

Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor als Tumorsuppressor im Mammakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von: Dipl.-Ing (FH) Christine Susanne Weißenborn

geb. am: 8. Februar 1986 in Blankenburg (Harz)

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ana Claudia Zenclussen

Prof. Dr. rer. nat. Carsten Gründker

eingereicht am: 27. September 2016

verteidigt am: 16. Januar 2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Brustkrebs.....	1
1.1.1 Östrogene	1
1.1.2 Molekulare Tumorklassifikation und adjuvante endokrine Brustkrebstherapien	2
1.2 Klassische Östrogenrezeptoren und Varianten.....	4
1.3 Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor.....	5
1.3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	5
1.3.2 GPER Agonisten und Antagonisten.....	7
1.3.3 GPER Signalwege	8
1.3.4 GPER im Mammakarzinom	10
1.4 Genetische und epigenetische Regulation.....	11
1.5 DNA Methylierung.....	11
1.6 Zellzyklus.....	13
1.7 Apoptose	16
1.8 Zielstellung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Allgemeine Laborausstattung.....	19
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	20
2.1.3 Enzyme, Nukleinsäuren und biologisch aktive Substanzen.....	22
2.1.4 Kits	23
2.1.5 Laborgeräte.....	24
2.1.6 Computerprogramme.....	25
2.1.7 Zellkulturmedien.....	25
2.1.8 Angefertigte Lösungen und Puffer	26
2.1.9 Zelllinien.....	27
2.1.10 Antikörper	29
2.1.11 Primer	30
2.1.12 Patientenproben.....	30
2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellkultur	32
2.2.1.1 Trypsinieren von Zellen.....	32

2.2.1.2	Zellzahlbestimmung	32
2.2.1.3	Einfrieren von Zellen im flüssigen Stickstoff (Kryokonservierung)	33
2.2.1.4	Auftauen Kryo-konservierter Zellen	33
2.2.2	Immunfluoreszenzmikroskopie für GPER	33
2.2.3	Zellviabilitätsmessung mittels MTT-Test	34
2.2.4	Stimulation von Tumorzellen mit G-1, G-15 und Aza	35
2.2.5	Wundheilungstest zur Migrations- und Proliferationsmessung adhärenter Zellen	35
2.2.6	RNA Isolierung aus humanen Zellen nach Chomczynski und Sacchi	36
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.8	cDNA Synthese	38
2.2.9	Quantitative Echtzeit (Real-Time) Polymerase-Kettenreaktion	38
2.2.9.1	Durchführung der Real-Time PCR	39
2.2.9.2	Auswertung der Real-Time PCR	40
2.2.10	Protein Isolierung aus Zellen	40
2.2.11	Proteinquantifizierung nach Bradford	40
2.2.12	Western Blot	41
2.2.12.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	41
2.2.12.2	Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran	43
2.2.12.3	Nachweis der Zielproteine mittels Chemilumineszenz	43
2.2.13	Ausschalten der Protein Expression mit Hilfe der RNA Interferenz (siRNA)	44
2.2.14	Durchflusszytometrie	45
2.2.14.1	Apoptosebestimmung am Durchflusszytometer	45
2.2.14.2	Zellzyklusbestimmung am Durchflusszytometer	47
2.2.15	Behandlung von Zellen mit radioaktiven Strahlen	48
2.2.16	Immunhistochemische GPER Färbung von Tumorschnitten	48
2.2.17	DNA Isolierung aus humanen Zelllinien	49
2.2.18	DNA Isolierung aus Gewebeschnitten	50
2.2.19	Detektion von Methylierungen in genomischer DNA	50
2.2.19.1	Bisulfitkonvertierung der DNA	51
2.2.19.2	Methylierungsspezifische PCR für die <i>GPER</i> Promotorregion	53
2.2.20	Statistik	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Untersuchung der GPER Expression in vier verschiedenen Mammakarzinomzelllinien	56
3.1.1	Die vier verwendeten Mammakarzinomzelllinien exprimierten unterschiedliche Mengen GPER	56

3.1.2	GPER war in den Zelllinien vorrangig in kernnahen Bereichen und in der Zellmembran lokalisiert	57
3.2	Einfluss der spezifischen GPER Aktivierung auf Viabilität und Proliferation von Mammakarzinomzelllinien	59
3.2.1	Der spezifische GPER Agonist G-1 hemmte die Zellviabilität von Mammakarzinom-zellen in vitro	59
3.2.2	Die Sensitivität der Zelllinien bezüglich G-1 schien abhängig von der GPER Proteinexpression zu sein	62
3.2.3	Der GPER Antagonist G-15 hemmte den Effekt des GPER Agonist G-1	63
3.2.4	G-1 konnte die Proliferation und die Migration von Mammakarzinomzellen hemmen.....	64
3.2.5	Die Verringerung der GPER Expression in triple-negativen Mammakarzinomzelllinien verminderte den negativen Effekt des GPER Agonisten	66
3.2.6	G-1 induzierte einen Zellzyklusarrest in der G ₂ /M-Phase	67
3.2.7	G-1 verringerte die Expression von Cyclin-B1 und der Cyclin-abhängigen Kinase 1 in MCF-7 und SKBr-3	69
3.2.8	G-1 erhöhte die Phosphorylierung des Histons H3 an Position Serin 10	70
3.2.9	GPER Stimulierung mit G-1 induzierte den programmierten Zelltod von Tumorzellen	70
3.2.10	GPER vermittelte die Apoptose nicht über die Aktivierung eines Caspase-unabhängigen Apoptosewegs	72
3.2.11	G-1 induzierte die Expression des Tumorsuppressors p53	73
3.2.12	Radioaktive Strahlung erhöhte die Expression von GPER in Abhängigkeit des funktionstüchtigen Tumorsuppressors p53.....	74
3.3	Untersuchungen zur Methylierung der <i>GPER</i> Promotorsequenz	76
3.3.1	Inhibierung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-2'-desoxycytidin erhöhte die Expression von GPER	76
3.3.2	5-Aza-2'-desoxycytidin erhöhte den inhibitorischen Effekt von G-1 auf die Zellviabilität von Mammakarzinomzellen in vitro	77
3.3.3	Identifizierung eines potentiell methylierbaren DNA Sequenzabschnitts im GPER Promotor	78
3.3.4	Die GPER Promotormethylierung kontrollierte die GPER Expression in Proben von Brustkrebspatientinnen	80
3.3.5	Die GPER Hypermethylierung korrelierte mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen mit triple-negativen Brustkrebs	84
4	Diskussion	86
4.1	Verschiedene Mammakarzinomzelllinien zeigen eine unterschiedliche Expression von GPER	86

4.2 Die Lokalisierung von GPER in Zellen wird von der Dynamik des Rezeptoraufbaus und -abbaus beeinflusst	89
4.3 Die spezifische Aktivierung von GPER hemmt die Viabilität und Proliferation von Mammakarzinomzellen	91
4.4 Andauernde GPER Aktivierung hemmt den Zellzyklus von Mammakarzinomzellen in der Mitosephase	93
4.5 Der durch die anhaltende Aktivierung von GPER induzierte Zellzyklusarrest in der Mitosephase führte zur Apoptose der Mammakarzinomzellen	96
4.6 Tumorsuppressor p53 wird als down-stream Mediator von GPER aktiviert	97
4.7 Die globale DNA-Demethylierung in Mammakarzinomzellen führte zu einem verstärkten Effekt der GPER Aktivierung.....	99
4.8 Die Promotormethylierung von GPER beeinflusst die Expression von GPER im Mammakarzinom	102
4.9 Zusammenfassung und Ausblick	103
5 Zusammenfassung.....	105
6 Summary.....	106
7 Literaturverzeichnis.....	107
8 Abbildungsverzeichnis	123
9 Tabellenverzeichnis.....	125
10 Danksagung.....	126
11 Eidesstattliche Erklärung	127
12 Publikationen.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aza	5-Aza-2'-desoxycytidin
bp	Basenpaare
BRCA1/2	engl. <i>breast cancer 1/2</i> (Brustkrebsgen 1/2)
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK1	engl. <i>cyclin-dependent kinase 1</i> (Cyclin-abhängige Kinase 1)
CpG	Cytosin-phosphadityl-Guanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFS	engl. <i>disease free survival</i> (krankheitsfreies Überleben)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
E ₂	Östradiol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ER	Östrogenrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGF Rezeptor)
Egr-1	engl. <i>early growth response protein 1</i>
ERK1/2	engl. <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FBS	engl. <i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
G ₁ - / G ₂ -Phase	engl. <i>gap phases</i> (Lücken-Phasen)

GnRH	engl. <i>gonadotropin-releasing hormon</i> (Gonadotropin-freisetzendes Hormon)
GPCR	engl. <i>G-protein coupled receptor</i> (G-Protein gekoppelter Rezeptor)
GPOR	G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
H3	Histon H3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
M-Phase	Mitosephase
MSP	methylierungsspezifische PCR
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
odTs	Oligodesoxythymidinnukleotide
OS	engl. <i>overall survival</i> (Gesamtüberleben)
OvGU	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIC	Protein-Inhibitor-Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. <i>real-time PCR</i> (Echtzeit PCR)
SD	engl. <i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler der Mittelwerte)

SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i> (selectiver Östrogenrezeptormodulator)
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
TF	Transkriptionsfaktor
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TNBC	engl. <i>triple-negative breast cancer</i> (triple-negativer Brustkrebs)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
U	engl. <i>unit</i> (Enzymaktivität U = $\mu\text{mol}/\text{min}$)
ü.N.	über Nacht

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

In Deutschland erkranken jährlich rund 75000 Frauen an Brustkrebs. Damit ist das Mammakarzinom (Brustkrebs) der häufigste maligne Tumor der Frau und zugleich die häufigste Todesursache von Frauen im Alter von 50 - 60 Jahren¹. Die Mehrzahl der Mammakarzinome treten sporadisch auf. Nur bei einem geringen Anteil von circa 5 % der Mammakarzinompatientinnen ist eine Keimbahnmutation der Gene *BRCA1* und *BRCA2* (engl. *breast cancer 1* und *2*) Auslöser der Tumorentstehung². Charakteristisch für Krebserkrankungen wie dem Mammakarzinom ist die Entwicklung des Tumors durch einen mehrstufigen Prozess gekennzeichnet. Die Anhäufung von genetischen Mutationen sowie epigenetischen Veränderungen beeinflussen die Expression bestimmter Gene und verschaffen den Tumorzellen einen Selektionsvorteil³. So entsteht ein invasives Karzinom aus einer Hyperplasie oder einem *carcinoma in situ*⁴⁻⁶.

Die weibliche Brustdrüse unterliegt vielen kontrollierten und hormonell gesteuerten Veränderungen. Das wichtigste Hormon hierbei ist Östrogen. Unter der Wirkung von Östrogen kommt es in der Pubertät zur Aussprossung der Gangsysteme und zum Wachstum der Brust. Während jeder Schwangerschaft kommt es wiederum zu einer verstärkten Proliferation des Brustgewebes und der Vorbereitung der Brust auf die Laktation⁷. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass Östrogen und Östrogen-signalwege auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren in der Brust spielen⁸.

1.1.1 Östrogene

Östrogene sind weibliche Sexualhormone die zu der Klasse der Steroidhormone gehören. Die drei wichtigsten natürlichen Östrogene sind Östron, Östradiol und Östriol, wobei Östradiol der bedeutendste Vertreter der Östrogene ist. Sie werden durch Umwandlung der männlichen Sexualhormone (Androgene) durch das Enzym Aromatase gebildet. Vor dem Einsetzen der Menopause findet die Produktion der Östrogene hauptsächlich in den Follikeln und im Gelbkörper statt. Während der Schwangerschaft ist auch die Plazenta in der Lage,

Östrogene zu produzieren, wodurch die Serumkonzentration von Östradiol auf das 100-fache (bis 7000 pg/ml) der basalen Konzentration ansteigen kann⁹. Außerhalb des weiblichen Genitaltraktes werden Östrogene zu einem geringen Teil in der Nebenniere und im Fettgewebe gebildet. Als weibliches Sexualhormon bezieht sich die vorrangige Funktion von Östrogenen auf den weiblichen Reproduktionstrakt. Dazu gehören die Ausbildung der weiblichen sekundären Geschlechtscharakteristiken (Brust und Uterus), sowie die Reifung der Eizellen und die Durchblutung der Gebärmutter Schleimhaut. Darüber hinaus sind Östrogene auch für die Zusammensetzung des Gebärmutter Schleimsekrets und damit für die Durchlässigkeit der Spermien zur Eizelle verantwortlich.

Neben der Funktion als weibliches Geschlechtshormon haben Östrogene einen Einfluss auf die Knochendichte¹⁰, das Herz-Kreislauf-¹¹ sowie das Immunsystem¹² und spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklung, Diagnose, Prognose und Behandlung von Brustkrebs¹³ sowie anderen hormonsensitiven Tumoren¹⁴.

1.1.2 Molekulare Tumorklassifikation und adjuvante endokrine Brustkrebstherapien

Für die bestmögliche Therapie der Brustkrebspatientinnen ist eine Klassifizierung des Karzinoms anhand pathologischer Untersuchungen von Gewebeproben des Tumors und der anliegenden Lymphknoten von sehr großer Bedeutung. Dabei stellen neben der anatomischen TNM-Klassifikation, welche die Tumorgroße (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und eventuelle Fernmetastasen (M) beschreibt, auch die histologische und molekulare Tumorklassifikation für den Therapieerfolg wichtige Eigenschaften des Tumors dar. Die molekulare Brustkrebsklassifikation erfolgt anhand von Genexpressionsprofilen der Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor α (ER α) und Progesteronrezeptor (PR), sowie des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (HER2/neu, engl. *human epidermal growth factor receptor 2*). Nach der molekularen Klassifizierung von Perou und Kollegen lassen sich die Brusttumore vereinfacht in die drei molekularen Untergruppen luminal (ER α - und/oder PR-positiv), HER2/neu-positiv und basal-ähnlich oder triple-negativ (ER α -, PR- und HER2/neu-negativ) einteilen¹⁵. Etwa 70-80 % der invasiven duktaalen Mammakarzinome exprimieren ER α und/oder PR (luminal) und können dadurch mit adjuvanten endokrinen Therapien behandelt werden. In der Klinik gibt es für die adjuvante endokrine Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms drei Strategien.

Zum einen kommen dabei selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) zum Einsatz¹⁶. Diese Substanzen binden an ER und wirken abhängig vom Gewebetyp entweder als Östrogenagonisten oder -antagonisten. Der erste für die Behandlung des hormonabhängigen Mammakarzinoms zugelassene SERM war Tamoxifen¹⁷. Tamoxifen antagonisiert ER α im Brustgewebe und reduziert dadurch die Rückfallrate der Patientinnen um 40 – 50 %¹⁸. Nachteil der Therapie mit Tamoxifen ist eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation des Endometriums, welche in der Ausbildung von Endometriumkrebs resultieren kann¹⁹ und die Entwicklung von Tamoxifenresistenzen in 20 – 30 % der behandelten Patientinnen^{20,21}. Zum anderen können endokrinsensitive Mammakarzinompatientinnen mit Aromataseinhibitoren und Analoga des Gonadotropin-freisetzenden Hormons (GnRH, engl. *gonadotropin-releasing hormone*) behandelt werden. Aromataseinhibitoren reduzieren die Menge an zirkulierendem Östrogen durch Hemmung des für die Östrogenbiosynthese wichtigen Enzyms Aromatase und werden zur Behandlung von postmenopausalen Patientinnen genutzt²². GnRH-Analoga blockieren die Produktion der weiblichen Sexualhormone bereits auf der Regulationsebene²³.

Rund 15-20 % der Mammakarzinome weisen eine Überexpression von HER2/neu auf und werden daher als HER2-positiv bezeichnet. Diese Tumore können mit einer Anti-HER2-Therapie behandelt werden. Hierbei kommen monoklonale Anti-HER2-Antikörper (Trastuzumab), Inhibitoren der HER2 und HER3 Dimerisierung (Pertuzumab) und Tyrosinkinaseinhibitoren (Lapatinib) zum Einsatz. Rund die Hälfte der HER2-positiven Tumore ist auch ER α -positiv und kann zusätzlich von einer endokrinen Therapie profitieren. Für Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom (TNBC, engl. *triple-negative breast cancer*), das bei rund 15 % der Brustkrebspatientinnen diagnostiziert wird, ist bislang aufgrund der fehlenden Hormonrezeptoren noch keine molekulare Therapie verfügbar^{24,25}. Diesen Patientinnen bleibt momentan nur die ungerichtete zytotoxische Chemotherapie als Therapiemöglichkeit. Zudem sind triple-negative Tumore eine heterogene Mammakarzinomgruppe, die aus unterschiedlichen Tumorentitäten besteht²⁶. Sie gelten als besonders aggressiv und sind mit einer erhöhten Metastaserate, sowie einem schlechteren Überleben der Patientinnen verbunden²⁷. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zu neuen Therapieansätzen mit Östriol²⁸ oder Anti-Androgenen^{29,30} lassen jedoch auf neue Therapiemöglichkeiten hoffen.

1.2 Klassische Östrogenrezeptoren und Varianten

ERs gehören zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren und aktivieren als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen. Durch Bindung eines Liganden kommt es zur Aktivierung und Dimerisierung der Rezeptoren. Aktive Rezeptordimere binden an bestimmte hormonempfindliche DNA Abschnitte (ERE, engl. *estrogen response element*) in den Promotoren von hormonell regulierten Genen und aktivieren dadurch die Transkription dieser Gene. Diese Funktion der klassischen ERs wird als (langsame) genomische Signalübertragung bezeichnet. ERs sind auch in der Lage ohne eigene Bindung an DNA die Genexpression zu modifizieren. Durch Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1³¹ und SP-1³² induzieren sie die Expression AP-1 und SP-1 regulierter Gene. Ein Beispiel für die negative Genregulation durch ER ist die Bindung der Östrogen-aktivierten ER an den Transkriptionsfaktor NFκB (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), wodurch dieser nicht mehr an den Interleukin-6 Promotor binden kann^{33,34}. Neben den weit bekannten Funktionen als nukleäre Transkriptionsfaktoren und Aktivatoren anderer Transkriptoren fungieren klassische ERs auch außerhalb des Zellkerns^{35,36} und vermitteln Signale über die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR, engl. *epidermal growth factor receptor*)³⁷.

Der erste entdeckte ER war ERα^{38,39}. Erst rund 25 Jahre später wurde ein weiterer, zu ERα strukturell ähnlicher ER, mit dem Namen ERβ identifiziert⁴⁰. Durch unterschiedliches Spleißen sind darüber hinaus mehr als 20 verschiedene ERα Varianten, die sich bezüglich ihrer Reaktion auf Östrogen, Antiöstrogene und Östrogenentzug unterschiedlich verhalten, bekannt⁴¹. Als membrangebundener ER wurde eine 36 kDa große Spleißvariante (ERα36) des ERα beschrieben^{42,43}. Neben der Aktivierung nicht-genomischer Signalkaskaden, ist ERα36 in der Lage auch als dominant negativer Inhibitor der Transkriptionsaktivität von ERα und ERβ zu agieren⁴⁴.

1.3 Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor

Obwohl eine Vielzahl verschiedener Wirkungsmechanismen und Varianten der klassischen ERs beschrieben wurden, lassen sich nicht alle Östrogen-induzierten Effekte anhand dieser Mechanismen erklären. Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER, engl. *G-protein coupled estrogen receptor*) gehört zu der großen Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs, engl. *G-protein coupled receptors*) und unterscheidet sich strukturell und funktional von den klassischen nukleären Östrogenrezeptoren. Er wurde bereits Mitte der 90er Jahre zeitgleich von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zellsystemen entdeckt und kloniert. Carmeci und Kollegen fanden GPER in ER-positiven Brustkrebszellen⁴⁵. Andere Arbeitsgruppen identifizierten GPER in humanen Endothelzellen⁴⁶ und in B-Lymphozyten⁴⁷ sowie in Lungen- und Herzzellen⁴⁸. Da potentielle Rezeptorliganden zu der Zeit jedoch noch nicht bekannt waren, erhielt der Rezeptor die Bezeichnung G-Protein gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30). Erst nach der Identifizierung von Östrogen als GPR30 Agonist etablierte sich 2007 der Name G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor, kurz GPER⁴⁹⁻⁵². Die *GPER* Gensequenz (Chromosom 7p22.3) besteht aus drei Exons, wobei das dritte Exon die Proteinsequenz (375 Aminosäuren) für den rund 41 kDa schweren Rezeptor kodiert⁵³.

GPER spielt eine Rolle in nahezu allen Organsystemen des menschlichen Körpers⁵⁴. Wichtige GPER Funktionen für das Immunsystem^{55,56}, Nerven-⁵⁷ und Herz-Kreislaufsystem^{58,59} sowie für das endokrine^{60,61} und reproduktive System⁶² konnten bereits beschrieben werden. Darüber hinaus wurde die Expression von GPER in verschiedenen Tumorzelllinien und bösartigen Tumoren, wie dem Mammakarzinom^{49,52,63}, Endometrium-^{64,65} und Ovarialkarzinom^{66,67} sowie in Schilddrüsen-⁶⁸, Lungen-⁶⁹ und Prostatakrebs⁷⁰ gezeigt.

1.3.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

GPCRs stellen mit über 800 Mitgliedern die größte und heterogenste Familie der membrangebundenen Signalmoleküle dar. Mehr als 2 % des gesamten proteinkodierenden humanen Genoms enthalten Sequenzinformationen der einzelnen Rezeptoren. Die klassische Struktur der GPCRs beinhaltet eine meist extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, sieben membrandurchspannende α -Helix-Domänen, die abwechselnd durch intrazelluläre

und extrazelluläre Schleifen verbunden sind, und ein intrazellulär gekoppeltes heterotrimeres Guanosin triphosphat (GTP) -bindendes-Protein (G-Protein). Aufgrund der charakteristischen sieben Transmembranhelices haben GPCRs auch den beiläufigen Namen 7-Transmembranrezeptoren (7TMR). Die drei Untereinheiten der intrazellulär an 7TMR gebundenen G-Proteine werden als α -, β - und γ -Untereinheiten bezeichnet. Durch verschiedene α -Untereinheiten und eine Vielzahl von zellulären Effektormolekülen und sekundären Botenstoffen (engl. *second messengers*), die an G-Proteine assoziiert sein können, bestimmt das gebundene G-Protein maßgeblich das intrazelluläre Signal des jeweiligen GPCRs⁷¹. Das Prinzip der Rezeptoraktivierung ist jedoch bei allen GPCRs gleich: Nach Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch dieser als GTP-Austauschfaktor agiert und das an die α -Untereinheit des G-Proteins gebundene Guanosindiphosphat (GDP) gegen ein energiereicheres GTP austauscht. Durch Bindung von GTP wird das G-Protein aktiviert, ist in der Lage vom Rezeptor zu dissoziieren und intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren⁷². Vielfältige Liganden, wie Neurotransmitter, Hormone, Lipide, Geruchsstoffe und Licht können unterschiedliche GPCRs aktivieren, wodurch eine Vielzahl von biologischen Prozessen und Zellantworten wie Wachstum, Bewegung und Angiogenese in normalen Zellen und Tumorzellen reguliert werden⁷³. Wichtige intrazelluläre Signalwege der GPCRs sind die Aktivierung von Kinasen, das Öffnen von Ionenkanälen und die Freisetzung von sekundären Botenstoffen⁷⁴. Nach Ligandenbindung und Aktivierung erfolgt die Inaktivierung der Rezeptoren durch Internalisierung und Abbau der GPCRs nach Phosphorylierung durch GPCR Kinasen (GRKs) und Bindung an Arrestin⁷⁵.

Neben den vielen zellulären Funktionen wie Zellproliferation, Zellmobilität und dem Überleben der Zellen, kontrollieren GPCRs auch physiologische Funktionen wie zum Beispiel die Freisetzung von Hormonen und Enzymen, den Blutdruck sowie Herz - und Muskelkontraktion. So ist es wenig verwunderlich, dass rund 50 - 60 % der zurzeit angewendeten Medikamente direkt oder indirekt GPCRs als Ziel haben⁷⁶.

1.3.2 GPER Agonisten und Antagonisten

Neben den natürlichen Östrogenen bindet eine Vielzahl weiterer Liganden und synthetischer Östrogene an GPER. Viele dieser Substanzen binden auch an die klassischen Östrogenrezeptoren ER α und ER β . Östradiol (E₂), das vorherrschende humane Östrogen vor der Menopause ist ein positiver Aktivator aller drei Rezeptoren. Physiologische Konzentrationen des Östrogens Östron haben hingegen nur eine geringe Bindungsaffinität an die Rezeptoren^{51,52,77}. Im Gegensatz dazu konnte für Östriol bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich eine antagonistische Wirkung von GPER in sowohl ER-negativen SKBr-3⁷⁸ als auch triple-negativen Tumorzellen²⁸ gezeigt werden. Neben den körpereigenen Östrogenen sind lebende Organismen auch einer Vielzahl von natürlichen Östrogenen aus der Umwelt und künstlich hergestellten östrogenähnlichen Substanzen ausgesetzt. Natürliche Umweltöstrogene, wie Isoflavone und Coumestran, werden von Pflanzen (Phytoöstrogene) synthetisiert. Xenoöstrogene hingegen sind synthetisch hergestellte Substanzen, die sich in Pestiziden und Plastikwaren befinden können. Phytoöstrogene (z.B. Genistein) und Xenoöstrogene (z.B. Bisphenol A und Nonylphenol) zeigen bei den klassischen Östrogenrezeptoren sowie bei GPER ähnliche Bindungsaffinitäten⁷⁹, sind in der Lage diese zu aktivieren und dadurch physiologische Prozesse auszulösen^{80,81}. Sie werden aufgrund ihrer Wirkung auf das Hormonsystem auch als endokrine Disruptoren bezeichnet. Auch synthetisch erzeugte Medikamente der endokrinen Krebstherapie, wie das Antiöstrogen Fulvestrant, welches klassische ERs sowohl blockiert als auch zu einem Abbau der Rezeptoren führt⁸², bindet und aktiviert GPER^{49,52}. Neben diesen selektiven ER Antagonisten gibt es auch eine Gruppe von selektiven ER Modulatoren (SERMs). Diese Medikamente, wie Tamoxifen und Relaxifen aktivieren oder blockieren die klassische ERs abhängig vom Gewebetyp⁸³. GPER Signalwege werden durch die Bindung dieser beiden SERMs hingegen aktiviert^{52,84}, was einen möglichen Signalweg für die Entwicklung der Tamoxifenresistenz von Brusttumoren darstellt⁸⁵.

Der erste spezifische, synthetisch hergestellte GPER Agonist ohne Aktivität zu den klassischen ERs ist G-1 (1-[4-(6-bromobenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3a,4,5,9b-tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolin-8-yl]-ethanone)⁸⁶. Die Aktivierung von GPER mit G-1 erhöht die intrazelluläre Kalziumionen (Ca²⁺)-Freisetzung in GPER überexprimierten COS-7 Zellen,

aktiviert die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) in SKBr-3 und MCF-7 Brustkrebszellen und inhibiert deren Migration⁸⁶. Der Effekt von G-1 scheint jedoch abhängig vom Zelltyp zu sein. In vielen *in vitro* Studien ist G-1 in der Lage die Proliferation von Tumorzellen zu verstärken, was auf eine Rolle von GPER in der Tumorentstehung hindeutet^{49,64,66,85}. Andere Arbeitsgruppen berichten jedoch von einer antiproliferativen Wirkung von G-1^{70,87-89}. Neben G-1 als selektivem GPER Agonist wurden auch die spezifischen GPER Antagonisten G-15⁹⁰ und G-36⁹¹ beschrieben. Ein weiterer GPER Antagonist mit dem Namen MIBE, der sowohl GPER als auch klassische ERs blockiert, wurde ebenfalls charakterisiert⁹². Selektive GPER Agonisten und Antagonisten werden zur Untersuchung der GPER Bedeutung in verschiedenen Zellsystemen eingesetzt und stellen eine neue Therapiemöglichkeit für GPER abhängige Erkrankungen dar.

1.3.3 GPER Signalwege

Filardo und Kollegen zeigten im Jahr 2000 erstmalig die Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) ERK1/2 (engl. *extracellular signal regulated kinase 1/2*) durch Bindung von Östrogen an GPER. Des Weiteren konnte in der genannten Arbeit beschrieben werden, dass der GPER Signalweg über die Transaktivierung von EGFR, einem membranständigen Tyrosinkinase-Rezeptor, vermittelt wird⁴⁹. Über den Östrogen-vermittelten GPER/EGFR/ERK-Signalweg werden in Brustkrebszellen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie der Zinkfingertranskriptionsfaktor Egr-1 (engl. *early growth response protein 1*)⁹³, der Wachstumsfaktor für Bindegewebe CTGF (engl. *connective tissue growth factor*)⁹⁴ und der Hypoxie-induzierte Faktor 1 α (HIF1 α)⁹⁵, aktiviert. All diese Wachstumsfaktoren sind mit einem aggressiven Verlauf des Tumorgeschehens assoziiert⁹⁶. Eine umgekehrte Regulation der GPER Aktivität durch EGF und dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1 (IGF-1, engl. *insulin-like growth factor 1*) konnte ebenfalls gezeigt werden^{97,98}.

Des Weiteren konnten auch die durch die G α_s - Untereinheit von GPER vermittelte Freisetzung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Kalziumionen nachgewiesen werden^{50,51,86}. Neben der Aktivierung von MAPK können über den GPER-EGFR Stoffwechselweg auch Proteinkinase C (PKC)⁹⁹ und PI3K^{52,84} aktiviert werden. Ein weiterer Signalmechanismus von GPER ist die indirekte Inhibierung der cAMP Freisetzung durch Bildung eines Proteinkomplexes mit dem A-Kinase Ankerprotein 5 (AKAP5) und

membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs)¹⁰⁰. Neben der Aktivierung von schnellen Signalkaskaden ist GPER auch in der Lage die Expression von Genen, wie beispielsweise dem Apoptoseregulatorprotein Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma2*)¹⁰¹, dem Protoonkogen c-Fos⁸⁰ oder Egr-1⁹³, zu beeinflussen. Eine vereinfachte Übersicht der GPER Signalwege ist in Abb. 1 dargestellt.

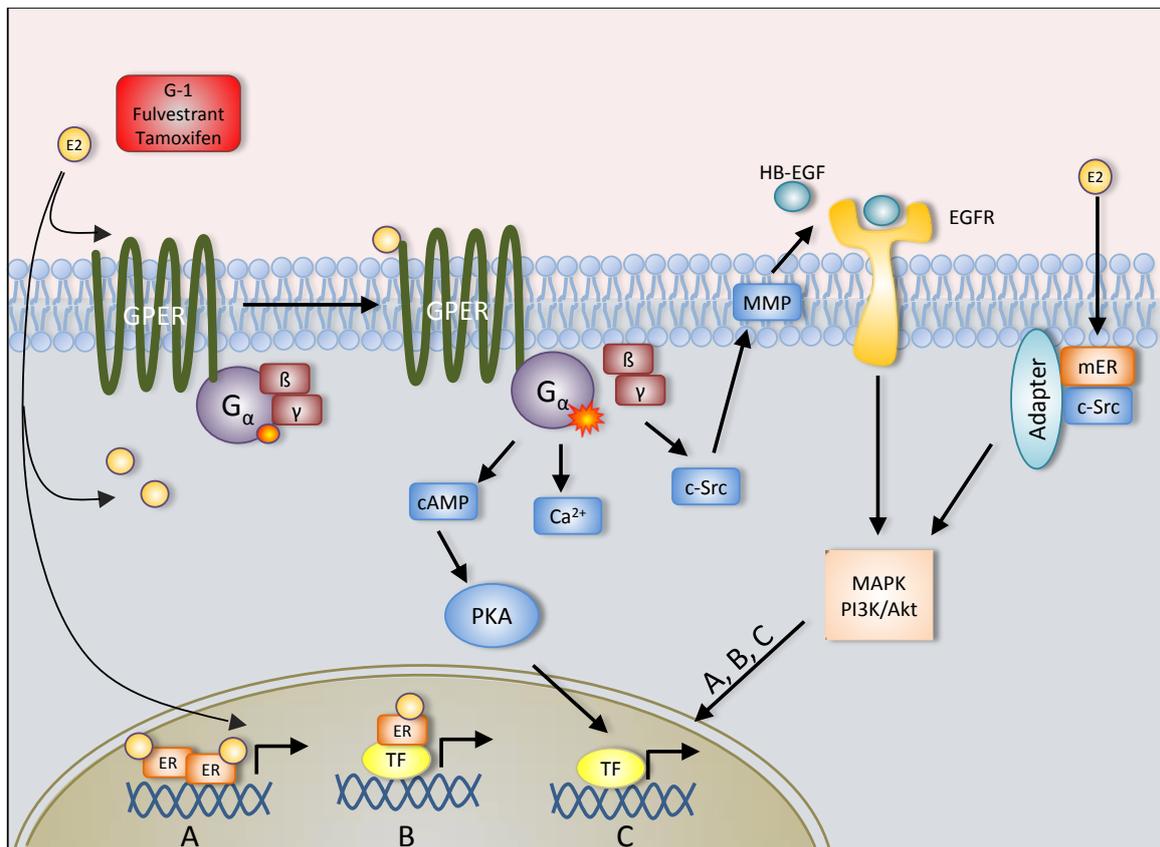


Abb. 1 GPER und ER Signalwege. Östrogene, wie Östradiol (E2) aktivieren den GPER und die klassischen nukleären, sowie membrangebundene ERs. Nach Aktivierung der nukleären ERs kommt es zur Rezeptordimerisierung und Bindung der Dimere an spezifische Promotorbereiche der DNA (A). Alternativ binden aktivierte ERs über Protein-Proteininteraktionen an andere Transkriptionsfaktoren (TF) (B). Membrangebundene ERs (mER) interagieren mit spezifischen Adapterproteinen (Adapter) und weiteren Signalmolekülen wie c-Src, wodurch es zu einer Aktivierung der MAPK und PI3K/Akt Signalwege kommt. GPER wird sowohl durch E2 als auch durch seinen spezifischen Agonisten G-1 und die Antiöstrogene Tamoxifen und Fulvestrant aktiviert. Ligandenbindung an GPER induziert die cAMP und Ca²⁺ Freisetzung über G_α. Proteinkinase A (PKA) Aktivierung durch cAMP resultiert in der Aktivierung weiterer TF (C). Die aktivierte G_{βγ}-Untereinheit des G-Proteins induziert die Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) über Matrix Metalloproteinasen (MMP) und Freisetzung des Heparin-gebundenen epidermalen Wachstumsfaktors (HB-EGF). Abbildung modifiziert nach Prossnitz und Barton, 2014⁹⁶.

1.3.4 GPER im Mammakarzinom

GPER wird in mehr als 50 % aller primären Mammakarzinome exprimiert^{63,102–107}. In der ersten Studie zur GPER Expression in Brusttumoren konnten Filardo und Kollegen einen Zusammenhang der GPER Expression in den Tumoren mit größeren Tumoren, höherer Metastaserate und einem schlechteren Überleben der Patienten nachweisen¹⁰². In einer weiteren großen klinischen Studie, in der 981 primäre Brustkarzinome auf ihre GPER Proteinexpression untersucht wurden, stellten Samartzis und Kollegen fest, dass biologische Eigenschaften der Tumore mit der Expression von GPER entweder im Zytoplasma (19,3 % der Tumore) oder im Nukleus (53,9 % der Tumore) korrelierten¹⁰⁷. Während die zytoplasmatische GPER Expression eher mit einem niedrigen Tumorgrad und moderater Differenzierung und ER- und PR-positiven Tumoren assoziiert war, korrelierte die GPER Proteinexpression im Zellkern mit undifferenzierten Tumoren und triple-negativem Rezeptorstatus. Einen besonderen Einfluss hat die GPER Expression auf die Resistenzbildung gegen Tamoxifen. Patienten mit GPER positiven Tumoren hatten mit Tamoxifen ein schlechteres Überleben als Patientinnen mit GPER Expression, die keine Tamoxifenbehandlung bekamen. Für diese Patientinnen war GPER sogar ein positiver Faktor für das Überleben¹⁰⁵. Mo und Kollegen bestätigten dieses Ergebnis und konnten zusätzlich zeigen, dass die Expression von GPER an der Zellmembran entscheidend für die Ausbildung der Tamoxifenresistenz ist¹⁰⁸. Damit übereinstimmend wurde von unserer und weiteren Arbeitsgruppen gezeigt, dass eine verminderte GPER Expression in den Mammatumoren einen negativen Einfluss für das Überleben der Patientinnen darstellt^{63,103,106}. Der Vergleich zwischen normalem Brust- und Tumorgewebe konnte zusätzlich eine verringerte GPER Proteinexpression in den Tumoren aufzeigen¹⁰⁶. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die GPER Expression im Ovarialkarzinom gezeigt¹⁰⁹. Kürzlich wurde GPER auch als potentieller Biomarker im TNBC beschrieben. Durch Ausschalten der GPER Expression in TNBC Zellen konnten Girgert und Kollegen eine verminderte *in vitro* Proliferation der Karzinomzellen zeigen^{28,110}.

Die Bedeutung von GPER bezüglich der Proliferation von Tumorzellen und der Entwicklung von Tumoren wird in zahlreichen *in vitro* Studien mit Tumorzelllinien unterschiedlicher Tumorarten kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite fördert die Stimulierung von GPER

durch verschiedene Liganden die Proliferation von Tumorzellen^{64,66,94}. Auf der anderen Seite inhibiert die spezifische Stimulation von GPER mit seinem Liganden G-1 und weiteren Liganden wie Progestinen die Proliferation und das Wachstum von Zellen in verschiedenen Zellkultursystemen^{70,87,88,111–113}.

1.4 Genetische und epigenetische Regulation

Jede Zelle eines mehrzelligen Organismus besitzt die gleiche genetische Erbinformation, jedoch existieren eine Vielzahl von verschiedenen Zell- und Gewebetypen mit sehr unterschiedlichem Aussehen und spezialisierten Funktionen (Phänotyp). Die Ursache für die Ausbildung verschiedener Zelltypen liegt in unterschiedlichen Genexpressionsmustern der Zellen. Die Genexpression umfasst dabei den gesamten mehrstufigen Prozess von der genetischen Erbinformation (DNA) bis hin zum funktionsfähigen Protein, welche an vielen Stellen reguliert und beeinflusst werden kann. Neben der Regulierung von Transkription und Translation, sowie alternativen Spleißvarianten der mRNA, spielen auch epigenetische Regulationsmechanismen eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und Aufrechterhaltung der Identität der Zellen. Zu den molekularen Mechanismen der epigenetischen Genregulation zählen Micro-RNAs (miRNAs), Modifikationen der Histone und die Methylierung der DNA. Wie genetische Veränderungen der DNA durch Mutationen und Veränderungen der Genregulation, können epigenetische Modifikationen zu abnormaler Aktivierung oder Inhibierung verschiedene Genprodukte und Signalwege führen und dadurch Krankheiten wie Krebs auslösen. Sie beruhen jedoch nicht auf einer veränderten Abfolge der DNA Sequenz, sondern vielmehr auf der Veränderung der Chromatinstruktur¹¹⁴.

