Universitätsklinikum der Universität Ulm

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Janni

Untersuchungen zur Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems für die Tumorangiogenese beim Mammakarzinom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der

Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Christof Sauer

Offenburg

2017

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. apl. Dr. Christine Wulff

2. Berichterstatter: Prof. apl. Dr. Rainer Meierhenrich

Tag der Promotion: 11. 01. 2019

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen III

1. Einleitung 1

1.1. Das Mammakarzinom 1

1.2. Tumorangiogenese 6

1.3. Vascular Endothelial Growth Factor 8

1.4. Renin-Angiotensin-System 9

1.5. Zielsetzung 13

2. Material und Methoden 15

2.1. Zellkultur 15

2.1.1. Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung 15

2.1.2. Angiotensin-II-Stimulation 16

2.1.3. AGT-Knockdown 18

2. 2. RNA-Isolation 19

2.3. Reverse Transkription 21

2.4. PCR 22

2.4.1. PCR-Protokoll, Cycler Programm und Primer Sequenzen 22

2.4.2. Darstellung und Auswertung der PCR-Produkte 23

2.5. VEGF-ELISA 24

2.6. Quantitative Real-Time-PCR 25

2.7. Überprüfung des AGT-Knockdowns 27

2.8. Auswertung der TaqMan-Rohdaten 29

2.9. Statistik 29

3. Ergebnisse 31

3.1. Nachweis der Expression von Genen, die an der Regulation der Angiogenese über den Renin-Angiotensin-Weg beteiligt sind 31
3.2. Angiotensin-II-Stimulation 32
3.2.1. Real-Time-PCR 32
3.2.2. VEGF-ELISA 38
3.3. Angiotensinogen-Knockdown 40
3.3.1. VEGF-Real-Time-PCR 40
3.3.2. VEGF-ELISA 42
4. Diskussion 45
4.1. Nachweis von Komponenten des RAS bei Mammakarzinomzellen 46
4.2. Einfluss von extrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression 47
4.3. Einfluss von intrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression 51
4.4. Schlussfolgerungen 58
5. Zusammenfassung 61
6. Literaturverzeichnis 63
Anhang: 76
TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung: 76
Danksagung 80
Lebenslauf 81

Abkürzungen

A	
A	in RNA-Sequenz: Adenin
A.	Arterie (Arteria)
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ACE2	Angiotensin-converting-enzyme-2
AGT	Angiotensinogen
Akt	Proteinkinase B
Ang1-7	Angiotensin1-7
Ang1-9	Angiotensin1-9
Ang1-12	Angiotensin1-12
AP-1	Activator protein 1
ATI	Angiotensin I
ATII	Angiotensin II
AT_1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor- 1
AT_2-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor- 2
B	
bp	Basenpaare (base pairs)
BRCA1	Breast cancer 1, Brustkrebsgen 1
BRCA2	Breast cancer 2, Brustkrebsgen 2
C	
C	in RNA-Sequenz: Cytosin
° C	Grad Celsius
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Fos	Protoonkogen, Untereinheit des Activator protein 1
c-Jun	Protoonkogen, Untereinheit des Activator protein 1

Cl	Chlor
CO_2	Kohlendioxid
COX2	Cyclooxygenase
cm	Zentimeter
ct	Schwellenwert-Zyklus (cycle threshold)
D	
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Zellkulturmedium
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alii, lateinisch für "und andere"
F	
FAM	Reporterfarbe für quantitative Real-Time-PCR
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
Fra-1	Protoonkogen, Untereinheit des Activator protein 1
G	
G	in RNA-Sequenz: Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
H	
h	Stunde(n)
H_2O	chemische Summenformel von Wasser
Ham's F12	Zellkulturmedium

Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HR	Hormonrezeptor
K	
K	Negativkontrolle
Ki-67	Antigen Ki-67, Proliferationsmarker
M	
M	molar (Mol pro Liter)
M.	Morbus
MAP	mitogen-activated protein
mas-Rezeptor	MAS1 oncogene, Rezeptor für Ang1-7
Mg^{2+}	Magnesium-Ion
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
mol/l	Mol pro Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
N	
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells
NO	Stickstoffmonooxid
Nonidet P-40	Octylphenoxypolyethoxyethanol

P

p	p-Wert, Signifikanzwert
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD123,319	selektiver Angiotensin-II-Rezeptor-2-Antagonist
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PGF	Plazenta-Wachstumsfaktor (placental growth factor)
PR	Progesteronrezeptor
%	Prozent

Q

Q-Solution	Lösung von Qiagen TaqMan

R

RAS	Renin-Angiotensin-System
RD1W	Reagenz für ELISA von R&D Systems
RD5K	Kalibrierungsdiulent für ELISA von R&D Systems
rel.	relative
RLN	Lyse-Puffer zur Ribonukleinsäurenisolation
RLT	Lyse-Puffer zur Ribonukleinsäurenisolation
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonukleinase
RNeasy	Eigenname des RNA-Isolierungs-Kits von Qiagen
RPE	Waschpuffer für RNA-Isolierung von Qiagen
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

RPMI-1640	Zellkulturmedium, das am Rosswell Park Memorial Institut entwickelt wurde
RW1	Waschpuffer zur RNA-Isolierung von Qiagen
S	
sek.	Sekunden
siRNA	small interfering ribonucleic acid
T	
T	in RNA-Sequenz: Thymin
T25	Zellkulturflasche mit einer Fläche von 25 cm²
T75	Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm²
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
U	
U	in RNA-Sequenz: Uracil
U/ml	Einheiten pro Milliliter (Units per milliliter)
U/µl	Einheiten pro Mikroliter (Units per microliter)
USA	United States of America
V	
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	Rezeptor für den Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor
VIC	Reporterfarbe für quantitative Real-Time-PCR
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (vascular permeability factor

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

Mit einer altersstandardisierten Inzidenz in Deutschland von knapp 107 pro 100.000 und Jahr (s. Abbildung 1a) ist das Mammakarzinom das mit großem Abstand häufigste Malignom der Frau und damit für mehr als jede vierte Tumordiagnose bei Frauen verantwortlich (Caspitz et al., 2015). Obwohl die zunehmende Kenntnis der Risikofaktoren, verbesserte Therapieregimes und Früherkennungsmethoden zu einem Rückgang der tumorbedingten Sterblichkeit geführt haben (Katalinic et al., 2009) (s. Abbildung 1b), ist das Mammakarzinom nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste malignombedingte Todesursache mit einer altersstandardisierten Mortalität von 24 pro 100.000 Frauen. Eine von acht Frauen wird in ihrem Leben an einem Mammakarzinom erkranken und mehr als jede vierte davon an diesem versterben (Caspitz et al., 2015).

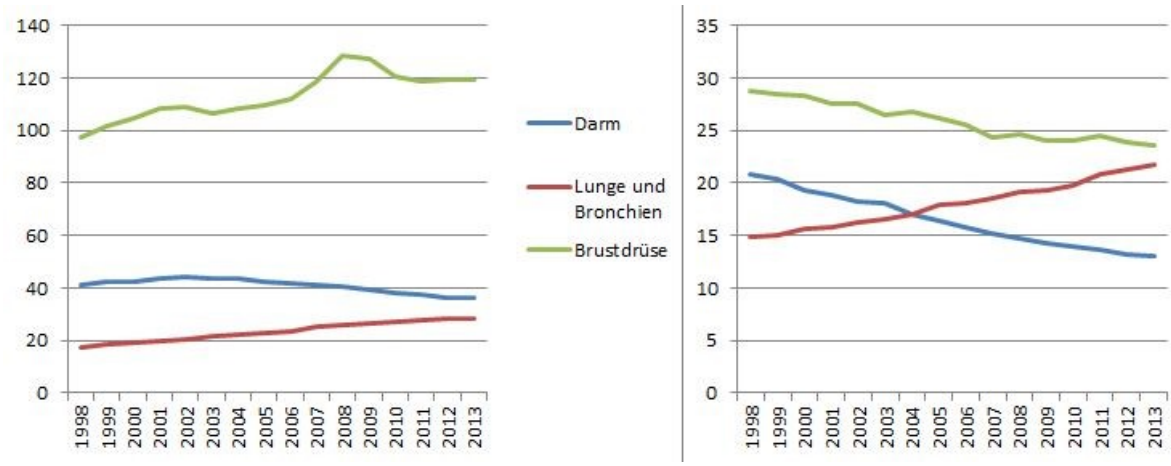


Abbildung 1: Abgebildet sind die altersstandardisierten Inzidenzen (links) und Mortalitäten (rechts) pro 100.000 Frauen in Deutschland der drei häufigsten Karzinome der Frau (Robert Koch-Institut, 2016). Während die Inzidenz des Mammakarzinoms während der letzten Jahre weiter zugenommen hat, ist die Mortalität deutlich zurückgegangen. Die Graphiken basieren auf Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut (Datenstand: 03.11.2016; x-Achse: Jahr; y-Achse: Anzahl der Neuerkrankungen bzw. Todesfälle pro 100.000 Frauen in Deutschland).

Die wichtigsten unbeeinflussbaren Risikofaktoren sind das Alter – das mittlere Erkrankungsalter beträgt 64 Jahre – und das weibliche Geschlecht. Weitere Risikofaktoren sind eine positive Familien- oder Eigenanamnese eines Mammakarzinoms und dabei insbesondere das Vorliegen einer BRCA1- oder BRCA2-Mutation sowie die Bestrahlung des Brustdrüsenkörpers in jungen Jahren. Außerdem führt eine langjährige Östrogenexposition aufgrund früher Menarche, insbesondere vor dem 12. Lebensjahr, und später Menopause, insbesondere nach dem 55. Lebensjahr, und später oder fehlender Geburten und Stillperioden zu einer Risikoerhöhung. Des Weiteren wird diskutiert, dass auch eine Östrogenexposition durch hormonelle Kontrazeption oder einer Hormonersatztherapie dieses Risiko erhöhen könnte (Surakasula et al., 2014; Yang et al., 2011).

Das Mammakarzinom ist dabei keine einheitliche Krankheitsentität, sondern lässt sich nach verschiedenen Kriterien in mehrere

unterschiedliche Malignome des Brustdrüsengewebes unterscheiden. So lassen sich alle Mammakarzinome anhand des histopathologischen Typs, der TNM-Klassifikation, des Tumorzelldifferenzierungsgrades und nach immunhistologischen und molekulargenetischen Kriterien differenzieren.

Histopathologisch kann man duktal-invasive Karzinome, die fast 73 % aller Mammakarzinome von lobulär-invasiven Karzinomen, die etwa 12 % aller Mammakarzinome ausmachen, unterscheiden. Den Rest machen Mischformen oder seltenere Formen wie das tubuläre, das invasiv-kribiforme, das muzinöse und das medulläre Mammakarzinom aus (Onitilo et al., 2009).

Bei der TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1 im Anhang) werden die Mammakarzinome anhand der Größe des Primärtumors, dem Bestehen beziehungsweise der Anzahl und der Lokalisation von regionären Lymphknotenmetastasen sowie der Existenz von Fernmetastasen eingeteilt (American Joint Committee on Cancer, 2017).

Immunhistochemisch lassen sich bei den Malignomen Tumoren, die Östrogen- (ER) und/oder Progesteronrezeptoren (PR) exprimieren und somit hormonsensibel sind, von solchen unterscheiden, die keine Hormonrezeptoren exprimieren. Molekulargenetisch können die Tumoren, die den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor Her2/neu überexprimieren, von solchen unterschieden werden, die diesen Rezeptor nicht exprimieren (Onitilo et al., 2009). Nach diesen immunhistochemischen und molekulargenetischen Kriterien, dem Proliferationsmarker Ki-67 und dem histologischen Grading können die Mammakarzinome in fünf Gruppen mit unterschiedlichen Häufigkeiten eingeteilt werden (s. Tabelle 1). Diese immunhistochemischen und molekulargenetischen Kriterien werden seit diesem Jahr neben der

TNM-Klassifikation in das Staging-System miteinbezogen (Giuliano et al., 2017).

Tabelle 1: Die molekularbiologische Einteilung der Mammakarzinomsubtypen nach St. Gallen 2011 und deren Häufigkeiten (Goldhirsch et al., 2011; Yang et al., 2011). ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; Her2/neu: human epidermal growth factor receptor 2; +: positiv; -: negativ; G1: low-grade, G3: high-grade

Subtyp	Hormonrezeptor-Status	Her2/neu-Status	Grading /Ki-67	Häufigkeit
Luminal A	ER und/oder PR +	Her2/neu -	G1/ < 14%	67 %
Luminal B, Her2/neu-negativ	ER und/oder PR +	Her2/neu -	G3/ > 14%	
Luminal B, Her2/neu-positiv	ER und/oder PR +	Her2/neu +		12 %
Her2/neu-positiv, non-luminal	ER und PR -	Her2/neu +		7 %
Triple-negativ	Er und PR -	Her2/neu -		14 %

Dieser Einteilung kommt prognostisch und therapeutisch große Bedeutung zu. So folgt beispielsweise bei Tumoren des Luminal-A-Typs auf die operative Therapie lediglich eine endokrine Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren oder Aromataseinhibitoren, bei allen anderen in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus und des Her2/neu-Status eine Kombination oder Sequenz aus Chemotherapie, endokriner Therapie und eine Therapie mit dem monoklonalen Her2/neu-Antikörper Trastuzumab.

Hieraus geht auch hervor, dass dabei die Differenzierung von hormonrezeptorpositiven von hormonrezeptornegativen Karzinomen eine außerordentliche Bedeutung hat. Bei diesen Hormonrezeptoren handelt es sich um nukleäre Östrogen- und Progesteronrezeptoren, die

durch Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an die DNA zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Suzuki et al., 2002) und der Protoonkogene c-Jun, c-Fos und Fra-1 führen, was einen Proliferationsanstieg bedingt (Hedge et al., 2016). Im gesunden Brustdrüsengewebe werden diese Rezeptoren von 7-17 % der Zellen exprimiert. Bei Mammakarzinomen werden diese Rezeptoren aber häufig überexprimiert, sodass sie in 70-80 % der Tumoren nachgewiesen werden können (Badowska-Kozakiewicz et al., 2015). Ältere und postmenopausale Frauen erkranken meist an diesen hormonrezeptorpositiven Tumoren, wogegen die meisten Patientinnen, die an hormonrezeptornegativen Tumoren erkranken, jünger und prämenopausal sind. Die hormonrezeptornegativen Karzinome sind signifikant häufiger high-grade-Tumoren als hormonrezeptorpositive Karzinome und bei Diagnosestellung signifikant größer und haben häufiger bereits in die regionären Lymphknoten metastasiert (Badowska-Kozakiewicz et al., 2015). Der Hormonrezeptorstatus ist dabei aber kein konstanter Faktor, sondern kann sich im Laufe der Tumorprogression verändern. So zeigt sich oft ein Unterschied zwischen dem Hormonrezeptorstatus des Primärtumors und dem der Lymphknotenmetastase, wobei es hierbei meist zu einem Verlust der Hormonrezeptorexpression kommt, sodass Lymphknotenmetastasen häufiger hormonrezeptornegativ sind, als dies zu erwarten wäre (Yeung et al., 2016). Es scheinen daher vor allem die Karzinomzellen zu sein, die die Fähigkeit der Hormonrezeptorexpression verloren haben, die am häufigsten metastasieren. Anhand dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass sich hormonrezeptornegative Karzinome in ihren molekularen Regulationsmechanismen bezüglich Tumorwachstum und Metastasierung von hormonrezeptorpositiven Karzinomen unterscheiden. Verschiedene potenzielle Regulationsmechanismen der

Metastasierung werden in der Literatur beschrieben (Liu et al., 2017). Als ein potenzieller Faktor hierfür könnte die unterschiedliche Tumorangiogenesekapazität von rezeptorpositiven und -negativen Karzinomen vermutet werden. Auf diesen möglichen Zusammenhang wird im Folgenden eingegangen.

1.2. Tumorangiogenese

Voraussetzung für Tumorwachstum und Fernmetastasierung ist eine suffiziente Tumorangiogenese, damit der Primärtumor Anschluss an das Gefäßsystem des Organismus erlangt. Nur so kann auch der Tumor eine dem hohen Zellumsatz angepasste Ernährung selbst sicherstellen und über eine Größe von mehr als 1 bis 2 mm wachsen. Die Fähigkeit der Angiogenese hat somit höchste Bedeutung in der Evolution eines malignen Tumors für Proliferation, Invasivität und Metastasierung (Folkman, 1995). Infolge einer zunehmenden Hypoxie im Zentrum eines an Größe zunehmenden Tumors kommt es vor allem durch Stickstoffmonooxid (NO) zu einer Dilatation bestehender Gefäße. Außerdem führt das NO zu einer verstärkten Expression des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF), was zusätzlich durch den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) verstärkt wird (Kimura et al., 2000). Der VEGF bewirkt eine deutlich heraufgesetzte Permeabilität der Gefäße, sodass es zu einem Austritt von aktivierten, zirkulierenden Endothelzellen sowie von Plasmaproteinen wie Matrix-Metalloproteinasen kommt, die die extravaskuläre Matrix degradieren und somit Raum für neue Gefäße schaffen (Nelson et al., 2000). Daraufhin findet eine Migration der Endothelzellen in diesen Raum statt, was unter anderem durch Angiopoietin-2 begünstigt wird, da dies zu einer Lösung der Zellverbindungen zwischen den perivaskulären glatten Muskelzellen

und der darunterliegenden Matrix führt (Gale et al., 1999). Nachdem so die physikalischen Barrieren entfernt sind, migrieren die Endothelzellen chemotaktisch durch Angiopoitin-1 vermittelt in diesen Raum, wo sie durch Stimulation durch VEGF weiter proliferieren, sodass es nun zu einer Endothelsprossung kommt (Veikkola et al., 2000). Auch die Bildung neuer Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen untereinander durch Integrine (Eliceiri et al., 1999) und Gap-Proteine wie VE-Cadherin (Corada et al., 1999) und periendothelialen Zellen werden durch Angiopoietin-1 induziert (Suri et al., 1996). Anfänglich bilden die migrierten Endothelzellen noch einen Endothelstrang ohne Lumen, welches erst später, ebenfalls durch VEGF und Angiopoietin-1 induziert, gebildet wird (Suri et al., 1998). Dieser neugebildete Endotheltubulus wird durch periendotheliale Zellen, hauptsächlich glatte Muskelzellen, stabilisiert und dadurch in einer unkontrollierten Proliferation und Migration eingeschränkt. Die extrazelluläre Matrix bietet dafür ein stabiles Gerüst und speichert und mobilisiert hierfür benötigte Wachstumsfaktoren (Conway et al., 2000). Die glatten Muskelzellen differenzieren sich dabei unter dem Einfluss des Platelet Derived Growth Factors (PDGF) und VEGF aus Endothelzellen, mesenchymalen Stammzellen oder Makrophagen (Yamashita et al., 2000; Suzuki et al., 2005).

