

**Aus der Klinik für Strahlentherapie
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. Jürgen Dunst

in Zusammenarbeit

**mit dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann

**„*In vitro* Charakterisierung des Zusammenspiels der Hypoxie-
Induzierbaren-Faktoren und der Östrogenrezeptoren beim
Mammakarzinom“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Medizin

vorgelegt von

Matthias Holger Wolff

aus Lübeck

Lübeck 2013

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Dunst
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Habermann PhD
 3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2014

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.11.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Risikofaktoren	1
1.1.3 Klassifikation	3
1.1.4 Therapie.....	5
1.1.5 Endokrine Therapie und Rezeptorstatus	7
1.2 Hormonrezeptoren	8
1.2.1 Östrogenrezeptoren	8
1.2.2 Progesteronrezeptoren.....	11
1.3 Tamoxifen	11
1.4 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare-Faktoren	12
1.4.1 Sauerstoff und Hypoxie	12
1.4.2 Die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren	13
1.4.3 Chemische HIF-Stabilisatoren.....	16
1.4.4 Hypoxie-assoziierte Gene	16
1.4.5 HIF und Tumorigenese.....	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material und Geräte.....	20
2.2 Zellbiologische und bioanalytische Methoden	27
2.2.1 Zelllinien	27
2.2.2 Zellkultivierung	29
2.2.3 Zellzahlbestimmung	30
2.2.4 Versuchsaufbau	30

2.2.5 Herstellung von Gesamtzelllysaten	31
2.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.2.7 MTT-Assay.....	32
2.2.8 Transfektion mit siRNA.....	33
2.2.9 Western-Blot	33
2.2.10 Densitometrie	34
2.2.11 Isolation von RNA und Umwandlung in cDNA	34
2.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	35
2.3 Statistische Auswertungen	35
3. Ergebnisse	36
3.1 MTT-Vitalitätsassay.....	36
3.2 Östrogenrezeptorexpression unter Hypoxie und der Zusammenhang mit den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren	37
3.3 Die Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Expression unter Hypoxie und der Einfluss der Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren.....	45
4. Diskussion	54
4.1. Das Verhalten der Östrogenrezeptoren unter Hypoxie	54
4.2 Der Einfluss von Hypoxie und den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren auf die Regulation des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	60
4.3 Das Zusammenspiel des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator und der Östrogenrezeptoren bei Brustkrebs	65
4.4 Resümee und Ausblick.....	66
5. Zusammenfassung	68
6 Literaturverzeichnis	70
7. Danksagung	90
8. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	91
9. Lebenslauf (Kurzfassung)	92
10. Erklärung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	- Abbildung
ACR4	- Klassifikation des American College of Radiology (dichtes Gewebe)
AhR	- Aryl Hydrocarbon Receptor
AMP / ATP	- Adenosin Mono- / Tri-Phosphat
ANG	- Angiopoietin
ARNT	- Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BET	- Brusterhaltende Therapie
bFGF	- Basic Fibroblast Growth Factor
bHLH-PAS	- Basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim
CAD	- C-terminale Transaktivierungsdomäne
cAMP	- Cyclic Adenosinmonophosphat
CBP	- cAMP Response Element Binding Protein
cDNA	- Complementary Deoxyribonucleic Acid
CO	- Kohlenstoffmonoxid
CoCl ₂	- Cobalt(II)-Chlorid
COX	- Cyclooxygenase
CREB2	- cAMP Response Element Binding Protein 2
CTAD	- C-terminale transaktivierende Domäne
CXCR4	- CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CYP	- Cytochrom P450
DCIS	- Ductales Carcinoma in Situ
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMOG	- Dimethyloxalylglycin
DNA	- Deoxyribonucleic Acid
dNTP	- Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECL	- Enhanced Chemiluminescence Substrate
EPAS1	- Endothelial PAS Domain-containing Protein 1
EPO	- Erythropoietin
ER	- Estrogen Receptor, Östrogenrezeptor
ERE	- Estrogen Response Element
ERR	- Estrogen Related Rezeptor
FCS / FKS	- Fetales Kälberserum

Fe(II)	- zweiwertiges Eisen
FGF	- Fibroblast Growth Factor
FIH	- Factor Inhibiting HIF
g	- Gramm
GLUT	- Glukosetransporter
GnRH	- Gonadotropin Releasing Hormon
H / Hox	- Hypoxie
h	- Stunde(n)
Hb	- Hämoglobin
HER	- Human Epidermal Growth Factor Receptor
HIF	- Hypoxia-Inducible-Factor
HRE	- Hypoxia Response Element
Hsp90	- Heat Shock Protein 90
IGF	- Insulin Like Growth Factor
IL	- Interleukin
iNOS	- induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K	- Kontrolle
KCL	- Kaliumchlorid
kDa	- kiloDalton
LCIS	- Lobuläres Carcinoma In Situ
LDHA	- Laktat-Dehydrogenase A
LOX	- Lipoxygenase
lt	- Long Term
m	- Anzahl einzelner Versuchsproben
MAPK	- Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	- Minute(n)
ml	- Milliliter
mmHg	- Millimeter-Quecksilbersäule
mRNA	- Messenger Ribonucleic Acid
mTOR	- Mammalian Target of Rapamycin
MTT	- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	- Mittelwert
n	- Anzahl wiederholter Versuche
NaCl	- Natriumchlorid
NAD	- N-terminale Transaktivierungsdomäne

NADPH	- Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	- Nuclear Factor Kappa B
nm	- Nanometer
NO	- Stickstoffmonoxid
Nox	- Normoxie
O ₂	- Sauerstoff
ODDD	- Oxygen Dependent Degradation Domain
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PDGF-B	- Platelet Derived Growth Factor B
Pen / Strep	- Penicillin / Streptomycin
PHD	- Prolyl-Hydroxylase-Domain enzymes
PI3K	- Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	- Proteinkinase C
pmol	- pikomol
pO ₂	- Sauerstoffpartialdruck
PR	- Progesteronrezeptor
pVHL	- Protein-von-Hippel-Lindau
qRT-PCR	- Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RNA	- Ribonucleic Acid
ROS	- Reactive Oxygen Species
RT-PCR	- Real Time Polymerase Chain Reaction
rpm	- Rounds per Minute
SD	- Standard Deviation
SDS-PAGE	- Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERD	- Selektive Estrogen Receptor Downregulator
SERM	- Selektive Estrogen Receptor Modulator
siRNA	- Small Interfering Ribonucleic Acid
Tab.	- Tabelle
Tam	- Tamoxifen
TEMED	- Tetramethylethylenediamin
TGF	- Transforming Growth Factor
TNFα	- Tumor Nekrose Faktor alpha
VEGF	- Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	- zum Beispiel
µg / µl / µM	- Mikrogramm / Mikroliter / mikromolar

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Tamoxifen.....	11
Abbildung 2: Domänenstruktur der Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der HIF-Regulation am Beispiel von HIF-1 α	15
Abbildung 4: Strukturformel von Dimethyloxallylglycin.....	16
Abbildung 5: Ausgewählte HIF-regulierte Gene im Hinblick auf Tumorigenese..	17
Abbildung 6: MTT-Vitalitätsassays von MCF-7 Zellen unter 1%iger Hypoxie....	36
Abbildung 7: Western-Blot Analyse der ER- α und ER- β -Proteinexpression in MCF-7 Zellen.....	37
Abbildung 8: Western-Blot Analyse der ER- α und ER- β -Proteinexpression in T47D Gesamtzelllysaten.....	38
Abbildung 9: Western-Blot Analyse der ER- α und ER- β -Proteinlevel in MCF-7, HeLa, MD-A-MB-231, MX-1, SK-BR-3 und T47D Gesamtzelllysaten.....	39
Abbildung 10: Quantitative RT-PCR von ER- α und ER- β -mRNA-Konzentrationen in MCF-7, HeLa, MD-A-MB-231, MX-1 und T47D Zellen.....	40
Abbildung 11: Western-Blot Analyse der ER-Proteinkonzentrationen in MCF-7 und T47D Gesamtzelllysaten nach HIF-1 α -Knock-down.....	42
Abbildung 12: Western-Blot Analyse der ER- α , ER- β , HIF-1 α und HIF-2 α - Proteinexpression in MCF-7lt Gesamtzelllysaten.....	43
Abbildung 13: MTT-Vitalitätsassays von MCF-7lt Zellen unter Behandlung mit Tamoxifen.....	44
Abbildung 14: Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinexpression in MCF-7 Gesamtzelllysaten.....	46
Abbildung 15: Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinexpression in MCF-7 Gesamtzelllysaten.....	47

Abbildung 16: Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinlevel in MCF-7, HeLa, Hep3B und REPC Gesamtzelllysaten.....	48
Abbildung 17: Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinleveln in MCF-7, HeLa, Cos7, HepG2, Hep3B, REPC und Kelly Gesamtzelllysaten.....	49
Abbildung 18: Quantitative RT-PCR von ARNT-mRNA-Konzentrationen in MCF-7, HeLa, REPC und Hep3B Zellen.....	51
Abbildung 19: -Blot Analyse der ARNT-Proteinkonzentrationen in MCF-7, T47D, Hep3B Gesamtzelllysaten nach HIF-1 α -Knock-down.....	53
Tabelle 1: Risikofaktoren und relatives Risiko für eine Brustkrebsentstehung, modifiziert nach den Stufe-3 Leitlinien Brustkrebs.....	2
Tabelle 2: Einteilung der Hypoxien.....	13

1. Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der menschlichen Brust und der häufigste maligne Tumor der Frau weltweit [1]. In Deutschland liegt die Inzidenz bei ungefähr 72000 pro 82 Millionen Einwohner pro Jahr. Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt 1:100. Jede 8. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Die Mortalität in Deutschland beträgt zurzeit etwa 41 pro 100000 Frauen pro Jahr. Das Mammakarzinom ist laut Statistischem Bundesamt die Haupttodesursache bei Frauen zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Während die Inzidenz auf Grund der verbesserten Diagnostik, des 2005 eingeführten Mammographiescreenings und der stetig wachsenden Lebenserwartung steigt, nimmt gleichzeitig die Mortalität dank verbesserter therapeutischer Maßnahmen ab [2,3].

1.1.2 Risikofaktoren

Neben dem stetig mit höherem Alter steigenden Risiko an Krebs zu erkranken, gibt es Risikofaktoren, die zur Onkogenese beitragen.

Als Risikofaktoren sind beim Mammakarzinom wie auch bei anderen Krebsarten allgemeine, die Krebsentstehung fördernde Ursachen, sogenannte Kanzerogene, zu nennen. Zu diesen gehören z.B.: Rauchen, Alkohol, Adipositas, vermehrte Exposition mit ionisierender Strahlung, Umweltgifte etc. [4]

Im Gegensatz zu den allgemeinen Kanzerogenen gibt es brustkrebsspezifische Risikofaktoren. Etwa 5% der Mammakarzinome sind genetisch vererbt [5]. Dabei bedingen die Mutationen eine gesteigerte Suszeptibilität. Die wichtigsten Mutationen sind die der Breast-Cancer-Gene BRCA1 und BRCA2. Trägerinnen des mutierten BRCA1 haben eine Wahrscheinlichkeit von 65 % im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken, Trägerinnen des mutierten BRCA2 etwa 45% [6]. 2010 konnte eine dritte entscheidende Genmutation, RAD51C, bestimmt werden. Keimzellmutationen des RAD51C Gens sind hochpenetrant in ihrer Vererbung [7]. Frauen, die eine oder mehrere dieser Mutationen aufweisen,

1. Einleitung

zählen zur Hochrisiko-Gruppe und bedürfen besonderer gynäkologischer Aufmerksamkeit. Sie kommen für prophylaktische Interventionen zur Senkung der Mortalität in Frage [8]. Hier können Tamoxifen, Raloxifen oder Aromatasehemmer präventiv gegeben werden.

Das Brustdrüsengewebe wird stark durch Östrogene und Gestagene, die weiblichen Sexualhormone, in ihrem Wachstum beeinflusst. Demzufolge sind proliferationsfördernde Veränderungen des Hormonhaushaltes ein Risiko [9,10].

Risikofaktor	Relatives Risiko	Literatur
Menarche vor dem 11. Lebensjahr	3	Talamini et al. 1996 Vogel et al. 1996 Tavani et al. 1999
Menopause nach dem 54. Lebensjahr	2	Peer et al. 1993
Erste Entbindung nach dem 40. Lebensjahr	3	Layde et al. 1989 Ramon et al. 1996 McGredie et al. 1998
Familiäre Belastung: Hochrisiko-Gruppe Verwandte ersten Grades	4-10 2	Colditz et al. 1993 Lancaster et al. 1997
Vorangegangene benigne Erkrankungen der Brust	1,5-2	London et al. 1992 Dupont et al. 1993 Yabro et al. 1999
Atypische duktale Hyperplasie	4	Dupont et al. 1993 Yabro et al. 1999
Prämenopausales DCIS	5	London et al. 1992 Yabro et al. 1999
Kontralaterales Mammakarzinom	2-6	Adami et al. 1986
BMI >30 prämenopausal	0,7	Franceschi et al. 1996 Hunt et al. 2000
BMI >30 postmenopausal	2	Franceschi et al. 1996 Hunt et al. 2000
Morbus Hodgkin	10	Guibout et al. 2005 Travis et al. 2005
Krebserkrankung als Kind	20	Kaste et al. 1998
Hormontherapie in der Postmenopause	3-4	Chen et al. 2002
Gewebsdichte postmenopausal ACR4	5	Speroff et al. 2002 Ziv et al. 2003

Tab. 1 Risikofaktoren und relatives Risiko für eine Brustkrebsentstehung, modifiziert nach den Stufe-3 Leitlinien Brustkrebs [11]

Ob hormonelle Kontrazeption ein Risiko darstellt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Studien zur Folge ist das Risiko substanz- und dosisabhängig und weniger hoch als noch vor einigen Jahren angenommen. In der Literatur wird das relative Risiko mit 1-1,5 angegeben [12–15].

In unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass Linkshänderinnen ein erheblich höheres Brustkrebsrisiko aufweisen als Rechtshänderinnen [16–18]. Ein Erklärungsversuch könnte eine intrauterin hohe Sexualhormonkonzentration sein, die wiederum verantwortlich für die Händigkeit und dichtes Brustdrüsengewebe sein könnte.

1.1.3 Klassifikation

Histopathologisch (WHO, 2003 [19])

nicht-invasives Karzinom

- Carcinoma ductale in situ (DCIS)
- Carcinoma lobulare in situ (LCIS) und atypische lobuläre Hyperplasie
- seltene, atypische und gemischte Formen / Vorläufer-Läsionen

invasives Karzinom

- invasives duktales Karzinom (IDC) / Adenokarzinom (inkl. Unterformen)
- invasives lobuläres Karzinom (ILC)
- medulläres Karzinom
- tubuläres Karzinom (ITC)
- muzinöses Karzinom
- invasives papilläres Karzinom
- adenoid-zystisches Karzinom
- juvenil-sekretorisches Karzinom
- apokrines Karzinom
- metaplastisches Karzinom
- seltene, atypische und gemischte Formen

Sonderformen:

- Pagetkarzinom der Mamille
- inflammatorisches Karzinom

1. Einleitung

mesenchymale Tumore

fibroepitheliale Tumore

maligne Lymphome der Brust

Tumore der männlichen Brust

Metastasen

Die invasiven Karzinome machen mit ca. 80% den größeren Anteil gegenüber den nicht-invasiven Karzinomen (~20%) aus. Die nicht-invasiven Karzinome müssen jedoch als Risikofaktoren/Vorläuferläsionen der invasiven Karzinome angesehen werden [20,21]. Mit etwa 75% ist das Adenokarzinom, auch invasives ductales Karzinom (IDC) genannt, die häufigste Entität des invasiven Mammakarzinoms. Das invasive lobuläre Karzinom (ILC) ist mit ca. 15% die 2. häufigste Entität. Weniger als 10% entfallen auf die selteneren Formen (in absteigender Häufigkeit): medulläres Karzinom, tubuläres Karzinom, muzinöses Karzinom, invasiv papilläres Karzinom, adenoid-zystisches Karzinom, juvenil-sekretorisches Karzinom, apokrines Karzinom, metaplastisches Karzinom, gemischte und sehr seltene Formen [19,22]. Es handelt sich bei diesen Formen um epitheliale Tumore des Brustdrüsenparenchyms, die den Hauptanteil der Mammakarzinome ausmachen und die in dieser Arbeit stellvertretend am Zellmodel untersucht werden.

Immunhistochemisches Genexpressionsprofil [23]

- luminal A (ER- α + und/oder PR+, HER2-)
- luminal B (ER- α + und/oder PR+, HER2+)
- basal-like (ER-, PR-, HER2-, cytokeratin 5/6+, und/oder HER1+)
- HER2+/ER- (ER-, PR- und HER2+)
- unklassifizierbar (alle Marker negativ)

Grading

Histopathologisch wird der Differenzierungsgrad der Zellen nach Bloom und Richardsen, modifiziert nach Elston und Ellis (Nottingham-Klassifikation), beschrieben. Hierbei werden die mikroskopische Kernmorphologie, die tubulär-drüsige Ausdifferenzierung im Zellverband und die Mitoserate beurteilt und der Wert einem Grad zugeordnet. Die Prognose korreliert eng mit dem Grad der Klassifikation und somit mit der Enddifferenzierung der Zellen (G1-G3) [24–26].

Staging

Für das Staging von Krebs hat sich weltweit die TNM-Klassifikation durchgesetzt. Sie setzt sich zusammen aus der Tumorgröße (T), dem Ausmaß des Befalls der Lymphknoten (N) und der Metastasierung (M), wobei für jede Krebsart spezifische Grenzwerte existieren [27].

Auf der Grundlage der TNM Klassifikation kann eine weitere Stadieneinteilung in I bis IV stattfinden [27].

Vor allem für die Therapie des Mammakarzinoms ist die Einteilung nach der St. Gallen Consensus Conference von 2007 von Bedeutung. Diese Einteilung berücksichtigt den Hormonrezeptorstatus (ER und PR), der für die Therapie und die Prognose des Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle spielt [28].

1.1.4 Therapie

Die Therapiestrategie des Mammakarzinoms sollte immer multidisziplinär und individuell je nach Alter, Geschlecht, Begleiterkrankungen, Art des Tumors, Größe und Metastasen erstellt werden [28,29].

Die Therapie setzt sich aus 3 großen Säulen zusammen:

- chirurgische Entfernung des Tumorgewebes und der Lymphknoten
- Strahlentherapie
- medikamentöse Behandlung

Die medikamentösen Therapiemöglichkeiten setzen sich ihrerseits aus 3 Hauptgruppen zusammen:

- antihormonelle Therapie
- Chemotherapie
- gezielte Therapie (Targeted Therapy)

Zusätzlich können Bisphosphonate hilfreich sein. Schmerzen müssen mit einer adäquaten Schmerztherapie behandelt werden.

Da es sich im Frühstadium des Mammakarzinoms um eine lokalbegrenzte Erkrankung handelt, kann durch eine operative Entfernung des entarteten Gewebes eine Heilung erzielt werden. Auch bei fortgeschrittenem Stadium kann in

Einzelfällen die Tumormassereduktion die Überlebenszeit verlängern, dies ist aber individuell abzuwägen, insbesondere gegen eine mögliche lokale Strahlentherapie. Als operatives Vorgehen der Wahl kommt heute in etwa 60-70% der Fälle die Brusterhaltende Therapie (BET) zum Einsatz, die sich aus einer vollständigen Entfernung des Tumorgewebes (R0-Resektion) und anschließender Bestrahlung der gesamten Brust oder des Operationsfeldes zusammensetzt. Die Frage der optimalen Behandlung der axillären Lymphknoten (Wächter-Lymphknoten-Entfernung, ggf. weitere operative Therapie oder Strahlentherapie) ist gegenwärtig Stand von Diskussionen. Die BET steht der Mastektomie (Ablatio) gegenüber [29–33].

Durch die adjuvante Radiotherapie konnte bei der BET das Rezidivrisiko gesenkt werden und so eine Alternative zur Mastektomie entstehen [34–36]. Auch bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3, T4) und Mastektomie ist eine adjuvante Strahlentherapie sinnvoll, um das hohe Rezidivrisiko zu senken [37]. Ebenfalls kann eine Bestrahlung der Lymphknotenstationen alternativ / ergänzend zur operativen Ausräumung in Frage kommen. Auch in palliativer Situation kann die Radiotherapie zur Bestrahlung von Metastasen eingesetzt werden, um die Tumormasse zu verkleinern, (Knochen-)Schmerzen zu lindern und pathologische Frakturen zu verhindern [29,38]. Die Strahlentherapie bedient sich hierzu hoch-energetischer Röntgenstrahlung, Gammastrahlung oder Partikelstrahlung zur Bestrahlung von extern. Als Alternative steht mit der Brachytherapie eine Methode zur Verfügung, um den Tumor von innen zu bestrahlen. Im Hinblick auf diese Arbeit soll erwähnt werden, dass die durch Sauerstoffmangel-induzierten Faktoren Strahlenresistenz hervorrufen können [39].

Die medikamentöse Behandlung des Mammakarzinoms ist stark abhängig von der Art des Tumors. Sie kann aus Chemotherapie, antihormoneller Therapie, Antikörpertherapie (Targeted Therapy), einer Kombination oder einer Sequenz dieser bestehen. Die Polychemotherapie stellt die wichtigste Form der medikamentösen Beeinflussung des Tumors dar und ist bei allen Tumoren mit hohem Rezidivrisiko, G3 Tumoren, HER2-positiven Tumoren, Hormonrezeptor-negativen Tumoren, jungem Erkrankungsalter (< 35 Jahre) oder nodal-positiven Tumoren indiziert. Sie kann vor der Operation (neoadjuvant) oder nach der

operativen Versorgung (adjuvant) angewendet werden. Aktuell sind als Chemotherapeutika insbesondere Anthrazykline und Taxane zu nennen [29,40].

Unter die sogenannte „Targeted Therapy“ fallen spezifische monoklonale Antikörper wie z.B. Trastuzumab. Trastuzumab ist ein selektiv gegen den HER-2/neu-Rezeptor (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2), eine transmembranäre Tyrosinkinase, gerichteter Antikörper. Eine Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors findet sich in etwa 25% aller Mammakarzinome und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [29,41,42]. Ein weiterer Antikörper ist unter anderem Bevacizumab, ein VEGF-Inhibitor (Vascular Endothelial Growth Factor), der die Tumorangiogenese hemmen soll [43]. Ein neueres vielversprechendes Medikament stellt Everolimus, ein mTOR-Inhibitor (mammalian Target of Rapamycin, ein Wachstumsfaktor), dar [44,45].

Bisphosphonate kommen in der Behandlung des ossär metastasierten Mammakarzinoms zum Einsatz und hemmen den Knochensubstanzabbau durch Hemmung der Osteoklastentätigkeit. Dies soll pathologische Frakturen, Knochenschmerzen und die Ausbreitung des Tumorgewebes im Knochen vermindern. Außerdem soll so einer vorzeitigen Osteoporose durch eine antihormonelle Therapie vorgebeugt werden. Der routinemäßige Einsatz ist jedoch umstritten [29,46], [47]. Denosumab ist als RANKL-Inhibitor (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand) ein neuer Antikörper, der die gleichen Ziele wie Bisphosphonate verfolgt [48,49].

1.1.5 Endokrine Therapie und Rezeptorstatus

Für die endokrine Therapie ist der Hormonrezeptorstatus entscheidend. Das Prinzip der Behandlung beruht auf der Tatsache, dass diese Tumore aus Krebszellen bestehen, die auf eine Wachstumsstimulation durch Steroidhormone, insbesondere das weibliche Sexualhormon Östrogen, angewiesen sind [50]. Patientinnen mit östrogenrezeptor- und / oder progesteronrezeptor-positiven Tumoren können demnach antihormonell behandelt werden. Bei prämenopausalen Frauen ist Tamoxifen, ein SERM (Selektive Estrogen-Rezeptor Modulator), Therapie der Wahl [29]. Raloxifen ist ebenfalls ein SERM mit anderen intrinsischen Eigenschaften, zeigt jedoch vergleichbare Wirksamkeit [51]. Ein neueres Medikament dieser Art ist Fulvestrant, ein SERD (Selektive Estrogen-

Receptor Downregulator) [52]. Eine weitere Möglichkeit stellt die Ausschaltung der Ovarialfunktion mit GnRH-Analoga, Ovariectomie oder Radiomenolyse dar. Dies wird insbesondere als zusätzliche Maßnahme bei metastasiertem Mammakarzinom empfohlen [29,53]. Bei Postmenopausalen Patientinnen sind mittlerweile Aromatasehemmer, die systemisch die enzymatische Östrogenproduktion hemmen, die Therapie der 1. Wahl [54]. Alternativ behandelt man mit Tamoxifen oder einer Sequenz aus Tamoxifen und Aromatasehemmer. Eine weitere Therapiemöglichkeit stellt die hochdosierte Gabe von Gestagenen dar [29].

Mehr als zwei Drittel der Mammakarzinome sind primär östrogenrezeptorpositiv. Tumore, die auf eine endokrine Therapie ansprechen, haben eine deutlich bessere Prognose als hormonrezeptornegativer Brustkrebs [55–58]. Triple-negativer Brustkrebs, das heißt, der Tumor exprimiert keine Hormonrezeptoren (ER / PR) und kein HER2/neu, ist mit primär 10-15% seltener. Kann solch ein Tumor nicht komplett operativ entfernt werden, so ist er sehr schlecht zu behandeln [59,60].

Unter antihormoneller Therapie kommt es, vor allem bei palliativer Therapie, fast ausschließlich zu einer Resistenzentwicklung des Tumors und einem Rezidiv innerhalb von Jahren [58,61,62]. Da die antiöstrogene Therapie eine elegante, gut wirksame und meist gut verträgliche Behandlungsmethode darstellt, liegt das Interesse auf der Hand, zu verstehen wie es zu Resistenzbildung und Therapieversagen kommen kann. Diese Arbeit untersucht die Expression der Östrogenrezeptoren alpha und beta unter Sauerstoffarmut (Hypoxie) und unter antihormoneller Therapie an Brustkrebszellen *in vitro* und zeigt mögliche Resistenzmechanismen von Tumoren auf.

1.2 Hormonrezeptoren

1.2.1 Östrogenrezeptoren

Östrogene, auch Estrogene oder Follikelhormone genannt, sind die wichtigsten weiblichen Sexualhormone. Sie gehören zur Familie der Steroidhormone (C18-Steroide, Estran-Grundgerüst). Produziert werden sie vorrangig in den Follikeln der Ovarien und während der Schwangerschaft von der Plazenta. Zu einem

geringen Anteil entstehen Östrogene in den Nebennieren, der Leber und in der Brustdrüse. Sie können aus Testosteron auch im Fettgewebe gebildet werden [63]. Ein Schlüsselenzym der Synthese ist die Aromatase. Die verschiedenen Östrogene sind Östradiol, Östron und Östriol. Diese unterscheiden sich in ihrer intrinsischen Aktivität am jeweiligen Rezeptor [64–66].

Es gibt verschiedene östrogenabhängige Rezeptoren. Als wichtigster und im klassischen Sinne als „der Östrogenrezeptor“ bezeichnet, gilt der Östrogenrezeptor-alpha (ER-a / ER- α / ESR1 / NR3A1). ER- α wird bei der Bestimmung des Rezeptorstatus von Brustkrebs im Hinblick auf eine antihormonelle Therapie bestimmt [67]. 1995 wurde ein weiterer in seinem Aufbau sehr ähnlicher (56% homologe Aminosäuresequenz), jedoch in seiner Funktion unterschiedlicher Östrogenrezeptor entdeckt, Östrogenrezeptor-beta (ER-b / ER- β / ESR2 / NR3A2) [68] [69]. Beide werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert (ESR1-Gen, 6q25.1 und ESR2-Gen ,14q23.2 [70,71]). ER- α und ER- β zeigen starke Sequenzhomologien. Beide besitzen 6 Domänen (A-F). Hierzu gehört eine A/B-Domäne (AF-1, Activation Function 1), die im Gegensatz zur E-Domäne auch in Abwesenheit eines Liganden Gentranskription aktivieren kann, jedoch nur sehr speziell und in geringem Maße. Die E-Domäne (AF-2) enthält die Bindungsregion für den Ligand und Coaktivatoren bzw. Corepressoren [72]. Sie ist für die ligandengesteuerte Transkription verantwortlich. Die C-Domäne verfügt über die DNA-Bindungsdomäne. Sie enthält 2 Zinkfinger-Module. Die D-Domäne fungiert als Bindeglied und Dimerisierungsregion. Die F-Domäne ist variabel und ihre Funktion noch schlecht verstanden [65,66,73].