1.5 DNA Methylierung

Die DNA Methylierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulierung der Genexpression und gehört zur Gruppe der epigenetischen Modifikationen der DNA. Biochemisch beschreibt sie die kovalente Bindung einer Methylgruppe (CH₃) an das fünfte Kohlenstoffatom (⁵C) des Pyrimidinrings der Nukleinbase Cytosin, welche von DNA Methyltransferasen (DNMT) katalysiert wird¹¹⁵. Während DNMT 3A und 3B neue Methylierungen (*de novo*

Methylierungen) katalysieren, ergänzt DNMT 1 die Methylierungen an hemimethylierter DNA und sorgt so für die Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster nach Zellteilungen. Durch eine DNA Methylierung kommt es zur Inaktivierung der Expression des betreffenden DNA Abschnitts, da die direkte Bindung von spezifischen Transkriptionsfaktoren an die DNA verhindert wird¹¹⁶. Zusätzlich ermöglichen DNA Methylierungen die Bindung spezifischer Transkriptionsrepressoren¹¹⁷. Eine notwendige Voraussetzung für die DNA Methylierung ist die 5' Position des Cytosins (C) zum Guanin (G), sogenannte CpG (Cytosin-phosphadityl-Guanin) Motive¹¹⁸. In normalen Zellen findet die Methylierung vorrangig in CpG-armen DNA Abschnitten statt¹¹⁹. Diese befinden sich mehrheitlich in LINE - (engl. *long interspersed transposable elements*) und SINE - (engl. *short interspersed nuclear elements*) Retrotransposon-Elementen, sowie in Satellitensequenzen. DNA Methylierungen in diesen DNA Bereichen dienen der Stabilisierung des Chromatins. DNA Sequenzbereiche mit einem erhöhten CG Gehalt von mindestens 50 % und einer Länge von 500 – 5000 Basenpaaren (bp) können als CpG Inseln bezeichnet werden^{120,121}. Rund die Hälfte aller Gene besitzt CpG Inseln in ihren regulatorischen Promotorbereichen¹²². CpG Inseln bleiben im Gegensatz zu den global verteilten CpG Motiven meist unmethyliert. Ausnahmen stellen hierbei die Anhäufung von Methylierungen der CpG Inseln in regulatorischen DNA Abschnitten von inaktiven elterlich geprägten Genen (*imprinted genes*)^{123,124} und Genen auf dem inaktivierten weiblichen X-Chromosom^{125,126} dar.

Da es in malignen Zellen häufig zu abweichenden Methylierungsmustern kommt, diese reversibel, vererbbar und oft bereits sehr früh in der Tumorentwicklung stattfinden, hat die DNA Methylierung eine besondere Bedeutung für die Diagnostik und Behandlung von Tumoren¹²⁷. Dabei tragen sowohl globale Hypomethylierungen des Genoms als auch lokale Hypermethylierungen der CpG Inseln zur Entartung der Tumorzellen bei^{128,129}.

Viele Tumorsuppressorgene werden durch Hypermethylierung ihrer regulatorischen DNA Sequenzen inaktiviert¹³⁰⁻¹³². Tumorsuppressorgene gehören wie auch Onkogene zu den Tumorgenen. Diese Gene kontrollieren Zellteilung, Zelldifferenzierung, sowie den Zelltod und unterstützen bei einer veränderten Expression oder Funktion die Umwandlung einer gesunden Körperzelle in eine sich unbegrenzt teilende Tumorzelle. Während Onkogene durch Aktivierung ihrer „harmlosen“ zellulären Vorstufen (Protoonkogene) die Proliferation

der Zelle fördern, hemmen aktive Tumorsuppressoren die Zellteilung. Erst durch einen Funktionsverlust beider Allele infolge von Mutationen oder einer verringerten Expressionsrate kommt es bei Tumorsuppressorgenen zu einem malignen Phänotyp¹¹⁵. Auch bei Brustkrebspatientinnen führt die Hypermethylierung zum Expressionsverlust einer Vielzahl von Genen wie zum Beispiel *ERα*, *PR*, *BRCA1* und *E-Cadherin*^{133–137}.

Azacytidin (5-azacytidin) und Decitabin (5-Aza-2'-desoxycytidin) sind Nukleosidanaloga und wirken als Inhibitoren der DNMT 1¹³⁸. DNMT 1 erkennt das in die DNA inkorporierte Cytosin analog als natürliches Substrat, bindet es irreversibel und wird daraufhin inaktiviert und abgebaut¹³⁹. Für die Behandlung hämatologischer Erkrankungen wie dem myelodysplastischen Syndrom und akuter myeloischer Leukämie (AML) sind Azacytidin und Decitabin bereits zugelassen¹⁴⁰ und haben einen positiven Effekt auf das Überleben der Patienten^{141,142}. Die Behandlung solider Tumore mit DNMT Inhibitoren ist momentan noch nicht möglich, da zu hohe und damit toxische Konzentrationen Decitabin nötig wären, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen. Für die Zukunft vorstellbar wäre jedoch eine Kombinationstherapie aus DNMT Inhibitoren und anderen Antitumormedikamenten.

1.6 Zellzyklus

Tumorzellen unterscheiden sich von Normalzellen durch einige typische Eigenschaften^{143,144}. Zu diesen wesentlichen Merkmalen zählt dabei auch die Fähigkeit, sich unbegrenzt zu teilen. Neben dem Verlust der Apoptose und einer veränderten Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren und Signalen, ist auch eine entartete Regulation des normalen Zellzyklus eine Ursache für deutlich erhöhte Proliferationsraten.

Der Zellzyklus beschreibt den Verlauf der Zellen zwischen zwei Zellteilungen und kann in genau definierte Zyklusphasen, nämlich der Mitosephase (M-Phase), der DNA-Synthesephase (S-Phase) und den beiden, die S-Phase umrahmenden „Lücken-Phasen“, G₁- und G₂, eingeteilt werden (Abb. 2A). Während in der G₁- und G₂-Phase unter anderem Proteine und Lipide synthetisiert werden, findet in der Mitose die Aufteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen und ihre Trennung (Zytokinese) statt. Dabei wird die Mitose weiterhin in die Prophase, Promethaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase

unterteilt. In der Prophase kondensiert das Chromatin, wodurch die Chromosomen sichtbar werden. Die beiden Zentriolen wandern zu den entgegengesetzten Zellpolen und bilden das Zentrum der ersten sich aufbauenden Mikrotubuli. In der Prometaphase löst sich die Kernmembran auf und Spindelfasern wandern von den Zellpolen zu den Chromosomen. Durch Bindung der Spindelfasern an die Kinetochore der Chromosomen ordnen sich diese während der Metaphase in der Äquatorialebene an. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden durch den Spindelapparat zu den zwei Zellpolen gezogen. Im letzten Schritt der Mitose, der Telophase, bilden sich zwei neue Kernmembranen und es erfolgt die Aufteilung der Zelle in zwei Tochterzellen ^{145,146}.

Zellen, die sich nicht mehr teilen befinden sich in der Ruhephase (G_0). Aus dieser können sie nach erneutem Proliferationssignal wieder in den Zellzyklus zurückkehren. Einmal in die G_0 -Phase übergegangen, verbleiben die Zellen jedoch meist in der G_0 -Phase und kehren nicht zurück in den Zellzyklus. Sie sind ausdifferenziert und führen ihre bestimmte Funktion bis zum Zelltod aus. Ein Stoppen des Zellzyklus ist nur an genau definierten Kontrollpunkten möglich. Hier werden bestimmte Voraussetzungen für den Übergang in die nächste Zyklusphase überprüft. Die drei wichtigen Kontrollpunkte liegen am Ende der G_1 -Phase, sowie am Übergang der G_2 -Phase zur Mitosephase und zwischen der Meta- und der Anaphase der Mitose ¹¹⁵. Der G_1 -Kontrollpunkt wird auch als Restriktionspunkt bezeichnet und stellt eine Art Startpunkt der Zellteilung dar. Hier kontrolliert die Zelle, ob alle äußeren und inneren Signale (Größe der Zelle und Platz zu benachbarten Zellen, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren sowie DNA-Integrität) für eine Zellteilung gegeben sind, bevor die DNA in der S-Phase repliziert wird. Am G_2 -Kontrollpunkt wird die vollständige und fehlerfreie DNA-Replikation überprüft. Der dritte Kontrollpunkt wird auch als Spindelkontrollpunkt bezeichnet. Hier wird überprüft, ob alle Kinetochore der Schwesterchromatiden mit Spindelfasern verbunden sind.

Kontrolliert und gesteuert wird der Zellzyklus durch verschiedene Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, engl. *cyclin dependend kinases*). Cycline sind Proteine, die selber keine enzymatische Aktivität besitzen. Jedoch aktivieren sie durch Bindung an CDKs und Bildung eines Cyclin-CDK-Heterodimers die Kinaseaktivität der CDKs. Diese sind daraufhin in der Lage Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die für den Übergang in die nächste

Zellzyklusphase verantwortlich sind, durch Phosphorylierung zu aktivieren^{147,148}. Neben der Bildung von Cyclin-CDK-Komplexen unterliegt die enzymatische Aktivität weiteren regulatorischen Mechanismen. Aktive Cyclin-CDK-Komplexe müssen in einem bestimmten Phosphorylierungszustand vorliegen und können durch Bindung von CDK-Inhibitoren in ihrer Aktivität gehemmt werden. Während die Proteinlevel der verschiedenen CDKs über den Zellzyklus relativ stabil bleiben, unterliegt die Aktivierung der Expression und der Abbau der Cycline einer starken Regulation durch wichtige mitogene Signalwege, wie dem MAPK- und dem WNT-Signalweg, wodurch abhängig von der jeweiligen Zellzyklusphase große Konzentrationsunterschiede der Cycline vorherrschen¹⁴⁹. Das Expressionslevel der unterschiedlichen Cycline ist in Abb. 2B dargestellt. Aufgrund ihrer Wichtigkeit für den Ablauf des Zellzyklus sind Cycline und CDKs in Tumoren häufig überexprimiert.

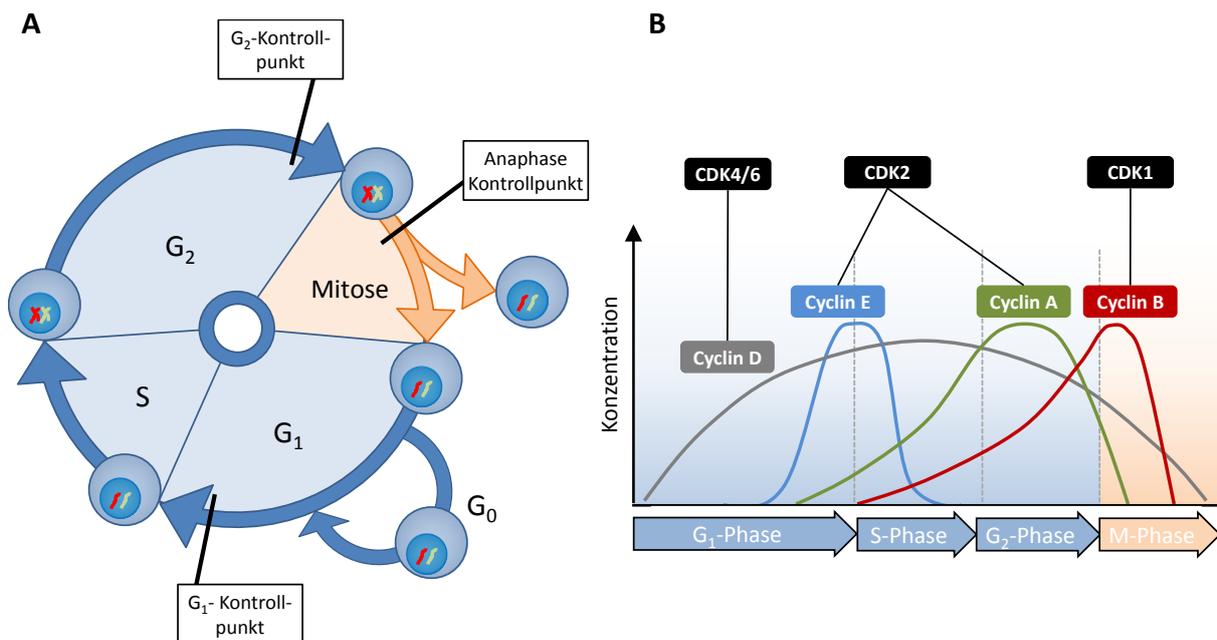


Abb. 2 Übersicht der Zellzyklusphasen und Konzentration der Cycline im Verlauf des Zellzyklus. (A) Dargestellt sind die Zellzyklusphasen Mitose, DNA-Synthesephase (S) und die beiden „Lückenphasen“ G₁ und G₂ sowie der Zustand einer sich nicht teilenden Zelle mit normaler Zellfunktion (G₀). Zur Verdeutlichung der Anzahl der Chromosomen sind diese auch außerhalb der Mitosephase als kondensiert gezeigt. (B) Charakteristische Cyclinkonzentration während der Zellzyklusphasen und Bindung der einzelnen Cycline an spezifische Cyclin-abhängige Kinasen (CDK). (Abbildungen modifiziert nach Lodish (2001)¹⁵⁰ und Hohegger (2008)¹⁵¹)

1.7 Apoptose

Neben der Zellzyklusregulation spielt auch der programmierte Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle für die Transformation von Normalzellen in Tumorzellen. Die Apoptose ist ein wichtiger Prozess in jedem Organismus um entartete und überschüssige Zellen zu beseitigen (Homöostase) und spielt eine wichtige Rolle bei der Zell- und Organentwicklung^{152,153}. Der aktive „Selbstmord“ der Zellen wird durch Einflüsse von außen, wie Aktivierung durch Immunzellen (extrinsischer Weg) oder durch innere Einflüsse, wie Fehler in der DNA (intrinsischer Weg), ausgelöst. Morphologisch und biochemisch sind apoptotische Zellen durch Zellschrumpfen, Bläschenbildung der Membran, DNA Fragmentierung, Umbau der Zellmembran und Zerfall der Zelle in Vesikel gekennzeichnet. Diese Vesikel werden von Phagozyten beseitigt. Im Gegensatz zur Nekrose, einem weiteren wichtigen Mechanismus des Zelltods, werden bei der Apoptose benachbarte Zellen und Gewebe nicht durch die sterbenden Zellen beeinflusst und geschädigt¹⁵⁴.

Schlüsselenzyme der Apoptose sind die Caspasen (Cysteinyln-Aspartasen), welche als inaktive Zymogene exprimiert werden und in der Apoptose kaskadenartig hintereinander geschaltet sind. Funktionell lassen sich die Caspasen in Initiator- und Effektorcaspasen einteilen. Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) aktivieren durch ihre proteolytischen Eigenschaften die inaktiven Vorstufen der Effektorcaspase zu ihren aktiven Formen. Die Effektorcaspase-3, -6 und -7 sind aktiv am Abbau des Zytoskeletts (Aktin) und der Kernmembran (Lamin) beteiligt. Caspase-3 ist dabei der wohl wichtigste Vertreter der Effektorcaspasen. Sie spielt als Finale Effektorcaspase sowohl bei dem extrinsischen als auch bei dem intrinsischen Caspaseweg eine Rolle und ist für den Abbau der meisten Substrate in der Apoptose verantwortlich¹⁵⁵. Beide Signalwege sind miteinander verbunden und beeinflussen sich gegenseitig über das Bcl-2 Protein Bid (engl. *BH3 interacting-domain death agonist*)¹⁵⁶.

Die Einleitung der Apoptose durch extrazelluläre Einflüsse (extrinsische Apoptose) wird über membranständige Todesrezeptoren vermittelt. Zu diesen Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptorfamilie gehören unter anderem der Fas-Rezeptor (CD95) und der TNF-Rezeptor 1. Durch Bindung von Todesliganden wie CD95L und TNF α , die sich auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen befinden, an die Todesrezeptoren, kommt es zur

intrazellulären Aktivierung der Rezeptor-Todesdomäne und anschließender Aktivierung der Initiatorcaspase-8, welche über die Caspasekaskade die Effektorcaspase-3 aktiviert und so die Apoptose herbeigeführt wird¹⁵⁷. Auslöser für die Aktivierung der Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg können neben DNA Schäden auch der Entzug von Wachstumsfaktoren oder osmotischer Stress sein. Intakte Zellen reagieren auf DNA Schäden mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53. Dieser wiederum löst die Transkription der pro-apoptischen Proteine Bad und Bax aus. Durch die Aktivierung des Multidomänenproteins Bax wird Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt. Parallel dazu löst sich der Apoptose-aktivierende Faktor (Apaf-1) von der Mitochondrienmembran. Cytochrom C, Apaf-1 und Caspase-9 bilden zusammen das Apoptosom, welches in der Lage ist, Caspase-3 zu aktivieren und den Tod der Zelle herbeizuführen¹⁵⁸. Der dritte Apoptosesignalweg wird durch eine Stressreaktion im endoplasmatischen Retikulum eingeleitet. Bei diesem Apoptoseweg spielt Caspase-12 eine zentrale Rolle^{159,160}.

Neben den drei Caspase-abhängigen Apoptosesignalwegen gibt es auch einen Caspase-unabhängigen Apoptosewege, dessen zentrales Protein der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist^{161,162}. AIF wurde 1996 erstmals beschrieben¹⁶³. Drei Jahre später konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine, durch die Translokation des löslichen mitochondrialen Flavoproteins AIF in den Zellkern ausgelöste, Apoptosereaktion nachweisen¹⁶⁴. AIF ist unter anderem in der Lage die Kondensation und Fragmentierung der DNA sowie die Permeabilisierung der Mitochondrien auszulösen.

1.8 Zielstellung

Die kontroversen Forschungsergebnisse bezüglich der Bedeutung von GPER im Tumorgeschehen des Mammakarzinoms bildeten den Ausgangspunkt für die vorliegende Forschungsarbeit.

Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle von GPER als Tumorsuppressor im Mammakarzinom zu erforschen. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Gibt es einen Unterschied in der GPER Expression in unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien mit verschiedenem Hormon- und HER2-Rezeptorstatus?
- 2) Wie ist der Einfluss der spezifischen Aktivierung von GPER auf den Zellzyklus in diesen Zelllinien?
- 3) Ist *GPER* Expression durch eine epigenetische Modifikation *in vitro* reguliert?
- 4) Hat die eventuelle epigenetische Modifikation von GPER eine Relevanz für das Überleben der Patientinnen mit Mammakarzinom?

Die gewonnenen Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Klärung der Bedeutung des GPER im Mammakarzinom liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeine Laborausstattung

ABgene® PCR Platten	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>aqua ad injectabilia</i>	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Chromatografie Papier	Whatman, Dassel, Deutschland
Cryo 1 °C Freezing Container „Mr. Frosty“	Sigma, Steinheim, Deutschland
Cryovial® 2 ml	Simport, Beloeil, Kanada
Deckgläschen 24x40 mm; 24x50 mm; 24x60 mm	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Einbettkassette Kunststoff	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalspritze Omnifix-F 1 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegskalpell	Feather, Osaka, Japan
Eisbox	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Filterspitzen 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
flüssiger Stickstoff	Air Liquide, Biederitz, Deutschland
Glasmaterialien	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Immobilon™ Transfermembran	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
0,2 µm; 0,45 µm	
Kapillarpipetten	Servoprax®, Wesel, Deutschland
Microseal® 'B' Film	BioRad, München, Deutschland
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger mit Mattrand	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Objektträger für Zellkultur, 8-Kammer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Parafilm M	Neolab, Heidelberg, Deutschland
PCR Puffer 5x GoTaq	Promega, Mannheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Petrischalen 60x15mm; 100x20mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Puradisc Filter für Spritzen 0,2 µm	Whatman, Dassel, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Röhrchen 15 ml; 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Serologische Pipette Glas 5 ml; 10 ml; 25 ml	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Serologische Pipette Kunststoff 5 ml; 10 ml; 25 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Einwegspritzen 30 ml	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vernichtungsbeutel	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Wägepapier	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² ; 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten 6-, 12-, 96-Loch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zubehör für Western Blot	PeqLab, Erlangen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

2-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (30%)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Agarose für Gele	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Amersham Full-Range Rainbow Maker	GE Healthcare, Berlin, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Azeton (C ₆ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform (CHCl ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
DAPI-Eindeckelmedium (Vectashield)	Vector, Burlingame, CA, USA
Di-Methyl-Sulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Doppelt-destilliertes Wasser	Braun, Melsungen, Deutschland
Essigsäure (CH_3COOH)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol 100 Vol-% ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	Otto Fischer, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	BD, Heidelberg, Deutschland
Fluorescein	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
G-1	Sigma, Steinheim, Deutschland
G-15	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Hämatoxylin (nach Meyer)	Fluka, Steinheim, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Immersionsöl 518F Immersol TM	Zeiss, Jena, Deutschland
Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Methanol (CH_3OH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
M-MLV RT 5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim, Deutschland
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid)	Sigma, Steinheim, Deutschland

Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriummetavanadate (NaO ₃ V)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumpyruvat (C ₆ H ₅ NaO ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Nonidet P-40 (Igepal CA-630)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Colbe, Deutschland
Propidiumiodid (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Proteinmarker Rainbow Marker	GE Healthcare, München, Deutschland
Proteinmarker, biotinyliert	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Rockfort, USA
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris Base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCL)	Sigma, Steinheim, Deutschland
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blau-Lösung	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30%) (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Enzyme, Nukleinsäuren und biologisch aktive Substanzen

Aktivkohle behandeltes fötales Kälberserum	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
DNase für cDNA Synthese	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

dNTPs für cDNA Synthese	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
dNTPs für PCR	Promega, Mannheim, Deutschland
Fötale Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Lipofectamine 2000	Life, Technologies, Darmstadt, Deutschland
Methylierte/ nicht methylierte Standard DNA	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, Deutschland
Oligo-Desoxy-Thymidin-Nukleotide (odTs)	Promega, Mannheim, Deutschland
Penicillin 10000 U/mL / Streptomycin 10 mg/mL	Biochrom, Berlin, Deutschland
Polymerase GoTaq	Promega, Mannheim, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (PhoStop)	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio Rad, München, Deutschland
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNase A	Sigma, Steinheim, Deutschland
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim, Deutschland
siRNA: GPER (60743), p53 (29435), Kontrolle A (37007)	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
SYBR Green I Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
5 % Trypsin/EDTA 10x	Life Technologies, Darmstadt Deutschland

2.1.4 Kits

Proteinassay (Bradford)	BioRad, München, Deutschland
Chemilumineszenz Peroxidase Substrat	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
CpGenome™ DNA Modification Kit	Chemicon, Temecula, CA, USA
DNA Isolationskit NucleoSpin®	Machery-Nagel, Düren, Deutschland
FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit	BD, Heidelberg, Deutschland
DAB Detection Kit	Ventana, Unterhaching, Deutschland

2.1.5 Laborgeräte

Analysenwaage CPA225D	Sartorius, Berlin, Deutschland
Chemilumineszenzgerät GeneGnome5	Syngene, Cambridge, UK
CO ₂ -Inkubator HERACELL 240	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
CO ₂ -Inkubator NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegler, Isernhagen, Deutschland
Elektrophoresesystem (horizontal, für Agarosegele)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
FACS Calibur™	BD, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank Liebherr FKEX 3600	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlschrank Liebherr KTP 1810-20	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Laboklav 80-V	SHP Steriltechnik, Magdeburg, Deutschland
Magnetrührer RH Basic 2	Windaus-Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axio Observer A1	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Minishaker MS 3 Basic	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sulzetal, Deutschland
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multifunktionsplattenlesegerät Synergy HT	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
NexES Färbemodul	Ventana, Unterhaching, Deutschland
pH-Meter	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Power Supply	Peqlab Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage LA 620	Sartorius, Berlin, Deutschland
Real-Time PCR Detection System iQ5	BioRad, München, Deutschland
Reinigungs- und Desinfektionsautomat	Omnilab, Bremen, Deutschland
Röntgentherapiegerät D3225	Gulmay, Byfleet, Surrey, UK
Schüttelwasserbad SWB25	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Sicherheitswerkbank Nu-437-400E	NuAire, Plymouth, MN, USA

Trockenschrank	Novodirect, Kehl, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank MDF-U53V	Laborfachhandel Gaudig GbR, Sulzetal, Deutschland
Ultraschallhomogenisator	Bandelin, Berlin, Deutschland
UV Transilluminator Imaging System	UVP, Upland, CA, USA
Vakuumpumpe für Zellkultur	IBS Integra, Biebertal, Deutschland
Vortexer	IKA, Staufen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage Elix10	MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland
Western Blot Apparatur	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Wippchütteler PMR30	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Biofuge	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

2.1.6 Computerprogramme

AxioVision Rel. 4.6	Zeiss Microimaging, Göttingen, Deutschland
Cell Quest Pro 4.bf4b	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gen 5 TM Data Analysis Software	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	Statcon, Witzenhausen, Deutschland
Image J	National Institute of Health (NIH), USA
iQ5 Software	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Excel 2007 und 2010	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2007 und 2010	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
Microsoft Word 2007 und 2010	Microsoft Deutschland, Berlin, Deutschland
SPSS Version 22.0	SPSS, Chicago, IL, USA

2.1.7 Zellkulturmedien

DMEM/F12 (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
DMEM/F12 Phenolrot-frei	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

Opti-MEM

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Zellkulturmedium

DMEM/F12 (1:1)

+ 10 % FBS

+ 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml

Streptomycin

Hormonreduziertes Kulturmedium

Phenolrot freies DMEM/F12 (1:1)

+ 10 % Aktivkohle-behandeltes FBS

+ 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml

Streptomycin

+ 15 mM HEPES

Einfrriermedium

FBS +10 % DMSO

2.1.8 Angefertigte Lösungen und Puffer

MTT Solution:

5 mg/ml MTT in PBS (sterilfiltriert)

MTT Solvent

4 mM HCl,
0,1 % Nonidet P-40
in 2-Propanol

Protein Lyse Puffer Stock pH 6,8

4 M Urea
0,5 % SDS
62,2 mM Tris

PBS (10x) pH 7,4

1,37 M NaCl
100 mM Na₂HPO₄
27 mM KCl
18 mM KH₂PO₄

TBS (10x) pH 7,6

0,5 M Tris
1,5 M NaCl

FACS-Puffer

1 x PBS
1 % BSA
0,1 % NaN₃

Lösungen für SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot

APS	1 g APS in 1 ml destilliertem Wasser (10 % (w/v))
SDS Lade Puffer (5x) pH 6,8	15 % 2-Mercaptoethanol 6 % SDS 60 % Glycerol 0,006 % Bromphenolblau 0,18 M Tris
Elektroden Puffer (10x)	0,25 M Tris Base 1,92 M Glycin 1 % SDS 10 g
TAE-Puffer (50x) pH 8,0 (Tris-Acetat-Essigsäure Puffer)	0,5 M EDTA 1 M Essigsäure 2 M Tris
TE-Puffer (10x) pH 8,0 (Tris-EDTA Puffer)	10 mM EDTA 100 mM Tris
Transfer Puffer (10x)	0,25 M Tris Base 1,92 M Glycin
Transfer Puffer (1x)	20 % Methanol in 1xTransferpuffer
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in TBS
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in Waschpuffer

2.1.9 Zelllinien

Für die *in vitro* Experimente wurden vier verschiedene humane Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-213 und MDA-MB-468) und eine humane Nierenzelllinie (HEK293) verwendet. Jede Karzinomzelllinie steht für ein bestimmtes molekulares Brustkrebsmodell, was sich durch unterschiedliche Expression von Hormon- und Wachstumsfaktorrezeptoren zeigt. Alle vier Zelllinien stammen ursprünglich aus Patientinnen mit Mammakarzinom und gelten heute als Standardzelllinien. Sie wurden von der CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland bezogen. Als Kontrollzelllinie ohne GPER Expression wurde die

Nierenzelllinie HEK293 in Kooperation mit der Regensburger Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie unter Prof. Oliver Treeck genutzt.

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7¹⁶⁵ wird aufgrund der Expression der Hormonrezeptoren ER α und PR auf molekularer Ebene als „Luminal-A“ bezeichnet. Darüber hinaus besitzen MCF-7 Zellen keine funktionsfähige Caspase-3¹⁶⁶. Die Zelllinie SKBr-3 wird durch eine fehlende Expression von ER α und PR, sowie einer Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu charakterisiert und als „HER2-positive“ Zelllinie klassifiziert. Bei den beiden triple-negativen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 fehlen sowohl ER α als auch PR und HER2/neu. Während MDA-MB-468¹⁶⁷ dem basal-ähnlichen (engl.: *basal-like*) Tumortyp zuzuordnen sind, zählen MDA-MB-231¹⁶⁸ zu den Claudin-niedrigen (engl.: *claudin-low*) Mammakarzinomen. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Charakterisierung von Tumoren ist die Funktionalität des Tumorsuppressors p53. Nur in den MCF-7 Zellen ist die p53 Gensequenz noch intakt. In den Zelllinien SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 ist p53 durch unterschiedliche Mutationen auf der DNA Ebene funktionsunfähig¹⁶⁹.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten humanen Karzinomzelllinien.

Zelllinie	Subtyp	ER α	PR	HER2	Ref.	Medium (+10 % FBS, 1x P/S)	# CLS
MCF-7	luminal A	+	+	-	165,170,171	DMEM/F12	300273
SKBr-3	HER2/neu -positiv	-	-	+	170,171	DMEM/F12	300333
MDA-MB-231	triple-negativ	-	-	-	170-172	DMEM/F12	300275
MDA-MB-468	triple-negativ	-	-	-	171,172	DMEM/F12	300279

2.1.10 Antikörper**Tab. 2 Antikörperliste mit verwendeter Verdünnung**

Antikörper	Molekulargewicht	Verdünnung	Firma
Anti- GPER, K19	40 kDa	1:500 in TBST + 5 % BSA	Santa Cruz Heidelberg, Deutschland
Anti-AIF	inaktiv 67 kDa aktiv 57 kDa	1:1000 in TBST + 5 % BSA	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-β-Aktin	42 kDa	1:10000 in TBST + 5 % BSA	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Cdc2	34 kDa	1:1000 in TBST + 5 % BSA	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-CyclinB1	55 kDa	1:1000 in TBST + 5 % BSA	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-Caspase-3	Procaspase-3 29 kDa aktiv 12 kDa	1:1000 in TBST + 5 % milk	Abcam Cambridge, UK
Anti-phospho- Histon H3 (Ser10)	17 kDa	1:1000 in TBST + 5 % BSA	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-p53 (AB-6)	53 kDa	1:1000 in TBST + 5 % BSA	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Anti-Maus-HRP	Sekundär AK	1:1000 in TBST + 5 % milk	Thermo Fischer Scientific, Dreireich, Deutschland
Anti-Kaninchen- HRP	Sekundär AK	1:1000 in TBST + 5 % milk	Thermo Fischer Scientific, Dreireich, Deutschland
Anti-Biotin, HRP- gekoppelter AK	Sekundär AK	1:5000 in TBST + 5 % milk	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-GPER, N-15	Primär AK Immunfluoreszenz	1:200 in PBS + 2,5 % FBS	Santa Cruz Heidelberg, Deutschland
Anti-Kaninchen- FITC	Sekundär AK Immunfluoreszenz	1:200 in PBS + 2,5 % FBS	Thermo Fischer Scientific, Dreireich, Deutschland
Anti-GPER-1	Primär AK Immunhistochemie	1:500 in PBS + 2,5 % FBS	Acris, Herford, Deutschland

2.1.11 Primer

Tab. 3 Verwendete Primer für die PCR

Primer	Sequenz
GPER	vorwärts 5'-AGT CGG ATG TGA GGT TCA G-3'
	rückwärts 5'-TCT GTG TGA GGA GTG CAA G-3'
GPER_UM	vorwärts 5'-GTT TGT ATG AGA TTG TGA AAT TTG T-3'
	rückwärts 5'-ACT AAA AAT ACA CTT AAA ACC CAC T-3'
GPER_M	vorwärts 5'-TTT GTA CGA GAT TGT GAA ATT CGT-3'
	rückwärts 5'-ACT AAA AAT ACA CTT AAA ACC CGC T-3'
β-Aktin	vorwärts 5'-GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC-3'
	rückwärts 5'-ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC-3'

Alle Primer wurden bei Metabion, Martinsried, Deutschland bezogen.

2.1.12 Patientenproben

Für die Untersuchung der GPER Promotormethylierung und GPER Proteinexpression wurden Tumorproben von 260 Brustkrebspatientinnen analysiert. Alle Frauen waren zwischen 2001 und 2012 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg (OvGU). Einschlusskriterien für die Untersuchungen war ein primäres operables Mammakarzinom, ohne vorherige Chemotherapie oder andere Krebserkrankungen. Die Patientenverfolgung (*Follow-up*) begann mit dem Tag der Brustkrebsdiagnose und endete mit dem Tod der Patientin oder der letzten verfügbaren Information in der Datenbank der OvGU. Der Zeitraum der Patientenbeobachtung endete am 31.05.2015. Es konnte ein Median von 50,4 (Bereich 1 – 158 Monate) Monaten für die Follow-up Zeit erreicht werden. Die Patientencharakteristiken sind in Tab. 4 dargestellt. Die für die DNA Isolierung genutzten Tumorschnitte wurden für die Diagnostik der Patientinnen nicht mehr benötigt und pseudonymisiert behandelt. Somit stehen sie nach §16 Abs. 5 der Allgemeinen Vertragsbedingungen (AVBs) der OvGU und Rücksprache mit einem Mitglied der Ethikkommission für eine rein retrospektive Untersuchung zur Verfügung (AVBs der OvGU, Stand 13.08.2009; Dtsch Ärztebl. 2003; 100:A 1632).

Tab. 4 Tumorcharakterisierung der analysierten Brustkrebspatientinnen

Tumorcharakteristik	N	%
Total	260	100
Alter (Bereich)	62 (30-96)	
Tumorgröße		
≤ 2 cm	137	52,7
> 2 cm	94	36,2
unbekannt	29	11,2
Lymphknotenstatus		
negativ	162	62,3
positiv	79	30,4
unbekannt	19	7,3
Histologische Einteilung		
duktal	61	23,5
lobulär	15	5,8
andere	4	1,5
unbekannt	180	69,2
Histologischer Grad		
1	29	11,2
2	117	45,0
3	105	40,4
unbekannt	9	3,5
ER Status		
negativ	106	40,8
positiv	142	54,6
unbekannt	12	4,6
PR Status		
negativ	134	51,5
positiv	114	43,8
unbekannt	12	4,6
HER2/neu Status		
negativ	204	78,5
positiv	42	16,2
unbekannt	14	5,4
Operation		
ohne	11	4,2
Brust erhaltend	130	50,0
Mastektomie	103	39,6
unbekannt	16	6,2
Bestrahlung		
nein	72	27,7
ja	181	69,7
unbekannt	7	2,7

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Trypsinieren von Zellen

Das Passagieren der adhärennten humanen Zelllinien erfolgte unter Ausnutzung der Proteaseaktivität der Trypsin/EDTA Lösung. Dafür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von rund 80 % kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums und einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS zur Beseitigung noch vorhandener Mediumrückstände, wurden 10 ml einer 0,05 % igen Trypsin-EDTA Lösung auf die Zellen gegeben. Nach drei Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an der Kulturflasche gelöst (Kontrolle unter dem Mikroskop, gegebenenfalls noch 1 Minute (min) inkubieren) und die Trypsin/EDTA Lösung mit 10 ml Kulturmedium inaktiviert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 1 ml Zellkulturmedium und Weiterkultivierung der Zellen mit geeignetem Verdünnungsfaktor.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die adhärennten Zellen nach dem Trypsinieren in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Eine Probe von 10 µl Zellsuspension wurde 1:2 - 1:100 mit Trypan-Blau verdünnt. Da nur tote Zellen wegen ihrer defekten Zellmembran den blauen Farbstoff aufnehmen, dient Trypan-Blau unter dem Lichtmikroskop zur Unterscheidung der lebenden und toten Zellen. Es wurden je 10 µl der mit Trypan-Blau verdünnten Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer hinein pipettiert. Aufgrund der Beschaffenheit der Zählkammer (ein Eckquadrat besitzt eine Fläche von 1 mm² und eine Höhe von 0,1 mm) ist es möglich anhand der gezählten Zellen in den vier Eckquadraten die Zellzahl der Ausgangszellsuspension zu bestimmen. Hierfür wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l} = \frac{\# \text{ Zellen in 4 Eckquadraten}}{4} * 10 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen im flüssigen Stickstoff (Kryokonservierung)

Für die Langzeitlagerung wurden die Zelllinien im flüssigen Stickstoff bei -196 °C gelagert. Dafür wurden die Zellen nach dem Trypsinieren noch einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium (FBS + 10 % DMSO) aufgenommen und je 1×10^6 Zellen in ein Kryogefäß überführt. Um einen möglichst schonenden Einfrierprozess zu gewährleisten, wurden die Zellen vor der endgültigen Lagerung im Stickstoff für 24 Stunden (h) in einem speziellen Einfrierbehälter („Mr. Frosty“) bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4 Auftauen Kryo-konservierter Zellen

Um in Stickstoff gelagerte Zelle wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen rasch im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml warmem Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension der Zellen in neuem Kulturmedium, wurden die Zellen in eine frische Kulturflasche mit warmem Kulturmedium überführt.

2.2.2 Immunfluoreszenzmikroskopie für GPER

Die Immunfluoreszenzmikroskopie macht es möglich, Zielstrukturen und Moleküle mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern zu markieren und deren Lokalisation unter dem Fluoreszenzmikroskop zu detektieren. Für die Immunfluoreszenzfärbung von adhären wachsenden Zellen wurden diese in speziellen Zellkulturgefäßen mit einem Objektträger als Kulturuntergrund kultiviert (8-Kammer Objektträger (*chamber slides*), 1 Kammer = $0,8\text{ cm}^2$). Nach Erreichen einer Zelldichte von 50 - 60 %, wurde das Kulturmedium aus den Kammern entfernt und die Zellen für 20 min mit eiskaltem Methanol/Azeton (1:1) bei -20 °C fixiert. Zum Entfernen des Methanol/Azetongemisches folgten zwei Waschschrte mit PBS für 5 min bei RT, bevor die Zellen für weitere 5 min mit TBS + 0,05 % Tween permeabilisiert und anschließend alle freien Bindungsstellen mit 5 % FBS in PBS blockiert wurden. Der verwendete GPER Erstantikörper (GPER Klon N-15) wurde 1:200 in PBS mit 2,5 % FBS verdünnt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht (ü.N.) bei 4 °C in einer

Feuchtkammer. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS (5 min, RT), wurden die Zellen für 1 h bei RT mit dem fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper inkubiert, danach wiederum zweimal gewaschen und anschließend mit DAPI-Einfassungsmedium (4',6-Diamidin-2-phenylindol), zur Gegenfärbung der Zellkerne, eingedeckelt. Direkt im Anschluss erfolgte die Auswertung der Färbung am Fluoreszenzmikroskop. Zur Betrachtung der Präparate mit dem 100er Objektiv wurde zwischen Objektträger und Objektiv ein Tropfen Immersionsöl gegeben.

2.2.3 Zellviabilitätsmessung mittels MTT-Test

Der kolorimetrische MTT-Test ist eine Methode zur indirekten Bestimmung der Zellviabilität¹⁷³. Mit Hilfe dieses Testes ist indirekt auch eine Aussage über die relative Zellproliferation von behandelten, in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen, möglich. Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der intrazellulären enzymatischen Umwandlung des löslichen gelben Tetrazols (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) in blau-violette Formazan Kristalle infolge der Reduktion durch NADH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat).

Für die Durchführung des MTT-Tests wurden 2000 Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch Platte in 200 µl Zellkulturmedium ausgesät und ü.N. bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues hormonfreies bzw. Standardkulturmedium hinzugegeben. Nach weiteren 24 h Kultur unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) erfolgte die Behandlung der Zellen mit der jeweiligen chemischen Substanz (G-1, G-15 oder Aza). Kontrollzellen wurden mit entsprechenden Mengen DMSO (0,1 %) bzw. 50 % Essigsäure (0,1 %), in denen die jeweilige zu testende Substanz gelöst war, behandelt. In Abhängigkeit des Experiments wurden drei - fünf Tage nach der Stimulation 40 µl der gelben MTT Lösung (5 mg/ml MTT in PBS) in jede Vertiefung mit Zellen gegeben und die gesamte Platte für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die in den Zellen gebildeten unlöslichen Formazan Kristalle wurden nach Entfernung des Mediums mit MTT Solvent gelöst. Um eine vollständig homogen gefärbte Lösung zu erhalten, wurden die Platten, lichtgeschützt in Aluminiumfolie verpackt, für 20 min geschüttelt. Die Absorptionsmessung erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 590 nm. Nach Subtraktion der Absorption bei 620 nm konnten die Daten ausgewertet werden.