Dieser im Gesunden durch eine Vielzahl von pro- und antiangiogenen Faktoren regulierte Vorgang der Angiogenese ist in Tumoren jedoch häufig gestört. Dies führt dazu, dass die Gefäße in Tumoren meist gewunden und dilatiert sind und eine erhöhte Permeabilität aufweisen. Außerdem liegen häufig exzessive Verästelungen und Kurzschlussverbindungen vor, sodass in Tumoren ein desorgansierter Blutfluss vorliegt (Baish et al., 2000). Senchukova et al. (2014) konnten des Weiteren eine sich von der physiologischen Angiogenese

unterscheidenden Art der Gefäßneubildung beim Magenkarzinom nachweisen. Dabei werden kavernenartige Strukturen im Inneren des Tumors von Endothelzellen ausgekleidet, die dann später miteinander und mit zuführenden Blutgefäßen verschmelzen. Diese Art der Angiogenese ist auch beim Mammakarzinom nachgewiesen (Senchukova et al., 2015). Ursächlich für diese veränderte Angiogenese bei Malignomen ist, dass eine Vielzahl von Tumoren proangiogene Faktoren überexprimieren und so der physiologischerweise eng regulierte Vorgang der Angiogenese durch eine Imbalance von proangiogenen und antiangiogenen Faktoren empfindlich gestört ist. Einer dieser häufig überexprimierten Faktoren ist der als wichtigster Effektor der Angiogenese angesehene VEGF (Ribatti, 2005). Seine Bedeutung und molekularen Wirkmechanismen werden im nachfolgenden Kapitel erörtert.

1.3. Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF wurde 1983 durch Sanger et al. als Protein entdeckt, das die vaskuläre Permeabilität stark heraufsetzt, weshalb es initial als Vascular Permeability Factor (VPF) bezeichnet wurde. Erst 1989 zeigte sich, dass es sich bei VPF auch um ein relativ zellspezifisches, endotheliales Mitogen handelte, weshalb dieses Protein seither als Vascular Endothelial Growth Factor bezeichnet wird. In den folgenden Jahren wurden weitere Proteine identifiziert, die ebenfalls zur VEGF-Familie gerechnet werden, sodass bis heute sieben verschiedene Formen des VEGFs bekannt sind, von denen wiederum mehrere Splicevarianten bestehen. Die für die Angiogenese wichtigste Form ist das VEGF-A, weshalb im Allgemeinen und so auch in dieser Arbeit mit „VEGF“ die A-Form gemeint ist. VEGF wirkt über drei verschiedene Tyrosinkinase-

Rezeptoren (VEGF-Rezeptor [VEGFR]-1, -2 und -3) auf die Endothelzelle, wobei deutliche Affinitätsunterschiede der VEGF-Formen zu den einzelnen Rezeptortypen bestehen. Diese Rezeptoren bestehen alle aus jeweils sieben extrazellulären Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne (Ribatti, 2005). Nach Bindung des Faktors an die Rezeptoren dimerisieren diese und es kommt zur Autophosphorylierung und anschließenden Auslösung der intrazellulären Signalkaskade, die bei VEGFR-2 über mitogen-aktivierte Protein-(MAP)-Kinasen-Kaskaden (Ylä-Herttuala et al., 2007) zur Endothelzellproliferation und Permeabilitätserhöhung führt, bei VEGFR-1 über den PI3K/Akt- und ERK1/2-Signalweg zur Migration und Tubulusbildung der Endothelzellen (Ellis et al., 2000) und bei VEGFR-3 über den PI3K/Akt-Signalweg und MAPK-Kaskaden zur Proliferation von lymphatischen Endothelzellen und zur Lymphangiogenese (Ylä-Herttuala et al., 2007).

Die Expression von VEGF wird selbst übergeordnet durch mehrere verschiedene pro- und antiangiogenetische Faktoren und Systeme reguliert (Klagsbrun et al., 1996), von denen eines der wichtigsten das Renin-Angiotensin-System ist. Dieses wird im Folgenden näher beschrieben.

1.4. Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine Kaskade verschiedener Enzyme und Peptidhormone, dessen wesentliche Aufgabe die Homöostase des Wasser- und Natriumhaushaltes des Körpers und damit ein wichtiger Regulator des Blutdrucks ist. Zu Beginn dieser Kaskade steht die Aspartylprotease Renin, die in Myoepithelzellen der Vasa afferentia des juxtaglomerulären Apparates der Nieren gebildet

und auf einen niedrigen Blutdruck in den Vasa afferentia, eine niedrige Chloridkonzentration im distalen Nierentubulus oder eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate sowie direkt auf vegetative Stimulation hin ausgeschüttet wird (Friis et al., 2013). Daraufhin wird das in Hepatozyten gebildete Angiotensinogen (AGT) durch Renin in Angiotensin I (ATI) konvertiert, das wiederum durch das vor allem im Lungengefäßsystem lokalisierte Angiotensin-converting-enzyme (ACE) in die aktive Form Angiotensin II (ATII) konvertiert wird. Bei dem Oktapeptid ATII handelt es sich um den Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Systems, durch den die physiologischen Effekte wie die Regulation des Gefäßtonus, die Hormonsekretion von Aldosteron, aber auch Gewebsproliferation vermittelt werden. ATII wirkt dabei sowohl endokrin als auch para- und autokrin durch Aktivierung eines der vier bekannten Angiotensin-II-Rezeptoren, von denen die Typen I (AT_1-Rezeptor) und II (AT_2-Rezeptor) die bedeutsamsten sind. Der AT_1-Rezeptor wird in praktisch allen Geweben exprimiert und gehört zu den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren. Nach dessen Aktivierung kommt es über eine Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege – G-Protein-abhängig und -unabhängig und mit Interaktion verschiedener Tyrosinkinasen – zur Konstriktion vaskulärer glatter Muskelzellen und damit zu einer Erhöhung des Gefäßtonus. Außerdem führt die Aktivierung zu einer Steigerung der NF-κB-Expression und infolge dessen zu Inflammation und einer Hochregulation der Expression des Gewebefaktors, was wiederum zu Gewebsproliferation führt (Mehta et al., 2007). Die Aktivierung des AT_2-Rezeptors, bei dem es sich ebenfalls um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor handelt und der hauptsächlich in fetalem Gewebe exprimiert wird und nur vereinzelt im kardiovaskulären System vorkommt, führt zu überwiegend den von AT_1-Rezeptor gegenteiligen Effekten (Escobar et al., 2004). Allerdings

konnte gezeigt werden, dass sich die über den AT_2-Rezeptor vermittelten Effekte sowohl gewebs- als auch dosisabhängig erheblich unterscheiden (Ager et al., 2010; Zhou et al., 2014).

Neben diesem hauptsächlich für die Blutdruckregulation wichtigen systemischen RAS existiert ein lokales RAS, das vor allem für Gewebsproliferation und Angiogenese wichtige Stimuli vermittelt. So werden Komponenten des RAS auch in den meisten Geweben unter physiologischen Umständen exprimiert und in vielen Malignomen stark überexprimiert, so auch in gesundem Brustdrüsengewebe und im Mammakarzinom (Tahmasebi et al., 2006). In diesem lokalen RAS (s. Abbildung 2) existieren eine Reihe weiterer Angiotensine, die zum Teil unabhängig von ATII wirken, zum Teil aber auch dessen Wirkung antagonisieren und modulieren (Ferrario, 2010). Neben dem bereits beschriebenen Weg der ATII-Bildung aus ATI nach der reninabhängigen Hydrolyse aus Angiotensinogen existiert hier auch ein alternativer Weg über Angiotensin1-12 (Ang1-12), das reninunabhängig aus Angiotensinogen gebildet wird und das ebenfalls durch ACE und Chymase in ATII umgewandelt wird (Ahmad et al., 2011; Prosser et al., 2008). Dies scheint der prädominierende Weg der ATII-Bildung des lokalen RAS zu sein, da in Geweben wie Leber, Lunge, Pankreas, Myokard und Gehirn höhere Konzentrationen von Ang1-12 als von ATI nachgewiesen werden konnten (Nagata et al., 2006). Des Weiteren existiert neben der ACE/ATII/AT_1-Rezeptor-Achse eine weitere Wirkkaskade, die eine antagonisierende Wirkung ausübt. Durch das dem ACE homologe Angiotensin-converting-enzyme-2 (ACE2) wird ATI in Ang1-9 gespalten, was wiederum durch ACE in Ang1-7 umgewandelt wird (Donoghue et al., 2000). Außerdem kann ACE2 auch direkt ATII in das Heptapeptid Ang1-7 spalten. Nach Aktivierung des Mas-Rezeptors und Second-Messenger-Mechanismen, die eine Hemmung des MAP-

Kinase-Kinase-Wegs, die Stimulation von zellulären Phosphatasen (Nie et al., 2008), die Hemmung der Cyclooxygenase 2 (COX2) sowie die Freisetzung von Stickstoffmonooxid (NO) beinhaltet (Tallant et al., 2003), vermittelt Ang1-7 hauptsächlich den von ATII entgegengesetzten Wirkungen. So führt dieses zu einer Vasodilatation und wirkt der proliferativen, fibrosierenden und angiogenetischen Wirkung von ATII entgegen (Machado et al., 1999). Diese beiden Achsen antagonisieren sich zudem gegenseitig, indem ATII zu einer Hemmung der Enzymaktivität und Expression von ACE2, Ang1-7 dagegen zu einer Steigerung der ACE2-Expression führt (Gallagher et al., 2008).

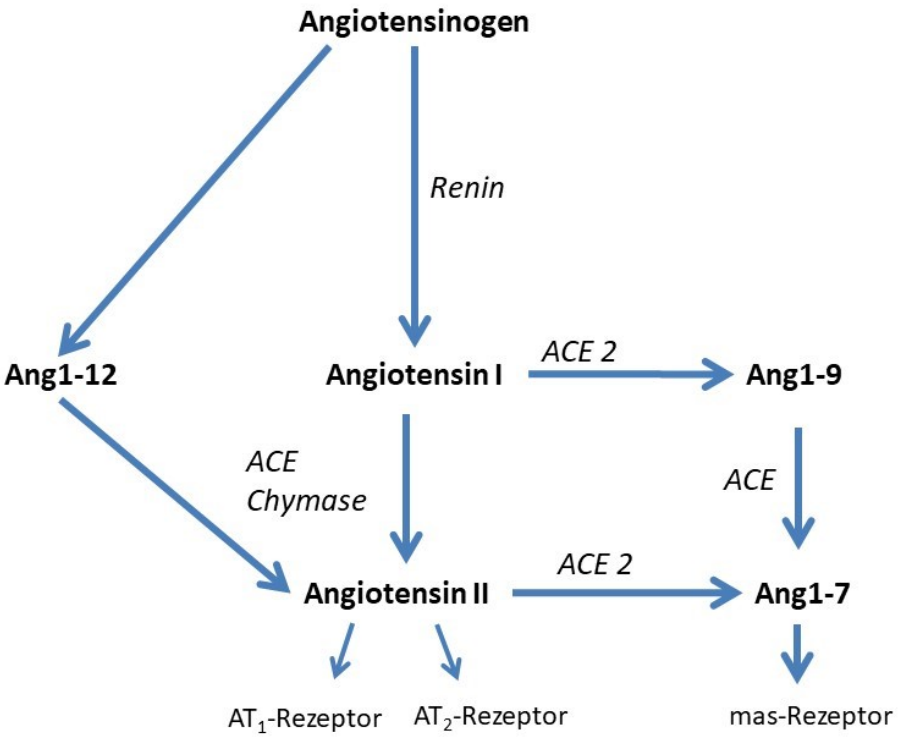


Abbildung 2: Dargestellt sind die wichtigsten Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems, deren Rezeptoren sowie deren Syntheseschritte (Ahmad et al., 2011; Donoghue et al., 2000; Prosser et al., 2008). ACE = Angiotensin-converting-enzyme; ACE 2 = Angiotensin-converting-enzyme-2; Ang1-7 = Angiotensin1-7; Ang1-9 = Angiotensin1-9; Ang1-12 = Angiotensin1-12; AT_1-Rezeptor = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1; AT_2-Rezeptor = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2

Das lokale RAS basiert daher nicht nur auf einer Kaskade, sondern auf der Balance zweier sich gegenseitig kontrollierender Angiotensinachsen. Da in diesem lokalen System jedoch dieselben Faktoren, Rezeptoren und Enzyme involviert sind wie beim systemischen RAS, liegt die Vermutung nahe, dass durch Beeinflussung des RAS auf systemischer Ebene auch die Balance der lokalen Angiotensinachsen verändert werden könnte. Eine solche Beeinflussung des systemischen RAS durch ACE-Inhibitoren und AT_1-Rezeptor-Antagonisten hat schon seit einigen Jahren einen hohen Stellenwert in der Therapie der arteriellen Hypertonie, der chronischen Herzinsuffizienz, der diabetischen Nephropathie sowie nach Myokardinfarkt (Wzgarda et al., 2017). Das Nebenwirkungsprofil dieser Substanzklassen ist günstig und die Erfahrung sehr groß. Daher scheint grundsätzlich auch eine Einflussnahme auf das lokale RAS mittels exogen zugeführter Substanzen denkbar, was neue Therapieoptionen eröffnen würde.

1.5. Zielsetzung

Die Prognose eines Mammakarzinoms hängt stark von den immunhistochemischen und molekulargenetischen Eigenschaften des Tumors ab. Dabei sind insbesondere hormonrezeptornegative Mammakarzinome mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Dies hängt unter anderem davon ab, dass diese Malignome früher viszeral metastasieren als dies bei hormonrezeptorpositiven Karzinomen der Fall ist, was möglicherweise durch eine aggressivere Tumorangiogenese dieser Karzinome bedingt sein könnte. Es ist daher zu vermuten, dass unterschiedliche Mammakarzinom-Subtypen über unterschiedliche Mechanismen der Regulation der Tumorangiogenese

verfügen. Da das RAS in Verdacht steht, maßgeblich an den wichtigen Schritten der Tumorevolution wie Proliferation und vor allem Angiogenese beteiligt zu sein, ist es das Ziel dieser Arbeit, Unterschiede bezüglich der molekularen Regulation der Tumorangiogenese durch das RAS zu untersuchen. Hierfür werden hormonrezeptorpositive und hormonrezeptornegative Mammakarzinomzellen verwendet und getestet, ob das von den Tumorzellen synthetisierte ATII zu einer Steigerung der VEGF-Expression führt und wie diese Expression durch Hemmung von ACE durch den ACE-Inhibitor Captopril und Blockaden der ATII-Rezeptoren durch den selektiven AT_1-Rezeptor-Antagonisten Candesartan bzw. den selektiven AT_2-Rezeptor-Antagonisten PD123,319 beeinflusst werden kann. Die Stimulierbarkeit des RAS und dessen Einfluss auf die VEGF-Expression wird durch extrinsisch zugeführtes ATII getestet. Besondere Bedeutung kommt der Suppression des gesamten RAS – also sowohl der ATII/AT_1-Rezeptor, als auch der Ang1-7/Mas-Signalkaskade – durch einen Angiotensinogen-Knockdown zu. Dabei ist von besonderem Interesse, ob sich Unterschiede in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus der Mammakarzinomzelllinien nachweisen lassen. Letztlich ist es Ziel dieser Arbeit, durch die hier gewonnenen Erkenntnisse potenzielle Möglichkeiten einer zielgerichteten Beeinflussung der Tumorangiogenese in Abhängigkeit des Hormonrezeptorstatus bei Brustkrebspatientinnen abzuleiten.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

Im Rahmen der Untersuchungen wurden sechs verschiedene Zelllinien untersucht, davon jeweils drei hormonrezeptorpositive (MCF-7, ZR-75-1 und MDA-MB 361) und drei hormonrezeptornegative (MDA-MB 231, MDA-MB 468 und MDA-MB 453) Zelllinien. Die Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 453 und ZR-75-1 wurden vom Leibnitz Institut, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland), die Zelllinien MDA-MB 468 und MCF-7 von Cell Line Service (Eppelheim, Deutschland) und die Zelllinie MDA-MB 361 von der American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA) bezogen und nach Angaben des Herstellers kultiviert. Dabei wurden die hormonrezeptorpositiven Zelllinien in RPMI-1640 mit L-Glutamine (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), die hormonrezeptornegativen Zelllinien MDA-MB 231 und MDA-MB 468 in DMEM mit High Glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamine, mit Sodium Pyruvate (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und die hormonrezeptornegative Zelllinie MDA-MB 453 in DMEM/Ham's F-12 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) bei 37° C und 5 % CO_2 kultiviert. Dem Zellkulturmedium wurde jeweils 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 10 % FBS (Fetal Bovine Serum Gold (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)) hinzugefügt und die Zellen wurden in T75 Tissue Culture Flask Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, NC, USA) ausgesät. Ein Kulturmediumswechsel wurde alle 48 h durchgeführt, wobei die Zellkulturen lichtmikroskopisch auf eine mögliche Pilzkontamination untersucht und die Vitalität der Zellen überprüft wurden.

2.1.2. Angiotensin-II-Stimulation

2.1.2.1. Vorversuch:

Um für die geplanten Stimulationsversuche mit ATII die geeignete Konzentration zu ermitteln, wurden jeweils 1 * 10^6 Zellen auf T25 Tissue Culture Flask Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, NC, USA) im entsprechenden Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 10 % FBS ausgesät und mit 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l oder 10^{-5} mol/l ATII (Sigma Aldrich, Deutschland) stimuliert. Nach 48 h wurden die Zellen nach dem später erläuterten Schema abtrypsiniert und die mRNA isoliert.

Unerwarteterweise zeigte sich in diesem Vorversuch zur Ermittlung einer geeigneten ATII-Konzentration zur Zellstimulation nur bei einer Konzentration von 10^{-7} mol/l ein signifikanter Anstieg gegenüber der Negativkontrolle. Bei den höheren ATII-Konzentrationen von 10^{-6} mol/l und 10^{-5} mol/l kam es zwar ebenfalls zu einem Anstieg der VEGF-Genexpression. Dieser Anstieg war aber nur tendenziell und erreichte das definierte Signifikanzniveau nicht. Möglicherweise spielen bei höheren Konzentrationen toxische Effekte eine Rolle, sodass in den nachfolgenden Stimulationsversuchen eine ATII-Konzentration von 10^{-7} mol/l verwendet wurde.

2.1.2.2. Untersuchung von exogenem ATII auf die VEGF-Expression:

Dem Vorversuch entsprechend wurden zur ATII-Stimulation ebenfalls jeweils 1 * 10^6 Zellen auf T25 Tissue Culture Flask Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, NC, USA) im entsprechenden Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 2

% FBS ausgesät. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Zellen nach Stimulation mit ATII mit einer verstärkten VEGF-Expression reagieren und ob sich dies bei hormonrezeptorpositiven und -negativen Zelllinien unterscheidet, wurden die Zellen mit 10^{-7} mol/l ATII (Sigma Aldrich, Deutschland) stimuliert und Zellkulturen ohne ATII-Stimulation als Negativkontrolle angelegt (s. Tab. 2, Zeile 1). Da hierbei besonders die Differenzierung der Wirkung von endogenem und exogenem ATII von Interesse war, wurde parallel dazu in weiteren Ansätzen eine Angiotensin-Converting-Enzyme-Blockade mit 10^{-6} mol/l Captopril (Sigma Aldrich, Deutschland) durchgeführt, um in diesen Zellkulturen die Expression von endogenem ATII zu unterbinden, zum einen ohne gleichzeitige ATII-Stimulation, zum anderen mit gleichzeitiger ATII-Stimulation (s. Tab. 2, Zeile 2). Zur Differenzierung, über welchen der unterschiedlichen Angiotensin-II-Rezeptortypen eine mögliche verstärkte VEGF-Expression vermittelt wird, wurden in weiteren Zellkulturen eine Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blockade mit 10^{-6} mol/l Candesartan (AstraZeneca, Hamburg, Deutschland) (s. Tab. 2, Zeile 3) beziehungsweise eine Angiotensin-II-Rezeptor-2-Blockade mit 10^{-6} mol/l PD 123,319 (Sigma Aldrich, Deutschland) durchgeführt (s. Tab. 2, Zeile 4). Auch dies wurde zum einen ohne gleichzeitige ATII-Stimulation, zum anderen mit gleichzeitiger ATII-Stimulation durchgeführt. Insgesamt ergibt sich somit folgendes Stimulationsschema (Tab. 2):

Tabelle 2: Stimulationsschema des Angiotensin-II-Stimulationsversuches. ATII = Angiotensin II, PD 123,319 = selektiver Angiotensin-II-Rezeptor-2-Antagonist

1	Negativkontrolle	ATII
2	Captopril	ATII + Captopril
3	Candesartan	ATII + Candesartan
4	PD 123,319	ATII + PD 123,319

Die Zellen wurden ebenfalls jeweils 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dem später erläuterten Schema abtrypsiniert und die mRNA isoliert. Diese Stimulationsversuche wurden mit jeder Zelllinie achtmal wiederholt.

