

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. K. Diedrich

**Untersuchungen über die wechselseitige Beeinflussung von
Östrogenrezeptor- und Rezeptortyrosinkinase-Signalwegen
anhand des Proliferationsverhaltens humaner endome-
trialer Adenokarzinomzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Medizinischen Fakultät

vorgelegt von
Michaela Böster
aus Ostercappeln

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Merz

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2005
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.08.2005

Gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Wer mit der Wissenschaft sich sonnt,
ganz gleich in welchen Themen,
erweitert mit dem Horizont
die Vielzahl von Problemen.

Aus „Einsichten- Aussichten- Absichten“ von Hans Horn

Inhaltsverzeichnis

1)	Abkürzungsverzeichnis und Glossar	Seite 6
I	Einleitung	Seite 7
I.1	<i>Bisheriges Verständnis der Signalkaskaden nach Östradiol - oder Wachstumsfaktor - Stimulus</i>	
I.2	<i>Hintergrund dieser Arbeit</i>	
I.3	<i>Hintergründe zu den eingesetzten Substanzen</i>	
I.3.1	Rezeptorstatus der verwendeten Zelllinien	
I.3.2	Östradiol und. Antiöstrogene	
I.3.3	Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der Signaltransduktion	
I.4	<i>Überlegungen zu den Kombinationsversuchen</i>	
I.4.1	Kombinationen aus Östradiol und Antiöstrogenen	
I.4.2	Kombinationen aus Östradiol und Inhibitoren der RTK vermittelten Signaltransduktion	
I.4.3	Kombinationen aus Wachstumsfaktoren und Antiöstrogenen	
I.4.4	Kombinationen aus EGF und IGF-1 und Inhibitoren der RTK vermittelten Signaltransduktion	
I.4.5	Mehrfachkombinationen mit Heregulin	
II	Material und Methoden	Seite 21
II.1	<i>Material</i>	
II.I.1	Herkunft	
II.I.2	Lösungsmittel	
II.I.3	Konzentrationen der eingesetzten Substanzen	
II.2	<i>Methoden</i>	
II.2.1	Zellkultur	
II.2.2	Versuchsaufbau	
II.2.3	BrdU-Proliferations-ELISA	
II.2.3.1	Prinzip der Methode	
II.2.3.2	Durchführung der Methode	
II.2.4	Auswertung	

III	Ergebnisse	Seite
<i>III.1</i>	<i>Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit Einzelsubstanzen</i>	28
III.1.1	Proliferationsverhalten endometrialer Ishikawa - und HEC-1A-Zellen nach Behandlung mit Östradiol bzw. Antiöstrogenen	
III.1.2	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren bzw. Inhibitoren deren Signaltransduktion	
<i>III.2</i>	<i>Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit zwei Substanzen</i>	
III.2.1	Proliferationsverhalten endometrialer Ishikawa - und HEC-1A-Zellen nach Behandlung mit Östradiol bzw. Antiöstrogenen	
III.2.2	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren verschiedener Wachstumsfaktor-Signalwege	
III.2.3	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Östradiol und Inhibitoren der Wachstumsfaktorsignaltransduktion	
III.2.4	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Antiöstrogenen	
<i>III.3</i>	<i>Ergebnisse nach Inkubation mit mehr als zwei Substanzen</i>	
III.3.1	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Heregulin- β -1 in Kombination mit Herceptin und verschiedenen Östradiol -Antiöstrogen - Kombinationen	
III.3.2	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Östradiol- Antiöstrogen- Kombinationen und verschiedenen	

	Wachstumsfaktoren	
III.3.3	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa- Zellen nach Behandlung mit Östradiol- Anti- östrogen- Kombinationen und Inhibitoren der Wach- stumsfaktorsignaltransduktion	
III.3.4	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Is- hikawa- Zellen nach Behandlung mit Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, Inhibitoren der Signaltrans- duktion und Tamoxifen	
III.3.5	Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Is- hikawa- Zellen nach Behandlung mit Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, Inhibitoren der Signaltrans- duktion und Östradiol	
IV	Diskussion	Seite 55
V	Zusammenfassung	Seite 64
VI	Literaturverzeichnis	Seite 66
VII	Anhang	Seite 71
<i>VII.1</i>	<i>Tabellen</i>	
VII.1.1	Material: Hersteller und Vertrieb	
VII.1.2	Anzahl der Experimente pro Versuchsansatz	
VII.1.3	Statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$	
VII.1.4	Statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$	
VII.1.5	Statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$	
<i>VII:2</i>	<i>Schematische Darstellung der Versuchsanordnung</i>	
VIII	Danksagung	Seite 79
IX	Lebenslauf	Seite 80

1) Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Accutase: Medium zur enzymatischen Zellablösung bzw. -trennung

BrdU = 5-**B**rom-2-**D**esoxyuridin

CH₃COOH = Essigsäure

DMEM = **D**ulbecco's **m**odified **e**agle's **m**edium

E₂ = Östradiol

EGF = **e**pidermal **g**rowth **f**actor

EGFR = **E**GF - **R**ezeptor

Endotoxine: Gifte aus der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien

ERα = Östrogenrezeptor alpha

ERE = **e**strogen **r**esponse **e**lement

ERK = **e**xtracellular signal-**r**egulated **k**inase

FCS = **f**etal **c**alf **s**erum

Gestripptes Medium: mit Aktivkohle behandeltes FCS (durch Aktivkohle werden Steroide aus dem FCS entfernt)

GF = **g**rowth **f**actor (Wachstumsfaktor)

HCl = Salzsäure

HRG-β1 = **H**eregulin-**β**1

IGF-1 = **i**nsulin-like **g**rowth **f**actor **1**

IGFBP = **I**GF **B**indungs**p**rotein

IL-1 = **I**nter**l**eukin **1**

M = Molar, μM = Mikromolar

MAPK = **M**itogen **a**ktiviert**e** **P**rotei**n**ki**n**ase

MEKK1 = MAP-/ERK- Kinase 1; entspricht einer MAP- Kinase- Kinase

Mitogen: eine die Zellteilung aktivierende Substanz

nM = Nanomolar

PBS = Waschpuffer

PKC = **P**rotei**n**ki**n**ase **C**

RTK = **R**ezeptor**t**yr**o**s**i**n**k**inase

SHP = **s**hort **h**eterodimer **p**artner

SR2 = **s**erum **r**eplacement medium 2

TGF-α = **t**ransforming **g**rowth **f**actor alpha

TNF = **T**um**o**r**n**ek**r**ose**f**aktor

I Einleitung

I.1 Bisheriges Verständnis der zellulären Signalkaskaden nach Östradiol- oder Wachstumsfaktor – Stimulus

Zellproliferation und -differenzierung werden im Endometrium über unterschiedliche Signalwege reguliert. Eine der beiden Kaskaden wird über Wachstumsfaktoren, die andere über Hormone aktiviert. Sie unterscheiden sich in der Lokalisation der zugehörigen Rezeptoren und der Art der Signalverarbeitung. So entfalten Wachstumsfaktoren ihre Wirkung über sog. Rezeptortyrosinkinasen. Diese sind membranständig und besitzen sieben Transmembrandomänen. Nach Ligandenbindung kommt es an dieser Rezeptorform zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne und nachfolgend zur Aktivierung von MAP- Kinasen und Proteinkinase C. Diese wiederum induzieren weitere Mechanismen wie z.B. c-jun, c-myc oder AP-1 sensitive Gene die letztlich zur Transkription und DNA-Replikation führen, so dass es zur Proliferation der Zellen kommt. Alle MAP- Kinasen sind durch eine Aktivierungsschleife charakterisiert, die eine bestimmte Aminosäuresequenz enthält. Diese Sequenz wird von der Aminosäure Threonin eingeleitet und von Tyrosin beendet. Nach einem extrazellulären Stimulus kommt es zur Phosphorylierung an Threonin und Tyrosin durch MAP- Kinase- Kinasen. Es lassen sich mindestens drei MAPK- Familien differenzieren. Sie unterscheiden sich in Sequenz und Größe der Aktivierungsschleife. Die erste Familie bilden die sog. " extrazellulär signalregulierte Kinasen (ERK), die durch verschiedene Mitogene und Agonisten an Rezeptortyrosinkinasen stimuliert werden. In der zweiten Gruppe finden sich die stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK). Die dritte Familie beinhaltet die p38-Familie. Die beiden letztgenannten werden über verschiedene Stressfaktoren aktiviert. Dazu zählen z.B. UV- Strahlung, Hitze, chemisch oder osmotisch erzeugter Schock, Endotoxine und Zytokine wie IL-1 und TNF [27].

Das Steroidhormon Östradiol erzielt seine Wirkung über zytoplasmatische Östrogenrezeptoren. Es diffundiert zunächst in die Zelle und aktiviert den

Östrogenrezeptor (ER). In der Folge transloziert der angeregte Rezeptor in den Zellkern, bindet an Kofaktoren und dann an ein sog. estrogen response element (ERE), wodurch die Transkription östrogenabhängiger Gene eingeleitet wird.

Der Östrogenrezeptor setzt sich aus verschiedenen Regionen zusammen. Man unterscheidet zwischen den Rezeptorregionen AF1, DBD, NLS und LBD oder auch AF2. Die AF1-Domäne (**activation function 1**) liegt N-terminal und dient der Gentranskription durch Interaktion mit Kernrezeptorkoaktivatoren. DBD (**DNA-Bindungsdomäne**) als zentrales Zinkfingermotiv reguliert die sequenzspezifische DNA-Bindung und vermittelt die Transkriptionsaktivität am ERE. Die nötige Flexibilität in der Rezeptorkonformation wird durch das NLS (**nuclear localization signal**) gewährleistet. C-terminal liegt die LBD (**Liganden-Bindungsdomäne**). Sie dient der regulatorischen Rezeptorfunktion und enthält die AF2 - Region (**activation function 2**), deren Aufgabe die Rekrutierung von Koaktivatoren zur Gentranskription ist [5].

Diese beiden klassischen Signalwege wurden bis vor einigen Jahren als voneinander unabhängig betrachtet. Mittlerweile können sie aber nicht länger als getrennt ablaufende Reaktionen ohne gegenseitige Beeinflussung angesehen werden. So kann EGF eine E_2 -ähnliche Proliferation imitieren, die teilweise durch das reine Antiöstrogen ICI 164,384 inhibiert wird, was für eine Signalvermittlung über den ER spricht. Gleichzeitig führen bestimmte Mutationen des ER zum Verlust bestimmter Rezeptordomänen, wodurch diese Rezeptorformen nicht mehr über einen Östradiolstimulus aber durch EGF oder IGF-1 aktiviert werden können [34]. Weitere Hinweise ergeben sich aus der Beobachtung, dass E_2 im uterinen Gewebe eine Tyrosinphosphorylierung sowohl des IGF-1- als auch des EGF- Rezeptors bedingt. Außerdem inhibiert das reine Antiöstrogen ICI 182,780 die uterine IGF1- Genexpression, was zu einem verringerten Uterusgewicht führt [32]. Zusätzlich konnte am Modell humaner Tumorzell- Linien gezeigt werden, dass Ligandenbindung an RTKs zur Aktivierung eines ERE führen kann [17]. Abgesehen von diesen Ak-

tivierungen kann es jedoch auch über Rezeptorinteraktionen zur Inhibition kommen. So kann SHP, ein verwaister „Orphan“ Rezeptor, mit ER α und ER β interagieren. SHP besitzt keine DNA-Bindungsdomäne, wohl aber eine Ligandenbindungsdomäne. Er stellt einen negativen Regulator der Kernrezeptoraktivität dar und hemmt im HEC-1A- Zellkultur- Modell die E₂-ER α -stimulierte Aktivität eines ERE- regulierten Luciferase Reportergens [35]. Ist der ER α mit ICI 182,780 besetzt, kommt es nicht zur Inhibition der Luciferaseaktivität durch SHP [23]. Weiterhin konnte im HeLa – Zellkultur -Modell gezeigt werden, dass Glucocorticoide ebenso in der Lage sind, die Östradiol - Effekte zu inhibieren. Dies erfolgt über einen kompetitiven Antagonismus an AP-1-response-Elementen [39].

Die genannten wahrscheinlichen Interaktionen zwischen den ER- und RTK- Signalkaskaden sind nicht nur für das Verständnis von Proliferationsmechanismen wichtig, sondern auch von klinischer Bedeutung, da sie nicht nur die Wirksamkeit antitumorale Therapien beeinflussen könnten, die gegen einen der beiden Signalwege gerichtet sind, sondern da sie darüber hinaus Ansatzpunkte für neue therapeutische Strategien zur Behandlung von Malignomen liefern können.

1.2 Hintergrund dieser Arbeit

Sowohl die beschriebenen Rezeptorwechselwirkungen als auch das Problem der Resistenzen gegen eine Antiöstrogentherapie bei Mammakarzinom - Patientinnen erfordern neue Behandlungsansätze. Antiöstrogenresistenzen treten besonders im Zusammenhang mit der Überexpression der Rezeptortyrosinkinase HER2/neu auf. Her2/neu ist ein Transmembranrezeptor mit 50% Homologie zum EGF- Rezeptor [15]. Diese RTK findet sich physiologisch sowohl im Endometrium als auch im Mammagewebe, ist jedoch bei 15-30% der Mammakarzinom - Patientinnen überexprimiert. In diesen Fällen ist bei fortgeschrittener Erkrankung die Ansprechrate auf eine antihormonelle Therapie mit Tamoxifen signifikant schlechter verglichen mit den Fällen ohne HER2/neu- Überexpression. Da gleichzeitig auch eine signifikante Korrelation zwischen vermehrter Tumorgröße und

abnehmendem ER- Status einerseits und der Her2/neu- Überexpression andererseits beschrieben wird, wird eine solche Überexpression als Marker für eine Tamoxifenresistenz diskutiert [6]. Als weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung dieser RTK an der Entstehung einer Antiöstrogenresistenz kann die Tatsache angesehen werden, dass bei Überexpression von Her2/neu nachfolgend ein ERE aktiviert werden kann. Diese Aktivierung ist von Östrogenen unabhängig und kann somit nicht durch Antiöstrogene inhibiert werden. Daraus lassen sich neue Therapieansätze ableiten. So führt die Blockierung des Her2/neu- Rezeptors durch den rekombinanten Antikörper Herceptin, der gegen diese RTK gerichtet ist, *in vitro* zur verstärkten Tamoxifenwirksamkeit [30].

Im Gegensatz zu ihrem Effekt am Mammagewebe wirken Antiöstrogene wie Tamoxifen am Endometrium agonistisch. Die Expression einer aktiven MEKK1(Kinase, die im MAP- Kinasesignalweg die ERK aktiviert) erhöht die agonistische Wirkung des 4- Hydroxytamoxifens auf ein Niveau vergleichbar mit Östradiol, wohingegen die antagonistische Wirkung vollständig geblockt wird [26].

Untersuchungen mit Zellkulturen aus Zervixkarzinomen haben gezeigt, dass dieser Malignomtyp ebenfalls von einer HER2/neu- Überexpression betroffen sein kann. Wenn dies der Fall ist, scheint die Prognose wesentlich schlechter zu sein und eine Verknüpfung mit einem fortgeschritteneren Stadium zu bestehen. Diese Tumoren sind vermeintlich hochproliferativ und mit einer erhöhten Resistenz gegen Bestrahlung vergesellschaftet [29]. Untersuchung bezüglich der HER2/neu- Gen- Amplifikation und -Überexpression haben ferner gezeigt, dass eine erhöhte Her2/neu-Amplifikationsrate einem negativen Vorhersagewert im Hinblick auf Tumorstadium und -differenzierung gleichkommt [33].

Die Überexpression von Her2/neu scheint also in verschiedenen Malignomtypen zu unterschiedlichen Resistenzen zu führen. Diese zu umgehen bzw. aufzuheben ist vermutlich von besonderer Bedeutung. Dazu muss ein besseres Verständnis der Rezeptorinteraktionen und deren Mechanismen erreicht werden, um somit neue Behandlungen entwickeln zu können. Ein Beispiel neuer Therapieansätze wäre z.B., die Signalkaskaden

durch spezifische Inhibitoren zytoplasmatischer Kinasen zu unterbrechen. Durch diese gezielten Manipulationen der RTK- Signalwege werden Regulationen beider beschriebenen Rezeptoraktivierungen ermöglicht, ohne von den Interaktionen der beiden verschiedenen Signalkaskaden umgangen zu werden.

I.3.1 Charakterisierung der verwendeten endometrialen Adenokarzinomzellen

Bei den hier eingesetzten Zell-Populationen handelt es sich um die beiden endometrialen Adenokarzinomzelllinien HEC-1A und Ishikawa. Als hormonsensitives Gewebe exprimiert das Endometrium Rezeptoren, die auch endometriale Karzinomzellen aufweisen. Diesbezüglich sind für die Zell-Linie HEC-1A widersprüchliche Ergebnisse beschrieben worden. Einige Autoren beschreiben die Expression von ERs [9,18], andere Untersuchungen konnten dies nicht eindeutig bestätigen [7]. Dabei nutzen die beiden Östrogenrezeptorsubtypen α und β anscheinend verschiedene Signaltransduktionswege. Die Reaktion der Zellen auf Antiöstrogene ist daher abhängig vom Verhältnis der Rezeptorsubtypexpression [18]. Weitere Rezeptoren in HEC-1A-Zellpopulationen sind IGF-I- und EGF- Rezeptoren [3,15]. Auch die Ishikawa- Zelllinie exprimiert Östrogenrezeptoren [1,15,], EGF- und IGF-I- Rezeptoren [15,21]. In beiden Zell-Populationen gibt es Hinweise auf eine vermehrte Expression des c-erbB2-Onkoproteins, das einen Transmembranrezeptor mit 50%iger Homologie zum EGF- Rezeptor kodiert. Früheren Erkenntnissen zufolge scheint die c-erbB2-Onkogen-Expression in Ishikawa- Zellkulturen über Östrogene und Wachstumsfaktoren reguliert zu werden. Insgesamt kommt es durch EGF, IGF-I und TGF α dosisabhängig zu einer vermehrten Proliferation bei diesen Zellen. In HEC-1A-Zellkulturen erfolgt die Expressionsregulation des c-erbB2-Onkoproteins nicht über Östrogene oder Wachstumsfaktoren, sondern muss scheinbar als Teil der autokrinen Schleife ähnlich der Regulation der Wachstumsfaktoren angesehen werden [15].

I.3.2 Östradiol und Antiöstrogene

Das Endometrium ist ein hormonsensitives Gewebe. Für die in dieser Arbeit dargestellten Proliferationsstudien wurden die beiden endometrialen Adenokarzinomzelllinien HEC-1A und Ishikawa eingesetzt, deren Proliferation von Hormonen und Wachstumsfaktoren gesteuert werden kann. Östradiol ist als Steroidhormon ein wichtiger Bestandteil des weiblichen Hormonhaushaltes. Seine Synthese findet vorwiegend in den Ovarien statt. Seine Zielorgane sind v. a. Uterus, Vagina und das Mammagewebe. Dort stimuliert Östradiol die Proliferation. Die eingesetzten Zell-Linien Ishikawa und HEC-1A zeigen einen differenten Metabolismus für Östrogene. Die Aktivität der 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase, dem Schlüsselenzym des Östrogenmetabolismus, unterscheidet sich deutlich in den beiden verschiedenen Zellpopulationen. Sie scheint in HEC-1A-Zellen ca. 6fach höher zu sein als in Ishikawa-Zellen. [8]. In ER-positiven Zellen (z.B. Ishikawa-Zellen) überwiegt die Reduktion von Östrogenen (Östron zu Östradiol), in ER-negativen (z.B. HEC-1A-Zellen) die Oxidation der Östrogene (Östradiol zu Östron). Dabei ist die Oxidation offenbar nicht so anfällig für Beeinflussungen wie die Reduktion.[7]. Dies könnte bedeuten, dass eine systematische Einflussnahme auf den Östrogenmetabolismus zellspezifisch unterschiedlich aussehen muss. Zusätzlich hängt die Wirkung des Östradiols ebenso wie die des Tamoxifens auf Ishikawa-Zellen vom Kulturmedium ab. So induzieren beide Substanzen eine Proliferation, wenn die Zellkultur zunächst in östradiolfreiem Medium erfolgt. Dies gilt in gleicher Weise für das Antiöstrogen Tamoxifen [13]. Tamoxifen gehört zur Gruppe der Triphenylethylene und besitzt eine partiell agonistische Wirkung an Endometriumzellen [1,43]. Seine Wirkung kann nicht als einfache Blockade von Östrogenrezeptoren beschrieben werden. Eine treffendere Bezeichnung verbirgt sich hinter dem Ausdruck "SERM" (**s**elective **ER** **m**odulator). So ist Tamoxifen abhängig vom jeweiligen zellspezifischen Promoter in der Lage, Signale auf Transkriptionsebene zu übermitteln. Dazu ist ein ERE im Promoter erforderlich [1]. Im Gegensatz zu ICI 182,780 blockieren Tamoxifen und sein aktiver Metabolit 4-Hydroxyta-

moxifen lediglich die AF-2-Region des Östrogenrezeptors, während das reine Antiöstrogen sowohl die AF-2- als auch die AF-1-Region inhibiert [12].

ICI 182,780 entfaltet seine Wirkung durch die Degradation des ER. Daher tritt bei Patientinnen mit negativem ER- Status keine Wirkung nach Therapie mit ICI 182,780 ein [43]. Außerdem wirkt es auf Ebene der Interaktion zwischen Östrogenrezeptor und ERE [30].

1.3.3 Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der Signaltransduktion

Die Inkubation der beiden Zell-Linien mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der Signaltransduktion dient der Charakterisierung der verwendeten Zellkultur-Modelle hinsichtlich ihrer Reaktion auf eben diese Substanzen. Außerdem dient sie zur Bildung von Kontroll- und Vergleichswerten für die späteren Kombinationsansätze. Bei den eingesetzten Wachstumsfaktoren handelt es sich um EGF, IGF-1, TGF- α und Heregulin- β 1. Sie wurden aufgrund ihrer Wichtigkeit in der Regulation des Zellwachstums ausgewählt. Alle diese Substanzen induzieren durch Bindung an Rezeptortyrosinkinasen die Zellproliferation.

EGF (epidermal **g**rowth **f**actor) bewirkt über Bindung an den EGF- Rezeptor eine dosisabhängige Steigerung der Zellteilung. Strukturell ist es dem nachfolgend noch beschriebenen TGF α ähnlich. Der EGF- Rezeptor besitzt 50% Homologie zum c-erbB2-Onkoprotein [15]. Dies wird vor dem Hintergrund der durchgeführten Kombinationsexperimente später noch wichtig sein. Weiter ist EGF in der Lage, die Östradiol- Wirkung in Ishikawa- Zellen zu imitieren. Dieser Effekt ist nicht von einem ERE abhängig und kann nicht durch Antiöstrogene inhibiert werden. Daher scheint der ER nicht an seiner Entstehung beteiligt zu sein. Gleichzeitig lässt sich aus dieser Beobachtung die Möglichkeit einer gegenseitigen autokrinen oder parakrinen Modulation der Signaltransduktion von EGF und Östradiol ableiten [12]. Eine weitere Wirkung des EGF auf die Zell-Linie Ishikawa ist die Reduktion des IGF-1-mRNA-Levels, die nicht durch ICI 182,780 aufge-

hoben werden kann [14]. Sowohl EGF als auch das später noch beschriebene TGF α scheinen die Invasivität gynäkologischer Tumoren im Sinne positiver Regulatoren zu beeinflussen, indem sie die Motilität, die Expression von Proteinasen und die Angiogenese fördern [38].