Die Östrogenrezeptoren sind Steroidrezeptoren und gehören somit zur Familie der Kernrezeptoren. Die Östrogenrezeptoren liegen in inaktiviertem Zustand an Chaperon-Proteine gebunden als Komplex gelöst im Zytosol und im Nukleus der Zelle vor [74]. Steroidhormone sind lipophil und somit membrangängig [75]. Bindet ein Ligand z.B. Östradiol an einen Rezeptor, so dimerisiert dieser und bindet im Zellkern an spezifische sogenannte „Estrogen Response Elements“ (ERE) an der DNA und stimuliert oder inhibiert die Transkription bestimmter Gene. Die so regulierten Proteinprodukte sind für die Zell- und somit die Gewebeantwort verantwortlich [76]. Durch die unterschiedliche Struktur, insbesondere an der sehr variablen alpha-Helix der E-Domäne, kommt die unterschiedliche Affinität der

beiden Rezeptoren für unterschiedliche Liganden zustande. 17-beta-Östradiol bindet etwa gleichermaßen an ER- α und ER- β . Östron bindet vor allem an ER- α , Östriol insbesondere an ER- β [66]. Hormonaktivierte Rezeptoren formen Dimere. Diese können sich aus 2 ER- α -Monomeren ($\alpha\alpha$), aus 2 ER- β -Monomeren ($\beta\beta$) oder kombiniert als Heterodimer ($\alpha\beta$) zusammensetzen [76]. Auf Grund unterschiedlicher Spleißvarianten auf RNA-Ebene entstehen unterschiedliche Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften der Rezeptormonomere. Für ER- α sind zur Zeit mindestens 2 Isoformen beschrieben [77–79]. Für ER- β sind es zur Zeit 5, ER- β 1-5 [80–82]. Je nach Zusammensetzung der Dimere aus diesen Kombinationsmöglichkeiten ist die Affinität zu unterschiedlichen Response-Elementen unterschiedlich. Die Art der Rezeptoren und ihre Dichte, das Vorhandensein von Ligand, Coaktivatoren und Corepressoren und die spezifischen Response-Elemente der jeweiligen Zelle sind entscheidend für die Regulation der Zellhomöostase. Die jeweilige Ausstattung ist für jeden Zelltyp unterschiedlich und aus diesem Grund ist die Wirkung von Östrogenen gewebespezifisch. Dies wirkt sich insbesondere bei Brustkrebs aus, wo die Rezeptorexpression stark variiert und eng mit dem Outcome korreliert [78,80]. Erschwerend kommt hinzu, dass ein geringer Anteil dieser Östrogenrezeptoren auch membranständig vorkommt und direkte, DNA-unabhängige Funktionen erfüllt [75]. Es lässt sich jedoch verallgemeinert für das Brustdrüsengewebe erkennen, dass die Stimulation von ER- α eine proliferative und differenzierende Wirkung hervorruft, während die Stimulation von ER- β einen hemmenden Einfluss auf ER- α zeigt und zudem die Zellvermehrung hemmt oder sogar Apoptose induziert [80,83–86].

Der Vollständigkeit halber sei hier der G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor, GPR30 genannt. Es handelt sich um einen membranständigen Rezeptor, dessen Funktionen noch weitgehend unklar sind, der aber neuerdings in Zusammenhang mit Tamoxifenresistenz gebracht wird [87].

ERR- α , ERR- β und ERR- γ gehören zur Familie der Estrogen-Related-Receptors und sind ebenfalls Kernrezeptoren. Sie interagieren mit ER- α und binden teilweise an identische Response-Elements der DNA [88]. Ihre Rolle in Bezug auf Brustkrebs ist unklar.

1.2.2 Progesteronrezeptoren

Progesteron ist ebenfalls ein Steroidhormon (C21-Steroid, Pregnan-Gerüst) und ein Sexualhormon. Es wird wie Östrogen hauptsächlich in den Ovarien, während der Schwangerschaft in der Plazenta und zu geringen Teilen in der Nebenniere produziert. Progesteron kann in mehreren Schritten zu Androgenen und weiter zu Östrogenen metabolisiert werden.

Der Progesteron-Rezeptor (PR / NR3C3) ist auch ein Kernrezeptor, existiert in 2 Isoformen, PR-A und PR-B und wird von einem einzelnen Gen codiert (11q22.1) [89,90]. Der PR wird in Brustkrebszellen bestimmt und ist ein Marker für Therapie und Prognose. Synthese und Expression des PR wird durch Estradiol stimuliert [91], während Progesteron die Degradation fördert und größtenteils inhibitorische Signale an der Brustdrüse vermittelt.

1.3 Tamoxifen

Tamoxifen, (Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamine, ist ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM). Ursprünglich als Verhütungsmittel entwickelt, war es das erste Antiöstrogen, das zu einer antihormonellen Therapie eingesetzt wurde [92,93]. Es ist heute das meistverwendete Therapeutikum eines hormonsensitiven Mammakarzinoms.

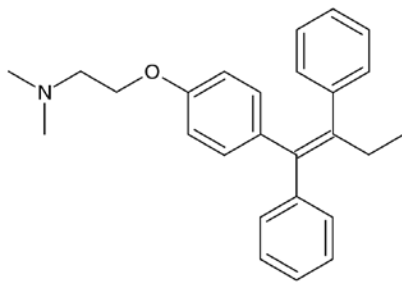


Abb. 1 Strukturformel von Tamoxifen, C₂₆H₂₉NO

Es wird oral verabreicht, in der Leber mit Hilfe vom Cytochrom-P450-Enzymsystem, insbesondere Cyp 3A4, 2C9 und 2D6 in seine wirksamen Metaboliten Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) und 4-Hydroxytamoxifen metabolisiert und größtenteils fäkal ausgeschieden. Tamoxifen und seine Metaboliten sind zu 98% an Plasmaproteine gebunden. Tamoxifen besitzt im Körper eine Halbwertszeit von durchschnittlich 7 Tagen [94,95]. Endoxifen bindet an Östrogenrezeptoren kompetitiv zu Östrogen. Es induziert

ebenfalls eine Dimerisierung, die jedoch als Komplex eine andere Konformation aufweist. Im Gegensatz zu Östradiol wird nur die AF-1-Domäne aktiviert, während die AF-2-Domäne inaktiv bleibt [96]. Promotoraktivierungen, die unabhängig von AF-2 aktiviert werden können, werden agonisiert und wie mit Östradiol als Ligand aktiviert. Andere Promotorregionen, die AF-2 abhängig aktiviert werden müssen, werden gehemmt. Dies erklärt die je nach Gewebe unterschiedliche Wirkung und die Bezeichnung Partialagonist / Partialantagonist bzw. Modulator [97,98].

Am Brustdrüsengewebe wirkt Tamoxifen insbesondere über eine kompetitive Verdrängung von Östradiol. ER- α und ER- β werden antagonisiert, weil hier die AF-2-abhängige Aktivierung dominiert. ER- α und PR werden downreguliert [91] [99]. Tamoxifen besitzt weiterhin rezeptorunabhängige Eigenschaften, auf die eine gewisse Wirksamkeit bei rezeptornegativem Krebs zurückzuführen ist. In diesem Sinne hemmt Tamoxifen unter anderem die Angiogenese in Tumoren, begünstigt einen Zellarrest in der G1-Phase, vermindert Wachstumsfaktoren, stimuliert TGF- β , inhibiert die Proteinkinase C, Calmodulin etc. [100–104]

1.4 Hypoxie und Hypoxie-induzierbare-Faktoren

1.4.1 Sauerstoff und Hypoxie

Sauerstoff (O_2) ist für den Menschen und die meisten Eukaryoten sowie für viele Bakterien essentiell für die Energiegewinnung. Durch oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette der Mitochondrien wird Adenosintriphosphat (ATP) sauerstoffabhängig als universeller Energieträger produziert. Auch für die Oxygenierung von Stoffwechselprodukten durch bestimmte Enzyme (Oxygenasen) ist O_2 als Reaktionspartner (Redox-Reaktion) ebenfalls substanziell. Die Atemluft enthält etwa 21% O_2 (20,942% O_2), dies entspricht auf Meereshöhe einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von ca. 160 mmHg. Das respiratorische und das kardiovaskuläre System des Menschen sorgen für einen arteriellen pO_2 von 75-95 mmHg. Auf diese Art können die Gewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Normoxie).

Entlang einer Kapillare hin zum gemischt venösen Blut und senkrecht dazu in das eine Kapillare umgebende Gewebe sinkt der pO_2 (Krogh-Gewebszylinder) [105]. Das bedeutet, dass kapillarferne und zum venösen Ende hin liegende Zellen

1. Einleitung

schlechter versorgt werden und schon geringe O₂-Partialdruckabnahmen zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff führen können (Hypoxie). Zu einer Hypoxie kann es durch vermehrten Sauerstoffverbrauch des Gewebes oder durch ein zu geringes Angebot kommen.

Art der Gewebhypoxie	Ursache
Hypoxämische Hypoxie	verringerte O ₂ -Aufladung des Blutes durch: • Höhengedhalt (niedriger Partialdruck) • verminderte alveoläre Ventilation • Störung des alveolären Gasaustauschs
Anämische Hypoxie	gesenkte O ₂ -Kapazität des Blutes, niedriger Hb (z.B. Eisenmangelanämie)
Ischämische Hypoxie	verminderte Durchblutung (z.B. Herzversagen, Arterienverschluss)
Hypoxie durch Diffusionswegverlängerung	aufgrund von Gewebsvermehrung mit inadäquater Kapillargefäßbildung (z.B. Tumoren)
Zytotoxische Hypoxie	verminderte O ₂ -Verwertung in den Mitochondrien durch Giftstoffe (z.B. Blausäure)

Tab. 2 Einteilung der Hypoxien, modifiziert nach [106]

1.4.2 Die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren

Leidet eine Zelle unter Sauerstoffarmut, so werden die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF) stabilisiert. Bei diesen Faktoren handelt es sich um Proteine einer Zelle, die in die Stoffwechselaktivität eingreifen und das Überleben und die Anpassung der Zelle unterstützen [107–109]. HIF-alpha Untereinheiten akkumulieren zellspezifisch ab einem pO₂ zwischen 10 – 20 mmHg, während die mitochondriale ATP-Generierung erst ab Werten unter 0,5 mmHg eingeschränkt ist [110].

Aktive HIF-Proteine bestehen jeweils aus 2 Untereinheiten, einer sauerstofflabilen alpha-Untereinheit (HIF- α), die mit einer konstitutiv exprimierten beta-Untereinheit (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator, ARNT, HIF- β) dimerisiert [107]. Als HIF- α -Untereinheiten sind zurzeit 3 Isoformen bekannt, HIF-1 α , HIF-2 α (EPAS1) und HIF-3 α . Die Untereinheiten weisen starke sequenzielle Homologie auf, zeigen jedoch unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten [111–113].

Alle HIF-Untereinheiten gehören der Superfamilie der Basic Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim-Proteine (bHLH-PAS-Proteine) an und sind Transkriptionsfaktoren, die

an spezifische Hypoxie-Responsive-Elements (HRE) auf der DNA binden und so in die Zellregulation eingreifen [114]. Der N-Terminus beherbergt den bHLH-Abschnitt der für die Bindung an die HRE an der DNA verantwortlich ist. Richtung C-Terminus schließt sich die PAS-Domäne an, die für die Dimerisierung zuständig ist. Benachbart liegt die sauerstoffabhängige Degradationsdomäne (ODDD), die mit der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (NAD) zusammenhängt. Nur bei HIF-1 α und HIF-2 α befindet sich C-terminal eine weitere Aktivierungsdomäne, die CAD. ARNT enthält keine ODDD und keine CAD [115]. Die codierenden Genregionen sind für HIF-1 α 14q23.2, für HIF-2 α 2p21, für HIF-3 α 19q13.32 und für ARNT 1q21.3 [116–119].

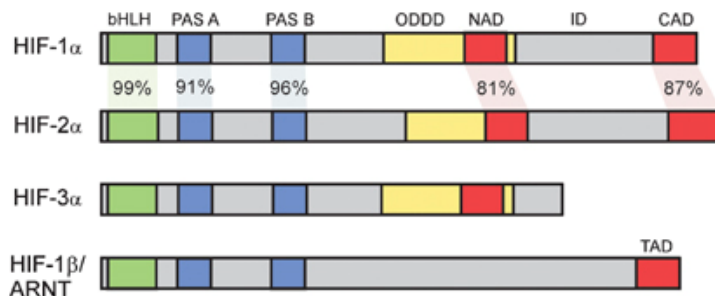


Abb. 2 Domänenstruktur der Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF), modifiziert nach [115]

Die HIF-Faktoren sind hochkonservierte Proteine. Mit einer sehr hohen Aminosäuresequenzhomologie zwischen Mensch und Maus haben Sie sich im Laufe der Evolution nur wenig verändert [115]. HIF-1 α und HIF-2 α sind essentiell für die postnatale Reifung, die Aufrechterhaltung allgemeiner Zellfunktionen und des Energiestoffwechsels. Sie sind zu diesem Zweck in geringem Maße auch unter Normoxie aber nur mit einer kurzen Halbwertszeit von ca. 5 - 8 min. exprimiert [120,121]. In Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff werden Proline der ODDD durch Prolylhydroxylasen (Prolyl-Hydroxylase-Domain enzymes: PHD1, PHD2, PHD3) hydroxyliert [122]. Die PHDs benötigen neben O₂ auch Eisen(II), Ascorbat und 2-Oxoglutarat als Cofaktoren [123]. Durch die Hydroxylierung der HIF- α -Untereinheiten sind diese für das Tumorsuppressor-Protein-von-Hippel-Lindau (pVHL, eine E3 Ubiquitinligase) markiert und werden durch dieses polyubiquitinyliert und dann proteasomal abgebaut [124]. Weiter kann die CAD von HIF-1 α und HIF-2 α durch eine Asparaginyhydroxylase (Factor Inhibiting HIF, FIH) mit Hilfe von O₂ hydroxyliert werden.

Auf diese Weise wird die Bindung der p300-CBP-Coaktivatoren unterbunden und so die Transkriptionsaktivität unter Normoxie gehemmt [125,126]. Da allen HIF-3 α -Splicevarianten die CAD fehlt, wird angenommen, dass HIF-3 α regulatorisch-inhibitorisch auf die HIF-induzierte Transkription wirkt [127,128].

Unter Sauerstoffarmut wird die Hydroxylierung durch die PHDs und FIH unterbunden, da O₂ als Kofaktor fehlt und zusätzlich die PHDs durch SIAH (Seven In Absentia Homolog), eine E3 Ubiquitinligase, markiert und degradiert werden [129,130]. Die HIF- α -Proteine können so akkumulieren, mit Hilfe eines Kernimportsignals (Nuclear Localisation Signal, NLS) in den Kern gelangen und sich mit ARNT zu aktiven Heterodimeren zusammenschließen [131]. Dort binden sie an HRE der DNA und modulieren mit Hilfe der Koaktivatoren p300 und CREB (cAMP Response Element Binding Protein) die Transkription und Entstehung der mRNA für die Proteinbiosynthese und somit die Zellhomöostase.

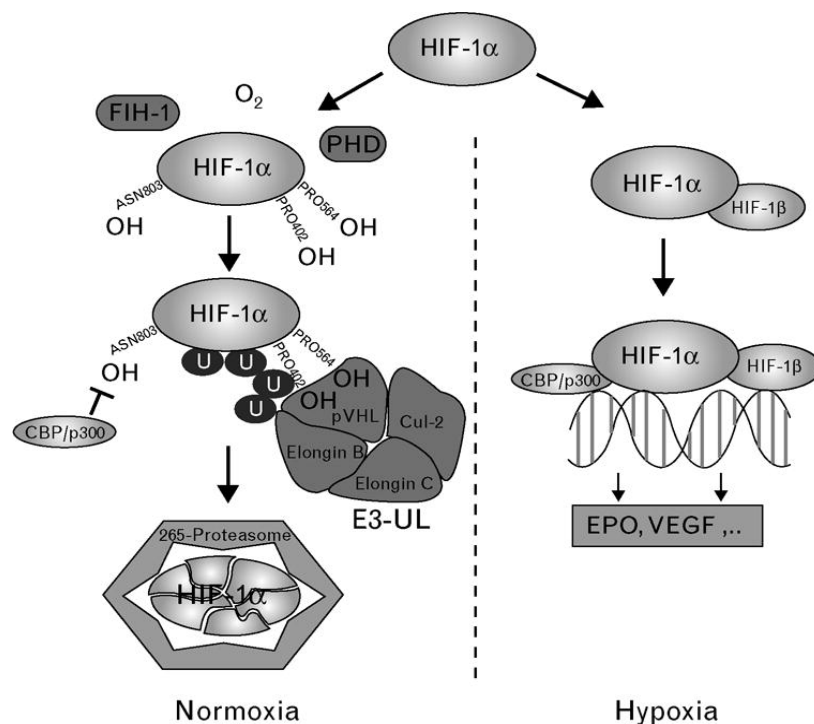


Abb. 3 Schematische Darstellung der HIF-Regulation am Beispiel von HIF-1 α , nach [132]

Zyklisierende Hypoxie, wie sie auf zellulärer Ebene häufig in Tumoren entsteht, gilt als sehr potenter HIF-Induktor [133]. Im Gegensatz zu chronischer Hypoxie entstehen bei zyklisierender Hypoxie vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die die Proteinkinase-C (PKC) aktivieren. Die aktivierte PKC hemmt, zusätzlich zum O₂-Mangel, direkt die PHDs. Gleichzeitig wird durch die PKC das mTOR (mammalian Target of Rapamycin) aktiviert, welches direkt HIF phosphoryliert und

dadurch stabilisiert. Weitere Möglichkeiten einer HIF-Stabilisierung sind die S-Nitrosylation von HIF und die mTOR-Aktivierung via PI3K/AKT-Signalweg oder Erk1/2-Signalweg [132,134].

1.4.3 Chemische HIF-Stabilisatoren

Anorganisches Cobalt(II)-Chlorid (CoCl_2) ist ein Hypoxie-Mimetikum. Es bewirkt eine HIF-Stabilisation durch eine Inhibierung der PHDs. Es wird vermutet, dass das zweiwertige Übergangsmetall Cobalt die Eisen(II)-Bindung an die PHDs verhindert, dadurch die PHDs inaktiv bleiben und somit auch unter Normoxie HIF- α -Proteine nicht ubiquitinyliert und somit nicht degradiert werden [132,135,136]. Weiter soll Cobalt(II)-Chlorid durch direkte Bindung an HIF- α die Interaktion zwischen HIF- α und von-Hippel-Lindau-Protein verhindern [129,137]. Wesentlich stärker als die PHDs inhibiert CoCl_2 FIH, was wiederum die HIF-transkriptionelle Aktivität steigert. Aktuellere Studien legen einen weiteren Zusammenhang mit der Erzeugung von ROS und so eine Stimulation von HIF via mTOR oder direkt via Erk-Signalweg nahe [136,138].

Dimethyloxallylglycin (DMOG) ist ebenfalls ein Hypoxie-Mimetikum. Es ist ein 2-Oxoglutarat-Analogon, das die PHDs und FIH aber auch unspezifisch andere Hydroxylasen / Dioxygenasen hemmt, die 2-Oxoglutarat als Cofaktor benötigen. Wie auch bei CoCl_2 sind die Genexpressionsmuster nach DMOG-Gabe und Hypoxie größtenteils identisch [139].

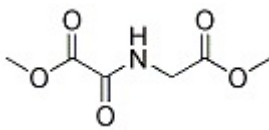


Abb. 4 Strukturformel von Dimethyloxallylglycin (DMOG)

1.4.4 Hypoxie-assoziierte Gene

Mehr als 250 Hypoxie-assoziierte Genprodukte sind aktuell bekannt, die unter Sauerstoffarmut reguliert werden [139]. Insbesondere sollen viele durch HIF hochregulierte Genprodukte das Überleben der Zelle unter Stress sicherstellen und die Sauerstoffversorgung verbessern [140]. Hierfür sorgen z.B. VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A) und Angiopoietin (ANG-1, ANG-2) über eine Stimulation der Angiogenese, Erythropoietin (EPO) über eine Anregung der Erythrozytensynthese und Transferrin über eine Förderung der Eisenverfügbarkeit

für den Sauerstofftransport in Erythrozyten. Durch Induktion glykolytischer Enzyme und somit Anregung der Glykolyse soll auch unter anaeroben Bedingungen energiereiches Phosphat zur Verfügung gestellt werden [141–143]. Insulin Like Growth Factor 2 (IGF-2) und Fibroblast Growth Factor (FGF-2) sind zellproliferationsfördernde Wachstumsfaktoren, die durch HIF vermehrt transkribiert werden. HIF-1 α und HIF-2 α überschneiden sich weithin in ihrer transkriptionellen Aktivität. Dennoch gibt es entscheidende Unterschiede. Ein Schwerpunkt von HIF-1 α ist z.B. die Umstellung auf anaerobe Glykolyse, während HIF-2 α vorwiegend die EPO-Regulation und Gefäßstruktur im Gewebe unter Hypoxie reguliert. Weitere Unterschiede zwischen HIF-1 α und HIF-2 α sind auch in der Expression verschieden aggressiver Tumoren beobachtet worden [144–147]. Ausgewählte HIF-assoziierte Gene zeigt Abb. 5.

1.4.5 HIF und Tumorigenese

Die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren und ihre Signalwege stellen einen wichtigen Forschungsschwerpunkt der modernen Tumorforschung dar. In vielen Tumoren sind HIF überexprimiert, was seinerseits mit einem schlechten Outcome für den Patienten korreliert. Die HIF nehmen auf verschiedene Art und Weise Einfluss auf die Genese und Therapie von Krebs [148].

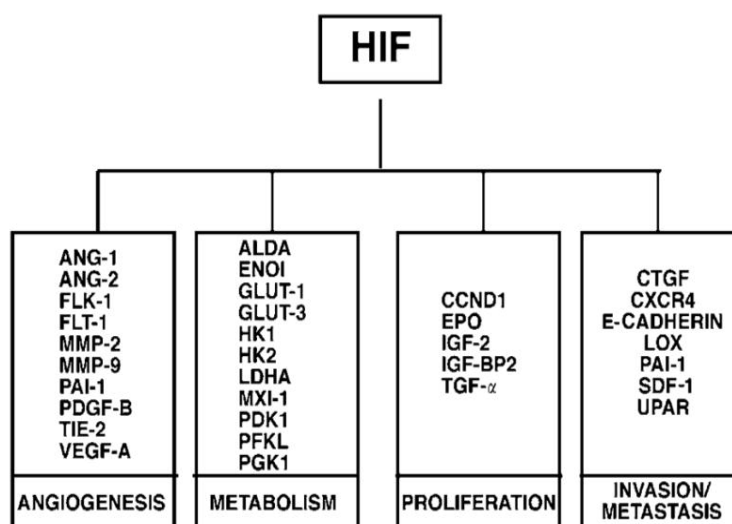


Abb. 5 Ausgewählte HIF-regulierte Gene im Hinblick auf Tumorigenese, nach [148]

Eine der ersten Entdeckungen dieser Art war die Gefäßneubildung solider Tumore. Solide Tumore sind meist schnell größenprogredient und aus diesem Grund kann es zu einer Unterversorgung an Sauerstoff und Nährstoffen der Krebszellen im Inneren des Tumors kommen. Diese hypoxischen Zellen

exprimieren vermehrt HIF und sorgen so z.B. via VEGF, ANG und weitere Wachstumsfaktoren für eine schnelle Neovaskularisation. Die auf diese Art überstürzte Neubildung von qualitativ schlechten Gefäßen begünstigt wiederum die Metastasierung [149].

Der Warburg-Effekt, also der Shift von oxidativer Phosphorylierung hin zur Glykolyse in Tumorzellen, sowie weitere tumorspezifische Metabolismen sind vor allem auf HIF-1 α zurückzuführen. Durch Stimulierung von Wachstumsfaktoren wie IGF-2 wirken die HIF-Proteine auf die Proliferation der Krebszellen und das Wachstum des Tumors. In dieser Hinsicht ist insbesondere die Überexpression von HIF-2 α mit einem besonders schnellen Wachstum vergesellschaftet [148]. Adhäsionsmoleküle und Matrixproteine wie z.B. E-Cadherin und LOX, die für eine normale Zell-Zellkonnektivität im Gewebe nötig sind, Chemokinrezeptoren wie z.B. CXCR4 und viele weitere Genprodukte werden durch HIF fehlreguliert. Somit korreliert die Invasivität eines Tumors ebenfalls mit HIF. Der Grad der Entdifferenzierung eines Tumors steht meist mit der Aggressivität der Krebserkrankung in engem Zusammenhang. Studien haben gezeigt, dass HIF die Differenzierung von Zellen hemmt und zu einer genetischen Instabilität beiträgt [148,150]. Dies führt seinerseits zu vermehrter Therapieresistenz, im Sinne von Chemo- und Strahlenresistenz [108].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist, Zusammenhänge der Transkriptionsfaktoren HIF- α , ARNT, ER- α und ER- β in Brustkrebszellen zu untersuchen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein molekularbiologisch biochemischer Ansatz gewählt. Hiermit wurden die Protein- und mRNA-Konzentrationen in verschiedenen Krebszelllinien, nach vorausgegangenen Behandlungen, *in vitro* bestimmt. In dieser Arbeit soll insbesondere der Einfluss von Hypoxie und den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF) auf die Östrogenrezeptorexpression untersucht werden. Unter Sauerstoffarmut werden innerhalb der Zelle verschiedene Signalkaskaden beeinflusst. Viele dieser Veränderungen sind auf die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren zurückzuführen. Es gilt zu verstehen, wie sich die Expressionen der beiden Östrogenrezeptoren ER- α

und ER- β unter Hypoxie in „ER- α -positiven“ und „ER- α -negativen“ Brustkrebszellen verändern und inwieweit diese Veränderungen HIF-abhängig sind. Deshalb wurde mittels der Methode der RNA-Interferenz eine HIF- α -Defizienz erzeugt. Weiterhin wurde der Einfluss von Cobalt(II)-Chlorid (CoCl_2) untersucht. Um darüber hinaus Aussagen über mögliche Resistenzentwicklungen, die auf die betrachteten Transkriptionsfaktoren zurückzuführen sind, treffen zu können, wurden Zellen über 50 Wochen unter Östrogendeprivation in Kultur gehalten und anschließend charakterisiert. Diese Arbeit soll weiterhin den Einfluss von Hypoxie und den HIF- α -Monomeren speziell auf die Expression des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocators (ARNT/HIF-1 β) untersuchen. ARNT ist der Dimerisierungspartner der HIF- α -Monomere. Er gilt im Gegensatz zu diesen als sauerstoffunabhängig, ubiquitär vorhanden und unreguliert. In Bezug auf Hypoxie und HIF- α galt es vereinzelte Beobachtungen einer veränderbaren ARNT-Expression näher zu untersuchen. Hierfür wurden neben Brustkrebszelllinien auch Zellen, die anderen Geweben entstammen untersucht. Weiterhin wurde mit den Hypoxie-Mimetika Cobalt(II)-Chlorid (CoCl_2) und Dimethyloxallylglycin (DMOG) gearbeitet, um eventuelle Unterschiede zwischen „chemischer Hypoxie“ und „regulärer Hypoxie“ zu eruieren.

