

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. Walter Hermanns

Angefertigt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern der Ludwig-Maximilians-
Universität München
(Dr. med. Hendrik Seeliger)

**Expression des Östrogenrezeptors beta beim humanen duktalem
Pankreasadenokarzinom und Inhibition der Tumorprogression durch Einsatz des
selektiven Östrogenrezeptormodulators Raloxifen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Nina Nicola Seel
aus München

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Gabius

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das humane duktale Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1	Vorkommen	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Klinik und Symptome	2
1.1.4	Pathologie	3
1.1.5	Diagnose	3
1.1.6	Therapie und Prognose	4
1.1.6.1	Whipple-Operation	4
1.1.6.2	Chemotherapie	5
1.1.6.3	Strahlentherapie	6
1.1.6.4	Stammzelltherapie	6
1.2	Das Pankreasadenokarzinom beim Tier	6
1.2.1	Vorkommen	6
1.2.1.1	Hund und Katze	7
1.2.1.2	Pferd	7
1.2.1.3	Andere Tierarten	8
1.2.2	Ätiologie	8
1.2.3	Klinik und Symptome	8
1.2.4	Pathologie	9
1.2.5	Diagnose	9
1.2.6	Therapie und Prognose	10
1.3	Östrogenrezeptoren	10
1.3.1	Struktur und Signalübertragung	10
1.3.2	Einfluss von Östrogenrezeptoren auf die Tumorprogression	12
1.4	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren	14
1.4.1	Wirkweise	14
1.4.2	Raloxifen (Evista®)	15
1.4.3	Raloxifen in der Tiermedizin	16
2	Fragestellung	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Material und Geräte	18
3.2	Zelllinien	18
3.3	Zellkultur	18

3.4	Tissue Microarrays (TMAs)	20
3.4.1	Erstellung des Patientenkollektivs	20
3.4.2	Herstellung der Tissue Microarrays	20
3.4.3	Auswertungsscore	22
3.5	Immunoblot Analyse (Western Blot)	22
3.6	BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin)-Proliferationstest	23
3.7	Tierversuche	24
3.7.1	Versuchstiere und Haltung	24
3.7.2	Tierversuchsantrag	25
3.7.3	Versuchsdurchführung	25
3.7.3.1	Orthotope (intrapankreatische) Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen in der Nacktmaus	25
3.7.3.2	Therapie	26
3.7.3.3	Sektion	26
3.8	Histologische Untersuchungen	27
3.8.1	Anfertigen der Schnitte	27
3.8.2	Hämatoxylin / Eosin-Färbung	27
3.8.3	Immunhistochemie	27
3.8.3.1	Ki67	27
3.8.3.2	CD31 (PECAM-1)	28
3.8.3.3	ER β	28
3.8.3.4	Auswertung	29
3.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
3.10	Transiente Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit ER-spezifischer small interfering RNA (siRNA)	31
3.11	Statistik	33
4	Ergebnisse	35
4.1	Expression von ER β auf dem humanen duktalem Pankreasadenokarzinom	35
4.2	Nachweis von ER α und ER β in humanen Pankreaskarzinomzelllinien	40
4.3	Antiproliferative Effekte des selektiven Östrogenrezeptormodulators Raloxifen auf Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	41
4.4	Inhibition des Tumorwachstums durch Raloxifen als mögliche Folge einer Down-Regulation des Zytokins Interleukin-6	43
4.5	Die antiproliferative Wirkung von Raloxifen auf humane Pankreaskarzinomzellen ist ER β -vermittelt	44
4.6	Inhibition der Tumorprogression beim Pankreaskarzinom durch Therapie mit Raloxifen <i>in vivo</i>	47
4.6.1	Sektion	48

4.6.2	Körpergewicht	48
4.6.3	Tumorgewicht	48
4.6.4	Tumolvolumen	49
4.6.5	Leber- und Lymphknotenmetastasen	51
4.6.6	Wundtumore	53
4.7	Immunhistochemische Untersuchungen	54
4.7.1	Ki67	54
4.7.2	ER α und ER β	55
4.7.3	CD31	56
5	Diskussion	57
5.1	Prognostische Bedeutung von ER β im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom	57
5.2	Inhibition des Tumorwachstums durch Raloxifen	61
5.3	Raloxifen moduliert die Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in humanen Pankreaskarzinomzelllinien	65
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	70
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	74
8	Literaturverzeichnis	76
9	Verzeichnis der Abbildungen	96
10	Verzeichnis der Tabellen	98
11	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	99
12	Verzeichnis der verwendeten Materialien	103
12.1	Chemikalien und Kits	103
12.2	Antikörper	106
12.3	Verbrauchsmaterialien	107
12.4	Laborgeräte	108
12.5	Puffer und Lösungen	110
	Danksagung	112

1 Einleitung

1.1 Das humane duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Vorkommen

Pankreaskarzinome machen etwa 3,5 % aller bösartigen Neubildungen beim Erwachsenen aus. Mit einer geschätzten Inzidenz von 42470 Erkrankungen im Jahre 2009 und 35240 Todesfällen stellt das Pankreaskarzinom die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in den USA dar [1]. Insgesamt liegen dabei die Inzidenzraten in den westlichen Regionen (USA, Kanada, Nordeuropa, Skandinavien) höher als in den südöstlichen Ländern (Südostasien, Indien, Südeuropa). In Deutschland erkranken laut Angaben des Robert Koch-Instituts (RKI) knapp 13500 Menschen pro Jahr neu an einem Pankreaskarzinom und jeder sechste tumorbedingte Tod in Deutschland wird durch ein duktales Pankreasadenokarzinom verursacht [2].

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 1 bis 5 % [1, 3, 4] und ohne therapeutisches Eingreifen beläuft sich die mediane Überlebenszeit im fortgeschrittenen Stadium auf 3,5 Monate [5]. Der Altersgipfel liegt zwischen der 6. und 8. Dekade, wobei 60 bis 70 % der Erkrankten älter als 60 Jahre sind. In den meisten Ländern sind Männer vom Pankreaskarzinom häufiger betroffen als Frauen mit einem Verhältnis von etwa 1,25 bis 1,75 zu 1 [6]. Dies gleicht sich aber mit fortschreitendem Alter zunehmend aus und scheint sich mit Einsetzen der Menopause der Frau nahezu die Waage zu halten. Physiologisch bedingt sinkt bei Frauen nach der Menopause der Östrogenspiegel im Blut, woraus man schließen könnte, dass Östrogene eine protektive Wirkung gegen Pankreaskarzinombildung ausüben, wie es auch für die Tumorigenese des Kolonkarzinoms zu gelten scheint [7]. Gegen einen positiven Effekt von Östrogeneinfluss spricht allerdings die Tatsache, dass dieser wesentlich zur Karzinogenese von Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinom beiträgt [8, 9].

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist nach wie vor ungeklärt. Zu den bekannten Risikofaktoren für dessen Entwicklung zählt sowohl aktiver als auch passiver Nikotinkonsum, was in zahlreichen epidemiologischen Studien bewiesen wurde [10-16]. Dabei steigt die

Inzidenz proportional mit der konsumierten Tabakmenge und der Zeitspanne des Nikotinkonsums [17]. Auch diätetische Gesichtspunkte, wie übermäßiger Verzehr von Kohlenhydraten und rotem Fleisch bzw. tierischen Fetten und Adipositas werden als prädisponierend angesehen [18, 19]. Vermehrter Verzehr von Obst und Gemüse sowie Bewegung wirken dagegen offensichtlich protektiv [18, 20, 21].

Als weitere mögliche krankheitsfördernde Faktoren wurden mehrfach übermäßiger Kaffee- [22, 23] und Alkoholkonsum [16] diskutiert. Ein erhöhtes Risiko konnte für beide Faktoren jedoch nicht bewiesen werden [24]. Alkohol ist zwar der Hauptrisikofaktor für eine chronische Pankreatitis, die oft ein Pankreaskarzinom nach sich ziehen kann, eine kausale Verbindung ist jedoch nicht abschließend bewiesen [20].

Als hereditäre Ursache lässt sich eine bei 5 bis 10 % aller Pankreaskarzinompatienten auftretende familiäre Häufung nachweisen [25]. Zu den familiären Tumorsyndromen, die mit einer signifikant erhöhten Erkrankungshäufigkeit einhergehen [26], gehören in erster Linie die hereditäre Pankreatitis [27], das familial atypical multiple mole melanoma-Syndrom (FAMMM) [28] und das Peutz-Jeghers-Syndrom [29].

Auch Diabetes mellitus wird mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht [30-34]. Im Tierversuch lässt sich das Pankreaskarzinom durch Langzeitbehandlung mit Karzinogenen wie Nitrosamin induzieren [35]. Als weiterer Risikofaktor wird daher auch ein längerer Kontakt im Rahmen beruflicher Exposition mit chemischen Noxen wie 2-Naphthylamin, Benzidin oder DDT angenommen [36-40].

1.1.3 Klinik und Symptome

Da in der Frühphase der Erkrankung keine typischen Beschwerden oder Symptome vorliegen, erfolgt die Diagnose meist erst im fortgeschrittenen Stadium, wenn der Tumor schon Metastasen entwickelt hat. Die spät einsetzende Symptomatik hängt von der Lokalisation des Tumors in der Bauchspeicheldrüse ab. Das Pankreasadenokarzinom ist beim Menschen zu ca. 70 % im Pankreaskopf lokalisiert [41], dabei kommt es durch die Verengung des Gallengangs und somit gestörten Galleabfluss oftmals zu einem extrahepatischen Ikterus. Bei Tumoren im Corpus- und Caudabereich äußern sich die ersten Symptome uncharakteristisch in Gewichtsverlust und Schmerzen im Oberbauch. Dazu können jeweils gestörtes

Allgemeinbefinden, Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und unspezifische Rückenschmerzen auftreten; ca. 80 % der Patienten entwickeln eine Diabetes mellitus [42].

1.1.4 Pathologie

Der weitaus häufigste solide Pankreastumor, das duktales Pankreasadenokarzinom, wird durch frühzeitige hämatogene und lymphogene Metastasierung charakterisiert [43, 44], meist in regionären Lymphknoten, Leber oder Lunge. Zudem zeigen duktales Pankreasadenokarzinome ein lokal ausgeprägtes infiltratives Wachstum mit meist ausgedehnter Nervenscheideninfiltration. Die meisten Pankreasadenokarzinome sind mäßig (ca. 50 %) bis hoch differenziert (ca. 40 %) [45], führen zu einer deutlichen desmoplastischen Stromareaktion und weisen somit eine derbe Konsistenz auf.

In den meisten Tumoren können anhand genetischer Untersuchungen Mutationen des p53-Gens und bis zu 90 % des K-ras-Protoonkogens nachgewiesen werden [46-50].

1.1.5 Diagnose

Laboruntersuchungen allein sind wenig aussagekräftig, da sämtliche Parameter, wie die Serumkonzentration der gängigen Tumormarker CA19-9 und CEA, die notwendige Sensitivität und Spezifität vermissen lassen. Bei Verdacht auf Pankreaskarzinom erfolgt der erste Schritt zur Diagnose üblicherweise über perkutane Sonographie. Auf diese Weise lassen sich etwa 70 % der Karzinome erkennen und Lebermetastasen detektieren. Als Verfahren für das Staging der Tumore werden hauptsächlich die Computertomographie (CT) mit einer Sensitivität von ca. 90 % und die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) mit MRCP (Magnetresonanz-Cholangio-Pankreatikographie) verwendet. Auch die Endosonographie kommt für diese Indikation infrage. Die invasive Endoskopische Retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) dient, abgesehen von der Abklärung von Papillenprozessen, in erster Linie therapeutischen Zwecken. Stellt sich ein Karzinom aufgrund seines fortgeschrittenen Stadiums bereits im Vorfeld als inoperabel dar, oder soll eine neoadjuvante Therapie durchgeführt werden, ist eine histologische Beurteilung durch Fein- bzw. Grob-Nadelpunktion indiziert. Diese erfolgt in der Regel sonographisch, endosonographisch oder CT-kontrolliert. Bei Verdacht auf Fernmetastasen in Leber oder Peritoneum, welche oftmals in den bildgebenden Verfahren nicht erfasst werden, kann präoperativ eine diagnostische Laparoskopie durchgeführt werden [51].