2.2.4 Stimulation von Tumorzellen mit G-1, G-15 und Aza

Die pulverförmigen Substanzen G-1 (GPER Agonist)⁸⁶ und G-15 (GPER Antagonist)⁹⁰ wurden in DMSO gelöst. Es wurden Stocklösungen von 100 mM G-1 und 100 mM G-15 angelegt und bei -20 °C gelagert. Für die Versuche wurden die Substanzen so mit DMSO verdünnt, dass in jedem Reaktionsgefäß eine Endkonzentration von maximal 0,1 % DMSO enthalten war. Kontrollzellen wurden ebenfalls mit 0,1 % DMSO behandelt.

Für die Versuche zur globalen Demethylierung der DNA wurde 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza, Decitabin), ein synthetisches Nukleosid und Analogon des Nukleosids Desoxycytidin, verwendet¹⁷⁴. Da Aza in gelöster Form sehr instabil ist, wurde für jeden Versuch eine kleine Menge Aza mit der Feinwaage abgewogen und eine Stammlösung von 10 mg/ml mit 50 % Essigsäure angesetzt. Diese erste Stammlösung wurde 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass eine Arbeitslösung von 0,5 mg/ml (2191 µM) Aza entstand. Die Zellen wurden dann mit 5 µM Aza stimuliert (22,87 µl Arbeitslösung in 10 ml Kulturmedium).

2.2.5 Wundheilungstest zur Migrations- und Proliferationsmessung adhärenter Zellen

Der Wundheilungstest wurde zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation angewendet. Das Prinzip dieses Tests ist die Migration und Proliferation von adhärenenten Zellen, um eine Lücke in der konfluent gewachsenen Zellschicht zu schließen¹⁷⁵. Diese Lücke wurde vorher durch einen Kratzer mit einer sterilen Pipettenspitze in den Zellrasen manuell eingebracht. Für die Auswertung der Proliferation wurde die nach 48 h mit Zellen zugewachsene Fläche nach folgender Formel ermittelt.

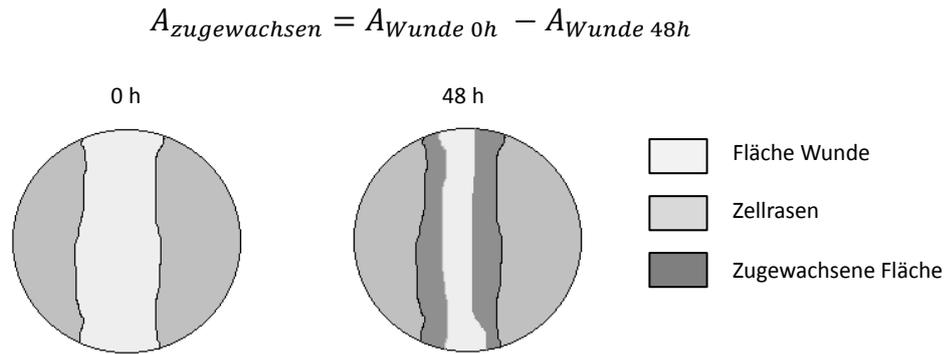


Abb. 3 Schematische Darstellung des Wundheilungstests. Mit Hilfe einer sterilen 200 µl Pipettenspitze wird ein senkrechter Kratzer in den Zellrasen eingebracht. Die Fläche des Kratzers wird unter dem Lichtmikroskop über einen Zeitraum von 48 h beobachtet und vermessen.

MCF-7 Zellen wurden für den Versuch in einer Konfluenz von 70 – 80 % (300000 Zellen/Loch) auf eine 12-Loch-Zellkulturplatte ausplattiert. Um eine Betrachtung des gleichen Zellausschnitts zu verschiedenen Zeitpunkten zu ermöglichen, wurde der Boden der Zellkulturplatte vorher von außen mit einer Markierung versehen. Nach Übernachtskultur der Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ im Zellkulturinkubator wurde mit Hilfe einer sterilen 200 µl Pipettenspitze ein vertikaler Kratzer in den Zellrasen eingebracht. Um die abgelösten Zellen zu beseitigen, wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Stimulantien (G-1 und G-15) behandelt und ein Foto des markierten Zellausschnitts unter dem Lichtmikroskop aufgenommen (Zeitpunkt 0 h). Nach weiterer Inkubation im Zellkulturinkubator (24 h und 48 h) wurde dieser Zellabschnitt wiederum unter dem Mikroskop mit gleichen Einstellungen fotografiert und im Anschluss die zugewachsene Fläche berechnet.

2.2.6 RNA Isolierung aus humanen Zellen nach Chomczynski und Sacchi

Das verwendete Protokoll zur Isolierung der RNA aus Zellen basiert auf der „single step“ Methode nach Chomczynski und Sacchi unter der Verwendung von TRIzol®¹⁷⁶. Hierbei werden Zellen in einem Schritt lysiert und die biochemischen Bestandteile RNA, DNA und Proteine nach Zugabe von Chloroform in drei einzelne Phasen getrennt.

Nach Resuspension der Zellen in 1 ml TRIzol mit anschließender Inkubation für 10 min bei RT, wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und der Ansatz nach mehrfacher Invertierung für

weitere 10 min bei RT inkubiert. Bereits nach der Inkubation sollten eine milchige obere und eine rötliche untere Phase zu erkennen sein. Diese Phasen wurden dann mit Hilfe eines Zentrifugationsschritts (15 min, 12000 rpm, 4 °C) in eine klare obere Phase (enthält RNA), eine milchige Zwischenphase (enthält DNA) und eine klare rote untere Phase (enthält Protein) getrennt. Die RNA enthaltene obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (RNase-frei) überführt und mit gleichem Volumen eiskaltem 2-Propanol versetzt. Durch diesen Reaktionsschritt wird die RNA aus der Lösung gefällt. Um eine höhere Ausbeute an RNA zu erzielen, wurden die Proben ü.N. bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde die RNA bei 12000 rpm für 10 min (4 °C) zentrifugiert, wodurch sich ein sichtbares RNA Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes bildete. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml 70 % Ethanol. Um die RNA von Restalkohol zu befreien, wurden die Pellets 10 min bei RT getrocknet bevor sie in 12 µl RNase-freies Wasser aufgenommen wurden. Bis zur Weiterbehandlung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf der Eigenschaft der Nukleinsäuren, im UV-Bereich Licht zu absorbieren. Mit Hilfe eines Multiplikationsfaktors ist es möglich, direkt aus dem Messwert der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) auf die Nukleinsäurekonzentration zu schließen. Um Verunreinigungen mit Protein auszuschließen wurde das Verhältnis der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ermittelt. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist eine OD_{260}/OD_{280} von 1,8-2,0 auf.

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der Gesamtlösung

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor:

50 für doppelsträngige DNA

40 für RNA

Für die Messung wurden die Proben 1/100 bzw. 1/200 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm im Spektralphotometer gemessen.

2.2.8 cDNA Synthese

Bei der cDNA (*engl. complementary DNA*, komplementäre DNA) Synthese wird RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Umwandlung ist notwendig, da die sehr instabile RNA nicht als Template für die PCR genutzt werden kann.

Für jede Reaktion wurden 2 µg RNA in ein 0,2 ml RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und mit entsprechendem Volumen an RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 18 µl ergänzt. Nach Zugabe von 1 µg oligo-dT-Primern (odTs) wurden die Proben kurz gemixt und herunterzentrifugiert. Die Anlagerung der odTs an den Poly-A-Schwanz der mRNA erfolgte für 10 min bei 75 °C im Thermocycler. Danach wurden die Proben für 2 min auf Eis abgekühlt bevor 18,5 µl Mix A in jeden Ansatz gegeben wurden. Mix A enthält 5x M-MLV RT-Puffer (8 µl), Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs, 4 µl, 2,5 mmol/l), DNase (2 µl, 2 U/µl), RNase Inhibitor (0,5 µl, 40 U/µl) und RNase-freies Wasser (4 µl). Die danach folgenden Inkubationen der Proben für 30 min bei 37 °C, sowie 5 min bei 75 °C und 2 min bei 4 °C dienten dem Abbau noch vorhandener DNA und der anschließenden Inaktivierung der daran beteiligten Enzyme. Im letzten Schritt der cDNA Synthese wird der cDNA Strang komplementär zum Matrizen Strang (RNA) ergänzt. Hierfür wurden je 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 1 µl RNase Inhibitor (40 U/µl) zu jedem Ansatz hinzugefügt und die Proben für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die abschließende Erhitzung des Ansatzes für 5 min auf 94 °C führte zur kompletten Inaktivierung der an den Reaktionen beteiligten Enzyme. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Quantitative Echtzeit (Real-Time) Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*engl. quantitative Real-Time PCR*) ist eine Methode, bei der in Abhängigkeit der gewählten Primer, spezifische Bereiche der eingesetzten DNA (*template*) vervielfältigt werden. Grundprinzip hierbei sind die drei Schritte der herkömmlichen PCR (Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation). Ziel der Real-Time PCR ist eine Aussage über die Expression von Zielgenen anhand der mengenmäßigen Vervielfältigung der eingesetzten cDNA. Für die Quantifizierung der entstandenen PCR Produkte wurde das SYBR-Green Fluoreszenzsystem verwendet. SYBR-Green I ist ein Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und dadurch mit der

DNA einen grün-fluoreszierenden Komplex bildet (emittierte Wellenlänge $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$). Mit der exponentiellen Zunahme der doppelsträngigen PCR Produkte nach jedem PCR Zyklus nimmt somit auch das SYBR-Green I Fluoreszenzsignal zu. Da als DNA Template die zur mRNA komplementäre cDNA genutzt wurde, lässt sich darüber hinaus eine Aussage über die mengenmäßige Expression von einzelnen Genen treffen.

2.2.9.1 Durchführung der Real-Time PCR

Jede Real-Time PCR wurde auf speziellen 96-Loch-PCR Platten im iCycler (BioRad) durchgeführt. Der einfache Mastermix (Gesamtvolumen 13 μl) setzte sich folgendermaßen zusammen:

RNase-freies Wasser (<i>aqua ad inj.</i>)	2 μl
Primer Mix	3 μl
Fluorescein (1:10 mit RNase-freiem Wasser)	0,5 μl
SYBR Green I	6,5 μl
cDNA	1 μl

Die optimalen Primerkonzentrationen und PCR Bedingungen wurden für jedes Zielgen über eine Primertitration ermittelt. Anhand dieser Titration ergaben sich für die Amplifizierung vom GPER eine optimale Primerkonzentration von 50 nM Vorwärts- und 50 nM Rückwärtsprimer sowie folgende PCR Konditionen:

Tab. 5 Programm der GPER Echtzeit PCR

	Temperatur	Zeit
1	95 °C	10 min
2	95 °C	30 s
3	54 °C	45 s
4	72 °C	30 s
2-4	40x	
5	95 °C	1 min
6	55 °C	1 min

Als Referenzgen wurde β -Aktin für jede Probe (Vorwärtsprimer 50 nM, Rückwärtsprimer 300 nM) amplifiziert. Wie auch bei dem Zielgen wurden alle Reaktionen in Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.2.9.2 Auswertung der Real-Time PCR

Die Auswertung der PCR Ergebnisse beruht in der Analyse der c_t -Werte der einzelnen Proben. Als c_t -Wert (*cycle threshold*) bezeichnet man den Zyklus einer PCR in dem das jeweilige Fluoreszenzsignal erstmalig exponentiell ansteigt und damit signifikant größer ist als der Hintergrund. Für die Ermittlung der relativen Expression wurden zuerst aus den beiden c_t -Werten der Doppelbestimmungen des Zielgens und des Referenzgens die Mittelwerte gebildet. Die zwei Werte der Doppelbestimmung sollten dabei nicht mehr als 0,5 Zyklen voneinander abweichen. Bei einer höheren Abweichung als 0,5 Zyklen muss die PCR wiederholt werden. Die Differenz des mittleren c_t des Zielgens und des Referenzgens wird als Δc_t bezeichnet. Mit der Formel $2^{-\Delta c_t}$ wurde dann die relative Expression des Zielgens in Bezug auf das Referenzgen bestimmt.

2.2.10 Protein Isolierung aus Zellen

Die Gesamtproteinmenge der Zellen wurde aus Zellpellets isoliert. Hierfür wurden die Pellets in Abhängigkeit ihrer Größe bzw. Zellzahl mit 30 μ l – 50 μ l Protein Lyse Puffer (2 ml Lyse Puffer Stock, 100 mM PMSF, 1:100 Protease Inhibitor Cocktail Set III) resuspendiert und anschließend mit fünf Ultraschallimpulsen homogenisiert. Die Lyse der Zellen fand über eine Stunde auf Eis statt, wobei die Zellen alle 10 min gemischt wurden (Vortexer). Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -80 °C.

2.2.11 Proteinquantifizierung nach Bradford

Der Bradford Test¹⁷⁷ ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung. Die Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G250 von 470 nm auf 595 nm in Abhängigkeit der in der Lösung enthaltenen Proteinmenge (basische Aminosäureseitenketten der Proteine). Da die Proteinkonzentration nicht direkt aus den Extinktionswerten bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt werden kann, wurde für die

Auswertung des Assays eine Standardreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen (hergestellt mit BSA) angefertigt.

Für die Messung wurde das Coomassie-Brilliant-Blue G250 Reagenz (Bio Rad) 1:5 mit *aqua ad inj.* verdünnt und anschließend steril filtriert (0,2 µm Filter). Die Proteinproben wurden 1:20 mit dem *aqua ad inj.* verdünnt und je 10 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen. Anschließend wurden zu jeder Proteinprobe 200 µl des verdünnten Coomassie Reagenz gegeben und die Platte für 5 min bei RT inkubiert, bevor die Absorptionsmessung im Spektralphotometer erfolgte. Zur Auswertung wurde aus der Standardreihe eine lineare Funktion ermittelt, mit Hilfe welcher die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet werden konnte.

2.2.12 Western Blot

Der Western Blot ist eine biochemische Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen. Dabei werden Proteine im ersten Schritt in einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Im zweiten Schritt werden sie dann auf eine Membran übertragen. Auf dieser Membran ist eine Detektion der Zielproteine mit spezifischen Antikörpern möglich. Durch den Vergleich der Bandenstärke der Zielproteine mit Referenzproteinen ist eine semiquantitative Auswertung der Proteinexpression im Western Blot möglich.

2.2.12.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Elektrophorese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Methode zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen in einem Polyacrylamidgel¹⁷⁸. Durch die Verwendung von SDS als Zusatz in der Probenvorbereitung und als Bestandteil in den Trägern wird die spezifische Eigenladung der Proteine von der negativen Ladung des SDS überdeckt. Die Trennung der einzelnen Proteine im elektrischen Feld ist dadurch nur von der Proteingröße und dem damit verursachten Widerstand beim Durchlauf durch die vernetzten Acrylamidpolymere abhängig.

Für die vorgelegten Versuche wurden Gele mit 12 % und 15 % Acrylamid angefertigt. Je höher der Anteil an Acrylamid im Gel ist, desto feinmaschiger wird das Netz der Acrylamidpolymere, welches die Bewegung der Proteine behindert. Proteine gleicher Größe bewegen sich demzufolge in einem höher prozentigen Gel bei gleich angelegter Spannung langsamer. Besonders kleine Proteine (10-20 kDa) lassen sich durch einen hohen Acrylamidanteil im Gel besser voneinander trennen. Die Gele wurden in einer Gelkammer (10 cm Gele, Peqlab) zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 1,5 mm gegossen. Jedes Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Das Trenngel ist dabei für die Separierung der Proteine verantwortlich, das durchlässigere Sammelgel ermöglicht den gleichmäßigen Start der Proteinlauffront ermöglicht. Die Gele wurden vor jeder Elektrophorese frisch gegossen und setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen (Volumenberechnung für zwei Gele):

Tab. 6 Zusammensetzung von je zwei Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt

Komponente	Trenngel		Sammelgel	
	12 % Trenngel	15 % Trenngel	Komponente	Sammelgel
destilliertes Wasser	8,3 ml	5,8 ml	destilliertes Wasser	6,8 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	6,3 ml	6,3 ml	1,0 M Tris HCl pH 6,8	1,25 ml
Acrylamid 30%	10 ml	12,5 ml	Acrylamid 30%	1,7 ml
SDS 10%	0,25 ml	0,25 ml	SDS 10%	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	TEMED	0,01 ml
APS 10%	0,25 ml	0,25 ml	APS 10%	0,1 ml

Nachdem die Gele komplett polymerisiert waren und 1xElektrodenpuffer in die Elektrophoreseapparatur gefüllt wurde, erfolgte die Auftragung der Proteinproben in die Vertiefungen des Sammelgels. Jede Probe beinhaltete 50 µg Gesamtprotein. Vor der Beladung des Gels wurden die Proteinproben mit 1/5 Volumen 5xSDS-Ladepuffer vermischt, für 5 min bei 95 °C gekocht (Denaturierung der Proteine) und anschließend auf Eis abgekühlt. Der Lauf der Elektrophorese fand erst bei 70 V (etwa 30 min zum Sammeln der Proteine an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel) und später bei 100 V (etwa 3 h zur Auftrennung der Proteine im Gel) statt. Bei jeder Elektrophorese wurde ein Proteinmarker mit definiertem Molekulargewicht mit auf das Gel aufgetragen. Dies ermöglichte die spätere Größenabschätzung der einzelnen getrennten Proteine.

2.2.12.2 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel wurden die Proteine in einem senkrecht zum Gel ausgerichteten elektrischem Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen (Elektrotransfer), wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Membran und Proteinen haften. Erst durch diese Übertragung in einer speziellen Transferkammer (*Wet-Blot*, Peqlab) war es möglich die Proteine mit spezifischen Antikörpern auf der Membran zu detektieren. Dafür wurden die einzelnen Schichten bestehend aus Proteingel, PVDF-Membran und in kaltem Transferpuffer getränkte Schaumstoffschwämme und Filterpapiere sandwichartig in einer Kassette übereinander gelegt. Es ist wichtig, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bilden, da diese den Transfer stören. Die so gepackte Kassette wurde dann in den, mit kaltem Transferpuffer gefüllten, Tank der Elektrophorese Apparatur gesetzt. Der Transfer lief über 2 Stunde bei 80 V.

2.2.12.3 Nachweis der Zielproteine mittels Chemilumineszenz

Nach dem Transfer wurden die Membranen für 5 min mit 1 x TBS gewaschen um die Rückstände des Transferpuffers zu beseitigen. Die noch freien Bindungsstellen wurden für 1 h blockiert (5 % Magermilchpulver in TBS bei RT). Anschließend wurden die primären Antikörper zur spezifischen Bindung an die Zielproteine auf den Membranen inkubiert (bei 4 °C ü.N.). Hierfür wurden die Antikörper nach Anleitung im Datenblatt (Tab. 2) in 5 % Magermilchpulver oder 5 % BSA in TBS+0,05 % Tween verdünnt. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen gewaschen (3 x mit TBS+0,05 % Tween) und danach für 2 h mit den sekundären Antikörpern inkubiert (Verdünnung Tab. 2, RT). Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an das Enzym Meerrettichperoxidase (*HRP horseradish peroxidase*) gekoppelt. Diese Peroxidase ist in der Lage Luminol zu oxidieren und katalysiert damit eine chemilumineszente Reaktion. Bei dem Abfall von oxidiertem Luminol in seinen Grundzustand wird sichtbares Licht freigesetzt, welches die Detektion der Antikörper - und damit verbunden des Zielproteins - auf der Membran ermöglicht. Vor der Detektion der Zielproteine wurden überschüssige Sekundärantikörper von den Membranen gewaschen (3 x 5 min, TBT+5 % Tween), bevor im Anschluss jede

Membran mit 2 ml Chemilumineszenzlösung, bestehend aus gleichen Teilen Luminolreagenz und Peroxidlösung (Chemilumineszenz Kit Millipore), inkubiert (3 min, RT) wurde.

So erfolgte der Nachweis der Zielproteine im Western Blot mit zwei verschiedenen Antikörpern in zwei Schritten. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das Zielprotein, wobei der zweite Antikörper den gebundenen Erstantikörper erkennt und durch seine Kopplung an ein Enzym den Nachweis des Zielproteins indirekt ermöglicht. Bei Verwendung des biotinylierten Proteinmarkers zur Größendefinition der Zielproteine wurde der Sekundärantikörperlösung der ebenfalls HRP gekoppelte Anti-Biotin Antikörper 1:5000 zugesetzt. Die Aufnahme und Auswertung der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe des Chemilumineszenzgerätes GeneGenome und der Softwarewerkzeuge GeneSnap und GeneTools der Firma Syngene. Zur Auswertung wurde die Chemilumineszenz der Zielbanden als Kurve dargestellt. Das Volumen unter der Kurve wurde als Maß für die Chemilumineszenz verwendet.

Für die Quantifizierung mehrerer Proteine auf einer Membran wurden zum einen zwei Primärantikörper (z.B. Cyclin B1 und CDK1) des gleichen Wirts zusammen inkubiert und dann gemeinsam mit einem Sekundärantikörper detektiert. Aufgrund unterschiedlicher Größe, konnten beide Proteine gut voneinander unterschieden werden. Zum anderen wurden die auf den Membranen gebundenen Antikörper nach der Detektion mit Hilfe von Stripping Puffer entfernt. Hierfür wurden die Membranen für 7 min abgedunkelt mit je 5 ml Stripping Puffer auf dem Kippschüttler inkubiert und danach zweimal mit TBS gewaschen. Im Anschluss daran konnte die Membran erneut zur Detektion weiterer Proteine genutzt werden.

2.2.13 Ausschalten der Protein Expression mit Hilfe der RNA Interferenz (siRNA)

Zum Ausschalten der Proteinexpression von GPER und p53 wurden kurze eingreifende RNA-Moleküle (*short interfering RNA*, siRNA) von 19 - 25 Basenpaaren Länge verwendet. Ein Set dieser siRNA bestand aus 3-5 sequenz-spezifischen doppelsträngigen Ribonukleotidsequenzen. Prinzip der siRNA ist die komplementäre Bindung eines siRNA Einzelstranges an die Ziel-mRNA, wodurch diese abgebaut wird.

Die siRNA Versuche entstanden in Kooperation mit der Potsdamer Arbeitsgruppe Biochemie von Prof. Zoya Ignatova. Die Transfektion der Zelllinien mit siRNA erfolgte dabei nach dem Protokoll des Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000. Dafür wurden die adhärenenten Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten bis zu einer Konfluenz von 70–90 % kultiviert. Für jede Transfektion wurden 2500 ng siRNA mit 5–12,5 µl Lipofectamine 2000 in einem Gesamtvolumen von 250 µl OptiMEM-Medium auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubation der Zellen im Zellkulturinkubator konnten die Zellen für die weiterführenden Versuche genutzt werden. Zusätzlich erfolgte die Kontrolle der Transfektion auf Proteinebene durch Western Blot Analyse der Zielproteine.

2.2.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Analyseverfahren, bei dem die einzelnen Zellen einer Zellpopulation aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz vermessen werden können. Die Zellen werden dabei in einem Messstrom durch eine Flusszelle geleitet. In dieser Flusszelle werden sie mit einem Laser (Argon-Ionen-Laser, 488 nm) angestrahlt. Das dabei entstehende Streulicht jeder Zelle wird von Detektoren erfasst. Das Vorwärtsstreulicht zeigt die, durch die Zelle verursachte, Beugung des Lichtes im flachen Winkel und ist damit ein Maß für die Größe bzw. das Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht hängt von der Granularität der Zelle ab und bestimmt sich aus der Brechung des Lichtes im rechten Winkel. Neben dem Streulicht lassen sich mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch Fluoreszenzen messen. In dem für die Versuche verwendeten Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD) konnten die Zellen anhand von fluorochromgekoppelten Antikörpern mit bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert werden. Das Gerät besitzt neben dem Argon-Ionen Laser einen zweiten Dioden Laser mit einer Strahlungsintensität von 635 nm. Dadurch ist es möglich ein breiteres Lichtspektrum anzuregen. Neben fluorochromgekoppelten Antikörpern können für die Markierung der Zellen auch fluoreszierende Farbstoffe, wie Propidiumiodid (PI) verwendet werden.

2.2.14.1 Apoptosebestimmung am Durchflusszytometer

Für die Detektion und Quantifizierung von apoptotischen Zellen wurde eine Doppelfärbung mit Annexin V und PI im Durchflusszytometer durchgeführt (Apoptose Kit, BD). Das Ca²⁺-

Ionen abhängige Protein Annexin V bindet an die Phosphatidylserine in der äußeren Zellmembran, die während der Apoptose von der inneren Seite in die Außenseite der Membran umgebaut werden. Lebende Zellen lassen sich dadurch nicht mit Annexin V anfärben. Durch die Kopplung von Annexin V an das grüne Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) wird eine Fluoreszenzdetektion der Annexin V gebundenen Zellen im Durchflusszytometer möglich. Da nicht nur früh-apoptotische Zellen, sondern auch bereits tote und nekrotische Zellen die Integrität ihrer Membranen verlieren, kann Annexin V in diese Zellen eindringen und sich an die inneren PS anlagern. Aus diesem Grunde wird die Annexin V Färbung zusammen mit einer Zellviabilitätsfärbung durchgeführt. Hierfür wurde der rot fluoreszierende Farbstoff PI verwendet. PI wird nur von bereits toten und nekrotischen Zellen mit zerstörten Membranen aufgenommen und interkaliert mit der DNA dieser Zellen. So lassen sich apoptotische Zellen (Annexin V positiv, PI negativ) von bereits toten Zellen mit starker PI Färbung (Annexin V positiv, PI positiv) unterscheiden.

Für die Annexin V/PI Färbung wurden die Zellen aus den Kulturgefäßen auf Eis geerntet (1x waschen mit PBS; 3 min Trypsin/EDTA bei 37 °C; abstoppen mit Kulturmedium; Zentrifugation 750 rpm, 15 min, 4 °C). Da adhärenente Zellen beim Sterben ihren Kontakt zum Kulturgefäß verlieren ist es wichtig, dass die Kultur- und Waschüberstände zusammen mit den trypsinierten Zellen geerntet wurden. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit 2 ml PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, rund $0,5-1 \times 10^6$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und wiederum zentrifugiert (750 rpm, 15 min, 4 °C). Pro Probe werden zwei FACS-Röhrchen benötigt (gefärbte Probe und ungefärbte Kontrolle bzw. Isotyp-Kontrolle). Danach wurden die Zellpellets in 500 µl Bindepuffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und anschließend gefärbt. Für die Färbung wurde ein Mastermix (pro Probe 5 µl PI, 4 µl Annexin V, 91 µl Bindepuffer) angesetzt, der auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT im Dunkeln, wurden die Proben mit weiteren 300 µl Bindepuffer verdünnt und anschließend im Durchflusszytometer die Intensität von Annexin V und PI gemessen.

2.2.14.2 Zellzyklusbestimmung am Durchflusszytometer

Auch die Analyse der Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus ist mit Hilfe des Durchflusszytometers möglich. Die Messung beruht auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zellen in den Zellzyklusphasen. Hierbei wird wie bei der Apoptosefärbung der rot fluoreszierenden DNA-Interkalant PI zur Färbung der Zellen verwendet. Mit Hilfe dieser Methode können die Zellen den Zellzyklusphasen G_1 -, S-, und G_2 /M-Phase zugeordnet werden. In der G_0/G_1 -Phase besitzt die Zelle einen einfachen diploiden Chromosomensatz. Während der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) wird die DNA verdoppelt. Der DNA Gehalt der Zelle steigt dabei stetig an. Mit Beginn der G_2 -Phase bis zur Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen besitzt die Zelle einen doppelten, tetraploiden Chromosomensatz. Da es während der Apoptose durch Caspase-3 zu einer Aktivierung des DNA-Fragmentierenden Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase kommt, weisen apoptotische Zellen in mittleren bis späten apoptotischen Stadien einen geringeren DNA Gehalt auf als diploide Zellen in der G_0/G_1 -Phase. Diese Zellen stellen sich in der Zellzyklusanalyse mit PI als Sub- G_0/G_1 -Peak dar.

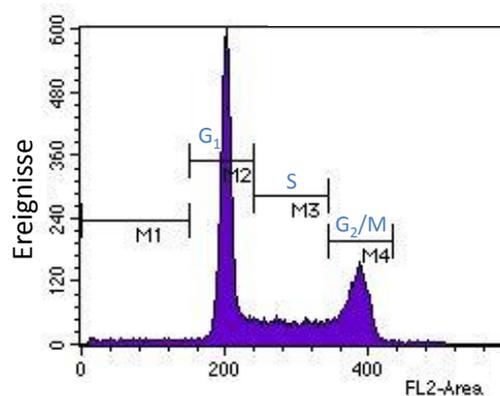


Abb. 4: Beispiel eines Histogramms der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse. M2 = G_0/G_1 -Phase; M3 = S-Phase; M4 = G_2 /M-Phase; M1 = sub G_1 (apoptotische Zellen). G_1, G_2 =Gap-Phasen; S=DNA-Synthese-Phase; M=Mitose.

Die Zellen wurden, wie bei der Apoptosebestimmung beschrieben, gerntet, und anschließend zwei Mal mit je 2 ml PBS gewaschen. Für die Fixierung in 70 % Ethanol wurden die Zellen in 420 μ l PBS resuspendiert und unter ganz leichtem Vortexen langsam mit 1 ml eiskaltem Ethanol (100 %) versetzt. Nach Inkubation ü.N. bei 4 °C konnten die Zellen am nächsten Tag gefärbt oder bei -20 °C bis zur Weiterbearbeitung gelagert werden.

Vor der Färbung wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen um den Alkohol zu entfernen. Da PI neben DNA ebenfalls an RNA bindet, wurde die RNA im nächsten Schritt mit Hilfe von RNase abgebaut (100 µg/ml RNase in 200 µl PBS, 37 °C, 10 min). Nachdem die Reaktion durch Abkühlen auf Eis abgestoppt wurde, erfolgte die Färbung der Zellen mit 100 µl PI (Stocklösung 50 µg/ml in PBS) für 20 min bei RT im Dunkeln.

2.2.15 Behandlung von Zellen mit radioaktiven Strahlen

Zur Vorbereitung für die Bestrahlung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 - 90 % in 6-cm Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung von 1, 5 und 10 Gy bei RT unter dem Röntgentherapiegerät in der Klinik für Strahlentherapie der OvGU. Nach weiterer Kultur im Zellkulturinkubator wurden die Zellen nach 48 h trypsinisiert. Aus dem Zellpellet wurden sowohl RNA als auch Proteine isoliert.

2.2.16 Immunhistochemische GPER Färbung von Tumorschnitten

Die Anfertigung von Tumorschnitten aus Paraffinblöcken von Formalin-fixierten Tumorproben sowie die immunhistochemische Färbung der Schnitte wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Kalinski im Institut für Pathologie der OvGU Magdeburg mit Hilfe eines Färbemoduls der Firma Ventana durchgeführt. Es wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger übertragen und anschließend mittels absteigender Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 75%) in destilliertes Wasser überführt. Die Schnitte wurden mit dem anti-GPER Antikörper (SP4677P Acris, 1:500 für 32 min bei 37 °C) inkubiert und mit einem Biotin-gekoppelten Anti-Maus Sekundärantikörper (8 min, 37 °C) anhand der ABC-Methode (*Avidin-Biotin-Complex*) detektiert (DAB Detection Kit, Ventana). Bei dieser Methode wird zur Detektion der gebundenen Antikörper ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex verwendet. Streptavidin bindet fest an das an den Sekundärantikörper gekoppelte Biotin. Durch die anschließende Zugabe des Peroxidasesubstrats Diaminobezidin (DAB) und Wasserstoffperoxid fällt ein unlösliches braunes Präzipitat aus, welches unter dem Lichtmikroskop detektiert werden kann. Für eine bessere Übersicht wurden die Schnitte zusätzlich mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, im letzten Schritt in Xylol überführt und anschließend eingedeckelt.

Zur Charakterisierung der GPER Proteinexpression wurde ein GPER Score ermittelt. Die Ermittlung des GPER Scores orientierte sich am immunreaktiven Score für Hormonrezeptoren nach Remmele und Stenger¹⁷⁹. Er setzt sich zum einen aus der GPER Expressionsintensität und zum anderen aus der GPER Ausbreitung zusammen. Folgende Maßstäbe wurden für die Bewertung der Expression herangezogen. Bei einem Score von mehr als zwei wurde der Tumor als GPER positiv eingestuft.

Tab. 7 Immunhistochemische Charakterisierung der GPER Expression

GPER Intensität	GPER Ausbreitung	GPER Score
0 keine Expression	0 keine positiven Zellen	Score =
1 schwache Expression	1 < 10 % positive Zellen	Intensität x Ausbreitung
2 mäßig starke Expression	2 10 – 50 % positive Zellen	GPER negativ = 0 - 2
3 starke Expression	3 > 50 % positive Zellen	GPER positiv = 3 - 9

2.2.17 DNA Isolierung aus humanen Zelllinien

Die DNA Isolierung aus menschlichen Tumorzellen (Zelllinien) erfolgte mit einem DNA Isolationskit der Firma Macherey-Nagel (NucleoSpin®Tissue). Das Protokoll folgte dabei der Anleitung des Herstellers. Als Ausgangsmaterial wurden Zellpellets von rund 1×10^6 Zellen genutzt und in 200 μ l T1 Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 25 μ l Proteinase K und 200 μ l Lysispuffer B3 zu der Zellsuspension gegeben. Die Lyse der humanen Zellen erfolgt für 10 min bei 70 °C unter leichtem Schütteln. Nach Zugabe von 210 μ l Ethanol (100 %) und Vermischen des Reaktionsansatzes flockte die DNA im Reaktionsgefäß aus und war als weißer Niederschlag mit bloßem Auge sichtbar. Der Ansatz wurde auf die Reinigungssäule gegeben. Um den Durchfluss der Säule aufzufangen, wurde die Reinigungssäule in ein dafür vorgesehenes Auffanggefäß gesetzt. Anschließend erfolgte die erste Zentrifugation (11000 x g, 1 min, RT). Dabei wurde die DNA in der Säule gebunden. Für eine weitere Reinigung der DNA wurden zwei weitere Waschschrte, einmal mit 500 μ l BW-Waschpuffer und einmal mit 600 μ l B5-Waschpuffer, durchgeführt. Nach jedem Waschschrte wurden die Säulen zentrifugiert (11000 x g, 1 min, RT) und der Durchfluss

anschließend verworfen. Nach dem Waschen wurde die Säule noch ein weiteres Mal zentrifugiert, um die Membran von Überresten des Waschpuffers zu befreien und zu trocknen. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 60 µl angewärmten BE-Puffer (70 °C) aus der Membran eluiert (11000 x g, 1 min, RT). Die DNA wurde nach der Isolation bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt analog zum Protokoll der RNA Konzentrationsbestimmung (Punkt 2.2.7).

2.2.18 DNA Isolierung aus Gewebeschnitten

Für die Isolierung von DNA aus in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeproben wurden Gewebeschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Der Bereich des Tumors wurde von Pathologen markiert. Es wurden nur Gewebe mit mindestens 70 % Tumoranteil für die DNA Isolation verwendet. Nekrotisches Gewebe wurde von der Isolierung ausgeschlossen. Um genügend Ausgangsmaterial für die DNA Isolierung zu erhalten, wurden, je nach Größe des Tumorbereichs, vier – zehn Schnitte für die Isolierung herangezogen. Die DNA Isolierung erfolgte, wie bereits bei der Isolierung der DNA aus humanen Zelllinien beschrieben, mit Hilfe des DNA Isolationskits Nucleo-Spin® von Macherey-Nagel (Protokoll Punkt 2.2.17)

2.2.19 Detektion von Methylierungen in genomischer DNA

Eine qualitative Methode zur Untersuchung des Methylierungsstatus genomischer DNA-Sequenzen ist die Bisulfitkonvertierung der DNA mit anschließender methylierungsspezifischer PCR (MSP). Bei der Bisulfitkonvertierung werden alle nicht-methylierten Cytosine einer einzelsträngigen DNA Sequenz durch Konvertierungsreaktionen mit Natriumbisulfit in Uracil umgewandelt¹⁸⁰. In der darauffolgenden PCR wird das umgewandelte Uracil als Thymin erkannt. Methylierte Cytosine werden bei dieser Reaktion nicht verändert. Sie sind durch ihre Methylierung vor dem Umbau geschützt. So entsteht nach der Bisulfitreaktion, in Abhängigkeit des DNA Methylierungsgehaltes, eine veränderte Nukleotidsequenz, die nicht mehr komplementär zu dem ursprünglich komplementären DNA Strang ist. Mit spezifischen Primern, die entweder den bisulfit-sensitiven, unmethylierten Strang, oder den bisulfit-resistenten, methylierten Strang binden, kann in der anschließenden methylierungsspezifischen PCR der Methylierungsstatus der Sequenz ermittelt werden. Die

schematische Darstellung der Bisulfitkonvertierung mit anschließender MSP ist in Abb. 5 dargestellt.

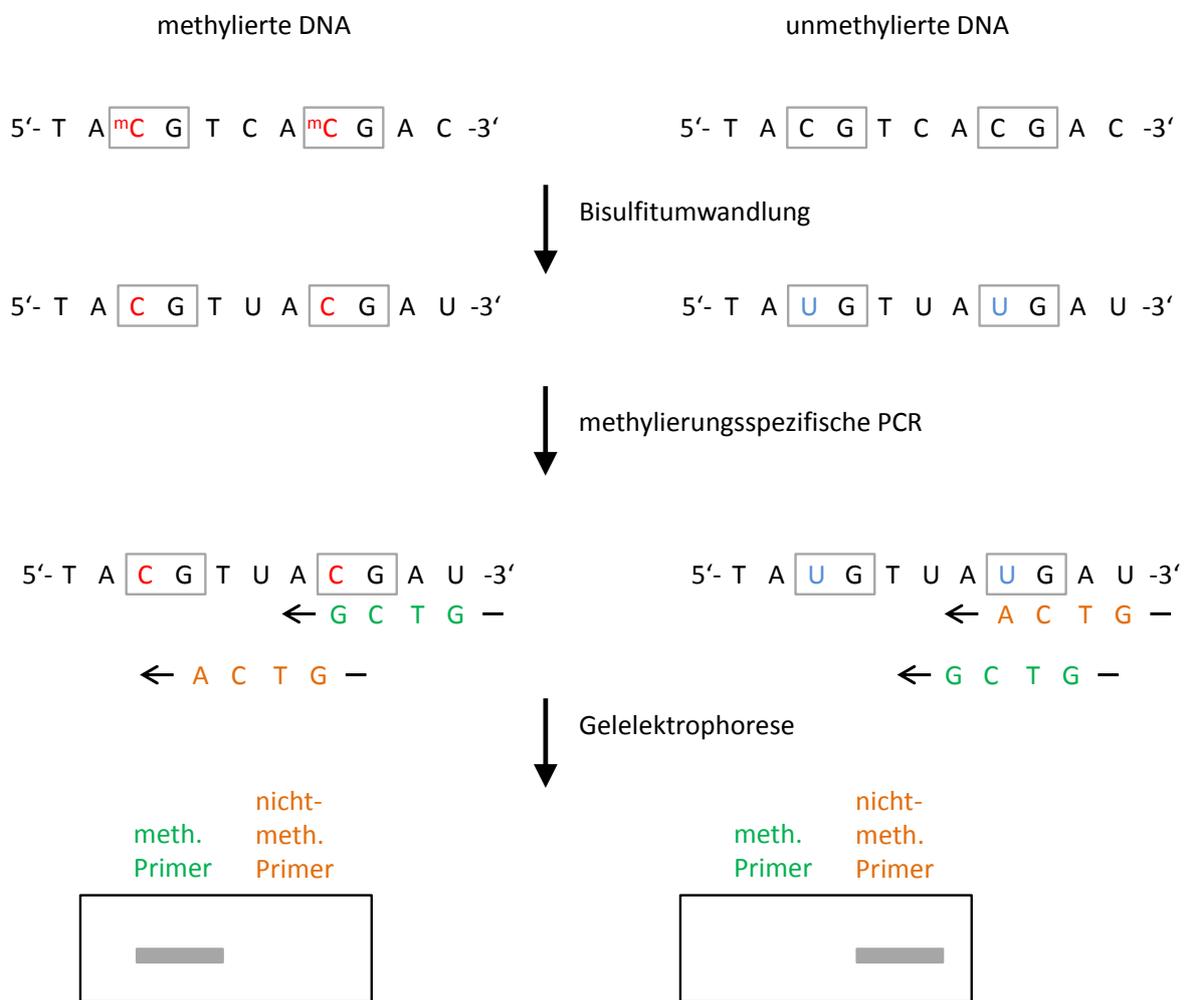


Abb. 5 Schematische Darstellung der Bisulfitkonvertierung in Abhängigkeit des Methylierungsstatus der DNA. Methylierte Cytosine werden bei der Bisulfitumwandlung aufgrund ihrer Methylierung nicht in Uracil konvertiert. Im Gegensatz dazu werden unmethylierte Cytosine in Uracil umgewandelt. Anhand der im Agarosegel detektierten PCR Produkte kann eine Aussage über die Methylierung der DNA-Sequenz getroffen werden.