Die Ergebnisse dieser Studien sollen letztlich dazu führen das Zusammenspiel und die Beeinflussbarkeit der genannten Transkriptionsfaktoren besser zu verstehen. Es sollen so Möglichkeiten aufgezeigt werden, gezielt an diesen Transkriptionsfaktoren anzugreifen, um eventuell in Zukunft eine bessere Therapierbarkeit von Brustkrebs erreichen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

Einwegartikel

Amersham Hybond-ECL-Membrane	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare, München
Cell Counting Chamber, Cellometer, CHT4-003	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Durapore 3M, Pflaster	3M medica, Neuss
Easy Flask 75 Filt Nunclon D SI	Nunc, Roskilde, DK
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips, steril, 2,5 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Filter Tip, blau, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Tip, farblos, 2,5 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Tip, gelb, 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Tip, blau, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
PP-Röhrchen, steril, 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PP-Röhrchen, steril, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reagiergefäß, Micro tube, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß, Safe-seal micro tube, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo-Blottingpapiere, 0,35mm	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipette, steril, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette, steril, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette, steril, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette, steril, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Dish, 100 mm x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue Culture Platte, steril, 6 Well mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tissue Culture Platte, steril 24 Well mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Tissue Culture Platte, steril, 96 Well mit Abdeckplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber, 39 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Laborgeräte	
ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation	Applied Biosystems, Darmstadt
Aura 200 M A.C.	Nunc, Roskilde, DK
Axiovert 25 CFL	Carl-Zeiss, Oberkochen
BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Heraeus B 5060 EC-CO2	Heraeus, Hanau
CO2-Inkubator Heraeus	Fisher Scientific, Schwerte
Captair bio	Erlab, Rowley, USA
Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Consort E835	Sigma-Aldrich, München
Flockeneisbereiter Scotsman AF-100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
FS 777, Folienschweißgerät	Clatronic, Kempen
G 7883 CD, Miele Professional	Miele, Gütersloh
Ikamag RO motor	Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen
Invivo2 400, Hypoxie Workstation	Ruskin, Bridgend, UK
Kältemaschine DKMB-51-EWL-000	DWM, Berlin
Laboratory DC Power Supply, GPS-3030D	GW Instek, Taipei, Taiwan

Liebherr comfort	Liebherr, Biberach an der Riss
LX-850	Epson, Meerbusch
MC 1 Analytic AC 120 S	Sartorius, Göttingen
Messwaage Kern 510-33	Kern, Albstadt
MetoBox 407	Meteor, Siegen
Microwflow biological safety cabinet, Klasse 2	Nunc, Roskilde, DK
Mini-Protean 3 Cell system	Bio-Rad, München
Minispin, personal microcentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Peltor Twin Cup H10A	3M, Indianapolis, USA
Pipetboy acu, IBS	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetman Classic, P2, 0,2 ml – 2 ml	Gilson, Middleton, USA
Pipetman Classic, P20, 2 ml – 20 ml	Gilson, Middleton, USA
Pipetman Classic, P200, 50 ml – 200ml	Gilson, Middleton, USA
Pipetman Classic, P1000, 200ml – 1000 ml	Gilson, Middleton, USA
Polymax 1040, Taumelmischer	Heidolph, Schwabach
Primus 96 Plus Thermal Cycler	MWG Biotech AG, Martinsried
Reinstwassersystem, Ultra Clear	VLM, Bielefeld
Scanner, CanoScan 4200F	Canon, Krefeld
Schott Duran Kolben	Schott Medica, Wertheim
Sonopuls GM 3100 / HD 3100	Bandelin, Berlin
Spectra Rainbow	SLT-TECAN, Neustadt

Systec V-150 Autoklav	Systec, Hünenberg, CH
Thermomix MM	B.Braun, Melsungen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkälte-Lagertruhe	KTL Kryotec-Kryosafe, Hamburg
Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Wasserbad Thermomix	BU B. Braun, Melsungen

Chemikalien, Reagenzien und Gase

Alkohol 70% vol. vergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham ECL (enhanced chemiluminescence substrate)	GE Healthcare, München
Cutasept F	Bode, Hamburg
Chemische Elemente und Verbindungen	Merck, Darmstadt
Chemische Elemente und Verbindungen	Carl Roth, Karlsruhe
DC Protein-Assay- Kit	Bio-Rad, München
Gase (N ₂ , CO ₂ , Druckluft)	Air Liquide, Düsseldorf
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KAPA SYBR FAST Universal	Peqlab, Erlangen
Labor-Abzug	Norddeutsche Laborbau, Kaltenkirchen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMAX Transfektionsreagenz	Invitrogen, Darmstadt
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin / Streptomycin	PAA, Pasching, Austria
Calbiochem Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-free	Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 25%	Merck, Darmstadt
SDS granuliert reinst	AppliChem, Darmstadt
Sterillium Classic Pure	Bode, Hamburg
Sterillium Virugard	Bode, Hamburg
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS ultra pure	Biomol, Hamburg
Trypsin-EDTA	PAA, Pasching, Austria
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
UREA (Harnstoff)	GERBU Biotechnik, Wieblingen

Chemikalien

4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich, München
--------------------	------------------------

Antikörper

HIF-1alpha	1:1000	610959	BD Transduction
ARNT	1:1000	nb 2B10	Novus
HIF-2alpha	1:1000	AF2886	R&D Systems
ER-alpha	1:1000	sc-8005	Santa Cruz
ER-beta	1:1000	sc-8974	Santa Cruz
Lamin	1:1000	sc-6215	Santa Cruz,
Goat-Ig	1:2000	P0449	Dako
Mouse-Ig	1:2000	P0447	Dako
Rabbit-Ig	1:2000	P0448	Dako

Small Interfering RNAs (siRNAs)

HIF-1 α siRNA

Stealth-RNAi Custom-made synthetisiert durch Invitrogen

sense: 5'-AUA AUGU UCCAAU UCCUACUGCUUG-3'

antisense: 5'-CAAGCAGUAGGAAUUGGAACA UUAU-3'

HIF-2 α siRNA

Stealth-RNAi Custom-made synthetisiert durch Invitrogen

sense: 5'-CAGCAUCUUUGAUAGCAGUTT-3'

antisense: 5'-ACUGCUAUCAAAGAUGCUGTT-3'

Computerprogramme und Datenbanken

AIDA Image Analyzer v4.27

Raytest, München

GraphPad InStat 3.06

GraphPad, La Jolla,
USA

Microsoft Office 2007

Microsoft
Deutschland,
Unterschleißheim

MikroWin 2000

Berthold
Technologies GmbH
& Co. KG, Bad
Wildbad

Zellkulturmedien

500 ml DMEM

GIBCO, Darmstadt

500 ml RPMI-1640

GIBCO, Darmstadt

10% Fötales Kälberserum (FCS)

Biochrom, Berlin

1% Penicillin Streptomycin

Invitrogen, Darmstadt

Puffer und Lösungen

Laufpuffer (10x)

Tris 250 mM

Glycin 1,92 M

SDS 1%

ad Aqua bidest.

MTT-Assay:

MTT: 5 mg/ml PBS

Lysepuffer: 0,7 % SDS in Isopropanol

PBS (Phosphate Buffered Saline):

Natriumchlorid (NaCl) 8 g/l

Kaliumchlorid (KCl) 0,2 g/l

Kaliumhydrogenphosphat 1 g/l

Natriumhydrogenphosphat 1,44 g/l

Probenpuffer (2x)

Tris HCl 60 mM

Glycerol 87% 25 %

SDS 2 %

β -Merkaptoethanol 5 %

Bromphenolblau 0,1 %

ad Aqua bidest.

Sammelgel

Acrylamid 13 %

Tris-HCl pH 6,8 0,125 M

SDS 0,1 %

APS 0,05 %

TEMED 0,001 %

ad Aqua bidest.

Trenngel (10 %)

Acrylamid 33 %

Tris-HCl (Salzsäure) pH 8,8 0,375 M

SDS 0,1 %

APS (Ammoniumpersulfat) 0,05 %

TEMED (Tetramethylethylenediamin) 0,05 %

ad Aqua bidest.

Trypanblau-Test

2 % Trypanblau in PBS

UREA-Zelllysepuffer:

Glycerol 10 %

SDS (Natriumdodecylsulfat) 1 %

Dithiothreitol 5 mM

Tris pH 6,8 10 mM

UREA (Harnstoff) 6,7 M

Protease Inhibitor Cocktail 1:1000

Kommerzielle Puffer und Lösungen

SensiMix SYBR Hi-ROX

Bioline, Luckenwalde

Nucleic acid Purification Elution Solution

Applied Biosystems,
Darmstadt

Nucleic acid Purification Wash Solution

Applied Biosystems,
Darmstadt

RNA Purification Wash Solution 1 + 2

Applied Biosystems,
Darmstadt

2.2 Zellbiologische und bioanalytische Methoden

2.2.1 Zelllinien

MCF-7

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation – 7) ist eine ductale Adenocarcinomzelllinie der Brust von einer weißen (kaukasischen) 69-jährigen Frau. Angelegt wurde die Kultur 1970 durch Isolation aus einem malignen Pleuraerguss. Sie ist ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻ [151].

T47D

T47D ist eine humane ductale Adenocarcinomzelllinie der Brust, die aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen wurde. Sie ist ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻ [151].

MD-A-MB-231

Diese Epithelzellen eines humanen Adenocarcinoms der Brust sind ER- α^- , PR $^-$, HER2 $^-$. Sie wurden 1973 am M.D. Anderson Cancer Center aus einem malignen Pleuraerguss gewonnen und gelten als etabliertes Modell für triple-negativen Brustkrebs [151].

MX-1

Mammary Xenograft-1 ist eine humane Zelllinie eines ductalen Adenocarcinoms, die ursprünglich zuerst transplantiert in Mäusen etabliert werden konnte, bevor Zellkulturversuche mit dieser Zelllinie möglich wurden. Diese Zelllinie gilt als ER- α negativ während PR marginal nachweisbar ist [152].

SK-BR-3

Diese Brustkrebszellen eines 1970 vom Memorial Sloan-Kettering Cancer Center in New York isolierten Adenocarcinoms stammen aus einem malignen Pleuraerguss. Sie sind ER $^-$ und überexprimieren das HER2-Gen [151].

HeLa

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die mit humanem Papillomvirus 18 (HPV18) befallen sind. Diese Zellen waren die ersten, die in Zellkultur zu Forschungszwecken etabliert werden konnten [153].

Hep3B

Diese Zellen einer Leberbiopsie eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) eines acht-jährigen Jungen enthalten Hepatitis B-Virus-Genom und produzieren HBsAg [154].

HepG2

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine gut-differenzierte humane Hepatomzelllinie (HCC) eines 15-jährigen Jungen ohne Hepatitis-Virus-Infektion [155].

REPC

Die auch HK-120 genannten Zellen einer humanen Nierenfibroblastenzelllinie wurden ursprünglich aus einem Tumorpatienten isoliert [156]. Die Uniformität dieser Zelllinie wird noch geprüft (Prof. J. Fandrey, Essen, persönliche Mitteilung September 2013)

Kelly

Kelly-Zellen sind humane Neuroblastomzellen [157]

Cos-7

Cos-7-Zellen sind fibroblasten-ähnliche Zellen, die aus der Niere eines Primaten (grüne Meerkatze, *Chlorocebus*) stammen und stabil mit SV-40 transfiziert wurden [158].

Untersuchungen an Zellkulturen (*in vitro*) eignen sich insbesondere, um ausgewählte Parameter, wie z.B. Gaspartialdrücke oder Stoffmengenkonzentrationen kontrolliert zu beeinflussen und so die physiologische Reaktion eines Gewebes gezielt zu erforschen. Alle verwendeten Zelllinien wachsen als Monolayer.

2.2.2 Zellkultivierung

Die Zellkulturarbeit fand ausschließlich an der Sterilwerkbank (Microwflow biological safety cabinet, Klasse 2, Nunc, Roskilde, Dänemark) statt.

Die Zelllinien MCF-7, T47D, MD-A-MB-231, MX-1, SK-BR-3, HeLa und Cos-7 wurden in DMEM-Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO, Darmstadt) inkubiert. Die Zelllinien Hep3B, HepG2, REPC und Kelly wurden in RPMI-1640-Kulturmedium (GIBCO, Darmstadt) inkubiert. Die Kulturmedien wurden jeweils mit einem Zusatz von 10% (vol./vol.) fötalem Kälberserum (FCS, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und 1% (vol./vol.) Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching, Austria) angereichert. Unter einer luftbefeuchteten Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft (~21% O₂) bei 37°C im Brutschrank (Heraeus B 5060 EC-CO2, Heraeus, Hanau, Deutschland) in Zellkulturflaschen (Easy Flask 75 Filt Nunclon D SI, Nunc, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Unter dreimaligem Kulturmediumwechsel pro Woche wurden die Zellen auf eine Dichte von ca. 80%

Konfluenz angezüchtet. Anschließend erfolgte die Subkultivierung der Zellen durch Spülung mit Medium und Ablösung durch Inkubation mittels Trypsin (Trypsin-EDTA, PAA, Pasching, Austria) für 5 Minuten bei 37° Celsius im Brutschrank. Die entstandene Zellsuspension wurde dann weiter mit 10 ml Kulturmedium verdünnt und je nach erwünschter Zellzahl ausgesät.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wurde mittels Trypanblau-Test mit Hilfe des Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) durchgeführt. Durch die Bestimmung der Zahl vitaler Zellen konnte dann eine geeignete Anzahl an Zellen für den jeweiligen Zweck ermittelt und dann standardisiert ausgesät werden.

2.2.4 Versuchsaufbau

Für die Versuchsreihen wurden je nach benötigter Zellzahl, Protein- oder RNA-Menge, die Zellen auf unterschiedlich großen Gewebekulturplatten angezüchtet. Gewebekulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm (Tissue Culture Dish, 100 mm x 20 mm, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden mit 10 ml Kulturmedium, 6-Wellplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 2 ml Kulturmedium, 24-Wellplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 500 µl Kulturmedium oder 96-Wellplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 100 µl Kulturmedium pro Well befüllt. Auf diese Art wurden die Zellen 24h im Brutschrank unter „normoxischen Bedingungen“ (5% CO₂ und 95% Luft (~21% O₂) bei 37°C, Normoxie) angezüchtet. Anschließend begannen die entsprechenden Behandlungen.

Normoxie und Hypoxie

Die Versuche und die jeweiligen Kontrollen wurden für die Zeit der Versuchsdauer im Brutschrank unter normoxischer bzw. hypoxischer Atmosphäre gehalten. Versuche unter 1% Hypoxie (5% CO₂, 1% O₂ und 94% N₂, Edelgase und weitere Luftbestandteile vernachlässigt; das entspricht einem pO₂ von ~7,1 mmHg) und 3% Hypoxie (5% CO₂, 3% O₂ und 92% N₂, weitere Luftbestandteile vernachlässigt, das entspricht einem pO₂ von ~21 mmHg) wurden an einer Hypoxie-Workstation (Invivo2 400 Hypoxie-Workstation, Ruskinn, Bridgend, United Kingdom) durchgeführt. Da der perizelluläre Sauerstoffpartialdruck laut 1. Fickschem Gesetz [159] abhängig von der Diffusionsstrecke durch das Medium

zur Zelle ist, wurde, um konstante Bedingungen innerhalb der Versuche zu gewährleisten, stetig mit niedrigen Medienvolumina gearbeitet. Zusätzlich wurde auf eine subkonfluente Zelldichte von etwa 50 bis 60% geachtet, um den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf der Zellen ständig gewährleisten zu können [159].

Tamoxifen und Diarylpropionitrile

Die Arbeitskonzentrationen von Tamoxifen und DPN wurden durch Konzentrationsverdünnungsreihen in MTT-Vitalitätstests ermittelt und decken sich mit verwendeten Konzentrationen der gängigen Literatur. Für die Studien mit DPN (Diarylpropionitrile, Biozol, München, Deutschland, Daten nicht gezeigt) wurden die Zellen mit einer Konzentration von 10 nM DPN inkubiert. Die Tamoxifenversuchsreihen (4-Hydroxytamoxifen, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurden mit einer Konzentration von 100 nM 4-Hydroxytamoxifen durchgeführt. Mit Tamoxifen wurde auf Grund der Lichtinstabilität des S-Enantiomeres durchgehend lichtgeschützt gearbeitet.

2.2.5 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Die Zellen wurden nach Beendigung der Versuchsdauer und Erreichen einer Plattenkonfluenz von ca. 50% mit eiskalter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vom Untergrund der Gewebekulturplatten gelöst und zusammen mit 1 ml kaltem PBS mit der Pipette (Pipetman Classic, Gilson, Middleton, USA) in Reagiergefäße (Reagiergefäß, Micro tube, 1,5 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgenommen. Die Reagiergefäße wurden dann in der Zentrifuge (Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 4° Celsius mit 800 rpm 8 Minuten lang zentrifugiert und gekühlt. Daraufhin wurde mit der Pipette der Überstand über dem Zellsediment abgesaugt und 100 µl Urea-Puffer (Urea-Zelllysepuffer) und 1 µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Weiter wurden die Zellen in den Reagiergefäßen mit Ultraschall (Sonopuls GM 3100 / HD 3100, Bandelin, Berlin, Deutschland) in Fragmente zerkleinert. Nach erneuter Zentrifugation mit 13000 rpm wurde die Suspension über dem Sediment behalten, mittels Pipette in neue Reagiergefäße überführt und bei -20° Celsius tiefgefroren und aufbewahrt.

2.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Messung des Proteingehalts der Versuchsproben wurde das DC Protein-Assay-Kit (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet und nach Anleitung vorgegangen. Sein Prinzip beruht auf einer Biuret-Reaktion, bei der Verbindungen mit mindestens zwei Peptidbindungen in wässrig-alkalischer Lösung einen farbigen Komplex mit Cu^{2+} -Ionen eingehen und dabei zu Cu^{1+} reduziert werden. Diese reagieren mit Bicinchinonsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) und bilden einen violettfarbenen Komplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde dann mittels Spektrophotometer für Mikrotiterplatten (SLT Rainbow, SLT LAB Instruments GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 700 nm bestimmt. Da die Farbintensität direkt mit den reagierenden Komplexen und somit direkt mit der Proteinmenge korreliert, konnte anhand einer Albumin-Standardverdünnungsmessreihe (Albumin, Bio-Rad, München, Deutschland) die jeweilige Proteinkonzentration ($\mu\text{g} / \mu\text{l}$) bestimmt werden.

2.2.7 MTT-Assay

Der MTT-Assay dient als Vitalitätstest. Er zeigt die Anzahl an lebenden Zellen nach einer bestimmten Behandlung / Versuchsdurchführung und überprüft, ob quantitativ-vergleichende Proteinmessungen zulässig sind.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) ist ein gelber Farbstoff, der von Zellen leicht aufgenommen wird. Intrazellulär wird er von Dehydrogenasen lebender Zellen zu Formazan reduziert. Das Formazan bildet Kristalle und kann die Zelle nicht mehr verlassen, es reichert sich so in vitalen Zellen an. Die Menge der violetten Formazan-Kristalle korreliert dann direkt mit der Anzahl der lebenden Zellen. Nach Lysieren der Zellen mittels eines Isopropanollysepuffers kann die Menge quantitativ über Photometrie ermittelt werden.

Für den MTT-Assay wurden die Zellen in 96-Wellplatten (Tissue Culture Platte, steril, 96 Well mit Abdeckplatte) ausgesät und mit 100 μl Medium versehen. Die Zellen wurden analog zu den jeweiligen Versuchen behandelt. Zusätzlich wurden MTT-Lösungsmittelkontrollen mitgeführt. Zur Auswertung der Versuche wurde das Medium dann mit 25 μl MTT-Lösung versetzt und für weitere 1 bis 2 Stunden

inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Um die Menge an Farbstoff photometrisch messen zu können, wurden die Zellen mit je 100 µl Lysepuffer 5 Minuten lysiert. Die Absorption konnte dann bei 570 nm im Spektrophotometer ermittelt werden.

2.2.8 Transfektion mit siRNA

Die Transfektion wurde in einer 6-Wellplatte 24 h nach Aussaat der Zellen mit 100 pmol / Well siRNA und 5 µl / Well Lipofectamine RNAiMax Transfektionsreagenz (Invitrogen, Darmstadt) für 48h bei 37°C nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Small Interfering RNA (siRNA) unterdrückt gezielt die Expression eines bestimmten Proteins in der Zelle durch Hemmung der Translation der Proteinbiosynthese. Das Wirkungsprinzip beruht darauf, dass kurze Ribonukleinsäure-Molekül-Ketten (die siRNA) an komplementäre Nukleotidsequenzen der messenger-RNA (mRNA) binden und so den selektiven Abbau dieser mRNA induzieren. Die siRNA wirkt so als ein Bestandteil des RISC (RNA-Induced Silencing Complex), der für selektive Gen-Inhibierung zuständig ist.

2.2.9 Western-Blot

Zum Nachweis von HIF-1 α -, ARNT-, HIF-2 α -, ER- α - und ER- β -Protein wurden die Gesamtzelllysate mittels Western Blot-Methode analysiert. Dazu wurden jeweils 50 µg Protein des Zelllysates mit Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 100° Celsius gekocht und anschließend in diskontinuierlichem SDS-Polyacrylamidgel (10%) mit Hilfe eines Mini-Protean 3 Cell system (Bio-Rad, München, Deutschland), bei 75 V angelegter Spannung, massenabhängig aufgetrennt. Danach wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel, unter Anlegen einer 10V Spannung, elektrophoretisch (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Hybond-ECL-Membrane, GE Healthcare, München, Deutschland) übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen zu blockieren, wurden diese für 2 Stunden mit 5% Magermilchpulver in PBS geschwenkt. Anschließend wurden die jeweils spezifischen Primärantikörper dazugegeben und über Nacht bei 4° Celsius bzw. für 4 bis 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die

Membranen einer 3 mal 10 minütigen Waschung mit PBS unterzogen. Die darauffolgende 2. Inkubation mit dem jeweils zugehörigen Sekundärantikörper wurde für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur und durch eine weitere Waschung für 3 mal 10 Minuten mit PBS vollzogen. Danach wurden die Membranen 1 Minute in ECL (Amersham ECL (enhanced chemiluminescence substrate), GE Healthcare, München, Deutschland) geschwenkt, dann auf einen Hyperfilm (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare, München, Deutschland) aufgelegt und in der Dunkelkammer, je nach Signalstärke, für 3 bis 30 Minuten belichtet. Ein mit auf die Membranen aufgetragener Proteinmarker (PageRuler, Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) ermöglichte die Zuordnung der spezifischen Banden nach Molekülgröße (kDa).

2.2.10 Densitometrie

Die quantitative Auswertung der einzelnen Proteinbanden der Western-Blots wurde mittels densitometrischem Verfahren objektiviert. Der artifizielle Hintergrund eines Blots wurde hierbei von der Intensität der individuell zu messenden Fläche abgezogen und dieser Wert zur Laminkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Es wurde das Computerprogramm AIDA Image Analyzer v.4.27 (Raytest, München, Deutschland) nach Anleitung verwendet.

2.2.11 Isolation von RNA und Umwandlung in cDNA

Zelluläre Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems, Darmstadt) im RNA-Cell-Programm nach Herstellerprotokoll und vorgegebenen Puffern isoliert. Hierfür wurden die Zellen in 24-Wellplatten ausgebracht und nach der jeweiligen versuchsspezifischen Behandlung mit PBS gewaschen und in 500 µl Lysepuffer lysiert. Je 0,5 µg der isolierten zellulären Gesamt-RNA wurden mit 2,5 µl Oligo(dT)₂ (50 µM) und DEPC-H₂O für 15 Minuten bei 68°C im Primus 96 Plus Thermal Cycler (MWG Biotech AG, Martinsried) präinkubiert. Anschließend wurde der Probenansatz für 15 Minuten auf 4°C gekühlt. Parallel wurde ein Master-Mix mit 0,5 µl Reverse-Transcriptase Superscript III (Invitrogen, Darmstadt), 5 µl zugehöriger RT-Puffer und 5 µl dNTP Basenmix (10 mM) für jede zu messende Probe erstellt. Der Master-Mix wurde darauf folgend mit 10,5 µl des Präinkubationsansatzes

zusammengefügt und im Primus 96 Plus Thermal Cycler 45 Minuten bei 42 °C, 45 Minuten bei 52°C und 10 Minuten bei 100 °C inkubiert.

2.2.12 Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Für die Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden 5 µl gewonnene cDNA mit SensiMix SYBR HI-ROX Mastermix (Bioline, Luckenwalde) und den gen-spezifischen TaqMan Gene Expression Assays (Hs01100353_m1, Hs00174860_m1 und Hs01100353_m1, Applied Biosystems, Darmstadt) nach Protokollangaben des Herstellers amplifiziert. Das L28-Housekeeping-Gen (sense: 5'-ATGGTCGTGCGGAACTGCT-3' and reverse: 3'-TTGTAGCGGAAGGAATTGCG-5', custom, Ivtrogen, Darmstadt) wurde mit KAPA SYBR FAST Universal (PeqLab, Erlangen) als Normalisierungsstandard verwendet. Die qRT-PCR wurde schließlich mit Hilfe des ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: Initialer Polymeraseaktivierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 45 Zyklen mit 95°C für 15 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 72°C für 20 Sekunden. Wasserkontrollproben wurden stets mitgeführt. Die relativen mRNA-Mengen wurden n = 4 bis 10 fach bestimmt und berechnet und verglichen mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode.

Die qRT-PCR ermöglicht die zellulär-vorhandene mRNA-Menge eines bestimmten Zielgens indirekt über die Amplifikation von cDNA zu messen und zu vergleichen.

2.3 Statistische Auswertungen

Um eine möglichst gute Verlässlichkeit (Reliabilität) sicherzustellen, wurden alle Experimente 3 bis 10 mal unabhängig voneinander durchgeführt (n = 3 - 10) und nur solche Messwerte einbezogen, die sich innerhalb der Mehrfachbestimmungen ähnelten, jeweils dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SD). Für die statistische Auswertung wurde die GraphPad InStat 3.06 Software (GraphPad, La Jolla, USA) benutzt. Durchgeführt wurden der Unpaired t-Test korrigiert nach Welch, die ANOVA-Analyse und der Post-Test nach Dunnett. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (* = P < 0,05, ** = P < 0,005, *** = P < 0,001).

3. Ergebnisse

3.1 MTT-Vitalitätsassay

Um eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Experimente zu gewährleisten, wurden MTT-Vitalitätstests mit den Behandlungszeiträumen und Konzentrationen der einzelnen Substanzen untersucht. Die ermittelten Konzentrationen decken sich mit der gängigen Literatur. Abbildung 6 zeigt stellvertretend, dass MCF-7 Zellen unter Hypoxie langsamer proliferieren als unter Normoxie. Um aus dieser Tatsache entstehende Fehlerquellen zu minimieren, wurden die anschließenden Versuche doppelt normalisiert bzw. kontrolliert durchgeführt. So wurden bei der Westernblot-Methode nach Proteinbestimmung gleiche Mengen an Protein geladen. Bei der anschließenden densitometrischen Auswertung wurden alle erhobenen Werte als relative Werte bezogen auf die zugehörige Lamin-Kontrolle angegeben. In Bezug auf die RT-PCR-Methode wurden gleiche Mengen an RNA eingesetzt. Die erhobenen Werte wurden anschließend mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode auf eine L28-Gen-Kontrolle bezogen.

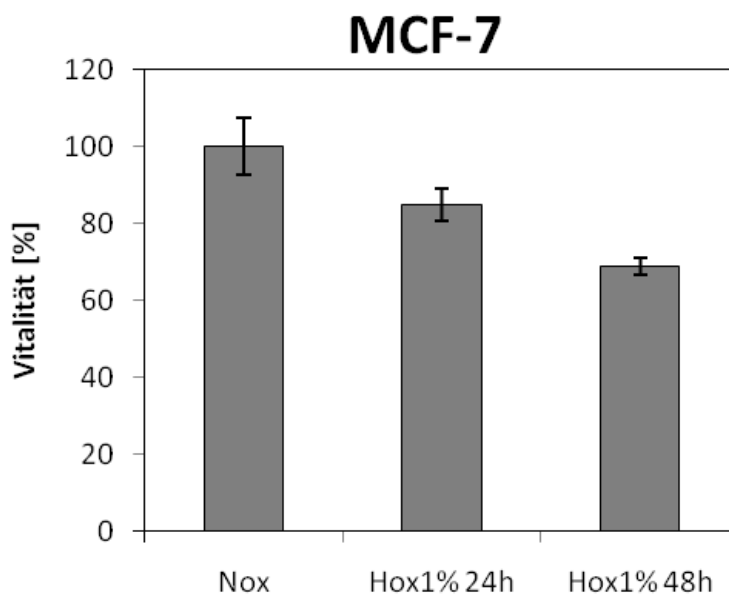


Abb. 6 MTT-Vitalitätsassays von MCF-7 Zellen unter 1%iger hypoxischer Behandlung. MCF-7-Zellen wurden in Normoxie (Nox) oder 1% Hypoxie (1% O₂) für 24 Stunden (Hox1% 24h) bzw. 48 Stunden (Hox1% 48h) gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mg / ml MTT-Lösung für 1 Stunde inkubiert, lysiert und photometrisch die Extinktion bei 570 nm gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SD). (n = 3; m = 18).

