

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Einfluss des Östrogenrezeptors beta (ER β) auf das biologische Verhalten im kolorektalen Karzinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Felix Maximilian Prokein

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Flügen

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Helfen, ohne zu fragen wem!

Jean-Henri Dunant

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

-im Rahmen eines Vortrags auf dem Kongress der österreichischen Gesellschaft für Chirurgie (ÖCK) 2025 in Salzburg, Österreich

-im Rahmen eines Vortrags auf dem Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DCK) 2026 in Leipzig, Deutschland

Zusammenfassung

Kolorektale Lebermetastasen (CLM) können beim kolorektalen Karzinom (CRC) lange nach einer primären R0-Resektion auftreten, vermutlich durch Reaktivierung dormanter Tumorzellen. Das CRC- und CLM-Risiko ist bei prämenopausalen Frauen sowie Frauen unter Hormonersatztherapie geringer. Im CRC besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen ER β positiven Primärtumoren und einer CLM-Abwesenheit. Der im Darmepithel vorherrschende Östrogenrezeptor beta (ER β) ist mit einer Hemmung der Proliferation, der Heraufregulierung von Zellzyklus Inhibitoren (p27, p21) und einer Aktivierung von p38, einem zentralen *Dormancy*-Signalweg, assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es, das protektive Potenzial des ER β im CRC in vitro zu untersuchen. Hierfür wurden HCT116 (CRC) Zellen lentiviral ESR2(ER β)-GFP-transduziert. Über 10 Tage erfolgte die Kultivierung in Matrigel unter *Low*- und *High-Density*-Bedingungen, zur Simulation einer disseminierten CRC-Zelle im Lebergewebe. Eine regelmäßige Behandlung mit ERB-041 (ER β -Agonist), PHTPP (ER β -Antagonist) oder DMSO (Kontrolle) erfolgte, sowie mehrfache fluoreszenzmikroskopische Auswertungen. Weiterführend erfolgte mit jeweils gleicher Stimulation über 36h ein CellTrace-Proliferationsassay sowie ein BrdU-Assay mit anschließender Durchflusszytometrie. In *Low-Density*-Kulturen verhielten sich die mit ERB-041 behandelten HCT116^{ESR+} Einzelzellen von Tag 2 bis 5 weitgehend statisch und zeigten am 10. Tag im Vergleich zur PHTPP- oder DMSO-Stimulation weniger Organoide und mehr Einzelzellen, jedoch ohne statistische Signifikanz. In *High-Density*-Kulturen verzögerte ERB-041 die Zellaggregatbildung nicht, führte aber ebenfalls zur geringsten Anzahl an Organoiden am 10. Tag. Die BrdU-Analyse zeigte in SW620-Zellen (ohne ER β) unter ERB-041 einen leicht erhöhten Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase, während sich bei HCT116^{ESR+}-Zellen das gegenteilige Bild ergab. Die CellTrace-Analyse ergab, dass ERB-041-behandelte HCT116^{ESR+}-Zellen eine höhere normalisierte CellTrace-Intensität (nCTI), ergo weniger Zellteilungen, aufwiesen als mit DMSO-behandelte Zellen; diese war jedoch niedriger als unter PHTPP-Gabe. Unabhängig von der Behandlung zeigten HCT116^{ESR+}-Zellen eine höhere normierte und nicht normierte CellTrace-Intensität als HCT116-Zellen, entsprechend geringerer Proliferation. Ergänzend schien bei den nicht ER β -positiven SW620-Zellen die GFP-Expression (GFP-positiv) die Proliferation im Vergleich zu den nicht-GFP-exprimierenden SW620-Zellen (GFP negativ) zu hemmen. Die Aktivierung von ER β durch ERB-041 scheint in *Low-Density*-Kulturen die Proliferation zu hemmen und ein dormantes Verhalten zu fördern, während sich dieser Effekt nur teilweise in der *High-density* Kultur zeigte. Auch die ligandunabhängige ER β -Präsenz könnte in vitro wachstumshemmend wirken, wie die CellTrace-Ergebnisse nahelegten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu ER β -basierten Therapieansätzen sowohl zur CLM-Prävention (Agonist) als auch zur gezielten Reaktivierung dormanter Zellen zwecks Sensibilisierung gegenüber herkömmlicher antiproliferativer Therapie (Antagonist).

Abstract

Colorectal liver metastases (CLM) in CRC can emerge long after primary R0 resection, likely through reactivation of dormant tumor cells. Premenopausal women and those on hormone replacement therapy (HRT) show reduced CRC and CLM risk. ER β -positive CRCs correlate with CLM-absence. ER β , the predominant estrogen receptor in the colon, is associated with proliferation inhibition, upregulation of cell cycle inhibitors (p27, p21) and activation of p38, a key Dormancy pathway. This study aims to investigate ER β 's protective potential in vitro.

ESR2(ER β)-GFP transduction was performed with CRC cells (HCT116). Over 10 days cells were cultured in Matrigel under low- and high-density conditions to simulate dormant disseminated CRC-cells in liver tissue.

Regular treatment with ERB-041 (ER β -agonist), PHTPP (ER β -antagonist), or DMSO (control) as well as multiple fluorescence microscopy was performed.

Further on, cells were incubated for 36h conducting BrdU- and CellTracer-proliferation-assays measured by flow cytometry after similar stimulation.

In low-density cultures, ERB-041-treated HCT116^{ESR+} single cells remained static from day 2 to 5, with fewer organoids and more single cells by day 10 compared to PHTPP or DMSO, yet lacking statistical significance. In high-density settings, ERB-041 did not delay cell clustering but still resulted in the fewest organoids.

BrdU analysis showed a slightly higher G0/G1 population in SW620 (ESR2-) cells treated with ERB-041 and vice versa in HCT116^{ESR+}.

CellTrace analysis revealed that ERB-041 treated HCT116^{ESR2+} cells had a higher normalized CellTrace intensity (nCTI), indicating fewer cell divisions, than DMSO-treated cells; but they had a lower nCTI than those treated with PHTPP.

HCT116^{ESR+} cells also showed both a higher nCTI and higher raw CellTrace intensity compared to HCT116 cells, in disregard of the treatment.

SW620 (ESR2-) cells displayed slower proliferation dynamics in CellTrace compared to HCT116, consistent with the literature. Additionally, GFP expression in SW620-GFP (ESR2-) cells appeared to reduce proliferation relative to non-GFP-expressing SW620 (ESR2-) cells.

ER β activation via ERB-041 appears to reduce proliferation in low-density cultures, mimicking Dormancy-like behavior, while this effect diminishes at higher densities suggesting different microenvironmental influence. Ligand-independent ER β presence in vitro also seems to inhibit growth due to CellTrace observation.

These findings support the necessity for further investigation into ER β -targeted therapies for CLM prevention (agonist) or sensitization to antiproliferative treatment (antagonist).

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA		einfaktorielle Varianzanalyse
APC		Adenomatöses Polypsis Coli, Allophycocyanin
BrdU		Bromdesoxyuridin
CDK		Cyclin abhängige Kinasen
CEA		Carcinoembryonales Antigen
CLM		kolorektale Lebermetastase
CME		komplette mesokolische Resektion
CRC		kolorektales Karzinom
CTC		Circulating tumor cell
DBD		DNA-Bindungsdomäne
DCC		Deleted in Colorectal Cancer
DCE		dynamic contrast-enhanced
DFS		krankheitsfreies Überleben
DMSO		Dimethylsulfoxid
DNA		deoxyribonucleic acid
DPBS		Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTC		disseminated tumor cells
DWI		diffusion weighted imaging
E1		Estron
E2		Estradiol
E3		Estriol
ECM		Extrazellulärmatrix
EGFR		Epidermal Growth Factor Receptor
EMT		Epitheliale-Mesenchymale-Transition
eNOS		endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERE		Estrogen response Element
ERK		Extracellular Signal-Regulated Kinase
ER α		Östrogenrezeptor alpha
ER β		Östrogenrezeptor beta
ESR2		Estrogen Receptor beta
FACS		Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung
FAP		familiäre adenomatöse Polyposis
FBS		Fetales Bovines Serum
FM		Fluoreszenzmikroskopie
FOBT		fäkaler okkultter Bluttest
GPER		G-Protein-gekoppelter-Östrogenrezeptor
HAI		hepatische arterielle Infusion
hd		high-density
HDI		Human Development Index
HIPEC		hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie
HNPCC		hereditären nicht polypösen Kolonkarzinom-Syndrom
LBD		C-terminale Ligand-Bindungsdomäne
ld		low-density
MANOVA		multivariate Varianzanalyse
MAP		MUTYH-assoziierte Polyposis
MAPK		Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Mitogen-Activated Protein Kinase
MET		Mesenchymale-Epitheliale-Transition
MOI		Multiplicity of Infection
MSI		Mikrosatelliteninstabilität
nCTI		normierte CellTrace-Intensität
NGS		Next-Generation-Sequencing
OS		Gesamtüberleben
PARP		poly-ADP-ribose-polymerase

PI	<i>Propidiumiodid</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
PKA	<i>Proteinkinase A</i>
PKB	<i>Proteinkinase B</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PMN	<i>prämetastatischen Nische</i>
PRE	<i>promoter response elements</i>
RAR β	<i>Retinsäure-Rezeptor β</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	<i>Retinoblastom Protein</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RTK	<i>Rezeptor-Tyrosinkinase</i>
SAPK	<i>stress-activated-protein-kinase</i>
SHBG	<i>Sexualhormon-bindende Globulin</i>
SIRT	<i>selektiver interner Radioembolisation</i>
TACE	<i>transarterielle Chemoembolisation</i>
TME	<i>totale mesorektale Exzision, tumor micro environment</i>
TU	<i>total transducing units needed</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
UKD	<i>Universitätskrankenhaus Düsseldorf</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

Einheiten

g	Gramm
G	Mittlere Erdbeschleunigung
L	Liter
mol	Mol
m	Meter
s	Sekunde
U	<i>Unit</i>
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS KOLOREKTALE KARZINOM	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2	<i>Ätiologie</i>	2
1.1.2.1	Onkogenese - Adenom-Karzinom-Sequenz bei chromosomaler Instabilität	2
1.1.2.2	Hereditäres Kolonkarzinom	4
1.1.2.3	Risikofaktoren	5
1.1.3	<i>Symptome und klinisches Erscheinungsbild</i>	5
1.1.4	<i>Ausbreitung und Metastasierung</i>	6
1.1.4.1	Lebermetastasen	6
1.1.5	<i>Stadieneinteilung nach UICC und TNM</i>	7
1.1.6	<i>Therapie</i>	8
1.1.6.1	Chirurgische Therapie	8
1.1.6.2	Adjuvante Therapie	9
1.1.6.3	Neoadjuvante Therapie	9
1.1.6.4	Therapie bei Metastasierung und in der palliativen Situation	10
1.1.7	<i>Prävention und Diagnostik</i>	10
1.2	DORMANCY	11
1.2.1	<i>Dormancy</i>	11
1.2.2	<i>Arten von Dormancy</i>	12
1.2.3	<i>Dormancy im CRC mit Fokus auf Lebermetastasen</i>	13
1.2.4	<i>Zellzyklus</i>	14
1.2.5	<i>Dormancy-Signalwege</i>	15
1.2.5.1	MAPK/ERK Signalweg	15
1.2.5.2	PI3K/Akt/mTOR-Signalweg	17
1.2.5.3	Wnt/ β -catenin-Signalweg	18
1.2.5.4	Notch-Signalweg	18
1.3	ÖSTROGENE	19
1.4	ÖSTROGENREZEPTOREN	20
1.4.1	<i>Genetische Wirkung der Östrogenrezeptoren ERα und ERβ</i>	20
1.4.1.1	Ligandenabhängig-ERE	20
1.4.1.2	Ligandenabhängig-PRE	21
1.4.1.3	Ligandenunabhängig	22
1.4.2	<i>Nicht-genetische Wirkung der Östrogenrezeptoren ERα und ERβ</i>	22
1.4.3	<i>G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptoren</i>	23
1.5	ÖSTROGEN UND ÖSTROGENREZEPTOREN IM CRC HINSICHTLICH DORMANCY UND BIOLOGISCHES VERHALTEN	24
1.5.1	<i>Epidemiologie CRC und Östrogenstoffwechsel</i>	24
1.5.2	<i>Unterschiede im CRC nach Lokalisation und Östrogenrezeptorexpression</i>	25
1.5.3	<i>ERβ und CRC</i>	26
1.5.4	<i>Experimentelle Hinweise / in vivo und in vitro Studien CRC und ERβ</i>	27
1.5.5	<i>Hormonersatztherapie im CRC</i>	27
1.6	THERAPEUTISCHER AUSBLICK	29
1.6.1	<i>Therapie Dormancy und DTCs bei MRD im CRC</i>	29
1.6.2	<i>Monitoring MRD/Dormancy state</i>	31
1.6.2.1	Bildgebung	31
1.6.2.2	Biomarker	31
1.7	STELLUNGNAHME ZUM ETHIKVOTUM	32
1.8	ZIELE DER ARBEIT	32
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	MATERIALIEN	33
2.1.1	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	33
2.1.2	<i>Zelllinien</i>	33
2.1.3	<i>Plasmide</i>	34
2.1.4	<i>Reagenzien und Chemikalien</i>	34
2.1.5	<i>Verwendete Kits</i>	35
2.1.6	<i>Buffer, Medium und Lösungen</i>	35
2.2	GERÄTE	37
2.3	SOFTWARE	38

2.4	STATISTIK.....	39
2.5	METHODEN.....	40
2.5.1	Zellkultur.....	40
2.5.2	Zellzählung.....	41
2.5.3	Killing Curve.....	41
2.5.4	Lentivirale Transduktion.....	41
2.5.5	ERB-041 und PHTPP Stimulation.....	43
2.5.6	3D Matrigel-Versuch.....	44
2.5.7	Hoechst – Färbung.....	45
2.5.8	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
2.5.9	Image-J Protokoll.....	46
2.5.10	CellTrace-Experiment.....	46
2.5.11	BrdU-Assay.....	48
2.5.12	Durchflusszytometrie.....	51
2.5.12.1	Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Assays.....	52
2.5.12.2	Durchflusszytometrische Analyse des CellTrace-Assays.....	53
2.5.13	FACS-Zellselektion.....	53
3	ERGEBNISSE.....	54
3.1	TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ.....	54
3.2	CELLTRACE PROLIFERATIONS EXPERIMENT.....	57
3.3	BRDU-ASSAY.....	63
3.4	MATRIGEL-PROLIFERATIONS EXPERIMENT.....	70
3.4.1	Vergleich der ERB-041-, PHTPP- und DMSO-Gruppen bei HCT116-ESR2-GFP.....	73
3.4.2	Wachstumsverhalten HCT116-ESR2-GFP.....	75
3.4.3	Vergleich der low-density und high-density Kultur.....	81
3.4.4	SW620-GFP im Matrigel.....	83
3.4.5	Vergleich der Zelllinien.....	86
4	DISKUSSION.....	88
4.1	CELLTRACE-ASSAY: KEINE SIGNIFIKANZ; GERINGERER PROLIFERATION IN PHTPP-GRUPPE.....	89
4.2	LIGANDENUNABHÄNGIGE ANTIPROLIFERATIVE WIRKUNG DES ERB MÖGLICH.....	91
4.3	UNTERSCHIEDE SW620 UND HCT116.....	92
4.4	BRDU-ASSAY: KEIN ERB-041 VERMITTELT ZELLZYKLUSARREST BEI FEHLENDER SIGNIFIKANZ.....	92
4.5	MATRIGEL: STAGNIERENDE EINZELZELLEN UND WENIGER ORGANOIDE BEI ERB-041.....	94
4.6	LIMITATIONEN.....	96
4.7	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	97
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	98

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahre 2020 sind laut aktuellen Zahlen der „GLOBOCAN 2020“ Studie der Internationalen Agentur für Krebsforschung in Lyon (IARC) weltweit 19,3 Millionen Menschen neu an Krebs erkrankt (1). Insgesamt starben im Jahre 2020 10 Millionen Menschen aufgrund einer Krebserkrankung (1). Davon erkrankten im Jahr 2020 über 1,88 Millionen Menschen an einem kolorektalen Karzinom (CRC) und über 915 Tausend Menschen starben aufgrund einer kolorektalen Krebserkrankung (1). Damit ist das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Krebserkrankung (10%) und für die zweithäufigsten krebsbedingten Todesfälle weltweit im Jahre 2020 verantwortlich (9,4%) (1). Es stirbt einer von 10 Krebstoten aufgrund eines kolorektalen Karzinoms (1). Der Großteil der heutigen Krebspatienten stirbt nicht mehr an dem Primärtumor, sondern an den Folgen einer Metastasierung. Dies betrifft ca. 90% der Krebstodesfälle (2) und somit ca. 9 Millionen Patienten weltweit im Jahr 2020.

In Relation zur menschlichen Entwicklung gemessen am *Human Development Index* (HDI) steigt mit dem HDI die Inzidenz maligner Erkrankungen weltweit (1). Auf das Kolonkarzinom bezogen zeigt sich bei Männern in Ländern mit einem hohen bis sehr hohen HDI eine Inzidenz von z.B. 23,2/100.000 in Nordeuropa wohingegen sich in Ländern mit einem mittleren bis niedrigen HDI eine deutlich geringere Inzidenz zeigt von beispielsweise 5,9/100.000 in Nordafrika (1). Bei Frauen zeigt sich im Kolonkarzinom eine niedrigere Inzidenz in Ländern mit einem hohen bis sehr hohen HDI wie z.B. 18,8/100.000 in Nordeuropa und ebenfalls eine deutlich geringere Inzidenz in Ländern mit einem mittleren bis niedrigen HDI wie z.B. 5,4/100.000 in Nordafrika (1).

Aufgrund der zunehmenden Industrialisierung im Rahmen der Globalisierung und der demographischen Entwicklung mit einem steigenden Durchschnittsalter sind in der Zukunft maligne Erkrankungen vermehrt zu erwarten. So geht die Globocan2020 Studie im Jahre 2040 von 28,4 Mio. neuen Krebserkrankungen aus, dies ist eine Steigerung von 47% im Vergleich zum Jahre 2020 (1). Dies zeigt wie wichtig Fortschritte im Bereich der Prävention und Therapie von Krebserkrankungen sind und welche Relevanz schon jetzt in den westlichen Industrienationen besteht.

In Deutschland erkrankten im Jahr 2020 ca. 30.000 Männer und ca. 24.000 Frauen neu an einem CRC (3). In 2/3 der Fälle ist der Dickdarm betroffen (3). Im Laufe ihres Lebens erkranken in Deutschland 1/15 Männern und 1/19 Frauen an Darmkrebs (3), somit ist das CRC Risiko mit einem Verhältnis von 1:1,27 bei Männern größer. Bei einem Durchschnittsalter von 75

Jahren bei Frauen und 71 Jahren bei Männern bei Erstdiagnose im Jahr 2020 ist ein Großteil der Patienten über 70 Jahre alt (3). Nur ca. 10% Patienten erkranken vor dem 55. Lebensjahr (3). Die Fortschritte im Bereich der Früherkennung und die gute Prognose bei frühen Tumorstadien erklären die recht hohe relative 5-Jahres-Überlebensrate von 64% (Männer) bzw. 66% (Frauen) (3). So kann im Frühstadium durch eine vollständige endoskopische oder chirurgische Entfernung (R0 Resektion) eine vollständige Heilung erreicht werden (4). Die Prognose sinkt in höherem Tumorstadium, maßgeblich ist hier der Prozess der Metastasierung. Dabei wandern Tumorzellen über die Blut- und Lymphgefäße vom Ort des Primärtumors aus und breiten sich im Körper aus. Über diese sogenannte Disseminierung kommt es zu einer systemischen Erkrankung, die meist nicht mehr kurativ therapiert werden kann und die wichtigste Todesursache bei Krebserkrankungen darstellt. Beim CRC kommen in späteren Stadien zur chirurgischen Resektion multimodale systemische Therapiekonzepte zum Einsatz (4).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des sporadischen CRCs lässt sich grob in zwei Signalwege einteilen. Zum einen liegt in 80% der CRCs eine chromosomale Instabilität vor (5). Daneben liegt bei 12% der sporadischen CRCs eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) vor (5). Außerdem sind in 5-10% der Fälle hereditäre Kolonkarzinomformen bekannt. Da bei ca. 20-30% der CRCs eine familiäre Häufung ohne Identifizierung einer konkreten genetischen Ursache beobachtet wird, wird zudem das familiäre CRC abgegrenzt (4).

1.1.2.1 Onkogenese - Adenom-Karzinom-Sequenz bei chromosomaler Instabilität

Kolonkarzinome entstehen überwiegend aus gutartigen Vorstufen wie villösen oder tubulären Adenomen der Kolonschleimhaut, die in einem mehrstufigen Prozess zu invasiven Karzinomen mutieren, meist aufgrund einer chromosomalen Instabilität. Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz wurde 1978 von Hill und Morson postuliert (6). Fearon und Vogelstein konnten 1990 genetische Grundlagen des Modells der Adenom-Karzinom-Sequenz darlegen (7). Über einen Zeitraum von ca. 5-15 Jahren tritt eine schrittweise Transformation von Präkanzerosen zu invasiven Karzinomen auf, wobei es aufgrund von Mutationen in den Onkosuppressor- und Protoonkogenen zu Apoptosehemmung und unkontrollierter Proliferation kommt, wie in Abb. 1 schematisch dargestellt. Diese Ätiologie verdeutlicht den besonders hohen Stellenwert präventiver Maßnahmen im CRC. Meist betreffen diese Mutationen initial das APC-Gen, ein Tumorsuppressorgen, das für das Adenomatöse Polyposis Coli Protein kodiert (APC) (7). Physiologischerweise sorgt das APC-Protein für den Abbau des für Zellteilung über den Wnt-Signalweg wichtigen Transkriptionsfaktors β -Catenin (8). Eine β -Catenin Akkumulation im Zellkern bei Ausfall des APC-Gens sorgt für eine Induktion von proliferationsfördernden Genen wie MYC. Das Protoonkogen MYC kodiert für

den Transkriptionsfaktor c-MYC, der als Transkriptionsfaktor den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt (Zellproliferation). Dies geschieht einerseits über die c-MYC abhängige Expression von Cyclinen (D1, D2, B1) und der Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4), andererseits hemmt es zusätzlich die CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 (9). Somit gehen Defekte im APC-Gen mit einer unkontrollierten Proliferation der betroffenen Enterozyten einher und ein Adenom kann entstehen.

Bei zusätzlichen weiteren Mutationen auf Grund der gesteigerten Proliferation folgt die sukzessive weitere maligne Transformation zum Karzinom. Neben anderen beschriebenen Prozessen der Karzinomgenese spielen häufig auch Pathologien im KRAS-Protoonkogen und den Tumorsuppressorgenen DCC und p53 eine wichtige Rolle in der malignen Transformation (7). Das KRAS-Gen (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) kodiert für das KRAS-Protein, dass insbesondere im RAS/MAPK-Signalweg eine wichtige Funktion für Wachstum und Proliferation einnimmt. Liegt eine KRAS-Mutation vor kann eine dauerhafte Aktivierung zu einer ungehemmten Proliferation führen (10). In 50% der sporadischen CRCs liegt eine K-RAS Mutation vor (5). Das DCC -Gen (Deleted in Colorectal Cancer) ist ein Gen, dass zu 70% im CRC deletiert ist und somit eine Funktion als Tumorsuppressor angenommen wird (11). Bei Nachweis im CRC ist es mit einer positiven Prognose assoziiert (12). p53 ist ein wichtiger Tumorsuppressor, der über p21 Aktivierung einen Zellzyklusarrest verursacht, *deoxyribonucleic acid* (DNA) Reparatur veranlasst und BAX und PUMA vermittelt eine Apoptose bei irreparablen DNA-Schäden einleitet (5). Somit stellen Adenome ein CRC-Risiko dar und sollten frühzeitig entfernt werden, wobei die Adenomgröße mit dem Malignitätsrisiko proportional steigt (4).

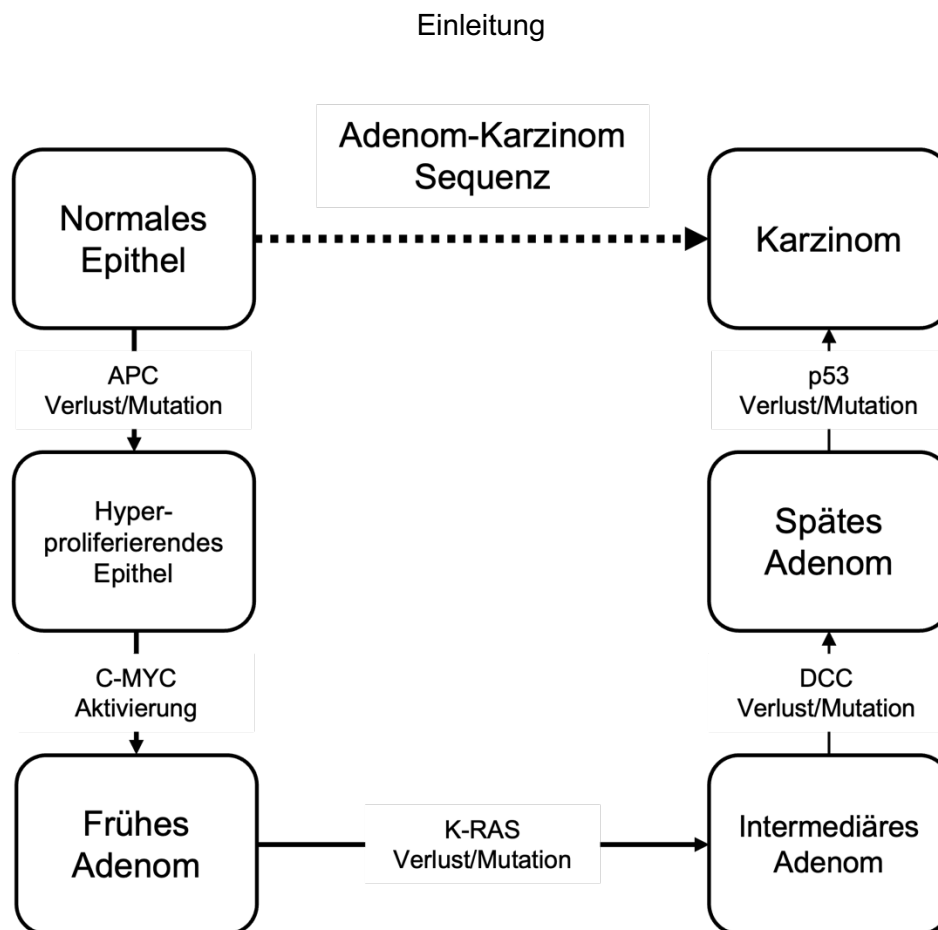


Abb. 1 Adenom-Karzinom Sequenz modifiziert nach F. Kullmann (5)

1.1.2.2 Hereditäres Kolonkarzinom

Diese zuvor genannten Defekte sind auch beim hereditären CRC (ca. 5-10%) verantwortlich, nur liegt die Mutation hier schon in der Keimbahn vor. So liegt bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) eine erbliche Mutation im APC-Gen vor, wodurch es bei Betroffenen fast immer zu einem CRC im Laufe ihres Lebens kommt (5). Bei hereditären CRCs kann es auch zu malignen Erkrankungen anderer Organe kommen, daher der Begriff der Tumorsyndrome. Beim häufigsten hereditären CRC handelt es sich um das Lynch Syndrom, auch hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom genannt (HNPCC)(5). Hierbei liegen Mutationen der *Mismatch*-Reparatur Gene der DNA vor, was zu einer Akkumulation von verschiedensten weiteren Mutationen, unter anderen auch in den sonst genetisch stabilen Regionen der Mikrosatelliten („Mikrosatelliteninstabilität“) führt. Auf Grund der Keimbahnmutation der *Mismatch*-Reparatur Gene kann es beim HNPCC außerdem noch zu anderen Karzinomen kommen, z.B. bei über 40% der betroffenen Frauen zum Endometriumkarzinom (5). Neben der FAP ist im Rahmen der adenomatösen Polyposis-Syndrome noch die MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP) und die attenuierte FAP zu nennen (4). Hamartomatöse Polyposen wie das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Cowden-Syndrom sind ebenfalls mit CRCs assoziiert (5).

1.1.2.3 Risikofaktoren

Zu den Risikofaktoren für ein sporadisches CRC gehören das männliche Geschlecht, höheres Alter, Nikotinabusus, Alkohol, Adipositas, fettreiche-ballaststoffarme Nahrung sowie der Verzehr von rotem Fleisch (3). Eine unspezifische familiäre Belastung mit CRCs oder das Vorliegen anderer Malignome geht ebenfalls mit einem erhöhten CRC-Risiko einher. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, bei der primären sklerosierenden Cholangitis und bei Diabetes mellitus Typ 2 besteht ein erhöhtes Risiko für ein CRC.

Protektiv gestalten sich körperliche Aktivität, eine schnelle Darmpassage und eine ausgewogene, ballaststoffreiche Ernährung (3).

Dem folgend zeichnen sich zwei Ebenen der Prävention des CRC ab. Einmal die Reduktion der oben genannten Risikofaktoren bei Steigerung der protektiven Faktoren im Rahmen der primären Prävention durch Aufklärung. Andererseits im Rahmen der sekundären Prävention durch DRU, Koloskopien und Stuhltests auf okkultes Blut ab dem mittleren Alter, da nur weniger als 10% vor dem 55. Lebensjahr erkranken und eine CRC-Vorstufen-Resektion kurativ ein CRC verhindern kann (3). Diese Vorsorgeuntersuchungen, wie sie in einigen Ländern, z.B. Deutschland mittlerweile durchgeführt werden, sind für den leichten Rückgang der Mortalität in den letzten Jahren verantwortlich

1.1.3 Symptome und klinisches Erscheinungsbild

Kolonkarzinome können bei langsamem Wachstum lange asymptomatisch bleiben und daher eine beträchtliche Größe bei Diagnosestellung aufweisen, ein okkultes Blutverlust über den Stuhl ist jedoch vorher häufig zu detektieren (13). Bei Nachweis von perianalem Blutabgang und okkultem Blutabgang sollte daher auch bei Vorliegen einer bekannten Erklärung für die Blutung wie z.B. Hämorrhoidalleiden an ein Kolonkarzinom gedacht und dieses ausgeschlossen werden (13).

Aufgrund der Tatsache, dass linksseitig im Colon descendens ein kleineres Lumen vorliegt und der Stuhl zunehmend eine festere Konsistenz aufweist, kommt es häufiger und früher bei linksseitigem Karzinom zu Darmverschlüssen und Obstipationsbeschwerden (13). Somit kann sich ein Kolonkarzinom auch als Notfall demaskieren und für einen mechanischen Ileus (ca. 10%) oder eine Darmperforation (2-5%) verantwortlich sein (13). Das weitere klinische Bild hängt neben allgemeinen Tumor-Symptomen wie B-Symptomatik maßgeblich von den von Metastasen betroffenen Organen ab, wie in Tabelle 1 aufgeführt.

Frühsymptome		Spätsymptome	
Lokal	Systemisch	Metastasen	
Blut im Stuhl	Anämie	Leber	Ikterus
Auffällige Stuhlgewohnheiten	Gewichtsabnahme		Leberinsuffizienz
Schmerzen, Krämpfe	Leistungsknick	Lunge	Husten
Ileus	Paraneoplastische Syndrome		Dyspnoe
Tastbare Raumforderung	B-Symptomatik	Skelett	Path. Brüche, Schmerzen
		ZNS	Neurologische Defizite
		Lokal	Peritonealkarzinose, Infiltration benachbarter Organe

Tabelle 1 Zusammenstellung der Symptome und des klinischen Erscheinungsbildes des kolorektalen Karzinoms (13, 14)

1.1.4 Ausbreitung und Metastasierung

Das unkontrollierte Wachstum eines Kolonkarzinoms führt einerseits zu einer lokalen Ausbreitung (per continuitatem) mit Infiltration des perikolischen Fettgewebes nach außen sowie einem endoluminalen Wachstum, welches zu einer Darmstenose führen kann. Andererseits erfolgt eine indirekte Ausbreitung bei Absiedelung einzelner Tumorzellen von einem Primärtumor über das Lymphsystem oder die Blutgefäße, wodurch es zu Metastasen kommen kann. Wird das Bauchfell durchbrochen kann dies zu einer Peritonealkarzinose führen. Bei lymphogener Ausbreitung kommt es zu Lymphknotenmetastasen entlang der je nach Tumorlokalisation entsprechenden drainierenden Lymphgefäße. Bei hämatogener Metastasierung treten abgesiedelte einzelne Tumorzellen als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) in die Blutbahn über. So gelangen CTCs zu Sekundärorganen, wo sie mit dem dortigen Mikromilieu in Kontakt treten und sich so als sogenannte disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells*, DTCs) ansiedeln und im Verlauf Metastasen bilden können. Über das portalvenöse Blut kommt es in der Regel zunächst zu einer hämatogenen Metastasierung in die Leber, von dieser dann weiter über das Lebervenenblut in die Lunge und weitere Organe.

Für den Prozess der Metastasierung erlangen epitheliale Tumorzellen mesenchymale Eigenschaften (Motilität und Invasivität), um sich vom Primärtumor abzulösen und invasiv in Lymph- oder Blutgefäße zu penetrieren. Den Prozess nennt man Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) (2). Wenn eine CTC durch Endotheladhäsion und Extravasation an einem anderen Organ ins Gewebe gelangt, findet ein gegensätzlichen Zellprogramm statt, die sogenannte Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) (2).

1.1.4.1 Lebermetastasen

Sowohl beim lokalen als auch beim fortgeschrittenen CRC ist das häufigste Zielorgan der Metastasierung die Leber. Die meisten Patienten versterben an einer Metastasierung (15).

Dass es beim CRC so häufig zu kolorektalen Lebermetastasen (*colorectal liver metastasis*, CLM) kommt lässt sich mutmaßlich anatomisch erklären. Über die Mesenterialvenen erfolgt die portalvenöse Drainage des Darms direkt in die Lebersinusoide (16). Beim Vergleich von peripher-venösem Blut und von portalvenösem Blut von CRC-Patienten konnten im portalvenösen Blut signifikant mehr CTCs nachgewiesen werden (17). Dies lässt auf eine Filterfunktion der Leber für CRC-CTCs schließen (17) und die Prädisposition für eine CLM-bildende Extravasation von CTCs begründen.

Ein Viertel der CRC-Patienten weist bereits bei Erstdiagnose eine CLM auf (18). Von Patienten, die initial nur lokal infiltrierende CRCs ohne Metastasierung aufwiesen, entwickeln 50% im Verlauf der Erkrankung eine CLM (19).

1.1.5 Stadieneinteilung nach UICC und TNM

Das unter Absatz 1.1.4 beschriebene Proliferationsverhalten von CRCs ist prognostisch und therapeutisch relevant und folglich in der Stadieneinteilung wiederzufinden. Die Einteilung der Stadien des CRC erfolgt nach der gängigen TNM-Klassifikation für Malignome, in Tabelle 2 aufgeführt. T steht dabei für die Tumorgöße und Eindringtiefe im Falle des CRC von der Basalmembran nach extraluminal. N steht für die Menge der infiltrierten regionalen Lymphknoten und M für Metastasen. Weiterhin von Bedeutung ist das histopathologische Grading, das den Differenzierungsgrad angibt. Mit steigendem Grading geht eine aggressivere und invasivere Dysplasie einher, die antiproportional eine sinkende Prognose bedeutet.

Diese Form der Verschlüsselung der im Rahmen des Staging erhobenen Informationen lassen durch ein weltweit einheitliches Nutzen beim Erheben von Studien eine Aussage über Prognose und Therapiemöglichkeiten treffen und werden herangezogen von der Union for International Cancer Control (UICC) um eine klinische Stadieneinteilung vorzunehmen.

Solange kein Lymphknotenbefall und keine Fernmetastasierung vorliegt, liegt je nach Infiltrationstiefe ein Stadium I oder II vor. Sobald ein Lymphknotenbefall hinzukommt, liegt mindestens ein Stadium III und sobald eine Fernmetastasierung vorliegt ein Stadium IV vor. Diese genannten Unterscheidungen stellen wichtige Weichen im Therapiealgorithmus dar.

UICC 2010		T	N	M
Stadium 0		Tis	N0	M0
Stadium I		T1 / T2	N0	M0
Stadium II		T3 / T4	N0	M0
	IIA	T3	N0	M0
	IIB	T4a	N0	M0
	IIC	T4b	N0	M0
Stadium III		jedes T	N1 / N2	M0
	IIIA	T1 / T2	N1	M0
		T1	N2a	M0
	IIIB	T3 / T4	N1	M0
		T2 / T3	N2a	M0
		T1 / T2	N2b	M0
	IIIC	T4a	N2a	M0
		T3 / T4a	N2b	M0
		T4b	N1 / N2	M0
	Stadium IV		jedes T	jedes N
	IVA	jedes T	jedes N	M1a
	IVB	jedes T	jedes N	M1b

Tabelle 2 UICC-Klassifikation des Kolorektalen Karzinoms modifiziert nach S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1, 2019, AWMF (20)

1.1.6 Therapie

1.1.6.1 Chirurgische Therapie

Bei einem kurativen Therapieansatz besteht die Therapie des Kolonkarzinoms primär aus einer radikalen chirurgischen Resektion (4). Da einerseits befallene Lymphknoten mit reseziert werden sollten, aber andererseits auch bei N0-Karzinomen die Anzahl der resezierten Lymphknoten mit der Prognose korreliert, sollten generell bei chirurgischer Resektion die regionalen Lymphknoten entfernt werden (4). Die drainierenden Lymphknoten folgen in ihrem Verlauf den mesenterialen Arterien. Unmittelbar am Kolon befinden sich die parakolischen Lymphknotenstationen (D1), entlang der radiären Arterien die intermediären Lymphknoten (D2) und abgangsnah die zentralen Lymphknoten (D3). Dementsprechend orientieren sich die Resektionsgrenze anhand der Tumorlokalisation und der entsprechenden Anatomie der Lymph- und Blutgefäße, wie in Tabelle 3 dargestellt (21). Es sollten mindestens 12 Lymphknoten im pathologischen Resektat enthalten sein (4). Befallende Lymphknoten befinden sich in einem longitudinalen Umfang von 10cm in beide Richtungen des Primärtumors, somit sollte nach Möglichkeit ein Sicherheitsabstand von mindestens 10cm eingehalten werden (4). Da die Lymphknoten im Gewebe des Mesokolon eingebettet sind, gilt es eine komplette mesokolische Resektion (CME) anzustreben, mit dem Ziel eine komplette Resektion (R0-Resektion) en bloc zu erreichen (4).

Diese Technik der CME wurde von W. Hohenberger analog zur zuvor etablierten totalen mesorektalen Exzision (TME) nach R.J. Heald (22) für das Rektumkarzinom, als standardisierte OP-Methode etabliert (21). Eine Dissektion des viszeralen und parietalen Blattes des Mesokolons sollte beidseits ohne Verletzung erfolgen mit einer maximalen D3-

Lymphknotenausbeute durch eine schichtgerechte Mobilisation des tumortragenden Darmabschnitts mit Freilegen der Mesenterialwurzel und zentraler Gefäßligatur (21).

Die Qualität der Resektion kann man anhand von intakten Schichten, insbesondere des viszerale Blattes des Mesokolons, im pathologischen Resektat bemessen (23).

Nach Möglichkeit sollte die Operation Kontinuitätserhaltend erfolgen. Bei Notfallsituationen ist dies ggf. nicht möglich und es kann sinnvoll bzw. nötig sein ein protektives oder endständiges Stoma anzulegen (4).

Tumorlokalisation	Regeloperation/Kolonresektion	Lymphabflussgebiet entlang der arteriellen Versorgung
Zökum und Colon ascendens	Hemikolektomie rechts	A. ileocolica A. colica dextra
Rechte Kolonflexur und prox. Colon transversum	erweiterte Hemikolektomie rechts	A. ileocolica A. colica dextra A. colica media A. gastroepiploica dextra
Colon transversum	Transversumresektion	A. colica media
linke Kolonflexur	erweiterte Hemikolektomie links	A. colica media A. colica sinistra
Colon descendens und proximales Sigma	Hemikolektomie links	A. colica sinistra
mittleres und distales Sigma	Sigmaresektion	A. mesenterica inferior

Tabelle 3 Resektionsverfahren des Kolonkarzinoms in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation. Modifiziert nach Duale Reihe Chirurgie, 4. Auflage, 2012 (24)

1.1.6.2 Adjuvante Therapie

Nach erfolgter R0-Resektion ist ab UICC-Stadium III eine adjuvante Chemotherapie empfohlen (4). Im UICC-Stadium II kann eine adjuvante Chemotherapie bei Vorliegen von Risikofaktoren (Monotherapie mit Fluoropyrimidinen) erfolgen (4). Ist die Infiltration auf die Muscularis propria beschränkt (T2) so handelt es sich um UICC-Stadium I, das einer reinen chirurgischen Resektion bedarf, ohne postoperative Chemotherapie (4).

Die unter dem Kapitel 1.2 erwähnten immunzytologischen Nachweise von disseminierten isolierten Tumorzellen in Knochenmarkbiopsien oder Lymphknoten, sowie zytologische Tumorzellbefunde in Peritonealspülungen, stellen aktuell keine Indikation zur Durchführung einer adjuvanten Therapie dar und sind aktuell im Rahmen von Studien Gegenstand der Forschung (20).

1.1.6.3 Neoadjuvante Therapie

Im Kolonkarzinom wird eine neoadjuvante Therapie nicht standardmäßig angewandt, während sie beim Rektumkarzinom des unteren und mittleren Rektum Drittels im UICC-Stadium II und III erfolgen sollte (20). Aktuelle klinische Studien zur Anwendung einer Neoadjuvanten Therapie auch bei Kolonkarzinomen werden aktuell durchgeführt und könnten auch hier für eine Änderung des Behandlungspfades führen.

1.1.6.4 Therapie bei Metastasierung und in der palliativen Situation

In fortgeschrittenem Stadium orientiert sich das Vorgehen in der palliativen Situation maßgeblich am Allgemeinzustand der Patienten, der Lokalisation von Tumor und Metastasen, sowie der molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors (20). Grundsätzlich ist die Therapieentscheidung im fortgeschrittenen Stadium eine individuelle Entscheidung. Diese sollte in einer interdisziplinären Tumorkonferenz getroffen werden, die neben der Tumorthherapie auch im Sinne eines ganzheitlichen Therapieansatzes getroffen wird unter Berücksichtigung einer adäquaten Ernährungsmedizin, Schmerztherapie und bedarfsgerechter psychoonkologischer und psychosozialer Betreuung (20). Eine Operation kann auch bei nicht kurativem Ziel (R1-Resektion) zur Senkung der Symptomlast (Schmerzen, Obstipation) und zur Komplikationsbeherrschung indiziert, wenn nicht sogar nötig, sein (Ileus, Blutung).

Ist eine primäre Resektion von Metastasen möglich, sollte diese erfolgen (20). Bei primär nicht resektablen Metastasen sollte eine systemische Chemotherapie erfolgen, die in ihrer Intensität dem Allgemeinzustand und in ihrer Zusammensetzung der Molekularbiologie des Tumors angepasst ist (20).