1.1.6 Therapie und Prognose

Gegenwärtig gilt die radikale chirurgische Resektion unter Einbeziehung der regionären Lymphknoten noch immer als einzige potentiell kurative Therapiemöglichkeit. Diese ist jedoch nur bei auf das Pankreas begrenzten Tumoren, das heißt in 20 % der Fälle durchführbar, da auf zuverlässige Maßnahmen zur Früherkennung nicht zurückgegriffen werden kann und die Diagnosestellung oftmals auf Zufallsbefunden beruht. Der Tumor ist zu diesem Zeitpunkt bei 40 % der Patienten schon lokal fortgeschritten, bei weiteren 40 % haben sich bereits Metastasen entwickelt. Ist dies der Fall, beträgt die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung nur noch 5 Monate, auch wenn verschiedene palliative Maßnahmen ergriffen werden. Doch selbst bei einer radikalen Resektion liegen die 5-Jahres-Überlebensraten nur bei 10 bis 20 %, die mediane Überlebenszeit bei 18 bis 25 Monaten [52, 53].

Aufgrund des Fehlens von zuverlässigen Methoden zur Früherkennung und des sehr aggressiven Tumorwachstums entspricht die Inzidenzrate beim Pankreasadenokarzinom annähernd der Mortalitätsrate.

1.1.6.1 Whipple-Operation

Wenn noch keine komplexe Infiltration der umliegenden Gefäße existiert und sich noch keine Fernmetastasen gebildet haben, stellt das klassische Resektionsverfahren für die zu 60 bis 70 % im Pankreaskopf lokalisierten Karzinome die partielle Pankreatoduodenektomie (PPD) dar. Diese Operation nach Kausch-Whipple beinhaltet eine Resektion von Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase inklusive distalem Choledochus und distaler Magenhälfte. Regionäre Lymphknoten werden ebenfalls entfernt. Alternativ hierzu wird in den letzten Jahren zunehmend die pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie (PPPD) nach Traverso-Longmire als operatives Verfahren eingesetzt, bei welcher der Magen inklusive Pylorus vollständig erhalten bleibt.

Bei fortgeschrittenen Tumoren im Corpus- oder Caudabereich, die bereits die arteriellen Gefäße infiltriert haben, erfolgt in der Regel eine Pankreaslinksresektion mit Splenektomie. Sind Tumore in diesem Bereich lokal auf das Pankreas beschränkt, kann dieser Eingriff heutzutage oftmals mit Erhaltung der Milz durchgeführt werden.

1.1.6.2 Chemotherapie

Die aktuelle Standardchemotherapie nach R0/R1-Resektion eines Pankreasadenokarzinoms stellt eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine dar, obwohl sich Pankreasadenokarzinome oft als chemotherapieresistent erweisen. Noch vor wenigen Jahren galt 5-Fluorouracil (5-FU) als das Chemotherapeutikum, das die höchsten Erfolge erzielte, mit einer medianen Überlebenszeit von 4,2 bis 5,5 Monaten [54, 55]. Allerdings erwies sich die Ansprechrate von 0 % bis 19 % [56-59] als niedrig.

Eine bessere Verträglichkeit und auch geringfügig höhere Erfolgsraten als mit 5-FU konnten erzielt werden, als 1996 Gemcitabine (Difluorodeoxycytidine) aufgrund einer randomisierten Studie in Deutschland zugelassen wurde [60]. Hierbei sprachen die Patienten wesentlich besser auf Gemcitabine an (23,8 %) als auf die Therapie mit einem 5-FU-Bolus (4,8 %). Die Überlebensrate nach 12 Monaten lag bei den mit Gemcitabine behandelten Patienten deutlich höher (18 % verglichen mit 2 % bei den 5-FU-Therapiepatienten). Zudem konnte durch Gemcitabine eine signifikant längere mediane Überlebensdauer erzielt werden als durch 5-FU (5,65 Monate versus 4,41 Monate).

Es konnten letztendlich verschiedene Versuche von Kombinationstherapien mit diesem Pyrimidin-Antimetabolit nicht zu dem erhofften prägnanten Anstieg der Ansprechraten führen. Dennoch wurde in Phase-II- und -III-Studien mit Gemcitabine an unvorbehandelten Patienten mit Pankreasadenokarzinom in fortgeschrittenem Stadium eine Verbesserung des medianen Überlebens von 4,8 bis 5,6 Monaten erzielt [60-63]. Auch neuere Studien lassen darauf rückschließen, dass eine adjuvante Chemotherapie das Überleben verlängert [64, 65]. Aus den aktuellen präklinischen und klinischen Studien wird deutlich, dass, auf molekularbiologischem Verständnis basierend, wahrscheinlich mehrere Signalwege gleichzeitig durch Kombinationen von Inhibitoren oder unselektiven Tyrosinkinase-Inhibitoren blockiert werden müssen.

Für die palliative Behandlung von fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Tumorstadien sind als Wirkstoffe derzeit Gemcitabine und seit Januar 2007 der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib zugelassen. Die Kombinationstherapie aus beiden Substanzen (wöchentlich 1000 mg/m² i. v. Gemcitabine und täglich 100 mg Erlotinib p. o.) wird in den aktuellen S3-Leitlinien als Behandlungsstandard empfohlen, da sie verglichen mit Gemcitabine als

Monotherapeutikum sowohl das progressionsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben signifikant verlängert [66-70].

1.1.6.3 Strahlentherapie

Über den Stellenwert der Strahlentherapie in der Behandlung des Pankreasadenokarzinoms herrschen kontroverse Meinungen.

Da bei den meisten Patienten aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums eine R0-Resektion (nach welcher kein Tumorgewebe am Resektionsrand mehr nachzuweisen ist) nicht mehr durchgeführt werden kann, verbleibt einzig die Möglichkeit einer palliativen Therapie. In den meisten der bisherigen Studien konnte der alleinige Einsatz ionisierender Strahlung keine signifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit bewirken, verbunden mit oft erheblichen Nebenwirkungen [71]. Zumeist wird die Strahlentherapie deshalb mit der Chemotherapie kombiniert und kommt dann als simultane Radio-/Chemotherapie zu neoadjuvanten, adjuvanten oder palliativen Zwecken zum Einsatz.

1.1.6.4 Stammzelltherapie

Für mehrere Tumorentitäten konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass deren Proliferations- und Wachstumsverhalten auf die Physiologie undifferenzierter Stamm- und Progenitorzellen zurückzuführen ist [72-80], der oftmals zu Resistenzen gegen Chemotherapien führt. Diese Tumorstammzellen zeichnen sich durch stammzelltypische Oberflächenmarker aus (wie CD133, ABCG2), besitzen das Potenzial zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in unterschiedliche Gewebearten und zeigen eine erhöhte Tumorigenität [81, 82]. Um den Tumorstammzell-Pool gezielt beeinflussen zu können und somit Resistenzmechanismen ausschalten zu können, steht die bessere Charakterisierung der molekularen und biologischen Eigenschaften dieser Zellpopulation im Fokus des Interesses der Forschung, um daraus neue Therapiekonzepte zu entwickeln.

1.2 Das Pankreasadenokarzinom beim Tier

1.2.1 Vorkommen

Das exokrine Pankreaskarzinom ist bei den Haussäugetern bislang relativ schlecht untersucht, tritt aber offensichtlich bei allen Spezies auf. Dass die häufigsten Fälle nach wie vor

hauptsächlich bei Hunden und etwas seltener bei Katzen diagnostiziert werden [83-85], ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese üblicherweise aufgrund der Fürsorge des Halters oder im Zusammenhang mit Impfungen tierärztlichen Allgemeinuntersuchungen unterliegen und somit regelmäßig auf Veränderungen des Gesundheitsstatus überprüft werden. Die Analyse der Daten von elf veterinärmedizinischen Fakultäten in den USA und Kanada umfasste in einem Zeitraum von acht Jahren eine Anzahl von 54 registrierten Patienten mit Primärtumor. Unter diesen Fällen mit Pankreaskarzinom befanden sich 42 Hunde, neun Katzen, zwei Rinder und ein Pferd [85].

1.2.1.1 Hund und Katze

Obwohl Adenokarzinome des Pankreas regelmäßig bei Menschen auftreten, sind sie bei unseren domestizierten Tieren vergleichsweise selten. Am häufigsten finden sie sich bei älteren Hunden (8 bis 10 Jahre), und machen hier 0,5 bis 1 % aller Tumore aus [86-88]. Bei Hund und Katze sind sie vor allem im Corpus lokalisiert [89]. Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Pankreas nicht wie beim Menschen in Caput, Corpus und Cauda untergliedert wird, sondern sich aus dem zentralen Corpus und den zwei Schenkeln, Lobus pancreaticus dexter und sinister, zusammensetzt. Unter den Hunden sind Boxer signifikant häufiger betroffen als andere Rassen. Auch für den Airedale Terrier wird eine Rassedisposition vermutet. Ebenso verhält es sich mit dem Springer Spaniel [90, 91]. Bei Katzen finden sich Pankreaskarzinome im Allgemeinen noch seltener. Allerdings ist davon auszugehen, dass sich bei Katzen ebenso erst ab einem Alter von 8 Jahren ein klinisch nachweisbares Pankreaskarzinom entwickelt.

In einer retrospektiven Studie [92] konnte bei Hunden nach Untersuchung von 9342 Pankreata in 0,43 % ($n = 40$) aller Fälle ein Pankreaskarzinom diagnostiziert werden. Bei Katzen ergaben sich mit 0,4 % unter 6504 untersuchten Pankreata ähnliche Ergebnisse.

1.2.1.2 Pferd

Bei Pferden sind Pankreaskarzinome äußerst selten und am lebenden Tier schwer nachzuweisen, so dass sämtliche bislang beschriebenen Fälle erst post mortem diagnostiziert werden konnten [93, 94].

1.2.1.3 Andere Tierarten

Über Pankreaskarzinome bei anderen Tierarten wird in der Literatur selten berichtet, obwohl sie bei allen Haus- und vermutlich auch Wildsäugetieren auftreten [95]. Meist handelt es sich in diesen wenigen Fällen um Zufallsbefunde bei der Sektion von Zoo- oder Labortieren oder um Schlachthofkontrollen von Rindern und Schweinen. Ausführlichere Berichte existieren über Pankreastumore bei Rindern und Labortieren [85, 96, 97]. Infiltratives Wachstum und frühzeitige, aggressive Metastasierung, vor allem in Lymphknoten und Leber, werden in nahezu allen dokumentierten Fällen, unabhängig von der Spezies, beschrieben.

Auch bei allen Vogelarten können sich Pankreaskarzinome entwickeln [98-102]. Diese metastasieren ebenfalls in die Leber und in Blutgefäße und enden trotz Resektion so gut wie immer tödlich. Oft treten sie gemeinsam mit einem Gallengangkarzinom auf [102].

1.2.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist bei Tieren bislang nicht aufgeklärt. Bei Hunden lässt sich auf schon genannte Rassedisposition schließen. Bei Katzen konnten bislang keine Unterschiede hinsichtlich Rasse oder Geschlecht erkannt werden. Beinahe alle betroffenen Tiere waren fortgeschrittenen Alters. Als ein möglicher Einflussfaktor werden Mutationen des K-ras-Onkogens vermutet, da diese bei Katzen bislang einzig im Zusammenhang mit Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden konnten [84]. Zudem weisen Hunde eine fast identische K-ras-Mutation auf, wie sie bei Menschen mit Pankreaskarzinom zu beobachten sind [83].

