

Aus dem Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf E. Leube)

**Studien zur Expression und Regulation des CXC-Motiv-
Chemokinrezeptors CXCR4 und seiner Liganden CXCL12 und MIF in drei
Mammacarcinom-Zelllinien**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Hanna Maria Irene Wilhelm Rampelbergh

aus Eupen, Belgien

Berichter/-in: Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. Claudia Astrid Krusche

Herr Universitätsprofessor Dr. med. Joseph Neulen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Mamma und Mammacarcinome	1
1.1.1	Die Mamma	1
1.1.2	Das Mammacarcinom	2
1.1.3	Hormonelle Regulation der Mamma.....	3
1.1.4	Hormonelle Regulation des Mammacarcinoms	5
1.2	CXCR4 und seine Liganden (CXCL12 und MIF)	7
1.2.1	CXCR4	7
1.2.2	CXCL12.....	8
1.2.3	MIF	10
1.3	Histon-Deacetylasen und der Inhibitor Trichostatin A	11
2	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Verwendete Materialien.....	16
3.1.1	Verwendete Chemikalien	16
3.1.2	Kulturmedien und Medienzusätze	16
3.1.3	Enzyme, Kits.....	17
3.1.4	Verwendete Puffer und Gele: Zusammensetzung	17
3.2	Zellkultur	18
3.2.1	Kulturmedien.....	18
3.2.2	Zelllinien	19
3.2.3	Zellkulturexperimente.....	19
3.3	RNA-Isolierung für die real time RT-PCR (LightCycler®).....	21
3.4	cDNA-Synthese.....	22
3.5	Real time RT-PCR.....	22
3.5.1	Ansatz und Ablauf der Real time PCR mit SYBR Green I	23
3.5.2	Ansatz und Ablauf der real time PCR mit TaqMan	23
3.5.3	Quantifizierung.....	24
3.5.4	Sequenzierung.....	24
3.6	Western-Blot	25
3.6.1	SDS-Elektrophorese nach Lämmli	25
3.6.2	Western Blot Reaktion	25
3.6.3	β -Aktin–Western Blot	27
3.7	Immunhistochemie	27
3.7.1	Methode I.....	27
3.7.2	Methode II.....	29
3.7.3	Methode III.....	29

3.8 Tissue Microarray (TMA)	30
3.9 Statistische Auswertung	31
4 Ergebnisse.....	32
4.1 Einleitung	32
4.2 Methodenetablierung.....	32
4.3 Effekte der Steroidhormone auf die Expression des CXCR4 Rezeptors	34
4.3.1 Der CXCR4: Regulation der Genexpression durch Steroidhormone	34
4.4 TSA-Effekte auf Mammacarcinom – Zelllinien	41
4.4.1 Zellvitalitäts-Messungen (MTT-Assay) nach Behandlung mit Trichostatin A	42
4.4.2 Der Effekt der TSA-Inkubationszeit auf die CXCR4-Expression	47
4.5 Die Beeinflussung der CXCR4 Genexpression durch die kombinierte Gabe von TSA und Steroidhormonen auf die von Mammacarcinom – Zelllinien	50
4.5.1 MCF7 Zellen	50
4.5.2 T47D Zellen	53
4.6 Die Beeinflussung der Expression der CXCR4 Liganden – CXCL12 und MIF - durch die kombinierte Gabe von TSA und Steroidhormonen	55
4.6.1 CXCL12 Expression in MCF7 Zellen.....	55
4.6.2 MIF mRNA Expression in MCF7 Zellen.....	57
4.6.3 CXCL12 Expression in MDA-MB 231 Zellen	57
4.6.4 MIF Expression in MDA-MB 231 Zellen.....	58
4.6.5 CXCL12 Expression in T47D Zellen.....	59
4.6.6 MIF mRNA Expression in T47D Zellen.....	60
4.6.7 Auswertung der CXCL12-Protein-Expression von Mammatumoren in Bezug zum Tumor-Grading, der Progesteron- und Östrogen-Rezeptor-Immunreaktivität sowie dem Proliferations-Index (Ki 67-Immunfärbung)	61
5 Diskussion	66
5.1 Kritische Diskussion der Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen	66
5.2 Die Effekte von Estradiol und Gestagenen auf die CXCR4 mRNA Expression in drei Brustkrebszelllinien	67
5.3 Der Effekt der TSA-Konzentration auf Proliferation und Zelltod.....	70
5.4 Der Effekt der TSA-Inkubationszeit auf die CXCR4-Expression	72
5.5 Die Interaktion von TSA und Steroidhormonen auf die Genexpression von CXCR4 und seinen Liganden.....	72
5.6 Mammacarcinome und CXCL12-Expression – klinische Erwägungen	76
6 Zusammenfassung	80
7 Literaturverzeichnis.....	81
Auflistung der eigenen Publikationen	96
Danksagung.....	97
Erklärung zur Datenaufbewahrung.....	99
Eidesstattliche Erklärung.....	100
Lebenslauf	101

1 Einleitung

Das Mammacarcinom gehört zu den häufigsten bösartigen Neuerkrankungen der Frau in Deutschland und weltweit. Laut Robert Koch Institut (RKI) erkrankt nach neuesten Daten durchschnittlich eine von acht Frauen in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Im Jahre 2008 erkrankten 71.660 Frauen sowie 520 Männer in Deutschland an Brustkrebs. Es starben 2008 17.208 Frauen (24,6 %) und 136 Männer (0,2 %) an Brustkrebs. Die Prognose für 2014 beläuft sich laut RKI bei den Frauen auf 75.200 und bei den Männern auf 600 Neuerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt etwas über dem 60sten Lebensjahr. Jedoch bei 40% der Frauen wird die Diagnose Brustkrebs bereits vor dem 60. Lebensjahr gestellt und bereits jede 10. Frau mit der Diagnosestellung Brustkrebs ist jünger als 45 Jahre. Insbesondere ein Anstieg der Neuerkrankungsrate zwischen dem 30. und dem 50. Lebensjahr ist auffällig (Giersiepen et al., 2005, Robert Koch Institut, 2013).

1.1 Mamma und Mammacarcinome

1.1.1 Die Mamma

Die Brustdrüsen (Glandulae mammae) sind entwicklungsgeschichtlich Hautdrüsen, die bilateral angelegt werden und sich von der 2./3. bis zur 6./7. Rippe erstrecken. Die Mammogenese erfolgt unter dem Einfluss der ovariellen Steroidhormone. Bei der Frau entwickelt sich die Mamma während der Pubertät. Die pränatal angelegten Drüsengänge entwickeln sich zum Drüsenkörper bei gleichzeitiger Vermehrung des umliegenden Binde- und Fettgewebes.

Der Drüsenkörper setzt sich aus 15-20 durch Bindegewebe getrennte Lappen (Lobus), die von je einem Milchgang (Ductus lactiferus) drainiert werden, zusammen. Das Bindegewebe wird von Nerven und Gefäßen durchzogen und ist ebenso wie das Drüsenepithel von hormonellen Schwankungen beeinflusst. Prämenstruell entsteht als Folge der nachlassenden Gestagenwirkung häufig ein Spannungsgefühl in den Brüsten.

Der Drüsenkörper ist über die Ligamenta suspensoria mammae (syn. Coopersche Ligamente) verschieblich mit der Faszia des Musculus pectoralis

major und der Clavicula verbunden. Der Fettkörper umhüllt die Drüsenlappen, fehlt jedoch unter dem Warzenhof. Im Laufe des Lebens nimmt der Fettkörper zu (Haag et al., 2006).

Der Lymphabfluss erfolgt in die Axilla (Level I-III), entlang der Arteria mammaria interna zu den parasternalen und mediastinalen Lymphknoten und weiter zum Ductus thoracicus. Außerdem erfolgt ein Abfluss zur kontralateralen Brust (Haag et al., 2006).

Beim Mammacarcinom ist das axilläre Gebiet von besonderer Bedeutung, da es häufig mitbetroffen und bei der Operation leicht zugänglich ist. Die erste und auch am häufigsten von Metastasen betroffene Stelle ist der Sentinel-Lymphknoten (Wächter-Lymphknoten). Das Auffinden dieses Lymphknotens und ggfs. der Lymphknoten des Level I, während der Operation, spielen eine wichtige Rolle aus prognostischer Sicht und zur weiteren Therapieplanung (Haag et al., 2006).

1.1.2 Das Mammacarcinom

Die bösartige Neubildung der Mamma unterliegt verschiedenen prädisponierenden Faktoren. Nullipara, späte Erstparität (> 30. Lebensjahr), nicht stillende Frauen, frühes Menarchenalter (vor dem 12. Lebensjahr) und spätes Menopausenalter gehören dazu.

Eine genetische Disposition wird in der Literatur bei 5-10 % der Patientinnen gesehen (Chang-Claude, 1997). Es wurden zwei Gene entdeckt, das BRCA1 und das BRCA2 Gen. Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken, beträgt für die Trägerinnen dieser Gene 80-85 % (Tyczynski, 2002).

Histologisch teilt man das Mammacarcinom in eine duktale, eine lobuläre oder Mischformen ein. 75 % der Fälle gehen von den Milchgängen aus und sind somit duktal. 15 % haben ihren Ursprung in den Lobuli oder Azini und sind somit lobulär. Außerdem wird das Mammacarcinom in invasiv und nicht invasiv wachsend eingeteilt (Haag et al., 2006).

Eine Metastasierung erfolgt beim Mammacarcinom häufig und relativ früh. Sie verläuft lymphogen und/oder hämatogen. Schätzungen zur Folge sind bei der Primärbehandlung bereits 50 % der Patientinnen von Metastasen betroffen (Haag et al., 2006).

Lymphogen erfolgt die Metastasierung hauptsächlich in die ipsilaterale Axilla und die parasternalen Lymphknoten. Seltener finden sich Metastasen in den supraclaviculären und retrosternalen Lymphknoten sowie in der kontralateralen Mamma. Ziele der hämatogenen Metastasierung sind vorwiegend Rippen, Becken, Wirbelkörper und der Femur, wo sich osteolytische Knochenmetastasen bilden. Weitere mögliche Lokalisationen stellen Pleura, Lunge, Haut, Leber, ZNS, Ovarien, Uterus und Nebennieren dar (Haag et al., 2006).

1.1.3 Hormonelle Regulation der Mamma

Die Brustdrüse ist bei der Geburt in Form eines primitiven Gangsystems in der direkten Umgebung der Areola angelegt. In der Phase zwischen Geburt und Pubertät wächst die Brustdrüse isometrisch in Relation zum restlichen Körper. Während der Pubertät unterliegt sie dem Einfluss von ovariellen und hypophysären Hormonen. Dies ist die erste Phase des allometrischen Wachstums des Drüsengewebes. Die zweite Phase tritt während der Frühphase einer Schwangerschaft auf. Zwischen diesen beiden Phasen unterliegt das Brustdrüsenepithel und das umgebende Binde- und Fettgewebe den zyklischen Schwankungen der ovariellen Hormone während des Menstruationszyklus (Anderson & Clarke, 2004).

Die ovariellen Hormone Östrogen (E) und Progesteron (P) sind essentiell für das Brustdrüsengewebe und seine Entwicklung. Vom Beginn der Pubertät bis zur Menopause werden beide Hormone unter dem Einfluss der hypophysären Gonadotropine in den Ovarien zyklisch synthetisiert und sezerniert (Anderson & Clarke, 2004).

Die Epithelzellen der Brustdrüsen exprimieren Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Es existieren jeweils zwei Rezeptorisoformen, ER α und ER β sowie PRA und PRB. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Liganden-aktivierte nukleäre Transkriptionsfaktoren, welche die Proliferations- und Apoptose-Rate sowie den Differenzierungszustand des Drüsenepithels steuern (Ikeda & Inoue, 2004; Kariagina et al., 2008).

Während des Klimakteriums können durch die ovarielle endokrine Insuffizienz typische Wechseljahrsbeschwerden entstehen. Insbesondere die Schwankungen des Östrogenspiegels können zu somatischen, vegetativen und

psychischen Störungen führen. Um dem postmenopausalen Symptomkomplex entgegenzuwirken, wird häufig eine Hormonsubstitutionstherapie mit Sexualsteroiden als Behandlung eingesetzt (Bauerfeind, 2009). Die peri- und postmenopausale Hormonsubstitution (HRT) wird in der Regel als Monotherapie mit einem Östrogen durchgeführt (ET), bei vorhandenem Uterus jedoch in Kombination mit einem Progestagen (EPT). Die Kombinationstherapie mit Östrogen und Progesteron scheint das Mammacarcinomrisiko zu erhöhen. Dies wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Bauerfeind, 2009; Narod, 2011). Daten der Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (Beral, 1997; Kaaks et al., 2005) zeigen eine leichte Zunahme der Inzidenz mit einem relativen Risiko von 1,35 bei einer Hormonersatztherapie von mehr als 5, durchschnittlich 11 Jahren (überwiegend ET). Metaanalysen zeigen eine Risikoerhöhung bei EPT auf ein relatives Risiko von 1,3 bis 2 (Greiser et al., 2005; Lee et al., 2005). Auch die Ergebnisse der „Women’s Health-Initiative“ (WHI) Studie zeigten eine Inzidenzzunahme durch eine Östrogen-Gestagen-Substitution sowie die Tendenz zu größeren Tumoren und fortgeschritteneren Stadien, während sich durch eine alleinige Östrogengabe keine Erhöhung des Brustkrebsrisikos nachweisen ließ (The Woman’s Health Initiative Steering Committee, 2004; Hulley et al., 2002; Chlebowski, Hendrix et al., 2003; Anderson et al., 2004). In den USA kam es - als Reaktion auf Bekanntwerden der Ergebnisse der WHI Studie von 2002 - zur Reduktion der HRT Anwendung und parallel zu einer signifikanten Erniedrigung der Mammacarcinominzidenz. Dieser Effekt war nicht in allen Ländern nachzuvollziehen und die Gründe hierfür werden noch kontrovers diskutiert (Chlebowski, Kuller et al., 2009; Jemal et al., 2007; MacMahon et al., 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine zusätzliche Gestagengabe bei der HRT das Risiko an einem Mammacarcinom zu erkranken - im Gegensatz zum Endometrium - und Ovarialkarzinom - wahrscheinlich erhöht (Kaaks et al., 2005; Narod, 2011; Pearce et al., 2009; The Woman’s Health Initiative Steering Committee, 2004).

Partialwirkung der Gestagene

Gestagene sind synthetische und halbsynthetische Steroidhormone. Das einzige natürliche Gestagen ist das Progesteron.

Sie werden nach ihrer chemischen Struktur folgendermaßen unterteilt:

- Progesteronderivate: mikronisiertes Progesteron und sein Isomer (Retroprogesteron=Dydrogesteron)
- 17-Hydroxyprogesteronderivate: Medroxyprogesteronacetat (MPA), Medrogeston, Cyproteronacetat, Megestrolacetat (MegAc)
- Testosteronderivate: Levongesterel, Gestoden, Desogestrel
- 19-Norprogesteronderivate: Promegeston (R5020), Trimegeston
- Spironolactonderivate: Drosperinon

Eine gemeinsame Wirkung der Gestagene am Endometrium besteht darin, die sekretorische Transformation des Endometriums – nach vorausgegangener Östrogenstimulation – zu induzieren. Am Endometriumepithel weisen sie einen ausgeprägten antiöstrogenen, antiproliferativen Effekt auf.

Da zwischen dem Progesteron-, Androgen-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptor eine strukturelle Verwandtschaft besteht, können Gestagene an sie binden und agonistische oder antagonistische Wirkungen entfalten (Birkhäuser et al., 2004). Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Gestagene ganz erheblich in ihren Partialwirkungs-Profilen. Diese Wirkungen können jedoch bei gezieltem klinischem Einsatz von Nutzen sein (Druckmann, 2002). Eine antiandrogene Partialwirkung kann z.B. bei Akne, Hirsutismus, Seborrhoe genutzt werden.

Allerdings können auch unerwünschte Partialwirkungen in Organen und Geweben, z.B. der Haut, dem Gehirn und dem kardiovaskulären System, auftreten (Druckmann, 2002). Eine androgene Partialwirkung kann Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Aggressivität und Hirsutismus verursachen. Im Übrigen können androgene Gestagene Risikofaktoren für Herz und Kreislauf darstellen, sowie Lebermetabolismus und Blutgerinnung negativ beeinflussen. Die glukokortikoide Partialwirkung kann zu Veränderungen der Psyche sowie zu Ödemen führen (Druckmann, 2002).

1.1.4 Hormonelle Regulation des Mammacarcinoms

Die Bestimmung der Steroidhormonrezeptor-Expression von Mammacarcinomen hat eine wichtige klinische Bedeutung erlangt. Der Steroidhormonrezeptorstatus besitzt vor allem eine prädiktive Bedeutung in Hinblick auf die Therapie (Regan et al., 2006).

Weitere prognostische Faktoren mit gesicherter klinischer Relevanz sind außerdem der axilläre Lymphknotenstatus, die Expression des Her-2/neu-Onkoproteins sowie morphologische Kriterien (Bauerfeind, 2009).

Bei allen invasiven Mammacarcinomen und in der Regel auch bei den dukталen in situ Carcinomen (DCIS) ist im Rahmen der Primärdiagnostik die Bestimmung des Östrogenrezeptors (-alpha) (ER) und des Progesteronrezeptors (PR) obligat durchzuführen (Goldhirsch et al., 2005). Die Bestimmung erfolgt in der Regel an Schnitten des Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Tumormaterials, vorzugsweise bereits am dem zur Diagnostik entnommenen Stanzmaterial. Als Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung wird obligatorisch der Prozentsatz der positiven Tumorzellkerne getrennt für den Östrogen- und den Progesteronrezeptor angegeben (Goldhirsch et al., 2003). Gemäß dem St. Gallen-Konsens von 2003, 2005 und 2007 wird zwischen dem hormonsensitiven und dem nicht-hormonsensitiven Mammacarcinomen unterschieden (Goldhirsch et al., 2003, 2005, 2009). Mammacarcinome, in denen > 10 % der Zellkerne Östrogenrezeptor positiv sind, werden als Hormonrezeptor positive und damit als hormonsensitive Tumoren eingestuft (Harvey et al., 1999).

Ein positiver Rezeptorstatus ist nicht nur für die Vorhersage des Ansprechens auf eine endokrine Therapie von Bedeutung. Neuere Daten deuten darauf hin, dass Patientinnen mit Hormonrezeptor-negativen Tumoren signifikant besser auf eine primäre Chemotherapie ansprechen als Patientinnen mit Hormonrezeptor-positiven Tumoren (Colleoni et al., 2004; von Minckwitz et al., 2005; Ellis et al., 2008).

Aktuell in der Diskussion befindet sich die möglicherweise unterschiedliche Bedeutung der Östrogen- und Progesteronexpression. Während der Östrogenrezeptorstatus deutlich mit dem Ansprechen auf endokrine Therapie korreliert, wird die Wertigkeit des Progesteronrezeptorstatus durch die Daten der Analyse der Early Breast Cancer Trialists Collaborate Group (EBCTCG) hingegen in Frage gestellt (EBCTCG Sekretariat, 2007). In der St. Gallen Konsensuskonferenz von 2009 wurde daher der Einsatz einer endokrinen Therapie bei Nachweis einer nur geringen Östrogenexpression befürwortet, während ein alleinige positiver Progesteronrezeptor als Artefakt eingestuft wurde (Goldhirsch et al., 2009).

1.2 CXCR4 und seine Liganden (CXCL12 und MIF)

1.2.1 CXCR4

Der CXCR4 Rezeptor gehört zur Familie der Chemokin-Rezeptoren. Ihre Liganden sind 8-10 kDa großen Chemokine, welche eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie z.B. der Regulation des „Leukozyten trafficking“, der Modulation der hämatopoetischen Zellproliferation sowie der Steuerung der Zell-Adhäsion an die extrazelluläre Matrix spielen (Rollins, 1997).

Der CXCR4, welcher aus 352 Aminosäuren besteht, ist ein G-Protein gekoppelter Transmembranrezeptor, dessen transmembranärer Anteil siebenmal die Zellmembran durchspannt. Immunhistochemisch lässt sich der CXCR4 in der Zellmembran und im Zytoplasma lokalisieren.

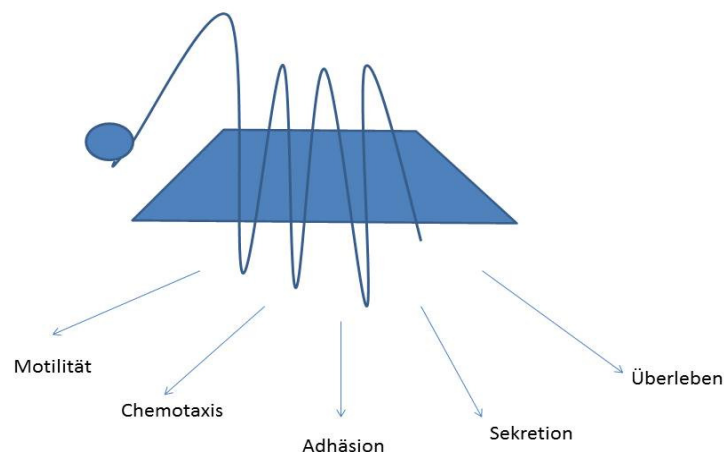


Abbildung 1.1: CXCR4 Rezeptor

Der CXCR4 wird in unterschiedlichen Zelltypen, z.B. T-Lymphozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen, exprimiert (Baggiolini, 1998; Volin et al., 1998; Feil et al., 1998). Nach der Bindung seiner Liganden CXCL12 und MIF aktiviert der CXCR4 verschiedene Signaltransduktionskaskaden: die Phosphatidyl-3-Kinase und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase. Das führt zur Umorganisation des Zytoskeletts, zur Hemmung der Apoptose und zum Zellwachstum (Ganju et al., 1998).

Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der CXCR4 Expression und Fernmetastasen beim primären Mammacarcinom zeigen (Salvucci et al., 2006; Blot et al., 2008; Holm et al., 2007; Li et al., 2004; Hassan, Ferrario et al., 2009).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 spielt eine wichtige Rolle bei der Migration, Metastasierung und Proliferation von Brustkrebszellen (Mukherjee & Zhao, 2013; Salvucci, Bouchard et al., 2006). Müller et al. (2001) zeigten, dass die Expression des CXCR4 in malignen Brustkrebszellen höher ist als im normalen, gesunden Mamma-Gewebe.

Studien haben gezeigt, dass der CXCR4 in Brusttumoren eine Rolle als Proliferationsfaktor spielt (Hall et al., 2003; Ferrari et al., 2012).

In einer neuen Studie mit 794 Patientinnen mit primärem Mammacarcinom zeigten 12 % der Patientinnen eine CXCR4 Expression. Die CXCR4-Expression korrelierte weder mit der Proliferation noch mit der Fernmetastasierung. Jedoch zeigten die CXCR4-positiven Mamma-Tumoren ein signifikant höheres Risiko für die Bildung von Knochenmetastasen. Die 10 Jahres Inzidenz für Knochenmetastasen war bei den CXCR4 positiven Tumoren 23 % (13,6 % - 32,6 %) und lag bei den CXCR4 negativen Tumoren bei 12 % (9,7 % - 15 %) (Andre et al., 2009).

1.2.2 CXCL12

CXCL12 ist ein Chemokine, welches verschiedene synonyme Bezeichnungen trägt. Es wird unter anderem als stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) oder als pre-B cell growth-stimulating factor (PBSF) bezeichnet. CXCL12 hat eine Molekularmasse von etwa 8 kDA und das Gen ist auf dem Chromosom 10q11.1 lokalisiert (Shirozu et al., 1995).

CXCL12 ist ein spezifischer Ligand der G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7. Die Interaktion zwischen dem Ligand und Rezeptor vermittelt verschiedene zelluläre Reaktionen. Die CXCL12/CXCR4 Achse ist in die Hämatopoese, neurale, vaskuläre sowie kraniofasziale Organogenese involviert. CXCL12 und CXCR4 „*knock-out*“ Mäuse sterben im Verlauf der Embryonalentwicklung (Mirisolva et al., 2009).

Müller und Mitarbeiter (2001) haben erstmalig nachgewiesen, dass Mammacarcinome eine hohe CXCR4-Expression zeigen und dass die Metastasen-Zielorgane wie Lunge, Leber und Knochen die höchsten CXCL12-Expressionsniveaus aufweisen. CXCL12 wirkt vermutlich chemotaktisch auf die CXCR4 positiven Zellen des Primärtumors, nachdem sie sich aus dem Tumorzellverband herausgelöst haben. Wird eine Maus mit der CXCR4 positiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 inokuliert und gleichzeitig mit einem CXCR4-Rezeptor Antagonisten behandelt, kann eine signifikante Senkung der Metastasen-Bildung gegenüber den nicht mit Antagonisten behandelten Kontroll-Mäusen erreicht werden (Müller et al., 2001).

CXCL12 wird in hoher Konzentration in den Stroma- und Endothelzellen des Knochenmarks (Tashiro et al., 1993), Osteoblasten sowie von Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten verschiedener Organe (Salvucci, Yao et al., 2002; Müller et al., 2001) und epithelialen Tumorzellen (Mirisola et al., 2009) produziert.

CXCL12 wird von vielen Tumoren und Tumorzelllinien (Kryczek et al., 2007), inklusive Brustkrebszelllinien (Ross et al., 2000) exprimiert. MCF7, eine Östrogenrezeptor positive Mammacarcinom-Zelllinie, welche gelegentlich zur Metastasierung neigt (Harrell et al., 2006), exprimiert CXCL12 (Hall et al., 2003). Die Zelllinie MDA-MB-231, welche Östrogenrezeptor negativ ist, exprimiert kein CXCL12 (Wendt et al., 2008). In MCF7-Zellen wird die CXCL12 Expression von 17- β -Estradiol induziert (Hall et al., 2003). Die Abwesenheit des Östrogenrezeptors in den MDA-MB 231-Zellen könnte deshalb erklären, warum diese Zellen kein CXCL12 exprimieren.

CXCL12 wurde als erster Patienten-spezifischer prädiktiver Blutplasmamarker für die Fernmetastasierung des Mammacarcinoms identifiziert (Hassan et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass eine niedrige CXCL12-Konzentration im Blutplasma der Patientin prädiktiv für die Metastasierung eines CXCR4-positiven Mammacarcinoms ist. Hierbei spielt der Konzentrationsgradient des CXCL12 zwischen Blutplasma und Metastasen-Zielgewebe eine entscheidende Rolle. In einer Folgestudie konnten Hassan und Mitarbeiter (2009) bestätigen, dass insbesondere Patientinnen mit einer niedrigen CXCL12 Plasmakonzentration und einer hohen CXCR4 Expression im Mammatumor eine signifikant schlechtere Prognose als Patientinnen mit niedriger CXCL12

Plasmakonzentration und niedriger CXCR4 Tumorexpression aufwiesen. Dies zeigt, dass eine niedrige CXCL12 Plasmakonzentration die Extravasation von Tumorzelle, die eine starke CXCR4-Expression besitzen, begünstigt (Hassan et al., 2009).

1.2.3 MIF

Der Makrophagen Migrations Inhibitionsfaktor (MIF) ist ein pleiotropes Zytokin und Mediator von akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen (Lolis und Bucala, 2003). Außerdem spielt es eine wichtige Rolle beim septischen Schock, rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose, Kolitis sowie in der Karzinogenese (Weber et al., 2004; Donnelly et al., 1997; Morand et al., 2006; Bernhagen et al., 1993; Calandra et al., 2003). MIF ist der Ligand des CXCR2- und des CXCR4-Rezeptors (Bernhagen et al., 2007).

MIF wird nicht nur von Immunzellen sezerniert, sondern auch von Parenchym- und Tumorzellen, z.B. durch inflammatorische Stimulation und Stress (Calandra et al., 2003). Man findet MIF im Zytosol der verschiedenen Zelltypen und es greift regulativ in das Zellüberleben, den Zellzyklus und die Homöostase ein (Verjans et al., 2009).

Bereits 1999 wurde durch Mitchell und Mitarbeiter herausgefunden, dass MIF eine Rolle in der Karzinogenese spielt. Inzwischen wurde erkannt, dass MIF ein wichtiges Bindeglied zwischen chronischer Entzündungen und Krebs darstellt. Es ist zu beachten, dass die MIF-Expression in zahlreichen Tumorentitäten, wie beim Prostatacarcinom, dem Koloncarcinom sowie beim Mammacarcinom deutlich erhöht ist (Wilson et al., 2005; Meyer-Siegler et al., 2005; Bando et al., 2002). MIF inhibiert p53 abhängige Genexpression und supprimiert die Apoptose. Tumorzellsekretion von MIF zeigte eine Erhöhung der Tumorzellproliferation durch autokrine Amplifikation, ähnlich wie bei bereits bekannten anderen exprimierten Tumorzellfaktoren (Hudson et al., 1999; Fingerle-Rowson et al., 2003; Mitchell, Liao et al., 2002; Nguyen et al., 2003).

Der Zusammenhang zwischen MIF und Brustkrebs wurde erst in wenigen Studien untersucht. Bando und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass die MIF-Expression mit einem verringerten krankheitsfreien Zeitraum assoziiert ist, jedoch bestehe kein Zusammenhang zwischen der MIF-Expression und dem Gesamtüberleben. Außerdem zeigte diese Studie einen Korrelation zwischen

MIF und CXCL8 in Brustkrebsgewebe, aber keinen Zusammenhang zur Hormonrezeptor-Expression (Bando et al., 2002). In Studien von Verjans und Mitarbeitern (2009) zeigte sich eine duale Rolle des MIF in Bezug auf das Mammacarcinom. Die intrazelluläre Lokalisation von MIF kann auf eine günstige Prognose hindeuten. Dahingegen deutet die extrazelluläre Lokalisation von MIF auf ein proinflammatorisches Geschehen hin und stellt wahrscheinlich einen ungünstigen Prognosemarker dar (Verjans et al., 2009).