2.1.3. AGT-Knockdown

Um den Einfluss von intrinsischem ATII auf die VEGF-Expression der Zellen auszuschalten, wurden in einer weiteren Versuchsreihe ein Knockdown von Angiotensinogen (AGT) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit siRNA transfiziert. Dabei wurden zuerst jeweils $8 * 10^5$ Zellen pro T25 Tissue Culture Flask Zellkulturflasche (Sarstedt, Newton, NC, USA) im entsprechenden Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 10 % FBS ausgesät. Nach 24 h wurde ein Transfektionsgemisch aus 400 µl kälberserumfreiem Medium, 12 µl HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 6 µl siRNA (Tab. 3) angesetzt und für fünf Minuten inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Für die Versuchsansätze wurde hierfür ein siRNA-Gemisch aus je 2 µl AGT-1-siRNA, 2 µl AGT-4-siRNA und 2 µl AGT-7-siRNA (Qiagen, Hilden, Deutschland) eingesetzt, für die Negativkontrollen 6 µl Negativkontroll-

siRNA (AllStars Negative Control siRNA, 20 µM, Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums und die Zellen wurden mit 410 µl des vorbereiteten Transfektionsgemischs transfiziert.

Tabelle 3: Verwendete siRNA und deren Nukleobasensequenzen. siRNA = small interfering ribonucleic acid

siRNA-Name	Sense-Sequenz	Antisense-Sequenz
Hs_AGT_1	5‘-GAG UCU ACC CAA CAG CUU ATT-3‘	5’-UAA GCU GUU GGG UAG ACU CTG-3’
Hs_AGT_4	5’-CCG UGU AGU GUC UGU AAU ATT-3’	5’-UAU UAC AGA CAC UAC ACG GAG-3’
Hs_AGT_7	5’-GGC UGU ACA GGG CCU GCU ATT-3’	5’-UAG CAG GCC CUG UAC AGC CTG-3’

48 h, 72 h, 96 h, 120 h und 144 h nach der initialen Transfektion erfolgten die Entnahmen des jeweiligen Kulturmediumüberstandes und die anschließende Abtrypsinierung der Zellen zur RNA-Isolation nach dem später erläuterten Schema. Ein Kulturmediumswechsel mit erneuter Transfektion der Zellen wurde 48 h und 96 h nach der initialen Transfektion durchgeführt. Pro Zelllinie erfolgten 6 Wiederholungen.

2. 2. RNA-Isolation

Zum jeweiligen Zelllysezeitpunkt wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) von der Zellkulturflasche gelöst, im direkten Anschluss wurde das Trypsin durch die Zugabe von zusätzlichem Kulturmedium neutralisiert. Dann wurden die Zellen bei Raumtemperatur bei 1200 rpm für 5 Minuten vom Kulturmedium abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 2 ml Dulbecco’s

PBS 1x ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und erneut abzentrifugiert, danach der Überstand abgekippt und das Zellpellet in 175 µl eines vorbereiteten RLN-Puffers resuspendiert. 50 ml dieses RLN-Puffers waren zuvor aus 2,5 ml Tris-Cl (1 M), pH 8,0, 1,4 ml NaCl (5 M), 75 µl $MgCl_2$ (1 M), 250 µl Nonidet P-40 (99,9 %) und 45,775 ml RNase-freiem Wasser angesetzt worden. Unmittelbar vor Gebrauch wurden noch 10 µl DTT (1 mM) und 50 µl RNase-Inhibitor (1000 U/ml) hinzugefügt. Dieses Resuspendat wurde dann in ein 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäß überführt, für 5 Minuten auf Eis lysiert und anschließend für 2 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das die Zelltrümmer enthaltende, so gewonnene Pellet wurde verworfen. Anschließend wurde die RNA aus dem Überstand mit dem auf der von Chomczyknski et al. (1987) entwickelten Methode basierenden RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei wurden zuerst RNasen inaktiviert, indem zu dem Überstand 600 µl RLT-Puffer (Stocklösung aus 1000 µl RLT und 10 µl Mercaptoethanol) gegeben wurde, anschließend wurden 430 µl Ethanol hinzugefügt, um optimale Bedingungen für eine Bindung der RNA an die in den zum Kit gehörenden Spin-Säulen enthaltenden Silicalgel-Membran zu schaffen. Dieses Gemisch wurde auf die Spin-Säulen gegeben und eine Minute bei 11000 rpm zentrifugiert, um die Bindung der RNA an die Membran zu ermöglichen. Der Überstand wurde verworfen. Daraufhin wurden etwaige Kontaminationen der RNA mittels mehrerer Waschschritte entfernt. Hierbei wurden einmalig 700 µl RW1-Puffer aus dem Hersteller-Kit und zweimalig 500 µl RPE-Puffer aus dem Hersteller-Kit auf die Spin-Säule gegeben und jeweils für eine Minute bei 11000 rpm abzentrifugiert. Der letzte Zentrifugationsschritt betrug 2 Minuten, um die Silicagel-Membran zu trocknen. Abschließend wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und die RNA

durch Zentrifugation für 1 Minute bei 11000 rpm von der Membran aus der Säule eluiert. Während dieser RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis gelagert.

Daraufhin wurde die RNA-Reinheit und die RNA-Konzentration des Extrakts photometrisch mit dem NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) bestimmt. Hierbei wurde ein Gemisch aus 2 µl der RNA-Lösung und 198 µl 10 mM Tris-HCL angesetzt, da die Messung bei einem pH von 7,0 erfolgen muss. Anschließend wurden die Extinktionen des Gemisches in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei einer $Ratio_{260/280}$ zwischen 2,0 und 2,3 wurde eine ausreichende RNA-Reinheit angenommen, andernfalls wurde die Probe verworfen. Abschließend wurde die RNA-Konzentration durch die photometrisch gemessene Extinktion bei 260 nm bestimmt.

2.3. Reverse Transkription

Zur Synthese der cDNA wurde der High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei wurde für jede Probe 5 µl 10x Reverse Transkriptase Puffer, 5 µl 10x Random Primers und 2 µl 2x dNTPs in ein 0,2-ml-Mikroreaktionsgefäß auf einem eisgekühlten Probeständer gegeben. Dann wurde jeweils 2,5 µg RNA hinzugegeben und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 48 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde 2 µl Multi Scribe Reverse Transkriptase 50 U/µl hinzugegeben und die Proben in den PCR-Thermocycler (FlexCycler, Analytik Jena, Jena, Deutschland) gestellt. Dort wurden die Proben für 10 Minuten bei 25° C und für 120 Minuten bei 37° C inkubiert und

anschließend auf 4° C herunter gekühlt. Die cDNA-Proben wurden anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -20° C gelagert.

2.4. PCR

2.4.1. PCR-Protokoll, Cycler Programm und Primer Sequenzen

Um zu verifizieren, dass die untersuchten Zelllinien die grundlegenden Voraussetzungen zur Untersuchung einer VEGF-Produktion in Abhängigkeit des Renin-Angiotensin-System erfüllen, wurde zunächst der Nachweis der Existenz der zugehörigen mRNA und damit der Transkription der entsprechenden Gene (Tab. 4) aus dem Zellgenom mittels PCR geführt. Da die PCR als Template DNA benötigt, musste die isolierte RNA wie oben beschrieben zunächst revers transkribiert werden. Alle Standardkomponenten für die PCR wurden von der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen. Es wurde die Transkription der Gene für Angiotensinogen (AGT), Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Angiotensin-II-Rezeptor-1 (AT_1-Rezeptor), Angiotensin-II-Rezeptor-2 (AT_2-Rezeptor) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) untersucht.

Als Template wurde 4 µl 1:10 verdünnte cDNA eingesetzt. Dazu wurden je 4 µl dNTPs (10 mM) und $MgCl_2$ (25 mM), 5 µl PCR-10x-Puffer (5x), 10 µl Q-Solution, 17,5 µl H_2O, je 2,5 µl Sense- und Antisense-Primer (10 µM) und 0,5 µl Hot-Star-Taq-Polymerase (5 U/µl) gegeben. Für die Negativkontrollen wurde anstatt eines Templates 4 µl Wasser verwendet.

Als Cycler-Programm wurden folgende Reaktionsschritte gewählt: primäre Denaturierung bei 94° C für 15 Minuten, 45 repetitive Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94° C für 45 Sekunden, Annealing bei

59° C bzw. 61° C für 45 Sekunden und Elongation bei 72° C für 60 Sekunden. Danach erfolgte eine abschließende Elongation/Extension bei 72° C für 10 Minuten. Abschließend erfolgte eine Temperaturabsenkung auf 4° C. Die PCR wurde dabei mit dem FlexCycler (Analytik Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt.

Folgende Primer (Thermo Fisher, Rockfort, USA) wurden eingesetzt (s. Tabelle 4):

Tabelle 4: Bei der Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesene Gene, deren Nukleobasensequenzen, Größen und deren Annealingtemperatur. ACE = Angiotensin-converting-enzyme; AGT = Angiotensinogen; AT_1R = Angiotensin-II-Rezeptor-1; AT_2R = Angiotensin-II-Rezeptor-2; bp = Basenpaare; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

Gen	Sequenz	Größe	Annealing-Temperatur
GAPDH	Forward: 5‘-CTG GCG CTG AGT ACG TCG-3‘ Reverse: 5’-TTG ACA AAG TGG TCG TTG A-3’	657 bp	59° C / 61° C
AT_1R	Forward: 5’-GGA AAC AGC TTG GTG GTG AT-3’ Reverse: 5’-GCA GCC AAA TGA TGA TGC AG-3’	330 bp	59° C
AT_2R	Forward: 5‘-CTG CTG TTG TTC TGG CCT TCA T-3‘ Reverse: 5’-ACT CTC TCT TTT CCC TTG GAG CC-3’	263 bp	61° C
AGT	Forward: 5‘-CCC TGG CTT TCA ACA CCT AC-3‘ Reverse: 5’-CTG TGG GCT CTC TCT CAT CC-3’	499 bp	61° C
ACE	Forward: 5’-GGT GGT GTG GAA CGA GTA TG-3’ Reverse: 5’-TCG GGT AAA ACT GGA GGA TG-3’	428 bp	61°C
VEGF	Forward: 5’-CGG GCC TCC GAA ACC ATG AAC TTT-3’ Reverse: 5’-CTA TGT GCT GGC CCT GGT GAG GTT T-3’	367 bp	59° C

2.4.2. Darstellung und Auswertung der PCR-Produkte

Zur Darstellung der PCR-Produkte wurden eine Gelelektrophorese in einem 2-%-Agarosefertiggel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe,

Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden in die Slots des Agarosefertiggels bei den Genproben jeweils 18 µl der Probe, in die leeren Slots 18 µl Wasser gegeben. Zur Ermittlung der Fragmentgröße der PCR-Produkte diente eine mit auf das Gel aufgetragene 100-bp-Ladder. Dazu wurde 1 µl eines 100-bp-DNA-Standards (Gene Ruler DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) und 17 µl Wasser in einen zusätzlichen Slot gegeben. Außerdem wurde in jeden Slot 1 µl eines Loading Buffers, bestehend aus 0,25 **%** Bromphenol Blue, 0,25 % Xylene Cyanol, 30 % Glycerol und 69,5 % H_2O, gegeben und schließlich die PCR-Produkte bei einer Spannung von 100 Volt für 30 Minuten aufgetrennt. Abschließend wurden die Gele mit dem AlphaImager 3400 (Alpha Innotech, San Leandro, USA) fotodokumentiert.

2.5. VEGF-ELISA

Die Bestimmung der von den kultivierten Zellen produzierten VEGF-Menge erfolgte mittels quantitativer VEGF-A-Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA) nach Angaben des Herstellers aus den Zellkulturüberständen. Dabei wurden bei den Kulturmediumüberständen von MCF-7, MDA-MB 231 und MDA-MB 468 zu 30 µl Mediumprobe jeweils 270 µl RD5K und bei den Mediumproben von MDA-MB 453, MDA-MB 361 und ZR-75-1 zu 60 µl Mediumprobe jeweils 240 µl RD5K gegeben, um eine Verdünnung von 1:10 beziehungsweise von 1:5 zu erreichen, um sicherzustellen, dass sich die gemessene VEGF-Konzentrationen im Bereich der Standardkurve befinden.

Zur Auswertung der VEGF-Konzentrationen wurde eine Standardverdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen angelegt:

2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml und 0 pg/ml.

Anschließend wurde in jedes Well der ELISA-Reaktionsplatte 50 µl Assay Diluent RD1W vorgelegt und 200 µl der zu analysierenden Probe beziehungsweise der Standardverdünnungsreihe gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Proben abgekippt, die Wells dreimal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und dann 200 µl VEGF-Conjugate in jedes Well pipettiert und erneut für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauf erfolgte das erneute dreimalige Waschen der Wells mit 200 µl Waschpuffer. Schließlich wurde 200 µl Substrat Solution, die 15 Minuten zuvor aus gleichen Teilen Color Reagent A und Color Reagent B vorbereitet und lichtgeschützt inkubiert worden war, in jedes Well gegeben und für 20 Minuten erneut lichtgeschützt inkubiert.

Zuletzt wurde die Inkubation mit 50 µl Stop-Solution abgestoppt und die VEGF-Konzentration durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm mit dem MRX Absorbance ELISA Microplate Reader (Dynatech Laboratory, Bath, Großbritannien) bestimmt.

2.6. Quantitative Real-Time-PCR

Um die Menge der transkribierten VEGF-mRNA nach ATII-Stimulation und die Mengen der transkribierten VEGF- und AGT-mRNA nach Angiotensinogen-Knockdown zu bestimmen, erfolgte eine quantitative Real-Time-PCR. Dabei wird die Menge einer zu untersuchenden mRNA im Verhältnis zur Menge der mRNA eines Referenzgens gemessen, in den Versuchen dieser Arbeit β_2-Mikroglobulin. Da die PCR DNA als Template benutzt, wurde die mRNA zuvor wie oben beschrieben

reverse transkribiert und anschließend 1:10 beziehungsweise bei den quantitativen Real-Time-PCR-Läufen nach Angiotensinogen-Knockdown der Zelllinie MDA-MB 361 1:5 und der Zelllinie MCF-7 1:2 verdünnt.

Zur Detektion der Genamplifikation wurden die Gensonden für VEGF-A Hs00173626_m1, für AGT Hs01586213_m1 und für β_2-Mikroglobulin 4326319E (alle Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) benutzt. Obwohl die VEGF- und die AGT-Gensonde FAM-markiert und die β_2-Mikroglobulin-Gensonde VIC-markiert sind, wurde auf eine Multiplex-Real-Time-PCR verzichtet, um eine gegenseitige Interferenz der Amplifikation und der Detektion durch die Gensonden auszuschließen.

Bei der quantitativen Real-Time-PCR wurde in einer 96-Well-Reaktionsplatte (MicroAmp Optical 96-Well Reaction plate, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in jedes Well 1,25 µl verdünnte cDNA beziehungsweise H_2O für die Negativkontrolle sowie 13,75 µl eines vorbereiteten Mastermixes gegeben. Dieser bestand pro zu untersuchender Probe aus 22,5 µl Reaktionspuffer TaqMan Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 16,5 µl H_2O und 2,25 µl der entsprechenden Gensonde (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Abschließend wurde die Reaktionsplatte mit einer Folie (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) abgeklebt.

Jeder Probenansatz wurde in drei aufeinander folgenden Wells wiederholt. So ergibt sich folgendes Schema der Reaktionsplatte (Tab. 5.):

Tabelle 5: Schema der Wellbelegung der quantitativen Real-Time-PCR-Reaktionsplatte. AGT = Angiotensinogen; PCR = Polymerase-Kettenreaktion; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

K: Negativkontrolle mit 1,25 µl H_2O als Template
1: Kontrolle
2: Angiotensin II
3: Captopril
4: Candesartan
5: PD123,319
6: Angiotensin II + Captopril
7: Angiotensin II + Candesartan
8: Angiotensin II + PD123,319
VEGF-/AGT-Gensonde (FAM-markiert)
β_2-Mikroglobulin-Gensonde (VIC-markiert)

K	K	K	1	1	1	2	2	2	3	3	3
4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
8	8	8									
K	K	K	1	1	1	2	2	2	3	3	3
4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7
8	8	8									

Anschließend erfolgte die PCR unter folgenden Reaktionsbedingungen (Tab. 6):

Tabelle 6: Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion, deren Reaktionstemperatur, Dauer und Anzahl der Wiederholungen. Min = Minuten; sek. = Sekunden

	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Stage 1	50 °C	2 min	1
Stage 2 Denaturierung	95 °C	10 min	1
Stage 3 Denaturierung Annealing/Elongation	95 °C 60 °C	15 sek. 1 min	40

2.7. Überprüfung des AGT-Knockdowns

Zur Verifizierung des erfolgreichen Angiotensinogen-Knockdowns wurde die Konzentration der transkribierten AGT-mRNA mittels Real-

Time-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich zwar ein signifikanter Rückgang der AGT-Genexpression (p = 0,034) (s. Abbildung 3), ein vollständiges Ausschalten der Gentranskription ist aber nicht gelungen. Wenn in einer Real-Time-PCR kein signifikanter Rückgang der AGT-Expression nachgewiesen werden konnte, wurden die Daten der entsprechenden VEGF-Real-Time-PCR ausgeschlossen. Hinsichtlich des Lysezeitpunktes konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (p = 0,575), ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus (p = 0,507).