IGF-1 gehört zu einer Familie wichtiger Regulatoren des physiologischen und malignen Zellwachstums. Seine biologische Funktion und Wirkung wird durch Bindung an Membranrezeptoren (IGF-1R) und sog. IGF-Bindungsproteine (IGFBP) reguliert. In Ishikawa - Zellkulturen lassen sich sechs Klassen von IGFBP unterscheiden. Diese teilen sich auf in membrangebundene und lösliche. Die löslichen besitzen eine deutliche höhere Affinität zu den verschiedenen IGF als der IGF- Rezeptor. Dadurch wird das IGF im Extrazellulärraum gebunden und steht nicht zur Induktion der Zellproliferation zur Verfügung. Die Zuordnung der Funktion der membrangebundenen IGFBP ist nicht so eindeutig. So können sie die IGF-Wirkung sowohl inhibieren als auch verstärken bzw. erleichtern, wobei die Inhibition v.a. durch IGFBP3 von IGF unabhängig zu sein scheint [19,21,22]. IGF-1 liegt zu etwa 95% gebunden an membranständige IGFBP vor. Die Konzentration der IGF-1-Rezeptoren steigt zwar im neoplastischen Endometrium an, aber die Anzahl der IGFBP der Zelloberfläche ist etwa 20fach höher.[22]. Die Zell-Linie HEC-1A exprimiert mindestens drei verschiedene IGFBP. Die IGF- Wirkung wird also auch in dieser Zellpopulation über die beschriebenen Proteine reguliert [25].

TGF- α ist ein autokriner Wachstumsfaktor humaner Tumorzellen. Es ist strukturell dem EGF ähnlich und bindet ebenfalls an den EGF- Rezeptor, wodurch dosisabhängig die Zellproliferation induziert wird [10,15]. Auch das eingesetzte **Heregulin- β 1** aktiviert durch Bindung an die EGFR-Proteine HER3 und HER4 und nachfolgende Transaktivierung von HER2 die Signaltransduktion. Dieser Rezeptor ist ein Membranglycoprotein mit Tyrosinkinaseaktivität der intrazellulären Domäne und molekularer Homologie zum EGF- Rezeptor. HER2/neu wird physiologisch ausschließlich in endometrialen Drüsenzellen exprimiert, wohingegen sich der EGF- Re-

zeptor v.a. in den Stromazellen findet. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Liganden ist die Funktion des HER2/neu- Proteins noch nicht vollständig geklärt [40].

Die verwendeten **Inhibitoren** der Signaltransduktion greifen an verschiedenen Stellen des MAPK- Weges an. Wegen dieser Unterschiede ist es interessant zu untersuchen, ob sich auch die Auswirkungen auf die Zellproliferation unterscheiden. Dabei handelt es sich um die Substanzen AG 1478, AG 1024, PD 98059, ZD 1839 und Herceptin. AG 1478 ist ein Tyrophostin und „small molecule“ Inhibitor von EGF- Rezeptoren (EGFR). Als solcher greift er den EGFR intrazellulär an und verhindert die Phosphorylierung und Aktivierung des nachfolgenden Signalweges [16] Auch AG 1024 gehört dieser Wirkstoffgruppe der Tyrphostine an, wobei es spezifisch den IGF-1- Rezeptor blockiert. Eine spezifische Inhibition des EGF- Rezeptors bewirkt ZD 1839 („Iressa“). Es verkörpert einen wichtigen neuen Ansatzpunkt in der Therapie humaner Tumore, da es das Tumorstadium eindeutig zytostatisch hemmt. Hierbei handelt es sich um ein synthetisches Molekül, das die ATP- Bindungsdomäne des EGF- Rezeptors blockiert, wodurch die Aktivierung des EGFR verhindert wird [16]. Bei gleichzeitiger Applikation zytotoxischer Medikamente in Kombination mit ZD 1839 kommt es zu einer erhöhten Apoptoserate [10].

Anders als die bisher genannten Stoffe übt PD 98059 keinen Einfluss auf bestimmte Rezeptoren aus, sondern wirkt direkt an der cytoplasmatischen Kinase MEK1/2 als Bestandteil der MAPK- Signalkaskade. Diese Kinasegruppe aktiviert ERK1/2, die am weitesten in der Signaltransduktion und Zellproliferation verbreitet sind [11]. Die aktive MEK1 kann bei gleichzeitiger Expression mit dem ER die *in vitro* Transkriptionsaktivität sowohl endometrialer als auch ovarieller Tumorzellen erhöhen [26]. Aus diesem Grund könnte dem MEK- Inhibitor eine wichtige Rolle in der Therapie gynäkologischer Tumoren zukommen.

Der humanisierte Antikörper Herceptin richtet sich gegen Her2/neu und inhibiert die Heregulin- β 1-induzierte MAPK- Aktivierung, die *in vitro* zu einer gesteigerten Proliferation von endometrialen Adenokarzinomzellen

führt [36]. Des Weiteren induziert Herceptin in vitro (Mamma - Karzinom - Zellen) eine zelluläre Zytotoxizität in Anwesenheit peripherer mononukleärer Zellen. Diese Zytotoxizität betrifft v.a. Tumorzellen. Die Aktivierung der HER2-Rezeptoren führt zu einer evtl. echten Zytostatikaresistenz. In Bronchialkarzinomzellen kam es nach HER2-Aktivierung zu einer gesteigerten DNA-Reparation, die eine 4-10fach größere Resistenz gegenüber der cisplatininduzierten Zytotoxizität und Apoptose zur Folge hatte. Eben dieser Effekt lässt sich durch Herceptin blockieren.[24].

I.4 Überlegungen zu den Kombinationsversuchen

I.4.1 Kombinationen aus Östradiol und Antiöstrogenen

Bei den Kombinationen von Östradiol und Antiöstrogenen handelt es sich um Vorversuche zur Charakterisierung der Wirkung dieser Substanzen, bevor sie in weiteren Kombinationen getestet werden.

Da es sich bei Tamoxifen um ein Antiöstrogen mit partialagonistischer Wirkung handelt, ist eine geringere Inhibition als durch das reine Antiöstrogen ICI 182,780 zu erwarten. Der östradiolgebundene ER α benutzt die gleichen Protein - Protein - Kontakte zur Aktivierung von ERE und AP-1. Der klassische Aktivierungsweg läuft über ein ERE unter Rekrutierung eines p160/p300 Koaktivorenkomplexes. Tamoxifen und ICI 182,780 blockieren die Bildung von AF2, was zu einer verminderten Koaktivorenrekrutierung führt. Dadurch kommt es zu einer eingeschränkten ER α AF1-Aktivität. Diese führt bei normaler Ausprägung zu einer starken und ER α AF2 zu einer schwächeren Inhibition der Antiöstrogenwirkung.

Fehlt AF1 ganz, kann die AP1-Aktivität des ER α nicht über Östradiol vermittelt werden, jedoch über Antiöstrogene, da Tamoxifen einen potenten Agonisten an AP-1 darstellt und durch AF1 in seinem Effekt unterdrückt wird [42].

Aufgrund dieser Überlegungen ist die Überprüfung des Effektes der Antiöstrogene auf die Östradiolwirkung in den beiden verwendeten Zellkulturmodellen die Grundlage für die späteren Kombinationsversuche.

I.4.2 Kombinationen aus Östradiol und Inhibitoren der RTK vermittelten Signaltransduktion

Es gibt Erkenntnisse, dass MAP- Kinasen in der Lage sind, den ER α zu phosphorylieren. [20]. Diese Phosphorylierung führt zur Potenzierung der AF1 - Domäne des ER α , wobei sie über eine Konformationsänderung des Rezeptors und nicht über MAPK- Aktivierung durch Östradiol zustande kommt. Die AF1-Funktion ist ligandenunabhängig und determiniert, wohingegen die AF2-Funktion ligandeninduziert ist. Es sind jedoch beide Funktionen für die Aktivierung über Ligandenbindung essentiell. Dabei wird wahrscheinlich die AF1-Funktion durch die ungebundene AF2 - Domäne unterdrückt [20]. Das bedeutet, Östradiol bewirkt durch Bindung an den ER α eine Änderung der Rezeptorkonformation und somit die Möglichkeit zur Phosphorylierung durch MAPK. Nachfolgend potenziert sich die Gentranskription durch verstärkte AF1- Aktivität. MAPK können also zu einer verstärkten Östradiol- Wirkung an ER α beitragen. Vor diesem Hintergrund erscheint es nötig, den Einfluss von MAPK- Inhibitoren auf die Östrogen-induzierte Proliferation von endometrialen Zellen zu überprüfen. Dazu werden die verschiedenen Angriffspunkte der unterschiedlichen Inhibitoren genutzt. Zum Einsatz kommen AG 1478 mit direktem Einfluss auf den EGF- Rezeptor, PD 98059 mit MEK1/2 als Wirkort und Kombinationen mit diesen beiden Hemmstoffen. Der EGF- Rezeptor dient als repräsentatives Beispiel einer RTK, weshalb auch AG 1478 exemplarisch ausgewählt wurde.

I.4.3 Kombinationen aus Wachstumsfaktoren und Antiöstrogenen

Die in Abschnitt I.4.2 beschriebenen Effekte gelten für die Manipulation der Östrogenrezeptor - Signalkaskade durch MAPK. Die Zusammenstellung aus Wachstumsfaktoren und Antiöstrogenen soll zeigen, ob sich umgekehrt auch die MAPK- Signalkaskade durch Antiöstrogene beeinflussen lässt. Dazu werden EGF, IGF-1, TGF α oder Heregulin- β 1 jeweils mit Tamoxifen oder ICI 182,780 kombiniert. Grundlage dieser Versuche ist die

Theorie, dass auch die GF- vermittelte Proliferation durch Antiöstrogene inhibiert werden kann, wenn eine wechselseitige Beziehung zwischen den beiden Transkriptionswegen besteht. EGF imitiert in Ishikawa- Zellpopulationen die Östradiolwirkung. Dieser Effekt ist nicht ERE- abhängig und wird nicht durch Tamoxifen oder ICI 182,780 inhibiert. Daher scheint die Reaktion auf Inkubation mit EGF nicht ER- vermittelt zu sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Tamoxifen lediglich die AF2- nicht jedoch die AF1- Funktion des ER blockiert, wohingegen ICI 182,780 beide Domänen hemmt. Da beide Antiöstrogene nicht in der Lage sind, den EGF- Effekt aufzuheben, steigt die Wahrscheinlichkeit einer gegenseitigen auto- oder parakrinen Modulation der Signaltransduktion durch EGF und Östradiol [12]. Durch die Experimente mit IGF-1, TGF α und Heregulin- β 1 soll überprüft werden, ob alle Wachstumsfaktoren in gleicher Weise reagieren.

I.4.4 Kombinationen aus EGF bzw. IGF-1 und Inhibitoren der RTK vermittelten Signaltransduktion

Die Kombinationen aus Wachstumsfaktoren und den Inhibitoren der RTK- vermittelten Signaltransduktion dient zur Erhebung von Daten über die Art und das Ausmaß der zu erwartenden Proliferationsminderung, da bisher nur wenig über die Wirkung der RTK- Inhibitoren in endometrialen Zellen bekannt ist. Gleichzeitig bilden die Ergebnisse dieser Vorversuche die Bezugswerte für die späteren Mehrfachkombinationen. Wie schon bei den Versuchen mit Östradiol und diesen Hemmstoffen werden erneut Substanzen mit verschiedenen Wirkorten eingesetzt. Dabei kommen ebenfalls Zusammenstellungen mit zwei Inhibitoren zum Einsatz. Durch die Verknüpfung wird geklärt, ob sich die Hemmstoffe in ihrer Wirkung verstärken. Es handelt sich hierbei um AG 1478 und PD 98059. Zusätzlich wird nun auch ZD 1839 verwendet. ZD 1839 ist ein selektiver Inhibitor an EGF- Rezeptoren mit zytostatischer Wirkung. Diese Substanz stellt einen wichtigen Ansatz in der Therapie von humanen Tumoren dar, weil es das Tumorstadium deutlich inhibiert und in Verbindung mit zytotoxischen

Medikamenten die Apoptoserate erhöht. Unterstrichen wird seine Wichtigkeit durch die Tatsache, dass eine Überexpression von EGF- Rezeptoren und TGF α , einem Wirkstoff an dieser RTK, die Prognose verschiedener Tumorarten stark verschlechtert [10]. Als weiterer Inhibitor findet AG 1024 Anwendung. Es handelt sich bei dieser Substanz um einen IGF-1-Rezeptor-Blocker. In dieser Versuchsanordnung ist der Vergleich zwischen dem Potential von AG 1478 und AG1024 interessant.

I.4.5 Mehrfachkombinationen mit Heregulin

Heregulin als Ligand an HER- Rezeptoren ist von entscheidender Bedeutung bezüglich der Frage, ob und wie die Überexpression bzw. Aktivierung dieses Rezeptors sich auf verschiedene Gewebe auswirkt. Da keine endometrialen Zellkulturmodelle mit einer HER-2 Überexpression zur Verfügung stehen, ist die Stimulation mit Heregulin eine Möglichkeit, den Einfluss aktivierter HER- 2 Rezeptoren zu untersuchen. Eine solche Überexpression scheint mit verschiedenen humanen Tumorerkrankungen vergesellschaftet zu sein. Besonders evident ist die damit verbundene Problematik bei Mammakarzinom - Patientinnen. Aber auch im Endometrium gibt es eine klare Relation zwischen Östrogenstimulation und maligner Entartung. In Extrakten aus Ishikawa- Zell- RNA konnten zwei Transkripte des *cerbB2*-Proteins gefunden werden. Diese zwei Transkripte werden unter Östrogenstimulation vermehrt exprimiert. Die vermehrte Expression scheint über den ER vermittelt zu werden, da sie durch Tamoxifen inhibiert werden kann [28].

Es soll ebenfalls der Effekt des Her2/neu- Antikörpers Herceptin geprüft, der eventuell als zielgerichteter Inhibitor eine effektivere Verminderung des *c-erbB2*-Proteins erreichen kann. Außerdem soll kontrolliert werden, ob und wie sich die Herceptin- Wirkung weiter beeinflussen lässt. Es ist bekannt, dass Östradiol die Herceptin- Wirkung beeinträchtigt und dass durch ICI 182,780 der Herceptin - Effekt auf die Heregulin - induzierte Proliferation in Ishikawa - Zellkulturen wieder hergestellt werden kann

[36,37]. Des Weiteren werden die Wirkungen von Tamoxifen und PD 98059 und deren Veränderungen im Zusammenhang mit Östradiol überprüft. Obwohl es sich hier um *in vitro* Verhältnisse handelt, scheinen diese Experimente von Bedeutung unter Berücksichtigung, dass das endometriale Gewebe hormonsensitiv ist. So könnten die Ergebnisse bei der Suche nach neuen Therapieansätzen richtungsweisenden Charakter besitzen.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.I.1 Herkunft

Die Bezeichnungen der Materialien und deren Herkunft sind im Anhang unter Tabelle VII.1.1 aufgelistet.

II.I.2 Lösungsmittel

Die eingesetzten Substanzen sind in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst. Dies sind im Einzelnen: Östradiol, EGF, TGF α und Herceptin in H₂O; IGF-1 in CH₃COOH; Heregulin- β 1 in PBS; ZD in 0,1 M HCl; AG 1478, AG 1024 und PD 98059 in DMSO sowie Tamoxifen und ICI 182,780 in Ethanol. Keines dieser Lösungsmittel zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der beiden Zell-Linien. Vielmehr stellte sich ein uneinheitliches Wachstum nach Inkubation mit den Lösungsmitteln ein. So kam es teilweise zu einer Zunahme der Zelldichte in einer Versuchsreihe und in der nächsten zu einer Abnahme der Zellproliferation unter den gleichen Versuchsbedingungen. Da sich dieses Phänomen für alle durchgeführten Lösungsmittelkontrollen zeigte, kann nicht von einer stimulierenden oder inhibierenden Wirkung der Lösungsmittel ausgegangen werden. Die sowohl proliferativen als auch inhibierenden Effekte hoben sich in ihrer Gesamtheit letztlich auf. Auszugsweise sind die Ergebnisse in den beiden nachfolgenden Grafiken dargestellt. Dabei zeigte sich ein stimulierender Effekt der Lösungsmittel DMSO und HCl. Da in den durchgeführten Experimenten bei Zugabe von AG 1478, AG 1024 und ZD 1839 jedoch keine dem entsprechende vermehrte Zellproliferation resultierte, kann ein Effekt der Lösungsmittel auf die Versuchsergebnisse zwar nicht endgültig ausgeschlossen werden, aber er erscheint eher unwahrscheinlich. Allerdings war die proliferative Wirkung des DMSO auf die Ishikawa-Zell- Kultur statistisch signifikant. Aus diesem Grund könnten die erzielten Ergebnisse in Versuchsansätzen mit AG 1478 und AG 1024 bei dieser Zell-Linie durch den Lösungsmittelleffekt verfälscht sein.

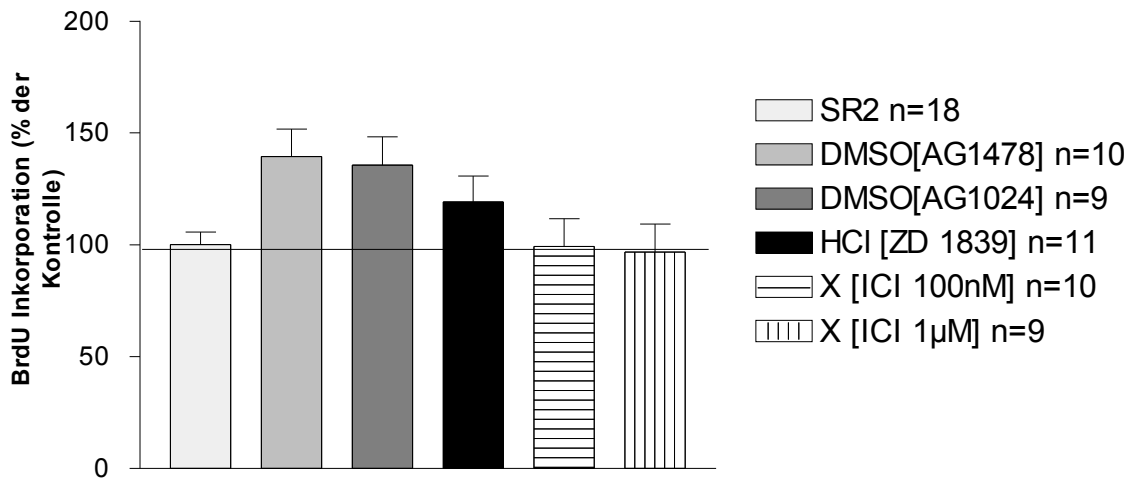


Abb. A1: Reaktion der HEC-1A-Zellen auf Inkubation mit den Lösungsmitteln der Testsubstanzen; -- = Wachstum der Kontrolle, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$

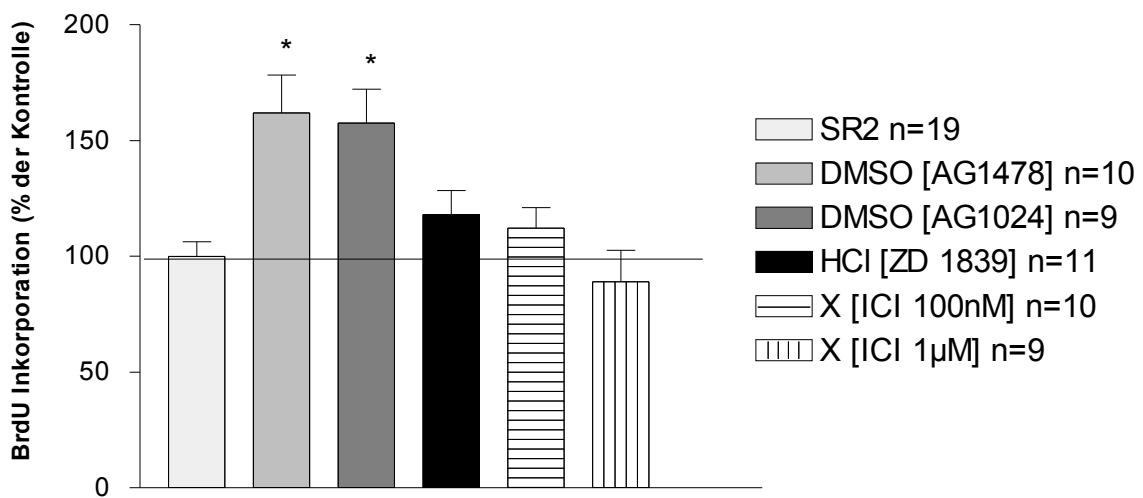


Abb. A2: Reaktion der Ishikawa-Zellen auf Inkubation mit den Lösungsmitteln der Testsubstanzen; -- = Wachstum der Kontrolle, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$; X = Ethanol

II.I.3 Konzentrationen der eingesetzten Substanzen

Die unterschiedlichen Wirkstoffe wurden in den Experimenten in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Wirkstoff	Konzentration
Östradiol	1 nM
Östradiol	10 nM
Tamoxifen	100nM
Tamoxifen	1 µM
Tamoxifen	10 µM
ICI 182,780	100 nM
ICI 182,780	1 µM

EGF	1 nM
IGF-1	1 nM
TGF α	1 nM
Heregulin- β 1	10 nM
AG 1478	100 nM
AG 1024	1 μ M
PD 98059	10 μ M
ZD 1839	100nM
Herceptin	1 μ M

II.2 Methoden

II.2.1 Zellkultur

Die Kultur der humanen Adenokarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A (ATCC) erfolgt in DMEM mit 10% FCS, 100U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin. Bei Erreichen von ca. 75% Konfluenz der Zellpopulationen werden die Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Mit Hilfe des Enzyms Accutase lassen sie sich aus den Zellkulturflaschen herauslösen. Danach werden die Zellen zentrifugiert (5min, 1000g) und in 5% gestripptem Normalserum (SNS) resuspendiert. Diese Zellsuspension stellt man auf 5000 Zellen/Well ein. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel von 5% SNS zu 0.5% SNS. Nach weiteren 24 Stunden wurde den Zellen SR2 als neues Medium angeboten. Dieser Vorgang der schrittweisen Reduktion des Nährstoffangebotes nennt sich "Aushungern" der Zellen. 72 Stunden nach dem Aussäen kommt es dann zur Behandlung der Zellen entweder mit 17 β - Östradiol oder verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. deren Inhibitoren oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Substanzen.

II.2.2 Versuchsaufbau

Pro Zell-Linie und Versuch wird jeweils eine 96-Well-Zellkulturplatte verwendet. Diese besteht aus zwölf Spalten mit acht Zeilen. Gedanklich teilt man diese nun horizontal in zwei Komplexe mit jeweils vier Zeilen. Es entstehen also 24 Einheiten mit je vier Wells. Um Konzentrations-

schwankungen der Substanzen infolge von Verdunstungseffekten an den Plattenrändern vorzubeugen, werden die Komplexe eins, zwölf, 13 und 24 lediglich mit SR2-Medium gefüllt (Eine schematische Darstellung einer Plattenbelegung findet sich im Anhang unter VII.2). Dabei dienen die Einheiten eins und 13 als Kontrolle. Einheit eins enthält keine Zellen, wird aber später mit BrdU inkubiert werden. Dies stellt die Negativkontrolle dar. In Einheit 13 werden zwar Zellen gehalten, diese jedoch nicht mit BrdU behandelt. Dadurch wird überprüft, ob der Zellmetabolismus evtl. auch ohne das Reagenz zu einer messbaren Farbreaktion fähig ist. Der zweite Komplex beinhaltet die Positivkontrolle, in der die Zellen nur SR2-Medium angeboten bekommen. Pro Versuch können also maximal 19 verschiedene Substanzen bzw. Substanzkombinationen getestet werden (s. Anhang VII.2 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung).

II.2.3 BrdU-Proliferations-ELISA

II.2.3.1 Prinzip der Methode

Durch den BrdU Proliferations- ELISA wird die Proliferationsaktivität einer Zellpopulation gemessen. Das Resultat korreliert streng mit der Anzahl der sich teilenden Zellen. 5-Brom-2desoxyuridin (BrdU) wird bei der Zellreplikation statt Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Dabei liegt die Sensitivität mindestens genauso hoch wie bei dem Einbau von [³H]-Thymidin. Nach der Inkubation und dem Entfernen des BrdU werden die Zellen denaturiert und fixiert. Danach wird eine BrdU- Antikörperlösung (Anti-BrdU-POD) dazugegeben. Die Antikörper binden an das eingebaute BrdU und die so entstandenen Immunkomplexe werden in der nachfolgenden Substratreaktion erkannt und gefärbt. Als letzter Schritt wird die Färbung mittels eines Spektralphotometers gemessen. Sie korreliert direkt mit der vorherigen DNA-Synthese und damit mit der Zahl der proliferierenden Zellen in den Proben.