1.3 Histon-Deacetylasen und der Inhibitor Trichostatin A

Die DNA aller eukaryoten Zellen, mit Ausnahme der mitochondrialen DNA, befindet sich in kondensierter Form als Chromatin im Zellkern. Chromatin wird aus DNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen gebildet. Die Histone H2A, H2B sowie H3 und H4 liegen als Dimere vor und es bilden je vier Dimere ein oktameres Nukleosomencore. Um dieses windet sich die DNA unter Bildung einer linksgängigen Superhelix mit 1,8 Windungen, wobei das Nukleosom entsteht. Als Verbindung zwischen den Nukleosomen ist eine 50-60 Basenpaare DNA, welche mit dem Histon H1 assoziiert ist. Die Nukleosomenfaser wickelt sich spulenförmig auf, mit je Windung 6 Nukleosomen, und bildet somit die Nukleosomenkette. Diese 30 nm dicke Kettenfaser faltet sich unter Beteiligung von Nicht-Histonproteinen zu vielen Schleifen (Löffler, 2001; de Ruijter et al., 2003; Hess-Stumpp, 2005).

Die Histonacetylierung ist ein dynamischer, reversibler Prozess, welcher durch HATs (Histon-Acetylasen) und HDACs reguliert wird.

Histon-Deacetylasen, abgekürzt HDACs, sind Schlüsselenzyme in der Regulation der Chromatin-Struktur und der Genexpression. Sie verändern die Histon-Konformation durch die Abspaltung von Acetylgruppe aus den acetylierten Lysin-Seitenketten am N-Terminus der Histon-Proteine. Durch diese Deacetylierung wird eine engere Bindung der DNA um die Nukleosomen bewirkt und damit eine Hemmung der Transkription (Wade, 2001; Strahl & Allis, 2000; Yoshida, Furumai et al., 2001).

HDACs können auch Nicht-Histon Proteine, wie p53, E2F, α -Tubulin und MyoD deacetylieren. Dies zeigt ihre komplexen Funktionen in der Regulation der verschiedensten zellulären Prozesse (Hubbert et al., 2002; Juan et al., 2000).

Studien haben gezeigt, dass HDACs generell in allen untersuchten Geweben exprimiert werden. Jedoch wurden signifikante Variationen der HDAC-Expressionsstärke in den unterschiedlichen Gewebe gefunden (de Ruijter et al., 2003).

HDAC-Aktivität interferiert auf verschiedenen Ebenen mit der Wirkung von Antiöstrogenen wie Tamoxifen. So kann durch die Applikation von HDAC-Inhibitoren die Tamoxifen-Resistenz von Östrogenrezeptor-positiven Mammatumor-Zellen aufgehoben werden (Thomas et al., 2011).

Steroidhormone sowie auch Schilddrüsenhormone und Retinoide sind an der Regulation von Homöostase und Entwicklung beteiligt. Sie wirken durch Regulation der Transkription spezifischer Gene (Xu et al., 1999).

Zu den Steroidhormonrezeptoren gehören Östrogen- und der Progesteronrezeptoren sowie Glukokortikoid- und Mineralokortikoidrezeptoren. Sie liegen intrazellulär und funktionieren nach dem Rezeptor-Ligand Prinzip. Der Östrogenrezeptor verändert seine Konformation durch Bindung von Östrogen. Dies führt zu einer Bindung des Rezeptors an eine spezifische DNA Bindungsstelle, welches zu einer Regulation der Transkription der Zielgene führt. Verschiedene Cofaktoren – genannt Coaktivatoren und Corepressoren - interagieren mit dem Östrogenrezeptor im Rahmen der Transkriptionssteuerung. Sie können die Transkription aktivieren oder supprimieren. Coaktivatoren sind SRC-1, TIF2, AIB1, CBP und P/CAF. Zu den Corepressoren gehören N-CoR (nuclear hormone receptor-corepressor) und SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) (Kurebayashi et al., 2000).

Es hat sich gezeigt, dass HDACs der Klasse I und II ebenfalls mit den Corepressoren sowie Transkriptionsfaktoren durch direkte oder indirekte Bindung interagieren (Hess-Stumpp, 2005).

Eine Hyperacetylierung aktiviert die Chromatinstruktur im Sinne einer Öffnung, so dass Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen einen besseren Zugang zur DNA bekommen, an ihre spezifischen Sequenzen binden und die Gentranskription starten können (Bulger, 2005).

Die 18 bisher bekannten Histon-Deacetylasen werden in 3 Klassen eingeteilt. Zur ersten Klasse gehören HDAC-1,-2,-3,- 8. Sie sind homolog zu dem PRD3 Protein der Hefen und man findet sie hauptsächlich im Zellkern. HDAC-1 und HDAC-2 besitzen das NLS (nuclear localization signal) jedoch nicht das NES (nuclear export signal), weshalb sie ausschließlich im Zellkern anzufinden sind (Hess-Stumpp, 2005; de Ruijter et al., 2003).

Krusche und Mitarbeiter zeigten 2005 erstmalig die HDAC-1 und HDAC-3 Proteinexpression in Brustkrebszellen mit der TMA (Tissue-Microarray) Methode und etablierten HDAC-1 als einen potentiellen neuen Marker für ein verlängertes, krankheitsfreies Überleben (Patientinnen mit ER und PR positivem und Her2/neu negativem Carcinom).

Zur zweiten Klassen gehören HDAC-4,-5,-6,-7,-9,-10. Sie sind homolog zu dem HDAC 1 Protein und haben die Fähigkeit zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu „shutteln“, aufgrund von NLS sowie NES (Hess-Stumpp, 2005).

In die dritte Klassen, genannt Sirtuins, gehören SIRT-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7. Sie sind homolog dem SIR 2 Protein (Minucci & Pelicci, 2006).

Zur Klasse vier wird das kürzlich neu entdeckte HDAC-11 zugeordnet. Es ist im Zellkern aufzufinden und scheint in die Regulierung der Interleukin-10 Expression involviert zu sein (Gene NCBI).

Es existieren verschiedene Inhibitoren für HDACs (HDACi), welche natürlichen oder synthetischen Ursprunges sind. Chemisch kann man die Inhibitoren in 6 Gruppen einteilen:

- Hydroxamsäure-Derivate (Trichostatin A, Oxamflatin, Pyroxamide, Scriptaid, SAHA Suberoylanilide hydroxamic acid)
- Carboxylat
- Benzamide (N-acetyldinaline)
- Elektrophile Ketone
- Zyklische Tetrapeptide (Trapoxin, Depudesin, HC-Toxin, Chlamydocin)
- Kurzkettige Fettsäuren (Valproinsäure, Phenylbutyrate)

(Hess-Stumpp, 2005; Mai et al., 2005; Miller et al., 2003; Minucci & Pelicci, 2006; de Ruijters et al., 2003).

Sie arbeiten wirksam gegen HDAC Klasse 1, 2 und 4. Die meisten HDACi inhibieren HDAC reversibel, Ausnahme bilden Trapocin und Depudesin. Diese beiden zyklischen Tetrapeptide inhibieren das Enzym irreversibel mittels

kovalenter Bindung an der Epoxyketon Gruppe (de Ruijter et al., 2003; Marks et al., 2001; Furunami et al., 2001; Kramer et al., 2001).

HDACi induzieren zellspezifische Effekte, wie Apoptose, Zellzyklus-Stop, Seneszenz und Differenzierung (Minucci & Pelicci, 2006).

Eine der bekanntesten HDACi ist das Trichostatin A. Das Hydroxamsäure-Derivat Trichostatin A, TSA genannt, ist ein antifugales Antibiotikum und wurde 1976 von Tsuji et al. erstmalig beschrieben. Später entdeckte man die potenten Proliferations-Inhibitions Eigenschaften an Tumorzellen (de Ruijter et al., 2003). Es ist ein nicht-kompetitiver, reversibler Inhibitor der HDAC-Aktivität (Vigushin et al., 2001).

Die Fähigkeit von TSA HDACs zu inhibieren, wurde 1990 erstmalig von Yoshida und Mitarbeiter beschrieben. Bei der aktuellen Entwicklung von HDAC-Inhibitoren für den klinischen Einsatz dient TSA lediglich als Referenzsubstanz, da seine Synthese ineffizient und damit seine Produktion zu teuer ist (de Ruijters et al., 2003). Viele ähnliche Verbindungen der Hydroxamsäure-Derivat-Gruppe wurden bereits entwickelt. Jedoch ist Oxamflatin die einzige Verbindung mit ähnlichem in vitro Potential wie TSA (de Ruijters et al., 2003).

HDACi induzieren in Tumorzellen in unterschiedlichem Maße einen Zell-Zyklus-Stop, Differenzierung sowie Apoptose in vitro und in vivo (Johnstone, 2002; Marks et al., 2001). Diese Fähigkeiten hat man zum Anlass genommen, klinische Studien zu beginnen. Die klinischen Studien über den Nutzen von HDACi befinden sich bereits in Phase I und II (Tinoco et al., 2013). Erste Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Rosato & Grant, 2004; Johnstone & Licht, 2003; Drummond et al., 2004).

Münster und Mitarbeiter (2009) untersuchten in ihrer Phase I und II klinischen Studien den Erfolg von einer Kombination aus dem HDACi Valproinsäure und Kombination mit dem Chemoregime FEC. In Phase II konnte bei 9/14 Frauen (64 %) ein objektiv gutes Ansprechen nach 6 Zyklen gezeigt werden.

2 Zielsetzung

Das Mammacarcinom ist eine immer häufiger werdende maligne Erkrankung. Zunehmend sind auch junge, prämenopausale Frauen betroffen und das metastasierte Mammacarcinom ist die häufigste Malignom-bedingte Todesursache bei der Frau (RKI, 2012).

Es ist bekannt, dass sowohl natürliche als auch im Rahmen einer HRT therapeutisch applizierte Steroidhormone das Risiko an einem Mammacarcinom zu erkranken erhöhen (Narod, 2011). Des Weiteren ist bekannt, dass der CXCR4 Rezeptor und sein Ligand CXCL12 eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Mammacarcinomen spielen (Mukherjee & Zhao, 2013; Müller et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die klinisch relevante Frage bearbeitet, ob in den Östrogen und Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebs-Zelllinien MCF7 und T47D sowie der Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativen Brustkrebs-Zelllinien MDA-MB 231 die CXCR4-, CXCL12 und MIF-Expression unter hormoneller Regulation steht und ob sich die Genregulation in den Zelllinien unterscheidet. Die Brustkrebszelllinien wurden mit 17 β -Estradiol und den in klinischer Anwendung befindlichen Gestagene Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und Megestrol-Acetat sowie mit Promegeston (R5020) behandelt, drei Gestagene, die sich außerdem in ihren Partialwirkungen an Androgen- und Glucocorticoid-Rezeptoren unterscheiden. Des Weiteren wurde der Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) auf die CXCR4-, CXCL12- und MIF-Expression untersucht. HDACi werden als neue Medikamente in der Tumor-Therapie diskutiert, da sie in Tumorzellen eine Wachstumshemmung, Differenzierung oder Zelltod induzieren können. Da die HDACs Bestandteil der transkriptionssteuernden Steroidhormon-Rezeptor-Komplexen sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob durch HDACs die Wirkung von Steroid-Hormonen auf die CXCR4, CXCL12- und MIF-Expression beeinflusst werden kann. Darüber hinaus wurde die CXCL12 Proteinexpression an einer repräsentativen Auswahl von Mammacarcinomen (zusammengefasst in einem Tissuemicroarray) mittels Immunhistochemie untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der CXCL12-Expression und dem Tumorgrading, der ER und PR- Expression und der Ki 67- Expression besteht.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Verwendete Chemikalien

- Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, USA
- BSA, Albumin bovine Fraction V pH 7 SERVA, Heidelberg
- Carbonsäure, SIGMA-Aldrich GmbH, Steinheim
- Coomassie G, SERVA, Heidelberg
- ECLplus-Reagenz IMMOBILON Western, Millipore, Eschborn
- ECL-Reagenz, AMERSHAM
- EDTA, Ethylenediaminetetracetic acid SIGMA-Aldrich GmbH, Steinheim
- Entwickler, KODAK LX24
- Fixierer, KODAK AL4
- H₂O₂ Wasserstoffperoxid 30 %, MERCK, Darmstadt
- Hämlaunlösung sauer nach Mayer, CARL ROTH , Karlsruhe
- Kodak X-OMAT UV Plus Film, 18 x 24 cm Kodak, Cedex, Frankreich
- Methanol, Haus
- Milchpulver, Magermilch Supermarkt
- NaCl, Natriumchlorid, MERCK, Darmstadt
- PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Ontario, Kanada
- Paraformaldehyd reinst, MERCK, Darmstadt
- PBS Dulbecco Instamed, 9,55 g/l, BIOCHROM AG, Berlin
- PVDF Membran, 0,45µm Porengröße, Millipore, Eschborn
- SDS, Sodium dodecyl sulfat, FLUKA Biochemika, Steinheim
- TRIS, ultra pure p.A., BIOMOL, Hamburg
- Tween 20, CALBIOCHEM, Darmstadt
- Tween 20, SERVA, Heidelberg
- Whatmanfilterpapiere, Schleier und Schüll, Dassel

3.1.2 Kulturmedien und Medienzusätze

- Antibiotic-Antimycotic, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, USA
- D-Glucose, SIGMA-Aldrich, Steinheim

- Dulbecco's Modified Eagle Medium, CC Pro, Neustadt
- FCS, CC Pro, Neustadt
- HBSS, CC Pro, Neustadt
- Insulin, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, USA
- L-Glutamin, GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, USA
- Phenolrot, CC Pro, Neustadt
- RPMI 1640 Medium (1x), Biochrom AG, Berlin
- Trypsin-EDTA-Lösung, 10fach konzentriert, Gibco BRL, Darmstadt

3.1.3 Enzyme, Kits

- AEC (red) Substrate Kit, ZYMED® Laboratories, CA, USA
- Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche, Mannheim, Deutschland
- High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Mannheim, Deutschland
- High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Mannheim, Deutschland
- Histostain® Bulk Kit, Zymed® LAB-SA Detection System, ZYMED® Laboratories, CA, USA
- Histostain-Plus® Kits, Zymed® 2.Generation, ZYMED® Laboratories, CA, USA
- LightCycler® FastStart DNA Master Plus Hybprobe, Roche, Mannheim, Deutschland
- LightCycler® FastStart DNA Master Plus SYBR Green I, Roche, Mannheim, Deutschland
- LightCycler® h-ALAS Housekeeping Gene Set, Roche, Mannheim, Deutschland
- LightCycler® TaqMan Master, Roche, Mannheim, Deutschland
- Reverse Transcriptase, AMV, Roche, Mannheim, Deutschland
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche, Mannheim, Deutschland

3.1.4 Verwendete Puffer und Gele: Zusammensetzung

- Coomassie-Färbelösung = 2,5 g Coomassie G, Serve Blue G; 454 ml Methanol; 454 ml Essigsäure; 92 ml H₂O

- DNA-Agarose-Gel = 1,4 g Agarose; 120 ml TAE Puffer 10 x; 6 µl Ethidiumbromid
- Entfärber für Coomassie-gefärbte Protein-Gele = 490 ml Methanol; 490 ml H₂O; 20 ml Essigsäure
- 10 % Trenngel für die Protein-Auftrennung:
6240 µl H₂O; 3000 µl 40 % Acrylamid; 2620 µl Trenngelpuffer; 108 µl 10 % SDS; 9 µl Temed; 20 µl 10 % Per.
- 15 % Trenngel für die Protein-Auftrennung:
4500 µl 40 % Acrylamid; 4745 µl H₂O; 2620 µl Trenngelpuffer; 108 µl 10% SDS; 9 µl Temed; 20 µl 10 % Per
- Laufpuffer:
12,12 g Tris, 57,6 g Glycin, 4 g SDS, 4000 ml H₂O
- Sammelgel für die Proteinauftrennung:
800 µl 40 % Acrylamid; 5570 µl H₂O; 524 µl Sammelgelpuffer; 57 µl 10% SDS; 7 µl Temed; 35 µl 10 % Per
- Stopgel:
100 µl 40 % Acrylamid; 400 µl Trenngelpuffer; 2,5 µl Temed; 10 µl 10 % Per
- TB1-Puffer = 5,2 g Carbonsäure(0,04 M); 200 ml Methanol; 800 ml H₂O
- TB2-Puffer = 3,03 g Tris (0,025 M); 200 ml Methanol; 800 ml H₂O
- TB3-Puffer = 36,34 g Tris (0,3 M); 200 ml Methanol; 800 ml H₂O
- TBS-Puffer = Tris 5 mM/L, pH 7,6, NaCl 130 mM

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kulturmedien

Die Zusammensetzung von 50 ml Medium sieht wie folgt aus: 44 ml Medium (T47D-Zellen RPMI 1640; MCF7 sowie MDA MB-231 Zellen Dulbecco's Modified Eagle), 5 ml FCS, 0,5 ml Antibiotic-Antimycotic, 0,0625 ml Insulin sowie 0,125 g D-Glucose.

3.2.2 Zelllinien

MCF7 Zellen dankend erhalten von Professor Dr. med. U. Schumacher, Institut für Anatomie II - Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die MDA-MB 231 Zellen sowie die T47D Zellen wurden bei der Firma ATCC, LGC Standards, Wesel, Deutschland, gekauft.

3.2.3 Zellkulturexperimente

Die Zellen wurden in Plastik-Kultur-Flaschen (25 cm², Greiner GmbH, Frickenhausen) mit je 5 ml Medium (siehe 3.1.2) versetzt und bei 37°C in einer 5% CO₂ angereicherten, feuchten Luftatmosphäre kultiviert (NAPCO-Inkubator). Wenn eine Zelldichte von ≥ 90 % erreicht wurde, sind die Zellen passagiert worden. Der Mediumüberstand wurde abgesaugt und die Zellen 2 x mit HBSS gespült. Um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen, wurde 5 ml 1 x konzentriertes Trypsin auf die Zellen gegeben und die Kulturflasche für ca. 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die nun gelösten Zellen wurden in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Kulturflasche wurde mit Medium + 20 % FCS ausgespült und in das Falconröhrchen überführt, bevor eine Zentrifugation von 10 min bei 700 rpm folgte. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in frischem Komplettmedium resuspendiert und 1:2 bis 1:3 gesplittet in neue Flaschen ausgesät.

Es wurden 4 verschiedene Zellkulturexperimente durchgeführt um die CXCR4 und CXCL12-Expression unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen.

I. 12 – 96 h Inkubation mit 0,5 µM/L TSA

MCF7 und MDA-MB 231 Zellen wurden 1:2,5 gesplittet in 5 Flaschen ausgesät und 1 Tag mit Komplettmedium vorkultiviert. Am folgenden Tag wurden 4 der Flaschen mit 0,5 µM/L TSA behandelt und eine zur Kontrolle mit Ethanol (EtOH), der Substanz in der die Steroide und TSA gelöst worden sind. Die mit TSA behandelten Zellen wurden nach 12 h, 24 h, 48 h sowie 72 h für die Analysen gesammelt. Die Kultur mit den EtOH behandelten Zellen wurde nach 72 h abgebrochen.

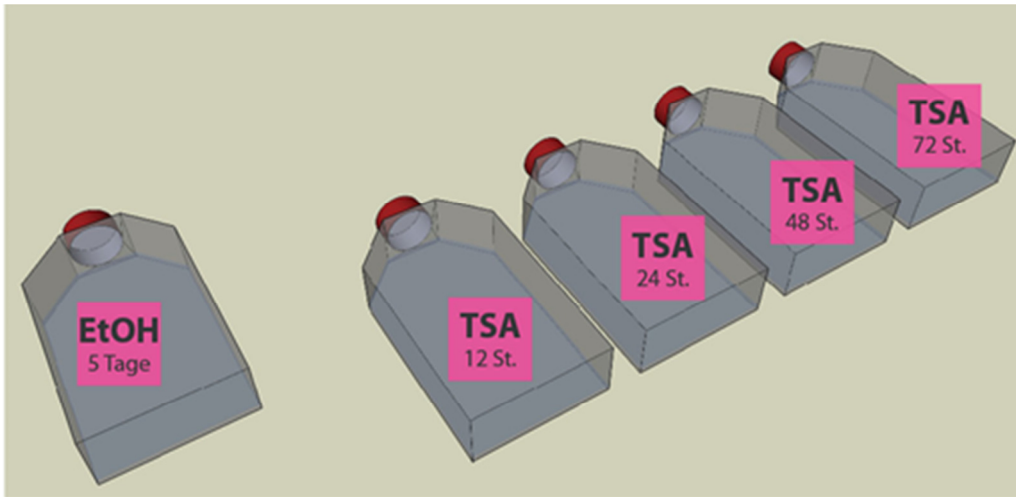


Abbildung 3.1: Zellkulturschema für die 12-96 stündige Inkubation mit 0,5 µM/L Trichostatin A (TSA)

II. Studium der Effekte von mit unterschiedlichen TSA-Konzentrationen (0 - 2 µM/L)

MCF7 und MDA-MB 231 Zellen wurden in je 5 Flaschen ausgesät und für 2 Tage vorkultiviert. Anschließend wurden sie für einen Tag mit unterschiedlichen TSA Konzentrationen behandelt; 2 µM/L, 1 µM/L, 0,75 µM/L, 0,5 µM/L sowie 0,2 µM/L. Eine Flasche wurde zur Kontrolle mit EtOH behandelt.

III. CXCR4 sowie CXCL12 Expression mit verschiedenen Gestagen

MDA-MB 231 Zellen wurden in 6 Flaschen ausgesät und für 2 Tage in Kompletmedium ohne Steroidhormone angezüchtet. Anschließend wurden sie für 4 Tage mit Steroiden kultiviert. 3 der Flaschen wurden mit dem Gestagen MPA (Medroxyprogesteron-Acetat) in den Konzentrationen 5×10^{-7} M/L; 2×10^{-7} M/L; 10^{-6} M/L eine Flasche wurde mit 10^{-6} M/L R5020, einem reinen Progesteronrezeptor-Agonisten, sowie je eine weitere mit 10^{-8} M/L 17β-Estradiol (E) und eine mit EtOH behandelt.

IV. Behandlung mit verschiedenen Estradiol- und Gestagenkonzentrationen

Es wurden MCF7 und MDA-MB 231 Zellen in jeweils 6 Flaschen ausgesät und für 2 Tage vorkultiviert. Anschließend wurden sie für 96h mit Hormonen behandelt. Jeweils eine Flasche wurde mit 10^{-8} M/L E + MPA 10^{-6} M/L, eine mit E + R5020 (10^{-6} M/L), eine mit E2 + Megestrol-Acetat (Meg-Ac; 10^{-6} M/L)

sowie eine mit E + Meg-Ac (5×10^{-6} M/L) behandelt. Je eine weitere Flasche wurde pro Zelllinie mit EtOH und mit E2 alleine kultiviert.

Die Zellkulturexperimente wurden mit 3-6 Passagen jeder Zelllinie durchgeführt.

Gewinnung der Zellen für die RNA- und Protein Expressionsanalyse

Am Versuchsende wurden die Zellen wie beim Passagieren trypsinisiert und das gewonnene Zellpellet in 3 ml PBS aufgenommen. Je 1,5 ml wurden in ein separates Eppendorfgefäß überführt und die Zellen pelletiert (10 Minuten bei 700 rpm). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen für die RNA-Isolierung wurden in 400 µl Lysinpuffer (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) und 200 µl PBS/DEPC aufgenommen und bei -40 °C eingefroren. Das Zellpellet im zweiten Eppendorfgefäß wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -40 °C bis zur Aufarbeitung für die Western Blot-Analysen gelagert.

3.3 RNA-Isolierung für die real time RT-PCR (LightCycler®)

Bei der RNA Isolierung muss auf eine RNase freie Umgebung geachtet werden. Es ist wichtig mit Handschuhen und RNase freien Pipettenspitzen zu arbeiten. Zur RNA Isolierung wurde das High Pure RNA Isolation Kit verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Es wurden von den Zellen in dem 400 µl Lyse-/Bindungspuffer/200 µl PBS-DEPC-Gemisch ausgegangen. Diese wurden zunächst für 30-60 sec im Eppendorfgefäß gepottet. Nach kurzem Zentrifugieren (15 sec; $8000 \times g$; Centrifuge Eppendorf 5417R Rotor) wurde das Zellhomogenat auf den Filter der Isolationssäule des High Pure RNA Isolation Kit pipettiert und diese in ein Collection Tube gesetzt. Es folgte erneutes Zentrifugieren, wonach der Durchfluss verworfen wurde. 10 µl DNase I gemischt mit 90 µl DNase-Inkubationspuffer wurden direkt auf den Glasvliesfilter aufgetragen und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschschrte mit Waschpuffer I und II, jeweils mit nachfolgendem Zentifugieren, und dem Verwerfen des Durchflusses.

Am Ende wurde die Säule in ein frisches, RNase freies 1,5 ml Eppendorfgefäß eingesetzt und 50 µl Elutionspuffer auf das Glasvlies pipettiert. Es folgte eine

Zentrifugation für 2 min bei 7000 x g. Die Probe wurde anschließend direkt auf Eis gestellt und weiterverarbeitet oder bei –40 °C bis –70 °C gelagert.

3.4 cDNA-Synthese

Verwendet wurde das Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit von Roche. Es wurde 1 µg RNA, welche wie unter Punkt 3.3.1 isoliert wurde, mit 1 µl Oligo dT-Primer vermischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 7 µl Master-Mix, (der nach Kitvorlage angesetzt wurde) zugefügt und nach sorgfältigem Durchmischen 60 min bei 50 °C inkubiert. Es folgte eine 5 minütige Inkubationszeit bei 85 °C und ein kurzes Abkühlen auf Eis. Die cDNA wurde dann direkt in die PCR-Analyse eingesetzt oder bei –35 °C gelagert.

3.5 Real time RT-PCR

Die Real Time PCR wurde mit dem LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführt.

Als “Housekeeping” Gen wurde die 5-Aminolevulinat-Synthase (ALAS) verwendet. Die ALAS-Expression wurde mit dem LightCycler-h-ALAS Housekeeping Gene Set und dem LightCycler FastSTART DNA Master Hybridization Probes-Kit (beide Roche, Mannheim) detektiert.

Die CXCR4 PCR-Reaktion wurde mit dem LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I von Roche, Mannheim durchgeführt (siehe 3.5.1). Die CXCL12 PCR Reaktion mit dem LightCycler TaqMan Master von Roche, Mannheim (siehe 3.5.2).

Die eingesetzten Primer-Paare wurden mit einem Internetprimer-Design-Programm (<http://doprimer.interactiva.de/index.html>) hergestellt.

Die verwendeten UPL-Proben wurden mit dem Universal ProbeLibrary Assay Design Center, Roche, Mannheim ermittelt.

Für einen PCR-Lauf sind pro Probe 2 Kapillaren (Doppelbestimmung) sowie je eine für die Negativkontrolle Wasser (H₂O) und RNA (-RT) vorbereitet worden. In jede wurden 18 µl des vorbereiteten Mixes (siehe 3.5.1 sowie 3.5.2) sowie 2 µl cDNA-Probe hinzugefügt. Nachdem die Kapillaren verschlossen und anzentrifugiert worden sind, wurden sie in den Rotor des Light Cyclers gestellt.

Die Läufe konnten nun gestartet werden, welche mit dem LightCycler Software Version 3.5 programmiert wurden (siehe 3.5.1 sowie 3.5.2).

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte exemplarisch einem DNA-Agarose-Gel im Anschluss analysiert.

3.5.1 Ansatz und Ablauf der Real time PCR mit SYBR Green I

Hierzu wurde das LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I – Kit verwendet.

PCR Komponente:

12 µl H₂O

1 µl Forward Primer

1 µl Reverse Primer

4 µl Master Mix

18 µl Total

2 µl cDNA-Probe, oder 2 µl (= 60 ng RNA) oder 2 µl H₂O als Negativkontrolle.

Ein LightCycler Lauf mit SYBR Green besteht aus den folgenden Schritten:

1. Denaturierung 95°C, 10 min
2. Amplifikation und Quantifizierung:
 - Denaturierung bei 95°C 10 sec
 - Annealing: Primer entsprechend, 0-10 sec
 - Extension bei 72°C 20 sec.
 - Messung der Produkte
 - erneute Denaturierung; für insgesamt 45 Zyklen
3. Schmelzkurven-Profil, Renaturierung bei 65°C 65 sec; Aufschmelzen der PCR-Produkte durch Steigerung der Temperatur mit 0,1°C/sec auf 95°C Endtemperatur bei kontinuierlicher Messung.
4. Abkühlen auf 40°C

3.5.2 Ansatz und Ablauf der real time PCR mit TaqMan

Verwendet wurde LightCycler TaqMan Masterkit.

Für die CXCL12 Reaktion wurde die UPL Probe #41 verwendet; bei der ALAS Reaktion die Probe #64 (Human ALAS Delta-aminolevulinate synthase X56351.1, Probe #64, Primer forward: ccctcttcaccctggctaa Primer reverse:

aggccatggttcccagaatc). Die Primersequenzen und die Kombination mit der UPL Probe wurden mit dem Universal ProbeLibrary Assay Design Center, Roche, Mannheim ermittelt.

PCR Komponentenete:

13,4 µl H₂O
0,2 µl UPL Probe
0,2 µl Forward Primer
0,2 µl Reverse Primer
4 µl TaqMan Master Mix
18 µl Total
2 µl cDNA-Probe, oder 2 µl (=60 ng RNA) oder 2 µl H₂O als Negativkontrolle.

Ein LightCycler Lauf mit TaqMan besteht aus den folgenden Schritten:

1. Vorinkubation bei 95 °C für 10 min
2. Amplifikation: Denaturierung bei 95 °C 10 sec
 Annealing: Primer entsprechend 60 °C, 30 sec
 Extension bei 72 °C 1 sec
3. Abkühlen auf 40 °C

Exemplarischer Auftrag von Proben und Negativkontrollen auf das Gel.
Kontrolle der Produktgröße.

3.5.3 Quantifizierung

Die quantitative Auswertung erfolgte mit der RelQuant Software, Version 1.01 von Roche, Mannheim.