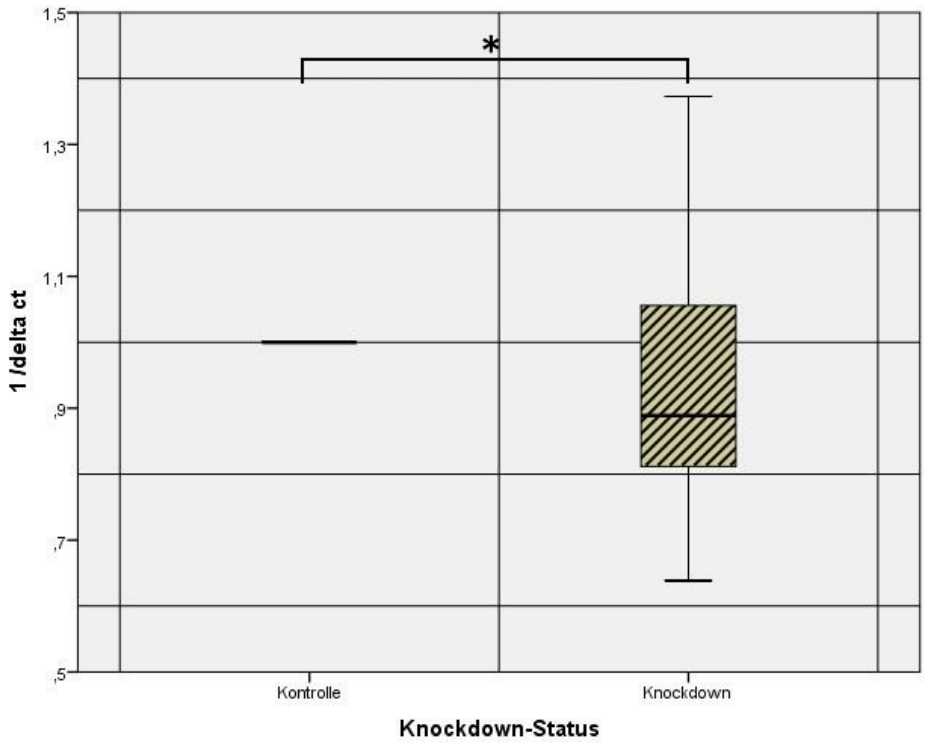


Abbildung 3: Relative Expression von Angiotensinogen nach Angiotensinogen-Knockdown gegenüber der Negativkontrolle. Durch den Angiotensinogen-Knockdown konnte zwar eine signifikante (p = 0,034), jedoch nicht vollständige Ausschaltung des Angiotensinogen-Gens erreicht werden. ct = cycle threshold

2.8. Auswertung der TaqMan-Rohdaten

Da jede Probe in drei aufeinanderfolgenden Wells im Sinne von drei Messwiederholungen pipettiert wurde, wurde aus diesen drei ct-Werten der Mittelwert gebildet. Der ct-Wert des VIC-markierten β_2-Mikroglobulins wurde vom ct-Wert des FAM-markierten VEGFs bzw. AGTs subtrahiert, um den Δct-Wert zu erhalten, der dem relativen Anstieg der Genexpression von VEGF bzw. AGT gegenüber von β_2-Mikroglobulin entspricht. Da der ct-Wert den PCR-Zyklus angibt, in dem das Signal der Gensonde erstmals überschwellig über die Hintergrundfluoreszenz wird, entspricht ein kleiner ct-Wert einer hohen DNA-Konzentration und ein hoher ct-Wert einer geringen DNA-Konzentration. Es wurde daher mit den Kehrwerten der berechneten Δct-Werte gearbeitet, sodass eine hohe DNA-Konzentration in der Real-Time-PCR auch durch einen hohen Wert auf der Ordinate der Grafiken repräsentiert wird. Zuletzt wurden alle Werte mit dem Kehrwert des Δct-Wertes der Kontrollgruppe dividiert, um auf die Kontrollgruppe normierte Werte zu erhalten.

2.9. Statistik

Sämtliche statistischen Berechnungen wurden anhand auf die Negativkontrollen normierter Werten durchgeführt. Nach Verifizierung, dass eine Normalverteilung vorliegt, kam bei den Daten der Stimulationsversuche eine Varianzanalyse zum Einsatz. Wenn dabei signifikante Effekte auftraten, wurden paarweise Post-Hoc-Vergleiche nach Bonferroni durchgeführt. Da die Daten der Knockdown-Versuche nicht normalverteilt waren, erfolgten hier die statistischen Berechnungen nach dem Mann-Whitney-Test. Für alle Berechnungen kam das Programm „IBM SPSS Statistics Version 21“ zum Einsatz. Bei

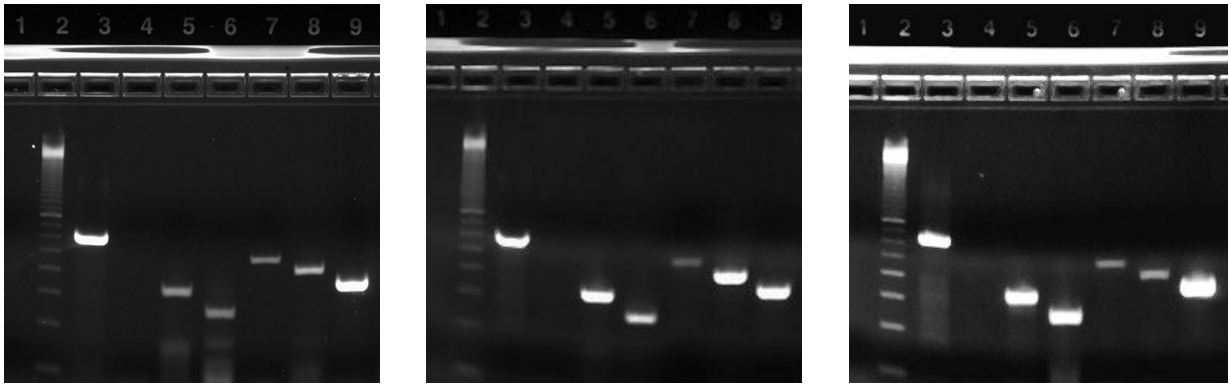
einer Irrtumswahrscheinlichkeit < 5% wurden die Unterschiede als signifikant angesehen ($p < 0,05$).

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Box-Whisker-Plots. Dabei zeigt der durchgängige Strich innerhalb der Box den Median, das obere Ende der Box das obere Quartil und das untere Ende der Box das untere Quartil. Da die verwendeten Daten auf die Negativkontrollen normiert wurden, werden diese dementsprechend durch Linien gekennzeichnet. Die beiden Whisker zeigen den größten beziehungsweise niedrigsten Wert innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands. Ausreißer, die über beziehungsweise unter diesem Wert liegen, werden mit Kreisen (O) gekennzeichnet, Extremwerte, die über beziehungsweise unter dem 3-fachen Interquartilsabstand liegen, mit Dreiecken (Δ). Signifikante Differenzen zwischen Behandlungsgruppen und den Negativkontrollen wurden durch mit einem Stern (*) markierte Klammern gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

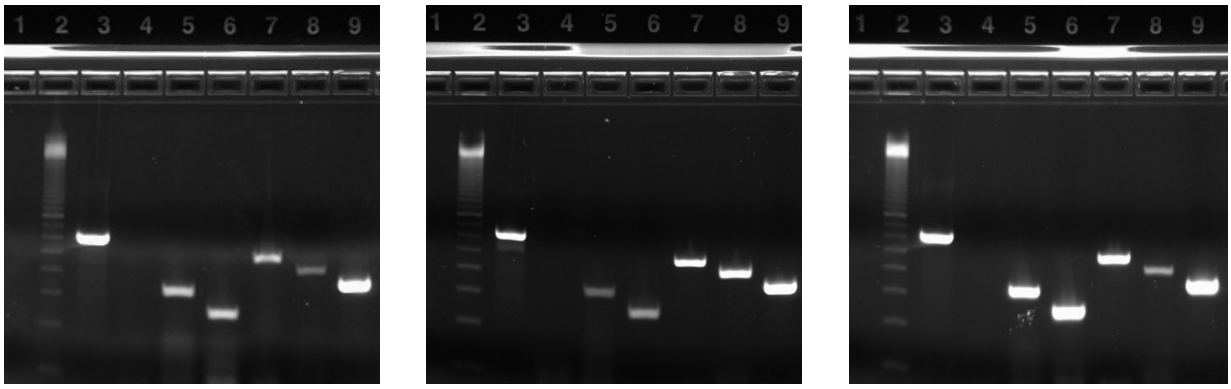
3.1. Nachweis der Expression von Genen, die an der Regulation der Angiogenese über den Renin-Angiotensin-Weg beteiligt sind

Sowohl bei den hormonrezeptorpositiven Zelllinien MCF-7, MDA-MB 361 und ZR-75-1 als auch bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 453 und MDA-MB 468 gelang in der Gelelektrophorese der Nachweis deutlicher Banden nach PCR der Gene für Angiotensinogen, Angiotensin-Converting-Enzyme, Angiotensin-II-Rezeptor-1, Angiotensin-II-Rezeptor-2 und VEGF (Abbildung 4 und Abbildung 5).



(a) (b) (c)

Abbildung 4: Nachweis der Transkriptionsprodukte von zur Regulation der Angiogenese mittels des Renin-Angiotensin-Systems notwendiger Proteine bei den hormonrezeptorpositiven Zelllinien MCF-7 (a), MDA-MB 361 (b) und ZR-75-1 (c): 2. 100-basepairs(bp)-Ladder, 3. Glycerinaldehy-3-Phosphat-Dehydrogenase als Positivkontrolle (657 bp), 4. Negativkontrolle, 5. Angiotensin-II-Rezeptor-1 (330 bp), 6. Angiotensin-II-Rezeptor-2 (263 bp), 7. Angiotensinogen (499 bp), 8. Angiotensin-converting-enzyme (428 bp), 9. Vascular endothelial growth factor (367 bp)



(a) (b) (c)

Abbildung 5: Nachweis der Transkriptionsprodukte von zur Regulation der Angiogenese mittels des Renin-Angiotensin-Systems notwendiger Proteine bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien MDA-MB 231 (a), MDA-MB 453 (b) und MDA-MB 468 (c): 2. 100-basepairs(bp)-Ladder, 3. Glycerinaldehy-3-Phosphat-Dehydrogenase als Positivkontrolle (657 bp), 4. Negativkontrolle, 5. Angiotensin-II-Rezeptor-2 (330 bp), 6. Angiotensin-II-Rezeptor-2 (263 bp), 7. Angiotensinogen (499 bp), 8. Angiotensin-converting-enzyme (428 bp), 9. Vascular endothelial growth factor (367 bp)

3.2. Angiotensin-II-Stimulation

3.2.1. Real-Time-PCR

3.2.1.1. Vorversuch:

Ohne Beachtung der unterschiedlichen Zelllinien zeigte sich in den Vorversuchen zur Ermittlung der geeigneten ATII-Stimulationskonzentration in der Real-Time-PCR ein Anstieg der VEGF-Expression nach Stimulation mit 10^{-7}, 10^{-6} und 10^{-5} mol/l ATII, wobei der Anstieg der VEGF-Expression nur nach Stimulationen mit 10^{-7} mol/l ATII signifikant größer war als in der Negativkontrolle ($p = 0{,}048$) (s. Abbildung 6).

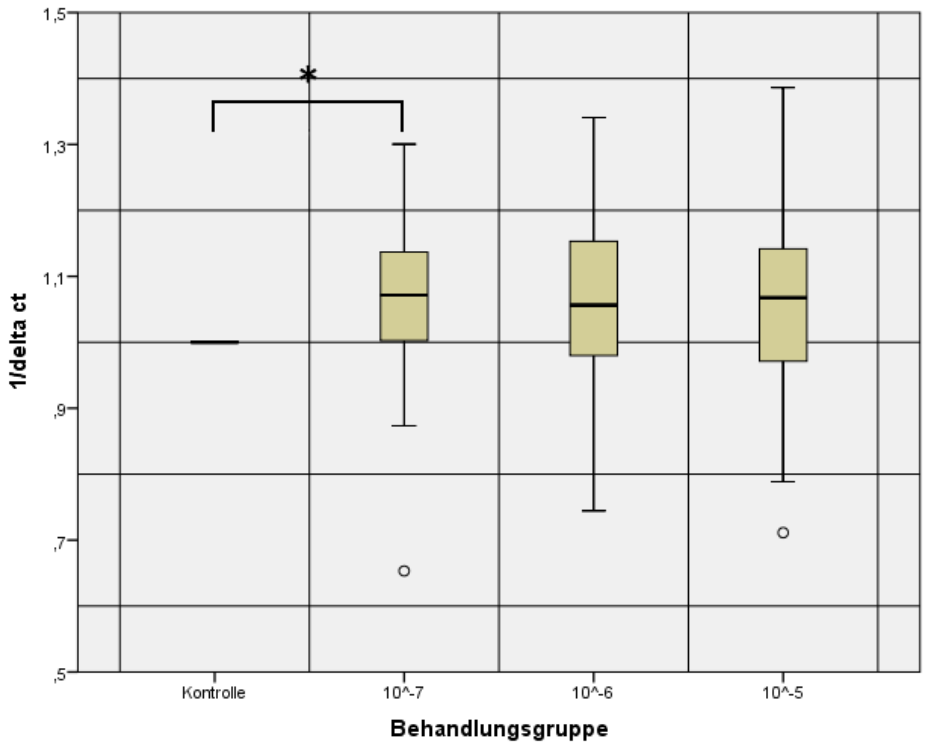


Abbildung 6: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nach Stimulation mit Angiotensin II in unterschiedlichen Konzentrationen zur Ermittlung der geeigneten Stimulationskonzentration. Nur bei einer Angiotensin-II-Konzentration von 10^{-7} mol/l konnte ein signifikanter Anstieg der Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nachgewiesen werden. Kontrolle = Negativkontrolle; 10^-7 = Stimulation mit 10^{-7} mol/l Angiotensin II; 10^-6 = Stimulation mit 10^{-6} mol/l Angiotensin II; 10^-5 = Stimulation mit 10^{-5} mol/l Angiotensin II; ct = cycle threshold

3.2.1.2. VEGF-Genexpression nach Stimulation mit extrinsischem Angiotensin II:

Ohne Beachtung der unterschiedlichen Zelllinien und des Hormonrezeptorstatus (Abbildung 7) zeigt sich nach Stimulation der Mammakarzinomzellen mit ATII ein signifikanter Anstieg der VEGF-Expression (p = 0,038). Bei der getrennten Betrachtung der hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Zelllinien (s. Abbildung 8) zeigt sich dieselbe Tendenz, allerdings ist der Effekt in diesem Fall nicht mehr signifikant. Bei hormonrezeptorpositiven Zelllinien war ein etwas größerer Anstieg der VEGF-Expression

gegenüber der hormonrezeptornegativen Zelllinien nachweisbar, dieser Unterschied war jedoch ebenfalls nicht signifikant (p = 0,091).

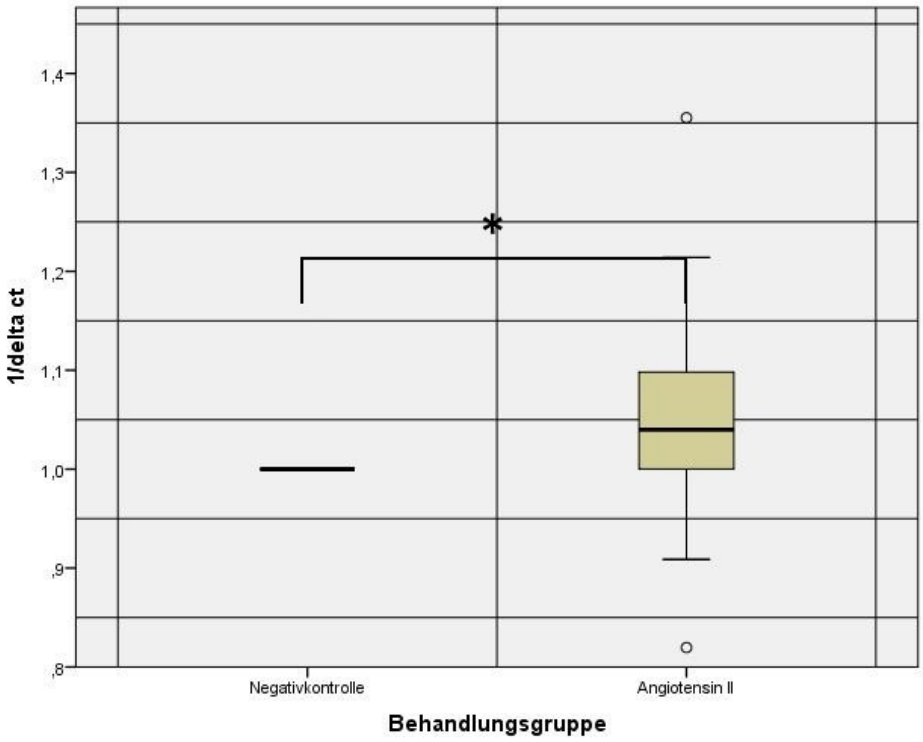


Abbildung 7: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nach Stimulation mit Angiotensin II gegenüber der Negativkontrolle ohne Beachtung der unterschiedlichen Zelllinien. Hierbei zeigt sich nach Angiotensin-II-Stimulation eine signifikant größere Expression des Vascular Endothelial Growth Factors als bei der Negativkontrolle. ct = cycle threshold

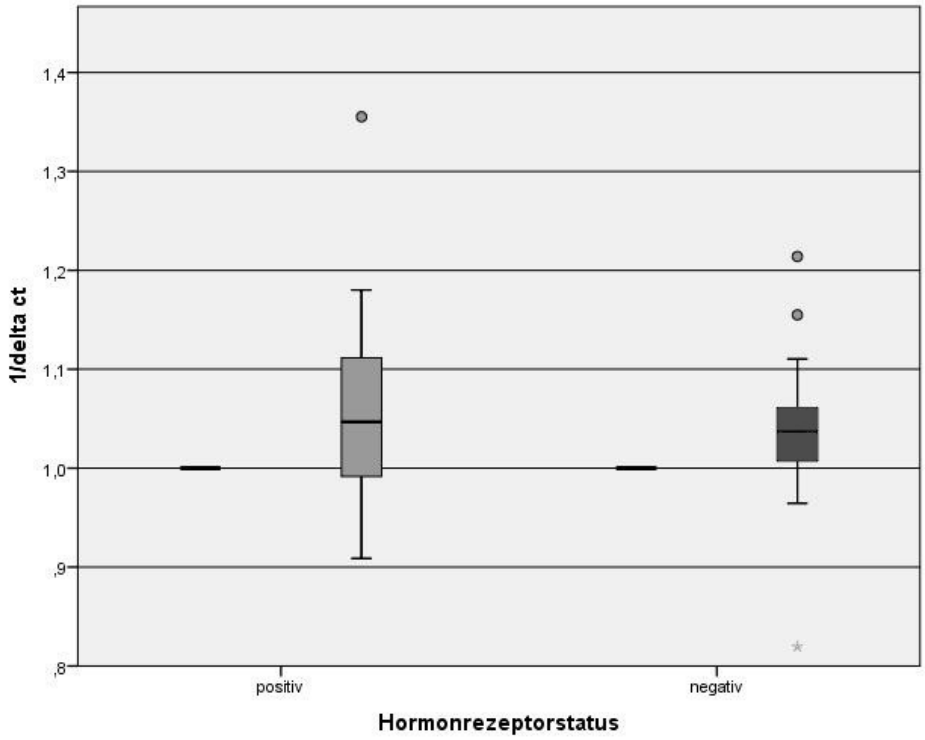


Abbildung 8: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nach Stimulation mit Angiotensin II gegenüber den Negativkontrollen bei hormonrezeptorpositiven (hellgrau) und -negativen (dunkelgrau) Zelllinien. Es fällt bei beiden Hormonrezeptorstatus eine gesteigerte Expression des Vascular Endothelial Growth Factors gegenüber der Negativkontrolle auf. Dieser Effekt erreicht jedoch nicht das definierte Signifikanzniveau. ct = cycle threshold

3.2.1.3. Einfluss von intrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression:

Zur Untersuchung der Wirkung des intrinsischen ATII und der Differenzierung des Wirkmechanismus wurde jeweils die VEGF-Genexpression nach ACE-Inhibition durch Captopril und AT_1-Rezeptor- und AT_2-Rezeptorblockade analysiert. Nach ACE-Inhibition zeigte sich eine signifikante Suppression der VEGF-Genexpression sowohl in hormonrezeptorpositiven ($p = 0,02$) als auch -negativen ($p < 0,01$) Zelllinien (s. Abbildung 9).

Ebenso führt die Blockade des AT_1-Rezeptors durch Candesartan sowohl in hormonrezeptorpositiven ($p < 0,001$) als auch -negativen ($p < 0,001$) Zelllinien zu einer signifikanten Suppression der VEGF-Genexpression (s. Abbildung 9).