3.2 Östrogenrezeptorexpression unter Hypoxie und der Zusammenhang mit den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren

MCF-7 Brustkrebszellen bilden beide Unterformen der Östrogenrezeptoren aus (ER- α und ER- β). Um eine Beeinflussung der Rezeptorexpression durch Hypoxie zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen unter Normoxie (21% O₂) angezüchtet und anschließend für 48 Stunden in einer künstlichen Atmosphäre mit 1% O₂ (Hox1% 48h) inkubiert. Um die Gesamtheit an Östrogenrezeptoren (ER) in der Zelle zu beurteilen, also membranständige, zytosolische und kernständige ER, wurde mittels Gesamtzelllysaten gearbeitet. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, nahm die ER- α -Konzentration nach 48 Stunden 1% Hypoxie signifikant ab, oft bis unter die Nachweisgrenze der Western-Blot-Methode. ER- β zeigte ein ähnliches Verhalten. ER- β nahm in seiner Konzentration ebenfalls nach 48 Stunden 1% Hypoxie um bis zu 50% ab. HIF-1 α wurde zur Kontrolle der hypoxischen Induktion mit überprüft.

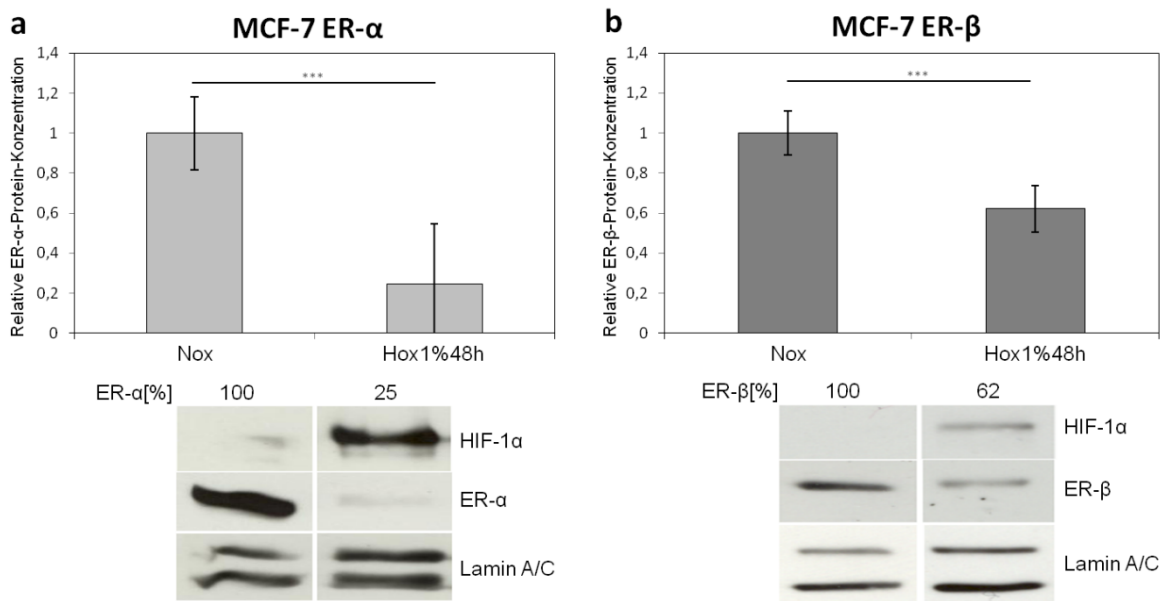


Abb. 7 Western-Blot Analyse der ER- α und ER- β -Proteinexpression in MCF-7 Gesamtzelllysaten (50 μ g Protein geladen). Zellen wurden unter normoxischen (21% O₂) Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden (Hox1% 48h) unter 1% hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Das Diagramm zeigt die hypoxische Reduktion von ER- α und β im Verhältnis zur jeweiligen Normoxiekontrolle (Nox), gemessen mittels Densitometrie. MW $\pm$ SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 5 - 6). Mittelwerte sind als Prozentangabe über einem stellvertretenden Western-Blot mit abgebildet. HIF-1 α -Protein wurde als Hypoxiekontrolle bestimmt. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

3. Ergebnisse

Um eine Übertragbarkeit dieser Beobachtungen auf andere östrogensensible Brustkrebszellen zu überprüfen, wurden T47D Zellen analog zu MCF-7 Zellen behandelt (Abb. 8). Auch hier zeigte sich eine deutliche Reduktion von ER- α nach 48 Stunden Hypoxiebehandlung. Der ER- β wurde, analog zu den MCF-7 Zellen, in seiner Konzentration ebenfalls vermindert.

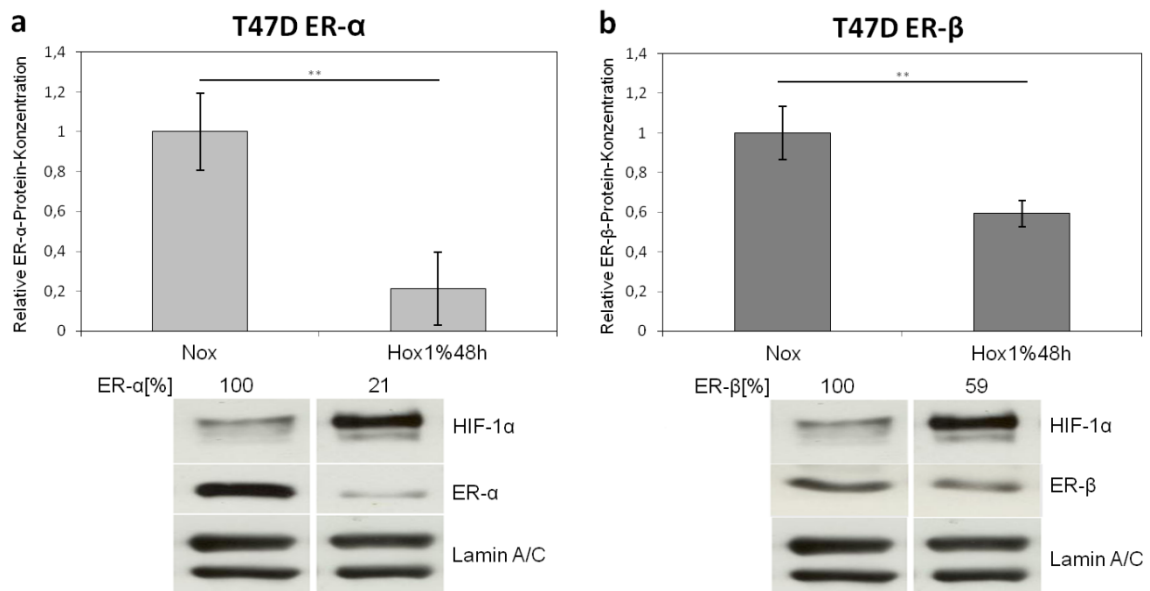


Abb. 8 Western-Blot Analyse der ER- α - und ER- β -Proteinexpression in T47D Gesamtzelllysaten (50 μ g). Zellen wurden unter normoxischen (21% O₂) Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden (Hox1% 48h) unter 1% hypoxischer Atmosphäre (1% O₂) inkubiert. Das Diagramm zeigt die hypoxische Reduktion von ER- α und β im Verhältnis zur jeweiligen Normoxiekontrolle (Nox), gemessen mittels Densitometrie. MW $\pm$ SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 3 - 4). Mittelwerte sind als Prozentangabe über einem stellvertretenden Western-Blot mit abgebildet. HIF-1 α -Protein wurde als Hypoxiekontrolle bestimmt. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

Zur Validierung dieser Befunde wurden weitere Krebszelllinien untersucht (Abb. 9a und b). Es wurden hierbei auch Zellen auf ER- α untersucht, die als „östrogenrezeptor-negativ“ angesehen werden, weil ihre Konzentrationen an ER- α sehr gering oder nicht nachweisbar sind. Weiterhin sollte ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der Östrogenrezeptorexpression und den HIF- α -Faktoren untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen zusätzlich mit dem Hypoxie-Mimetikum Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. „ER- α -negative“ Zelllinien zeigten keine oder kaum ER- α -Expression. Es ließ sich die Konzentration an ER- α bei HeLa, MD-A-MB-231 und MX-1 Zellen durch CoCl₂ erhöhen bzw. induzieren und dadurch der ER- α /

3. Ergebnisse

Quotient verändern. Bei MD-A-MB-231 und MX-1 ließ sich die Konzentration an ER- α durch CoCl₂ so stark erhöhen, dass die Nachweisgrenze der Western-Blot-Methode überschritten wurde und ER- α nachgewiesen werden konnte. ER- β konnte in allen untersuchten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden.

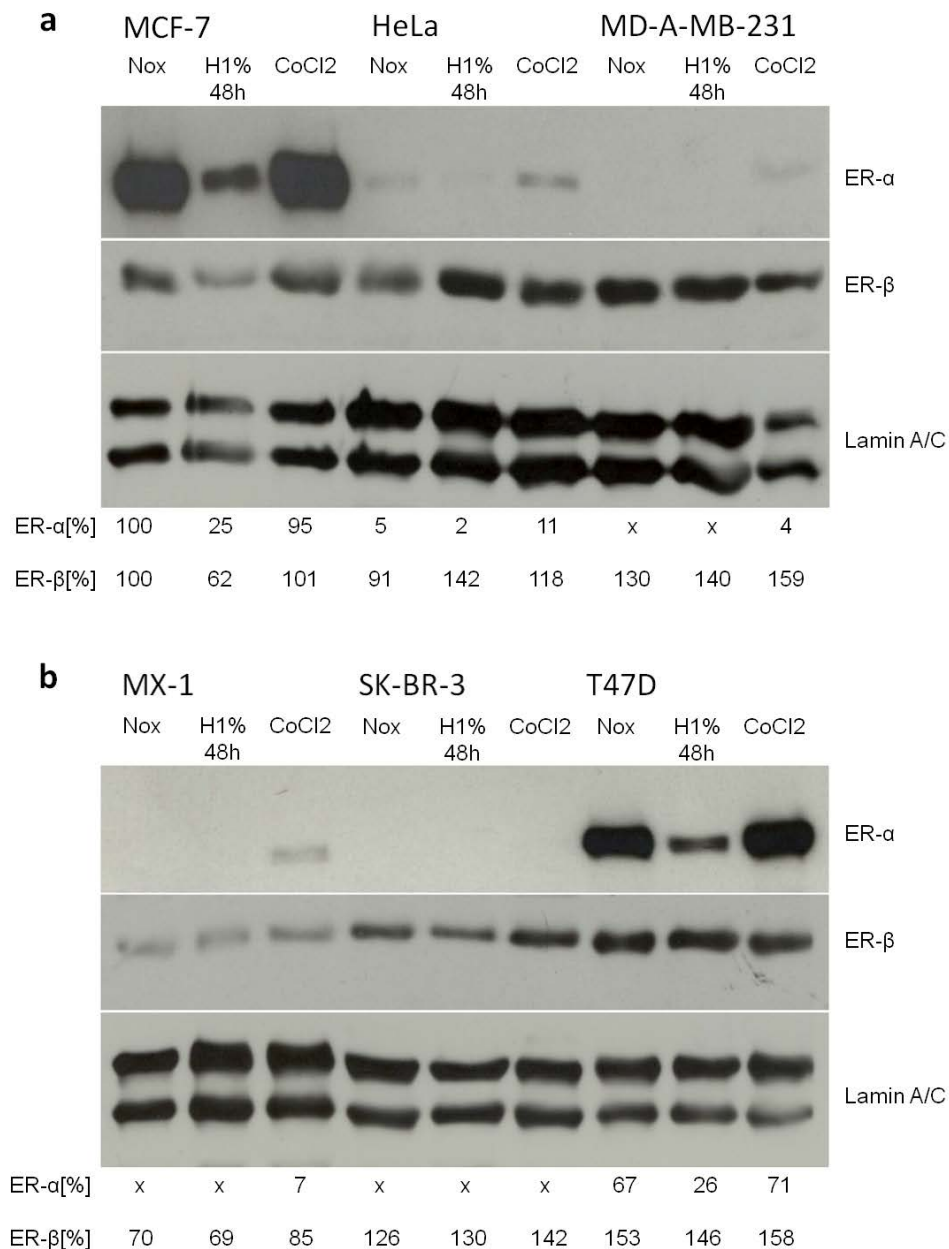
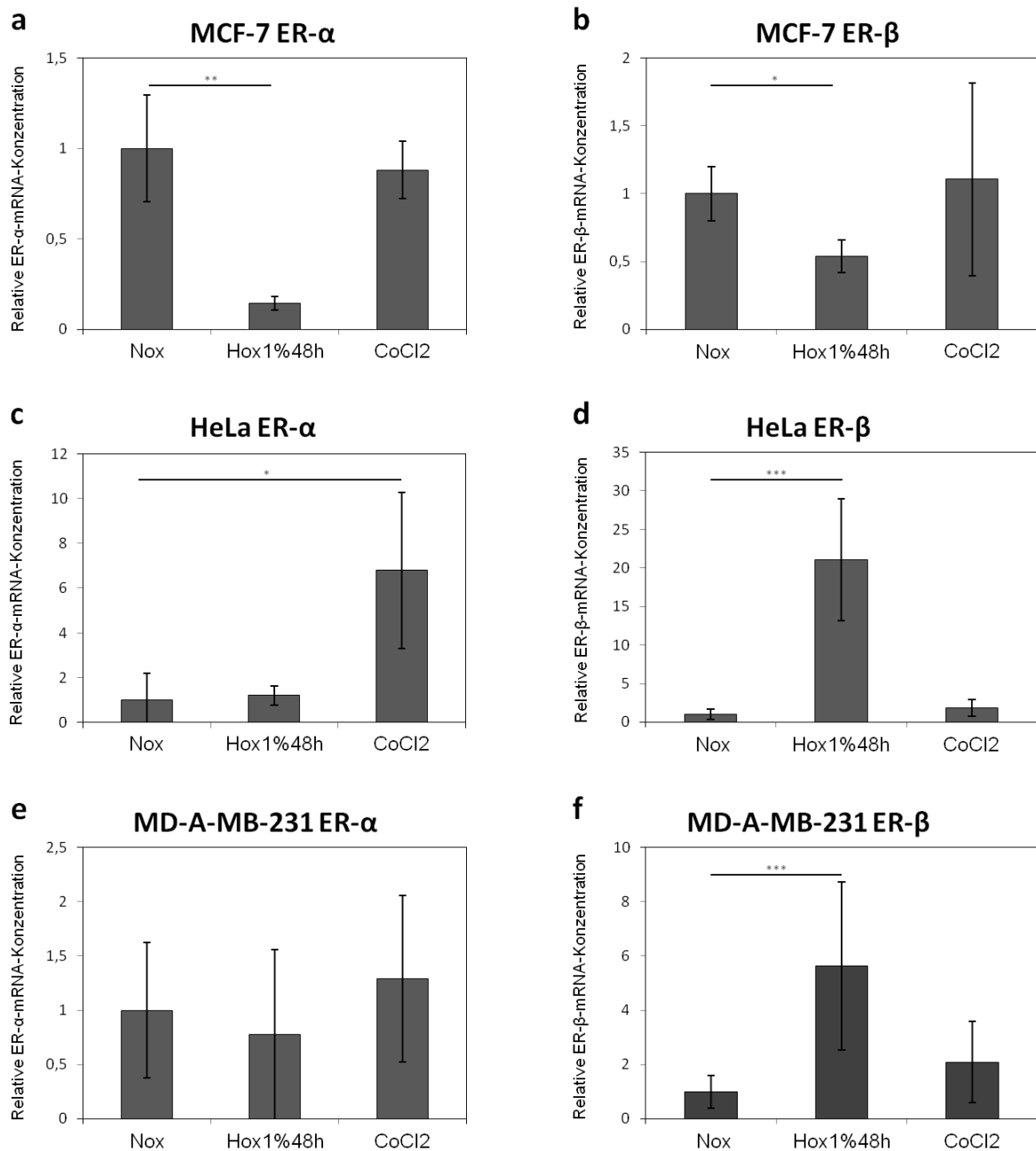


Abb. 9 Western-Blot Analyse von ER- α - und ER- β -Proteinspiegel in MCF-7, HeLa, MD-A-MB-231, MX-1, SK-BR-3 und T47D Gesamtzelllysaten (50 μ g). Zellen wurden unter normoxischen (21% O₂) Bedingungen angezüchtet und anschließend für 48 Stunden entweder unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) (H1% 48h) oder unter normoxischer Atmosphäre mit 50 μ M Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) inkubiert. Proteinspiegel wurden mittels Densitometrie bestimmt und sind in Prozent zur MCF-7- Normoxiekontrolle (Nox) angegeben. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

3. Ergebnisse

Um die beschriebenen Reaktionen der Östrogenrezeptorexpression auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden MCF-7, HeLa, MD-A-MB-231, MX-1 und T47D Zellen mit der quantitativen RT-PCR-Methode auf ER- α - und ER- β -mRNA untersucht (Abb. 10a - j).



3. Ergebnisse

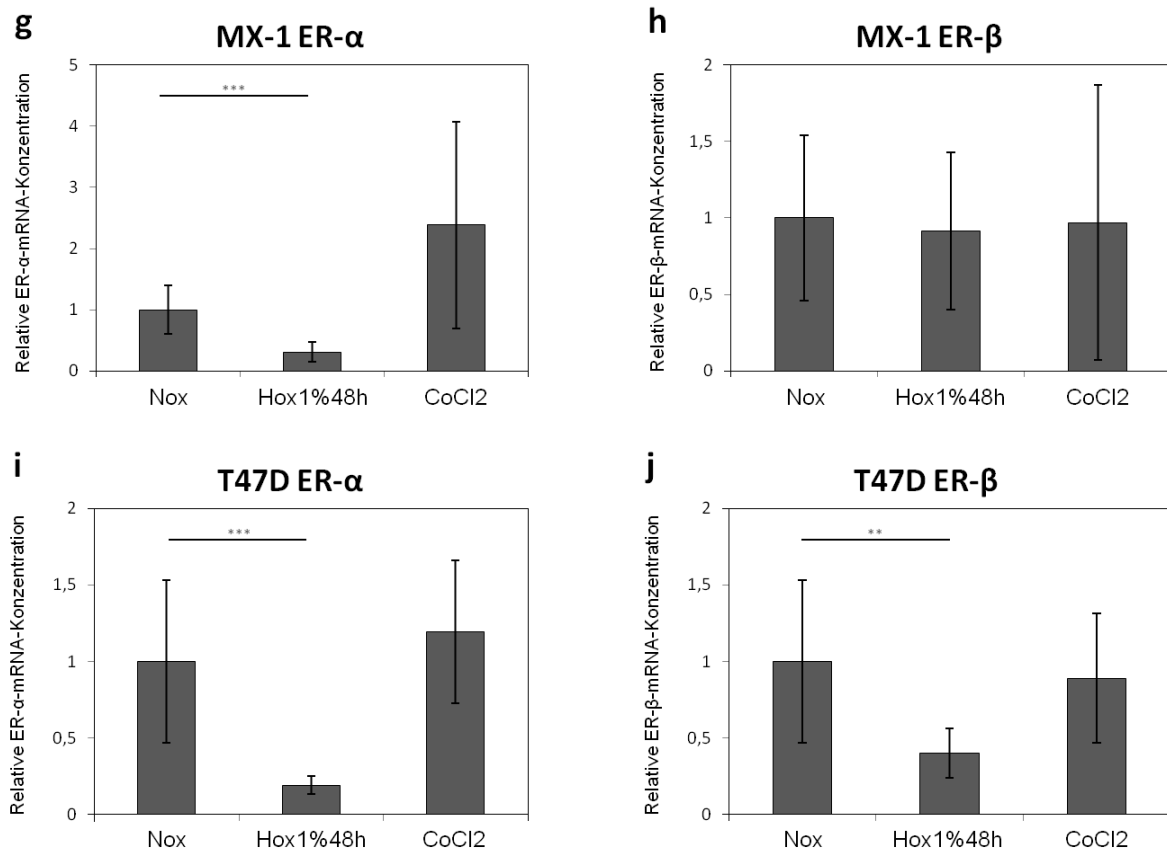


Abb. 10 Quantitative RT-PCR von ER-α und ER-β-mRNA-Konzentrationen in MCF-7, HeLa, MD-A-MB-231, MX-1 und T47D Zellen (0,2 µg mRNA geladen). Zellen wurden unter Normoxie (21% O₂) angezüchtet und anschließend für 48 Stunden mit 1% Hypoxie oder 50 µM Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) behandelt. L28 wurde zur Normalisierung verwendet. Relative Mengen an mRNA wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der relativen Menge an ER-mRNA im Verhältnis zur Normoxiekontrolle (Nox). MW $\pm$ SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 4 -12)

Weiterhin wurden MCF-7 und T47D Zellen transient mit HIF-1α-siRNA transfiziert und anschließend für 24 Stunden unter 1% Hypoxie gehalten (Abb. 11). Zellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden (BlockIt), zeigten die normale HIF-1α-Induktion. Schon nach 24 Stunden Hypoxie waren leicht reduzierte ER-α-Konzentrationen erkennbar. Der Knock-down der HIF-1α-Expression entsprach im Durchschnitt bei MCF-7 Zellen 85% und bei T47D 70%. Hieraufhin reagierten die Zellen mit einer ausgeprägten Reduktion der ER-α-Konzentration und einer deutlichen Induktion von ER-β. Die Rezeptorexpression ist demnach entgegengesetzt, wenn HIF-1α-Mangel unter Hypoxie herrscht.

3. Ergebnisse

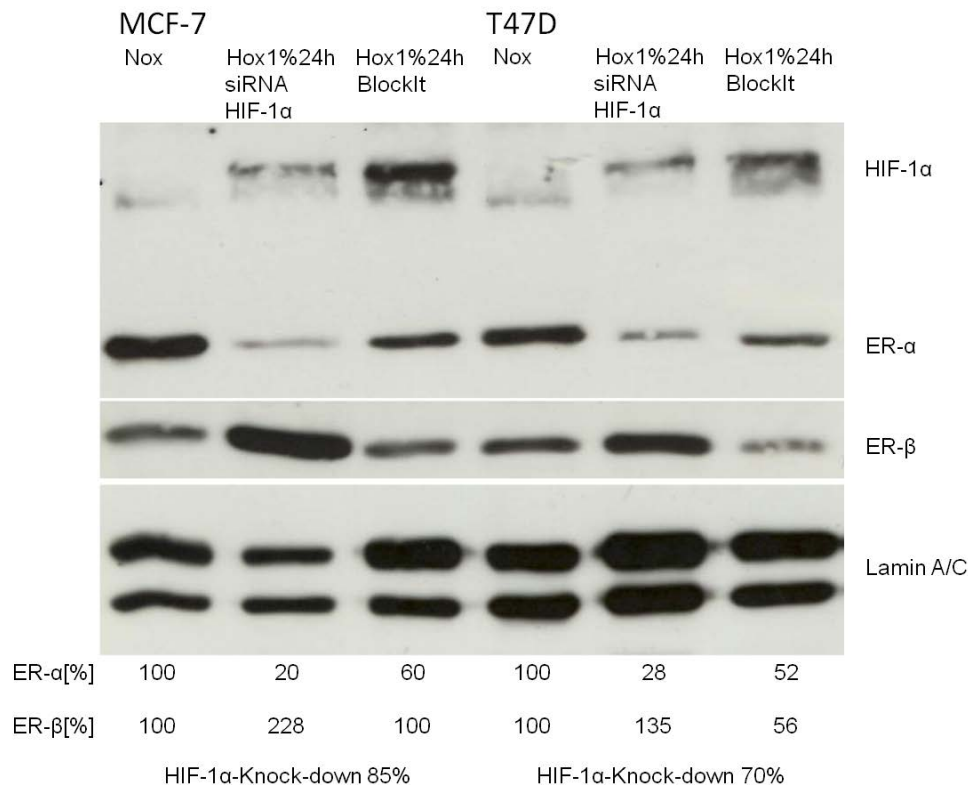
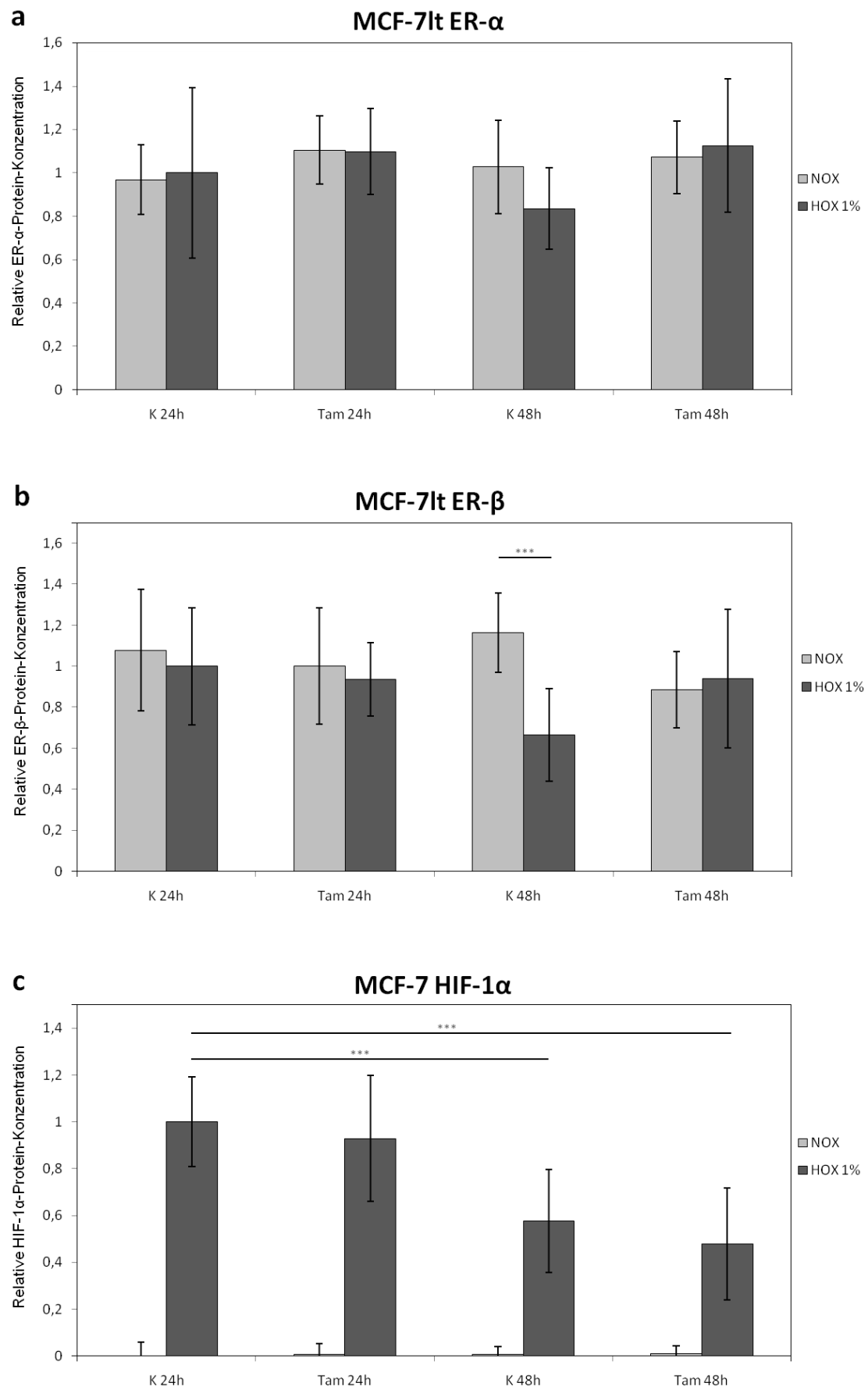


Abb. 11 Western-Blot Analyse der ER-Proteinkonzentrationen in MCF-7 und T47D Gesamzelllysaten nach HIF-1α-Knock-down (50 µg). Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) kultiviert und mit Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) und HIF-1α-siRNA (Hox1% 24h siRNA aHif-1a) oder als Negativkontrolle mit unspezifischer siRNA (BlockIt™, Invitrogen, Hox1% 24h siRNA BlockIt) transient transfiziert. ER-α- und ER-β-Proteinspiegel wurden mittels Densitometrie bestimmt und die Mittelwerte in Prozent im Verhältnis zur Normoxiekontrolle dargestellt. Als Kontrolle ist der Knock-down von HIF-1α mit abgebildet und als Durchschnittswert der Versuche in Prozent angegeben. Lamin A/C dient als Ladekontrolle. Ein stellvertretender Westernblot ist dargestellt. (n = 4)

Während der Durchführung der Versuche wurde beobachtet, dass MCF-7 Zellen, die länger in Kultur gehalten wurden, die Fähigkeit verlieren, auf Hypoxie mit Verminderung der ER-α-Expression zu reagieren. Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen für 50 Wochen in Kultur (MCF-7lt) gehalten und die Östrogenrezeptorexpression unter Normoxie und Hypoxie beobachtet (Abb. 12). Weiter wurden diese Zellen auf ihr Reaktionsmuster bezüglich HIF-1α und HIF-2α unter Hypoxie untersucht, welches sich von den wildtyp (wt) Zellen nicht unterscheidet. Zusätzlich wurden die MCF-7lt Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen (Tam) behandelt, um einen Einfluss auf die ER- und HIF-Proteine dieser Zellen zu erforschen.