3.5.4 Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung wurde das High Pure PCR Product Purification Kit verwendet. Nach dem Kit-Protokoll wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und die Konzentration nach den Vorgaben der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland eingestellt. Derart vorbereitet wurden die PCR-Produkte an die Firma zur Sequenzierung geschickt.

3.6 Western-Blot

3.6.1 SDS-Elektrophorese nach Lämmli

Zur Vorbereitung der Gele, wurden 2 Glasplatten mit Extran-neutral gereinigt und unter Einsatz von 750 µm dicken „Spacern“ zusammen geschraubt. Bei maximal 25°C Raumtemperatur wurden die Polyacrylamidgele hergestellt. Zu Beginn wurde ein Stopgel gegossen, um die Kammer nach unten abzudichten. Darauf wurde ein homogenes 10 % bzw. 15 %igen Trenn-Gel gegossen, welches über Nacht auspolymerisierte. Am nächsten Tag wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet, in dem mit einem 15-zähnigen Kamm Probentaschen hergestellt wurden. Nach einer Stunde Polymerisationszeit war das Gel bereit für die Beladung mit den Protein-Proben.

40 µg Proteine wurden je Geltaschen aufgetragen. Parallel zu den Proben wurde in ein Tasche ein Molekulargewichtmarker aufgetragen, wodurch ein Abschätzen der Größe der Proteine in den Proben ermöglicht wird.

Der Gellauf (mit zwei Gelen in der Elektrophorese-Kammer) wurde bei 600 V, 80 mA, 50 W durchgeführt und dauerte im Durchschnitt 90 min.

3.6.2 Western Blot Reaktion

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst.

Zwei Whatmanfilterpapiere, getränkt in Transferpuffer TB1, sowie ein Filterpapier getränkt in TB2 wurden auf die untere Graphitplatte (Anode, +Pol) des Fast Blot Semidry B33 (BIOMETRA, Göttingen) gelegt. Die mit Methanol angefeuchtete PVDF Membran, wurde getränkt in TB2 auf die 3 Filterpapiere gelegt. Dann folgte das Gel (in TB2) sowie drei weitere Filterpapiere, getränkt in TB3 (Abb. 3.2). Da Luftblasen den Stromfluß und damit den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran behindern würden, wurde diese mit einer kleinen Maler-Rolle aus dem Filterpapier-Gel-Membran-Sandwich entfernt. Dann wurde die obere Graphitplatte (Kathode, -Pol) auf das „Sandwich“ aufgelegt und mit einem Stein beschwert. Das Transferieren der Proteine vom Gel auf die PVDF Membran benötigte 40 Minuten bei einer Spannung von 40 V und einem Stromfluß von 300-500 mA. Es wurde der Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Biometra, Göttingen) verwendet.

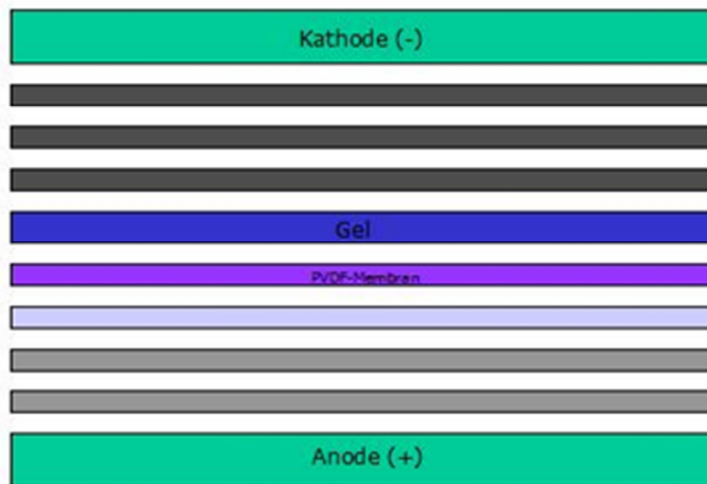


Abbildung 3.2: Filterpapier-Gel-PVDF-Membran-Sandwich zum Semidry Blotting von Proteinen

Nach Ablauf des Blottens wurde die Membran zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen in 5 % Milchpulver sowie 0,1 % Tween 20 in TBS-Puffer für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die spezifischen Primärantikörper wurden anschließend in TBS + 0,1 % Tween 20 + 5 % Milchpulver in den jeweils in der Tabelle 3.1 angegebenen Konzentrationen, über Nacht im Kühlraum inkubiert.

Nach dreimaligem zehnminütigem Waschen mit TBS/0,1 % Tween 20-Puffer wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper 1:5000 in TBS/0,1 % Tween 20/5 % Milchpulver-Puffer verdünnt und für 60 min bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal 10 min in TBS + 0,1 % Tween 20-Puffer gewaschen.

Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz-Reaktion mit dem „Enhanced chemiluminescence (ECL) Kit“ (Amersham Science, Freiburg) oder mit „Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate“ (Millipore, Billerica, USA).

Die Sichtbarmachung der Lumineszenz erfolgte auf einem Röntgenfilm. Die Belichtungszeiten betrugen je nach Antikörper und verwendetem Detektionssystem wenige Sekunden bis 30 Minuten.

Nach erfolgter Detektion wurde die Membran luftgetrocknet und bis zur Quantifizierung des Blots mit dem Housekeeping-Gen β -Aktin trocken aufbewahrt.

Das Gel wurde nach erfolgreichem Transfer für 1 min in Coomassie Blue-Lösung inkubiert und im Anschluss zur Sichtbarmachung von im Gel verbliebenen Proteinen für 1-5 min mit Entfärber-Lösung entfärbt.

Tabelle 3.1: Antikörper für den Western Blot

Antigen	Klon	Hersteller	Verdünnung	Detektion
CXCR4	rabbit polyklonal	ProSci	1:2000	Goat anti-rabbit- HRP (DAKO) 1:5000
CXCL12	79018	R&D Systems	1:250	Goat anti-mouse- HRP (DAKO) 1:5000

3.6.3 β -Aktin–Western Blot

Die bereits mit CXCR4 oder CXCL12 detektierte Membran wurde kurz mit Methanol benetzt und anschließend dreimal 10 Minuten in TBS/0,1% Tween 20-Puffer gespült. Der β -Aktin Antikörper wurde 1:50.000 in TBS/0,1 % Tween-Puffer verdünnt und für 45 min bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Ein erneuter dreimaliger Spülschritt folgte, bevor für 25 min bei Raumtemperatur Goat-Anti-Mouse-HRP-Konjugat 1:5000 in TBS/0,1% Tween 20-Puffer aufgetragen wurde. Nach erneutem dreimaligem Spülen konnte mit ECL detektiert werden. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug 20 sec. Die Membran wurde im Anschluss erneut mit Coomassie gefärbt und so aufbewahrt.

3.7 Immunhistochemie

3.7.1 Methode I

3.7.1.1 Zellen lösen und fixieren

Für die Immunhistochemie wurden die Zellen in „wells“ gezüchtet. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen zunächst mit 5 ml vorgewärmten PBS zweimalig gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden dann mit 1,5 ml 2 mmol/l EDTA in PBS behandelt und die abgelösten Zellen in

ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 1200 rpm wurde die Zellen mit RPMI 1640 Medium gewaschen und anschließend 2 min bei 1200 rpm zentrifugiert.

Zum Fixieren wurde das Zellpellet in 1 ml 4 % Paraformaldehyd für je 2,4,6,8,10 min bei Raumtemperatur suspendiert. Anschließend folgte ein 2 min Zentrifugationsschritt (1200 rpm). Die Zellen wurden in PBS/0,1 % BSA/1mM EDTA und erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 0,5 ml PBS/1mM EDTA resuspendiert.

Mehrere Spots à 10 µl Zellsuspension wurden auf einem Objektträger aufgetragen. Diese wurden dann für 1 h bei 60°C inkubiert, um die Zellen auf dem Objektträger zu fixieren.

3.7.1.2 Immunhistochemie auf Objektträgern

Zur Peroxidaseblockierung wurden die Objektträger in 1,5 % H₂O₂/PBS 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Die Serumblockierung mit 5 % BSA in PBS erfolgte bei 4°C in der feuchten Kammer über Nacht, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Dieser wurde in 1 % BSA/PBS verdünnt (siehe Tabelle 3.2). Nachdem die Serumblockade abgeklopft worden ist, wurden je 35 µl Primärantikörper aufgetragen und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Tabelle 3.2: Antikörper für Immunhistochemie

Antigen	Klon	Hersteller	Verdünnung	Verwendete Isotyp-Kontrolle
CXCR4	Rabbit polyklonal	ProSci	1:200	Rabbit Immunglobulin (DAKO) 1:3000
CXCR4(Fusin)	12G5	R&D Systems	1:100	Mouse IgG1 (DAKO) 1:20
CXCL12	79018	R&D Systems	1:20 1:62	Mouse IgG1 (DAKO) 1:4

Nach 3 x 5 min Spülen mit PBS wurde der Sekundärantikörper (Reagent B; HistostainPlus Kit-Broad Spectrum) für 1 h aufgetragen. Es folgte erneut ein

Spülschrittgefolgt von Auftragen des Streptavidin-Peroxidase-Komplexes (Reagent C) für 30 min bei Raumtemperatur. Das nicht-gebundene Streptavidin wurde durch einen erneuten Spülschritt entfernt.

3.7.2 Methode II

Die Zellen wurden für die Immunhistochemie in 4 wells angezüchtet. Die Kulturen wurden für 10 min mit 4 % Formalin/in PBS bei 8°C zur Fixierung bedeckt. Darauf folgte ein 2 minütiger PBS- Waschschrift.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Kulturen für 10 min mit 0,3 % H_2O_2 in Methanol im Dunkeln inkubiert. Es folgte für 3mal 5 Minuten ein PBS Waschschrift. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde für 10 min mit Reagent A (HistostainPlus Kit; Broad Spectrum) behandelt. Anschließend wurde der Primärantikörper auf die Wells aufgetropft (Verdünnungen siehe Tabelle 3.2) und für 1 h bei Raumtemperatur belassen. Nach 3 x 5 minütigem Spülen mit PBS wurde der Sekundärantikörper (Reagent B) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein erneuter Waschschrift folgte, bevor die Streptavidin-Peroxidase (Reagent C) für 20 Minuten inkubiert wurde. Zum Schluss folgte zweimaliges 5 minütiges Waschen in PBS und ein 5 minütiges Spülen in destilliertem Wasser. Nun konnte die Farbdetektion durchgeführt werden.

3.7.3 Methode III

Die bereits auf den Objektträgern aufgetragenen Zellen wurden für 2 x 5 min in PBS rehydratisiert. Anschließend folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase, 30 min 1 % H_2O_2 in Methanol. Es folgte erneutes Spülen 2 x 5 min in PBS/0,1 % Tween auf dem Schüttler. Bevor der Primärantikörper aufgetragen wurde, erfolgte eine 20 minütige Blockierung mit Lösung 1A (Histostain-Kit) mit anschließendem Ablaufen der Lösung. Der Antikörper wurde verdünnt in PBS/1 % BSA 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte 3 x 5 min Spülen mit PBS/0,1 % Tween, bevor der Sekundärantikörper (1B, Histostain-Kit) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Erneutes 3 x 5 min Spülen mit PBS/0,1 % Tween schloss sich an. Das Streptavidin Peroxidase Konjugat (Lösung 2) wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 2 x 5 min mit

PBS/0,1 % Tween gespült wurde. Es schloss sich ein 5 min Spülen mit destilliertem Wasser an, bevor die Farbdetektion erfolgen konnte.

Farbdetektion

Verwendet wurde das AEC (RED) Substrate Kit.

Dieses Substrat kann verwendet werden, nachdem ein Meerrettich-Peroxidasegekoppeltes Streptavidin verwendet wurde. Zur Reagentvorbereitung mischt man in 1 ml destilliertem Wasser 50 µl Substartpuffer (Reagent A); 50 µl Chromogenlösung (Reagent B) sowie 25 µl Wasserperoxidaselösung (Reagent C). Nach dem Hinzugeben des jeweiligen Reagent, erfolgt ein intensives Mischen durch Mischen. Unter mikroskopischer Sicht wird die Reaktion beobachtet, und nach ausreichender Rotfärbung abgebrochen. Die Inkubationszeit kann bis zu 30 min betragen. Die Farbreaktion wird durch das Abspülen der AEC-Lösung vom Objektträger mit destilliertem Wasser erreicht.

Gegenfärbung

Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger 1 min in Häkalaunlösung (sauer nach Mayer, Carl Roth, Karlsruhe) getaucht. Anschließend wurden die Objektträger zum Bläuen mit Leitungswasser gespült.

Zur Konservierung wurden die gefärbten Präparate mit je einem Tropfen Glycerol-Gelatine und einem Deckglas eingedeckelt.

3.8 Tissue Microarray (TMA)

In den verwendeten Mammacarcinom-TMAs wurden Gewebebezyylinder von 24-40 verschiedenen Mammacarcinompräparate in einem einzigen Paraffinblock zusammengefasst, so dass in einem einzigen Paraffinschnitt von diesem Block zwischen 24 und 40 Mammacarcinom-Proben parallel gefärbt und ausgewertet werden konnten. Die TMAs mit den Mammacarcinom-Proben sind freundlicherweise von Herrn Professor Dr. H.-H. Kreipe, Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt worden.

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Statistik-Programms GraphPadPrism Version 3.0 sowie Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Daten wurden mittels Kruskal-Wallis, Dunn's Multiple Comparison Test, t-Test und/oder Column Statistik bzw. Mann-Whitney Test ausgewertet und ein p-Wert ermittelt. Eine statistische Signifikanz liegt bei einem Wert von $p \leq 0,05$ vor.

Die Regressionskurven der MTT Assay Ergebnisse wurden mittels $\log(\text{inhibitor})$ vs. Response errechnet und der Determinationskoeffizient R^2 ermittelt. Dieser Koeffizient liegt zwischen 0 und 1. Ist $R^2 = 0$ besteht kein linearer Zusammenhang, bei $R^2 = 1$ besteht ein perfekter linearer Zusammenhang also eine Dosis-Wirkungsbeziehung.

Die Ergebnisse der Tissue Microarrays wurden ebenfalls mittels der GraphPad Prism Software und dem Fisher's Exakt Test ausgewertet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Zur Textverarbeitung sowie Tabellenerstellung wurden Microsoft® Word 2010 verwendet. Abbildungen wurden mittels Microsoft® PowerPoint erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde der hormonelle Einfluss von Estradiol (E) und Medroxyprogesteronacetat (MPA) sowie der Einfluss des Histon-Deacetylase Inhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) auf der mRNA Ebene und der Proteinebene in MCF7-, MDA-MB 231- und T47D Brustkrebszellen untersucht. Die mRNA Expression des CXCR4 und seiner Liganden CXCL12 und MIF wurde mittels Real-time RT-PCR analysiert. Die Protein Expression wurde mittels Western Blot untersucht.

4.2 Methodenetablierung

Real time RT-PCR

Die zur mRNA Expression verwendete Methode, die RT-PCR wurde ausgehend von einem Standardprotokoll durchgeführt (siehe 3.5). Von allen cDNA-Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und in jedem PCR-Lauf wurde eine Kapillare mit der Negativkontrolle Wasser (H₂O) und eine Kapillare mit RNA (-RT) mitgeführt. Als "Housekeeping" Gen wurde die 5-Aminolevulinat-Synthase (ALAS) verwendet. Bei der Anfertigung der Coefficient-Files, die zur Bestimmung der PCR-Effizienz herangezogen wurden, sind für jede Verdünnungsstufe Dreifach-Bestimmungen angefertigt worden (siehe Abb. 4.1) Die Abb. 4.1 gibt die Präzision des Pipettierens wieder. Des Weiteren zeigt die mitgeführte Wasserprobe, dass beim Ansetzen der PCR kontaminationsfrei gearbeitet wurde. Die mitgeführte RNA-Probe, in der sich während der PCR kein spezifisches Produkt bildet, zeigt, dass sich aus der isolierten RNA kein PCR-Produkt generieren lässt und dass somit die RNA keine DNA mehr enthält.

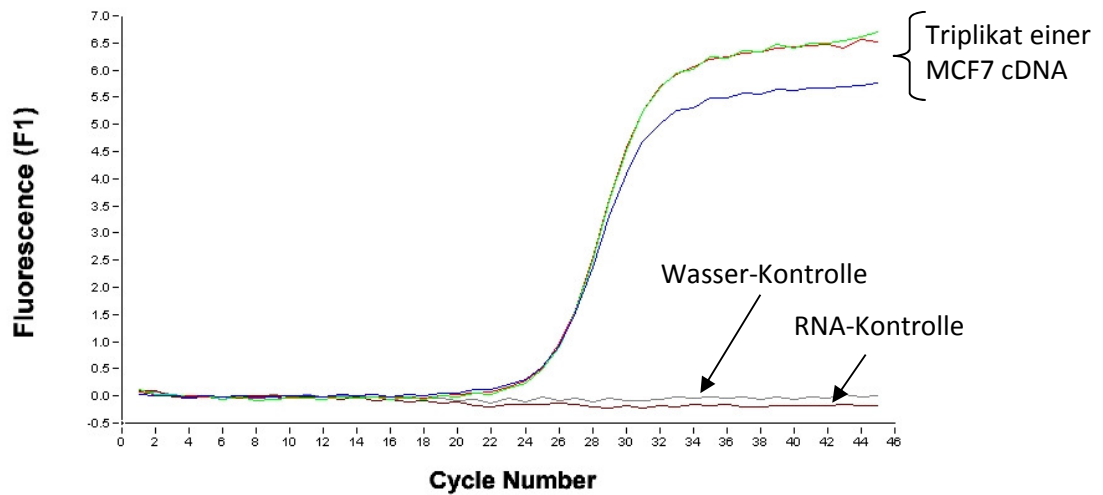


Abbildung 4.1: Beispielhaft wird hier ein Real-time PCR-Lauf gezeigt, der zur Bestimmung der Primer-Effizienz angefertigt wurde.

Western Blot

Die CXCR4 Western Blot wurden ausgehend von einem Standardprotokoll des Labors etabliert. Während der Etablierung wurden verschiedene Antikörper verwendet. Zu Beginn wurde der CXCR4 Antikörper (Anti-Fusin; H-118) von Santa Cruz eingesetzt, ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper. Da der Western Blot mit diesem Antikörper auch nach mehreren methodischen Modifikationen nur unspezifische Banden zeigte, wurde der monoklonale Maus-Anti-CXCR4 Antikörper der Firma R&D Systems (Klon 12G5, IgG2A) ausprobiert. Auch mit diesem Antikörper wurde keine Bande der erwarteten Größe detektiert. Schließlich wurde der CXCR4 – Antikörper (ProSci, Kaninchen-polyklonal) eingesetzt, mit dem ein spezifisches Blot-Ergebnis, nämlich eine Bande mit der nach Literatur zu erwarteten Größe, detektiert werden konnte.

Immunhistologie

Zur Etablierung der Immunhistologie wurde anfangs das Protokoll unter 3.7 Methode II verwendet. Zum Fixieren der Zellen in den Kulturschalen wurden unterschiedliche Verfahren ausprobiert, um spezifische Färbeergebnisse zu erreichen.

Ausgetestet wurden drei verschiedene Fixierungsprotokolle:

- a) 10 Minuten in 1 % Formalin in PBS bei 8 °C
- b) 2 Minuten mit eiskaltem (–20 °C) Ethanol

c) 10 Minuten in 4 % Formalin in PBS bei 8 °C.

Letztendlich war die Fixierung mit 4 % Formalin in PBS bei 8 °C die geeignetste zum Erhalt der Antigenität, allerdings war die Zellmorphologie der am Boden der Kulturschalen fixierten Zellen nicht zufriedenstellend.

Daher modifizierten wir ein Protokoll von ProSci Incorporated, Kalifornien, USA, welches in Methode I unter Punkt 3.7 beschrieben wurde.

Den Primärantikörper ließen wir über Nacht inkubieren, statt einer Stunde, da die Färbung erst dann eine ausreichende Intensität hatte.

Während der Etablierung der Immunfärbung wurden drei verschiedene Antikörper getestet. CXCR4-Antikörper von SantaCruz und der CXCR4-Antikörper von Prosci zeigten zusätzlich zu der erwarteten Membranfärbung auch eine unspezifische Kernfärbung. Im Gegensatz dazu wurden mit dem CXCR4-Antikörper von R&D Systems erwartungsgemäß nur die Zellmembran gefärbt, deshalb wurde dieser Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Für den CXCL12-Nachweis konnte direkt mit Erfolg der Antikörper von R&D Systems angewandt werden.

4.3 Effekte der Steroidhormone auf die Expression des CXCR4 Rezeptors

4.3.1 Der CXCR4: Regulation der Genexpression durch Steroidhormone

4.3.1.1 CXCR4 Expression in MCF7-Zellen

CXCR4 Expression auf der mRNA Ebene

Die CXCR4 mRNA Expression von MCF7 Zellen wurde mittels real-time PCR untersucht. Die graphische Darstellung der Daten ist in Abbildung 4.2 zu sehen. Diese zeigt eine signifikante Erniedrigung der CXCR4 mRNA Expression ($p = 0,0012$) bei einer Steroidhormonbehandlung im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle (EtOH). Im paarweisen Vergleich mittels Dunn's Multiple Comparison Test zeigte sich eine Signifikanz zwischen E (17 β -Estradiol) und der Ethanol (EtOH) Kontrolle ($p < 0,05$) sowie zwischen E + Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und der EtOH Kontrolle ($p < 0,01$). Dies weist daraufhin, dass vor allem die 17 β -

Estradiol, nicht jedoch die MPA-Applikation einem Effekt auf die CXCR4 Expression in MCF7 Zellen ausübt.

Die Mittelwerte sowie Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

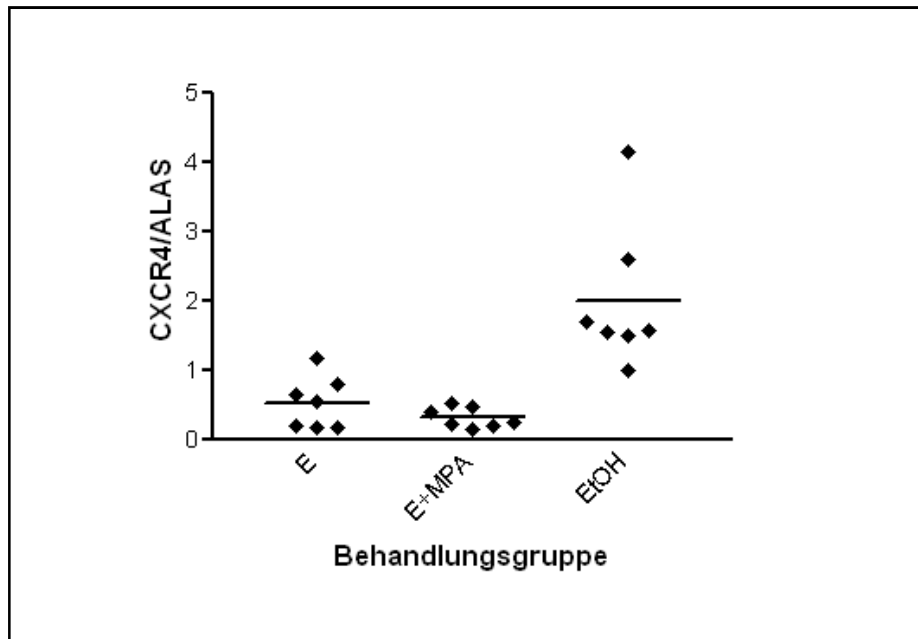


Abbildung 4.2: CXCR4 mRNA Expression in hormonell behandelten MCF7-Zellen. EtOH: Ethanol-Kontrolle; E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat;

Tabelle 4.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in MCF7 Zellen.

Behandlung	E	E+MPA	EtOH
Mittelwert	0,52	0,30	2,00
Standardabweichung	0,38	0,15	1,05

CXCR4 Expression auf der Proteinebene

Die CXCR4 Proteinexpression von MCF7-Zellen wurde mittels Western Blot untersucht. Abb. 4.3 zeigt einen repräsentativen Western Blot und Abbildung 4.4 fasst die Ergebnisse grafisch zusammen.

Die CXCR4 Proteinexpression zeigt keine statistisch Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen ($p = 0,6407$). Auf der Protein-Ebene hat die Steroidhormongabe scheinbar keinen Einfluss auf die CXCR4 Expression in MCF7-Zellen, obwohl auf der mRNA-Ebene eine starke Regulation zu beobachten war.

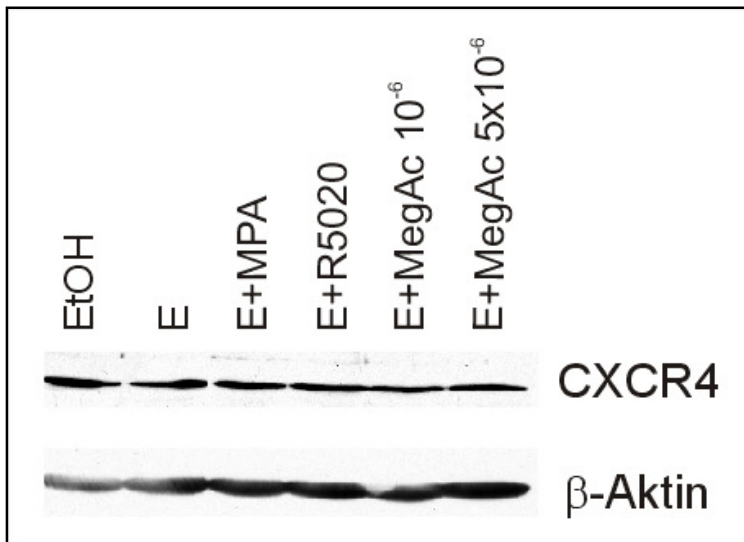


Abbildung 4.3: Repräsentativer Western-Blot zum Nachweis der CXCR4 Protein-Expression in MCF7-Zellen. Das „Housekeeping Protein“ β-Aktin dient als Ladungskontrolle. EtOH: Ethanol-Kontrolle; E : 17 β-Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; Meg-Ac: Megestrol-Acetat

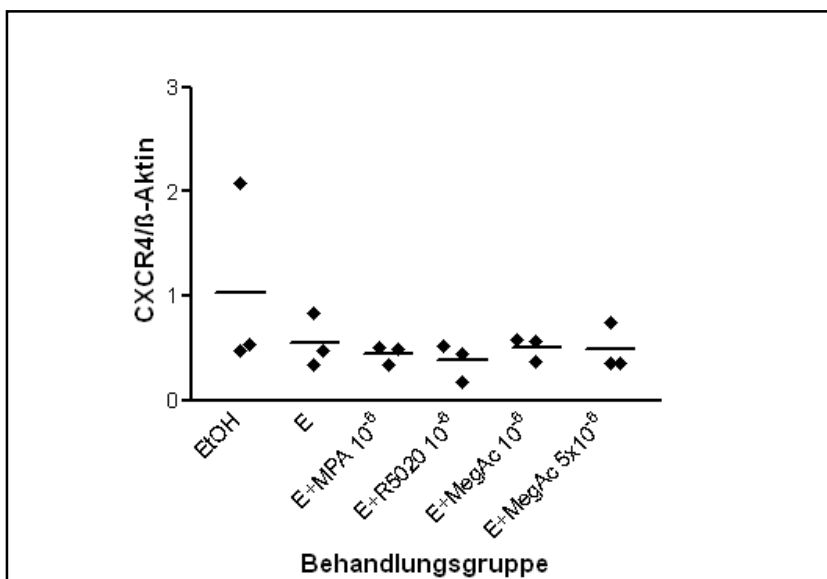


Abbildung 4.4: Quantifizierung der CXCR4-Western Blot Ergebnisse aus den MCF7-Zellen. EtOH: Ethanol-Kontrolle; E : 17 β-Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; Meg-Ac: Megestrol-Acetat

Tabelle 4.2: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen.

Hormonelle Behandlung	EtOH	E	E+MPA 10 ⁻⁶	E+R5020 10 ⁻⁶	E+MegAc 10 ⁻⁶	E+MegAc 5 x 10 ⁻⁶
Mittelwert	1,03	0,55	0,44	0,38	0,50	0,49
Standardabweichung	0,92	0,25	0,09	0,18	0,11	0,23

Lokalisierung der CXCR4 Protein Expression mittels Immunhistochemie

Zur Lokalisation der CXCR4 Proteinexpression wurde an den MCF7-Zellen mittels Immunhistochemie durchgeführt. Die Zellen wurden wie folgt behandelt: EtOH, E, E+MPA behandelt.