1.2.3 Klinik und Symptome

Die klinischen Symptome bei Hund und Katze sind ebenso wie beim Menschen unspezifisch und umfassen Apathie, Inappetenz, Vomitus, Ikterus (posthepatisch), schmerzhaftes Abdomen, Kachexie, Aszites, palpierbare Umfangsvermehrung im kranialen Bauchbereich mit z. T. Kaudalverlagerung des Intestinums sowie Nekrosen. Oftmals beschrieben wird vor allem bei Katzen eine paraneoplasische Alopezie, welche allerdings auch bei Gallengangskarzinomen zu beobachten ist. Diese kann sekundär mit Malassezia-Hefen infiziert und nach Resektion des Karzinoms sogar reversibel sein. Sie stellt sich als symmetrischer bilateraler Haarverlust an Bauch, Kopf und medialen Gliedmaßen dar [103]. Nur in seltenen Fällen kommt es zu einer exokrinen Pankreasinsuffizienz [104].

Als Symptome bei den untersuchten Fällen der Equiden werden Inappetenz und Gewichtsverlust infolge Diarrhoe beschrieben. Alle anderen unspezifischen Symptome können aufgrund der geringen Anzahl ausgewerteter Fälle nicht als typisch betrachtet werden.

1.2.4 Pathologie

Meist handelt es sich um duktale oder azinäre Adenokarzinome mit früher und ausgeprägter Metastasierung und lokaler Infiltration in Abdominalraum, Diaphragma und vor allem Duodenum [105]. Eine ausgeprägte Metastasierung der im Gegensatz zum Menschen hauptsächlich im Corpus lokalisierten Tumore erfolgt ausgesprochen frühzeitig, insbesondere in Leber und Ln. sternalis cranialis [89, 106]. Eine K-ras-Mutation ist wie beim Menschen bei einem Großteil der Fälle nachweisbar.

1.2.5 Diagnose

Es muss bei Hund und Katze sorgfältig darauf geachtet werden, knotige Hyperplasien älterer Tiere und Tumore des endokrinen Pankreas auszuschließen. Die Diagnose wird meist auf Verdacht gestellt bzw. kann in seltenen Fällen durch Röntgenaufnahmen des Abdomens erhärtet werden, wenn sich dabei eine Verdichtung im kranialen rechten Abdomen und/oder eine Rechtsverlagerung des Duodenums nachweisen lässt.

Bildgebende Verfahren mit hoher diagnostischer Aussagekraft sind kontrastmittelverstärkte Computertomographie und abdominale Sonographie, insbesondere wenn bereits bestehende Metastasen nachgewiesen werden können.

Die palpatorisch erfassbaren Pankreasveränderungen lassen sich als hypoechogene Masse zwischen Duodenum und Magen sonographisch darstellen [107] und punktieren. Labordiagnostische Untersuchungen liefern entsprechend der Beteiligung anderer Organe oft unspezifische Ergebnisse, die beispielsweise Metastasierung widerspiegeln können. So zeigen Blutuntersuchungen variable Aktivitätssteigerungen von Lipase und Amylase im Serum.

Die Enddiagnose kann jedoch nur anhand einer histologischen Untersuchung von Biopsie- oder Resektionsmaterial erfolgen.

Bei Equiden mit Pankreaskarzinom findet sich oftmals eine beträchtlich erhöhte Aktivität der Leberenzyme, insbesondere der γ -Glutamyl-Transferase [93].

1.2.6 Therapie und Prognose

Die Prognose ist bei Adenokarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung aufgrund der extrem frühzeitigen und aggressiven Metastasierung bereits sehr schlecht. Eine Behandlung wird derzeit bei eindeutiger Diagnose in der Regel nicht durchgeführt, an eine Resektion ist aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums bei Diagnose nur ausnahmsweise zu denken. Es sind bislang keine Fälle bekannt, in denen ein Tier durch Operation oder Therapie geheilt werden konnte.

1.3 Östrogenrezeptoren

1.3.1 Struktur und Signalübertragung

Östrogenrezeptor-Signalwege regulieren wichtige physiologische Prozesse, so wie Zellwachstum und Apoptose [108]. Die vielschichtigen Aufgaben von Östrogenen wirken sich nahezu auf den gesamten Organismus aus. Infolgedessen haben Modifikationen des Hormonhaushalts weitreichende Folgen, wie sie beispielsweise nach der Menopause der Frau deutlich ersichtlich sind.

1985 konnte der erste Östrogenrezeptor [109] kloniert werden, der heute als Östrogenrezeptor alpha ($ER\alpha$) bezeichnet wird und zum wichtigsten prognostischen und prädiktiven Faktor beim Mammakarzinom avancierte. Erst 1996 konnte ein weiterer Östrogenrezeptor kloniert werden [4], der Östrogenrezeptor beta ($ER\beta$). Bis zu diesem Zeitpunkt gab es großen Klärungsbedarf in der Interpretation der Tatsache, dass zwar die meisten Körperzellen, sowohl beim Menschen wie auch beim Tier, mit Östrogenrezeptoren ausgestattet sind, natürliche und chemische Östrogene und Antiöstrogene jedoch in verschiedenen Organen und Organsystemen völlig unterschiedliche Wirkungen entfalteten. Die Klonierung des $ER\beta$ sowie das bessere Verständnis von gewebespezifischen Enhancer- und Repressor-Genen konnten schließlich weitere maßgebliche Aufschlüsse erbringen.

$ER\alpha$ und $ER\beta$ gehören zur Klasse 1 der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren und sind sich strukturell ähnlich. Beide weisen fünf [110] bzw. sechs [111] Domänen (A bis F) auf. In der DNA-bindenden C-Domäne (DBD) besteht eine 97%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, im Bereich der Liganden-bindenden E-Domäne (LBD) entsprechen sie sich beinahe zu 60 % (siehe Abbildung 1).

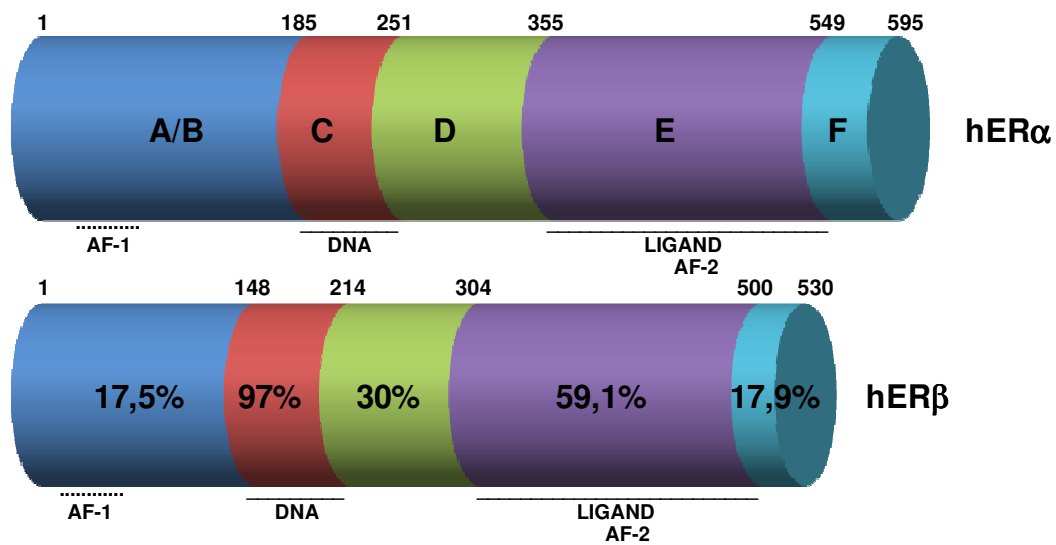


Abbildung 1: Struktur und Domänen der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β

Die Prozentzahlen nach [110] geben den Grad der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen innerhalb der einzelnen Domänen (A-F) an. AF (activation function), DNA (DNA-binding domain, DBD), Ligand (ligand-binding domain, LBD)

Sobald ein Ligand an den Rezeptor bindet, unterliegt dieser einer Konformationsänderung und es bilden sich nach Translokation in den Nukleus Homo- oder Heterodimere. Diese binden mit hoher Affinität an die spezifische DNA-Sequenz (Estrogen Responsive Elements, ERE) bestimmter Gene und können mithilfe von Co-Regulatoren und -Repressoren die Transkription beeinflussen.

Lange Zeit beschrieb man die Rezeptoren als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren [111]. Heute jedoch kennt man neben dem klassischen auch andere Wege der Aktivierung. So können nach Ligandenbindung über Interaktionen mit DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren wie dem SP-1-Komplex [112] genregulatorische Prozesse ohne direkte Bindung an die DNA abgewickelt werden. Zudem können über verschiedene Signaltransduktionswege, z. B. durch Wachstumsfaktoren, zelluläre Kinasen aktiviert werden, die die Östrogenrezeptoren phosphorylieren. Diese können dann die Dimerisierung vollziehen, an die DNA binden und auf die Regulation der Genexpression einwirken. Des Weiteren existieren nicht-genomische Effekte, die sich innerhalb weniger Sekunden oder Minuten ereignen und nicht auf der Transaktivierung von Genen beruhen. Dieser ligandenunabhängige Weg führt über die Phosphorylierung der ER durch Kinasen, die über verschiedene Signaltransduktionswege, wie z. B. Wachstumsfaktoren, aktiviert werden (siehe

Abbildung 2). Vermutlich läuft diese Aktivierung unter Involvierung von Second-Messenger-Systemen über membranständige ER [113, 114].

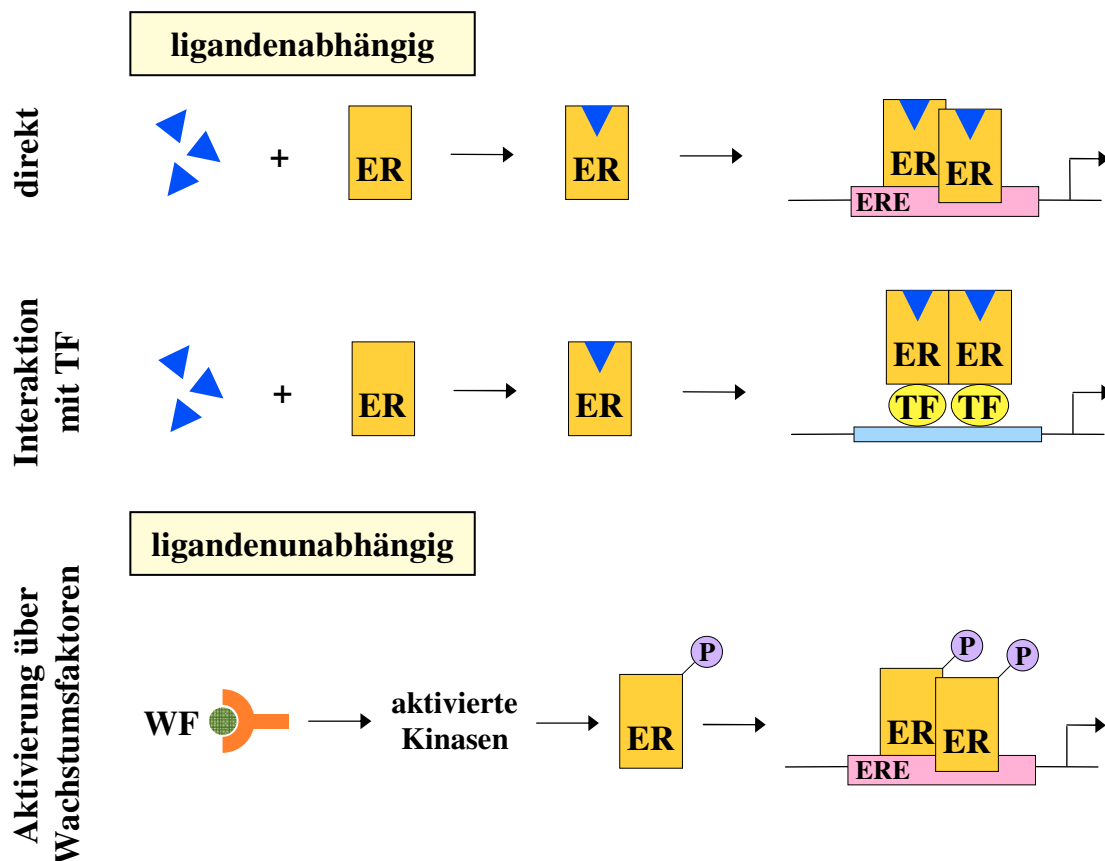


Abbildung 2: Wege der Modulation von Genexpression durch Östrogenrezeptoren
(Abbildung modifiziert nach [114]; TF: Transkriptionsfaktor, WF: Wachstumsfaktor, P: Phosphatgruppe)

1.3.2 Einfluss von Östrogenrezeptoren auf die Tumorprogression

Östrogenrezeptor-Signalwege regulieren wichtige physiologische Prozesse wie Zellwachstum und Apoptose [108]. Indem sie Zellzyklus-fördernde Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Proto-Onkogene und Cyclin D1 hochregulieren, verursachen sie auf diese Weise aber auch mitogene Effekte. Da östrogenregulierte Gene in Tumorzellen häufig überexprimiert aufzufinden sind, kann die ER-Aktivierung durchaus als kritischer Schritt in der Tumorprogression betrachtet werden. Der Hormonrezeptorstatus nimmt bei vielen Tumorarten eine wesentliche Rolle für Entstehung, Prognose und Therapiewahl ein und bietet somit gute Ansatzpunkte zur Intervention durch Hormontherapie. Dabei spielt die Verteilung

der ER in den verschiedenen Organen eine wichtige Rolle. So wird ER α vornehmlich in Uterus, Leber, Brustdrüse und Niere exprimiert. In Prostata, Lunge, Knochen, Gastrointestinal- und Harntrakt dominiert ER β [115-120].

