMV3-Y537S transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage in einer Östradiolverdünnungsreihe kultiviert. Fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt, um danach die Besiedlungsfläche mit dem Axio Observer mit der Festkörperlichtquelle Colibri 7 und ImageJ zu berechnen. Um die Standardabweichung übersichtlich darzustellen, wurde ein Säulendiagramm verwendet.



Zelllinie	Östradiolkonzentration 10^{-9} M					Östradiolkonzentration 10^{-13} M			
	0	-13	-11	-9		0	-13	-11	-9
pCMV3					pCMV3-Y537S				
pCMV3-ESR1					MCF-7				

Zelllinie	Östradiolkonzentration 10 ⁻ M			
	0	-13	-11	-9
MCF-7 LTED				

Zelllinie	Östradiolkonzentration 10 ⁻ M					Östradiolkonzentration 10 ⁻ M			
	0	-13	-11	-9		0	-13	-11	-9
pCMV3					pCMV3-Y537S				
pCMV3-ESR1					MCF-7				

Zelllinie	Östradiolkonzentration 10 ⁻ M			
	0	-13	-11	-9
MCF-7 LTED				

Danksagung

Der erfolgreiche Abschluss dieser Promotion wäre ohne Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Neubauer, der mich mit seiner fachlichen Expertise, wertvollen Ratschlägen und Anregungen sowie mit großem Verständnis auf diesem Weg begleitet hat.

Ein ebenso herzliches Dankeschön richte ich an Dr. André Franken aus der Arbeitsgruppe für translationale Gynäkoonkologie der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Der intensive Austausch, die konstruktive Kritik und die kompetente Anleitung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich meiner Kollegin Alina Eßer, mit der ich eine angenehme und unterstützende Arbeitsatmosphäre im Labor teilen durfte.

Zudem habe ich die Möglichkeit geschätzt, die Geräte des Labors für experimentelle chirurgische Onkologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stoecklein mitnutzen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, auf deren Unterstützung und Vertrauen ich stets zählen konnte. Insbesondere meine Eltern Katja Scharnbeck und Frank Eßer, meine Schwester Lisa Blanke sowie meine Großeltern haben mich seit Beginn meines Studiums begleitet und mir durch ihren Rückhalt und ihr Verständnis Kraft gegeben. Ihr Vertrauen und ihre Ermutigung haben mich stets motiviert, mein Bestes zu geben, um diesen Weg erfolgreich zu bestreiten.