Circa 70 Prozent der MCF7-Zellen zeigen eine membranständige Anfärbung mit dem CXCR4-Antigen. Verwendet wurde der CXCR4 Antikörper von R&D Systems in einer Konzentration von 1:100. Die beiden Negativkontrollen, ohne 1. Antikörper und Non-Immunsersum, zeigten keine Immunfärbung (Abb. 4.5)

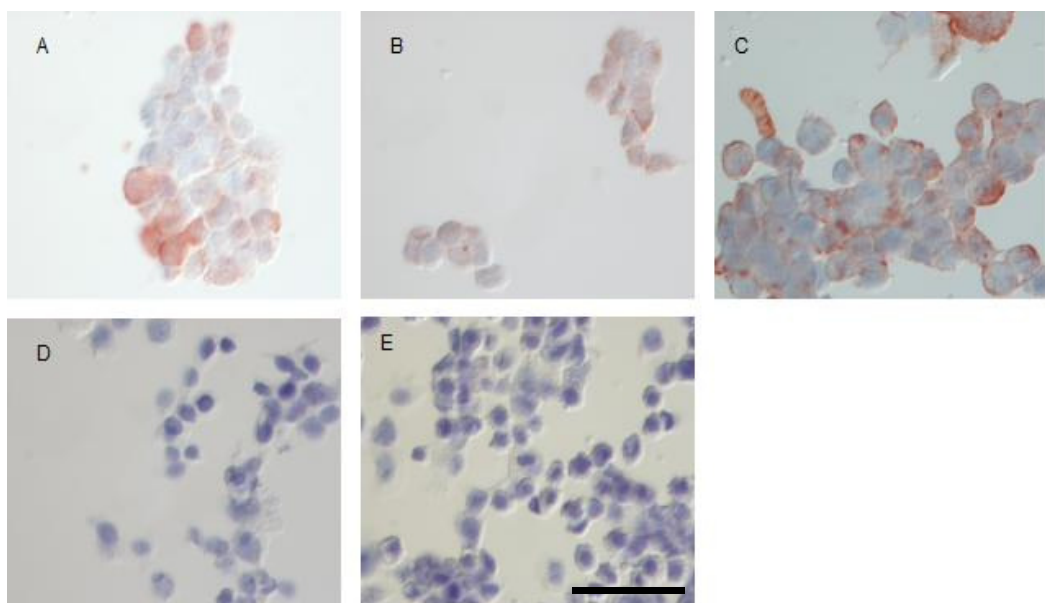


Abbildung 4.5: Lokalisation der CXCR4 Protein Expression in MCF7-Zellen nach Kultivierung mit EtOH (A), 17 β -Estradiol (B) sowie E+MPA (C). Der Nachweis der Spezifität der CXCR4-Immunhistologie wurden mittels „non-immune“ Maus-IgG (1:20 verdünnt) (D) sowie durch das Weglassen des CXCR4-Antikörpers (E) gezeigt. Alle Bilder wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen. Maßstab in E: 100 μ m

4.3.1.2 CXCR4 Expression in MDA-MB 231 Zellen

CXCR4 Expression auf der mRNA Ebene

Die CXCR4 mRNA Expression von MDA-MB 231 Zellen wurde mittels real time RT-PCR relativ quantifiziert. Abb. 4.6 zeigt die Ergebnisse. Zwischen den Behandlungsgruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,7160$). Somit haben die applizierten Steroidhormone keinen Einfluss auf die CXCR4 Expression in MDA-MB 231 Zellen.

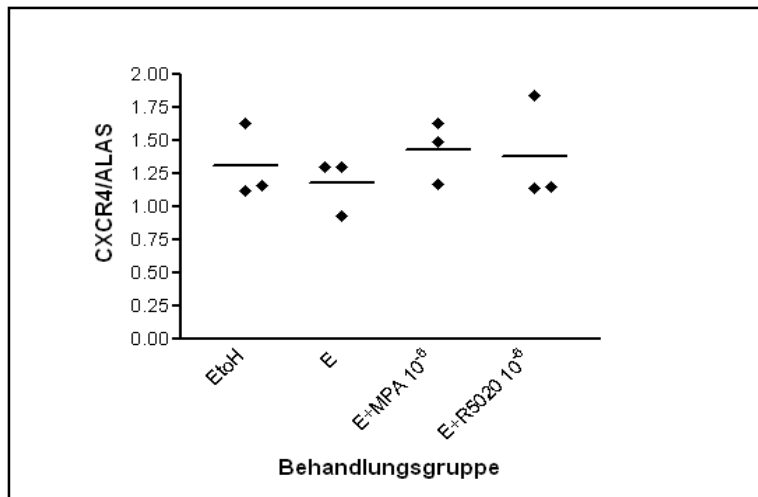


Abbildung 4.6: CXCR4 mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen

EtOH: Ethanol-Kontrolle; E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist.

Tabelle 4.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen

Hormonelle Behandlung	EtOH	E	E+MPA 10 ⁻⁶	E+R5020 10 ⁻⁶
Mittelwert	1,30	1,78	1,43	1,38
Standardabweichung	0,28	0,21	0,24	0,40

CXCR4 Expression auf der Proteinebene

Abbildung 4.7 zeigt einen repräsentativen Western Blot und Abbildung 4.8 sowie Tabelle 4.4 zeigen die Ergebnisse der Quantifizierung. Wie schon auf der mRNA-Ebene zeigen die Steroidhormone auch auf der Protein-Ebene keinen Einfluss auf die CXCR4 Protein-Expression in MDA-MB 231 Zellen ($p = 0,7490$).

Um zu überprüfen, ob wie in der Literatur durch Palmieri und Mitarbeiter (2005) beschrieben eine alleinige Gabe von Gestagenen einen Effekt auf die MDA-MB-231-Zellen ausübt, sind die Zellen mit E bzw. mit MPA oder R5020 allein behandelt worden. Palmieri und Mitarbeiter konnten 2005 eine gesteigerte Expression des Metastasen Suppressor Gens Nm23-H1 durch eine MPA Behandlung nachweisen. Dieser Effekt konnte bei den Progesteronrezeptor-negativen Zellen durch den Glukokortikoidrezeptor erreicht werden.

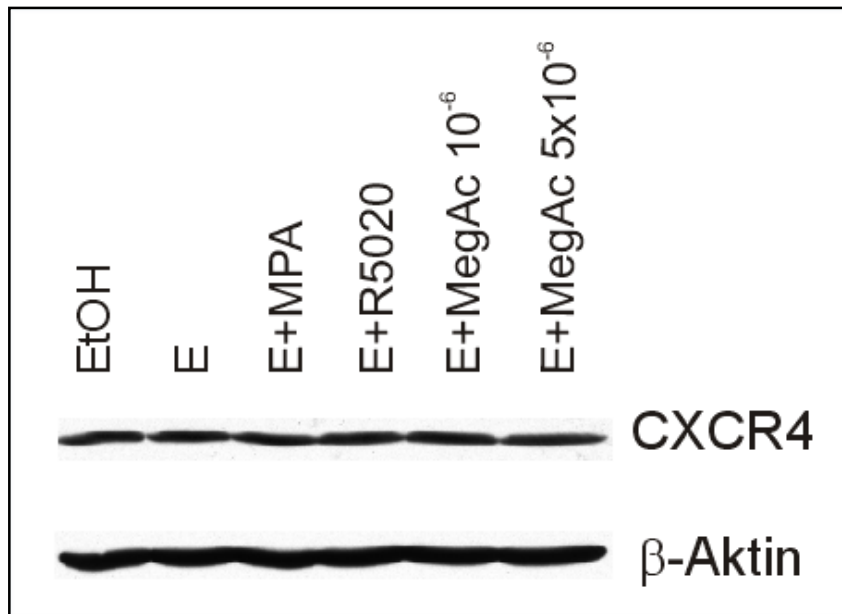


Abbildung 4.7: Repräsentativer CXCR4 Western-Blot von MDA-MB 231 Zellen
EtOH: Ethanol-Kontrolle E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist; Meg-Ac: Megestrol-Acetat

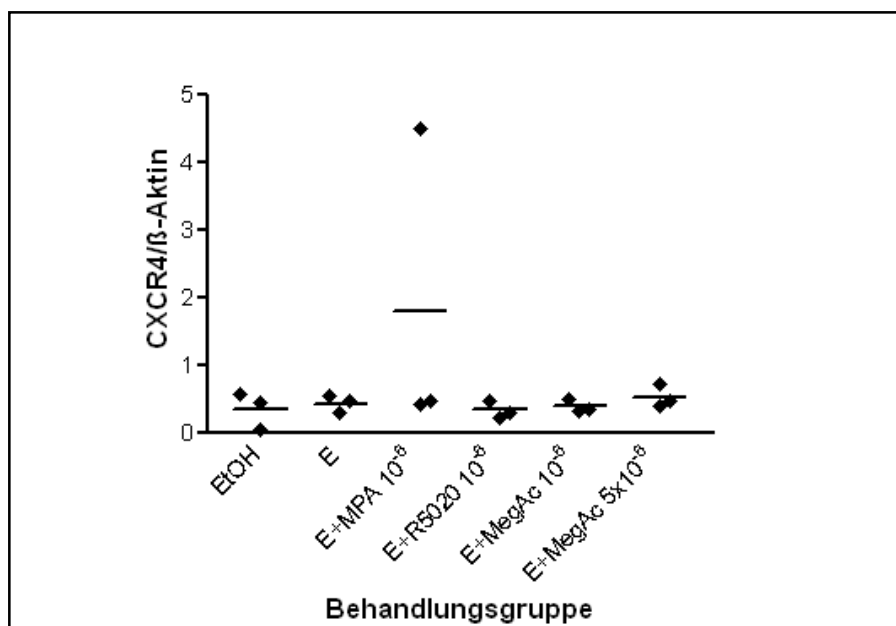


Abbildung 4.8: Quantifizierung der CXCR4-Western Blot Ergebnisse der MDA-MB 231 Zellen
EtOH: Ethanol-Kontrolle; E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist; Meg-Ac: Megestrol-Acetat

Tabelle 4.4: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MDA-MB 231 Zellen

Hormonelle Behandlung	EtOH	E	E+MPA 10^{-6}	E+R5020 10^{-6}	E+MegAc 10^{-6}	E+MegAc 5×10^{-6}
Mittelwert	0,35	0,43	1,79	0,33	0,38	0,53
Standardabweichung	0,27	0,12	2,34	0,13	0,88	0,18

Abbildung 4.9 und Tabelle 4.5 zeigen jedoch, dass auch die alleinige Applikation von einem Gestagen keinen Einfluss auf die CXCR4-Expression nimmt ($p = 0,4724$).

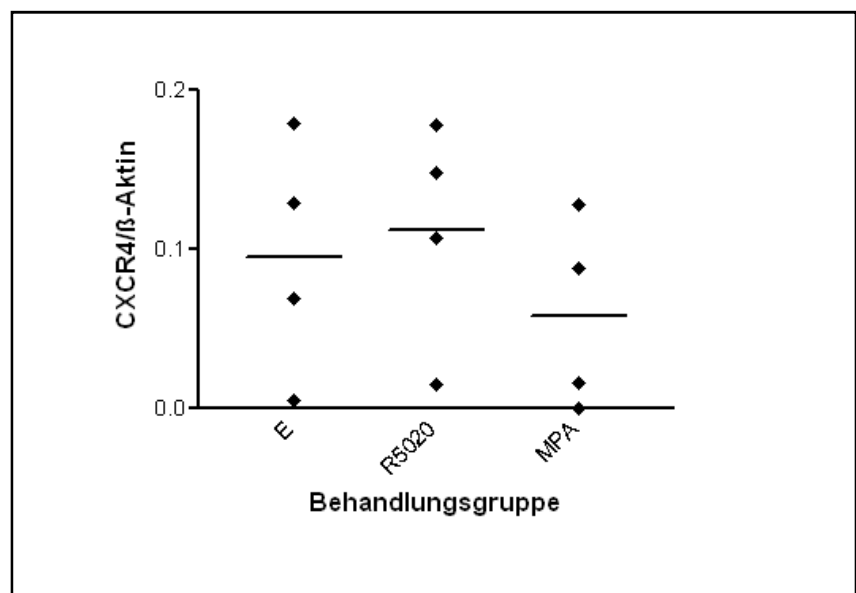


Abbildung 4.9: CXCR4 Protein Expression in MDA-MB 231 Zellen nach alleiniger Behandlung mit Gestagen E : 17β-Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist

Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MDA-MB 231 Zellen nach alleiniger Behandlung mit 17 β-Estradiol oder einem Gestagen

Hormonelle Behandlung	E	R5020	MPA
Mittelwert	0,10	0,11	0,06
Standardabweichung	0,08	0,07	0,06

4.3.1.3 CXCR4 Expression in T47D Zellen

CXCR4 Expression auf der mRNA Ebene

Die CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen wurde mittels real time RT-PCR analysiert (Abb. 4.10). Obwohl der Mittelwert der CXCR4 mRNA Expression in den mit 17 β-Estradiol (E) behandelten Zellen um den Faktor 3 über den der Ethanol-Kontrollgruppe (EtOH) behandelten Zellen lag, konnte aufgrund der hohen Variabilität der CXCR4 mRNA Expression zwischen den untersuchten Passagen keine statistische Signifikanz erreicht werden (Kruskal Wallis $p = 0,0862$). Die kombinierte Applikation von 17 β-Estradiol und MPA senkt die

CXCR4 mRNA Expression auf das Niveau der hormonfrei kultivierten Zellen. MPA supprimiert somit die durch 17 β -Estradiol-gesteigerte CXCR4 mRNA-Expression in der T47D-Brustkrebs-Zelllinie.

Aus der EtOH Kontrollgruppe wurde ein Ausreißer herausgenommen. Dies wurde mit einem im Internet frei zugänglichen Programm mittels outlier Test errechnet (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>).

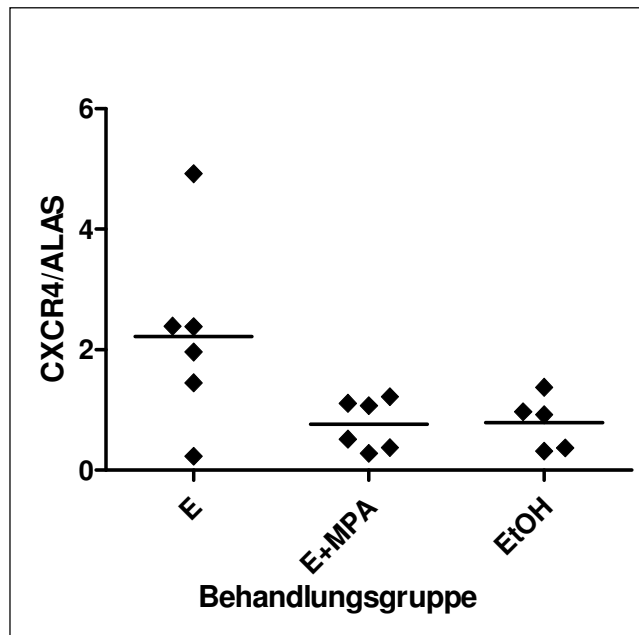


Abbildung 4.10: CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; EtOH: Ethanol-Kontrolle

Tabelle 4.6: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen

Hormonelle Behandlung	E	E+MPA	EtOH
Mittelwert	2,22	0,76	0,80
Standardabweichung	1,55	0,42	0,45

4.4 TSA-Effekte auf Mammacarcinom – Zelllinien

Dosis und Einwirkdauer von Trichostatin A (TSA) können verschiedene Effekte in unterschiedlichen Zelllinie hervorrufen. Bekanntermaßen wirkt TSA in höheren Dosierungen zytotoxisch. Damit werden bei höheren Dosierungen vor allem die Zytotoxizität-Effekte im Vordergrund stehen und nicht die eher physiologischen regulatorischen Effekte z.B. im Rahmen der Steroidhormon regulierten Genexpression. Um eine Dosis und Zeitpunktfindung für die

Kombinationsversuche von TSA und Steroiden durchzuführen, wurde der Effekt von verschiedenen TSA-Konzentrationen auf die Viabilität der drei untersuchten Zelllinien durchgeführt. Die Viabilitäts-Untersuchungen wurden zum Zeitpunkt 48 und 96 Stunden durchgeführt: entweder mittels MTT-Assay oder durch mikroskopische Inspektion der Zellen. Die optische Dichte (OD)-Messung der MTT-Assays korreliert mit dem Vorhandensein vitaler Zellen, d.h. eine hohe OD korreliert mit einer hohen Anzahl von vitalen Zellen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.11 bis 4.14 zu entnehmen (Die Daten wurden freundlicherweise von C. Krusche und V. Creutz zur Verfügung gestellt).

Abbildung 4.15 zeigt die jeweiligen Regressionskurven der Ergebnisse. Diese wurden wie auch alle anderen Graphiken mittels GraphPad Prism erstellt. Mittels $\log(\text{inhibitor})$ vs. Wirkung wurde der Determinationskoeffizient R^2 ermittelt. Dieses Bestimmungsmaß liegt zwischen 0 und 1. Ist $R^2 = 0$ besteht kein Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung, bei $R^2 = 1$ besteht ein perfekter Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung.

4.4.1 Zellvitalitäts-Messungen (MTT-Assay) nach Behandlung mit Trichostatin A

4.4.1.1 MCF7 Zellen

Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse des MTT-Assays in MCF7 Zellen nach 48 stündiger TSA-Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen. Tabelle 4.7 fasst die Mittelwerte und Standardabweichungen zusammen.

Jedoch ist hier eine eindeutige Tendenz der OD nach einer TSA Behandlung zu erkennen. Ab einer TSA Konzentration von 0,2 $\mu\text{M/L}$ sinkt die OD um knapp die Hälfte ab, was eine Reduktion der vitalen Zellen um 50 % entspricht. Auch bei den höheren TSA Konzentrationen ist zu diesem Zeitpunkt eine Reduktion der OD um 50 % zu beobachten.

Die Regressionskurve zeigt ein R^2 von 0,5129 (Abbildung 4.15). Somit ist zum Zeitpunkt nach 48 Stunden TSA-Behandlung keine eindeutigen Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erkennen.

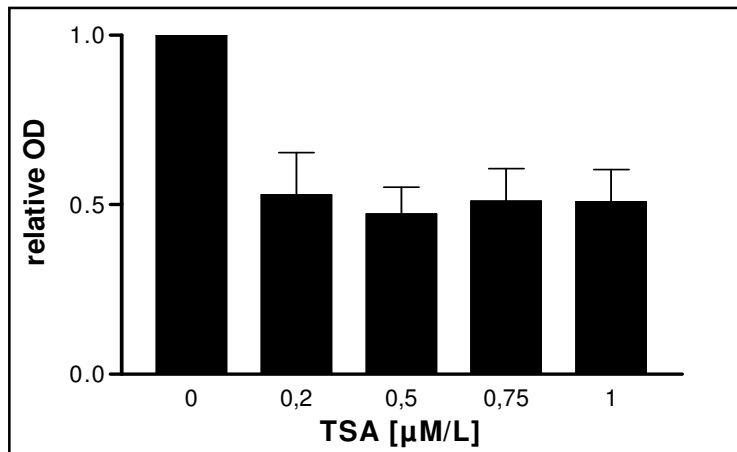


Abbildung 4.11: Ergebnisse des Zellvitalitäts-Messung (MTT)-Assay in MCF7-Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit verschiedenen TSA Konzentrationen.

Tabelle 4.7: Mittelwerte und Standardabweichungen der MCF7-Zellen nach 48 Stunden TSA-Behandlung in den angegebenen Konzentrationen

TSA Konzentration [μM/L]	0	0,2	0,5	0,75	1
Mittelwert	1	0,53	0,47	0,51	0,51
Standardabweichung	0	0,22	0,14	0,17	0,17

Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse der OD Messung in MCF7 Zellen nach 96 Stunden TSA Behandlung in den angegebenen Konzentrationen.

Zu diesem Zeitpunkt besteht eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung in den MCF7 Zellen (siehe Regressionskurve in Abb. 4.15; $R^2 = 0,8271$). Tabelle 4.8 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen.

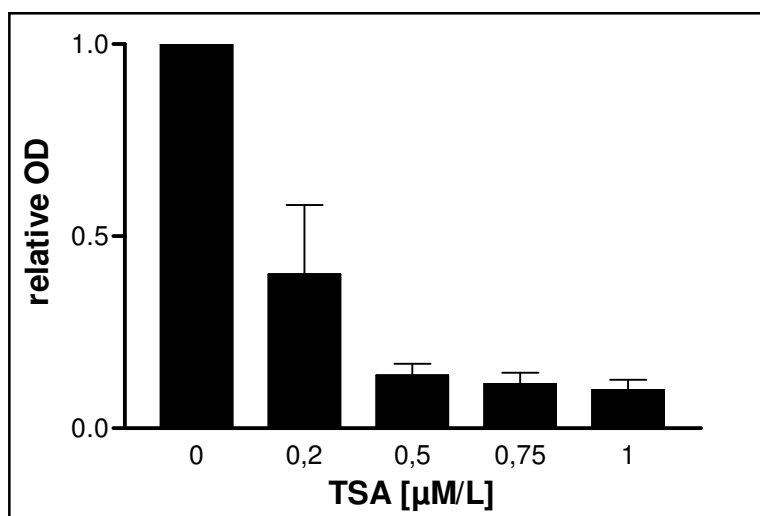


Abbildung 4.12: Ergebnisse des Zellvitalitäts-Messung (MTT-Assay) in MCF7-Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit verschiedenen TSA-Konzentrationen.

Tabelle 4.8: Mittelwerte und Standardabweichungen der MCF7-Zellen nach 96 h TSA in verschiedenen Konzentrationen

TSA Konzentration [$\mu\text{M/L}$]	0	0,2	0,5	0,75	1
Mittelwert	1	0,40	1,38	0,12	0,10
Standardabweichung	0	0,31	0,05	0,05	0,05

4.4.1.2 MDA-MB 231 Zellen

Abbildung 4.13 zeigt eine Abnahme der OD mit zunehmender TSA Konzentration nach 48h Inkubationszeit. Tabelle 4.9 zeigt die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen. Nach 48 stündiger Inkubationszeit zeigt sich mit R^2 gleich 0,8004 eine sehr gute Annäherung an die Ideale Regressionskurve. Die Regressionskurve ist der Abbildung 4.15 zu entnehmen. Es ist eine eindeutige Abnahme der OD mit steigender TSA Konzentration zu erkennen.

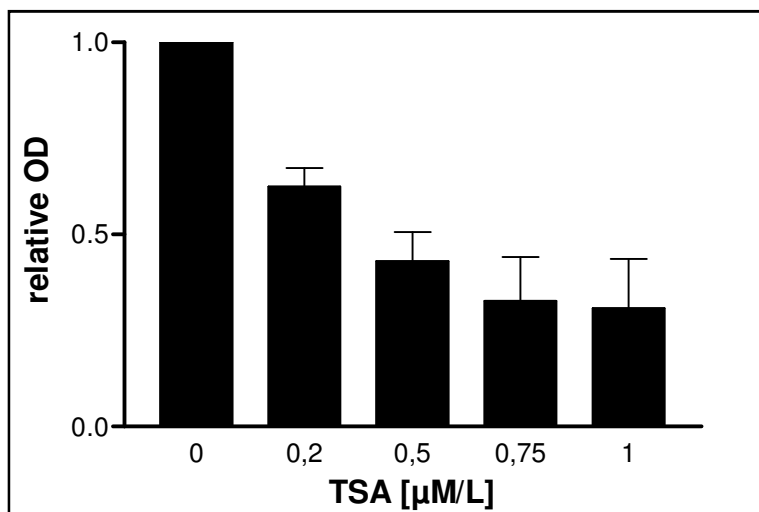


Abbildung 4.13: relativierte Ergebnisse des MTT-Assays von MDA-MB 231 Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit TSA mit steigenden Konzentrationen.

Tabelle 4.9: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen OD des MTT-Assays von MDA-MB 231 Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit TSA in steigenden Konzentrationen

TSA Konzentration [$\mu\text{M/L}$]	0	0,2	0,5	0,75	1
Mittelwert	1	0,62	0,43	0,33	0,31
Standardabweichung	0	0,08	0,13	0,20	0,22

Nach 96 stündiger Inkubationszeit weist R^2 einen Wert von 0,9404 auf und somit einen fast perfekten Zusammenhang zwischen Dosis und Wirkung. Abbildung 4.14 zeigt eine Abnahme der OD mit zunehmender TSA Konzentration. Tabelle 4.10 zeigt die dazugehörigen Mittelwerte und

Standardabweichungen. Die entsprechende Dosis-Wirkungs-Kurve ist der Abbildung 4.15 zu entnehmen.

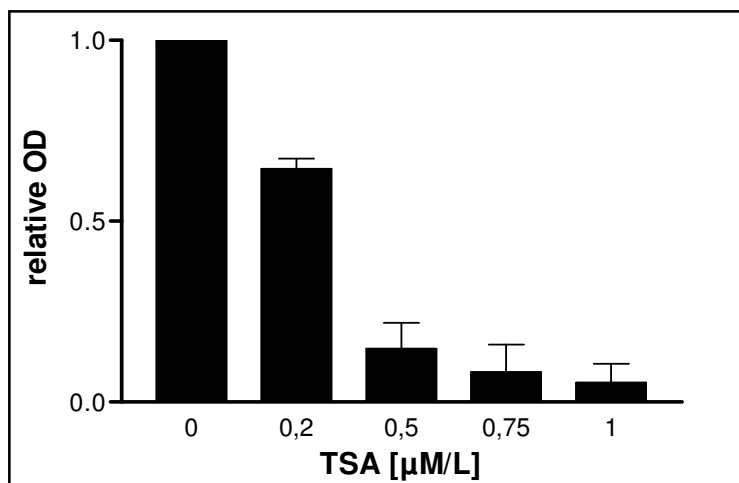


Abbildung 4.14: relativierte Ergebnisse des MTT-Assays von MDA-MB 231 Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit TSA mit steigenden Konzentrationen.

Tabelle 4.10: Mittelwerte und Standardabweichungen der MDA-MB 231 Zellen nach 96 h TSA in verschiedenen Konzentrationen

TSA Konzentration [µM/L]	0	0,2	0,5	0,75	1
Mittelwert	1	0,64	0,15	0,08	0,05
Standardabweichung	0	0,05	0,13	0,13	0,09

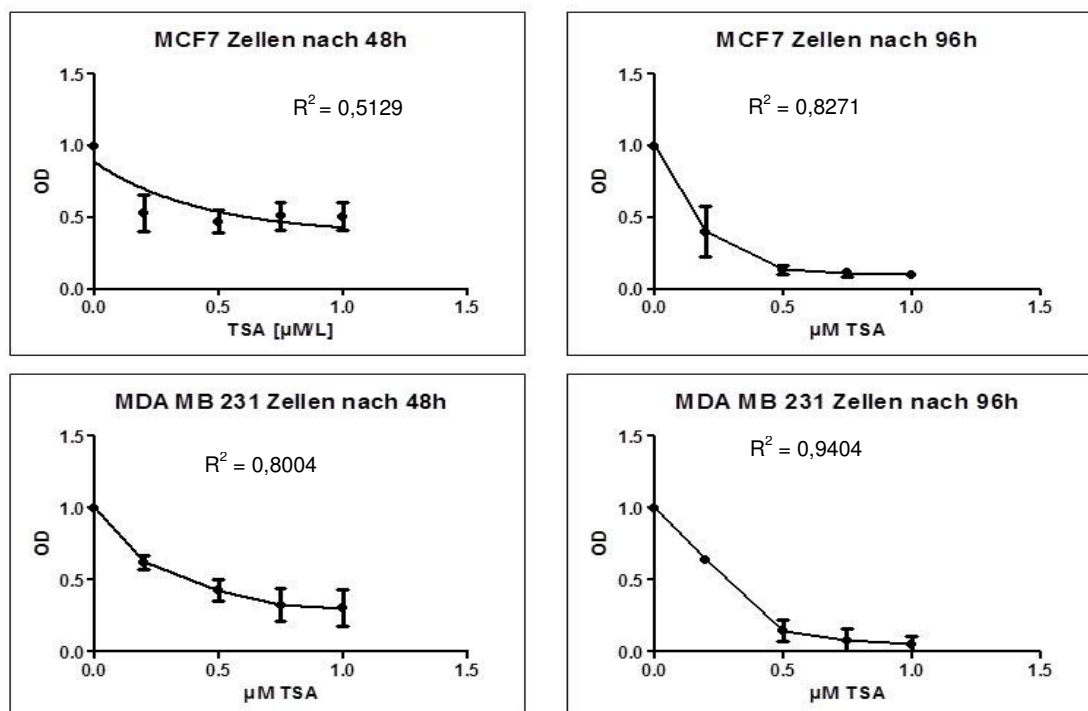


Abbildung 4.15: Trichostatin A (TSA) Dosis-Wirkungskurven in MCF7 und MDA-MB 231 Zellen nach 48 h und 96 Stunden Inkubation. Die R^2 -Werte geben die Übereinstimmung der Regressionskurve mit der Idealkurve der Dosis-Wirkungs-Beziehung an ($R^2 = 1$ entspricht einer 100% igen Übereinstimmung)

4.4.1.3 T47D Zellen

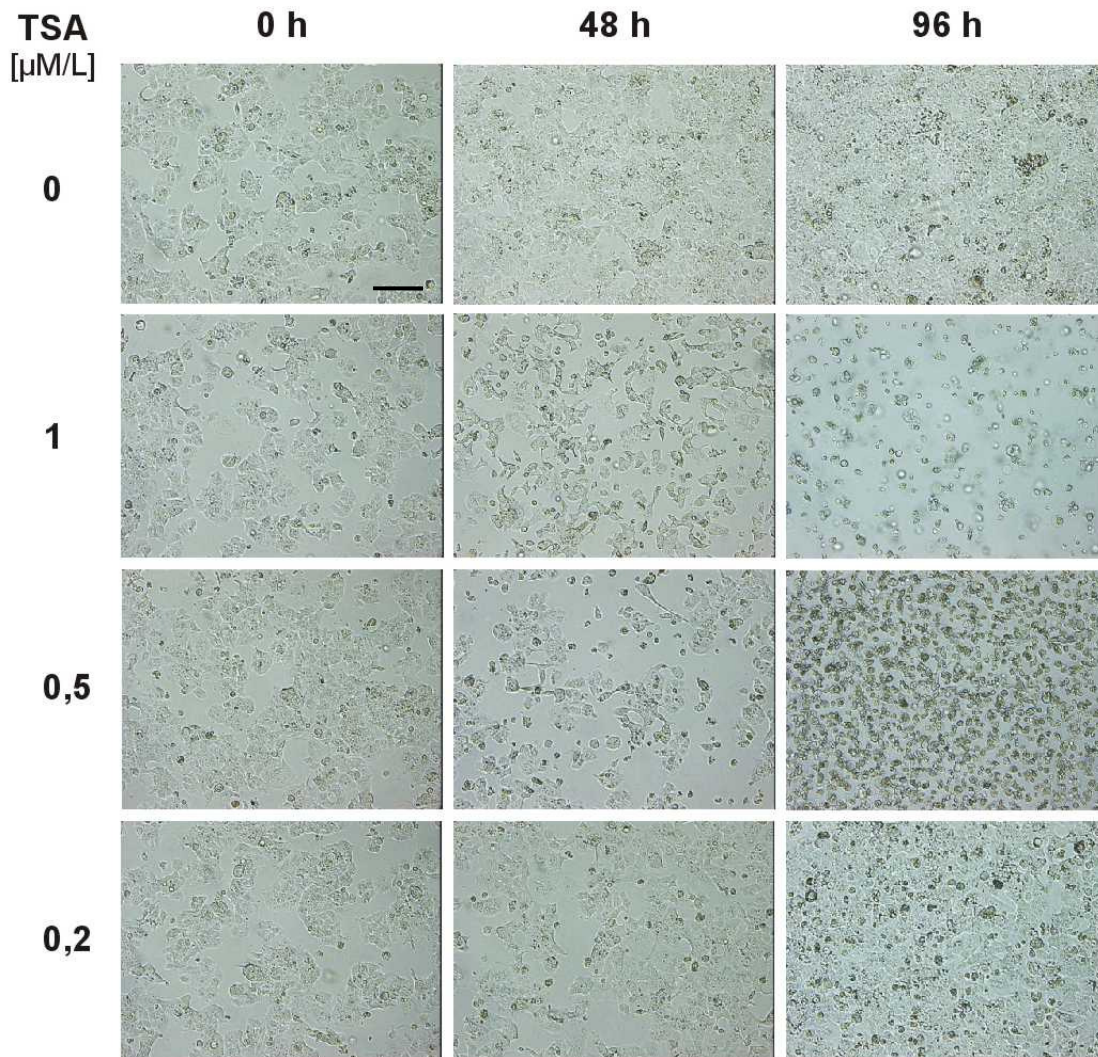


Abbildung 4.16: T47D-Zellen nach 48 und 96 Stunden Inkubation mit Trichostatin A (TSA) in den Konzentration 0,2 µM/l, 0,5 µM/l und 1 µM/l steigenden Konzentrationen. Alle Aufnahmen wurden mit derselben Vergrößerung aufgenommen. Maßstab = 100 µm

Um den Einfluss von den verschiedenen, getesteten TSA-Konzentration auf T47D-Zellen zu untersuchen, wurde die Zellzahl, Grad der Konfluenz und die Zellmorphologie der T47D Zellen für 96 Stunden beobachtet (siehe Abbildung 4.16). Die T47D-Zellen wurden - wie zuvor die MDA-MB 231 und MCF7-Zellen - mit EtOH (Kontrolle), 1 µM/L, 0,5 µM/L und 0,2 µM/L TSA kultiviert. Die Zellen sind vor dem Beginn der TSA-Behandlung (Zeitpunkt 0 h) nach dem Aussäen in die frischen Kulturfラスchen 2 Tage vorkultiviert worden, damit sie genügend Zeit zum Anheften hatten. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop beobachtet und alle 48 Stunden fotografiert.