Es wird aber vermutet, dass nicht nur die Bindung von Östrogenen an die Rezeptoren, sondern auch die in 1.3.1 beschriebenen ligandenunabhängigen Signaltransduktionswege maßgeblich an Tumorwachstum und somit Resistenzen gegen Antiöstrogene beteiligt sind [121, 122].

Der Zusammenhang zwischen hormonellen Faktoren der Frau und Auftreten von Pankreasadenokarzinomen wurde in zahlreichen Studien intensiv hinterfragt [123-132], und die Ergebnisse erwiesen sich als äußerst konträr. Aus Auswertungen vieler dieser Studien geht hervor, dass etwa das frühe Auftreten der ersten Regelblutung oder das späte Einsetzen der Menopause nicht eindeutig mit der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms in Zusammenhang gebracht werden kann, ebenso wenig wie die orale Einnahme von Kontrazeptiva, postmenopausale Hormonersatztherapien oder Schwangerschaften [133, 134]. Einige dieser analysierten Untersuchungen stammen jedoch aus der Zeit vor der Entdeckung des ER β .

Beim Tier liegen bezüglich des Hormonrezeptorstatus ähnliche Verhältnisse vor wie beim Menschen. Neben dem ER α gelang es auch, den ER β , der erstmals bei der Ratte kloniert wurde, bei Hund und Katze und anderen verschiedenen Spezies nachzuweisen, unter anderem auch bei Schwein und Rind [135, 136].

Am intensivsten erforscht ist der Östrogenrezeptorstatus im Mammatumor bei Hund und Katze. Mammatumoren des Hundes stimmen in ihrem histologischem Typus und ihren biologischen und physiologischen Eigenschaften, im Gegensatz zu denen der Katze, die nahezu unabhängig von Östrogenen zu proliferieren scheinen [137, 138], mit denen des Menschen überein [139]. Allerdings ist bekannt, dass Tamoxifen beim Hund im Gegensatz zum Menschen einen östrogenen Effekt besitzt [140].

1.4 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren

1.4.1 Wirkweise

Die Bezeichnung „Selektiver Östrogenrezeptormodulator“ (SERM) wird seit Beginn der 1990er Jahre mit Einführung des Raloxifens verwendet und wurde erstmals 1994 veröffentlicht [141]. SERMs sind synthetische Östrogenrezeptor-Liganden, die gewebe-spezifisch entweder östrogene oder antiöstrogene Effekte erzielen [142, 143].

Dies lässt sich darauf zurückführen, dass je nach Organ unterschiedliche Co-Regulatoren aktiviert werden [144, 145]. SERMs binden ebenso wie Östrogene an den ER und bewirken dort eine Konformationsänderung (siehe Abbildung 3). Diese variiert aber je nach molekularen Eigenschaften des Liganden [142].

So erlaubt ein Liganden-ER-Komplex mit Östradiol im Brustdrüsengewebe eine Interaktion mit einem Co-Regulatorprotein, wodurch ein Transkriptionsprozess initiiert und somit eine agonistische Wirkung erzielt wird. Dagegen verursacht eine Fusion des Östrogenrezeptors mit Raloxifen, einem SERM der zweiten Generation, ein Konformationsgebilde, das diese Interaktion nicht zulässt und deshalb in einer vollständigen Antagonisierung resultiert [146].

Viele vorklinische und auch klinische Studien bestätigen, dass der Einsatz von SERMs (u. a. Raloxifen, Tamoxifen, Toremifen) sich als präventiv bezüglich mehrerer Tumorentitäten erweist [147-150].

Wechselwirkungen verschiedener Liganden mit dem Östrogenrezeptor

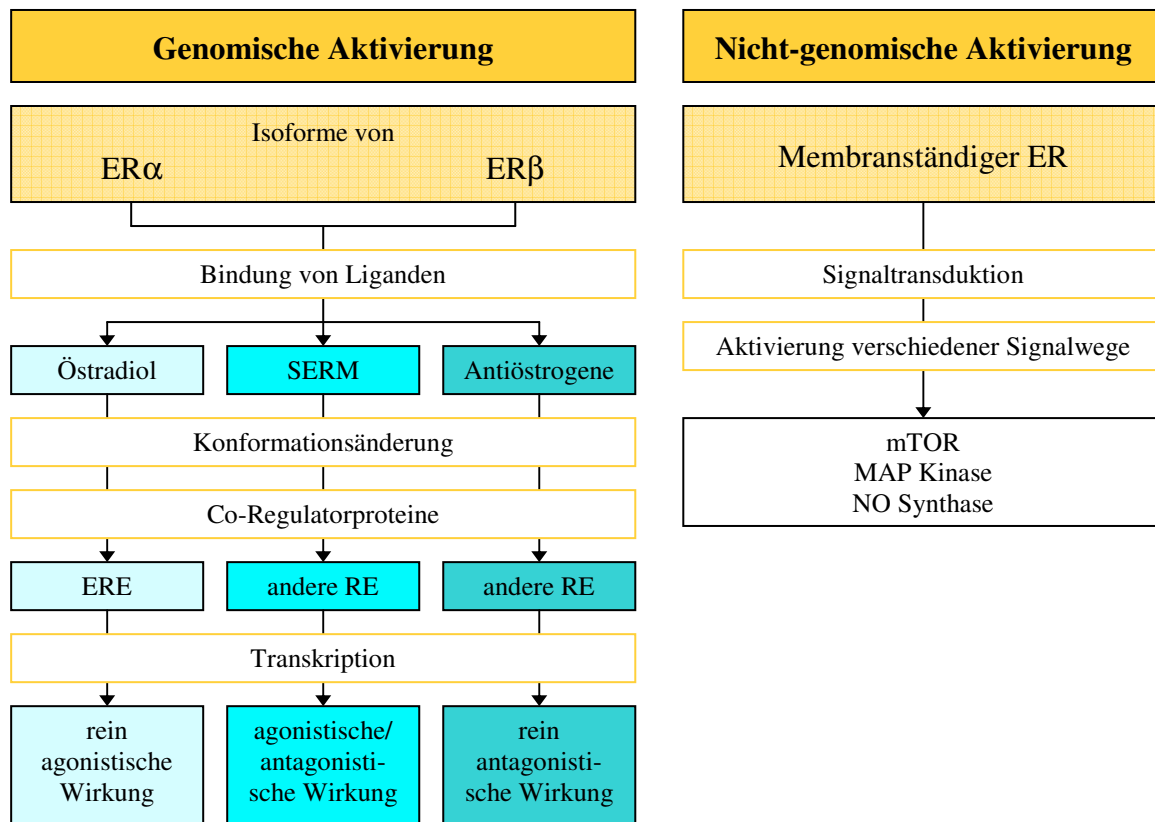


Abbildung 3: Bindung unterschiedlicher Liganden an die ER-Isoforme

Die Bindung von Liganden an ER-Isoforme resultiert in einem charakteristischen Komplex aus dimerisiertem Rezeptor und Liganden. Die Interaktion mit diversen RE (responsive elements), die als Co-Regulatoren wirken, führt zu verschiedenen transkriptionalen Effekten: rein agonistisch, rein antagonistisch oder eine Mischung aus beiden (Abbildung modifiziert nach [151]).

1.4.2 Raloxifen (Evista®)

Raloxifen (siehe Abbildung 4) ist ein nicht-steroidales SERM aus der Gruppe der Benzothiophenderivate und in den USA und Europa zur Behandlung und Prävention der postmenopausalen Osteoporose zugelassen. Zusätzlich wird es in den USA auch für die Therapie von postmenopausalen Frauen mit hohem Brustkrebsrisiko eingesetzt, da Raloxifen hier ähnliche antiproliferative Wirkung zeigt wie Tamoxifen [147], jedoch anders als Tamoxifen nicht die Bildung von Uterusmalignomen fördert.

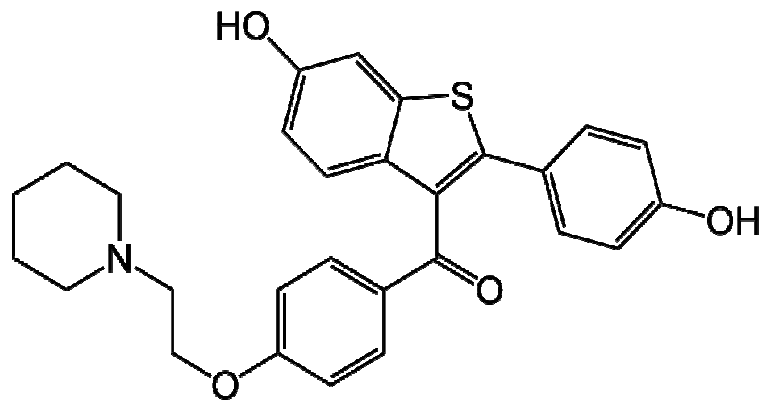


Abbildung 4: Strukturformel von Raloxifen
(Quelle: [152])

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Raloxifen (RAL) an ER α und ER β gleichermaßen mit ähnlicher Affinität bindet [153]. Dabei agiert Raloxifen am ER α als Agonist/Antagonist und am ER β als reiner Antagonist. Somit fungiert Raloxifen in Brustgewebe und Endometrium als Östrogen-Antagonist [147, 154, 155]. Anders als Tamoxifen entfaltet Raloxifen jedoch im Knochen eine agonistische Wirkung und kennzeichnet sich auch durch kardiovaskuläre Effekte [154]. Raloxifen ist aufgrund dieser Eigenschaften unter den SERMs der exemplarische Vertreter für die Vorbeugung und Behandlung von Osteoporose und Mammakarzinomen [147, 148, 156] und verursacht dabei nur geringe Nebenwirkungen. Bei Patienten mit Pankreasadenokarzinom wurde Raloxifen bislang nicht eingesetzt. Frühe klinische Studien, die den Effekt von Tamoxifen beim Pankreaskarzinom untersuchten, führten zu keinen erfolgreichen Erkenntnissen [157, 158]. Da zu dieser Zeit, wie schon erwähnt, einzig der ER α bekannt war, ist bislang nicht geklärt, ob sich durch andere Therapieansätze mit SERMs nicht doch erfolgversprechende Therapiemöglichkeiten abzeichnen können.

1.4.3 Raloxifen in der Tiermedizin

In der Tiermedizin hat Raloxifen bislang keine Zulassung und findet hier somit auch keine Anwendung. Allerdings wurden zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen mit RAL durchgeführt. Dabei konnte im Tiermodell bewiesen werden, dass RAL im Knochengewebe als Östrogen-Agonist fungiert [154, 159, 160]. Ebenso wurden antagonistische Effekte in Uterus und Mamma aufgezeigt [153].