3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

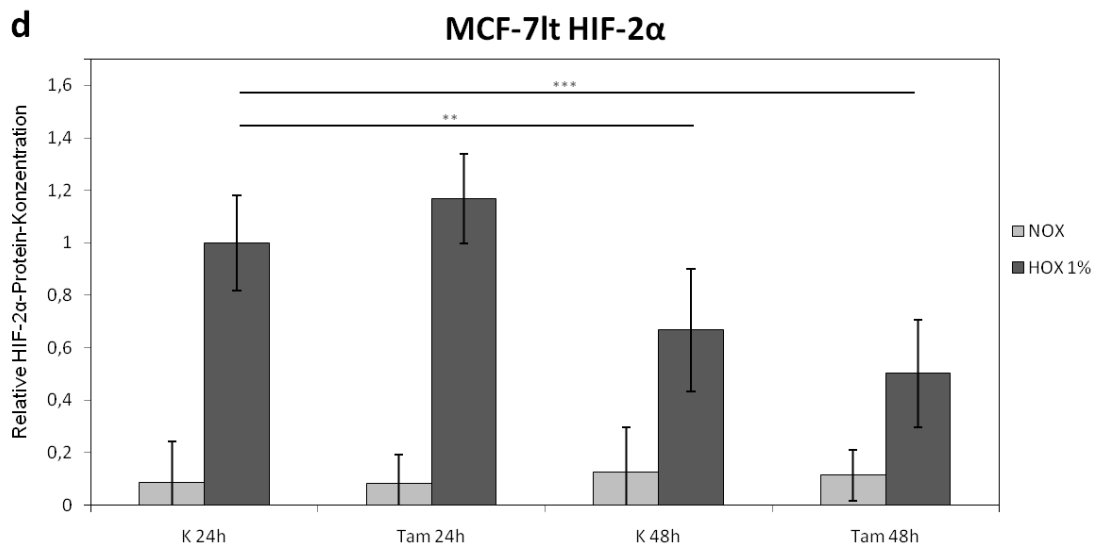


Abb. 12 Western-Blot Analyse der ER- α -, ER- β -, HIF-1 α - und HIF-2 α -Proteinexpression in MCF-7lt (long term incubation, > 50 Wochen) Gesamtzelllysaten (50 μ g). Zellen wurden unter normoxischen (21% O₂) Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 oder 48 Stunden mit normoxischer (NOX) oder 1% hypoxischer Atmosphäre (HOX 1%) inkubiert (K 24h, K 48h). Zusätzlich wurden Zellen mit 100 nM 4-Hydroxytamoxifen behandelt (Tam 24h, Tam 48h). Das Diagramm zeigt die Proteinexpression im Verhältnis zur 24 h Kontrolle (K 24h), gemessen mittels Densitometrie. MW $\pm$ SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 9 - 12).

Um das Überleben der MCF-7lt Zellen unter Hypoxie, Tamoxifen und Hypoxie kombiniert mit Tamoxifen zu untersuchen, wurden MTT-Vitalitätsassays durchgeführt (Abb. 13). Es zeigte sich, dass die MCF-7lt Zellen nicht signifikant durch die Gabe von 4-Hydroxytamoxifen in ihrer Proliferation gehemmt werden.

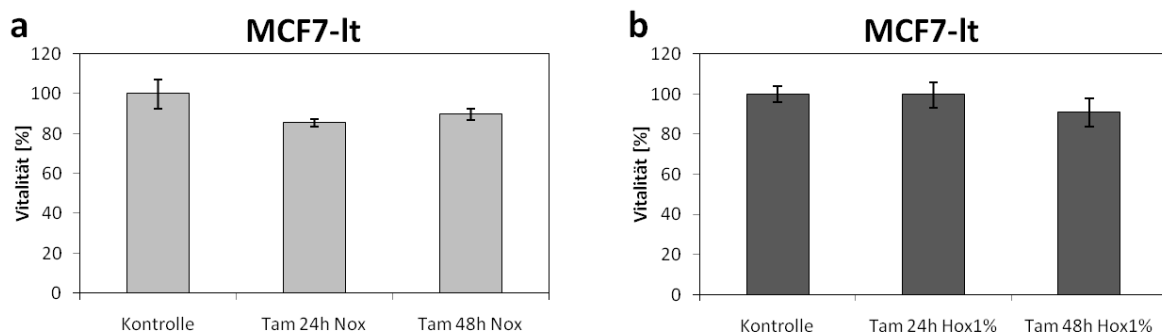


Abb. 13 MTT-Vitalitätsassays von MCF-7lt Zellen unter Behandlung mit Tamoxifen (a) oder Hypoxie kombiniert mit Tamoxifen (b). Zellen wurden mit 100 nM 4-Hydroxytamoxifen (Tam) für 24 oder 48 Stunden unter Normoxie oder 1% Hypoxie inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mg / ml MTT-Lösung für 1 Stunde inkubiert, lysiert und photometrisch die Extinktion bei 570 nm gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen als MW $\pm$ SD nach Vorbehandlung im Vergleich zur lösungsmittelbehandelten Zellpopulation als Kontrolle. (n $\geq$ 3; m $\geq$ 18).

3.3 Die Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator Expression unter Hypoxie und der Einfluss der Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren

Der Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT, HIF-1 β) gehört, wie seine Heterodimerisierungspartner HIF- α , zur Gruppe der basic-Helix-Loop-Helix PER/ARNT/SIM (bHLH/PAS) Proteinfamilie. Im Gegensatz zu den HIF- α -Untereinheiten gilt ARNT als konstitutiv exprimiert und durch Hypoxie somit nicht induzierbar [160–163]. ARNT wird als ubiquitär vorhanden angesehen und soll nicht als limitierender Faktor in die Zellhomöostase eingreifen [164]. Obwohl vereinzelt Beobachtungen beschrieben worden sind, dass die ARNT-Expression beeinflussbar ist, ist dieses Thema bisher nicht näher erforscht worden [120,165,166]. Um dieses Problem zu untersuchen, wurde quantitativ die Menge an Protein mittels Western-Blot und anschließender Densitometrie sowie die mRNA mittels qRT-PCR gemessen. ARNT liegt hauptsächlich im Zellkern vor [160]. Da es jedoch einem ständigen Kernimport und Export unterliegt, wurden Gesamtzelllysate hergestellt. Diese Arbeit zeigt auf, dass die ARNT-Proteinexpression zelllinienspezifisch pO₂-abhängig variiert, obwohl ARNT die Oxygen Dependent Degradation Domain (ODDD) fehlt.

Um ARNT-Proteinspiegel zu bestimmen, wurden MCF-7 Zellen unter Normoxie (21% O₂) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend 24 Stunden in 1% Hypoxie (1% O₂) oder 48 Stunden in 1% Hypoxie inkubiert. Gesamtzelllysate wurden mittels Western-Blot analysiert und anschließend densitometrisch ausgewertet. HIF-1 α wurde als Kontrolle für eine hypoxische Induktion analysiert. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, wurden die ARNT-Proteinspiegel in MCF-7 Zellen durch Hypoxie erhöht. Eine Behandlung mit 1% Hypoxie für 24 Stunden führte zu einem signifikant größeren Anstieg von ARNT als 48 Stunden 1% Hypoxie.

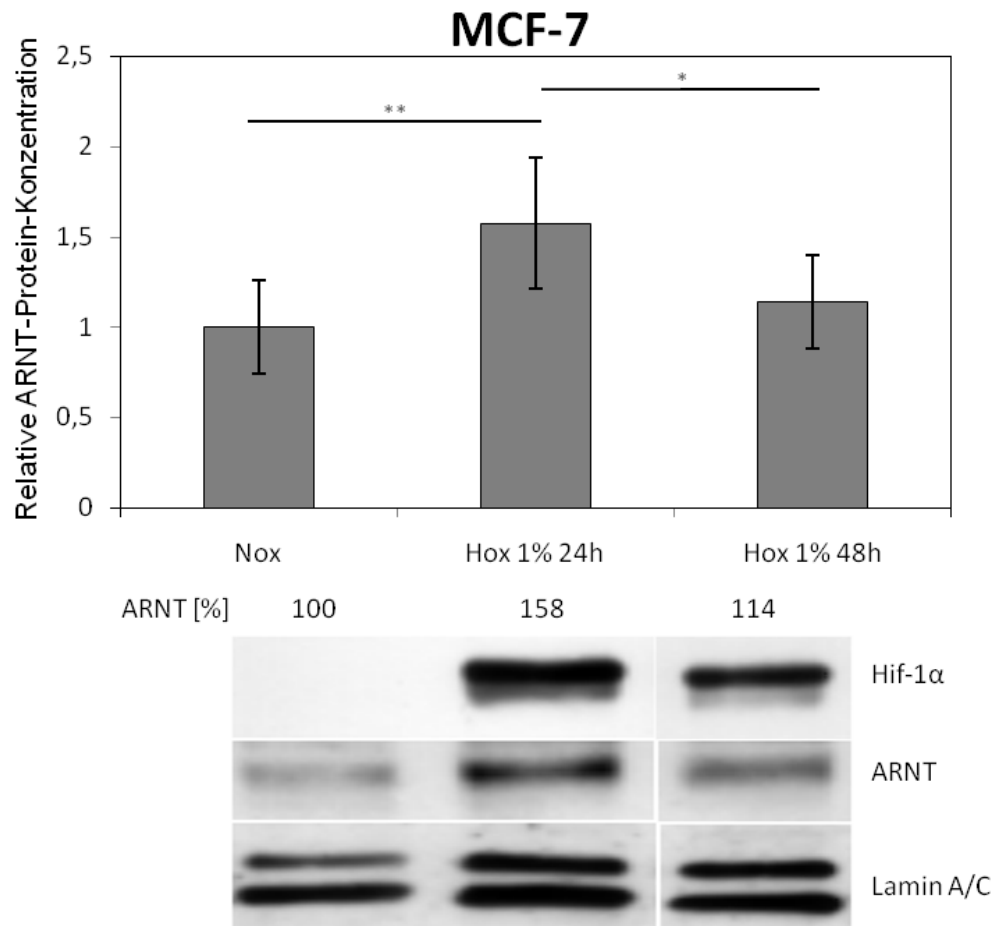


Abb. 14 Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinexpression in MCF-7 Gesamtzelllysaten (50 µg Protein geladen). Zellen wurden unter normoxischen (21% O₂) Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden (Hox 1% 24h) oder 48 Stunden (Hox 1% 48h) unter 1% hypoxischer Atmosphäre inkubiert. Das Diagramm zeigt die hypoxische Induktion von ARNT im Verhältnis zur jeweiligen Normoxiekontrolle (Nox), gemessen mittels Densitometrie. MW ± SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 6 -11). Mittelwerte sind als Prozentangabe über einem stellvertretenden Western-Blot mit abgebildet. HIF-1α-Protein wurde als Hypoxiekontrolle bestimmt. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

Um Effekte längeranhaltender Hypoxie zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen bis zu 96 Stunden in Hypoxie (1% O₂) gehalten. Hierbei zeigten MCF-7 Zellen einen initialen Anstieg der ARNT-Proteinkonzentration schon nach 12 Stunden. Eine weitere Begasung mit 1% O₂ führte zu einer zeitabhängigen Verminderung der ARNT-Spiegel in Richtung der normoxischen Ausgangskonzentrationen (Abb. 15).

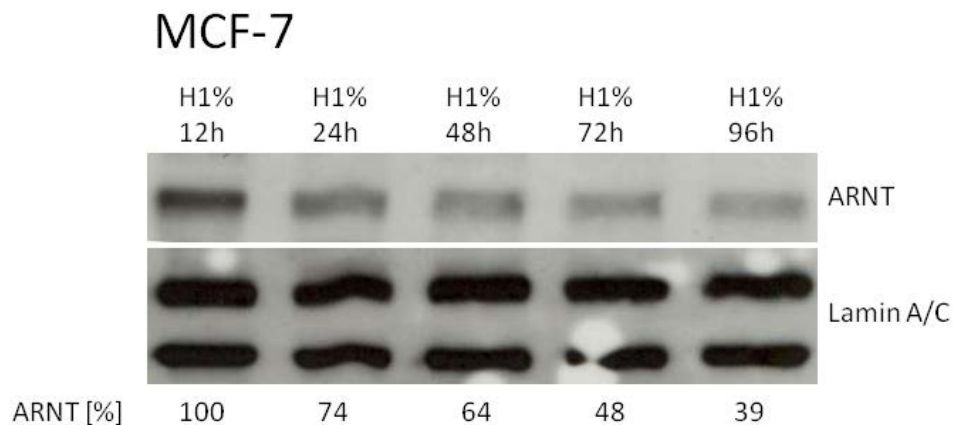


Abb. 15 Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinexpression in MCF-7 Gesamtzelllysaten (50 µg). Zellen wurden unter hypoxischen (1% O₂) Bedingungen für 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h gehalten. ARNT-Proteinlevel wurden mittels Densitometrie gemessen und sind in Prozent im Verhältnis zu 12 Stunden 1% Hypoxie (H1% 12h) angegeben. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

Um Auswirkungen unterschiedlich intensiver Hypoxie auf ARNT zu untersuchen, wurden MCF-7 Zellen unter 3% Hypoxie (3% O₂) und 1% Hypoxie (1% O₂) für 12 bzw. 24 Stunden inkubiert (Abb. 16a). Um interzelluläre Unterschiede der ARNT Expression zu untersuchen, wurden HeLa, Hep3B und REPC Zellen identisch zu MCF-7 Zellen behandelt (Abb. 16b - d). In allen hypoxisch behandelten Zellen stiegen die ARNT-Proteinspiegel an. 1% Hypoxie (1% O₂) führte zu einer schnelleren Induktion aber auch zu einer schnelleren Normalisierung der ARNT-Proteinspiegel als 3% Hypoxie (3% O₂). Unter Behandlung mit 3% Hypoxie zeigte sich eine maximale ARNT Induktion nach 24 Stunden.

3. Ergebnisse

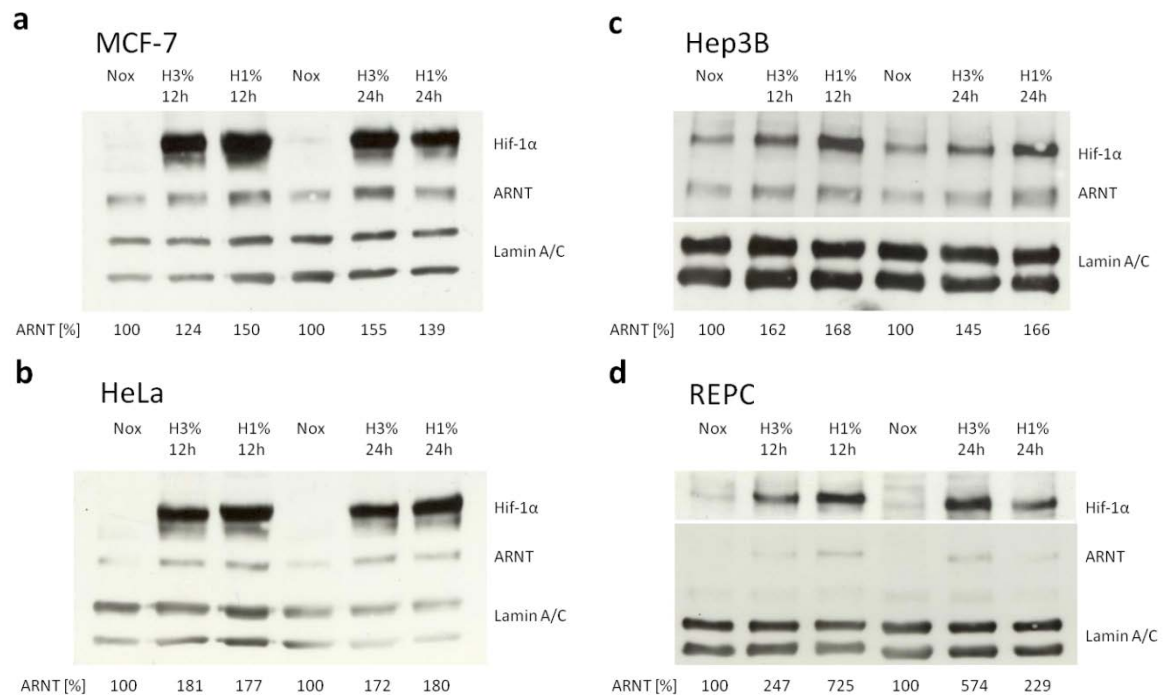
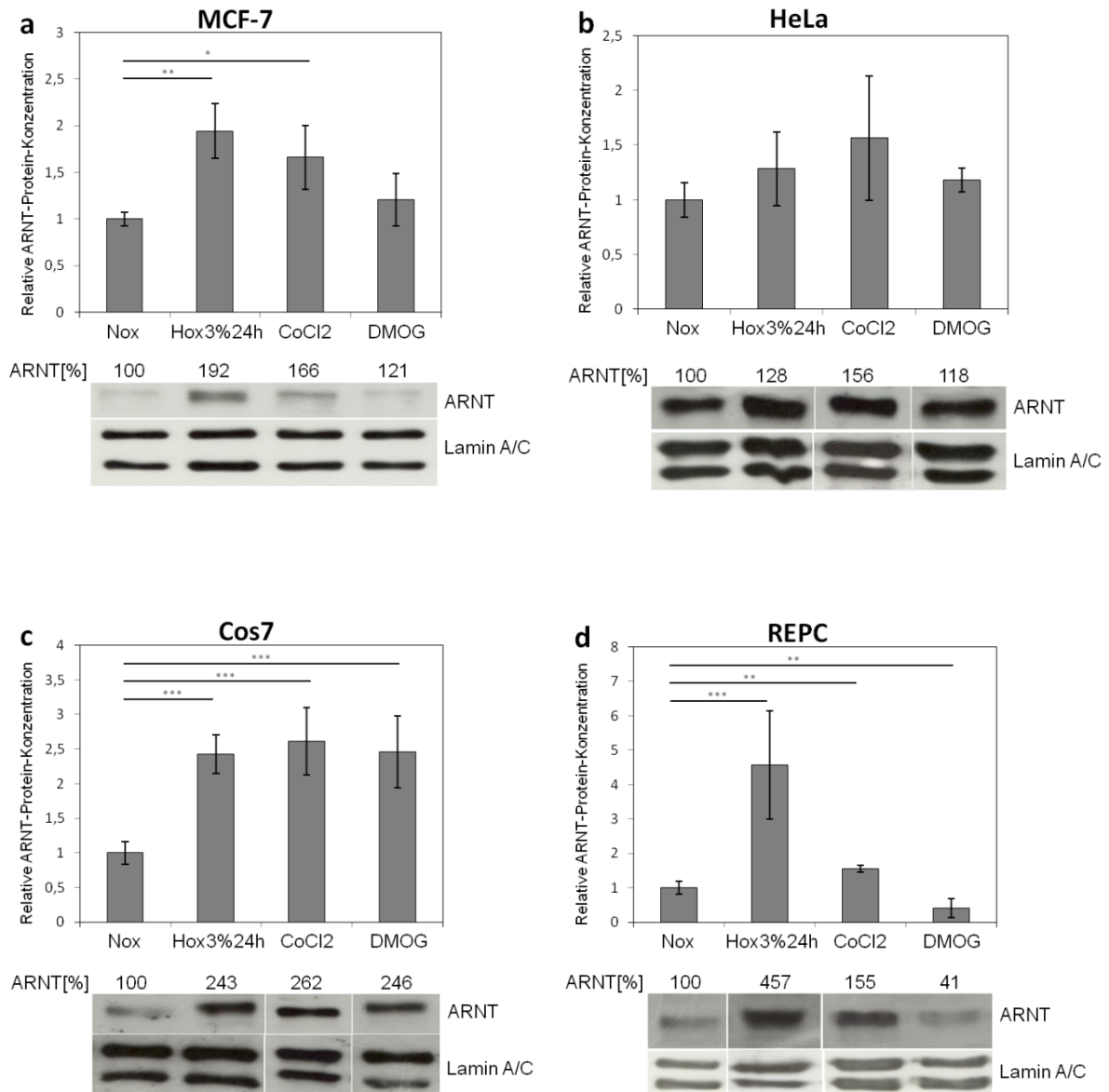


Abb. 16 Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinspiegel in MCF-7, HeLa, Hep3B und REPC Gesamtzelllysaten (50 µg). Zellen wurden unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂ und 1% O₂) für 12 oder 24 Stunden (H3% 12h, H1% 12h, H3% 24h, H1% 24h) inkubiert. ARNT-Proteinlevel wurden mittels Densitometrie bestimmt und sind in Prozent zur jeweiligen Normoxiekontrolle (Nox) angegeben. HIF-1α-Protein dient als Kontrolle der hypoxischen Induktion. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

Um einen Zusammenhang zwischen der ARNT-Induktion und den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF-α) zu untersuchen, wurden MCF-7, HeLa, Cos7, REPC, HepG2, Hep3B und Kelly Zellen mit den Hypoxiemimetika Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) und Dimethyloxallylglycin (DMOG) behandelt (Abb. 17a-g). HepG2 und Kelly Zellen antworteten nicht mit einer Zunahme der ARNT-Proteinkonzentrationen nach 24 Stunden Hypoxie. HeLa Zellen zeigten eine leichte ARNT Induktion, die aber nicht signifikant war. MCF-7 Zellen reagierten mit einem signifikanten Anstieg der ARNT-Proteinspiegel nach 24 Stunden hypoxischer Behandlung. Weiterhin zeigten MCF-7 Zellen eine ARNT Induktion unter Behandlung mit CoCl₂. MCF-7 Zellen reagierten nicht mit einer Induktion unter DMOG-Behandlung. Cos7 Zellen zeigten einen starken Anstieg der ARNT-Proteinspiegel sowohl unter Hypoxie als auch unter CoCl₂- und DMOG-Behandlung. REPC Zellen reagierten mit einer starken Induktion von ARNT auf Hypoxie und einer geringer ausgeprägten Induktion durch CoCl₂. DMOG reduzierte signifikant ARNT-Proteinspiegel in REPC Zellen. HepG2 Zellen

3. Ergebnisse

reagierten nicht auf Hypoxie und DMOG, zeigten jedoch einen sehr starken Anstieg der ARNT-Spiegel unter CoCl_2 . In Hep3B Zellen stiegen ARNT-Proteinkonzentrationen unter allen Behandlungen an. Kelly Zellen reagierten nicht mit einer ARNT Induktion, weder unter hypoxischer noch unter hypoxiemimetischer Behandlung.



3. Ergebnisse

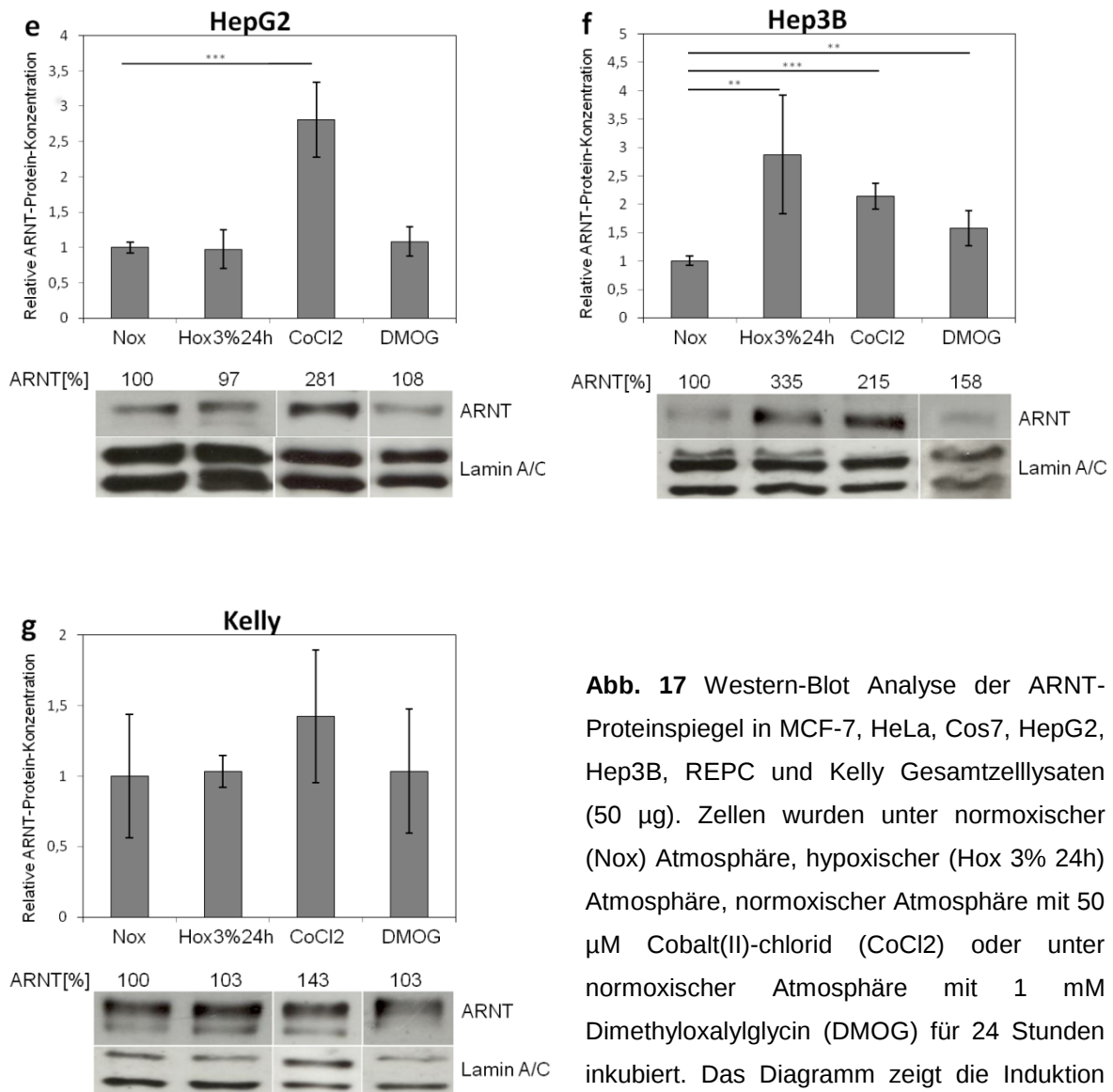


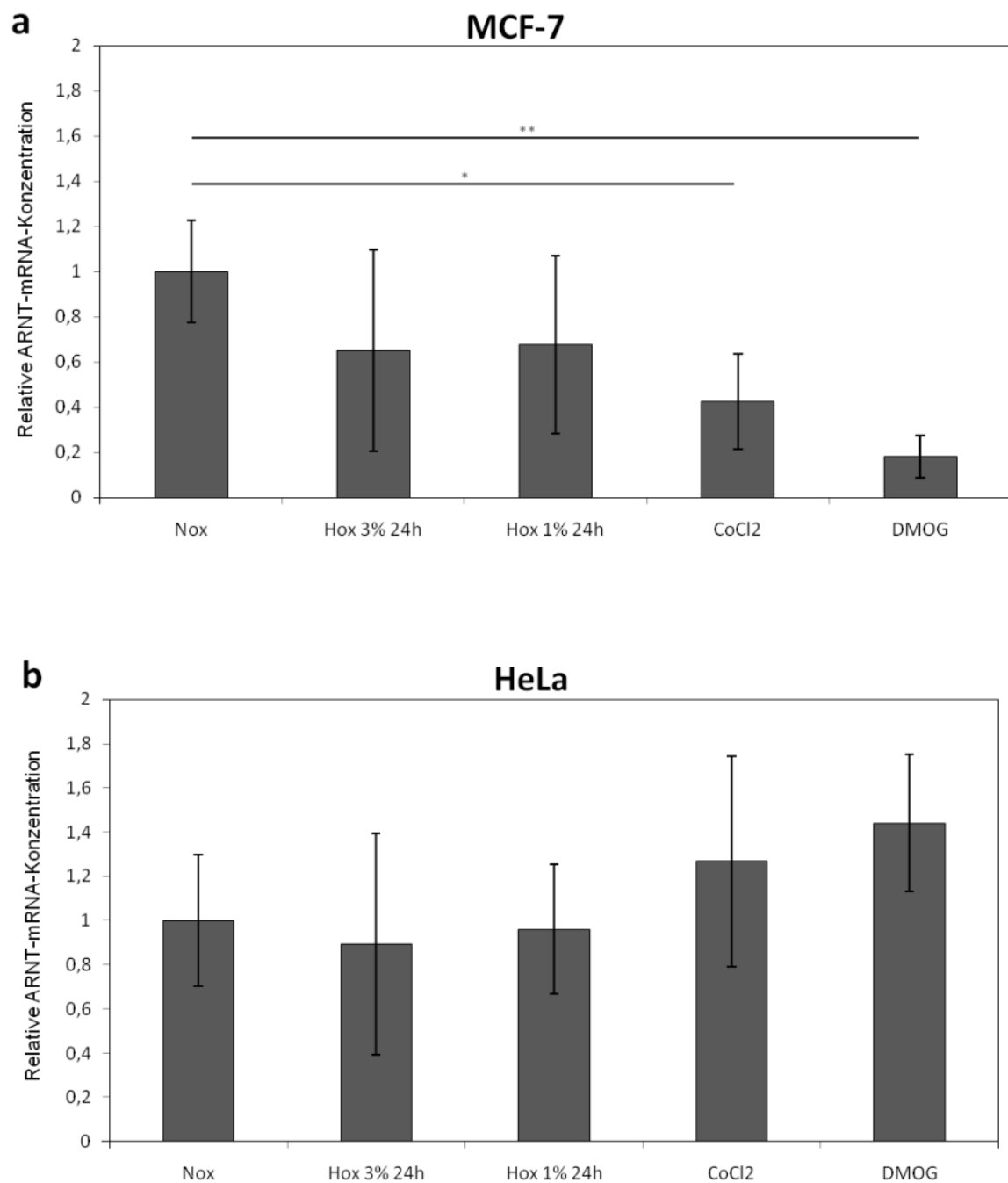
Abb. 17 Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinspiegel in MCF-7, HeLa, Cos7, HepG2, Hep3B, REPC und Kelly Gesamtzelllysaten (50 µg). Zellen wurden unter normoxischer (Nox) Atmosphäre, hypoxischer (Hox 3% 24h) Atmosphäre, normoxischer Atmosphäre mit 50 µM Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) oder unter normoxischer Atmosphäre mit 1 mM Dimethyloxallylglycin (DMOG) für 24 Stunden inkubiert. Das Diagramm zeigt die Induktion von ARNT im Verhältnis zur jeweiligen

Normoxiekontrolle (Nox), gemessen mittels Densitometrie. MW ± SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 6 -11). Mittelwerte sind als Prozentangabe dargestellt. Ein repräsentativer Western-Blot wurde jeweils mit abgebildet. Lamin A/C dient als Ladekontrolle.