Eine Analyse der RAS-Gene, des BRAF-Gens und der Mikrosatelliteninstabilität sollte erfolgen (20). Bei Vorliegen eines RAS-Wildtyps und linksseitiger Primärtumorlage ist es empfohlen neben Chemotherapie eine gegen den *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) gerichtete anti-EGFR-Therapie durchzuführen (20). Weitere eingesetzte Substanzen sind Antikörper gegen den vaskulären-endothelialen-Wachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor* = VEGF) wie Bevacizumab oder bei Vorliegen einer HER-2 Amplifikation HER-2-Antikörpern wie Trastuzumab und Lapatinib (20). Bei MSI können Immun-Checkpoint Inhibitoren eingesetzt werden (20).

Disseminierte Lebermetastasen können mittels selektiver interner Radioembolisation (SIRT) oder durch Anwendung von intraarterieller Chemotherapie behandelt werden. Zu nennen ist die hepatische arterielle Infusion (HAI) sowie die transarterielle Chemoembolisation (TACE), lokale ablativ Verfahren können ebenfalls verwendet werden (20).

Unter bestimmten Bedingungen kann bei Vorliegen einer Peritonealkarzinose eine zytoreduktive Chirurgie mit anschließender hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie (HIPEC) angewandt werden (20).

Anschließend folgt ein engmaschiges Nachuntersuchungsregime mit laborchemischen, endoskopischen und bildgebenden Methoden (20).

1.1.7 Prävention und Diagnostik

Im Rahmen der Prävention für die asymptomatische Bevölkerung sollte ab dem 50. Lebensjahr mit Vorsorgeuntersuchungen begonnen werden (4). Die höchste Sensitivität und Spezifität

liegt bei der kompletten Koloskopie vor und sollte alle 10 Jahre erfolgen (20). Alternativ sollte jährlich ein fäkaler okkultter Bluttest erfolgen (FOBT), bei Auffälligkeit sollte dann eine Koloskopie erfolgen. Bei Unmöglichkeit der kompletten Koloskopie sollten bildgebende Verfahren ergänzend hinzugezogen werden.

Bei koloskopischem Karzinomnachweis sollte eine histologische Aufarbeitung erfolgen, das Therapiekonzept sollte in einer interdisziplinären Tumorkonferenz beschlossen werden (20).

Zum präoperativen Staging gehört mindestens eine komplette Koloskopie, CEA-Bestimmung (Carcinoembryonales Antigen), Abdomensonographie und ein Röntgenthorax. Ergänzend sollte beim Rektumkarzinom eine starre Rektoskopie, MR-/CT-Becken und eine rektale Endosonographie erfolgen. Bei Verdacht auf Fernmetastasen sollte ergänzend eine CT des Thorax oder des Abdomens durchgeführt werden. Für das Monitoring eines Rezidivs ist die CA 19-9 Bestimmung sinnvoll (20).

Bei Verdacht auf hereditäre Karzinome gelten andere, teils individuelle Vorsorgeregime, hier sporadisch aufgeführt (20).

Beim anamnestischen Verdacht auf das Lynch-Syndrom/HNPCC, gemäß der Amsterdam- und Bethesda-Kriterien, sollten molekulopathologische Untersuchungen erfolgen bezüglich der immunhistochemischen Expression von *DNA-Mismatch-Reparatur-Proteinen* und eine Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität erfolgen (20). Ab dem 25. Lebensjahr sollte eine jährliche koloskopische Vorsorge erfolgen (20).

Bei Verdacht auf familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) sollte ab dem 10. Lebensjahr eine genetische Beratung und Diagnostik erfolgen (20). Bei Vorliegen einer APC-Keimbahnmutation sollte ab dem 10. Lebensjahr eine jährliche Koloskopie erfolgen, die Proktokolektomie ist indiziert (20).

Bei Colitis ulcerosa sollten Vorsorgeuntersuchungen individuell nach Krankheitsaktivität, bei starker Aktivität spätestens 8 Jahre nach Symptombeginn, alle 1-2 Jahre erfolgen (20).

1.2 Dormancy

1.2.1 Dormancy

Dormancy ist ein Forschungsbereich (aus dem Englischen: „*Dormancy*“, bedeutend: „Ruhezustand“), der sich mit den Prozessen der Metastasierung und dem Reaktivierungspotential nach der Ruhephase bzw. mit dem Erhalt der Ruhephase von Tumorzellen beschäftigt. Anfängliche Arbeiten von Rupert Willis beschäftigen sich bereits 1934 mit dormanten Tumorzellen, bereits 1954 wurde von Geoffrey Hadfield bezüglich des Wiederauftretens von Tumorerkrankungen ein temporärer Mitose-Arrest vermutet (25). Von einem Primärtumor lösen sich Tumorzellen und treten als zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) in die Blutbahn über. Dies kann bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt geschehen, zu dem der Primärtumor selbst noch nicht diagnostizierbar ist (26).

So gelangen CTCs zu Sekundärorganen wo sie mit dem dortigen Mikromilieu in Kontakt treten und sich so als sogenannte disseminierte Tumorzellen (*disseminated tumor cells*, DTCs) ansiedeln. Während der *Dormancy* können die einzelnen DTCs nicht klinisch diagnostiziert werden. Diese Phase der Erkrankung nennt man „minimal residual disease (MRD)“, auf die klinisch momentan nur mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen reagiert wird.

Man geht davon aus, dass manche DTCs direkt eine Metastase bilden, andere DTCs jedoch in der Lage sind, in einem Ruhezustand (*Dormancy*) zu überleben und erst Monate oder Jahre später Ausgangspunkt einer Metastase zu werden.

Da während der *Dormancy* wahrscheinlich keine Zellteilungen stattfinden, sind dormante DTCs in dieser Zeit nicht durch konventionelle antiproliferative Chemo- oder Radiotherapie behandelbar (27). Daher ist der noch nicht endgültig erforschte Prozess der Entstehung einer Metastase aufgrund des Erwachens aus *Dormancy*, bzw. die *Dormancy* erhaltenden Prozesse, von großem klinischem Interesse. Hieraus gewonnene Informationen könnten direkt neue therapeutische Möglichkeiten darstellen, um maligne Erkrankungen besser zu verstehen und erfolgreicher zu therapieren.

1.2.2 Arten von Dormancy

Auf Organoid-Ebene beschreibt das Modell der Tumormassen-*Dormancy* ein sich im Gleichgewicht befindendes Verhältnis von Tumor Auf- und Abbau (28). Für die Zellproliferation benötigt ein Tumor Energie und Ressourcen, damit diese ihn erreichen werden neue Gefäße gebraucht. Somit spielen die Prozesse, die die Angiogenese beeinflussen eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum. Neben der Angiogenese stellt die Immunüberwachung einen weiteren zentralen Aspekt dar (28). Wird eine Tumorzelle vom Immunsystem als solche erkannt, so wird sie durch Apoptose Induktion beseitigt. Gelingt es jedoch einer Tumorzelle durch Anpassungen sich der Immunüberwachung zu entziehen, so kann ein unkontrolliertes Tumorwachstum entstehen.

Im Modell der Tumorzell-*Dormancy* werden die Prozesse auf Zellebene betrachtet (29). Sie ist charakterisiert durch minimale Proliferation, minimales Zellsterben und die Eigenschaft der Reversibilität (28). Die dormanten Zellen stellen die Proliferation ein, bleiben jedoch lebendig und stoffwechselaktiv. Für den Erhalt des minimalen Metabolismus wird eine die dormanten Tumorzellen ernährende Umgebung benötigt. Wang et al. beschreiben hier für das CRC die Bildung einer prämetastatischen Nische (PMN=*primary tumor-modified pre-metastatic niche*) (30). Dormante Tumorzellen befinden sich in einem temporären G0/G1 Zellzyklus Arrest (25). Zellzyklusarrest ist ebenfalls eine Strategie von Tumorzellen um unter dem Stress von Tumortherapien, z.B. Chemotherapien, zu überleben. Hier ist jedoch zu unterscheiden zwischen primär dormanten DTCs und sogenannten *drug-resistant* Zellen, die erst durch

Stress in einen non-proliferativen Zustand kamen (25). Immunologische Prozesse die zum „*Immune escape*“ führen sind ebenfalls relevant für dormante Tumorzellen (25).

Eine Eigenschaft von *Dormancy* ist die Reversibilität des Zellzyklusarrests und somit die krankheitsdefinierende Fähigkeit Metastasen zu bilden (25). Hier können verschiedene extrinsische Prozesse zur Reaktivierung führen, unter anderem im umgebenden Tumormikromilieu, in der Extrazellulärmatrix, durch inflammatorische Prozesse, durch Wechselwirkungen mit anderen Zellen und abhängig von der Sauerstoffversorgung (25).

Ein intrinsischer Mechanismus, bei dem es nach Ansammlung eines ausreichenden Nährstoffvorrats zu einem Erwecken der dormanten Tumorzelle kommt, wird von Phan et al. vermutet (31). Um Energie zu sparen nutzen dormante Tumorzellen Autophagie, um im langfristigen dormanten Zustand zu überleben (32).

1.2.3 Dormancy im CRC mit Fokus auf Lebermetastasen

Einzelne DTCs sind in Studien für das CRC im Knochenmark nachgewiesen worden (33-35). Da das Knochenmark für Biopsien bei Patienten viel leichter und risikoärmer zugänglich ist als z.B. das Lebergewebe, gibt es mehr Studien, die sich mit DTCs im Knochenmark beschäftigen, als in der Leber.

Für eine frühe Dissemination und Verbleib von dormanten Tumorzellen beim CRC sprechen die folgenden Studienergebnisse, bei denen es nach früher radikaler Therapie zu einer späteren erneuten Erkrankung kam:

- Patienten, die initial nur ein lokal infiltrierendes CRC ohne Metastasierung aufwiesen, entwickeln in 50% im Verlauf der Erkrankung eine CLM (19).
- Nach kompletter R0 Resektion dieser CLM kommt es bei ca. 60% der Patienten dennoch innerhalb von 2 Jahren zu einem Rezidiv (18).
- Patienten, die bei Erstdiagnose ein lokales, sehr frühes Stadium eines CRCs aufweisen (UICC Stadium I, Dukes Stadium A), welches R0 reseziert wurde, entwickeln in ca. 6% der Fälle innerhalb von 10 Jahren nach Operation eine CLM (15).
 - 1/3 dieser Patienten entwickeln erst nach 5-10 Jahren eine CLM

Dieses späte Auftreten einer Metastase lässt darauf schließen, dass sich bereits vor R0 Resektion des Primärtumors Tumorzellen in der Leber angesiedelt haben, die nach langer Ruhephase ein Reaktivierungspotential aufweisen (36). Auch wenn die Tatsache, dass 90% der Patienten nicht an den Folgen eines Primärtumors, sondern an den Folgen einer Metastasierung versterben (2), hinsichtlich der Therapie des Primärtumors erfreulich ist, ist ein wissenschaftlicher Fokus auf die Mechanismen der Metastasierung äußerst sinnvoll.

1.2.4 Zellzyklus

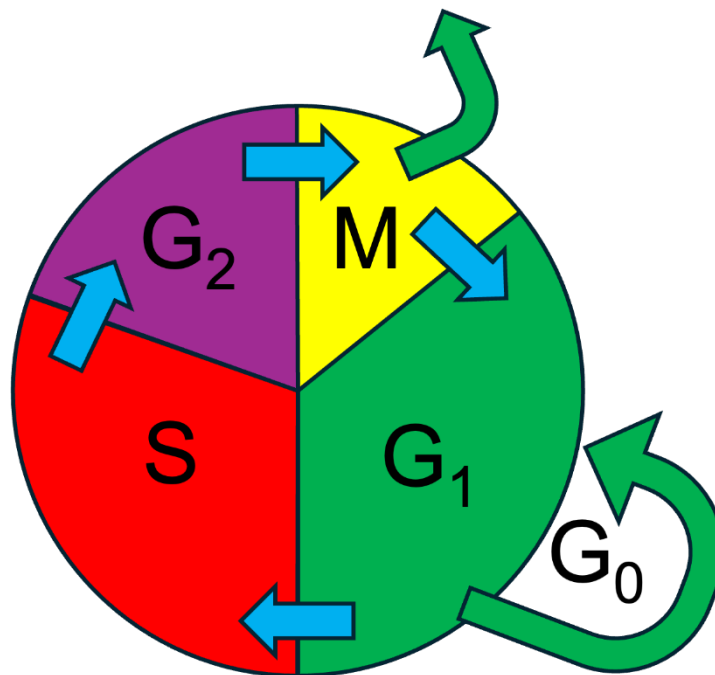


Abb. 2 Zellzyklus

Ob eine Zelle proliferiert oder dormant verbleibt, wird durch den streng kontrollierten Zellzyklus reguliert. Hier gibt es Schlüsselproteine und Schaltstellen, die durch eine Kontrollfunktion ein reguliertes und intaktes Wachstum bezwecken sollen. Der in Abb. 2 dargestellte Zellzyklus lässt sich in vier Hauptphasen einteilen. In der G₁-Phase (Gap 1) wird durch Wachstum und Synthese der benötigten Enzyme und Proteine die DNA-Replikation vorbereitet (37). In der S-Phase (Synthese) findet die DNA-Replikation statt, sodass am Ende ein doppelter Chromosomensatz vorliegt. In der folgenden G₂-Phase (Gap 2) findet erneut die Vorbereitung auf die anstehende Zellteilung durch Synthese der Zellorganellen und benötigten Ressourcen statt. In der M-Phase (Mitose) erfolgt die tatsächliche Zellteilung (37).

Dieser Prozess der Zellteilung, der unkontrolliert im Rahmen der Onkogenese verheerende Folgen hat, wird streng überwacht. Zu erwähnen sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), die durch Cycline in Ihrer Aktivität reguliert werden und bei nuklearer Akkumulation zum Zellzyklusfortschritt führen (38). Des Weiteren sind Tumorsuppressorproteine wie p53 oder Retinoblastom Protein (Rb) wichtige Inhibitoren des Zellzyklus bei z.B. DNA-Schäden, um Reparaturen und ggf. eine Apoptose bei irreparablen Strangbrüchen einzuleiten. Apoptose ist ein geordneter biologischer Prozess, der zum kontrollierten Zelltod führt. Dieser physiologische Prozess schützt vor Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen. Apoptose kann intrinsisch (Zellschäden), extrinsisch und durch Immunzellen (Zytotoxische T-Zellen) eingeleitet werden. In diesem komplexen Zellprogramm sind Caspasen involviert, die einen Zellabbau einleiten. Eine Entzündungsreaktion bleibt aus und die Zellreste werden schlussendlich durch Phagozytose abgebaut. Bei therapeutisch eingesetzter Chemotherapie können die dadurch verursachten DNA-Schäden eine p53 Akkumulation verursachen. p53

bindet an den p21-Promoter, wodurch eine p21 Transkription erfolgt. p21 verursacht einen Zellzyklusarrest (37). Bevor eine weitere Phase des Zellzyklus stattfindet, bedarf es der Freigabe durch Checkpoints, damit sich keine beschädigten Zellen vermehren. Wichtige Checkpoints befinden sich zwischen G1- und S-Phase, sowie zwischen G2- und M-Phase. Eine dormante Zelle befindet sich im Zellzyklusarrest. Dieser kann durch CDK-Inaktivierung, die Aktivierung von Tumorsuppressoren oder Induktion von Zellzyklusinhibitoren wie p21 und p27 herbeigeführt werden.

1.2.5 Dormancy-Signalwege

1.2.5.1 MAPK/ERK Signalweg

Der MAPK/ERK Signalweg (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase*) ist ein Signalweg, der extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren (Mitogene) durch Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) wahrnimmt und letztendlich die Zelldifferenzierung, Wachstum und Überleben reguliert (10).

Eine Aktivierung einer RTK führt über Dimerisierung und Autophosphorylierung zur RAS-Aktivierung. Die GTPase RAS aktiviert eine Serin/Threonin-Kinase RAF (z.B. BRAF), die wiederum die Kinase MEK aktiviert (10). MEK aktiviert durch Phosphorylierung schließlich ERK (10). ERK führt zu einer Zellkerntranslokation und Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-Myc. c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der vom MYC-Protoonkogen kodiert wird und den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus bewirkt. C-Myc bewirkt eine Zellproliferation einerseits über die Expression von Cyclinen (D1, D2, B1) und Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4), andererseits hemmt es CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 (9).

Die Proteine p21 und p27 haben damit Einfluss auf Zellzyklus Schlüsselstellen bei zellulärer *Dormancy*, da diese als Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren eine Fortführung des Zellzyklus hemmen (39).

Ein Mikromilieu mit Hypoxie ist mit einer niedrigen ERK-Aktivität assoziiert (40), Fluegen et al. konnten anhand von DTCs eines mit Hypoxie behandelten Primärtumors eine erhöhte Expression von den *Dormancy*-Markern NR2F1, DEC2 und p27 zeigen (41).

Der MAPK/ERK-Signalweg spielt eine zentrale Rolle und kann durch seine Einflussmöglichkeiten *auf* den Zellzyklus bei niedriger Aktivität einen dormanten Zustand von Tumorzellen erhalten oder bei erhöhter Aktivität zu einem Erwecken aus *Dormancy* führen (42). Das Verhältnis der Aktivität der Proteine p38 und ERK zueinander wurde als eine der wichtigsten Schaltstellen, die ein Aufwachen aus oder das Erhalten von *Dormancy* bewirkt, identifiziert (43). p38-SAPK (*stress-activated-protein-kinase*) ist eine MAPK, die eine zentrale Rolle bei der zellulären Stressantwort spielt und beispielsweise durch UV-Strahlungsexposition, Entzündungszytokine oder osmotischen Stress aktiviert wird. Im

weiteren Verlauf aktiviert p38 wiederum durch Phosphorylierung u.a. Transkriptionsfaktoren und den Tumorsuppressor p53 mit Einfluss auf Wachstum, Differenzierung und Apoptose (44). Beim HNSCC konnte in vivo eine Assoziation von *Dormancy* mit der Aktivierung via Phosphorylierung von p38 gezeigt werden (45). Gegensätzlich konnte durch pharmakologische Inhibierung von p38 in Mäusen mit HNSCC eine Aktivierung von dormanten Zellen in der Leber demonstriert werden (45).

Eine niedrige ERK-Aktivität ist jedoch nötig für eine Stoffwechselreduzierung die ein effizientes Überleben einer dormanten Zelle in Energie- und Ressourcen-armer Umgebung ermöglicht (46). Dies wird unter anderem mittels Autophagie ermöglicht (46). Somit handelt es sich nicht um eine Schalterfunktion, vielmehr entscheidet eine feine Balance der Intensität der ERK-Aktivität über einen „Überlebensmodus“ im Zellzyklusarrest oder Proliferation (46).

Die Tumorumgebung mit der Extrazellulärmatrix (ECM) kann ebenfalls auf diese Schaltstelle Einfluss nehmen. So kann Fibronectin im ECM der DTCs beispielsweise mitogen wirken und zu einer erhöhten ERK-Aktivität bei gleichzeitig verminderter p38 Aktivität führen und somit DTC-Proliferation und Mikrometastasenbildung verursachen (47). Fibronectin ist beispielsweise in dem in den Experimenten verwendeten Matrigel enthalten (48).

Neben den genannten Faktoren können jedoch auch Mutationen verantwortlich sein für eine Einflussnahme auf die ERK-Aktivität wie beispielsweise BRAF- und RAS-Mutationen, wobei durch anhaltende Kontrollmechanismen-resistente ERK-Signalwegaktivierung Tumorproliferation ausgelöst werden kann (49).

Der RAS-ERK-Signalweg kann durch einen weiteren *Dormancy*-relevanten Signalweg aktiviert werden. Der Urokinase Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) ist ein auf der Zelloberfläche befindliches Glykoprotein welches mit diversen Proteinen wie z.B. Integrinen interagieren kann und eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Prozessen und Gewebeumbau innehat. Physiologisch geschieht dies im Rahmen der Wundheilung, pathologisch bei Zellmigration und Metastasierung (50).

Eine Interaktion des $\alpha 5 \beta 1$ -Integrins und Vitronectin mit dem uPAR führt zur Bildung des uPAR- $\alpha 5 \beta 1$ Komplexes, der zu einer RAS-Aktivierung führt und somit zur Aktivierung des RAS-ERK Signalweges (25).

Eine Blockade des uPAR- $\alpha 5 \beta 1$ Komplexes konnte mit einer Unterdrückung der Tumorzellproliferation assoziiert werden (25).

Aguirre-Ghiso et al. konnten zeigen, dass es neben der RAS-ERK Aktivierung auch zur uPAR vermittelten Bildung von Fibronectin-Fibrillen kommt, die wiederum die p38-Aktivität unterdrückt (51), was durch zusätzliche Enthemmung der Zellzykluskontrolle zu vermehrter Proliferation führt. Bei direkter pharmakologischer oder genetischer Unterdrückung von p38-Aktivität kam es zu einer ERK-Aktivierung und uPAR-Überexpression, was letztendlich zu einem Erwecken aus *Dormancy* führte (51).

Mittels uPAR-Aktivierung kommt es zum Umbau von Plasminogen zu Plasmin, wodurch es zur perizellulärer Proteolyse mit ECM-Abbau und Lösung von darin enthaltenen Botenstoffen kommt. Eine uPAR-Aktivierung kann auch inflammatorisch bedingt sein. Durch uPAR-vermitteltem Abbau der ECM können Tumorzellen leichter in das umgebende Gewebe infiltrieren. Über den Einfluss von Botenstoffen kommt es zur Veränderung der Zelladhäsion, Zellmigration und Angiogenese und dies führt zu einem Pro-Tumorphorproliferationsprofil mit Begünstigung von Metastasierungen (50).

1.2.5.2 PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und andere extrazelluläre Botenstoffe binden an RTKs an der Zelloberfläche und lösen über Phosphorylierung eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aus, wodurch es zur Aktivierung einer intrazellulären Kaskade kommt, die den Zellstoffwechsel und das Proliferationsverhalten beeinflusst (10). PI3K wandelt die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) um, wodurch die Proteinkinase B (PKB/Akt) rekrutiert wird und eine mTOR Aktivierung folgt (10).

Akt löst eine downstream Kaskade aus, die zum Zellüberleben führt. Zum einen werden pro-apoptotische Faktoren inhibiert und so ein programmierter Zelltod umgangen. Unter hypoxischen Bedingungen herrscht eine verminderte Akt-Aktivität; bei forcierter Aktivierung von Akt unter hypoxischen Bedingungen kommt es zum vermehrten Zelltod, entsprechend lässt sich vermuten, dass eine niedrige Akt-Aktivität für einen dormanten Zustand nötig ist (52). Zum anderen werden Akt vermittelt die Zellzyklusregulatoren p21 und p27 phosphoryliert, was zu einem Erhalt des G0-Zellzyklus Arrests beiträgt (53).

Im Glucosestoffwechsel spielt Akt ebenfalls eine wichtige Rolle, so führt eine Akt-Aktivierung zu einer erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle durch Glucose transporter 1, welcher die für die Proliferation nötige Energie bereitstellt (54).

mTOR ist ebenfalls eine wichtige Schaltstelle für die Signaltransduktion, so kann eine mTor Überaktivierung zu unkontrolliertem Zellwachstum führen (55). Ebenfalls reguliert mTor den für das Überleben einer dormanten Tumorzelle unerlässliche Mechanismus der Autophagie. Eine hohe mTOR-Aktivität führt zu einer Inhibierung der Autophagie, während eine niedrige mTOR-Aktivität Autophagie auslösen kann (46).

Eine hohe PI3K/Akt/mTOR-Signalweg Aktivität ist mit Tumorwachstum assoziiert, insbesondere mit Metastasenwachstum, vice versa ist eine geringe Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs mit einem dormanten Tumorzellzustand assoziiert (46).

Somit hat der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg nicht nur bei *Dormancy* sondern auch bei Tumorrezidiv/-progress eine Wirkung. Milieuveränderungen mit gestiegenem Ressourcenangebot oder Sauerstoffangebot die zu sinkendem Zellstress führen, können über eine Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zu einem *Dormancy*-Exit führen. Dies kann

auch bei genetischen Mutationen wie PTEN erfolgen (46). Der Tumorsuppressor PTEN hat eigentlich eine inhibierende Wirkung auf Akt, bei Fehlern kann eine dauerhaft aktivierte Akt zu einem Tumorwachstum führen.

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist bei Aktivierung auch mit drug-resistance und ECM-Modulation assoziiert (46).

Therapeutisch ergeben sich aus dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg Ziele, um den Überlebensmodus unter *Dormancy* zu durchbrechen (46). Mit PI3K-Inhibitoren wie z.B. idelalisib und alpelisib und Akt-Inhibitoren wie z.B. ipatasertib können zuvor beschriebene Überlebensstrategien behindert werden (46). Der mTOR-Inhibitor rapamycin beispielsweise kann Autophagie induzieren und Proliferation hemmen, letztendlich *Dormancy* erhalten bzw. induzieren (46). Ein Therapieansatz bestehend aus den genannten Substanzen könnte ergänzend mit klassischer Chemotherapie eine gewünschte Wirkung auf dormante und proliferierende Zellen haben.

1.2.5.3 Wnt/ β -catenin-Signalweg

Über Wnt/ β -catenin-Signalweg werden ebenfalls Proliferation, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Überlebensstrategien reguliert (46).

Der Signalweg beginnt mit einer Bindung von Wnt-Liganden an Frizzled-Rezeptoren und low-density lipoprotein receptor-related protein 5 oder 6. Die so entstandenen Dishevelled-Proteine verhindern den β -catenin-Abbau. Ohne Wnt-Signal wird β -catenin durch einen Zerstörungskomplex abgebaut, zu dem unter anderem APC gehört (46).

Eine β -catenin Akkumulation führt, wie schon erläutert, zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die unter anderem eine c-Myc und Cyclin D1 Transkription zur Folge haben, deren Folge eine unkontrollierte Zellteilung ist (46). Eine niedrige Wnt-Aktivität erhält über eine niedrige Cyclin D1 und c-myc Aktivität eine *Dormancy* aufrecht, vice versa ist eine erhöhte Wnt-Aktivität mit einer erhöhten Cyclin D1 und c-myc Aktivität assoziiert, deren Folge Zellproliferation ist (46).

Der Wnt/ β -catenin-Signalweg spielt eine zentrale Rolle in der Reversibilität von *Dormancy*, durch Regulation von Stammzeleigenschaftengen, die einen Wiederbeginn des Zellzyklus ermöglichen. Der Wnt/ β -catenin-Signalweg hilft ebenfalls bei der Adaption der Zellen im Hungerstoffwechsel (46). Zu erwähnen sind Mutationen im APC-Gen, die bei dysfunktionalem APC zu einer dauerhaften unkontrollierten β -catenin-Akkumulation führen. Dies ist beim Krankheitsbild der FAP der Fall. Therapeutisch kann ICG-001, ein kleines Protein, die β -catenin-Interaktion stören (46).

1.2.5.4 Notch-Signalweg

Transmembranrezeptoren, sogenannte Notch-Rezeptoren, und darauf passende Liganden lösen durch direkte Zell-zu-Zell-Kontakte den Notch-Signalweg aus (46). Nach Aktivierung

wird über Proteolyse die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors gelöst. Durch Translokation in den Zellkern wird so die Genexpression beeinflusst.

Eine Notch-Signalwegaktivierung kann über entsprechende Genexpression einen Zellzyklusarrest von Stammzellen und eine *Dormancy* von Krebszellen induzieren, während eine verstärkte Notch-Signalwegaktivierung ebenfalls mit Tumorrezidiven und Progressen assoziiert ist (46).

1.3 Östrogene

Östrogene zählen zu den Steroidhormonen, deren Ausgangsprodukt Cholesterin mit dem Sterangerüst darstellt. Die Östrogenbiosynthese erfolgt über die Zwischenstufe Pregnenolon (56). Eine direkte Synthese erfolgt über den $\Delta 4$ -Syntheseweg u.a. über die Zwischenstufen Progesteron und Androstendion (57). Eine indirekte Synthese ist außerdem über den $\Delta 5$ -Syntheseweg möglich per Aromatisierung des androgenen Hormons Testosteron (56, 57). Die Östrogensynthese erfolgt zum Großteil in den Granulosazellen der Ovarien, zum weitaus geringeren Teil zudem in der Nebennierenrinde, im Fettgewebe und beim Mann in den Leydig-Zellen des Hodens (56). Während der Schwangerschaft erfolgt eine Produktion zudem in der Plazenta (56).

Die Östrogenproduktion wird, übergeordnet in der endokrinologischen Achse, durch die in der Hypophyse produzierten Gonadotropine FSH und LH angeregt. Eine Regulation erfolgt mittels einer Feedbackschleife durch die synthetisierten Endprodukte (57).

Die relevantesten im Körper vorkommenden Östrogene stellen Estradiol (E2), Estron (E1) und Estriol (E3) da (56).

Estriol ist ein Abbauprodukt vom potentesten und vorherrschendem Östrogen Estradiol und wird von der 16α -Hydroxylase in der Leber hydroxyliert, es hat eine Potenz von nur 10% im Vergleich zu E2 (56). E1 ist das ab der Menopause vorherrschende Östrogen bei der Frau und hat eine Potenz von ca. nur 50% im Vergleich zu E2 (56).

Der Transport zu den Zielorganen im Blut erfolgt proteingebunden an das Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG) sowie an Albumin (58). Östrogene sind lipophil und entsprechend in der Lage die Zellmembran zu passieren (56). Über die Bindung an zytoplasmatische Östrogenrezeptoren entfalten Östrogene ihre genetische Wirkung. Nach Ligandenbindung werden sie zum Zellkern transportiert, und fungieren dort als Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression beeinflussen (56, 58).

Neben der genetischen-langsam (Stunden bis Tage) Östrogenrezeptor-vermittelten Wirkung ($ER\alpha$ und $ER\beta$), können Östrogene auch direkte, schnelle (Sekunden bis Minuten) Wirkungen entfalten, sogenannte „rapid non-genomic responses“ (59).

Dazu zählen direkte Modulationen von Ionenkanälen (60) oder Effekte über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten-Östrogenrezeptoren (GPER) (28). GPER-Aktivierung führt zu

einer Freisetzung von Ca^{2+} , der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), zytosolisches cAMP, Aktivierung der PI3K/Akt- und MAPK/ERK-Signalwegen, Stimulation der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), wodurch eine Vasodilatation erreicht wird (61).

E2 hat zudem eine modulierende Wirkung auf Entzündungsprozesse, z.B. konnten Shivers et al. eine antiinflammatorische Wirkung zeigen (62).

So kommt es zum einen auf eine Wirkung der weiblichen Geschlechtsorgane mit Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale und Zyklusbeeinflussung wie z.B. Endometriumaufbau (56). Des Weiteren kommt es auch zu einer Vielzahl an extragenitaler Beeinflussung u.a. im Gastrointestinaltrakt (63). Beispielweise zu nennen sind der Knochenstoffwechsel, Lipidstoffwechsel, das kardiovaskuläre System und der Metabolismus (56, 64). Östrogen und die Konzentration des Östrogens sind unterschiedlich je nach Zyklusphase und nimmt nach der Menopause bedeutend ab (64). Mit der endokrinologischen Umstellung im Rahmen der Menopause sind typische klimakterische Beschwerden assoziiert. Darunter zählen Hitzewallungen, Depression, Osteoporose und weitere Symptome (65). Bei bestimmten Folgen mit Krankheitswert und Beschwerden ist postmenopausal eine Hormonersatztherapie indiziert (65). E1 zeigte in Versuchen mit Kolonkarzinomzelllinien (SW620) eine antiproliferative Wirkung (66). Eine Umwandlung von E2 zu E1 geschieht im Kolon über die 17 β -Hydroxylasen 2 und 4 (67).

1.4 Östrogenrezeptoren

Östrogenrezeptoren gehören zu den Steroidhormonrezeptoren und fungieren als intrazelluläre nukleäre Hormonrezeptoren (68). Es konnten zwei Subtypen bei den Östrogenrezeptoren identifiziert werden. Der Östrogenrezeptor alpha ($\text{ER}\alpha$) wurde 1986 von Greene et al. entdeckt (69). 1996 gelang es Kuiper et al. den zweiten Östrogenrezeptorsubtyp, den Östrogenrezeptor beta ($\text{ER}\beta$) zu entdecken (70). Mittlerweile sind drei $\text{ER}\alpha$ - und 5 $\text{ER}\beta$ -Varianten bekannt (61). Des Weiteren sind noch G-Protein-gekoppelte-Östrogenrezeptoren bekannt.

Der für diese Arbeit interessante $\text{ER}\beta$ ist mit dem Gen ESR2 auf dem Chromosom 14q22-24 lokalisiert (71).

1.4.1 Genetische Wirkung der Östrogenrezeptoren $\text{ER}\alpha$ und $\text{ER}\beta$

1.4.1.1 Ligandenabhängig-ERE

Östrogenrezeptoren sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die inaktiv im Zellkern vorliegen. Eine Aktivierung erfolgt durch Liganden wie Östrogene (72).

Östrogenrezeptoren sind aus mehreren Domänen aufgebaut. Eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), C-terminale Ligand-Bindungsdomäne (LBD) und eine N-terminale Bindungsdomäne (72). Bei Bindung von Liganden wie Agonisten (Östrogene) oder Antagonisten (Antiöstrogene), an die LBD kommt es zu einer Bildung von Rezeptordimeren. Dabei

entstehen die Homodimere ER α /ER α und ER β /ER β , sowie das Heterodimer ER α /ER β , die mit einer hohen Affinität an spezifische DNA-Sequenzen binden, sogenannte „*estrogen response Elements*“ (EREs) (72). Über diese Bindung in den Regulator-Regionen der Östrogenzielregion wird bei Agonistenbindung die Gentranskription hochreguliert und bei Antagonistenbindung inhibiert (72).

Gemeinsamkeiten des ER α und ER β liegen in einer genetischen Übereinstimmung von 95% bzgl. der DBD (70), einem sich gleichenden DNA-Bindungsverhalten (73) und derselben Bindungsaffinität von 17 β -Östradiol (70).

Hinsichtlich der Genetik der LBD besteht lediglich eine Übereinstimmung von 55%(70), die N-terminalen-Domänen weisen stärkere Unterschiede auf (74). 1997 konnten Cowley et al. sowie separat Petterson et al. eine stärkere Gentranskription beim ER α durch 17 β -Östradiol, als beim ER β nachweisen (73) (75).

Während in vielen verschiedenen Gewebetypen ER α , ER β oder beide ERs immunologische nachzuweisen sind, ist die Menge der beiden Östrogenrezeptoren in den verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich verteilt (76). Der im Darmepithel vorherrschende Östrogenrezeptor ist der hier untersuchte ER β (77).

1.4.1.2 Ligandenabhängig-PRE

Neben dem beschriebenen klassischen Weg sind ebenfalls noch nicht endgültig erforschte Wege der Östrogenwirkung Gegenstand der Forschung. Es wird beispielsweise eine Interaktion von aktivierten Östrogenrezeptoren mit anderen Transkriptionsfaktoren beobachtet, wie beispielsweise c-Jun, c-Fos, SP1 und AP-1, hier über sogenannte „*promoter response elements*“(PREs) (61, 78).

Dabei scheint die ER α -Interaktion mit den genannten Transkriptionsfaktoren wichtiger zu sein, während sich die Interaktion von ER α und ER β mit den EREs gleicht (79).

Diese unterschiedliche Wirkung auf die Gentranskription von ER α und ER β konnten Peach et al. 1997 für den aktivierenden-Proteinkomplex-1 (AP1) nachweisen (78).

Eine Bindung von Östrogen am ER α -AP-1 Komplex führte zu einer Steigerung der Gentranskription, während es bei Östrogenbindung am ER β -AP-1 Komplex zu einer Hemmung der Gentranskription kam (78).

Zudem konnte gezeigt werden, dass der ER β die transkriptionelle Aktivität vom ER α hemmt und somit eine Schlüsselstelle darstellt, wie sich die jeweilige zelluläre biologische Antwort auf einen Östrogenreiz ausprägt und hier das jeweils unterschiedliche im jeweiligen Gewebe vorliegende Verhältnis vom ER α und ER β eine wichtige Rolle spielt (80).

Somit scheint eine separate Betrachtung der Wirkung des ER α und des ER β sinnvoll und lässt vermuten, dass die Wirkung einerseits unterschiedlich reguliert wird und die Wirkung selbst ebenfalls eine unterschiedliche ist.

1.4.1.3 Ligandenunabhängig

Neben der Liganden-abhängigen Östrogenrezeptoraktivierung ist auch eine nicht Liganden-abhängige Östrogenrezeptoraktivierung möglich (81). So kann beispielsweise der EGFR-Rezeptor über die Kinasenkaskade Ras/Raf/MAPK Östrogenrezeptoren mittels Phosphorylierung aktivieren und dimerisieren, was zu einer Liganden-unabhängigen Östrogenrezeptor vermittelten Genexpression führt (81).

Die genetischen Effekte der Östrogenrezeptorwirkung betreffen viele Gene, so auch beispielsweise den für Angiogenese relevanten vaskulären-endothelialen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor=VEGFR), die für Zelladhäsion relevanten Cadherine und Lamine, Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β , mit insgesamt erheblicher Auswirkung auf Proliferation und Apoptose und somit auf das bei Tumoren krankheitsdefinierende biologische Verhalten (61).

1.4.2 Nicht-genetische Wirkung der Östrogenrezeptoren ER α und ER β

Die Östrogenrezeptoren können auch intrazelluläre Prozesse ohne DNA-Beteiligung modulieren. Die Wirkungen können erheblich schneller eintreffen und direkt das Zellmilieu verändern.

Diese sogenannten "*rapid non-genomic responses*" sind, so vermutet es die Arbeit von Galluzzo et al., abhängig von membranständigen Östrogenrezeptoren. Die Verankerung des ER α und ER β in der Zellmembran werde über Palmitoylierung erreicht (82).

Transmembrane ER α können direkt über den PI3K/AKT- und ERK/MAPK-Signalweg Proliferations- und Überlebenssignale senden, während der ER β für eine Aktivierung per Phosphorylierung von p38/MAPK, Caspase-3 und Spaltung von PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*) sorgt und somit Proliferationshemmung und Apoptose verursacht (83), was erneut die Bedeutung der Balance von ER α und ER β unterstreicht.

Insbesondere die durch den im Darmepithel vorherrschende ER β verursachte Phosphorylierung von p38 (84) ist durch die Beeinflussung der wichtigen *Dormancy*-Schaltstelle (Verhältnis der Aktivität der Proteine p38 und ERK zueinander) (43) für diese Arbeit besonders im Fokus.

In in vivo Experimenten mit CRC-Zellen (SW480) konnte konkordant gezeigt werden, dass der ER β mit einer Hemmung der Proliferation (Zellzyklusarrest und niedrigeres Tumorgewicht), der Heraufregulierung von Zellzyklus Inhibitoren (p27, p21) und einer Aktivierung von p38 assoziiert ist (85).

Jin et al. konnte eine Korrelation von Heraufregulierung von *DNA-Mismatch*-Reparatur-Genexpression im Kolon bei einem Östrogenspiegel >45pg/ml zeigen (86). Bei LoVo-CRC-Zellen wurde ER β abhängig eine erhöhte p53 Aktivität gezeigt, die antiproliferative und

apoptotische Folgen hatte (87). Außerdem konnte eine hemmende Wirkung des ER β auf Onkogene gezeigt werden, wie z.B. auf das Onkogen PROX1 (88).

Transmembrane ER β können zudem für einen Kalziumioneneinstrom sorgen, der wiederum, wie auch Östrogene direkt, kann mit der Proteinkinase C (PKC) interagieren (89). Des Weiteren ist eine Zellzyklus-modulierende Fähigkeit über Interaktion des transmembranen ER β mit Cyclin D1 (90) und Cyclin A (91) beschrieben, die eine Hemmung eines Zellzyklusprogresses bewirken kann (61).

Treeck et al. beschrieben für das Mamma-Ca eine Wirkung des ER β als Tumorsuppressor, da es ER β -abhängig zu niedrigerer Cyclin A2-Aktivität (Cyclin A2 ist pro Zellzyklusprogress) und weniger p21-Hemmung kam (p21 ist pro Zellzyklusarrest) (91).

Edvardsson et al. haben die Signalwirkung der drei CRC-Zelllinien SW480, HT29 und HCT116 nach ER β -Transfektion untersucht und konnten antiinflammatorische Wirkungen (IL 6-Downregulation) und antitumorigene Wirkungen nachweisen über eine erhöhte *DNA-Repair*-Kapazität, genetisch-transkriptionische Änderungen und MAPK-Signalweg Beeinflussung (92).

1.4.3 G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptoren

Neben den größtenteils intrazellulär vorliegenden und genetisch wirksamen Östrogenrezeptoren ER α und ER β sind an der Zellmembran zudem G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptoren (GPER) zu finden (93).

Über die GPER kommt es zu einer schnelleren, nicht genetischen, Östrogen-Signalübertragung, sogenannte „*rapid non-genomic responses*“ (59). Dazu zählen zum Teil sekundenschnelle Effekte wie die Freisetzung von Ca²⁺, der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), zytosolische cAMP-Bildung, Aktivierung der PI3K/Akt- und MAPK/ERK-Signalwegen, Stimulation der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), wodurch über eine NO-Freisetzung eine Vasodilatation erreicht wird (61). Die GPER-vermittelte Signalübertragung ist besonders relevant im Herz-Kreislauf-System und im zentralen Nervensystem (93). Mittels der GPER vermittelten Adenylatzyklasenaktivierung kommt es zu einer cAMP-Bildung aus ATP. Der Second Messenger cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA) (93), Transkriptionsfaktoren wie CREB und moduliert Zellproliferation, Apoptosehemmung und Vasodilatation.

1.5 Östrogen und Östrogenrezeptoren im CRC hinsichtlich Dormancy und biologischem Verhalten

1.5.1 Epidemiologie CRC und Östrogenstoffwechsel

Weltweit erkranken mehr Männer (222/100.000) als Frauen (186/100.000) an einer Krebserkrankung und auch die Mortalität ist bei Männern höher (1). Dies gilt auch für das Kolon- und Rektumkarzinom (1). Grundsätzlich erkranken Männer häufiger an einem CRC als Frauen, wie in der Tabelle 4 aufgeführt.

Krebserkrankung	Inzidenz/100.000		Mortalität/100.000	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Alle weltweit	222	186	120,8	84,2
Kolonkarzinom	13,1	10	6,4	4,6
Rektumkarzinom	9,8	5,6	4,4	2,4

Tabelle 4 CRC-Epidemiologie modifiziert nach Global Cancer Statistics 2020 (GLOBOCAN) (1)

Nach der Pubertät ist der Östrogenspiegel im Blut bei Frauen zyklusabhängig (20-530pg/ml) und in der Schwangerschaft (300-17.900 pg/ml) deutlich höher als bei Männern (12-34pg/ml) und lässt nach der Menopause deutlich nach (<50 pg/ml). Bei der Betrachtung der Geschlechter und des Östrogenangebotes hinsichtlich des CRC-Risikos fällt auf, dass das geringere Risiko für ein CRC von Frauen gegenüber Männern sich nur bei prämenopausalen Frauen (Alter <45 Jahre) zeigt. Bei älteren Frauen gleicht sich das CRC-Risikoniveau dem von Männern an; ab einem Alter von >55 Jahren ist das Erkrankungsrisiko bei Frauen sogar größer als das von Männern, außer es wird eine HRT eingenommen (94). Dies konnte bereits 2001 eine Metaanalyse von Fernandez et al. zeigen. Es ergab sich eine geringere CRC-Inzidenz bei postmenopausalen Frauen, die eine HRT eingenommen haben, gegenüber Frauen, die keine HRT eingenommen haben mit einem relativen Risiko (RR) von 0.82 (95% CI: 0.74-0.92)(95).