2 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Hinblick auf die Bedeutung des Östrogenrezeptors beta im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom folgende Fragen zu untersuchen:

- 1.) Wird der Östrogenrezeptor beta im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom exprimiert?
- 2.) Welche Bedeutung hat die Expression des Östrogenrezeptors beta für die Prognose der betroffenen Patienten?
- 3.) Lässt sich im präklinischen Modell das Tumorwachstum durch Interaktion mit dem ER β inhibieren?
- 4.) Durch welche Mechanismen lassen sich die Wirkweisen des selektiven Östrogenrezeptormodulator (ERM) Raloxifen erklären?

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

Sämtliche verwendeten Chemikalien, Kits, Antikörper, Puffer, Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind im Kap. 12 aufgelistet.

3.2 Zelllinien

Für die meisten Untersuchungen in dieser Arbeit wurden L3.6pl- und AsPC-1-Zellen herangezogen. Die *in vivo* hoch metastatische und aggressiv infiltrativ wachsende humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl wurde aus der humanen duktaalen Pankreaskarzinomzelllinie FG („fast growing“) in der Nacktmaus selektioniert [161]. Die schnell wachsende Variante FG wurde neben der langsam wachsenden Variante SG („slow growing“) von der Arbeitsgruppe Vezeridis und Mitarbeiter aus der humanen, primär nicht metastatischen Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357 generiert [162], welche wiederum aus einer coeliacalen Lymphknotenmetastase eines lokal fortgeschrittenen Pankreaskopfkarcinoms isoliert wurde [163]. AsPC-1 stellt eine metastatische Zelllinie dar, die ursprünglich von disseminierten Zellen aus dem Aszites eines Patienten mit Pankreasadenokarcinom stammt.

Des Weiteren wurden für das Western Blot-Verfahren zwei weitere Pankreaskarzinomzellen, FG und MiaPaCa2, und die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eingesetzt. Als Kontrollen dienten die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB 231, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen worden waren.

3.3 Zellkultur

Alle Tumorzelllinien wurden als subkonfluierende Monolayer in 75-cm³-Kulturflaschen unter Standardkulturbedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre, 5 % CO₂) im Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden zweimal pro Woche durch Trypsinierung passagiert, zusätzlich wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Die Kultivierung der Zelllinien L3.6pl, AsPC-1, FG und MDA-MB-231 erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), das mit fetalem Kälberserum (FCS; Endkonzentration

10 %, Biochrom AG), und jeweils 2 % Vitaminen (MEM, Pan Biotech GmbH), nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA, Pan Biotech GmbH) und Glutamax (Pan Biotech GmbH) angereichert wurde.

Für die HT-29- und die MiaPaCa2- Zellen wurde RPMI 1640+ Glutamax-Medium verwendet, ebenfalls mit 10 % FCS.

Die MCF-7-Zellen wurden in DMEM ohne jegliche Zusätze inkubiert.

Die in der Zellkultur verwendeten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Material	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Easy Flask™ Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, D
Glutamax	Pan Biotech GmbH, D
MEM NEAA (100x) without L-Glutamine	Pan Biotech GmbH, D
PBS (Phosphate-buffered saline)	Pan Biotech GmbH, D
RPMI 1640+ Glutamax GIBCO®	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Trypsin/EDTA	Pan Biotech GmbH, D
Vitamine MEM (100x)	Pan Biotech GmbH, D

Tabelle 1: Materialien für die Zellkultur

3.4 Tissue Microarrays (TMAs)

3.4.1 Erstellung des Patientenkollektivs

Untersucht wurden 94 Tumorproben von Patienten mit im Zeitraum zwischen 1.1.2003 und 31.12.2006 reseziertem duktalem Pankreasadenokarzinom. Sämtliche Tumorpräparate wurden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Ludwigs-Maximilians-Universität München bezogen, der Zugang zu den zugehörigen Überlebensdaten war durch das Tumorregister München gewährleistet. Das Ausgangsgewebe wurde in 4%-gepuffertem Formalin fixiert und stand uns nach dem Einbetten in Form von Paraffinblöcken zur Verfügung.

Die patientenbezogenen Daten sind pseudonymisiert und die Untersuchungen wurden der lokalen Ethikkommission angezeigt.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde bei der Auswertung als signifikant angesehen.

3.4.2 Herstellung der Tissue Microarrays

Die Tissue Microarray Methode ermöglicht in kurzer Zeit die gleichzeitige Analyse mehrerer hundert Gewebeproben, welche exakt den gleichen Bedingungen ausgesetzt sind. Hierbei beschränkt sich die Menge benötigter Antikörper und Reagenzien auf ein Minimum. Diese Technik wurde ursprünglich in der Onkologie eingesetzt, hat sich aber inzwischen auch in der Erstellung von Genexpressionsprofilen und in der Routinepathologie bewährt.

Die Spenderblöcke, die sich aufgrund eines großen Tumoranteils und möglichst wenig nekrotischem Gewebe am besten eigneten, wurden zur Generierung der TMAs herangezogen.

Für diese Zwecke wurden die zugehörigen HE-Färbungen als Schablone über die Blöcke gelegt, um die auszustanzenden Areale zu identifizieren. Es wurden pro Block drei optimale Stellen im Tumor ausgewählt. Diese Dreifachbestimmung diente einerseits dazu, möglichen Verlusten durch Abschwemmung und anderen färbungsbedingten Schäden vorzubeugen, andererseits um ein repräsentatives Beurteilungsobjekt zu erhalten. Des Weiteren wurden zum Vergleich Empfängerblöcke mit je zwei Gewebestanden der Patienten angefertigt, die aus an den Tumor angrenzendem Normalgewebe des Pankreas bestanden. Hierfür wurden jeweils

leere Paraffinblöcke in der Größe von 45 x 20 mm verwendet, die im Manual Tissue-Gerät akkurat fixiert wurden.

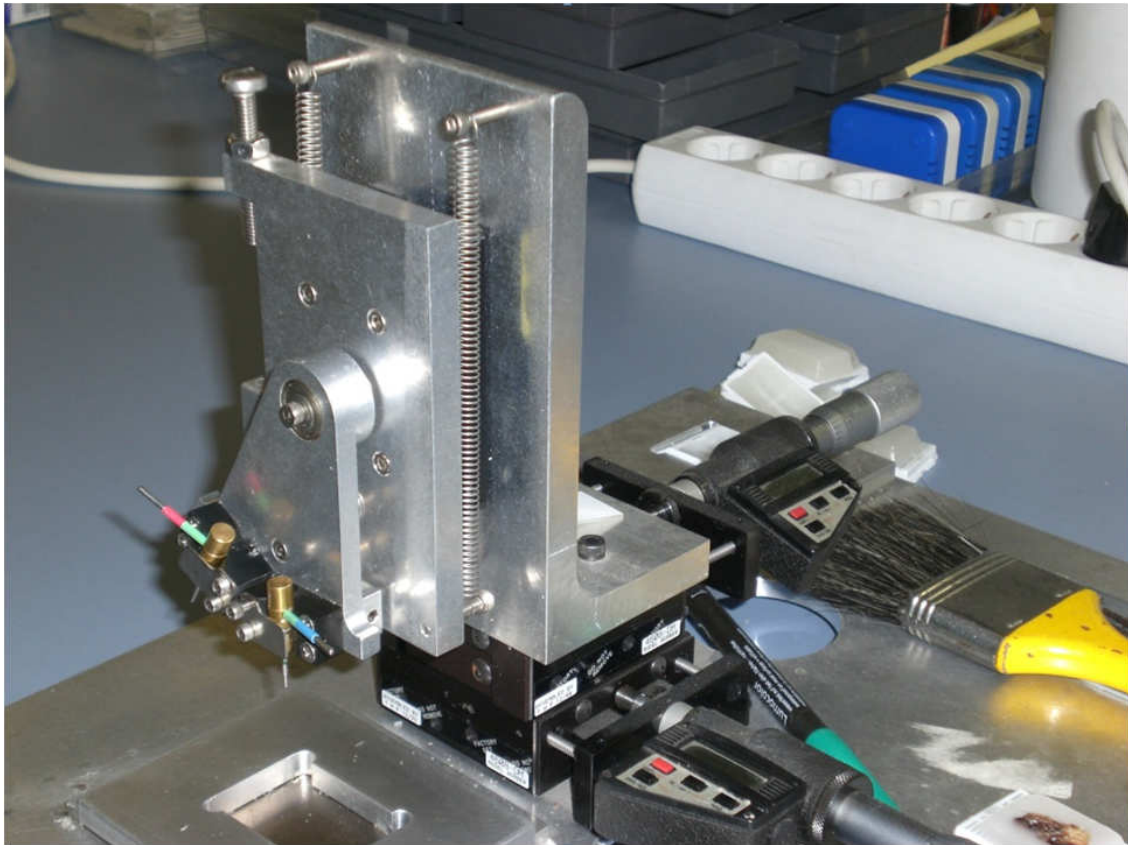


Abbildung 5: MTA1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments)

Mit einer Hohnadel mit dem äußeren Hohlzylinder von 0,6 mm wurden pro Patienten je drei Löcher im Empfängerblock ausgestanzt, wobei zwischen den Proben der einzelnen Patienten jeweils ein Abstand von 2,5 mm eingehalten wurde. Die ersten sechs zylindrischen Gewebestanden auf jedem TMA bestanden jeweils aus Tonsillenpräparaten, um den Beginn der Reihe zweifelsfrei identifizieren zu können. Nach Herstellung der Vertiefungen im leeren Paraffinblock wurden durch Betätigung des Rotors mit der Hohnadel größeren Durchmessers die Gewebeproben eingelassen. Alsdann wurden die Blöcke für eine Stunde bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert, um eine optimale Verschmelzung der Proben mit dem Paraffinblock zu gewährleisten. Anschließend wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt, auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel) aufgezogen und über Nacht bei 50 °C getrocknet. Daraufhin standen diese für immunhistochemische Färbungen zur Verfügung.

3.4.3 Auswertungsscore

Zur Auswertung wurde der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner [164] herangezogen, mit dem in Deutschland üblicherweise Hormonrezeptoren quantifiziert werden. Hierbei wird das Produkt der Punkte für Färbeintensität (Staining Intensity SI) und für den Anteil positiver Kerne (PP) gebildet. Daraus ergibt sich ein Score von 0 bis 12. Die Auswertungskriterien dieses semiquantitativen Verfahrens sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Färbeintensität (SI) \ Anteil positiver Zellkerne (PP)	keine Farbreaktion = 0 Punkte	schwache Farbreaktion = 1 Punkt	mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	starke Farbreaktion = 3 Punkte
	keine positiven Zellkerne = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10 % positive Zellkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
> 10 - 50% positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
> 50 - 80% positive Zellkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 80 % positive Zellkerne = 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) nach REMMELE und STEGNER 1987 (SI x PP)

Ein Ergebnis von 0, 1 oder 2 gilt als Hormonrezeptor-negativ. Ergibt das Produkt eine 3, bedeutet dies schwach positiv, und ein Resultat von 4, 6, 8, 9 oder 12 wird als eindeutig positiv bewertet. Die immunhistochemischen TMA-Färbungen wurden von einem geblindeten Pathologen beurteilt.

3.5 Immunoblot Analyse (Western Blot)

Der spezifische Nachweis von ER β und ER α wurde auf Proteinebene mittels Western Blotting untersucht. Eingesetzt wurden die Tumorzelllinien L3.6pl, AsPC-1, MiaPaCa2, FG (alle vier Pankreaskarzinomzelllinien) und HT-29 (Kolonkarzinom) sowie als Positivkontrolle für den ER β die Zelllinie MDA-MB-231 (Mammakarzinom) und als Positivkontrolle für den ER α MCF-7 (Mammakarzinom). Die Zellen wurden jeweils in 6-Well-Platten ausgelegt (200000/Well) und für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden sie mit

Lysepuffer abgelöst. Nach Waschen mit eiskaltem PBS und Zentrifugieren (10 min, 14000 rpm, 4 °C) wurden die Überstände in ein neues Röhrchen überführt und die Lysate bei -20 °C gelagert.