Mit steigender TSA Konzentration kam es zu deutlichen Veränderungen der Zellmorphologie (siehe Abbildung 4.16). Bei einer TSA Konzentration von 0,2 $\mu\text{M/L}$ sind Zellen nach 96 Stunden Kultur noch konfluent, erreichen aber nicht die Dichte der unbehandelten Zellen. Die Zellen, die mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA kultiviert wurden, zeigen zum Zeitpunkt 48 Stunden bereits eine reduzierte Zellzahl sowohl im Vergleich zum Versuchsbeginn als auch zu den unbehandelten Kontroll-Zellen. Beim Zeitpunkt 96 Stunden sind die mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA behandelten Zellen abgerundet und von der Platte abgelöst. Bei einer TSA Konzentration von 1 $\mu\text{M/L}$ sind diese Effekte noch stärker ausgeprägt. Dies ist besonders nach 96 Stunden Kultivierung deutlich zu sehen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl die TSA Konzentration als auch die Inkubationszeit eine entscheidende Rolle auf die Ausprägung der TSA-Wirkung zeigen.

4.4.2 Der Effekt der TSA-Inkubationszeit auf die CXCR4-Expression

4.4.2.1 CXCR4 Expression in TSA-behandelten MCF7 Zellen

Die CXCR4 Proteinexpression wurde in MCF7 Zellen, die 12 bis 72 Stunden mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA kultiviert wurden, mittels Western Blot analysiert. Die Abbildung 4.18 zeigt ein repräsentatives Western Blot- Ergebnis, welches bei der Untersuchung von 3 aufeinanderfolgenden Passagen von MCF7 Zellen gewonnen wurden. Abbildung 4.17 fasst die quantitative Auswertung der Western Blot Ergebnisse zusammen und Tabelle 4.11 enthält Mittelwerte und Standardabweichungen. Die Inkubations-Zeit hatte bei zwei der drei untersuchten Passagen einen deutlichen Effekt auf die CXCR4 Protein - Expression der MCF7 Zellen. Allerdings konnte in der dritten untersuchten Passage – trotz korrekter technischer Durchführung des Experimentes - kein Effekt der Zeit auf die CXCR4 Proteinexpression gezeigt werden. Insgesamt zeigt sich eine Reduktion der CXCR4 Expression um den Faktor 2,4 nach 72 Stunden TSA Behandlung (Kruskal Wallis Test: $p = 0,3309$).

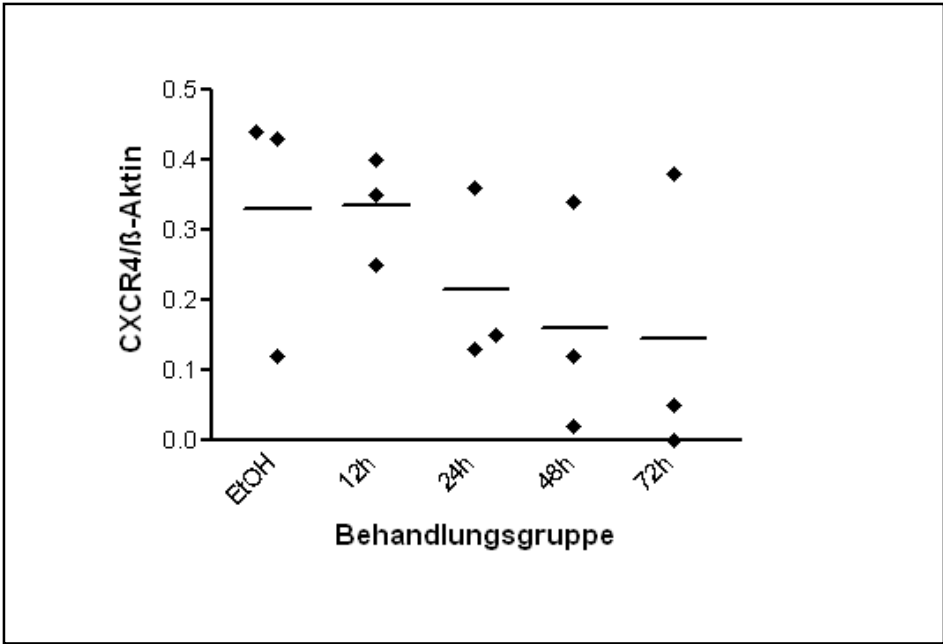


Abbildung 4.17: CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen nach 12-72 Stunden Inkubation mit 0,5 µM/L Trichostatin A

Tabelle 4.11: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen nach 12 bis 72 Stunden Inkubation mit 0,5 µM/L Trichostatin A (TSA)

TSA Behandlung	EtOH	12h	24h	48h	72h
Mittelwert	0,33	0,33	0,21	0,16	0,14
Standardabweichung	0,18	0,08	0,13	0,16	0,21

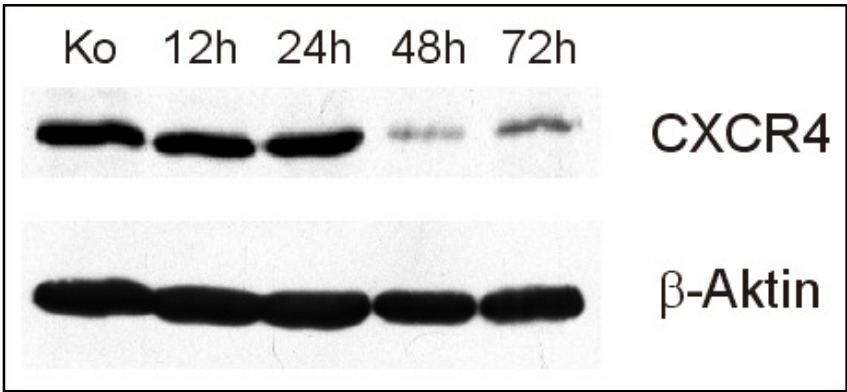


Abbildung 4.18: CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen nach 12-72 Stunden Inkubation mit 0,5 µM/L Trichostatin A: der Western-Blot zeigt die Ergebnisse der beiden MCF7-Passagen, bei denen ein Effekt der Inkubations-Zeit beobachtet werden konnte.

4.4.2.2 CXCR4 Expression in MDA-MB 231 Zellen

Mittels Western Blot wurde die CXCR4 Proteinexpression in MDA-MB 231 Zellen nach 12 - 72 Stunden Behandlung mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA analysiert. Abbildung 4.19 und 4.20 zeigen die Ergebnisse. Nach 72 Stunden Inkubation mit TSA gibt es einen Ausreißer, ansonsten verändert sich die CXCR4 Expression über den untersuchten Zeitraum durch die TSA-Behandlung nicht (Kruskal-Wallis Test $p = 0,6747$).

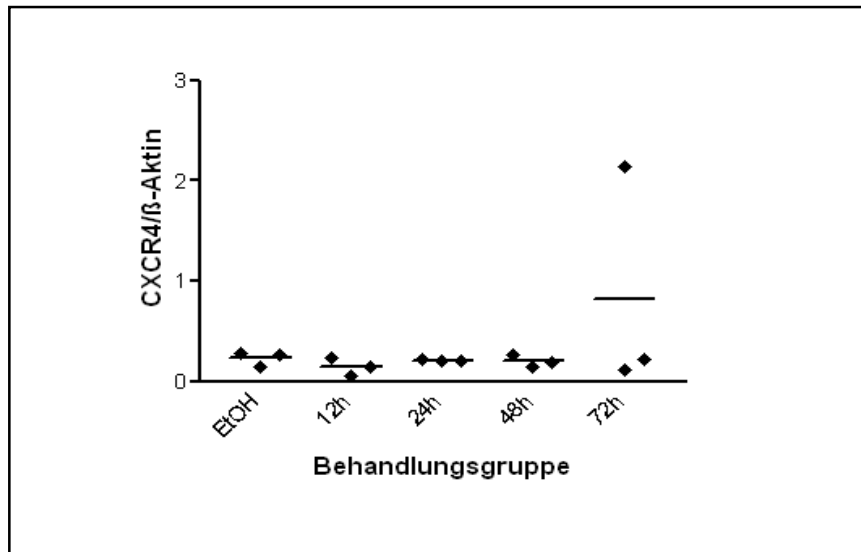


Abbildung 4.19: CXCR4 Protein Expression in MDA MB 231 Zellen nach 12-72 Stunden Inkubation mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A; EtOH: mit Ethanol kultivierte Kontroll-Zellen

Tabelle 4.12: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MDA-MB 231 Zellen über 72 h

TSA Behandlung	EtOH	12h	24h	48h	72h
Mittelwert	0,23	0,14	0,21	0,20	0,82
Standardabweichung	0,07	0,09	0,01	0,06	1,14

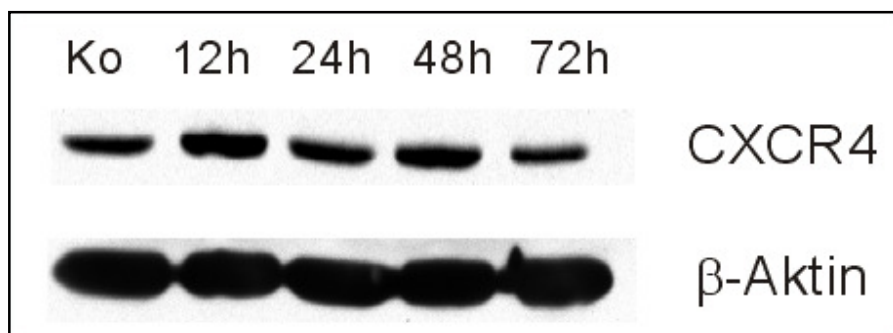


Abbildung 4.20: Der repräsentative Western Blot zeigt die CXCR4 Expression in MDA-MB 231 Zellen nach 12-72 Stunden Inkubation mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A.

4.5 Die Beeinflussung der CXCR4 Genexpression durch die kombinierte Gabe von TSA und Steroidhormonen auf die von Mammacarcinom – Zelllinien

4.5.1 MCF7 Zellen

CXCR4 Expression auf der mRNA Ebene

Die CXCR4 mRNA Expression wurde in MCF7 Zellen unter verschiedenen hormonellen Bedingungen untersucht. TSA wurde in den Konzentrationen 0,2 $\mu\text{M/L}$ sowie 0,5 $\mu\text{M/L}$ verwendet. Die CXCR4 mRNA-Expression wurden mittels real time RT-PCR analysiert.

In den Versuchsgruppen, in denen mit einer TSA Konzentration von 0,2 $\mu\text{M/L}$ gearbeitet wurde, zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der CXCR4 mRNA-Expression zwischen den MCF7-Zellen die mit TSA bzw. mit der Vehikel-Kontrolle Ethanol behandelt wurden ($p > 0,05$). Abbildung 4.21 zeigt die graphische Darstellung und Tabelle 4.13 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen.

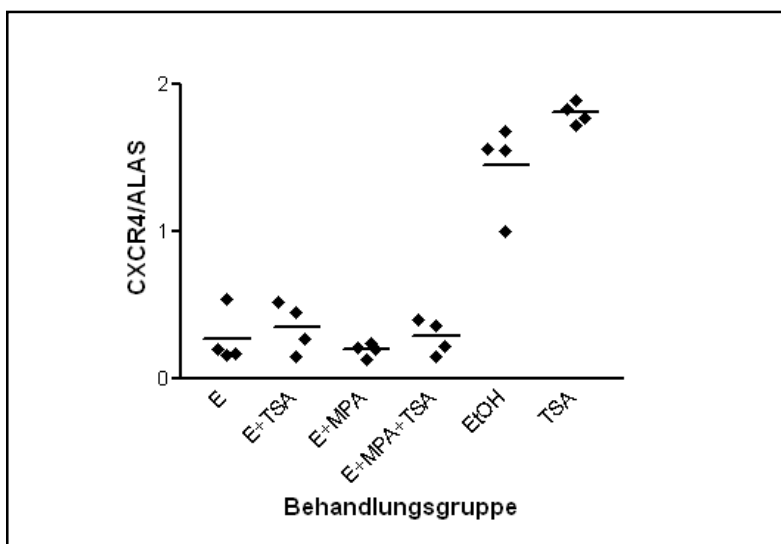


Abbildung 4.21: CXCR4 mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und mit 0,2 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.13: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und mit 0,2 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	0,27	0,35	0,20	0,28	1,45	1,80
Standardabweichung	0,18	0,17	0,05	0,12	0,30	0,07

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der schon zytotoxisch wirkenden TSA Konzentration von 0,5 μ M/L zeigte sich zwischen den einzelnen Behandlungen signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis Test $p < 0,0049$). In den Post Hoc-Tests (Dunn's Multiple Comparison Test) wurden jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht, was auf die Anzahl der Versuchsdurchläufe ($n = 3$) zurückzuführen ist.

Die Daten zeigen jedoch, dass mit der Dosis von 0,5 μ M/L TSA eine Steigerung der durch 17 β -Estradiol unterdrückten CXCR4 mRNA-Expression erreicht wird. Abbildung 4.22 zeigt die graphische Darstellung und Tabelle 4.14 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse.

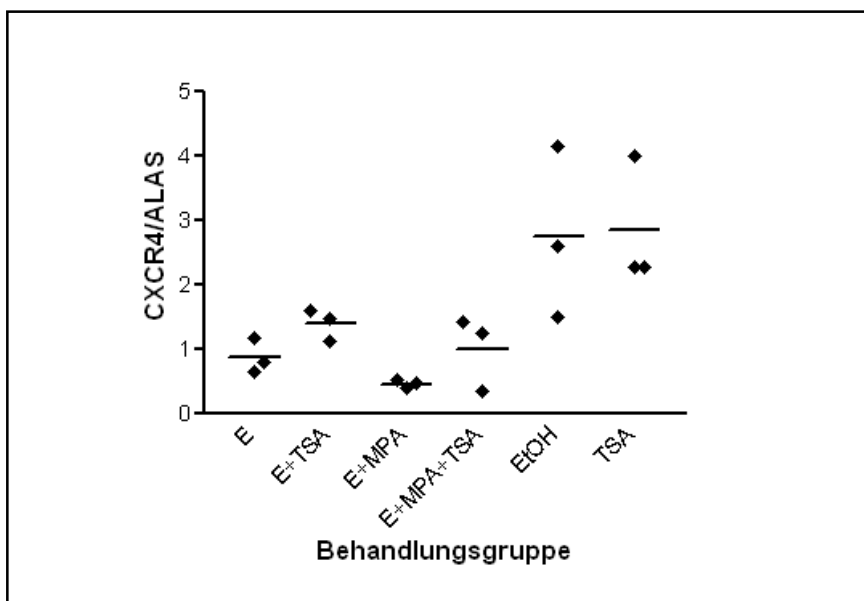


Abbildung 4.22: CXCR4 mRNA Expression in MCF7 nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.14: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	0,86	1,39	0,45	1,00	2,73	2,84
Standardabweichung	0,27	0,25	0,07	0,57	1,33	1,01

CXCR4 Expression auf der Proteinebene

Die CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA wurde mittels Western Blot ermittelt. Abgebildet sind diese Daten in der Abbildung 4.23 und ihre Mittelwerte und Standardabweichungen in Tabelle 4.15. Auf Proteinebene zeigte sich – wie auf der mRNA-Ebene – eine herabgesetzte CXCR4 Expression bei der Behandlung mit Steroiden. Durch 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA wird kein Effekt auf die CXCR4 Protein-Expression in E und E+MPA behandelten MCF7-Zellen ausgeübt. Die ohne Hormone kultivierten MCF7-Zellen zeigen unter 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA eine leichte Steigerung der CXCR4 Protein-Expression im Vergleich zu den ohne TSA-kultivierten Zellen.

Der Kruskal-Wallis Test ergab eine statistische Signifikanz mit $p = 0,0009$. Beim anschließenden Post Hoc-Test zeigte sich im paarweisen Vergleich der Gruppen keine Signifikanz (Dunn's Multiple Comparison Test; E vs. E+TSA, E+MPA vs. E+MPA+TSA sowie EtOH vs. TSA: $p > 0,05$). Die Ergebnisse auf der Proteinebene reflektieren die Ergebnisse der mRNA Ebene.

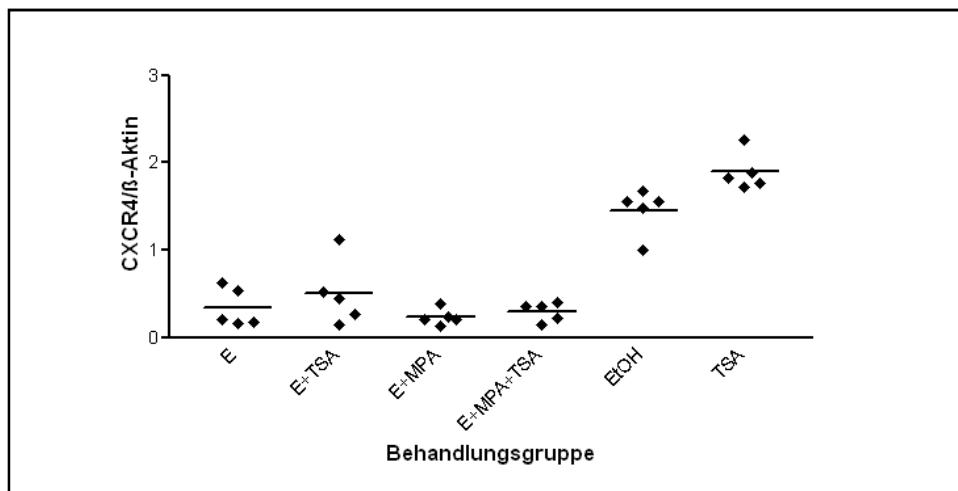


Abbildung 4.23: CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.15: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 Protein Expression in MCF7 Zellen mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	0,34	0,50	0,23	0,30	1,45	1,89
Standardabweichung	0,23	0,38	0,09	0,11	0,26	0,21

4.5.2 T47D Zellen

CXCR4 Expression auf der mRNA Ebene

Auch in den T47D Zellen wurde die CXCR4 mRNA Expression unter 17 β -Estradiol und Medroxyprogesteron-Behandlung in Kombination mit zwei verschiedenen TSA Konzentrationen (0,2 und 0,5 μ M/L) untersucht

In der ersten Versuchsgruppe wurde die CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen mit einer TSA Konzentration von 0,2 μ M/L analysiert. Abbildung 4.24 zeigt die graphische Darstellung der Daten und Tabelle 4.16 die Mittelwerte und Standardabweichungen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der CXCR4 mRNA-Expression zwischen den Behandlungsgruppen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,5422$). Die T47D-Zellen unterscheiden sich somit in der hormonellen Regulation der CXCR4 mRNA-Expression von den MCF7-Zellen.

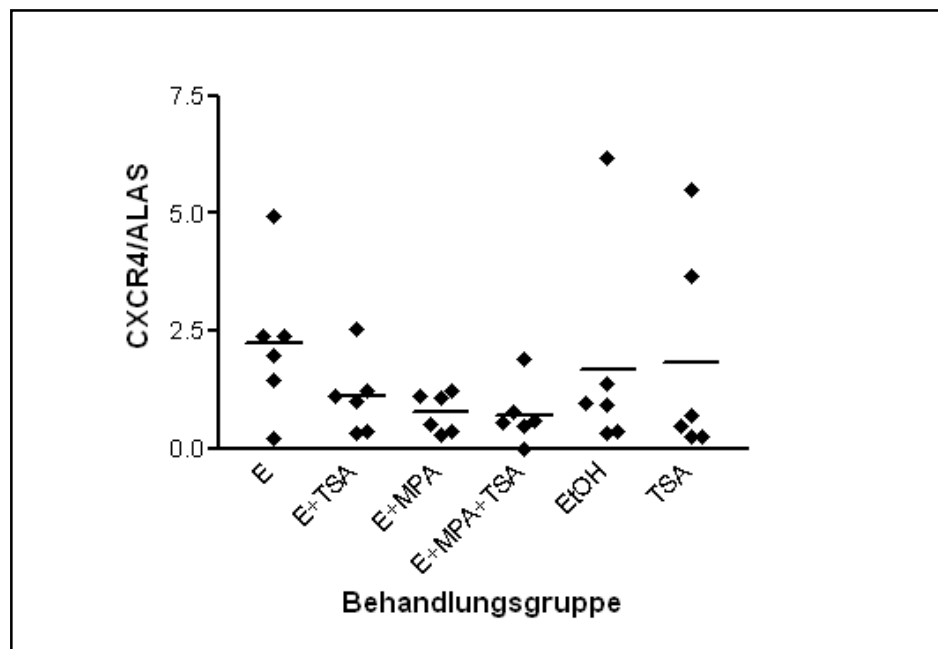


Abbildung 4.24: CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.16: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	2,22	1,10	0,76	0,72	1,69	1,80
Standardabweichung	1,55	0,80	0,42	0,64	2,24	2,23

In den zweiten Versuchsansätzen wurde die CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen unter Steroidbehandlung in Kombination mit 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA untersucht. Abbildung 4.25 sowie Tabelle 4.17 zeigen entsprechende Daten. Bei $n = 2$ konnte keine statistischen Tests durchgeführt werden. Die TSA-Applikation hatte jedoch keinen Effekt auf die CXCR4 mRNA-Expression.

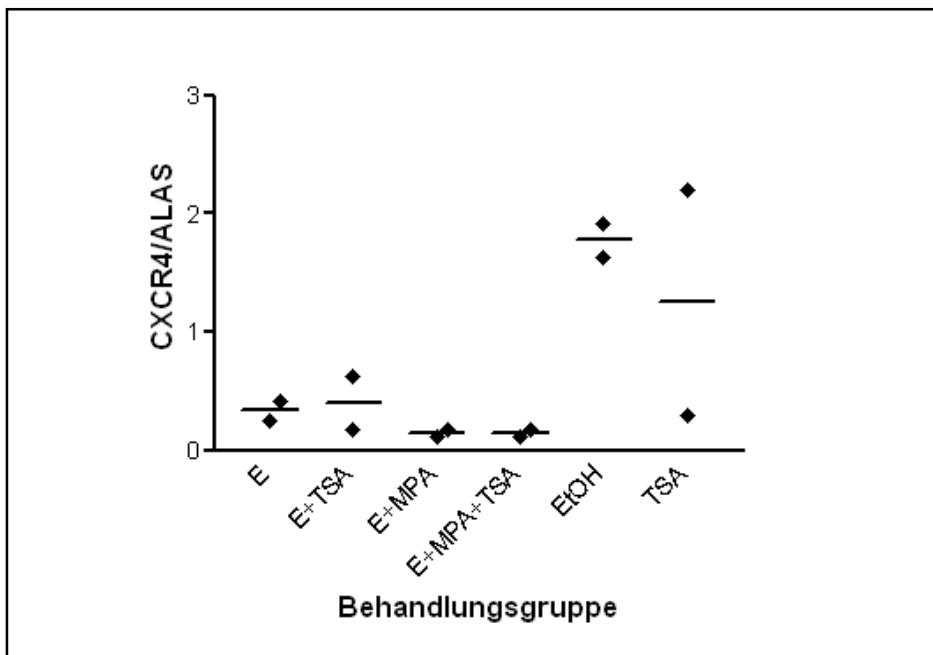


Abbildung 4.25: CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.17: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 $\mu\text{M/L}$ Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	0,34	0,40	0,15	0,15	1,78	1,25
Standardabweichung	0,12	0,31	0,04	0,05	0,21	1,34

4.6 Die Beeinflussung der Expression der CXCR4 Liganden – CXCL12 und MIF - durch die kombinierte Gabe von TSA und Steroidhormonen

4.6.1 CXCL12 Expression in MCF7 Zellen

Die Untersuchung der mRNA Expression des CXCR4 Liganden CXCL12 an MCF7 Zellen erfolgte mittels real time PCR. Abbildung 4.26 zeigt die nicht relativierten Daten und Tabelle 4.18 die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Kruskal-Wallis, mit einer statistischen Signifikanz von $p = 0,0070$. Der Dunn's Multiple Comparison Test zeigt den paarweisen Vergleich. Die Paare E vs. E+TSA, E+MPA vs. E+MPA+TSA sowie das Paar EtOH vs. TSA zeigten keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Es zeigt sich jedoch eine Senkung der CXCL12 Expression um den Faktor 3 in mit E und TSA behandelten Zellen im Vergleich alleinigen E Behandlung. Eine MPA Zugabe senkt die CXCL12 Expression in mit TSA behandelten Zellen sogar um den Faktor 10, im Vergleich zur alleinigen E+MPA Behandlung.

Es lässt zeigen, dass eine Behandlung mit TSA zu einer nicht signifikanten Senkung der CXCL12 Expression in MCF7 Zellen bei einer steroideabhängigen Behandlung führt.

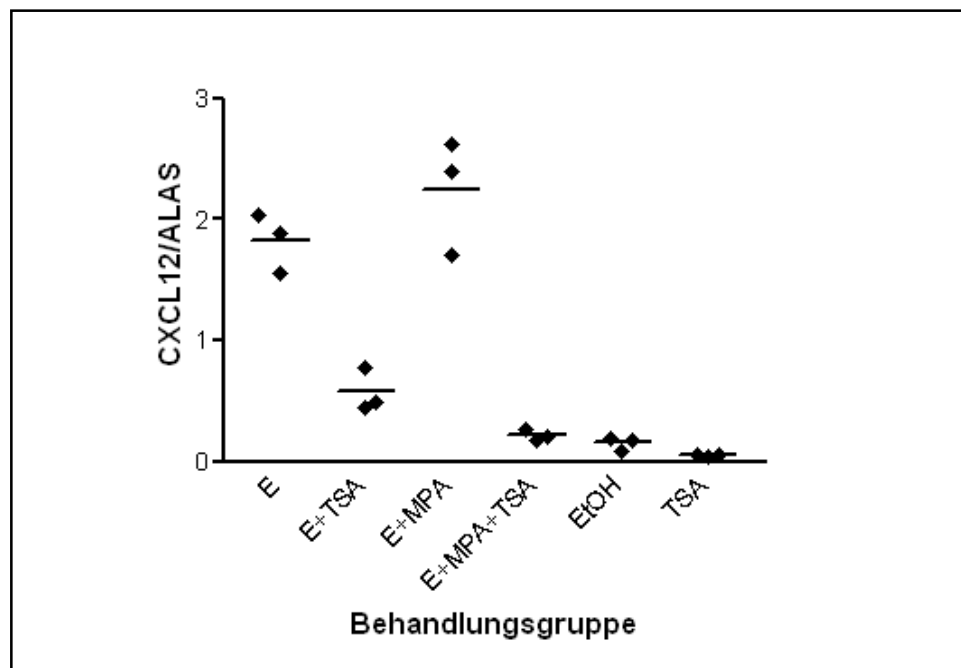


Abbildung 4.26: CXCL12 mRNA Expression in MCF7 Zellen mit nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.18: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCL12 mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	1,82	0,57	2,24	0,21	0,15	0,05
Standardabweichung	0,24	0,18	0,47	0,05	0,06	0,01

Lokalisierung des CXCL12 mittels Immunhistochemie

Der CXCL12 Nachweis wurden an den MCF7-Zellen, Tonsillen sowie an Sichtungsblöcken durchgeführt.

An den MCF7 Zellen sowie an den Tonsillen wurden der CXCL12 Antikörper (R&D Systems) in 2 verschiedenen Konzentrationen (25 μ g/ml (1:20) sowie 8 μ g/ml (1:62)) ausgetestet. Abbildung 4.27 zeigt den Nachweis des CXCL12-Proteins. Wie in den Bildern A und B der Abbildung 4.27 zu erkennen, zeigt sich eine Abfärbung des Cytoplasmas und der Zellmembran der Mammacarcinom-Zellen. Auch das Positivkontrollgewebe Tonsille weist dieses Färbemuster auf (Abb.4. 27 D und E). Die jeweiligen Negativkontrollen zeigen erwartungsgemäß keine Immunfärbung (Abb. 4.27 C und F).