Bei fortgeschrittener Erkrankung konnte in einer Untersuchung von CRC Patienten gezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang gab zwischen ERβ positiven Primärtumoren und der Abwesenheit einer CLM (96). Damit konkordant weisen postmenopausale CRC-Patientinnen, die eine Hormonersatztherapie (HRT) erhielten, ein deutlich besseres rezidiv-freies Überleben nach CRC auf (67, 97). Außerdem ist das Risiko bei prämenopausalen Frauen geringer (15) und bei postmenopausalen Frauen ohne HRT gleich dem Risiko von Männern, eine CLM zu entwickeln (96).

Gegenstand dieser Arbeit ist, aufgrund des epidemiologischen Überlebensvorteils von Östrogen, das biologische Verhalten in CRC-Zellen hinsichtlich *Dormancy* und der Beeinflussung des ERβ in in vitro Experimenten zu untersuchen.

1.5.2 Unterschiede im CRC nach Lokalisation und Östrogenrezeptorexpression

Embryologisch lässt sich das Colon in einen rechten und linken Teil einteilen. Dabei entspricht der rechte Teil dem proximalen Colon bis zur splenischen Flexur bzw. 2/3 des Colon transversum (Cannon-Böhm-Punkt), der embryologisch aus dem Mitteldarm hervorgeht. Das linke Colon, bzw. distale Colon reicht vom letzten Drittel des Colon transversum bis zum Darmausgang und entspringt embryologisch dem Hinterdarm. Die embryologisch bedingten unterschiedlichen Ursprünge gehen mit einer unterschiedlichen arteriellen Versorgung einher (rechts A. mesenterica superior, links A. mesenterica inferior). Bufill et al. konnten im CRC unterschiedliche genetische Eigenschaften nach betreffender Colon-Seite aufgeschlüsselt entdecken (98).

So ist das proximale CRC eher mit MSI assoziiert und das linke CRC eher mit chromosomaler Instabilität aufgrund einer Runterregulierung von Tumorsuppressoren wie p53 und APC, sowie einer Heraufregulierung von Onkogenen wie K-RAS (99).

Frauen erkranken eher an einem proximalen CRC, während Männer eher an einem distalen CRC erkranken (99). Weibliches Geschlecht in zunehmendem Alter stellt einen Risikofaktor für ein proximales CRC da (99).

Papaxoinis zeigte 2010 eine unterschiedliche Verteilung des ERβ im gesunden Colon. Die ERβ-Expression ist im Colon ascendens höher als im Colon descendens (100).

Jassam et al. wiesen im CRC einen 21% ERβ-Verlust nach, wobei der ERβ-Verlust im linksseitigen CRC größer war (27%) als im rechtsseitigen CRC (8%) (101).

In Zusammenschau kann von einer mutmaßlichen protektiven Wirkung von Östrogenen für distale CRC-Tumore ausgegangen werden. Diese protektive Östrogenwirkung scheint bei Frauen nach der Menopause zu fehlen, da es zu einer Zunahme von proximalen Tumoren kommt. Ebenso kann von einer protektiven Wirkung des ERβ fürs CRC ausgegangen werden, da die Inzidenz im distalen Colon erhöht ist und die ERβ-Expression verringert. Die genannten Punkte sind übersichtlich in Tabelle 5 aufgeführt.

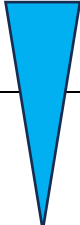
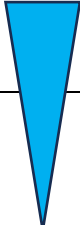
Kolonseite	Embryologie/ Gefäße	CRC Lokalisation	CRC Häufigkeit	Klinik	Geschlecht	Genetik/ Mutation	ERβ- Gesund	ERβ- Verlust CRC
proximales/ rechtes Colon	Mitteldarm, AMS	Zökum und rechtes Hemikolon	25%	Größer, da später symptoma- tisch	Eher Frauen	MSI CIMP BRAF		8%
		Transversum	15%					
distales/ linkes Colon	Hinterdarm, AMI	Colon descendens	5%	Früher symptoma- tisch, Ileus	Eher Männer	Chromos omale Instabilitä t, p53, APC, KRAS		27%
		Sigma und Rektum	55%					

Tabelle 5 Übersicht der Unterschiede im CRC hinsichtlich einer Einteilung in eine rechte und linke Seite, Daten dargestellt nach Aussagen der im Text 1.5.2 angegebenen Quellen

1.5.3 ER β und CRC

Die genaue Östrogenwirkung im kolorektalen Karzinom ist noch nicht vollständig erforscht. So ist die direkte Östrogenwirkung auf die Enterozyten im Darm und die Östrogenrezeptor-vermittelte Wirkung zu bedenken. Diese können einerseits ligandenabhängig und ligandenunabhängig oder durch die alleinige Veränderung des ER α und ER β Verhältnisses bedingt sein (61). So ändert sich nach der Menopause, was mit einer CRC-Zunahme einhergeht, einerseits das ER α - und ER β -Verhältnis, was auch mit folgender Liganden-unabhängiger Wirkung einhergeht, andererseits ist auch die Liganden-abhängige Wirkung deutlich geringer bei postmenopausal deutlich niedrigerem E2-Level (61).

Der im gesunden Darmgewebe vorherrschende Östrogenrezeptor ist der ER β ; Konstantinopoulos et al. konnten zeigen, dass sein Verlust im CRC mit einer Abnahme der Differenzierung, folglich mit einer schlechten Prognose und höherem Tumorstadium korreliert (77). Eine protektive Rolle wurde dem ER β im CRC zugesprochen (77). Der ER α ist in normalem Kolongewebe sowie im CRC-Gewebe nur gering exprimiert (77).

Pérez-Ruiz et al. diskutierten den ER β als prognostischen Faktor im CRC und konnten eine Korrelation von niedriger ER β -Expression und fortgeschrittenem Tumorgeschehen nachweisen (102).

He et al. untersuchte die ER β -Expression hinsichtlich des Auftretens von Lebermetastasen im CRC. Synchrone CLM hatten eine ER β -Positivrate von 39,5% und die Abwesenheit von CLMs korrelierte signifikant mit dem Vorhandensein des ER β im Primärtumor. Bei CRC Patienten mit CLM kann der ER β -Status als prognostischer Faktor herangezogen werden (103).

Topi et al. untersuchten die kombinierte Expression der Östrogenrezeptoren ER α und ER β im CRC und fanden dabei heraus, dass eine erhöhte ER β -Intensität mit einer Risikoreduktion eines metastatischen Events im CRC korreliert und eine erhöhte ER α Intensität mit einem metastatischen Event, insbesondere einer CLM, korreliert (104). Des Weiteren korreliert eine niedrige ER β -Expression mit einem Tumorrezidiv. Topi et al. schlagen eine ER α - und ER β -Expressionsbestimmung als prognostischen Faktor bezüglich krankheitsfreiem Überleben (DFS) vor, da eine niedrige ER α - und hohe ER β -Expression mit einer insgesamt besseren Prognose, einem längerem Gesamtüberleben (OS) und DFS einhergehen (105).

Im Darmepithel bewirkt der Östrogenrezeptor beta (ER β) eine Phosphorylierung von p38 (84). Das Verhältnis der Aktivität der Proteine p38 und ERK zueinander wurde als eine der wichtigsten Schaltstellen, die ein Aufwachen aus oder das Erhalten von *Dormancy* bewirkt, identifiziert (43). Beim HNSCC konnte in vivo eine Assoziation von *Dormancy* mit der Aktivierung via Phosphorylierung von p38 gezeigt werden (45). Gegensätzlich konnte durch pharmakologische Inhibierung von p38 in Mäusen mit HNSCC eine Aktivierung von dormanten Zellen in der Leber demonstriert werden (45).

In in vivo Experimenten konnte gezeigt werden, dass der ER β mit einer Hemmung der Proliferation, der Heraufregulierung von Zellzyklus Inhibitoren (p27, p21) und einer Aktivierung von p38 assoziiert ist (85).

1.5.4 Experimentelle Hinweise / in vivo und in vitro Studien CRC und ER β

In Tierexperimenten mit APC-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit E2 zu einem CRC-protectiven, erhöhten ER β /ER α Verhältnis führte (106).

Somit könnte eine HRT eine protective Eigenschaft im CRC haben, sofern sie früh genug kommt, bevor es zu einer irreversiblen ER β -Repression kommt.

Es konnte im CRC-Östrogenstoffwechsel nachgewiesen werden, dass die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 und Typ 4, die eine Konversion des potenten E2 zu E1 bewirkt, im CRC schwächer exprimiert wird als in gesundem Darm (61). Die Übersichtsarbeit von Barzi et al. postuliert, dass das Verhältnis E2 zu E1 eine regulierende Rolle einnimmt und bei Imbalance mit erhöhtem E2-Level im Verhältnis zu E1 die proliferative und antiapoptotische Wirkung eintritt mit protumorigenen Folgen (61). Für ein chinesisches CRC-Patientenkollektiv wurden ESR2-Genvarianten und erhöhte E2-Level als Risikofaktoren detektiert mit einem 2,3-fach erhöhtem CRC Risiko im Vergleich zu niedrigem E2-Level und der CC-ESR2-Genvariante (61).

In Experimenten mit der humanen CRC-Zelllinie DLD-1 konnte durch die Gabe von Isoflavonen (Bestandteil von Soja, ein Phytoöstrogen und damit ER β -Agonist) ein G₂-Zellzyklusarrest hervorgerufen werden, der bei ER β -Silencing nicht zu zeigen war (107). Eine protective Wirkung von Ernährung mit Soja ist nur für Frauen erwiesen (108).

Armstrong et al. konnten eine stärkere E2-vermittelte Inflammationslinderung im Colon bei mit proentzündlichen Substanzen behandelten Mäusen gegenüber ER β -knockout-Mäusen zeigen, die eine stärkere Proliferation aufwiesen (109).

Ein weiterer Hinweis auf die antiinflammatorische Wirkung von Östrogenen und dem ER β und damit vermittelt ein protektiver Effekt für die Entwicklung eines CRC bei CED konnten Söderlund et al. für Frauen zeigen (110).

1.5.5 Hormonersatztherapie im CRC

Bei der Ätiologie des CRC ist eine Wirkung von einer HRT nur in einer bestimmten molekulargenetischen Tumorentität erwartbar und nicht ubiquitär anwendbar (61).

Die Wirkung einer CRC-Risiko-Reduktion ist mit einer HRT ab 60 Jahren nicht so wirkungsvoll wie zu einem früheren Zeitpunkt (61). Somit könnte eine HRT über das Erhalten von ER β eine protective Eigenschaft im CRC haben, sofern sie früh genug kommt, bevor es zu einer prokanzerösen irreversiblen ER β -Repression kommt, die von Östrogengaben nicht

rückgängig gemacht werden kann (61). Somit sind mutmaßlich die protektiven Östrogenwirkungen auf das Vorhandensein des ER β angewiesen.

Kürzlich konnten Liu et al. eine Risikoreduktion für Frauen mit HRT bezüglich des Auftretens eines CRCs zeigen, im Vergleich zu Frauen ohne HRT-Einnahme (111).

Bei der HRT gilt es die Nebenwirkungen, insbesondere das erhöhte kardiovaskuläre Risiko, mit dem Nutzen abzuwägen (61).

1.6 Therapeutischer Ausblick

1.6.1 Therapie Dormancy und DTCs bei MRD im CRC

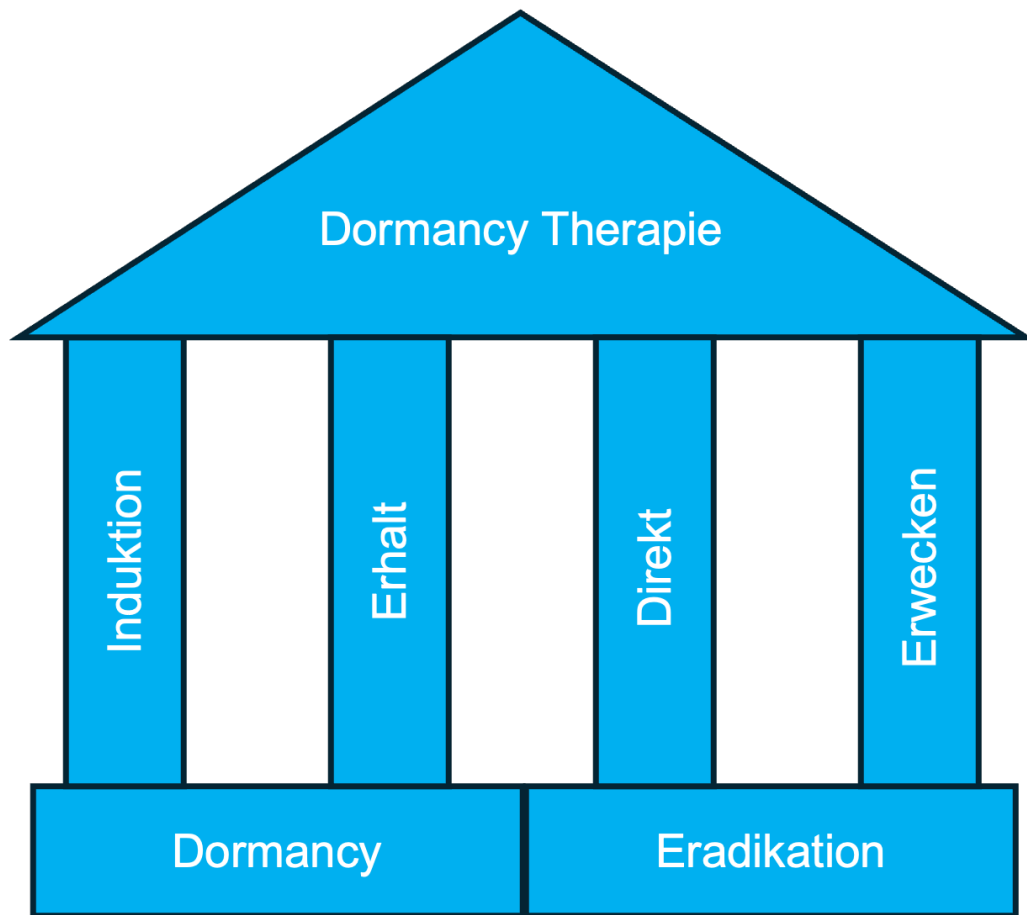


Abb. 3 Dormancy Therapiekonzepte

Im Rahmen der *Dormancy*-Forschung lassen sich zwei grundsätzliche therapeutische Ansätze (prolongierte *Dormancy*, Eradikation) beschreiben, die mit 4 Strategien erreicht werden könnten, siehe Abb. 3. Eine Säule besteht aus dem Konzept kanzeröse Proliferation durch *Dormancy* zu verhindern, die andere Säule stellt die Eradikation von dormanten Tumorzellen dar. Macht man sich in der Krebstherapie *Dormancy* zunutze, so kann einerseits das Auftreten eines Rezidivs durch die *Dormancy*-Erhaltung verzögert werden oder die aktive Krebserkrankung durch *Dormancy*-Induktion kontrolliert und in eine chronische Erkrankung überführt werden. Dem gegenüber steht der Eradikationsansatz, indem einerseits Wege gesucht werden auch eine dormante Tumorzelle direkt zu attackieren (Immunaktivierung/Zytostatika) oder der durchaus risikoreichere Ansatz eine dormante Tumorzelle erst zu erwecken (Rückführung in Proliferation), um sie so wieder einer herkömmlichen antiproliferativen zyto-reduktiven Chemotherapie gegenüber angreifbar zu machen. Für den Erhalt bzw. die *Dormancy* Induktion spielt eine Zellzyklusmodulation eine zentrale Rolle. Einen Knotenpunkt stellt der Orphan-Rezeptor NR2F1 dar (112). NR2F1 induziert ein *Dormancy*-Programm über den Transkriptionsfaktor SOX9 und den Retinsäure-

Rezeptor β (RAR β). Dies führt zu einer Expression von CDK-Inhibitoren p27 und p16, was zu einem G0/G1 Zellzyklus-Arrest und Quieszenz führt (112). Ein NR2F1 Agonist, C26, konnte im HNSCC *Dormancy* induzieren (113). Um dormante Tumorzellen direkt zu treffen könnten die Effekte von Integrin-Inhibitoren und Autophagie-Inhibitoren genutzt werden (25). Interessante therapeutische Ziele im MAPK/ERK-Signalweg können mit BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren adressiert werden. In beiden Fällen wäre der Ansatz *Dormancy* erhaltend. BRAF-Inhibitoren sollen die ERK-Aktivität senken während MEK-Inhibitoren die downstream Aktivierung von ERK blockieren (46). Die ERK-Aktivität bietet sich zudem als Biomarker an (46). Therapeutisch ergeben sich aus dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg Ziele, um den Überlebensmodus unter *Dormancy* zu durchbrechen (46). Mit PI3K-Inhibitoren wie z.B. idelalisib und alpelisib und Akt-Inhibitoren wie z.B. ipatasertib können zuvor beschriebene Überlebensstrategien behindert werden (46). Der mTOR-Inhibitor rapamycin beispielsweise kann Autophagie induzieren und Proliferation hemmen, letztendlich *Dormancy* erhalten bzw. induzieren (46). Ein Therapieansatz bestehend aus den genannten Substanzen könnte ergänzend mit klassischer Chemotherapie eine gewünschte Wirkung auf dormante und proliferierende Zellen haben.

Das Protein ICG-001 kann im Wnt/ β -catenin-Signalweg die β -catenin-Interaktion stören (46). Gezielte CRC-Therapieansätze konnten für das MSI- bzw. *Mismatchreparaturgen*-Defizienzbedingte CRC im Rahmen der KEYNOTE-177 Studie durch den Einsatz von Checkpoint Inhibitoren wie der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab einen Vorteil zeigen (114).

Neben der etablierten Therapie des CRC gehören gezielte Therapien des CRC ergänzend, zum Teil im Rahmen von Studien, zum modernen Therapieansatz. Diese umfassen Kinaseinhibitoren wie Regorafenib oder Inhibitoren und Antikörper des VEGFR, sowie Antikörper gegen den EGFR (88).

Da ebenfalls für ein inflammatorisches Mikromileu eine *Dormancy*-Beeinflussung beschreiben ist (25, 50) kann eine antiinflammatorische Therapie mit COX-2-Inhibitoren (Acetylsalicylsäure und Celecoxib) diskutiert werden. So konnte für ASS 300mg/Tag eine CRC-Risikoreduktion in Studien gezeigt werden, jedoch ist das Nebenwirkungsprofil zu beachten (88). Für Celecoxib ist eine Studie aufgrund eines erhöhten kardiovaskulären Risikos abgebrochen worden (88). Andersherum kann die Induktion eines inflammatorischen Milieus als Strategie zum Erwecken aus *Dormancy* erwogen werden (25).

Betrachtet man die epidemiologische, klinische und experimentelle in den vorherigen Kapiteln dargelegte Studienlage könnte eine Beeinflussung des ER β ebenfalls im CRC eine *Dormancy* modulierende Wirkung haben. Therapeutisch könnte man zwei Behandlungskonzepte diskutieren. Einerseits könnte eine CLM-Prophylaxe mittels eines ER β Agonisten in Betracht gezogen werden, andererseits könnte man das Erwecken der DTCs aus der *Dormancy* mittels eines ER β Antagonisten erwägen, mit dem Zweck die DTCs wieder gegenüber einer

konventionellen antiproliferativen Therapie vulnerabel zu machen. Eine prophylaktische HRT-Einnahme (111) sowie eine prophylaktische Therapie mittels Phytoöstrogenen (107) gilt es ebenfalls zu diskutieren.

1.6.2 Monitoring MRD/Dormancy state

1.6.2.1 Bildgebung

Es bestehen aktuell noch erhebliche Schwierigkeiten mit den gängigen radiologischen Methoden, um eine sehr geringe Tumormasse zu detektieren, selbst mit dem aktuell etablierten PET-CT. Fortgeschrittene MRT-Methoden wie *diffusion weighted imaging* (DWI) und *dynamic contrast-enhanced* MRI (DCE-MRI) oder Methoden aus der Gruppe der Fluoreszenz-Bildgebungen können feinere Informationen über die Blutversorgung und die unmittelbare Tumorumgebung (*Tumor micro environment*=TME) liefern, um so ggf. dormante Tumore zu identifizieren (46).

1.6.2.2 Biomarker

Um bei dormanten Krebserkrankungen ein erneutes Tumorwachstum und Rezidiv früh therapeutisch adressieren zu können, ist es notwendig, Informationen über die Tumoraktivität zu gewinnen. Ebenfalls für Prognoseangaben und zur Kalkulation des Rezidivrisikos sind Informationen essenziell, um eine fundierte individuelle Therapieentscheidungen zu treffen.

Um im Zustand der MRD frühzeitig auf ein Rezidiv reagieren zu können sind Biomarker im Rahmen der Tumorüberwachung essenziell. Um Rückschlüsse auf die *Dormancy* vs. Proliferationsaktivität bzw. Wahrscheinlichkeit zu schließen, bietet sich als Biomarker das Erheben von Expressionsprofilen an. So sind hohe Expressionsraten von p27 und p21 sowie eine niedrige Expressionsrate des Proliferationsmarkers Ki-67 mit einem dormanten Zustand assoziiert, während MAPK/ERK Aktivität und PI3K-Aktivität sowie der Stammzellenmarker CD44 auf ein Rezidiv und Tumorwachstum hindeuten (46). Des Weiteren ist der Nachweis und die Anzahl von CTCs im Blutstrom mit Tumoraktivität assoziiert.

CTCs können durch Blutabnahmen per *Liquid Biopsy* erfasst und die CTC-DNA anschließend via *Single-Cell-Sequenzierung* analysiert werden mit dem Ziel ergänzende Immuntherapieansätze abhängig von den individuell vorliegenden Mutationen zu finden (46). Außerdem können über extrazelluläre Vesikel freigesetzte *ribonucleic acid*- (RNA) und DNA-Proteine als Biomarker aus dem Blut analysiert werden. Dies machen die neuen sogenannten *High-Throughput*-Technologien möglich. Diese Hochdurchsatzverfahren zeichnen sich durch die Fähigkeit aus biologischen Proben in großen Mengen schnell effizient und parallel zu analysieren. Neben der *Single-Cell-Sequenzierung* zählen dazu *Next-Generation-Sequencing* (NGS), Massenspektrometrie, *High-Throughput-Screening* und *Microarray*-Analysen. Dies lässt eine genetischen, Transkription-bedingten und epigenetischen Betrachtung der unterschiedlichen betroffenen Gewebearten zu (46).

1.7 Stellungnahme zum Ethikvotum

Da ausschließlich etablierte, kommerziell erhältliche Zelllinien verwendet wurden, ist kein Ethikvotum erforderlich.

1.8 Ziele der Arbeit

Das Verhältnis der Aktivität der Proteine p38 und ERK zueinander wurde als eine der wichtigsten Schaltstellen, die ein Aufwachen aus oder das Erhalten von *Dormancy* bewirkt, identifiziert (43). Beim HNSCC konnte in vivo eine Assoziation von *Dormancy* mit der Aktivierung via Phosphorylierung von p38 gezeigt werden (45). Gegenätzlich konnte durch pharmakologische Inhibierung von p38 in Mäusen mit HNSCC eine Aktivierung von dormanten Zellen in der Leber demonstriert werden (45). Der im Darmepithel vorherrschende Östrogenrezeptor beta (ER β) bewirkt eine solche Phosphorylierung von p38 (84).

In in vivo Experimenten konnte gezeigt werden, dass der ER β mit einer Hemmung der Proliferation, der Heraufregulierung von Zellzyklus Inhibitoren (p27, p21) und einer Aktivierung von p38 assoziiert ist (85). In einer Untersuchung von CRC Patienten konnte ebenfalls klinisch ein signifikanter Zusammenhang zwischen ER β positiven Primärtumoren und einer CLM Abwesenheit gefunden werden (96). Damit konkordant weisen postmenopausale CRC-Patientinnen, die eine Hormonersatztherapie (HRT) erhielten, ein deutlich besseres rezidiv-freies Überleben auf (67, 97). Außerdem ist das Risiko einer CLM bei prämenopausalen Frauen geringer (15) und bei postmenopausalen Frauen ohne HRT gleich dem Risiko von Männern (96). Der Überlebensvorteil könnte durch die Östrogenwirkung am ER β bedingt sein, welche dann eine *Dormancy* erhaltende Wirkung entfaltet.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass Agonisten am ER β beim CRC hinsichtlich DTCs *Dormancy* erhaltend wirken und das Risiko einer CLM sinkt. Dem gegenüber steht die zu beantwortende Frage, inwieweit ein Antagonist reaktivierend auf dormante DTCs wirkt. Hier neue Erkenntnisse zu gewinnen, soll mit den klinisch bereits getesteten selektiven ER β Agonisten (ERB-041) und Antagonisten (PHTPP) Gegenstand meines Promotionsvorhabens sein.

Therapeutisch könnten die Ergebnisse für zwei Behandlungskonzepte wertvolle Beiträge leisten. Einerseits könnte eine CLM-Prophylaxe mittels eines ER β Agonisten in Betracht gezogen werden, andererseits könnte man das Erwecken der DTCs aus der *Dormancy* mittels eines ER β Antagonisten erwägen, mit dem Zweck die DTCs wieder gegenüber einer konventionellen antiproliferativen Therapie vulnerabel zu machen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

- Zellkulturflaschen (T25, T75, T125), Sarstedt, Art.-Nr. 83.3910.002 (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- FACS-Röhrchen (5 mL), Becton Dickinson Art.-Nr. 352054 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Falcon-Röhrchen (15 mL, 50 mL), Falcon, Art.-Nr. 3217295, 352070 (Corning Inc., Corning, NY, USA)
- Kryoröhrchen, Sarstedt, Art.-Nr. 72.380.004 (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (2,5 µL, 10 µL), Biozym Scientific GmbH, Art.-Nr. 690005 (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Pipettenspitzen (20 µL, 100 µL, 1000 µL), Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
- Pipettenspitzen (200 µL), Greiner Bio-One International GmbH, Art.-Nr. 738261 (Kremsmünster, Österreich)
- Serologische Pipetten (5, 10, 25 mL), Costar, Art.-Nr. CLS4487, CLS4488, CLS4489 (Corning Inc., Corning, NY, USA)
- 96-Well-Zellkulturplatte, Costar, Art.-Nr. 3596 (Corning Inc., Corning, NY, USA)
- 48-Well-Zellkulturplatte, IUL Instruments GmbH, Art.-Nr. 910004 (Königswinter, Deutschland)
- 24-Well-Zellkulturplatte, Becton Dickinson, Art.-Nr. 353047 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- 12-Well-Zellkulturplatte, Biozym, Art.-Nr. 3513 (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- 6-Well-Zellkulturplatte, Sarstedt, Art.-Nr. 833.920 (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)
- 8-Well-Chamberslides, Life Technologies, Art.-Nr. 154534PK (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

2.1.2 Zelllinien

- HT-29 RRID:CVCL_0320 weiblich, human, kaukasisch, 44, Primärtumor kolorektales Adenokarzinom, 1964 J. Fogh (115)

- SW620 RRID:CVCL_0547 männlich, human, kaukasisch, 51, Lymphknoten, kolorektales Adenokarzinom, A. Leibovitz (116)
- HCT 116 RRID:CVCL_0291 männlich, human, kaukasisch, kolorektales Adenokarzinom, M.G. Brattain (117)

2.1.3 Plasmide

- Estrogen Receptor beta (ESR2) (NM_001437) Human Tagged ORF Clone Lentiviral Particle, CAT#: RC218519L4V von OriGene Technologies, Rockville, USA

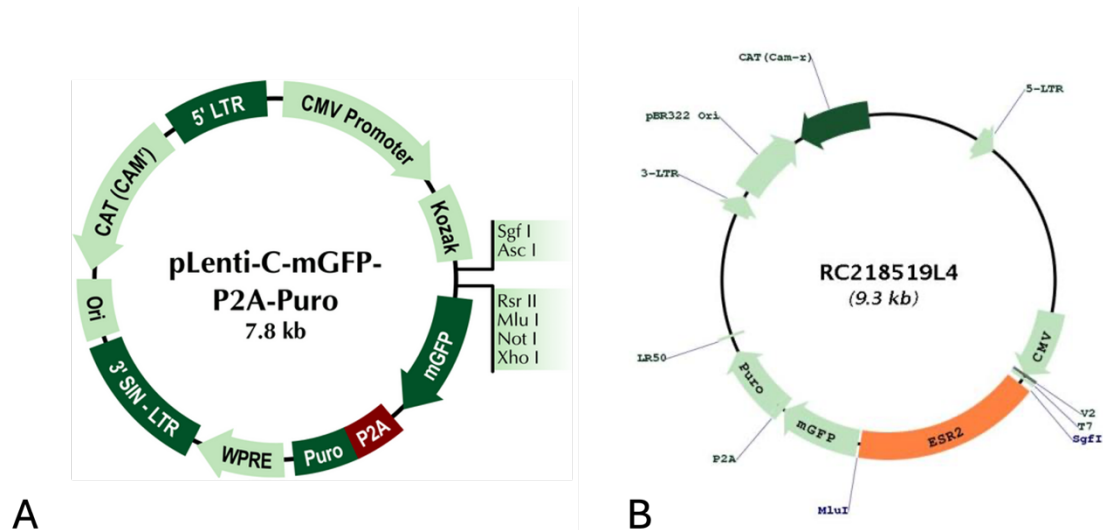


Abb. 4 A:Vector-map (118), B:Plasmid-map (119) des verwendeten ESR2-GFP Plasmids RC218519L4V von OriGene Technologies, Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Origene Technologies (118, 119)

2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Pan-Biotech, Art.-Nr. P60-36720100 (Aidenbach, Deutschland)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), Gibco, Art.-Nr. 14190-169 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep), Sigma-Aldrich, Art.-Nr. P4333 (St. Louis, MO, USA)
- Trypsin 0,05 % EDTA/0,02 % in PBS, Pan-Biotech, Art.-Nr. P10-023100 (Aidenbach, Deutschland)
- Trypsin 0,25 % EDTA/0,02 % in PBS, Pan-Biotech, Art.-Nr. P10-020100 (Aidenbach, Deutschland)
- Puromycin, Merck, Art.-Nr. 540411 (Darmstadt, Deutschland)
- Fetales Bovines Serum (FBS), Sigma-Aldrich, Art.-Nr. F7524 (St. Louis, MO, USA)
- Trypan Blue Solution, 0.4 %, Gibco, Art.-Nr. 15250-061 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

- Kanamycinsulfat (from *Streptomyces kanamyceticus*), Sigma-Aldrich, Art.-Nr. K1377 (St. Louis, MO, USA)
- Neomycin Solution 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, Art.-Nr. N1142-20ML (St. Louis, MO, USA)
- Polybrene (Hexadimethrine Bromide), Sigma-Aldrich, Art.-Nr. H9268-5G (St. Louis, MO, USA)
- Ethanol 99,5 %, VWR, Art.-Nr. 85.033.360 (Radnor, PA, USA)
- Matrigel Matrix, Corning, Art.-Nr. 356237 (Corning, NY, USA)
- ERB-041, Sigma-Aldrich, Art.-Nr. PZ0183 (St. Louis, MO, USA)
- PHTPP, Tocris Bioscience, Art.-Nr. 2662 (Bristol, UK)
- Wasser (H₂O), Sigma-Aldrich, Art.-Nr. W3500 (St. Louis, MO, USA)
- Puromycin, Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Propidium Iodide Solution, Miltenyi Biotec, Art.-Nr. 130-093-233 (Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Hoechst 33342, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- FcR Blocking Reagent, Miltenyi Biotec, Art.-Nr. 130-059-901 (Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Estrogen Receptor Beta (ESR2) (NM_001437) Human Tagged ORF Clone Lentiviral Particle, Origene, Art.-Nr. RC218519L4V (Rockville, MD, USA)
- Leibovitz's L-15 Medium, Gibco, Art.-Nr. 11415-049 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- McCoy's 5A Medium, Gibco, Art.-Nr. 26600-023 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

2.1.5 Verwendete Kits

- APC BrdU Flow Kit, BD Pharmingen™, Art.-Nr. 552598 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- CellTrace™ Far Red Cell Proliferation Kit, Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific), Art.-Nr. C34572 (Waltham, MA, USA)

2.1.6 Buffer, Medium und Lösungen

- Zellkulturmedium für SW 620
 - 89% 445ml Leibovitz's L-15 Medium
 - 10% 50ml FBS
 - 1% 5ml Penicillin/Streptomycin

Material und Methoden

- Zellkulturmedium für HT29 und HCT 116
 - 89% 445ml McCoy's Medium
 - 10% 50ml FBS
 - 1% 5ml Penicillin/Streptomycin
- Einfrier-Medium für HT29, HCT 116 und SW620
 - 70% 8ml Zellkulturmedium
 - 20% 2ml FBS
 - 10% 1ml DMSO
- Matrigel-Medium für HT29, HCT 116 und SW620
 - 92% 46ml Zellkulturmedium
 - 5% 2,5 ml FBS
 - 1% 0,5ml Penicillin/Streptomycin
 - 2% 1ml Matrigel Matrix → Jedes Mal frisch hinzufügen
- Matrigel-Medium für HT29, HCT 116 und SW620
 - 92% 46ml Zellkulturmedium
 - 5% 2,5 ml FBS
 - 1% 0,5ml Penicillin/Streptomycin
 - 2% 1ml Matrigel Matrix → Jedes Mal frisch hinzufügen
- Transduktions-Medium für HT29, HCT 116 und SW620 in 96 well
 - 92% 200µl Zellkulturmedium
 - 5% 2,5 ml Polybrene Stocklösung bei HT 29 und HCT 116
 - 5% 2,5 ml Polybrene Stocklösung bei SW 620
 - 1% 0,5ml Lentivirale ESR2 GFP Partikel

Polybrene

5g Pulver in 50 ml H₂O Lösen

→ Stocklösung I = 100mg/ml

0,1ml der Stocklösung I (100mg/ml) mit 99,9ml H₂O verdünnen (1:1000)

→ Stocklösung II = 1µg/10µl

ERB-041

5mg Pulver 271,24g/mol in 1843µl DMSO lösen

→ Stocklösung I = 10mM

Material und Methoden

$$10mM = \frac{5mg}{1843,4\mu l * 271,24g/mol}$$

10 μ l der Stocklösung I (10mM) mit 990 μ l H₂O verdünnen (1:100), Aliquots je 1ml

→ Stocklösung II = 100 μ M

$$10mM * 10\mu l = 100\mu M * 1ml$$

1 μ l der Stocklösung I (10mM) mit 999 μ l H₂O verdünnen (1:1000), Aliquots je 1ml

→ Stocklösung III = 10 μ M

$$10mM * 1\mu l = 10\mu M * 1ml$$

PHTPP

10mg Pulver 423,31g/mol in 2362 μ l DMSO lösen

→ Stocklösung I = 10mM

$$10mM = \frac{10mg}{2362,3\mu l * 423,31g/mol}$$

100 μ l der Stocklösung I (10mM) mit 900 μ l H₂O verdünnen (1:10), Aliquots je 1ml

→ Stocklösung II = 1mM

$$10mM * 100\mu l = 1mM * 1ml$$

10 μ l der Stocklösung I (10mM) mit 990 μ l H₂O verdünnen (1:100), Aliquots je 1ml

→ Stocklösung III = 100 μ M

$$10mM * 10\mu l = 100\mu M * 1ml$$

DMSO

100ml DMSO $\geq$ 99.9% Reinheit

100 μ l pures DMSO mit 900 μ l H₂O verdünnen (1:10), Aliquots je 1ml

→ Verdünnung I (1:10) 10%

10 μ l DMSO 10% mit 990 μ l H₂O verdünnen (1:100), Aliquots je 1ml

→ Verdünnung II (1:1000) 0,1%

2.2 Geräte

- Zellkulturinkubator HERAcell®, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- CO₂-Zellkulturinkubator HERAcell®, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- Laminar-Flow-Werkbank, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)
- Sicherheitswerkbank HERAsafe® KS, Heraeus Instruments (Hanau, Deutschland)

- Thermostatisches Wasserbad WBS, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Thermostat-Wasserbad WBS, Fried Electric (Leipzig, Deutschland)
- Zählkammer (Neubauer), Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland)
- Zellgefrierbehälter CoolCell®, BioCision (Larkspur, CA, USA)
- Zellgefrierbehälter Mr. Frosty™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Stickstofftank Biosafe® MD, Cryotherm GmbH & Co. KG (Troisdorf, Deutschland)
- Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge Fresco 17, Thermo Scientific Heraeus (Waltham, MA, USA)
- Zentrifuge Multifuge X1, Thermo Scientific Heraeus (Waltham, MA, USA)
- Zentrifuge Universal 30 RF, Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
- Mehrkanalpipette, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Pipette (0.5–1000 µL), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Pipettor Accu-jet® pro, Brand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland)
- Kühlschrank TSX Series, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Laborwaage, Kern & Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)
- Vortexer Lab Dancer, VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Mikroskop Wilovert A, Helmut Hund GmbH (Wetzlar, Deutschland)
- Inversmikroskop DMIL, Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop MPS, Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
- Inverses motorisiertes Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1/7, Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
- Zellsorter: MoFlo® XDP, Beckman Coulter (Brea, CA, USA); Software: Summit 5.4; Düsengröße: 100 µm; Durchflussrate: 10 000 Ereignisse/Sekunde.
- Analysegerät: CyAn™ ADP, Beckman Coulter (Brea, CA, USA); Software: Summit 4.1.

2.3 Software

- Microsoft Office® 365, Version 16 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- Fiji (ImageJ), Version 1.53t (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)
- EndNote™, Version 20.6 (Clarivate, Philadelphia, PA, USA)
- IBM® SPSS® Statistics, Version 26 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)
- GraphPad Prism®, Version 10.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)
- ZEISS ZEN Blue, Version 3.6 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland)
- Kaluza® Analysis, Version 2.1 (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA)

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung und Abbildungserstellung erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel (Microsoft Office® 365, Version 16; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA), IBM® SPSS® Statistics, Version 26 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) und GraphPad Prism®, Version 10.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Ergebnisse wurden als signifikant ab einem Alpha <0,05 angesehen, p-Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als Trend gewertet und Ergebnisse in der Regel als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Bei $n=3$ wurde aufgrund der sehr kleinen Stichprobengröße kein sinnvoll interpretierbarer Test auf Normalverteilung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden deskriptiv ausgewertet und parametrische Verfahren nur explorativ angewendet.

Für die CellTrace-Daten wurde zum Vergleich der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen eine ein-faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die ANOVA testet, ob sich die Mittelwerte von mehr als zwei Gruppen signifikant unterscheiden. Zusätzlich wurden für gezielte Mittelwertvergleiche in Bezug auf die Eigenschaften GFP-Signal (ER β -Expression) und Zelltyp t-Tests für unabhängige Stichproben eingesetzt. Der t-Test prüft, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Gruppen signifikant unterscheiden.

Im BrdU-Assay wurden die Zellzyklusverteilungen nach unterschiedlichen Behandlungen mittels ein-faktorieller multivariater Varianzanalyse (MANOVA) analysiert. Die MANOVA ermöglicht den gleichzeitigen Vergleich mehrerer abhängiger Variablen (hier Anteile der G0/G1-, S- und G2/M-Phasen) und berücksichtigt die gemeinsame Varianzstruktur dieser Variablen. Auch zum Vergleich zwischen verschiedenen Zelltypen wurde eine ein-faktorielle MANOVA durchgeführt.

Das Wachstumsverhalten der Zellen in der 3D-Matrix über mehrere Zeitpunkte hinweg wurde mit einer ein-faktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen (ANOVA) untersucht. Dieser Test berücksichtigt die wiederholte Messung derselben Proben über die Zeit und prüft auf Effekte der Behandlung und deren Verlauf. Zur Analyse des Behandlungseinflusses wurde zudem eine MANOVA durchgeführt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der low-density- und high-density-Kulturen sowie die Daten verschiedener Zelllinien jeweils mittels t-Tests für unabhängige Stichproben verglichen, um Unterschiede zwischen diesen experimentellen Bedingungen gezielt zu analysieren.

2.5 Methoden

2.5.1 Zellkultur

Die Experimente wurden mit im Labor der chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) etablierten Kolonkarzinom Zelllinien durchgeführt. Alle Zelllinien zeigen ein adhärentes Wachstum. Die Zelllinie HT29 stammte ursprünglich von einer 44-jährigen kaukasischen Frau und wurde aus einem Primärtumor eines kolorektalen Adenokarzinoms 1964 durch J.Fogh gewonnen (115). HT29 Zellen zeigen keine endogene ESR2 Expression. SW620 Zellen stammen von einem 51-jährigen kaukasischen Mann und konnten aus einer Lymphknotenmetastase eines kolorektalen Karzinoms gewonnen werden durch A. Leibovitz (116). Bei SW620 Zellen zeigt sich gegensätzlich zu den HT29 eine schwache endogene ESR2 Expression. Die HCT 116 Zellen stammen ebenfalls von einem kaukasischen Mann, wurden jedoch aus einem kolorektalen Karzinom durch M.G. Brattain kultiviert (117).

Leibovitz's L-15 Medium wurde für die Kultivierung der SW620 genutzt, McCoy's Medium für die HCT116 und HT29 Zellen. Das Zellkulturmedium wurde ergänzt durch 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin.

Für das Wachstum im Inkubator herrschen Standardzellkulturbedingungen mit einer Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂. Das Arbeiten erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank mit Abzug. Mittels zehnfacher Vergrößerung erfolgte die Beurteilung der Zellen und deren Wachstum per Mikroskopie.

Das Pipettieren erfolgte unter Zuhilfenahme der elektronischen Pipettierhilfe (PipetBoy) und sterilen Stripetten.

Das Splitten der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80%. Das Medium wurde abpipettiert und anschließend die Zellkulturflasche/Platte mit DPBS gewaschen, sodass der Zellkulturboden bedeckt war. DPBS wurde mit abgelösten Zellen und Debris im Überstand vorsichtig abpipettiert und anschließend das Lösen der Zellen mittels Trypsin 0,05% EDTA/0,02% durchgeführt. Nach kurzer Inkubationszeit wurde das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert und eine dem Trypsin entsprechende Menge an Zellkulturmedium zugeben, um die lytische Wirkung des Trypsins zum Schutz der Zellen zu neutralisieren. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden alle Zellen gelöst und anschließend in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann für 5 Minuten bei 1500 rpm (rounds per minute) zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet nach Bedarf mit Zellkulturmedium resuspendiert um die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen/Platten zu überführen.

Sollte eine Zählung der Zellen erfolgen, wurden die Zellen mit DPBS resuspendiert und nach unten aufgeführtem Protokoll ausgezählt unter Zuhilfenahme der Neubauer Zählkammer.

Zum Einfrieren der Zellen wurden die Zellen wie oben aufgeführt ebenfalls mittels des Trypsins abgelöst und bei 4°C zentrifugiert. Das Einfriermedium (Zellkulturmedium 70%, FBS 20%, DMSO 10%) wurde auf Eis kühlgestellt. Pro konfluenter 75cm² Zellkulturflasche wurde ein 2ml Cryo-Röhrchen angesetzt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet mit 1ml Einfriermedium resuspendiert, ins Cryo-Röhrchen überführt und direkt in einen -20°C Gefrierschrank gestellt. Nach 2 Stunden erfolgte die Überführung in -80°C, nach 24 Stunden die dauerhafte Lagerung im Stickstofftank.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Cryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37°C. Sobald das Zellpellet mobil war, erfolgte der Transfer in ein 15ml Falcon-Röhrchen mit 9ml warmen Zellkulturmedium. Anschließend Zentrifugieren und Verwerfen der Überstandes, Resuspendieren des Zellpellets mit Zellkulturmedium und aussäen der Zellen nach Bedarf.