2.2.19.1 Bisulfitkonvertierung der DNA

Für die Bisulfit-Umwandlung wurde das CpG Genome DNA Modifikationskit von Chemicon verwendet und das Protokoll nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Spezielle Kontrollen in Form von DNA Standards für 50 % methylierte und 50 % nicht-methylierte DNA wurden bei jeder Bisulfitreaktion mitgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden 1 µg DNA aus

Tumorgewebe bzw. aus Tumorzellen verwendet. Im ersten Schritt der Bisulfitkonvertierung wurde die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 50 °C (10 min) und ein alkalisches Milieu (durch Zugabe von Natriumhydroxid) in Einzelstränge denaturiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von Reagenz 1 (enthält Natriumbisulfit) die Umwandlung der nicht methylierten Cytosinbasen über zwei Reaktionsschritte in eine sulfonierte Uracilzwischenstufe (Uracilsulfonat). Diese Reaktion lief ü.N. bei 50 °C ab. Am nächsten Tag erfolgte durch Erhöhung der Salzkonzentration (Reagenz 2) die Bindung an einen Mikropartikel DNA Träger (Reagenz 3). Anschließend wurden die Proben durch dreimaliges Waschen mit 70 % Ethanol entsalzt (1 min, 14000 rpm). Durch Resuspension der Pellets in alkalischer Lösung (20 nM NaOH in 90 % Ethanol) und anschließender Entsalzung mit 90 % Ethanol erfolgte dann durch alkalische Desulfonierung die Umwandlung von Uracilsulfonat zu Uracil. Im letzten Schritt wurde die umgewandelte DNA in angewärmten TE Puffer aufgenommen und für 10 min bei 55 °C inkubiert. Dieser Schritt diente dem Lösen des DNA Trägers von der umgewandelten DNA. Nach anschließender Zentrifugation (3 min, 14000 rpm) konnte der, die DNA enthaltene Überstand, in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Bis zur Durchführung der MSP wurden die DNA Proben bei -20 °C gelagert.

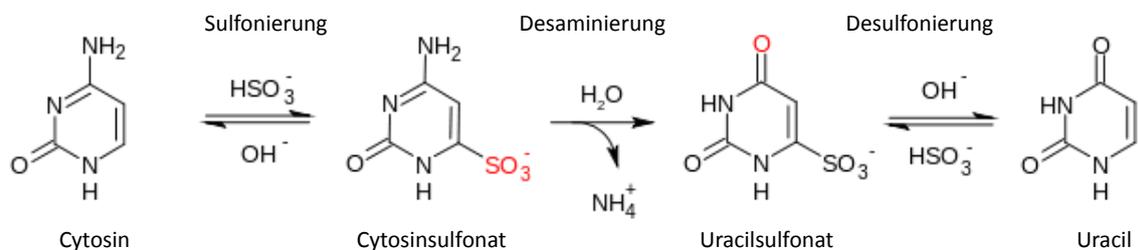


Abb. 6 Chemische Umwandlung von Cytosin in Uracil durch die Bisulfitkonvertierung. Nicht-methylierte Cytosine werden mit Natriumbisulfit durch Sulfonierung und Desaminierung in Uracilsulfonat umgewandelt. Anschließend erfolgt durch Desulfonierung die Konversion von Uracilsulfonat in Uracil.

2.2.19.2 Methylierungsspezifische PCR für die *GPER* Promotorregion

Für die spezifische Analyse der Methylierung des *GPER* Promotors wurde zunächst die *GPER* DNA Sequenz (NCBI Referenznummer NC_00007.13) auf CpG-Inseln in der 5'-Promotorregion untersucht. Mit Hilfe der Software MethPrimer¹⁸¹ konnte stromabwärts des *GPER* Translationsstarts, zwischen der Basenposition -4365 und -4797, eine CpG-reiche, potentiell methylierbare Promotorregion identifiziert werden (Abb. 7). Auf Grundlage dieser Sequenz wurden spezifische Primerpaare, die nur die methylierte bzw. die unmethylierte DNA Sequenz amplifizieren, synthetisiert.

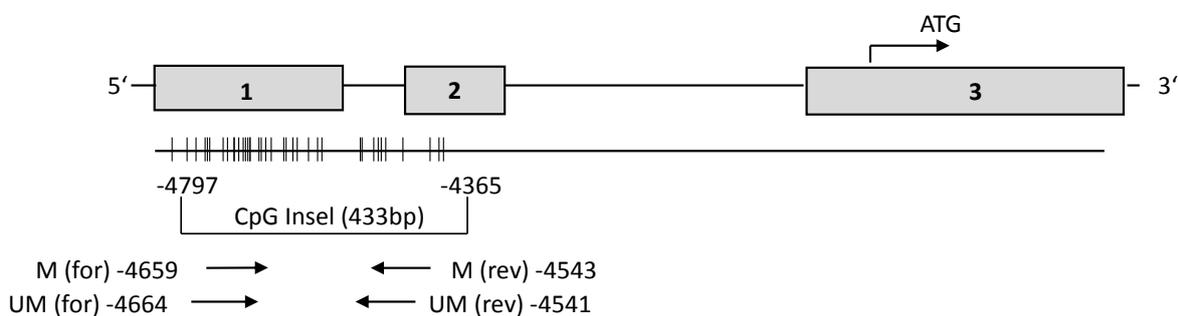


Abb. 7 Schematische Darstellung des *GPER* Gens mit proximaler Promotorregion und *GPER* Methylierungsanalyse mittels methylierungsspezifischer PCR. Dargestellt ist die potentielle 433 Basenpaar lange CpG-reiche Region (CpG Insel) des *GPER* Promotors zwischen Position -4365 und -4797 stromabwärts des Startcodons ATG. Einzelne CpGs sind durch vertikale Striche markiert. Die grauen Boxen zeigen die drei *GPER* Exons. Die Pfeile verdeutlichen die Position der MSP Primer (M, UM, Primer spezifisch für methylierte bzw. unmethylierte DNA Sequenz). Für die Analyse wurde die *GPER* DNA Sequenz zwischen Basenpaar 1126443-1133451 des 7. Chromosoms (NCBI Referenznummer NC_00007.13) herangezogen.

Die MSP besteht daher aus zwei individuellen PCR Reaktionen. Eine spezifisch für die methylierte DNA Sequenz und eine für die unmethylierte DNA Sequenz. Folgende Zusammensetzung wurde für beide PCR Reaktionen identisch angesetzt: 100 nmol/l spezifische vorwärts-und rückwärts Primer, 0,2 mmol/l dNTPs, 5 µl 5xPCR Puffer, 0,75 U GoTaq Polymerase und 100 ng Bisulfit-behandelte DNA in einem Endvolumen von 25 µl.

PCR Programm:	95 °C , 10 min	
	94 °C, 1 min	} 40 Zyklen
	55 °C, 1 min	
	72 °C, 1 min	
	72 °C, 10 min	

Für die Auswertung der PCR wurden 15 µl jedes PCR Ansatzes auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Die im elektrischen Feld für 5 h bei 30 V aufgetrennten PCR Proben wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Auswertung der MSP erfolgte als einfache positiv/negativ Entscheidung ohne quantitative Bestimmung der PCR Banden.

2.2.20 Statistik

Für die Ermittlung der Signifikanzen und graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism5 verwendet. Die statistische Auswertung der Patientendaten und die Erstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven erfolgte mit dem Programm SPSS 22.0. Alle *in vitro* Versuche wurden in mindestens drei unabhängigen Einzelversuchen in Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Auswertung der verbundenen, voneinander abhängigen Stichproben wurden zum Vergleich zweier Gruppen der gepaarte zweiseitige t-Test und zum Vergleich mehrerer Gruppen eine Varianzanalyse (ANOVA) genutzt. Die Durchführung der MTT-Tests erfolgte in Vierfachbestimmung. Graphisch wurde der Mittelwert der Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM) der Doppel- und Vierfachbestimmungen der Einzelversuche dargestellt. Die quantitative Auswertung der Proteinexpression bzw. PCR Produkte für GPER, Cyclin B1, CDK1, p53, Caspase-3 und AIF erfolgte nach Ermittlung der Fläche unter Kurve nach graphischer Verarbeitung der Bandenbilder der Blots und Agarosegele. Es wurden Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen gebildet und über den exemplarischen Protein- und DNA -banden gezeigt.

Die Bestimmung der effektiven Konzentration (EC_{50}) von G-1 erfolgte anhand einer logarithmischen Dosis-Antwort-Sigmoidfunktion. Als Kurvenanpassung wurde dabei die Methode der kleinsten Quadrate (*least squares*) angewendet.

Zur Prüfung der Korrelation wurde aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung der Werte der Spearman-Korrelationstest angewandt und damit der Rangkorrelationskoeffizient r_s ermittelt. Im Anschluss wurde zur Ermittlung einer Regressionsgeraden eine lineare Regression der Werte durchgeführt und als Gütemaß der Regression das Bestimmtheitsmaß R^2 ermittelt.

Die Verknüpfung zwischen dem GPER Methylierungsstatus und den verschiedenen Tumorcharakteristiken wurde mit Hilfe des χ^2 -Test (Pearson Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest) oder des exakten Fisher-Tests bestimmt. Die Überlebensraten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Kurven ermittelt. Die Gleichheit der Kurven wurde Anhand des Log rank Tests analysiert. Das primäre Outcome war das Gesamtüberleben. Das krankheitsfreie Überleben der Patienten wurde als sekundäres Outcome untersucht. Das Gesamtüberleben beinhaltet die Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem Tod der Patientin. Das krankheitsfreie Überleben wurde als die Zeit zwischen der Erstdiagnose und dem Rezidiv/Metastase der Erkrankung, dem Progress der Erkrankung oder dem Patiententod definiert. Die statistischen Analysen wurden zweiseitig und P -Werte von <0.05 wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der GPER Expression in vier verschiedenen Mammakarzinomzelllinien

3.1.1 Die vier verwendeten Mammakarzinomzelllinien exprimierten unterschiedliche Mengen GPER

Für die, in dieser Arbeit dargelegten, *in vitro* Versuche wurden vier verschiedenen Brustkrebszelllinien, nämlich MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 verwendet. Als *in vitro* Modell für verschiedene molekulare Mammakarzinomtypen, wiesen die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Hormon- und Wachstumsfaktorrezeptorexpressionen auf. Eine Zusammenfassung des Hormonrezeptorstatus der Zellen ist in Tab. 1 in Abschnitt 2.1.9 gezeigt. In Abb. 8 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der adhärent wachsenden Zelllinien dargestellt.

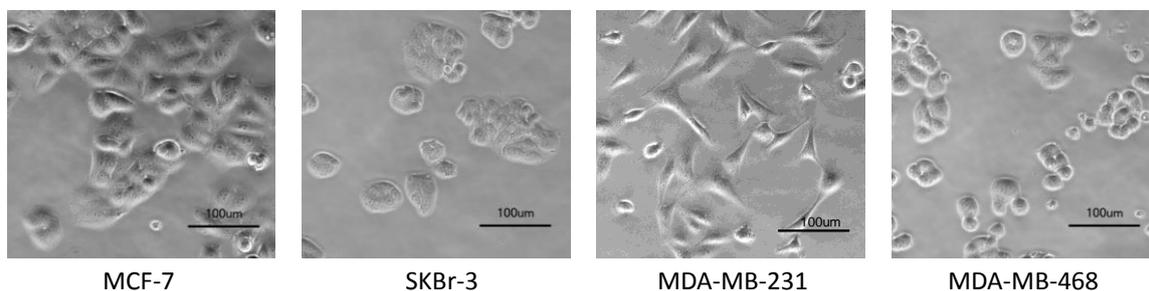


Abb. 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der vier Brustkrebszelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468. (Maßstabsbalken = 100 µM)

Zur genaueren Charakterisierung der Zelllinien wurden die relativen Expressionslevel von GPER in den vier verwendeten Brustkrebszelllinien sowohl auf Transkriptionsebene (mRNA) als auch auf Proteinebene bestimmt (Abb. 9). In allen vier Zelllinien konnte GPER nachgewiesen werden, wobei MCF-7 Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene die größte Menge an GPER exprimierten. Die triple-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 wies anhand der detektierten GPER Proteinmenge im Western Blot im Vergleich zu den anderen Zelllinien einen sehr geringen GPER Proteingehalt auf. Auf der Transkriptionsebene zeigten MDA-MB-231 hingegen eine annähernd so hohe GPER mRNA

Expression wie SKBr-3 (Abb. 9 C) und sogar eine höhere GPER Expression als in der anderen triple-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-468.

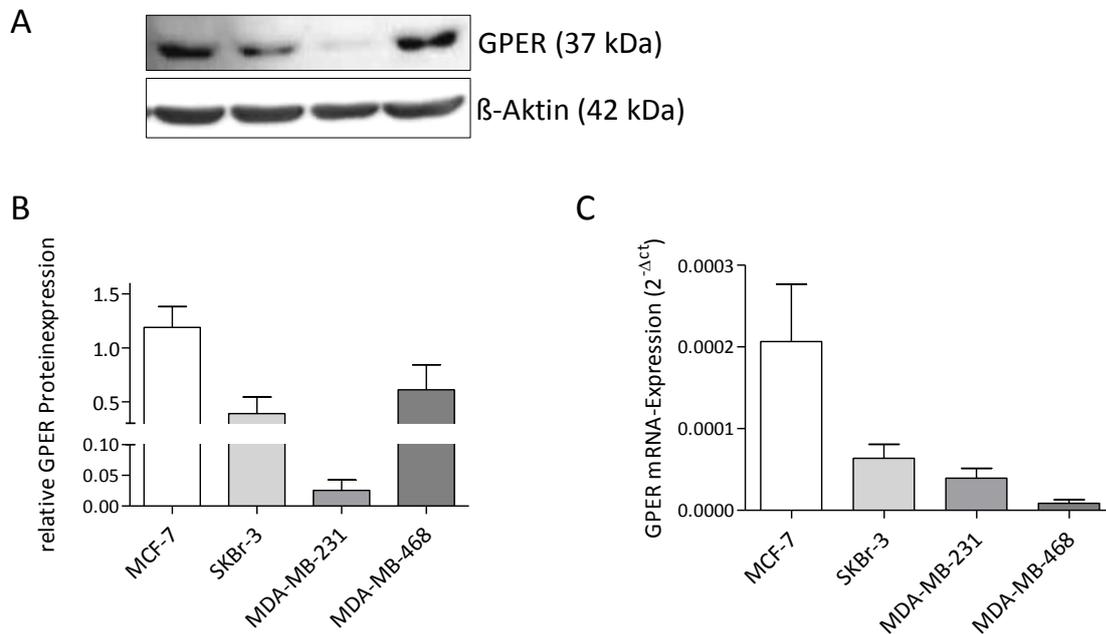


Abb. 9 Unterschiedliche Expression von GPER in den vier analysierten Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468. (A) exemplarische Proteinexpression von GPER und Referenzprotein β -Aktin im Western Blot. **(B)** Statistische Auswertung der relativen GPER Proteinexpression bezogen auf die Expression von β -Aktin (jeweils $n = 3$, Mittelwert mit SD). **(C)** mRNA Expression von GPER relativ zur mRNA Expression von β -Aktin (jeweils $n = 4$, Mittelwert mit SD).

3.1.2 GPER war in den Zelllinien vorrangig in kernnahen Bereichen und in der Zellmembran lokalisiert

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung konnte neben dem reinen Expressionsnachweis auch die Lokalisierung von GPER in den Zelllinien gezeigt werden. Wie für membrangebundene G-Protein gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren charakteristisch, war in der Zelllinie MCF-7 die Verankerung von GPER in der Zellmembran deutlich zu sehen. Bei den Zelllinien SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 konnte die GPER Membranexpression mit der einfachen Fluoreszenzmikroskopie nicht gezeigt werden. In allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien wurde GPER auch in der Nähe des Zellkerns nachgewiesen. Die unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierte Menge an GPER zeigte, bis auf die sehr starke GPER Expression in MCF-7, keine großen Unterschiede zwischen den

Brustkrebszelllinien. Als Kontrollzelllinie mit einer negativen GPER Expression wurde die humane Nierenzelllinie HEK293 verwendet. Diese Zelllinie zeigte wie zu erwarten eine kaum detektierbare GPER Expression. Exemplarische Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie sind in Abb. 10 dargestellt.

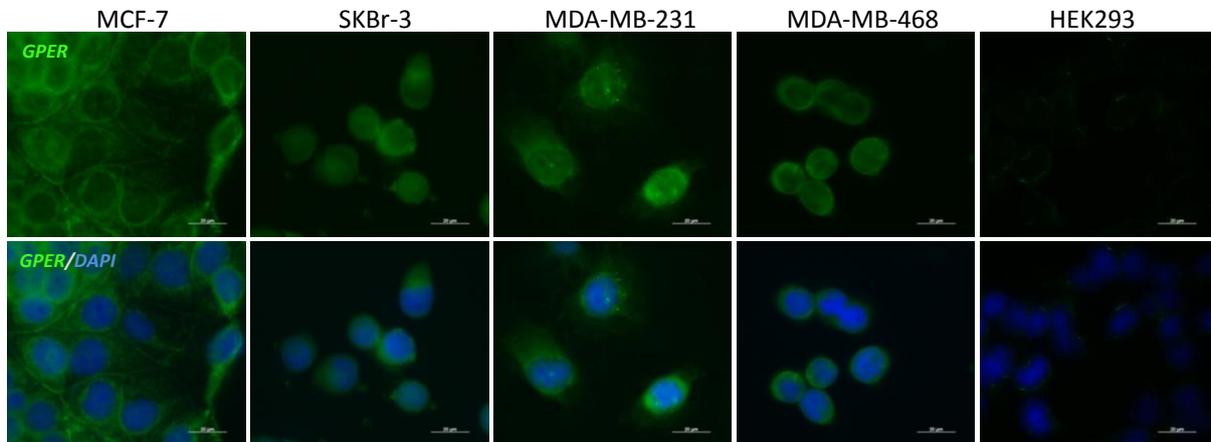


Abb. 10 Lokalisierung von GPER in Mammakarzinomzelllinien. Immunfluoreszenzfärbung von GPER (grün) in den vier verwendeten Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468, sowie der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293. In der unteren Reihe ist die GPER Färbung zusammen mit der DAPI Färbung der Zellkerne (blau) dargestellt. MCF-7 Zellen zeigten neben der zytoplasmatischen und kernnahen GPER Expression auch deutlich die Expression des Rezeptors in der Zellmembran. SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 exprimierten GPER in vergleichbaren Mengen im Zytoplasma und in unmittelbarer Nähe zum Zellkern. (Maßstabsbalken = 20 μ M)

3.2 Einfluss der spezifischen GPER Aktivierung auf Viabilität und Proliferation von Mammakarzinomzelllinien

3.2.1 Der spezifische GPER Agonist G-1 hemmte die Zellviabilität von Mammakarzinomzellen *in vitro*

Die bereits beschriebenen vier Mammakarzinomzelllinien wurden über einen Zeitraum von drei Tagen mit unterschiedlichen Dosen des spezifischen GPER Ligandes G-1 behandelt. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mit Hilfe eines MTT-Tests bestimmt. Um zusätzliche Effekte des im Kulturmedium enthaltenen Östrogens auszuschließen, wurden diese Experimente zum einen im normalen Kulturmedium und zum anderen in hormonfreiem Kulturmedium (phenolrotfreies DMEM/F12, Aktivkohle-behandeltes FBS) durchgeführt. Alle Zelllinien reagierten mit steigender G-1 Konzentrationen mit einer verminderten Zellviabilität (Abb. 11). Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für jede Zelllinie, in Abhängigkeit von Östrogen (E_2) im Medium, ist in Tab. 8 dargestellt. Die einzige Zelllinie, bei der es kaum Unterschiede zwischen den EC_{50} Konzentrationen von G-1 gab, war die ER-negative Zelllinie SKBr-3 (Abb. 11 B). Hier lagen die EC_{50} Konzentrationen von G-1 mit und ohne E_2 im Medium bei 2,8 μM bzw. 2,0 μM . Die östrogenabhängige Zelllinie MCF-7 zeigte sich unter normalen Kulturbedingungen (mit E_2) gegenüber G-1 wesentlich sensitiver ($EC_{50} = 1,3 \mu\text{M}$) als unter E_2 -freien Bedingungen ($EC_{50} = 6,7 \mu\text{M}$) (Abb. 11 A). Jedoch war die Gesamtproliferation der MCF-7 Zellen in hormonfreiem Medium aufgrund der Östrogenabhängigkeit der Zellen deutlich herabgesetzt. Die beiden triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 zeigten in Abhängigkeit vom Kulturmedium unterschiedliche Reaktionen auf G-1. Während MDA-MB-231 Zellen unter hormonfreien Bedingungen sensitiver auf G-1 reagierten ($EC_{50} = 3,2 \mu\text{M}$ bzw. 0,053 μM (E_2 -frei)) (Abb. 11 C), waren MDA-MB-468 Zellen unter normalen Kulturbedingungen sensitiver ($EC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ bzw. 1,2 μM (E_2 -frei)) (Abb. 11 D).

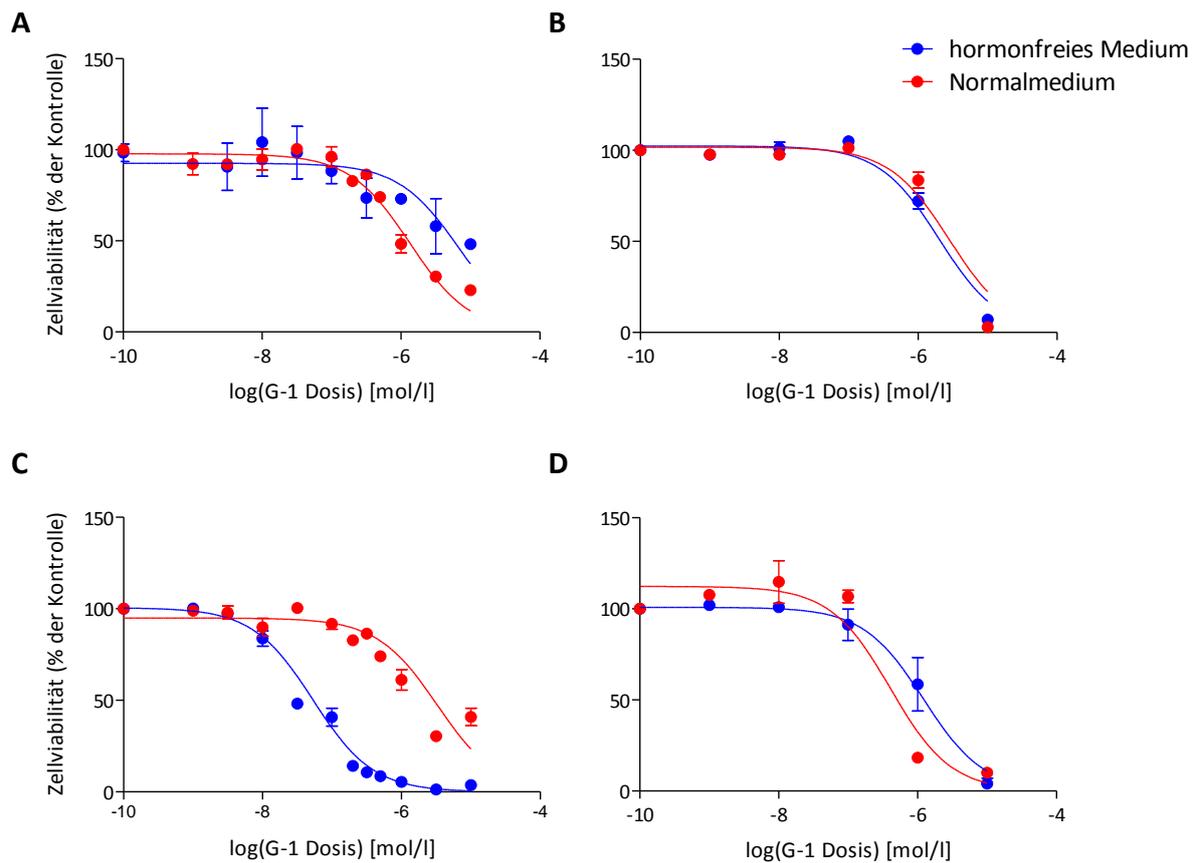


Abb. 11 GPER Aktivierung mit Hilfe des spezifischen GPER Agonisten G-1 resultierte in einer Dosis-abhängigen Verringerung der Zellviabilität. Dargestellt sind logarithmische Dosis-Wirkungskurven der Zellviabilität der vier Mammakarzinomzelllinien (A) MCF-7; (B) SKBr-3; (C) MDA-MB-231; (D) MDA-MB-468 nach 72 h Stimulation mit unterschiedlichen G-1 Konzentrationen. Die Zellviabilität wurde anhand eines MTT-Tests bestimmt. Die Versuche wurden zum einen unter normalen Zellkulturbedingungen und zum anderen in hormonfreiem Kulturmedium durchgeführt. Zur Kurvenanpassung wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewendet. Abgebildet sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 3-5$).

Tab. 8 Ermittelte effektive Konzentrationen (EC_{50}) von G-1 auf Mammakarzinomzelllinien in Abhängigkeit von Östrogen im Zellkulturmedium. EC_{50} Werte wurden anhand der Dosis-Wirkungs-Sigmoidfunktion mit Kurvenanpassung der kleinsten Quadrate ermittelt (Abb. 11)

Zelllinie	$EC_{50} + E_2$	$EC_{50} - E_2$
MCF-7	1,3 μ M	6,7 μ M
SKBr-3	2,8 μ M	2,0 μ M
MDA-MB-231	3,2 μ M	0,053 μ M
MDA-MB-468	0,4 μ M	1,2 μ M

Der negative Einfluss von G-1 zeigte sich auch durch „Todesanzeichen“ in der Morphologie der Tumorzellen. Lichtmikroskopisch konnte bereits nach 24 h G-1 Behandlung ein vermehrtes Abrunden, sowie ein Ablösen der Zellen vom Zellkulturgefäß beobachtet werden. In Abb. 12 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach 48 h Kultur mit 1 μ M G-1 gezeigt.

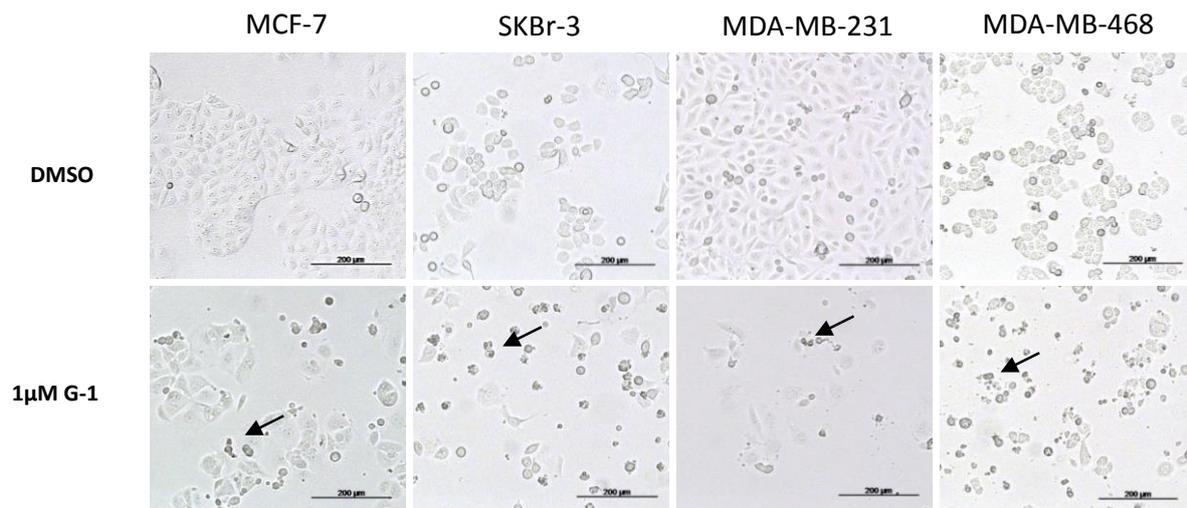


Abb. 12 Die Behandlung der Tumorzellen wirkte sich negativ auf die Morphologie der Tumorzellen aus. Dargestellt sind charakteristische lichtmikroskopische Aufnahmen nach 48 h Stimulation der Tumorzellen mit 1 μ M G-1. Kontrollzellen wurden mit DMSO behandelt. Die Pfeile deuten auf abgerundete und tote Zellen. (Maßstabsbalken = 200 μ M)

3.2.2 Die Sensitivität der Zelllinien bezüglich G-1 schien abhängig von der GPER Proteinexpression zu sein

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von GPER und der Sensitivität der Zelllinien gegen G-1 wurde anhand einer Korrelationsanalyse untersucht. Aufgrund der niedrigen Anzahl von vier Zelllinien ließ sich kein signifikanter Rangkorrelationskoeffizient ermitteln. Jedoch deuteten die Werte auf eine mögliche Verbindung beider Parameter in Abhängigkeit von Östrogen im Kulturmedium. Unter normalen Zellkulturbedingungen schien eine höhere GPER Proteinexpression mit geringeren EC_{50} G-1 Konzentrationen assoziiert zu sein (Abb. 13 A). Im Gegensatz dazu konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der GPER Expression und den EC_{50} Werten unter hormon- bzw. östrogenfreien Kulturbedingungen (Abb. 13 B) beobachtet werden.

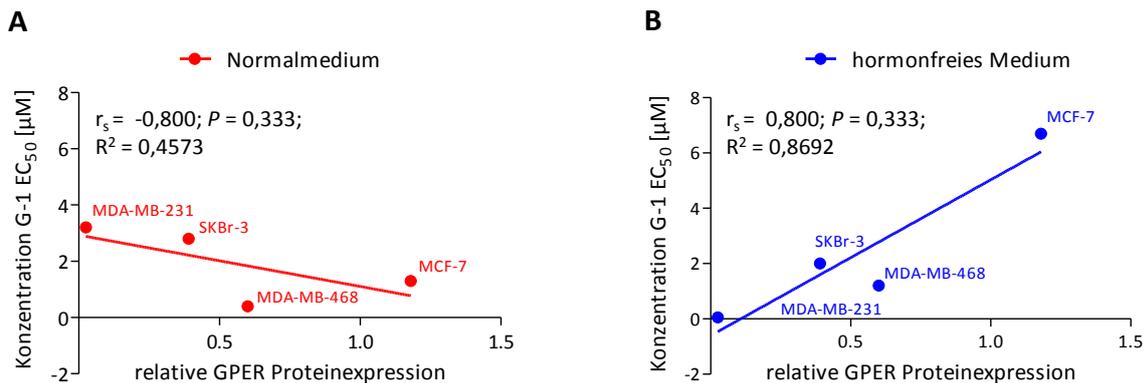


Abb. 13 Lineare Regressionsanalyse der Korrelation zwischen GPER Proteinexpression und G-1 Konzentration in Normalmedium (A) sowie in hormonfreiem Zellkulturmedium (B). R^2 Spearman's rank Korrelationskoeffizient.

3.2.3 Der GPER Antagonist G-15 hemmte den Effekt des GPER Agonist G-1

Um eine Aussage über die Proliferation der Zellen nach G-1 Stimulation treffen zu können, wurde die Zellzahl der Zelllinie MCF-7 nach drei Tagen G-1 Stimulation durch Auszählen der Zellen in der Neubauer Zählkammer bestimmt. G-1 verringerte die Zellzahl und damit die Proliferation der Zellen signifikant um rund 70 %. Für den Nachweis, dass der GPER Agonist G-1 spezifisch an GPER bindet, wurden die Ligandenbindungsstellen des Rezeptors vor der G-1 Stimulation für 4 h mit dem GPER Antagonist G-15 blockiert. Erst im Anschluss daran erfolgte die Ko-stimulierung von G-1 und G-15. Nach 72 h Inkubation mit Agonist und Antagonist wurde die Zellzahl in jedem Ansatz durch Zählen in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch die kompetitive Rezeptorhemmung wurde der Effekt von G-1 um rund 16 % vermindert (Abb. 14). Der Antagonist alleine wirkte sich nur leicht negativ auf die Zellzahl nach 72 h Inkubation aus.

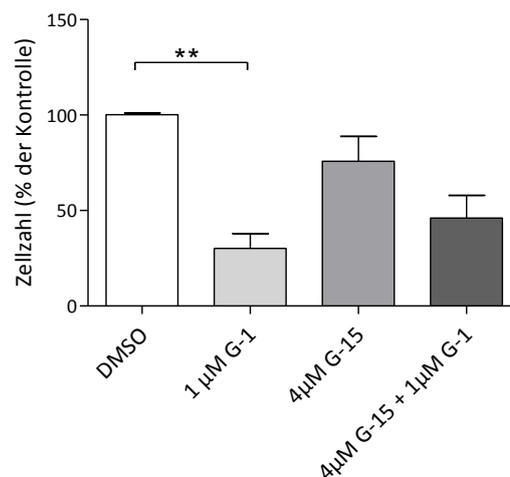


Abb. 14 Der GPER Antagonist G-15 verminderte die G-1 Hemmung der Zellproliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7. MCF-7 Zellen wurden für 4 h mit 4 µM G-15 prä-inkubiert bevor sie danach mit einem Gemisch aus 1 µM G-1 und 4 µM G-15 für drei Tage inkubiert wurden. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Versuchen dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Friedman Test gefolgt von Dunn`s Multiple Comparison Test; ** = $p < 0,01$

3.2.4 G-1 konnte die Proliferation und die Migration von Mammakarzinomzellen hemmen

Als ergänzenden Nachweis des Effektes von G-1 und G-15 auf die Proliferation und Migration von Brustkrebszellen wurde ein Wundheilungstest durchgeführt. Bei diesem Experiment wurde die von Zellen wieder bewachsene Fläche eines Zellkulturgefäßes nach Zuführen einer Wunde in den Zellrasen gemessen. Somit war eine zusätzliche Aussage über die Proliferation der Zellen möglich. Auch in diesem Test verminderte G-1 die Proliferation der Tumorzellen und damit die „Wundheilung“ signifikant. Während die mit DMSO behandelten Kontrollzellen innerhalb von 48 h eine Fläche von rund 59000 μm^2 bewachsen, schlossen die mit G-1 behandelten Zellen eine Fläche von nur rund 29000 μm^2 . Mit Hilfe des GPER Antagonisten G-15 ließ sich der negative Effekt von G-1 nahezu aufheben (zugewachsene Fläche 52000 μm^2) (Abb. 15). Im Gegensatz zu den in 3.2.3 gezeigten Versuchen, wurde in dem Wundheilungstest auf eine Vorinkubation von G-15 verzichtet. Um dennoch eine ausreichende kompetitive Hemmung von G-1 zu erreichen, wurde die G-15 Konzentration (10 μM) auf das 10-fache der G-1 Konzentration (1 μM) erhöht. Eine Behandlung mit 10 μM G-15 zeigt keinen Einfluss auf die Morphologie und Proliferation der MCF-7 Zellen. Charakteristische lichtmikroskopische Aufnahmen des Wundheilungstests sind in Abb. 16 dargestellt.

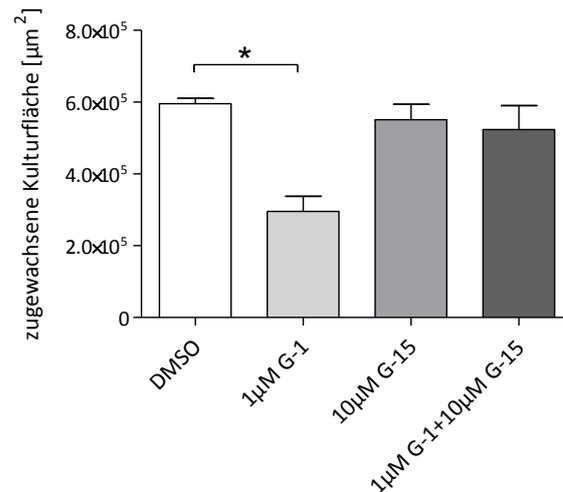


Abb. 15 Der GPER Agonist verminderte die Proliferation und Migration der MCF-7 Zellen signifikant. Der GPER Antagonist G-15 hob den Effekt von G-1 durch Blockierung der Ligandenbindungsstelle annähernd auf. Dargestellt ist die nach 48 h Stimulation mit 1 μM G-1 und 10 μM G-15 von MCF-7 Zellen zugewachsene Fläche des Kulturgefäßes. Statistische Auswertung von drei unabhängigen Versuchen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mittels Friedman Test gefolgt von Dunn's Multiple Comparison Test; * = $p < 0,05$

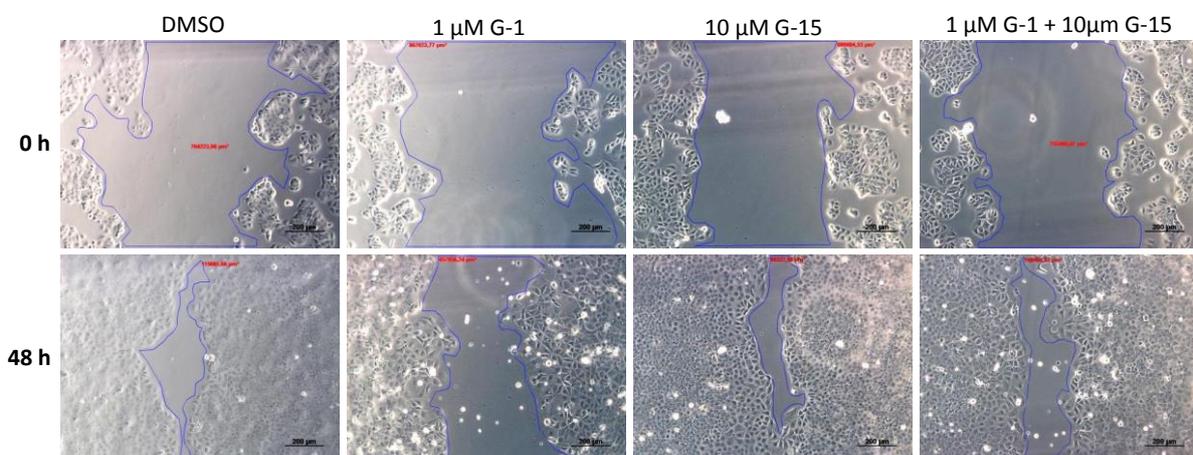


Abb. 16 G-1 Stimulation von MCF-7 Zellen resultierte in einer verringerten Wundheilung, welche durch zusätzliche Behandlung mit dem GPER Antagonisten G-15 verbessert wurde. Dargestellt sind charakteristische lichtmikroskopische Aufnahmen des Kratzers in der Zellschicht zum Zeitpunkt der Wundinduktion (0h) und nach 48 h Stimulation mit 1 μM G-1 und 10 μM G-15. Die zur statistischen Auswertung herangezogenen Flächen der Wunde sind mit einer blauen Linie umrandet und ihre Größe mit Hilfe der AxioVision Software (Zeiss) ermittelt. Maßstabsbalken = 200 μm .