II.2.3.2 Durchführung der Methode

Nach einer dreitägigen Inkubationsphase wurde der BrdU- Inkorporations- -ELISA durchgeführt. Hierzu wurde eine 100µM BrdU- Lösung angesetzt (20µl BrdU- Reagenz, 10mM, gelöst in 2ml SR2). Von dieser Lösung wurden jeweils 80µl/Well zum Stimulationsmedium pipettiert. Danach wurden die Zellen drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesen drei Stunden wurde das Medium entfernt, und die Zellen bei 60°C für 30 Minuten getrocknet. Nun folgten die Denaturierung und Fixierung der Zellen durch 200µl "FixDenat"/Well. Sofort im Anschluss wurde die Anti - BrdU - Stocklösung frisch angesetzt. Dazu musste Anti-BrdU- Stocklösung in 1,1 ml destilliertem Wasser gelöst werden. Von dieser Stocklösung wurden 100µl mit 10ml Antikörper-Verdünnungslösung gemischt. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur konnte das "FixDenat" verworfen werden. Dann wurden von der Anti-BrdU-Antikörperlösung jeweils 100µl/Well auf die Zellen pipettiert und diese für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Antikörperlösung entfernt. Nun wurden die Zellen drei Mal mit jeweils 250µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach diesem Vorgang und dem möglichst vollständigen Abfließen des Waschpuffers konnte die Substratlösung (Tetramethylbenzidin, TMB) zu den Zellen pipettiert werden (100µl/Well), um die Farbreaktion zu starten. Nach etwa 15 Minuten wurde diese unter Zuhilfenahme eines Photometers gemessen.

II.2.4 Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism 2,0 (Graph Pad). Als statistisch signifikant wurden die Ergebnisse bei $p < 0.05$ anerkannt. Die Signifikanz wurde durch einen one-way ANOVA in Kombination mit dem Newman-Keuls post-test geprüft. Die Versuchsansätze mit den Einzelsubstanzen wurden gegen die Kontrolle (Proliferation 100%) getestet. Bei den Experimenten mit zwei Substanzen wurde jeweils die Signifikanz gegen Östradiol bzw. den jeweiligen Wachstumsfaktor kontrolliert. Bei Behandlung der Zellen mit drei oder vier Wirkstoffen wurde die Signifi-

kanz gegenüber der Kombination aus Wachstumsfaktor und entsprechendem RTK- Inhibitor bzw. Östradiol und Antiöstrogen getestet (z. B. die Ansätze HRG+Herceptin+E₂ 1nM bzw. HRG+Herceptin+ E₂ 1nM+PD98059 jeweils gegen HRG+ Herceptin). Dies sollte den Effekt der eingesetzten Inhibitoren/Antiöstrogene auf die zuvor induzierte Proliferation verdeutlichen.

III Ergebnisse

III.1 Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit Einzelsubstanzen

III.1.1 Proliferationsverhalten endometrialer Ishikawa - und HEC-1A-Zellen nach Behandlung mit Östradiol bzw. Antiöstrogenen

Zunächst sollten beide Zelllinien hinsichtlich ihrer Reaktion auf Östrogene und Antiöstrogene charakterisiert werden, um definierte Zellkulturmodelle für die Kombinationsstudien zu erhalten, in denen die Interaktion mit dem Wachstumsfaktor- Signaltransduktion untersucht wird. 100% BrdU Inkorporation ist definiert als Wachstum der Zellpopulation nach Inkubation mit hormonfreiem SR2-Medium. Die endometrialen HEC-1A-Zellen zeigten nach Behandlung mit Östradiol (E_2) der Konzentration 1nM einen Wachstumsanstieg auf 129%. Durch Erhöhung der Konzentration auf 10nM konnte die Proliferation nicht gesteigert werden. Sie blieb mit 118% sogar unter dem Wert für E_2 1nM. Für die endometrialen Ishikawa-Zellen wurde der gleiche Effekt beobachtet. Er war hier sogar noch deutlicher (133% für die Stimulation mit E_2 1nM/107% nach Behandlung mit E_2 10nM). Die nächste zu testende Substanz war das partiell agonistische Antiöstrogen Tamoxifen. Es wurde in den Konzentrationen 100nM, 1 μ M und 10 μ M verwendet. Sowohl bei den HEC-1A- als auch bei den Ishikawa-Zellen zeigte sich eine Zunahme des Wachstums durch Zugabe von Tamoxifen 100nM und Tamoxifen 1 μ M. Durch die weitere Konzentrationserhöhung auf 10 μ M wurde die Proliferation bei beiden Zell-Linien deutlich gehemmt. So kam es zu einer Wachstumsverringering bei den HEC-1A-Zellen um fast 60% und bei den Ishikawa-Zellen um knapp 40%.

Auch die Reaktion auf Zugabe des reinen Antiöstrogens ICI 182,780 war bei beiden Zell-Linien tendenziell gleich. So kam es durch Inkubation mit ICI 100nM zu einer klaren Wachstumsinhibition um knapp 30%, wohingegen ICI 1 μ M die Proliferation kaum beeinflusste. So reagierte die Zell-Linie HEC-1A mit einem Wachstum von 103%. Im Gegensatz dazu trat bei den Ishikawa-Zellen mit einem Wert von 100% weder Proliferation noch Inhibition ein (Abb.1/2).

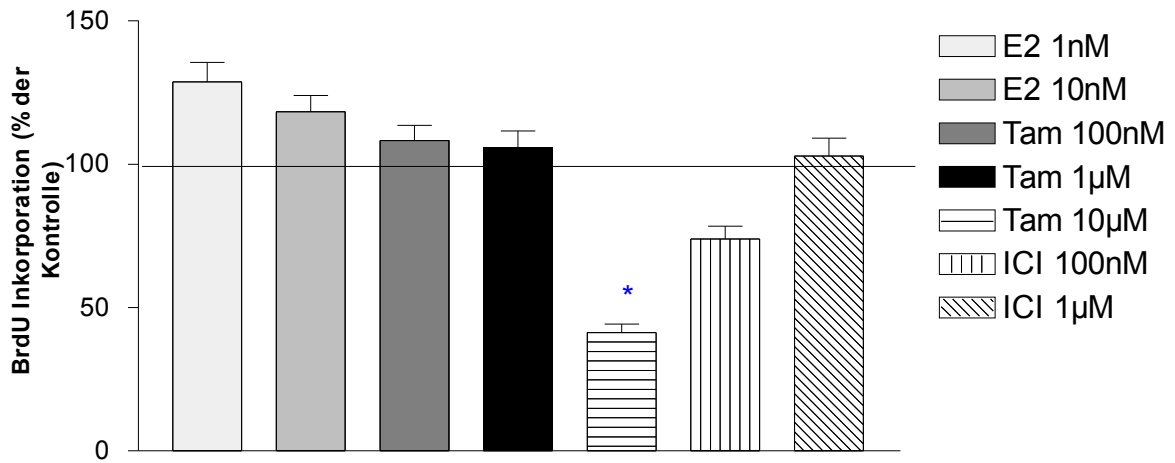


Abb. 1: Proliferation endometrialer HEC-1A-Zellen nach Behandlung mit Östradiol bzw. Antiöstrogenen; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

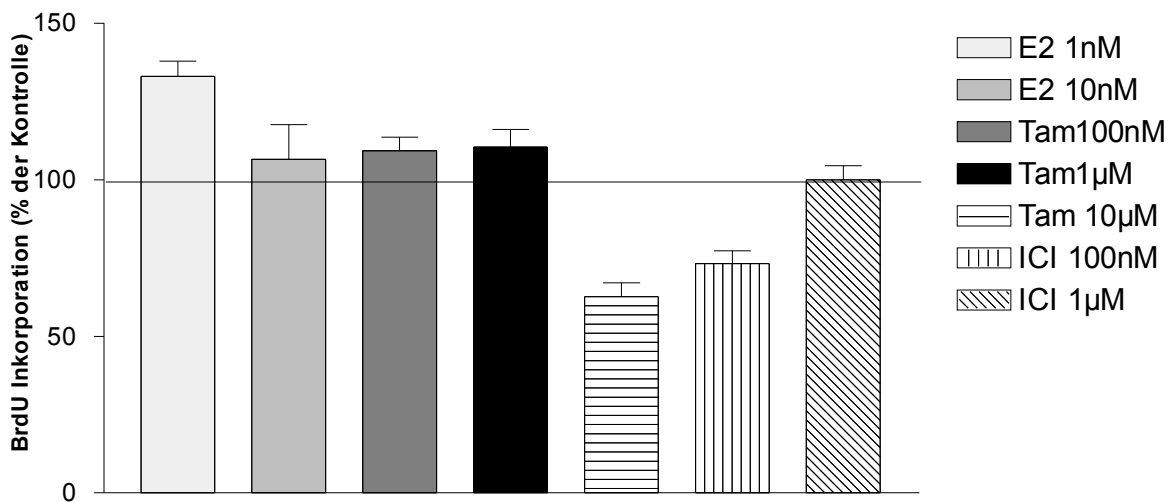


Abb. 2: Proliferation endometrialer Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Östradiol bzw. Antiöstrogenen; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.1.2 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren bzw. Inhibitoren ihrer Signaltransduktion

Den stärksten Proliferationsstimulus für die HEC-1A-Zellen bildete die Behandlung mit den Substanzen EGF und HRG- β 1. Mit 129% Wachstum entsprachen die Werte in etwa denen, die auch durch die Zugabe von Östradiol erreicht wurden. Ähnliche, wenn auch nicht ganz so hohe Proliferationsresultate wurde durch die Inkubation mit den Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- α , sowie mit den Inhibitoren ZD 1839 (EGF- rezeptorspezifisch) und Herceptin (Antikörper gegen HER2/neu) erzielt. Sie lagen alle um 120%. Während diese Ergebnisse für EGF und TGF- α zu erwarten war, überraschten sie für ZD 1839 und Herceptin. Die Werte nach Stimulation mit dem EGF- Rezeptor- Inhibitor AG 1478 und dem IGF-1-Rezeptor-Inhibitor AG 1024 zeigten eine leichte, statistisch nicht signifikante Proliferationszunahme um wenige Prozentpunkte. Lediglich der Wachstumsfaktor- Inhibitor PD98059, der an MEK1/2 die Signaltransduktion hemmt, führte zu einer erwarteten Reduktion der Proliferation (Abb.3).

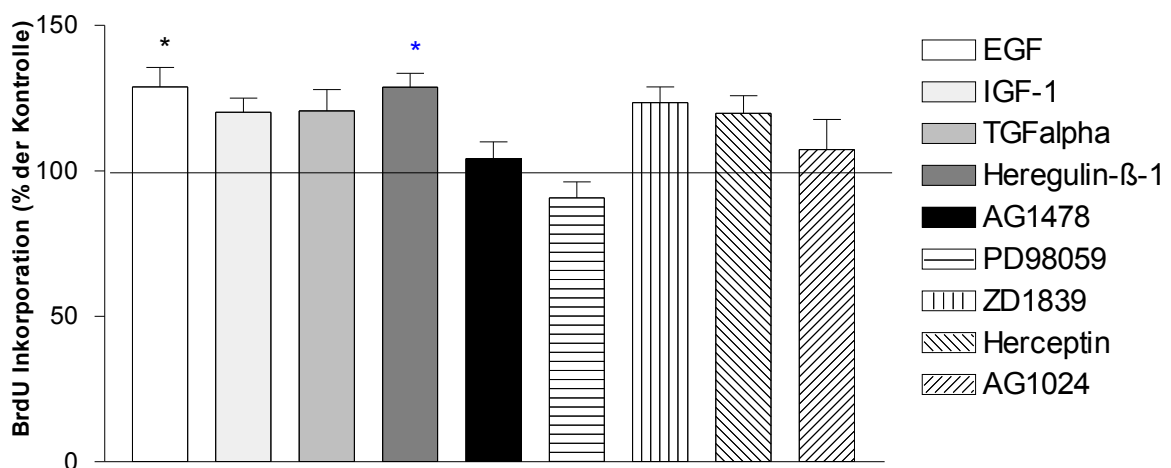


Abb. 3: Proliferation endometrialer HEC-1A-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren bzw. Inhibitoren der Signaltransduktion; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Auch die Zell-Linie Ishikawa reagierte auf die Stimulation mit EGF und HRG- β 1 ähnlich wie auf diejenige durch Östradiol. Mit 139% übertrafen

diese Ergebnisse die Östradiolwerte sogar etwas. Das stärkste Wachstum resultierte jedoch unerwarteterweise aus der Behandlung mit ZD1839 (207%). Neben IGF-1 (136%) und TGF- α (119%) führten auch die Substanzen Herceptin und AG 1024 (118%/139%) zu einer deutlichen Proliferationssteigerung. Wie oben aufgeführt war dieser Effekt nicht zu erwarten. PD 98059 inhibierte das Wachstum um 18%. Während die Inkubation mit AG 1478 bei den HEC-1A-Zellen zu einer leichten Zunahme des Wachstums führte, zeigten die Ishikawa-Zellen hier weder eine Zu- noch eine Abnahme der Proliferation (Abb.4).

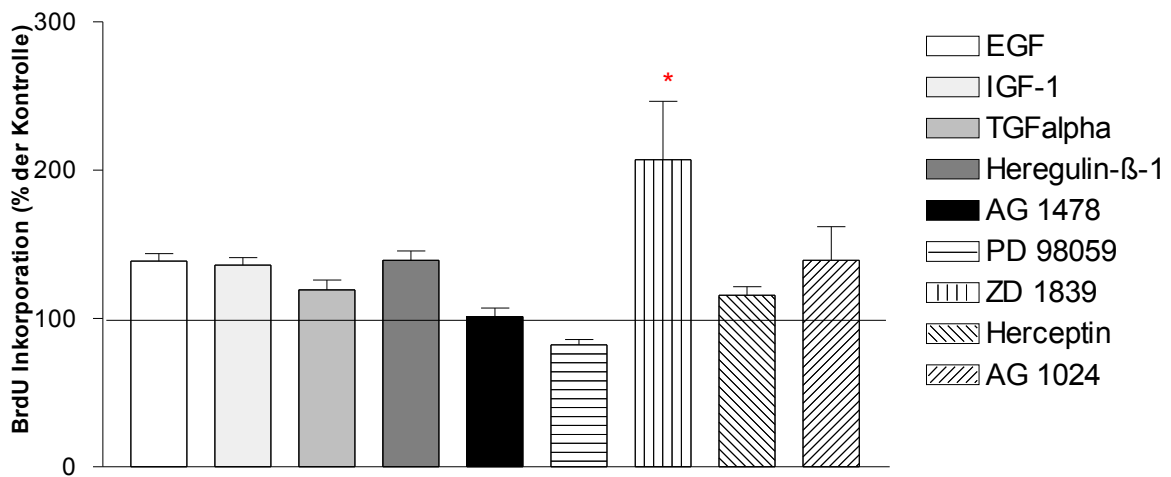


Abb. 4: Proliferation endometrialer Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren bzw. Inhibitoren der Signaltransduktion; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.2 Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit zwei Substanzen

III.2.1 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Kombinationen aus Östradiol und Antiöstrogenen

Wie oben schon beschrieben reagierten die HEC-1A-Zellen mit einer Wachstumszunahme um 29% auf die Stimulation mit E_2 1nM. Kombinierte man nun E_2 1nM mit Tamoxifen 100nM, so kam es mit 96% Wachstum zu einem Rückgang der Proliferation unter das Niveau der Kontrolle. Es trat also eine deutliche Inhibition der Proliferation gegenüber

der solitären Behandlung mit E₂ 1nM ein. Unerwarteterweise stieg die Wachstumsrate aber bei Zugabe der Kombination E₂ 1nM/Tamoxifen 1µM auf 146% an. Durch eine weitere Erhöhung der Tamoxifenkonzentration auf 10µM trat bei Zusatz der Kombination E₂ 1nM/Tamoxifen 10µM eine sehr starke Inhibition des Wachstums auf. Auch das reine Antiöstrogene ICI 182,780 inhibierte in Kombination mit E₂ 1nM die Proliferation. So führte die Behandlung mit E₂ 1nM/ICI 100nM zu einem um 29% niedrigerem Wachstum als E₂ 1nM allein. Dieses Resultat konnte durch E₂ 1nM/ICI 1µM sogar noch verstärkt werden. Hier betrug der Wert nur noch 97% im Gegensatz zu 129% durch die Zugabe von E₂ 1nM (Abb. 5).

Die Ishikawa- Zellen zeigten eine Proliferation von 133% bei solitärer Stimulation mit E₂ 1nM. Wurde nun E₂ mit Tamoxifen kombiniert, ergab sich eine relative Wachstumsinhibition gegenüber den zuvor erwähnten 133%.. Diese korrelierte mit der Höhe der Tamoxifenkonzentration. So kam es zu einer Abnahme der Progression um 15% durch E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM, um 26% durch E₂ 1nM/Tamoxifen 1µM und um 63% durch E₂ 1nM/Tamoxifen 10µM. Die Behandlung mit dem reinen Antiöstrogen ICI 182,780 führte zu einer effektiveren Proliferationssenkung als Tamoxifen in der gleichen Dosis. Bei der Verknüpfung E₂ 1nM/ICI 100nM zeigte sich eine Abnahme des Wachstums gegenüber dem Zusatz von E₂ 1nM allein um 33% und bei E₂ 1nM/ICI 1µM um 29% (Abb. 6).

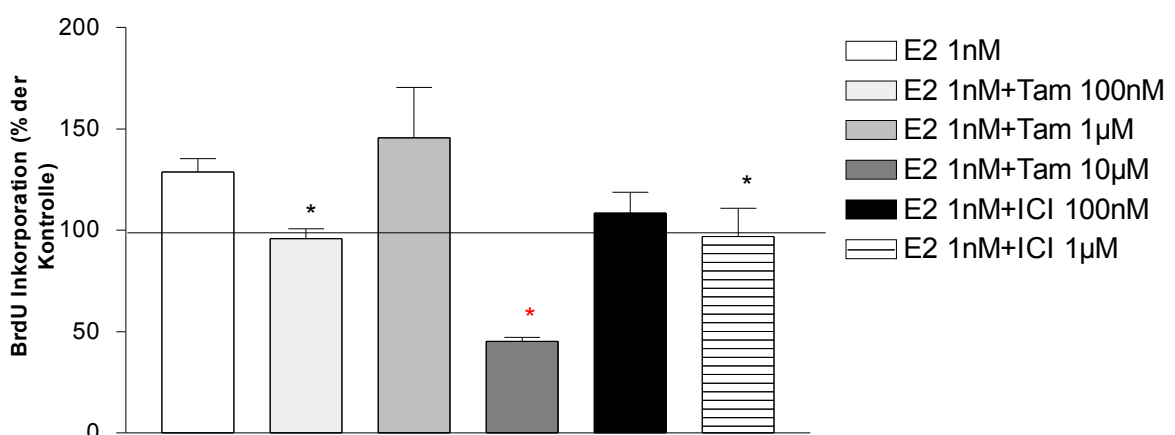


Abb. 5: Beeinflussung der Östradiol-Wirkung durch Antiöstrogene bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0,05 gegenüber E2 1nM, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0,001 gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

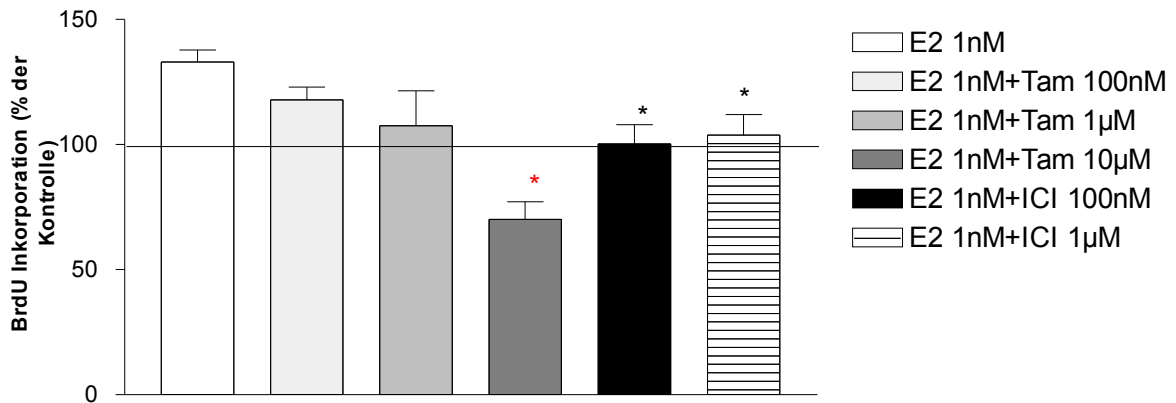


Abb. 6: Beeinflussung der Östradiol-Wirkung durch Antiöstrogene bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber E2 1nM, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.2.2 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren verschiedener Wachstumsfaktor-Signalwege

Die im Folgenden beschriebenen Versuchsergebnisse wurden erhoben, um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß die Substanzen AG 1478, PD 98059, ZD 1839 oder AG 1024 Einfluss auf die Signaltransduktion von EGF bzw. IGF-1 nehmen. Die genannten Stoffe sind allesamt Inhibitoren der Wachstumsfaktor-Signalwege. Dabei handelt es sich bei AG 1478 um einen EGF- Rezeptor - und bei AG 1024 um einen IGF- Rezeptor-Antagonisten. ZD 1839 zeigt eine EGF- Rezeptor spezifische Hemmwirkung. Die Substanz PD 98059 greift an MEK1/2, zwei homologen mischfunktionellen Threonin-Thyrosin-Kinasen, an.

Durch die Behandlung mit EGF alleine kam es zu einer Proliferationssteigerung von 29% bei den HEC-1A-Zellen und 39% bei den Ishikawa-Zellen. Bei beiden Zell-Linien konnte das Wachstum durch die Zugabe von EGF/AG 1478 deutlich gesenkt werden. Die Hemmung war bei der Ishikawa- Population stärker ausgeprägt. Im Vergleich dazu führte der Zusatz von EGF/PD 98059 zu unterschiedlichen Resultaten. Während die Zell-Linie HEC-1A mit einem um 1% gegenüber der Stimulation mit EGF gesteigerten Wachstum reagierte, fiel die Proliferation der Ishikawa- Zellen auf 89% ab. Wurden beide Substanzen gemeinsam mit EGF kombiniert,

kam es zu einer drastischen Reduktion des Wachstums bei beiden Zellpopulationen. So sank die Zelldichte der Ishikawa- Linie um fast die Hälfte und die der HEC-1A-Zellen auf etwa 60% des Ausgangswertes bei Behandlung mit EGF/AG 1478/PD 98059. Der EGF- rezeptor-spezifische Inhibitor ZD 1839 führte in Kombination mit EGF zu einer Proliferationsminderung. Durch das Angebot von EGF/ZD 1839 sanken die Werte von 129% auf 98% für die Zell-Linie HEC-1A und von 139% auf 125% für Die Ishikawa- Population (Abb.7/8).