2.5.2 Zellzählung

In PBS suspendierte Zellen wurden mehrmals gewendet, um eine repräsentative Zellprobe abpipettieren zu können (10µl). Die 10µl wurden in eine 96-well Zellkulturplatte gegeben und 10µl Trypanblau zugegeben. Mehrmaliges auf- und abpipettieren, anschließend wurden 10µl Zellsuspension mit Trypanblau auf eine Neubauer-Zählkammer auftragen und zwischen das Deckglas laufen gelassen, je oben und unten. Nun folgte das Auszählen der 4 Felder oben und unten mit dem 10X Objektiv im Mikroskop. Dabei wurden nur weiß imponierende lebendige Zellen gezählt. Bei akzeptabler Homogenität wurden die Mittelwerte aus 8 Feldern bestimmt und die Zellzahl/ml nach unten aufgeführter Formel berechnet.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} (2) * 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

2.5.3 Killing Curve

An Tag 1 wurden 11x 24-wells mit je 5-8x10⁴ Zellen ausgesät. An Tag 2 erfolgte das Zugabe des Hemmstoffes (Puromycin) in Konzentrationen von 0µg/ml – 10 µg/l nach dem Mediumwechsel. An den folgenden Tagen erfolgte eine Konfluenz-Kontrolle per Mikroskop. Es wurde die geringste Konzentration gewählt, bei dem alle Zellen nach 3 Tagen gestorben waren.

2.5.4 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion wurde in S2 Laboren durchgeführt. Eine entsprechende Genehmigung für die Experimente wurde unter Aktenzeichen 53.05-01-D-21-014 vom Gesundheitsamt der Stadt Düsseldorf eingeholt.

Die entsprechende Zelllinie wurde in einer 24-well Platte ausplattiert, pro Well 0,5 x 10⁴ Zellen. Inkubieren der Zellen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ für 24 Stunden. Bei einer

Konfluenz von ca. 50 % erfolgte die Transduktion am Folgetag. Dabei wurden die lentiviralen Viruspartikel des ESR2-GFP-Plasmids (120) (RC218519L4V) hinzugegeben.

Die notwendige Menge an lentiviralen Partikeln pro Zelle, für eine erfolgreiche Transduktion (MOI = Multiplicity of Infection), wurde mit der Anzahl an Zellen pro Well multipliziert, so erhielt man die Anzahl der benötigten Transduktionseinheiten (TU = total transducing units needed). Nach unten aufgeführter Formel wurde die Menge an lentiviralen Viruspartikeln in ml je nach Konzentration (TU/ml) berechnet.

$$\text{Zellanzahl pro well} * \text{MOI} = \text{TU}$$

$$\frac{\text{benötigte TU}}{\frac{\text{TU}}{\text{ml}} \text{ der lentiviralen Viruspartikel}} = \text{ml benötigter lentiviraler Viruspartikel/well}$$

Nach einem Mediumwechsel wurden die lentiviralen Partikel auf Eis aufgetaut und anschließend den Zellen zugegeben. Ebenfalls wurde Polybrene (Hexadimethrinbromid) zur Steigerung der Transduktionseffektivität hinzugefügt. Bei den SW620-Zellen wurde mit einer Polybrene-Konzentration von 8µg/ml gearbeitet, bei den HT29- und HCT116-Zellen mit einer Konzentration von 2µg/ml.

Nun wurden die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert, bevor ein erneuter Mediumwechsel erfolgte. Die lentiviralen Partikel wurden in dem Zuge abpipettiert. Weiteres inkubieren der Zellen. Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie hinsichtlich der Entwicklung von GFP-positiven Signalen untersucht. Bestanden GFP-Signale wurde bei einer Konfluenz über 80% die transduzierte Zellkulturflasche gesplittet. Im weiteren Verlauf erfolgte bei Bedarf eine Selektion durch Puromycin alle 3-4 Tage. Weitere Selektion mittels FACS (Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung), indem nur die GFP-positiven Zellen weiter kultiviert wurden.

Über den Nachweis des GFP-Signals wurde bei den zuvor GFP-negativen Zelllinien von einer erfolgreichen Transduktion ausgegangen. Bei GFP-Positivität über 90% erfolgte eine Sicherung der Zellen durch Einfrieren und Einlagern in den Stickstofftank bevor weitere Experimente erfolgten.

In einem zuvor durchgeführten Experiment wurde die notwendige Menge an lentiviralen Partikeln pro Zelle bestimmt (MOI). Dafür wurde auf einer 96-well Platte ein MOI von 17-490 angewandt. Ab einem MOI von 68 zeigten sich erfolgreiche Transduktionsergebnisse, siehe für die Zelllinie HT29 in Tabelle 6, mit einer GFP-Positivrate von 0,57% in der Untersuchung mittels FACS. Es wurde für die weiteren Transduktion der Zelllinien mit einem MOI von 100 gearbeitet. Sämtliche nicht erfolgreichen Transduktionsreihen, sowie der bei den S2 arbeiten angefallene Abfall, wurde ordnungsgemäß autoklaviert und entsorgt, nachdem die Zellen zuvor mittels Ethanol getötet wurden.

MOI	Zellzahl im FACS GFP-positiv	GFP positiv in % im FACS
17	1530	0,13
34	1768	0,48
68	2360	0,57
490	1737	0,99

Tabelle 6 FACS von transduzierten HT29-ESR2-GFP in 24-well Zellkulturplatten

Bei stets frustrierender Transduktion der SW620-Zellen erfolgten zusätzlich weitere Versuche mit verschiedenen Polybrene-Konzentrationen. Leider konnte auch so keine stabile Zelllinie SW620-ESR2-GFP kultiviert werden.

Protokoll Lentivirale Transduktion

Ausplattieren

8750 Zellen/ 96- well

Inkubieren für 24h mit 200µl Zellkulturmedium/well

Transduktion

Waschen mit 100µl DPBS

Mediumwechsel mit 200µl Zellkulturmedium/well

MOI 100 lentivirale Viruspartikel hinzufügen

Polybrene (II) hinzupipettieren 8µg/ml bei SW620, 2µg/ml bei HT29 und HCT116

Inkubieren für 24h

Nachbehandlung

Waschen mit 100µl DPBS

Mediumwechsel mit 200µl Zellkulturmedium/well

Zellkultur nach Protokoll

Nach 2-facher Passage Überführen der Zellen in das S1 Labor

Puromycin-Selektion

FACS-Selektion

Einfrieren und weitere Experimente

2.5.5 ERB-041 und PHTPP Stimulation

In der Arbeitsgruppe erfolgte parallel in einem anderen Projekt eine Untersuchungsreihe der ESR2-Genexpression bei unterschiedlichen ERB-041(ESR2-Agonist) und PHTPP(ESR2-Antagonist) Konzentrationen mittels qPCR. Bei einer ERB-041 Konzentration von 100nM zeigte sich die höchste ESR2-Genexpression, bei einer PHTPP Konzentration von 0,5µM zeigte sich über verschiedene zeitliche Intervalle die geringste ESR2-Genexpression, daher wurden diese Konzentrationen für die folgenden Experimente genutzt.

2.5.6 3D Matrigel-Versuch

Aufbauend auf die zuvor durchgeführten Experimente wurden die transduzierte Zelllinie HCT116-ESR2-GFP sowie die Zelllinie SW620-GFP, die eine schwache endogene Östrogenrezeptor-beta-Expression aufweist, über einen Zeitraum von 10 Tagen im Matrigel-Experiment untersucht. Dieses 3D-Modell kommt den in vivo-Bedingungen disseminierter Kolonkarzinomzellen in Sekundärorganen näher, da Matrigel eine extrazelluläre Matrix bildet und ein dreidimensionales Wachstum ermöglicht.

Für die Experimente wurden 8-well-Chamberslides mit 50 µl flüssigem, auf Eis aufgetautem Matrigel beschichtet, das anschließend 30 Minuten im Zellkulturinkubator polymerisierte. Die Zellen wurden bei etwa 80 % Konfluenz aus der Kultur gelöst, in DPBS durch ca. 30-maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl-Pipette zur Einzelzellensuspension resuspendiert. Anschließend erfolgte das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer. Für die low-density-Kultur wurden 2.000 Zellen pro Kammer, für die high-density-Kultur 5.000 Zellen pro Kammer in die Matrigel-beschichteten Wells ausgesät, entsprechend den Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe. Die Zellen wurden alle zwei Tage im Rahmen des Mediumwechsels mit ERB-041 (100nM) und PHTPP (0,5µM) behandelt, als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO genutzt. Für jede Behandlungsgruppe wurden n=3 unabhängige Experimente durchgeführt.

An den Tagen 2, 5 und 10 wurden lebende und GFP-positive Zellen in 10 nach einem Zufallsalgorithmus ausgewählten Positionen mittels Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Bilder mit mehr als 25 % Randanteil wurden ausgeschlossen. Zellvitalität wurde anhand einer intakten Zellmembran und der zelltypspezifischen Morphologie klassifiziert; Zellen mit deutlicher Abrundung, oder ausgeprägter zytoplasmatischer Granularität wurden nicht als vital gewertet.

Die Zählung erfolgte visuell assistiert mithilfe eines Makros des wissenschaftlichen Bildverarbeitungsprogramms ImageJ. Es wurden Singletten (einzeln vorliegende Zellen), Multipletten (differenzierbare Zellen im Verband) und Organoide (nicht mehr differenzierbare Zellaggregate) manuell-visuell klassifiziert. Da initial Einzelzellen ausgesät wurden, konnte die Bildung eines Organoids als Ergebnis klonalen Wachstums aus einer Zelle interpretiert werden. Die Summe der gezählten Strukturen wurde anschließend auf die Anzahl auswertbarer Bilder normiert.

Protokoll Matrigel Versuche

1. Bei ca. 80% Konfluenz aussäen der Zellen in 8-well-chamberslides
 - Low-density Kultur mit 2000 Zellen/well
 - High-density Kultur mit 5000 Zellen/well
2. Beschichten der 8-well-chamberslides mittels auf Eis aufgetautem Matrigel
 - 50µl/well

3. Matrigelmedium hinzugeben

- 400µl /well
 - ⇒ 5% FCS
 - ⇒ 1% Penicillin-Streptomycin
 - ⇒ 2% Matrigel jedes Mal frisch hinzufügen

4. Inkubieren für 10 Tage bei 21% O₂ und 5% CO₂ und 37°C

5. Mediumwechsel (400µl) alle 48h und Behandlung

- ERB-041 4 µl der Stocklösung III → 100nM
- PHTPP 2 µl der Stocklösung III → 0,5µM
- Kontrolle 4 µl DMSO (0,1%)

6. Fluoreszenzmikroskopie an Tag 2, 5 und 10

2.5.7 Hoechst – Färbung

An Tag 10 des Matrigel-Experiments erfolgte zunächst eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Anschließend erfolgte eine Hoechst-Färbung, gefolgt von einer erneuten Bildaufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Hoechst-Färbung diente der Färbung und Visualisierung der Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop, eine Detektion erfolgte im DAPI-Kanal. Die Färbung wurde mit einer Konzentration von 5µg/ml über eine zehnminütige Inkubationszeit mit anschließender dreifacher Waschung mit PBS durchgeführt.

2.5.8 Fluoreszenzmikroskopie

An den Tagen 2, 5 und 10 erfolgt eine Auswertung und Bewertung der Matrigel-Experimente mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM). Die Aufnahmen wurden mit einem inversen motorisierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axio Observer.Z1 / 7) unter Verwendung von passenden Filtersets für TaGFP, DAPI und Cy3 mit einem 20x-Objektiv (LD-Plan-Neofluar) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Monochromkamera aufgenommen und mit der ZEN-Software verarbeitet. Die Chamberslides wurden initial ausgemessen und das Mikroskop auf die Chamberslides kalibriert. Mittels zufälliger Auswahl (Random-Funktion) wurden pro Well 10 Punkte automatisch angefahren und dann per Hand die Fokusebene mit den meisten Zellen scharfgestellt und die Aufnahme in allen 4 genannten Kanälen durchgeführt.

Die Belichtungszeit wurde mittels der Automatikfunktion des Mikroskops ausgewählt.

Somit werden pro Well 10 Bilder aufgenommen, pro Experiment mit 6 Wells 60 und über 3 Tage insgesamt 180 Bilder pro Experiment. Im Anschluss wurden die Zellen wieder in den Zellkulturinkubator gegeben.

Kanalnummer	Kanal	Anregung nm	Emission nm
1	TaGFP	482	505
2	DAPI	353	465
3	Cy3 / Red	548	561
4	Brightfield	-	-

Tabelle 7 Kanäle Fluoreszenzmikroskopie

2.5.9 Image-J Protokoll

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzbilder wurde Image-J genutzt. Zur systematischen Auswertung wurde ein Makro erstellt und angewandt. Die Bilder wurden in allen 4 Kanälen separat nebeneinander geöffnet. Der GFP-Kanal wurde ein zweites Mal mit einer aktivierten Zählfunktion geöffnet. In 4 Kategorien wurden die Bilder per händischem Markern ausgewertet. Der erste Marker wurde einmalig vergeben, sofern das Bild als Auswertbarkeit bewertet wurde. Wenn über 25% des Bildes den Rand zeigten, dann wurde das Bild ausgeschlossen. Der zweite Marker wurde für eine in der Hellfeld-Aufnahme lebendige und GFP-positive Zelle ohne Autofluoreszenz im Cy3-Kanal vergeben, die als Einzelzelle ohne Kontakt zu anderen Zellen vorlag. Im weiteren Verlauf wurden diese Zellen als „Singletten“ bezeichnet. Der dritte Marker wurde angewandt für Zellen, die im Verband vorlagen und schon Mitosen erfolgt sind. Also ab $\geq$ zwei Zellen, sofern in dem Verband die Einzelzellen zählbar abgrenzbar waren, wurde die Zelle mit dem Marker der Kategorie „Drei“ versehen. Im weiteren Prozess wurden die Zellen als „Multipletten“ bezeichnet. Ab einem Zellverband >7 Zellen, bzw. wenn eine sichere Identifikation von Einzelzellen nicht mehr möglich war, wurde ein Marker der Kategorie „Vier“ vergeben. Im weiteren Verlauf wurde ein solcher Zellverband als „Organoid“ bezeichnet. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse in einer Exceltabelle als Output ausgegeben und die Bilder mit Markern gespeichert.

Marker	Zellzahl im FACS
I	< 25 % Randbereich → auswertbar
II	Singlette
III	Multiplette
IV	Organoid

Tabelle 8 Matrigel-Zellkategorien

2.5.10 CellTrace-Experiment

Mit dem Ziel die Auswirkung einer Manipulation am Östrogenrezeptor-beta bei Kolonkarzinomzellen hinsichtlich der Proliferation zu untersuchen, wurden die zuvor transduzierten Kolonkarzinomzelllinien HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP in 3 unabhängigen experimentellen Ansätzen (n=3) mittels des CellTrace™ Far Red Proliferation Kits untersucht, dessen Fluoreszenzsignal (Anregung 630 nm, Emission 661 nm) im APC-

Kanal der Durchflusszytometrie erfasst wurde. Der fluoreszierende CellTrace™ Far Red Farbstoff wird durch zelleigene Esterasen nach Eintritt in die Zelle aktiviert, wodurch die fluoreszierende Eigenschaft ausgelöst wird. Die nun vorliegenden Succinimidylester binden kovalent an Aminogruppen der Proteine in den Zellen, wodurch es zu einer nachhaltigen mittelfristigen Färbung der Zellen im Plasma kommt. Wächst die Zelle und kommt es nun zu einer Mitose werden ebenfalls die Fluoreszenzpartikel zu ca. gleichen Anteilen auf die Tochterzellen aufgeteilt. Mittels Bestimmung der Fluoreszenz-Intensität per Durchflusszytometrie lässt sich somit auf die Menge der erfolgten Mitosen und damit auf die Proliferation Rückschlüsse ziehen, ergo verhält sich die Intensität umgekehrt proportional zur Proliferation. Es wurden jeweils die ERB-041-, PHTPP- und DMSO-Gruppen, sowie die GFP-positiven und GFP-negativen Zellen, separat gemessen. Es traten erhebliche Schwankungen der Intensitätsniveaus in den jeweiligen Experimentansätze auf. Jedoch war die Spannweite der Intensität, die innerhalb eines Ansatzes vorlag, reproduzierbar nah beieinander. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden die Proben jeweils auf die jeweilige DMSO-Probe (Kontrolle) normiert und mit der Einheit: „normierte CellTrace-Intensität (nCTI)“ angegeben.

$$\text{normierte Intensität ERB} - 041 = \frac{\text{Intensität ERB} - 041}{\text{Intensität DMSO}}$$

$$\text{normierte Intensität PHTPP} = \frac{\text{Intensität PHTPP}}{\text{Intensität DMSO}}$$

$$\text{normierte Intensität DMSO} = 1$$

Bei mehrfach gemessenen Proben wurde ein Mittelwert der Messungen für die weitere Analyse genutzt, sofern ERB-041, PHTPP und DMSO jeweils gleich oft bestimmt wurden.

Protokoll CellTrace-Assay

Lösen der Zellen aus der Zellkultur, Verdünnung des Zellpellets auf 10^6 Zellen/ml mit PBS

Färbung mit 1 µl CellTrace™ Far Red pro ml Zelllösung (10^6 Zellen/ml)

20min Inkubation 37°C in Lichtschutz

Hinzufügen des 5-fachen Volumens mit Zellkulturmedium

5 min Inkubation 37°C

Zentrifugation und Resuspendieren mit Zellkulturmedium

$0,3 \times 10^6$ Zellen pro Well in eine 6-well Platte gegeben

24h Inkubation

Tag 2 Mediumwechsel (2ml) und Behandlung je eines wells mit

- ERB-041 2 µl der Stocklösung II → 100nM

- PHTPP 1 µl der Stocklösung II → 0,5µM
- Kontrolle 1 µl DMSO (10%)

Anschließend Inkubation für 36 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen

Ernte und Lagerung 4°C Kühlschrank mit Alufolie bedeckt

Durchflusszytometrie Messung am gleichen Tag

2.5.11 BrdU-Assay

Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen wurde das APC BrDU Flow Kit (BD Pharmingen™) gemäß Herstellerprotokoll eingesetzt. Es wurden Experimentansätze von HCT 116 ESR2 GFP Zellen (n=3) und SW620-GFP Zellen (n=3) untersucht. Initial wurden $0,3 \times 10^6$ Zellen pro Well in eine 6-well Platte gegeben und für 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Es wurde jeweils das der Zelllinie entsprechende Medium hinzugegeben. An Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel, anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen. Diesbezüglich wurde ein Well mit ERB-041 behandelt durch hinzugeben von 2 µl der Stocklösung II, ein weiteres Well mit PHTPP durch hinzupipettieren von 4 µl der Stocklösung II, sowie ein Well als Kontrolle durch hinzugeben von 4 µl DMSO. Anschließend Inkubation für 36 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen. Nun wurde das BrdU-Assay durchgeführt gemäß dem unten aufgeführten Protokoll. Das Nukleosidanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) wurde im Assay zur DNA-Markierung genutzt.

Im Anschluss wurde mittels Durchflusszytometrie von jeder Zelle der Zellzyklus bestimmt mit dem Ziel die anteiligen Zellzyklusstadien der verschiedenen behandelten Zellen miteinander zu vergleichen. Dabei wurden jeweils die ERB-041-, PHTPP- und DMSO-Gruppen separat gemessen. Pro Probe wurden 100.000 Zellen mit Kaluza analysiert. Insgesamt wurden 3 Zellzyklusstadien durch entsprechende FACS-Gates definiert. Die so abgrenzbaren Zellzyklusstadien sind die G0/G1-Phase, G2/M-Phase und S-Phase. Bei den HCT116-ESR2-GFP-Proben (ERB-041, PHTPP und DMSO) wurde jeweils eine unmittelbare doppelte Messung vorgenommen, ein Mittelwert der Messungen wurde für die weitere Analyse genutzt. Bei den SW620-GFP Zellen erfolgte jeweils nur eine einmalige Messung.

Bei der Zelllinie HCT116-ESR2-GFP wurde ebenfalls das GFP-Signal gemessen und die Ergebnisse in GFP-positiv und GFP-negativ separat ausgegeben.

Beim BrdU-Assay mit den SW620-GFP Zellen ging das GFP-Signal nach Applikation des Permwashbuffers verloren. Daher sind die Ergebnisse für SW620-GFP nicht nach GFP-Signal aufgeschlüsselt angegeben. Im Rahmen der Etablierung des Experiments konnte gezeigt werden, dass wenn eine Färbung mit BrdU im Protokoll ausgelassen wird, die nicht mit BrdU gefärbten Zellen sich BrdU-negativ präsentieren und in der G0/G1- und G2/M-Phase nachzuweisen sind, jedoch nicht in der S-Phase.

Material und Methoden

Die Summe der Zellen von den 100.000 untersuchten Zellen, die in einem dieser drei Zellzyklusstadien registriert wurden, wurde als 100% gesetzt. Anschließend wurde für alle Proben die Prozentzahl der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase bestimmt und deren Mittelwerte berechnet.

$$100\% = G0/G1 + G2/M + S$$

$$G0/G1 \text{ in } \% = \frac{G0/G1}{G0/G1 + G2/M + S}$$

$$G2/M \text{ in } \% = \frac{G2/M}{G0/G1 + G2/M + S}$$

$$S \text{ in } \% = \frac{S}{G0/G1 + G2/M + S}$$

Protokoll BrdU-Assay

24h Inkubation nach Aussaat

Tag 2 Mediumwechsel (2ml) und Behandlung je eines *well*s mit

- ERB-041 2 µl der Stocklösung II → 100nM
- PHTPP 1 µl der Stocklösung II → 0,5µM
- Kontrolle 1 µl DMSO (10%)

Inkubation der Zellen in 6- well Zellkulturplatten über 36h nach Behandlung

Hinzufügen von 30µl 1mM BrdU pro well zu 3ml Zellkulturmedium

Inkubation 2 Stunden bei 37°C Standardzellkulturbedingungen

Waschen mit 1ml DPBS

Lösen mittels 0,5ml Trypsin/ EDTA 0,05%

Neutralisieren mittels 1ml Zellkulturmedium

Überführen in FACS-Röhrchen

Zentrifugation mit relativer Zentrifugalkraft = 300 (*relative centrifugal force* = rcf) für 5 Minuten

Abgießen des Überstands.

Resuspendieren mit 100µl BD Cytotfix/Cytoperm Buffer

Inkubation 20 Minuten auf Eis

Material und Methoden

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit BD Cytoperm Permeabilization Buffer

Inkubation 10 Minuten auf Eis

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit 100µl BD Cytofix/Cytoperm Buffer

Inkubation 5 Minuten bei Raumtemperatur

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit 100µl verdünnter DNase (30µl DNase+70µl DPBS)

Inkubation 1 Stunde bei 37°C Standardzellkulturbedingungen

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit 100µl verdünntem FcR-Blocking Reagent (20µl FcR-Blocking Reagent +80µl DPBS)

Inkubation 15 Minuten auf Eis

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit 50µl verdünnter APC anti-BrdU Lösung (1µl APC anti-BrdU Lösung+49µl Perm/Wash Buffer)

Inkubation 20 Minuten bei Raumtemperatur

Zellwaschung 1ml Perm/Wash buffer

Zentrifugation bei 300 rcf für 5 Minuten.

Abgießen des Überstands

Resuspendieren mit 100µl verdünnter PI-Lösung (2,5µl PI + 97,5µl DPBS)

Inkubation 30 Minuten bei 37°C Standardzellkulturbedingungen

Hinzugeben von 0,5ml DPBS

Lagerung 4°C Kühlschrank mit Alufolie bedeckt

Durchflusszytometrie Messung am gleichen Tag

2.5.12 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen bezüglich der Größe, der Granularität und Fluoreszenz gemessen werden (121). Aus einer Zellsuspension werden die Zellen mittels eines Hüllstroms fokussiert und in einen Mikrokanal einer Küvette geführt. Dabei ist der Kanal der Küvette, meist aus Glas oder Quarz, so klein, dass die Zellen einzeln hintereinander in den Messbereich treten. Somit wird jede Zelle einzeln analysiert. Dabei werden die Zellen einem Laserstrahl oder einer elektrischen Spannung ausgesetzt. Trifft eine Zelle auf den Laserstrahl, entsteht ein Streulicht, diese Emissionen werden von einem Detektor registriert. Durch diese Methode können sehr viele Zellen in kurzer Zeit einzeln quantifiziert werden (>1000 Zellen/Sekunde) und man erhält schnell eine aussagekräftige und repräsentative Analyse für eine gemessene Zellpopulation. Über die Art und Menge des Streulichts lassen sich Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle schließen. Durch das registrierte Vorwärtsstreulicht (FSC= Forward Scatter), welches die Beugung des Lichts im flachen Winkel angibt, kann das Volumen der Zelle bestimmt werden. Das Seitwärtsstreulicht (SSC= Side Scatter) gibt die Brechung des Lichts im 90° Winkel an und variiert bei unterschiedlicher Komplexität der Zellstrukturen wie Granularität, Zellkerngröße, Struktur, sowie bei Vorliegen von Vesikeln (121). Darüber hinaus lassen sich Fluoreszenzsignale detektieren. Dafür benötigt man meist vorangegangene Färbeprotokolle, da die meisten Zellen über kaum Autofluoreszenz verfügen. Die Laserstrahlen und Wellenlängen können variieren und auch mit Filtern nach Bedarf angepasst werden. Die Intensität wird ebenfalls mitgemessen. Diese Lichtsignale werden in einen elektrischen Impuls am Detektor umgewandelt. Diese Impulse haben drei Dimensionen, die Pulshöhe (H= pulse height), die Pulsweite (H= pulse width) und das Integral des Pulses (A). Durch Auswahl von Grenzwerten für die genannten messbaren Eigenschaften können sogenannte „Gates“ erstellt werden, auf die sich weitere Teilmengen beziehen können, um so nach Belieben Aussagen zu den gewünschten Teilmengen ausgeben zu können.

Die entsprechende Zelllinie wurde durch das entsprechende Setzen der „Gates“ detektiert anhand von der Größe (FSC-A) und der Granularität (SSC-A), auch um Zelldebris und tote Zellen aus der Analyse auszuschließen. Durch Eingrenzen der Population bei der höchsten Event-Dichte wurden die lebendigen Zellen der jeweiligen Zelllinie erkannt. In einem nächsten Schritt werden die Zellen auf der SSC-H und SSC-W Achse aufgetragen, um Dupletten und Zellklumpen auszusortieren. GFP-Fluoreszenzintensität konnte mit dem FITC-A und PE-A Kanal detektiert und hier ein GFP-positives Gate festgelegt werden. Initial wurde jeweils mit

einer GFP-naiven Kontrollpopulation das GFP-negative Gate definiert. Mittels dem KALUZA Programm von Beckman Coulter Life Sciences wurden die Analysen und das Gating durchgeführt, sowie Abbildungen und Tabellen erstellt mit Teilangaben der jeweiligen Populationen zur weiteren statistischen Analyse.

Das für diese Arbeit genutzte Durchflusszytometer CyAn ADP ist mit einem blauen Laser (488nm; 20mW), einem roten Laser (633nm; 17mW) und einem violetten Laser (405nm; 25mW) ausgestattet.

Folgende optische Filter wurden genutzt:

- 488/10 BP für SSC
- 530/40 BP für GFP
- 575/25 BP für PE als „Leerkanal“ (GFP gegen PE)
- 680/30 BP für Propidiumiodid (PI)
- 665/20 BP für BRDU-APC und CellTrace far red

GFP und PI wurden mit dem blauen Laser mit 488nm angeregt. Das Emissionsmaximum von GFP liegt bei 510nm, von PI bei 617nm. GFP wurde im FITC-Kanal (FL1) logarithmisch verstärkt detektiert. PI wurde im PerCP / PerCP-CyTM5.5-Kanal linear verstärkt detektiert (FL4). CellTrace far red und das mit dem Fluorochrom Allophycocyanin (APC) konjugierte BrdU wurden mit dem roten 633nm Laser angeregt. CellTrace far red hat ein Emissionsmaximum von 661nm, APC hat ein Emissionsmaximum von 660nm, beide wurden im APC-Kanal detektiert (FL6).

2.5.12.1 Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Assays

Für die Zellzyklusanalyse wurden erneut wie zuvor beschrieben die lebendigen (FSC-A und SSC-A) und als Einzelzelle (SSC-A und SSC-W) vorliegenden Zellen identifiziert. Zudem erfolgte eine Differenzierung nach GFP-Signal über den FITC-A und PE-A Kanal.

Die PI-Färbung wird zur Quantifizierung des DNA-Gehalts über die PerCP-A und PerCP-W Signale genutzt. BrdU ist aufgrund der Konjugation mit dem Fluorochrom APC im APC-Kanal detektierbar, PI im PerCP-H Kanal. Durch Darstellung des PerCP-H- gegen das APC-Signal konnten drei Gates definiert werden: eines für die G0/G1-Phase, eines für die M-Phase und eines für die S-Phase. Zellen mit höherem Signal im APC-Kanal hatten BrdU in ihre DNA eingebaut und befanden sich somit in der S-Phase des Zellzyklus. Die Unterscheidung zwischen G0/G1- und M-Phase erfolgte über die PI-Färbung, da Zellen in der M-Phase die doppelte Menge an DNA aufweisen und daher eine höhere PI-Fluoreszenz im PerCP-H-Kanal zeigten. Es wurden stets 100.000 Zellen ausgezählt und anschließend die Teilmengen der Zellzyklusphasen in Prozent ausgegeben. Zuvor wurden die Gates mit einer Färbekontrolle mit BrdU-naiven Zellen etabliert.

2.5.12.2 Durchflusszytometrische Analyse des CellTrace-Assays

Für das CellTrace-Proliferationsexperiment wurde das CellTrace™ Far Red Proliferation Kit verwendet. Es wurden erneut, wie zuvor beschrieben, die lebendigen (FSC-A und SSC-A) und als Einzelzelle (SSC-A und SSC-W) vorliegenden Zellen identifiziert. Zudem erfolgte eine Differenzierung nach GFP-Signal über den FITC-A und PE-A Kanal. Das Fluoreszenzsignal des CellTrace Far Red (Anregung 630 nm, Emission 661 nm) wurde im APC-Kanal erfasst und ein Intensitätsmittelwert für die Zellpopulation erhoben.

2.5.13 FACS-Zellselektion

Zusätzlich lassen sich die Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie sortieren (121). Aus der Mikrokanalküvette tritt ein Zellsuspensionsstrom aus, ein zusammenhängender Einzelzell-Flüssigkeitsfaden. Mithilfe eines Vibrators werden die Zellen aus diesem Fadenstrom in einzelne Tröpfchen getrennt. Dieses Prinzip nennt sich hydrodynamische Fokussierung. Dabei sind die Tröpfchen gerade so groß, dass nur eine Zelle pro Tröpfchen vorliegt. Diese, die Zelle umgebende Flüssigkeit im Tröpfchen, lässt sich so durch Anlegen eines elektrischen Feldes polarisieren und Ablenken in ein anderes Gefäß. Diese Ablenkung bzw. Sortierung wird ausgelöst, sobald die zuvor definierten Kriterien in der Messung mittels FSC, SSC und Fluoreszenzkanälen erfüllt werden. Somit wird jede Zelle einzeln analysiert und sortiert. Es liegen die sortierten Zellen in unterschiedlichen FACS-Röhrchen vor und können für weitere Experimente oder Rekultivierung verwendet werden. Mit diesem Prinzip erfolgte eine Selektion der GFP-positiven Zellen, um eine möglichst vollständig GFP-positive Zellpopulation zu erhalten. Somit ergänzte die FACS-Methode die Selektion mit Puromycin über die Resistenzkassette der transduzierten Zellen.

3 Ergebnisse

3.1 Transduktionseffizienz

Das entsprechende Östrogenrezeptor-beta tragende Plasmid ist mit einer für GFP kodierenden Sequenz gekoppelt. Bei erfolgreicher Transduktion ist neben einer Östrogenrezeptor-beta Expression somit auch eine GFP-Expression zu erwarten. Die verwendeten Zellen wiesen vor Transduktion keine GFP-Expression auf. Der Transduktionserfolg wird mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Nachweis eines GFP-positiven Fluoreszenzmikroskopiesignals erbracht. Dieses gelingt für die Zellen der Zelllinie HCT116 wie in Abb. 5 und Abb. 6 ersichtlich, nicht mit den HT29 und SW620 Zellen.

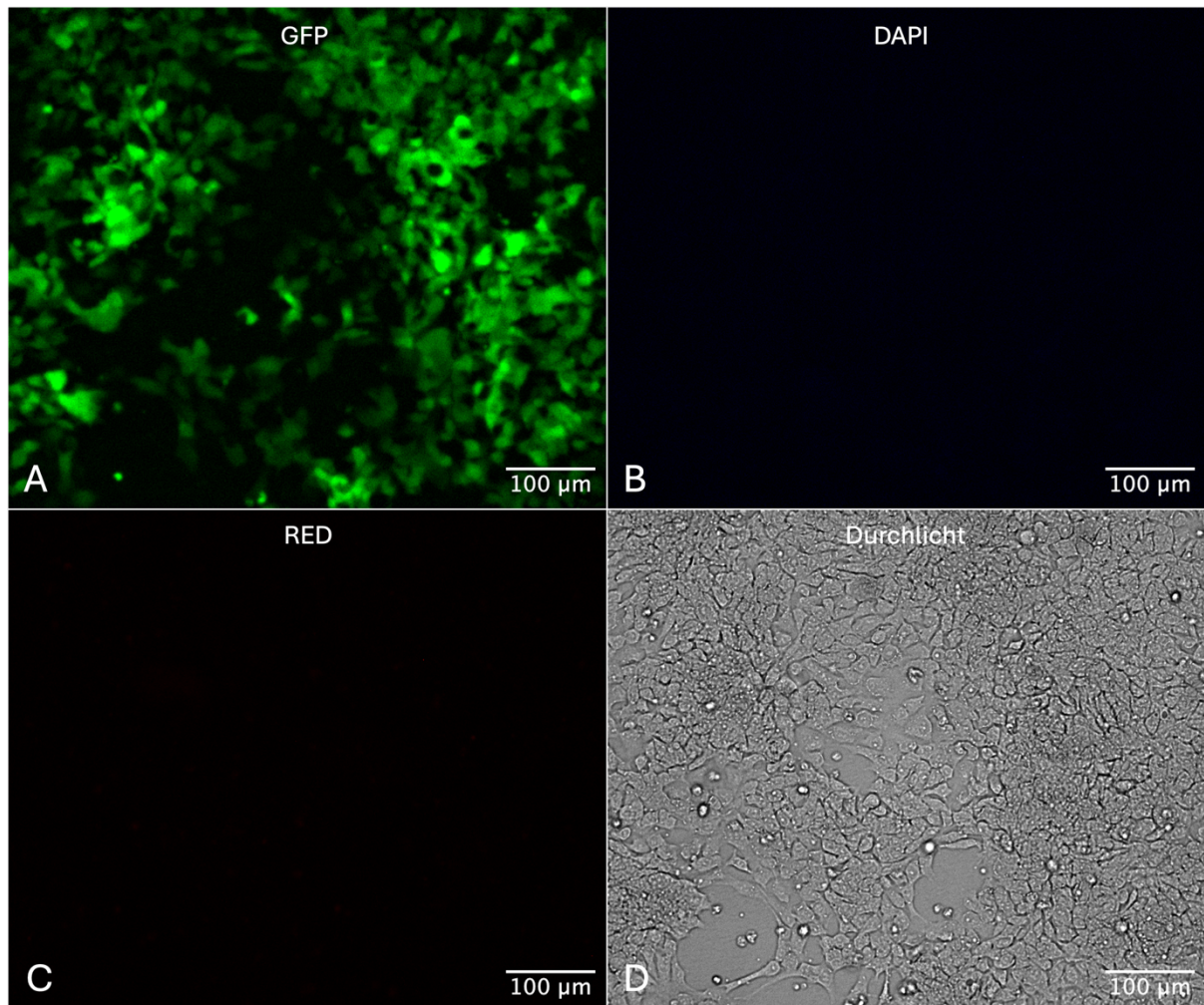


Abb. 5 FM 20x HCT116-ESR2-GFP in Zellkultur Fluoreszenzkanäle (A-C) mit individuell angepasstem linearem Kontrast zur besseren Visualisierung

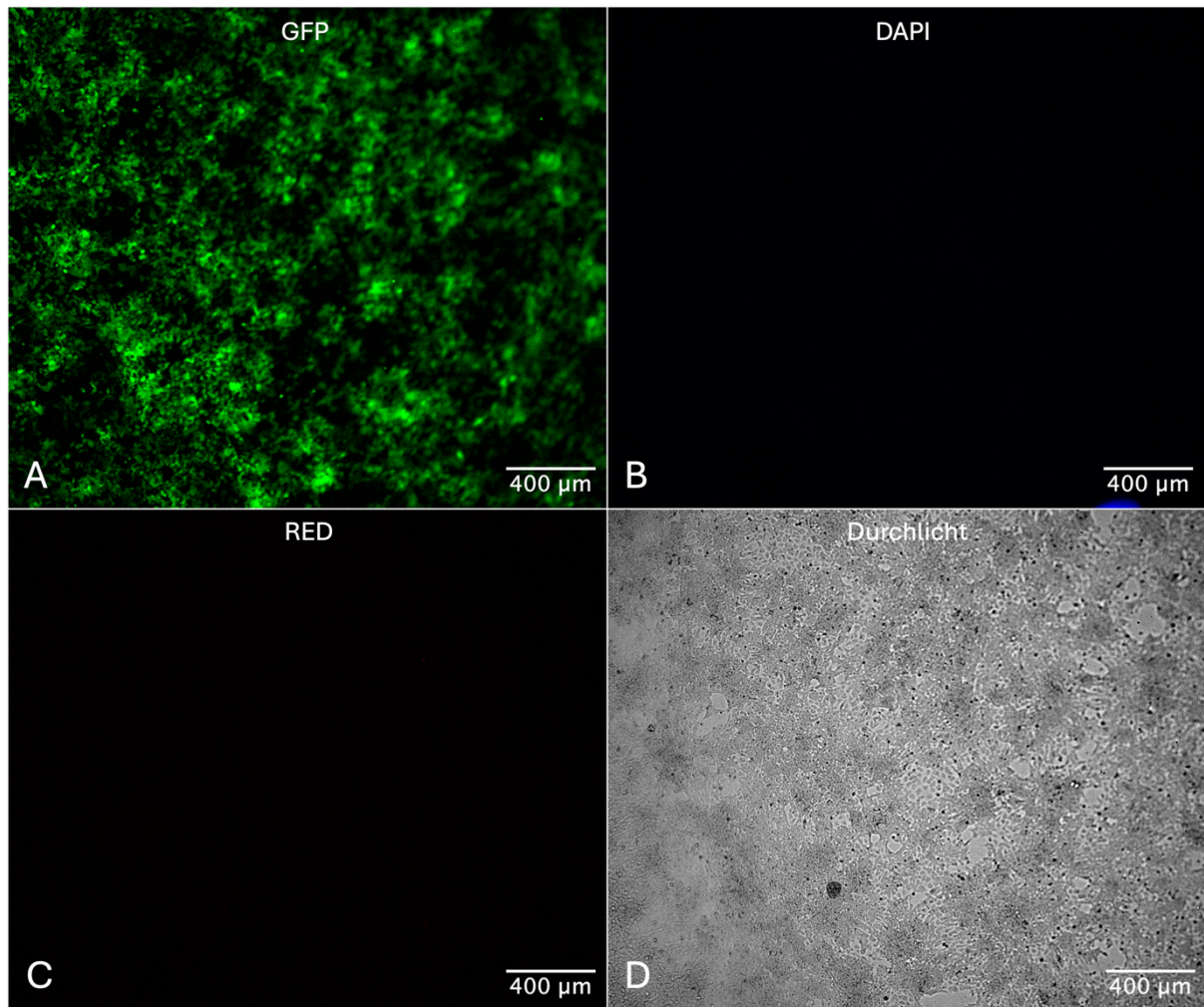


Abb. 6 FM 5x HCT116-ESR2-GFP in Zellkultur Fluoreszenzkanäle (A-C) mit individuell angepasstem linearem Kontrast zur besseren Visualisierung

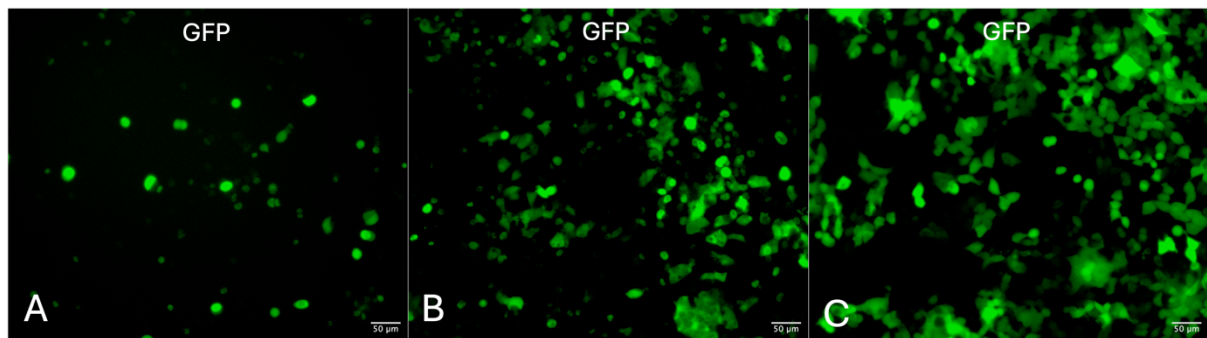
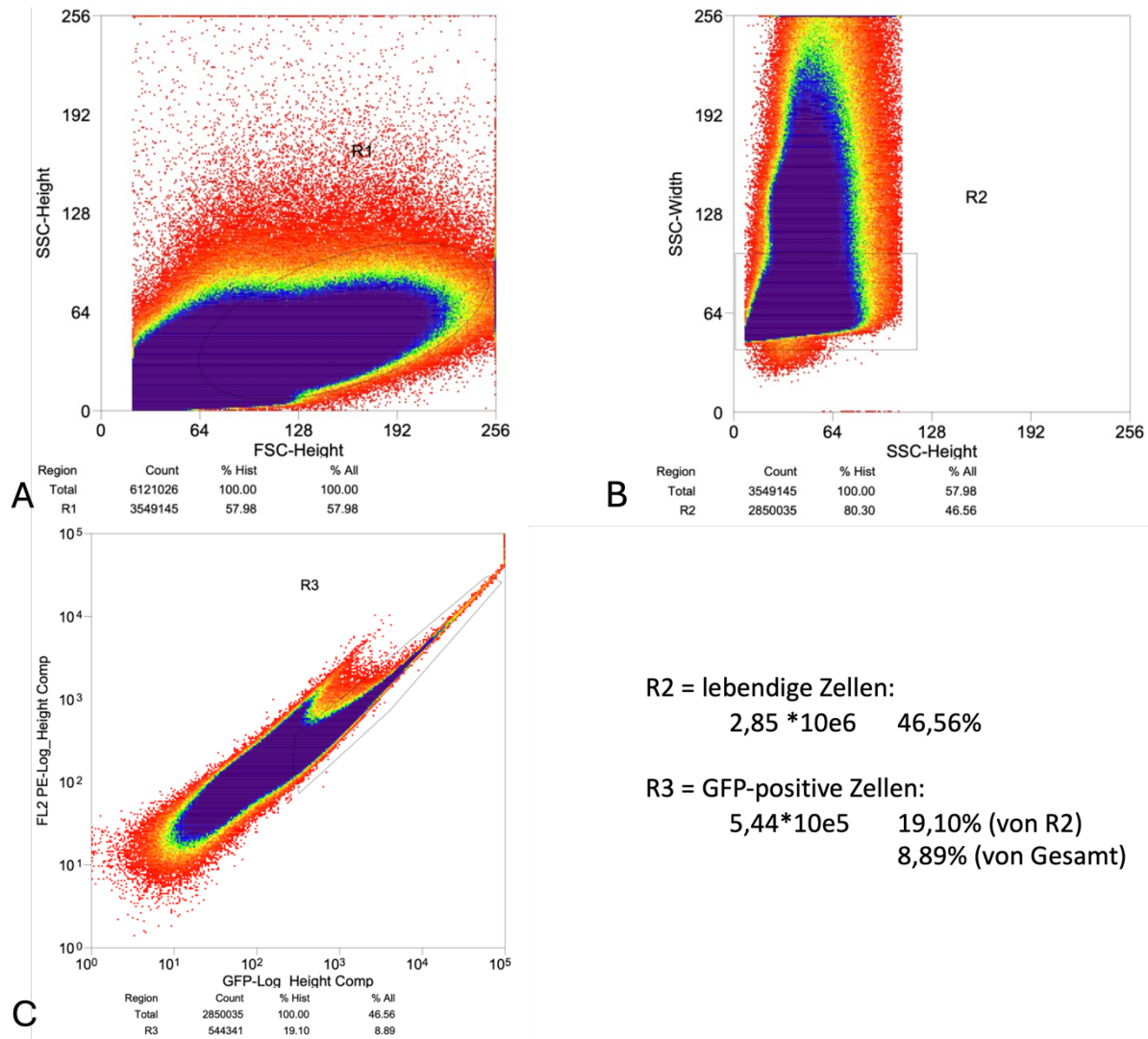


Abb. 7 FM 20x HCT116-ESR2-GFP Zellen im Selektionsprozess nach dem ersten FACS-Durchgang und niedriger Puromycindosierung (A), nach dem ersten FACS-Durchgang und hoher Puromycindosierung (B) und nach zwei FACS-Durchgängen (C)

Um eine stabile Population mit einer hohen Rate an GFP-positiven Zellen zu erreichen, wurden die Zellen mittels FACS sortiert und nur GFP-positive Zellen weiter kultiviert. So zeigte sich in einem ersten FACS-Durchgang eine GFP-Positivrate von 19,10% (Abb. 8) und in dem zweiten FACS-Durchgang bereits eine GFP-Positivrate von 55,27% (Abb. 9). Im weiteren Verlauf erfolgte eine Puromycin-Selektion über die Resistenzkassette des Plasmids, wie in Abb. 7 abgebildet. Bei den Transduktionsversuchen mit den Zelllinien SW620 und HT29 konnte

Ergebnisse

weder per Fluoreszenzmikroskopie noch per FACS eine stabile GFP-positive Population gewonnen werden. Nach mehrfachen frustrierten Versuchen wurden die Transduktionen abgebrochen. Neben den erfolgreich transduzierten HCT116-ESR-GFP Zellen wurden die Experimente mit SW620-GFP Zellen durchgeführt, da diese keine endogene ER β -Expression aufweisen und der Vergleich somit interessante Ergebnisse zeigen könnte.