Die Blockade des AT_2-Rezeptors durch PD 123,319 führte bei hormonrezeptorpositiven ($p = 0,811$) und -negativen ($p = 0,677$) Zelllinien zu keiner signifikanten Veränderung der VEGF-Genexpression (s. Abbildung 9).

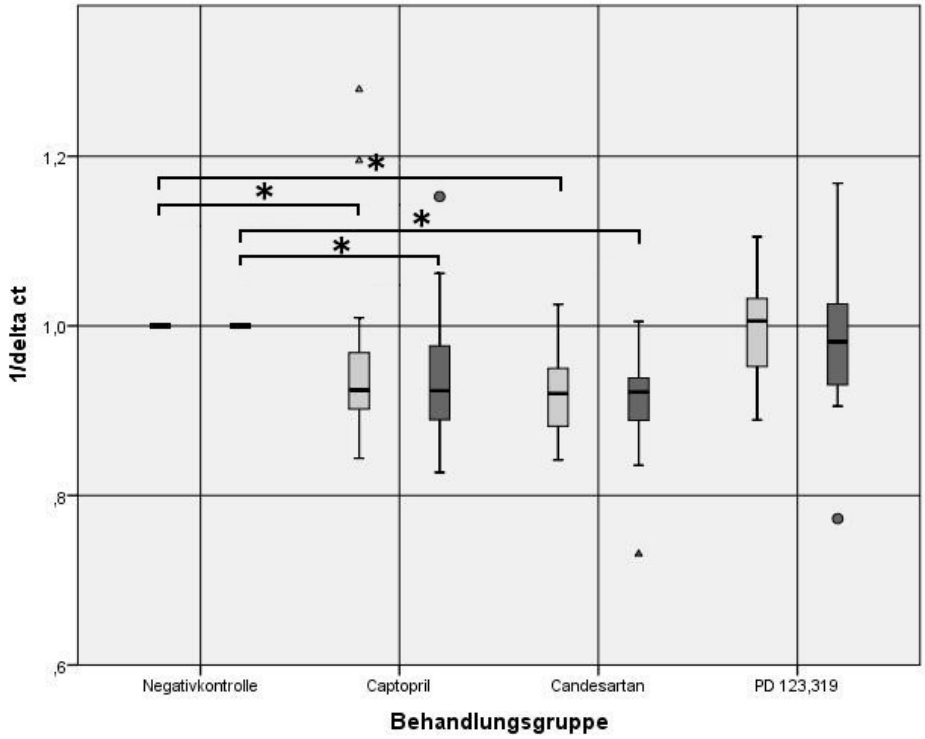


Abbildung 9: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nach Angiotensin-converting-enzyme-Inhibition mit Captopril, Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blockade mit Candesartan und Angiotensin-II-Rezeptor-2-Blockade mit PD 123,319 gegenüber den Negativkontrollen bei hormonrezeptorpositiven (hellgrau) und -negativen (dunkelgrau) Zelllinien. ct = cycle threshold

3.2.1.4. Einfluss von extrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression:

Weiterhin wurde die Wirkung von extrinsischem ATII auf die VEGF-Genexpression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass es nach einer ATII-Stimulation bei gleichzeitiger Inkubation der Mammakarzinomzellen mit dem ACE-Inhibitor Captopril zur Verhinderung einer intrinsischen ATII-Synthese bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien zu einer signifikant geringeren VEGF-Genexpression gegenüber der Negativkontrolle kommt ($p < 0,05$). Bei hormonrezeptorpositiven Zelllinien ist dagegen kein Unterschied zur Kontrolle zu beobachten ($p = 0,407$) (s. Abbildung 10).

Bei gleichzeitiger Inkubation der Mammakarzinomzellen mit dem AT_1-Rezeptorblocker Candesartan und ATII kommt es sowohl bei hormonrezeptorpositiven ($p = 0,004$) als auch -negativen ($p < 0,001$) Zelllinien zu einer signifikanten Suppression der VEGF-Genexpression gegenüber der Negativkontrolle (s. Abbildung 10).

Werden die Zellen bei gleichzeitiger AT_2-Rezeptorblockade durch den selektiven AT_2-Rezeptorblocker PD 123,319 mit ATII stimuliert, kommt es ebenfalls sowohl bei den hormonrezeptorpositiven wie -negativen Zellen zu einer deutlichen, signifikanten Suppression der VEGF-Genexpression gegenüber der Negativkontrolle (jeweils $p < 0,001$) (s. Abbildung 10) und tendenziell sogar zu einer stärkeren Suppression als bei AT_1-Rezeptorblockade.

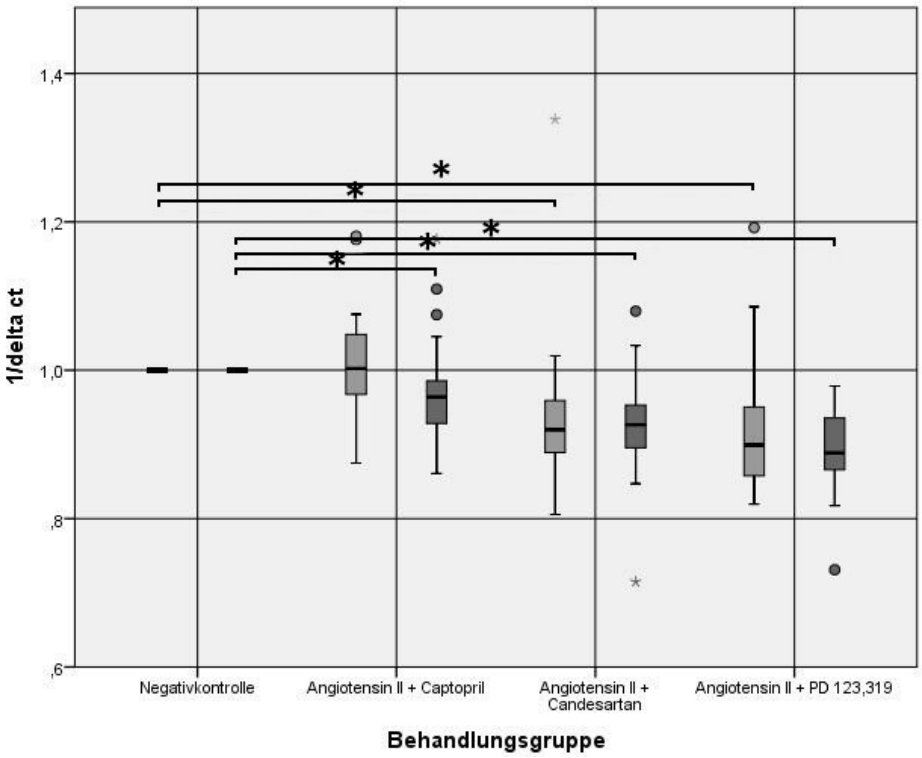


Abbildung 10: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors nach gleichzeitiger Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-converting-enzyme-Inhibition mit Captopril, gleichzeitiger Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blockade mit Candesartan sowie gleichzeitiger Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-II-Rezeptor-2-Blockade mit PD 123,319 gegenüber den Negativkontrollen bei hormonrezeptorpositiven (hellgrau) und -negativen (dunkelgrau) Zelllinien. ct = cycle threshold

3.2.2. VEGF-ELISA

In der ELISA konnten keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen nachgewiesen werden ($p = 0{,}094$) (s. Abbildung 11). Es zeigte sich jedoch, dass die hormonrezeptorpositiven Zelllinien unabhängig von der Behandlungsgruppe eine signifikant größere Menge an VEGF synthetisierten als hormonrezeptornegative Zelllinien ($p < 0{,}001$) (s. Abbildung 12).

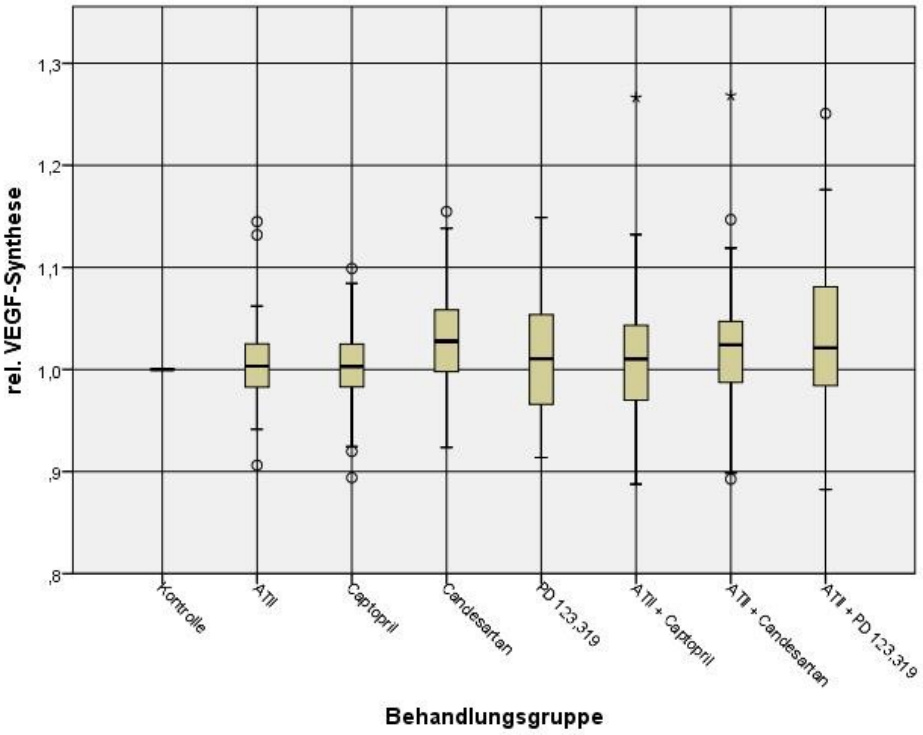


Abbildung 11: Relative Konzentrationen von Vascular Endothelial Growth Factor in den Zellkulturüberstände der verschiedenen Behandlungsgruppen. Kontrolle = Negativkontrolle; AT II = Stimulation mit Angiotensin II; Captopril. = Angiotensin-converting-enzyme-Inhibition mit Captopril; Candesartan = Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blockade mit Candesartan; PD 123,319 = Angiotensin-II-Rezeptor-2-Blockade mit PD 123,319; ATII + Captopril. = gleichzeitige Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-converting-enzyme-Inhibition mit Captopril; ATII + Candesartan = gleichzeitige Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blockade mit Candesartan; ATII + PD 123,319 = gleichzeitige Stimulation mit Angiotensin II und Angiotensin-II-Rezeptor-2-Blockade mit PD 123,319; rel. = relative; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

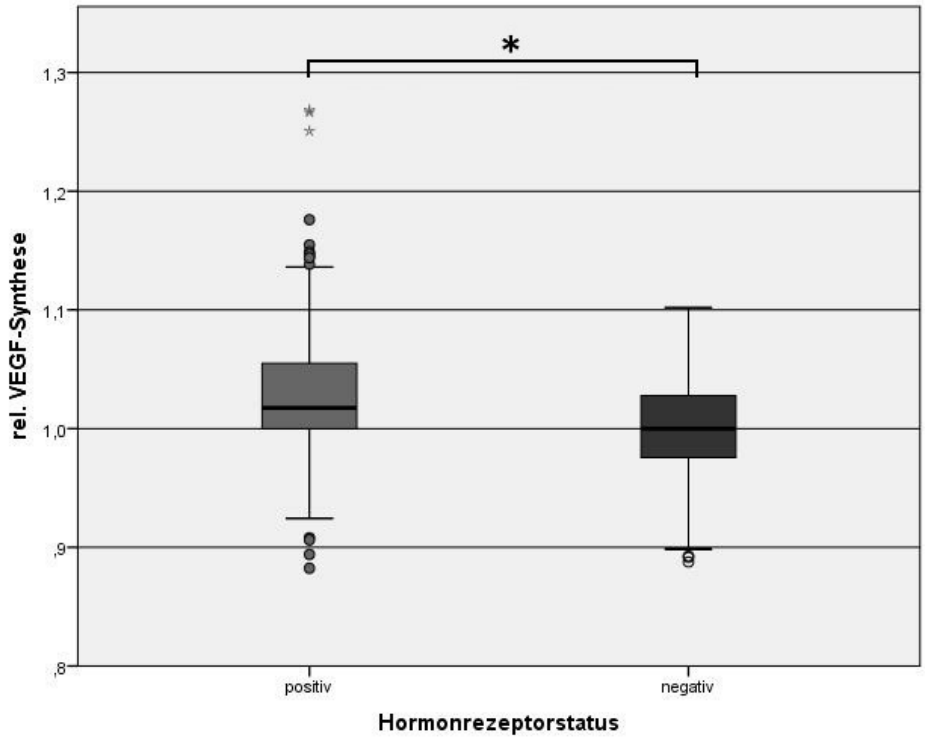


Abbildung 12: Unabhängig von der Behandlungsgruppe fiel bei den hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen (hellgrau) in der ELISA eine signifikant größere Synthese von Vascular Endothelial Growth Factor gegenüber den hormonrezeptornegativen Mammakarzinomzellen (dunkelgrau) auf. rel. = relative; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

3.3. Angiotensinogen-Knockdown

3.3.1. VEGF-Real-Time-PCR

Bei den hormonrezeptorpositiven Zelllinien zeigten sich zu allen Lysezeitpunkten sehr oder hochsignifikante Anstiege der VEGF-Genexpression nach AGT-Knockdown (48 h: $p = 0{,}003$; 72 h: $p < 0{,}000$; 96 h: $p < 0{,}000$; 120 h: $p = 0{,}002$; 144 h: $p < 0{,}000$) (s. Abbildung 13).

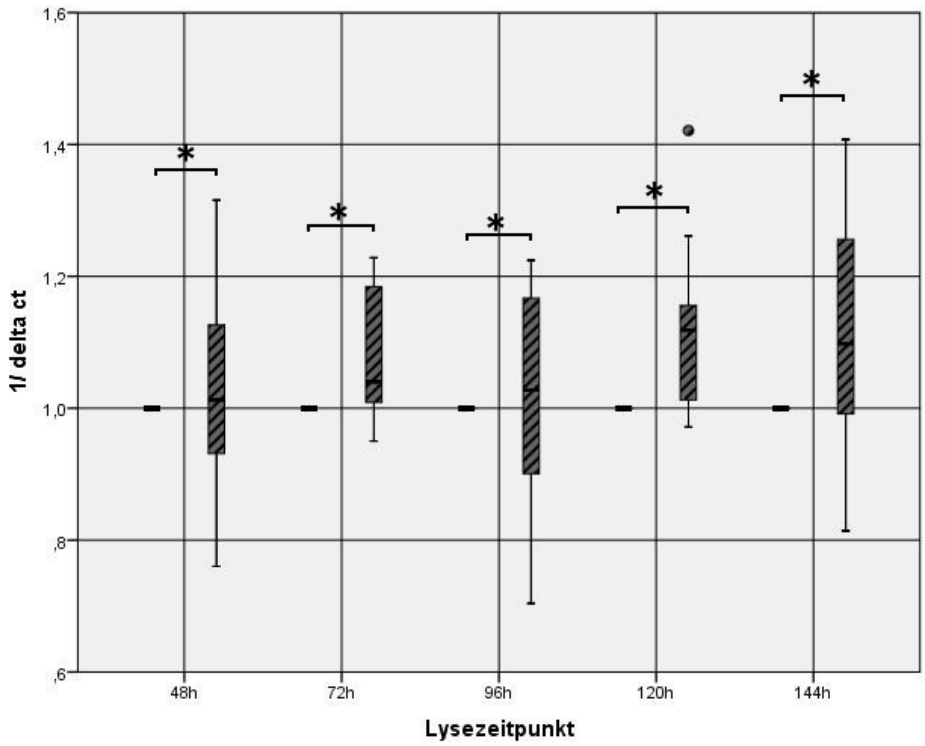


Abbildung 13: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors der hormonrezeptorpositiven Zelllinien nach Angiotensinogen-Knockdown (schraffiert) gegenüber den Negativkontrollen (nicht schraffiert) nach 48 Stunden (48h), 72 Stunden (72h), 96 Stunden (96h), 120 Stunden (120h) und 144 Stunden (144h). Zu allen Lysezeitpunkten sind gegenüber den Negativkontrollen signifikant gesteigerte Expressionen des Vascular Endothelial Growth Factors nachweisbar. ct = cycle threshold

Bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien dagegen war nach 48 Stunden ein sehr signifikanter Anstieg der VEGF-Genexpression zu beobachten (p = 0,003), zu den folgenden drei Lysezeitpunkten konnten jedoch keine signifikanten Effekte des AGT-Knockdowns mehr nachgewiesen werden (72 h: p = 1,00; 96 h: p = 0,139; 120 h: p = 0,139) und nach 144 Stunden war sogar ein signifikanter Rückgang der VEGF-Genexpression zu beobachten (p = 0,040) (s. Abbildung 14).

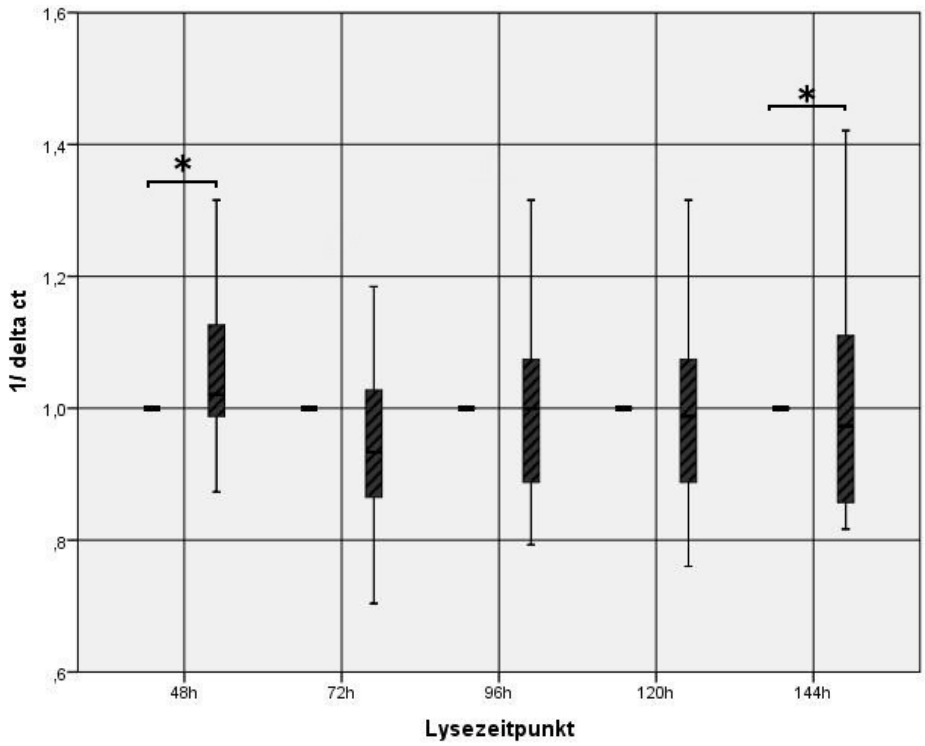


Abbildung 14: Relative Expression des Vascular Endothelial Growth Factors der hormonrezeptornegativen Zelllinien nach Angiotensinogen-Knockdown (schraffiert) gegenüber den Negativkontrollen (nicht schraffiert). Nach 48 Stunden (48h) zeigt sich eine signifikante Steigerung der Expression des Vascular Endothelial Growth Factors, nach 144 Stunden (144h) ein signifikanter Rückgang dieser. Nach 72 Stunden (72h), 96 Stunden (96h), 120 Stunden (120h) ist kein signifikanter Unterschied der Expression des Vascular Endothelial Growth Factors gegenüber der Negativkontrolle nachweisbar. ct = cycle threshold

3.3.2. VEGF-ELISA

Bei der Untersuchung der jeweils synthetisierten VEGF-Konzentration in den Überständen der Zellkulturen zeigte sich bei den hormonrezeptorpositiven Zelllinien zu allen Lysezeitpunkten eine gesteigerte VEGF-Synthese nach AGT-Knockdown gegenüber den Negativkontrollen (s. Abbildung 15). Zu den Lysezeitpunkten 72 Stunden und 120 Stunden konnte das Signifikanzniveau gerade nicht erreicht werden (jeweils p = 0,068), zu den anderen Lysezeitpunkten konnten jedoch sehr beziehungsweise hoch signifikante Differenzen

nachgewiesen werden (48 h: p = 0,003; 96 h: p = 0,003; 144 h: p < 0,000).