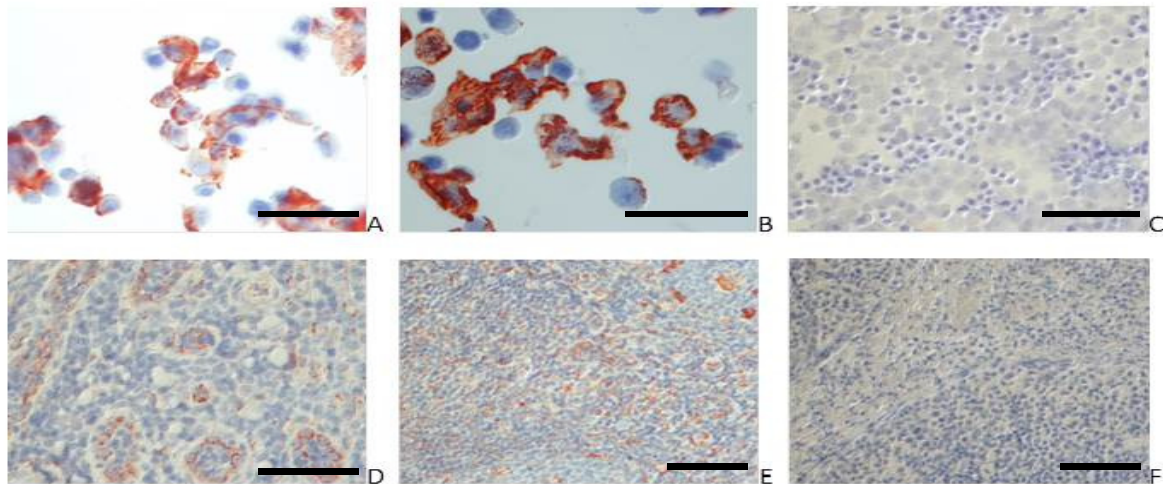


Abbildung 4.27: CXCL12 Protein Expression in MCF7 Zellen und der humanen Tonsille
MCF7 Zellen (A-C) inkubiert mit einer CXCL12-Antikörperkonzentration von 25 μ g/ml (A) und 8 μ g/ml (B). In (C) ist die Negativ-Kontrolle mit „non-immune“ Maus-IgG gezeigt.
Positiv-Kontrollgewebe humane Tonsille (D-F) mit einer CXCL12-Antikörperkonzentration von 25 μ g/ml (D) und von 8 μ g/ml (E) sowie die Negativkontrolle mit „non-immune“ Maus-IgG (F).
Maßstab: 100 μ m

4.6.2 MIF mRNA Expression in MCF7 Zellen

Abbildung 4.28 und Tabelle 4.19 zeigen die Ergebnisse der MIF-1 mRNA-Expression, die in insgesamt 7 Passagen von MCF7-Zellen untersucht worden ist. Die Ergebnisse zeigen, dass weder 17 β -Estradiol und Medroxyprogesteron-Acetat noch 0,5 μ M/L TSA einen Einfluss auf die MIF mRNA-Expression von MCF7 Zellen ausübt (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,7110$).

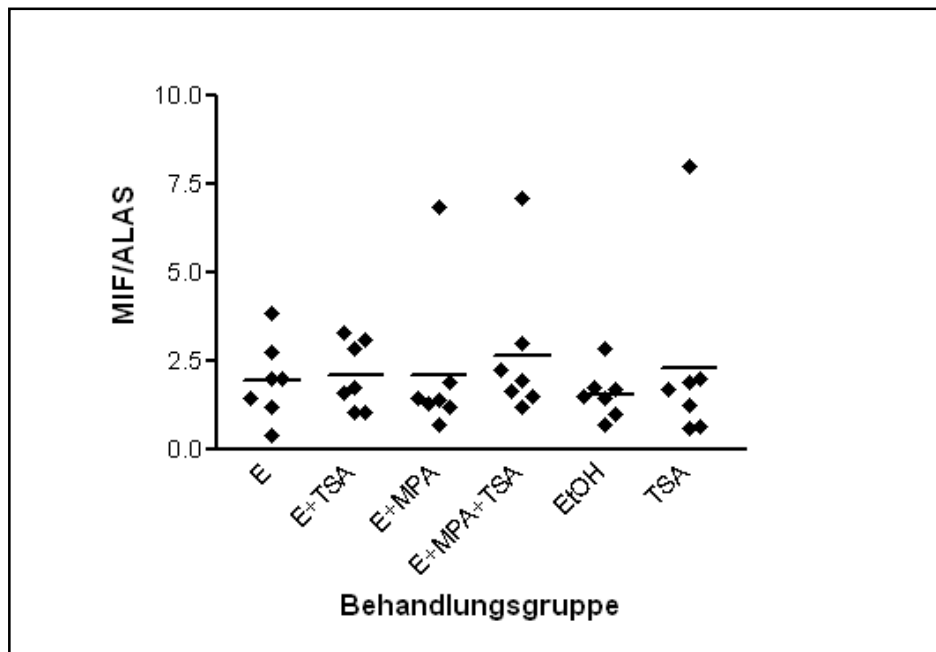


Abbildung 4.28: MIF mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Tabelle 4.19: Mittelwerte und Standardabweichungen der MIF mRNA Expression in MCF7 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,5 μ M/L Trichostatin A (TSA)

Hormonelle Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	1,93	2,07	2,09	2,64	1,55	2,28
Standardabweichung	1,12	0,96	2,12	2,04	0,68	2,58

4.6.3 CXCL12 Expression in MDA-MB 231 Zellen

Die CXCL12 mRNA Expression von MDA-MB 231 Zellen wurde mittels real time PCR untersucht (Abbildung 4.29 und Tabelle 4.20). Die MDA-MB-231 wurden mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und R5020, einem reinen Progesteronrezeptor-Agonisten behandelt.

Es konnten keine statistisch signifikanten Expressions-Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,545$).

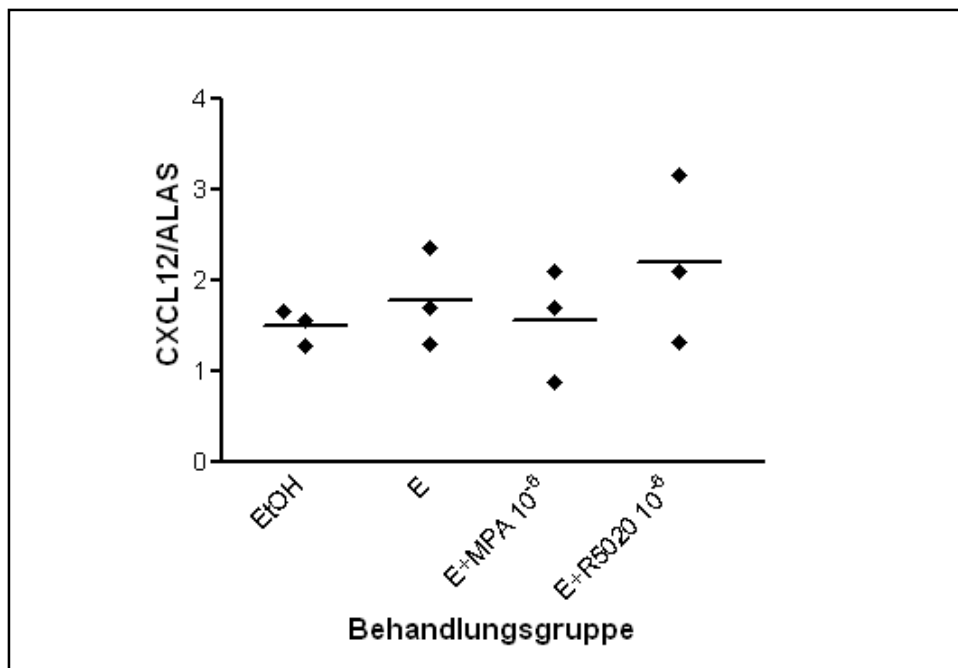


Abbildung 4.29: CXCL12 mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und R5020, einem reinen Progesteron-Rezeptor-Agonisten

Tabelle 4.20: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCL12 mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und R5020, einem reinen Progesteronrezeptor-Agonisten

Hormonelle Behandlung	EtOH	E	E+MPA 10^{-6}	E+R5020 10^{-6}
Mittelwert	1,5	1,78	1,56	2,20
Standardabweichung	0,2	0,53	0,62	0,92

4.6.4 MIF Expression in MDA-MB 231 Zellen

Abbildung 4.30 und Tabelle 4.21 zeigen die MIF mRNA Expression von MDA-MB 231 Zellen nach Kultivierung mit 17 β -Estradiol und 17 β -Estradiol in Kombination mit 3 verschiedenen Gestagenen, Medroxyprogesteron-Acetat (MPA), R5020, einem reinen Progesteronrezeptor-Agonisten und Megestrol-Acetat. MDA-MB 231 zeigen eine hohe Variabilität der MIF mRNA-Expression von Passage zu Passage. Es konnten keine signifikanten MIF mRNA-Expressions-Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,5193$).

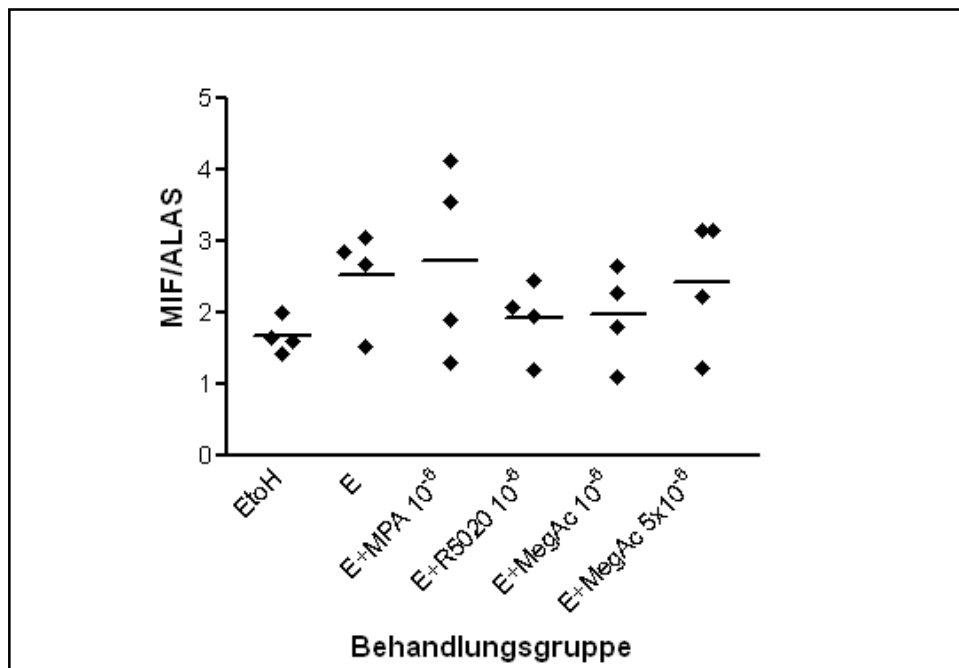


Abbildung 4.30: MIF mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen nach hormoneller Behandlung. E: 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist; MegAc: Megestrol-Acetat

Tabelle 4.21: Mittelwerte und Standardabweichungen der MIF mRNA Expression in MDA-MB 231 Zellen. E : 17 β -Estradiol, MPA: Medroxyprogesteron-Acetat; R5020: Promegeston, reiner Progesteronrezeptor-Agonist; MegAc: Megestrol-Acetat

Hormonelle Behandlung	EtOH	E	E+MPA 10^{-6}	E+R5020 10^{-6}	E+MegAc 10^{-6}	E+MegAc 5×10^{-6}
Mittelwert	1,67	2,51	2,71	1,91	1,96	2,42
Standardabweichung	0,24	0,68	1,33	0,52	0,67	0,91

4.6.5 CXCL12 Expression in T47D Zellen

Die CXCL12 mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit 17 β -Estradiol und Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) in Kombination mit 0,2 μ M/Trichostatin A (TSA) wurde mittels real time PCR analysiert (Abbildung 4.31 und Tabelle 4.22). 17 β -Estradiol führte zu einer signifikanten Steigerung der CXCL12 mRNA-Expression im Vergleich zu den ohne Hormon kultivierten Zellen (Ethanol-Kontrolle). (Kruskal-Wallis Test $p = 0,0004$; Post hoc Dunn's Multiple Comparison Test: E vs. EtOH $p < 0,01$; E vs. TSA $p < 0,01$; E+TSA vs. EtOH $p < 0,05$ sowie für E+TSA vs. TSA $p < 0,05$). Die durch 17 β -Estradiol gesteigerte CXCL12 Expression wurde durch die Zugabe von MPA stark supprimiert, ist jedoch im Post-hoc-test nicht als signifikant eingestuft worden.

Eine alleinige statistische Auswertung der CXCL12 mRNA-Expression von E und E+MPA-behandelten T47D Zellen mittels Mann-Whitney Test ergibt allerdings einen hochsignifikanten Unterschied ($p = 0.0022$).

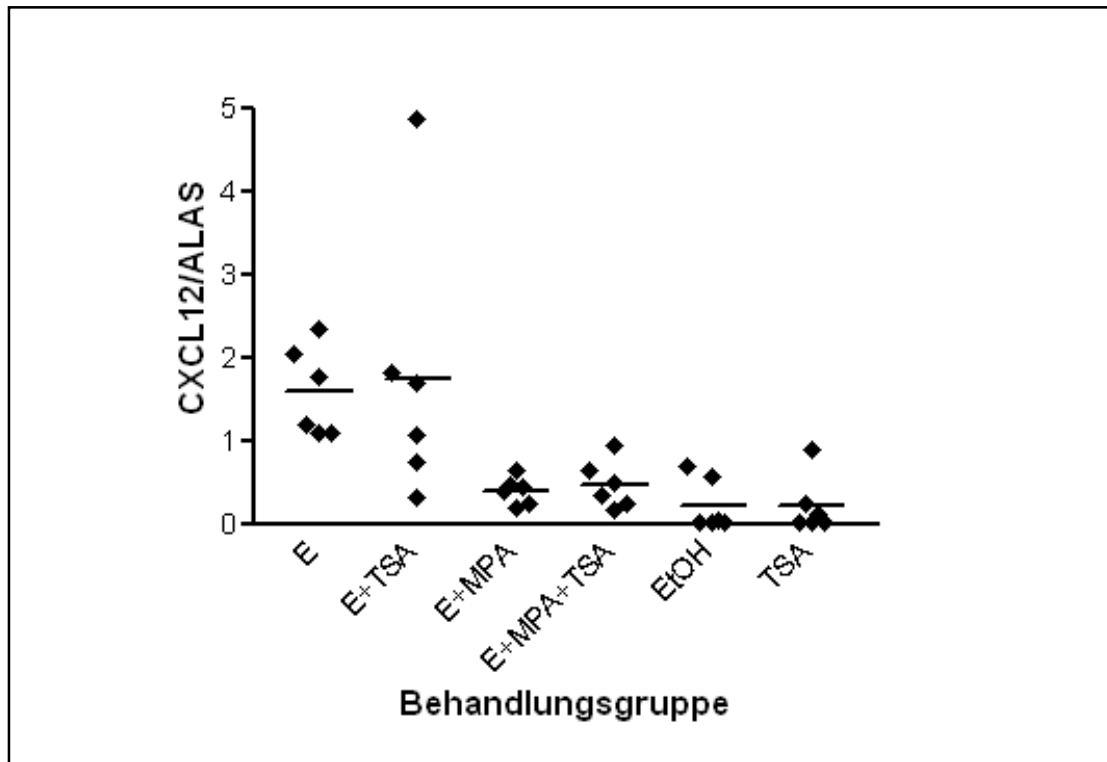


Abbildung 4.31: CXCL12 mRNA Expression von mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/l Trichostatin A (TSA) behandelten T47D Zellen.

Tabelle 4.22: Mittelwerte und Standardabweichungen der CXCL12 mRNA Expression von mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/l Trichostatin A (TSA) behandelten T47D Zellen

Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+ TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	1,58	1,75	0,39	0,47	0,22	0,21
Standardabweichung	0,54	1,63	0,16	0,28	0,31	0,34

4.6.6 MIF mRNA Expression in T47D Zellen

Mittels real time PCR wurde die MIF mRNA Expression in T47D Zellen untersucht (Abbildung 4.32 und Tabelle 4.23). Es zeigt sich keine Effekte durch die Steroidhormon und TSA-Behandlung auf die MIF Expression in T47D Zellen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,9345$).

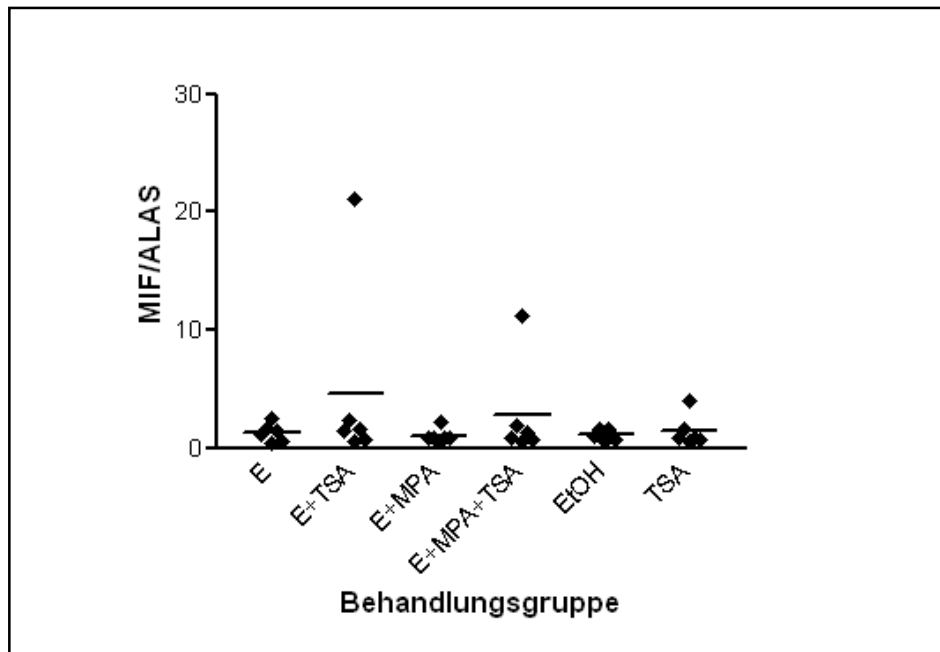


Abbildung 4.32: MIF mRNA Expression von mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/l Trichostatin A (TSA) behandelten T47D Zellen

Tabelle 4.23: Mittelwerte und Standardabweichungen der MIF mRNA Expression von mit 17 β -Estradiol (E), Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) und 0,2 μ M/l Trichostatin A (TSA) behandelten T47D Zellen

Behandlung	E	E+TSA	E+MPA	E+MPA+TSA	EtOH	TSA
Mittelwert	1,26	4,63	1,02	2,76	1,12	1,43
Standardabweichung	0,78	8,08	0,60	4,14	0,45	1,29

4.6.7 Auswertung der CXCL12-Protein-Expression von Mammatumoren in Bezug zum Tumor-Grading, der Progesteron- und Östrogen-Rezeptor-Immunreaktivität sowie dem Proliferations-Index (Ki 67-Immunfärbung)

Laut der World Health Organization Classification of Tumours von 2003 müssen alle invasiven Mammacarcinome graduiert werden. Die histopathologische Graduierung erfolgt nach Elston und Ellis in der modifizierten Graduierung von Bloom und Richardson (Elston et al., 1991; Ellis, Galea et al, 1992). Grundlage der Beurteilung sind histologische und zytologische Kriterien, die semiquantitativ beurteilt werden: Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate. G1 hat einen geringen Malignitätsgrad und ist gut differenziert. G2 hat einen mäßigen Malignitätsgrad und ist mäßig differenziert. G3 hat einen hohen Malignitätsgrad und hat eine schlechte Differenzierung (Bauerfeind, 2009).

CXCL12 Färbeintensität vs. Grading in Mammacarcinomen

In den Mammacarcinomen wurde zunächst die CXCL12 Färbeintensitäten in Bezug auf das histologische Grading analysiert. Abbildung 4.33 zeigt das überwiegend gut bis mäßig differenzierte Mammacarcinome (G1-G2) eine CXCL12-Färbungsintensität der Stufen 2-3 zeigen. Im Gegensatz dazu zeigen schlecht differenzierte Mammacarcinome (G3) eher eine niedrige CXCL12-Färbeintensitäten von 0-2. Insgesamt ist die CXCL12 Färbeintensität von G1 und G2 Mammacarcinomen höher als die der G3 Carcinome. Der Chi square-Test zeigt, dass diese Unterschiede statistisch signifikant sind ($p = 0,0310$).

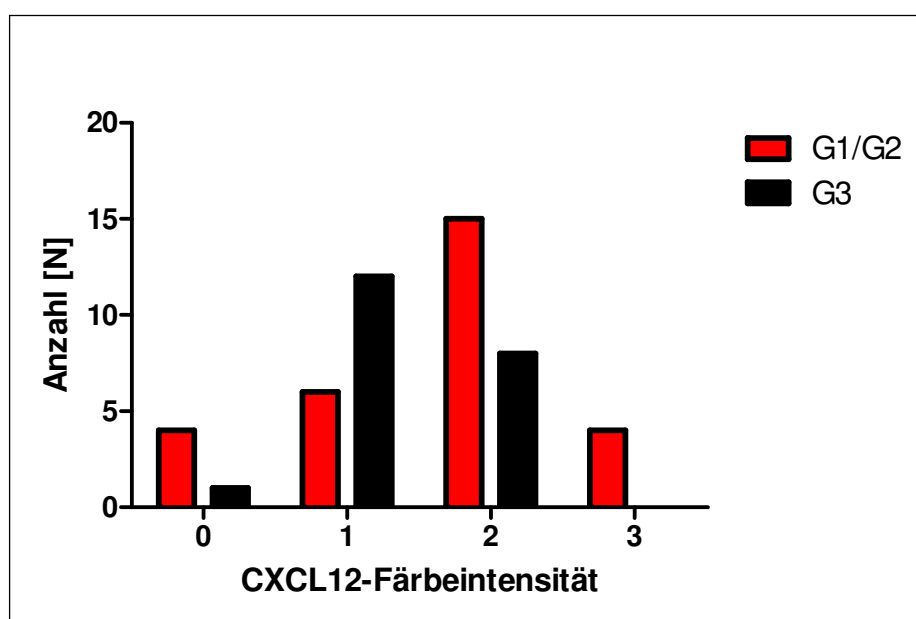


Abbildung 4.33: CXCL12 Färbeintensität in Bezug zum Tumor-Grading im Mammacarcinom.

Tabelle 4.24.:CXCL12 Färbeintensität in Mammacarcinomen in Bezug auf das Tumor-Grading

CXCL12-Immunreaktivität	Grading	
	G1/G2	G3
0	4	1
1	6	12
2	15	8
3	4	0

CXCL12 Immunreaktivität ausgewertet in Bezug zur Progesteronrezeptor-Immunreaktivität der Mammacarcinomen

Die graphische Auswertung der CXCL12 Färbeintensität in Bezug auf die Progesteronrezeptor (PR) Immunreaktivität wird in Abbildung 3.34 abgebildet.

Es zeigt, dass die CXCL12-Immunreaktivität der Mammatumoren mit der Intensität der PR Immunreaktivität korreliert (Chi square Test: $p = 0,0439$).

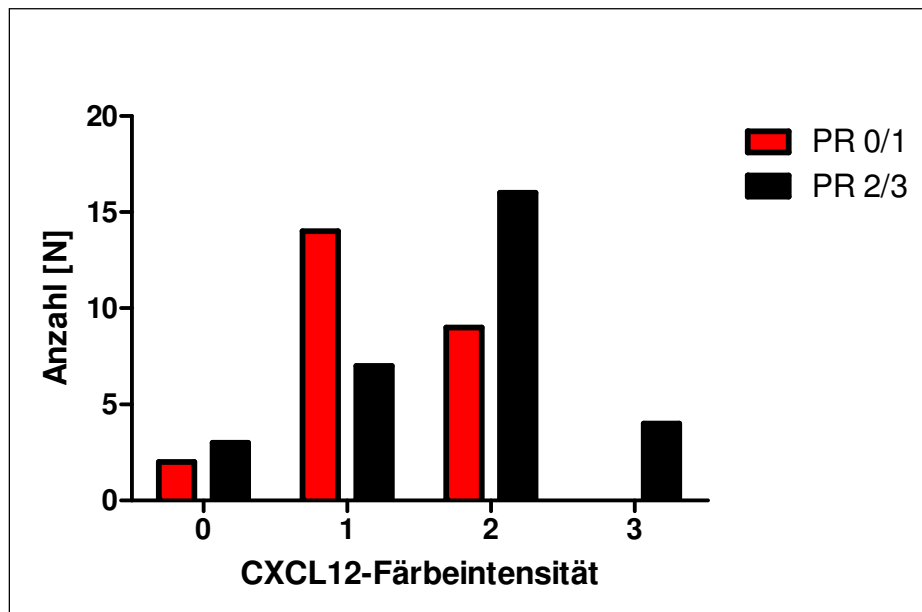


Abbildung 4.34: CXCL12 Immunreaktivität im Bezug zur Progesteronrezeptor-Immunreaktivität von Mammatumoren

Tabelle 4.25: CXCL12 Immunreaktivität in Bezug zur Progesteronrezeptor-Immunreaktivität der Mammatumoren

CXCL12 -Immunreaktivität	PR-Immunreaktivität	
	0/1+	2/3+
0	2	3
1	14	7
2	9	16
3	0	4

CXCL12 Immunreaktivität in Bezug zur Östrogen-Rezeptor-Immunreaktivität in Mammatumoren

Abbildung 4.35 zeigt die CXCL12 Färbungsintensität in Mammacarcinomen in Bezug auf die Östrogenrezeptor (ER) Immunfärbung. Die statistische Auswertung mittels Chi square-Test zeigt $p = 0,0656$ und somit gerade keine statistische Signifikanz.

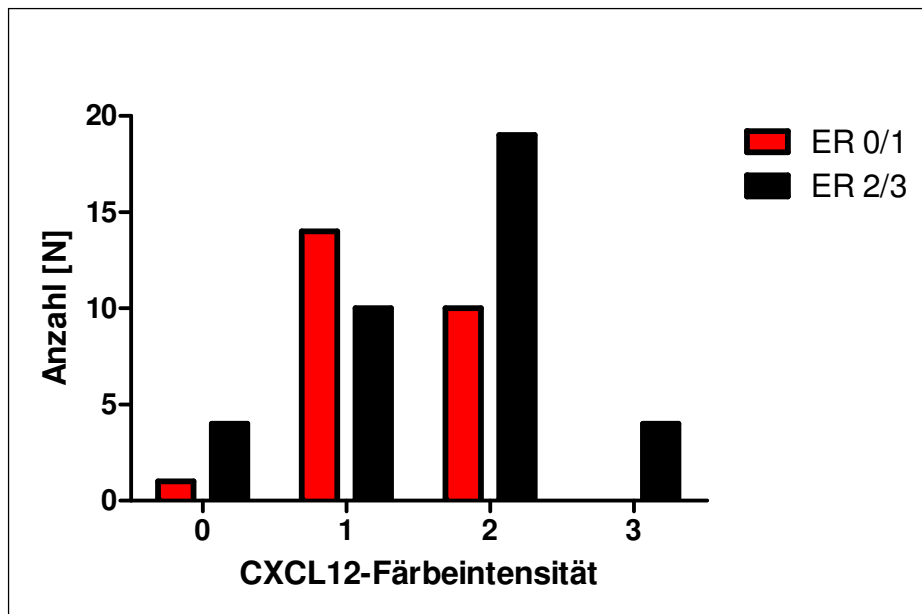


Abbildung 4.35: CXCL12 Immunreaktivität in Bezug auf die Östrogen-Rezeptor-Immunreaktivität von Mammatumoren

Tabelle 4.26: CXCL12 Immunreaktivität in Bezug auf die Östrogen-Rezeptor-Immunreaktivität von Mammatumoren

CXCL12 – Immunreaktivität	ER-Immunreaktivität	
	0/1+	2/3+
0	1	4
1	14	10
2	10	19
3	0	4

CXCL12 Immunreaktivität in Bezug auf den Proliferationsindex (% Ki 67 positive Zellen) von Mammatumoren

Ki 67 ist ein Protein, welches mit der Zellproliferation assoziiert ist. Während der Interphase ist das Protein im Zellkern zu finden und während der Mitose an der Zelloberfläche. Während der aktiven Phasen des Zellzyklus d.h. G1, S, G2 Phase und Mitose ist Ki 67 nachweisbar, jedoch nicht in der Ruhephase G0. Diese macht es zu einem exzellenten Proliferations-Marker (Scholzen & Gerdes, 2000). Die interdisziplinäre S3 Leitlinie des Mammacarcinoms von 2012 besagt, dass der prognostische und prädiktive Wert des Proliferationsmarkers Ki 67 nicht ausreichend belegt sei. Somit soll Ki 67 nur in

Rahmen von Studien als Entscheidungsgrundlage für eine systemische Therapie genutzt werden.

Abbildung 4.36 zeigt die CXCL 12 Immunreaktivität von Mammacarcinomen in Bezug zu den Prozentsatz von Ki 67 positiven Mammatumorzellen. Die statistische Auswertung mittels Chi Square-Test ergab einen p-Wert von 0,0628 und somit besteht in der untersuchten relativ kleinen Kohorte von Mammatumoren kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Proliferation und der CXCL12-Immunreaktivität der Tumoren.