R2 = lebendige Zellen:
 $2,85 \cdot 10^6$ 46,56%

R3 = GFP-positive Zellen:
 $5,44 \cdot 10^5$ 19,10% (von R2)
 8,89% (von Gesamt)

Abb. 8 erster Selektions-FACS-Durchgang HCT116-ESR2-GFP mit der Detektion einer vitalen Zellpopulation (A) über die Größe (FSC-Height) und der Granularität/Streusignal (SSC-Height), Selektion von Einzelzellen (B) über Impulsdauer (SSC-Width) und Granularität/Streusignal (SSC-Height) und Selektion nach GFP-Signal (C) über die Signale im PE-Kanal (Ordinatenachse) und GFP(FITC)-Kanal auf der Abszisse

Ergebnisse

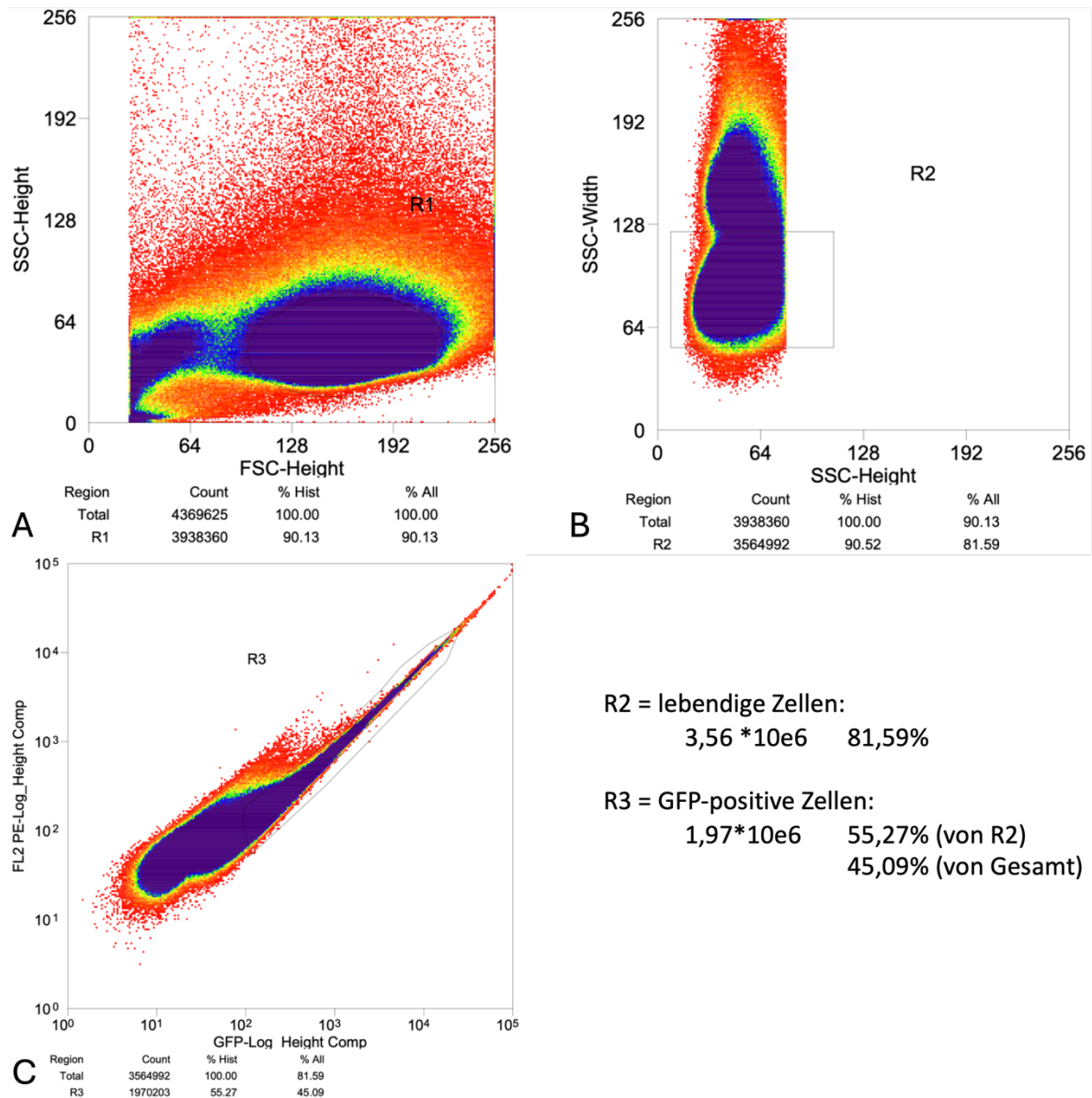


Abb. 9 zweiter Selektions-FACS-Durchgang HCT116-ESR2-GFP mit der Detektion einer vitalen Zellpopulation (A) über die Größe (FSC-Height) und der Granularität/Streusignal (SSC-Height), Selektion von Einzelzellen (B) über Impulsdauer (SSC-Width) und Granularität/Streusignal (SSC-Height) und Selektion nach GFP-Signal (C) über die Signale im PE-Kanal (Ordinatenachse) und GFP(FITC)-Kanal auf der Abszisse

3.2 CellTrace Proliferations Experiment

In Abb. 10 ist das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung des CellTrace-Experiments abgebildet.

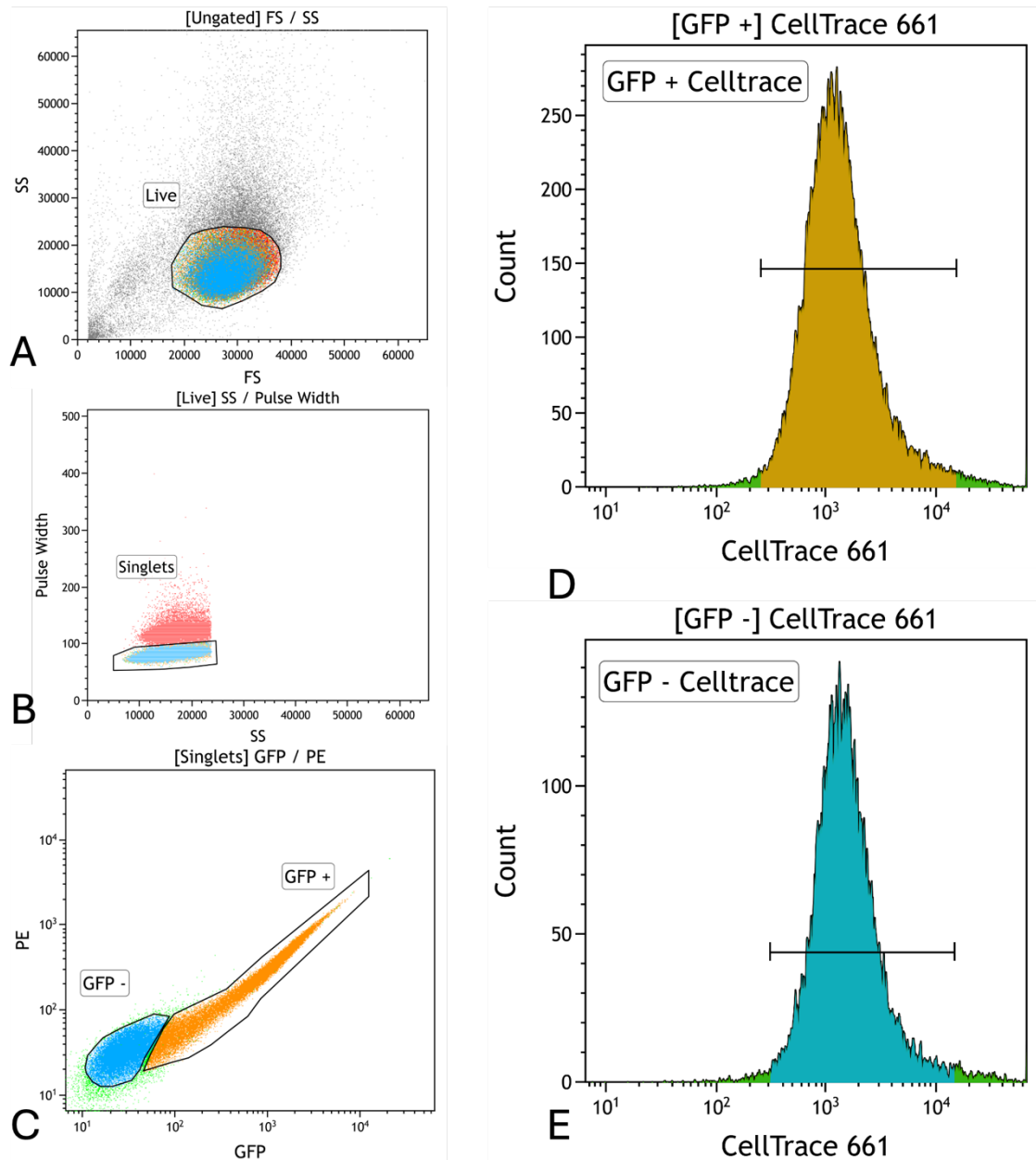


Abb. 10 Durchflusszytometrie CellTrace-Experiment und Gating Strategie HCT116 ESR2 ERB-041 Behandlung mit der Detektion einer vitalen Zellpopulation (A) über die Größe (FS) und der Granularität (SS), Selektion von Einzelzellen (B) über Pulse Width (SSC-W) und SS (SSC-H=Pulse height), Selektion nach GFP-Signal (C) über die Signale im GFP-(FITC) und PE-Kanal, CellTrace Messung der GFP-positiven (D) und GFP-negativen Zellen (E) im APC-Kanal nach Intensität (a.u.) auf der Abszisse und Anzahl der Zellen (Count) auf der Ordinatenachse

Bei der Zelllinie HCT116-ESR2-GFP konnte beim Vergleich der normierten Mittelwerte der CellTrace-Intensitäten zwischen den jeweiligen Behandlungen weder bei den GFP-positiven (Abb. 11-A) Zellen noch bei den GFP-negativen Zellen (Abb. 11-B) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Ebenfalls zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der unterschiedlichen Behandlung bei den GFP-negativen Zellen der Zelllinie SW620-GFP (Abb. 11-D).

Ergebnisse

Ein hochsignifikanter Unterschied zeigte sich bei den GFP-positiven Zellen der Zelllinie SW620-GFP hinsichtlich der Behandlung ($p < 0,001$) (Abb. 11-C). Bei einer Behandlung mit ERB-041 und mit PHTPP zeigte sich jeweils eine geringere CellTrace-Intensität ($p < 0,001$), als bei der Behandlung mit DMSO (Kontrolle).

Deskriptiv zeigt sich in allen untersuchten Proben ein stets geringerer normierter Mittelwert der CellTrace-Intensität bei den mit ERB-041 behandelten Zellen als bei den mit PHTPP behandelten Zellen (Tabelle 9).

Bei der Zelllinie SW620-GFP weisen GFP-positive und GFP-negative Zellen bei Behandlung mit ERB-041 und PHTPP einen geringeren normierten Mittelwert der CellTrace-Intensität auf als die DMSO-Kontrolle (Abb. 11-C und -D).

Bei der Behandlung mit ERB-041 zeigen GFP-positive HCT116-ESR2-GFP Zellen eine nicht signifikant höhere Intensität als die entsprechende Kontrollgruppe mit DMSO als Behandlung ($p = 0,788$; $MW_{\text{ERB-041}} \text{ nCTI } 1,015 \pm 0,048$; $MW_{\text{DMSO}} \text{ nCTI } 1$) (Abb. 11-A).

Ebenfalls bei der Behandlung mit PHTPP zeigen GFP-positive HCT116-ESR2-GFP Zellen eine nicht signifikant höhere Intensität als die entsprechende Kontrollgruppe mit DMSO als Behandlung ($p = 0,788$; $MW_{\text{PHTPP}} \text{ nCTI } 1,028 \pm 0,071$; $MW_{\text{DMSO}} \text{ nCTI } 1$) (Abb. 11-A).

Zelltyp	GFP	Behandlung	norm. MW Intensität CellTracer	
			Mittelwert	Standardabweichung
HCT116-ESR2-GFP	negativ	ERB-041	0,987	0,034
		PHTPP	1,019	0,016
		DMSO	1,000	0,000
	positiv	ERB-041	1,015	0,048
		PHTPP	1,028	0,071
		DMSO	1,000	0,000
SW620-GFP	negativ	ERB-041	0,964	0,032
		PHTPP	0,974	0,030
		DMSO	1,000	0,000
	positiv	ERB-041	0,945	0,009
		PHTPP	0,950	0,006
		DMSO	1,000	0,000

Tabelle 9 Ergebnisse CellTrace Experiment normierte CellTrace-Intensität

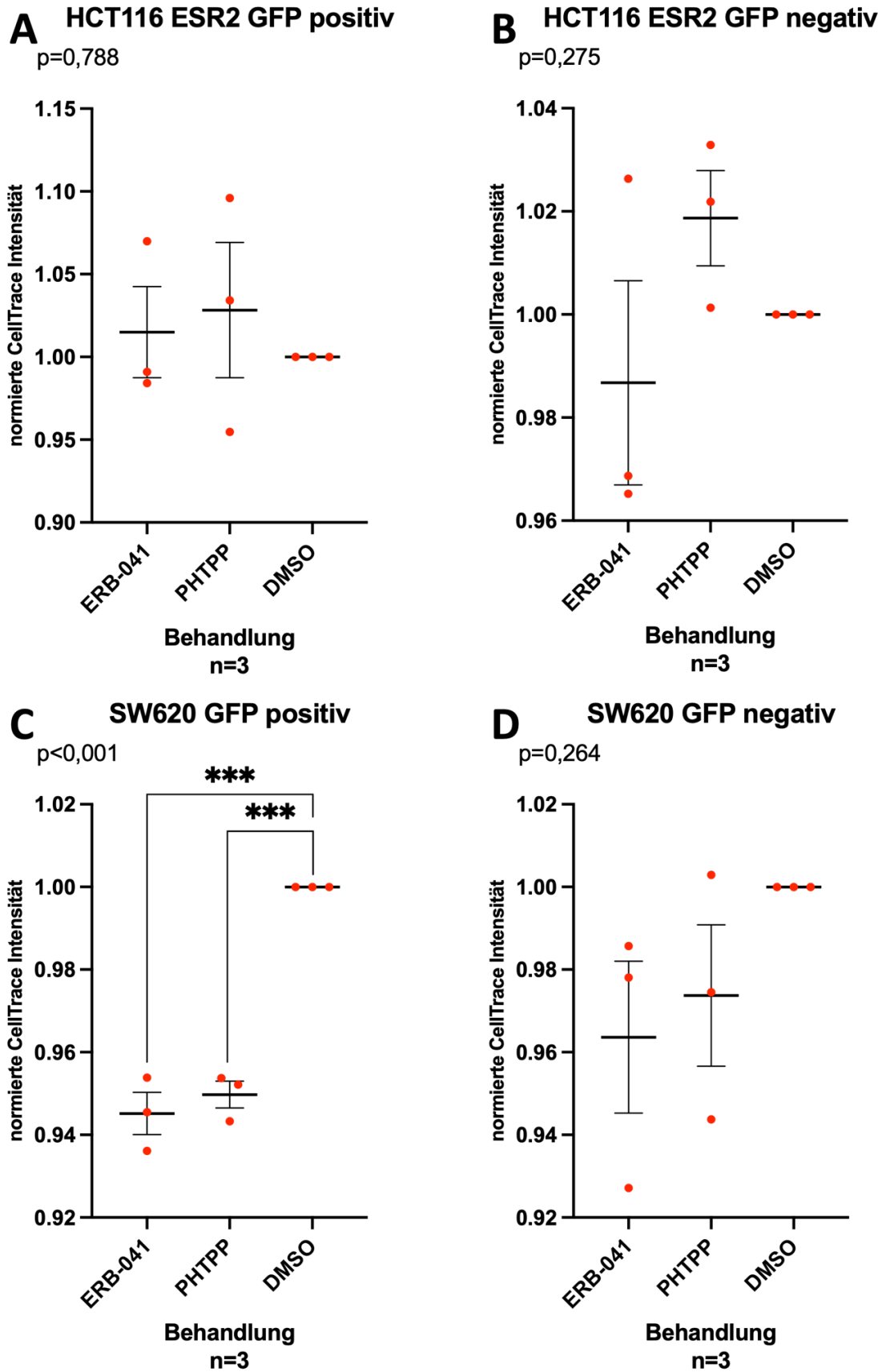


Abb. 11 normierte CellTrace-Intensität (y-Achse) mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes von HCT116-ESR2-GFP (oben) und SW620-GFP (unten) Zellen mit unterschiedlicher Behandlung (x-Achse) nach GFP-positiv (links) und GFP-negativ (rechts) separat aufgeführt

Ergebnisse

Behandlung	MW CellTrace Intensität - HCT116				Differenz ESR2-GFP-positiv> negativ in %
	ESR2-GFP-Positiv		ESR2-GFP-Negativ		
	MW	SD	MW	SD	
ERB-041	1372,32	±792,83	1347,40	±702,94	1,85%
PHTPP	1392,05	±804,80	1362,69	±681,46	2,16%
DMSO	1354,39	±806,96	1346,29	±687,97	0,60%

Tabelle 10 Ergebnisse HCT116 CellTrace-Intensität

Die nicht normierten CellTrace-Intensitäten zeigten bei HCT116-Zellen nur minimale Unterschiede zwischen GFP-positiven und GFP-negativen Populationen (Differenz 0,6-2,16 %), die angesichts der hohen Standardabweichungen und geringen Stichprobengröße nicht signifikant waren ($p=0,49-0,50$), jedoch war der Mittelwert der CellTracer-Intensität in allen drei Behandlungsgruppen bei den ESR2-GFP-positiven HCT116 höher (Tabelle 10).

Behandlung	MW CellTrace Intensität – SW620				Differenz GFP-positiv> negativ in %
	GFP-Positiv		GFP-Negativ		
	MW	SD	MW	SD	
ERB-041	3709,48	±1033,41	2539,56	±549,14	46,07%
PHTPP	3721,90	±1012,39	2571,26	±594,56	44,75%
DMSO	3918,50	±1057,49	2632,60	±540,42	48,85%

Tabelle 11 Ergebnisse SW620 CellTrace-Intensität

Innerhalb der SW620-Zellen zeigte sich in allen Behandlungsgruppen ein Trend ($p=0,079-0,094$) zwischen GFP-positiven und -negativen Populationen mit einer durchschnittlich um ca. 45 % höheren Fluoreszenzintensität in GFP-positiven Zellen, was auf eine reduzierte Teilungsrates hinweist, siehe Abb. 12 und Tabelle 11.

Ergebnisse

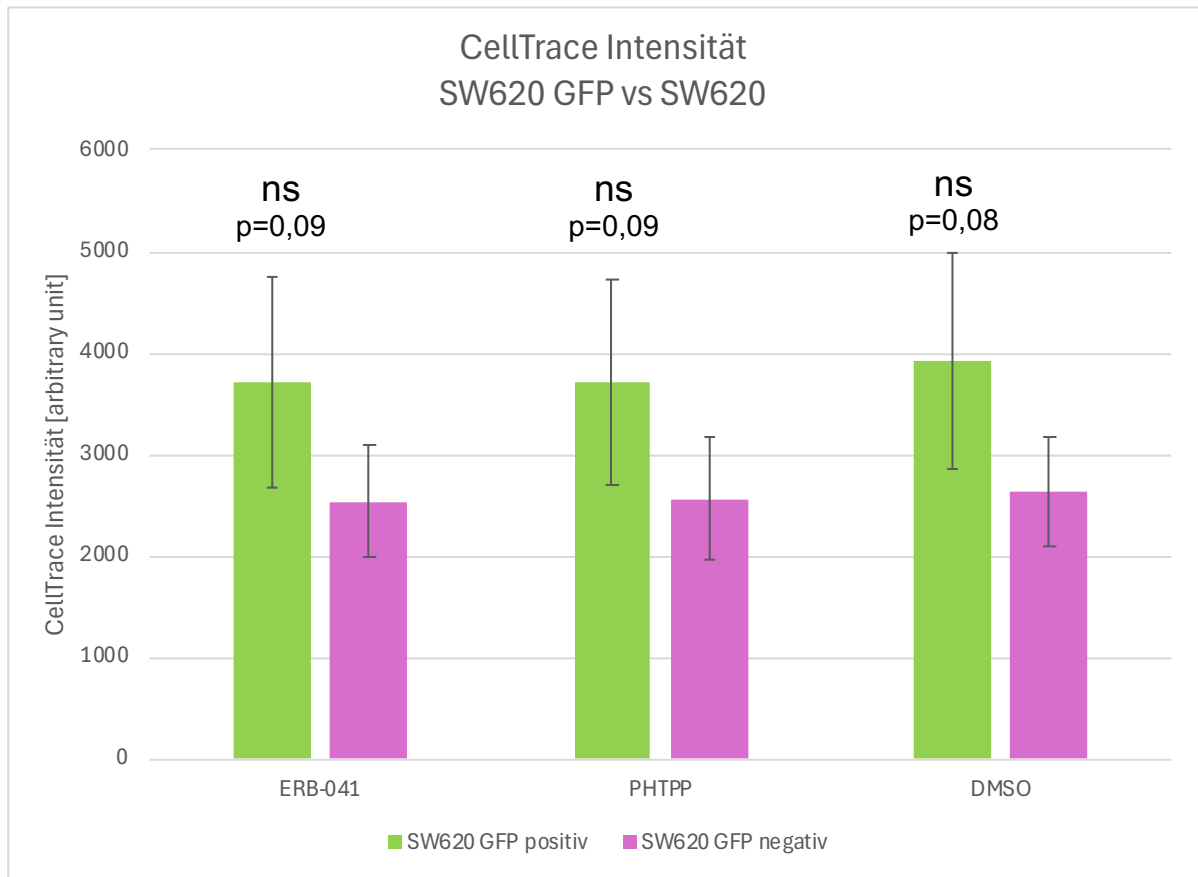


Abb. 12 CellTrace Experiment Vergleich nach GFP-Signal der SW620 Zellen (y-Achse) mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes der CellTrace-Intensität von SW620-GFP Zellen mit GFP-positiv (links) und GFP-negativ (rechts) nach unterschiedlicher Behandlung (x-Achse) separat aufgeführt

Ein Vergleich der beiden Zelllinien HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP ergab über alle Behandlungen hinweg signifikant höhere CellTrace-Intensitäten in den SW620-Zellen ($p < 0,05$) siehe Abb. 12. Ähnlich beim Vergleich der GFP-negativen HCT116 und SW620 Zellen, es zeigte sich ein Trend ($p=0,058-0,069$), somit lag der Mittelwert der CellTrace-Intensität (nicht normiert) bei SW620 stets über den entsprechenden Pendanten nach Behandlung und GFP-Signal der HCT116 Zellen (ca. 2,7x GFP-positiv und ca. 1,9x GFP-negativ).

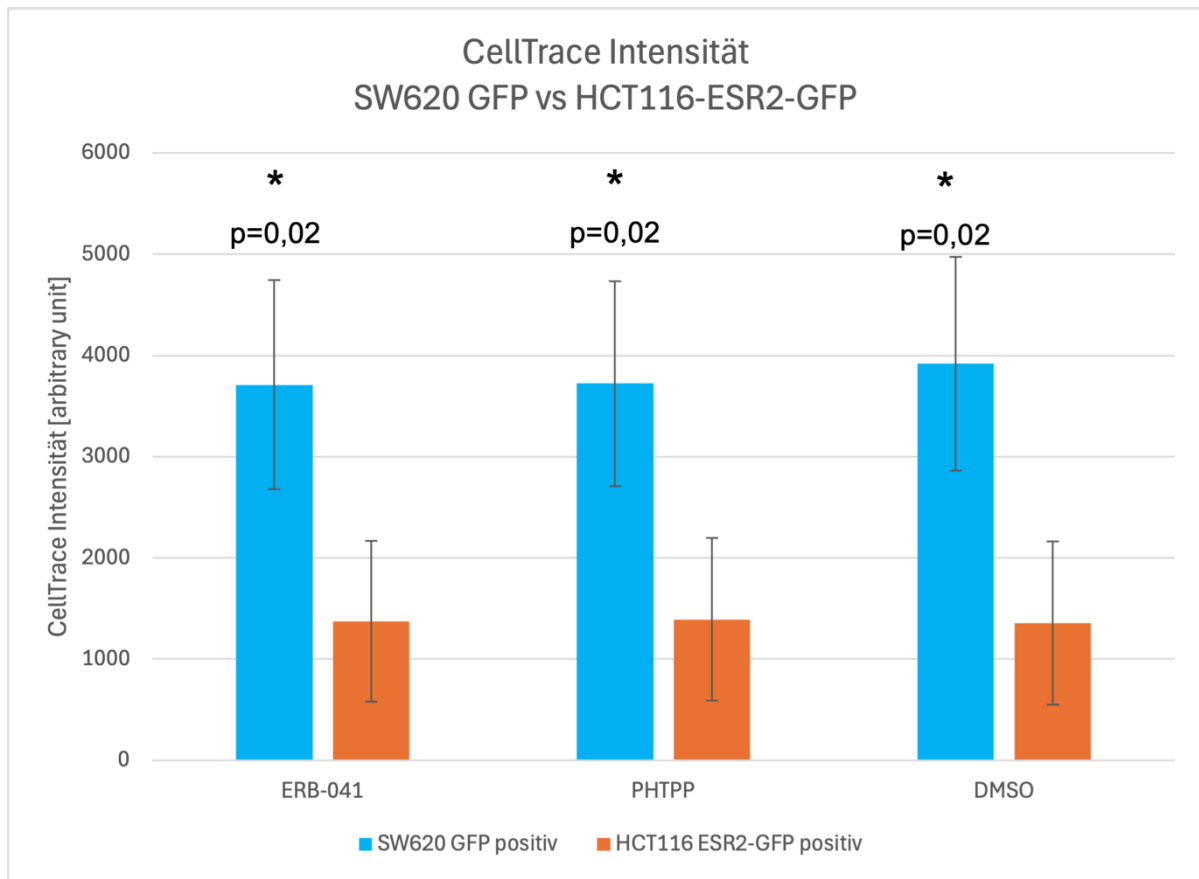


Abb. 13 CellTrace Experiment Vergleich von SW620 GFP und HCT116 ESR2 GFP Zellen (y-Achse) mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes der CellTrace-Intensität) nach unterschiedlicher Behandlung (x-Achse) separat aufgeführt

3.3 BrdU-Assay

In Abb. 14 ist das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Messung des BrdU-Assays abgebildet.

Ergebnisse

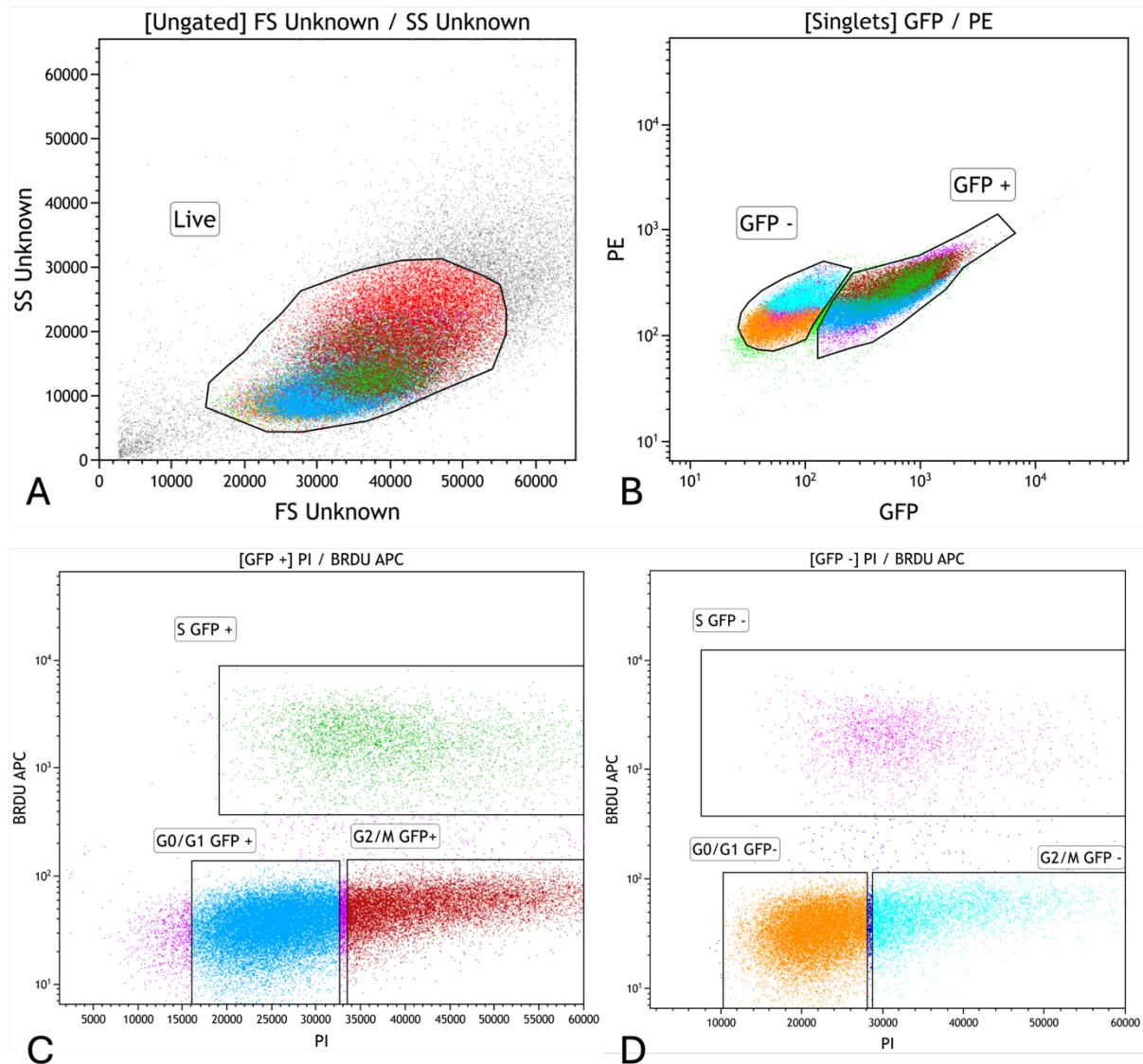


Abb. 14 Durchflusszytometrie BrdU-Assay und Gating Strategie HCT116 ESR2 ERB-041
 Behandlung mit der Detektion einer vitalen Zellpopulation (A) über die Größe (FS) und der Granularität (SS), Selektion von Einzelzellen (nicht gezeigt) über Pulse Width (SSC-W) und SS (SSC-H=Pulse height), Selektion nach GFP-Signal (B) über die Signale im GFP-(FITC) und PE-Kanal, Zellzyklusbestimmung der GFP-positiven (C) und GFP-negativen Zellen (D) im APC-Kanal nach BrdU-Intensität (a.u.) auf der Ordinatenachse und nach PI-Intensität (a.u.) im PerCP / PerCP-CyTM5.5-Kanal auf der Abszisse

Zelltyp	GFP	Behandlung	G0 / G1		G2 / M		S	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
HCT 116 ESR2 GFP	negativ	ERB-041	73,45	5,70	16,87	7,37	9,68	1,78
		PHTPP	76,29	0,76	14,40	2,05	9,31	1,55
		DMSO	76,11	2,54	14,74	3,34	9,15	1,70
	positiv	ERB-041	64,95	4,92	23,35	7,10	11,70	2,32
		PHTPP	66,93	1,91	21,63	2,80	11,44	2,09
		DMSO	66,31	4,57	22,57	6,05	11,11	1,91
SW620 GFP	not gated	ERB-041	59,24	1,65	1,10	0,20	39,66	1,60
		PHTPP	58,63	0,97	1,24	0,25	40,13	1,21
		DMSO	58,77	1,42	1,52	0,21	39,71	1,63

Tabelle 12 Ergebnisse BrdU-Assay

Ergebnisse

Bei den Zelllinien HCT116-ESR2-GFP und SW620 konnten weder bei den GFP-positiven Zellen noch bei den GFP-negativen Zellen beim Vergleich der anteiligen Zellzyklusphase nach Behandlung signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 15).

Bei Behandlung von HCT116-ESR2-GFP GFP-positiven Zellen mit ERB-041 zeigen sich nicht signifikant weniger Zellen in der Mitosephase G0/G1 (MW 64,95% $\pm$ 4,92%) als bei der Behandlung mit PHTPP (MW 66,93% $\pm$ 1,91%) oder DMSO (MW 66,31% $\pm$ 4,57%).

Der prozentuelle Anteil der Zellen in den proliferativen und aktiveren Zellzyklusphasen G2/M und S zeigte sich ebenfalls nicht signifikant. In der G2/M Phase zeigte sich ein leicht höherer Prozentsatz (MW 23,35% $\pm$ 7,1%) bei der Behandlung mit ERB-041, als bei Behandlung mit PHTPP (MW 21,63 $\pm$ 2,8%) und DMSO (MW 22,57% $\pm$ 6,05%). In der S-Phase sind die Prozentsätze nah beieinander mit 11,70% $\pm$ 2,23% bei Behandlung mit ERB-041, 11,44% $\pm$ 2,09% bei PHTPP-Behandlung und mit 11,11% $\pm$ 1,91% bei der Kontrolle mit DMSO (Tabelle 12).

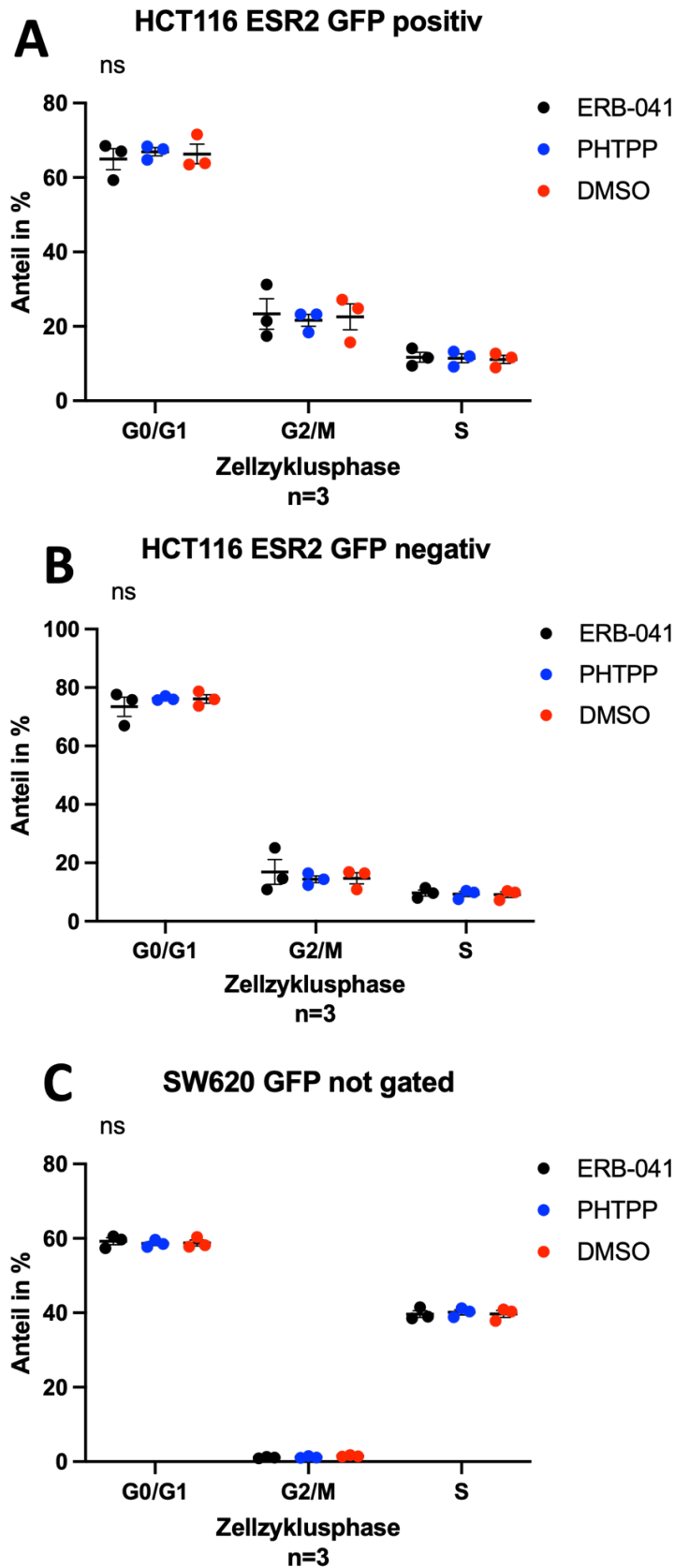


Abb. 15 Ergebnisse BrdU-Assay Prozentualer Anteil (y-Achse) der Zellzyklusphasen (x-Achse) bei unterschiedlicher Behandlung mit GFP-positiven (A), GFP-negativen (B) HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP (C) Zellen

Ergebnisse

Beim Vergleich der GFP-positiven und GFP-negativen Zellen der HCT116-ESR2-GFP Zellen zeigten sich bei der Behandlung mit PHTPP signifikante Unterschiede wie in Abb. 16 graphisch dargestellt. Bei Betrachtung der G0/G1-Phase (Abb. 16-A) ist der Unterschied hochsignifikant ($p < 0,001$) mit einem geringeren Mittelwert bei den GFP-positiven Zellen ($MW_{G0/G1} 66,93\% \pm 1,91\%$) als bei den GFP-negativen ($MW_{G0/G1} 76,29\% \pm 0,76\%$). Ebenfalls signifikant ist der Unterschied beim Vergleich in der G2/M-Phase (Abb. 16-B) ($p = 0,014$) mit einem höheren Mittelwert bei den GFP-positiven Zellen ($MW_{G2/M} 21,63\% \pm 2,80\%$) als bei den GFP-negativen ($MW_{G2/M} 14,40\% \pm 2,05\%$). In der S-Phase (Abb. 16-C) ist der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,5$), jedoch zeigt sich auch hier ein höherer Wert für die ebenfalls proliferative Zellzyklusphase S bei den GFP-positiven Zellen ($MW_S 11,44\% \pm 2,09\%$), als bei den GFP-negativen Zellen ($MW_S 9,31\% \pm 1,55\%$).