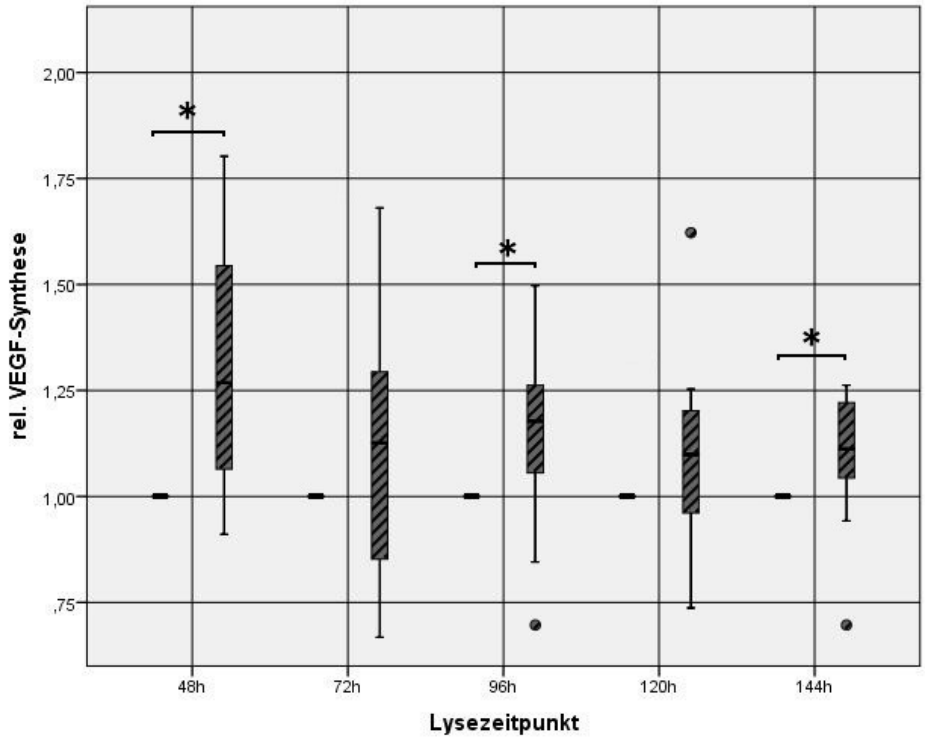


Abbildung 15: Relative Konzentration von Vascular Endothelial Growth Factor in den Überständen des Zellkulturmediums bei den hormonrezeptorpositiven Zelllinien nach Angiotensinogen-Knockdown (schraffiert) gegenüber den Negativkontrollen (nicht schraffiert) nach 48 Stunden (48h), 72 Stunden (72h), 96 Stunden (96h), 120 Stunden (120h) und 144 Stunden (144h). rel. = relative; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

Bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien konnte die auf mRNA-Ebene nachgewiesene Steigerung der VEGF-Expression nach 48 Stunden nicht nachgewiesen werden, auch zu den folgenden Lysezeitpunkten zeigten sich gegenüber den Kontrollen keine signifikanten Veränderungen der VEGF-Synthese. Nach 144 Stunden kam es dann aber auch hier zu einem sehr signifikanten Rückgang der VEGF-Synthese (p = 0,002) gegenüber der Negativkontrolle (s. Abbildung 16).

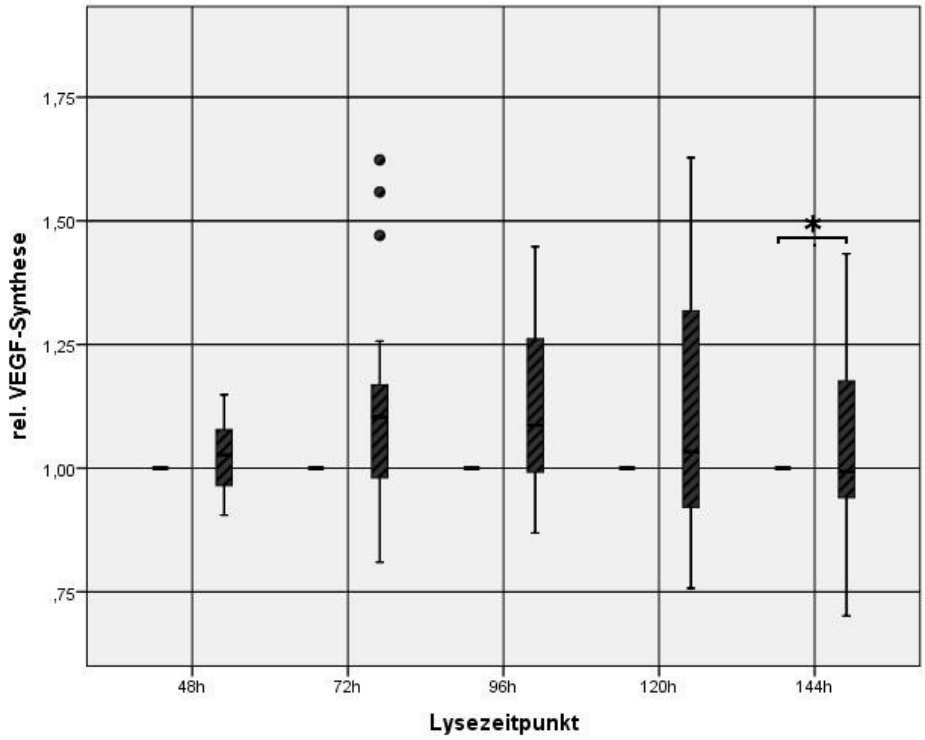


Abbildung 16: Relative Konzentration von Vascular Endothelial Growth Factor in den Überständen des Zellkulturmediums bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien nach Angiotensinogen-Knockdown (schraffiert) gegenüber den Negativkontrollen (nicht schraffiert) nach 48 Stunden (48h), 72 Stunden (72h), 96 Stunden (96h), 120 Stunden (120h) und 144 Stunden (144h). rel. = relative; VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

4. Diskussion

Da bei Tumorerkrankungen vor allem die systemische Metastasierung und die dadurch bedingten Organschädigungen prognoserelevant sind und für die systemische Metastasierung eine suffiziente Tumorangiogenese erforderlich ist, die dem Primärtumor einen Anschluss an das Gefäßsystem ermöglicht, war das Ziel dieser Arbeit, die molekulare Regulation der Tumorangiogenese durch das RAS in Abhängigkeit vom Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms zu untersuchen. Der Einfluss des RAS auf die Expression des VEGF ist bekannt und bereits bei vielen Tumoren untersucht worden (Regulska et al., 2013). Es gibt aber derzeit noch keine Arbeit, die untersucht hat, ob es hierbei Unterschiede dieser durch das RAS vermittelten Regulation der Tumorangiogenese zwischen Mammakarzinomen von unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus gibt und damit, ob die unterschiedlichen Prognosen der Karzinome in dieser unterschiedlichen Regulation begründet sein könnten.

Durch die Stimulationsversuche konnte gezeigt werden, dass alle Mammakarzinomzellen nach Stimulation mit extrinsischem ATII mit einer gesteigerten VEGF-Expression reagieren und auch intrinsisches ATII zu einer gesteigerten VEGF-Expression führt. Dieser stimulierende Effekt wird über den AT_1-Rezeptor vermittelt, wogegen der AT_2-Rezeptor eher modulierende Funktion hat. Im zweiten Teil der Arbeit konnte mit den Knockdown-Versuchen gezeigt werden, dass es bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen nach der Reduktion der AGT-Expression zu einer signifikanten Steigerung der VEGF-Expression kommt, wogegen nach dieser bei den hormonrezeptornegativen Mammakarzinomzellen im Verlauf ein

Rückgang der VEGF-Expression zu verzeichnen ist. Dies zeigt, dass die Tumorangiogenese bei hormonrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomen durch das RAS unterschiedlich reguliert wird.

Die einzelnen Ergebnisse werden im Folgenden ausführlich diskutiert.

4.1. Nachweis von Komponenten des RAS bei Mammakarzinomzellen

Eine große Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems ist mittlerweile für viele Malignome einschließlich Hirntumoren, Bronchial-, Pankreas-, Prostata-, Zervix- und kolorektaler Karzinome gesichert (Deshayes et al., 2005). Besonders die Überexpression des für die proliferative und proangiogene Wirkung von ATII bedeutende AT_1-Rezeptor ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen (Rhodes et al., 2009; Louis et al. 2007). Der Nachweis deutlicher Banden nach PCR der Gene für Angiotensinogen, Angiotensin-Converting-Enzyme, Angiotensin-Rezeptor-1, Angiotensin-Rezeptor-2 und VEGF in allen untersuchten Mammakarzinomzelllinien zeigt nun, dass auch alle diese Zelllinien grundsätzlich die Voraussetzungen für eine Regulation der Angiogenese über das RAS erfüllen und damit für die weitere Untersuchung dieser Fragestellung geeignet sind. Da der Nachweis der Gene sowohl für die hormonrezeptorpositiven Zelllinien MCF-7, MDA-MB 361 und ZR-75-1 als auch die hormonrezeptornegativen Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 453 und MDA-MB 468 gelungen ist, ist es wahrscheinlich, dass sowohl bei hormonrezeptorpositiven als auch -negativen Mammakarzinomen die Tumorangiogenese über das grundsätzlich gleiche System reguliert werden kann. Dies wird auch durch immunhistochemische Untersuchungen von Jethon et al. (2012) unterstützt, bei denen der Nachweis des AT_1-Rezeptors nicht mit dem

Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms korrelierte. Die untersuchten Zellen sind aufgrund des Nachweises der Expression des AT_1-Rezeptors und des AT_2-Rezeptors sensibel auf ATII und können somit auch durch extrinsisches ATII stimuliert werden. Des Weiteren verfügen sie über die Voraussetzung zur lokalen, intrinsischen ATII-Synthese und ermöglichen dem Tumor dadurch die Fähigkeit zur autokrinen Stimulation. Der Einfluss von solchem intrinsischen sowie auch von extrinsischen ATII auf die VEGF-Genexpression wurde, wie unten beschrieben, in dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

4.2. Einfluss von extrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression

Die Ergebnisse einiger früherer Studien haben gezeigt, dass das Renin-Angiotensin-System große Bedeutung für die Tumorevolution hat (Childers, 2015). Als Haupteffektor bezüglich der Tumorproliferation und der Tumorangiogenese konnte ATII ermittelt werden, das seine Wirkung über den AT_1-Rezeptor vermittelt (Herr et al., 2008 a; Herr et al. 2008 b). Dies hat eine Reihe von Signalkaskaden zur Folge, die eine verstärkte Expression von VEGF, fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF) und transforming growth factor β (TGF β) bewirken (Greene et al., 2002). VEGF ist hierbei der bedeutendste Faktor für die Angiogenese. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit haben Herr et al. (2008 b) und Chen et al. (2012, 2013) gleichermaßen gezeigt, dass bei Mammakarzinomzellen der hormonrezeptorpositiven Zelllinien MCF-7 und der hormonrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB 468 nach einer Stimulation mit ATII ein Anstieg der VEGF-Expression zu beobachten ist. Diese Erkenntnis konnte mit dieser Arbeit für weitere Zelllinien bestätigt werden. Chen et al. (2012) konnten nach einer Stimulation von Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 mit extrinsischem ATII die

höchste Konzentration an VEGF-A-mRNA nach 12 und 24 Stunden messen, sodass der gemessene, gerade nicht mehr signifikante Anstieg der VEGF-Genexpression gegenüber der Negativkontrolle möglicherweise auch darauf zurückzuführen ist, dass es nach 48 Stunden wieder zu einem Rückgang der ATII-mRNA-Konzentration kommt.

Entsprechend dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass beim Mammakarzinom das RAS über VEGF Einfluss auf die Tumorangiogenese nehmen kann.

Aufgrund der Tatsache, dass hormonrezeptornegative Mammakarzinome eine schlechtere Prognose, vermeintlich bedingt durch eine aggressivere Tumorangiogenese, wurde auch vermutet, dass hormonrezeptornegative Zellen mit einer stärkeren VEGF-Expression reagieren als hormonrezeptorpositive Zellen. Dies war allerdings nicht der Fall.

Da sich hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Expression fand, zeigt dieser exogene Stimulationsweg zur Regulation der Angiogenese vermutlich nur die potenzielle Möglichkeit der Angiogeneseregulation durch das RAS in beiden Zelllinien auf. Pathophysiologisch wird wohl der intrinsischen Regulation eine größere Bedeutung zukommen. Es sind so gut wie keine Erkrankungen mit einer systemisch erhöhten ATII-Produktion bekannt, die mit einer erhöhten Mammakarzinominzidenz einhergehen. Es ist eher so, dass bei Frauen, bei denen eine verringerte ATII-Synthese, z.B. durch einen Enzymdefekt, stattfindet, epidemiologisch ein geringeres Risiko am Mammakarzinom zu erkranken beobachtet wird (Koh et al., 2003; Gonzélez-Zuloeta et al., 2005).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass mit dem extrinsischen Stimulationsansatz nicht die unterschiedliche Regulation der Tumorangiogenese durch das RAS zwischen verschiedenen Mammakarzinomentitäten erklärt werden kann, aber er sehr wohl genutzt werden kann, um die Funktion der unterschiedlichen Rezeptoren bezüglich der grundsätzlichen Angiogeneseregulation zu testen, wie im Folgenden beschrieben wird.

Bei vielen Malignomen wird der AT_1-Rezeptor stark überexprimiert (Rhodes et al., 2009) und die Wirkung des ATII bezüglich der gesteigerten Angiogenese wird vor allem über diesen Rezeptortyp vermittelt (Herr et al., 2008). Zur Ermittlung der Signaltransduktion bei den untersuchten Mammakarzinomzellen erfolgte eine Blockade beider Angiotensin-II-Rezeptoren bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit extrinsischem ATII und anschließender Messung der exprimierten VEGF-Menge. Wurde der AT_1-Rezeptor durch eine Inkubation der Zellen mit Candesartan blockiert, so konnte auch extrinsisches ATII nicht zu einer gesteigerten VEGF-Genexpression führen, da die weitere Signaltransduktion ausgeschaltet war. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen den hormonrezeptorpositiven und -negativen Zelllinien, was vermuten lässt, dass der AT_1-Rezeptor bei Mammakarzinomzellen von beiden Hormonrezeptortypen für die Signaltransduktion verantwortlich ist und bei Aktivierung zu einer Steigerung der VEGF-Genexpression führt.

Obwohl die Untersuchung der Wirkung der AT_1-Rezeptorblockade auf die Tumorevolution und speziell die Tumorangiogenese das Ziel zahlreicher Untersuchungen war, ist über die Effekte, die über den überwiegend antagonistisch wirkenden AT_2-Rezeptor vermittelt werden, noch immer wenig bekannt und erscheinen zum Teil widersprüchlich.

So konnte gezeigt werden, dass es bei humanen kolorektalen Karzinomzellen und Kortexneuronen von Mäusen nach Stimulation dieses Rezeptors mit einem selektiven Agonisten zu einem VEGF-Anstieg kommt (Ager et al., 2010; Mateos et al., 2016) sowie durch Blockade des AT_2-Rezeptors durch den selektiven AT_2-Rezeptorantagonisten PD 123,319 ein Rückgang einer zuvor durch eine Stimulation mit extrinsischem ATII gesteigerten VEGF-Sekretion erreicht werden kann (Ptasińska-Wnuk et al., 2007). Demgegenüber konnten Zhou et al. (2014) zeigen, dass eine AT_2-Rezeptorstimulation mit einer geringen ATII-Konzentration bei humanen kolorektalen Karzinomzellen zu einer vermehrten VEGF-Sekretion führt, eine Stimulation mit einer hohen Konzentration an ATII jedoch zu einer Inhibition der VEGF-Sekretion führt. Entsprechend der Literatur zeigen sich auch die Ergebnisse dieser Arbeit in Teilen kontrovers. Wurde in den Versuchen der AT_2-Rezeptor durch eine Inkubation der Zellen mit PD 123,391 blockiert und nun extrinsisches ATII zugeführt, kam es ebenfalls zu einer signifikanten Suppression der VEGF-Genexpression. Dies ist umso überraschender, als die alleinige Blockade mit PD 123,391 zu keiner signifikanten Änderung der Menge des exprimierten VEGFs gegenüber der Negativkontrolle geführt hatte und somit kein direkter Effekt über diesen Rezeptortyp nachgewiesen werden konnte. Offensichtlich vermittelt dieser AT_2-Rezeptor also keinen rein antagonisierenden Effekt, sondern hat vielmehr modulierende Wirkung bei gleichzeitiger Stimulation des AT_1-Rezeptors. ATII scheint über den AT_1-Rezeptor also nur nach einer Koaktivierung des AT_2-Rezeptors seine stimulierende Wirkung auf die VEGF-Genexpression entfalten zu können. Dies unterstützt auch die Theorie, dass die über den AT_2-Rezeptor vermittelten Effekte sich je nach Zellart und physiologischem Kontext erheblich unterscheiden (Clere et al., 2010).

Die mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesenen Unterschiede in der Menge des exprimierten VEGFs zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen konnten auf Proteinebene mittels ELISA leider nicht nachvollzogen werden. Möglicherweise ist dies dadurch zu erklären, dass die Inkubationszeit zu kurz war, um die bereits auf RNA-Ebene nachgewiesenen Veränderungen der VEGF-Genexpression auch auf Proteinebene zu beobachten. Andererseits könnten auch weiter downstream gelegene Mechanismen korrigierend auf die Proteinsynthese eingewirkt und somit verhindert haben, dass es trotz der nachgewiesenen Veränderung der Transkriptionsrate des VEGF-Gens nicht auch zu einer veränderten Translation gekommen ist.

4.3. Einfluss von intrinsischem Angiotensin II auf die VEGF-Genexpression

Wie im vorigen Kapitel erklärt, ist ein exogener ATII-vermittelter Regulationsweg der Tumorangiogenese beim Mammakarzinom eher unwahrscheinlich. Es ist anzunehmen, dass das intrinsische ATII, also das durch die Tumorzellen selbst synthetisierte, eine weitaus größere Bedeutung hat. Hierbei scheint eine autokrine Stimulation der Karzinomzellen über die verschiedenen Rezeptoren, gefolgt von einer Stimulation der VEGF-Synthese, möglich. Dies wird anhand der Inhibitionsversuche mit verschiedenen Rezeptor- oder Enzymblockern deutlich.