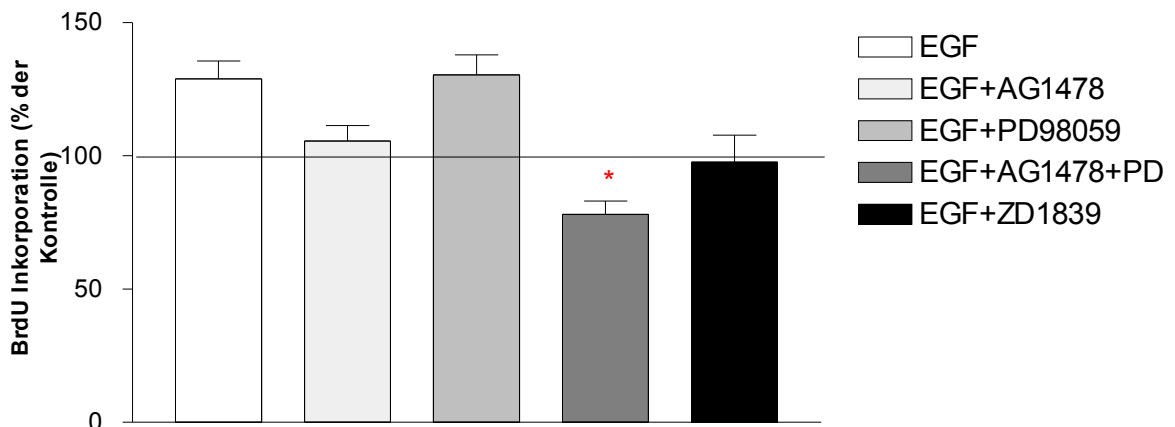


Abb. 7: Beeinflussung der EGF-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber EGF, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

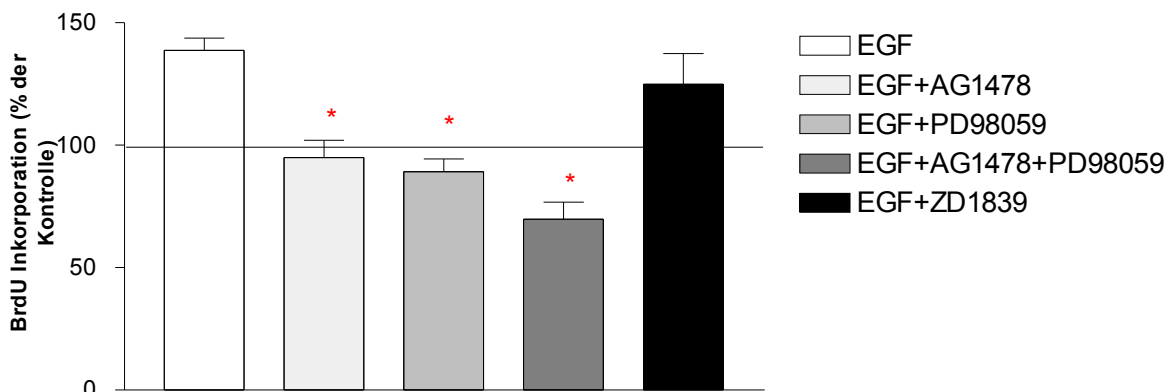


Abb. 8: Beeinflussung der EGF-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber EGF, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Der Wachstumsfaktor IGF-1 wurde jeweils mit den Substanzen PD 98059 und AG 1024 kombiniert. Bei solitärer Behandlung mit IGF-1 reagierten die beiden Zellpopulationen mit einer um 20% (HEC-1A) bzw. 36% (Ishikawa) vermehrten Proliferation. Durch die Zugabe von IGF-1/ PD 98059

wurde diese eindeutig abgesenkt. Dabei war der Effekt bei beiden Zell-Linien etwa gleich stark ausgeprägt. Der IGF- Rezeptor- Inhibitor AG 1024 führte in Kombination mit IGF-1 nicht zu einer so deutlichen Wachstumshemmung wie PD 98059. Durch die Behandlung mit IGF-1/AG 1024 kam es zu Resultaten von 98% für die HEC-1A-Population und von 91% für die Ishikawa- Zell- Linie (Abb. 9/10).

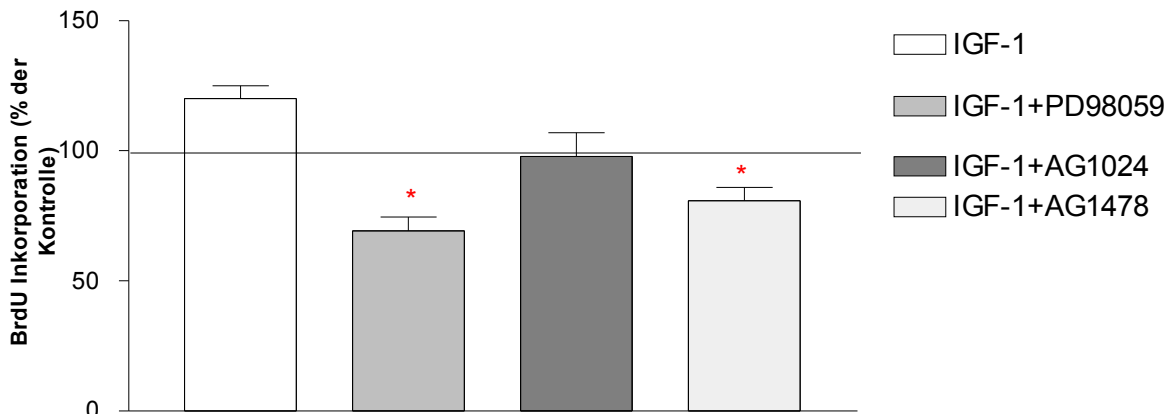


Abb. 9: Beeinflussung der IGF-1-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

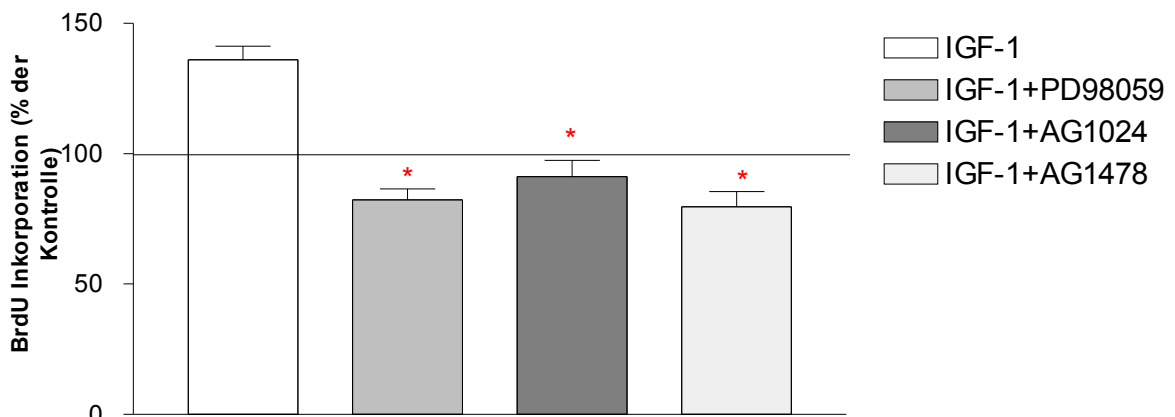


Abb. 10: Beeinflussung der IGF-1-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.2.3 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Östradiol und Inhibitoren der Wachstumsfaktorsignaltransduktion

Die im folgenden beschriebenen Versuche sollten einen möglichen Einfluss des EGF- Rezeptor- Inhibitors AG 1478 bzw. des MEK1/2-Inhibi-

tors PD 98059 auf die Signaltransduktion des Östradiols aufzeigen. Dies war nötig, da die ER- negativen HEC-1A-Zellen auf den Östradiolstimulus mit Proliferation reagierten. Also sollte getestet werden, ob dieser Effekt über die gleiche Signalkaskade wie das Wachstum nach GF- Zusatz vermittelt wird. Außerdem dienten diese Experimente indirekt zur Überprüfung, ob auch bei den ER- positiven Ishikawa- Zellen eine ER- unabhängige Östradiol- Signaltransduktion besteht. Hierzu wurden die beiden Zell-Linien zunächst mit E₂ 1nM/AG 1478 bzw. E₂ 1nM/PD 98059 behandelt. Dabei kam es zu einer Verringerung der Proliferation bei HEC-1A um jeweils 49% und bei Ishikawa um 42% bzw. 46% in Bezug auf das Ergebnis nach alleiniger Inkubation mit E₂ 1nM. Danach wurden alle drei Substanzen kombiniert. Auf die Zugabe von E₂ 1nM/AG 1478/PD 98059 reagierten beide Zelltypen mit einer weiteren Senkung des Wachstums. Diese war bei den Ishikawa- Zellen deutlicher ausgeprägt (Abb.11/12).

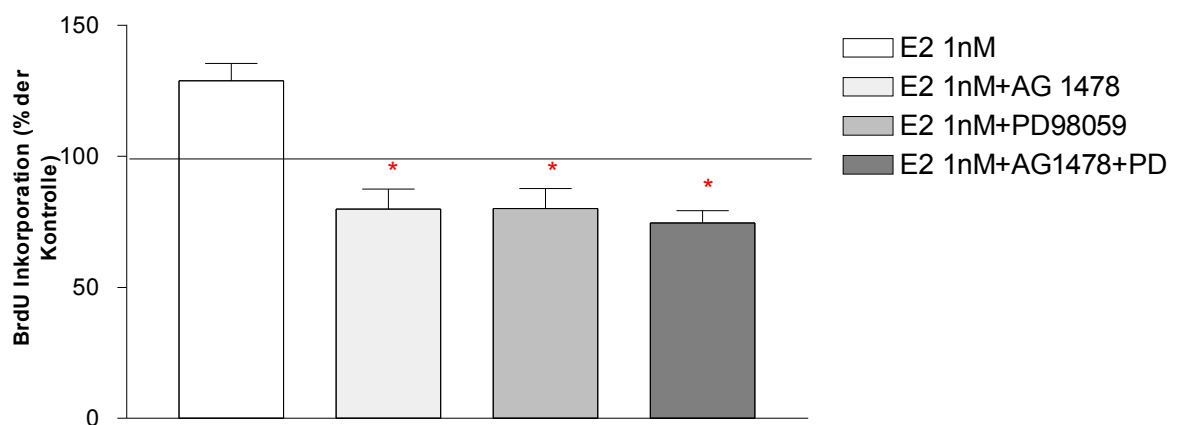


Abb. 11: Beeinflussung der Östradiol-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

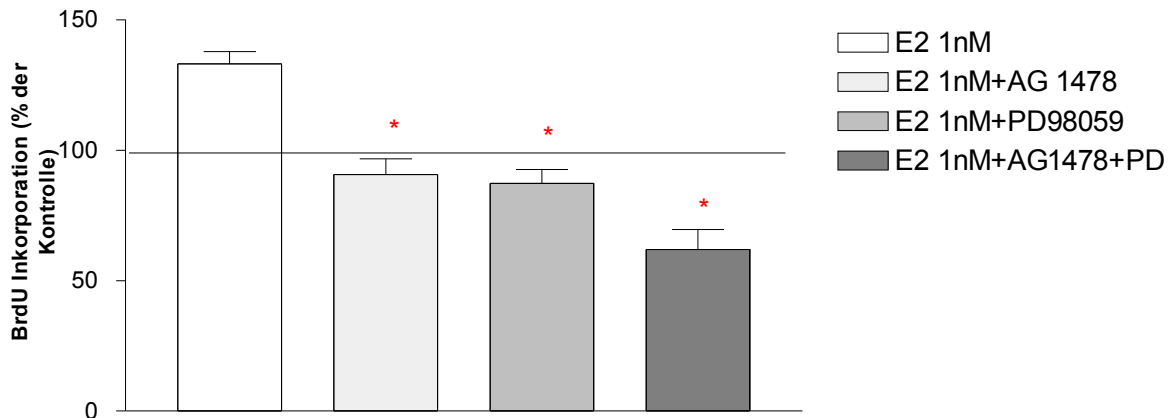


Abb. 12: Beeinflussung der Östradiol-Wirkung durch Inhibitoren der Signaltransduktion bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.2.4 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Antiöstrogenen

Diese Versuche sollten zeigen, ob Antiöstrogene in der Lage sind, in die Signaltransduktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren einzugreifen. Dazu wurde jeder einzelne mit den Substanzen Tamoxifen bzw. ICI 182,780 in den Konzentrationen 100nM und 1 μ M kombiniert. Zunächst wurden mögliche Einflüsse auf die EGF- Wirkung überprüft. Nach der alleinigen Zugabe von EGF resultierte eine Proliferation 129% bei der Zelllinie HEC-1A und 139% bei den Ishikawa- Zellen. Durch die Kombination von EGF mit Tamoxifen 100nM nahm das Wachstum bei beiden Zellpopulationen ab. Es reduzierte sich um 19% (HEC-1A) bzw. 26% (Ishikawa) verglichen mit dem Wert nach alleinigem EGF- Reiz. Durch die Behandlung mit EGF/Tamoxifen 1 μ M kam zu unterschiedlichen Reaktionen der zwei Zelltypen. Während es für die Ishikawa- Zellen zu einer stärkeren Inhibition der Proliferationsrate auf etwa das Niveau der Kontrolle (100%) kam, zeigten die HEC-1A-Zellen ein vermehrtes Wachstum, das mit 126% fast den Wert der solitären EGF- Stimulation erreichte. Nach der Zugabe des reinen Antiöstrogens ICI 182,780 reagierten beide Zell-Linien mit einer gesteigerten Proliferation. So zeigte die HEC-1A-Population ein Wachstum von 135% und der Ishikawa- Zelltyp eine Proliferation von 157%. Nach Erhöhung der ICI-Konzentration auf 1 μ M kam es sogar noch zu einer

deutlicheren Wachstumszunahme bei der Zell-Linie Ishikawa auf 190%. Die Kombination EGF/ICI 1µM führte bei HEC-1A zwar zu einem höheren Wert als EGF allein, aber zu einem etwas niedrigeren als EGF/ICI 100nM (Abb.13/14).

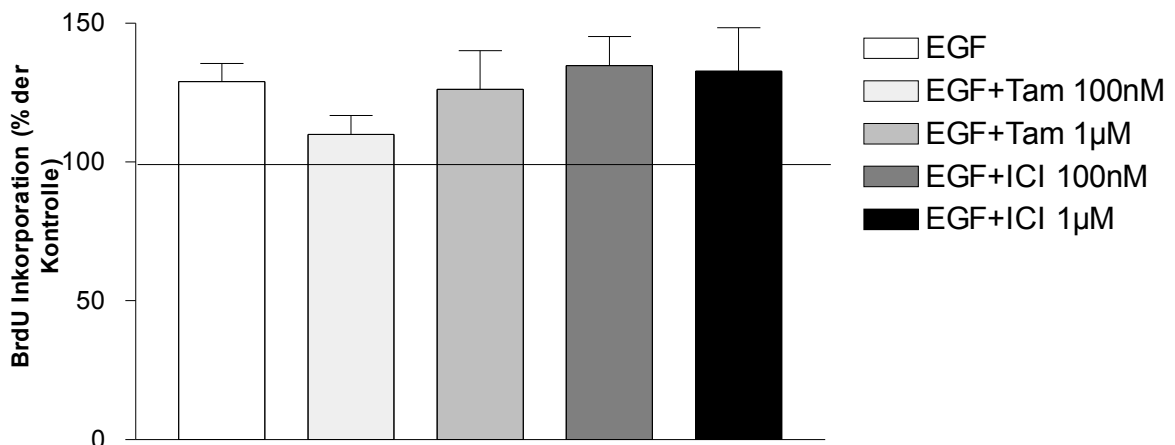


Abb. 13: Beeinflussung der EGF-Wirkung durch Antiöstrogene bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

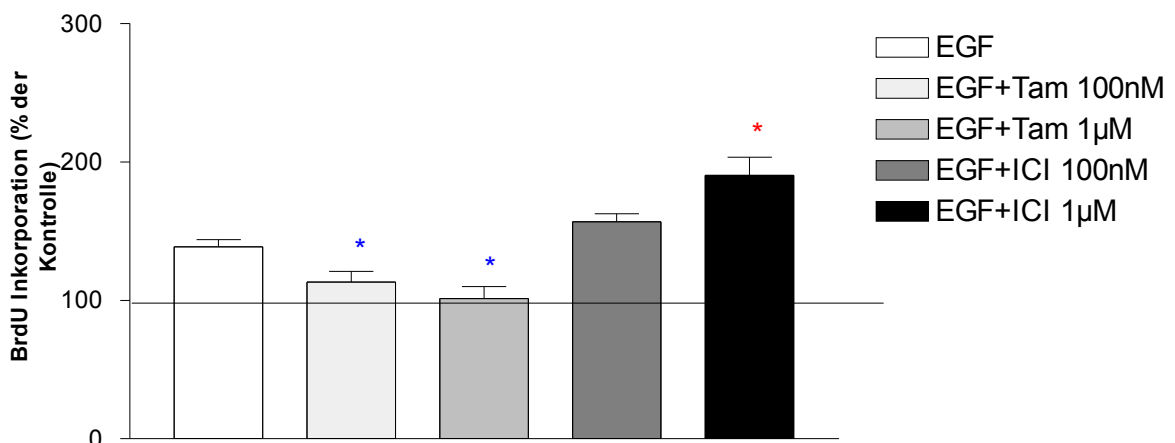


Abb. 14: Beeinflussung der EGF-Wirkung durch Antiöstrogene bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber EGF, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber EGF, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Der nächste getestete Wachstumsfaktor war IGF-1. Bei singulärer Zugabe führte er zu einer Steigerung der Proliferation auf 120% (HEC-1A) bzw. 136% (Ishikawa). In Verbindung mit Tamoxifen 100nM konnte das Wachstum deutlich inhibiert werden. Die Zell-Linie HEC-1A zeigte einen Rückgang der Zellteilung auf 90%, Ishikawa einen Rückgang auf 109% absolut. Die Behandlung mit IGF-1/Tamoxifen 1µM erzielte ebenfalls eine Wachs-

tumsinhibition bei beiden Zellpopulationen. Die erreichten Werte lagen für HEC-1A allerdings um wenige Prozentpunkte höher als für IGF-1/Tamoxifen 100nM. Die Ishikawa- Zellen reagierten mit einer etwa gleichbleibenden Proliferationsabnahme. Durch die Kombinationen IGF-1/ICI 100nM bzw. IGF-1/ICI 1µM wurde die Proliferation der HEC-1A um knapp 30% gegenüber der alleinigen Stimulation mit IGF-1 inhibiert. Die Werte lagen für beide ICI-Konzentrationen dicht zusammen. Die Ishikawa-Zellen sprachen unterschiedlich auf die genannten Zusammenstellungen an. In beiden Fällen kam es zu einer stärkeren Reduktion des Wachstums als durch Tamoxifen in den entsprechenden Konzentrationen. Die eindeutigste Senkung der Proliferation wurde mit 87% durch IGF-1/ICI 1µM erzielt (Abb. 15/16).

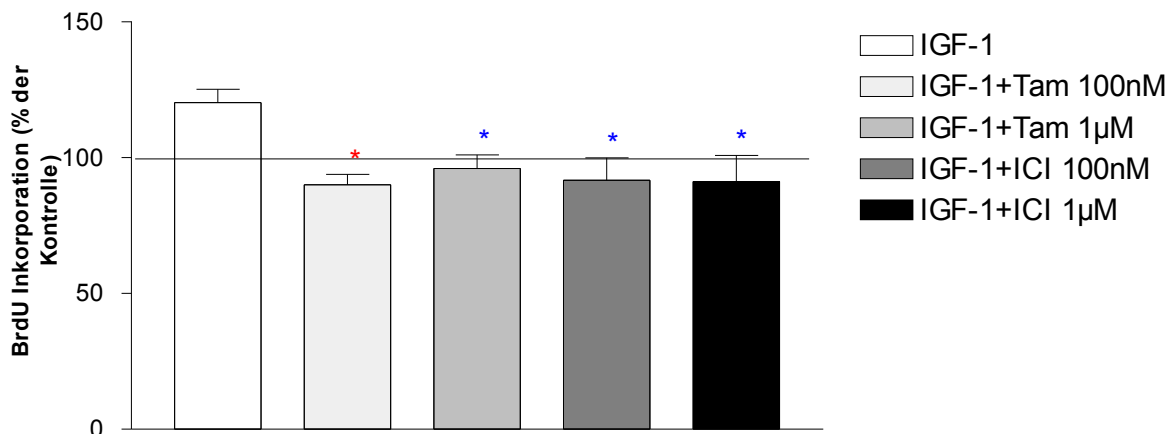


Abb. 15: Beeinflussung der IGF-1-Wirkung durch Antiöstrogene bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

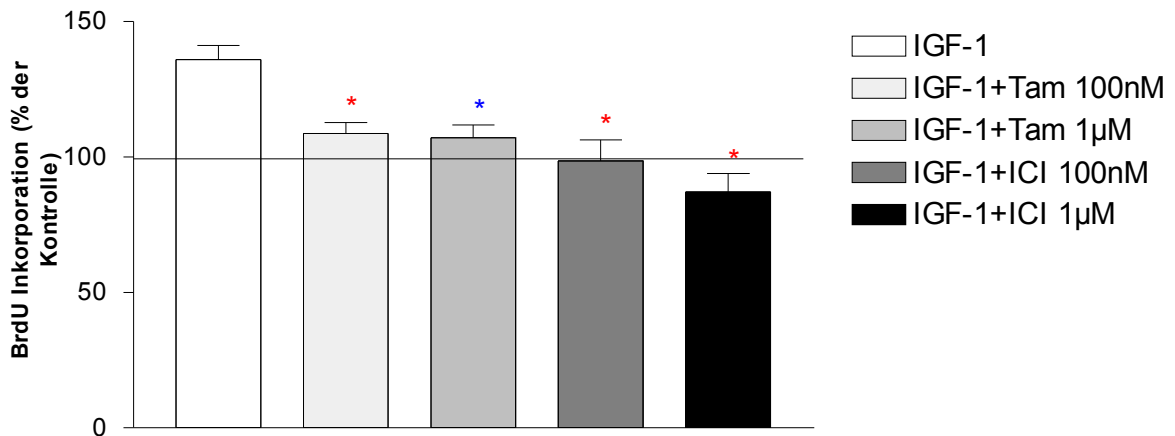


Abb. 16: Beeinflussung der IGF-1-Wirkung durch Antiöstrogene bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Auch TGF- α wurde im Zusammenhang mit Antiöstrogenen getestet. Die Proliferationsrate für die HEC-1A-Zellen lag bei 121%, für die Ishikawa-Zellen bei 119%. Tamoxifen war in der Lage die TGF- α -induzierte Proliferation um 40% zu senken. Die Ishikawa-Zellen reagierten nicht so deutlich, jedoch kam es auch hier zu einer Abnahme der Proliferation zum 24%. Bei einer höheren Tamoxifenkonzentration zeigte sich eine Inhibition um 50% (HEC-1A) bzw. 30% (Ishikawa) bezogen auf die Ergebnisse nach singulärer TGF- α -Zugabe. Das reine Antiöstrogen ICI 182,780 konnte die das Wachstum der beiden Zellpopulationen in Verbindung mit TGF- α nicht so stark hemmen wie Tamoxifen. Die HEC-1A-Zellen reagierten auf TGF- α /ICI 100nM mit einer Proliferation von 98% und auf TGF- α /ICI 1µM mit einem Wert von 102% absolut. Die Wachstumshemmung war bei den Ishikawa-Zellen etwa gleich stark ausgeprägt, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu zeigen (Abb. 17/18).