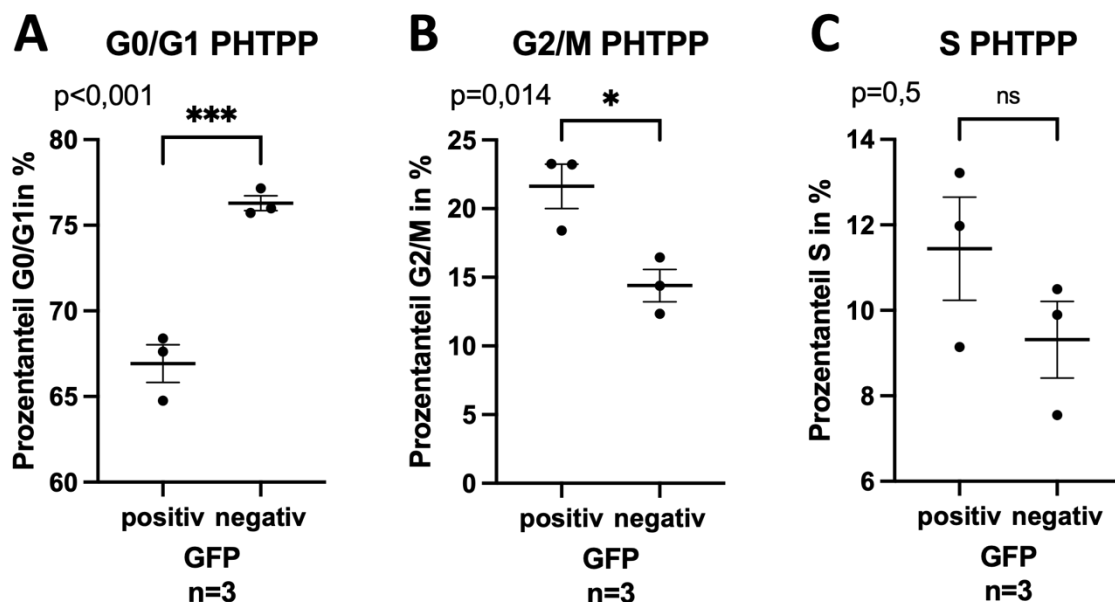


Abb. 16 PHTPP-HCT116-ESR2-GFP Zellzyklusanalyse Vergleich der Prozentanteile (y-Achse) von GFP-positiven und GFP-negativen SW620-GFP (x-Achse) bei PHTPP Behandlung bzgl. der Zellzyklusphasen G0/G1 (A), G2/M (B), S (C)

Beim Vergleich GFP-positiven Zellen und GFP-negativen Zellen bei der Behandlung von HCT116-ESR2-GFP mit ERB-041 (Abb. 17-A) zeigt sich hinsichtlich der Zellzyklusphasen kein signifikanter Unterschied, jedoch zeigt sich, dass die GFP-positiven Zellen in der Ruhephase (G0/G1) weniger sind ($MW_{G0/G1} 64,95\% \pm 4,92\%$) als die GFP-negativen Zellen ($MW_{G0/G1} 73,45\% \pm 5,70\%$) und andersherum sich die GFP-positiven Zellen vermehrt in den aktiveren Zellzyklusphasen befinden ($MW_{G2/M} 23,35\% \pm 7,10\%$; $MW_S 11,70\% \pm 2,32\%$), als die GFP-negativen Zellen ($MW_{G2/M} 16,87\% \pm 7,37\%$; $MW_S 9,68\% \pm 1,78\%$). Ähnlich sieht es bei der Behandlung mit DMSO aus (Abb. 17-B). In der Zellzyklusphase G0/G1 ist der Unterschied signifikant ($p = 0,026$) mit weniger GFP-positiven Zellen ($MW_{G0/G1} 66,31\% \pm 4,57\%$) als GFP-negativen Zellen ($MW_{G0/G1} 76,11\% \pm 2,54\%$). Dementsprechend andersherum lässt sich deskriptiv sagen, dass sich ebenfalls die GFP-positiven Zellen vermehrt in den aktiveren

Ergebnisse

Zellzyklusphasen befinden ($MW_{G2/M}$ 22,57% $\pm$ 6,05%; MW_S 11,11% $\pm$ 1,91%), als die GFP-negativen Zellen ($MW_{G2/M}$ 14,74% $\pm$ 3,34%; MW_S 9,15% $\pm$ 1,70%).

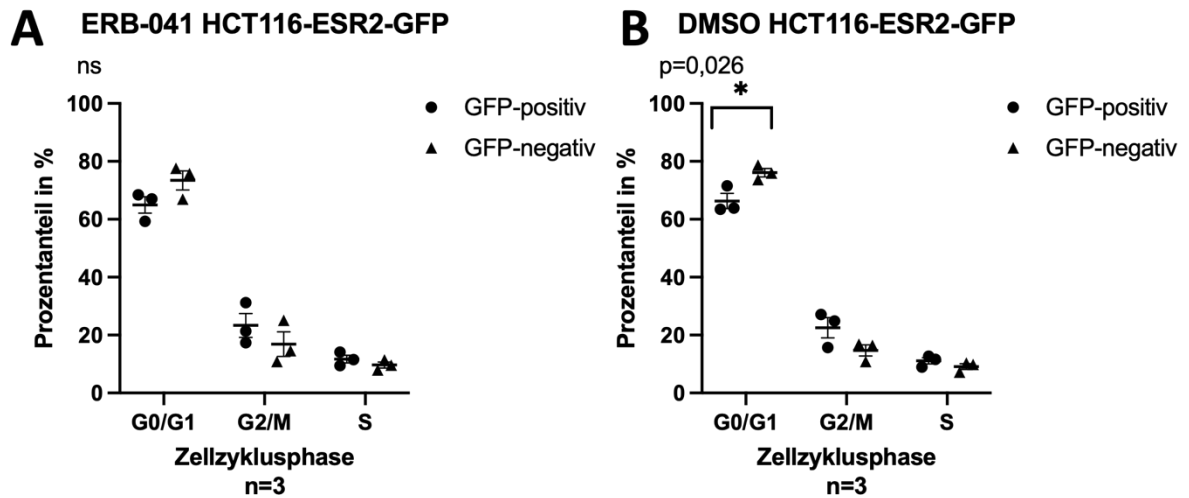


Abb. 17 ERB-041 und DMSO HCT116-ESR2-GFP Zellzyklusanalyse Vergleich der Prozentanteile (y-Achse) von GFP-positiven und GFP-negativen HCT116-ESR2-GFP bei Behandlung mit ERB-041 (A) und DMSO (B) bzgl. der Zellzyklusphasen G0/G1, G2/M, S (x-Achse)

Beim Vergleich der Zelllinien bei gleicher Behandlung (Abb. 18) zeigt sich bei der Betrachtung von der Zelllinie SW620-GFP bei allen Behandlungen, teils signifikant, teils als Trend, teils nicht signifikant, stets ein geringerer Anteil von SW620-GFP Zellen in der G0/G1-Phase, sowie in der G2/M-Phase, als bei den HCT116-ESR2-GFP positiven und negativen Zellen. Ebenfalls bei allen Behandlungen zeigen sich mehr SW620-GFP Zellen in der S-Phase als bei den HCT116-ESR2-GFP positiven und negativen Zellen.

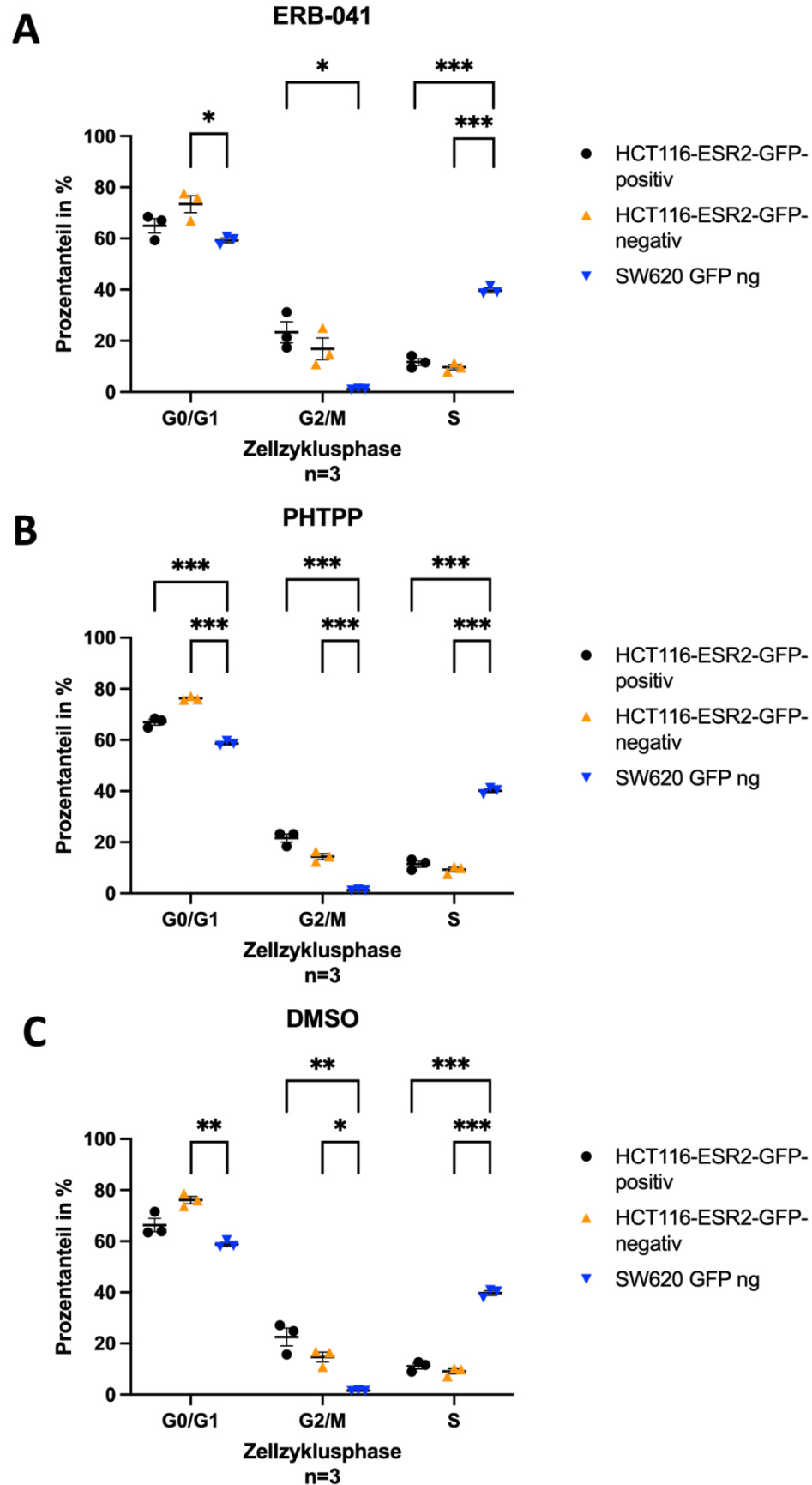


Abb. 18 Vergleich der Zellzyklusphasen der Zelllinien je nach Behandlung - Vergleich der Prozentanteile (y-Achse) von GFP-positiven und GFP-negativen HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP Zellen bei Behandlung mit ERB-041 (A), PHTPP (B) und DMSO (C) bzgl. der Zellzyklusphasen G0/G1, G2/M, S (x-Achse)

3.4 Matrigel-Proliferations Experiment

In den folgenden Abbildungen sind HCT116-ESR2-GFP-Zellen am 10. Tag im Matrigel nach Hoechstfärbung mittels IF-Mikroskopie erfasst abgebildet. In Abb. 19 sind verbliebende Einzelzellen, in Abb. 20 Organoide abgebildet.

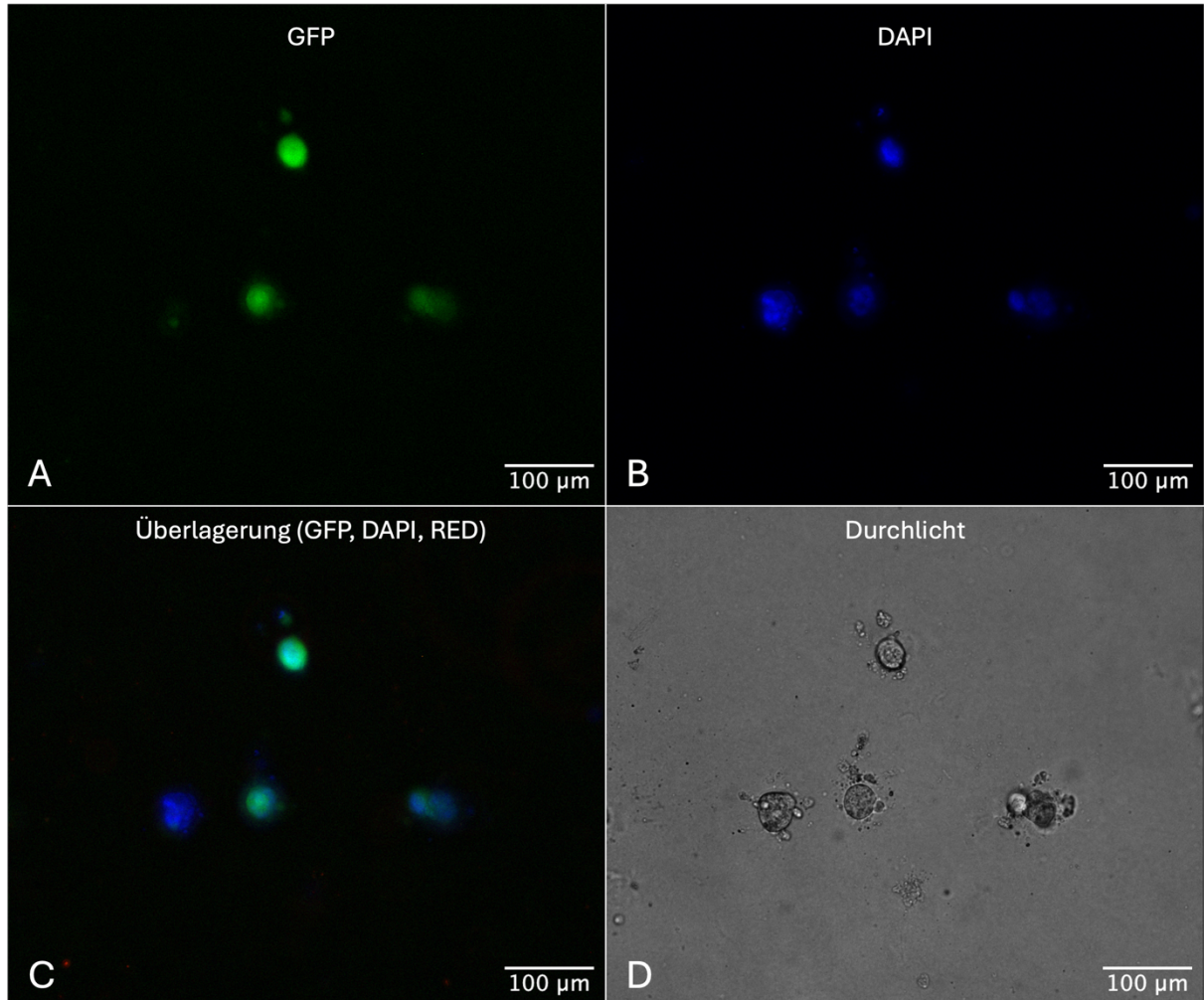


Abb. 19 FM HCT116-ESR2-GFP im Matrigel mit verbliebenden Einzelzellen (10. Tag, high-density Kultur und 20x Objektiv nach Hoechstfärbung) im GFP-Kanal (A), DAPI-Kanal (B), Überlagerung des GFP, DAPI und Cy3-Kanal (C) und Durchlicht (D), Fluoreszenzkanäle (A-C) mit individuell angepasstem linearem Kontrast zur besseren Visualisierung

Ergebnisse

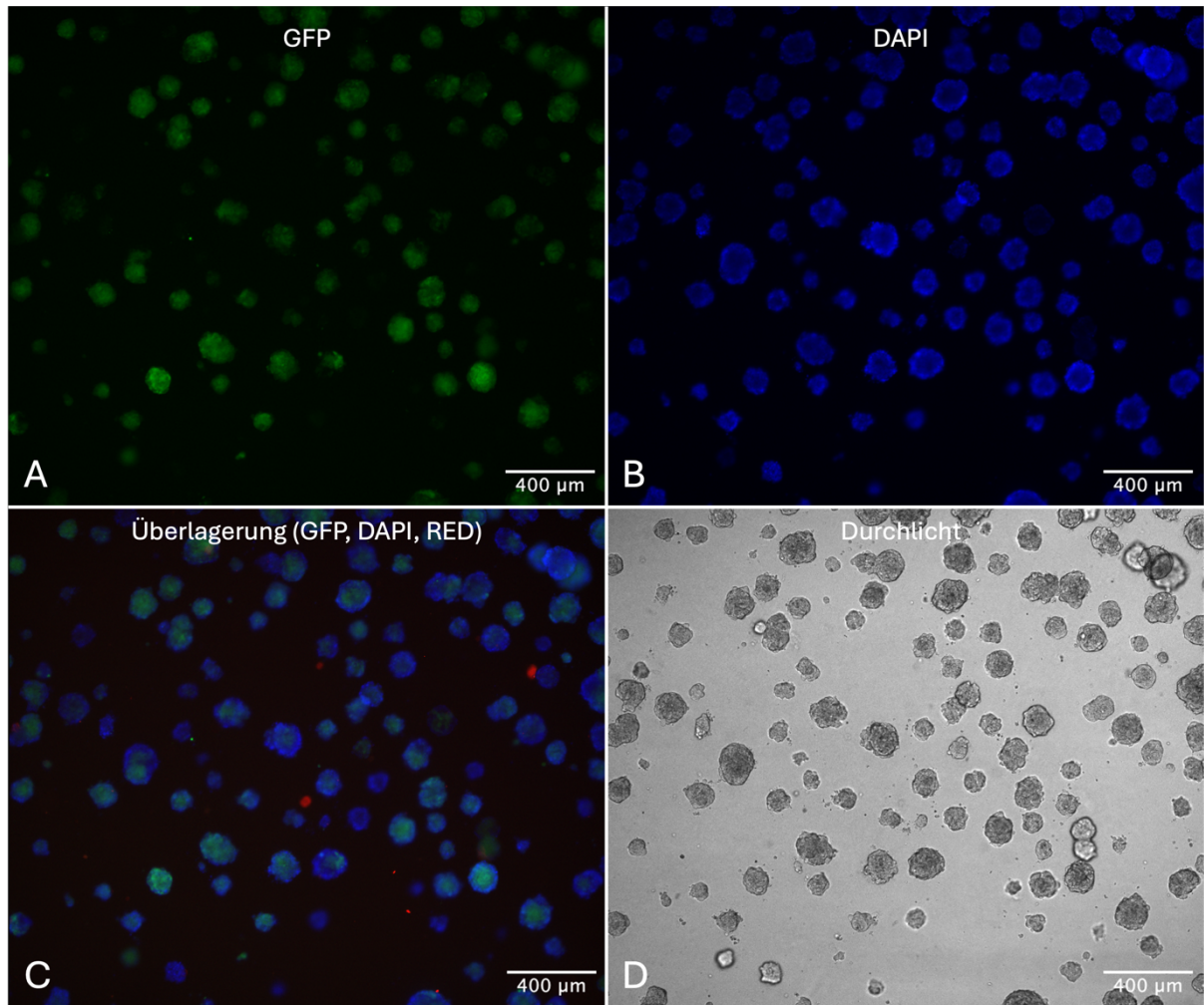


Abb. 20 FM HCT116 ESR2-GFP Organoide im Matrigel mit Organoiden (10. Tag low-density Kultur und 5xObjektiv nach Hoechstfärbung) im GFP-Kanal (A), DAPI-Kanal (B), Überlagerung des GFP, DAPI und Cy3-Kanal (C) und Durchlicht (D)

Die Ergebnisse des Matrigel-Versuchs sind in der unten aufgeführten Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgetragen. In allen HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP Proben zeigt sich im Verlauf über 10 Tage eine Abnahme der Einzelzellen (Abb. 21).

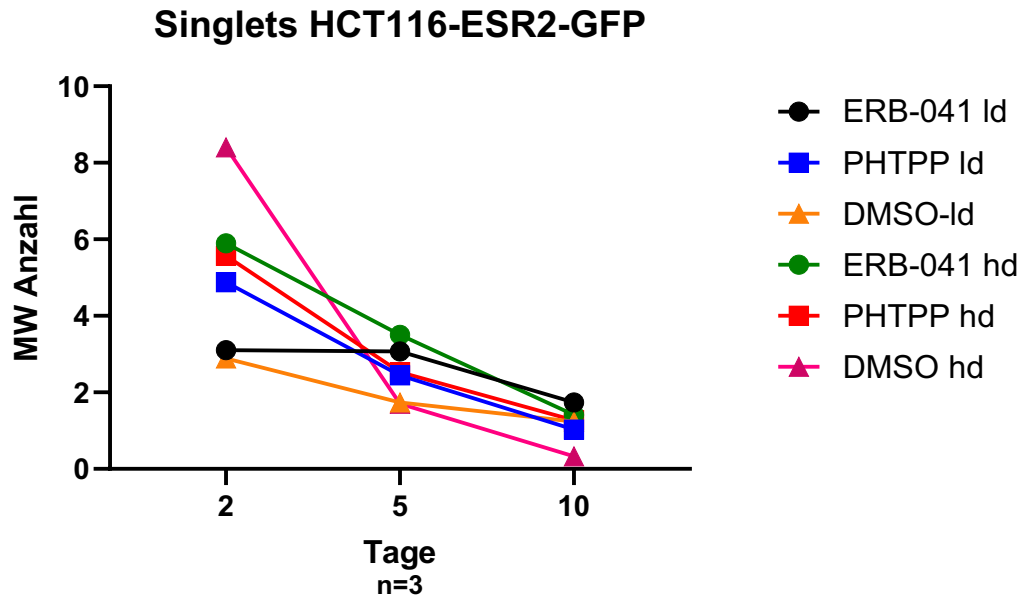


Abb. 21 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP Singletten im Matrigel - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Einzelzellen (MW y-Achse) im Matrigel über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO in der high-density Kultur (hd) und low density Kultur (Id)

Nur in der high-density Kultur der HCT116-ESR2-GFP Zellen zeigten sich an Tag zwei schon Organoide, jedoch waren es sehr wenige mit $0,54 \pm 0,68$ bei den mit ERB-041 behandelten Zellen und $0,07 \pm 0,12$ bei den mit PHTPP und $0,07 \pm 0,06$ bei den mit DMSO behandelten Zellen. In allen anderen Proben konnten keine Organoide nachgewiesen werden.

Kultur	Behandlung	IF-Tag	Singletten		Multipletten		Organoide	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
low-density	ERB-041	2	3,10	0,95	4,50	2,46	0,00	0,00
		5	3,07	0,91	3,60	2,10	0,77	0,99
		10	1,73	0,25	1,03	0,57	0,40	0,69
	PHTPP	2	4,88	0,89	4,74	1,93	0,00	0,00
		5	2,45	1,26	3,51	0,95	1,81	1,78
		10	1,03	0,82	1,02	0,88	1,39	2,08
	DMSO	2	2,89	1,06	2,67	2,87	0,00	0,00
		5	1,74	0,45	4,81	2,66	1,22	1,35
		10	1,24	0,60	1,80	1,30	1,42	1,88
high-density	ERB-041	2	5,89	2,06	5,41	2,67	0,54	0,68
		5	3,50	0,46	6,79	6,93	0,11	0,19
		10	1,41	0,60	1,97	1,11	0,41	0,40
	PHTPP	2	5,57	1,20	5,10	2,02	0,07	0,12
		5	2,53	0,95	5,60	3,82	2,57	3,16
		10	1,27	1,16	2,47	1,56	2,97	3,35
	DMSO	2	8,43	1,25	9,83	2,75	0,07	0,06
		5	3,76	2,00	7,72	2,02	3,38	3,93
		10	2,18	2,41	4,11	3,42	4,35	5,44

Tabelle 13 HCT116-ESR2-GFP Matrigel-Experiment Ergebnisse

Kultur	Behandlung	IF-Tag	Singletten		Multipletten		Organoide	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
low-density	ERB-041	2	1,27	0,90	0,20	0,35	0,00	0,00
		5	0,17	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00
		10	0,07	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
	PHTPP	2	0,53	0,61	0,37	0,64	0,00	0,00
		5	0,20	0,26	0,37	0,64	0,00	0,00
		10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	DMSO	2	1,43	1,76	1,50	1,80	0,00	0,00
		5	0,33	0,58	0,44	0,77	0,00	0,00
		10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
high-density	ERB-041	2	4,40	4,40	1,67	2,47	0,00	0,00
		5	0,23	0,40	0,07	0,12	0,00	0,00
		10	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	PHTPP	2	0,87	0,64	0,80	1,22	0,00	0,00
		5	0,20	0,20	0,17	0,29	0,00	0,00
		10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	DMSO	2	3,93	4,74	2,43	3,31	0,00	0,00
		5	0,20	0,35	0,27	0,46	0,00	0,00
		10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 14 SW620-GFP Matrigel-Experiment Ergebnisse

3.4.1 Vergleich der ERB-041-, PHTPP- und DMSO-Gruppen bei HCT116-ESR2-GFP

Deskriptiv zeigen sich in der low-density-Kultur bei HCT116-ESR2-GFP Zellen an Tag 10 die meisten Singletten bei der ERB-041 Probe mit $1,73 \pm 0,25$. Bei PHTPP Behandlung verblieben $1,03 \pm 0,82$ und bei DMSO-Behandlung $1,24 \pm 0,60$ Singletten an Tag 10 (Abb. 22).

Singlets HCT116-ESR-GFP low density

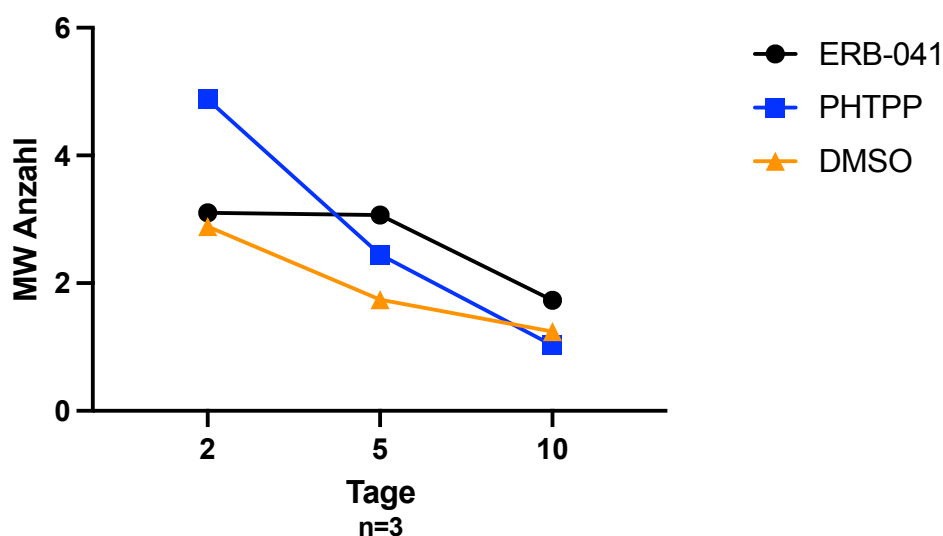


Abb. 22 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP Singletten in der low-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Einzelzellen (MW y-Achse) in der low-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO

In der low-density Kultur bei HCT116-ESR2-GFP Zellen an Tag 10 zeigten sich am wenigsten Organoide bei der ERB-041 Probe mit $0,4 \pm 0,69$. Bei PHTPP Behandlung lagen $1,39 \pm 2,08$ und bei DMSO-Behandlung $1,42 \pm 1,88$ Organoide an Tag 10 vor (Abb. 23).

Organoids HCT116-ESR-GFP low density

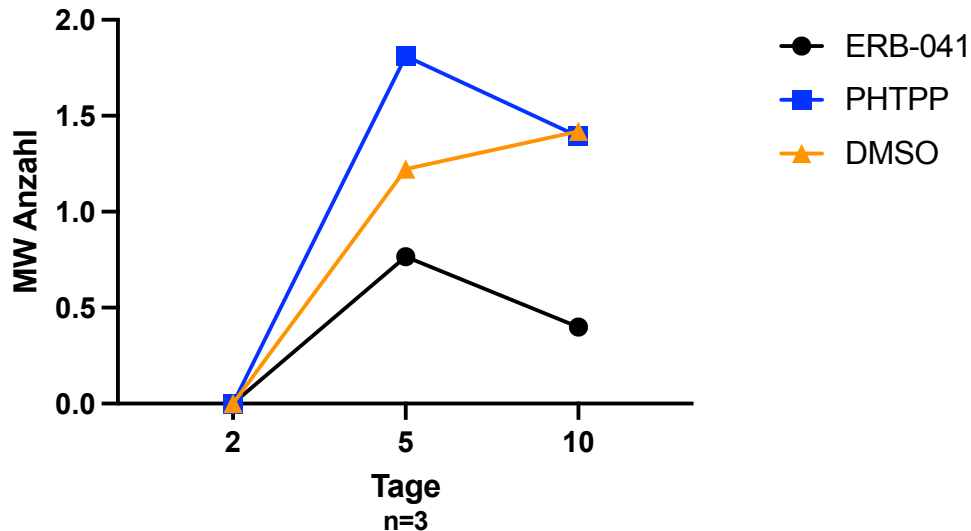


Abb. 23 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP Organoiden in low-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Organoiden (MW y-Achse) in der low-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO

In der high-density Kultur bei HCT116-ESR2-GFP Zellen (Abb. 24) an Tag 10 zeigten sich die meisten Singletten bei der DMSO-Probe mit $2,18 \pm 2,41$. Bei ERB-041 Behandlung verblieben $1,42 \pm 0,60$ und bei PHTPP Behandlung $1,27 \pm 1,16$ Singletten an Tag 10.

Singlets HCT116-ESR-GFP high density

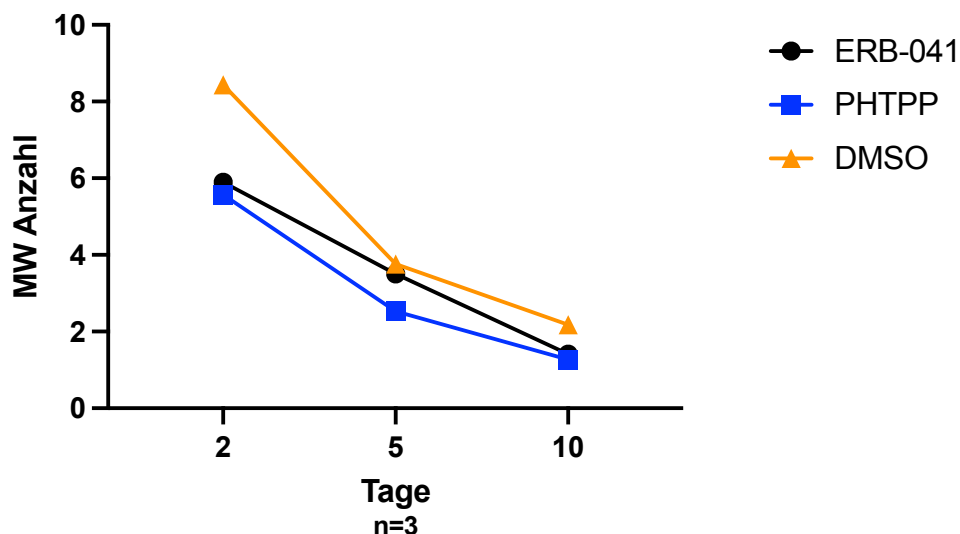


Abb. 24 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP Singletten in high-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Einzelzellen (MW y-Achse) in der high-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO

An Tag 10 lagen in der high-density Kultur bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen (Abb. 25) bei der ERB-041 Probe am wenigsten Organoiden vor mit $0,42 \pm 0,40$. Bei PHTPP-Behandlung lagen $2,97 \pm 3,36$ und bei DMSO-Behandlung $4,35 \pm 5,44$ Organoiden an Tag 10 vor.

Organoids HCT116-ESR-GFP high density

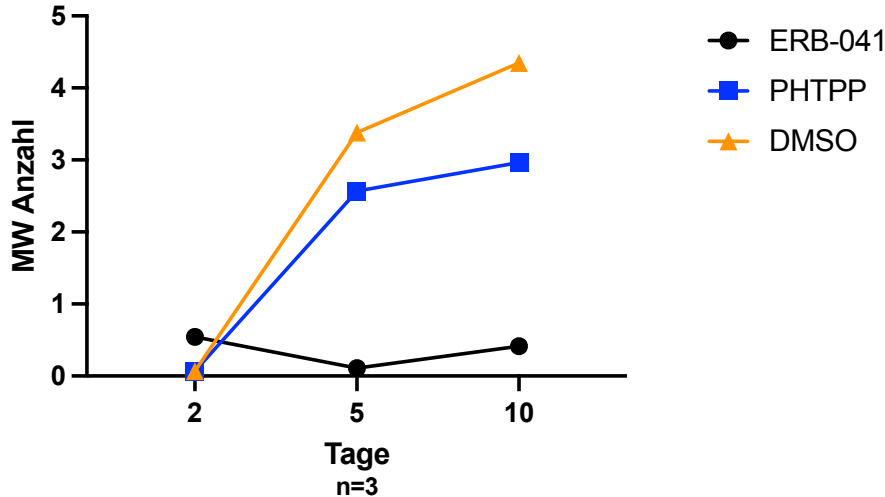


Abb. 25 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP Organoiden in high-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Organoiden (MW y-Achse) in der high-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO

3.4.2 Wachstumsverhalten HCT116-ESR2-GFP

Bezüglich des Matrigel-Experiments ist bei einer wachsenden und proliferierenden Zellkultur über die Tage 2,5 und 10 ein kontinuierlicher Abfall der Singletten zu antizipieren, da bei Proliferation Singletten in das Stadium der Multipletten übergehen würden, wie teilweise in Abb. 26 zu beobachten. Dies zeigt sich in der low-density-Kultur bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen, wie in Abb. 29-A ersichtlich. Bei den Multipletten könnte man initial deswegen eine Steigerung an Tag 5 erwarten, jedoch dann an Tag 10 eine sinkende Zahl, da eine Transformation zu Organoiden zu erwarten wäre bei Wachstumstendenz. Folglich müsste in einer proliferierenden Zellkultur die Anzahl der Organoiden kontinuierlich über die Zeit steigen (siehe Abb. 29-B). In Abb. 27 sind Organoiden in einer 2D-FM-Aufnahme von HCT116^{ESR2-GFP}-Zellen abgebildet und mittels Z-Stack in 3D in Abb. 28.

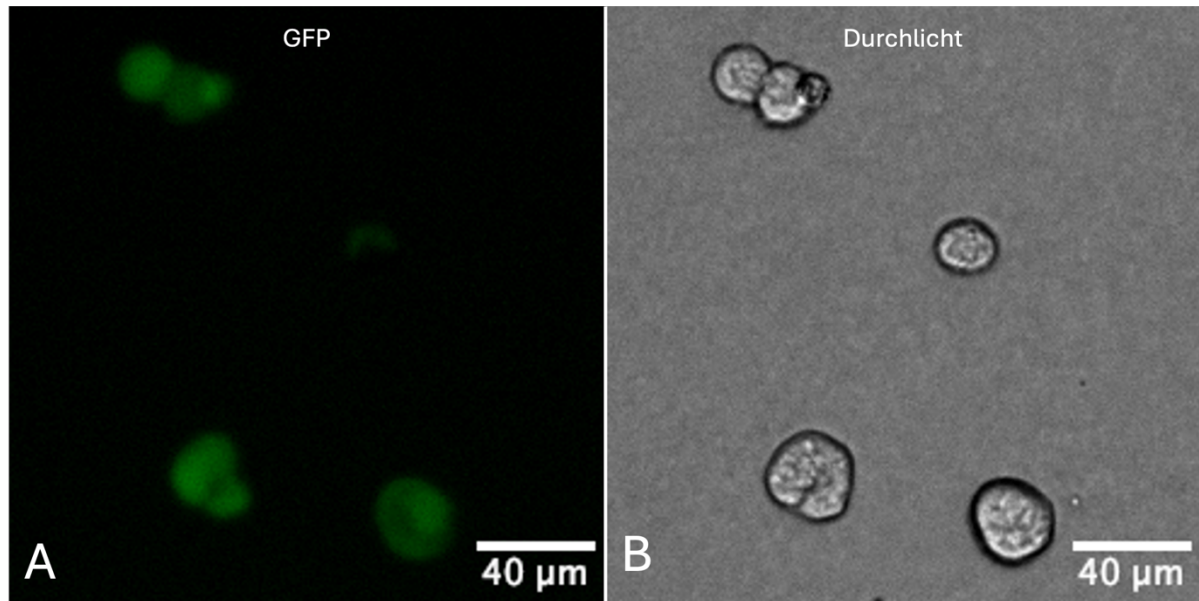


Abb. 26 FM HCT116 ESR2-GFP Einzelzellen und differenzierbare Zellaggregate (Multipletten) im Matrigel (2. Tag low-density Kultur und 20xObjektiv) im GFP-Kanal (A) und Durchlicht (B)

Ergebnisse

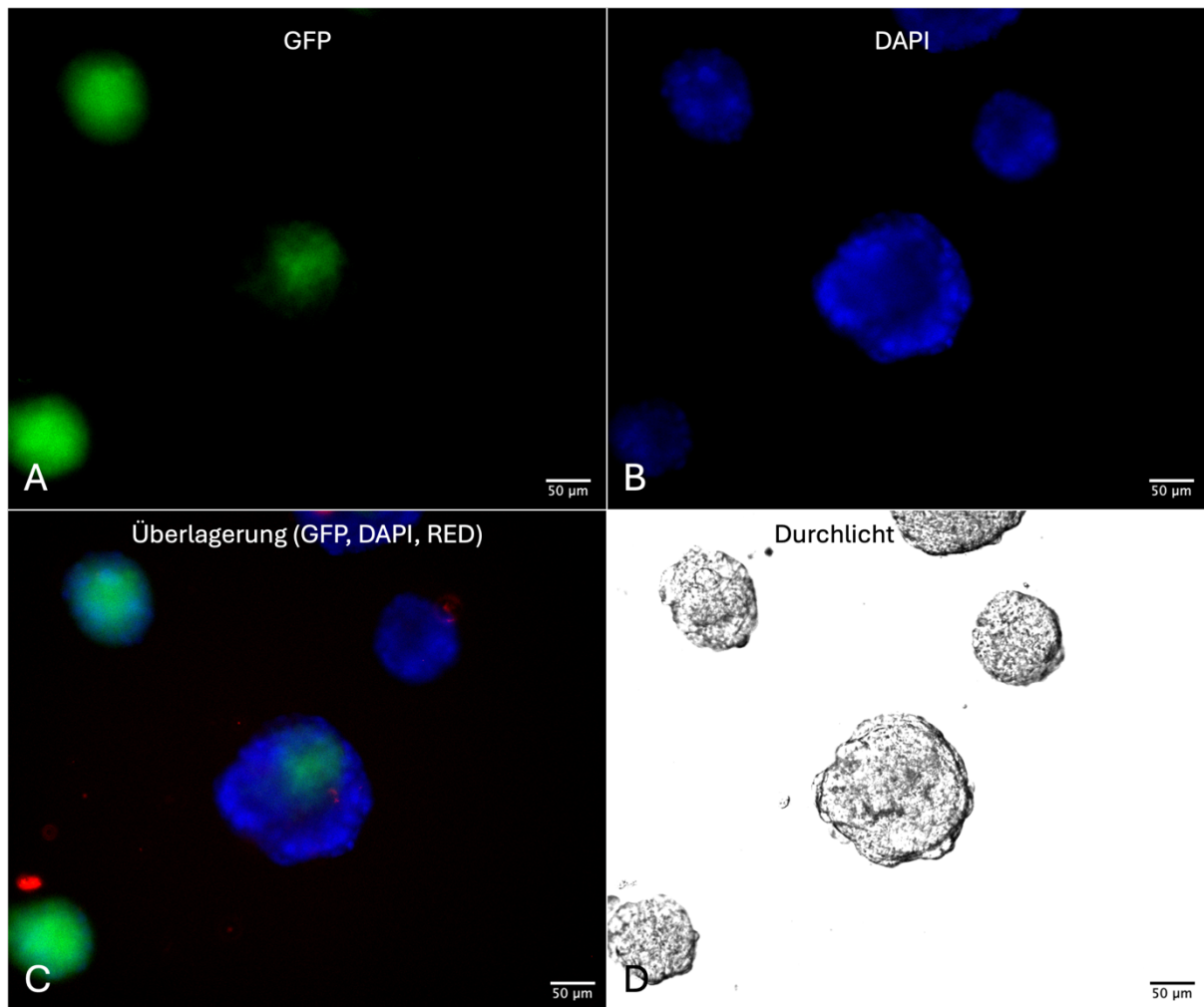


Abb. 27 FM HCT116-ESR2-GFP Organoide im Matrigel mit Organoiden (10. Tag low-density Kultur und 20xObjektiv nach Hoechstfärbung) im GFP-Kanal (A), DAPI-Kanal (B), Überlagerung des GFP, DAPI und Cy3-Kanal (C) und Durchlicht (D)

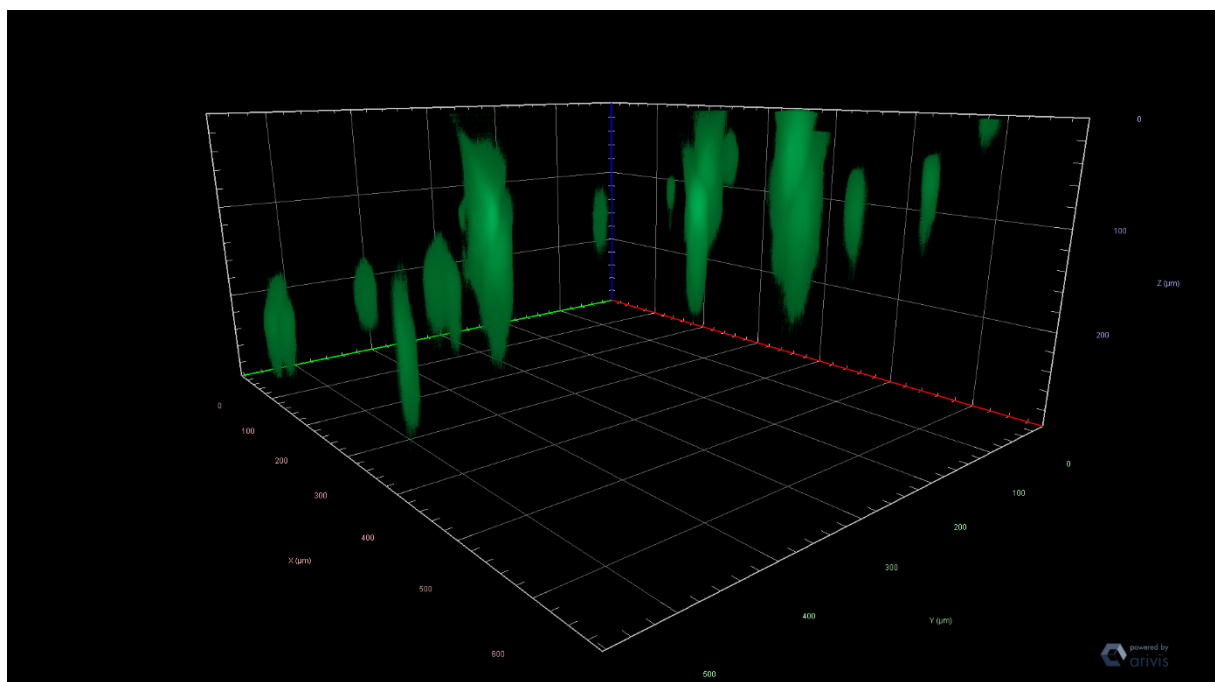


Abb. 28 HCT116-ESR2-GFP Organoide im Matrigel in 3D-Rekonstruktion

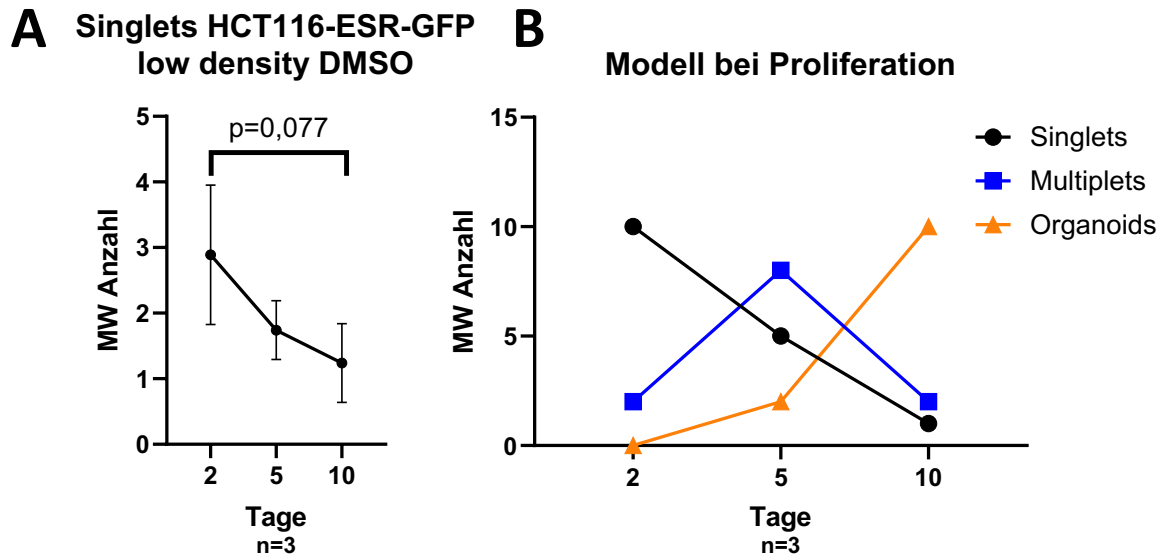


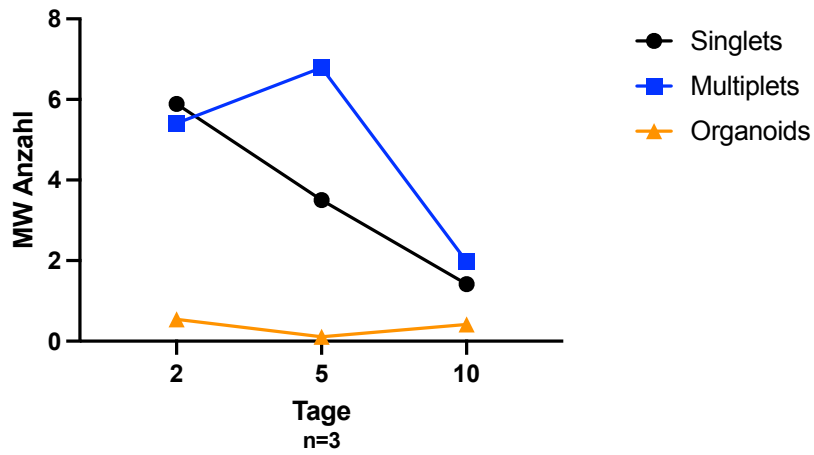
Abb. 29 Wachstumsverhalten im Matrigelexperiment A: Singlettenabfall in der Kontrollgruppe (DMSO) von HCT116-ESR2-GFP Zellen in low-density-Matrigel-Kultur mit dem MW der Anzahl (y-Achse) über die Zeit (x-Achse) B: Schemenhaftes Proliferationsmodell des Matrigelexperimentes

Betrachtet man unter diesen Gesichtspunkten das Verhalten der Zelllinie HCT116-ESR2-GFP in high-density Kultur fällt bei ERB-041 Behandlung (Abb. 30-A) auf, dass die Singletten abfallen, es zu einem Ansteigen der Multipletten an Tag 5 kommt, mit deutlichem Abfall an Tag 10. Ein Ansteigen der Organoiden ist jedoch nicht zu beobachten.