Um zusammenhängende ARNT-mRNA-Konzentrationsveränderungen in Bezug zu den beobachteten ARNT-Proteinveränderungen setzen zu können, wurden mRNA-Konzentration mit Hilfe der quantitativen RT-PCR ermittelt. MCF-7, HeLa, REPC und Hep3B Zellen wurden unter normoxischen Konditionen angezüchtet, bevor 3% Hypoxie, 1% Hypoxie, CoCl₂ und DMOG Behandlungen für 24 Stunden durchgeführt wurden (Abb. 18a-d). In MCF-7 Zellen konnte eine abnehmende, jedoch nicht signifikante Tendenz der ARNT-mRNA-Konzentration unter Hypoxie

3. Ergebnisse

beobachtet werden. CoCl_2 und DMOG erzeugten eine signifikante Verminderung der ARNT-mRNA-Konzentrationen. Während HeLa und REPC Zellen keine Reaktion auf die Behandlungen zeigten, wurde in Hep3B Zellen eine starke Reduktion von ARNT-mRNA unter Hypoxie beobachtet. CoCl_2 erzeugte ebenfalls eine Verminderung.



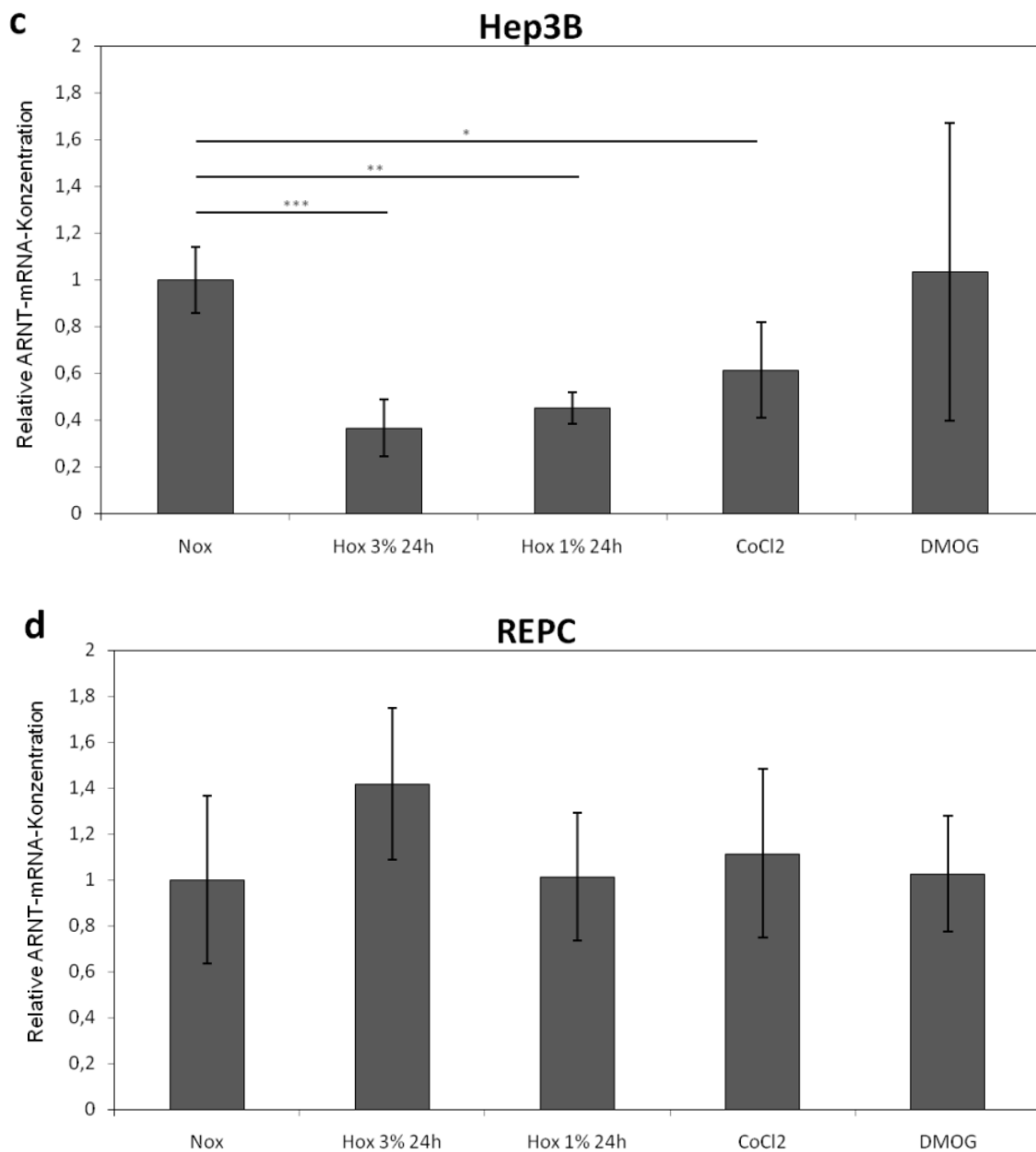


Abb. 18 Quantitative RT-PCR von ARNT-mRNA-Konzentrationen in MCF-7, HeLa, REPC und Hep3B Zellen (0,2 µg mRNA geladen). Zellen wurden unter Normoxie (21% O₂) angezüchtet und anschließend für 24 Stunden 3% Hypoxie, 1% Hypoxie, 50 µM Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) oder 1 mM Dimethyloxalylglycin (DMOG) behandelt. L28 wurde zur Normalisierung verwendet. Relative Mengen an ARNT-mRNA wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der relativen Menge an ARNT-mRNA im Verhältnis zur Normoxiekontrolle (Nox). MW $\pm$ SD; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 (two-tailed P-value; n = 4)

3. Ergebnisse

Um die Auswirkungen von HIF-1 α auf die Konzentration von ARNT-Protein zu klären, wurden MCF-7, T47D und Hep3B Zellen transient mit HIF-1 α -siRNA transfiziert (Abb. 19). Die Zellen wurden 48 Stunden mit Lipofectamine RNAiMAX und siRNA inkubiert, gefolgt von einer 6 Stunden langen Erholungsphase. Darauffolgend wurden die Zellen für 24 Stunden in 1% Hypoxie (1% O₂) gehalten. Es wurde ein durchschnittlicher Knock-down von HIF-1 α in MCF-7 Zellen von 85% in T47D Zellen von 70% und in Hep3B von 60% erreicht. Es konnte beobachtet werden, dass die ARNT-Proteinspiegel durch einen HIF-1 α -Knock-down deutlich abnahmen. Als Negativkontrolle hatte eine unspezifische siRNA-Transfektion mit BlockIt-siRNA (Invitrogen) keinen Einfluss auf den bekannten Anstieg der ARNT-Konzentration unter Hypoxie.

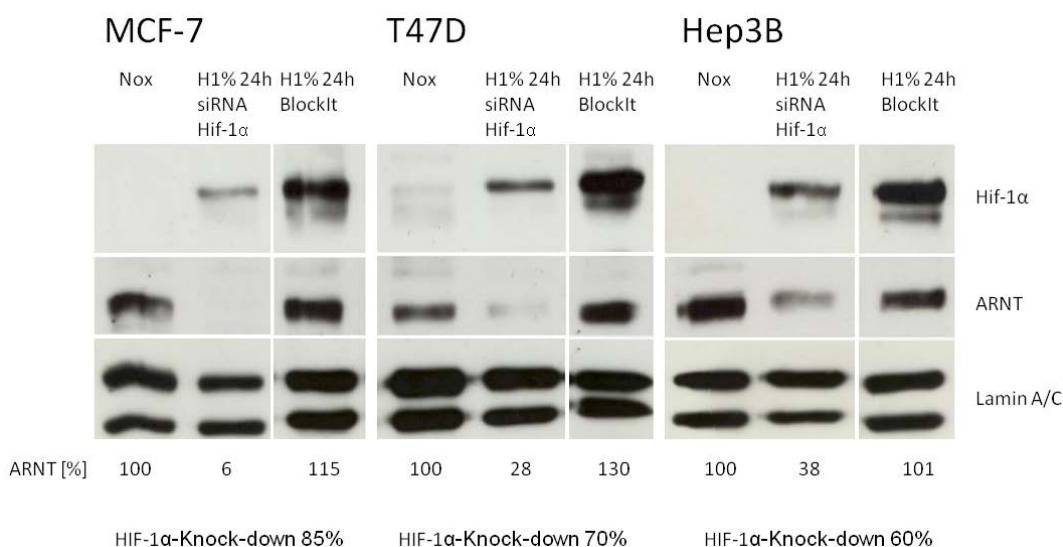


Abb. 19 Western-Blot Analyse der ARNT-Proteinkonzentrationen in MCF-7, T47D, Hep3B Gesamtzelllysaten nach HIF-1 α -Knock-down (50 μ g). Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) kultiviert und mit Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) und HIF-1 α -siRNA (Hox1% 24h siRNA aHif-1a) oder als Negativkontrolle mit unspezifischer siRNA (BlockIt™, Invitrogen, Hox1% 24h siRNA BlockIt) transient transfiziert. ARNT-Protein wurde mittels Densitometrie bestimmt und als Mittelwert in Prozent im Verhältnis zur Normoxiekontrolle dargestellt. Als Kontrolle ist der Knock-down von HIF-1 α mit abgebildet. Lamin A/C dient als Ladekontrolle. (MCF-7 und T47D n = 4; Hep3B n = 1)

4. Diskussion

Die normale Entwicklung der Brustdrüse, des Reproduktionstraktes, der Gefäße, des Skeletts und vieler anderer Gewebe ist entscheidend von den weiblichen Sexualhormonen, insbesondere den Östrogenen, abhängig. Dieser Einfluss wird über die zwei Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β reguliert. Die Östrogenrezeptoren liegen in der Zelle hauptsächlich als Monomere vor. In Anwesenheit eines Liganden dimerisieren diese Monomere und binden an spezifische Östrogenresponseelemente (ERE) der DNA und steuern so die Transkription vieler Gene und somit die Zellhomöostase. Eine Fehlregulation in diesem Zusammenhang trägt zur Tumorentstehung (Karzinogenese) bei. Eine lebenslange Exposition gegenüber Östrogenen ist einer der Hauptrisikofaktoren in der Brustkrebsentwicklung [167–171].

4.1. Das Verhalten der Östrogenrezeptoren unter Hypoxie

Mehr als zwei Drittel aller neu diagnostizierten Mammakarzinome sind primär Östrogenrezeptor (α) positiv. Das bedeutet, dass ER- α in diesen Fällen als Angriffspunkt einer antihormonellen Therapie genutzt werden kann. Unglücklicherweise sprechen hier jedoch über 40% auf eine antihormonelle Therapie nicht an (de novo resistance) oder werden im Verlauf resistent (acquired resistance) [172]. ER- β besitzt ein mehr ubiquitäres Expressionsmuster in menschlichen Körperzellen [173–175]. Während ER- α überwiegend proliferationsfördernd wirkt, scheint ER- β Apoptose und Zellarrest zu induzieren. ER- β wirkt demnach vorwiegend als ein Antagonist zu ER- α . Dies beruht zum einen auf unterschiedlicher Affinität und Spezifität zu bestimmten EREs, zum anderen sind ER- β -Monomere in der Lage, mit ER- α -Monomeren zu dimerisieren und somit inaktive Heterodimere ($\alpha\beta$) zu formen [76]. Man geht davon aus, dass die Reaktion von Brustdrüsengewebe auf Estradiol (E_2) oder andere Östrogen derivative von der Ratio- α/β , also dem Quotienten aus ER- α zu ER- β , abhängt [176]. Demnach liegt der Schluss nahe, dass insbesondere die Rezeptorausstattung bei östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs (Luminal A und B) über Entwicklung, Aggressivität, Behandelbarkeit und Resistenz des Tumors entscheidet. Aus diesem Grund muss in Zukunft vermehrt der ER- β neben ER- α in

den Fokus rücken, um eine Weiterentwicklung und Verbesserung der Behandlung dieser Krebspatienten zu erzielen. Weiterhin könnte der ER- β in Zukunft auch bei ER- α -negativem Brustkrebs, wie z.B. Basal-like klassifiziertem Brustkrebs, auf Grund seiner ubiquitäreren Expression als Zielstruktur dienen. Diese Arbeit soll durch *in vitro* Experimente einen Beitrag zum Verständnis der Expression der Östrogenrezeptoren in Tumoren *in vivo* und zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer antihormonellen Therapie leisten.

Die zelluläre Konzentration von ER- α nimmt HIF-unabhängig unter Hypoxie bei MCF-7 und T47D ab.

Diese Arbeit zeigt, dass MCF-7 und T47D Brustkrebszellen ihre Konzentration an ER- α -Rezeptoren unter Hypoxie (1% O₂) stark reduzieren. Diese Beobachtung machten auch schon Wormke et al. 2003 und Ryu et al. 2011 [177,178]. Rüegg et al. widersprachen diesen Beobachtungen und sagten, sie konnten eine solche Regulierung nicht reproduzieren und postulierten stattdessen, dass die ER- α -Konzentration in Hypoxie unbeeinflusst bleibt [179]. Um diesen Widerspruch zu klären, wurden MCF-7 Zellen 50 Wochen in Kultur gehalten und die verschiedenen Reaktionen auf Hypoxiebehandlung beobachtet. Es ist bekannt, dass Brustkrebszellen, die lange unter Östrogendeprivation gehalten werden, was einer artifiziellen antiöstrogenen Therapie (z.B.: Aromatasehemmer) entspricht, ihre Stoffwechsel- und Regulationswege verändern [180]. Man geht hier davon aus, dass die östrogenabhängige Proliferation der Brustkrebszellen von einer sensitiven in eine hypersensitive Phase und anschließend sogar in eine unabhängige Phase übergeht, was sich in einer Resistenz gegenüber antihormoneller Therapie äußert. Diese Arbeit zeigt, dass MCF-7 Zellen schon nach wenigen Wochen mit einer eingeschränkten bis nicht mehr vorhandenen Reduktion bezüglich ER- α auf Hypoxie reagieren. Diese verschiedenartige Reaktion auf Hypoxie hängt nicht mit der Veränderung der Konzentration von HIF-1 α oder HIF-2 α zusammen, denn die Zellen zeigen bei diesen hochkonservierten Faktoren weiterhin das gewohnte Expressionsmuster. Diese Erkenntnisse könnten erklären, warum Rüegg et al. die deutliche Reduktion der Konzentration von ER- α unter Hypoxie nicht reproduzieren konnten. Die Daten bestätigen weiterhin, dass

diese langfristig inkubierten (lt) Zellen bezüglich einer antihormonellen Behandlung mit Tamoxifen als unsensibel anzusehen sind [180]. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Verständnis der Resistenzentwicklung von Brustkrebs (Typ Luminal A und B) unter antihormoneller Therapie. Die Resistenzentwicklung ist auf eine Hyperphosphorylierung der Östrogenrezeptoren und deren weitere Signalwege zurückzuführen und begründet z.B. den Effekt von Everolimus, einen mTOR-Inhibitor, der in der späteren Signalkaskade angreift, eine eingetretene Resistenz gegenüber antihormoneller Therapie vorübergehend bekämpfen zu können [180,181].

Im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe von Lee et al. [178], die die Reduktion der Konzentration von ER- α auf einen HIF-1 α vermittelten Signalweg zurückführen, zeigen meine Ergebnisse, dass HIF-1 α nicht allein zu einer Reduktion von ER- α führt. Vielmehr verhindert HIF eine noch stärkere Erniedrigung der ER- α -Konzentration unter Hypoxie. Aus meinen Experimenten ist ersichtlich, dass unter Hypoxie die Transkription von ER- α herunterreguliert wird. Dies ist jedoch nicht auf einen HIF-1 α getriggerten Mechanismus, wie von Ryu und Lee et al. postuliert [178], zurückzuführen, denn eine chemische Induktion der HIF-Faktoren durch CoCl₂ und DMOG (Daten nicht gezeigt) führt in meinen Experimenten nicht zu einer Verminderung der ER- α -Konzentration, wie ebenfalls von der Gruppe um Lee et al. postuliert [182]. Weder Transkription noch Proteinexpression werden durch die Hypoxie-Mimetika beeinflusst. Wird HIF-1 α unter Hypoxie mittels siRNA auf Proteinebene reduziert, so resultiert eine weitere Verminderung der ER- α -Konzentration in den Zellen. Dass dieser Effekt nicht auf einer generellen Verminderung aller Proteine und Stoffwechselprodukte auf Grund exzessiven Zellstress beruht, zeigt z.B. die gleichzeitige Konzentrationserhöhung von ER- β . HIF hat demnach unter Hypoxie eine stabilisierende Wirkung auf ER- α und ist nicht für die Herunterregulierung des ER- α verantwortlich. Die Östrogenrezeptoren werden, wie alle Steroidrezeptoren, über Polyubiquitinylierung und proteasomale Degradation abgebaut [183,184]. Dies kann ligand-abhängig und ligand-unabhängig geschehen. Es ist bekannt, dass die Regulierung der Degradation stark Stimuli, Ligand und PTM (Posttranslational Modifications: Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, etc.) abhängig und zum Teil für eine erneute Transkription an den ERE nötig ist [167,185]. Ein genauer Zusammenhang mit

Hypoxie muss hier durch weitere Nachforschungen festgestellt werden. (Ein weiterer Zusammenhang von ER- α und HIF- α /ARNT wird im nächsten Abschnitt und unter 4.3 diskutiert.)

Die zelluläre Konzentration von ER- β nimmt unter Hypoxie in MCF-7 und T47D ab. HIF ist in der Lage, die ER- α/β -Ratio entscheidend zu beeinflussen.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass analog zu ER- α die Konzentration von ER- β unter Hypoxie in MCF-7 und T47D Zellen abnimmt. Es findet eine Reduktion um bis zu 50% statt. Unter Hypoxie wird analog zu ER- α auch die Transkription von ER- β verringert. Coradini et al. beobachteten 2003 eine geringe ER- β -Konzentrationserhöhung unter Hypoxie in Kombination mit Östradiol (E_2) [186]. Dies zeigt, dass E_2 als Bindungspartner in der Lage ist, eine verstärkte Degradation des ER- β zu vermindern bzw. zu verhindern. Anders als bei ER- α resultiert ein HIF-1 α -Knock-down in einer Zunahme der Konzentration von ER- β unter Hypoxie. Diese Zunahme an ER- β überschreitet sogar normoxische Konzentrationen. Diese Beobachtungen zeigen, dass HIF die ER- β -Konzentration in Brustkrebszellen reguliert und eine Überexpression unter Hypoxie verhindert. Eine chemische HIF-Stabilisierung mittels $CoCl_2$ ohne Hypoxie führt zu keiner signifikanten Veränderung der Transkriptionsrate oder Proteinexpression. Wie schon für ER- α erwähnt, ist die Degradation des ER- β ligand-, stimuli- und PTM-abhängig [183,184]. Den genauen qualitativen Zusammenhang auf molekularer Ebene festzustellen, wird auch hier Gegenstand der zukünftigen Forschung sein.

HIF, oft als antiapoptotisch-wirkend diskutiert, begünstigt somit das Überleben und die Proliferation von Brusttumorgewebe durch die Verschiebung der ER- α/β -Ratio zugunsten von ER- α unter Hypoxie. Dies unterstreicht, dass HIF als Zielstruktur einer Krebstherapie auch bei Brustkrebs vom Typ Luminal A und B sinnvoll ist. Diese Arbeit beweist so, dass die Verschiebung der ER- α/β -Ratio neben bekannten tumorigenen Wirkweisen, wie verstärkter Angiogenese, Wachstumsstimulation, Invasion und Metastasierung durch HIF zur Resistenzentwicklung beiträgt [148]. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Steroidhormone neben HIF auch direkt über ein eigenes ERE das VEGF-Gen (Vascular Endothelial Growth Factor) und somit die Angiogenese beeinflussen [187,188]. Hier stellte sich heraus, dass ER- β die hypoxische VEGF-

Induktion vermindern kann [189]. Im Gegensatz dazu kann es jedoch über ER- α , durch vermehrte Angiogenese, wiederum zu Therapieresistenz in „ER- α -positivem“ Brustkrebs führen [190]. Eine Beeinflussung der ER- α/β -Ratio konnte auch für den Wachstumsfaktor IGF in MCF-7 Zellen aufgezeigt werden. So korrelieren hohe Spiegel an IGF-1R mit einer vermehrten ER- α - und Progesteronrezeptor-Expression, während niedrige IGF-Konzentrationen eine vermehrte ER- β -Expression zur Folge haben [191]. Mendoza et al. postulieren weiterhin, dass eine niedrige ER- α/β -Ratio über schnelle Phosphorylierung von p38 MAPK und p53 eine beschleunigte Apoptoserate zur Folge hat [191].

Ein inverser Effekt, eine vermehrte ER- β -Expression unter Hypoxie in Endometriosezellen, ist 2011 von Wu et al. beschrieben worden [192]. Gleiches gilt für ER- β beim Prostatakarzinom. Auch diese Arbeit zeigt, dass die Zervixkarzinomzelllinie HeLa unter Hypoxie mit einer Erhöhung der ER- β -Konzentration reagiert. Dies unterstreicht das ungleiche Verhalten und die unterschiedliche Bedeutung der Östrogenrezeptoren für verschiedene Gewebe und ihre Krankheiten. Es ist somit unumgänglich, die Bedeutung der einzelnen Rezeptoren für die jeweiligen Gewebe und ihre Entartungen zu überprüfen. Eine generelle gewebeübergreifende Aussage hinsichtlich der therapeutischen Bedeutung der Östrogenrezeptoren ist somit nicht zulässig. Selbst innerhalb eines Gewebes kann die Funktion der Östrogenrezeptoren variieren, je nach PTM. So ist eine abberierende Methylierung einer ER- β -Promotorregion auf der DNA in Prostata-, Brust- und Ovarialkrebs beschrieben worden [193]. Diese fehlerhaften Methylierungen könnten einen Resistenzmechanismus gegenüber Tamoxifen darstellen. Es gilt in Zukunft, solche DNA-Methylierungen als potentiellen therapeutischen Angriffspunkt zu verstehen.

In dieser Arbeit werden Hypoxie und HIF- α oder Normoxie und somit kein HIF- α als Konstanten zu Grunde gelegt und die Reaktion in Bezug auf die jeweilige Rezeptorexpression gemessen. Lim et al. tauschten diesen Ansatz und untersuchten den Einfluss von ER- β auf HIF. Sie fanden heraus, dass eine hohe ER- β -Expression mit einem verstärkten Abbau, via Ubiquitinylierung und proteasomalem Abbau, von aktiven HIF-1 α /ARNT-Komplexen unter Normoxie einhergeht, wobei hier ARNT den Angriffspunkt darstellt [189]. Dieser Effekt kann durch eine ARNT-Überexpression unter Normoxie aufgehoben werden. Dies

bestätigt den Ansatz, ARNT als potentiell therapeutisches Ziel nutzen zu können. Unter 4.2 und 4.3 soll dies noch weiter diskutiert werden. Diese Arbeit zeigt zusammen mit den Erkenntnissen von Lim et al. und Mendoza et al., dass ER- β über die ER- α/β -Ratio mit HIF- α /ARNT in engem Zusammenhang steht [189,191]. Dieses Zusammenspiel bildet eine Schlüsselrolle im Hinblick auf Zellproliferation, Zellwachstum, Zellarrest sowie Apoptose und somit auf Entwicklung, Aggressivität, Behandelbarkeit und Resistenz des Tumors.

Cobalt(II)-Chlorid induziert ER- α in „ER- α -negativen“ Brustkrebszellen

Durch die Beobachtungen veranlasst, dass HIF-1 α sich entscheidend auf die ER- α/β -Ratio innerhalb der "ER-positiven" Brustkrebszelle auswirkt, wurde überprüft, ob sich mit Hilfe von HIF auch die ER- α/β -Ratio in „ER- α -negativen“ Brustkrebszellen verschieben lässt. Hierbei besteht das Problem, dass der ER- α in einer sehr geringen Konzentration exprimiert wird, die selbst für unsere sehr sensiblen Detektionsmethoden oft nicht nachweisbar ist. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass sich in MD-A-MB-231 und MX-1 Brustkrebszellen sowie in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa durch CoCl₂ die ER- α -Konzentration anheben lässt. Cobalt(II)-Chlorid wird in der Zellforschung als sog. Hypoxie-Mimetikum eingesetzt, da es in der Lage ist HIF- α unter Normoxie zu stabilisieren. Die Eigenschaft des Cobalt(II)-Chlorids die ER- α -Konzentration auch in „ER- α -negativen“ Zellen zu verändern beweist die Durchführbarkeit einer gezielten Östrogenrezeptor Induktion. Diese Erkenntnis könnte in Zukunft vielleicht zu einer Möglichkeit führen "ER-negativ" klassifizierten Brustkrebs in einen Luminal Typ zu überführen und somit die Behandelbarkeit, die Lebensqualität und das Outcome für den Patienten entscheidend zu verbessern. Gegen diese Theorie könnte die Beobachtung sprechen, dass "ER- α -negative" Brustkrebszelllinien, die mit ER- α transfiziert worden sind, im Zellmodell eine unvorhergesehene Reaktion auf Östrogene und antihormonelle Wirkstoffe zeigten [194]. So transfizierten Garcia et al. 1992 und Jeng et al. 1994 "ER-negative" Zellen mit ER- α und stellten fest, dass die Zellen teilweise mit Apoptose und eingeschränkter Metastasierungstendenz auf Östrogen reagierten [195,196]. Eine artifizielle Transfektion mit ER- α unterscheidet sich jedoch grundlegend von einer Induktion eines vorhandenen Gens mittels eines Therapeutikums. Ob eine Verschiebung der Ratio in diesen Tumorzellen zu einem positiven Effekt führen würde, muss demnach in Zukunft

eruiert werden. Festzuhalten ist jedoch, dass es möglich ist, die ER- α /ER- β -Ratio in Brustkrebszellen zu verschieben. Diese Arbeit zeigt, dass diese Möglichkeit auch bei sogenannten "ER- α -negativen" Brustkrebszellen durchführbar ist.