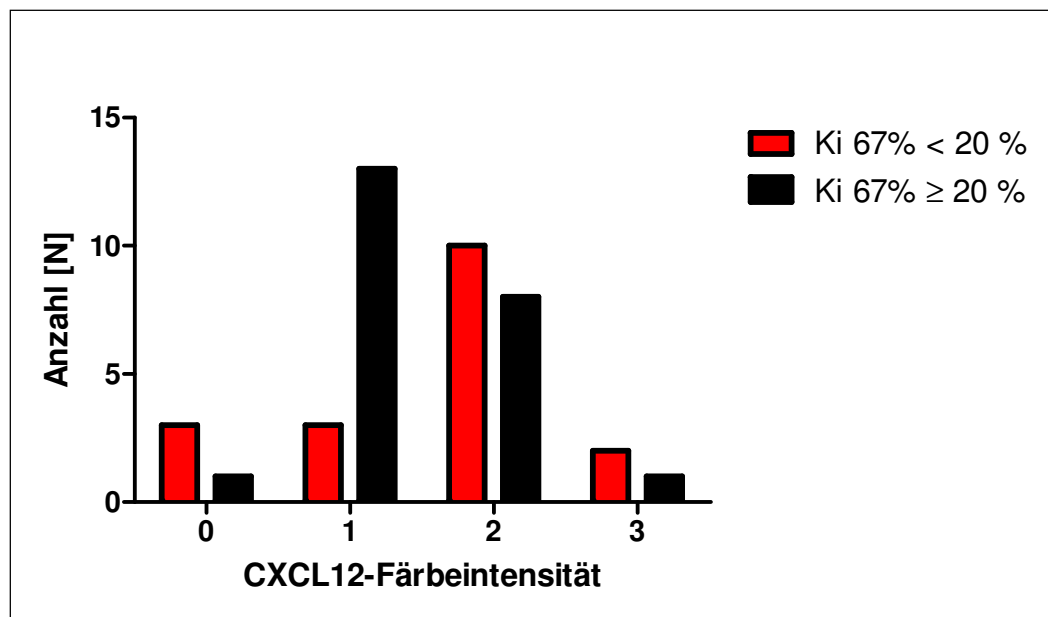


Abbildung 4.36: CXCL12 Immunreaktivität in Bezug auf den Proliferationsindex (% Ki67 positive Zellen) der Mammacarcinome

Tabelle 4.27: CXCL12 Immunreaktivität in Bezug zum Proliferationsindex (% Ki 67 positive Zellen) der Mammacarcinome

CXCL12- Immunreaktivität	Proliferations-Index (% Ki 67 positive Zellen)	
	< 20 %	≥ 20 %
0	3	1
1	3	13
2	10	8
3	2	1

5 Diskussion

5.1 Kritische Diskussion der Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hormonelle Einfluss sowie der Einfluss von HDACi auf die Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB 231 und T47D auf der mRNA- und auf der Protein-Ebene untersucht. Im Fokus stand die CXCR4 und die CXCL12-Expression. Auf der mRNA Ebene wurde mittel real time (RT-) PCR gearbeitet und auf der Proteinebene mittels Western Blot.

Die mRNA-Expressionsdaten dieser Arbeit stammen aus 6 aufeinanderfolgenden Passagen (Passage 1-6) und die Protein-Expressionsdaten aus den darauffolgenden Passagen (7-12). Insgesamt zeigt sich eine deutliche Variabilität der CXCR4 und CXCL12-Genexpression und -Regulation in den aufeinanderfolgenden untersuchten Passagen.

Darüber hinaus zeigte sich bei den MCF7-Zellen eine signifikante Regulation der untersuchten Gene auf der mRNA-Ebene, aber keine Regulation auf der Proteinebene in den höheren Passagen.

Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen war unerwartet. Sie könnte einerseits auf unterschiedliche Effekte der Steroide auf die mRNA- und Proteinebene hindeuten. Andererseits könnte der Unterschied unter Umständen auch auf die Verwendung von unterschiedlichen MCF7-Passagen zurückzuführen sein. In den niedrigeren Passagen wurde die mRNA-Expression untersucht, in den darauffolgenden höheren Passagen die Protein-Expression. Um hier eine Ursachenklärung zu erreichen, müssten mRNA- und Protein-Expression in denselben Passagen untersucht werden.

Auch ist in einigen Experimenten die Anzahl der Wiederholungen kritisch zu betrachten. Unter dem Punkt 4.4.2 „Der Effekt der TSA-Inkubationszeit auf die CXCR4-Expression“ sind die Experimente an den MCF7 und an den MDA-MB 231 Zellen zu finden. Die Ergebnisse wurden an drei Passagen erhoben. An den MCF7 Zellen wurde ein Absinken der CXCR4 Expression an zwei der drei Passagen beobachtet. Die dritte Passage reagiert jedoch gar nicht auf die TSA-Behandlung.

Um zu überprüfen, ob es nicht doch zu einer signifikanten Abnahme der CXCR4 Expression in den MCF7-Zellen über einen Zeitraum von 72h durch TSA kommt, und ob dieser Effekt unter Umständen Passage-abhängig ist, sollte

das Experiment in weiteren Passagen der Zelllinie nochmal wiederholt werden. Dann würde sich zeigen, ob eine Regulation vorliegt oder nicht.

5.2 Die Effekte von Estradiol und Gestagenen auf die CXCR4 mRNA Expression in drei Brustkrebszelllinien

Der CXCR4 ist möglicherweise ein wichtiges therapeutisches Target, da seine Expression-Stärke mit dem Metastasierungspotential und der Proliferations-Aktivität von Mammacarcinomen korreliert (Salvucci, Bouchard et al., 2006; Mukherjee und Zhao, 2013; Hall & Korach, 2003; Ferrari et al. 2012).

Während die Effekte von Estradiol auf die CXCR4-CXCL12-Achse in den letzten Jahren schwerpunktmäßig in der MCF7-Brustkrebszelllinie untersucht worden ist (Boudot et al., 2011) sind die Effekte der in der Kontrazeption und HRT verwendeten Gestagene auf die CXCR4-CXCL12-Achse weitestgehend unerforscht geblieben. Dies ist auf dem Hintergrund, dass ca. 60-80 % der Mammacarcinome eine Östrogenrezeptor-Expression (Hall & Korach, 2003, Klinga et al., 1984) und etwas 40 % auch eine Progesteronrezeptor-Expression zeigen (Osborne, 1990), eine deutliche Wissenslücke, zumal eine hohe CXCR4 Expression auch in Hormonrezeptor-positiven Mammacarcinomen mit einer schlechten Prognose korreliert (Chu et al, 2011).

Im ersten Teil der Arbeit wurden deshalb die Effekte von Estradiol und dem Progesteronderivat Medroxyprogesteron-Acetat (MPA) - sowie exemplarisch auch von den Gestagenen Megestrol-Acetat und Promegestone (R5020) - auf die CXCR4 Rezeptor-Expression in den Brustkrebs-Zelllinien MCF7, T47D sowie MDA-MB 231 untersucht. Die hormonellen Effekte wurden auf der mRNA-Ebene und der Proteinebene analysiert.

Der Motivation, die Effekte von Steroidhormonen auf den CXCR4-Expression zu untersuchen, liegen sowohl grundlegende Aspekte der Genregulation von CXCR4 und seinen Liganden als auch vielfältige, klinisch-therapeutisch relevante Fragen zugrunde.

Es wurden drei verschiedene Brustkrebs-Zelllinien untersucht: a) die Hormonrezeptor-negative Zelllinie MDA-MB 231 und b) die zwei Hormonrezeptor-positiven Zelllinien MCF7 und T47D. Interessanterweise konnten auch zwischen den beiden Hormonrezeptor-positiven Zelllinien ein

unterschiedliches Verhalten bei der hormonabhängigen Genregulation von CXCL12 und CXCR4 gezeigt werden.

Die MCF7 und T47D Zellen besitzen den α - und β -Östrogenrezeptor (ER α , ER β), den Androgen- (AR), Glukokortikoid- (GR) sowie den Progesteron-Rezeptor (PR).

MDA-MB-231 Zellen besitzen den ER β -, Androgen und Glukokortikoidrezeptor, jedoch im Gegensatz zu den T47D und MCF7 Zellen fehlt ihnen der ER α und der PR (Lin et al., 1999). Somit können die Gestagene ihren Effekt lediglich durch die Partialwirkung am Glukokortikoid-, Aldosteron- und Androgen-Rezeptor ausüben.

Die Verwendung von Medroxyprogesteronacetat (MPA), Megestrol-Acetate (MegAc) und R5020

Das verwendete Medroxyprogesteronacetat (MPA) ist ein synthetisches Progestagen mit androgener Wirkung, das an den Progesteron-, den Glucocorticoid- und den Androgen-Rezeptor bindet. Es bewirkt unter anderem eine Proliferation der Brustdrüsenacini und ist per Regelkreis an der Hemmung der Östrogenfreisetzung beteiligt.

MPA wird vielseitig verwendet. MPA findet Anwendung in der Therapie des Progesteronrezeptor positivem Endometriumcarcinoms, wie aus der interdisziplinären S2k-Leitlinie für die „Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms“ ersichtlich wird. Es wird als Bestandteil oraler Kontrazeptiva, in der Dreimonatsspritze (Depo-Provera, 150 mg), bei klimakterischen Beschwerden in der Postmenopause in Kombination mit Östrogenen und in der Endometriose-therapie eingesetzt (Karow & Lang-Roth, 2006). In der PR negativen MDA-MB 231 Brustkrebszelllinien wird durch eine Behandlung mit MPA deren Metastasierungspotential reduziert, was über die Erhöhung der Nm23-H1 Metastasen-Suppressor-Gen-Expression induziert wird. In dieser Zelllinie entfaltet MPA seine Wirkung über den partiellen Agonismus am Glukokortikoid-Rezeptor (Palmieri et al., 2005).

Megestrol-Acetate (MegAc) ist ein 17-Hydroxyprogesteronderivate, welches überwiegend gestagene und antigonadotropische Effekte aufweist (Graham et al., 1997). Es wirkt agonistisch am Progesteronrezeptor. In vitro wurden antiöstrogene, antiandrogene und schwache glukokortikoide Wirkungen

nachgewiesen. Durch seinen antiöstrogenen Effekt wird MegAc beim metastasierten Mammacarcinom als „*second line*“ Therapie sowie beim Endometrium- und Proststacarcinom eingesetzt. Außerdem wird die appetitanregende Nebenwirkung unter anderem zur Palliativversorgung von kachektischen Patienten ausgenutzt (Becker, 2001; Göretzlehner et al. 2011; Yeh et al. 2013).

R5020, Promegeston, ein reiner Progesteronrezeptor-Agonist, ist ein 19-Norprogesteronderivat. Er weist eine antiöstrogene sowie eine antiandrogene Wirkungen auf (Göretzlehner et al. 2011).

In MCF7-Zellen zeigte die CXCR4 mRNA-Expression unter Estradiol-Behandlung eine signifikante Erniedrigung. MPA in Kombination mit Estradiol zeigte den gleichen Effekt wie die alleinige Estradiol-Behandlung.

Mit einer Östrogen-Behandlung wurde die CXCR4 mRNA Expression in T47D Zellen um den Faktor 3 gesteigert, allerdings wurde keine statistische Signifikanz aufgrund der starken Streuung der Messwerte in den untersuchten sechs aufeinanderfolgenden Passagen der T47D-Zelllinie erlangt. Die Daten bestätigen jedoch Ergebnisse von Hall und Mitarbeitern (2003), die auch eine Steigerung der CXCR4-mRNA-Expression in der T47D-Zelllinie zeigen konnten. In Bezug auf die Östrogen-Regulation zeigen die beiden Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D damit eine völlig andere transkriptionelle Regulation der CXCR4 mRNA-Expression.

Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Zelllinien in Bezug auf die CXCR4-Genregulation durch Gestagene. Während MPA in MCF7-Zellen keinen Effekt auf die CXCR4 mRNA-Expression hat, kommt es zu einer Suppression der CXCR4-mRNA auf das Niveau von hormonfrei kultivierten Kontroll-Zellen bei kombinierter Estradiol und MPA-Behandlung in T47D Zellen.

An den MDA-MB 231 Zellen zeigen die Steroidhormone weder auf der mRNA- noch auf der Protein-Ebene einen Effekte auf die CXCR4- Expression. Lin und Mitarbeiter zeigten in ihrer Arbeit von 1999, dass durch eine alleinige Gestagen Gabe die Synthese und das Wachstum der MDA-MB 231 Zellen beeinflusst werden kann. Daher wurden in einem zweiten Versuchsansatz die MDA-MB 231 Zellen anstelle von der bisher gewählten mit Estradiol-Gestagen in Kombination ausschließlich mit einem Gestagen - MPA bzw. R5020 -

behandelt. Beide Gestagene zeigten in dieser Zelllinie jedoch keinen Einfluss auf die CXCR4 mRNA- und Protein-Expression. Somit kann der von Lin und Mitarbeitern (1999) beobachtete Effekt nicht verallgemeinert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen unterschiedliche Estradiol- und Gestagen-Effekte in den drei verschiedenen Brustkrebszelllinien. Diese scheinen zellspezifisch zu sein. Auch bei den beiden Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Brustkrebs-Zelllinien T47D und MCF7 liegt ein sehr unterschiedliches Verhalten der CXCR4-Genregulation unter Steroidhormongabe vor. Dies lässt vermuten, dass die Zelllinien unterschiedlich sensibel für eine Hormonsubstitution sind oder unterschiedliche molekulare Zusammensetzungen der Steroidhormon-Rezeptor-Komplexe besitzen, die die Effekte der Hormone unterschiedlich modulieren. Somit ist die Annahme, dass der CXCR4 Östrogenrezeptor-abhängig exprimiert wird und unter alleinigem Östrogeneinfluss steht deutlich zu simpel.

Daraus ist auch abzuleiten, dass in Bezug auf die CXCR4-Expression nicht in allen Zelllinien durch eine Antihormon-Therapie – mit Tamoxifen oder einem Aromatase-Hemmer - ein günstiger supprimierender Effekt auf den Metastase-fördernden CXCR4 zu erreichen ist.

An dieser Stelle müsste nun weiter untersucht werden, ob in Tumoren, die eine hohe Östrogenrezeptor-Expression haben, deren Metastasierung aber nicht durch eine Antihormon-Therapie unterbunden werden kann, eine Hochregulation der CXCR4-Expression durch die Therapie erfahren kann.

5.3 Der Effekt der TSA-Konzentration auf Proliferation und Zelltod

TSA wirkt in höheren Dosen zytotoxisch. Um zu untersuchen, bei welcher TSA-Konzentration physiologische Effekte auf die Genregulation zu beobachten sind und nicht die Begleiterscheinung einer Zytotoxizität, wurden die drei Brustkrebszelllinien MCF7, MDA-MB 231 und T47D unter 4 unterschiedlichen TSA-Konzentrationen kultiviert. Die gewählten TSA Konzentrationen waren 0,2 µM/L, 0,5 µM/L, 0,75 µM/L sowie 1 µM/L. Mittels des MTT-Assays, der die Zellvitalität über die mitochondriale Aktivität misst, wurde zum Zeitpunkt 48 und 96 Stunden der TSA-Behandlung die Zellaktivität überprüft. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ist ein membrangängiges

gelbes Tetrazoliumsalz, welches der Zellkultur zugesetzt wird und in die Zellen eindringt. Durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase wird der Farbstoff in stoffwechselaktiven Zellen in ein wasserunlösliches, blaues Formazane gespalten. Die Bildung der blauen Formazane ist direkt proportional zu der Anzahl an lebenden und proliferierenden Zellen (Mosmann, 1983). Darüber hinaus wurden die Zellen auch mikroskopisch während und am Ende der Kultivierungszeit von 96 Stunden begutachtet.

Bei den MCF7, T47D und MDA-MB 231 Zellen zeigte sich bereits zum Zeitpunkt 48 Stunden eine niedrigere Zellzahl als bei den EtOH behandelten Kontroll-Zellen bei allen vier verwendeten TSA-Konzentrationen.

Erst zum Zeitpunkt 96 Stunden wurde die zytotoxische Konzentration offensichtlich, die daran zu erkennen war, dass weniger Zellen als bei der Aussaat in den Kulturschalen vorhanden waren. Die Zellen wiesen außerdem oft eine abnorme Morphologie auf und ein Teil der abgerundeten und abgestorbenen Zellen war bereits im Zellkultur-Überstand zu finden. Bei allen drei Zelllinien wurde eine Zytotoxizität - und somit die Induktion der Apoptose - ab einer TSA-Konzentration von 0,5 $\mu\text{M/L}$ beobachtet. Dies ist eine wichtige Information im Hinblick auf die therapeutische Verwendung von TSA sowie für die Beurteilung der Effekte von TSA auf die Genregulation.

Die Dosis-Wirkungskurve zeigt, dass die MDA-MB 231 Zellen deutlich empfindlicher auf die TSA-Behandlung reagieren als die MCF7 Zellen. Zelllinienspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber HDAC-Inhibitoren sind aus der Literatur bereits bekannt (Sanda et al., 2007).

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht die zellulären Reaktionen im Rahmen des Zelltodes von Interesse waren, sondern eine Induktion des Zellzyklusarrests und der Zelldifferenzierung wurde TSA in den Konzentrationen 0,2 $\mu\text{M/L}$ und 0,5 $\mu\text{M/L}$ für die Experimente gewählt.

Da eine eindeutige, maximale TSA-Wirkung erst nach 96 Stunden sichtbar wird, haben wir eine Inkubationszeit von 96 Stunden für alle weiteren Experimente gewählt.

5.4 Der Effekt der TSA-Inkubationszeit auf die CXCR4-Expression

In den Zeitexperimenten wurde die Expression von CXCR4-Protein unter dem Einfluss von 0,5 $\mu\text{M/L}$ TSA an MCF7 sowie an MDA-MB 231 Zelllinien untersucht.

Bei drei untersuchten Passagen von MCF7-Zellen konnte in zwei der drei Passagen ein eindeutiger Effekt der Inkubationszeit auf die CXCR4-Protein-Expression gezeigt werden. Nach 24 Stunden TSA Behandlung ist eine Absenkung der CXCR4 Expression zu sehen, die mit zunehmender Länge der Inkubationszeit weiter fällt. TSA hat also mit zunehmender Inkubationszeit einen hemmenden Effekt auf die CXCR4 Expression in der MCF7-Zelllinie. Dies ist ein wünschenswerter therapeutischer Effekt, der die CXCR4 vermittelte Metastasierungskompetenz der MCF7-Brustkrebszellen reduzieren kann.

An den MDA-MB 231 Zellen konnte die CXCR4 Proteinexpression nicht durch TSA beeinflusst werden. Die CXCR4-Expression veränderte sich in den 96 Stunden TSA-Behandlung nicht.

In einem anderen malignen Zelltyp, den Zellen einer chronisch lymphatischen Leukämie, konnte die CXCR4-Expression durch den Histondeacetylase-Hemmer „*Suberoylanilide hydroxamic acid*“ (SAHA) inhibiert werden (Stamatopoulos et al., 2010). SAHA gehört wie TSA zu den Hydroxamsäure-Derivaten. Dies zeigt, dass die Regulation der CXCR4-Expression Zelltyp-abhängig ist.

Zusammenfassend ist also auch der Effekt des HDAC-Inhibitors TSA auf die CXCR4-Protein-Expression Brustkrebszelllinien-abhängig und es lässt sich kein generalisiertes Schema für eine Mammacarcinom-Therapie ableiten.

5.5 Die Interaktion von TSA und Steroidhormonen auf die Genexpression von CXCR4 und seinen Liganden

CXCR4

Um die TSA Effekte auf die CXCR4 mRNA Expression unter verschiedenen hormonellen Bedingungen in den MCF7 und T47D Zellen zu untersuchen, wurden die TSA-Konzentrationen von 0,2 $\mu\text{M/L}$ und 0,5 $\mu\text{M/L}$ eingesetzt.

In der MCF7 und T47D Mammacarcinom-Zelllinie zeigte TSA in Kombination mit keiner hormonellen Kultivierungsbedingung eine Beeinflussung der CXCR4-

mRNA- und Protein-Expression und bestätigt somit die Ergebnisse von einer aktuellen Studie Ierano und Mitarbeitern (2013), die in MCF7-Zellen keine Regulation der CXCR4 mRNA-Expression zeigen konnten.

Interessanterweise konnte aber Ierano und Mitarbeiter an verschiedenen Carcinom-Zelllinien (außer an MCF7-Zellen und an Colonicarcinomzellen) einen Metastasen vorbeugenden Effekt durch HDACi zeigen. Dabei wiesen sie paradoxerweise eine Steigerung der CXCR4 mRNA Expressionssteigerung und eine verminderte CXCL12 abhängige Signalkaskade durch STAT3 und c-SRC auf, was eine mögliche verzögernde oder verhindernde Rolle von HDAC-Inhibitoren in dem Metastasen Prozess an soliden Tumoren ergibt.

Insgesamt scheinen also Unterschiede in der HDACi-Wirkung auf die CXCR4-Expression in Leukämiezellen und Mammacarcinom-Zellen vorzuliegen. Von einer Übertragbarkeit der HDAC-Inhibitor Effekte kann somit nicht automatisch ausgegangen werden

MIF

Der CXCR4 Ligand MIF wurde erst in wenigen Studien im Zusammenhang mit Brustkrebs untersucht. Eine erhöhte MIF Expression wurde in zahlreichen Tumorentitäten, wie beim Prostatacarcinom, dem Koloncarcinom sowie beim Mammacarcinom gefunden (Verjans et al., 2009; Wilson et al., 2005; Meyer-Siegler et al., 2005; Bando et al., 2002).

Bando und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass die MIF-Expression beim Mammacarcinom in keinem Zusammenhang zur Steroidhormonrezeptor-Expression steht. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die publizierten Daten, da in keiner der drei untersuchten Mammacarcinom-Zelllinien eine hormonelle Regulation der MIF-Expression gezeigt werden konnte.

Verjans et al. (2009) zeigen zwar eine signifikant Korrelation zwischen der MIF sowie der Östrogen- und Progesteronrezeptoren-Expression in einer Kohorte von 175 primären invasiven Mammacarcinomen, ob aber in den Hormonrezeptor-positiven Mammatumoren die MIF-Expression durch Steroide reguliert wird, muss noch geklärt werden.

Die Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA führte zu keiner Modulation der MIF mRNA-Expression in den drei untersuchten Mammacarcinom-Zelllinien.

Dies mag darauf hindeuten, dass HDACs nicht an der MIF-Genexpression beteiligt sind.

CXCL12

Die Metastasen-Zielorgane von Mammacarcinomen (Lunge, Leber und Knochen) weisen laut Müller et al. (2001) eine überdurchschnittlich hohe Expression des CXCR4-Liganden CXCL12 auf. CXCL12 lockt vermutlich die CXCR4 positiven Zellen des Primärtumors, die sich aus dem Tumorzellverband herausgelöst haben, über Chemotaxis an (Müller et al., 2001). Die Tatsache, dass CXCR4 in invasiven und in situ Carcinoma (z.B. DCIS) gefunden wurde, zeigt, dass die CXCL12/CXCR4 Achse in allen Stadien des Mammacarcinoms involviert sein kann (Smith et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte die CXCL12 mRNA Expression in MCF7-Zellen durch eine Östrogen-Behandlung im Vergleich zur hormonfrei kultivierten Kontrollgruppe gesteigert werden. Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen von Hall & Korach (2003), die ebenfalls eine Induktion der CXCL12 Expression über 17 β -Estradiol und den ER α in MCF7-Zellen beobachten konnten. Diese und weitere Arbeiten deuten auf einen ER α abhängige CXCL12- Genexpression in dieser Brustkrebszelllinie hin (Rhodes et al., 2010, Sauve et al., 2009). Das Gestagen MPA hatte keinen Einfluss auf die CXCL12-Genexpression.

Durch eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor TSA wurde eine signifikante Inhibition der durch 17 β -Estradiol gesteigerten CXCL12-Expression auf mRNA Ebene erreicht, während TSA keine signifikanten Effekte auf die niedrige CXCL12 mRNA Expression von hormonfrei kultivierten MCF7-Zellen ausübte. Dies spricht für eine Koregulation des CXCL12-Gens durch Steroidhormone und HDACs in MCF7 Zellen.

Interessanterweise führt der HDACi zu einer Hemmung und nicht zu einer Steigerung der Genexpression. Wir haben entsprechend dem Arbeitsmodell erwartet, dass HDACs mit Corepressoren im Sinne der Genrepression interagieren, und folglich der HDAC-Inhibitor zu einer Steigerung der Genexpression führen würde. Das eindeutige Ergebnis weist nun auf eine höhere Komplexität bei der Genregulation durch HDACS und ihre Inhibitoren hin.

Eine Absenkung der CXCL12-Expression durch den HDAC-Inhibitor ist insgesamt eine zweiseitige Beobachtung, weil eine niedrige CXCL12-Expression des Tumors mit einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert sein könnte (Hassan et al, 2009). Andererseits könnte die Erniedrigung der CXCL12-Expression zu einer verminderten Proliferations-Aktivität der CXCR4-positiven Tumorzellen beitragen, da die Proliferation zum Teil über die CXCL12/CXCR4-Achse reguliert wird (Hall et al., 2003).

In T47D Zellen zeigt sich – wie bei den MCF7-Zellen - eine signifikante Steigerung der CXCL12 mRNA Expression durch Estradiol. Interessanterweise war in den T47D-Zellen auch ein Effekt des Gestagens MPA zu beobachten: durch MPA wurde die CXCL12 mRNA Expression gehemmt.

Auch in Hinblick auf die CXCL12-Genregulation durch TSA unterschieden sich die T47D-Zellen von den MCF7-Zellen: in T47D-Zellen wurde die CXCL12-Expression nicht durch TSA beeinflusst.

Dies spricht – trotz gleicher Ausstattung der T47D und MCF7-Zellen mit Steroidhormon-Rezeptoren - für deutliche Unterschiede in den molekularen Mechanismen der Genregulation des CXCL12-Gens. Vermutlich sind an der CXCL12 Genregulation weitere modulierende Cofaktoren beteiligt.

In MDA-MB 231 Zellen konnte kein Einfluss von 17 β -Estradiol und den untersuchten Gestagenen auf die CXCL12 mRNA Expression gezeigt werden. Dies könnte zum einen auf das Fehlen des ER α zurückzuführen sein, da ohne ihn die CXCL12 Expression nicht durch Estradiol gesteuert werden kann. Zum anderen scheinen die in den MDA-MB-231-Zellen exprimierten Glukokortikoid- und Androgen-Rezeptoren nicht an der Genregulation beteiligt zu sein oder aber der Partialagonismus der Gestagene konnte bei der verwendeten Konzentration keine Wirkung an den beiden Rezeptoren entfalten.

Zusammenfassend betonen die Ergebnisse dieser Arbeit die Spezifität der CXCL12-Genexpression in den verschiedenen Tumorzelllinien sowie die klinisch-therapeutisch zu beachtende Tatsache der Individualität der verschiedenen Tumorentitäten.

Ob insgesamt durch HDAC-Inhibitoren, die Malignität von Mammacarcinom-Zellen reduziert werden kann, muss letztendlich in *in-vivo*-Untersuchungen überprüft werden. Aufgrund der vielfältigen Beeinflussung unterschiedlicher zellulärer Prozesse kann die Gesamtreaktion von Tumoren auf den HDAC-Inhibitor nicht vorausgesagt werden kann.

5.6 Mammacarcinome und CXCL12-Expression – klinische Erwägungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante Steigerung der CXCL12 mRNA-Expression durch Estradiol in den Hormonrezeptor-positiven Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D. Des Weiteren konnte eine Hemmung der CXCL12 mRNA-Expression durch das Gestagen MPA in der T47D-Brustkrebszelllinie beobachtet werden.

Somit stellt sich die Frage, ob eine Antihormontherapie, beispielsweise mit dem selektiven Östrogen-Rezeptormodulator Tamoxifen, welcher eine kompetitive Hemmung an Östrogenrezeptoren sowie eine Steigerung der Progesteronrezeptor-Expression bewirkt, einen hemmenden Einfluss auf die CXCL12 vermittelte Metastasierung ausüben wird.

Da sowohl die CXCR4 als auch die CXCL12 mRNA-Expression einer differentiellen Genregulation in den beiden ER α und PR-positiven Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D unterliegt, ist eine generelle Vorhersage der Wirkung auf das Metastasierungsverhalten über die CXCL12-CXCR4-Achse nicht möglich. Diese Fragen gilt es in der Zukunft zu klären.

Eine zentrale Frage ist immer, ob sich die Befunde aus der Zellkultur auf Mammacarcinome übertragen lassen. Hierzu sind in einer ersten Annäherung immunhistochemische Untersuchungen an einem Kollektiv von 63 Mammacarcinomen durchgeführt worden, von denen Informationen zum Tumor- Grading, ER- und PR-Status sowie zur Ki67-Expression vorlagen

Der histologische Tumorgrad (G0-G3) ist ein wichtiger prognostischer Marker beim Mammacarcinom. Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem histologischen „Grading“ und dem Rezidiv-freien Überleben. Des Weiteren spielt das Grading eine wichtige Rolle bei der Wahl der Therapie (Bauerfeind, 2009).

Es zeigte sich in unserem kleinen Kollektiv eine Korrelation zwischen dem Tumor-Grad und der CXCL12-Expression: In den G3 Carcinomen wurde eher eine schwache bis mittelstarke CXCL12 Färbeintensität gefunden als in den G1- und G2 Carcinomen.

Im Gegensatz dazu zeigten Kang et al. (2005) eine Korrelation zwischen hoher CXCL12 Expression und Mammacarcinomen mit einem dem histologischen Grading von 2 bis 3.

Um eine genauere Aussage treffen zu können müsste man den Zusammenhang zwischen Grading und CXCL12 Intensität an einem größeren Kollektiv untersuchen.

Eine hohe CXCL12 Färbeintensität zeigt eine hohe CXCL12 Expression der Tumorzellen, was es frei gesetzten Tumorzellen erschwert, aus dem Tumor auszuwandern, da es keinen CXCL12-Gradienten zur Umgebung gibt. Ein niedriges Grading in Zusammenhang mit einer hohen CXCL12-Expression steht somit im Zusammenhang mit einer niedrigeren Metastasierungsneigung des Mammacarcinoms. Die Beobachtung wird unterstützt durch die Arbeiten von Hassan, 2009.