Dieses Verhalten zeigt sich bei PHTPP-Behandlung (Abb. 30-B) ähnlich, außer dass es zu einer steigenden Anzahl an Organoiden kommt. Bei DMSO-Behandlung (Abb. 30-C) bleibt das initiale Wachstum der Multipletten aus, die Organoiden steigen ebenfalls.

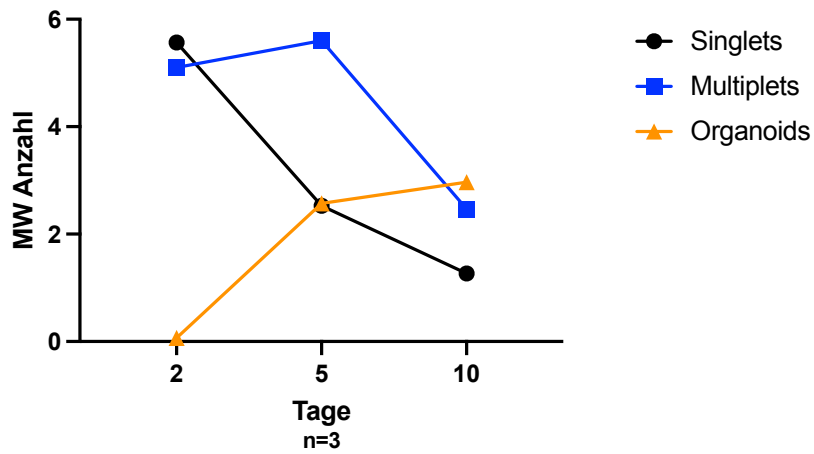
A

HCT116-ESR-GFP high density ERB-041



B

HCT116-ESR-GFP high density PHTPP



C

HCT116-ESR-GFP high density DMSO

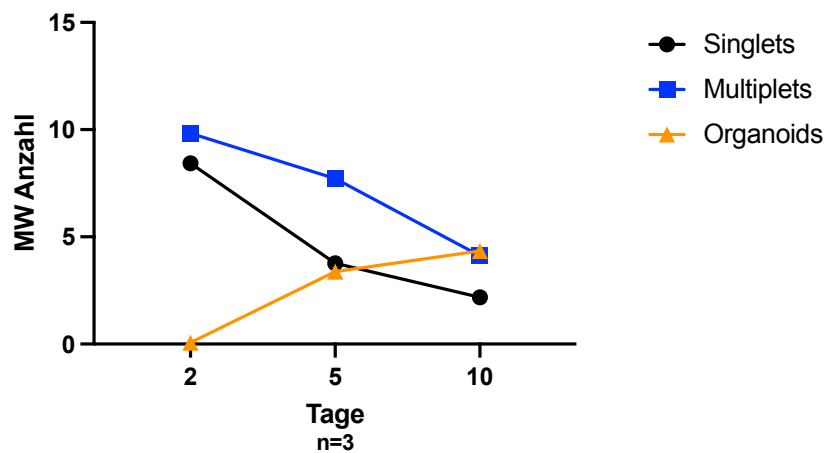


Abb. 30 Wachstum der HCT116-ESR2-GFP in high-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Zellen (MW y-Achse) in der high-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041 (A), PHTPP(B) und DMSO(C)

In der low-density Kultur (Abb. 31) der HCT116-ESR2-GFP Zellen zeigt sich ein ähnliches Verhalten bei ERB-041 Behandlung wie in der high-density Kultur, jedoch fällt auf, dass sich die Singletten zwischen Tag 2 und 5 auf statischem Niveau halten ($MW_{\text{Id-S-Tag 2}} 3,10 \pm 0,95$; $MW_{\text{Id-S-Tag 5}} 3,07 \pm 0,91$). Das Organoid-Wachstum ist ebenfalls schwach.

HCT116-ESR-GFP low density ERB-041

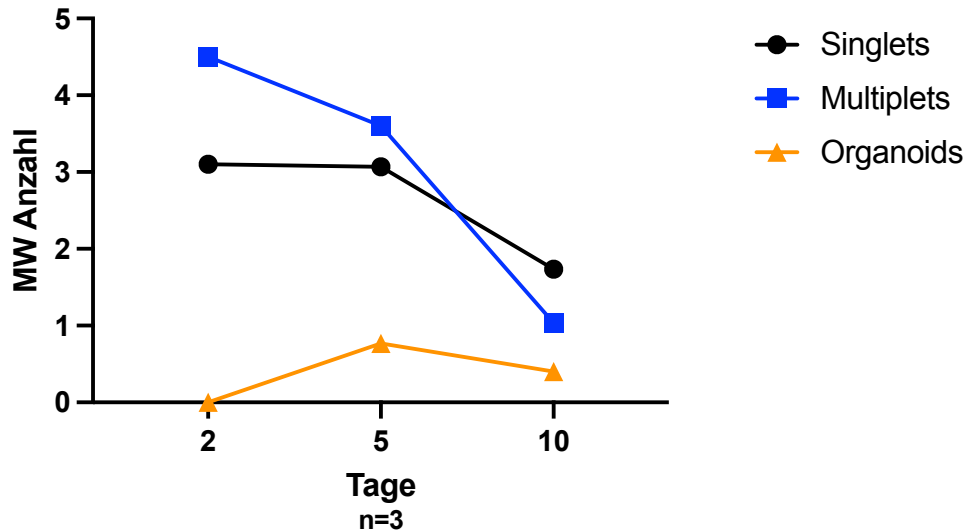


Abb. 31 Wachstum unter ERB-041 von HCT116-ESR2-GFP in low-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Zellen (MW y-Achse) in der low-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit ERB-041

Bei Betrachtung der low-density Kultur der HCT116-ESR2-GFP Zellen, zeigt sich ähnliches Verhalten wie bei der high-density Kultur bei PHTPP-Behandlung (Abb. 32) und DMSO-Behandlung (Abb. 33) mit einem Organoid-Anstieg bis Tag 10.

HCT116-ESR-GFP low density PHTPP

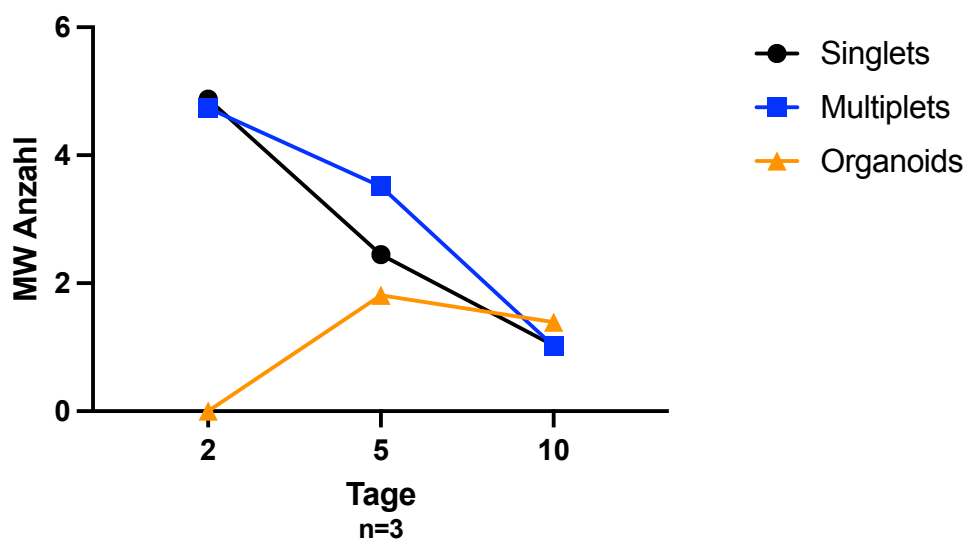


Abb. 32 Wachstum unter PHTPP von HCT116-ESR2-GFP in low-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Zellen (MW y-Achse) in der low-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit PHTPP

HCT116-ESR-GFP low density DMSO

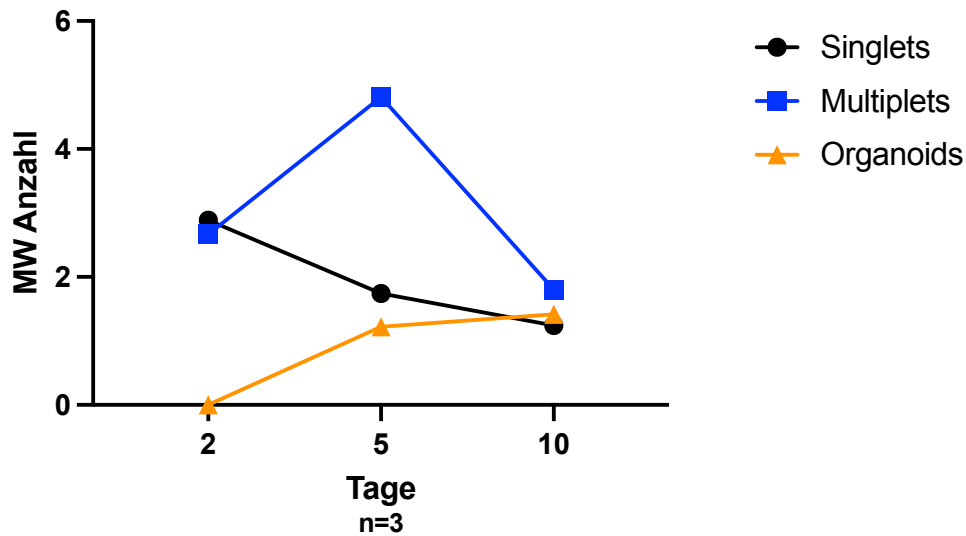


Abb. 33 Wachstum unter DMSO von HCT116-ESR2-GFP in low-density-Matrigel-Kultur - Vergleich des Wachstums von HCT116-ESR2-GFP Zellen (MW y-Achse) in der low-density-Matrigel-Kultur über die Zeitpunkte 2, 5 und 10 Tage (x-Achse) bei Behandlung mit DMSO

3.4.3 Vergleich der low-density und high-density Kultur

Bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen lagen entsprechend signifikant mehr Singletten in der high-density Kultur an Tag 2 bei der Kontrollgruppe (DMSO-Behandlung, siehe Abb. 34) vor ($p=0,004$) MW_{ld-S} $2,89 \pm 1,06$ und MW_{hd-S} $8,43 \pm 1,25$.

Singlets DMSO Tag 2 HCT116-ESR-GFP

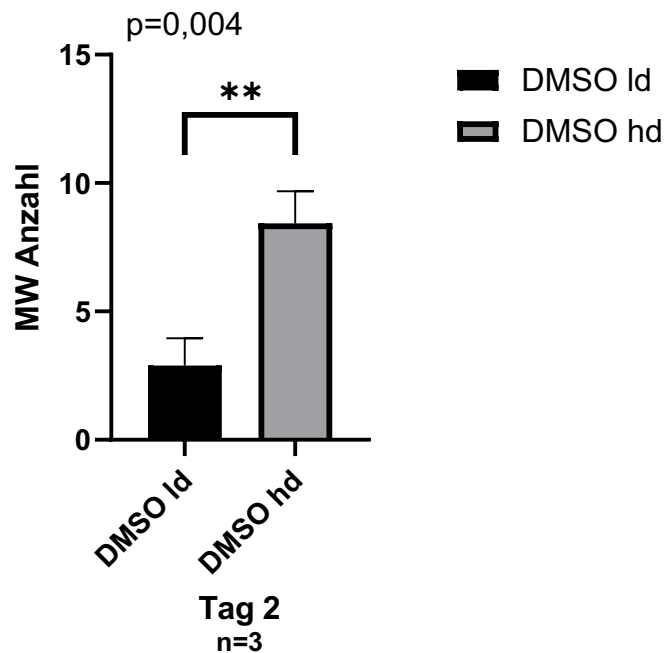


Abb. 34 High- vs. low-density Kultur Einzelzellen HCT116-ESR2-GFP Tag 2 DMSO

Ebenfalls bei den Multipletten (DMSO-Behandlung) lagen an Tag 2 signifikant weniger in der low-density Kultur vor ($p=0,035$) MW_{ld-M} $2,67 \pm 2,87$ und MW_{hd-M} $9,83 \pm 2,75$ (Abb. 35).

Multiplets DMSO Tag 2 HCT116-ESR-GFP

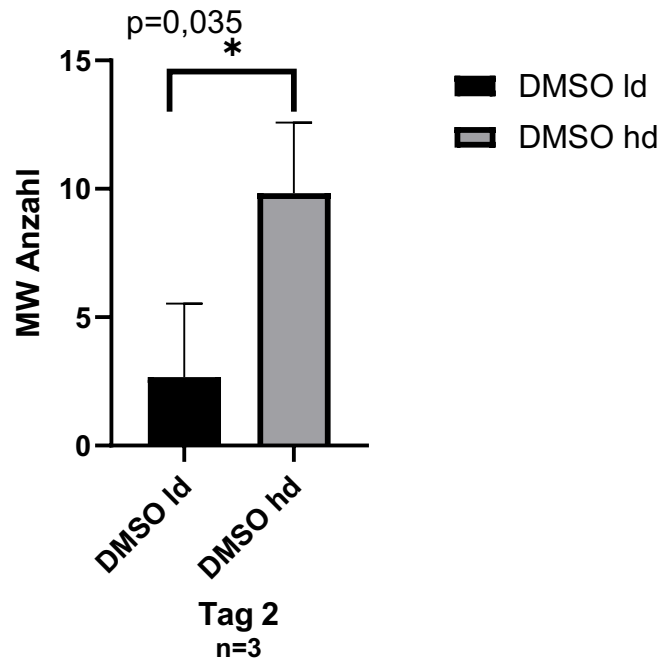


Abb. 35 High- vs. low-density Kultur Multipletten HCT116-ESR2-GFP Tag 2 DMSO

Deskriptiv lagen außer bei den Singletten bei ERB-041 Behandlung an Tag 2 stets mehr Singletten, Multipletten und Organoide in der high-density Kultur an Tag 2 (Abb. 36) und Tag 10 (Abb. 37) bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen vor.

Tag 2 HCT116-ESR-GFP high- vs low-density Kultur

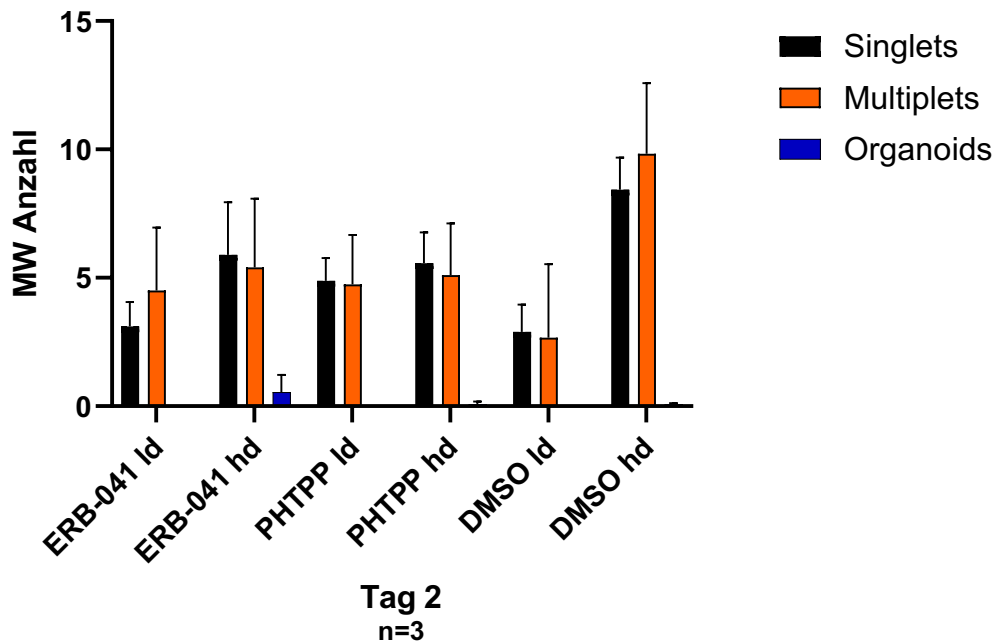


Abb. 36 High- vs. low-density Kultur HCT116-ESR2-GFP Tag 2

Tag 10 HCT116-ESR-GFP high- vs low-density Kultur

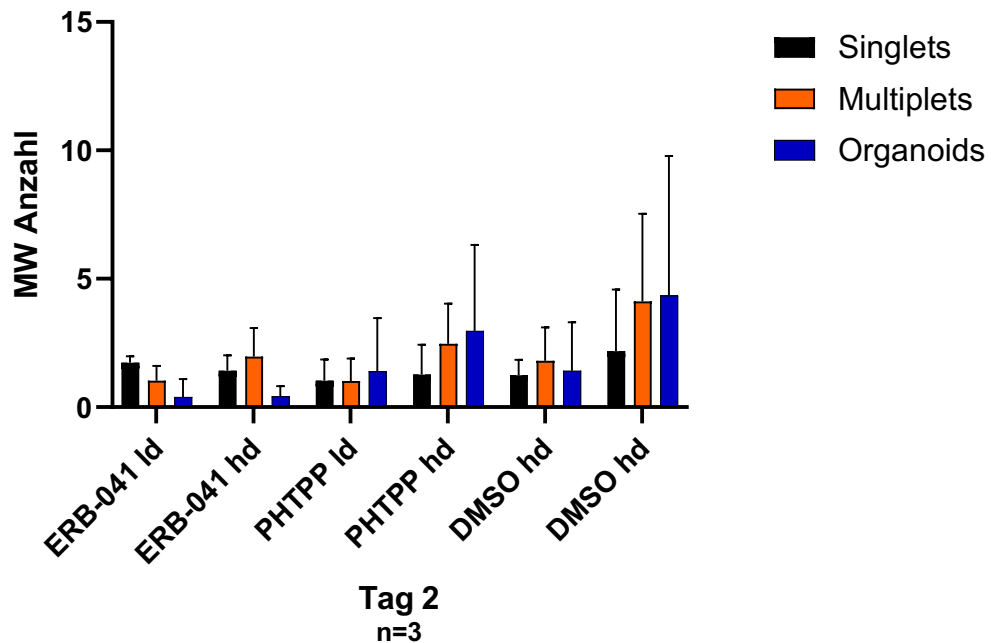


Abb. 37 High- vs. low-density Kultur HCT116-ESR2-GFP Tag 10

3.4.4 SW620-GFP im Matrigel

Die SW620-GFP Zellen ließen sich bei der low-density Kultur, als auch bei der high-density Kultur sehr schlecht im Matrigel kultivieren (Abb. 38).

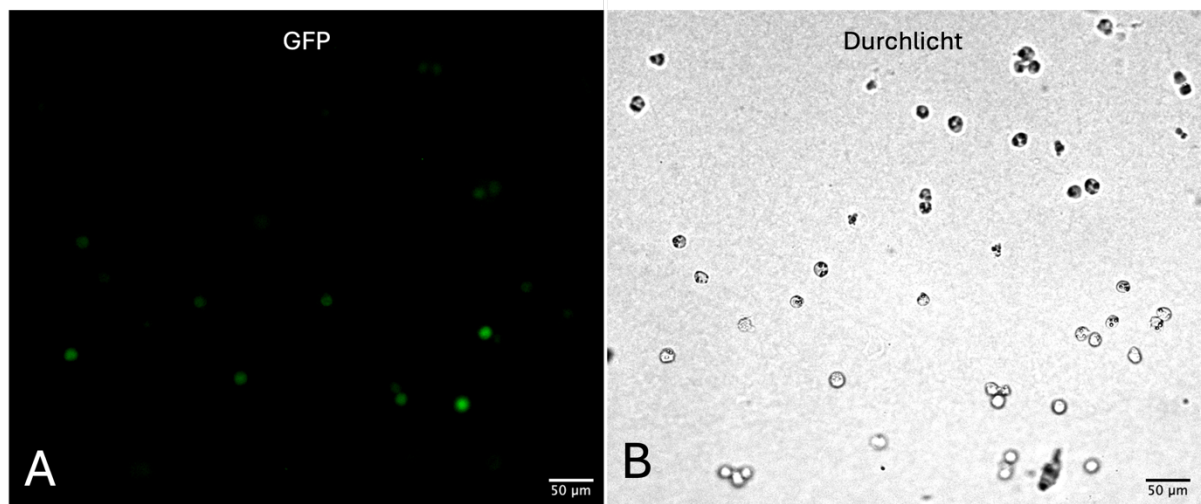


Abb. 38 FM SW620-GFP Zellen im Matrigel an Tag 2 mit teils avitalen und vitalen Einzelzellen

An Tag 10 zeigten sich bei den SW620-GFP Zellen nur bei den mit ERB-041 behandelten Zellen lebendige Singletten mit $0,07 \pm 0,12$ in der low-density Kultur (Abb. 39) und $0,03 \pm 0,06$ in der high-density Kultur (Abb. 40).

Singletten SW620 low density

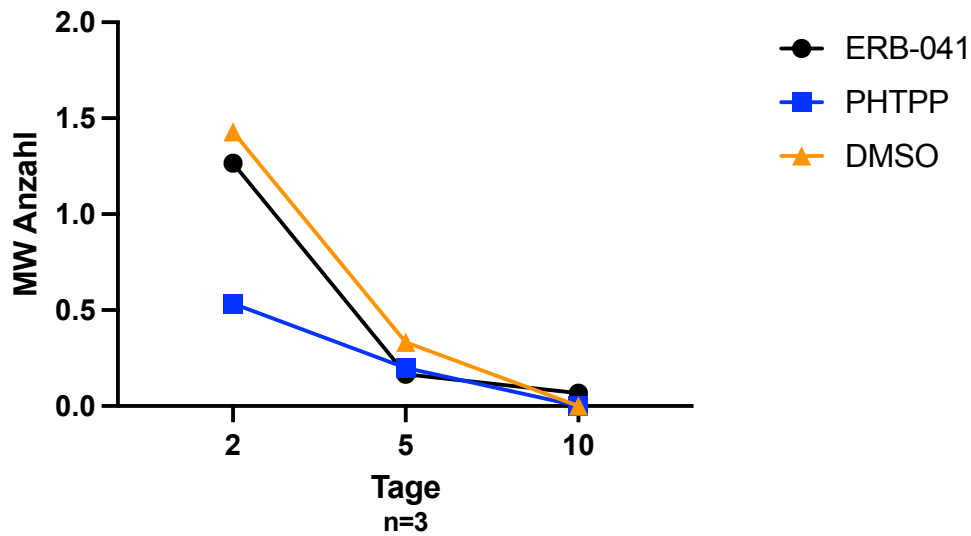


Abb. 39 Low-density Kultur Einzelzellen SW620-GFP

Singletten SW620 high density

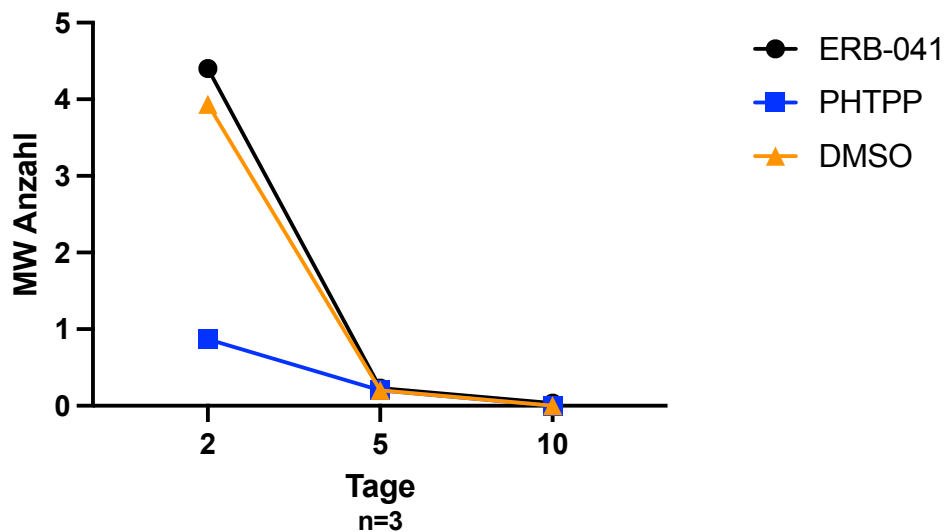


Abb. 40 High-density Kultur Einzelzellen SW620-GFP

Beim Vergleich von ERB-041 und PHTPP behandelten SW620-GFP Zellen ist zu erwähnen, dass weniger Singletten an Tag 2 in der low- und high-density Kultur bei PHTPP Behandlung vorliegen ($MW_{ld-S-ERB-041} 1,27 \pm 0,90$; $MW_{ld-S-PHTPP} 0,53 \pm 0,61$ und $MW_{hd-S-ERB-041} 4,40 \pm 4,40$. und $MW_{hd-S-PHTPP} 0,87 \pm 0,64$) (Abb. 41).

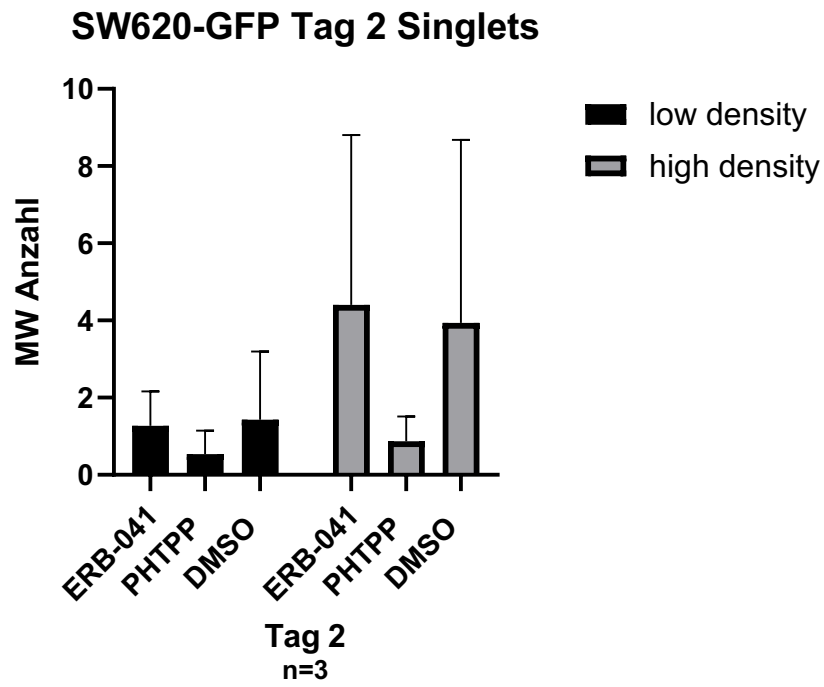


Abb. 41 High- vs. low-density Kultur Einzelzellen SW620-GFP an Tag 2

Zur Bildung von SW620-GFP Organoiden ist es bis Tag 10 nicht gekommen (Abb. 42).

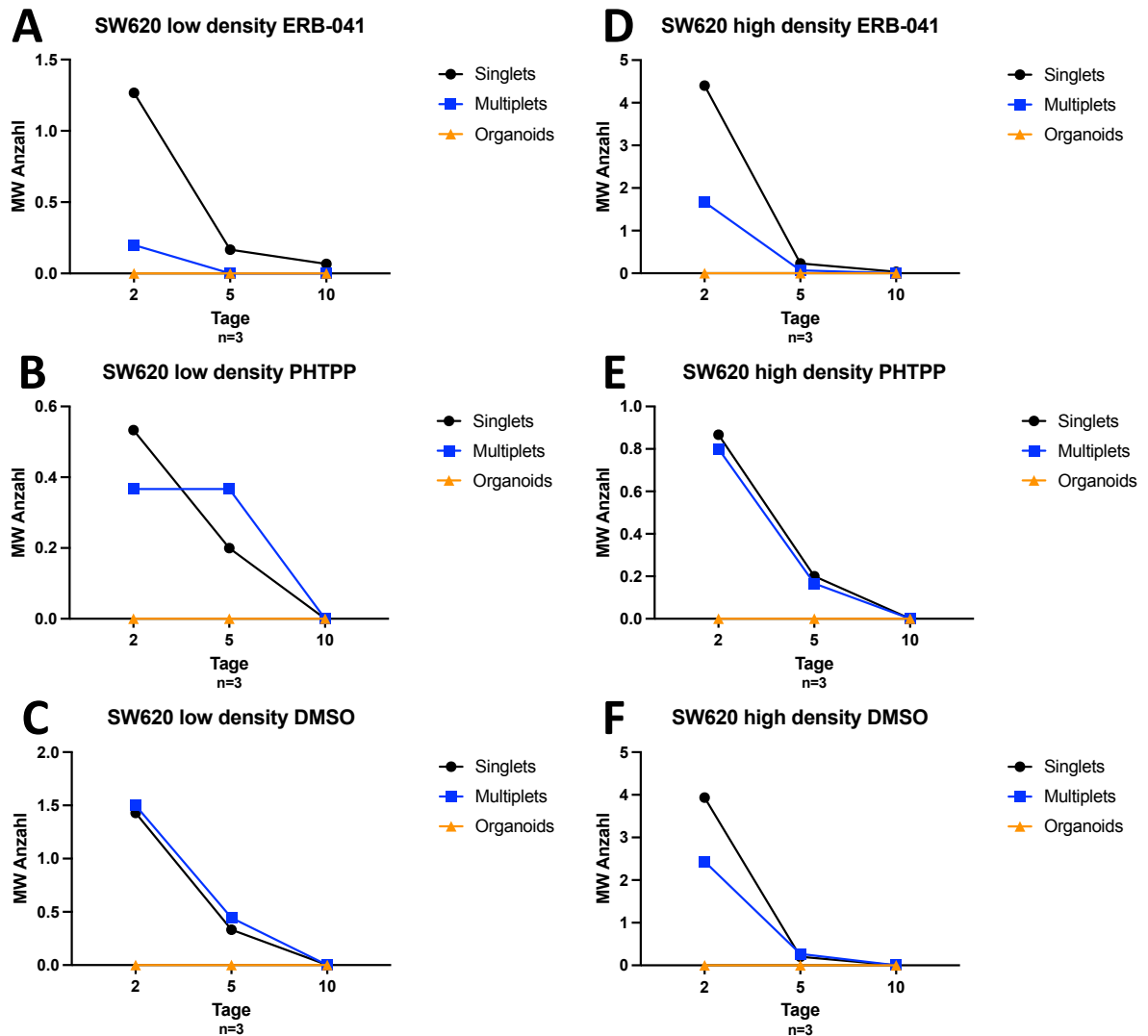


Abb. 42 Ergebnisübersicht SW620-GFP im Matrigelexperiment

3.4.5 Vergleich der Zelllinien

Bei der ersten Messung an Tag zwei lagen stets weniger Singletten bei den SW620-GFP vor als bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen. Deskriptiv lässt sich sagen, dass die HCT116-ESR2-GFP Zellen deutlich besser im Matrigel zu kultivieren sind als die SW620-GFP.

Im Vergleich mit den HCT116-ESR2-GFP sind die an Tag 10 verbleibenden SW620-GFP-Singletten (ERB-041-Behandlung) signifikant weniger bei den SW620-GFP Zellen als bei den HCT116-ESR2-GFP Zellen (low-density Kultur: $p < 0,001$, $MW_{ld-S-ERB-041-SW620-GFP} 0,07 \pm 0,12$, $MW_{ld-S-ERB-041-HCT116-ESR2-GFP} 1,73 \pm 0,25$; high-density Kultur: $p = 0,017$, $MW_{hd-S-ERB-041} 0,03 \pm 0,06$, $MW_{hd-S-ERB-041-HCT116-ESR2-GFP} 1,41 \pm 0,60$) (Abb. 43).

SW620-GFP vs. HCT116-ESR2-GFP Singlets

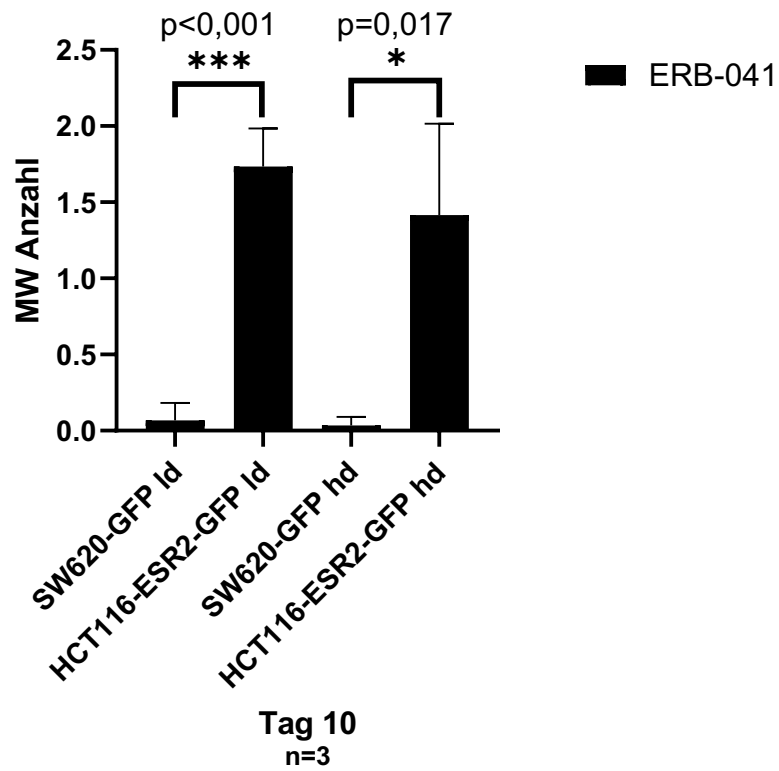


Abb. 43 HCT116-ESR2-GFP vs. SW620-GFP Einzelzellen an Tag 10 nach ERB-041 Behandlung

4 Diskussion

Der Östrogenrezeptor beta (ER β) und seine Rolle in der Genese des kolorektalen Karzinoms wird seit einigen Jahren untersucht, ist jedoch weiterhin unklar. Der ER β ist der vorherrschende Östrogenrezeptor im Darmepithel (77) und wird Großteils mit protektiven Eigenschaften im CRC assoziiert (77, 96, 102, 103, 105, 110). Ebenfalls protektiv bezüglich einem CRC scheint das Vorhandensein von erhöhten Östrogenspiegeln im menschlichen Organismus, wie es bei Frauen vor der Menopause und bei Einnahme einer Hormonersatztherapie nach der Menopause der Fall ist (15, 61, 67, 94-97, 111). Es scheint sich um eine kombinatorische protektive Wirkung zu handeln, bei dem die Östrogenwirkung rezeptor-vermittelt erfolgt (72). Der Östrogenrezeptor alpha wird im CRC - sowie in anderen onkologischen Erkrankungen - eher mit Tumorphilierung assoziiert (104, 105). Da einerseits das kolorektale Karzinom eines der häufigsten Karzinome des Menschen darstellt (1) und andererseits ein Großteil der Patienten nicht an dem Primärtumor, sondern an der metastasierten Situation und Rezidiven verstirbt (2), ist eine Erforschung der verantwortlichen Mechanismen von besonderem Interesse.

Der Forschungsbereich *Dormancy* beschäftigt sich mit den Mechanismen, die einerseits den Ruhemodus von disseminierten, dormanten Tumorzellen hervorrufen und andererseits mit der gefährlichen Reaktivierung der dormanten Tumorzellen, die zu potenziell tödlichen und therapielimitierenden Metastasen und Rezidiven führen. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse ist das am häufigsten betroffene Organ im kolorektalen Karzinom die Leber (16, 17). In vivo konnte zuvor eine Interaktion des ER β mit der wichtigen p38 Schaltstelle (p38/ERK Aktivität) des *Dormancy*-Programms ausgemacht werden (43, 85).

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um das biologische Verhalten in vitro von ER β -exprimierenden, einzelnen, kolorektalen Karzinomzellen zu untersuchen. In einem ersten Schritt erfolgte die lentivirale ESR2-GFP-Transduktion der HCT116 Zelllinie. Im Folgenden wurden zwei Proliferationsassays durchgeführt, die jeweils mit Durchflusszytometrie gemessen wurden. Es erfolgte jeweils eine Behandlung der HCT116-ER β Zellen in vitro mittels des ER β -Agonisten ERB-041 und des Antagonisten PHTPP, sowie eine Kontrolle mittels des Lösungsmittels DMSO.

Die Proliferation der HCT116- und SW620-Zellen wurden mittels eines fluoreszierenden CellTrace Farbstoffes untersucht (eine abnehmende Intensität bedeutet mehr Verdünnung durch Zellteilung), sowie mittels BrdU-Assay der Zellzyklus ermittelt.

In dem Kernexperiment meiner Arbeit wurde die Situation von disseminierten Tumorzellen in der Leber als Einzelzelle in mit Matrigel gefüllten *chamberslides* imitiert. Es erfolgte eine regelmäßige Behandlung mit ERB-041, PHTPP und DMSO, sowie eine regelmäßige manuelle

Auszählung und Beurteilung der Proliferation mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Experimente wurden jeweils mit n=3 biologischen Replikaten durchgeführt.

4.1 CellTrace-Assay: Keine Signifikanz; geringerer Proliferation in PHTPP-Gruppe

Die Nutzung des CellTrace-Farbstoffes ermöglichte eine quantitative Erfassung von Zellteilungen mittels Durchflusszytometrie, wobei eine geringere Fluoreszenzintensität auf eine erhöhte Zellteilungsrate hinweist. Die Zelllinie HCT116-ESR2-GFP und die GFP-negativen SW620-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede der normierten CellTrace-Intensität (nCTI) zwischen den Behandlungen. In allen Experimenten war die nCTI unter PHTPP- höher als bei ERB-041 Behandlung, was der Hypothese einer antiproliferativen Wirkung des ER β -Agonisten widerspricht. In GFP-positiven SW620-Zellen führte eine Behandlung mit ERB-041 und PHTPP im Vergleich zu DMSO jeweils zu einer signifikant geringeren nCTI ($p < 0,001$). Die SW620 Zellen haben eine schwache endogene ER β -Expression, eine Manipulation am ER β könne hier bei agonistischer und antagonistischer Behandlung die Proliferation beeinträchtigt haben.

Insgesamt blieben die Ergebnisse der ER β -Stimulation mittels ERB-041 und Inhibition mit PHTPP in den transduzierten HCT116-ESR2-GFP Zellen und nicht transduzierten SW620 Zellen leider inkonklusiv.

Vergleichbare Studien zu CellTrace-basierten Proliferationsexperimenten in HCT116- und SW620-Zellen liegen bisher nicht vor. Ma et al. veröffentlichten eine Arbeit 2023, in der sie mittels eines CFSE-CellTrace Farbstoffes eine dosisabhängige antiproliferative Wirkung von Oxaliplatin an T-Zellen in einem CRC-Mausmodell nachweisen konnten (122). Dies zeigt die grundsätzliche Eignung des von mir verwendeten CellTrace-Ansatzes für Proliferationsstudien im onkologischen Kontext.

Hartman et al. führten Proliferationsexperimente nach ER β -Überexpression mit CRC-Zelllinien durch (HCT116, SW480 und HT29). Nach einer Stimulation mit 10nMol/L E2 wurde in den HCT116- und SW480-Zellen eine verminderte Proliferation beobachtet (85). Ein methodischer Unterschied zu meinen Versuchen bestand darin, dass Hartmann et al. 24h vor den Experimenten das FBS im Zellkulturmedium durch mit Aktivkohle behandeltes FBS ersetzt haben, mit dem Ziel die darin vorhandenen Steroidhormone (u.a. Östrogene), andere Lipide, Fettsäuren, Wachstumsfaktoren und Vitamine zu eliminieren. Des Weiteren wurde von Hartmann et al. kein ER β -Antagonist zur Kontrolle genutzt. Der für meine Arbeit verwendete Antagonist PHTPP wirkt als selektiver ER β -Antagonist und blockiert als „*silent antagonist*“ den ER β ausschließlich, ohne die basale Rezeptoraktivität zu beeinflussen (123).