4.2 Der Einfluss von Hypoxie und den Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren auf die Regulation des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

Der Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT, HIF-1 β) spielt eine entscheidende Rolle als Transkriptionsfaktor in der Zellhomöostase. Wie alle bHLH/PAS-Proteine muss ARNT dimerisieren, um aktive DNA-Bindungskomplexe zu formen. ARNT ist Heterodimerisierungspartner vieler entscheidender Regulatorproteine, wie zum Beispiel des xenobiotic ligand activated Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR), der SIM-Proteine (Single Minded), des cardiovascular helix-loop-helix factor 1 (CHF1) und der HIF- α -Untereinheiten [197]. Aktuelle Studien berichten von einer direkten Verbindung von ARNT mit verschiedenen Krankheiten und Zelldysfunktionen, wie zum Beispiel Krebs und Diabetes [198–200]. Insbesondere aber via HIF- α steht ARNT in Verbindung mit Brustkrebs und Krebs im Allgemeinen. HIF-1 α und HIF-2 α sind zentrale Schlüsselfaktoren in Bezug auf Entstehung, Aggressivität und Therapierbarkeit von Tumoren [39,148,201]. Als essentieller Bindungspartner der HIF- α -Untereinheiten würde eine Depletion von ARNT in inaktiven oder verminderten HIF- α -Komplexen resultieren [201]. ARNT wird jedoch als konstitutiv exprimiert und von Hypoxie sowie physiologischen und pharmakologischen Veränderungen nicht reguliert angesehen [160–162]. Auf Grund dieser Annahme gilt ARNT nicht als limitierender Faktor und wurde hinsichtlich der Tumorforschung bisher wenig erforscht [164]. Um die Relevanz von ARNT in Bezug auf Krebs hervorzuheben und eine Neuevaluation zu erreichen, zeigt diese Arbeit zum ersten Mal, dass ARNT einer zelltyp-abhängigen hypoxischen und hypoxie-mimetischen Regulierung unterliegt. HIF- α scheint eine stabilisierend regulierende Rolle in Bezug auf ARNT einzunehmen. In dieser Diskussion soll nur von ARNT1 gesprochen werden (HIF-1 β), obwohl 2 weitere Isoformen, ARNT2 und ARNT3 (BMAL1, MOP3, JAP3, ARNTL1), existieren. ARNT3 ist ein selektiver Regulator der zirkadianen Uhr und steht mit HIF nicht in Verbindung und ARNT 2 hat ein

schmaleres Verbreitungsmuster und eine geringere Bedeutung in Bezug auf HIF- α [179,200,202].

In dieser Studie wurden acht verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Gewebe von zwei unterschiedlichen Hostspezies betrachtet, um intra- und interzelluläre Zusammenhänge von Hypoxie und Hypoxie-Mimetika auf die ARNT-Proteinexpression zu erforschen und um eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Krebsarten zu überprüfen. Wie bereits erläutert, treten hypoxische Verhältnisse vermehrt in schnell wachsenden und proliferierenden Tumoren auf und stellen ein Problem bezüglich Aggressivität und Behandlung dar [39,140,148,149].

Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass MCF-7 Brustkrebszellen mit einem Anstieg der ARNT-Proteinexpression unter Hypoxie reagieren. Diese Beobachtung widerspricht der gängigen Meinung, dass ARNT durch Hypoxie nicht beeinflusst wird und konstitutiv exprimiert ist, wie von Semenza zusammengefasst [164]. Schon Chilov et al. beobachteten 1999 vereinzelt eine ARNT-Proteininduktion in einigen ihrer Zelllinien [166]. Diese Arbeit zeigt weiter, dass dieser initiale Effekt der ARNT-Proteininduktion unter länger andauernder Hypoxie nach etwa 72 Stunden aufgehoben wird und basale ARNT-Proteinspiegel erreicht werden. Der Effekt der Induktion ist nach 12 stündiger Behandlung mit 1% Hypoxie (1% O₂) oder nach 24 stündiger Behandlung mit 3% Hypoxie (3% O₂) am ausgeprägtesten. Gleichzeitig zeigen MCF-7 Zellen keine oder aber eine geringe Reduktion ihrer ARNT-mRNA. Dieser Effekt könnte in einem negativen Feedback-Mechanismus der de novo-Synthese auf mRNA-Ebene bei gleichzeitiger Stabilisierung auf Proteinebene begründet sein. Ähnliche entgegengesetzte Regulationen der Gen-Transkription unter Hypoxie sind für verschiedene Enzyme und Moleküle bekannt [148,203]. Diese Beobachtung legt einen Zusammenhang des ARNT-Proteins mit den HIF- α -Faktoren nahe, wie von Mandl et al. für HIF-1 α postuliert [204]. Dafür spricht ebenfalls eine gewisse zeitabhängige Konzentrationskorrelation von ARNT und HIF-1 α unter (länger anhaltender) Hypoxie, denn werden die Zellen länger als 48 Stunden in Hypoxie gehalten, so nähern sich die ARNT-Konzentrationen dem normoxischen Vergleichswert an. Ein ähnlicher zeitlicher Verlauf mit einem Maximum nach 4 bis 12 Stunden hypoxischer Behandlung mit anschließendem Abfall ist für HIF-1 α und HIF-2 α

unter länger andauernder Hypoxie bekannt [165]. Dieser Effekt könnte ein Indiz für einen stabilisierenden Effekt von HIF- α -Überexpression gegenüber dem ARNT-Protein sein. Die Formation von HIF-1 α /ARNT-Komplexen im Zellkern könnte einen proteasomalen Abbau verhindern. Diese These deckt sich mit den Ergebnissen von Choi et al. und Mandl et al. [201,204]. Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, wurden MCF-7, T47D und Hep3B Zellen mit HIF-1 α -siRNA transient transfiziert und eine Verminderung der ARNT-Konzentration von bis zu 90% im Vergleich zur Normoxie-Kontrolle beobachtet. Eine unspezifische Kreuzreaktion der HIF-1 α -siRNA gegenüber ARNT konnte durch *in silico*-Analyse der siRNA-Gensequenz ausgeschlossen werden. Diese Erkenntnisse sprechen für eine enge Korrelation der ARNT- und HIF-1 α -Proteinexpression. Eine Erklärung hierfür könnte ein stabilisierender Effekt der O₂-unabhängigen ARNT-Bindungspartner, wie AhR, SIM und CHF1 gegenüber ARNT, unter Normoxie sein. Unter hypoxischen Bedingungen könnten verringerte Konzentrationen von AhR, SIM und CHF1 durch die Überexpression von HIF- α hinsichtlich der ARNT-Stabilisierung kompensiert werden. Ein HIF-1 α -Knock-down würde so zu einer stark erniedrigten ARNT-Konzentration über gedrosselte Neusynthese (de novo-Synthese), geringerer Stabilität gegenüber Ubiquitylierung und anschließendem proteasomalen Abbaus führen, weil die Bindungspartner fehlen [201]. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sprechen demnach für einen stabilisierenden Effekt der ARNT-Heterodimerisierungspartner, die je nach zellulärer Ausstattung und intrinsischer Aktivität unterschiedlichen Einfluss auf die ARNT-Regulierung haben dürften. Diese Hypothese passt wiederum mit den Beobachtungen von Choi et al. und Mandl et al. zusammen [201,204].

Um eine Übertragbarkeit dieser Beobachtung auf andere Krebsarten zu überprüfen, wurden HeLa (humanes Zervixkarzinom), Hep3B (humanes Hepatom), HepG2 (humanes Hepatom), Kelly (humanes Neuroblastom), REPC (humanes Nierengewebe) und Cos7 (Nierenzellen vom Primaten) Zellen analog zu MCF-7 behandelt. Um zusätzlich einen Zusammenhang mit HIF- α weiter bekräftigen zu können, wurden alle Zellen mit den Hypoxie-Mimetika Cobalt(II)-chlorid (CoCl₂) und Dimethyloxallylglycin (DMOG) behandelt. Meine Versuche ergaben, dass die Zelllinien Hep3B, Cos7 und REPC gleichsinnig zu MCF-7 mit einer Induktion der ARNT-Proteine unter Hypoxie reagieren. Bei HeLa Zellen ist

kein signifikanter Unterschied zu erkennen, in diesem Falle ließe sich maximal von einem Trend sprechen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen zeigt sich bei HepG2 und Kelly Zellen keine Induktion von ARNT unter Hypoxie, was der Theorie des konstitutiv exprimierten ARNT, wie von Wang und Semenza beschrieben, entsprechen würde [164]. Zusammen betrachtet, bestätigen diese Daten jedoch die inkonstanten Beobachtungen bezüglich ARNT in verschiedenen Zelllinien von Chilov et al. [166]. Die Hypoxie-Mimetika CoCl_2 und DMOG verhalten sich zum Teil losgelöst von Hypoxie und zeigen auch unter sich teils gegensätzliche Ergebnisse, obwohl ihr HIF- α -stabilisierender Effekt vergleichbar ist. In Hep3B und Cos7 Zellen erzeugen Hypoxie, CoCl_2 und DMOG eine signifikante ARNT-Proteininduktion. Diese Beobachtungen sind mit einer durch HIF- α stabilisierenden Wirkung auf ARNT, wie von Mandl et al. für HIF-1 α postuliert, vereinbar [204]. Ein ähnliches Verhalten, mit einer deutlichen Steigerung der ARNT-Proteinlevel nach CoCl_2 -Behandlung aber nicht nach DMOG-Behandlung zeigen auch HepG2 Zellen, jedoch ohne Induktion unter Hypoxie. REPC Zellen reagieren sogar mit einer Verminderung der ARNT-Konzentration unter DMOG-Behandlung. Dieser Unterschied ist auf Grund unterschiedlicher Wirkmechanismen von CoCl_2 und DMOG, die zellspezifisch variieren können, zu erklären. Bei HeLa und Kelly Zellen kann man keine signifikante Beeinflussung erkennen, die Zellen sind in Ihrer ARNT-Expression unabhängig von Hypoxie, CoCl_2 oder DMOG. In Hep3B Zellen zeigt sich analog zu MCF-7 Zellen eine ARNT-mRNA Reduktion bei gleichzeitiger ARNT-Proteininduktion. REPC Zellen zeigen entgegen ihres Verhaltens auf Proteinebene keine Veränderung ihrer mRNA-Spiegel, was eine vorwiegende Regulation auf Proteinebene impliziert. Diese gesammelten Beobachtungen und insbesondere das gute Ansprechen der Nierenzelllinie Cos7 auf alle Behandlungen könnten für einen Funktionsverlust im Laufe der Tumorigenese in bestimmten Krebsarten sprechen [180,205].

Choi et al. haben erstmalig 2006 postuliert, dass ARNT auf drei unterschiedliche Arten beeinflusst werden kann: 1) Verstärkung der de novo-Synthese 2) Erhöhung der Stabilität, bzw. Verminderung der proteasomalen Degradationsrate und 3) Dimerisierung mit HIF-1 α [201]. Die Daten dieser Dissertation unterstützen die Theorie von Choi et al. und widersprechen einer unregulierten ARNT-Expression

[160–162,164,201]. Weiter führen Choi et al. den positiven Effekt von Curcumin in der Krebsbehandlung auf die Verminderung von ARNT zurück. Einen ähnlichen Effekt, in Zusammenhang mit Strahlensensibilität konnte unsere Arbeitsgruppe für Curcumin und HIF zeigen [39,206].

Zusammengefasst zeigen die Daten an den verschiedenen Zelllinien eindeutig eine Beeinflussbarkeit von ARNT unter Hypoxie sowie Hypoxie-Mimetika und einen Zusammenhang mit HIF-1 α . Diese Beobachtungen stehen in Widerspruch zu der aktuell anerkannten Meinung, dass ARNT zellübergreifend weder beeinflusst noch reguliert wird [160–162,164], sind aber im Einklang mit den Beobachtungen von Chilov et al. [166]. Die Daten zeigen, korrespondierend mit Choi et al. und Mandl et al., dass die Heterodimerisation mit HIF- α ein wichtiger Mechanismus bei der Stabilisierung von ARNT unter Hypoxie ist [201,204]. Meine Ergebnisse legen eine generelle stabilisierende Regulation der ARNT-Bindungspartner, wie HIF- α , AhR, SIM und CHF1 bezüglich der ARNT-Expression nahe. Weiterhin scheint die ARNT-Expression sehr fein und je nach Zelltyp unterschiedlich reguliert zu sein, dies postulieren auch Swedenborg et al. und Labrecque et al. [207,208]. Wiederum ist aber ein Verlust der Regulation im Laufe der Tumorigenese bestimmter Krebsarten möglich und wahrscheinlich [180,205]. Da ARNT als Bindungspartner wichtiger Transkriptionsfaktoren in sehr viele Stoffwechselwege der Zelle eingreift, ist die Wichtigkeit dieses Heterodimers hervorzuheben [197]. Eine Reevaluierung der ARNT-Regulierung ist für jede Krebszelllinie nötig, um die Krebsart und ihr Verhalten bezüglich Wachstum, Aggressivität, Invasivität und Therapierbarkeit zu verstehen. Diese Arbeit zeigt auf, dass allgemein gültige Aussagen über Krebszellen oft nicht zulässig sind und viele Studien ihre Universalität an weiteren Zelllinien überprüfen müssen. Weiter will ich ARNT als einen möglichen therapeutischen Ansatzpunkt für die Krebstherapie hervorheben, der über eine Verminderung oder sogar Depletion von ARNT in inaktiven HIF- α -Untereinheiten resultieren würde.

4.3 Das Zusammenspiel des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator und der Östrogenrezeptoren bei Brustkrebs

Bislang wurden die Östrogenrezeptoren und ARNT in dieser Arbeit überwiegend getrennt diskutiert. Dass jedoch ein Zusammenhang dieser entscheidenden Zellmediatoren besteht, wird in der Literatur zunehmend deutlich [208]. Insbesondere die Gruppe um Pongratz et al. hat auf diesem Gebiet vermehrt zum Verständnis beigetragen [179,208,209]. Aufbauend auf den Beobachtungen von Klinge et al., dass Dioxin in den Signalweg der Östrogenrezeptoren eingreift [210], fand die Gruppe heraus, dass ARNT hierfür verantwortlich ist. ARNT fungiert als Coactivator der Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β , wobei ER- β stärker induziert zu sein scheint. Es resultiert eine vermehrte ER- α/β -Heterodimerisation, welche andere Affinitäten zu den ERE aufweist als die jeweiligen Homodimere [179]. Kombiniert man diese Erkenntnis mit den unter 4.1 diskutierten Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe und denen von Lim et al., so könnte man über einen Regelkreis spekulieren [189]. In diesem Regelkreis wäre ARNT für eine vermehrte ER-Aktivität verantwortlich. Über ER- β würde so vermehrt ARNT degradiert und wieder ein Gleichgewicht hergestellt werden. Diese These unterstreicht zusammen mit den Erkenntnissen von Lim et al. zusätzlich das unter 4.2 diskutierte Modell der ARNT-Regulation. Labrecque et al. konnten hinsichtlich der qualitativen Einflussnahme von ARNT auf ER- α und ER- β zeigen, dass diese vom Zelltyp abhängig ist [207]. Die Ansicht, dass die ARNT-Regulation also zelltypspezifisch variiert unterstützen neben dieser Arbeit auch Labrecque et al. und Swedenborg et al. [207,208].

Lim et al. zeigten 2011, dass ER- β über ARNT die HIF-Induzierung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) vermindern kann (siehe 4.1) [189]. Vorher berichteten Klinge et al. 1999 zum ersten Mal von einer ungerichteten AhR/ARNT Bindung an natürlich vorkommende Östrogenresponseelemente (ERE) und Progesteronresponseelemente (PRE) auf der DNA [211]. Diese direkte, "unperfekte Bindung" [211], könnte für einen teils inhibitorischen Effekt von ARNT in Bezug auf Östrogen derivative verantwortlich sein. Auch hier greift ARNT direkt in Regulationsmechanismen der Zelle ein. Diese Erkenntnis widerspricht erneut einer unregulierten Rolle des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocators

(ARNT), wie von Semenza und anderen beschrieben (siehe 4.2) [160–162,164,201].

Ein weiteres Beispiel stellt die Beobachtung von Callero et al. dar [212], dass das Chemotherapeutikum Aminoflavon (AF) ARNT-abhängig in den Nucleus von MCF-7 transportiert wird, um über DNA-Schäden seine Wirkung zu entfalten. Ohne ein funktionierendes AhR/ARNT-System im Zytoplasma mit Translokation in den Nucleus sind diese Zellen diesem Therapeutikum gegenüber resistent [212].

In neueren Studien erlangt ARNT in Bezug auf viele verschiedene Krankheiten mehr und mehr an Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass ARNT auch bei Diabetes mellitus eine Rolle spielt. Bei zuckerkranken Patienten und im Mausmodell wurde eine fehlende bzw. fehlerhafte Regulation von ARNT in Leber und Pankreas nachgewiesen [213,214]. Hier gilt es, angeregt durch die Beobachtungen dieser Arbeit, in Zukunft einen Zusammenhang mit ER- β (eventuell auch ER- α) zu überprüfen.

4.4 Resümee und Ausblick

Abschließend soll festgehalten werden, dass die Zellhomöostase komplex reguliert wird. In diesen Regulationsmechanismus greifen die Östrogenrezeptoren (ER- α und ER- β) und die Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF- α und ARNT), nicht nur unter Hypoxie, entscheidend ein. Der ER- α ist aktuell die Zielstruktur einer antihormonellen Brustkrebstherapie. Es ist möglich durch gezielte Modulation oder Herunterregulierung des ER- α oder durch Synthesehemmung der Östrogene seinen Einfluss auf die Brustkrebszelle zu beeinflussen. Mit dieser Studie wird zum ersten Mal gezeigt, dass der ER- α auch in sogenanntem „ER-negativem“ Brustkrebs und anderen Geweben strategisch eine Rolle spielen könnte und seine Expression hier veränderbar ist. Weiter soll diese Arbeit neben ER- α vermehrt auch ER- β als Zielstruktur einer (Brust)Krebstherapie zur Diskussion stellen. Auf Grund eines breiteren Expressionsmusters in vielen verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers könnte der ER- β vielseitiger als der ER- α in der Krebstherapie zum Einsatz kommen. Hierdurch ist jedoch auch gerade ein großes und unvorhersehbares Nebenwirkungsprofil bei systemischer Therapie zu erwarten, welches bewältigt werden müsste. Weiterhin soll mit dieser

Arbeit aufgezeigt werden, dass gerade die Verschiebung des Verhältnisses zwischen ER- α und ER- β eine entscheidende Rolle spielt und diese Verschiebung gezielt möglich ist. Die ER- α/β -Ratio ist für die Reaktion der Zelle auf Östrogene bzw. an den Rezeptoren angreifende Medikamente entscheidend. Es muss somit in Zukunft der ER- β bei der Krebstherapie mit berücksichtigt werden. HIF-1 α und HIF-2 α werden als aussichtsreiche therapeutische Angriffspunkte solider Tumoren in der Literatur diskutiert. Sie sind für das Überleben der Brustkrebszellen, den Proliferationsindex, die Invasivität, die metastatische Tendenz sowie die Therapierbarkeit mitverantwortlich [39,107,144]. Diese Arbeit zeigt, dass besonders in Brustkrebszellen HIF- α in Verbindung mit ARNT über die Östrogenrezeptoren entscheidend in die Zellhomöostase eingreift. In dieser Studie wird bewiesen, dass die Expression dieser Faktoren sich gegenseitig beeinflusst und vom Zelltyp abhängig ist. Weiter wird gezeigt, dass die Rolle des Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) unterschätzt wird. Die geltende Ansicht, ARNT sei gänzlich unreguliert, ubiquitär vorhanden und greife nicht selbst in die Zellhomöostase ein, ist nicht haltbar. ARNT, HIF- α und die Östrogenrezeptoren sind maßgebend an der Karzinogenese und der Therapierbarkeit von Brustkrebs beteiligt. Diese Arbeit zeigt auf, dass insbesondere bei Krebs aber auch bei weiteren Krankheiten, eine spezielle zelltypabhängige molekulare Charakterisierung nötig ist, um in Zukunft die Therapie entscheidend zu Gunsten der Patienten beeinflussen zu können.

In Zukunft werden die Möglichkeiten einer gezielten Beeinflussung von HIF- α , ARNT, ER- α und ER- β untersucht und diskutiert werden müssen. Dies könnte neue Strategien und Möglichkeiten im Kampf gegen Brustkrebs und andere Krankheiten erschließen. Es gilt hier insbesondere ein weites Verbreitungsmuster und Zell- und Gewebespezifische Differenzen dieser Regulationsfaktoren zu beachten. Der Naturstoff Curcumin ist beispielsweise in der Lage, über eine Verringerung der ARNT-Konzentrationen eine tumorprotektive Wirkung zu entfalten [201]. Dieses Beispiel belegt die Möglichkeit einer solchen Strategie und unterstreicht die Relevanz dieses Themas.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste bösartige Tumor der Frau. Für die Behandlung und das „Outcome“ der Patienten ist vor allem der Östrogenrezeptorstatus entscheidend. Es gibt zwei verschiedene Unterformen dieses Rezeptors, den ER- α , der proliferationsfördernd wirkt und der Hauptangriffspunkt einer antihormonellen Therapie ist und den ER- β , der Apoptose fördert und in der Brustdrüse einen Gegenspieler vom ER- α darstellt. Entscheidend für das Verhalten des Zielgewebes auf Östrogen ist somit das Verhältnis von ER- α zu ER- β (ER- α/β -Ratio). Ein weiteres entscheidendes Element im Hinblick auf die Karzinogenese sind Transkriptionsfaktoren vom Typ der Hypoxie-Induzierbaren-Faktoren (HIF). Aktive HIF-Dimere setzen sich aus dem Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 β) und je einer sauerstofflabilen Untereinheit der HIF- α -Monomere (HIF-1 α , HIF-2 α oder HIF-3 α) zusammen. Die HIF- α -Monomere werden demnach durch Sauerstoffarmut (Hypoxie) stabilisiert, können aber auch chemisch durch sog. Hypoxie-Mimetika wie z.B. Cobalt(II)-Chlorid (CoCl₂) vor einem Abbau bewahrt werden. HIF-1 α und HIF-2 α sind bekannt dafür die Aggressivität, die Invasivität und die Resistenzen von Tumoren entscheidend zu begünstigen.

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β entscheidend mit ARNT und HIF- α in Zusammenhang stehen und sich diese 4 Faktoren gegenseitig beeinflussen. Dazu wurden molekularbiologisch, bzw. biochemisch die Protein- und die mRNA-Konzentrationen an verschiedenen Krebszelllinien *in vitro* gemessen. Durch Hypoxie und Hypoxie-Mimetika konnten die HIF- α -Konzentrationen moduliert werden. Weiterhin wurde mittels der Methode der RNA-Interferenz eine HIF-Defizienz erzeugt. 4-Hydroxytamoxifen kam zur Simulation einer antihormonellen Therapie zum Einsatz.

Diese Arbeit zeigt *in vitro*, dass ER- α und ER- β durch Hypoxie in Brustkrebszellen vom Typ Luminal in ihrer Konzentration reduziert werden. Diese Reduktion ist jedoch bei ER- α ausgeprägter als bei ER- β und es wird somit unter Hypoxie die ER- α/β -Ratio verschoben. Weiter zeigt diese Arbeit auf, dass HIF- α nicht in der Lage ist diese Reduktion hervorzurufen. Vielmehr verhindert HIF-1 α unter Hypoxie eine weitere ER- α -Reduktion und zugleich eine ER- β -Überexpression und fungiert

somit als antiapoptotischer Faktor in Brustkrebszellen. Weiterhin beweisen die Resultate dieser Studie, dass Brustkrebszellen, welche lange unter Östrogendeprivation gehalten wurden, nicht mehr mit einer ER- α -Reduktion unter Hypoxie reagieren. Diese Arbeit beweist außerdem erstmalig, dass ER- α durch CoCl₂ in „ER-negativen“ Brustkrebszelllinien induzierbar ist. Zudem liefert diese Studie Belege dafür, dass ARNT, entgegen der gängigen Meinung, zelltypabhängig regulierbar ist. Es gilt somit festzuhalten, dass in der Zellhomöostase ER- α und ER- β mit ARNT und HIF- α eng verbunden sind und diese Faktoren in Zukunft vermehrt Angriffspunkte bei der Therapie von Brustkrebs darstellen könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2008. WHO Press 2012.
2. Hentschel, S Katalinic A, Kaatsch P, Spix C: Krebs in Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin 2012;8.
3. Backe J: Brustkrebs beim Mann. Deutsches Ärzteblatt 2002;99:1168–1172.
4. Bahadir M, Parlar H, Spiteller M: Springer Umweltlexikon, Gabler Wissenschaftsverlage, 2000.
5. Becker N, Karsa v L: Kompendium Internistische Onkologie. ed 4 Springer Verlag, 2006.
6. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch H a, Eyfjord JE, Hopper JL, et al.: Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. American journal of human genetics 2003;72:1117–30.
7. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al.: Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nature genetics 2010;42:410–4.
8. Domchek SM, Friebel TM, Singer CF, Evans DG, Lynch HT, Isaacs C, et al.: Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. journal of the American Medical Association 2010;304:967–75.
9. Siegmund-Schultze N, Zylka-Menhorn V, Leinmüller R, Meyer R: Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage. Deutsches Ärzteblatt 2008;17.
10. Lacey J V, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang S-C, Leitzmann MF, et al.: Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. BMC cancer 2009;9:84.
11. Schulz K D, Kreienberg R, Fischer R, Albert U S: Stage 3 recommendations-the early recognition of breast cancer in Germany. Abridged version for medical practitioners. Radiologe 2003;43:495.
12. Brinton LA, Daling JR, Liff JM, Schoenberg JB, Malone KE, Stanford JL, et al.: Oral Contraceptives and Breast Cancer Risk Among Younger Women. Journal of the National Cancer Institute 1995;87:827–835.

13. Ursin G, Wu a H, Hoover RN, West DW, Nomura a M, Kolonel LN, et al.: Breast cancer and oral contraceptive use in Asian-American women. *American journal of epidemiology* 1999;150:561–7.
14. Silvera AS, Miller AB, Rohan TE: Oral contraceptive use and risk of breast cancer among women with a family history of breast cancer: a prospective cohort study. *Cancer causes & control* 2005;16:1059–63.
15. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, Fu R, Griffin J, O'Meara ES, et al.: Risk Factors for Breast Cancer for Women Aged 40 to 49 Years: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine* 2012;156:635–48.
16. Lieske B: Left handedness and breast cancer: should left handed premenopausal women be screened? *BMJ* 2005 Oct 29;331:1024; author reply 1024.
17. Titus-Ernstoff L, Newcomb PA, Egan KM, Baron JA, Greenberg ER, Trichopoulos D, et al.: Left-handedness in relation to breast cancer risk in postmenopausal women. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 2000;11:181–4.
18. Ramadhani MK, Elias SG, van Noord PAH, Grobbee DE, Peeters PHM, Uiterwaal CSPM: Innate left handedness and risk of breast cancer: case-cohort study. *BMJ* 2005;331:882–3.
19. Tavassoli FA, Devilee P, Cancer TIA for R on: Pathology & Genetics: Tumours of the Breast and Female Genital Organs IARC, 2003.
20. Aulmann S, Penzel R, Schirmacher P, Sinn HP: Lobular carcinoma in situ (LCIS): risk factor and precursor of invasive lobular breast cancer. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2007;91:208–13.
21. Simpson PT, Gale T, Fulford LG, Reis-Filho JS, Lakhani SR: The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: pathology of atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma in situ. *Breast cancer research : BCR* 2003;258–62.
22. Lebeau A. HB, Nāhrig J, Permanetter W: MANUAL Mammakarzinome: "Pathomorphologie des Mammakarzinoms." Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München 2005.
23. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al.: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2006;295:2492–502.
24. Bloom HJ, Richardson WW: Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years, *British journal of cancer* 1957;11:359–77.

25. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403–10.
26. Genestie C, Zafrani B, Asselain B, Fourquet A, Rozan S, Validire P, et al.: Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. *Anticancer research*;18:571–6.
27. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. ed 4 Springer Verlag, 2006.
28. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J: Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2007;18:1133–44.
29. AWMF; Deutsche Krebsgesellschaft e.V.; Deutschen Krebshilfe e.V.; Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. AWMF-Reg No 032 - 045OL 2012;32–45.
30. Janni W, Gerber B, Sommer H, Untch M, Krause A, Dian D, Runnebaum I, Rack B, Friesen K: Deutsches Ärzteblatt: Zertifizierte medizinische Fortbildung: Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms (14.10.2005)
31. Fisher B, Jeong J-H, Anderson S, Bryant J, Fisher ER, Wolmark N: Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *The New England journal of medicine* 2002 22;347:567–75.
32. Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, et al.: Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *The New England journal of medicine* 2002 17;347:1227–32.
33. AGO e.V.; Breast Guidelines: Operative Therapie des Mammakarzinoms unter onkologischen Aspekten 2011;
34. Radiotherapy for early breast cancer. *Cochrane database of systematic reviews* 2002 Jan;:CD003647.

35. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003 1;21:3357–65.
36. Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, et al.: Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011 12;378:1707–16.
37. Cosar R, Uzal C, Tokatli F, Denizli B, Saynak M, Turan N, et al.: Postmastectomy irradiation in breast in breast cancer patients with T1-2 and 1-3 positive axillary lymph nodes: is there a role for radiation therapy? *Radiation oncology (London, England)* 2011;6:28.
38. Hoskin PJ: Bisphosphonates and radiation therapy for palliation of metastatic bone disease. *Cancer treatment reviews* 2003;29:321–7.
39. Ströfer M, Jelkmann W, Metzen E, Dunst J, Depping R: Stabilisation and Knockdown of HIF - Two Distinct Ways Comparably Important in Radiotherapy. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2011;805–812.
40. Palmieri C, Jones A: The 2011 EBCTCG polychemotherapy overview. *Lancet* 2012;379:390–2.
41. Shepard HM, Lewis GD, Sarup JC, Fendly BM, Maneval D, Mordenti J, et al.: Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *Journal of clinical immunology* 1991;11:117–27.
42. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al.: 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:29–36.
43. Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* 2003;3:401–10.
44. Martin L-A, Pancholi S, Farmer I, Guest S, Ribas R, Weigel MT, et al.: Effectiveness and molecular interactions of the clinically active mTORC1 inhibitor everolimus in combination with tamoxifen or letrozole in vitro and in vivo. *Breast cancer research : BCR* 2012 17;14:R132.
45. Morrow PK, Wulf GM, Ensor J, Booser DJ, Moore JA, Flores PR, et al.: Phase I/II study of trastuzumab in combination with everolimus (RAD001) in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer who progressed on trastuzumab-based therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011 10;29:3126–32.

46. Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Pöstlberger S, Menzel C, et al.: Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *The New England journal of medicine* 2009;360:679–91.
47. Coleman RE, Marshall H, Cameron D, Dodwell D, Burkinshaw R, Keane M, et al.: Breast-cancer adjuvant therapy with zoledronic acid. *The New England journal of medicine* 2011 13;365:1396–405.
48. Azim H, Azim HA: Targeting RANKL in breast cancer: bone metastasis and beyond. *Expert review of anticancer therapy* 2013;13:195–201.
49. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Akdä: Xgeva® (Denosumab) 2011;1–3.
50. Lønning E, Lien EA: Mechanisms of action of endocrine treatment in breast cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* 1995;21:158–93.
51. Vogel VG: Follow-up of the breast cancer prevention trial and the future of breast cancer prevention efforts. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001;7:4413s–4418s; discussion 4411s–4412s.
52. Valachis A, Mauri D, Polyzos NP, Mavroudis D, Georgoulas V, Casazza G: Fulvestrant in the treatment of advanced breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical reviews in oncology/hematology* 2010;73:220–7.
53. Klijn JG, Blamey RW, Boccardo F, Tominaga T, Duchateau L, Sylvester R: Combined tamoxifen and luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonist versus LHRH agonist alone in premenopausal advanced breast cancer: a meta-analysis of four randomized trials. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001;19:343–53.
54. Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz T a, Davidson NE, et al.: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:3784–96.
55. Peto R, Davies C, Godwin J, Gray R, Pan HC, Clarke M, et al.: Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* 2012;379:432–44.

56. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al.: Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378:771–84.
57. Provenzano A, Kurian S, Abraham J: Overcoming endocrine resistance in breast cancer: role of the PI3K and the mTOR pathways. *Expert review of anticancer therapy* 2013;13:143–7.
58. Herynk MH, Fuqua SAW: Estrogen receptors in resistance to hormone therapy. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;608:130–43.
59. Dawood S: Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options. *Drugs* 2010;70:2247–58.
60. Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, Liff JM, Flagg EW, Coates RJ, et al.: The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer causes & control* : CCC 2009;20:1071–82.
61. Schiff R, Massarweh SA, Shou J, Bharwani L, Arpino G, Rimawi M, et al.: Advanced concepts in estrogen receptor biology and breast cancer endocrine resistance: implicated role of growth factor signaling and estrogen receptor coregulators. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005;56 Suppl 1:10–20.
62. Nielsen KV, Ejlersen B, Müller S, Møller S, Rasmussen BB, Balslev E, et al.: Amplification of ESR1 may predict resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2011;127:345–55.
63. Nelson LR, Bulun SE: Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001;45:S116–24.
64. Weichman BM, Notides AC: Estrogen receptor activation and the dissociation kinetics of estradiol, estriol, and estrone. *Endocrinology* 1980;106:434–9.
65. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M: Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular aspects of medicine* 2006;27:299–402.
66. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H: Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences* 2000;21:381–8.

67. Du X, Li X-Q, Li L, Xu Y-Y, Feng Y-M: The detection of ESR1/PGR/ERBB2 mRNA levels by RT-QPCR: a better approach for subtyping breast cancer and predicting prognosis. *Breast cancer research and treatment* 2013; DOI: 10.1007/s10549-013-2432-2
68. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:5925–30.
69. Sun J, Baudry J, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Molecular basis for the subtype discrimination of the estrogen receptor-beta-selective ligand, diarylpropionitrile. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2003;17:247–58.
70. Genatlas sheet (internet) available from: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/fiche.php?symbol=ESR2>
71. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134–9.
72. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al.: AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science (New York, NY)* 1997;277:965–8.
73. Schwabe JWR, Teichmann SA: Nuclear receptors: the evolution of diversity. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2004;27.
74. Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL: Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Molecular biology of the cell* 1999;10:471–86.
75. Levin ER: Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2005:1951–9.
76. Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M: Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Molecular and cellular biology* 2004;24:7681–94.
77. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al.: Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews* 2001;81:1535–65.
78. Murphy LC, Dotzlaw H, Leygue E, Coutts A, Watson P: The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1998;65:175–80.

79. Staub C, Rauch M, Ferrière F, Trépos M, Dorval-Coiffec I, Saunders PT, et al.: Expression of estrogen receptor ESR1 and its 46-kDa variant in the gubernaculum testis. *Biology of reproduction* 2005;73:703–12.
80. Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, et al.: Nuclear and cytoplasmic expression of ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:5228–35.
81. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, et al.: Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochemical and biophysical research communications* 1998;247:75–8.
82. Leung Y-K, Mak P, Hassan S, Ho S-M: Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:13162–7.
83. Macedo LF, Sabnis G, Brodie A: Aromatase inhibitors and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1155:162–73.
84. Lindberg MK, Movérare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-A, et al.: Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a “ying yang” relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2003;17:203–8.
85. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-A: Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear receptor signaling* 2008;6:e003.
86. Minutolo F, Macchia M, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA: Estrogen receptor β ligands: recent advances and biomedical applications. *Medicinal research reviews* 2011;31:364–442.
87. Ignatov A, Ignatov T, Roessner A, Costa SD, Kalinski T: Role of GPR30 in the mechanisms of tamoxifen resistance in breast cancer MCF-7 cells. *Breast cancer research and treatment* 2010;123:87–96.
88. Vanacker JM, Pettersson K, Gustafsson JA, Laudet V: Transcriptional targets shared by estrogen receptor- related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *The EMBO journal* 1999;18:4270–9.
89. Gadkar-Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C: Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2005;10:2118–30.

90. Chen C, Opazo JC, Erez O, Uddin M, Santolaya-Forgas J, Goodman M, et al.: The human progesterone receptor shows evidence of adaptive evolution associated with its ability to act as a transcription factor. *Molecular phylogenetics and evolution* 2008;47:637–49.
91. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al.: Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO journal* 1990;9:1603–14.
92. Cole MP, Jones CT, Todd ID: A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *British journal of cancer* 1971;25:270–5.
93. Walter Sneader: *Drug Discovery a History* 2005
94. Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC: Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005;55:471–8.
95. ROTE LISTE® 2012 [Internet] Available from: <http://www.rote-liste.de/>
96. Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 1993;7:1266–74.
97. Robinson E, Kimmick GG, Muss HB: Tamoxifen in postmenopausal women a safety perspective. *Drugs Aging* 8:329 1996;
98. Shang Y: Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* 2006;6:360–8.
99. Rosal MA, da Silva BB: Evaluation of estrogen and progesterone receptors in non-neoplastic breast tissue of women of reproductive age exposed to tamoxifen and raloxifene: a randomized, double-blind study. *Breast cancer research and treatment* 2011;125:797–801.
100. Blackwell KL, Haroon ZA, Shan S, Saito W, Broadwater G, Greenberg CS, et al.: Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:4359–64.
101. Brandt S, Kopp A, Grage B, Knabbe C: Effects of tamoxifen on transcriptional level of transforming growth factor beta (TGF-beta) isoforms 1 and 2 in tumor tissue during primary treatment of patients with breast cancer. *Anticancer research* 2003;23:223–9.

102. Friedl A, Jordan VC, Pollak M: Suppression of serum insulin-like growth factor-1 levels in breast cancer patients during adjuvant tamoxifen therapy. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 1993;29A:1368–72.
103. Weber G: Down-regulation of increased signal transduction capacity in human cancer cells. *Advances in enzyme regulation* 2005;45:37–51.
104. O'Brian CA, Ioannides CG, Ward NE, Liskamp RM: Inhibition of protein kinase C and calmodulin by the geometric isomers cis- and trans-tamoxifen. *Biopolymers* 1990;29:97–104.
105. Klinke R; Pape HC; Silbernagl S: *Physiologie*. ed 5 Georg Thieme Verlag, 2005.
106. Silbernagl S; Despopoulos A: *Taschenatlas Physiologie*. ed 7 2007.
107. Semenza GL: Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2003;3:721–32.
108. Ströfer M, Jelkmann W, Metzen E, Brockmeier U, Dunst J, Depping R: Stabilisation and knockdown of HIF--two distinct ways comparably important in radiotherapy. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2011;28:805–12.
109. Zhang Q, Qian Z, Pan L, Li H, Zhu H: Hypoxia-inducible factor 1 mediates the anti-apoptosis of berberine in neurons during hypoxia/ischemia. *Acta physiologica Hungarica* 2012;99:311–23.
110. Robiolio M, Rumsey WL, Wilson DF: Oxygen diffusion and mitochondrial respiration in neuroblastoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1989;256:C1207–1213.
111. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA: Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene expression* 1998;7:205–13.
112. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J: HIF-1 and HIF-2 transcription factors-similar but not identical. *Molecules and cells* 2010;29:435–42.
113. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC: Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 2003;23:9361–9374.
114. Yang J, Zhang L, Erbel PJA, Gardner KH, Ding K, Garcia JA, et al.: Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:36047–54.

115. Lisy K, Peet DJ: Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell death and differentiation* 2008;15:642–9.
116. HIF1A hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) [Homo sapiens] - Gene - NCBI 2013
117. ARNT aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [Homo sapiens] - Gene - NCBI 2013
118. HIF3A hypoxia inducible factor 3, alpha subunit [Homo sapiens] - Gene - NCBI 2013
119. EPAS1 endothelial PAS domain protein 1 [Homo sapiens] - Gene - NCBI 2013
120. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al.: Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development* 1998;12:149–62.
121. Berra E, Roux D, Richard DE, Pouyssegur J: Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) escapes O(2)-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO reports* 2001;2:615–20.
122. Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, et al.: Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *Journal of cell science* 2003;116:1319–26.
123. Nytko KJ, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH, Stiehl DP: Regulated function of the prolyl-4-hydroxylase domain (PHD) oxygen sensor proteins. *Antioxidants & redox signaling* 2007;9:1329–38.
124. Czyzyk-Krzeska MF, Meller J: von Hippel-Lindau tumor suppressor: not only HIF's executioner. *Trends in molecular medicine* 2004;10:146–9.
125. Wilkins SE, Karttunen S, Hampton-Smith RJ, Murchland I, Chapman-Smith A, Peet DJ: Factor inhibiting HIF (FIH) recognizes distinct molecular features within hypoxia-inducible factor- α (HIF- α) versus ankyrin repeat substrates. *The Journal of biological chemistry* 2012;287:8769–81.
126. Liu X, Wang L, Zhao K, Thompson PR, Hwang Y, Marmorstein R, et al.: The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature* 2008;451:846–50.
127. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, et al.: Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414:550–4.

128. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EHL, Kondo Y, Hara S, et al.: Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:11032–40.
129. A Groenman F, Rutter M, Wang J, Caniggia I, Tibboel D, Post M: Effect of chemical stabilizers of hypoxia-inducible factors on early lung development. . *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007.
130. Nakayama K, Ronai Z: Siah: new players in the cellular response to hypoxia. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2004;3:1345–7.
131. Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *journal of cell science* 1999;112,1203-1212
132. Hieber S, Huhn R, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B: Hypoxia-inducible factor 1 and related gene products in anaesthetic-induced preconditioning. *European Journal of Anaesthesiology* 2009;26:201–206.
133. Dewhirst MW: Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiation research* 2009;172:653–65.
134. Shaw RJ, Cantley LC: Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006;441:424–30.
135. Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, et al.: C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation. *Cell* 2001;107:43–54.
136. Kawedia JD, Yang F, Sartor MA, Gozal D, Czyzyk-Krzeska M, Menon AG: Hypoxia and Hypoxia Mimetics Decrease Aquaporin 5 (AQP5) Expression through Both Hypoxia Inducible Factor-1 α and Proteasome-Mediated Pathways. *PloS one* 2013:e57541.
137. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE: Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:15911–6.
138. Kotake-Nara E, Saida K: Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor: regulation of expression via reactive oxygen species induced by CoCl₂, and Biological activities including neurite outgrowth in PC12 cells. *TheScientificWorldJournal* 2006;6:176–86.

139. Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, Gleadle JM: Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1 α , HIF-2 α , and other pathways. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:15215–26.
140. Hockel M, Vaupel P: Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2001 Feb;93:266–276.
141. Cheng Y, Chen G, Hong L, Zhou L, Hu M, Li B, et al.: How does hypoxia inducible factor-1 α participate in enhancing the glycolysis activity in cervical cancer? *Annals of diagnostic pathology* 2013; DOI:10.1016/j.anndiagpath.2012.12.002
142. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al.: Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998;394:485–90.
143. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM: Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006;441:437–43.
144. Qing G, Simon MC: Hypoxia inducible factor-2 α : a critical mediator of aggressive tumor phenotypes. *Current opinion in genetics & development* 2009;19:60–6.
145. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH: The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:8386–91.
146. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC: Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 2003;23:9361–74.
147. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wiesener M, et al.: Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004;18:1462–4.
148. Rankin EB, Giaccia AJ: The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell death and differentiation* 2008;15:678–85.
149. Vaupel P, Mayer A, Höckel M: Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods in enzymology* 2004;381:335–54.

150. Helczynska K, Kronblad A, Jögi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G, et al.: Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer research* 2003;63:1441–4.
151. Holliday DL, Speirs V: Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:215.
152. Inoue K, Fujimoto S, Ogawa M: Antitumor efficacy of seventeen anticancer drugs in human breast cancer xenograft (MX-1) transplanted in nude mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 1983;10. DOI:10.1007/BF00255758
153. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM: A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *BioTechniques* 2009;46:277–84.
154. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Stellungnahme der ZKBS zur Neueinstufung der Zelllinie Hep3B gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV; in : Az. 6790-05-04-20.
155. Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X-J, Darroudi F, Kassie F: Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 2004;198:329–40.
156. Frede S, Freitag P, Geuting L, Konietzny R, Fandrey J: Oxygen-regulated expression of the erythropoietin gene in the human renal cell line REPC. *Blood* 2011;117:4905–14.
157. D'Souza SS, Scherzinger-Laude K, Simon M, Salimath BP, Rössler J: Angiopoietin-2 inhibition using siRNA or the peptide antagonist L1-10 results in antitumor activity in human neuroblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2012;138:2017–26.
158. ATCC - CRL-1651; Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL_1651.aspx?geo_country=de
159. E.Metzen; M.Wolff; J.Fandrey; W. Jelkmann: Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *RespirPhysiol* 1995;100:101–106.
160. Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J: Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2008;32:210–7.

161. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L: Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:5667–72.
162. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF: Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:7987–92.
163. Kaelin WG: Proline hydroxylation and gene expression. *Annual review of biochemistry* 2005;74:115–28.
164. Semenza GL: Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012;148:399–408.
165. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:5510–4.
166. Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH: Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *Journal of cell science* 1999;112 Pt 8:1203–12.
167. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir J-M, Corbo L: Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine reviews* 2011;32:597–622.
168. Levin ER: Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *The Journal of physiology* 2009;587:5019–23.
169. McDonnell DP, Norris JD: Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science (New York, NY)* 2002;296:1642–4.
170. Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, et al.: Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocrine-related cancer* 2007;14:169–87.
171. Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews* 1999;20:358–417.
172. Ali S, Coombes RC: Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nature reviews Cancer* 2002;2:101–12.

173. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA: Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000;19:4970–8.
174. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson J-A: Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:1566–71.
175. Treeck O, Lattrich C, Springwald A, Ortmann O: Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast cancer research and treatment* 2010;120:557–65.
176. Sotoca AMC, van den Berg H, Vervoort J, van der Saag P, Ström A, Gustafsson J-A, et al.: Influence of cellular ERalpha/ERbeta ratio on the ERalpha-agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 2008;105:303–11.
177. Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, et al.: The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Molecular and cellular biology* 2003;23:1843–55.
178. Ryu K, Park C, Lee Y: Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogen receptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;407:831–6.
179. Rüegg J, Swedenborg E, Wahlström D, Escande A, Balaguer P, Pettersson K, et al.: The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2008;22:304–16.
180. Martin L-A, Farmer I, Johnston SRD, Ali S, Marshall C, Dowsett M: Enhanced estrogen receptor (ER) alpha, ERBB2, and MAPK signal transduction pathways operate during the adaptation of MCF-7 cells to long term estrogen deprivation. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:30458–68.
181. Ciruelos E, Cortes-Funes H, Ghanem I, Manso L, Arteaga C: Role of inhibitors of mammalian target of rapamycin in the treatment of luminal breast cancer. *Anti-cancer drugs* 2013;24:769–80.
182. Cho J, Kim D, Lee S, Lee Y: Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2005;19:1191–9.

183. Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, et al.: FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nature cell biology* 2001;3:15–23.
184. Marsaud V, Gougelet A, Maillard S, Renoir J-M: Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2003;17:2013–27.
185. Reid G, Hübner MR, Métivier R, Brand H, Denger S, Manu D, et al.: Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular cell* 2003;11:695–707.
186. Coradini D, Pellizzaro C, Speranza A, Daidone MG: Hypoxia and estrogen receptor profile influence the responsiveness of human breast cancer cells to estradiol and antiestrogens. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2004;61:76–82.
187. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN: Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:10972–7.
188. Wen X-F, Shen Z, Shen Z-Z, Nguyen M, Shao Z-M: The expression of ER beta protein correlates with vascular endothelial growth factor and its prognostic significance in human breast cancer. *Oncology reports* 2002;9:937–44.
189. Lim W, Park Y, Cho J, Park C, Park J, Park Y-K, et al.: Estrogen receptor beta inhibits transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 through the downregulation of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R32.
190. Foekens JA, Peters HA, Grebenchtchikov N, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Geurts-Moespot A, et al.: High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer. *Cancer research* 2001;61:5407–14.
191. Mendoza RA, Enriquez MI, Mejia SM, Moody EE, Thordarson G: Interactions between IGF-I, estrogen receptor- α (ER α), and ER β in regulating growth/apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of endocrinology* 2011;208:1–9.

192. Wu M-H, Lu C-W, Chang F-M, Tsai S-J: Estrogen receptor expression affected by hypoxia inducible factor-1 α in stromal cells from patients with endometriosis. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology* 2012;51:50–4.
193. Swedenborg E, Power KA, Cai W, Pongratz I, Rüegg J: Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009;66:3873–94.
194. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, et al.: Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 2002;9:1–13.
195. Jeng MH, Jiang SY, Jordan VC: Paradoxical regulation of estrogen-dependent growth factor gene expression in estrogen receptor (ER)-negative human breast cancer cells stably expressing ER. *Cancer letters* 1994;82:123–8.
196. Garcia M, Derocq D, Freiss G, Rochefort H: Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:11538–42.
197. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA: The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2000;40:519–61.
198. Liang Y, Li W-W, Yang B-W, Tao Z-H, Sun H-C, Wang L, et al.: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator is associated with tumor growth and progression of hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012;130:1745–54.
199. Shi S, Yoon DY, Hodge-Bell K, Huerta-Yepez S, Hankinson O: Aryl hydrocarbon nuclear translocator (hypoxia inducible factor 1beta) activity is required more during early than late tumor growth. *Molecular carcinogenesis* 2010;49:157–65.
200. Nakabayashi H, Ohta Y, Yamamoto M, Susuki Y, Taguchi A, Tanabe K, et al.: Clock-controlled output gene Dbp is a regulator of Arnt/Hif-1 β gene expression in pancreatic islet β -cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2013;434:370–5.
201. Choi H, Chun Y-S, Kim S-W, Kim M-S, Park J-W: Curcumin inhibits hypoxia-inducible factor-1 by degrading aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: a mechanism of tumor growth inhibition. *Molecular pharmacology* 2006;70:1664–71.

202. Labrecque MP, Prefontaine GG, Beischlag T V: The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) family of proteins: Transcriptional modifiers with multi-functional protein interfaces. *Current molecular medicine* 2012
203. Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Bauer C, Gassmann M: Hypoxia, a novel inducer of acute phase gene expression in a human hepatoma cell line. *The Journal of biological chemistry* 1995;270:27865–70.
204. Mandl M, Kapeller B, Lieber R, Macfelda K: Hypoxia-inducible factor-1 β (HIF-1 β) is upregulated in a HIF-1 α -dependent manner in 518A2 human melanoma cells under hypoxic conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 2013;434:166–72.
205. Chan CMW, Martin L-A, Johnston SRD, Ali S, Dowsett M: Molecular changes associated with the acquisition of oestrogen hypersensitivity in MCF-7 breast cancer cells on long-term oestrogen deprivation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2002;81:333–41.
206. Ströfer M, Jelkmann W, Depping R: Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells: the role of HIF. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntengesellschaft* 2011;187:393–400.
207. Labrecque MP, Takhar MK, Hollingshead BD, Prefontaine GG, Perdew GH, Beischlag T V: Distinct roles for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and ah receptor in estrogen-mediated signaling in human cancer cell lines. *PloS one* 2012;7:e29545.
208. Swedenborg E, Pongratz I: AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 2010;268:132–8.
209. Brunnberg S, Pettersson K, Rydin E, Matthews J, Hanberg A, Pongratz I: The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:6517–22.
210. Klinge CM, Kaur K, Swanson HI: The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERRalpha1. *Archives of biochemistry and biophysics* 2000;373:163–74.
211. Klinge CM, Bowers JL, Kulakosky PC, Kamboj KK, Swanson HI: The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Molecular and cellular endocrinology* 1999;157:105–19.

212. Callero MA, Loaiza-Pérez AI: The role of aryl hydrocarbon receptor and crosstalk with estrogen receptor in response of breast cancer cells to the novel antitumor agents benzothiazoles and aminoflavone. *International journal of breast cancer* 2011;2011:923250.
213. Wang XL, Suzuki R, Lee K, Tran T, Gunton JE, Saha AK, et al.: Ablation of ARNT/HIF1beta in liver alters gluconeogenesis, lipogenic gene expression, and serum ketones. *Cell metabolism* 2009;9:428–39.
214. Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng Y-H, et al.: Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 2005;122:337–49.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. Reinhard Depping**, Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann** und meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Jürgen Dunst** für die interessante Themenstellung und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle für das kritische Korrekturlesen meiner Manuskripte bedanken.

Bei Herrn **Dr. Depping** möchte ich mich vor allem für die sehr gute und zeitintensive Betreuung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Bei Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann** bedanke ich mich für die Aufnahme und Anstellung in seiner Arbeitsgruppe und das damit verbundene Vertrauen. Die Arbeit im Institut für Physiologie hat viel Spaß gemacht und mich wissenschaftlich sehr geprägt.

Herrn **Prof. Dr. Jürgen Dunst** danke ich insbesondere für die Initiierung des Themas sowie der Ermöglichung der Zusammenarbeit zwischen der Klinik für Strahlentherapie, UK-SH, Campus Lübeck und dem Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck.

Bei **Tanja Svensson** und **Bettina Rudzewski** möchte ich mich für die Einarbeitung in die Laborarbeit, die hervorragende Unterstützung und die schöne Zeit bedanken.

Allen **Mitarbeitern des Instituts für Physiologie** danke ich für die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre im Team.

Mein allergrößter Dank, nicht nur in Bezug auf diese Arbeit, gilt **meinen Eltern**, die mir das Potential geschenkt, mich stets gefördert, motiviert und unterstützt haben. Vielen Dank dafür, Ihr seid klasse! Bedanken möchte ich mich auch bei **meinen Geschwistern und meiner Freundin**, auf euch kann man sich verlassen.

Meinen lieben **Freunden** möchte ich für die Fokussierung auf die wirklich wichtigen Dinge im Leben und eine unvergessliche Zeit danken.

8. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Originalveröffentlichungen

Matthias Wolff, Wolfgang Jelkmann, Jürgen Dunst, Reinhard Depping

"The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1 β) is Influenced by Hypoxia and Hypoxia-Mimetics", Journal of Cellular Physiology and Biochemistry, Cell Physiol Biochem 2013;32:849-858, DOI: 10.1159/000354487
Impact Factor: 3,415 (Oktober 2013)

Matthias Wolff, Wolfgang Jelkmann, Jürgen Dunst, Reinhard Depping

"The Estrogen Receptor Expression in Breast Cancer is Influenced by Hypoxia and the Hypoxia Inducible Factors" (work in progress)

Wissenschaftliche Vorträge und Posterpräsentationen

Posterpreis und Kurzvortrag Lübecker Doktorandentag 2010 Uni im Dialog,
Poster: „Hypoxie in Tumoren“, Juni 2010, Lübeck

Kongressvortrag: „Hypoxie und das Mammakarzinom“, Ostseephysiologentagung,
17. Treffen der Ostseephysiologen, Mai 2012, Rostock

1.Preis FameLab - Schleswig-Holstein, "Die Östrogenrezeptorexpression beim Mammakarzinom", Januar 2013, Lübeck

Poster und Kurzvortrag: „Modulation der Östrogenrezeptorexpression durch Tumorphypoxie, Hypoxie-Mimetika und antihormonelle Therapie des Mammakarzinoms“, Senologiekongress, Juni 2013, München

9. Lebenslauf (Kurzfassung)

Persönliche Daten

Name: Matthias Holger Wolff
Geburtsdatum: 01. Oktober 1984
Geburtsort: Hansestadt Lübeck

Promotion

seit März 2009 Anfertigung der Dissertation am Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck in Kooperation mit der Klinik
für Strahlentherapie des UKSH

Berufliche Erfahrung

01/2013 bis 08/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für
Physiologie der Universität zu Lübeck

Studium

10/2006 bis 11/2012 Studium der Humanmedizin an der Universität zu
Lübeck, Abschluss: Staatsexamen

Zivildienst

09/2004 bis 07/2005 Maria-Montessori-Schule zu Lübeck, Schule für
geistig- und mehrfachbehinderte Kinder

Schulbildung

08/1995 bis 06/2004 Gymnasium Johanneum zu Lübeck

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Matthias Holger Wolff, dass ich die angefertigte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die beschriebenen Hilfsmittel genutzt. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Passagen habe ich als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe. Ich habe mich bis zum heutigen Tage noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 05.11.2014