In dem Mammacarcinom-Kollektiv wurde gerade eben keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der CXCL12-Färbeintensität und der Östrogen-Rezeptor-Expression erkennbar, wie aus der Literatur und den Zellkulturexperimenten zu erwarten gewesen wäre. Dies kann ursächlich wohl an dem relativ kleinen Stichprobenumfang und der Dominanz der Östrogenrezeptor positiven Mamma-Karzinome liegen. Allerdings konnte eine signifikante Korrelation zwischen CXCL12 und Progesteronrezeptor-Expression festgestellt werden.

Somit kann man sagen, dass eine erhöhte CXCL12 Expression in Zusammenhang mit einer hohen Steroidhormonrezeptor-Expression und einem niedrigeren Grading steht. Und somit als Marker für eine geringe Metastasierungswahrscheinlichkeit.

Diese Erkenntnis müsste von therapeutischem Nutzen sein, wenn man bedenkt, dass Hormonrezeptor-positive und niedrig graduierte

Mammacarcinome eine gute Prognose haben und durch den Einsatz von Antihormontherapie einen guten therapeutischen Angriffspunkt.

Um CXCL12 als Marker nutzen zu können, müsste man somit die CXCL12 Expressionsstärke des Tumors und die CXCL12-Serumkonzentration messen, denn um eine Chemotaxis-getriebene Abwanderung von Tumorzellen zu verhindern, muss die CXCL12-Tumor-Konzentration höher als die Plasma-Konzentration und die der Metastasen-Zielorgane sein, wie in der Studie von Hassan, Ferrario et al. (2009) beschrieben wurde. Es wäre auch sinnvoll, die CXCL12-Konzentration unter Antihormontherapie zu untersuchen, um Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten von CXCR4-positiven Mammacarcinomen ziehen zu können.

In der Klinik ist Ki67 immer noch ein sehr kontrovers diskutierter Marker im Rahmen der Therapieentscheidung (Inwald et al., 2013). Inzwischen wird jedoch der Prozentsatz Ki 67 positiver Zellen im Rahmen von Studien zur Subtypisierung von Hormonrezeptor-positiven Mammacarcinomen eingesetzt (Cheang et al., 2009). Die Einteilung erfolgt laut der S3 Leitlinie für Mammacarcinome in den Typ „Luminal A“ u.a. bei Ki 67 < 14 % und in Luminal B bei Ki 67 $\geq$ 14 %. In Studien erhalten die Patientinnen, welche in die Hochrisiko-Gruppe „Luminal B“ eingestuft werden, eine Chemotherapie (S3-Leitlinie 2012)

In der Abbildung 4.36 erkennt man, dass der Großteil der abgebildeten untersuchten Mammacarcinome eine höhere Proliferationsrate als 14% aufweisen, insbesondere diejenigen mit einer CXCL12 Färbeintensität von 1 und 2.

Sauve et al. (2009) konnten zeigen, dass ein autokriner Feedback-Bogen über die CXCL12-CXCR4-Achse und die Östrogen-Rezeptoren zu einer erhöhten Proliferation des Mammacarcinoms führen.

In unserer 63 Mammacarcinome umfassenden Kohorte konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Proliferation und der CXCL12-Expression hergestellt werden. Eine weiterführende Auswertung konnte zeigen, dass 70% der Mammacarcinome mit einer niedrigen Proliferation ($\leq$ 20%) eine starke ER und CXCL12-Expression zeigten. Hohe Proliferationsraten ($>21\%$) wurden

hingegen in der Mehrzahl (44,4%) der Mammacarcinome mit auffallend niedriger ER und CXCL12-Expression gefunden. Somit kann die von Sauve und Mitarbeitern (2009) gemachte Beobachtung in diesem Kollektiv nicht bestätigt werden, unter dem Vorbehalt, dass die CXCR4-Expression der Tumoren nicht mitberücksichtigt wurde.

6 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich ca. 70.000 Frauen erstmalig am Mammacarcinom. 60-70 % der Mammacarcinome exprimieren Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Rezeptoren. Sowohl die Tumor-Entwicklung als auch die Progression werden durch Östrogene und Gestagene beeinflusst. ER und PR sind Bestandteil transkriptions-steuernder Proteinkomplexe, welche die in den therapeutischen Blickpunkt gelangten Histondeacetylasen (HDACs) enthalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von Estradiol, Gestagenen und dem HDACi Trichostatin A (TSA) auf die Gen-Expression des Chemokin-Rezeptor CXCR4 und seiner Liganden, CXCL12 und MIF, untersucht. Die CXCL12/CXCR4-Achse spielt eine zentrale Rolle bei der Mammacarcinom-Metastasierung. Analysiert wurden die ER/PR-positive MCF7- und T47D- sowie die ER/PR-negative MDA-MB 231-Mammacarcinom-Zelllinie.

In der MDA-MB 231-Zelllinie wurden der CXCR4 und seine Liganden konstitutiv exprimiert. Hingegen zeigte sich in den ER/PR positiven Mammacarcinom-Zelllinien eine zelllinienspezifische Gen-Regulation. Durch Estradiol wurde die CXCR4 mRNA und Protein Expression in MCF7-Zellen signifikant erniedrigt. Gestagene und TSA hatten keinen Effekt. In den T47D-Zellen wurde die CXCR4-Expression weder durch Steroide noch durch TSA beeinflusst. Die CXCL12 mRNA-Expression wurde in MCF7- und T47D-Zellen signifikant durch Estradiol gesteigert. In MCF7-Zellen wurde die Estradiol induzierte CXCL12 mRNA-Expression nur durch TSA, in T47D-Zellen nur durch Gestagene supprimiert. Die MIF Gen-Expression wurde in beiden Zelllinien nicht reguliert.

An einem Panel von 63 Mammacarcinomen mit bekanntem Grading, ER-, PR- und Proliferations-Status konnte nach semiquantitativer immunhistochemischer Analyse der CXCL12-Protein-Expression eine Korrelation zwischen einer hohen CXCL12-Expression mit einem niedrigen Grading und einer hohen Steroid-Hormonrezeptor-Expression hergestellt werden. Dies impliziert, dass nicht nur in Zelllinien sondern auch in Mammatumoren Steroidhormone an der CXCL12-Genregulation beteiligt sind. Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass die Regulation der Mitglieder der CXCR4-CXCL12-Achse deutliche Unterschiede in ihrer Regulation durch Steroidhormone und TSA zeigen. Diese Ergebnisse weisen auf eine klinisch-therapeutisch zu beachtende Individualität verschiedener Mammacarcinom-Entitäten hin.

7 Literaturverzeichnis

Ali S, Coombes RC: Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*, 2:101-112, 2002.

Ameisen JC: HIV.Setting death in motion. *Nature*, 395:117-9, 1998.

Anderson E, Clarke RB: Steroid Receptors and Cell Cycle in Normal Mammary Epithelium. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 9(1):3-13, 2004.

Anderson GL, Limacher M, Assaf AR et al. for the Women's Health Initiative Steering Committee: Effects of conjugate equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: The Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 291:1701-1712, 2004.

Andre F, Xia W, Conforti R, Wei Y, Boulet T, Tomasic G, Spielmann M, Zoubir M, Berrada N, Arriagada R, Hortobagyi GN, Hung MC, Pusztai L, Delaloge S, Michiels S, Cristofanilli M: CXCR4 Expression in Early Breast Cancer and Risk of Distant Recurrence. *Oncologist*, 2009.

Awmf, das Portal der wissenschaftlichen Medizin, Leitlinien, Endometriumcarcinom, URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-034I_S2k_Endometriumkarzinom_01.pdf (Stand 30. April 2013).

Awmf, das Portal der wissenschaftlichen Medizin, Leitlinien, Mammacarcinom, URL: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_k_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf (Stand 11. August 2013).

Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392:565-8, 1998.

Bando H, Matsumoto G, Bando M, Muta M, Ogawa T, Funata N, Nishihira J, Koike M, Toi M: Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res*, 93:389-396, 2002.

Bauerfeind I: MANUAL MammaKarzinom, Empfehlung zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München, 2009.

Becker, K: Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

Bernhagen J et al.: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365:756-759, 1993.

Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl S, Bucala R, Hickey ML, Weber C: MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13:587-596, 2007.

Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW: A sevenmembrane domain recetor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol*, 70:6288-95, 1996.

Birkhäuser M, Braendle W, Keller PJ, Kiesel L, Kuhl H, Neulen J: Empfehlungen zur hormonellen Kontrazeption. *Frauenarzt*, 45:1029-1032, 2004.

Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al.: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382:829-33, 1996.

Blot E, Laberge-Le Couteulx S, Jamali H, Cornic M, Guillernet C, Duval C, Hellot MF, Pille JY, Picquenot JM, Veyret C: CXCR4 membrane expression in node-negative breast cancer. *Breast J*, 14:268, 2008.

Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M, Pakdel F: Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e20898. doi: 10.1371/journal.pone.0020898. Epub, 2011.

Bulger M :Hyperacetylated chromatin domains: lessons from heterochromatin. J Biol Chem., 10;280(23):21689-92, 2005.

Calandra T, Roger T : Macrophage migration inhibitory factor : A regulator of innate immunity. Nar Rev Immunol, 3:791-800, 2003.

Chang-Claude J: Genetische Disposition bei Krebserkrankungen von Frauen. Forum der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., Schwerpunktthema FrauenLeben und Krebs. Omnimed Verlagsgesellschaft 12, Heft 8:595-597, 1997.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO: Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst., 20;101(10):736-50, 2009.

Chlebowski RT, Kuller LH, Prentice RL et al.: Breast Cancer after Use of Estrogen plus Progestin in Postmenopausal Women. N Engl J Med, 360:573-587, 2009.

Chu QD, Holm NT, Madumere P, Johnson LW, Abreo F, Li BD: Chemokine receptor CXCR4 overexpression predicts recurrence for hormone receptor-positive, node-negative breast cancer patients. Surgery, 149(2):193-9, 2011.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, Beral V: Breast Cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. Lancet, 350: 1047-1059, 1997.

Colleoni M, Viale G, Zahrieh D et al.: Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. Clin Cancer Res, 10:6622-6628, 2004.

Cress WD, Seto E: Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. J Cell Physiol, 184:1-16, 2000.

De Ruijter AJM, van Gennip H, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J*, 370:737-749, 2003.

Donnelly SC et al.: Regulatory role of macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat. Med.*, 3: 320-323, 1997.

Druckmann R.: Individuelle Hormonsubstitution: Die Rolle der Gestagene. *Journal für Menopause* 9:4-5, 2002.

Drummond DC et al.: Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45:495-528, 2004.

EBCTCG Secretariat, on Behalf of EBCTCG: Highlights from the early breast cancer trialists collaborative group (EBCTCG) 2005-2006 worldwide overview. *Breast Cancer Res Treat* 100(suppl 1): Abstr 4, 2007.

Ellis IO, Galea M, Broughton N et al.: Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 20:479-489, 1992.

Ellis MJ, Tao Y, Luo T et al.: Outcome prediction for estrogen receptor-positive breast cancer based on postneoadjuvant endocrine therapy tumor characteristics. *J Natl Cancer Inst*, 100:1380-1388, 2008.

Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19:403-410, 1991.

Feil C, Augustin HG: Endothelial cells differentially express functional CXCR4 chemokine receptor-4 (CXCR4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*, 247:38-45, 1998.

Ferrari A, Petterino C, Ratto A, Campanella C, Wurth R, Thellung S, Vito G, Barbieri F, Florio T: CXCR4 expression in feline mammary carcinoma cells:

evidence of a proliferative role for the SDF-1/CXCR4 axis. BMC Vet Res.8:27-2012. doi: 10.1186/1746-6148-8-27.

Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Muller W, Bucala R: The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. Proc Natl Acad Sci USA, 100:9354-9359, 2003.

Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S: Potent histone deacetylase inhibitors built from Trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:87-92, 2001.

Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, et al.: The α -chemokine, stromal cell-derived factor -1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. J Biol Chem, 273:23169-75, 1998.

Giersiepen K, Heitman C, Janhsen K, Lange C: Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 25 Brustkrebs, Robert Koch-Institut, 2005.

Göretzlehner G, Lauritzen C, Römer T, Rossmanith W: Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie, De Gruyter Verlag 6. Auflage, 2011.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. Ann Oncol 16:1569-1583, 2005.

Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD: Thresholds for therapies: highlights of the ST gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. Ann Oncol, 20:1319-1329, 2009.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD et al.: Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. J Clin Oncol, 21:3357-3365, 2003.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD et al.: 10th ST. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol*, 18(7):1133-1144, 2007.

Graham JD, Clarke CL: Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*, 18(41997):502-19, 1997.

Greiser CM, Greiser EM, Dören M: Menopausal hormone therapy and risk of breast cancer: a meta-analysis of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Human Reprod Update*, 11:561-573, 2005.

Haag P, Hanhart N, Müller M: Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis - 2007/08, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2006.

Hall JM, Korach KS: Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, 17(5):792-803, 2003.

Harrell JC, Dye WW, Allred DC, et al.: Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes. *Cancer Res*, 66(18):9308-15, 2006.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK et al.: Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 17:1474-1481, 1999.

Hassan S, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M: Plasma stromal cell-derived factor-1: host derived marker predictive of distant metastasis in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 14:446-454, 2008.

Hassan S, Ferrario C, Saragovi U, Quenneville L, Gaboury L, Baccarelli A, Salvucci O, Basik M: The Influence of Tumor-Host Interactions in the Stromal

Cell-Derived Factor-1/CXCR4 Ligand/Receptor Axis in Determining Metastatic Risk in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*, 175(6):66-73, 2009.

Herbein G, Mählkecht U, Batliwalla F, et al.: Apoptosis of CD8⁺ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*, 395:189-94, 1998.

Hess-Stumpp H: Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic. *European Journal of Cell Biology* 84:109-121, 2005.

Holm NT, Byrnes K, Li BD, Turnage RH, Abreo F, Mathis JM, Chu QD: Elevated levels of chemokine receptor CXCR4 in HER-2 negative breast cancer specimens predict recurrence. *J Surg Res*, 141:53-59, 2007.

Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP : HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417:455-458, 2002.

Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Caenero A; Hannon GJ, Beach DH: A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Expp Med*, 190:1375-1382, 1999.

Hulley S, Furberg CD, Barrett-Conner E et al.: Noncardiovascular disease outcomes during 6,8 years of hormone therapy: heart and estrogen/progestin replacement study follow-up. *JAMA*, 288:58-66, 2002.

Ikeda K, Inoue S: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol.*, 67(5):435-42, 2004.

Jemal A, Ward E, Thun MJ: Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast Cancer Res*, 9:R28, 2007.

Johnstone RW: Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1:287-299, 2002.

Johnstone RW, Licht JD: Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*, 4:13-18, 2003.

Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW: Histone deacetylase specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J. Biochem.*, 275:20436-20443, 2000.

Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ et al.: Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer*, 12: 1071-1082, 2005.

Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG: Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res.*, R402-10, 2005.

Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ: Progesterone receptor isoform functions in normal breast development and breast cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 18(1):11-33, 2008.

Karow T, Lang-Roth R: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Thomas Karow Verlag, 2006.

Klinga M, Kaufmann M, Runnebaum B: Steroidrezeptoren beim Mammakarzinom. Neue Konzepte der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. Kubli F Springer-Verlag. Berlin: 217-225, 1984.

Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, Hirose M, Maeda Y, Takahashi H, Terashima Y, Matsushima K, Shimada I: Structural Basis of the Interaction between Chemokine Stromal Cell-derived factor-1/CXCL12 and Its G-protein-coupled Receptor CXCR4. *Journal of Biological Chemistry*, 284:35240-35250, 2009.

Kramer OH, Gottlicher M, Heinzl T: Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol. Metab.* 12:294-300, 2001.

Krusche CA, Wülfing P, Kersting C, Vloet A, Böcker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J: Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat.*, 90(1):15-23, 2005.

Kryczek I, Wei S, Keller E, Liu R, Zou W: Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(3):C987-95, 2007.

Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H: Expression Levels of Estrogen Receptor- α , Estrogen Receptor- β , and Corepressors in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 512-518, 2000.

Lee SA, Ross RK, Pike MC: An overview of menopausal oestrogen-progestin hormone therapy and breast cancer risk. *British Journal of Cancer*, 92: 2049-2058, 2005.

Li YM, Pan Y, Wei Y, Cheng X, Zhou BP, Tan M, Zhou X, Xia W, Hortobagyi GN, Yu D, Hung MC: Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 6:459-469, 2004.

Lin VCL, Ng EH, Aw SE, Tan MGK, Ng EHL, Chan VSW, Ho GH: Progestins Inhibit the Growth of MDA-MB 231 Cells Transfected with Progesterone Receptor Complementary DNA. *Clinical Cancer Research*, 5:395-403, 1999.

Löffler G: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie* 4. Auflage Springer Verlag, 2001.

Lolis E, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor. *Expert Opin Ther Targets.*, 7(2):153-64, 2003.

MacMahon B, Cole P: Is the breast cancer incidence declining? *Epidemiology*, 19:268-269, 2007.

Mai A, et al.: Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med. Res. Rev.*, 25:261-309, 2005.

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK: Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Rev. Cancer*, 1:194-202, 2001.

Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Vera PL: Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC Cancer*, 5:73, 2005.

Miller TA, Witter DJ, Belvedere S: Histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 46:5097-5116, 2003.

Minucci S, Pelicci PG: Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature*, 6(1):38-51 2006.

Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, Pfeffer U: CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *European Journal of Cancer*, 45:2579-2587, 2009.

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R: Sustained mitogen-activated kinase (MAPK) and comparison with C8IS MIF. *Eur J Biochem*, 261: 753-766, 1999.

Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: Regulatory role in the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:345-350, 2002.

Morand EF, Leech M, Bernhagen J, MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, 5:399-410, 2006.

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65:55-63, 1983.

- Mukherjee D, Zhao J: The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res.*, 3(1):46-57, 2013.
- Müller A, Homey B, Soto H, et al.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824):50-6, 2001.
- Münster P, Marchion D, Bicaku E, Lacevic M, Kim J, Centeno B, Daud A, Neuger A, Minton S, Sullivan D: Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC. *Clin Cancer Res.*, 1;15(7):2488-96, 2009.
- Narod SA: Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 8:669-679, 2011.
- Nguyen M, Lue H, Kleemann R, Thiele M, Tolle G, Fingelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J: The cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol*, 170:3337-3347, 2003.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al.: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 382:833-5, 1996.
- Osborne CK: Receptors. In: *Breast Diseases*, 2nd Edition. Harris J, Hellman IC, Kinne D, JB Lippincott Company. Philadelphia, 214-229, 1990
- Palmieri D, Halverson OD, OuatasbT, Horak CE, Salerno M, Johnson J, Figg WD, Hollingshead M, Hursting S, Berrigan D, Steinberg SM, Merino MJ, Steeg PS: Medroxyprogesterone Acetate Elevation of Nm23-H1 Metastasis Suppressor Expression in Hormone Receptor-Negative Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 97:632-642, 2005.

Pearce CL, Chung K, Pike MC et al.: Increased Ovarian Cancer Risk Associated With Menopausal estrogen Therapy Is Reduced by Adding a Progestin. *Cancer*, 115:531-539, 2009.

Regan MM, Viale G, Mastropasqua MG et al.: Re-evaluating adjuvant breast cancer trials: assessing hormone receptor status by immunohistochemical versus extraction assays. *J Natl Cancer Inst*, 98(21):1571-1581, 2006.

Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten-Brustkrebs, URL: <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs> (Stand 11. Februar 2014).

Rhodes LV, Short SP, Neel N, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S, Wei Y, Yu D, Sun M, Muir SE, Fonseca JP, Bratton MR, Segar C, Tilghman SL, Sobolik-Delmaire T, Horton LW, Zaja-Milatovic S, Collins-Burow BM, Wadsworth S, Beckman BS, Wood CE, Fuqua SA, Nephew KP, Dent P, Worthylake RA, Curiel TJ, Hung MC, Richmond A, Burow ME Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer, *Cancer research*, 2010.

Rollins BJ: Chemokines. *Blood*, 90:909-928, 1997.

Rosato RR, Grant S: Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 13:21-38, 2004.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al.: Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, 24(3):227-35, 2000.

Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A, Deschenes J, Sauter G, Simon R, Bianchi R, Basik M: The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. *Breast Cancer Res Treat*, 97:275-283, 2006.

Salvucci O, Yao L, Villaba S, Sajewicz A, Pittaluga S, Tosato G: Regulation of endothelial cell branching morphogenesis by endogenous chemokine stromal-derived factor-1. *Blood*, 99:2703-11, 2002.

Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R: Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*, 21(11):2344-53, 2007.

Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A: Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer research*, 69:5793–5800, 2009.

Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known to the unknown. *J Cell Physiol.*, 182(3):311-22, 2000.

Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 10;28(3):495-500, 1995.

Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, Luker GD: CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer research*, 64:8604–8612, 2004.

Stamatopoulos B, Meuleman N, De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Lagneaux L: The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis, down-regulates the CXCR4 chemokine receptor and impairs migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 95(7):1136-43, 2010.

Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403:41-45, 2000.

Tashiro K, Tada H, Heilker R, et al.: Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 261(5121):600-3, 1993.

The Women's Health Initiative Steering Committee: Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy - The Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. JAMA, 291:1701-1711, 2004.

Thomas S, Thurn KT, Biçaku E, Marchion DC, Münster PN: Addition of a histone deacetylase inhibitor redirects tamoxifen-treated breast cancer cells into apoptosis, which is opposed by the induction of autophagy. Breast Cancer Res Treat., 130(2):437-47, 2011.

Tinoco G, Warsch S, Glück S, Avancha K, Montero AJ: Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies. J Cancer, 4(2):117-32, 2013.

Tyczynski JE: Breast Cancer in Europe. Fact Sheet. European Network for Cancer Registries ENCR, 2002.

Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J: Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. BMC Cancer, 9:230, 2009.

Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC: Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast cancer in Vivo. Clinical Cancer Research, 7:971-976, 2001.

Volin MV, Joseph L, Shockley MS, Davies PF: Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. Biochem Biophys Res Commun, 242:46-53, 1998.

Von Minckwitz G, Raab G, Caputo A et al.: Doxorubicin with cyclophosphamide followed by docetaxel every 21 days compared with doxorubicin and docetaxel every 14 days as preoperative treatment in operable breast cancer: the GEPAR DUO study of the German Breast Group. J Clin Oncol, 23:2676-2685, 2005.

Wade PA: Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. Hum. Mol. Genet., 10:693-698, 2001.

Weber C, Schober A, Zernecke A: Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24: 1997-2008, 2004.

Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB: Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene*, 27(10):1461-71, 2008.

Wilson JM, Coletta PL, Cuthbert RJ, Scott N, MacLennan K, Hawcroft G, Leng L, Lubetsky JB, Jin KK, Lolis E, Medina F, Brieva JA, Poulsom R, Markham AF, Bucala R, Hull MA: Macrophage migration inhibitory factor promotes intestinal tumorigenesis. *Gastroenterology*, 129: 1485-1503, 2005.

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG: Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Genetics and Development*, 9:140-147, 1999.

Yeh YT, Chang CW, Wei RJ, Wang SN: Progesterone and Related Compounds in Hepatocellular Carcinoma: Basic and Clinical Aspects. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Article ID 290575, 2013.

Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, Horinouchi S: Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48(Suppl.1):20-26, 2001.

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatin A. *J. Biol. Chem.*, 265:17174-17179, 1990.

Auflistung der eigenen Publikationen

Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Gießen, 2007:

The effects of steroids and Trichostatin A on CXCR4 expression in T47D and MCF7 breast cancer cells

Rampelbergh H.M., von Rango U., Eisner S., Krusche C.A.

Department of Anatomy and Reproductive Biology, RWTH Aachen University,
52074 Aachen, Germany.

Danksagung

An erster Stelle und ganz besonders herzlich danke ich meiner Doktormutter **Priv. Doz. Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche**. Zum einen, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Thema zu arbeiten. Und zum anderen, dass sie mir interessante und neue Einblicke in die wissenschaftliche Forschung gewährte. Ihre hohe Begeisterung und Motivation haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sie war als hilfsbereite Ansprechpartnerin stets hoch engagiert und investierte viel Zeit und Geduld. Ich habe von ihr fachlich sowie menschlich viel gelernt. Danke!

Bei **Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Leube**, Direktor des Institutes für Molekulare und Zelluläre Anatomie, sowie bei **Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Henning M. Beier**, Emeritus, Direktor des Instituts für Anatomie und Reproduktionsbiologie a.D., möchte ich mich bedanken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben in ihrem Institut die Experimente für meine Dissertation durchzuführen.

Ebenso möchte ich Frau **Professor Dr. rer. nat. Irmgard Classen-Linke** und bei Frau **Priv. Doz. Dr. rer. nat. Ulrike von Rango** für ihre Unterstützung danken.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team des Institutes für Molekulare und Zelluläre Anatomie für die freundliche und geduldige Einarbeitung in den verschiedenen Forschungsbereichen. Besonderen Dank geht an **Vanessa Creutz** für ihre geduldige, motivierende und freundschaftliche Unterstützung, insbesondere bei der Zellkultur, den PCR Läufen und während des Schreibens der Dissertation. Auch einen herzlichen Dank an **Bärbel Bonn, Sabine Eisner, Sabina Hennes-Mades**, und **Diana Seelis** für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor.

Für die Bereitstellung der MTT Assays der MCF7 und MDA-MB 231 Zellen bedanke ich mich bei PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche und Vanessa Creutz.

Für die Bereitstellung der Mammacarcinomsichtungsblöcke bedanke ich mich bei Herrn **Professor Dr. H.-H. Kreipe**, Direktor des Institutes für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Danke an Stephan Haas für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, *Hanna Rampelbergh, Hagbenden 61, 4731 Eynatten, Belgien*, hinterlegt sind.

**Eidesstattliche Erklärung
gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung**

Hiermit erkläre ich, Frau Hanna Rampelbergh an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Studien zur Expression und Regulation des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors CXCR4 und seiner Liganden CXCL12 und MIF in drei Mammacarcinom-Zelllinien“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung der Zellkultur, der RNA-Isolierung, der cDNA Synthese, der RT-PCR Läufen, Western Blots, der Immunhistochemie sowie deren Analyse, statistische Auswertung und Bewertung.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind:

A. MTAs Vanessa Creutz, Sabine Eisner, Sabina Hennes-Mades, Bärbel Bonn, Diana Seelis: Einarbeitung und Hilfestellung bei der Durchführung der Laborarbeit

B. Professor Dr. H.-H. Kreipe, Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover und PD Dr. rer. nat. Claudia A Krusche: zur Verfügung gestellte Tissue Microarrays von Mammacarcinomen

C. PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche und Vanessa Creutz: Durchführung der MTT Assays von MCF7 und MDA-MB 231 Zellen

D. Stephan Haas: Formatierung der Arbeit

E. Doktormutter PD Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche: Studiendesign sowie Überwachung, Korrektur der Dissertation und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung

Hanna Rampelbergh

Als Betreuerin der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau Hanna Rampelbergh.

Priv. Doz. Dr. rer. nat. Claudia A. Krusche

Lebenslauf**Hanna Maria Irene Wilhem Rampelbergh**

Hagbenden 61
4731 Eynatten
Belgien

Mobil: +49 177 / 9582480
E-Mail: hanna.rampelbergh@luisenhospital.de

Geburtsdatum/-Ort: 11. Januar 1983 in Eupen, Belgien
Nationalität: belgisch
Familienstand: ledig
Konfession: katholisch

Ausbildung

1989 - 1995	Städtische Primarschule Oberstadt, Eupen, Belgien
1995 - 2001	Pater Damian Sekundarschule, Eupen, Belgien Abitur
2001 - 2002	Hazen High School, Hazen, North Dakota, USA High School Abschluss
2002 - 2009	Medizin-Studium an der RWTH Aachen Physikum Herbst 2005 Staatsexamen Oktober 2009
Seit 01/2010	Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Luisenhospital Aachen

Praktisches Jahr

August 2008 - Dezember 2008	1. Tertial des Praktischen Jahres: Medizinische Klinik Luisenhospital Aachen
Dezember 2008 - März 2009	2. Tertial des Praktischen Jahres: Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe Luisenhospital Aachen

**März 2009 -
Juli 2009**

3. Tertial des Praktischen Jahres:

Chirurgische Klinik, Unfallchirurgie sowie
Gefäßchirurgische Klinik
Luisenhospital Aachen

Dissertation

2006 - 2014

**Experimentelle Doktorarbeit am „Institut für
Anatomie und Reproduktionsbiologie“ der RWTH
Aachen**

Fachbereich: Reproduktionsbiologie

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Claudia Krusche

Posterpräsentation

Hanna M. Rampelbergh, Ulrike von Rango, Sabine
Eisner, Claudia A. Krusche

“The effects of steroids and Trichostatin A on CXCR4
mRNA expression in T47D and MCF7 breast cancer
cells”. 102nd Annual Meeting of the Anatomische
Gesellschaft, 2007, Gießen

Famulaturen

März 2006

Famulatur im Luisenhospital Aachen

Fachbereich: Innere Medizin

September 2006

**Praxis-Famulatur bei Dr. med. Gottfried von
Kirchbach und Dr. med. Rudolf Kasperek, Aachen**

Fachärzte für Bronchialheilkunde, Allergologie sowie
Umweltmedizin

August 2007

**Famulatur Akademiska Sjukhuset Uppsala,
Schweden**

Fachbereiche: Orthopädie und Unfallchirurgie

Februar 2008

Famulatur am Universitätsklinikum Aachen

Fachbereich: Geburtshilfe und Gynäkologie

Sonstige Aktivitäten

2004 - 2005**Hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin im „Institut für Anatomie“ der RWTH Aachen**

Betreuung von Studenten des ersten bis vierten Semesters

Makroskopie: Präparierkurs (Bewegungsapparat, Situs)

Mikroskopie: Histologie

2005**Studentische Aushilfskraft im Institut für Physiologie
RWTH Aachen**

Betreuung von Studenten während des Schmerzphysiologischen Praktikums

Seit 2010**Gynäkologischer Unterricht**

an der Hebammen- sowie OTA- Schule des Luisenhospitals Aachen