Die Einstellung auf die gleiche Proteinmenge erfolgte nach dem Auftauen der Proben mittels einer BCA (Biochinonic Acid)-Messung und Abgleich mit der BCA-Standardkurve. Danach wurden die Lysate mit 5x Laemmli-puffer gemischt und 5 Minuten bei 100 °C im Thermoblock inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) wurden die Proteine und ein mitlaufender Marker zur Identifizierung der Banden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 225 Volt Spannung und 0,7 Ampere Stromstärke) nach Molekülgröße aufgetrennt. Als Ladekontrolle in den Gelen, die aufgrund ähnlicher kDa-Größen der zu untersuchenden Proteine allesamt 12 % betragen, diente das Housekeeping-Gen β -Aktin. Nachfolgend wurden die Gele im Semi-Dry-Blot-Verfahren auf PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membranen übertragen (Blottingzeit 14 Stunden).

Die Membranen wurden anschließend bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden in 5 % Milch in TBS-Tween auf einem Schüttler geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Als Primärantikörper wurden für beide Östrogenrezeptoren polyklonale Kaninchen-Antiseren von Abcam in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet, die gegen die nachzuweisenden Proteine gerichtet waren und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler im Kühlschrank inkubiert wurden. Die Verdünnung des β -Aktin-Antikörpers betrug 1:5000. Nach mehreren Waschschritten mit TBS-Tween wurden die Membranen für 90 Minuten in dem 1:5000 in 5 % Milch verdünnten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren vier Waschvorgängen erfolgte zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers die Benetzung der Membranen mit einer Entwicklersubstanz, welche auf dem Prinzip der Chemilumineszenz beruht und in der Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm dargestellt werden kann.

Die Belichtungszeit betrug je nach Intensität der Banden drei Sekunden (β -Aktin) bzw. drei ($ER\alpha$) und fünf Minuten ($ER\beta$).

3.6 BrdU (5-Brom-2-desoxyuridin)-Proliferationstest

Zur Bestimmung der Zellproliferation beim Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus wurde ein BrdU-Assay von Roche verwendet, der inzwischen den radioaktiven [3H]-Thymidintest

weitgehend abgelöst hat. Das Prinzip dieses Assays beruht auf kompetitiver Inkorporierung des chemischen Thymidin-Analogons 5-Brom-2-desoxyuridin in die zelluläre DNA während der Synthese(S1)-Phase der proliferierenden Zellen. Die eingebauten Nukleotidanaloga werden im ELISA Reader bei 450 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 690 nm) detektiert, wobei die Höhe der Extinktion direkt proportional zur DNA-Synthese und somit Zellproliferation verläuft.

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden L3.6pl- und MCF-7-Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/Well ausgesät und mit DMEM mit 10 % FCS als Kulturmedium 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eine vollständige Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch die verschiedenen Therapieansätze bzw. die Kontrollen ersetzt.

Raloxifen wurde zunächst in DMSO gelöst (28 mg/ml DMSO) und anschließend in fünf unterschiedlichen Konzentrationen (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) in DMEM ohne FCS angesetzt. Diese wurden jeweils in sechsfacher Bestimmung (n = 6) auf die adhärenen Zellen der Mikrotiterplatte pipettiert. Als Negativkontrolle diente zur weiteren Kultivierung DMEM, das jeweils zu 5 Wells zugegeben wurde. Dabei wurde dasselbe Volumen des Lösungsmittels DMSO verwendet wie in den Raloxifenansätzen.

Hierauf wurde die Platte weitere 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Detektion des inkorporierten BrdU wurde eine Anti-BrdU-POD Lösung eingesetzt. Danach wurde die Platte nach Zugabe der POD-Substratlösung bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption innerhalb von 5 Minuten im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge 690 nm).

3.7 Tierversuche

3.7.1 Versuchstiere und Haltung

Für die Versuche wurden männliche, 6 bis 8 Wochen alte und ca. 20 g schwere Nacktmäuse des Stammes Balb/c nu/nu verwendet. Diese Tiere stammten allesamt aus spezifisch-pathogenfreier Zucht von Charles River Germany, Sulzfeld. Die Versuchstiere wurden in Zehnergruppen in Makrolon Typ III-Käfigen mit autoklaviertem Streu gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug konstant 20 °C, Wasser und Futter standen 24 Stunden ad

libitum zur Verfügung, der Tag-Nacht-Rhythmus war standardisiert auf 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit eingestellt. Im Detail wurden alle Versuche unter den gültigen Richtlinien gemäß Tierschutzgesetz § 7 bis § 9 durchgeführt.

3.7.2 Tierversuchsantrag

Genehmigungen für die Tierversuche lagen gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vor: Regierung von Oberbayern, Az. 55.2-1-54-2531-19-08

3.7.3 Versuchsdurchführung

3.7.3.1 Orthotope (intrapankreatische) Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen in der Nacktmaus

Die Balb/c nu/nu Mäuse wurden nach einer sechstägigen Akklimatisierungsphase nach Ankunft mit Ketamin/Xylazin/Atropin narkotisiert. Im linken Oberbauch wurde gemäß dem Verfahren nach [161] eine 1 cm lange Laparotomie angelegt und das Pankreas mobilisiert. Die L3.6pl-Zellen wurden pro Tier zu 10^6 Zellen in 40 μ l PBS suspendiert und mittels eines Applikators in den Pankreaskorpus injiziert (siehe Abbildung 6). Diese Zellen wurden aufgrund ihres schnellen und aggressiven Wachstums für den Tierversuch gewählt. Danach erfolgten die Reposition des Pankreas und der Verschluss des Abdomens mit Prolene 4-0. Nach abgeschlossener Operation wurde den Tieren gegen den Wundschmerz noch in Narkose eine Analgesie von 0,05 bis 0,10 mg/kg KG Buprenorphin s. c. injiziert. Während der Aufwachphase wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur unter eine Wärmeplatte platziert. Nach der Aufwachphase wurden die Tiere zunächst alle zwei Stunden kontrolliert, als sich der Zustand als stabil erwies, in täglichem Rhythmus.



Abbildung 6: Orthotope Injektion von 10^6 L3.6pl-Zellen in das Pankreas

3.7.3.2 Therapie

Die Therapiegruppe bestand ebenso wie die Kontrollgruppe aus je 10 Tieren. Es wurden ca. 6 Wochen alte männliche Balb/c nu/nu Mäuse (16 bis 22 g KG) für den Versuch verwendet. Nach sechs Tagen Eingewöhnungszeit nach Ankunft erfolgte die orthotope Applikation der L3.6pl Zellen in das Pankreas (10^6 Zellen/40 μ l PBS). Zwei Tage nach der Injektion der Tumorzellen begann die tägliche Therapie der 10 Tiere aus der Behandlungsgruppe mit Raloxifen (30 mg/kg KG) bzw. die entsprechende Injektion der Kontrolltiere ohne Raloxifengabe mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Corn Oil, Sigma-Aldrich) in gleichem Volumen (je nach KG der Maus 60 bis 80 μ l/Tier). Die Applikation der Substanzen erfolgte bei beiden Gruppen intraperitoneal.

Alle Tiere wurden täglich auf Allgemeinbefinden und durch Palpation auf unerwartet starkes Tumorstadium kontrolliert. Zusätzlich wurde dreimal wöchentlich eine Kontrolle des Tiergewichts durchgeführt.

3.7.3.3 Sektion

Am Versuchsende nach 31 Tagen wurden die Tiere mit CO₂ betäubt, im Anschluss durch zervikale Dislokation getötet, autopsiert und das Tumorgewebe entnommen. Alle Mäuse wurden auf einer Digitalwaage gewogen. Auch die Tumore wurden gemessen und gewogen und in Formaldehyd eingelegt. Sie standen nach Einbettung in Paraffin für

immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung. Aufgetretene Metastasen und Wundtumore sowie Lymphknoten-Status wurden ebenfalls festgehalten.

3.8 Histologische Untersuchungen

3.8.1 Anfertigen der Schnitte

Alle entnommenen Proben wurden für 24 Stunden in Formaldehyd fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden von den fertigen Paraffinblöcken Schnitte in einer Dicke von 3 µm angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und für 48 Stunden bei 37 °C getrocknet.

3.8.2 Hämatoxylin / Eosin-Färbung

Von allen Schnitten wurde zur Übersicht eine HE-Färbung durchgeführt. Die Präparate wurden hierfür in NeoClear[®] entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 % EtOH) rehydriert. Die Blaufärbung der Kerne wurde durch mehrfaches Eintauchen in Hämatoxylin erzielt, die Rotfärbung des Bindegewebes durch fünfminütiges Belassen in Eosin. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Eukitt[®] eingedeckelt.

3.8.3 Immunhistochemie

3.8.3.1 Ki67

Das Ki67-Antigen ist ein Proliferationsmarker und detektiert somit die Zellen im Gewebe, die sich in der Vermehrungsphase befinden. Während des Zellzyklus wird das Antigen in der G1-, in der S-, in der G2- und in der M-Phase, aber nicht in der G0-Phase exprimiert. Die angefertigten Paraffinschnitte wurden zunächst in Neo-Clear[®] und einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert. Die darauf folgende Demaskierung wurde durch 20-minütige Kochzeit in Citratpuffer gewährleistet. Um die Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers mit endogenen Immunglobulinen zu unterbinden, wurde ein erster Blockierungsschritt mit 8 % bovinem Serumalbumin in PBS mit 3 % BSA vollzogen und anschließend das Risiko einer hohen unspezifischen Hintergrundfärbung durch einen Avidin/Biotin-Block (Vector Laboratories) minimiert. Der erste Antikörper (Ki67; Abcam) wurde über Nacht bei 4 °C in einer 1:200 Verdünnung auf den Schnitten inkubiert. Nach

endogenem Peroxidaseblock mit 7,5 % H₂O₂, Inkubation mit dem sekundärem Antikörper (Dako; Verdünnung 1:125, 30 min bei RT) und Zugabe des ABC-Komplexes (Vector Laboratories) zur Verstärkung des sichtbaren Signals wurde das DAB+ (3,3-Diaminobenzidin; Dako) Chromogen nach Herstelleranleitung 10 Minuten auf den Schnitten belassen, die Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt und abschließend jeder Schnitt mit Kaisers Glycingelatine feucht eingedeckelt.

3.8.3.2 CD31 (PECAM-1)

Der Antikörper CD31 detektiert Epitope auf Endothelzellen und lässt im Rahmen der Angiogenese Rückschlüsse auf die Mikrogefäßdichte und somit auf das Maß der Beteiligung der Gefäßfunktionen in der Tumorprogression zu. Für die colorimetrische CD31-Detektion auf Paraffinschnitten wurden diese zunächst wie in 3.8.3.1 deparaffiniert und rehydriert, anschließend 30 Minuten in TRS6 in der Mikrowelle demaskiert. Nach Permeabilisierung in 0,25 % Triton-X in Tris-Cl folgten die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 7,5 % Wasserstoffperoxid und die Behandlung der Gewebeschnitte für 20 Minuten mit einer Proteinblocklösung (8 % Goatserum in PBS mit 3 % BSA).

Der primäre Antikörper (Abcam) wurde in einer 1:50-Verdünnung über Nacht bei 4 °C auf den Präparaten belassen. Im Anschluss wurden ein Avidin/Biotin-Block und danach die 30-minütige Inkubation mit einem biotinyliertem Sekundärantikörper (Dako; 1:100, RT) durchgeführt. Währenddessen wurde als Enzymreagenz der ABC-Komplex nach Vorgabe des Herstellers angemischt und nach dreimaligem Waschen in PBS für 30 Minuten auf die Gewebeschnitte pipettiert. Zur Entwicklung der Peroxidase wurden die Präparate für 15 Minuten mit Chromogen-Lösung DAB+ inkubiert, mit Hämalaun gegengefärbt und 10 Minuten in Leitungswasser gebläut. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Schnitte mit Kaisers Glycingelatine eingedeckelt.