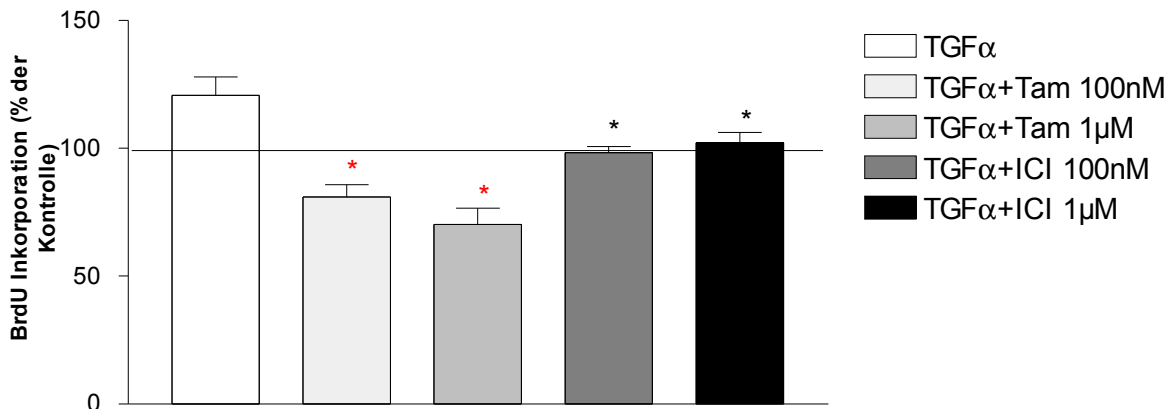


Abb. 17: Beeinflussung der TGF α -Wirkung durch Antiöstrogene bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber TGF α , * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber TGF α , --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

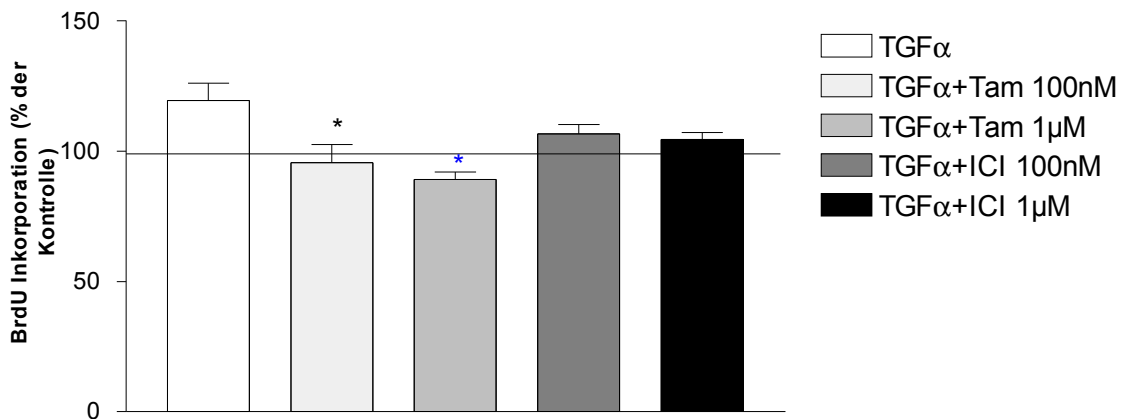


Abb. 18: Beeinflussung der TGF α -Wirkung durch Antiöstrogene bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber TGF α , * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber TGF α , --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Die letzte Substanz, die in Kombination mit Antiöstrogenen untersucht wurde, war Heregulin- β 1. Die Behandlung mit HRG- β 1 führte zu einer Proliferation von 129% bei den HEC-1A-Zellen und 139% bei der Zell-Linie Ishikawa. Sowohl Tamoxifen als auch ICI konnten bei diesen Verknüpfungen die stärkste Wachstumsinhibition hervorrufen. So sank die Proliferation um 54% für die Kombination HRG- β 1/Tamoxifen 100nM bei der HEC-1A-Population und um 42% für die Ishikawa-Zellen. Bei Zusammenstellung mit Tamoxifen 1 μ M fiel sie noch weiter, so dass das Wachstum bei beiden Zell-Linien nur noch etwa die Hälfte der Ausgangswerte (HRG- β 1 alleine) erreichte. Die Ergebnisse durch Kombinationen von HRG- β 1/ICI

waren für die entsprechenden Konzentrationen bei den HEC-1A-Zellen den Resultaten für die Verbindungen mit Tamoxifen vergleichbar. Dies gilt auch für die Zell-Linie Ishikawa, wobei allerdings durch die Kombination mit ICI jeweils um ca. 5% niedrigere Wachstumsraten als durch die Zusätze von HRG- β 1 mit Tamoxifen erzielt wurden (Abb.19/20).

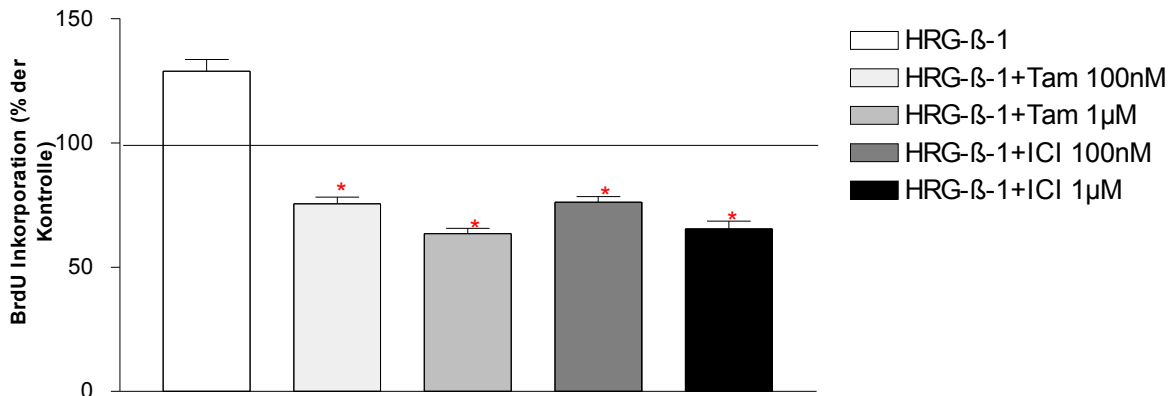


Abb. 19: Beeinflussung der Heregulin- β -I-Wirkung durch Antiöstrogene bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG- β -1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

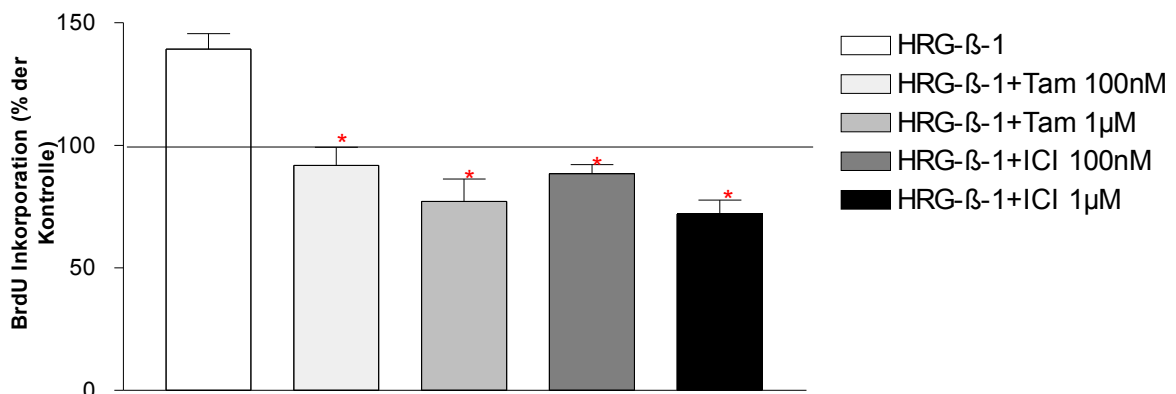


Abb. 20: Beeinflussung der Heregulin- β -I-Wirkung durch Antiöstrogene bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG- β -1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.3 Ergebnisse nach Inkubation der Zellkulturen mit komplexen Kombinationen

III.3.1 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Heregulin- β -1 in Kombination mit Herceptin und verschiedenen Östradiol -Antiöstrogen - Kombinationen

Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob die Wirkung antitumoraler Substanzen, vermittelt über einen der beiden genannten Signaltransduktionswege, durch den Einfluss des jeweils anderen Signalwegs gemindert werden kann. Beide Zell-Linien reagierten mit einem deutlichen Wachstum auf die Behandlung mit HRG- β -1. Durch die Kombination HRG- β -1/ Herceptin ließ sich die Proliferation stark senken. Die HEC-1A-Zellen zeigten eine Wachstumsminderung auf 78%, die Ishikawa- Zellen auf 62%. Dieser Effekt des Herceptins wurde durch den Zusatz von Östradiol gemildert. So bewirkte die Behandlung mit HRG- β -1/Herceptin/ E₂ 1nM einen Proliferationswert von 111% bei der Zell-Linie HEC-1A und einen Wert von 98% bei der Ishikawa- Linie. Wurde nun zusätzlich noch Tamoxifen 100nM verwendet, inhibierte dies das Wachstum der HEC-1A-Zellen um 20% und führte zu einem Wachstum von 91%. Die Ishikawa- Zellen zeigten nach Zugabe des Ansatzes HRG- β -1/Herceptin/ E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM einen Proliferationsrückgang um 13% auf 85%. Wurde statt Tamoxifen 100nM ICI 1 μ M verwendet, nahm das Wachstum der Zell-Linie HEC-1A um weitere 3% auf 88% ab, das der Ishikawa- Linie stieg dagegen auf 118% an. Auch die Kombination HRG- β -1/ Herceptin/ E₂ 1nM/PD98059 inhibierte die Proliferation der HEC-1A-Reihe noch weiter. In diesem Fall zeigten die Ishikawa- Zellen ebenfalls einen Wachstumsrückgang auf 93% (Abb. 21/22).

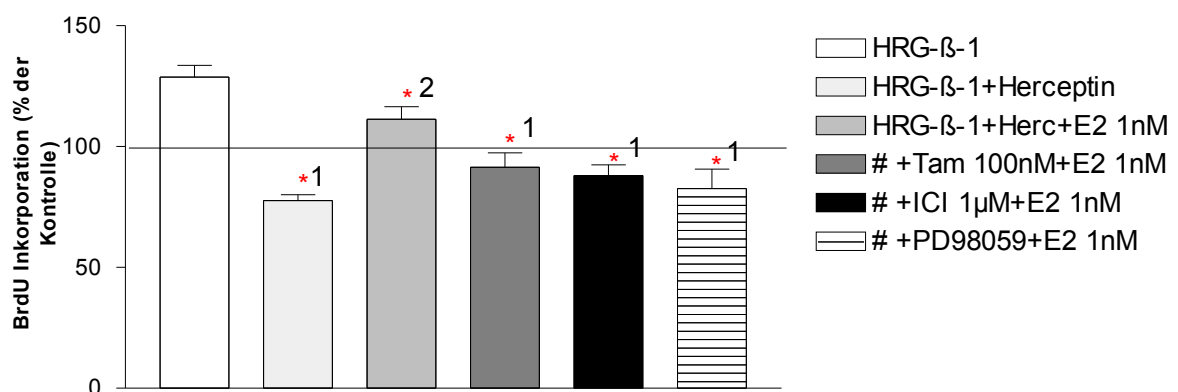


Abb. 21: Beeinflussung der Herceptin-Wirkung durch Östradiol bei HEC-1A; * 1= statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG- β -1, * 2= statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG- β -1+ Herceptin, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium, # = HRG- β -1+Herceptin

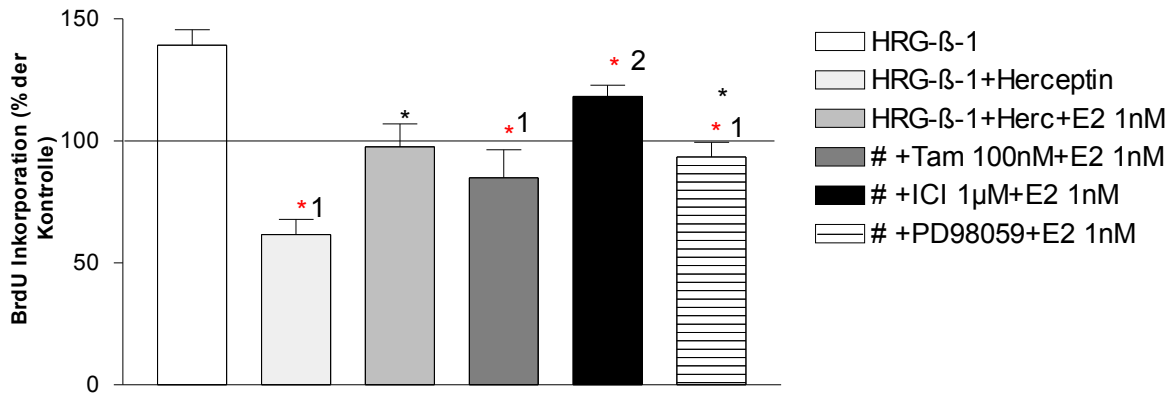


Abb. 22: Beeinflussung der Herceptin-Wirkung durch Östradiol bei Ishikawa; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG-β-1, * 2=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, *=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium, # = HRG-β-1 +Herceptin

Diese Versuchsreihe wurde gleichermaßen mit Östradiol 10nM durchgeführt, um zu klären, ob eine höhere Östradiolkonzentration einen anderen Einfluss auf das Proliferationsverhalten bewirkt. Es zeigte sich, dass lediglich die absoluten Zahlen verändert waren, die Reaktionsweise aber tendenziell die gleiche blieb (Abb. 23/24).

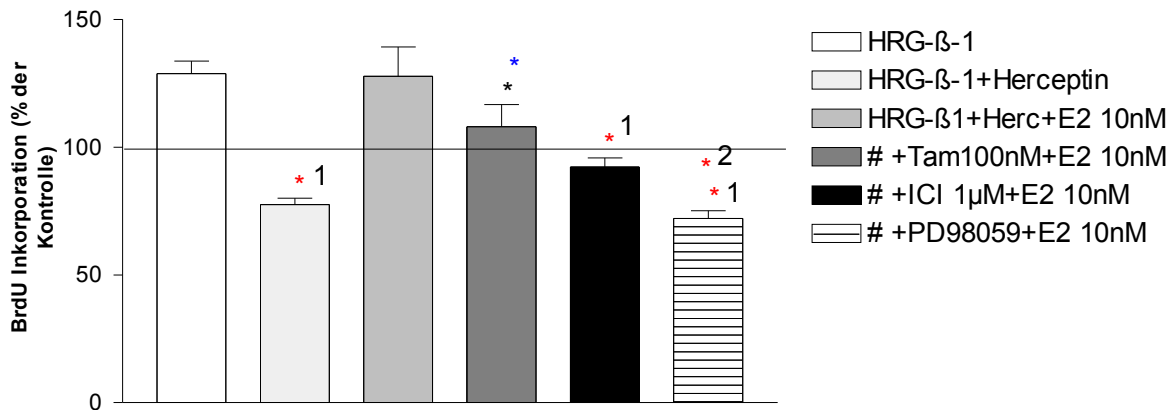


Abb. 23: Beeinflussung der Herceptin-Wirkung durch Östradiol bei HEC-1A; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG-β-1, * =statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber HRG-β-1, * =statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, * 2=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium, # = HRG-β-1+Herceptin

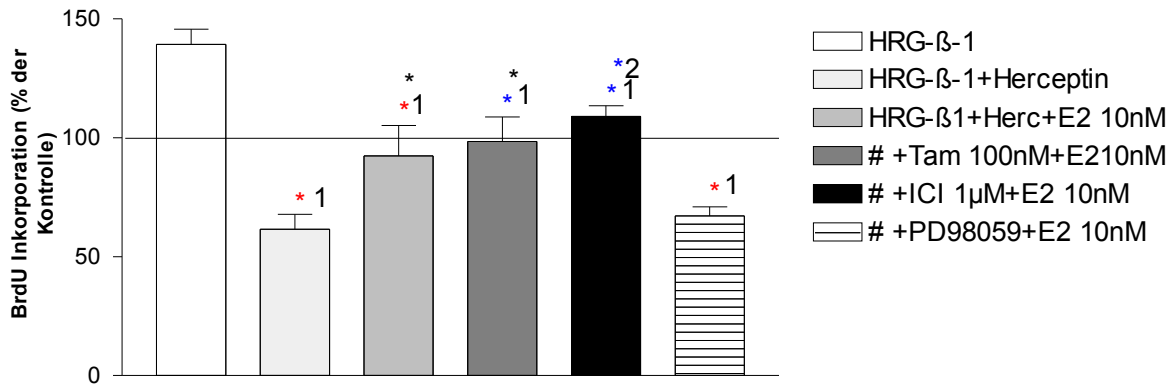


Abb. 24: Beeinflussung der Herceptin-Wirkung durch Östradiol bei Ishikawa; * 1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber HRG-β-1, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, * 1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber HRG-β-1, * 2 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber HRG-β-1+Herceptin, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium, # = HRG-β-1+Herceptin

III.3.2 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Östradiol- Antiöstrogen-Kombinationen und verschiedenen Wachstumsfaktoren

Nachdem verschiedene Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung der beiden Signaltransduktionswege bestehen, soll durch die Kombination von Östradiol, Tamoxifen und Wachstumsfaktoren nun geklärt werden, ob GF die Tamoxifen induzierte Proliferationsminderung aufheben können. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob verschiedene Wachstumsfaktoren unterschiedlich auf die Inhibition nach Tamoxifen einwirken. Ein weiterer Aspekt zur Lösung dieser Problematik scheint die Konzentration des eingesetzten Tamoxifens zu sein. Daher werden diese Experimente mit zwei verschieden stark konzentrierten Tamoxifenlösungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die HEC-1A- und Ishikawa- Zellen zunächst mit E_2 1nM/ Tamoxifen 100nM inkubiert. Die Zell-Linie HEC-1A reagierte mit einer deutlichen Proliferationsminderung im Gegensatz zu der alleinigen Behandlung mit E_2 1nM. Das Wachstum verringerte sich von 129% auf 96%. Durch die Zugabe von EGF, TGF- α und HRG-β-1 stieg die Proliferationsrate wieder etwa auf den Wert von E_2 1nM. Er betrug für EGF 123%, für TGF- α 138% und für HRG-β-1 auf 125%. Somit überstieg das Wachs-

tum nach Behandlung mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM/ TGF- α sogar den Wert nach Zugabe von E₂ 1nM. Durch die Inkubation mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM/IGF-1 fiel die Proliferation allerdings auf 75% ab (Abb. 25).

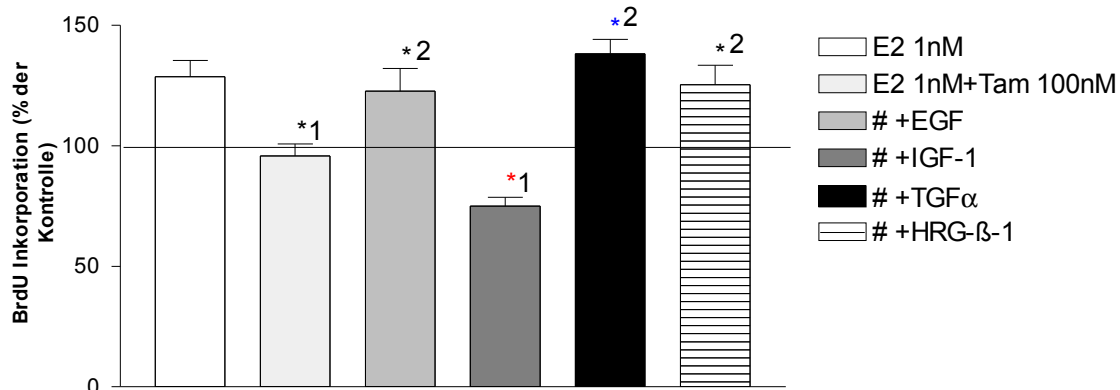


Abb. 25: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung durch Wachstumsfaktoren bei HEC-1A; *1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber E2 1nM, *2 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber E2 1nM+Tam 100nM, *1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, *2 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber E2 1nM+Tam 100nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium, # = E2 1nM+ Tam 100nM

Die Ishikawa - Zellen zeigten nach Behandlung mit E₂ 1nM ein Wachstum von 133%. Wurden sie mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM inkubiert verminderte sich die Proliferation um 15%. Auch bei dieser Zell-Linie ließ sich der Effekt des Tamoxifens durch EGF, TGF- α und HRG- β -1 aufheben. Die Wachstumsfaktoren EGF und TGF- α bewirkten sogar eine starke Zunahme der Zelldichte auf Werte von 198% bzw. 174%. Durch HRG- β -1 wurde lediglich eine leicht erhöhte Wachstumsrate von 120% erreicht. Ebenfalls identisch mit den Ergebnissen der Versuche für die HEC-1A-Zellen war, dass durch den Ansatz E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM/IGF-1 die Proliferation weiter inhibiert wurde. Sie sank auf 78% (Abb. 26).

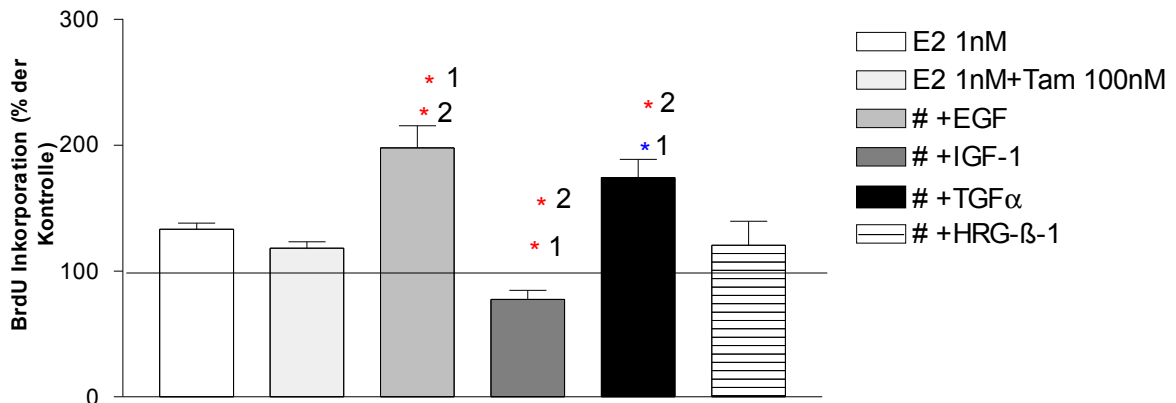


Abb. 26: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung durch Wachstumsfaktoren bei Ishikawa; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, * 2=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM+Tam 100nM, * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Diese Versuche wurden dann in leicht veränderter Form wiederholt. Die Konzentration des Tamoxifens wurde auf $10\mu\text{M}$ erhöht. Durch den Ansatz E₂ 1nM/Tamoxifen $10\mu\text{M}$ wurde das Wachstum stark inhibiert und fiel auf Werte von 45%. Durch die weitere Zugabe von Wachstumsfaktoren konnte dieser Effekt nicht mehr aufgehoben werden. Diese Beobachtung traf auf beide Zell-Linien zu. Bei den HEC-1A-Zellen war die Reaktion allerdings ausgeprägter. So inhibierte die Zugabe von E₂ 1nM/ Tamoxifen $10\mu\text{M}$ das Wachstum um 84%. Durch den weiteren Zusatz von EGF bzw. TGF- α nahm die Proliferation auf etwa 20% ab. Die Wachstumsfaktoren IGF-1 und HRG- β -1 bewirkten einen zusätzlichen Wachstumsrückgang auf ca. 33% (Abb. 27).

Die Ishikawa- Zellen reagierten ähnlich, aber die Inhibition war nicht ganz so ausgedehnt. So erzielte der Ansatz E₂ 1nM/Tamoxifen $10\mu\text{M}$ Werte von 70% im Gegensatz zu 133% bei singulärer Behandlung mit E₂ 1nM. Wurde außerdem IGF-1 zugesetzt, zeigte sich keine Wirkung. Die Werte blieben bei 70%. Durch zusätzlichen Einsatz von EGF, TGF- α oder HRG- β -1 sanken die Proliferationsraten weiter. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt: E₂ 1nM/Tamoxifen $10\mu\text{M}$ /EGF 60%, E₂ 1nM/ Tamoxifen $10\mu\text{M}$ / TGF- α 55% und E₂ 1nM/Tamoxifen $10\mu\text{M}$ / HRG- β -1 65% (Abb. 28).