Durch die Inkubation der Mammakarzinomzellen mit dem ACE-Inhibitor Captopril ist es den Zellen nicht mehr möglich, die Spaltung des synthetisierten ATI in das wirksame ATII zu katalysieren. Dadurch steht den Zellen offensichtlich kein intrinsisches ATII mehr zur Verfügung, das zu einer autokrinen Stimulation der VEGF-Synthese führen könnte.

Entsprechend konnte ein signifikanter Rückgang der VEGF-Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Koh et al. (2003) und González-Zuloeta et al. (2005), die ergaben, dass bei einer genetisch veränderten Enzymaktivität des ACEs mit einer gesteigerten Aktivität oder auch verringerten Aktivität entsprechend ein erhöhtes bzw. vermindertes Erkrankungsrisiko für das Mammakarzinom assoziiert ist. Ein Unterschied zwischen hormonrezeptorpositiven und -negativen Karzinomzellen nach ACE-Inhibition konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Diese Suppression der VEGF-Genexpression durch die Ausschaltung von intrinsischem ATII kann aber bei den hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen durch extrinsisches ATII wieder aufgehoben werden, sodass bei diesen Zellen keine signifikante Differenz gegenüber der Negativkontrolle mehr zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu bleibt bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien die durch den ACE-Inhibitor Captopril erreichte Suppression der VEGF-Expression weiterhin bestehen. Das extrinsische ATII kann diese Suppression nicht ausgleichen. Die VEGF-Genexpression ist bei der gleichzeitigen Inkubation der hormonrezeptornegativen Zellen mit Captopril und ATII zwar größer als bei alleiniger Inkubation mit Captopril, aber dennoch signifikant geringer als bei der Negativkontrolle. Das legt nahe, dass die zugeführte Menge des exogenen ATII nicht ausreichend ist, um bei hormonrezeptornegativen Zelllinien den gleichen Effekt zu erreichen, wie bei hormonrezeptorpositiven Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass hormonrezeptorpositive Zelllinien auf eine Stimulation mit ATII empfindlicher reagieren, bzw. bei Stimulation mit derselben Menge ATII mit einer größeren Steigerung der VEGF-Genexpression reagieren, als dies bei hormonrezeptornegativen

Zelllinien der Fall ist. An dieser Stelle wird ersichtlich, dass bei den verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Regulationswege beschritten werden können.

Neben dem für den Schritt der enzymatischen Aktivierung bedeutendsten Enzym ACE gibt es eine Reihe weiterer Enzyme, die die Aktivierung von ATI zu ATII katalysieren (Muramatus et al., 2000). So wurde gezeigt, dass die Endopeptidase Chymase und andere Chymotrypsine ebenfalls eine Angiotensin-konvertierende Aktivität besitzen (Froogh et al., 20017), deren katalytische Aktivität die des ACE sogar übersteigt (Ahmad et al., 2011). Rein spekulativ wäre es denkbar, dass hormonrezeptorpositive Zellen auch eine größere Menge an solchen Enzymen, die eine alternative, ACE-unabhängige ATII-Bildung ermöglichen, exprimieren, als hormonrezeptornegative Zellen. Dies lässt weiter vermuten, dass bei einer möglichen, in therapeutischer Absicht antiangiogenen Beeinflussung des RAS AT_1-Rezeptor-blockierende Substanzen bei Karzinompatientinnen ACE-inhibierenden Substanzen vorzuziehen sind, da so eine von alternativen Wegen unabhängige, effektivere VEGF-Suppression zu erwarten ist. Zu dieser Thematik gibt die Literatur keine wegweisenden Hinweise, und es werden zur Klärung dieser spannenden Hypothese der unterschiedlichen Kapazität der ACE-unabhängigen ATII-Bildung zur Regulation der Tumorangiogenese beim Mammakarzinom grundlegende Untersuchungen benötigt.

Wie zuvor beschrieben kann anstelle der Ausschaltung der ATII-Synthese die Blockade der Rezeptoren entscheidende Hinweise auf deren Funktion im RAS geben. Durch die Inkubation der Mammakarzinomzellen mit dem AT_1-Rezeptor-Blocker Candesartan ist es den Zellen zwar noch möglich, intrinsisches ATII zu synthetisieren,

durch die Rezeptorblockade wird jedoch offensichtlich die autokrine Stimulation verhindert, wodurch der beobachtete Rückgang der VEGF-Genexpression zu erklären ist. Dies konnte in Einklang mit unseren Ergebnissen auch für andere Tumorentitäten wie Karzinome des Ovars (Suganuma et al., 2005), der Prostata (Miyajima et al., 2009) und des Pankreas (Noguchi et al., 2009) gezeigt werden. Neben der VEGF-Suppression ist bei anderen Zelllinien auch ein Rückgang an den ebenfalls proangiogenen Faktoren IL-8 (Kosugi et al., 2006), HIF-2α (Herr et al., 2008) und EGF (epidermal growth factor) (Imai et al., 2006) nach der Gabe von Candesartan beschrieben. Auch von Chen et al. (2012) konnte nach Gabe von Losartan ein Rückgang an VEGF-A sowohl mittels RT-PCR als auch Immunhistochemie nachgewiesen werden. Dagegen blieb nach Inkubation der Mammakarzinomzellen mit dem AT_2-Rezeptor-Blocker PD 123,319 der erwartete VEGF-Anstieg aus. Daraus lässt sich schließen, dass über den AT_2-Rezeptor im Gegensatz zu einigen Literaturstellen (Pei et al., 2017) kein direkter AT_1-Rezeptor-antagonistischer Wirkmechanismus bezüglich der Regulation der Angiogenese vorhanden ist. Hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus konnten bei diesen Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktion keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass es sowohl bei hormonrezeptornegativen als auch bei -positiven Zelllinien durch intrinsisches ATII zu einer autokrinen Stimulation der VEGF-Genexpression kommt und dass die Signaltransduktion dieses Effektes durch den AT_1-Rezeptor vermittelt wird. Die Bedeutung des AT_2-Rezeptors für die Regulation in den unterschiedlichen Zelllinien konnte mit unseren Untersuchungen nicht hinreichend geklärt werden. Dies spiegelt den in der Literatur widersprüchlichen Sachstand der Funktion dieses Rezeptors wider und es darf spekuliert werden, dass der

Rezeptor modulierenden Einfluss, in welcher Form auch immer, auf die Regulation der Tumorangiogenese hat.

Obwohl der Fokus einer Vielzahl der experimentellen Arbeiten der letzten Jahre bezüglich der Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems auf die Tumorevolution und besonders die Tumorangiogenese auf der Untersuchung der Wirkungen von ATII und seiner Rezeptoren lag, zeigen die Beobachtungen dieser Arbeit, wie auch die in der Literatur (Hoffmann et al, 2017) beschriebenen Untersuchungen Effekte, die mit einer Signalkaskade allein nicht zu erklären sind. Deshalb sind Untersuchungen von weiteren Effektorproteinen neben ATII dringend erforderlich, um die offenen Fragen zu klären. Neben ATII als dem Haupteffektor des RAS existieren eine Reihe weiterer Angiotensine im lokalen RAS, die ebenfalls aus dem Vorläufer Angiotensinogen enzymatisch gespalten werden. Um den Nettoeffekt des gesamten RAS auf die Tumorangiogenese, gemessen an der VEGF-Expression, bei hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe ein AGT-Knockdown durchgeführt. Mit diesem Ansatz konnten in dieser Arbeit nun tatsächlich unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich von hormonrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomzellen gefunden werden, wie weiter unten aufgeführt wird.

Nach Durchführung wurde zunächst die Effizienz des Knockdowns geprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein komplettes Ausschalten des Gens nicht erreicht wurde. Es konnte lediglich eine signifikante, etwa dreißigprozentige Reduktion der AGT-Expression nachgewiesen werden. Dies ist in allererster Linie wahrscheinlich ein methodisches Problem. Trotzdem wurden die Ergebnisse ausgewertet,

um ein Gefühl dafür zu bekommen, ob bereits eine geringe Suppression des RAS einen Einfluss auf die VEGF-Expression haben könnte. Hierbei zeigte sich bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien zu frühen Zelllysezeitpunkten kein Unterschied zu den Kontrollen. Nach einer länger andauernden Reduktion der AGT-Expression und damit der Effektoren des RAS konnte ab 144 Stunden aber sogar ein signifikanter Rückgang der VEGF-Expression beobachtet werden. Divergent verhielten sich die hormonrezeptorpositiven Zelllinien. Sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene konnte in dieser Arbeit eine gesteigerte VEGF-Expression nachgewiesen werden. Hier zeigte sich also ein bisher bezüglich des RAS in der Literatur nicht beschriebener, deutlicher Unterschied der Regulation der VEGF-Expression zwischen hormonrezeptorpositiven und -negativen Zellen und das bereits bei einer lediglich dreißigprozentigen Suppression des RAS. Die Befunde lassen sich erklären, wenn neben der gut untersuchten ATII/AT_1-Rezeptor-Achse weitere Signalkaskaden des RAS in unterschiedlichem Maße in die Regulation der VEGF-Synthese bei hormonrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomen eingreifen. Eine Rolle hierbei könnte das Signalprotein des RAS Ang1-7 spielen. Durch mehrere Arbeiten an Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Ang1-7 zu einem langsameren Tumorwachstum (Menon et al., 2007) führt. Außerdem konnte in humanen Bronchialkarzinomzellen (Soto-Pantoja et al., 2009) durch Ang1-7 eine Hemmung der Tumorangiogenese erzielt werden. Diese antiproliferative und antiangiogene Wirkung von Ang1-7 wird unter anderem durch eine Suppression von VEGF bewirkt (Pei et al., 2016; Soto-Pantoja et al., 2009). Vor diesem Hintergrund kann man spekulieren, dass dieser Signalweg in den untersuchten Mammakarzinomzellen unterschiedlich stark eingreift. Durch die

erreichte Reduktion der Angiotensinogen-Expression verfügen möglicherweise hormonrezeptorpositive Zellen über weniger Ang1-7. Es wäre denkbar, dass bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen, die im Vergleich zu den hormonrezeptornegativen Karzinomen eine weniger aggressive Tumorangiogenese aufweisen, die hemmenden Signalkaskaden des RAS stärker ausgeprägt sind als bei den hormonrezeptornegativen Karzinomen. Daher würde eine Suppression der hemmenden Signalwege wie beispielsweise Ang1-7/Mas zu einer wie von uns beobachteten Steigerung der VEGF-Synthese in den hormonrezeptorpositiven Zelllinien führen. Umgekehrt würde in Karzinomen, in denen die die Angiogenese fördernden Signalwege überwiegen, die Suppression des AGT mit einem Abfall der VEGF-Synthese verbunden sein. Dieser Fall könnte für die hormonrezeptornegativen Zelllinien zutreffen, in denen wohl die antagonistische Wirkung des Ang1-7 eine geringere Bedeutung zu haben scheint. Dies könnte auch erklären, warum es bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomzellen bei ACE-Inhibition durch Captopril und gleichzeitiger Stimulation mit ATII zu einer leichten Steigerung der VEGF-Genexpression kommt und bei hormonrezeptornegativen Mammakarzinomzellen nicht. Unterstützt werden diese Überlegungen durch Untersuchungen von Gallagher et al. (2008). Diese Autoren konnten zeigen, dass ATII zu einer verringerten ACE2-Expression führt, sodass infolge dessen weniger Ang1-7 gebildet werden kann, was die VEGF-Expression supprimieren würde. Es kommt durch die Stimulation mit ATII also nicht nur zu einem Agonismus der ATII/AT_1-Rezeptor-Achse, sondern gleichzeitig zu einem Antagonismus der Ang1-7/Mas-Achse, was die hormonrezeptorpositiven Zellen gegenüber den

hormonrezeptornegativen Zellen hinsichtlich der VEGF-Expression begünstigt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Gewichtung der multiplen, über das RAS vermittelten Wirkungen zwischen den hormonrezeptorpositiven und den hormonrezeptornegativen Mammakarzinomzellen unterscheidet. So wäre es denkbar, dass das RAS bei den hormonrezeptorpositiven Zellen über die Ang1-7/Mas-Achse eher einen antiangiogenen Effekt vermittelt, der eine hohe intrinsische VEGF-Expressionsrate antagonisiert. Im Gegensatz dazu scheint das RAS bei den hormonrezeptornegativen Zelllinien vor allem über die ATII/AT_1-Rezeptor-Achse zu einer Steigerung einer intrinsisch geringeren VEGF-Expressionsrate und damit zu einer Steigerung der Angiogenese zu führen.

Abhängig vom Hormonrezeptorstatus scheint bei den Mammakarzinomen also eine unterschiedliche Gewichtung der beiden Angiotensinachsen vorzuliegen. Eine Beeinflussung dieses empfindlichen, durch die unterschiedlichen Enzymaktivitäten von ACE und ACE2 bedingten Gleichgewichts würde daher neue Therapieoptionen ermöglichen.

4.4. Schlussfolgerungen

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl hormonrezeptorpositive als auch -negative Mammakarzinomzellen durch ihre Expression von Komponenten des RAS die Voraussetzungen einer Regulation der Angiogenese durch das RAS erfüllen. Dies ermöglicht es daher, in therapeutischer Absicht in diese Regulation einzugreifen. Außerdem konnte die Hypothese

bestätigt werden, dass es nach Stimulation der Zellen mit ATII zu einer Steigerung der VEGF-Expression kommt und dass diese Wirkung durch den AT_1-Rezeptor vermittelt wird. Mammakarzinompatientinnen könnten daher von einer Hemmung der ATII/AT_1-Rezeptor-Achse, aufgrund der Möglichkeit der ACE-unabhängigen ATII-Bildung und den Ergebnissen der Stimulationsversuche entsprechend, bevorzugt per AT_1-Rezeptorblockade, profitieren. Chae et al. (2011) konnten bereits nachweisen, dass es bei Mammakarzinompatientinnen, die mit ACE-Inhibitoren oder AT_1-Rezeptorblocker behandelt werden, das Rezidivrisiko signifikant verringert ist.

Durch die Knockdown-Versuche ließen sich erstmalig Unterschiede zwischen den hormonrezeptorpositiven und -negativen Zellen finden.

Damit konnte die Hypothese auf molekularer Ebene bestätigt werden, dass sich die Regulation der Tumorangiogenese durch das RAS zwischen hormonrezeptorpositiven und hormonrezeptornegativen Karzinomen unterscheidet. Bei hormonrezeptornegativen Karzinomen steht dabei ein proangiogener Effekt vermutlich via der ATII/AT_1-Rezeptor-Achse im Vordergrund, bei hormonrezeptorpositiven Karzinomen eher ein antiangiogener Effekt, der vermutlich über die Ang1-7/Mas-Achse vermittelt wird. Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen könnten diesen Ergebnissen entsprechend daher auch von einer Stimulation dieser Ang1-7/Mas-Achse profitieren. In einer Phase-I- und Pharmakokinetikstudie von Petty et al. (2009) wurde dieser mögliche therapeutische Ansatz bereits an Patienten mit soliden Tumoren erprobt, wodurch eine Größenreduktion beziehungsweise -stabilisierung der Tumoren erreicht werden konnte.

Ausblickend sollte ein Ziel weiterer Untersuchungen sein, die Unterschiede in der Gewichtung dieser antagonistischen Angiotensin-Achsen weiter zu differenzieren. Mittels Untersuchung der Enzymkonzentration und -aktivität von ACE2 sowie durch die Messung der Verhältnisse der Konzentrationen von ATII und Ang1-7 mittels ELISA könnte versucht werden, Rückschlüsse auf die unterschiedliche Bedeutung dieser Angiotensin-Achsen je nach Hormonrezeptorstatus zu ziehen. Dadurch könnten die Erkenntnisse der Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems für die Tumorangiogenese beim Mammakarzinom und Möglichkeiten eines antiangiogenen Therapieansatzes als zusätzlicher Baustein in der multimodalen Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Neben seinen Funktionen bei der Regulation des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushalts besitzt das Renin-Angiotensin-System (RAS) große Bedeutung für die Angiogenese sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen und so auch beim Mammakarzinom. Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede in der Regulation der Tumorangiogenese zwischen hormonrezeptorpositiven und -negativen Mammakarzinomen zu identifizieren. Der erste Schritt dieser Untersuchungen an jeweils drei Hormonrezeptor(HR)-positiven und -negativen Zelllinien war daher der Nachweis der Expression der wichtigsten, am RAS beteiligten Gene für Angiotensinogen (AGT), Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), Angiotensin-Rezeptor-1 (AT_1R), -2 (AT_2R) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), was in allen untersuchten Zelllinien gelang. Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl HR-positive als auch -negative Mammakarzinome prinzipiell durch das RAS beeinflussbar sind. Anschließend wurde die Wirkung von intrinsischem Angiotensin II (ATII) auf die VEGF-Expression sowie der Effekt durch eine Hemmung beziehungsweise Blockade von ACE beziehungsweise der Angiotensin-Rezeptoren untersucht. Dies wurde dann nach Stimulation mit exogen zugefügtem ATII wiederholt. Die VEGF-Expression wurde dabei mittels Real-Time-PCR gemessen. Hierbei zeigte sich, dass es sowohl bei den HR-positiven als auch -negativen Zelllinien zu einem Rückgang der VEGF-Expression nach ACE-Inhibition kommt, was aber nur bei HR-positiven Zellen durch eine gleichzeitige Stimulation mit ATII rückgängig gemacht werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit ATII

bei allen untersuchten Zelllinien zu einer Steigerung der VEGF-Expression kommt und dieser Effekt über den AT_1R vermittelt wird, da die Expressionssteigerung durch eine AT_1R-Blockade verhindert werden kann. Die alleinige AT_2R-Blockade hatte keinen Einfluss auf die VEGF-Expression, bei gleichzeitiger ATII-Stimulation zeigte sich aber interessanterweise ein Rückgang der VEGF-Expression, was nahelegt, dass dieser immer noch nur ungenau definierte Rezeptortyp gegenüber dem AT_1R eine weder rein antagonistische noch agonistische Funktion erfüllt, sondern vielmehr bei gleichzeitiger Stimulation des AT_1R modulierende Wirkung haben könnte. Abschließend wurde die VEGF-Expression nach Reduktion der AGT-Expression mittels AGT-Knockdown untersucht. Hierbei zeigte sich bei den HR-negativen Zelllinien zuerst keine signifikante Veränderung der VEGF-Expression, nach 144 Stunden kam es jedoch zu einem Rückgang, was durch die reduzierte stimulierende Wirkung des RAS erklärbar wäre. Bei den HR-positiven Zelllinien konnte dagegen eine signifikante Steigerung der VEGF-Expression nach AGT-Suppression nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass bei diesen Karzinomzellen die endogene VEGF-Expression durch die antagonisierenden Signalwege, wie beispielsweise die Ang1-7/Mas-Achse, supprimiert wird und nach Wegfall dieser Suppression zum Tragen kommt. Es wird daher spekuliert, dass das RAS bei HR-positiven Zellen eher eine antiangiogene Wirkung über die Ang1-7/Mas-Achse bewirkt, bei HR-negativen Zellen eher proangiogene Wirkung über die ATII/AT_1-Rezeptor-Achse. Dies ergibt die potenzielle therapeutische Konsequenz, dass Patientinnen HR-negativer Mammakarzinome eher von einem Antagonismus der ATII/AT_1-Rezeptor-Achse profitieren würden, wogegen bei HR-positiven Karzinomen zusätzlich ein Agonismus der Ang1-7/Mas-Achse angestrebt werden müsste.