3.2.5 Die Verringerung der GPER Expression in triple-negativen

Mammakarzinomzelllinien verminderte den negativen Effekt des GPER Agonisten

Für den Nachweis, dass der negative Effekt von G-1 spezifisch durch Bindung an GPER ausgelöst wird, wurde neben der Verwendung des GPER Antagonisten G-15 auch die GPER Expression in den Zelllinien gehemmt. Die Herunterregulation der GPER Proteinexpression durch siRNA konnte die Wirkung von G-1 in den beiden triple-negativen Mammakarzinomzelllinien (MDA-MB-231 und MDA-MB-468) nahezu aufheben (Abb. 17). Als Kontrolle wurden GPER negative HEK293 Zellen ebenfalls mit GPER siRNA behandelt. Diese Zellen zeigten weder auf G-1 noch auf die GPER siRNA eine Reaktion (Abb. 17). Um unspezifische Effekte der GPER siRNA auszuschließen, wurde jede Zelllinie auch mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt. Zellen, die mit dieser Kontroll-siRNA behandelt wurden, reagierten ähnlich auf G-1 wie Zellen ohne siRNA Behandlung. Als Nachweis für die Funktionsfähigkeit der GPER-siRNA wurde die GPER Proteinmenge 48 h nach Behandlung mit siRNA bestimmt (Abb. 17 B). Die siRNA Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Zoya Ignatova in der Abteilung Biochemie in Potsdam.

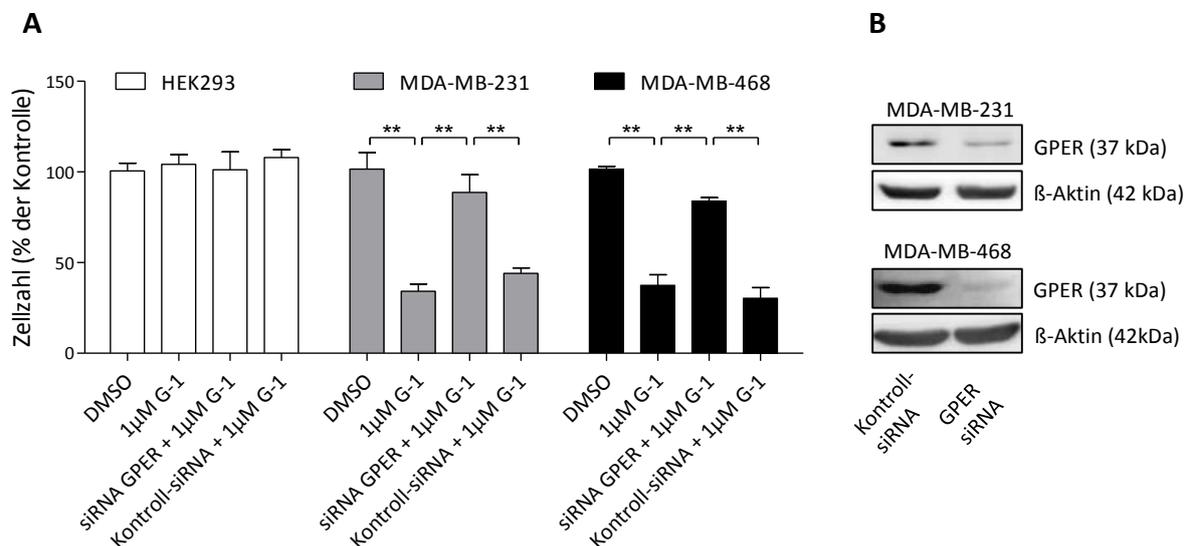


Abb. 17 Herunterregulation von GPER mit GPER siRNA minimierte den anti-proliferativen Effekt des GPER Agonisten G-1. (A) HEK293, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 wurden transient mit GPER siRNA transfektiert und 48 h nach siRNA Behandlung für weitere 72 h mit 1 μ M G-1 stimuliert. Dargestellt sind, zu unbehandelten Kontrollzellen relativierte, Zellzahlen von HEK293, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 nach drei unabhängigen siRNA Versuchen (Mittelwert \pm SD). Der paarweise Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit gepaartem t-Test, ** = $p < 0,01$ **(B)** Charakteristische Western Blots der GPER Proteinmenge 48 h nach Behandlung mit GPER siRNA.

3.2.6 G-1 induzierte einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase

Nachdem gezeigt werden konnte, dass G-1 die Proliferation der Mammakarzinomzellen hemmt, wurde der Effekt von G-1 auf den Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie untersucht. Beispielhistogramme der Zellzyklusanalyse sind in Abb. 18 gestellt. In Abb. 19 sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse für die einzelnen Zelllinien dargestellt. Alle vier Zelllinien zeigten spätestens nach 48 h G-1 Stimulation eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in der Sub-G₁-Phase. Zellen, die der sub-G₁ Population der Zellzyklusmessung zuzuordnen waren, konnten aufgrund ihres verringerten DNA Gehaltes als tote, apoptotische Zellen bezeichnet werden. Während es bei MCF-7 und SKBr-3 Zellen keine großen Unterschiede an Zellen in der G₀/G₁-Phase gab, konnten bei den beiden TNBC Zelllinien nach 48 h G-1 rund 30 % weniger Zellen in dieser Phase detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten MCF-7 und SKBr-3 nach G-1 Stimulation weniger Zellen in der DNA-Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus (Abb. 19). Allen vier Zelllinien ist gemeinsam, dass es durch die Behandlung mit G-1 zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase kam. Die dargestellten Versuche wurden unter normalen Zellkulturbedingungen, ohne Östrogenzug im Medium durchgeführt.

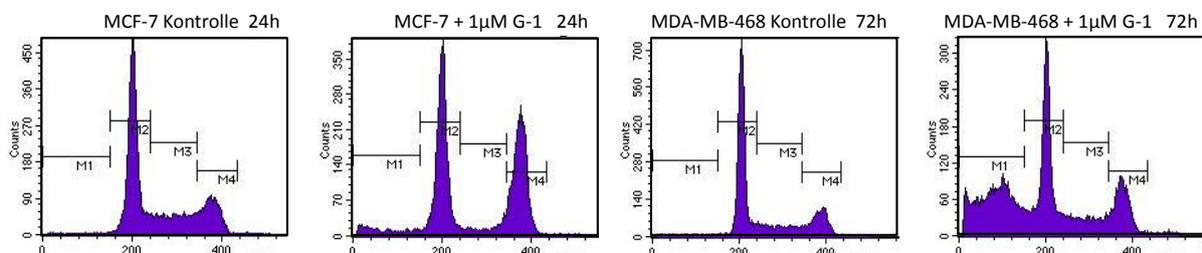


Abb. 18 Charakteristische Histogramme der Zellzyklusanalyse zeigten Unterschiede in der Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen. Nach 24 h G-1 Stimulation zeigten MCF-7 Zellen einen deutlichen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase sowie eine erhöhte Anzahl an Zellen in der sub-G₁-Phase und eine verringerte Anzahl an Zellen in der Synthesephase. MDA-MB-468 zeigten nach 72 h eine sehr hohe Anzahl an Zellen in der sub-G₁-Phase, sowie einen Anstieg in der G₂/M-Phase.

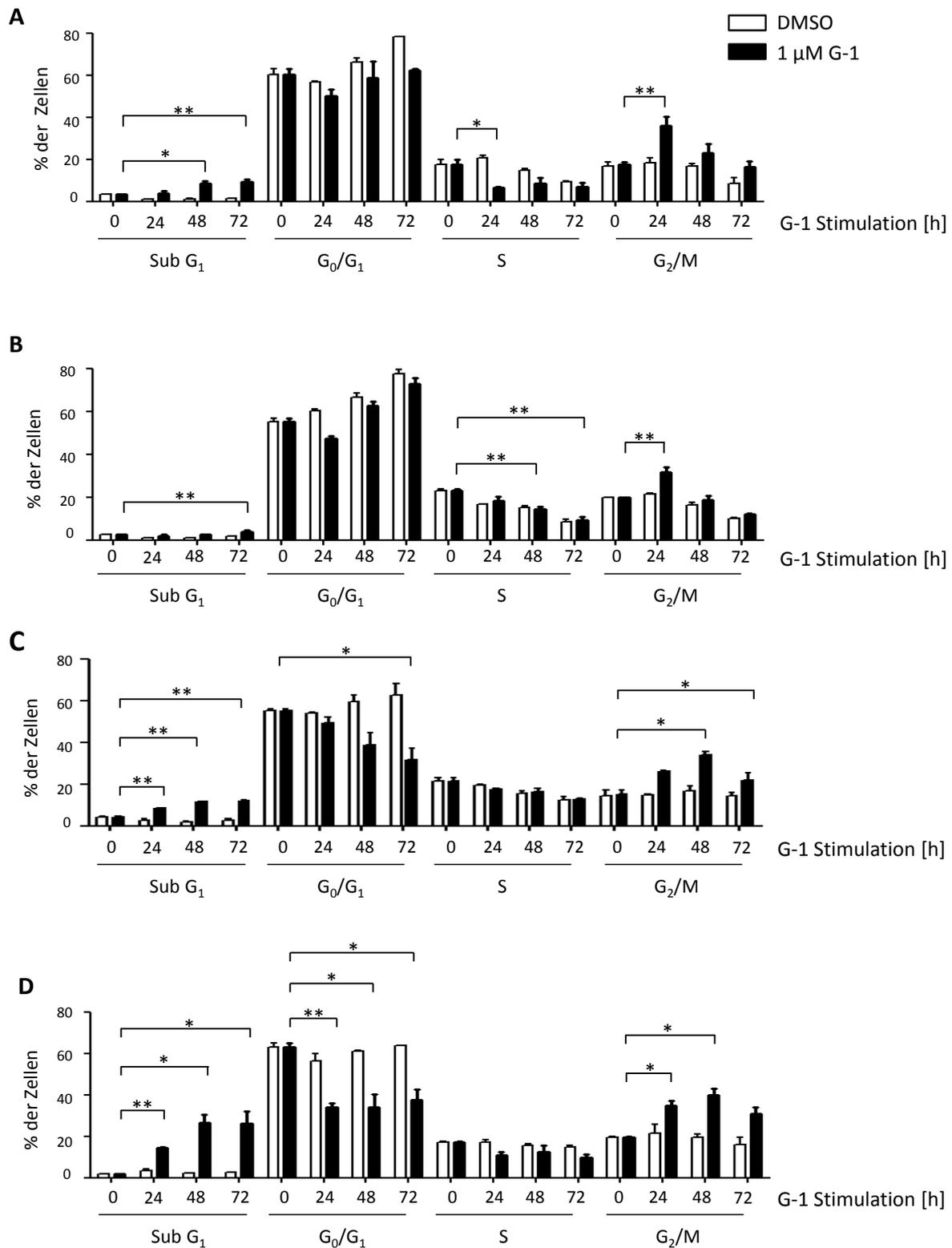


Abb. 19 Die Zellzyklusanalyse der Mammakarzinomzelllinien (A) MCF-7, (B) SKBr-3, (C) MDA-MB-231 und (D) MDA-MB-468 zeigte eine unterschiedliche Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen nach G-1 Behandlung. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus 3-4 Versuchen dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen erfolgte mit dem gepaarten t-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.2.7 G-1 verringerte die Expression von Cyclin-B1 und der Cyclin-abhängigen Kinase 1 in MCF-7 und SKBr-3

Da Anhand der Zellzyklusanalyse gezeigt werden konnte, dass es nach G-1 Stimulation der Mammakarzinomzellen *in vitro* zu einer Anhäufung der Zellen in der G₂/M-Phase des Zellzyklus kommt, wurde die Expression der für den Übergang von der G₂-Phase in die Mitosephase verantwortlichen Proteine, Cyclin B1 und CDK1, bestimmt. In einem normalen Zellzyklus steigt die Cyclin B1 Expression beginnend in der S-Phase während der gesamten G₂-Phase ständig an. Mit Eintritt in die Mitosephase kommt es zu einem rapiden Abfall der Cyclin B1 Expression¹⁸². MCF-7 und SKBr-3 Zellen zeigten nach 48 h und 72 h G-1 Stimulation eine deutlich niedrigere Expression beider Proteine. Diese Beobachtung deutete auf einen Arrest der Zellen in der Mitosephase. In den beiden TNBC Zelllinien war diese Herunterregulierung nicht zu beobachten. Exemplarische Western Blots für Cyclin B1 und CDK1 sind in Abb. 20 dargestellt.

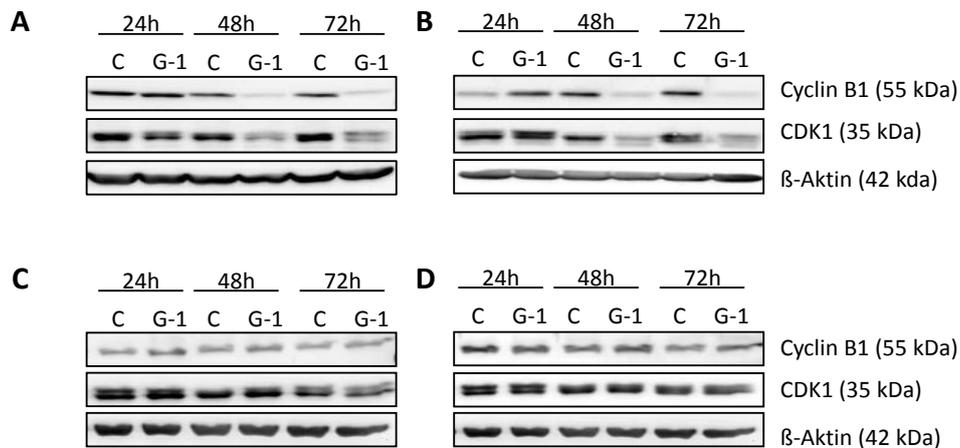


Abb. 20 G-1 verringert die Proteinexpression von Cyclin B1 und CDK1 in MCF-7 und SKBr-3, aber nicht in TNBC Zellen. Dargestellt sind charakteristische Western Blots für die Expression von Cyclin B1 und CDK1 sowie dem Referenzprotein β-Aktin nach der Stimulation der Mammakarzinomzellen (A) MCF-7, (B) SKBr-3, (C) MDA-MB-231 und (D) MDA-MB-468 mit 1 μM G-1 (G-1). Kontrollzellen (C) wurden mit DMSO behandelt. Die Versuche wurden in hormonfreiem Medium in unabhängigen Versuchen dreimal durchgeführt.

3.2.8 G-1 erhöhte die Phosphorylierung des Histons H3 an Position Serin 10

Neben den zellzyklusspezifischen Cyclin B1 und CDK1 wurde auch die Phosphorylierung von Histon H3 an der Aminosäure Serin 10 im Western Blot analysiert. Die Serin 10 Phosphorylierung spricht für den Eintritt der Zellen in Mitosephase, da sie eine wichtige Voraussetzung für die Chromosomenkondensation in der Prophase ist¹⁸³. Alle untersuchten Mammakarzinomzelllinien zeigten bereits nach 6 h Stimulation mit 1 μ M G-1 eine stark erhöhte Phosphorylierung des Histons H3 (Abb. 21). In MCF-7 und MDA-MB-468 Zellen konnte die erhöhte Histon H3 Phosphorylierung bereits nach 1 h beobachtet werden (Abb. 21 A und D).

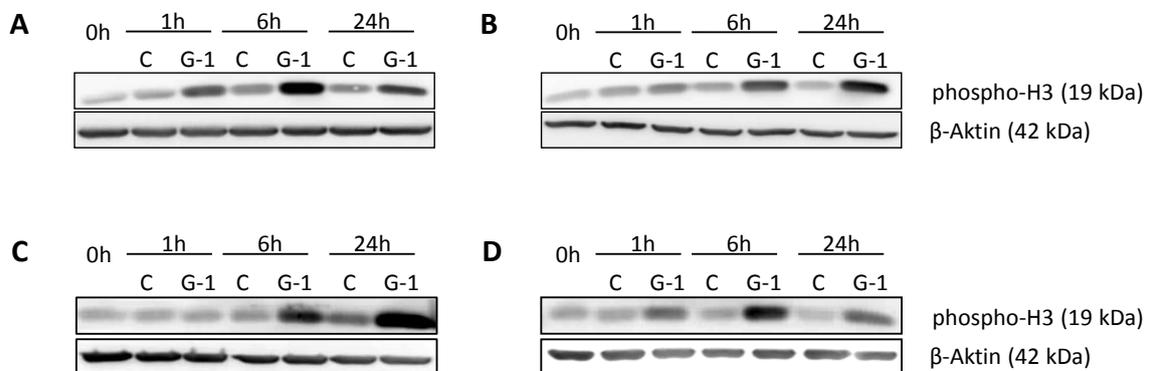


Abb. 21 G-1 erhöhte die Expression von phosphoryliertem Histon H3 bereits nach wenigen Stunden. Gezeigt sind charakteristische Western Blots für die Expression von phospho-Histon H3 (Ser10), sowie dem Referenzprotein β -Aktin nach Stimulation von (A) MCF-7, (B) SKBr-3, (C) MDA-MB-231 und (D) MDA-MB-468 mit 1 μ M G-1. Die Versuche wurden in hormonfreiem Medium in unabhängigen Versuchen dreimal durchgeführt.

3.2.9 GPER Stimulation mit G-1 induzierte den programmierten Zelltod von Tumorzellen

Die Anhäufung von toten Zellen in der Sub-G₁-Phase des Zellzyklus ließ vermuten, dass eine spezifische GPER Aktivierung der Zellen diese zum Sterben veranlasst. Für die genaue Untersuchung des Zelltods wurden die Zellen zusätzlich zu PI auch mit dem Apoptosemarker Annexin V gefärbt und die beiden Signale im Durchflusszytometer gemessen. Diese Doppelfärbung ermöglicht die Identifizierung von apoptotischen Zellen anhand des,

während der Apoptose stattfindenden, Membranumbaus. Alle vier Mammakarzinomzelllinien zeigten nach 48 h Behandlung mit 1 μ M G-1 eine erhöhte Anzahl an Annexin V positiven apoptotischen Zellen (Abb. 22). Am stärksten äußerte sich der Effekt von G-1 auf die Apoptose von MDA-MB-468 Zellen. Hier vervierfachte sich die Menge an apoptotischen Zellen nach 48 h G-1 Stimulation in Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen.

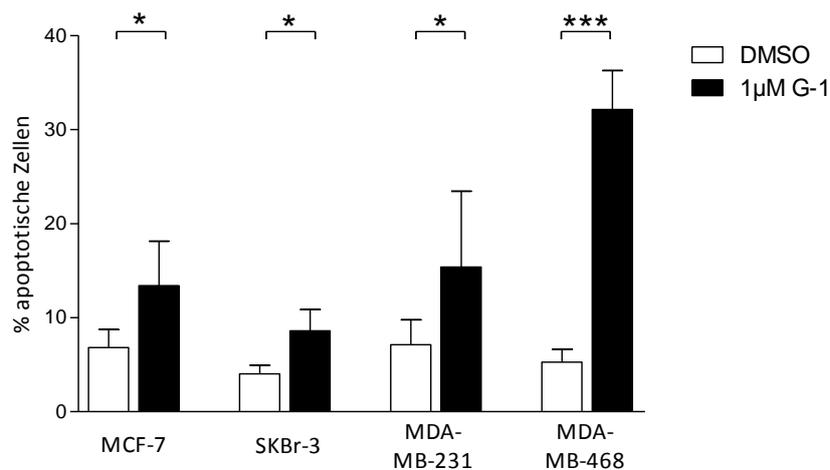


Abb. 22 G-1 erhöhte die Anzahl an Annexin V positiven, apoptotischen Zellen signifikant. Gezeigt ist die Anzahl an apoptotischen Zellen nach Messung des Annexin V und PI Signals im Durchflusszytometer nach 48 h G-1 Stimulation. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt. Gepaarter t-Test. $p < 0,05 = *$; $p < 0,001 = ***$

Zusätzlich zur Apoptosefärbung im Durchflusszytometer wurde die Proteinexpression der Effektorcaspase-3 und deren ungeschnittener Vorstufe Procaspase-3 im Western Blot bestimmt (Abb. 23). Die beiden TNBC Zelllinien zeigten nach 48 h G-1 Stimulation eine deutliche Proteinexpression der aktiven Caspase-3, sowie eine stark erhöhte Expression des Zymogens. In der Zelllinie SKBr-3 konnte nach G-1 Stimulation eine erhöhte Expression der Procaspase-3 beobachtet werden. Es konnte jedoch keine durch G-1 induzierte aktivierte Caspase-3 nachgewiesen werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben¹⁶⁶, war die Expression der Caspase-3 in MCF-7 Zellen aufgrund einer Mutation im Caspase-3 Gen nicht nachweisbar.

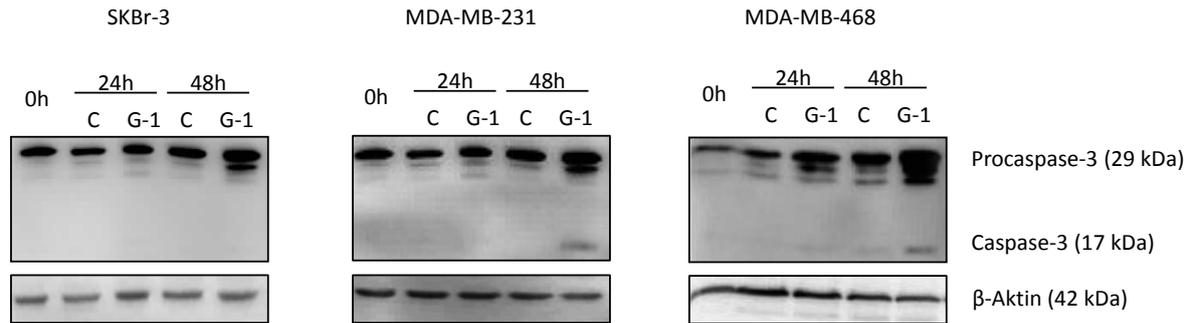


Abb. 23 G-1 induzierte die Expression der Effektorcaspase-3 und ihrer inaktiven Vorstufe Procaspase-3.

Dargestellt sind exemplarische Western Blots für Caspase-3 (Procaspase-3, 29 kDa, Caspase-3, 12 kDa) und dem Referenzprotein β -Aktin (42 kDa) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Zelllinien SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 wurden für 24 h und 48 h mit 1 μ M G-1 stimuliert. Kontrollzellen (C) wurden mit DMSO behandelt.

3.2.10 GPER vermittelte die Apoptose nicht über die Aktivierung eines Caspase-unabhängigen Apoptosewegs

Da die MCF-7 Zellen aufgrund der Basendeletion im Caspase-3 Gen keine Caspase-3 exprimieren¹⁶⁶, wurde die Möglichkeit der Aktivierung eines Caspase-unabhängigen Apoptosewegs durch GPER untersucht. Hierfür erfolgte die Bestimmung der Expression des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF), dem Schlüsselprotein des Caspase-unabhängigen Apoptosewegs, nach 24 h und 48 h Stimulation mit 1 μ M G-1 durch Quantifizierung der AIF Proteinmenge im Western Blot. Es konnte gezeigt werden, dass MCF-7 Zellen AIF exprimieren. Jedoch kam es durch Aktivierung von GPER weder zu einer erhöhten AIF Expression (67 kDa), noch konnte die Expression der aktiven Form von AIF (57 kDa) gezeigt werden (Abb. 24). Dies spricht gegen die Auslösung der Apoptose über den Caspase-unabhängigen Apoptoseweg durch GPER.

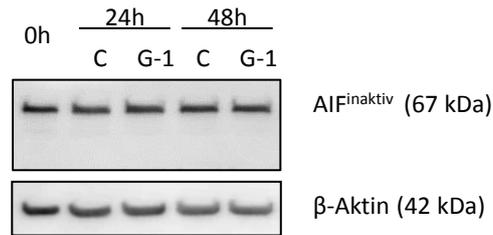


Abb. 24 Die Aktivierung von GPER in MCF-7 Mammakarzinomzellen veränderte die Expression von AIF nicht.

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die Expression von AIF (67 kDa) in MCF-7 nach 1 μM G-1 Stimulation. Als Referenz wurde die Expression von β-Aktin in den Proben bestimmt. Eine zweite Bande (57 kDa) für die Detektion der aktiven Form von AIF konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.11 G-1 induzierte die Expression des Tumorsuppressors p53

Da gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von GPER in Mammakarzinomzellen sowohl die Proliferation der Zellen hemmt, als auch den Zelltod durch die Aktivierung der Apoptose einleitet, wurde nach einem intrazellulären Mediator und down-stream Effektor von GPER gesucht. Einer der bekanntesten Tumorsuppressorproteine ist p53¹⁸⁴. Als ein wichtiges Regulatorprotein des Zellzyklus ist p53 in der Lage den Zelltod durch Apoptose zu induzieren. Im Western Blot wurde die Proteinexpression von p53 nach GPER Aktivierung mit G-1 untersucht. In allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien kam es nach 48 h G-1 Stimulation zu einer Erhöhung der p53 Proteinexpression (Abb. 25).

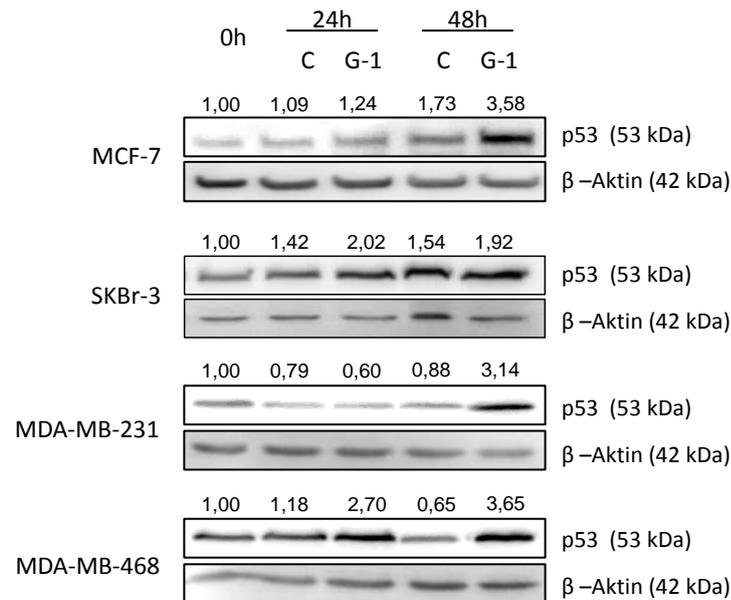


Abb. 25 Die GPER Aktivierung induzierte die Proteinexpression des Tumorsuppressors p53. Gezeigt sind charakteristische Western Blots des Tumorsuppressors p53 nach Stimulation der Mammakarzinomzellen MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-Mb-468 mit 1 μ M G-1 (G-1). Die entsprechenden Kontrollzellen (C) wurden mit DMSO behandelt. Als Referenzprotein wurde die Expression von β -Aktin bestimmt. Die Zahlen über den Proteinbanden stellen den Mittelwert der relativen Expression von p53 aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die p53 Expressionswerte wurden für jede Zelllinie auf den 0 h Wert normiert.

3.2.12 Radioaktive Strahlung erhöhte die Expression von GPER in Abhängigkeit des funktionstüchtigen Tumorsuppressors p53

Durch die Behandlung von lebenden Zellen mit radioaktiver Strahlung entstehen Schäden in der DNA der bestrahlten Zellen. Diese DNA Fehler induzieren die Expression von p53, welches dann als Transkriptionsfaktor entweder die Reparatur der DNA veranlasst oder die Apoptose der Zellen auslöst¹⁸⁵.

Mit Hilfe der RT-PCR wurden die mRNA Expressionslevel von GPER in den beiden TNBC Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 sowie in der Zelllinie MCF-7 nach unterschiedlichen Dosen von radioaktiver Strahlung (0, 2, 5, 10 Gy) bestimmt. Bei diesem Versuch war die Expression von funktionalem p53 in den einzelnen Zelllinien von besonderer Bedeutung. Während MCF-7 Zellen ein intaktes, funktionsfähiges p53 exprimieren, weisen MDA-MB-231 und MDA-MB-468 ein fehlerhaftes, mutiertes p53¹⁸⁶ auf. Als zusätzliche

Kontrolle wurde p53 in MCF-7 Zellen durch siRNA ausgeschaltet. Die siRNA Herunterregulierung von p53 fand in Kooperation mit der Potsdamer Arbeitsgruppe für Biochemie unter der Leitung von Prof. Zoya Ignatova statt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die GPER mRNA Menge 48 h nach Bestrahlung der einzelnen Zelllinien verändert (Abb. 26). Die beiden TNBC Zelllinien zeigten nach der Bestrahlung mit 5 Gy und 10 Gy eine signifikante Erhöhung der GPER Expression. MCF-7 Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine signifikante Verringerung der GPER Transkription. MCF-7 Zellen mit verringerter p53 Expression (MCF-7-p53 neg) wiesen ähnlich der TNBC Zelllinien einen erhöhten GPER mRNA Spiegel nach Bestrahlung mit 5 Gy auf (Abb. 26).

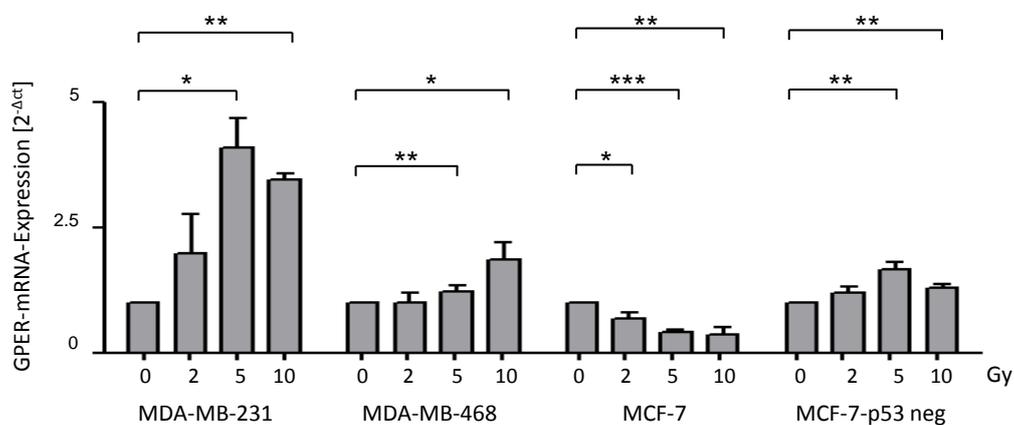


Abb. 26 Radioaktive Strahlen veränderten die GPER mRNA Expression in Abhängigkeit des Tumorsuppressorproteins p53. Dargestellt ist die GPER mRNA Expression relativ zum Referenzmolekül β -Aktin 48 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen (0, 2, 5 und 10 Gy). In den TNBC Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 konnte eine dosisabhängige Erhöhung der relativen GPER Expression gezeigt werden. MCF-7 Zellen reagierten mit einer verringerten GPER Expression auf die Bestrahlung. Durch Ausschalten von p53 mit Hilfe von siRNA (MCF-7-p53 neg) wurde der Effekt der Bestrahlung in MCF-7 aufgehoben. MCF-7-p53 neg Zellen reagierten ähnlich wie die beiden Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 mit einer erhöhten GPER mRNA Expression auf die radioaktiven Strahlen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Der paarweise Vergleich der einzelnen Gruppen erfolgte mit mittels t-Test. $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$.

Weiterhin wurde die Expression von p53 in Abhängigkeit der radioaktiven Strahlung untersucht (Abb. 27). Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Mit steigender Konzentration der Bestrahlung wurde eine signifikante Erhöhung der p53 Proteinexpression in allen 3 Zelllinien beobachtet.

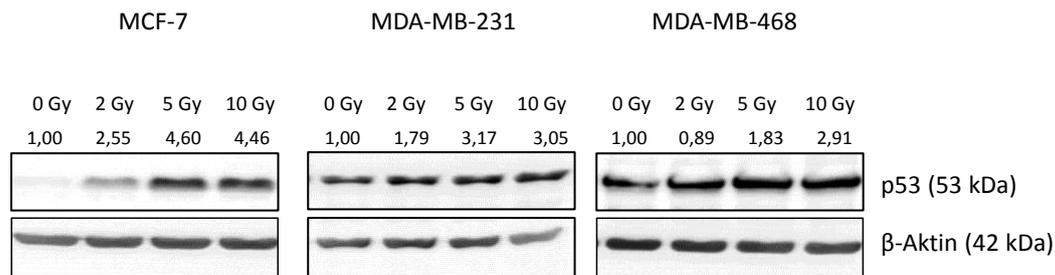


Abb. 27 Radioaktive Strahlen erhöhten die Proteinexpression von p53 in den Mammakarzinomzelllinien.

Gezeigt sind repräsentative Westen Blots für p53 und dem Referenzprotein β -Aktin 48h nach Strahlenbehandlung. Die Zahlen über den Proteinbanden stellen den Mittelwert der relativen Expression von p53 aus drei unabhängigen Versuchen dar. Die p53 Expressionswerte wurden für jede Zelllinie auf den 0 Gy Wert normiert.

3.3 Untersuchungen zur Methylierung der GPER Promotorsequenz

Die bis hierhin gezeigten Daten ließen vermuten, dass GPER eine potentielle Rolle als Tumorsuppressor im Mammakarzinom spielt. Wichtige Mechanismen zur Ausschaltung verschiedener Tumorsuppressoren stellen neben den genetischen Modifikationen epigenetische Prozesse dar. Für den klassischen Östrogenrezeptor ER α wurde eine epigenetische Regulation bereits beschrieben¹⁸⁷. In diesem Kontext wurde der Methylierungszustand des GPER Promotors sowohl in Mammakarzinomzelllinien als auch in Brustkrebspatientinnen analysiert.

3.3.1 Inhibierung der DNA-Methyltransferase durch 5-Aza-2'-desoxycytidin erhöhte die Expression von GPER

Wie bereits beschrieben exprimieren MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 Zellen unterschiedliche Mengen an GPER (siehe 3.1.1). Um herauszufinden, ob GPER in den Mammakarzinomzelllinien methyliert ist, wurden die Zellen mit 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) behandelt. Als Analogon zu Desoxycytidin wirkt das synthetische Nukleosid Aza als Inhibitor der DNA-Methyltransferase-1, wodurch teilende Zellen unspezifisch demethyliert werden¹³⁸. Nach Behandlung der Zellen für 24 h und 48 h mit 5 μ M Aza konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von GPER in allen vier untersuchten Zelllinien durch die Inhibierung der DNA-Methyltransferase signifikant erhöht wurde (Abb. 28).

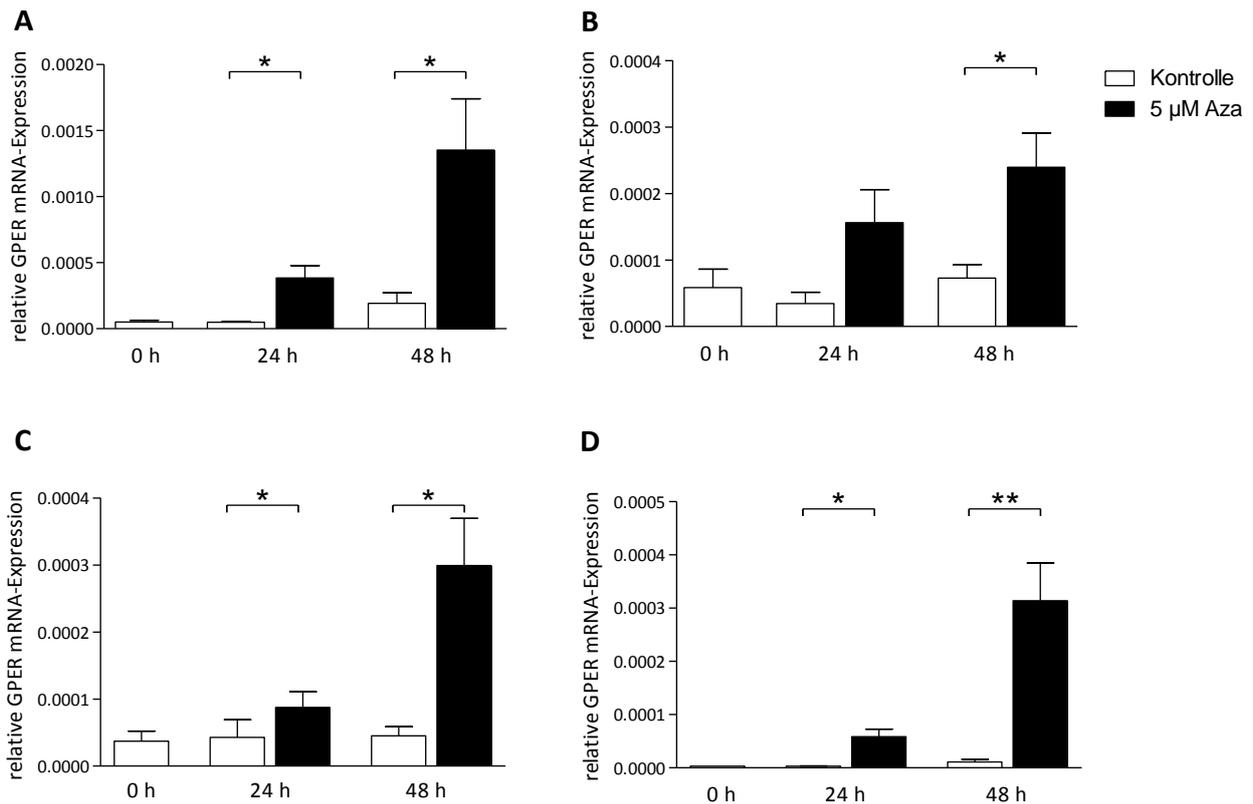


Abb. 28 Die Inhibierung der DNA-Methyltransferase-1 durch 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) erhöhte die mRNA Expression von GPER statistisch signifikant. (A) MCF-7, (B) SKBr-3, (C) MDA-MB-231 und (D) MDA-MB-468 Zellen wurden für 24 h und 48 h mit 5 µM Aza behandelt. Kontrollzellen wurden mit 0,005 % Essigsäure kultiviert. Dargestellt sind die relativen mRNA Expressionslevel von GPER aus drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SD; gepaarter t-Test, * = $p < 0,05$)

3.3.2 5-Aza-2'-desoxycytidin erhöhte den inhibitorischen Effekt von G-1 auf die Zellviabilität von Mammakarzinomzellen *in vitro*

In einem weiteren Versuch wurde die Auswirkung einer veränderten Genexpression als Folge der Demethylierung mit Aza Behandlung in Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden Mammakarzinomzellen nach 48 h Vorinkubation mit 5 µM Aza, zusätzlich für 72 h mit 1 µM G-1 behandelt. Mit Hilfe eines MTT-Tests wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die kombinierte Gabe von Aza und G-1 erhöht den inhibitorischen Effekt von G-1 auf die Zellviabilität verglichen zu den Zellen, die nur mit einer der beiden Substanzen behandelt wurden (Abb. 29). In diesem Versuch konnte außerdem beobachtet werden, dass die beiden TNBC Zelllinien wesentlich sensitiver auf die DNA-Demethylierung durch 5 µM Aza sowie G-1

Stimulation reagierten als die beiden anderen untersuchten Zelllinien MCF-7 (Luminal A) und SKBr-3 (HER2/neu positive Zellen).