3.8.3.3 ERβ

Das Färbungsprotokoll für das entnommene Gewebe aus dem Tierversuch entsprach bei beiden Antikörpern dem von Ki67. Die Verdünnung des Primärantikörpers betrug im Falle von ERα (Abcam) 1:100 und für den Nachweis von ERβ (Abcam) 1:50. Um ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden, wurde jeweils auf demselben Objektträger ein zweiter Schnitt ohne Primärantikörper mitgefärbt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen für die Detektion von ER β (BioGenex Laboratories) und ER α (Novocastra Laboratories) auf den TMAs wurden in mehrmaligen Optimierungsvorgängen im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden dort in Neo-Clear[®] entparaffiniert und in einer Alkoholreihe rehydriert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte 10 Minuten lang mit 7,5 % Wasserstoffperoxid behandelt. Nach 30-minütiger Demaskierung in der Mikrowelle, Blockierung von Protein und endogenem Biotin wurden die Schnitte mit den Primäantikörpern (beide 1:100) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Immunperoxidase-basierte Detektion wurde mit einem Streptavidin-Avidin-basierten LSAB2 System (Dako) durchgeführt.

Gefärbt wurde mit dem AEC-Kitsystem (Zytomed Systems). Im Anschluss an ein 10-minütiges Bläuen in fließendem Leitungswasser wurden die Kerne mit Hämatoxylin Gill's Formula (Vector Laboratories) gegengefärbt und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

3.8.3.4 Auswertung

Die Reaktion auf die Behandlung mit dem Ki67-Antikörper wurde in meiner Anwesenheit von einer erfahrenen Pathologin ohne Kenntnis der klinischen Daten beurteilt. Die Ki67-Expression wurde dabei nach Prozentsatz gefärbter Zellen dreimal beurteilt und bei Abweichungen der Mittelwert gebildet. Zur Auswertung diente dabei ein Index von 0 bis 4 Punkten mit Unterteilungen gemäß Tabelle 3.

Anteil positiver Bereiche	Punkte
0 %	0
> 0 % bis 20 %	1
> 20 % bis 50 %	2
> 50 % bis 80 %	3
> 80 % bis 100 %	4

Tabelle 3: Bewertungsindex für die Ki67-Expression

Die Endothelzellen wurden gemäß einer Methode nach Weidner [165] mit Hilfe eines CD31-Antikörpers quantifiziert und somit die Mikrogefäßdichte ermittelt. Hierbei wurden die Präparate unter dem Lichtmikroskop zunächst bei kleiner Vergrößerung nach zwei geeigneten sogenannten „hot spots“ mit hoher Signalintensität abgesucht und die dort zu erkennenden gefärbten Endothelzellen oder zusammenhängende Endothelareale in höherer Vergrößerung (100x) ausgezählt. Der Mittelwert wurde als Mikrogefäßanzahl pro high power field (hpf = 0,159 mm²) angegeben.

3.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In einigen Tumorentitäten spielt das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle für die Pathogenese (siehe 5.3). Deshalb wurde die IL-6-Konzentration in L3.6pl-Zellen untersucht.

Für die quantitative Bestimmung des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) im Überstand der L3.6pl-Zellkultur wurde die ELISA-Technik verwendet. Mit Hilfe dieses immunologischen Nachweisverfahrens können Konzentrationsbestimmungen von Substanzen in Lösung durchgeführt werden. Der verwendete Testkit Human IL-6 ELISA (BenderMed Systems) beruht auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. IL-6 bindet an den Anti-IL-6-Primärantikörper, mit dem die 96-Well-Platte beschichtet ist. Nach Zugabe eines biotinylierten Zweitantikörpers wird nach mehreren Waschschritten Peroxidase-markiertes Streptavidin (HRP) hinzugefügt, welches an das Biotin bindet. Nach erneutem Waschen kann die IL-6-Konzentration durch eine anschließende Farbreaktion mit der Substratlösung und darauf folgendem Stoppvorgang durch Schwefelsäure bei 450 nm im ELISA-Reader photometrisch detektiert werden. Die quantitative Berechnung von IL-6 erfolgt anhand der Standardkurve, welche die Rückführung der gemessenen optischen Dichte auf die IL-6-Konzentration nach folgender Funktion ermöglicht:

$$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$

Dabei ist y der jeweilige Extinktionswert und x die dazu korrespondierende Konzentration in pg/ml. Für die Standardkurve gelten hierbei die Koeffizienten $A = -0,0262$, $B = 0,885$, $C = 3,76 \cdot 10^7$, $D = 1,17 \cdot 10^5$. Zudem muss anschließend noch der Verdünnungsfaktor von 1:2 mit einbezogen werden.

Für diesen Versuch wurden L3.6pl Zellen zu je 200.000 Zellen pro Loch in 6-Well-Plates angesetzt und in den anschließenden 24 Stunden Inkubationszeit mit Zugabe von 100 ng

Lipopolysaccharid (LPS) pro ml Medium zur Bildung von Entzündungsmediatoren angeregt. In diesem Versuch diente LPS zur erwünschten IL-6-Stimulation. Nach Abschluss dieser Inkubationsphase wurden ohne Mediumwechsel für weitere 48 Stunden Inkubationszeit die schon beim BrdU verwendeten Raloxifenkonzentrationen (100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) angewendet. Die Kontrolle ohne Raloxifenzugabe enthielt ein den mit Raloxifen behandelten Wells äquivalentes DMSO-Volumen.

Die Überstände wurden anschließend abgenommen und bei 1700 g ($g = \text{Erdbeschleunigung}$) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Überführung der Aliquots in neue 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden sie bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Durchführung des ELISA-Assays erfolgte in jeweils fünffacher Bestimmung nach Herstellerangaben.

3.10 Transiente Transfektion von Pankreaskarzinomzellen mit ER-spezifischer small interfering RNA (siRNA)

Der Knockdown eines Rezeptors dient dazu, Erkenntnisse über seine Expression (beispielsweise hinsichtlich Prognose, Diagnose und Therapieplanung bei Karzinomen) zu erlangen, indem seine Synthese für eine bestimmte Zeitperiode blockiert wird. Der Östrogenrezeptor-Expression-Knockdown wurde mittels siRNA durchgeführt. Dies gelingt durch Einschleusen chemisch synthetisierter kurzer RNA-Stränge in die Zelle, welche durch das Zerlegen längerer dsRNA-Moleküle in Fragmente durch eine Nuklease namens Dicer entstehen. Die Fremdmoleküle werden in einen sogenannten RISC (RNA-induced silencing complex) inkorporiert und binden an die komplementäre mRNA des Zielgens, welches in diesem Fall für die Expression der jeweiligen Östrogenrezeptoren zuständig ist. Dort werden sie von einem zelleigenen Enzym erkannt und degradiert, so dass die weitere Proteincodierung verhindert wird („Gene-silencing“). Das Einbringen der siRNA-Moleküle ermöglicht also, die Genexpression von endogen vorhandenem ER α , ER β , oder auch die Expression beider Rezeptoren gleichzeitig, in den Zellkulturen von L3.6pl- und AsPC-1-Zellen spezifisch zu reduzieren. Hierfür wurden beide Zellstämme mit ER-siRNAs mithilfe des BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription Kits und BLOCK-iT Dicer RNAi Kits (beide Invitrogen) nach Herstellerangaben transfiziert.

Die gesamte RNA wurde für diese Zwecke zunächst aus MCF-7-Zellen unter Verwendung des RNeasy mini Kits (Qiagen) isoliert und hiermit eine single-step RT-PCR unter Benutzung des SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die ER α si forward und ER α si reverse Primer wurden so entwickelt, dass sie 586 Basenpaare bzw. 531 Basenpaare amplifizieren (siehe Tabelle 4). Die Produkte aus der folgenden PCR waren jeweils nur für ER α und ER β spezifisch. Dies wurde mithilfe einer BLAST („Basic local alignment search tool“)-Analyse der NCBI-Sequenzdatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) bewiesen. Die mRNA Sequenzen des humanen ER α und ER β wurden mittels der Software DNASTar Lasergene module MegAlign aligniert. Die Sequenzen der mRNA, die nur in ER α , nicht aber in ER β enthalten sind, wurden bestimmt und dienten als Template in der PCR zur Herstellung des siRNA-Pools, durch welchen die Expression von ER α gehemmt werden kann. Analog hierzu wurde auch die ausschließlich in ER β vorkommende mRNA amplifiziert und für die Gewinnung des siRNA-Pools zur Inhibition der Expression von ER β verwendet.

Die jeweiligen Forward- und Reverse-Primer für ER α und ER β lauteten folgendermaßen:

Primer	Sequenz in 5' → 3' Richtung
ER α si	forw GTATGATCCTACCAGACCCTTCAGTGA
	rev CAGATGCTCCATGCCTTTGTTACTC
ER β si	forw GCCGCCCCATGTGCTGAT
	rev ATGGATTGCTGCTGGGAGGAGATG

Tabelle 4: siRNA Primersequenzen für ER α und ER β

Der T7-Promotor wurde dem aufgereinigten PCR-Produkt unter der Verwendung des TOPO cloning hinzugefügt, einem von der Firma Invitrogen entwickelten Verfahren zur Verknüpfung von Vektor und Fremd-DNA.

Es erfolgte für die spezifische Transkription von ER α bzw. ER β jeweils die Denaturierung der beiden Stränge der dsDNA bei 95 °C und in den folgenden PCR-Zyklen die Amplifizierung

der (+) und (-) Einzelstränge, unter Verwendung des T7-Primers aus dem Kit und der entsprechenden Primer für die Östrogenrezeptoren.

Mit beiden aufgereinigten PCR-Produkten wurde eine *in vitro* Transkription durchgeführt. Beide Produkte, die mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert werden konnten, wurden kombiniert und zu einer doppelsträngigen RNA zusammengefügt. Diese wurde im Anschluss mithilfe eines aufgereinigten Dicer Enzyms in kurze, doppelsträngige Fragmente gespalten. Die so entstandene siRNA wurde mittels Säulenteknik eluiert und dann für die transiente Transfektion der L3.6pl- bzw. AsPC-1-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin TM 2000 (Invitrogen) verwendet. Die Transfektanten wurden in den folgenden 48 Stunden weiteren Analysen unterzogen. Die mit dem Reporter gen LacZ behandelte Kontrolle wurde auf gleiche Art und Weise hergestellt, wofür Primer und Template aus dem Kit benutzt wurden. Diese Kontrolle dient als Beweis, dass eine wirksame Transfektion der Zellen stattgefunden hat und somit eine Inhibition der Expression von ER α bzw. ER β gewährleistet ist.

Für diesen Versuch wurden von den Zellkulturen von L3.6pl- und AspC-1-Zellen jeweils vier 96-Well-Platten mit 5000 Zellen/Well ausgelegt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Davon wurde 24 Stunden danach pro Zelllinie je eine Platte für die Inhibition des ER α , des ER β , beider Östrogenrezeptoren ER α und ER β zusammen, und für die mit dem Reporter gen LacZ behandelte Transfektionskontrolle verwendet.

Raloxifen wurde weitere 24 Stunden danach wie in Abschnitt 3.6 beschrieben in fünf unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 nM bis 1000 nM) in DMEM ohne FCS jeweils in sechsfacher Bestimmung den Zellen der Mikrotiterplatte zugegeben. Auch hier diente, wie oben beschrieben, als Negativkontrolle in sechsfacher Bestimmung DMEM mit anteilig äquivalentem Volumen des DMSO. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Auswertung entsprechend Abschnitt 3.6 mittels BrdU.

3.11 Statistik

Bei der Auswertung der Daten wurde die Statistik-Software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago) verwendet. Die Ergebnisse der Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Signifikanzberechnungen erfolgten jeweils mit Hilfe des zweiseitigen ungepaarten Student's t-Tests. Dieser Test untersucht, ob sich die Mittelwerte zweier

Datengruppen signifikant voneinander unterscheiden. Bei der statistischen Auswertung der TMAs kam der Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) nach Pearson zur Anwendung. Mit Hilfe dieses Tests lässt sich eine mögliche Korrelation der Expression von ER β mit verschiedenen patientenbezogenen Parametern überprüfen.

Die Darstellung des Gesamtüberlebens und des tumorfreien Überlebens erfolgte univariat in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Unterschiede wurden mit dem Log-Rang-Test auf Signifikanz überprüft. Die Prüfung auf prognostische Signifikanz bzw. auf unabhängige prognostische Faktoren erfolgte mittels einer multivariaten Cox-Regressions-Analyse. Aus den Regressionskoeffizienten wurden adjustierte Hazard Ratios und das jeweilige 95%-Konfidenzintervall als Maß für die Stärke des Zusammenhangs berechnet.