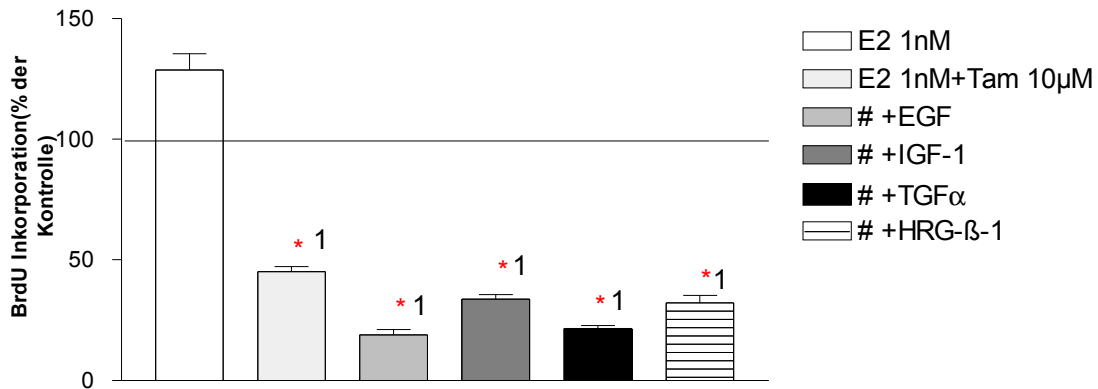


Abb. 27: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung durch Wachstumsfaktoren bei HEC-1A; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

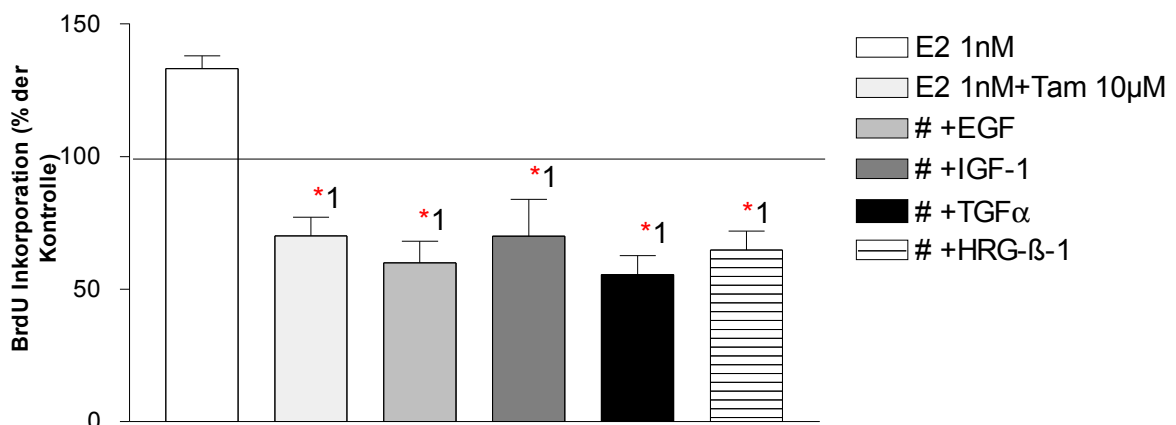


Abb. 28: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung durch Wachstumsfaktoren bei Ishikawa; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber E2 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.3.3 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Östradiol- Antiöstrogen-Kombinationen und Inhibitoren der Wachstumsfaktorsignaltransduktion

Die Kombinationen aus Östradiol, Tamoxifen und Inhibitoren der MAPK-Signaltransduktion werden durchgeführt, um zu klären, ob die Tamoxifen induzierte Proliferationsinhibition noch verstärkt werden kann. Da Östradiol nicht nur über ER wirkt, sondern auch die RTKs beeinflusst,

könnte sich hier ein weiterer Ansatz zu neuen Therapien ergeben. Dazu wurden die Zellen wiederum mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM inkubiert. Wie oben beschrieben fiel die Proliferation der Zell-Linie HEC-1A durch diesen Ansatz auf 96% ab. Wurde ferner der EGF- Rezeptor- Inhibitor AG 1478 zugegeben, sank das Wachstum auf 59%. Durch den MEK1/2- Inhibitor PD 98059 in Kombination mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM kam es zu keiner signifikanten Änderung der Proliferation gegenüber der solitären Behandlung mit E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM.

Die Ishikawa- Zellen ähnelten in ihrer Reaktionsweise auch hier den HEC-1A-Zellen. Wie bereits erwähnt erreichte der Ansatz E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM ein Wachstum von 118% und verringerte somit die Wirkung des E₂ 1nM um 15%. Wurde nun außerdem noch AG 1478 zugesetzt, fiel die Proliferation um weitere 6% auf 112%. Im Gegensatz zu der Zell-Linie HEC-1A konnte dieser Effekt durch PD 98059 noch verstärkt werden. So wurden mit der Zugabe von E₂ 1nM/Tamoxifen 100nM/PD 98059 nur noch Wachstumswerte von 105% erreicht (Abb. 29/30).

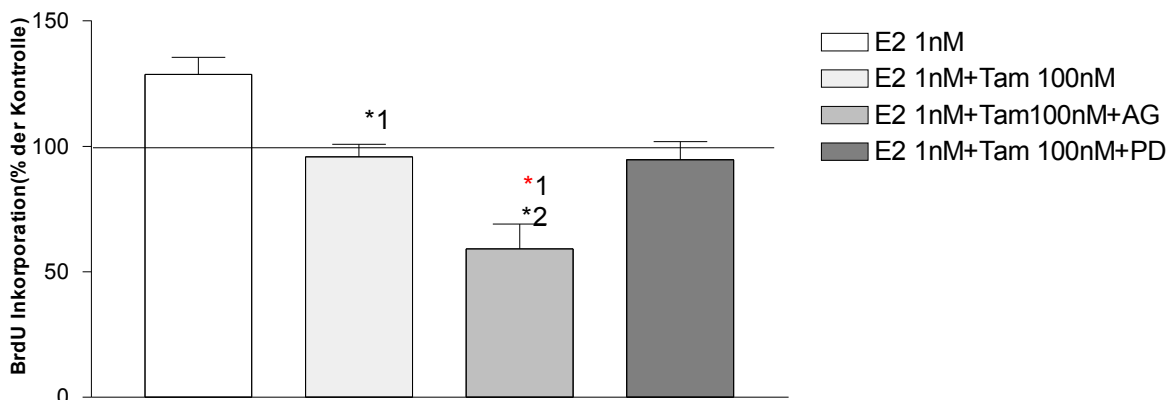


Abb. 29: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die E₂ induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei HEC-1A; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0,05 gegenüber E₂ 1nM, * 2=statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0,05 gegenüber E₂ 1nM+Tam 100nM, * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0,001 gegenüber E₂ 1nM, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

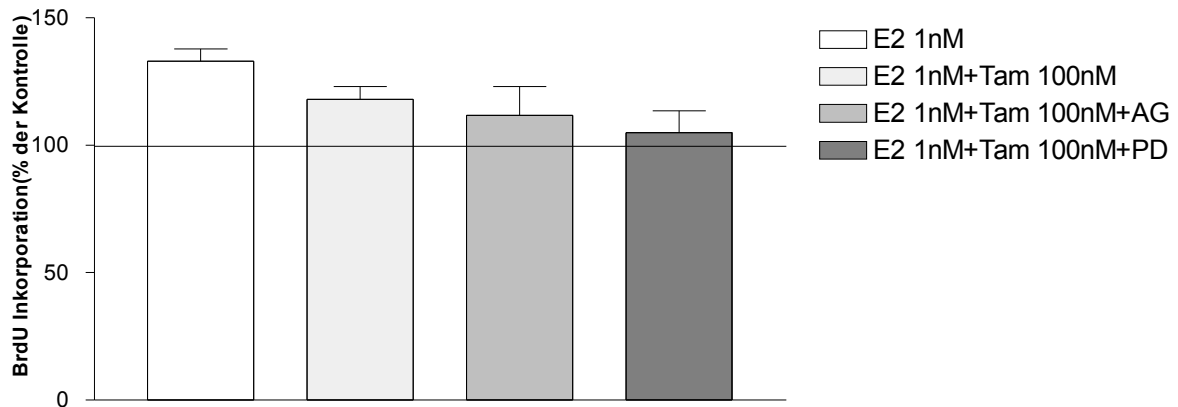


Abb. 30: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die E2 induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.3.4 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, Inhibitoren der Signaltransduktion und Tamoxifen

Durch diese Versuchsplanung sollte gezeigt werden, ob und in welchem Maß Tamoxifen in die Reaktion der Signaltransduktionsinhibitoren eingreift. Zu diesem Zweck wurden die Zell-Linien HEC-1A und Ishikawa zunächst mit EGF und EGF/AG 1478 bzw. mit EGF/PD 98059 behandelt. Dabei konnte für die HEC-1A-Zellen festgestellt werden, dass durch die Kombination EGF/AG 1478 die Proliferation wirksam inhibiert wurde und von 129% (EGF alleine) auf 106% abfiel. Wurde weiterhin mit Tamoxifen zugegeben, wurde dieser Effekt teilweise aufgehoben. Der Ansatz EGF/AG 1478/ Tamoxifen 100nM bewirkte ein Wachstum von 114%. Die Inkubation mit EGF/PD 98059 führte zu keiner Abnahme der Zelldichte. Diese blieb konstant. Bei der zusätzlichen Behandlung mit Tamoxifen stieg sie allerdings mit 146% über den Wert für die solitäre EGF- Inkubation.

Die Ishikawa- Zellen reagierten ebenfalls mit einer Proliferationsminderung auf die Zugabe von EGF/AG 1478. Hier fiel der Wert von 139% nach EGF- Behandlung auf 95% ab. Durch den Ansatz EGF/PD 98059 wurden nur noch 89% erreicht. Auch in diesem Fall konnten die Effekte durch Tamoxifen rückgängig gemacht werden. Nach Zusatz von EGF/AG 1478/ Tamoxifen 100nM reagierten diese Zellen mit einem Wachstum von

133% und erreichten so fast die Ausgangswerte. Durch EGF/PD 98059/ Tamoxifen 100nM kam es zu einer Proliferation von 110%. Die PD 98059-Wirkung wurde also nur in Teilen kompensiert (Abb. 31/32).

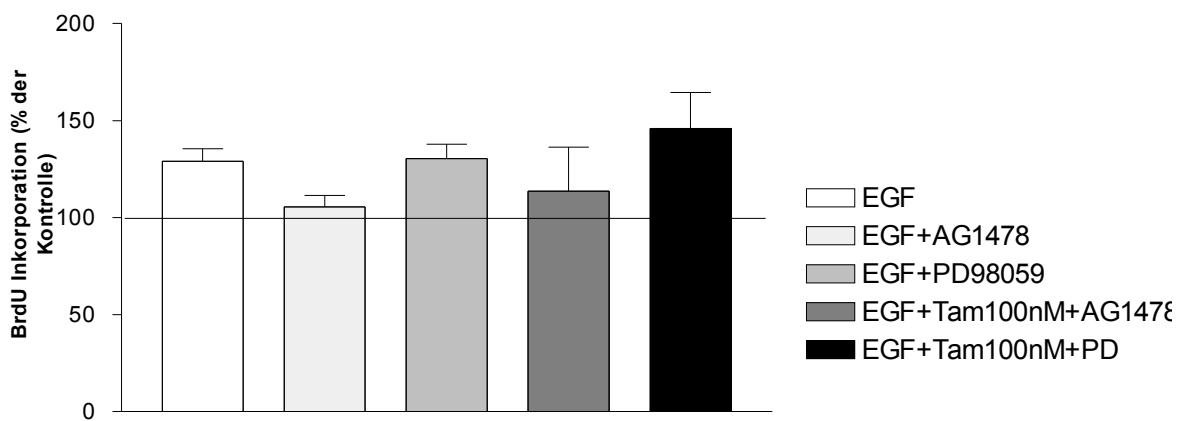


Abb. 31: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die EGF induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

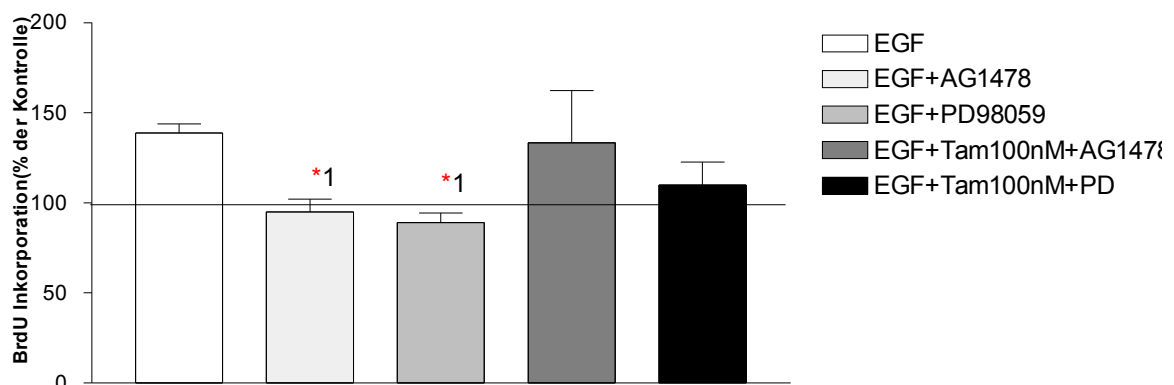


Abb. 32: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die EGF induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei Ishikawa; * 1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber EGF, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

Dieser Versuchsaufbau wurde auch mit dem Wachstumsfaktor IGF-1 durchgeführt. Die Zell-Linie HEC-1A reagierte mit einem Wachstum von

120% auf die Inkubation mit IGF-1. Dieses Ergebnis wurde durch IGF-1/Tamoxifen 100nM inhibiert. Wurde nun zusätzlich AG 1478 zugesetzt, fiel die Proliferationsdichte weiter ab und lag nur noch bei 67%. Die gleiche Wirkung wurde durch IGF-1/Tamoxifen 100nM/PD 98059 erzielt.

Die Ishikawa- Zellen zeigten ein Wachstum von 136% nach Behandlung mit IGF-1. Auch hier wurde der Effekt durch die Zugabe von Tamoxifen inhibiert. Ebenfalls identisch in der Reaktionstendenz waren beide Zell-Linien nach dem Zusatz von IGF-1/ Tamoxifen 100nM/Ag 1478. Hier sank das Wachstum der Ishikawa- Linie auf 84%. Wurde AG 1478 durch PD 98059 ersetzt, fiel es sogar um weitere 10% ab (Abb. 33/34)

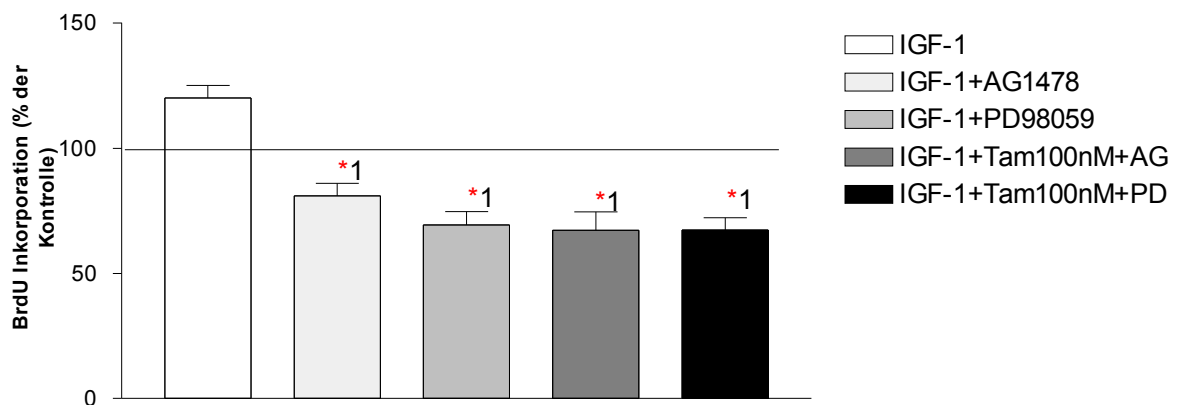


Abb. 33: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die IGF-1 induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei HEC-1A; * 1=statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

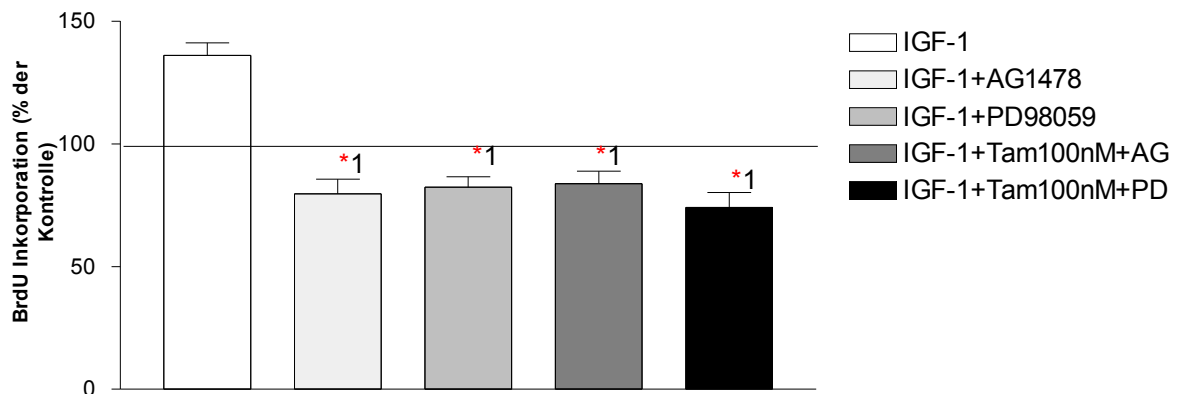


Abb. 34: Beeinflussung der Tamoxifen-Wirkung auf die IGF-1 induzierte Proliferation durch AG 1478 bzw. PD 98059 bei Ishikawa; *1 = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber IGF-1, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

III.3.5 Proliferationsverhalten endometrialer HEC-1A- und Ishikawa-Zellen nach Behandlung mit Kombinationen aus Wachstumsfaktoren, Inhibitoren der Signaltransduktion und Östradiol

Diese Versuche sollten klären, ob und in welcher Weise Östradiol in die Wirkung der beiden EGF- Rezeptor- Inhibitoren ZD 1839 und AG 1478 eingreift. Dazu wurden sowohl die HEC-1A- als auch die Ishikawa- Zellen erst einmal mit EGF alleine inkubiert. Dabei zeigte sich in beiden Fällen eine deutliche Proliferation 129% (HEC-1A) bzw. 139% (Ishikawa). Die Ansätze EGF/AG 1478 und EGF/ZD 1839 inhibierten das Wachstum beider Zell-Linien eindeutig. Wurde im Weiteren mit EGF/AG 1478/ E_2 1nM behandelt stieg die Zelldichte wieder an. Die HEC-1A-Reihe erreichte Werte von 128%, die Ishikawa- Linie Werte von 160%. Diese lagen weit über denen nach solitärer EGF- Inkubation. EGF/ZD 1839/ E_2 1nM führte ebenfalls zu einer Proliferationsvermehrung. Diese lag im Bereich von 143% für die HEC-1A-Zellen und von 141% für die Ishikawa- Zellen (Abb. 35/36).

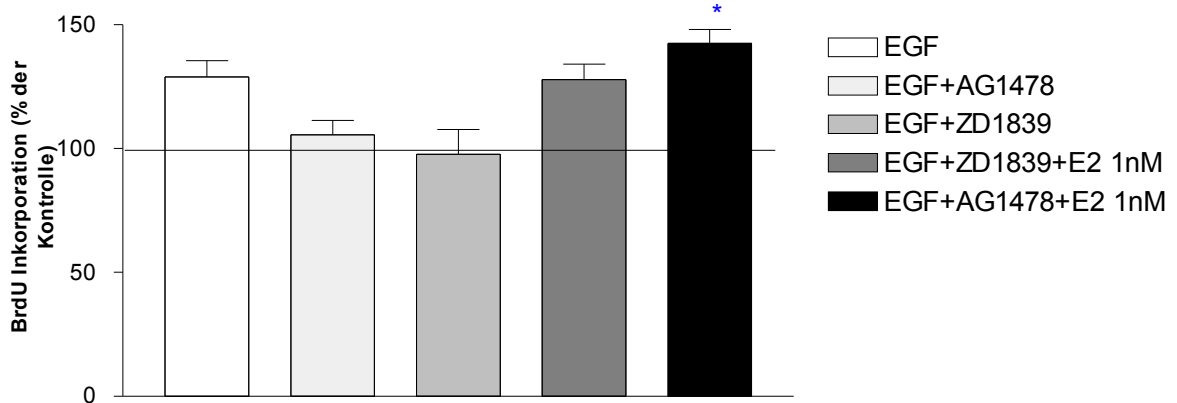


Abb.35: Beeinflussung der RTK-Inhibitoren-Wirkung durch Östradiol bei HEC-1A; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,01$ gegenüber EGF+AG 1478, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

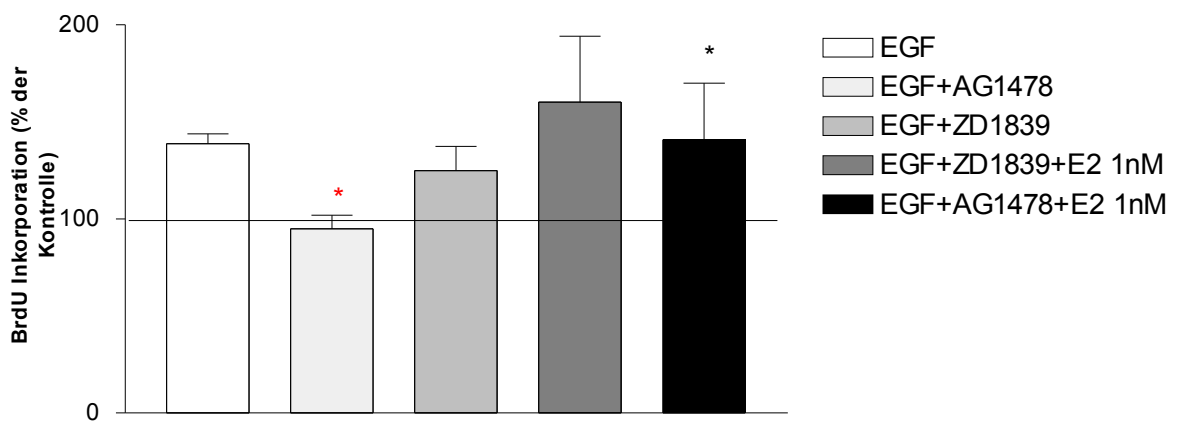


Abb.36: Beeinflussung der RTK-Inhibitoren-Wirkung durch Östradiol bei Ishikawa; * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,05$ gegenüber EGF, * = statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$ gegenüber EGF+AG 1478, --- = Wachstum der Kontrolle nach Inkubation mit SR2-Medium

IV Diskussion

Die erarbeiteten Ergebnisse liefern Hinweise für eine Interaktion zwischen der ER- und RTK- Signaltransduktion in endometrialen Tumorzellen. Indizien für eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Signalwege liefern die Versuche, bei denen die Proliferation vermittelt über einen Signalweg durch Inhibitoren des anderen Transduktionsmechanismus gemindert wurde. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl die Tamoxifenwirkung auf die durch Östradiol induzierte Wachstumszunahme durch RTK- Inhibitoren als auch die Wirkung der RTK- Inhibitoren auf die durch Wachstumsfaktoren induzierte Zellvermehrung beeinflusst werden können. Diese Resultate können Ausdruck zwei verschiedener Eventualitäten sein: Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Östradiol sowohl über den ER als auch über RTKs bzw. die Wachstumsfaktoren nicht nur über RTKs sondern auch über den ER ihre Wirkung entfalten. Andererseits könnten die RTK- Inhibitoren bzw. die Antiöstrogene auf beide Signalkaskaden wirken.

In dieser Versuchsreihe wurde durch die Behandlung der HEC-1A-Zellen mit Östradiol eine gesteigerte Proliferation erreicht. Dies kann auf das Vorhandensein von ERs oder aber, da diese Zellen als ER- negativ gelten, auf eine alternative Signaltransduktion durch Östradiol hinweisen. Ein deutliches Indiz hierfür ist die Tatsache, dass die östradiolinduzierte Proliferation der HEC-1A-Zellen durch die RTK- Inhibitoren AG 1478 und PD 98059 signifikant gehemmt wird (s. Abb. 11).