Topi et al. konnten einen wichtigen Beitrag zu dem Kontext dieser Arbeit leisten, indem sie die tumorsuppressiven Effekte des ER β anhand von klinischen Daten an CRC-Patienten, mit CRC-Zellen in vitro sowie anhand eines *Zebrafish-Xenograft-Modells* in vivo untersuchten (124). Der Fokus ihrer Arbeit bestand in der Wirkung des ER β auf die entzündlichen Prozesse und wie sie die Progression bzw. das Verhalten von CRC-Zellen beeinflussen. Neben anderen Zelllinien wurde hier ebenfalls die Stimulierung des Östrogenrezeptors in der Zelllinie HCT116 untersucht. Während ich mit einer ERB-041 Konzentration von 100nM gearbeitet habe, nutzen diese jedoch 60nM über einen Zeitraum von 48h und 72h. Die Arbeit konnte zeigen, dass die HCT116 und Caco-2 Zellen (eine weitere CRC-Zelllinie) eine endogene ER β -Expression haben. Nach Stimulation mit ERB-041 zeigte sich eine erhöhte ESR2-mRNA sowie eine erniedrigte MYC-mRNA und CTNNB1-mRNA (kodiert für β -Catenin) in beiden Zelllinien. Die ebenfalls untersuchte CCND1-mRNA, die für Cyclin D1 kodiert, war in Caco-2 Zellen ebenfalls erniedrigt, nicht aber bei den HCT116 Zellen, in denen eine β -Catenin Mutation vorliegt. Somit zeigt sich eine Zelllinien-abhängige Expressionskaskade des ER β -Signalwegs, die ggf. auch für die inkonklusiven Ergebnisse meiner Arbeit relevant sein könnten. Grundsätzlich konnte die Arbeit von Topi et al. die in der Einleitung genannten Beobachtungen unterstützen, dass es ER β -vermittelt zu einer antiproliferativen Wirkung und einem Zellzyklusarrest kommt. Die ER β -vermittelte Herunterregulierung von MYC- und CTNNB1-mRNA zeigt ebenfalls die tumorprotektive Signalwirkung. Dass dies in der Arbeit von Topi et al. durch eine agonistische Stimulation mit der gleichen Substanz (ERB-041) wie in meiner Arbeit erreicht wurde ist ein gutes Beispiel dafür, dass der methodische Aufbau meiner Arbeit, bei der ich leider wenig konklusive Ergebnisse gefunden habe, dennoch sinnvoll für die Untersuchung der Hypothese ist.

Aufgrund meiner inkonklusiven Ergebnisse könnte ein nächster Schritt für anschließende Arbeiten darin bestehen, zur weiteren Validierung der ER β -Expression nach der Transduktion neben der GFP-Expression eine zusätzliche Methode heranzuziehen.

Ein methodischer Aspekt, der berücksichtigt werden muss, sind die hier beschriebenen teils erheblichen Intensitätsschwankungen innerhalb der Messansätze. Die Reproduzierbarkeit innerhalb einzelner Proben war jedoch gegeben, was die Validität der Ergebnisse trotz interexperimenteller Variation stützt. Die Normierung auf DMSO-Proben erwies sich als notwendige und effektive Strategie, um Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten herzustellen.

4.2 Ligandenunabhängige antiproliferative Wirkung des ER β möglich

Beim Vergleich der GFP-positiven (und damit ER β -transduzierten) und GFP-negativen (und damit auch ER β -Wildtyp) Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Ein Vergleich der beiden Gruppen (GFP-positiv und GFP-negativ) kann als interne Kontrolle genutzt werden, um Rückschlüsse auf die Wirkung bei Vorliegen bzw. Fehlen des ER β zu schließen.

Beim deskriptiven Vergleich der ER β -positiven und ER β -negativen HCT116 Zellen zeigt sich sowohl bei ERB-041, als auch bei PHTPP-Behandlung eine erhöhte nCTI in den ER β -positiven HCT116-ESR2-GFP Zellen.

Bei genauer Betrachtung der nicht normierten Rohdaten zeigten sich die nCTI-Werte der jeweiligen GFP-positiven und GFP-negativen Versuchspaare nah beieinander, jedoch war der Mittelwert der CellTrace-Intensität in allen drei Behandlungsgruppen bei den ESR2-GFP-positiven HCT116 höher (ERB-041: 1,85%; PHTPP: 2,16% und DMSO: 0,6%) und deutet somit auf eine geringere Proliferation in diesen Zellen hin.

Wenngleich die Interpretation sehr vorsichtig vorgenommen werden sollte, lässt sich ein ligandenunabhängiger Effekt durch das reine Vorliegen des ER β diskutieren, da sich bei den ER β -positiven HCT116 Zellen behandlungsunabhängig eine erhöhte nCTI messen ließ und somit weniger Zellteilungen und Proliferation stattfand, als in den ER β -negativen (GFP-negativen) internen Kontrollzellen.

Eine ligandenunabhängige ER β -Aktivierung wurde ERK-abhängig in Osteoblasten von Castillo et al. beschrieben (125). Diese fanden eine EGFR-Rezeptor abhängige Aktivierung des ER β über die Kinasenkaskade Ras/Raf/MAPK, was zu einer ligandenunabhängigen Östrogenrezeptor vermittelten Genexpression führte (81).

EGF und direkte Agonisten und Antagonisten sind zumindest nicht in den von mir in den vorliegenden Experimenten genutzten Zellkulturmedien (L-15 und McCoy's) enthalten, jedoch kann eine indirekte Beeinflussung durch enthaltene Lipide und Vitamine nicht ausgeschlossen werden. Auch das in der Zellkultur verwendete FBS kann Spuren von E2, Zytokinen und Wachstumshormonen enthalten.

Mittels *western blot* Analyse zeigten Hartman et al. ebenfalls eine ER β abhängige Induktion von p14^{ARF} (p53 Stabilisierer), p53, p21 und p27. C-MYC und p45 (p27-Regulierer) waren herunterreguliert. Dies konnte bei in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) mutiertem ER β , bei dem eine ERE-Interaktion nicht möglich ist, nicht nachgewiesen werden. Allein der Ligand reichte nicht aus für eine protektive Wirkung. Mittels *realtime PCR* zeigte sich eine E2-unabhängige c-MYC-mRNA Reduktion um 70% bei intakter DBD. Die Arbeit von Hartman et al. spricht entsprechend teilweise für eine ER β vermittelte antiproliferative Wirkung, die nicht nur durch Vorhandensein des Liganden E2 erreicht werden kann. Dies unterstützt die ligandenunabhängige These aus den CellTrace Versuchen meiner Arbeit.

4.3 Unterschiede SW620 und HCT116

Beim Vergleich der GFP-positiven und GFP-negativen SW620 Zellen zeigt sich ebenfalls bei Betrachtung der nicht normierten Daten, dass die CellTrace-Intensität in allen Behandlungsgruppen deutlich höher in der GFP-positiven Gruppe war (ERB041 1:1,46; PHTPP 1:1,45 und DMSO 1:1,49). Eine Erklärung könnte sein, dass die GFP-Produktion metabolisch aufwendiger für die Zellen ist und diese somit im Vergleich zu den GFP-negativen Zellen nicht so schnell proliferieren können.

Der Mittelwert der CellTrace-Intensität (nicht normiert) war bei den SW620 stets größer als bei den HCT116 Versuchspaaren (ca. 2,7x GFP-positiv ($p < 0,05$) und ca. 1,9x GFP-negativ ($p = 0,058-0,069$)). Der beobachtete Proliferationsunterschied ist konkordant mit den gängigen Darstellungen der Literatur, in der die Dopplungsrate der SW620 Zelllinie (aus einer humanen Metastase) langsamer als die der HCT116 Zellen (von einem Primärtumor stammend) ist (116, 117).

In meinen Experimenten vorteilhaft ist, dass GFP-positive und GFP-negative Zellen vor der Messung gemeinsam in derselben Zellkultur inkubiert wurden und somit identische Bedingungen erfahren haben. Da die Trennung der Zellpopulationen erst bei der Messung erfolgte, kann eine gegenseitige parakrine Beeinflussung über das Kulturmedium beim Vergleich der ER β -positiven und ER β -negativen HCT116-Zellen dennoch nicht ausgeschlossen werden.

4.4 BrdU-Assay: kein ERB-041 vermittelter Zellzyklusarrest bei fehlender Signifikanz

In dem für diese Arbeit durchgeführten BrdU-Zellzyklusanalyseexperiment konnte mit den HCT116-ESR2-GFP und SW620-GFP Zellen kein signifikantes Ergebnis beim Vergleich der unterschiedlichen Behandlungsgruppen gezeigt werden.

Gemäß der Hypothese, dass eine agonistische Stimulation des ER β zu einer Proliferationshemmung führt, wäre in dem BrdU-Experiment ein G0-Zellzyklusarrest anzunehmen, so wie ihn auch die Arbeitsgruppe um Hartmann et al. für SW480 Zellen zeigen konnte (75% der Zellen in der G1-Phase). In meiner Arbeit waren von den agonistisch mit ERB-041 behandelten HCT116-ESR2-GFP Zellen 64,95% der G0/G1-Phase zuzuordnen, 23,35% der G2/M-Phase und 11,70% der S-Phase.

Hartman et al. verwendeten zusätzlich eine Kontrollzelllinie mit mutierter DNA-Bindungsdomäne des ER β . In diesen Zellen zeigten sich weder im Proliferationsassay noch in der Zellzyklusanalyse antiproliferative Effekte. So lag der Anteil der G1-Phase in den SW480^{ER β -DBD^{mut}} Zellen mit 58 % auf einem ähnlichen Niveau wie in der Kontrollgruppe (52 %).

Die SW480^{ERβ-E2} Zellen von Hartmann et al. lagen auch in den mit Proliferation assoziierten Zellzyklusphasen vor, wenn auch weniger als in den hier von mir dargestellten Ergebnissen. Während Hartmann et al. einen deutlicheren Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisen konnten, zeigte sich der Effekt nicht in den von mir mit HCT116-Zellen durchgeführten Experimenten.

Entgegen der Hypothese befanden sich bei mir die mit PHTPP und DMSO (Kontrolle) behandelten Zellen vermehrt in der G1-Phase mit 66,93% und 66,31%. Der Effekt war gering und statistisch nicht signifikant, jedoch auch bei den GFP-negativen HCT116-ESR2 Zellen aufgetreten.

Beim Vergleich der GFP-positiven HCT116-ESR2-GFP und GFP-negativen HCT116-ESR2 Zellen fällt auf, dass die GFP-negativen HCT116-ESR2 Zellen, unabhängig von der Behandlung, vermehrt in der G0/G1-Phase zu finden waren und entsprechend weniger in der G2/M-Phase, wobei das Niveau in der S-Phase näher zusammen blieb mit ca. 9% und 11%.

Zu diskutieren ist, inwieweit die Zellen, die kein GFP mehr produzieren (aufgrund der Selektionsprozesse *Gating* und Puromycin ist eine initiale GFP-Produktion anzunehmen) unter Stress stehen und eher den avitaleren Populationsanteil darstellen und somit ein Bias besteht. Es wäre möglich, dass stressbedingt die aufwendige GFP-Produktion eingestellt wurde und folglich auch keine Ressourcen zur Proliferation bereitstehen - oder die Zelle bereits den Apoptoseweg eingeschlagen hat.

Ein zu beachtender Unterschied zwischen meinem Experiment und dem von Hartman et al. ist die initiale Synchronisierung des Zellzyklus mit 40µmol/L Mevinolin, die Hartmann et al. durchführten. Außerdem wurde mit Aktivkohle gereinigtes FBS verwendet um eine obskure Wirkung auf den ERβ auszuschließen. Dieser sinnvolle Schritt ist in meiner Arbeit nicht beachtet worden. Die Inkubationszeit von 36h bei Hartman et al. glich dem Setup meines Experimentes.

Möglicherweise ist auch die einmalige Stimulation mit einem Agonisten/Antagonisten nicht ausreichend bzw. deren Effekt über 36h nicht mehr nachweisbar. Dies wäre bei einer früheren Beurteilung ggf. aufgefallen. Diesbezüglich wäre es sinnvoll, weitere Zeitintervalle zu untersuchen und mit unterschiedlichen Konzentrationen des ERB041 und PHTPP zu arbeiten. Hartman et al. haben initial, dann nach 16h, 24h und 36h eine Zellzyklusbestimmung durchgeführt. Anfangs befanden sich die ERB-041- und Kontrollzellen zu 89% in der G1 Phase, nach 16h nur noch 70% in der Kontrollgruppe während die ERB-041-Zellen noch zu 87% von initial 89% in der G1 Phase sich befanden. Nach 24h waren es jedoch schon 10% (77%) weniger, über die Zeit war insgesamt auch hier ein fallender Trend zu beobachten.

Möglicherweise hätte nach einer noch längeren Inkubationszeit eine Angleichung stattgefunden. In den von mir durchgeführten Matrigelexperiment erfolgte alle 48h ein Mediumwechsel mit erneuter Behandlung - hier konnte ich einen Effekt beobachten.

Des Weiteren ist ein *Rebound*-Phänomen zu diskutieren. Dies könnte bei PHTPP Behandlung zu einer kompensatorischen *Upregulation* von ER β nach Blockade führen und so die antiproliferativen Effekte im CellTrace-Proliferationsassay und Brdu-Zellzyklusassay bei PHTPP Behandlung erklären. In der Literatur wurden diesbezüglich keine Arbeiten gefunden.

Beim Vergleich der SW620 Zellen, bei denen keine ER β -Transduktion erfolgt ist, und den HCT116-Zellen zeigt sich unabhängig der Behandlung eine deutliche Tendenz zu einem proliferativen biologischen Verhalten bei niedrigeren G0/G1-Raten und mehr G2/M- und S-Phase-Raten. Eine unterschiedliche Zellbiologie der beiden Zelllinien liegt somit vor und ist ggf. dafür verantwortlich. Jedoch kann man auch diskutieren, inwieweit das Vorliegen des ER β in der Zellkultur bei den HCT116-Zellen, die gemeinsam kultiviert wurden, ggf. eine antiproliferative parakrine interzelluläre Wirkung hatten. Dies ist spekulativ und müsste anhand des Mediums weiterführend untersucht werden. Die Ergebnisse widersprechen dennoch den CellTrace Ergebnissen, die weniger Zellteilungen in den SW620 Zellen vermuten lassen, was sich mit der Literatur deckt (116, 117).

4.5 Matrigel: Stagnierende Einzelzellen und weniger Organoide bei ERB-041

Die SW620 Zellen konnten in keinem Experimentansatz im Matrigel über 10 Tage kultiviert werden. Auch wenn nur bei den mit ERB-041 behandelten Zellen überhaupt noch vereinzelt lebende Einzelzellen am 10. Tag gefunden werden konnten sind die Ergebnisse nicht statistisch signifikant. Daher gehe ich im Folgenden auf die HCT116 Zellen ein, mit denen das Experiment erfolgreicher gelang.

Im Matrigelexperiment zeigt sich in der Kontrollgruppe der HCT116-ESR2-GFP Zellen in *low-density* Kultur ein Proliferationsverhalten dem angenommenen Modellwachstum entsprechend - mit einer Abnahme der Einzelzellen über die Zeit, einem Zunehmen der Zellverbände (Multipletten) hin zu Organoiden am Ende des Experiments an Tag 10.

Statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Behandlung der Zellen zeigten sich dennoch nicht.

HCT116-ESR2-GFP Zellen zeigten in der *low-density*-Kultur im Matrigel-Experiment bei Behandlung mit PHTPP eine schnellere Abnahme von Einzelzellen (Tag 2: 4,88; Tag 5: 2,45),

hin zu einem Zellverbund, während sich die Einzelzellen an Tag 2 und 5 bei Behandlung mit ERB-041 statisch verhielten (Tag 2: 3,10; Tag 5: 3,07).

In der *high-density*-Kultur zeigte sich ein anderes Wachstumsverhalten mit früherem Abfallen der Einzelzellen hin zu einem Zellverband bei Behandlung mit ERB-041, ggf. ist eine Beeinflussung über das Mikromilieu bei dichterem Kultivierung mit interzellulären Wachstumssignalen verantwortlich. Nur in der *high-density*-Kultur waren schon an Tag 2 Organoide vorhanden, was auf die Notwendigkeit der Zell-Zell-Adhäsion in der *high-density* Kultur hinweist.

In der *high*-, sowie in der *low-density*-Kultur wurden jeweils am 10. Tag am wenigsten Organoide in der ERB-041 Gruppe registriert. Somit kann eine verminderte Organoidbildung in der *low*- und *high-density*-Kultur aufgrund einer antiproliferativen und antiinvasiven ERB-041 vermittelten ER β Wirkung angenommen werden.

Das Stagnieren des Wachstums der Einzelzellen von Tag 2 bis Tag 5 bei agonistischer ERB-041-Behandlung in der *low-density*-Kultur sowie das verminderte Organoidwachstum sowohl in der *high-density*-Kultur als auch in der *low-density*-Kultur an Tag 10 bei ERB-041 Behandlung unterstützt die These und könnte auf eine *Dormancy*-induzierende Funktion des ER β bei agonistischer Stimulation hinweisen.

Ein grundsätzlich ähnlicher methodischer Ansatz konnte von Fluegen et al. in ebenfalls *low-density* Matrigel-*Dormancy* Experimenten etabliert werden. Hier ergaben sich Hinweise auf eine hypoxische NR2F1-abhängige *Dormancy* Induktion in *low-density* ER $^{+}$ -Brustkrebszellen (27). Diese Ergebnisse decken sich mit den in vitro Migrations-, Überlebens- und Koloniebildungsassays von Topi et al. (124) und Hsu et al. (126), sowie mit den in vivo Ergebnissen von Topi et al. im Xenograft-Zebrafisch-Modell (124) und Hartman et al. im Mausmodell (85).

Topi et al. führten ein Zellmigrationsexperiment und ein Koloniebildungsassay (colony formation assay) durch (124). Ebenfalls bei ERB-041 Stimulation verhielten sich die HCT116 und SW480 Zellen weniger invasiv und bildeten signifikant weniger Kolonien aus. Dieser Effekt zeigte sich nicht, als die Zellen zuvor antagonistisch mit einer 1 μ M Konzentration von PHTPP für 30 Minuten vor ERB-041 Stimulierung behandelt wurden. Bei diesen beiden Experimenten gibt es Parallelen, so werden im Koloniebildungsassay ebenfalls Einzelzellen ausgesät, auch wenn die 3D Matrix hier fehlt. Zusätzlich wurde der ER β in den Zellen mittels siRNA-Transfektion supprimiert, was zu einem Verlust der ERB-041 Wirkung, ähnlich der PHTPP Behandlung führte.

Hsu et al. behandelten CRC-Zellen (LoVo) mit ER β -Agonisten (E2) und zeigten im *cell viability assay* (MTT-Assay) eine Abnahme der Zellviabilität von 28%, sowie in *Western blot* Analysen eine p21 und p27 Abnahme und eine Abnahme der Migrationsfähigkeit und Motilität im 2D Zellmigrationsassay (126).

Des Weiteren zeigte die ERB-041-Behandlung im Überlebensassay (*survival assay*) von Topi et al. nach 72h eine verminderte Überlebensrate sowie eine erhöhte CASPASE 3 Aktivität (124), was auf eine proapoptotische Ursache hindeutet. Ebenfalls zeigten sich bei ERB-041 vermittelter ER β -Stimulation vermehrte apoptotische Bläschen (*apoptotic blebs*) sowie eine verminderte Viabilität von Sphäroiden (*Spheroid Viability*) im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In dem Fall zeigt sich kein aktivierter Überlebensmodus, sondern eine ERB-041 vermittelte Apoptose.

Die Arbeit von Topi et al. konnte zudem in einem weiteren Experiment zeigen, dass es im Xenograft-Zebrafisch Modell bei Injektion von mit ERB-041 behandelten CRC-Zellen zu weniger distalen Schwanzmetastasen kommt als in der Kontrollgruppe (124). Hier scheint ERB-041 eine protektive Wirkung auf die metastatische Kompetenz von CRC-Zellen in vivo zu haben. Das Experiment von Topi et al. führt zu einer metastatischen Situation, die in meiner Arbeit durch das Ausstreuen von Einzelzellen imitiert werden sollte.

In einem konsekutiven in vivo Mausmodell von Hartman et al. wurden ER β -positive und negative SW480 CRC-Zellen in immunsupprimierte Mäuse implantiert, mit subkutanen Injektionen von E2 behandelt, und nach 14 Tagen die Tumormasse gemessen. Hier zeigte sich eine deutlich geringere Tumormasse bei ER β -Expression und E2-Behandlung (85).

Die ebenfalls meinerseits diskutierte zu kurze Experimentdauer, um ggf. Effekte in vitro zu bemerken, die sich im menschlichen Organismus über Jahre abspielen, wird durch ergänzende Untersuchungen von Hartman et al. gestützt, da über einen Zeitraum von drei Wochen mittels *Microarray Analyse* vielfache transkriptomweite Veränderungen detektiert wurden, im Großteil mit repressivem Charakter.

4.6 Limitationen

Die vorliegende Arbeit ist durch eine geringe Anzahl an experimentellen Wiederholungen limitiert, was die statistische Aussagekraft einschränkt. Zudem fehlen Optimierungsschritte wie eine Serumdepletion oder Synchronisation des Zellzyklus, die in vergleichbaren Studien durchgeführt wurden.

Ein Rebound-Phänomen am ER β könnte aufgetreten sein und könnte die hier beschriebenen Ergebnisse erklären. Eine *downstream* Betrachtung mittels weiterer Methoden zur Erhebung der *Dormancy*-Biomarker ist ebenfalls ein sinnvoller ausgebliebener Validierungsschritt.

Die gemeinsame Kultivierung von GFP-positiven und -negativen Zellen kann zu interzellulären Effekten führen und eine klare Trennung der Gruppen beeinflussen. Schließlich erlaubt das in vitro-Setting nur eine begrenzte Modellierung komplexer in vivo-Prozesse wie *Dormancy* oder Metastasierung, die sich im menschlichen Organismus über lange Zeiträume ereignen. Es könnten weitere Agonisten und Antagonisten in unterschiedlichen Dosierungen und über verschiedene Intervalle am ER β in einer erweiterten Palette an CRC-Zelllinien untersucht werden. Darauf aufbauend wären in vivo Experimente sinnvoll zur Validierung der hier beschriebenen in vitro Ergebnisse.

4.7 Schlussfolgerungen

In der Zusammenschau konnte mit der Arbeit leider kein konklusiver Zusammenhang zwischen dem ER β -Signalweg und der verlangsamten Proliferation oder einem verlängerten Einzelzell-Status (als Surrogat für eine zelluläre *Dormancy*) in zwei CRC Zelllinien festgestellt werden. Dies ist überraschend, da mehrere publizierte in vitro und in vivo Studien einen protektiven ER β Effekt im CRC gezeigt haben (88).

In dieser Arbeit wurden im 3D Matrigel-Experiment stagnierende HCT116-ESR2-GFP-Einzelzellen in der low-density Kultur bei agonistischer ER β -Behandlung beobachtet. Auch beeinflusste die ERB-041 Behandlung die Menge an Organoiden am 10. Tag in der low-density-, sowie in der high-density-Kultur.

Therapeutisch könnten meine Ergebnisse für zwei Behandlungskonzepte wertvolle Beiträge leisten. Einerseits könnte eine CLM-Prophylaxe mittels eines ER β Agonisten in Betracht gezogen werden, andererseits könnte man das Erwecken der DTCs aus der *Dormancy* mittels eines ER β Antagonisten, mit dem Zweck die DTCs wieder gegenüber einer konventionellen antiproliferativen Therapie vulnerabel zu machen, erwägen. Bei der Verwendung von z.B. ERB-041 kann einerseits die Selektivität auf den ER β einen Vorteil gegenüber einer unselektiven HRT bieten, die aktuell zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führen kann (127), andererseits sind umfassende weitere Studien zur Erfassung von systemischen Effekten von ER β -wirksamen *Pharmaceuticals* nötig.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(1-2):43-73.
3. Robert Koch Institut ZfK. Krebs in Deutschland, Darm: RKI, ZfKD; 2024 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html].
4. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF.Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogrammonkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 12.03.2025].
5. Kullmann F. Karzinogenese und hereditäre Kolonkarzinome. *Der Internist.* 2003;44(3):254-67.
6. Hill MJ, Morson BC, Bussey HJR. ÆTIOLOGY OF ADENOMA—CARCINOMA SEQUENCE IN LARGE BOWEL. *The Lancet.* 1978;311(8058):245-7.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
8. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006;127(3):469-80.
9. Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Molecular Cancer.* 2021;20(1):3.
10. Schmitz S, Desel C. Signalwege und zellbasierte Assays. *Der Experimentator Zellbiologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 173-93.
11. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 2004;22(16):3420-8.
12. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jr., et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1996;335(23):1727-32.
13. Isenmann R, Gebhardt H, Dürig M. Klinische Symptomatik. In: Henne-Bruns D, editor. *Duale Reihe Chirurgie.* 4., aktualisierte Auflage ed: Thieme; 2012.
14. Villano A. Kolorektale Karzinome MSD Manual Profi-Ausgabe: MSD Manual; 2023 [updated 2023/10. Available from: <https://www.msmanuals.com/de/profi/gastrointestinale-erkrankungen/tumoren-des-gastrointestinaltrakts/kolorektale-karzinome>].
15. Landreau P, Drouillard A, Launoy G, Ortega-Deballon P, Jooste V, Lepage C, et al. Incidence and survival in late liver metastases of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2015;30(1):82-5.
16. Van Den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Hoyer-Hansen G, et al. The Multifaceted Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: Biology and Clinical Implications. 2013;73(7):2031-43.

17. Rahbari NN, Aigner M, Thorlund K, Mollberg N, Motschall E, Jensen K, et al. Meta-analysis shows that detection of circulating tumor cells indicates poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1714-26.
18. Rees M, Tekkis PP, Welsh FK, O'Rourke T, John TG. Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. *Ann Surg*. 2008;247(1):125-35.
19. Bartlett DL, Chu E. Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology (Williston Park)*. 2012;26(3):266-75.
20. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1, 2019, AWMF. .Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 12.03.2025]
- .
21. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: complete mesocolic excision and central ligation – technical notes and outcome. *Colorectal Disease*. 2009;11(4):354-64.
22. Heald RJ. The 'Holy Plane' of rectal surgery. *J R Soc Med*. 1988;81(9):503-8.
23. Benz S, Tannapfel A, Tam Y, Grünenwald A, Vollmer S, Stricker I. Proposal of a new classification system for complete mesocolic excision in right-sided colon cancer. *Tech Coloproctol*. 2019;23(3):251-7.
24. Isenmann R, Gebhardt H, Dürig M. Therapie. In: Henne-Bruns D, editor. *Duale Reihe Chirurgie*. 4., aktualisierte Auflage ed: Thieme; 2012.
25. Wang Y, Wang L, Wei Y, Wei C, Yang H, Chen Q, et al. Advances in the molecular regulation mechanism of tumor dormancy and its therapeutic strategy. *Discover Oncology*. 2024;15(1):184.
26. Vera-Ramirez L, Hunter KW. Tumor cell dormancy as an adaptive cell stress response mechanism. *F1000Res*. 2017;6:2134.
27. Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, Padgen MR, Williams JK, Ana, et al. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nature Cell Biology*. 2017;19(2):120-32.
28. Endo H, Inoue M. Dormancy in cancer. *Cancer Sci*. 2019;110(2):474-80.
29. Yeh AC, Ramaswamy S. Mechanisms of Cancer Cell Dormancy--Another Hallmark of Cancer? *Cancer Res*. 2015;75(23):5014-22.
30. Wang D, Sun H, Wei J, Cen B, DuBois RN. CXCL1 Is Critical for Premetastatic Niche Formation and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cancer Research*. 2017;77(13):3655-65.
31. Phan TG, Croucher PI. The dormant cancer cell life cycle. *Nature Reviews Cancer*. 2020;20(7):398-411.
32. Vera-Ramirez L, Vodnala SK, Nini R, Hunter KW, Green JE. Autophagy promotes the survival of dormant breast cancer cells and metastatic tumour recurrence. *Nature Communications*. 2018;9(1):1944.
33. Flatmark K, Borgen E, Nesland JM, Rasmussen H, Johannessen HO, Bukholm I, et al. Disseminated tumour cells as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2011;104(9):1434-9.
34. Bork U, Grutzmann R, Rahbari NN, Scholch S, Distler M, Reissfelder C, et al. Prognostic relevance of minimal residual disease in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(30):10296-304.
35. Buergy D, Fuchs T, Kambakamba P, Mudduluru G, Maurer G, Post S, et al. Prognostic impact of extracellular matrix metalloprotease inducer. *Cancer*. 2009;115(20):4667-78.

36. Stremitzer S, Zhang W, Yang D, Ning Y, Stintzing S, Sunakawa Y, et al. Variations in genes involved in dormancy associated with outcome in patients with resected colorectal liver metastases. *Annals of Oncology*. 2015;26(8):1728-33.
37. Schmitz S, Desel C. Zellzyklus und Proliferation, Differenzierung und Seneszenz. *Der Experimentator Zellbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 113-29.
38. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013;140(15):3079-93.
39. Weston WA, Barr AR. A cell cycle centric view of tumour dormancy. *British Journal of Cancer*. 2023;129(10):1535-45.
40. Luo Z, Tian M, Yang G, Tan Q, Chen Y, Li G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):218.
41. Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, Padgen MR, Williams JK, Nobre AR, et al. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nat Cell Biol*. 2017;19(2):120-32.
42. Aguirre-Ghiso JA, Estrada Y, Liu D, Ossowski L. ERK(MAPK) activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38(SAPK). *Cancer Res*. 2003;63(7):1684-95.
43. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(11):834-46.
44. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007;1773(8):1358-75.
45. Bragado P, Estrada Y, Parikh F, Krause S, Capobianco C, Farina HG, et al. TGF- β 2 dictates disseminated tumour cell fate in target organs through TGF- β -RIII and p38 α / β signalling. 2013;15(11):1351-61.
46. Tufail M, Jiang C-H, Li N. Tumor dormancy and relapse: understanding the molecular mechanisms of cancer recurrence. *Military Medical Research*. 2025;12(1):7.
47. Sosa MS, Bragado P, Debnath J, Aguirre-Ghiso JA. Regulation of tumor cell dormancy by tissue microenvironments and autophagy. *Systems biology of tumor dormancy*. 2013:73-89.
48. Corning. Matrigel Matrix [Available from: <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>].
49. Bahar ME, Kim HJ, Kim DR. Targeting the RAS/RAF/MAPK pathway for cancer therapy: from mechanism to clinical studies. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):455.
50. Hamada M, Varkoly KS, Riyadh O, Beladi R, Munuswamy-Ramanujam G, Rawls A, et al. Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR) in Inflammation and Disease: A Unique Inflammatory Pathway Activator. *Biomedicines*. 2024;12(6):1167.
51. Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell*. 2001;12(4):863-79.
52. Endo H, Okuyama H, Ohue M, Inoue M. Dormancy of cancer cells with suppression of AKT activity contributes to survival in chronic hypoxia. *PLoS One*. 2014;9(6):e98858.
53. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002;8(10):1145-52.
54. Simons AL, Orcutt KP, Madsen JM, Scarbrough PM, Spitz DR. The Role of Akt Pathway Signaling in Glucose Metabolism and Metabolic Oxidative Stress. In: Spitz DR, Dornfeld KJ,

- Krishnan K, Gius D, editors. Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 21-46.
55. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-76.
 56. AMBOSS SE; Kapitel: Sexualhormone, Sektion: Östrogene [<https://next.amboss.com/de/article/zo0reS?q=%C3%B6strogen#vRcAKX0>; Kapitel zuletzt aktualisiert am: 30.09.2024; Kapitel zitiert am: 25.03.2025 um 19:34 Uhr] [
 57. Strauss JF. Chapter 4 - The Synthesis and Metabolism of Steroid Hormones. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology (Seventh Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2014. p. 66-92.e3.
 58. Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U. Steroidhormone – Produkte von Nebennierenrinde und Keimdrüsen. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 495-511.
 59. Maingi JW, Tang S, Liu S, Ngenya W, Bao E. Targeting estrogen receptors in colorectal cancer. *Molecular Biology Reports*. 2020;47(5):4087-91.
 60. Saint-Criq V, Rapetti-Mauss R, Yusef YR, Harvey BJ. Estrogen regulation of epithelial ion transport: Implications in health and disease. *Steroids*. 2012;77(10):918-23.
 61. Barzi A, Lenz AM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2013;19(21):5842-8.
 62. Shivers KY, Amador N, Abrams L, Hunter D, Jenab S, Quiñones-Jenab V. Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine*. 2015;72(2):121-9.
 63. Gustafsson JA. Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*. 1999;163(3):379-83.
 64. Felberbaum R, Weiss JM, Lopens A. Hormonelle Regulation. In: Diedrich K, Schultze-Mosgau A, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Weiss JM, editors. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 59-77.
 65. Lerchbaum E. Postmenopausale Hormonersatztherapie: Anleitung für die Praxis! *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*. 2023;16(3):92-6.
 66. English MA, Kane KF, Cruickshank N, Langman MJS, Stewart PM, Hewison M. Loss of Estrogen Inactivation in Colonic Cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(6):2080-5.
 67. English MA, Stewart PM, Hewison M. Estrogen metabolism and malignancy: analysis of the expression and function of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in colonic cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;171(1-2):53-60.
 68. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1535-65.
 69. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986;231(4742):1150-4.
 70. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(12):5925-30.
 71. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(12):4258-65.
 72. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*. 2007;87(3):905-31.

73. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 1997;272(32):19858-62.
74. Delaunay F, Pettersson K, Tujague M, Gustafsson JA. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol.* 2000;58(3):584-90.
75. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol.* 1997;11(10):1486-96.
76. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 2000;24(1):145-55.
77. Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vondoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, et al. Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer.* 2003;39(9):1251-8.
78. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 1997;277(5331):1508-10.
79. Deroo BJ, Buensuceso AV. Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol.* 2010;24(9):1703-14.
80. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 1999;140(12):5566-78.
81. Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(10):422-7.
82. Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M. Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(1):153-67.
83. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, et al. Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol.* 2005;203(1):193-201.
84. Caiazza F, Galluzzo P, Lorenzetti S, Marino M. 17β-Estradiol induces ERβ up-regulation via p38/MAPK activation in colon cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007;359(1):102-7.
85. Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, Zhao C, Williams C, Strom A, et al. Tumor Repressive Functions of Estrogen Receptor in SW480 Colon Cancer Cells. *Cancer Research.* 2009;69(15):6100-6.
86. Jin P, Lu XJ, Sheng JQ, Fu L, Meng XM, Wang X, et al. Estrogen stimulates the expression of mismatch repair gene hMLH1 in colonic epithelial cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(8):910-6.
87. Hsu HH, Cheng SF, Wu CC, Chu CH, Weng YJ, Lin CS, et al. Apoptotic effects of over-expressed estrogen receptor-beta on LoVo colon cancer cell is mediated by p53 signalings in a ligand-dependent manner. *Chin J Physiol.* 2006;49(2):110-6.
88. Williams C, DiLeo A, Niv Y, Gustafsson J. Estrogen receptor beta as target for colorectal cancer prevention. *Cancer Lett.* 2016;372(1):48-56.
89. Alzamora R, Harvey BJ. Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by steroid hormones. *Steroids.* 2008;73(9-10):885-8.

90. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, et al. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24353-60.
91. Treeck O, Lattrich C, Springwald A, Ortmann O. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;120(3):557-65.
92. Edvardsson K, Ström A, Jonsson P, Gustafsson J, Williams C. Estrogen receptor β induces antiinflammatory and antitumorigenic networks in colon cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2011;25(6):969-79.
93. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(12):715-26.
94. Hendifar A, Yang D, Lenz F, Lurje G, Pohl A, Lenz C, et al. Gender disparities in metastatic colorectal cancer survival. *Clin Cancer Res*. 2009;15(20):6391-7.
95. Fernandez E, La Vecchia C, Balducci A, Chatenoud L, Franceschi S, Negri E. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2001;84(5):722-7.
96. Zhenhua HX, Zhang; Sen, Zhang; Zhenjie WJ, Ouyang ER β as a Prognostic Factor for Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Journal of Cancer Therapy*. 2012;3:880-7.
97. Fernandez E, Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C. Hormone replacement therapy and cancer risk: A systematic analysis from a network of case-control studies. *International Journal of Cancer*. 2003;105(3):408-12.
98. Bufill JA. Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med*. 1990;113(10):779-88.
99. Koo JH, Leong RW. Sex differences in epidemiological, clinical and pathological characteristics of colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(1):33-42.
100. Papaxoinis K, Triantafyllou K, Sasco AJ, Nicolopoulou-Stamati P, Ladas SD. Subsite-specific differences of estrogen receptor beta expression in the normal colonic epithelium: implications for carcinogenesis and colorectal cancer epidemiology. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010;22(5):614-9.
101. Jassam N, Bell SM, Speirs V, Quirke P. Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol Rep*. 2005;14(1):17-21.
102. Pérez-Ruiz E, Rueda A, Pérez L, Rivas-Ruiz F, Torres E, de Luque V, et al. Expression and Prognostic Value of Oestrogen Receptor Beta in Colorectal Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(4):871-9.
103. Z. He XZ, S. Zhang, Z. Wu and J. Ouyang. ER β as a Prognostic Factor for Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Journal of Cancer Therapy*. 2012;Vol. 3 No. 6A:pp. 880-7.
104. Topi G, Satapathy SR, Ghatak S, Hellman K, Ek F, Olsson R, et al. High Oestrogen receptor alpha expression correlates with adverse prognosis and promotes metastasis in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):198.
105. Topi G, Ghatak S, Satapathy SR, Ehrnström R, Lydrup ML, Sjölander A. Combined Estrogen Alpha and Beta Receptor Expression Has a Prognostic Significance for Colorectal Cancer Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:739620.
106. Weyant MJ, Carothers AM, Mahmoud NN, Bradlow HL, Remotti H, Bilinski RT, et al. Reciprocal expression of ERalpha and ERbeta is associated with estrogen-mediated modulation of intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001;61(6):2547-51.
107. Bielecki A, Roberts J, Mehta R, Raju J. Estrogen receptor- β mediates the inhibition of DLD-1 human colon adenocarcinoma cells by soy isoflavones. *Nutr Cancer*. 2011;63(1):139-50.

108. Yan L, Spitznagel EL, Bosland MC. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(1):148-58.
109. Armstrong CM, Allred KF, Weeks BR, Chapkin RS, Allred CD. Estradiol Has Differential Effects on Acute Colonic Inflammation in the Presence and Absence of Estrogen Receptor β Expression. *Dig Dis Sci.* 2017;62(8):1977-84.
110. Söderlund S, Granath F, Broström O, Karlén P, Löfberg R, Ekblom A, et al. Inflammatory bowel disease confers a lower risk of colorectal cancer to females than to males. *Gastroenterology.* 2010;138(5):1697-703.
111. Liu Q, Simin J, Debelius J, Fall K, Sadr-Azodi O, Engstrand L, et al. Menopausal hormone therapies and risk of colorectal cancer: a Swedish matched-cohort study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2021;53(11):1216-25.
112. Sosa MS, Parikh F, Maia AG, Estrada Y, Bosch A, Bragado P, et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat Commun.* 2015;6:6170.
113. Khalil BD, Sanchez R, Rahman T, Rodriguez-Tirado C, Moritsch S, Martinez AR, et al. An NR2F1-specific agonist suppresses metastasis by inducing cancer cell dormancy. *Journal of Experimental Medicine.* 2021;219(1).
114. André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2207-18.
115. Cellosaurus. HT-29 [Available from: https://www.cellosaurus.org/CVCL_0320.
116. Cellosaurus. SW620 [Available from: https://www.cellosaurus.org/CVCL_0547.
117. Cellosaurus. HCT 116 [Available from: https://www.cellosaurus.org/CVCL_0291.
118. OriGene Technologies IR, MD 20850, USA. Vector Map [cited 2025 10.07.2025]. Available from: <https://www.origene.com/catalog/vectors/lentiviral-gene-expression-vectors/ps100093-plenti-c-mgfp-p2a-puro-lentiviral-gene-expression-vector>.
119. OriGene Technologies IR, MD 20850, USA. Plasmid-map [cited 2025 10.07.2025]. Available from: <https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/expression-plasmids/rc218519l4-estrogen-receptor-beta-esr2-nm-001437-human-tagged-lenti-orf-clone>.
120. OriGene. Lentiviral Particle Estrogen Receptor beta [Available from: https://www.origene.com/catalog/cdna-clones/lentiviral-particles/rc218519l4v/estrogen-receptor-beta-esr2-nm_001437-human-tagged-orf-clone-lentiviral-particle.
121. Schmitz S, Desel C. *Praktische Grundlagen der Zellbiologie. Der Experimentator Zellbiologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 19-49.
122. Ma Y, Guo C, Wang X, Wei X, Ma J. Impact of chemotherapeutic agents on liver microenvironment: oxaliplatin create a pro-metastatic landscape. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023;42(1):237.
123. Compton DR, Sheng S, Carlson KE, Rebacz NA, Lee IY, Katzenellenbogen BS, et al. Pyrazolo[1,5-a]pyrimidines: Estrogen Receptor Ligands Possessing Estrogen Receptor β Antagonist Activity. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2004;47(24):5872-93.
124. Topi G, Satapathy SR, Dash P, Fred Mehrabi S, Ehrnström R, Olsson R, et al. Tumour-suppressive effect of oestrogen receptor β in colorectal cancer patients, colon cancer cells, and a zebrafish model. *J Pathol.* 2020;251(3):297-309.
125. Castillo AB, Triplett JW, Pavalko FM, Turner CH. Estrogen receptor- β regulates mechanical signaling in primary osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;306(8):E937-44.

126. Hsu HH, Kuo WW, Ju DT, Yeh YL, Tu CC, Tsai YL, et al. Estradiol agonists inhibit human LoVo colorectal-cancer cell proliferation and migration through p53. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16665-73.
127. Warner M, Huang B, Gustafsson JA. Estrogen Receptor β as a Pharmaceutical Target. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(1):92-9.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Georg Flügen für die engagierte und stets wertschätzende Betreuung dieser Doktorarbeit sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Professorin Dr. med. Verena Keitel-Anselmino danke ich ebenfalls herzlich für die Betreuung dieser Arbeit.

Dem gesamten Team der chirurgischen Forschung danke ich herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit und die kontinuierliche Unterstützung, insbesondere Maria Wecker und Dennis Roth, die mir während der Arbeit jederzeit hilfreich zur Seite standen, mich geduldig in den Laboralltag einarbeiteten und einen wesentlichen Beitrag zur Durchführung der Experimente leisteten, genauso wie Katharina Raba. Herrn Professor Dr. med. Nikolas H. Stoecklein danke ich für das herzliche Willkommen und die offene Aufnahme in der Abteilung der chirurgischen Forschung.

Für die Möglichkeit, mich in der chirurgischen Abteilung als studentischer Mitarbeiter zu beweisen und eine Begeisterung für die Chirurgie entwickeln zu können gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Wolfram T. Knoefel.

Der Düsseldorf *School of Oncology* danke ich für die finanzielle Förderung sowie für das Vertrauen in dieses Projekt. Bei der Heinrich-Heine-Universität, ihrer *Medical Research School* und ihren Dozenten und Dozentinnen bedanke ich mich für alles, was ich lernen durfte.

Mein abschließender und besonderer Dank gilt meiner Familie sowie meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotionszeit stets unterstützt, motiviert und begleitet haben.