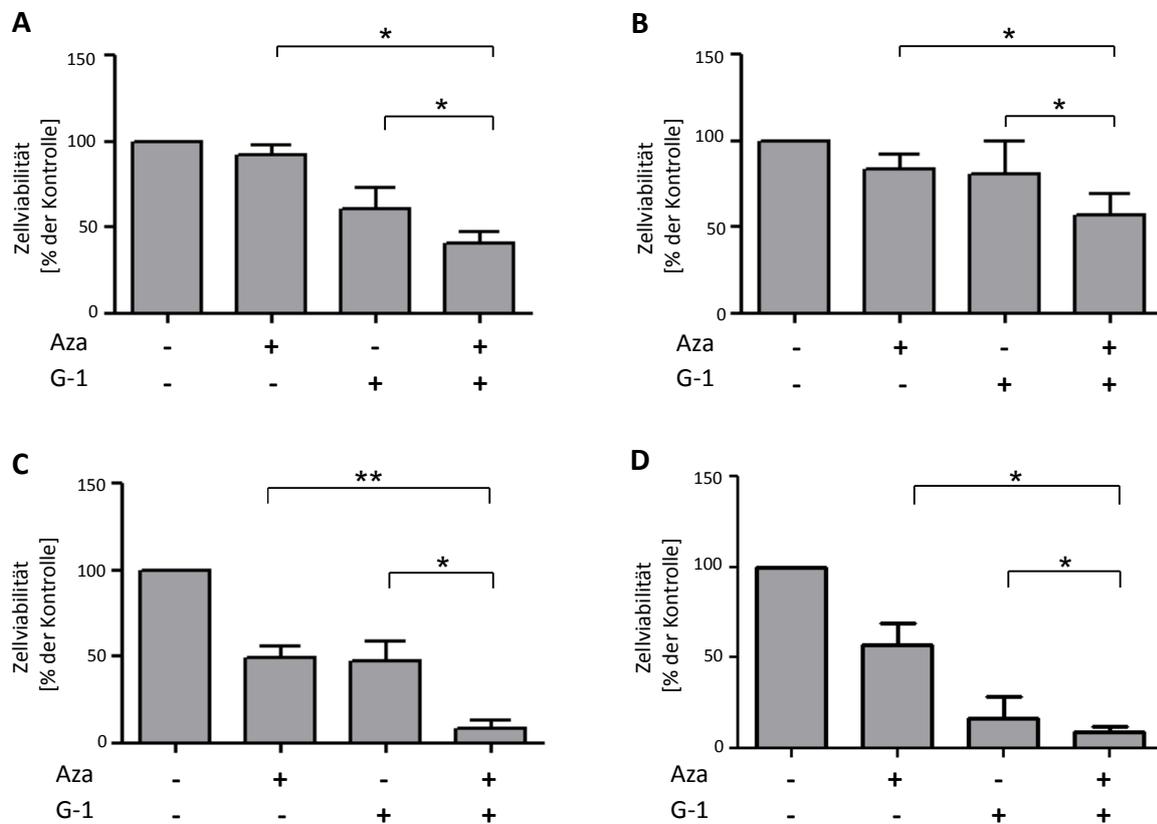


Abb. 29 Die kombinierte Gabe von Aza und G-1 bewirkte, verglichen mit den Einzelsubstanzen, eine **signifikant verringerte Zellviabilität in Mammakarzinomzelllinien**. Die Zellen wurden 48 h mit 5 μ M Aza vorinkubiert, und anschließend mit 1 μ M G-1 für 72 h stimuliert. Die Daten des MTT-Zellviabilitätstest sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt (n=3). Gezeigt sind die Versuche in den vier verschiedenen Mammakarzinomzelllinien **(A)** MCF-7, **(B)** SKBr-3, **(C)** MDA-MB-231 und **(D)** MDA-MB-468. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten t-Test, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

3.3.3 Identifizierung eines potentiell methylierbaren DNA Sequenzabschnitts im GPER Promotor

Da die gezeigten Versuche mit Aza auf eine Methylierung von GPER deuten, diese aber aufgrund der globalen Demethylierung durch Aza und der damit verbundenen veränderten Expression vieler Proteine und Regulatoren einhergeht, wurde im zweiten Teil dieses Versuchskomplexes eine spezifische Analyse der Methylierung des GPER Promotors

durchgeführt. Durch Etablierung der Methode der methylierungsspezifischen PCR (MSP) für die *GPER* Gensequenz (siehe 2.2.19.2) war es möglich, einen spezifischen, potentiell methylierbaren DNA Bereich des *GPER* Gens auf DNA-Methylierungen zu untersuchen.

Die MSP der *GPER* Promotorsequenz der Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468 zeigte eine Methylierung dieser DNA Sequenz. In allen vier Zelllinien konnte die methylierte DNA Sequenz mit Hilfe der methylierungsspezifischen Primer (M-Primer) nachgewiesen werden (Abb. 29 A). Darüber hinaus konnte mit der MSP eine spezifische Demethylierung des *GPER* Promotors durch Aza, anhand einer signifikanten Verringerung der Menge an PCR Produkten nach der MSP, nachgewiesen werden (Abb. 30 B).

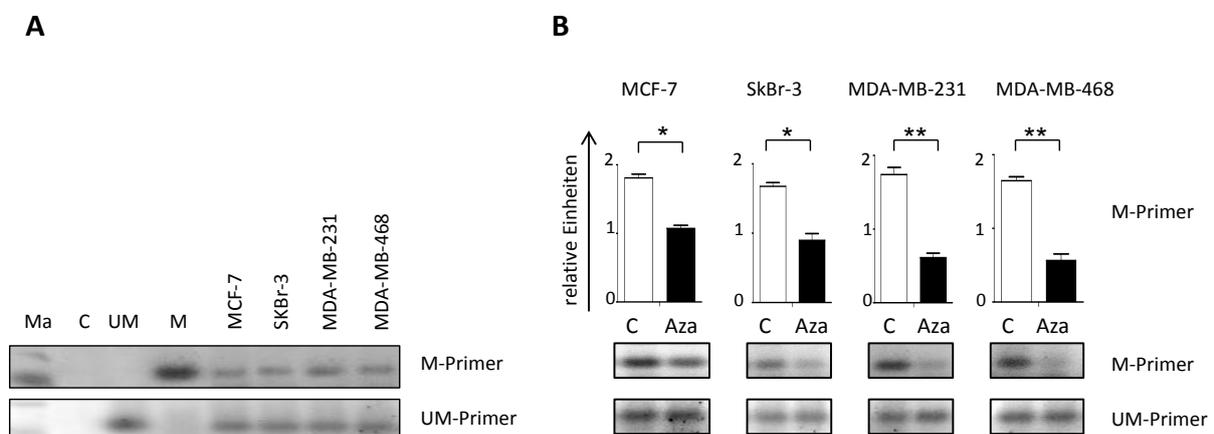


Abb. 30 Die methylierungsspezifische PCR zeigte einen möglichen methylierbaren *GPER* DNA Bereich *in vitro*.

(A) MSP der untersuchten Mammakarzinomzelllinien. Dargestellt ist ein exemplarisches Bild eines DNA Agarosegels nach der PCR. Ma, DNA Marker; C, Kontrolle (ddH₂O); UM, unmethylierte Standard DNA; M, methylierte Standard DNA; M-Primer, methylierungsspezifische Primer für methylierte DNA; UM-Primer, methylierungsspezifische Primer für unmethylierte DNA. **(B)** MSP der untersuchten Mammakarzinomzellen nach 48 h Behandlung mit 5 µM Aza. Aza verringert die Methylierung des *GPER* Promotors signifikant. Gezeigt sind charakteristische DNA Agarosegele für drei unabhängige Versuche. Die relativen Einheiten der PCR Produkte nach MSP mit methylierungsspezifischen Primern (M-Primer) sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem, zweiseitigem t-Tests, * = p < 0,05; ** = p < 0,01.

3.3.4 Die GPER Promotormethylierung kontrolliert die GPER Expression in Proben von Brustkrebspatientinnen

Nachdem die Methylierung der *GPER* Promotorsequenz *in vitro* nachgewiesen werden konnte, wurde die Bedeutung dieser Promotormethylierung in humanen Brusttumoren und nicht tumorigem Normalgewebe der Brust untersucht. Hierfür wurde aus Paraffinblöcken primärer Mammakarzinome und Normalgewebe gewonnene DNA durch Bisulfitreaktion in Abhängigkeit von DNA Methylierungen verändert und mit Hilfe der MSP der Methylierungsstatus der *GPER* Promotorsequenz analysiert. In Abb. 31 ist ein exemplarisches Agarosegel für die zwei MSP Reaktionen abgebildet. Anhand der entstandenen PCR Produkte mit M- und UM-spezifischen Primern erfolgte die Zuordnung der Tumore in GPER methyliert und nicht-methyliert. Es wurden 260 primäre, humane Mammakarzinome für die Auswertung herangezogen. Promotorhypermethylierung wurde dabei in 136 der 260 Tumoren (52,3 %) nachgewiesen. 124 Tumore (47,7 %) zeigten hingegen keine Methylierungen der untersuchten *GPER* DNA Sequenz.

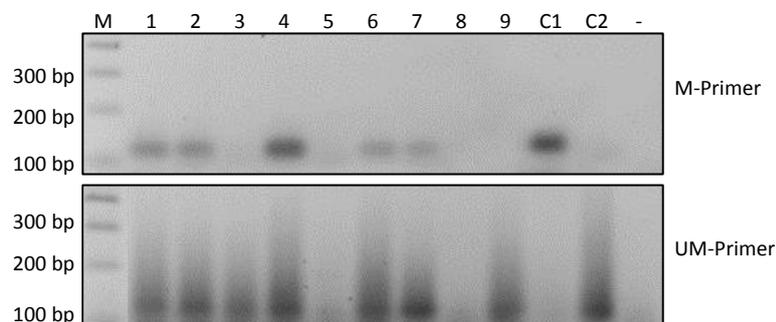


Abb. 31 Exemplarisches Bild der MSP der Tumorproben. Das obere Gel repräsentiert die PCR mit methylierungsspezifischen Primern (M-Primer), das untere Gel zeigt die entstandenen Produkte nach PCR mit Primern (UM-Primer) spezifisch für eine unmethylierte DNA Sequenz. M, 100 bp DNA marker; 1 – 9, DNA Proben der Tumore; C1, methylierte Standard DNA; C2, unmethylierte Standard DNA. Die DNA Tumorproben in Reihe 1,2,4,6 und 7 repräsentieren Proben mit methylierter GPER DNA Sequenz. Reihe 3 und 9 zeigen Proben mit unmethylierter GPER DNA Sequenz. Proben in den Reihen 5 und 8 zeigten bei keiner der beiden PCRs ein amplifiziertes Produkt. Diese Proben wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Durch Heranziehen des Chi-Quadrat-Tests konnte kein Zusammenhang zwischen der GPER Promotormethylierung und den Tumorcharakteristiken: Tumorgröße, Lymphknotenstatus, histologischem Tumortyp und -grad sowie Hormonrezeptor- und HER2-Expression festgestellt werden (Tab. 9).

Tab. 9 Zusammenhang zwischen der GPER Promotormethylierung und den Tumoreigenschaften der untersuchten Brustkrebspatientinnen. (Pearson Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest)

Tumoreigenschaft	N	GPER Methylierung		N	%	p-Wert
		keine Methylierung	Methylierung			
Gesamt	260	124	47,7	136	52,3	
Alter (Bereich)		59,79 (34-88)		63,21 (30-96)		0,272
Tumorgröße						
≤ 2 cm	137	66	53,2	71	52,2	
> 2 cm	94	46	37,1	48	35,3	
unbekannt	29	12	9,7	17	12,5	0,766
Lymphknotenstatus						
negativ	162	81	65,3	81	59,6	
positiv	79	36	29,0	43	31,6	
unbekannt	19	7	5,6	12	8,8	0,500
Histologische Einteilung						
duktal	61	28	22,6	33	24,3	
lobulär	15	8	6,5	7	5,1	
andere	4	3	2,4	1	0,7	
unbekannt	180	85	68,5	95	69,9	0,687
Histologischer Grad						
1	29	11	8,9	18	13,2	
2	117	54	43,2	63	46,3	
3	105	56	45,2	49	46,7	
unbekannt	9	3	2,4	6	4,6	0,349
ER Status						
negativ	106	54	43,5	52	38,2	
positiv	142	65	45,8	77	56,6	
unbekannt	12	5	4,0	7	5,1	0,659
PR Status						
negativ	134	69	55,6	65	47,8	
positiv	114	50	40,3	64	47,1	
unbekannt	12	5	4,0	7	5,1	0,444
Her-2 Status						
negativ	204	92	74,2	112	82,4	
positiv	42	26	21,0	16	11,8	
unbekannt	14	6	4,8	8	5,9	0,130

In Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Kalinski von der Pathologie der OvGU Magdeburg wurde die GPER Proteinexpression in den für die MSP herangezogenen Tumoren immunhistochemisch untersucht. Eine exemplarische GPER Färbung der Tumorschnitte ist in Abb. 32 dargestellt.

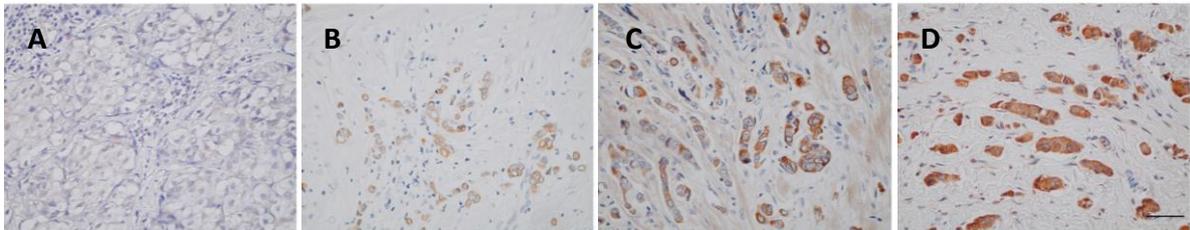


Abb. 32 Immunhistochemische GPER Färbung in Brusttumorschnitten. Dargestellt sind unterschiedliche Intensitäten der GPER Expression. Negativ (**A**); schwache GPER Intensität (**B**); gemäßigte GPER Expression (**C**); starke GPER Expression (**D**). Balken = 50 μ m

Anhand der immunhistochemischen GPER Proteinfärbung in den Tumorproben wurde der GPER Score ermittelt¹⁰⁶. Für die genaue Berechnung des GPER Scores und Charakterisierung von GPER Intensität und - Ausbreitung siehe 2.2.16. Es wurden Tumore mit einem GPER Score ≤ 2 als negativ und Tumore mit einem Score > 2 als GPER positiv bewertet. Auf Basis des Scores konnten 142 der untersuchten primären Mammakarzinome (54,8 %) als GPER positiv und 117 Tumore (45,2 %) als GPER negativ eingestuft werden.

In 83 der 117 GPER negativen Mammakarzinome (70,9 %) konnte eine Methylierung des GPER Promotors nachgewiesen werden. Passend dazu zeigte sich die GPER Hypermethylierung in nur 52 der 142 GPER positiven Tumore (36,6 %). Der mittlere GPER Score lag bei 2,602 für Tumore mit GPER Methylierung bzw. 4,0 für Tumore ohne Methylierung des GPER Promotors. Eine Korrelationsanalyse zwischen GPER Methylierung und Proteinexpression konnte die signifikante Abhängigkeit zwischen GPER Promotormethylierung und Proteinexpression beweisen ($p < 0,001$) (Tab. 11).

Tab. 10 Zusammenhang von *GPER* Promotormethylierung und Proteinexpression in Mammakarzinomproben
(Fisher's exact Test)

Tumoreigenschaft	N	Keine Methylierung		Methylierung		<i>p</i> -Wert
		N	%	N	%	
Gesamt	259	124	47,9	135	52,1	
GPER Intensität						
negativ oder schwach	150	52	34,7	98	65,3	
moderat oder stark	109	72	66,1	66,1	33,9	< 0,001
GPER Ausbreitung						
keine positiven Zellen	42	12	28,6	30	71,4	
< 10 % positive Zellen	108	40	37,0	68	63,0	
10-50 % positive Zellen	98	63	64,3	35	35,7	
> 50 % positive Zellen	11	9	81,8	2	18,2	< 0,001
GPER Score						
negativ (0-2)	117	34	29,1	83	70,9	
positiv (3-9)	142	90	63,4	52	36,6	< 0,001
Veränderung GPER Expression						
Keine Änderung/Steigerung	51	37	72,5	14	27,5	
Verringerung	57	20	35,1	37	64,9	< 0,001

Da in einer vorausgegangenen Studie unserer und anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass es während der Tumorgenese des Mammakarzinoms zu einer Verminderung der GPER Proteinexpression kommt und diese mit einer schlechteren Prognose der betroffenen Patienten einhergeht^{63,106}, wurde die Promotormethylierung in Tumorproben mit nicht-tumorigen Brustgewebe derselben Patientin verglichen. Es wurden Mammakarzinomgewebe und gesundes Brustgewebe von 108 Patientinnen untersucht. Bei 57 von 108 Patientinnen (52,8 %) konnte, im Vergleich zu gesundem Gewebe, eine Verringerung der GPER Proteinexpression im Tumor diagnostiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigten 51 der 108 Patientinnen (47,8 %) keine Veränderung oder sogar eine erhöhte GPER Expression in den Tumoren. Die Analyse der *GPER* Promotormethylierung konnte einen Zusammenhang zwischen der *GPER* Hypermethylierung und der verringerten GPER Expression in den Tumorproben zeigen. Von den 57 Patientinnen mit verringerter GPER Proteinexpression im Tumor wurde bei 37 Patientinnen eine *GPER* Promotormethylierung (64,9 %) bestätigt. Im Vergleich dazu konnte die *GPER* Promotormethylierung in nur 14 der

51 Patientinnen (27,5 %) mit gesteigerter oder unveränderter GPER Proteinexpression nachgewiesen werden.

3.3.5 Die GPER Hypermethylierung korrelierte mit dem Überleben von Brustkrebspatientinnen mit triple-negativen Brustkrebs

Die Analyse der Auswirkung der GPER Promotormethylierung auf das Überleben der zur Auswertung herangezogenen Brustkrebspatientinnen (N = 260) zeigte keine signifikante Korrelation zwischen der *GPER* Methylierung und dem krankheitsfreien Überleben (*disease free survival, DFS*) bzw. dem Gesamtüberleben (*overall survival, OS*) der untersuchten Patientinnen. Jedoch schien die GPER Methylierung einen leicht negativen Einfluss auf beide zu haben. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit nachgewiesener *GPER* Methylierung lag bei 80,2 % wohingegen Patientinnen ohne *GPER* Methylierung eine 5-Jahres-Überlebensrate von 85,4 % hatten. Gerade in den ersten drei Jahren nach der Brustkrebsdiagnose verstarben Patientinnen mit *GPER* Promotormethylierung häufiger als Patientinnen ohne diese Methylierung ($p = 0,067$; Daten nicht gezeigt).

Nach der Analyse des Überlebens des gesamten Patientenkollektivs, wurde der Einfluss der *GPER* Methylierung ausschließlich auf das Überleben der Patientinnen mit TNBC untersucht. Von 244 Patientinnen der Studie lagen Daten zum Expressionsstatus von ER, PR sowie HER2/neu vor. Mit 30,7 % (75 von 244 Tumoren) triple-negativen Tumoren lag der Anteil an TNBC Proben über dem durchschnittlichen Anteil von rund 15 %¹⁸⁸. In der untersuchten Patientenkohorte konnten keine Unterschiede in der Proteinexpression von GPER zwischen triple-negativen und nicht-triple-negativen Tumoren festgestellt werden. Die mittleren GPER Scores lagen bei 3,155 für TNBC Karzinome und 3,335 für Karzinome mit anderen molekularen Brustkrebsarten (nicht-TNBC). Eine Hypermethylierung des *GPER* Promotors konnte in 40 der 75 (53,3 %) triple-negativen Karzinomen nachgewiesen werden. Die nicht-TNBC zeigten mit einer *GPER* Promotormethylierung in 87 von 169 (51,5 %) Tumoren eine ähnliche Methylierungsrate der untersuchten *GPER* Sequenz. Die Überlebensanalyse der TNBC Patienten belegte, dass Patienten mit *GPER* Methylierung eine signifikant schlechtere Überlebensrate hatten als Patientinnen ohne diese Methylierung ($p = 0,025$) (Abb. 33). Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 5 Jahren verstarben nur 4 von 34 (11,7 %) Patientinnen ohne *GPER* Methylierung. Im gleichen Zeitraum starben dagegen jedoch 13 von

40 (30,5 %) Patientinnen mit einer GPER Promotormethylierung. Die Sterberate hat sich damit in Abhängigkeit von der GPER Promotormethylierung annähernd verdreifacht. Für das krankheitsfreie Überleben bestätigten die Überlebensraten der TNBC Patientinnen dieses Ergebnis und zeigten, wenn auch aufgrund der relativ geringen Probandenzahl nicht signifikant, den gleichen Trend. Die 5-jahres Überlebensraten für DFS betrugen 60 % für GPER methylierte und 77,1 % für GPER nicht-methylierte TNBC Patientinnen ($p = 0,082$). DFS und OS der nicht-TNBC Patientinnen zeigten in Abhängigkeit der GPER Methylierung keine signifikanten Unterschiede (OS: $p = 0,268$; DFS: $p = 0,969$; Daten nicht gezeigt).

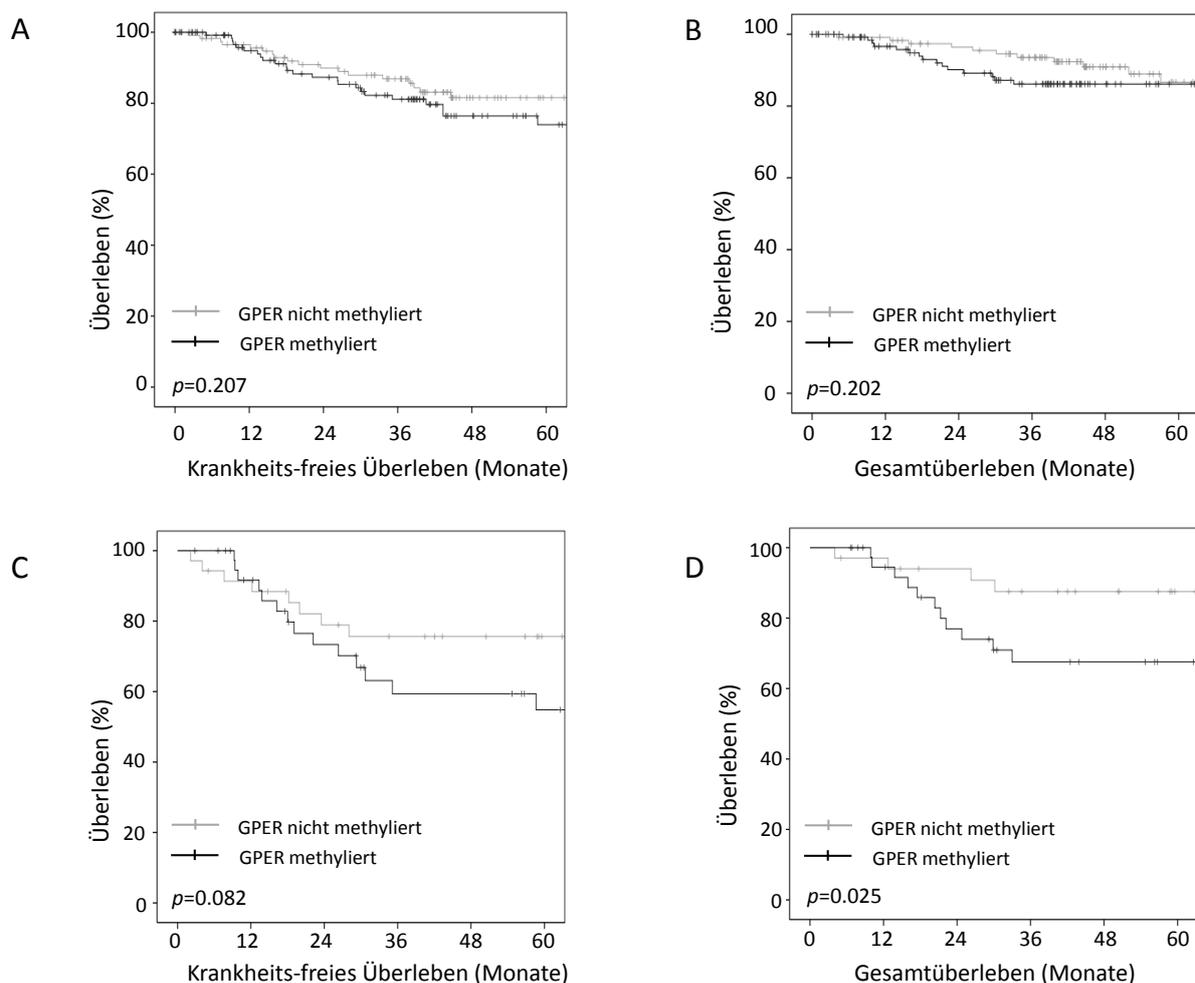


Abb. 33 Die Methylierung des GPER Promotors wirkte sich negativ auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen aus. Dargestellt sind Kaplan-Meyer-Grafen für das Überleben der Patientinnen in Abhängigkeit des Methylierungsstatus des GPER Promotors. **(A)** Krankheits-freies Überleben und **(B)** Gesamtüberleben des gesamten analysierten Patientenkollektivs (N = 260); **(C)** Krankheits-freies Überleben und **(D)** Gesamtüberleben der TNBC Patienten (N = 75). Die p-Werte wurden mit Hilfe des Log-rank Testes errechnet.

4 Diskussion

Jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Trotz der relativ hohen 5-Jahresüberlebensrate von 85 % bedeutet dies jedoch, dass über 10000 Patientinnen, die jährlich die Diagnose Brustkrebs erhalten, die nächsten fünf Jahre nicht überleben werden. Daher sind die weitere Verbesserung der Brustkrebsbehandlung und die Suche nach neuen Therapieansätzen von großer medizinischer Relevanz. Östrogene sind essentiell für eine normale Entwicklung der weiblichen Brustdrüse¹⁸⁹. Eine gestörte Regulierung der Östrogenfunktion kann daher auch für die Entstehung von Brustkrebs und anderen hormonsensitiven Tumoren, wie dem Endometriumkarzinom oder dem Ovarialkarzinom, verantwortlich sein¹⁹⁰. Die Funktion der verschiedenen Östrogenrezeptoren und das Zusammenspiel mit ihren aktivierten Stoffwechselwegen stellen dabei neue Therapieansätze gegen östrogensensitive Brusttumore dar. Bereits heute werden zur Abschätzung der Prognose und Behandlungsstrategie Genexpressionsprofile der Hormonrezeptoren ER α , PR und HER2/neu, sowie verschiedener Proliferationsmarker wie Ki-67 in Mammakarzinomen, erstellt und die Tumore bestimmten molekularen Gruppen zugeordnet^{15,191}. Neben dieser klassischen molekularen Einteilung ist auch die Funktion des GPER, einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher nach Bindung an Östrogen oder anderen Liganden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, von wissenschaftlichem Interesse für die Behandlung von hormonsensitiven Tumoren.

4.1 Verschiedene Mammakarzinomzelllinien zeigen eine unterschiedliche Expression von GPER

Mehr als 50 % der Mammakarzinome exprimieren neben nukleären ER auch GPER^{102,106,107}, dessen Relevanz als Tumorsuppressor im Mammakarzinom in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurde. Aufgrund der bislang sehr gegensätzlichen Ergebnisse und Diskussionsansätze bezüglich der Bedeutung von GPER im Mammakarzinom, erfolgte dabei zunächst eine eingehende GPER Expressionsanalyse der vier unterschiedlichen humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468. Jede Zelllinie beschreibt dabei durch unterschiedliche Hormon- und Wachstumsfaktorrezeptorexpression

einen anderen molekularen Mammakarzinomtyp. MCF-7 Zellen gehören aufgrund der positiven Expression von ER α und PR zu dem Luminal A Tumortyp. SKBr-3 stellt ein *in vitro* Zellmodell für HER2-positive Tumore dar. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 gehören zum triple-negativen Zelltyp. Sie exprimieren weder ER α und PR noch zeigen sie eine HER2/neu Überexpression. Jedoch unterscheiden sich die beiden Zelllinien in der GPER Expression und der Genexpression weiterer Gene. Aufgrund der Expression Stammzell-assoziiierter Gene und fehlender Expression charakteristischer Epithelgene (z.B. Claudin-3, -4 und -7 und E-Cadherin) können MDA-MB-231 Zellen dem „*claudin-low*“ Brustkrebs-Subtyp zugeordnet werden ¹⁹². Es wird vermutet, dass Tumorzellen dieses Zelltyps ihren Ursprung in somatischen Bruststammzellen haben. MDA-MB-468 Zellen zeigen hingegen ähnliche Expressionsmuster wie der „basal-ähnliche“ Brustkrebs-Subtyp. Tumore dieses Typs entwickeln sich aus weiter differenzierten luminalen Vorläuferzellen ¹⁹³. Die Mehrheit der triple-negativen Tumore lässt sich diesem „Basal-ähnlichen“ Tumortyp zuordnen.

Die genaue Analyse der Expression von GPER zeigte unterschiedliche GPER mRNA- und Proteinmengen in den vier untersuchten Mammakarzinomzelllinien. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Menge der mittels qRT-PCR bestimmten GPER mRNA nicht in allen Zelllinien mit der ermittelten Proteinmenge des Rezeptors korreliert. Diese Unterschiede zwischen GPER mRNA und Proteinlevel lassen sich mit verschiedenen Regulationsebenen zwischen Transkript (mRNA) und Protein begründen. So spielen etwa die Sekundärstruktur der mRNA, der Einfluss von regulatorischen Proteinen sowie die Dichte und Auslastung der Ribosomen eine entscheidende Rolle bei der Translation ¹⁹⁴. Eine weitere mögliche Erklärung der unterschiedlichen GPER mRNA- und Proteinmengen können Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) und Mutationen sein. Durch Variation eines Basenpaares des DNA-Stranges im Bereich der Primerhybridisierung kommt es zu einer geringeren Affinität des Primers zum Matrizenstrang und damit zu einer verringerten Amplifikation während der RT-PCR. Für den kodierenden Bereich der GPER Gensequenz, welcher nur das letzte der drei Exons umfasst ⁵³, wurden in Mammakarzinomproben verglichen zu Normalgewebe 13 SNPs identifiziert. Diese konnten jedoch bislang noch nicht mit einem bestimmten pathologischen Ereignis assoziiert werden ¹⁹⁵. Das in dieser Arbeit für die quantitative RT-PCR verwendete GPER Primerpaar überschneidet sich nicht mit diesen bekannten SNPs. Im Allgemeinen wird die Aussagekraft

von detektierter mRNA bezüglich der wirklichen Proteinexpression in der Literatur mit nur etwa 40% angegeben^{196–198}.

Von den untersuchten Zelllinien wiesen MCF-7 Zellen die stärkste GPER Expression, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, auf. Zusätzlich konnte eine Lokalisierung des Rezeptors in der Zellmembran von MCF-7 Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich bewiesen werden. SKBr-3 und MDA-MB-468 zeigten im Western Blot und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ähnlich hohe, jedoch verglichen zu MCF-7 Zellen, geringere GPER Proteinlevel. Eine zellmembrangebundene Expression konnte in den durchgeführten Versuchen bei diesen beiden Zelllinien, genau wie bei MDA-MB-231, nicht nachgewiesen werden. Aufgrund einer bestimmten Nachweisgrenze der Immunfluoreszenz ist dennoch nicht auszuschließen, dass sich geringere Mengen des Rezeptors in der Plasmamembran der Zellen befinden, diese jedoch mit der verwendeten Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Die detektierte GPER mRNA-Expression in MDA-MB-468 ist nur minimal. Es scheint, als wären die in der RT-PCR verwendeten Primer nicht optimal für die Amplifizierung der GPER mRNA in MDA-MB-468. Ein möglicher Grund dafür können bereits erwähnte genetische Veränderungen des *GPER* Gens sein. Im Gegensatz zu MDA-MB-468 ist die im Western Blot detektierte GPER Proteinmenge in MDA-MB-231, trotz einer relativ hohen mRNA Expression, sehr gering.

Hinsichtlich der geringen und teilweise nicht detektierbaren GPER Proteinexpression wurde die Zelllinie MDA-MB-231 von unterschiedlichen Arbeitsgruppen auch als GPER-negative Mammakarzinomzelllinie verwendet^{45,49,80,105}. Carmeci und Kollegen klonierten bereits 1997 die GPER cDNA auf Grundlage unterschiedlicher Expression von GPER in den beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231⁴⁵, womit sie Mitte der 90er Jahre eine der ersten Arbeitsgruppen waren, die die *GPER* Genesequenz identifizieren konnten. Andere Arbeitsgruppen beschrieben die TNBC Zelllinie hingegen als GPER-positiv^{199–201}. Aufgrund der Expressionsanalyse im Western Blot und der GPER Immunfluoreszenzfärbung wurden MDA-MB-231 Zellen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als GPER-positiv eingestuft. Als GPER-negative Kontrollzelllinie wurde in der vorliegenden Arbeit daher die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 herangezogen. Diese Zelllinie wurde bereits von anderen

Laboren als GPER-negativ beschrieben^{51,202,203} und zeigte auch in den, in dieser Arbeit durchgeführten, Versuchen keine GPER Expression.

4.2 Die Lokalisierung von GPER in Zellen wird von der Dynamik des Rezeptoraufbaus und -abbaus beeinflusst

Alle vier Zelllinien zeigten eine zytoplasmatische und verstärkt kernnahe Lokalisierung von GPER, was auf eine mögliche Verankerung des Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum hindeuten könnte. Die Lokalisierung von GPER im endoplasmatischen Retikulum wurde bereits beschrieben⁵². Nur in der Zelllinie mit der stärksten GPER Proteinexpression (MCF-7) konnte die membrangebundene und für Vertreter der GPCR charakteristische Expression nachgewiesen werden. Unterschiede in der Expressionsintensität zwischen Western Blot Analyse und Immunfluoreszenzmikroskopie lassen sich durch die Verwendung von verschiedenen GPER Antikörpern in den Methoden erklären. Beide GPER Antikörper binden unterschiedliche Epitope des Rezeptors. Entscheidend für die Lokalisierung von membranständigen Proteinen ist die Verwendung von Antikörpern, die Epitope außerhalb der Transmembrandomänen erkennen. Der für die Immunfluoreszenz verwendete Antikörper Klon (N-15) bindet, anders als der für den Western Blot verwendete Klon K-19, an den außerhalb der Membran liegenden GPER N-Terminus und erfüllt damit dieses Kriterium.

Die genaue Lokalisierung von GPER in den Zellen sowie auch in humanen Gewebeproben ist ein kontrovers diskutiertes Kapitel in der Geschichte des Rezeptors. Bereits 2005 konnten Thomas und Kollegen die Lokalisierung von GPER in der Plasmamembran von SKBr-3 Zellen zeigen⁵¹. Weitere Studien bestätigten GPER als membrangebundenen Rezeptor in Pyramidenzellen von Rattenhirnen²⁰⁴ und in GPER transfizierten HEK293 Zellen²⁰². Zeitgleich zu diesen ersten Veröffentlichungen wurde mit Hilfe eines fluoreszierenden Östrogenderivates (E₂-Alexa) GPER auch im endoplasmatischen Retikulum von GPER transfizierten COS7 Zellen⁵² und in der Membran des Golgi-Apparates nachgewiesen²⁰⁵.

Die Funktionsfähigkeit von zytoplasmatischen oder an intrazelluläre Membranen gebundenen GPCRs wurde bereits beschrieben²⁰⁶. Eine wichtige Voraussetzung für die Funktion eines intrazellulären GPCRs ist dabei, dass die Rezeptorliganden die Zellmembranen

durchdringen können oder gar endogen produziert werden und dadurch intrazelluläre Rezeptoren aktivieren²⁰⁷. Steroidhormone wie Östrogen, welche sogar klassische nukleäre ERs im Zellkern binden, sind aufgrund ihrer lipophilen Charakteristik zellpermeabel und können somit problemlos Zellmembranen passieren. Der Beweis für die intrazelluläre Funktionalität von GPER konnte durch Verwendung von synthetischen Östrogenderivaten mit unterschiedlicher Zellpermeabilität erbracht werden²⁰⁸. Gegenteilige Studien widerlegen hingegen die intrazelluläre Funktionalität von GPER^{199,209}. Für eine richtige Interpretation dieser Ergebnisse sind jedoch zwei wesentliche Mechanismen von Membranproteinen zu beachten. Zum einen laufen alle Membranproteine während ihrer Synthese im rauen endoplasmatischen Retikulum auf dem Weg zur Zellmembran durch den Golgi-Apparat. Dabei kann es zu einer Akkumulation der Proteine im endoplasmatischen Retikulum kommen^{52,204,208}. Zum anderen findet zum Schutz vor einer übermäßig starken Signalaktivierung eine Rezeptorinternalisierung durch Endozytose des membranständigen Rezeptors nach Ligandenbindung statt. Nach dieser Rezeptordesensibilisierung werden internalisierte GPCRs entweder recycelt und zurück an die Membran transportiert oder durch das Proteasom abgebaut. Durch diese dynamischen Prozesse befindet sich immer ein gewisser Anteil an Rezeptoren innerhalb der Zellstrukturen und kann dort nachgewiesen werden. Für GPER wurde zusätzlich ein retrograder Transport von der Plasmamembran zum Zellkern beschrieben^{203,210,211}. Die heterogenen Ergebnisse zur Expression von GPER lassen vermuten, dass individuelle Gewebe und Organe des Körpers ihre Östrogenantwort durch unterschiedliche GPER Expression infolge äußerer und innerer Einflüsse steuern können. Zu den äußeren Einflüssen könnten die Verfügbarkeit von Östrogen und weitere extrazelluläre Signale und Stimuli gehören. Als innere Einflüsse für die GPER Expression könnte z.B. das Gewebeer und das Geschlecht bezeichnet werden²¹². Zusätzlich wird eine Ko-Expression von GPER in Abhängigkeit von ER α vermutet^{63,102,103}, welche jedoch nicht in allen Studien bestätigt werden konnte.

4.3 Die spezifische Aktivierung von GPER hemmt die Viabilität und Proliferation von Mammakarzinomzellen

Die Bedeutung von GPER im Tumorgeschehen wurde bislang kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Studien, die GPER eine Beteiligung an der Tumorprogression zuschreiben, als auch Ergebnisse, welche auf eine tumorprotektive Funktion von GPER hindeuten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die spezifische Aktivierung von GPER in den untersuchten humanen Mammakarzinomzelllinien eine dosisabhängige Verminderung der Zellviabilität und der Proliferation der Tumorzellen auslöst. Damit bestätigen die Ergebnisse den wachstumsinhibierenden Effekt der GPER Aktivierung, welcher auch in anderen Krebsarten, wie Prostatakarzinomzellen⁷⁰ und Urothelkarzinomzellen²¹³, sowie Ovarial-¹⁰⁹ und Hodenkarzinomzellen²¹⁴ gezeigt werden konnte. Darüber hinaus stützen die gewonnenen Daten die These bezüglich des vorteilhaften Effektes von GPER für das Überleben von Krebspatientinnen^{63,104–106}. Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die einen proliferativen Effekt der GPER Aktivierung in Tumorzellen^{49,50,66,80,215} und damit verbunden einen negativen Effekt von GPER für Tumorpatienten zeigen konnten^{64,93,102,216–219}. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass ein Großteil der Daten, welche einen proliferativen Effekt von GPER zeigen, mit unspezifischen Liganden wie Östrogen und Tamoxifen, gewonnen wurden. Diese unspezifischen Liganden binden neben GPER auch an klassische ERs. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen der spezifische GPER Ligand G-1 für die Rezeptoraktivierung verwendet. Die Wahl der GPER Liganden ist somit eine mögliche Erklärung kontroverser Resultate.