Der ER ist ein zytoplasmatischer Rezeptor, der nach Aktivierung durch Östradiol in den Zellkern transloziert und dort an ein sog. "estrogen response element" (ERE) bindet. Dadurch wird die Transkription östrogenabhängiger Gene aktiviert. Das Antiöstrogen Tamoxifen greift ebenfalls am ER an. Es inhibiert die AF-2-Region des Rezeptors [12], die für die Rekrutierung von Kofaktoren zuständig ist. Die Aktivierung von AP-1, einer fos/jun-Familie von Transkriptionsfaktoren [5], ist auch über Östradiol möglich. Für diese Aktivierung ist die DNA-Bindungsdomäne des ER nicht notwendig, wohingegen Tamoxifen für diesen Signalweg die DNA-Bindungsdomäne benötigt (sog. α - Signalweg). Dies unterstreicht die

Wahrscheinlichkeit zweier unterschiedlicher Signaltransduktionswege ausgehend von der Aktivierung des ER durch Östradiol bzw. Tamoxifen. [41]. Die Tamoxifen-stimulierte Interaktion ist zellspezifisch und konnte im Endometrium, Knochen- und Fettgewebe nachgewiesen werden [43]. Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF, IGF-1 oder TGF α binden an Transmembranrezeptoren. Diese Rezeptortyrosinkinasen genannten Proteine werden über Ligandenbindung aktiviert. Nach der Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des RTKs und in der Folge über die Induktion von MAP-Kinase und Proteinkinase C sowie weiterer Gene zur DNA-Replikation und Zellproliferation. Die beiden beschriebenen Signalwege können nicht länger als voneinander unabhängig betrachtet werden. Vielmehr scheinen sie miteinander zu interagieren. So konnte gezeigt werden, dass sowohl EGF als auch TGF α als RTK-Liganden in Ishikawa-Zellen in der Lage war, ein ERE zu aktivieren [17]. Diese Erkenntnis konnte in den vorliegenden Proliferationsstudien durch die Tatsache untermauert werden, dass sowohl das EGF- als auch das TGF α -induzierte Wachstum der Zellpopulationen durch Antiöstrogene inhibiert wurde. Dieser Effekt war bei den Ishikawa-Zellen deutlicher als bei den HEC-1A-Zellen und bezog sich nicht nur auf die Inhibition durch Tamoxifen sondern auch auf diejenige durch ICI 182,780. Als weitere Hinweise für die Verbindung der beschriebenen Aktivierungskaskaden müssen die Erfahrungen angesehen werden, dass sowohl Östradiol als auch Tamoxifen Endometrium-Karzinomzellen für die Wirkungen des Wachstumsfaktors IGF-1 sensibilisieren können, sofern diese über den IGF-1-Rezeptor vermittelt werden [21,22]. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Entdeckung, dass HEC-1A- und Ishikawa-Zellen zu einer autokrinen Produktion von IGF-1 und TGF α fähig sind [31]. Dies könnte erklären, warum sich bei den hier vorhandenen Ergebnissen nach Zugabe der RTK-Inhibitoren ZD 1839 oder AG 1024 bzw. des Her2/neu-Antikörpers Herceptin tendenziell proliferative Reaktionen der Zellkulturen zeigten, obwohl keine wachstumsfördernden Substanzen im Kulturmedium enthalten waren. Es ist also möglich, dass die Tumorzellen sich autokrin stimulieren. Dieser Tatsache sollte bei Überlegungen zu

Therapieansätzen Rechnung getragen werden, da nur die Umgehung solcher zelleigenen Mechanismen zu einer effektiveren Therapie führen kann. Als weiterer Anhaltspunkt für die gegenseitige Beeinflussung von ER- und RTK- vermittelter Signaltransduktion zeigte sich die statistisch signifikante Proliferationsinhibition nach Behandlung beider Zell-Linien mit Kombinationen aus Östradiol und AG 1478 oder PD 98059. Auch die Zugabe beider Inhibitoren in Kombination mit Östradiol führte zu einem Wachstumsrückgang verglichen mit dem solitären Östradiolzusatz. Nach diesen Ergebnissen sollte geprüft werden, ob die RTK- Liganden Teile ihrer Effekte über den Aktivierungskomplex des Östradiols erzielen. Dazu wurden die Wachstumsfaktoren EGF, IGF-1, TGF α und Heregulin- β 1 jeweils mit Tamoxifen oder ICI 182,780 zusammengegeben. Die HEC-1A-Linie reagierte sowohl in Bezug auf die verschiedenen Antiöstrogenkonzentrationen als auch hinsichtlich der Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF α und Heregulin- β 1 mit einer statistisch signifikanten Abnahme der Proliferation. Dahingegen waren die Ergebnisse der Kombinationen mit EGF sehr uneinheitlich, wobei die Werte etwa auf Niveau der alleinigen EGF-Zugabe blieben. Die Zell-Linie Ishikawa reagierte mit einer statistisch signifikanten Inhibition der Proliferation nach kombinierter Behandlung mit IGF-1 bzw. Heregulin- β 1 und Antiöstrogenen. Das Zusammenwirken von TGF α oder EGF mit Tamoxifen konnte das Wachstum ebenfalls signifikant senken. Nach der gemeinsamen Behandlung mit TGF α und ICI 182,780 zeigten die Ishikawa- Zellen lediglich eine tendenzielle Proliferationsabnahme. Aus allen diesen Resultaten lässt sich allerdings keine Aussage über eine Richtung der Beeinflussung treffen. Einerseits ist die zumindest partielle Wirkung des Östradiols über die RTK- Signalkaskade bzw. der Wachstumsfaktoren über den Östradiolsignalweg möglich, andererseits kann ein Effekt der Antiöstrogene auf den MAPK- Weg bzw. der RTK- Inhibitoren auf die ER- vermittelte Signaltransduktion nicht ausgeschlossen werden.

Überraschend waren die Ergebnisse bei der Kombination von EGF und ICI 182,780. Wurde die Konzentration des ICI auf 100nM eingestellt, reagierten die Ishikawa- Zellen mit einer leichten , auf die Konzentration von

1µM sogar mit einer statistisch signifikanten Zunahme des Wachstums. Ein ähnlicher Effekt wurde schon für HeLa- Zellen, eine humane endometriale Tumorzell-Linie, beschrieben. Nach Transfektion punktmutierter Östrogenrezeptoren (Punktmutationen in der AF-2-Region) in diese Zellen kam es zu einer reduzierten östradiolabhängigen Transkriptionsaktivität und zusätzlich zu einem starken Agonismus der Antiöstrogene Tamoxifen und ICI 164,384. Allerdings konnten in dieser Studie gleichzeitig keine natürlichen Mutationen der AF-2-Regionen von vier verschiedenen humanen Tamoxifen - stimulierten Tumoren gefunden werden [4]. Ferner ist diese Erklärung im vorliegenden Fall auch deshalb unwahrscheinlich, weil die Stimulation nur durch ICI 182,780 ausgelöst wurde. Wäre eine Punktmutation vorhanden, so müsste auch Tamoxifen eine Proliferationszunahme bewirken, und es müssten alle Versuche mit Antiöstrogenen betroffen sein. Der beschriebene Effekt war aber lediglich für diesen einen Versuchsansatz evident, wenngleich er reproduzierbar war.

4-Hydroxytamoxifen, der aktive Metabolit des Tamoxifens, interagiert über eine tertiäre Stickstoffgruppe der antiöstrogenischen Seitenkette mit der an Position 351 der Ligandenbindungsdomäne des ER vorhandenen Aminosäure Aspartat. Diese Assoziation ist schwächer als die Interaktion des Raloxifens, eines Antiöstrogens der Benzothiophengruppe, mit dieser Aminosäure. Der beobachtete Unterschied wird als Grund für die stärkere östrogenähnliche Wirkung des Tamoxifens verglichen mit Raloxifen angesehen [2]. Außerdem liegt in diesem Wirkungsmodus auch eine Erklärung für die gesteigerte Tamoxifenresistenz von Mammakarzinomzellen bei c-erbB2-Überexpression, da die c-erbB2-Überexpression invers mit dem Hormonrezeptorstatus bei diesem Malignom korreliert [24]. Der genannte Umstand bietet neue Ansatzpunkte für die Therapie hormonabhängiger Tumoren. So ist es durchaus denkbar, dass sich die Tamoxifen - Aspartat - Interaktion gezielt beeinflussen lässt und sich somit eventuell aufgetretene Tamoxifenresistenzen bzw. Wachstumsinduktionen nach Tamoxifenbehandlung umgehen lassen. Mit solchen Proliferationstendenzen muss gerechnet werden, da die hier vorliegenden Versuche gezeigt haben, dass

Tamoxifen sowohl HEC-1A- als auch Ishikawa- Zellen zu vermehrtem Metabolismus anregten.

Des weiteren scheinen Untersuchungen bezüglich einer möglichen Reaktion des Tamoxifens mit dem HER2/neu- Rezeptor nötig, da die durchgeführten Versuche eine signifikante Inhibition des Wachstums beider endometrialen Zellpopulationen nach Inkubation mit einer Mischung aus Heregulin- β 1 und Tamoxifen zur Folge hatten. Da es sich hierbei allerdings nur um Proliferationsmessungen handelt, kann keine Aussage über den Mechanismus dieses Effektes getroffen werden. Weitere Experimente hinsichtlich der Heregulin- β 1 vermittelten Wachstumsstimulation zeigten wie oben beschrieben, dass die Tamoxifenwirkung auf den Heregulin- β 1-Effekt durch Östradiol z.T. aufgehoben werden kann. Dabei ergaben sich nur sehr geringe Unterschiede im Reaktionsausmaß zwischen den beiden verschiedenen Östradiolkonzentrationen. Um dieses Phänomen weiter abzuklären, wurden weitere Versuche mit Heregulin- β 1 in Kombination mit Herceptin, Östradiol und Antiöstrogenen bzw. dem MEK1/2-Inhibitor PD 98059 durchgeführt. Die daraus resultierenden Experimente sollten die Frage klären, ob und inwiefern die Herceptin- Wirkung auf die Heregulin- β 1 vermittelte Proliferation durch Östradiol bzw. Östradiol- Antiöstrogen- / - Inhibitor - Verbindungen manipuliert werden kann. Die Resultate zeigen eindeutige Hinweise für eine Kompensation des Herceptineffektes durch Östradiol. Beide Zell-Linien und beide eingesetzten Östradiolkonzentrationen führten zu der genannten Wirkungsaufhebung, ohne eine wesentliche Diskrepanz zwischen den zellspezifischen absoluten Proliferationswerten zu offenbaren. Daher scheint ein kompetitiver Mechanismus diesem Ergebnis nicht zugrunde zu liegen. Die zusätzliche Verbindung mit Tamoxifen oder ICI 182,780 zog eine Inhibition des Östradiol induzierten Proliferationsanstiegs der Zellpopulation HEC-1A nach sich. Dieser ist also vermutlich über den ER erzielt worden. Die Reaktion der Ishikawa- Zellen glich für den Versuchsansatz mit Tamoxifen dem Ergebnis für HEC-1A. Beim Einsatz von ICI 182,780 allerdings kam es zu einem weiteren Proliferationszuwachs, der das Niveau des Ansatzes HRG- β 1/Herceptin/ E_2 noch übertraf. Daraus resultiert die Überlegung, ob die

Ishikawa- Zellen einem anderen Mechanismus der Signaltransduktion unterworfen sind. Es stellte sich anhand von Aktivitätsmessungen der 17 β - Hydroxysteroiddehydrogenase und Typisierungen der 17 β -Hydroxysteroidoxidoreduktase heraus, dass die beiden genannten Zell-Linien Östrogene unterschiedlich metabolisieren [7,8]. Andere Untersuchungen stellten dar, dass ICI 182,780 einen EGF induzierten Effekt auf die IGF-1-Expression nicht aufheben konnte, wohingegen die Auswirkungen von Östradiol und Tamoxifen auf die IGF-1-Expression inhibiert wurden [14]. Vor dem Hintergrund einer starken Homologie des Her2/neu- Rezeptors mit dem EGF-Rezeptor [28] scheint eine Erklärung für den bei diesen Versuchen beobachteten ICI-Effekt gefunden. Schließlich ist eine gewisse Homologie zwischen Heregulin- β 1 und EGF aufgrund der ausgeprägten Rezeptorähnlichkeit sehr wahrscheinlich.

Der MEK1/2-Inhibitor PD 98059 war in der Lage, das Wachstum der HEC-1A-Zellen nach Östradiolzusatz wieder auf etwa das Niveau der mit Heregulin- β 1 und Herceptin erreichten Werte zurückzubringen. Diese Tatsache spricht für eine Verbindung der verschiedenen Signaltransduktionswege. Im Gegensatz dazu konnte PD 98059 die Proliferation der Ishikawa-Population lediglich auf ähnliche Werte wie Tamoxifen zurücksetzen, wenn Östradiol der Konzentration 1nM angewendet wurde. Beim Einsatz von Östradiol 10nM hingegen kam es zu vergleichbaren Resultaten nach Zusatz von PD 98059 wie nach Heregulin- β 1/Herceptin. Die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen scheinen also nicht unerheblich zu sein. Jedoch spricht der beschriebene Effekt wiederum gegen einen kompetitiven Reaktionsablauf, weil im zweiten Fall eine stärkere Hemmung eingetreten ist, obwohl die Konzentration des zu inhibierenden Wirkstoffs höher war. Es stellt sich daher die Frage, ob bei einem geringeren Östradiolangebot der Wachstumsreiz in stärkerem Maß über den ER vermittelt wird. Ausgehend von dieser Hypothese ist es denkbar, dass der ER einem Saturationsphänomen unterliegt und alle über die Sättigungsgrenze hinausgehenden Proliferationsstimuli über den AP-1-Signalweg verarbeitet werden. Dies könnte erklären, warum trotz höherer Östradiolkonzentration eine vermehrte Inhibition durch PD 98059 erreicht wird, da PD 98059 an einer

Komponente der fos/jun-Familie angreift. Aus allen genannten Kombinationen mit Heregulin- β 1, Herceptin, Östradiol, ICI 182,780 und PD 98059 lassen sich Überlegungen zu neuen Therapieformen ableiten. So scheint unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse besonders im HEC-1A-Zellkultur-Modell eine Kombination von Herceptin und PD 98059 sinnvoll, um die Proliferation der Tumorzellen auch dann effektiv inhibieren zu können, wenn ein Östradiolstimulus vorhanden ist. Von diesem Stimulus muss im hormonsensitiven Endometrium ausgegangen werden. Gleichzeitig zeigen die Resultate des Ishikawa - Zellkultur- Modells, dass das Angebot von Östradiol entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von Herceptin und PD 98059 haben könnte.

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Überprüfung der angenommenen Rezeptorenwechselwirkung stellten die Versuche zur möglichen Reversibilität des inhibitorischen Tamoxifeneffektes auf die Östradiol induzierte Proliferation durch verschiedene Wachstumsfaktoren dar. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigten sich für die Zell-Linie HEC-1A zusätzliche Hinweise für ein sehr ähnliches Wirkungspotential bezogen auf EGF und HRG- β 1. Beide GF hoben die Tamoxifen induzierte Wachstumshemmung dieser Zellpopulation in gleichem Maß auf. In beiden Fällen näherte sich das Wachstum wieder den Ausgangswerten nach alleiniger Östradiolstimulation. Auch TGF α zeigte sich als potenter Modulator der Tamoxifenwirkung an HEC-1A-Zellen. Da die Wachstumswerte nach Inkubation mit E₂/Tam 100nM und wahlweise EGF, HRG- β 1 oder TGF α alle etwa auf dem Niveau nach solitärer Östradiolbehandlung lagen, scheinen diese GF direkt auf die Tamoxifenwirkung Einfluss zu nehmen. Demgegenüber könnte allerdings auch das Ausmaß der Wachstumsfaktor induzierten Proliferation genauso stark sein wie die Reaktion nach E₂. Das würde bedeuten, dass die Tamoxifen induzierte Inhibition des Östradiolstimulus nicht manipuliert wird, sondern die beobachtete Wirkung der Wachstumsfaktoren unabhängig vom ER- Signalweg erfolgt. Für diese Hypothese sprechen die Resultate aus den Einzelversuchen, aus denen hervorgeht, dass E₂ 1nM, EGF, IGF-1; HRG- β 1 und TGF α jeweils eine etwa gleich stark ausgeprägte Proliferation erzeugen. Dieser Überlegung steht jedoch die Tatsache

entgegen, dass IGF-1 die Tamoxifen induzierte Wachstumsinhibition nicht aufhob, sondern tendenziell noch vermehrte.

Die Ishikawa- Zellen reagierten in anderer Weise auf das zusätzliche Angebot an GF. So waren weder HRG- β 1 noch IGF-1 nicht in der Lage, die durch das Antiöstrogen Tamoxifen ausgelöste Proliferationsminderung zu annullieren. IGF-1 intensivierte die Hemmung sogar noch, wohingegen die Zugabe von HRG- β 1 keine weitere Änderung im Wachstumsverhalten nach sich zog. Der Zusatz von EGF oder TGF α dagegen steigerte die Proliferation in starkem Ausmaß. Dies ist mit Hinsicht auf die weitgehende Rezeptorhomologie von EGF und HRG- β 1 sehr interessant, da sich aus den Ergebnissen dieser Versuche mit der HEC-1A-Zell-Linie eine ähnliche Wirkung der beiden Substanzen vermuten ließ. Es scheint also, dass sich zumindest die Metabolisierung, wenn nicht sogar der Aufbau der Rezeptoren bei unterschiedlichen Zellpopulationen unterscheiden. Andererseits könnte der erzielte

Effekt auch durch eine Sensibilisierung der Ishikawa- Zellen gegenüber EGF und TGF- α infolge der gleichzeitigen Inkubation mit Tamoxifen sein. Diese Wirkung ist für IGF-1 an Tamoxifen inkubierten Ishikawa- Zellpopulationen beschrieben [21,22], konnte aber in dieser Versuchsreihe nicht reproduziert werden.

Interessant sind auch die Auswirkungen der Kombinationen von Tamoxifen und AG 1478 bzw. PD 98059 auf die E₂ induzierte Zellproliferation. Da sowohl die ER- als auch die RTK- Signalkaskade durch jeweils einen Inhibitor blockiert wird, lassen sich bei kombinierter Inkubation größere Wachstumseinbußen erwarten als bei solitärer Einschränkung eines Transduktionsweges. Entgegen dieser Erwartung verstärkte sich die Inhibition jedoch nicht. Sie blieb in beiden Zellkultur- Modellen auf Niveau der solitären Blockade mit Tamoxifen. Die einzige Ausnahme stellt hier das Zusammenspiel von Tamoxifen und AG 1478 in HEC-1A-Zellpopulationen dar. In diesem Fall sank die Proliferation gegenüber der alleinigen Inkubation mit Tamoxifen deutlich ab. Darin findet sich also ein weiterer Anhaltspunkt auf die Unterschiede der Rezeptoren bzw. der Metabolisierung zwischen den beiden eingesetzten Zell-Linien. Da sich nunmehr

mehrere Differenzen zeigen, muss in weiteren Studien geklärt werden, ob sich allgemein gültige Schlussfolgerungen aus den erzielten Resultaten ableiten lassen. Einerseits können die Unterschiede auf dem abweichenden Rezeptorstatus beruhen, andererseits können sie auch Ausdruck grundsätzlich verschiedener Reaktionsweisen der beiden Zellpopulationen sein. Sollte dies zutreffen, bleibt die Frage zu klären, ob sich neue Therapieschemata auf gerade diesen Diskrepanzen aufbauen lassen.

V Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Signaltransduktionswege des Östrogenrezeptors und der Rezeptortyrosinkinasen in den endometrialen Adenokarzinomzelllinien HEC-1A und Ishikawa nicht als vollständig voneinander isoliert betrachten lassen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass diese Interaktion in der Lage ist, die Wirkung von antitumoralen Substanzen zu schwächen, die gegen diese Signalwege gerichtet sind.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit können bei aller Vorsicht gegenüber der Frage der Übertragbarkeit von in vitro Daten in die klinische Situation bei der Entwicklung neuer Strategien zur Therapie des Endometriumkarzinoms eine wichtige Rolle spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben ergeben, dass die Zell-Linie HEC-1A als Beispiel einer endometrialen Zellpopulation mit negativem ER- Status in nahezu gleichem Ausmaß proliferativ auf einen Östradiolstimulus reagiert wie Ishikawa- Zellen mit positiven Rezeptorstatus. Dies könnte für eine Vermittlung des Östradiolsignales über den MAPK- Weg in diesen Zellen sprechen, eine Hypothese, die durch die deutliche Verminderung der Östradiol-induzierten Proliferation durch Inhibitoren des MAPK-Signalwegs unterstützt wird. Umgekehrt konnten Antiöstrogene in vielen Fällen die wachstumsfaktorinduzierte Proliferation in ähnlicher Weise heruntersetzen wie die RTK- Inhibitoren. Weiter konnte festgestellt werden, dass Heregulin- β 1 als Ligand an Rezeptoren der HER- Familie sowohl durch Antiöstrogene als auch durch Herceptin an seiner Wirkungsentfaltung gehindert wird. Sowohl der Herceptin - als auch der Tamoxifen - Effekt auf die Heregulin- β 1 induzierte Proliferation ließ sich dabei durch die Zugabe von Östradiol aufheben. Im Gegensatz dazu trat die durch Östradiol aufgehobene Herceptin- Wirkung bei Zusatz von PD 98059 wieder in Kraft. Dabei ist PD 98059 sogar potenter als Tamoxifen oder ICI 182,780. Hinsichtlich der Angriffspunkte dieser drei Inhibitoren ist dies ein interessanter Aspekt, weil die effektivste Blockade des Östradiolstimulus nicht über Antiöstrogene sondern durch einen MEK1/2- Hemmstoff erreicht wird, was ebenfalls für die Vermitt-

lung des Östrogensignals über den MAPK- Weg in den verwendeten endometrialen Zelllinien spricht.

Bei aller Vorsicht, die bei der Frage der klinischen Relevanz von *in vitro* Daten generell gelten muss, sind diese Daten in jedem Falle in der Lage, weitere Arbeiten zur Bedeutung der ER-RTK Interaktion für die Therapie des endometrialen Adenokarzinoms zu ermutigen.