6. Literaturverzeichnis

1. Ager EI, Chong WW, Wen SW, Christophi C: Targeting the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in colorectal liver metastases. Cancer Cell International 10:19 (2010)
2. Ahmad S, Simmons T, Varagic J, Moniwa N, Chappell MC, Ferrario CM: Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. PloS one 6: e28501 (2011)
3. American Joint Committee on Cancer (AJCC). AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York: Springer; 2017
4. Badowska-Kozakiewicz AM, Patera J, Sobol M, Przybylski J: The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer - immunohistochemical evaluation of oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. Contemporary Oncology 19: 220-225 (2015)
5. Baish JW, Jain RK: Fractals and Cancer. Cancer Research 60: 3683-3688 (2000)
6. Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Weg-Remers S, Wittenberg K: Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Instituts (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, S. 74-77 (2015)
7. Chae YK, Valsecchi ME, Kim J, Bianchi AL, Khemasuwan D, Desai A, Tester W: Reduced risk of breast cancer recurrence in

patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins. Cancer Investigation 29: 585-593 (2011)

8. Chen X, Meng Q, Zhao Y, Liu M, Li D, Yang Y, Sun L, Sui G, Cai L, Dong X: Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit cell proliferation and angiogenesis in breast cancer. Cancer Letters 328: 318-324 (2013)
9. Childers WK: Interactions of the renin-angiotensin system in colorectal cancer and metastasis. International Journal of Colorectal Disease 30: 749-752 (2015)
10. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 162: 156-159 (1987)
11. Clere N, Corre I, Faure S, Guihot AL, Vessières E, Chalopin M, Morel A, Coqueret O, Hein L, Delneste Y, Paris F, Henrion D: Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. International Journal of Cancer 127: 2279-2291 (2010)
12. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E: Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 9815-9820 (1999)
13. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S: A novel angiotensin-converting enzyme-

related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circulation Research 87: E1-9 (2000)

14. Eliceiri BP, Cheresh DA: The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. The Journal of Clinical Investigation 103: 1227-1230 (1999)
15. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM: Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. The Oncologist 5: 11-15 (2000)
16. Escobar E, Rodríguez-Reyna TS, Arrieta O, Sotelo J: Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer. Current Vascular Pharmacology 2: 385-399 (2004)
17. Ferrario CM: New physiological concepts of the renin-angiotensin system from the investigation of precursors and products of angiotensin I metabolism. Hypertension 55: 445-452 (2010)
18. Folkman J: Clinical Applications of Research on Angiogenesis. The New England Journal of Medicine 333: 1757-1763 (1995)
19. Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PB, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL: Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. Pflugers Archiv: European Journal of Physiology 465: 25-37 (2013)
20. Froogh G, Pinto JT, Le Y, Kandhi S, Aleligne Y, Huang A, Sun D: Chymase-dependent production of angiotensin II: an old enzyme in old hearts. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 312: H223-H231 (2017)
21. Gale NW, Yancopoulos GD: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs,

angiopoietins, and ephrins in vascular development. Genes & Development 13: 1055-1066 (1999)

22. Gallagher PE, Ferrario CM, Tallant EA: Regulation of ACE2 in cardiac myocytes and fibroblasts. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology 295: H2373-2379 (2008)
23. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, Weaver DL, Winchester DJ, Hortobagyi GN: Breast Cancer - Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA: A Cancer Journal for Clinicians 67: 290-303 (2017)
24. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ: Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Annals of Oncology 22: 1736-1747 (2011)
25. González-Zuloeta Ladd AM, Arias Vásquez A, Sayed-Tabatabaei FA, Coebergh JW, Hofman A, Njajou O, Stricker B, van Duijn C: Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and breast cancer risk. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions 14: 2143-2146 (2005)
26. Greene AS, Amaral SL: Microvascular angiogenesis and the renin-angiotensin system. Current Hypertension Reports 4: 56-62 (2002)
27. Hegde SM, Kumar MN, Kavya K, Kumar KM, Nagesh R, Patil RH, Babu RL, Ramesh GT, Sharma SC: Interplay of nuclear receptors (ER, PR, and GR) and their steroid hormones in MCF-7 cells. Molecular and Cellular Biochemistry 422: 109-120 (2016)

28. Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C: Regulation of endothelial proliferation by the renin-angiotensin system in human umbilical vein endothelial cells. Reproduction 136: 125-130 (2008 a)
29. Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C: Potential role of Renin-Angiotensin-system for tumor angiogenesis in receptor negative breast cancer. Gynecologic Oncology 109: 418-425 (2008 b)
30. Hoffmann BR, Stodola TJ, Wagner JR, Didier DN, Exner EC, Lombard JH, Greene AS: Mechanisms of Mas1 Receptor-Mediated Signaling in the Vascular Endothelium. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 37: 433-445 (2017)
31. Imai N, Hashimoto T, Kihara M, Yoshida S, Kawana I, Yazawa T, Kitamura H, Umemura S: Roles for host and tumor angiotensin II type 1 receptor in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. Laboratory Investigation 87: 189-198 (2007)
32. Jethon A, Pula B, Piotrowska A, Wojnar A, Rys J, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M: Angiotensin II type 1 receptor (AT-1R) expression correlates with VEGF-A and VEGF-D expression in invasive ductal breast cancer. Pathology Oncology Research 18: 867-873 (2012)
33. Katalinic A, Pritzkuleit R, Waldmann A: Recent Trends in Breast Cancer Incidence and Mortality in Germany. Breast Care (Basel) 4: 75-80 (2009)
34. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H: Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide:

control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. Blood 95: 189-197 (2000)

35. Klagsbrun M, D'Amore PA: Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Reviews 7: 259-270 (1996)
36. Koh WP, Yuan JM, Sun CL, van den Berg D, Seow A, Lee HP, Yu MC: Angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene polymorphism and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. Cancer Research 63: 573-578 (2003)
37. Kosugi M, Miyajima A, Kikuchi E, Horiguchi Y, Murai M: Angiotensin II type 1 receptor antagonist candesartan as an angiogenic inhibitor in a xenograft model of bladder cancer. Clinical Cancer Research 12: 2888-2893 (2006)
38. Lambert DW, Clarke NE, Turner AJ: Not just angiotensinases: new roles for the angiotensin-converting enzymes. Cellular and Molecular Life Sciences 67: 89-98 (2010)
39. Liu Q, Zhang H, Jiang X, Qian C, Liu Z, Luo D: Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to "seed and soil" hypothesis. Molecular Cancer 16: 176 (2017)
40. Machado RD, Santos RA, Andrade SP: Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. Life Sciences 66: 67-76 (2000)
41. Mateos L, Perez-Alvarez MJ, Wandosell F: Angiotensin II type-2 receptor stimulation induces neuronal VEGF synthesis after cerebral ischemia. Biochimica et Biophysica Acta 1862: 1297-1308 (2016)
42. Mehta PK, Griendling KK: Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. American Journal of Physiology. Cell Physiology. 292: C82-C97 (2007)

43. Menon J, Soto-Pantoja DR, Callahan MF, Cline JM, Ferrario CM, Tallant EA, Gallagher PE: Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. Cancer Research 67: 2809-2815 (2007)
44. Miyajima A, Kikuchi E, Kosaka T, Oya M: Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist as an Angiogenic Inhibitor in Urogenital Cancer. Reviews on Recent Clinical Trials. 4: 75-78 (2009)
45. Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, Majima M: Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model. The Journal of Biological Chemistry 275: 5545-5552 (2000)
46. Nagata S, Kato J, Sasaki K, Minamino N, Eto T, Kitamura K: Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. Biochemical and Biophysical Research Communications 350: 1026-1031 (2006)
47. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. Journal of Clinical Oncology 18: 1135-1149 (2000)
48. Nie W, Yan H, Li S, Zhang Y, Yu F, Zhu W, Fan F, Zhu J: Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. Molecular Immunology 46: 355-361 (2009)
49. Noguchi R1, Yoshiji H, Ikenaka Y, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Yoshii J, Yanase K, Yamazaki M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Fukui H: Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine

pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities. Oncology Reports 22: 355-360 (2009)

50. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN: Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. Clinical Medicine & Research 7: 4-13 (2009)
51. Pei N, Mao Y, Wan P, Chen X, Li A, Chen H, Li J, Wan R, Zhang Y, Du H, Chen B, Jiang G, Xia M, Sumners C, Hu G, Gu D, Li H: Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer. Journal of experimental and clinical cancer research 36:77 (2017)
52. Pei N, Wan R, Chen X, Li A, Zhang Y, Li J, Du H, Chen B, Wei W, Qi Y, Zhang Y, Katovich MJ, Sumners C, Zheng H, Li H: Angiotensin-(1-7) Decreases Cell Growth and Angiogenesis of Human Nasopharyngeal Carcinoma Xenografts. Molecular Cancer Therapeutics 15: 37-47 (2016)
53. Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM: Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. Clinical Cancer Research 15: 7398-7404 (2009)
54. Prosser HC, Forster ME, Richards AM, Pemberton CJ: Cardiac chymase converts rat proAngiotensin-12 (PA12) to angiotensin II: effects of PA12 upon cardiac haemodynamics. Cardiovascular Research 82: 40-50 (2009)
55. Ptasińska-Wnuk D, Lawnicka H, Fryczak J, Kunert-Radek J, Pawlikowski M: Angiotensin peptides regulate angiogenic activity in rat anterior pituitary tumour cell cultures. Endokrynologia Polska 58: 478-486 (2007)

56. Regulska K, Stanisz B, Regulski M: The renin-angiotensin system as a target of novel anticancer therapy. Current Pharmaceutical Design 19: 7103-7125 (2013)
57. Ribatti D: The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. British Journal of Haematology 128: 303-309 (2005)
58. Robert Koch-Institus, Krebsregisterdaten, Stand 03.11.2016, http://www.krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/datenbankabfrage_stufe2_form.html (23.03.2017)
59. Rhodes DR, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Kalyana-Sundaram S, Lonigro RJ, Helgeson BE, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Hayes DF, Lucas PC, Varambally S, Chinnaiyan AM: AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 10284-10289 (2009)
60. Sa-Nguanraksa D, Chuangsuwanich T, Pongpruttipan T, O-Charoenrat P: High vascular endothelial growth factor gene expression predicts poor outcome in patients with non-luminal A breast cancer. Molecular and Clinical Oncology 3: 1103-1108 (2015)
61. Senchukova M, Kiselevsky MV: The "cavitary" type of angiogenesis by gastric cancer. Morphological characteristics and prognostic value. Journal of Cancer 5: 311-319 (2014)
62. Senchukova MA, Nikitenko NV, Tomchuk ON, Zaitsev NV, Stadnikov AA: Different types of tumor vessels in breast cancer: morphology and clinical value. SpringerPlus 4:512 (2015)
63. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor

that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983-985 (1983)

64. Soto-Pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, Tallant EA: Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. Molecular Cancer Therapeutics 8: 1676-1683 (2009)
65. Soto-Pantoja DR, Petty W, Gallagher PE, Tallant EA: Angiotensin-(1-7) inhibits triple negative tumor growth through the inhibition of angiogenesis and a reduction in placental growth factor PlGF. Cancer Research 69, S. 901 (2009)
66. Suganuma T, Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, Kikkawa F: Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. Clinical Cancer Research 11: 2686-2694 (2005)
67. Surakasula A, Nagarjunapu GC, Raghavaiah KV: A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management. Journal of Research in Pharmacy Practice 3: 12-18 (2014)
68. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87: 1171-1180 (1996)
69. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD: Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. Science 282: 468-471 (1998)

70. Suzuki H, Watabe T, Kato M, Miyazawa K, Miyazono K: Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. Blood 105: 2372-2379 (2005)
71. Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Kimura M, Ohuchi N, Sasano H: In situ production of estrogens in human breast carcinoma. Breast cancer 9: 296-302 (2002)
72. Tahmasebi M, Barker S, Puddefoot JR, Vinson GP: Localisation of renin-angiotensin system (RAS) components in breast. British Journal of Cancer 95: 67-74 (2006)
73. Tallant EA, Clark MA: Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). Hypertension 42: 574-579 (2003)
74. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Research 60: 203-212 (2000)
75. Wzgarda A, Kleszcz R, Prokop M, Regulska K, Regulski M, Paluszczak J, Stanisz BJ: Unknown face of known drugs - what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors? European Journal of Pharmacology 15: 9-19 (2017)
76. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S: Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 408: 92-96 (2000)
77. Yanai A, Miyagawa Y, Murase K, Imamura M, Yagi T, Ichii S, Takatsuka Y, Ito T, Hirota S, Sasa M, Karagiri T, Miyoshi Y: Influence of body mass index on clinicopathological factors including estrogen receptor, progesterone receptor, and Ki67

expression levels in breast cancers. International Journal of Clinical Oncology 19: 467-472 (2014)

78. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, Humphreys K, Darabi H, Liu J, Van 't Veer LJ, van Leeuwen FE, Andrulis IL, Glendon G, Knight JA, Mulligan AM, O'Malley FP, Weerasooriya N, John EM, Beckmann MW, Hartmann A, Weihbrecht SB, Wachter DL, Jud SM, Loehberg CR, Baglietto L, English DR, Giles GG, McLean CA, Severi G, Lambrechts D, Vandorpe T, Weltens C, Paridaens R, Smeets A, Neven P, Wildiers H, Wang X, Olson JE, Cafourek V, Fredericksen Z, Kosel M, Vachon C, Cramp HE, Connley D, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MW, Dörk T, Bremer M, Meyer A, Karstens JH, Ay A, Park-Simon TW, Hillemanns P, Arias Pérez JI, Menéndez Rodríguez P, Zamora P, Benítez J, Ko YD, Fischer HP, Hamann U, Pesch B, Brüning T, Justenhoven C, Brauch H, Eccles DM, Tapper WJ, Gerty SM, Sawyer EJ, Tomlinson IP, Jones A, Kerin M, Miller N, McInerney N, Anton-Culver H, Ziogas A, Shen CY, Hsiung CN, Wu PE, Yang SL, Yu JC, Chen ST, Hsu GC, Haiman CA, Henderson BE, Le Marchand L, Kolonel LN, Lindblom A, Margolin S, Jakubowska A, Lubiński J, Huzarski T, Byrski T, Górski B, Gronwald J, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AM, Jager A, Kriege M, Tilanus-Linthorst MM, Collée M, Wang-Gohrke S, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Mononen K, Grip M, Hirvikoski P, Winqvist R, Mannermaa A, Kosma VM, Kauppinen J, Kataja V,

Auvinen P, Soini Y, Sironen R, Bojesen SE, Ørsted DD, Kaur-Knudsen D, Flyger H, Nordestgaard BG, Holland H, Chenevix-Trench G, Manoukian S, Barile M, Radice P, Hankinson SE, Hunter DJ, Tamimi R, Sangrajrang S, Brennan P, McKay J, Odefrey F, Gaborieau V, Devilee P, Huijts PE, Tollenaar RA, Seynaeve C, Dite GS, Apicella C, Hopper JL, Hammet F, Tsimiklis H, Smith LD, Southey MC, Humphreys MK, Easton D, Pharoah P, Sherman ME, Garcia-Closas M: Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Assoctiation Consortium Studies. Journal of the National Cancer Institute 103: 250-263 (2011)

79. Yeung C, Hilton J, Clemons M, Mazzarello S, Hutton B, Haggar F, Addison CL, Kuchuk I, Zhu X, Gelmon K, Arnaout A: Estrogen, progesterone, and HER2/neu receptor discordance between primary and metastatic breast tumours - a review. Cancer metastasis reviews 35: 427-437 (2016)
80. Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. Journal of the American College of Cardiology 49: 1015-1026 (2007)
81. Zhou L, Luo Y, Sato S, Tanabe E, Kitayoshi M, Fujiwara R, Sasaki T, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H: Role of two types of angiotensin II receptors in colorectal carcinoma progression. Pathobiology 81: 169-175 (2014)

Anhang:

Tabelle 1:

TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung:

T-Klassifikation	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ Tis (DCIS): Duktales Carcinoma in situ Tis (LCIS): Lobuläres Carcinoma in situ Tis (Paget): M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor (M. Paget kombiniert mit nachweisbarem Karzinom wird entsprechend der Größe und Charakteristika der Erkrankung im Brustdrüsenparenchym klassifiziert)
T1	Tumor maximal 2 cm im größten Durchmesser T1mic: Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser T1a: größer 0,1 cm bis maximal 0,5 cm im größten Durchmesser T1b: größer 0,5 cm bis maximal 1 cm im größten Durchmesser T1c: größer 1 cm bis maximal 2 cm im größten Durchmesser
T2	Tumor größer als 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
T3	Tumor größer als 5 cm im größten Durchmesser
T4	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut, wie beschrieben T4a-T4d

	T4a: Befall der Thoraxwand (Rippen, Interkostalmuskulatur, vorderer Serratusmuskel, jedoch nicht die Pektoralismuskulatur) T4b: Ödem (einschließlich „peau d'orange"), Ulzeration der Haut oder Satellitenknoten der Haut der gleichen Brust T4c: Vorliegen von T4a und T4b T4d: Inflammatorisches Karzinom

N-Klassifikation	
NX	regionären Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknoten
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an anderen Strukturen fixiert oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen N2a: Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert N2b: Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Abwesenheit klinisch erkennbarer axillärer Lymphknotenmetastasen
N3	Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten (Level III) mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten des Level I und II oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen des Level I und II oder

	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten mit oder ohne Beteiligung der axillären Lymphknoten oder der Lymphknoten entlang der A. mammaria interna N3a: Metastase(n) in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten N3b: Metastase(n) in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna in Anwesenheit axillärer Lymphknotenmetastasen N3c: Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

pN-Klassifikation	
pNX	keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in 1–3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna pN1a: 1-3 axilläre Lymphknotenmetastasen, mindestens eine > 2 mm pN1b: Mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar pN1c: pN1a und pN1b
pN2	Metastasen in 4–9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Metastasen pN2a: Metastasen in 4–9 axillären Lymphknoten, darunter mindestens eine > 2 mm

	pN2b: Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen wie nachfolgend beschrieben: pN3a: Metastasen in ≥ 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten pN3b: Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 2 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinel-Lymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar pN3c: Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

M-Klassifikation	
M0	keine Fernmetastase(n)
M1	Fernmetastase(n)

Danksagung

Zuallererst gilt mein Dank meiner Doktormutter und Leiterin der AG Angiogenese Frau Prof. Dr. Christine Wulff für die Betreuung der vorliegenden Doktorarbeit, ihre große Unterstützung und sehr geduldige Begleitung der Arbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Daniel Herr.

Für die gute Einarbeitung und Betreuung im Labor gilt mein Dank dem Team der AG Angiogenese, Regina Sauter, Nadine Gebhard, Tanja Köhler und ganz besonders Iris Holzheu, die mir mit Rat und unermüdliche Motivation stets weitergeholfen hat.

Außerdem danke ich PD Thomas Friedl für die Unterstützung und Beratung in Fragen der Statistik.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau, die mich während der gesamten Entstehung dieser Dissertation unterstützt und zu deren Gelingen maßgeblich beigetragen hat.

Lebenslauf

Christof Johannes Sauer

Berufserfahrung:	**Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen (11/2013 bis dato)** Assistenzarzt in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Ausbildung:	**Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen (11/2013 bis dato)** Facharztausbildung Kinder- und Jugendmedizin
	Universität Freiburg (08/2012 bis 11/2013) 2. Staatsexamen (11/2013)
	Schwarzwald-Baar Klinikum Villingen-Schwenningen (08/2012 bis 07/2013) Praktisches Jahr
	Universität Ulm (10/2007 bis 07/2012) 1. Staatsexamen (07/2009)

Promotion: **AG Angiogenese, Universität Ulm**

Untersuchungen zur Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems für die Tumorangiogenese beim Mammakarzinom