Neben der Auswahl spezifischer und unspezifischer GPER Agonisten scheint auch die eingesetzte Konzentration eine entscheidende Rolle für die Bewertung der Ergebnisse zu spielen. Der in dieser Arbeit verwendete GPER Ligand G-1 zeigte im Gegensatz zu den anfänglichen Daten, während seiner Etablierung als selektiver GPER Agonist^{86,90}, bei niedrigen Konzentrationen (1 nM – 100 nM) keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Mammakarzinomzellen. Bei Erhöhung der Konzentrationen im mikromolaren Bereich konnte G-1 die Proliferation der Tumorzellen hingegen signifikant verringern. Eine Wirkung bei Konzentrationen weit über der ursprünglich ermittelten Dissoziationskonstante

($K_d = 11 \text{ nM}$)⁸⁶ wurde auch von vielen anderen Arbeitsgruppen beobachtet^{88,112,113,220}. Die für die Stimulation eingesetzte Konzentration von $1 \mu\text{M}$ G-1 wird daher von den meisten anderen Arbeitsgruppen verwendet und gilt als eine Art Standardkonzentration für die Aktivierung von GPER^{88,201,220}. Zudem scheint die antiproliferative Wirkung von G-1 bei Konzentrationen von 100 nM und höher unabhängig von der Expression von ER α oder HER2/neu zu sein¹¹³. Im Gegensatz zu der allgemeinen Gültigkeit von G-1 als selektiver GPER Agonist konnte die Aktivierung von GPER Signalwegen mit G-1 in den letzten Jahren von mehreren Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden^{89,221–223}. Als ein weiterer Mediator nicht-genomischer Östrogensignalwege wurde die ER Spleißvariante ER α 36 beschrieben⁴². ER α 36 wird unabhängig von ER exprimiert und konnte sowohl in ER-positiven als auch in ER-negativen Mammakarzinomen nachgewiesen werden^{44,224}. Kang und Kollegen zeigten 2010, dass G-1 eher an ER α 36 als an GPER bindet, wodurch nicht-genomische Signalwege aktiviert werden²²¹. Auch bei der Ausbildung der Resistenz gegen die endokrine Tamoxifentherapie spielt ER α 36 neben GPER^{85,108} eine Rolle^{225,226}. Eine Wechselwirkung zwischen beiden Rezeptoren scheint demnach nicht verwunderlich²²⁷.

Im Jahr 2011 wurde G-15 als selektiver GPER Antagonist entwickelt⁹¹. G-15 ist in der Lage, spezifisch durch kompetitive Bindung an GPER, intrazelluläre Signale wie die Mobilisierung von Kalziumionen und die PI3K Aktivierung zu blockieren^{60,91,228–230}. Durch Vorinkubation mit G-15 oder dem Einsatz 10-fach höherer G-15 Konzentrationen konnte der antiproliferative G-1 Effekt in den Mammakarzinomzellen signifikant verringert, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden. Zur Kontrolle der Spezifität des Effektes von G-1 wurden neben der Verwendung von G-15 die GPER negative humane Nierenzelllinien HEK293 mit G-1 behandelt und die Expression von GPER in den triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 mit Hilfe von siRNA herunterreguliert. Die Zelllinie HEK293 exprimiert weder GPER und ER α , noch ER β oder die ER Spleißvariante ER α 36^{51,202,203}. Da durch G-1 Stimulation kein inhibitorischer Effekt in HEK293 Zellen zu beobachten war, konnte ein unspezifischer zytotoxischer Effekt von G-1 ausgeschlossen werden. Die verringerte Expression von GPER in den beiden Mammakarzinomzelllinien resultierte hingegen in einer deutlich verringerten Sensitivität der Zellen gegenüber G-1. Obwohl G-1 und G-15 als spezifische GPER Aktivatoren/Inhibitoren etabliert und anerkannt sind, gibt es jedoch auch konträre Ergebnisse, die den Effekt von G-1 als unabhängig von GPER beschreiben^{89,222,223}.

In dieser Studie zeigten alle vier Mammakarzinomzelllinien eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber G-1. Anhand einer einfachen Korrelation ließ sich ein linearer Zusammenhang zwischen dem GPER Proteinlevel und der EC_{50} Konzentration von G-1 vermuten. Dieser scheint abhängig vom Östrogengehalt im Medium zu sein. Während die G-1 EC_{50} Konzentration in hormonfreiem Medium positiv mit der relativen GPER Proteinmenge in den Zellen korreliert, scheint die Anwesenheit von Östrogen in normalem Zellkulturmedium die Sensitivität gegen G-1 leicht zu senken. Östrogen ist ein Ligand und Agonist von GPER und konkurriert mit G-1 um die Bindung an den Rezeptor, wodurch sich die Sensitivität gegenüber der spezifischen GPER Aktivierung mit G-1 verändern kann. Zudem ist bekannt, dass $ER\alpha$ durch Östrogen über eine Art negativen Feed-back-Regulationsmechanismus herunterreguliert wird, um eine Überreaktion der Zellen zu vermeiden²³¹. Dabei ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die GPER Expression negativ an seine Liganden E_2 oder auch G-1 gekoppelt ist. MCF-7 war die einzige der vier Zelllinien mit $ER\alpha$ Expression. Durch Hormonentzug im Medium zeigten diese Zellen eine, im Vergleich zu Normalmedium, um 80 % verminderte Proliferation und waren wesentlich weniger sensitiv gegenüber G-1 als die drei anderen $ER\alpha$ negativen Zelllinien. Diese Beobachtung konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe gemacht werden¹¹³. Der negative Effekt von G-1 auf die Viabilität und die Proliferation der Mammakarzinomzelllinien tritt jedoch sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Östrogen im Kulturmedium auf. Diese Unabhängigkeit von Östrogen im Medium konnte auch von anderen Forschergruppen beobachtet werden^{88,113,199}.

4.4 Andauernde GPER Aktivierung hemmt den Zellzyklus von Mammakarzinomzellen in der Mitosephase

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Mammakarzinomzelllinien nach spezifischer Aktivierung von GPER mit G-1 neben der verminderten Proliferation auch einen Zellzyklusarrest in der G_2/M -Phase. Ein Arrest in der G_1 -Phase oder während der DNA Replikation in der Synthesephase, wie von Ariazi und Kollegen und der Arbeitsgruppe von Nilsson und Mitarbeitern nach G-1 Behandlung von MCF-7 Zellen⁸⁸ und murinen bEnd.3 Endothelzellen¹¹² beobachtet, konnte in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Da anhand der durchflusszytometrischen Analyse, bei der der DNA-Gehalt der

Zellen ausschlaggebend für die Einordnung der Zellen in die Zyklusphasen ist, keine Unterscheidung der Zellen zwischen G₂- und M-Phase möglich war, wurden zur genaueren Betrachtung des Zellzyklusarrestes die Kontrollproteine Cyclin B1 und CDK1 bestimmt. Cyclin B1 ist ein G₂/M-Phase spezifisches Cyklin. Es wird verstärkt in der G₂-Phase gebildet, um durch Aktivierung von CDK1 den Übergang in M-phase zu gewährleisten¹⁸². Beide Proteine sind somit für den Übergang von der G₂ in die M-phase verantwortlich. Sowohl Cyclin B1 als auch CDK1 waren in den G-1 behandelten MCF-7 und SKBr-3 Zellen, nach zuerst verstärkter Expression nach 24 h, nach 48 h deutlich herabreguliert. Die verringerte Expression von Cyclin B1 und CDK1 nach G-1 Behandlung konnte von anderen Gruppen auch für Prostatakarzinom-⁷⁰ und ER-negative Brustkrebszellen²⁰¹ sowie von unserer Arbeitsgruppe und einer weiteren Arbeitsgruppe für Ovarialkarzinomzellen^{109,220} bestätigt werden. Im Allgemeinen deutet eine verringerte Cyclin B1/CDK1 Expression auf einen Zellzyklusarrest in der G₂-Phase hin. Erhöhte Proteinlevel der Proteine hingegen sind ein Zeichen für einen Arrest in der Mitosephase²³². Auch Chan und Kollegen werteten die verringerte Expression der beiden G₂/M-Kontrollproteine als Zellzyklusarrest in der G₂-Phase, da es laut ihrer Daten gar nicht erst zu einem Anstieg von Cyklin B1 und CDK1 kam und die Zellen somit den G₂/M-Kontrollpunkt nicht passieren konnten⁷⁰. Im Gegensatz dazu kann eine anfänglich erhöhte Expression von Cyclin B1 und CDK1 auch zu einem Zellzyklusarrest in der Mitosephase führen. Die verringerte Expression der Kontrollproteine nach längerer G-1 Stimulation würde damit auf einen bereits stattgefundenen Übergang der Zellen in die Mitosephase deuten, da zu diesem Zeitpunkt Cyclin B1 und CDK1 nicht mehr exprimiert werden. Dieser Effekt wurde bereits für zwei Mikrotubuliinhibitoren (Taxol und Nocodazol) gezeigt²³³. Ein Zellzyklusarrest von Mammakarzinom - und Ovarialkarzinomzellen durch G-1 in der Mitosephase wurde auch von anderen Laboren nachgewiesen^{109,201,220}. Darüber hinaus zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie von Mori und Kollegen den antiproliferativen Effekt von G-1 auch in Endometriumzellen von Endometriosepatientinnen²³⁴.

Die beiden triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 zeigten hingegen keine Unterschiede in den Expression von Cyclin B1 und CDK1, was einen Einfluss von GPER beim Passieren des G₂/M-Kontrollpunktes in diesen Zelllinien widerlegt und auf einen unterschiedlichen Einfluss von GPER in den verschiedenen Zelllinien deutet. Begründet wird dies aller Wahrscheinlichkeit nach durch die unterschiedliche Expression der verschiedenen

Östrogenrezeptoren in den einzelnen Zelllinien. Das Zusammenspiel und die Abhängigkeit der einzelnen Rezeptoren sind jedoch noch weitgehend unbekannt und stellen einen wichtigen Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsvorhaben dar.

Eine endgültige Bestätigung des Zellzyklusarrestes in der M-phase konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Analyse der Phosphorylierung von Histon H3 erbracht werden. Die Histon H3 Phosphorylierungen an den Aminosäuren Serin 10, Serin 28 und Threonin 11 sind eng mit der Chromosomenkondensation in der Mitose und Meiose verbunden²³⁵ und dienen damit als Indikator für den Eintritt der Zellen in die Mitosephase¹⁸³. Die Behandlung aller vier Mammakarzinomzellen mit G-1 führte zu einem signifikanten Anstieg der Expression von phosphoryliertem Histon H3 (Serin 10). Da für einen Fortlauf der Mitose eine Dephosphorylierung von Histon H3 nötig wäre, kommt es dann in der Prophase der Mitose zu einem Zyklusarrest der GPER aktivierten Zellen. Unterstützend zu diesen Daten konnten Wang und Kollegen anhand mikroskopischer Aufnahmen von Ovarialkarzinomzellen zeigen, dass G-1 behandelte Zellen bereits kondensierte Chromosomen, eine aufgelöste Kernmembran sowie einwandernde Mikrotubuli aufwiesen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich die Spindelfasern nicht angemessen ausbilden und sich die Chromosomen nicht richtig an der Metaphasen-Platte anordnen²²⁰. Dies bestätigt den Eintritt der Zellen in die Mitose und den Zellyklusarrest während der Teilung der Zellen.

Mögliche Erklärungen für den negativen Effekt von G-1 auf die Zellproliferation können zum einen die kontinuierlichen Kalziumionenausschüttung ins Zytosol und zum anderen eine über längere Zeit erhöhte Menge von aktiviertem Erk1/2 durch Stimulierung von GPER sein. Sowohl die intrazelluläre Kalziumionenmobilisierung als auch die Aktivierung von Erk1/2 durch GPER wurden bereits beschrieben⁵⁰⁻⁵². Ein dauerhaft erhöhtes Level an intrazellulärem Kalzium inhibiert das Zellwachstum sowie den Zellzyklus und induziert die Apoptose der Zellen²³⁶. Darüber hinaus könnte die Induktion von Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums durch GPER eine mögliche Ursache für den antiproliferativen Effekt von G-1 sein. Kürzlich konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass neben den klassischen Östrogenrezeptoren ER α und β auch GPER an der zytoprotektiven Wirkung von E₂ gegen Stressreaktionen des endoplasmatischen Retikulums beteiligt ist²³⁷.

Ebenso scheint die Aktivierung von Erk1/2 infolge der GPER Aktivierung entscheidend für den Effekt der GPER Stimulierung zu sein. Bereits Mitte der 1990er Jahre konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Erk1/2 Aktivierung zur Proliferation und zum Überleben der Zelle führt. Eine dauerhaft anhaltende Aktivierung von Erk1/2 im Zellkern hat jedoch antiproliferative Signale und die Apoptose der Zelle zur Folge^{238,239}. Für diesen Regulationsmechanismus spricht, dass bei den SKBr-3 Zellen nach G-1 Stimulation anfänglich ein erhöhtes Cyclin B1/CDK1 Level zu detektieren war, nach weiterer Stimulation dieses jedoch in das Gegenteil kippte und beide Regulationsproteine in G-1 behandelten Zellen kaum noch nachweisbar waren.

4.5 Der durch die anhaltende Aktivierung von GPER induzierte Zellzyklusarrest in der Mitosephase führte zur Apoptose der Mammakarzinomzellen

Die Auslösung der Apoptose von Tumorzellen ist ein wichtiger und gewünschter therapeutischer Effekt von Antitumormedikamenten bei der Behandlung von Krebs. Dabei stellt die Induktion des intrinsischen Apoptosewegs durch einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase einen bekannten Regulationsmechanismus von Tumorzellen dar²⁴⁰. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen nach GPER Aktivierung sowohl einen erhöhten Anteil an Zellen mit verringertem DNA Gehalt, was auf den typischen DNA Abbau während der Apoptose hindeutet, als auch die Aktivierung der Apoptose auslösenden Effektorcaspase-3. Darüber hinaus konnten zwei weitere Arbeitsgruppen kurz nach der Publikation dieser Daten die Induktion der Apoptose durch GPER Aktivierung in ER α negativen SKBr-3 Brustkrebszellen bestätigen^{201,241}. Wei und Kollegen zeigten die Herunterregulierung des antiapoptotischen Regulators Bcl-2 und eine verstärkte Expression der proapoptotischen Proteine Bax und BimS in G-1 stimulierten SKBr-3 Zellen²⁰¹. Als auslösenden Signalweg vermuteten Chimento und Kollegen wiederum eine verstärkte und anhaltende Aktivierung von Erk1/2, welche nicht nur zum Zellzyklusarrest, sondern auch zur Apoptose der SKBr-3 Zellen nach GPER Aktivierung führte²⁴¹. Eine weitere mögliche Ursache der Apoptose kann die verlängerte Verweildauer der Zellen in der Mitosephase infolge einer durch G-1 induzierten gestörten Mikrotubuliaktivität sein²²⁰. Die Induktion der Apoptose durch eine falsche Mikrotubulifunktion wurde bereits für bekannte Mikrotubulinhibitoren gezeigt²³³.

Obwohl MCF-7 Zellen aufgrund einer 47 Basenpaar großen Deletion im dritten Exon des Caspase-3 Gens keine Caspase-3 exprimieren¹⁶⁶, konnten nach G-1 Stimulierung apoptotische Zellen mit Hilfe der Annexin V Färbung nachgewiesen werden. Dass die Apoptose durch verschiedene Substanzen und Bedingungen in MCF-7 Zellen ohne Caspase-3 Expression ausgelöst werden kann, ist bekannt^{242,243}. Zudem wurde bereits ein Caspase-3 unabhängiger Apoptoseweg anhand der sequentiellen Aktivierung von Caspase-9, -7 und -6 in MCF-7 Zellen beschrieben²⁴⁴. Eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Caspase-unabhängigen Apoptose spielt das Protein AIF¹⁶². Durch einen apoptotischen Stimulus wird AIF von den Mitochondrien freigegeben und gelangt in den Zellkern, wo es die Chromosomenkondensation unabhängig von Caspasen auslöst. Beim Passieren des mitochondrialen Intermembranraums wird eine AIF Signalsequenz abgeschnitten¹⁶⁴. Durch den Verlust dieser Sequenz können die aktivierte und nicht aktivierte Form von AIF voneinander unterschieden werden. Wang und Kollegen konnten die Translokation von AIF in den Nukleus von IGROV-1 Ovarialkarzinomzellen nach GPER Aktivierung zeigen²²⁰. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar die Expression von AIF in MCF-7 Zellen nachgewiesen werden, jedoch war die Proteinexpression der kürzeren, aktiven Form nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis spricht gegen die These eines Caspase-unabhängigen Apoptosewegs in MCF-7 Zellen. Die unterschiedlichen Signalwege lassen vermuten, dass die Aktivierung von GPER mit G-1 abhängig vom Zelltyp sowohl die Caspase-abhängige als auch die Caspase-unabhängige Apoptose von Tumorzellen auslösen kann.

4.6 Tumorsuppressor p53 wird als down-stream Mediator von GPER aktiviert

Eine regulatorische Verbindung zwischen Östrogenrezeptoren und dem Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 ist bekannt. Bereits 2004 konnte die Regulation der ER α Expression durch p53 in MCF-7 Zellen nachgewiesen werden²⁴⁵. Darüber hinaus zeigten Berger und Kollegen, dass auch ER α als nukleärer Transkriptionsfaktor die Expression von p53 und seinen Effektoren MDM2 und p21 induzieren kann²⁴⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen eine verstärkte p53 Proteinexpression in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien nach GPER Aktivierung nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür ist die durch GPER induzierte intrazelluläre Mobilisierung von

Kalziumionen, welche über den kalziumabhängigen Transkriptionsfaktor CREB (engl. *cAMP-response-element binding protein*) die Induzierung des Tumorsuppressors p53 und dadurch einen Zellzyklusarrest bewirkt²⁴⁷. Eine p53 Mobilisierung und nukleäre Translokation nach G-1 Behandlung von Tumorzellen konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden^{88,201}. Zum anderen zeigten die Tumorzellen Veränderungen der GPER Expression infolge radioaktiver Strahlenbehandlung. Eine strahleninduzierte Expression ist ein charakteristisches Merkmal von Tumorsuppressorgen²⁴⁸. Darüber hinaus sind durch Bestrahlung und die daraus resultierenden Strangbrüche in der DNA Schlussfolgerungen bezüglich einer möglichen Verbindung von GPER und p53 möglich. Auffallend war dabei die unterschiedliche GPER Expression infolge der Strahlenbehandlung zwischen den triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 sowie der ER α positiven Zelllinie MCF-7. Während die beiden TNBC Zelllinien mit einer dosisabhängigen Erhöhung der GPER Expression auf die Bestrahlung reagierten, zeigten MCF-7 Zellen eine verringerte GPER mRNA Expression. Eine verringerte Proteinexpression von p53 in MCF-7 Zellen kehrte den Phänotyp der GPER Expression jedoch um, sodass die MCF-7-p53 neg Zellen ähnlich wie MDA-MB-231 und MDA-MB-468 Zellen auf die Bestrahlung reagierten.

Im Gegensatz zu MCF-7 Zellen (wtp53, Wildtyp p53) weisen die beiden TNBC Zelllinien Mutationen im p53 Gen auf (mtp53, mutiertes p53), wodurch p53 in diesen Tumorzellen nicht funktionsfähig ist (*loss-of-function* Mutation) und sogar gegensätzliche Funktionen des Transkriptionsfaktors (*gain-of-function* Mutation) beschrieben wurden²⁴⁹. Besonders unter den sehr heterogenen triple-negativen Tumoren stellt die Mutation von p53 die einzige genetische Veränderung dar, welche in der Mehrheit aller TNBC zu finden ist²⁵⁰. Bei den beiden Mutationen in MDA-MB-231 und MDA-MB-468 handelt es sich um Missense-Mutationen in der p53 DNA-Bindedomäne¹⁸⁶. Durch Basenaustausch kommt es hierbei zu einer modifizierten Aminosäuresequenz (MDA-MB-231 R280K; MDA-MB-468 R273H) und daraus resultierend zu einer veränderten Transkription infolge veränderter Bindung von p53 an die p53 Responseelemente in der DNA^{251,252}. Beide Mutationen gehören zu den häufig auftretenden p53 Mutationen und wurden bereits als Auslöser für onkogene Funktionen von p53 beschrieben^{253,254}. Bei TNBC tritt die Funktionsveränderung infolge einer Mutation im p53 Gen besonders häufig auf, wodurch diese Tumore aggressiver sind und mit einem erhöhten Metastaserisiko einhergehen^{255,256}. Da die Verringerung von wtp53 in MCF-7

Zellen in einem, die GPER Expression betreffend, ähnlichem Phänotyp resultiert, kann vermutet werden, dass die beiden Missence-Mutationen in den TNBC Zelllinien keinen zusätzlichen Einfluss auf die GPER Expression besitzen. Durch die Mutationen kommt es jedoch zu einem Funktionsverlust von p53, da mtp53 die Expression von GPER nach Bestrahlung nicht wie wtp53 gegenreguliert. Des Weiteren verstärkte G-1 die Expression von p53 in den Zelllinien unabhängig davon, ob eine Mutation im Gen vorliegt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es eine gegenseitige Regulation der Expression von p53 und GPER gibt: Die Aktivierung von GPER erhöht die Expression von p53, woraufhin p53 GPER herunterreguliert. Im Falle eines nicht funktionsfähigen mtp53 bleibt die GPER Expression auf einem hohen Niveau, alternative Stoffwechselwege werden aktiviert und induzieren die Apoptose der Zellen.

4.7 Die globale DNA-Demethylierung in Mammakarzinomzellen führte zu einem verstärkten Effekt der GPER Aktivierung

Nachdem in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von GPER die Proliferation von Mammakarzinomzellen durch einen Zellzyklusarrest und die Induktion der Apoptose hemmt, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation der Einfluss einer potentiellen DNA Methylierung des *GPER* Promotors untersucht. Eine solche spezifische Hypermethylierung von CpG-reichen DNA Sequenzen in den Promotorbereichen zählt, wie auch die globale Methylierung von Genbereichen, zu den wichtigen Merkmalen von Tumoren ²⁵⁷. Während die globale Methylierung jedoch mit einer Instabilisierung der Chromosomen und der Aktivierung von Onkogenen einhergeht, führt die lokale Methylierung zur transkriptionalen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Damit stellt die lokale Methylierung als epigenetische Modifikation, neben anderen genetischen und epigenetischen Regulationsmechanismen, eine ursächliche Möglichkeit für eine Abnahme der Expression des betreffenden Proteins dar ²⁵⁸. Für das Mammakarzinom konnten bereits eine Vielzahl von methylierten Genen nachgewiesen werden ^{135–137,259,260}. Das ER α Gen ist dabei eins der wichtigsten Gene, die im Mammakarzinom methyliert sein können ¹⁸⁷. In rund der Hälfte aller primären Mammakarzinome und über 70 % der ER α negativen Brusttumore wurde eine Methylierung der 5'-Region des ER α Promotors nachgewiesen ²⁶¹. Im Gegensatz

zu genetischen Mutationen, welche irreversibel sind, ist es möglich, epigenetisch stillgelegte Gene wieder zu aktivieren. Auf Basis verschiedener Mechanismen konnten daraufhin schon eine Reihe von neuen Medikamenten der „epigenetischen Therapie“ für die Behandlung von bösartigen Erkrankungen entwickelt werden¹²⁷. Da Methylierungen oft sehr früh in der Tumorentstehung auftreten, können potentielle Methylierungsmarker auch zur frühen Diagnose von Krebs beitragen und für die Abschätzung der Prognose für die Patientin von Bedeutung sein. Erst vor kurzem führte eine genomweite Sequenzierung des Methyloms TNBC DNA zur Identifikation von 17 TNBC-spezifischen DNA Bereichen mit veränderter Methylierung, welche einen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben scheinen²⁶².

Wir und andere Arbeitsgruppen konnten die signifikante Abnahme der GPER Expression während der Tumorprogression von Brust- und Ovarialkarzinomen zeigen^{103,106,109,263}. Darüber hinaus konnte in Tumorproben von Mammakarzinomen eine, im Vergleich zu gesundem Brustgewebe derselben Patientin, verringerte GPER Expression nachgewiesen werden¹⁰⁶. Auch für das Endometriumkarzinom wurde in einer großen Studie eine Korrelation zwischen einer geringen GPER Expression in Tumoren und einem schlechteren Überleben der Patientinnen nachgewiesen²⁶⁴. Eine Ursache der veränderten GPER Expression war bislang nicht bekannt. Da bisher keiner der bekannten GPER SNPs mit einer Krankheit assoziiert werden konnte, lag die Vermutung einer epigenetischen Regulierung der GPER Expression nahe.

Für die Untersuchung einer potentiellen Methylierung von GPER wurden die unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien mit dem Demethylierungsreagenz Aza behandelt. Als Analogon von Desoxycytidin führt Aza durch verschiedene Mechanismen, wie der Inhibierung und Degradierung der DNA-Methyltransferase-1 zur Demethylierung der DNA^{138,265}. Erstmals wurde Aza 1964 von Piskala und Sorm synthetisiert²⁶⁶. Jedoch wirkt dieser Inhibitor der DNA-Methyltransferase nur in niedriger Dosis als Demethylierungsreagenz. Hohe Dosen sind dagegen zytotoxisch²⁶⁷. Da für die Behandlung von soliden Tumoren höhere Dosen Aza nötig wären, ist ein Einsatz dieser Substanz bei soliden Tumoren aufgrund der hohen Toxizität gegen normale Körperzellen nicht möglich²⁶⁸. Eine Kombinationstherapie mit Substanzen wie Aza, die die ausgeschalteten Tumorsuppressoren reaktivieren und anderen Chemotherapeutika, könnte jedoch ein

vielversprechender therapeutischer Ansatz sein²⁶⁷. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen gezeigt, dass eine niedrige, nicht toxische Konzentration von Aza (5µM) die Expression von GPER in allen vier Mammakarzinomzellen erhöht. Diese Dosis wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe als angemessene niedrige Dosis für *in vitro* Versuche mit Mammakarzinomzellkulturen verwendet²⁶⁹. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass niedrige Aza Konzentrationen keine zytotoxischen Auswirkungen auf die nicht-tumorigenen Brustzelllinie MCF10A besitzen²⁷⁰, was einen Einsatz von niedrigen Dosen Aza in der Tumorthherapie möglich erscheinen lässt.

Darüber hinaus wurde zum anderen ein synergistischer Effekt von Aza und G-1 bei der Behandlung der Tumorzellen nachgewiesen. Dieser sich gegenseitig verstärkende Effekt beider Substanzen könnte durch die erhöhte GPER Expression durch Aza begründet werden, wodurch eine Aktivierung von GPER mit G-1 einen verstärkten Effekt auf die Tumorzellen hat. Die Demethylierung des GPER Promotors durch Aza konnte mit Hilfe der MSP in allen vier Zelllinien bewiesen werden. Da Aza jedoch das gesamte Genom demethyliert, ist nicht auszuschließen, dass weitere vorher methylierte und durch Aza reaktivierte Tumorsuppressorgene an der Vermittlung des Effektes von Aza und G-1 beteiligt sind. Auch die Expression von ERα wird durch Aza beeinflusst. Zeng und Kollegen konnten in ER positiven MCF-7 und T47D Brustkrebszellen nach Aza Behandlung eine Abnahme der ERα Proteinmenge in den Tumorzellen zeigen. In ER negativen Zelllinien hingegen bewirkte Aza eine Verstärkung der ERα Expression²⁷¹. Einen besonderen Stellenwert scheint die DNA Methylierung in den TNBC Zelllinien zu haben. Sowohl der Effekt von Aza alleine als auch der synergistische Effekt von Aza und G-1 waren in den beiden TNBC Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-468 wesentlich stärker ausgeprägt als bei MCF-7 und SKBr-3. Aza und G-1 wirken durch verschiedene Mechanismen, wie der Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose, inhibierend auf die Proliferation von Tumorzellen. Es ist bekannt, dass Aza durch Veränderung der Expression von Cyklinen und abweichende Methylierung von Genen, die in die Apoptose involviert sind, einen Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase sowie Apoptose auslösen kann²⁷²⁻²⁷⁴. Demzufolge ist eine kombinierte Therapie aus G-1 und DNA-Methyltransferaseinhibitoren wie Aza gerade für Patientinnen mit TNBC eine mögliche neue Therapiestrategie.

4.8 Die Promotormethylierung von GPER beeinflusst die Expression von GPER im Mammakarzinom

In dieser Arbeit konnte im Rahmen einer Studie mit 260 Brustkrebspatientinnen eine signifikante Korrelation zwischen der Methylierung des GPER Promoters und der GPER Proteinexpression gezogen werden. Die GPER Methylierung korreliert dabei mit einer verringerten GPER Expression. Damit liefern diese Daten nach den ersten in vitro Ergebnissen den Beweis, dass die Promotormethylierung ein wichtiger und wesentlicher epigenetischer Prozess ist, durch den die Expression von GPER im Mammakarzinom beeinflusst werden kann. Eine verringerte Expression von Tumorsuppressoren durch Hypermethylierung der Promotorbereiche der Gene ist eine bekannte Eigenschaft von Tumorzellen während des Voranschreitens der Tumorprogression und bekräftigt den Stellenwert von GPER als Tumorsuppressor.

Übereinstimmend mit anderen Studien zur GPER Expression im Mammakarzinom, zeigten gut 50 % der analysierten Tumorproben eine positive Expression von GPER^{102-104,106,107}. Im Gegensatz dazu ist GPER in gesundem, nicht tumorigen Brustgewebe ubiquitär exprimiert. Kürzlich veröffentlichten Broselid und Kollegen eine Studie in der sie zeigen konnten, dass die GPER Expression ein unabhängiger prognostischer Marker für ein verbessertes krankheitsfreies Überleben von ER α -positiven Brustkrebspatientinnen ist⁶³. Dazu passend konnte unsere Arbeitsgruppe eine verringerte GPER Expression im Mammakarzinom mit einem aggressiveren Tumorverhalten sowie einer schlechteren Prognose assoziieren¹⁰⁶. Mit dem Nachweis der GPER Promotormethylierung als eine Ursache für eine verringerte GPER Expression im Mammakarzinom ist ein möglicher Regulationsmechanismus der GPER Expression gefunden worden.

Die meisten Studien zur Expression von GPER zeigten eine positive Korrelation der Expression von GPER und ER α ^{63,88,102,103,106}. Dies würde im Umkehrschluss auf eine erhöhte Methylierungsrate in ER α -negativen Mammakarzinomen hindeuten. Leider konnte anhand der 260 analysierten Tumorproben keine signifikante Korrelation des GPER Methylierungsstatus mit ER α und weiteren Tumorparametern gefunden werden. Auch bezüglich der 5-Jahres-Überlebensraten von Patientinnen mit methylierter und nicht-methylierter GPER Gensequenz konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied gezeigt

werden. Jedoch scheint die GPER Promotormethylierung, gerade in den ersten drei Jahren nach Diagnose, einen leicht negativen Einfluss auf das Überleben zu haben.

Da die *in vitro* Daten dieser Dissertation einen besonders starken Effekt des Demethylierungsreagenz Aza in TNBC Zelllinien zeigten und GPER als potentieller Angriffspunkt für Therapien in dieser sonst nicht auf eine endokrine Therapie reagierenden Tumorart dienen könnte, wurde gezielt nach dem Einfluss der GPER Methylierung in Proben von TNBC Patientinnen geschaut. Mit rund 30 % lag der Anteil an TNBC Patientinnen in der Studie leicht über dem durchschnittlichen Wert von 15 – 20 %¹⁸⁸. In der Gruppe der TNBC Patientinnen korrelierte die GPER Hypermethylierung und daraus resultierend auch eine verringerte GPER Proteinexpression mit einer signifikanten Verringerung des Gesamtüberlebens. Zusätzlich wurden mehr Tumorrückfälle in der Gruppe der GPER methylierten TNBC Patientinnen gefunden. Es scheint als sei die Expression von GPER ein guter prognostischer Faktor und potentieller Angriffspunkt neuer Therapien für TNBC Patientinnen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen Studien, die die Expression von GPER als negativen prognostischen Faktor in TNBC beschrieben^{28,110,275}. Die unterschiedlichen Ergebnisse zur Bedeutung von GPER in TNBC zwischen den hier dargestellten Daten zur Methylierung und den Daten zur Expression von GPER in anderen Studien machen deutlich, dass GPER gerade bei triple-negativem Brustkrebs eine entscheidende Rolle zu spielen vermag. Denn aufgrund des Verlustes der klassischen Hormonrezeptoren ER α und PR sowie des Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu in triple-negativen Tumoren ist GPER der relevante Mediator der Östrogenaktivität.

4.9 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation konnte die Bedeutung von GPER als Tumorsuppressor im Mammakarzinom bestätigt werden. Die Arbeit trägt damit entscheidend zum besseren Verständnis der molekularen Stoffwechselwege von Östrogen bei. Darüber hinaus liefert sie einen neuen Ansatzpunkt für die Therapie des Mammakarzinoms. Zusammengefasst wurden folgende Erkenntnisse gewonnen: 1.) Die untersuchten Mammakarzinomzellen wiesen eine unterschiedliche GPER Proteinexpression auf. 2.) Auch bei geringer GPER Expression bewirkte die spezifische Stimulation von GPER einen Zellzyklusarrest in der Mitosephase und

die Induktion der Apoptose der Zellen, was sich in einer verminderten Proliferation der Tumorzellen zeigte. Dabei schien die Sensitivität der Zellen gegenüber der GPER Aktivierung abhängig von der zellspezifischen Expression des klassischen ER α , sowie dem Östrogengehalt in der Umgebung. 3.) Als Ursache für eine verringerte GPER Expression in Brusttumoren, verglichen zu gesundem Brustgewebe, konnte erstmalig die DNA Methylierung des *GPER* Promotors gezeigt werden. 4.) Es wurde eine besondere Relevanz der *GPER* Hypermethylierung für Patientinnen mit TNBC nachgewiesen. TNBC Patientinnen mit einer *GPER* Promotormethylierung zeigten gegenüber Patientinnen ohne Methylierung ein schlechteres Überleben. Weitere klinische Studien sind jedoch erforderlich, um die *GPER* Promotormethylierung als wichtigen Einflussfaktor im triple-negativen Mammakarzinom zu bestätigen. Gerade für diese Patientinnen, für die bislang keine spezifischen endokrinen Therapiemöglichkeiten verfügbar sind, geben neue Behandlungsansätze wie eine zielgerichtete Therapie anhand des GPERs Hoffnung auf eine größere Überlebenschance.

5 Zusammenfassung

Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER) spielt neben den klassischen Östrogenrezeptoren eine Rolle bei der Entstehung und dem Voranschreiten von hormonempfindlichen Tumoren. Da die bisherigen Ergebnisse bezüglich der GPER Funktion im Tumorgeschehen des Mammakarzinoms kontrovers diskutiert wurden, war das Ziel dieser Dissertation die Bedeutung dieses Östrogenrezeptors im Mammakarzinom in weiteren Details zu untersuchen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden *in vitro* Versuche mit Mammakarzinomzelllinien durchgeführt, die eine unterschiedliche Expression von Hormonrezeptoren und dem HER2/neu Rezeptor zeigten. Die spezifische Aktivierung von GPER verringerte die Proliferation der Tumorzellen, sowohl durch einen Zellzyklusarrest in der Mitosephase als auch durch die Induktion der Zellapoptose. Diese Daten bestätigen die anti-proliferative Funktion von GPER im Tumorgeschehen des Mammakarzinoms und deuten auf eine Funktion des Rezeptors als Tumorsuppressor. Da in einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die GPER Proteinexpression in Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen, verglichen zu gesundem Brustgewebe, abnimmt, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit eine potentielle Methylierung des *GPER* Promotors untersucht. Durch Anwendung einer methylierungsspezifischen PCR konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Promotorregion von *GPER* in Tumorgewebe methyliert ist. Analysen in Tumorproben zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der GPER Methylierung und der Proteinexpression des Rezeptors im Gewebe und lieferten damit eine plausible Erklärung für die unterschiedliche Expression von GPER beim Mammakarzinom im Vergleich zu dem normalen Brustgewebe. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse tragen maßgeblich zum besseren Verständnis der Bedeutung und der molekularen Regulation von GPER im Mammakarzinom bei und liefern mit der Identifizierung der DNA Methylierung einen Mechanismus zur Regulierung der GPER Expression. In diesem Zusammenhang stellt GPER, besonders für Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom, die aufgrund fehlender Hormonrezeptoren nicht von den klassischen adjuvanten Therapien profitieren, neue Denkanstöße zur Behandlung des Mammakarzinoms dar.

6 Summary

Together with the nuclear estrogen receptors (ER α and ER β), the G-protein coupled estrogen receptor (GPER) plays an important role in the development and progression of hormone-dependent tumors. Contradictory results were published in the last years regarding the role of GPER in tumor biology. Thus, the aim of this study was to investigate the function of GPER in breast cancer and to understand the mechanisms underlying its effects. Using breast cancer cell lines with different expression pattern of hormone receptors we observed a decreased proliferation of tumor cells upon specific GPER stimulation. GPER-activated cancer cells showed also cell cycle arrest in mitosis as well as increased apoptosis. As the GPER protein expression was shown to be diminished in tumor breast tissue compared to normal breast tissue we next analyzed the methylation state of the GPER promotor to assess a potential regulatory mechanism. We identified a CpG island in DNA sequence in the GPER promotor region. Additionally, we demonstrated an association between the GPER promotor methylation and GPER protein expression which may provide an explanation for the varying GPER protein expression in tumor tissue and during breast cancer progression. For patients with triple-negative breast cancer, methylation of the GPER promotor seems to have a negative impact on the overall survival. The data obtained during this PhD thesis contributes to a better understanding of the GPER function and its molecular regulation. We propose an anti-proliferative function of GPER on breast cancer cells and suggest this receptor as a potential new tumor suppressor. By identifying the DNA methylation pattern of the GPER promotor, we uncover a new regulatory mechanism for the GPER expression. Particularly for patients with triple-negative breast cancer, who do not benefit from available endocrine breast cancer therapies, GPER may represent a potential new target for cancer therapy.

7 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P. *et al.* *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10th ed. (Robert Koch-Institut, Berlin, 2015).
2. Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A. & Bender, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **75**, 429–439 (1997).
3. Osborne, C., Wilson, P. & Tripathy, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *The oncologist* **9**, 361–377 (2004).
4. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649 (1998).
5. Lerebours, F. & Lidereau, R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* **44**, 121–141 (2002).
6. Balmain, A., Gray, J. & Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nature genetics* **33 Suppl**, 238–244 (2003).
7. Macias, H. & Hinck, L. Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **1**, 533–557 (2012).
8. Kelsey, J. L., Gammon, M. D. & John, E. M. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews* **15**, 36–47 (1993).
9. Abbassi-Ghanavati, M., Greer, L. G. & Cunningham, F. G. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstetrics and gynecology* **114**, 1326–1331 (2009).
10. Imai, Y. *et al.* Nuclear receptors in bone physiology and diseases. *Physiological reviews* **93**, 481–523 (2013).
11. Knowlton, A. A. & Lee, A. R. Estrogen and the cardiovascular system. *Pharmacology & therapeutics* **135**, 54–70 (2012).
12. Cunningham, M. & Gilkeson, G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology* **40**, 66–73 (2011).
13. Williams, C. & Lin, C.-Y. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalscience* **7**, 370 (2013).
14. Fucic, A. *et al.* Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain. *Environmental health : a global access science source* **11 Suppl 1**, S8 (2012).
15. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
16. Osborne, C. K., Zhao, H. & Fuqua, S. A. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**, 3172–3186 (2000).
17. Cole, M. P., Jones, C. T. & Todd, I. D. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British journal of cancer* **25**, 270–275 (1971).
18. Davies, C. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)* **378**, 771–784 (2011).