VI Literaturverzeichnis

- 1) Barsalou A, Gao W, Anghel SI, Carriere J, Mader S: Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells. *J Biol Chem* 1998 Jul 3;273(27):17138-46
- 2) Bentrem D, Dardes R, Liu H, MacGregor-Schafer J, Zapf J, Jordan V: Molecular mechanism of action at estrogen receptor alpha of a new clinically relevant antiestrogen (GW 7604) related to tamoxifen. *Endocrinology* 2001 Feb;142(2):838-46
- 3) Bermont L, Fauconnet S, Lamielle F, Adessi GL. Cell-associated insulin-like growth factor-binding proteins inhibit insulin-like growth factor-I-induced endometrial cancer cell proliferation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000 Nov; 46(7): 1173-82
- 4) Bilimoria MM, Assikis VJ, Muenzner HD, Wolf DM, Satyaswaroop PG, Jordan VC: An analysis of tamoxifen-stimulated human carcinomas for mutations in the AF-2 region of the estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996 Aug; 58(5-6):479-88
- 5) Bollig A, Miksicek RJ: An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. *Mol Endocrinol* 2000 May;14(5):634-49
- 6) Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis RL, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S: c-erbB2 overexpression decreases the benefit of adjuvant Tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996 Oct;14:2702-08
- 7) Castagnetta LA, Granata OM, Taibi G, Casto MLo ,Comito L, Oliveri G, Di Falco M, Carruba G: 17 β -Hydroxysteroid oxidoreductase activity in intact cells significantly differs from classical enzymology analysis. *J Endocrinol* 1996 Sep;150 Suppl.: S73-S78
- 8) Castagnetta LA, Montesani AM, Granata OM, Oliveri G, Sorci CM , Amodio R, Liquori M, Carruba G: 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in endometrial cancer cells: different metabolic pathways of es-

- tradiol in hormon-responsive and non-responsive intact cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995 Dec; 55(5-6):573-9
- 9) Castro-Rivera E, Safe S: Estrogen- and antiestrogen-responsiveness of HEC-1A endometrial adenocarcinoma cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998 Mar; 64(5-6):287-95
 - 10) Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatico G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G: Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an EGF receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000 May;6(5):2053-63
 - 11) English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Shuichan X, Cobb H: New Insights into the control of MAP Kinase Pathways. *Experimental Cell Research* 1999;253:255-70
 - 12) Gehm BD, McAndrews JM, Jordan VC, Jameson JL: EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2000 Jan 25;159(1-2):53-62
 - 13) Gong Y, Ballejo G, Murphy LC, Murphy LJ: Differential effects of estrogen and antiestrogen on TGF gene expression in endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1992 Apr 1;52(7):1704-9
 - 14) Hana V, Murphy LJ: Expression of IGFs and their binding proteins in the estrogen responsive Ishikawa human endometrial cancer cell line. *Endocrinology* 1994 Dec;135(6):2511-6
 - 15) Hata H, Hamano M, Watanabe J, Kuramoto H: Role of estrogen and estrogen-related GF in the mechanism of hormon dependency of endometrial carcinoma cells. *Oncology* 1998 Dec;55 Suppl 1:35-44
 - 16) Herbst RS: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-6
 - 17) Ignar-Towbridge DM, Pimentel M, Teng CT, Korach KS, McLachlan JA: Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems. *Environ Health Perspect* 1995, Oct;103 Suppl 7:35-8
 - 18) Jones PS, Parrott E, White INH: Activation of Transcription by Era and b is Cell Type- and Promoter-dependent. *J Biol Chem* 1999,Nov 5; 274(45):32008-14

- 19) Karas M, Danilenko M, Fishman D, LeRoith D, Levy J, Sharoni Y: Membrane-associated IGFBP3 inhibits IGF-1 induced IGF-1 receptor signaling in Ishikawa endometrial cancer cells. *Biol Chem* 1997 Jun;272 (26): 16514-20
- 20) Kato S, Kitamoto T, Masuhiro Y, Yanagisawa J: Molecular mechanism of a Cross-Talk between Estrogen and Growth-Factor signaling Pathways. *Oncology* 1998;5 Suppl 1:5-10
- 21) Kleinman D, Karas M, Danilenko M, Arbell A, Roberts CT, LeRoith D, Levy J, Sharoni Y: Stimulation of endometrial cancer cell growth by tamoxifen is associated with increased IGF-1-induced tyrosin phosphorylation and reduction in IGFBP. *Endocrinology* 1996 Mar;137(3): 1089-95
- 22) Kleinman D, Karas M, Roberts CT Jr., LeRoith D, Phillip M, Segev Y, Levy J, Sharoni Y: Modulation of IGF-1 receptors and membrane-associated IGFBP in endometrial cancer cells by estradiol. *Endocrinology* 1995 Jun;136(6):2531-7
- 23) Klinge CM, Jernigan SC, Risinger KE: The agonist activity of tamoxifen is inhibited by the short heterodimer partner orphan nuclear receptor in human endometrial cancer cells. *Endocrinology* 2002 Mar;143(3):853-67
- 24) Konecny G, Untch M, Lebeau A: c-erbB-2-Überexpression und humanisierte Antikörper in der Therapie des Mammakarzinoms.
- 25) Lamson G, Oh Y, Pham H, Giudice LC, Rosenfeld RG: Expression of two IGFBPs in a human endometrial cancer cell line: structural, immunological and genetic characterization. *J Clin Endocrinol Metab* 1989 Oct; 69(4):852-9
- 26) Lee H, Jiang F, Wang Q, Nicosia SV, Yang J, Su B, Bai W: MEKK1 activation of human estrogen receptor alpha and stimulation of the agonistic activity of 4-hydroxytamoxifen in endometrial and ovarian cancer cells. *Mol Endocrinol* 2000 Nov; 14(11): 1882-96
- 27) Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL: p38 Mitogen-activated Protein Kinase Inhibitors-Mechanisms and Therapeutic Potentials. *Pharmacol Ther* 1999;82(2-3): 389-97

- 28) Markogiannakis E, Georgoulas V, Margioris AN, Zoumakis E, Stournaras C, Gravanis A: Estrogens and glucocorticoids induce the expression of c-erbB2/NEU receptor in Ishikawa human endometrial cells. *Life Sci* 1997;61(11):1083-95
- 29) Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S: Correlation of several carcinoma c-erbB2 oncogene with cell proliferation parameters in patient treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1997 Feb;79(3):513-20
- 30) Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ: HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;10:2435-46
- 31) Reynolds RK, Hu C, Baker VV: Transforming growth factor-alpha and insulin-like growth factor-I, but not epidermal growth factor, elicit autocrine stimulation of mitogenesis in endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 1998, Aug; 70(2): 202-9
- 32) Richards RG, DiAugustine RP, Petrusz P, Clark GC, Sebastian J: Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the IGF-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1996 Oct; 93:12002-7
- 33) Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, Copeland LJ, Niemann TH: HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1999 Apr; 18(2):138-43
- 34) Smith CL: Cross-talk between peptide GF and estrogen receptor signaling path-way. *Biol Reprod* 1998 Mar;58(3):627-32
- 35) Stoner M, Wang F, Wormke M, Nguyen T, Samudio I, Vyhldal C, Marme D, Finkenzeller G, Safe S: Inhibition of VEGF expression in HEC-1A endometrial cancer cells through interactions of estrogen receptor alpha and Sp3 proteins. *J Biol Chem* 2000 Jul 28;275(30):22769-79
- 36) Treeck O, Böster M, Siggel C, Getschmann N, Eggert K, Diedrich K, Ortman O: Activation of MAPK by E₂ impairs Trastuzumab action.

- 37) Treeck O, Frey N, Böster M, Porz S, Eggert K, Diedrich K, Ortmann O: Antiproliferative action of herceptin is decreased by estradiol influence in endometrial, ovarian and breast cancer cell lines independent of estrogen receptor status
- 38) Ueda M, Ueki M, Terai Y, Ueki K, Kumagai K, Fujii H, Yoshizawa K, Nakajima M: Biological implications of growth factors on the mechanisms of invasion in gynecological tumor cells. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48(3):221-8
- 39) Uht RM, Anderson CM, Webb P, Kushner PJ: Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element. *Endocrinol* 1997 Jul;138(7):2900-8
- 40) Wang D, Konishi I, Koshiyama M, Mandai M, Nanbu Y, Ishikawa Y, Mori T, Fujii S: Expression of c-erbB2 protein and EGF-receptor in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathologic and sex steroid receptor status. *Cancer* 1993 Nov 1;72(9):2628-37
- 41) Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ: Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 1995 Apr;9(4):443-56
- 42) Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McNemey E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JA, Nilsson S, Kushner PJ: The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 1999 Oct;13(10):1672-85
- 43) Yao K, Jordan VC: Questions about Tamoxifen and the Future Use of Antiestrogens. *The Oncologist* 1998 Apr;3(2): 104-10

VII Anhang

VII.1 Tabellen

VII.1.1 Material: Hersteller und Vertrieb

Substanz	Produkt- bzw. Katalognummer	Hersteller	Ort
BrdU-Proliferations-ELISA-Kit	Katalognummer 1647229	Roche	Mannheim, Deutschland
DMEM (ohne Phenolrot, mit L-Glutamin und 1000mg/L Glucose)	Produktnr. D2902	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
FCS	Katalognummer 10270	GibcoBRL	Karlsruhe, Deutschland
Herceptin		Genentech	San Francisco, USA
Heregulin- β 1	Katalognummer PF048	Oncogene Research Products	Boston, USA
Humanes rekombinantes EGF	Produktnummer E9644	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
Humanes rekombinantes TGF- α	Produktnummer T7924	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
IGF-1	Produktnummer I3769	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
PD 98059	Produktnummer 385-023-M005	Alexis Biochemicals	San Diego, USA
Reines Antiöstrogen ICI 182,780	Katalognummer 1047	Tocris	Bristol, UK
SR2	Produktnummer PF015	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
Tamoxifen	Produktnummer T9262	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
Tyrphostin AG 1024	Produktnummer 270-217-M001	Alexis Biochemicals	San Diego, USA

Tyrphostin AG 1478	Produktnummer 270-036-M005	Alexis Biochemi- cals	San Diego, USA
Wasserlösliches 17 β -Östradiol ZD 1839	Produktnummer E4389	Sigma	Schnelldorf, Deutschland
		AstraZeneca Pharmaceuticals	Macclesfield, UK

VII.1.2 Anzahl der Experimente pro Versuchsansatz

<u>Versuchsansatz</u>	<u>HEC-1A</u>	<u>Ishiakwa</u>
E2 1nM	25	40
E2 10nM	11	12
Tam 100nM	26	42
Tam 1 μ M	26	30
Tam 10 μ M	9	9
ICI 100nM	25	23
ICI 1 μ M	26	31
EGF	24	42
IGF-1	27	40
TGF α	24	22
HRG- β 1	27	42
AG 1478	24	27
PD98059	24	33
ZD1839	9	9
Herceptin	23	23
AG 1024	8	7
E2 1nM+Tam 100nM	20	25
E2 1nM+Tam 1 μ M	8	7
E2 1nM+Tam 10 μ M	9	7
E2 1nM+ICI 100nM	11	11
E2 1nM+ICI 1 μ M	11	13
E2 1nM+AG 1478	19	23
E2 1nM+PD 98059	20	21
E2 1nM+AG1478+ PD98059	14	14
E2 1nM+Tam100nM+ AG 1478	9	9
E2 1nM+Tam100nM+ PD 98059	9	8
E2 1nM+Tam100nM+ EGF	9	7
E2 1nM+Tam100nM+ IGF-1	9	7
E2 1nM+Tam100nM+ TGF α	8	8
E2 1nM+Tam100nM+ HRG- β 1	9	7
E2 1nM+Tam 10 μ M+ EGF	10	10
E2 1nM+Tam 10 μ M+ IGF-1	10	7
E2 1nM+Tam 10 μ M+ TGF α	10	8
E2 1nM+Tam 10 μ M+ HRG- β 1	9	8

EGF+AG 1478	28	27
EGF+PD 98059	19	20
EGF+AG1478+PD98059	10	8
EGF+ZD 1839	8	8
EGF+ZD1839+E2 1nM	8	7
EGF+AG1478+E2 1nM	9	7
EGF+Tam 100nM	22	21
EGF+Tam 1 μ M	12	12
EGF+ICI 100nM	8	9
EGF+ICI 1 μ M	8	10
EGF+Tam100nM+AG1478	7	8
EGF+Tam100nM+PD98059	8	8
IGF-1+Tam 100nM	31	36
IGF-1+Tam 1 μ M	17	16
IGF-1+ICI 100nM	17	17
IGF-1+ICI 1 μ M	16	16
IGF-1+AG 1478	15	17
IGF-1+PD 98059	14	15
IGF-1+AG 1024	7	7
IGF-1+AG 1024+E2 1nM	7	7
IGF-1+Tam100nM+AG 1478	15	17
IGF-1+Tam100nM+PD 98059	16	15
TGF α +Tam 100nM	18	13
TGF α +Tam 1 μ M	13	12
TGF α +ICI 100nM	16	17
TGF α +ICI 1 μ M	15	12
HRG- β 1+Tam 100nM	14	13
HRG- β 1+Tam 1 μ M	13	12
HRG- β 1+ICI 100nM	13	12
HRG- β 1+ICI 1 μ M	16	12
HRG- β 1+Herceptin	16	18
HRG- β 1+Herceptin+E2 1nM	20	21
HRG- β 1+Herceptin+Tam100nM+E2 1nM	10	13
HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E2 1nM	11	14
HRG- β 1+Herceptin+PD98059+E2 1nM	10	12
HRG- β 1+Herceptin+E2 10nM	9	12
HRG- β 1+Herceptin+Tam100nM+E2 10nM	10	12
HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E2 10nM	11	16
HRG- β 1+Herceptin+PD98059+E2 10nM	10	12

VII.1.3 Statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0.05

HEC-1A	Ishikawa
Tam 10 μ M vs. Kontrolle	ZD 1839 vs. Kontrolle
EGF vs. Kontrolle	E ₂ 1nM+AG 1478 vs. E ₂ 1nM
HRG- β 1 vs. Kontrolle	E ₂ 1nM+PD 98059 vs. E ₂ 1nM

E ₂ 1nM+AG 1478 vs. E ₂ 1nM	E ₂ 1nM+AG1478+PD98059 vs. E ₂ 1nM
E ₂ 1nM+PD 98059 vs. E ₂ 1nM	E ₂ 1nM+Tam 10μM vs. E ₂ 1nM
E ₂ 1nM+AG1478+PD98059 vs. E ₂ 1nM	E ₂ 1nM+ICI 100nM vs. E ₂ 1nM
E ₂ 1nM+Tam 10μM vs. E ₂ 1nM	E ₂ 1nM+ICI 1μM vs. E ₂ 1nM
E ₂ 1nM+Tam 100nM vs. E ₂ 1nM	EGF+AG 1478 vs. EGF
E ₂ 1nM+ICI 1μM vs. E ₂ 1nM	EGF+PD 98059 vs. EGF
EGF+AG 1478+PD 98059 vs. EGF	EGF+AG 1478+PD 98059 vs. EGF
IGF-1+Tam 100nM vs. IGF-1	EGF+ Tam 100nM vs. EGF
IGF-1+Tam 1μM vs. IGF-1	EGF+ Tam 1μM vs. EGF
IGF-1+ICI 100nM vs. IGF-1	EGF+ ICI 1μM vs. EGF
IGF-1+ICI 1μM vs. IGF-1	IGF-1+Tam 100nM vs. IGF-1
IGF-1+PD 98059 vs. IGF-1	IGF-1+Tam 1μM vs. IGF-1
IGF-1+AG 1478 vs. IGF-1	IGF-1+ICI 100nM vs. IGF-1
TGF-α + Tam 100nM vs. TGF-α	IGF-1+ICI 1μM vs. IGF-1
TGF-α + Tam 1μM vs. TGF-α	IGF-1+PD 98059 vs. IGF-1
TGF-α +ICI 100nM vs. TGF-α	IGF-1+AG 1478 vs. IGF-1
TGF-α +ICI 1μM vs. TGF-α	IGF-1+AG 1024 vs. IGF-1
HRG-β1+Herceptin vs. HRG-β1	TGF-α + Tam 100nM vs. TGF-α
HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 1nM vs. HRG-β1 +Herceptin	TGF-α + Tam 1μM vs. TGF-α
HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 10nM vs. HRG-β1 +Herceptin	HRG-β1+Herceptin vs. HRG-β1
HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 10nM +Tam 100nM vs. HRG-β1 +Herceptin	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 1nM vs. HRG-β1 +Herceptin
E ₂ 1nM+Tam 100nM+ AG1478 vs. E ₂ 1nM+Tam 100nM	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 1nM +ICI 1μM vs. HRG-β1 +Herceptin
E ₂ 1nM+Tam 100nM+TGF-α vs. E ₂ 1nM +Tam 100nM	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 1nM +PD 98059 vs. HRG-β1 +Herceptin
E ₂ 1nM+Tam 100nM+HRG-β1 vs. E ₂ 1nM+Tam 100nM	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 10nM vs. HRG-β1 +Herceptin
E ₂ 1nM+Tam 100nM+ EGF vs. E ₂ 1nM +Tam 100nM	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 10nM +Tam 100nM vs. HRG-β1 +Herceptin
HRG-β1+Tam 100nM vs. HRG-β1	HRG-β1+Herceptin+ E ₂ 10nM +ICI 1μM vs. HRG-β1 +Herceptin
HRG-β1+Tam 1μM vs. HRG-β1	HRG-β1+Tam 100nM vs. HRG-β1
HRG-β1+ICI 100nM vs. HRG-β1	HRG-β1+Tam 1μM vs. HRG-β1
HRG-β1+ICI 1μM vs. HRG-β1	HRG-β1+ICI 100nM vs. HRG-β1
	HRG-β1+ICI 1μM vs. HRG-β1

	E ₂ 1nM+Tam 100nM+TGF- α vs. E ₂ 1nM +Tam 100nM
	E ₂ 1nM+Tam 100nM+ IGF-1 vs. E ₂ 1nM +Tam 100nM
	E ₂ 1nM+Tam 100nM+ EGF vs. E ₂ 1nM +Tam 100nM

(Erklärung: z.B. EGF vs. Kontrolle bedeutet: EGF bewirkt ein statistisch signifikant unterschiedliches Ergebnis gegenüber dem Resultat der Kontrolle mit $p < 0,05$)

VII.1.4 Statistisch signifikante Ergebnisse mit $p < 0.01$

HEC-1A	Ishikawa
IGF-1+Tam 1 μ M vs. IGF-1	EGF+Tam 100nM vs. EGF
IGF-1+ICI 100nM vs. IGF-1	EGF+Tam 1 μ M vs. EGF
IGF-1+ICI 1 μ M vs. IGF-1	IGF-1+Tam 1 μ M vs. IGF-1
E ₂ 1nM+tam 100nM+TGF α vs. E ₂ 1nM+Tam 100nM	IGF-1+AG1024+E ₂ 1nM vs. IGF-1+AG1024
HRG- β 1+Herceptin+Tam 100NM+E ₂ 10nM vs. HRG- β 1+Herceptin	TGF α +Tam 1 μ M vs. TGF α
	E ₂ 1nM+Tam 100nM+IGF-1 vs. E ₂ 1nM+Tam 100nM
	E ₂ 1nM+Tam 100nM+TGF α vs. E ₂ 1nM
	HRG- β 1+Herceptin+Tam 100nM+E ₂ 10nM vs. HRG- β 1
	HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E ₂ 10nM vs. HRG- β 1
	HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E ₂ 10nM vs. HRG- β 1+Herceptin

(Erklärung: z.B. IGF-1+Tam 1 μ M vs. IGF-1 bedeutet: Der Versuchsansatz IGF-1+Tam 1 μ M bewirkt ein statistisch signifikant unterschiedliches Ergebnis gegenüber dem Resultat der alleinigen Zugabe von IGF-1 mit $p < 0,01$)

VII.1.5 Statistisch signifikante Ergebnisse mit p<0.001

HEC-1A	Ishikawa
E2 1nM+AG 1478 vs. E2 1nM	E2 1nM+AG 1478 vs. E2 1nM
E2 1nM+PD 98059 vs. E2 1nM	E2 1nM+PD 98059 vs. E2 1nM
E2 1nM+AG1478+PD98059 vs. E2 1nM	E2 1nM+AG1478+PD98059 vs. E2 1nM
E2 1nM+Tam 10 μ M vs. E2 1nM	E2 1nM+Tam 10 μ M vs. E2 1nM
EGF+AG1478+PD98059 vs. EGF	EGF+AG1478 vs. EGF
IGF-1+Tam 100nM vs. IGF-1	EGF+PD98059 vs. EGF
IGF-1+AG1478 vs. IGF-1	EGF+AG1478+PD98059 vs. EGF
IGF-1+PD98059 vs. IGF-1	EGF+ICI 1 μ M vs. EGF
TGF α +Tam 100nM vs. TGF α	IGF-1+Tam 100nM vs. IGF-1
TGF α +Tam 1 μ M vs. TGF α	IGF-1+ICI 100nM vs. IGF-1
HRG- β 1+Herceptin vs. HRG- β 1	IGF-1+ICI 1 μ M vs. IGF-1
HRG- β 1+Herceptin+E2 1nM vs. HRG- β 1+Herceptin	IGF-1+AG1478 vs. IGF-1
HRG- β 1+Herceptin+Tam 100nM+E2 1nM vs. HRG- β 1	IGF-1+PD98059 vs. IGF-1
HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E2 1nM vs. HRG- β 1	IGF-1+AG1024 vs. IGF-1
HRG- β 1+Herceptin+PD98059+E2 1nM vs. HRG- β 1	HRG- β 1+Herceptin vs. HRG- β 1
E2 1nM+Tam 100nM+AG1478 vs. E2 1nM	HRG- β 1+Herceptin+Tam 100nM+E2 1nM vs. HRG- β 1
IGF-1+Tam 100nM+AG1478 vs. IGF-1	HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E2 1nM vs. HRG- β 1+Herceptin
IGF-1+Tam 100nM+PD98059 vs. IGF-1	HRG- β 1+Herceptin+PD98059+E2 1nM vs. HRG- β 1
HRG- β 1+Tam 100nM vs. HRG- β 1	IGF-1+Tam 100nM+AG1478 vs. IGF-1
HRG- β 1+Tam 1 μ M vs. HRG- β 1	IGF-1+Tam 100nM+PD98059 vs. IGF-1
HRG- β 1+ICI 100nM vs. HRG- β 1	HRG- β 1+Tam 100nM vs. HRG- β 1
HRG- β 1+ICI 1 μ M vs. HRG- β 1	HRG- β 1+Tam 1 μ M vs. HRG- β 1
E2 1nM+Tam 100nM+IGF-1 vs. E2 1nM	HRG- β 1+ICI 100nM vs. HRG- β 1
HRG- β 1+Herceptin+E2 10nM vs. HRG- β 1+Herceptin	HRG- β 1+ICI 1 μ M vs. HRG- β 1
HRG- β 1+Herceptin+ICI 1 μ M+E2 10nM vs. HRG- β 1	E2 1nM+Tam100nM+EGF vs. E2 1nM

HRG-β1+Herceptin+PD98059+E2 10nM vs. HRG-β1	E2 1nM+Tam100nM+EGF vs. E2 1nM+Tam100nM
HRG-β1+Herceptin+PD98059+E2 10nM vs. HRG-β1+Herceptin	E2 1nM+Tam100nM+IGF-1 vs. E2 1nM
E2 1nM+Tam10μM+EGF vs. E2 1nM	E2 1nM+Tam100nM+TGFα vs. E2 1nM+Tam100nM
E2 1nM+Tam10μM+IGF-1 vs. E2 1nM	HRG-β1+Herceptin+E2 10nM vs. HRG-β1
E2 1nM+Tam10μM+TGFα vs. E2 1nM	HRG-β1+Herceptin+PD98059+E2 10nM vs. HRG-β1
E2 1nM+Tam10μM+HRG-β1 vs. E2 1nM	E2 1nM+Tam10μM+EGF vs. E2 1nM 1nM
	E2 1nM+Tam10μM+IGF-1 vs. E2 1nM
	E2 1nM+Tam10μM+TGFα vs. E2 1nM
	E2 1nM+Tam10μM+HRG-β1 vs. E2 1nM

(Erklärung: z.B. E2 1nM+AG1478 vs E2 1nM bedeutet: Der Versuchsansatz E2 1nM+AG1478 bewirkt ein statistisch signifikant unterschiedliches Ergebnis gegenüber dem Resultat der alleinigen Zugabe von E2 1nM mit $p < 0,001$)

VII.2 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

Modell einer 96-Well-Zellkulturplatte: 1; 13 = Negativkontrolle, 2 = Positivkontrolle, 12; 24 = nicht inkubiert, 3-11; 14-23 = Einheiten zur Inkubation

Beispiel einer Plattenbelegung:

- 1:** SR2 ohne Zellen
- 2:** SR2 mit Zellen
- 3:** E₂ 1nM
- 4:** EGF
- 5:** IGF-1
- 6:** Tamoxifen 100nM
- 7:** AG 1478
- 8:** PD 98059
- 9:** E₂ +Tamoxifen
- 10:** E₂ +AG 1478
- 11:** E₂ +PD 98059
- 12:** SR2
- 13:** SR2 ohne Zellen
- 14:** E₂ +AG 1478 +PD 98059
- 15:** EGF +Tamoxifen
- 16:** EGF+PD 98059
- 17:** EGF+ AG 1478
- 18:** EGF +AG 1478+PD 98059
- 19:** IGF-1 +Tamoxifen
- 20:** IGF-1 +AG 1478
- 21:** IGF-1 +PD 98059
- 22:** IGF-1 +Tamoxifen und AG 1478
- 23:** IGF-1 +Tamoxifen +PD 98059
- 24:** SR2

VIII Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Diedrich für die Bereitstellung der notwendigen Räumlichkeiten und Materialien meinen Dank aussprechen. Meinem Doktorvater Prof. Ortman gilt mein Dank für die Vergabe des sehr interessanten Themas dieser Dissertation. Des weiteren bedanke ich mich bei Dr. Oliver Treeck, der mir während des gesamten Zeitraumes dieser Dissertation mit vielfältigen Ratschlägen zur Seite stand und mich bei Rückschlägen neu motivierte. Ein besonderes Dankeschön gebührt Tanja, die mich in meiner Arbeit tatkräftig unterstützt hat und immer versuchte, mir bei der Lösung aufgetretener Probleme beizustehen. Ohne sie wären viele Versuche nicht durchführbar gewesen. Dies gilt natürlich genauso für Nicole und Constanze. Stefan danke ich für die Hilfe im Umgang mit meinem Problemkind "Prism".

Außerdem möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken, dass sie an mich geglaubt und mir als ruhender Pol stets neue Kraft gegeben haben.

IX Lebenslauf

Name	Michaela Ursula Böster
Anschrift	Maschweg 2 49152 Bad Essen
Geburtsdatum	22.08.1978
Geburtsort	Ostercappeln
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Grundschule, 1984-1988	Grund- und Hauptschule Bad Essen,
Orientierungsstufe, 1988-1990	Orientierungsstufe Bad Essen
Gymnasium, 1990-1997	Gymnasium Bad Essen, Abschluss: Abitur
Studium	Studium der Medizin seit Oktober 1997, Universität zu Lübeck, Ärztliche Vorprüfung bestanden im August 1999, Erster Abschnitt der Ärztlichen Prü- fung bestanden im Herbst 2000, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden im Herbst 2002, Praktisches Jahr von Oktober 2002 bis September 2003, Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prü- fung bestanden im Oktober 2003
Zeitraum der experimentellen Unter- suchungen der Dissertation	Juni 2000 bis Juli 2001