19. Hu, R., Hilakivi-Clarke, L. & Clarke, R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncology letters* **9**, 1495–1501 (2015).
20. Clemons, M., Danson, S. & Howell, A. Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer treatment reviews* **28**, 165–180 (2002).
21. Kurebayashi, J. Resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **56 Suppl 1**, 39–46 (2005).
22. Buzdar, A. U., Robertson, J. F. R., Eiermann, W. & Nabholz, J.-M. An overview of the pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors anastrozole, letrozole, and exemestane. *Cancer* **95**, 2006–2016 (2002).
23. Nicholson, R. I. & Walker, K. J. Gn-RH agonists in breast and gynaecologic cancer treatment. *Journal of steroid biochemistry* **33**, 801–804 (1989).
24. Dent, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 4429–4434 (2007).
25. Chen, J.-Q. & Russo, J. ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches. *Biochimica et biophysica acta* **1796**, 162–175 (2009).
26. Anders, C. K. & Carey, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clinical breast cancer* **9 Suppl 2**, S73-81 (2009).
27. Brenton, C. M. Shaving for head lice is unnecessary and distressing. *BMJ (Clinical research ed.)* **331**, 405 (2005).
28. Girgert, R., Emons, G. & Grundker, C. Inhibition of GPR30 by estriol prevents growth stimulation of triple-negative breast cancer cells by 17beta-estradiol. *BMC cancer* **14**, 935 (2014).
29. Barton, V. N. *et al.* Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease. *Hormones & cancer* **6**, 206–213 (2015).
30. Barton, V. N. *et al.* Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Molecular cancer therapeutics* **14**, 769–778 (2015).
31. Webb, P. *et al.* The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **13**, 1672–1685 (1999).
32. Porter, W., Saville, B., Hoivik, D. & Safe, S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **11**, 1569–1580 (1997).
33. Galien, R. & Garcia, T. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic acids research* **25**, 2424–2429 (1997).
34. Ray, A., Prefontaine, K. E. & Ray, P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *The Journal of biological chemistry* **269**, 12940–12946 (1994).
35. Kim, K. H., Toomre, D. & Bender, J. R. Splice isoform estrogen receptors as integral transmembrane proteins. *Molecular biology of the cell* **22**, 4415–4423 (2011).
36. Banerjee, S., Chambliss, K. L., Mineo, C. & Shaul, P. W. Recent insights into non-nuclear actions of estrogen receptor alpha. *Steroids* **81**, 64–69 (2014).

37. Razandi, M., Pedram, A., Park, S. T. & Levin, E. R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2701–2712 (2003).
38. Jensen, E. V. & DeSombre, E. R. Estrogen-receptor interaction. *Science* **182**, 126–134 (1973).
39. Greene, G. L. *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York, N.Y.)* **231**, 1150–1154 (1986).
40. Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. first discovery of ERbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 5925–5930 (1996).
41. Hirata, S., Shoda, T., Kato, J. & Hoshi, K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **14**, 124–129 (2003).
42. Wang, Z. *et al.* Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochemical and biophysical research communications* **336**, 1023–1027 (2005).
43. Zou, Y., Ding, L., Coleman, M. & Wang, Z. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. *FEBS letters* **583**, 1368–1374 (2009).
44. Wang, Z. *et al.* A variant of estrogen receptor- $\{\alpha\}$, hER- $\{\alpha\}$ 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9063–9068 (2006).
45. Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U. & Weigel, R. J. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* **45**, 607–617 (1997).
46. Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R. & Ando, J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 737–741 (1997).
47. Owman, C., Blay, P., Nilsson, C. & Lolait, S. J. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **228**, 285–292 (1996).
48. Kvingedal, A. M. & Smeland, E. B. A novel putative G-protein-coupled receptor expressed in lung, heart and lymphoid tissue. *FEBS letters* **407**, 59–62 (1997).
49. Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. & Frackelton, A. R. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1649–1660 (2000).
50. Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R. & Bland, K. I. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **16**, 70–84 (2002).
51. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. & Dong, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**, 624–632 (2005).
52. Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. & Prossnitz, E. R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1625–1630 (2005).
53. Mizukami, Y. In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo. *Endocr. J.* **57**, 101–107 (2010).

54. Prossnitz, E. R. & Barton, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* **7**, 715–726 (2011).
55. Brunsing, R. L. & Prossnitz, E. R. Induction of interleukin-10 in the T helper type 17 effector population by the G protein coupled estrogen receptor (GPER) agonist G-1. *Immunology* **134**, 93–106 (2011).
56. Brunsing, R. L., Owens, K. S. & Prossnitz, E. R. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) agonist G-1 expands the regulatory T-cell population under TH17-polarizing conditions. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **36**, 190–196 (2013).
57. Brailoiu, E. *et al.* Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *The Journal of endocrinology* **193**, 311–321 (2007).
58. Meyer, M. R. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor protects from atherosclerosis. *Scientific reports* **4**, 7564 (2014).
59. Kong, B. S., Cho, Y. H. & Lee, E. J. G protein-coupled estrogen receptor-1 is involved in the protective effect of protocatechuic aldehyde against endothelial dysfunction. *PLoS one* **9**, e113242 (2014).
60. Sharma, G. & Prossnitz, E. R. Mechanisms of estradiol-induced insulin secretion by the G protein-coupled estrogen receptor GPR30/GPER in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **152**, 3030–3039 (2011).
61. Sharma, G. *et al.* GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology* **154**, 4136–4145 (2013).
62. Kolkova, Z., Noskova, V., Ehinger, A., Hansson, S. & Casslen, B. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER, GPR 30) in normal human endometrium and early pregnancy decidua. *Molecular human reproduction* **16**, 743–751 (2010).
63. Broselid, S. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor is apoptotic and correlates with increased distant disease-free survival of estrogen receptor-positive breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1681–1692 (2013).
64. Vivacqua, A. *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **20**, 631–646 (2006).
65. He, Y.-Y., Cai, B., Yang, Y.-X., Liu, X.-L. & Wan, X.-P. Estrogenic G protein-coupled receptor 30 signaling is involved in regulation of endometrial carcinoma by promoting proliferation, invasion potential, and interleukin-6 secretion via the MEK/ERK mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Sci.* **100**, 1051–1061 (2009).
66. Albanito, L. *et al.* G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 1859–1866 (2007).
67. Albanito, L. *et al.* Effects of atrazine on estrogen receptor alpha- and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental health perspectives* **123**, 493–499 (2015).
68. Vivacqua, A. *et al.* 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Molecular pharmacology* **70**, 1414–1423 (2006).
69. Siegfried, J. M., Hershberger, P. A. & Stabile, L. P. Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Seminars in oncology* **36**, 524–531 (2009).

70. Chan, Q. K. Y. *et al.* Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G(2) cell-cycle arrest. *Cell Death Differ.* **17**, 1511–1523 (2010).
71. Luttrell, L. M. Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **332**, 3–49 (2006).
72. Neves, S. R., Ram, P. T. & Iyengar, R. G protein pathways. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 1636–1639 (2002).
73. Lappano, R. & Maggiolini, M. GPCRs and cancer. *Acta pharmacologica Sinica* **33**, 351–362 (2012).
74. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).
75. Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology* **69**, 511–534 (2007).
76. Pierce, K. L., Premont, R. T. & Lefkowitz, R. J. Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 639–650 (2002).
77. Kuiper, G. G. *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252–4263 (1998).
78. Lappano, R. *et al.* Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Molecular and cellular endocrinology* **320**, 162–170 (2010).
79. Thomas, P. & Dong, J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **102**, 175–179 (2006).
80. Maggiolini, M. *et al.* The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 27008–27016 (2004).
81. Pupo, M. *et al.* Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental health perspectives* **120**, 1177–1182 (2012).
82. Shanle, E. K. & Xu, W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews* **62**, 1265–1276 (2010).
83. Katzenellenbogen, B. S. & Katzenellenbogen, J. A. Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. *Science (New York, N.Y.)* **295**, 2380–2381 (2002).
84. Petrie, W. K. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor-selective ligands modulate endometrial tumor growth. *Obstetrics and gynecology international* **2013**, 472720 (2013).
85. Ignatov, A., Ignatov, T., Roessner, A., Costa, S. D. & Kalinski, T. Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 87–96 (2010).
86. Bologna, C. G. *et al.* Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nature chemical biology* **2**, 207–212 (2006).
87. Ahola, T. M., Alkio, N., Manninen, T. & Ylikomi, T. Progestin and G protein-coupled receptor 30 inhibit mitogen-activated protein kinase activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **143**, 4620–4626 (2002).
88. Ariazi, E. A. *et al.* The G Protein-Coupled Receptor GPR30 Inhibits Proliferation of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Research* **70**, 1184–1194 (2010).

89. Wang, C., Lv, X., Jiang, C. & Davis, J. S. The putative G-protein coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian and breast cancer cells in a GPER-independent manner. *American journal of translational research* **4**, 390–402 (2012).
90. Dennis, M. K. *et al.* In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature chemical biology* **5**, 421–427 (2009).
91. Dennis, M. K. *et al.* Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **127**, 358–366 (2011).
92. Lappano, R. *et al.* MIBE acts as antagonist ligand of both estrogen receptor α and GPER in breast cancer cells. *Breast cancer research : BCR* **14**, R12 (2012).
93. Vivacqua, A. *et al.* GPER mediates the Egr-1 expression induced by 17 β -estradiol and 4-hydroxitamoxifen in breast and endometrial cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* (2011).
94. Pandey, D. P. *et al.* Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO journal* **28**, 523–532 (2009).
95. Francesco, E. M. de *et al.* GPER mediates activation of HIF1 α /VEGF signaling by estrogens. *Cancer research* **74**, 4053–4064 (2014).
96. Prossnitz, E. R. & Barton, M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and cellular endocrinology* **389**, 71–83 (2014).
97. Vivacqua, A. *et al.* G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **23**, 1815–1826 (2009).
98. Marco, P. de *et al.* Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells. *Oncogene* **32**, 678–688 (2013).
99. Goswami, C. *et al.* Estrogen destabilizes microtubules through an ion-conductivity-independent TRPV1 pathway. *Journal of neurochemistry* **117**, 995–1008 (2011).
100. Broselid, S. *et al.* G protein-coupled receptor 30 (GPR30) forms a plasma membrane complex with membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs) and protein kinase A-anchoring protein 5 (AKAP5) that constitutively inhibits cAMP production. *The Journal of biological chemistry* **289**, 22117–22127 (2014).
101. Kanda, N. & Watanabe, S. 17beta-estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *The Journal of investigative dermatology* **121**, 1500–1509 (2003).
102. Filardo, E. J. *et al.* Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6359–6366 (2006).
103. Kuo, W.-H. *et al.* The interactions between GPR30 and the major biomarkers in infiltrating ductal carcinoma of the breast in an Asian population. *Taiwan J Obstet Gynecol* **46**, 135–145 (2007).
104. Arias-Pulido, H. *et al.* GPR30 and estrogen receptor expression: new insights into hormone dependence of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 51–58 (2010).
105. Ignatov, A. *et al.* G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **128**, 457–466 (2011).
106. Ignatov, T. *et al.* GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis. *Cancer Invest.* **31**, 309–315 (2013).

107. Samartzis, E. P. *et al.* The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS ONE* **9**, e83296 (2014).
108. Mo, Z. *et al.* GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **15**, R114 (2013).
109. Ignatov, T. *et al.* GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res* **6**, 51 (2013).
110. Girgert, R., Emons, G. & Gründker, C. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast cancer research and treatment* **134**, 199–205 (2012).
111. Ahola, T. M., Manninen, T., Alkio, N. & Ylikomi, T. G protein-coupled receptor 30 is critical for a progestin-induced growth inhibition in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* **143**, 3376–3384 (2002).
112. Holm, A., Baldetorp, B., Olde, B., Leeb-Lundberg, L. M. F. & Nilsson, B.-O. The GPER1 agonist G-1 attenuates endothelial cell proliferation by inhibiting DNA synthesis and accumulating cells in the S and G2 phases of the cell cycle. *Journal of vascular research* **48**, 327–335 (2011).
113. Lubig, J. *et al.* Effects of a combined treatment with GPR30 agonist G-1 and herceptin on growth and gene expression of human breast cancer cell lines. *Cancer investigation* **30**, 372–379 (2012).
114. Graw, J. *Genetik*. 6th ed. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015).
115. Müller, O. & Wagener, C. *Molekulare Onkologie*. 3rd ed. (THIEME, [s.l.], 2009).
116. Tate, P. H. & Bird, A. P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Current opinion in genetics & development* **3**, 226–231 (1993).
117. Prokhortchouk, E. & Hendrich, B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene* **21**, 5394–5399 (2002).
118. Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209–213 (1986).
119. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**, 6–21 (2002).
120. Antequera, F. & Bird, A. CpG islands. *EXS* **64**, 169–185 (1993).
121. Fatemi, M. *et al.* Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic acids research* **33**, e176 (2005).
122. Antequera, F. & Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 11995–11999 (1993).
123. Li, E., Beard, C. & Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362–365 (1993).
124. Tremblay, K. D., Saam, J. R., Ingram, R. S., Tilghman, S. M. & Bartolomei, M. S. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nature genetics* **9**, 407–413 (1995).
125. Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B. & Riggs, A. D. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science (New York, N.Y.)* **246**, 810–813 (1989).
126. Riggs, A. D. & Pfeifer, G. P. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends in genetics : TIG* **8**, 169–174 (1992).

127. Rius, M. & Lyko, F. Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene* **31**, 4257–4265 (2012).
128. Antequera, F., Boyes, J. & Bird, A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503–514 (1990).
129. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400–5413 (2002).
130. Costello, J. F. *et al.* Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature genetics* **24**, 132–138 (2000).
131. Baylin, S. B. *et al.* Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human molecular genetics* **10**, 687–692 (2001).
132. Robertson, K. D. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**, 5361–5379 (2002).
133. Esteller, M. *et al.* Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 564–569 (2000).
134. Yang, X., Yan, L. & Davidson, N. E. DNA methylation in breast cancer. *Endocrine-related cancer* **8**, 115–127 (2001).
135. Mirza, S. *et al.* Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* **81**, 280–287 (2007).
136. Moelans, C. B., Verschuur-Maes, A. H. J. & van Diest, P. J. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J. Pathol.* **225**, 222–231 (2011).
137. Rønneberg, J. A. *et al.* Methylation profiling with a panel of cancer related genes: association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer. *Mol Oncol* **5**, 61–76 (2011).
138. Christman, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**, 5483–5495 (2002).
139. Taylor, S. M. & Jones, P. A. Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5-azacytosine-containing DNA. *Journal of molecular biology* **162**, 679–692 (1982).
140. Fenaux, P. *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *The Lancet. Oncology* **10**, 223–232 (2009).
141. Kantarjian, H. *et al.* Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* **109**, 52–57 (2007).
142. Diesch, J. *et al.* A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clinical epigenetics* **8**, 71 (2016).
143. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
144. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
145. McIntosh, J. R. & Koonce, M. P. Mitosis. *Science (New York, N.Y.)* **246**, 622–628 (1989).
146. Pines, J. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in cell biology* **16**, 55–63 (2006).

147. Hartwell, L. H. & Kastan, M. B. Cell cycle control and cancer. *Science (New York, N.Y.)* **266**, 1821–1828 (1994).
148. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**, 630–641 (2005).
149. John, P. C., Mews, M. & Moore, R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma* **216**, 119–142 (2001).
150. Lodish, H. & Lange, C. *Molekulare Zellbiologie*. 4th ed. (Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 2001).
151. Hochegger, H., Takeda, S. & Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 910–916 (2008).
152. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239–257 (1972).
153. Penalzoza, C. *et al.* Cell death in mammalian development. *Current pharmaceutical design* **14**, 184–196 (2008).
154. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–776 (2000).
155. Porter, A. G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation* **6**, 99–104 (1999).
156. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491–501 (1998).
157. Lavrik, I., Golks, A. & Krammer, P. H. Death receptor signaling. *Journal of cell science* **118**, 265–267 (2005).
158. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 621–632 (2010).
159. Szegezdi, E., Fitzgerald, U. & Samali, A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1010**, 186–194 (2003).
160. Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A. & Yoshida, H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *Journal of cell science* **119**, 3958–3966 (2006).
161. Candé, C. *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215–222 (2002).
162. Cregan, S. P., Dawson, V. L. & Slack, R. S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**, 2785–2796 (2004).
163. Susin, S. A. *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of experimental medicine* **184**, 1331–1341 (1996).
164. Susin, S. A. *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441–446 (1999).
165. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409–1416 (1973).
166. Jänicke, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment* **117**, 219–221 (2009).
167. Voss, M. J. *et al.* Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism. *BMC cancer* **11**, 158 (2011).

168. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **12**, R68 (2010).
169. Lacroix, M., Toillon, R.-A. & Leclercq, G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 293–325 (2006).
170. Engel, L. W. & Young, N. A. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer research* **38**, 4327–4339 (1978).
171. Subik, K. *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast cancer : basic and clinical research* **4**, 35–41 (2010).
172. Cailleau, R., Olive, M. & Cruciger, Q. V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* **14**, 911–915 (1978).
173. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63 (1983).
174. Christman, J. K., Schneiderman, N. & Acs, G. Formation of highly stable complexes between 5-azacytosine-substituted DNA and specific non-histone nuclear proteins. Implications for 5-azacytidine-mediated effects on DNA methylation and gene expression. *The Journal of biological chemistry* **260**, 4059–4068 (1985).
175. E. Dejana & M. Corada (eds.). *Adhesion Protein Protocols* (Humana Press, New Jersey, 1999).
176. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
177. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
178. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
179. Remmele, W. & Stegner, H. E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* **8**, 138–140 (1987).
180. Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 1827–1831 (1992).
181. Li, L.-C. & Dahiya, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* **18**, 1427–1431 (2002).
182. Pines, J. & Hunter, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* **58**, 833–846 (1989).
183. Prigent, C. & Dimitrov, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of cell science* **116**, 3677–3685 (2003).
184. Levine, A. J., Momand, J. & Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**, 453–456 (1991).
185. Gudkov, A. V. & Komarova, E. A. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature reviews. Cancer* **3**, 117–129 (2003).
186. Bykov, V. J. N. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature medicine* **8**, 282–288 (2002).

187. Ottaviano, Y. L. *et al.* Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer research* **54**, 2552–2555 (1994).
188. Oakman, C., Viale, G. & Di Leo, A. Management of triple negative breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)* **19**, 312–321 (2010).
189. Brisken, C. & O'Malley, B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a003178 (2010).
190. Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G. & Kolar, Z. Mammary gland development and cancer. *Ceskoslovenska patologie* **41**, 94–101 (2005).
191. Mackay, A. *et al.* Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *Journal of the National Cancer Institute* **103**, 662–673 (2011).
192. Hennessy, B. T. *et al.* Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer research* **69**, 4116–4124 (2009).
193. Prat, A. & Perou, C. M. Mammary development meets cancer genomics. *Nature medicine* **15**, 842–844 (2009).
194. Maier, T., Güell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* **583**, 3966–3973 (2009).
195. Aihara, M. *et al.* Optimizing high-resolution melting analysis for the detection of mutations of GPR30/GPER-1 in breast cancer. *Gene* **501**, 118–126 (2012).
196. Gry, M. *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC genomics* **10**, 365 (2009).
197. Sousa Abreu, R. de, Penalva, L. O., Marcotte, E. M. & Vogel, C. Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Molecular bioSystems* **5**, 1512–1526 (2009).
198. Vogel, C. & Marcotte, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics* **13**, 227–232 (2012).
199. Otto, C. *et al.* G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology* **149**, 4846–4856 (2008).
200. Fraser, S. P. *et al.* Estrogen and non-genomic upregulation of voltage-gated Na(+) channel activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells: role in adhesion. *Journal of cellular physiology* **224**, 527–539 (2010).
201. Wei, W. *et al.* The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* **5**, e1428 (2014).
202. Filardo, E. *et al.* Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* **148**, 3236–3245 (2007).
203. Cheng, S.-B., Graeber, C. T., Quinn, J. A. & Filardo, E. J. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids* **76**, 892–896 (2011).
204. Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M. & Mizukami, Y. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochemical and biophysical research communications* **346**, 904–910 (2006).

205. Sakamoto, H. *et al.* Expression of G protein-coupled receptor-30, a G protein-coupled membrane estrogen receptor, in oxytocin neurons of the rat paraventricular and supraoptic nuclei. *Endocrinology* **148**, 5842–5850 (2007).
206. Irannejad, R. & Zastrow, M. von. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology* **27**, 109–116 (2014).
207. Gobeil, F. *et al.* G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **84**, 287–297 (2006).
208. Revankar, C. M. *et al.* Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS chemical biology* **2**, 536–544 (2007).
209. Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **20**, 1996–2009 (2006).
210. Madeo, A. & Maggiolini, M. Nuclear alternate estrogen receptor GPR30 mediates 17beta-estradiol-induced gene expression and migration in breast cancer-associated fibroblasts. *Cancer research* **70**, 6036–6046 (2010).
211. Cheng, S.-B., Quinn, J. A., Graeber, C. T. & Filardo, E. J. Down-modulation of the G-protein-coupled estrogen receptor, GPER, from the cell surface occurs via a trans-Golgi-proteasome pathway. *The Journal of biological chemistry* **286**, 22441–22455 (2011).
212. Gaudet, H. M., Cheng, S. B., Christensen, E. M. & Filardo, E. J. The G-protein coupled estrogen receptor, GPER: The inside and inside-out story. *Molecular and cellular endocrinology* **418 Pt 3**, 207–219 (2015).
213. Teng, J., Wang, Z.-Y., Prossnitz, E. R. & Bjorling, D. E. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits human urothelial cell proliferation. *Endocrinology* **149**, 4024–4034 (2008).
214. Chimento, A. *et al.* Selective GPER activation decreases proliferation and activates apoptosis in tumor Leydig cells. *Cell death & disease* **4**, e747 (2013).
215. Albanito, L. *et al.* G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environmental health perspectives* **116**, 1648–1655 (2008).
216. Du, G.-Q., Zhou, L., Chen, X.-Y., Wan, X.-P. & He, Y.-Y. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative and invasive effects induced by hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **420**, 343–349 (2012).
217. Ruan, S.-Q., Wang, S.-W., Wang, Z.-H. & Zhang, S.-Z. Regulation of HRG-beta1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression. *Molecular medicine reports* **6**, 131–138 (2012).
218. Heublein, S. *et al.* The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) in ovarian granulosa cell tumors. *International journal of molecular sciences* **15**, 15161–15172 (2014).
219. Sjostrom, M. *et al.* Lack of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) in the plasma membrane is associated with excellent long-term prognosis in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **145**, 61–71 (2014).
220. Wang, C. *et al.* The G-protein-coupled estrogen receptor agonist G-1 suppresses proliferation of ovarian cancer cells by blocking tubulin polymerization. *Cell death & disease* **4**, e869 (2013).
221. Kang, L. *et al.* Involvement of estrogen receptor variant ER-alpha36, not GPR30, in nongenomic estrogen signaling. *Mol. Endocrinol.* **24**, 709–721 (2010).

222. Holm, A. *et al.* The G protein-coupled oestrogen receptor 1 agonist G-1 disrupts endothelial cell microtubule structure in a receptor-independent manner. *Molecular and cellular biochemistry* **366**, 239–249 (2012).
223. Gui, Y. *et al.* The GPER agonist G-1 induces mitotic arrest and apoptosis in human vascular smooth muscle cells independent of GPER. *Journal of cellular physiology* **230**, 885–895 (2015).
224. Lee, L. M. J. *et al.* ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer research* **28**, 479–483 (2008).
225. Shi, L. *et al.* Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 3423–3429 (2009).
226. Zhang, X. & Wang, Z.-Y. Estrogen receptor-alpha variant, ER-alpha36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* **154**, 1990–1998 (2013).
227. Pelekanou, V. *et al.* Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ERalpha36 and GPR30/GPER1. *Journal of leukocyte biology* **99**, 333–347 (2016).
228. Lindsey, S. H., Carver, K. A., Prossnitz, E. R. & Chappell, M. C. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat. *Journal of cardiovascular pharmacology* **57**, 598–603 (2011).
229. Peyton, C. & Thomas, P. Involvement of epidermal growth factor receptor signaling in estrogen inhibition of oocyte maturation mediated through the G protein-coupled estrogen receptor (Gper) in zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of reproduction* **85**, 42–50 (2011).
230. Tica, A. A. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor 1-mediated effects in the rat myometrium. *American journal of physiology. Cell physiology* **301**, C1262-9 (2011).
231. Pink, J. J. & Jordan, V. C. Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer research* **56**, 2321–2330 (1996).
232. Ohi, R. & Gould, K. L. Regulating the onset of mitosis. *Current opinion in cell biology* **11**, 267–273 (1999).
233. Choi, H. J., Fukui, M. & Zhu, B. T. Role of cyclin B1/Cdc2 up-regulation in the development of mitotic prometaphase arrest in human breast cancer cells treated with nocodazole. *PloS one* **6**, e24312 (2011).
234. Mori, T. *et al.* G protein-coupled estrogen receptor 1 agonist G-1 induces cell cycle arrest in the mitotic phase, leading to apoptosis in endometriosis. *Fertility and sterility* **103**, 1228-35.e1 (2015).
235. Hans, F. & Dimitrov, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**, 3021–3027 (2001).
236. Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E. & Rizzuto, R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **27**, 6407–6418 (2008).
237. Kooptiwut, S. *et al.* Estrogen reduces endoplasmic reticulum stress to protect against glucotoxicity induced-pancreatic beta-cell death. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **139**, 25–32 (2014).
238. Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179–185 (1995).

239. Chen, J.-R. *et al.* Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *The Journal of biological chemistry* **280**, 4632–4638 (2005).
240. Okada, H. & Mak, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature reviews. Cancer* **4**, 592–603 (2004).
241. Chimento, A. *et al.* Oleuropein and hydroxytyrosol activate GPER/ GPR30-dependent pathways leading to apoptosis of ER-negative SKBR3 breast cancer cells. *Molecular nutrition & food research* **58**, 478–489 (2014).
242. Oberhammer, F. *et al.* Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *The EMBO journal* **12**, 3679–3684 (1993).
243. Eck-Enriquez, K., Kiefer, T. L., Spriggs, L. L. & Hill, S. M. Pathways through which a regimen of melatonin and retinoic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **61**, 229–239 (2000).
244. Liang, Y., Yan, C. & Schor, N. F. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* **20**, 6570–6578 (2001).
245. Angeloni, S. V. *et al.* Regulation of estrogen receptor-alpha expression by the tumor suppressor gene p53 in MCF-7 cells. *The Journal of endocrinology* **180**, 497–504 (2004).
246. Berger, C. E., Qian, Y., Liu, G., Chen, H. & Chen, X. p53, a target of estrogen receptor (ER) alpha, modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **287**, 30117–30127 (2012).
247. Lipskaia, L. & Lompre, A.-M. Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**, 55–68 (2004).
248. Fei, P. & El-Deiry, W. S. P53 and radiation responses. *Oncogene* **22**, 5774–5783 (2003).
249. Di Agostino, S. *et al.* Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer cell* **10**, 191–202 (2006).
250. Hirshfield, K. M. & Ganesan, S. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. *Current opinion in obstetrics & gynecology* **26**, 34–40 (2014).
251. Nigro, J. M. *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* **342**, 705–708 (1989).
252. Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* **28**, 622–629 (2007).
253. Polotskaia, A. *et al.* Proteome-wide analysis of mutant p53 targets in breast cancer identifies new levels of gain-of-function that influence PARP, PCNA, and MCM4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E1220-9 (2015).
254. Marzec, K. A., Lin, M. Z., Martin, J. L. & Baxter, R. C. Involvement of p53 in insulin-like growth factor binding protein-3 regulation in the breast cancer cell response to DNA damage. *Oncotarget* **6**, 26583–26598 (2015).
255. Collavin, L., Lunardi, A. & Del Sal, G. p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell death and differentiation* **17**, 901–911 (2010).

256. Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L. & Del Sal, G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* **33**, 2007–2017 (2012).
257. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 27–36 (2010).
258. Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427–5440 (2002).
259. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415–428 (2002).
260. Lo, P.-K. & Sukumar, S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* **9**, 1879–1902 (2008).
261. Wei, M. *et al.* Estrogen receptor alpha, BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast cancer research and treatment* **111**, 113–120 (2008).
262. Stirzaker, C. *et al.* Methylome sequencing in triple-negative breast cancer reveals distinct methylation clusters with prognostic value. *Nature communications* **6**, 5899 (2015).
263. Poola, I., Abraham, J., Liu, A., Marshalleck, J. J. & Dewitty, R. L. The Cell Surface Estrogen Receptor, G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30), is Markedly Down Regulated During Breast Tumorigenesis. *Breast cancer : basic and clinical research* **1**, 65–78 (2008).
264. Krakstad, C. *et al.* Loss of GPER identifies new targets for therapy among a subgroup of ERalpha-positive endometrial cancer patients with poor outcome. *British journal of cancer* **106**, 1682–1688 (2012).
265. Ghoshal, K. *et al.* 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and cellular biology* **25**, 4727–4741 (2005).
266. Sorm, F., Piskala, A., Cihak, A. & Vesely, J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* **20**, 202–203 (1964).
267. Jabbour, E., Issa, J.-P., Garcia-Manero, G. & Kantarjian, H. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* **112**, 2341–2351 (2008).
268. Connolly, R. & Stearns, V. Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* **17**, 191–204 (2012).
269. Tyagi, T., Treas, J. N., Mahalingaiah, P. K. S. & Singh, K. P. Potentiation of growth inhibition and epigenetic modulation by combination of green tea polyphenol and 5-aza-2'-deoxycytidine in human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **149**, 655–668 (2015).
270. Singh, K. P., Treas, J., Tyagi, T. & Gao, W. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine treatment abrogates 17 beta-estradiol-induced cell growth and restores expression of DNA repair genes in human breast cancer cells. *Cancer Lett.* **316**, 62–69 (2012).
271. Zeng, L. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) plays a role in the anti-tumorigenic effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (AZA) in breast cancer cells. *Experimental cell research* **319**, 2282–2295 (2013).
272. Al-Romaih, K. *et al.* Modulation by decitabine of gene expression and growth of osteosarcoma U2OS cells in vitro and in xenografts: identification of apoptotic genes as targets for demethylation. *Cancer cell international* **7**, 14 (2007).

273. Valdez, B. C. *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant myeloid leukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. *Leukemia research* **34**, 364–372 (2010).
274. Shin, D. Y. *et al.* Decitabine, a DNA methyltransferases inhibitor, induces cell cycle arrest at G2/M phase through p53-independent pathway in human cancer cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **67**, 305–311 (2013).
275. Steiman, J., Peralta, E. A., Louis, S. & Kamel, O. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *American journal of surgery* **206**, 698–703 (2013).

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	GPER und ER Signalwege.....	9
Abb. 2	Übersicht der Zellzyklusphasen und Konzentration der Cycline im Verlauf des Zellzyklus.....	15
Abb. 3	Schematische Darstellung des Wundheilungs-Assays.	36
Abb. 4	Beispiel eines Histogramms der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse.	47
Abb. 5	Schematische Darstellung der Bisulfitkonvertierung in Abhängigkeit des Methylierungsstatus der DNA.	51
Abb. 6	Chemische Umwandlung von Cytosin in Uracil durch die Bisulfitkonvertierung.....	52
Abb. 7	Schematische Darstellung des <i>GPER</i> Gens mit proximaler Promotorregion und <i>GPER</i> Methylierungsanalyse mittels methylierungsspezifischer PCR.....	53
Abb. 8:	Lichtmikroskopische Aufnahmen der vier Brustkrebszelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468.	56
Abb. 9	Unterschiedliche Expression von GPER in den vier analysierten Mammakarzinomzelllinien MCF-7, SKBr-3, MDA-MB-231 und MDA-MB-468.	57
Abb. 10	Lokalisierung von GPER in Mammakarzinomzelllinien.	58
Abb. 11	GPER Aktivierung mit Hilfe des spezifischen GPER Agonisten G-1 resultierte in einer Dosis-abhängigen Verringerung der Zellviabilität.	60
Abb. 12	Die Behandlung der Tumorzellen wirkte sich negativ auf die Morphologie der Tumorzellen aus.	61
Abb. 13	Lineare Regressionsanalyse der Korrelation zwischen GPER Proteinexpression und G-1 Konzentration in Normalmedium (A) sowie in hormonfreiem (B)Medium.....	62
Abb. 14	Der GPER Antagonist G-15 verminderte die G-1 Hemmung der Zellproliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.	63
Abb. 15	Der GPER Agonist verminderte die Proliferation und Migration der MCF-7 Zellen signifikant.	65
Abb. 16	G-1 Stimulation von MCF-7 Zellen resultierte in einer verringerten Wundheilung, welche durch zusätzliche Behandlung mit dem GPER Antagonisten G-15 verbessert wurde.	65
Abb. 17	Herunterregulation von GPER mit GPER siRNA minimierte den anti-proliferativen Effekt des GPER Agonisten G-1.....	66
Abb. 18	Charakteristische Histogramme der Zellzyklusanalyse zeigten Unterschiede in der Verteilung der Zellen in die einzelnen Zellzyklusphasen.	67
Abb. 19	Die Zellzyklusanalyse der Mammakarzinomzelllinien (A) MCF-7, (B) SkBr-3, (C) MDA-MB-231 und (D) MDA-MB-468 zeigte eine unterschiedliche Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen nach G-1 Behandlung.	68
Abb. 20	G-1 verringert die Proteinexpression von Cyclin B1 und CDK1 in MCF-7 und SKBr-3, aber nicht in TNBC Zellen.....	69
Abb. 21	G-1 erhöhte die Expression von phosphoryliertem Histon H3 bereits nach wenigen Stunden.	70
Abb. 22	G-1 erhöhte die Anzahl an Annexin V positiven, apoptotischen Zellen signifikant.	71
Abb. 23	G-1 induzierte die Expression der Effektorcaspase-3 und ihrer inaktiven Vorstufe Procaspase-3.....	72
Abb. 24	Die Aktivierung von GPER in MCF-7 Mammakarzinomzellen veränderte die Expression von AIF nicht. ..	73

Abb. 25	GPER Aktivierung induzierte die Proteinexpression des Tumorsuppressors p53.....	74
Abb. 26	Radioaktive Strahlen veränderten die GPER mRNA Expression in Abhängigkeit des Tumorsuppressorproteins p53.....	75
Abb. 27	Radioaktive Strahlen erhöhten die Proteinexpression von p53 in den Mammakarzinomzelllinien.....	76
Abb. 28	Die Inhibierung der DNA-Methyltransferase-1 durch 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) erhöhte die mRNA Expression von GPER statistisch signifikant.	77
Abb. 29	Die kombinierte Gabe von Aza und G-1 bewirkte, verglichen mit den Einzelsubstanzen, eine signifikant verringerte Zellviabilität in Mammakarzinomzelllinien.	78
Abb. 30	Die methylierungsspezifische PCR zeigt einen möglichen methylierbaren <i>GPER</i> DNA Bereich <i>in vitro</i> . (A), MSP der untersuchten Mammakarzinomzelllinien.	79
Abb. 31	Exemplarisches Bild der MSP der Tumorproben	80
Abb. 32	Immunhistochemische GPER Färbung in Brusttumorschnitten.....	82
Abb. 33	Die Methylierung des GPER Promotors wirkte sich negativ auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen aus.	85

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der verwendeten humanen Karzinomzelllinien.....	28
Tab. 2	Antikörperliste mit verwendeter Verdünnung	29
Tab. 3	Verwendete Primer für die PCR	30
Tab. 4	Tumorcharakterisierung der analysierten Brustkrebspatientinnen.....	31
Tab. 5	Programm der GPER Echtzeit PCR.....	39
Tab. 6	Zusammensetzung von je zwei Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt.....	42
Tab. 7	Immunhistochemische Charakterisierung der GPER Expression	49
Tab. 8	Ermittelte effektive Konzentrationen (EC_{50}) von G-1 auf Mammakarzinomzelllinien in Abhängigkeit von Östrogen im Zellkulturmedium.	60
Tab. 9	Zusammenhang zwischen der <i>GPER</i> Promotormethylierung und den Tumoreigenschaften der untersuchten Brustkrebspatientinnen.....	81
Tab. 10	Zusammenhang von <i>GPER</i> Promotormethylierung und Proteinexpression in Mammakarzinomproben	83

10 Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn apl. Prof. Dr. med. Atanas Ignatov und Frau Prof. Dr. Ana Zenclussen. Herr Prof. Ignatov vertraute mir sein Forschungsprojekt an und gab mir so die Möglichkeit, mit eigenen Ideen frei und unabhängig an diesem Projekt zu arbeiten. Er unterstützte mich dabei nach allen Kräften und nahm sich Zeit für Gespräche und fachliche Diskussionen. Frau Prof. Zenclussen nahm mich in ihrem Labor und ihrer Arbeitsgruppe auf und gab mir einen Raum und den Platz für meine Ideen. Zudem bekam Ich auch die Möglichkeit an den Seminaren der Arbeitsgruppe teilzunehmen, mich dort auszutauschen und weiter zu entwickeln. Dafür bin ich sehr dankbar und hoffe, dass wir auch in Zukunft unsere Zusammenarbeit vertiefen und weiter gemeinsam an Projekten arbeiten können.

Ich möchte den Gutachtern meiner Arbeit und den Mitgliedern des Promotionsausschusses danken. Durch Ihr Interesse und Ihre Zeit ist es möglich meine Dissertation erfolgreich zum Abschluss zu bringen.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei den Kolleginnen und Kollegen der Experimentellen Gynäkologie und Geburtshilfe bedanken. Es war stets ein sehr angenehmes und kollegiales Arbeiten mit euch. Im Labor, in Seminaren und in den Pausen konnte ich zu euch kommen und mit euch gemeinsam Lösungen und Antworten für alle Probleme und Fragen finden.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der Deutschen Krebshilfe sowie der Kommission zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie. Allen voran meinem Ehemann Norman für seine Unterstützung und den Halt zuhause, sowie für sein Interesse und die Wertschätzung meiner Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern Roswitha und Eckhard. Ihr habt mir mein Studium ermöglicht und seid auch heute noch unsere Stütze - immer zur Stelle und einsatzbereit, wenn wir euch brauchen.

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

Der G-Protein gekoppelte Östrogenrezeptor als Tumorsuppressor im Mammakarzinom

selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der ausgewiesenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 16. Januar 2017

Christine Weißenborn

12 Publikationen

Weissenborn C, Ignatov T, Nass N, Kalinski T, Costa SD, Zenclussen AC, Ignatov A. GPER Promoter Methylation Controls GPER Expression in Breast Cancer Patients. *Cancer Invest.* 2017, 1-8. (IF=2,20)

Nass N, Dittmer A, Hellwig V, Lange T, Mirjam BJ, Leyh B, Ignatov A, **Weißenborn C**, Kirkegaard T, Lykkesfeldt AE, Kalinski T, Dittmer J. Expression of transmembrane protein 26 (TMEM26) in breast cancer and its association with drug response. *Oncotarget.* 2016 (IF = 6,36)

Weißenborn C, Ignatov T, Ochel HJ, Costa SD, Zenclussen AC, Ignatova Z, Ignatov A. GPER functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 May;140(5):713-23 (IF=3,08)

Weißenborn C, Ignatov T, Poehlmann A, Wege AK, Costa SD, Zenclussen AC, Ignatov A. GPER functions as a tumor suppressor in MCF-7 and SK-BR-3 breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Apr;140(4):663-71 (IF=3,08)

Ignatov T, Modl S, Thulig M, **Weißenborn C**, Treack O, Ortmann O, Zenclussen A, Costa SD, Kalinski T, Ignatov A. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2013 Jul 13;6(1):51. (IF=2,03)

Ignatov T, **Weißenborn C**, Poehlmann A, Lemke A, Semczuk A, Costa SD, Kalinski T, Ignatov A. GPER-1 expression decreases during breast cancer tumorigenesis. *Cancer Invest.* 2013 Jun;31(5):309-15. (IF=2,06)

Ignatov A, Ignatov T, **Weißenborn C**, Eggemann H, Bischoff J, Roessner A, Costa SD, Kalinski T. G-protein-coupled Estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jul;128(2):457-66. (IF=4,43)

Magdeburg, 16. Januar 2017