Sofern im Einzelfall nicht anders angegeben, wurde in allen Analysen das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von ER β auf dem humanen duktalem Pankreasadenokarzinom

Zunächst sollte ermittelt werden, ob ER β im humanen duktalem Pankreas und Normalgewebe des Pankreas exprimiert wird und welche Rolle ER β für die Prognose spielen könnte. Hierfür wurden Tissue Microarrays (TMAs) aus Tumorgewebe von 94 Patienten, bei denen im Zeitraum zwischen 2003 und 2006 ein duktales Adenokarzinom des Pankreas reseziert wurde, angefertigt und immunhistochemisch ausgewertet (siehe Abbildung 7). Das Ziel dabei war, ER β durch Korrelationen von Expression und Krankheitsverlauf als prädiktiven Marker beim Pankreaskarzinom nutzen zu können. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus 47 (50 %) Frauen und 47 (50 %) Männern. Während keine Expression von ER α nachgewiesen werden konnte, ergab sich bei insgesamt 31,9 % der Tumore eine nukleäre ER β -Expression. Dies traf in 18 Fällen der Frauen (38,3 %) und in 12 Fällen der Männer (25,5 %) zu.

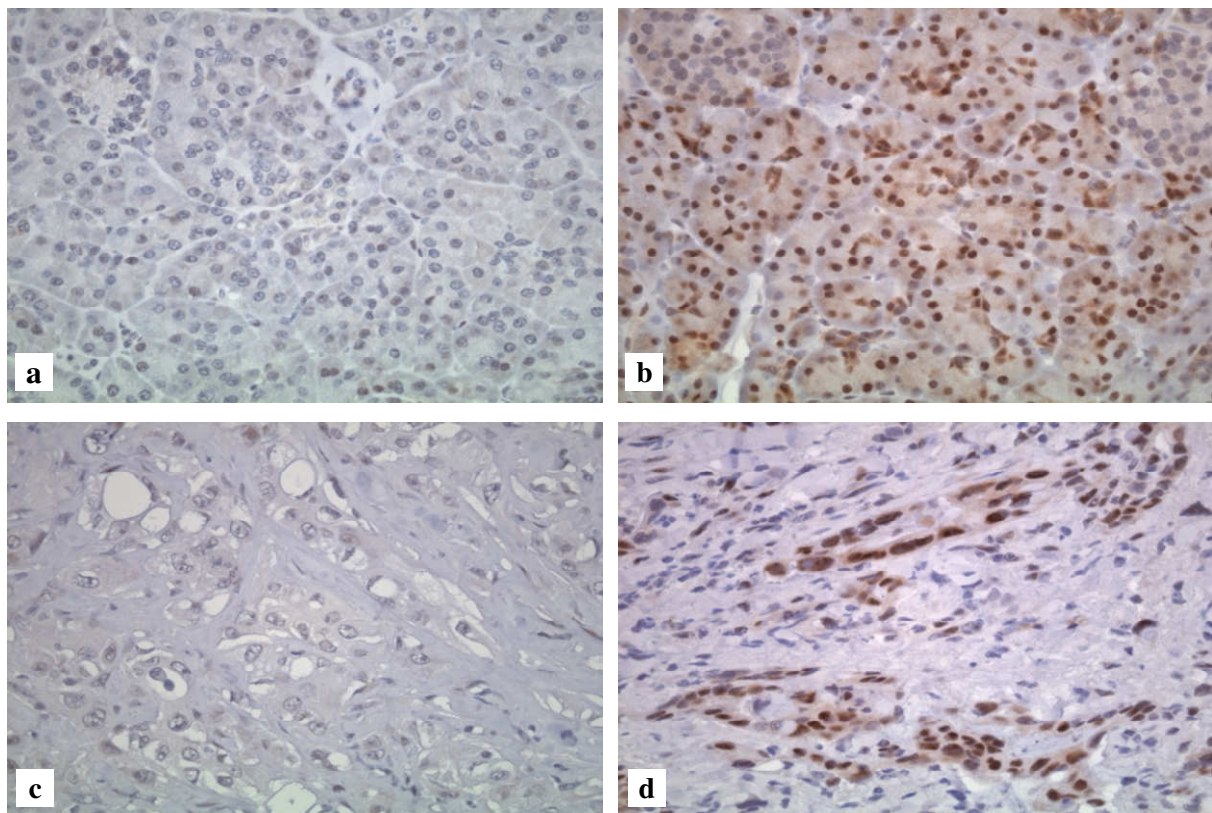


Abbildung 7: Expression von ER β in humanem Pankreasnormalgewebe und Pankreasadenokarzinom
Eine ER β -Expression in normalem Pankreasgewebe (a, b) und duktalem Adenokarzinom (c, d) auf Tissue Microarrays (TMAs) ist immunhistochemisch nachweisbar.

Dieser Expressionsunterschied hinsichtlich des Geschlechts weist ebenso keine Signifikanz ($p = 0,190$) auf wie derjenige bezüglich des Alters der Patienten ($p = 0,491$). Auch die anderen untersuchten Parameter lassen keinen signifikanten Zusammenhang mit der ER β -Expression erkennen (siehe Tabelle 5).

Parameter		n	ER β positiv [%]	p
gesamt		94	31,9	
Geschlecht	männlich	47	25,5	0,190
	weiblich	47	38,3	
Alter	≤ 60	26	34,6	0,491
	> 60	68	30,9	
T-Status	1-2	11	27,2	0,478
	3-4	83	33,7	
N-Status	0	38	31,6	0,496
	1	56	33,9	
Differenzierungsgrad (G)	1-2	33	24,2	0,136
	3-4	61	37,7	

Tabelle 5: Klinische und histopathologische Parameter von 94 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Die Expression des ER β (31,9 % im Gesamtkollektiv) zeigt keine signifikante Korrelation mit den einzelnen Parametern. T-Status: Ausdehnung des Primärtumors, N-Status: Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen

Aus diesen Ergebnissen kann resümiert werden, dass weder die Faktoren Alter und Geschlecht, noch die Tumorklassifikation (TNM-Klassifikation) oder das Grading signifikant mit der Expression des ER β korrelieren.

Anschließend wurden die Ergebnisse mit dem Patienten-Follow-up aus klinischen und histopathologischen Daten korreliert. Berücksichtigt wurden sowohl Gesamtüberleben als auch rezidivfreies Überleben ab dem Operationszeitpunkt.

Univariate Analysen identifizierten dabei die Existenz von Lymphknotenmetastasen sowie die Expression von ER β in den Tumorproben der Patienten als signifikante Risikofaktoren für kürzeres Gesamtüberleben und rezidivfreies Überleben (siehe Abbildungen 8, 9, 10, 11).

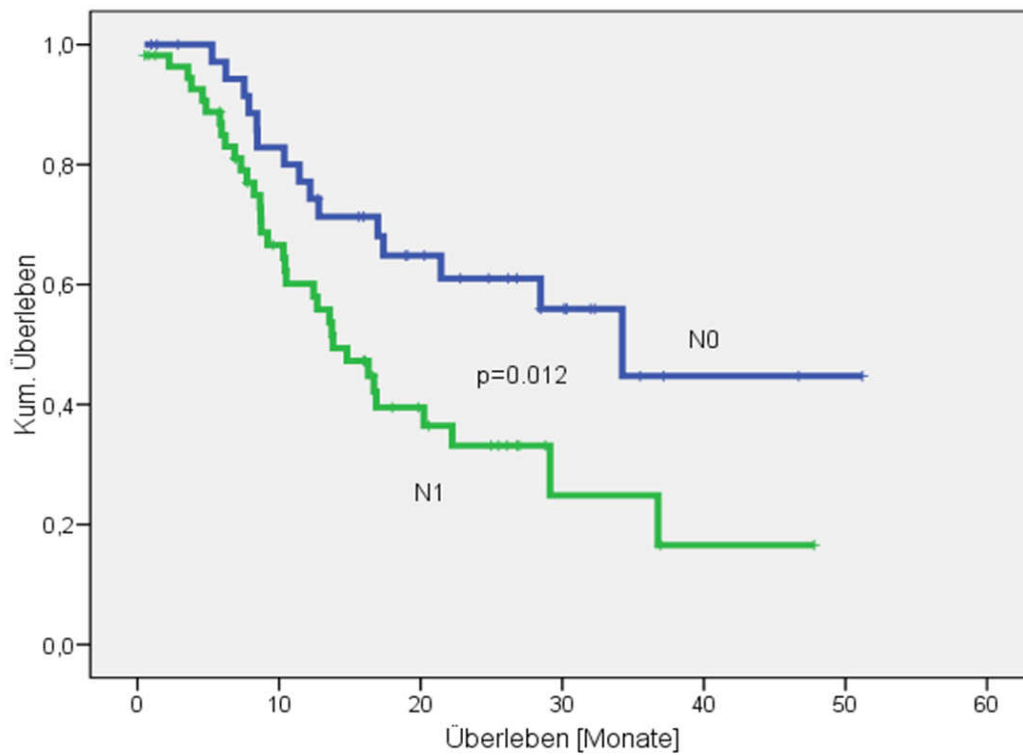


Abbildung 8: Gesamtüberleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positivem (N1) versus negativem (N0) Lymphknotenstatus in Monaten

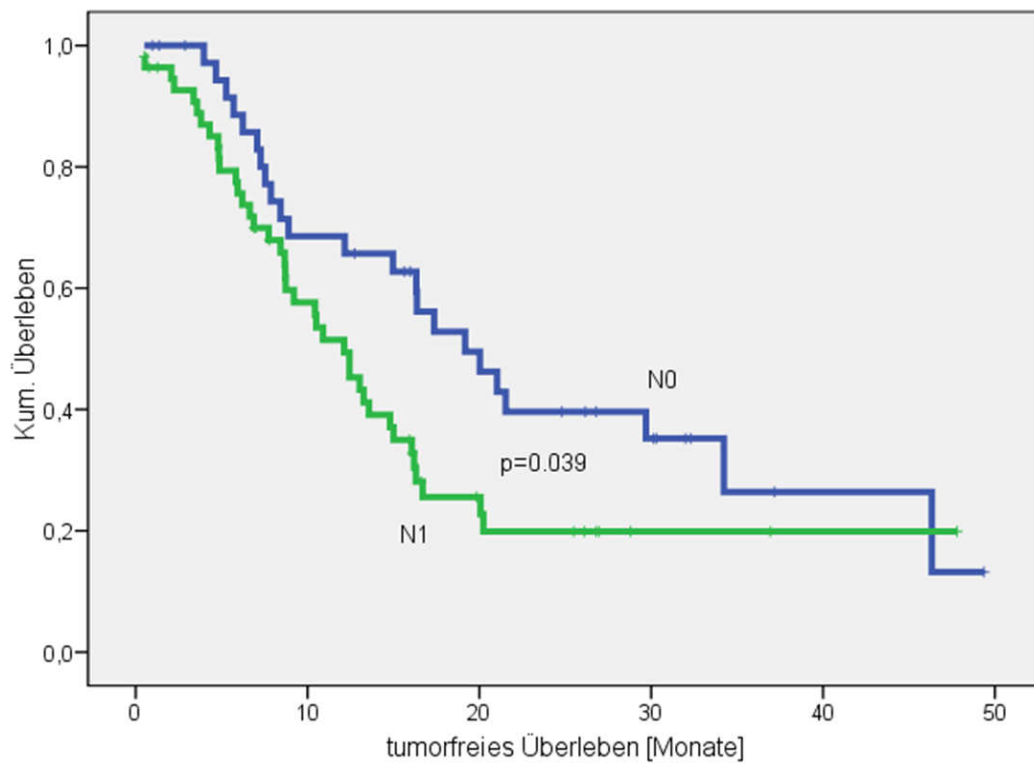


Abbildung 9: Tumorfrees Überleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positivem (N1) versus negativem (N0) Lymphknotenstatus in Monaten

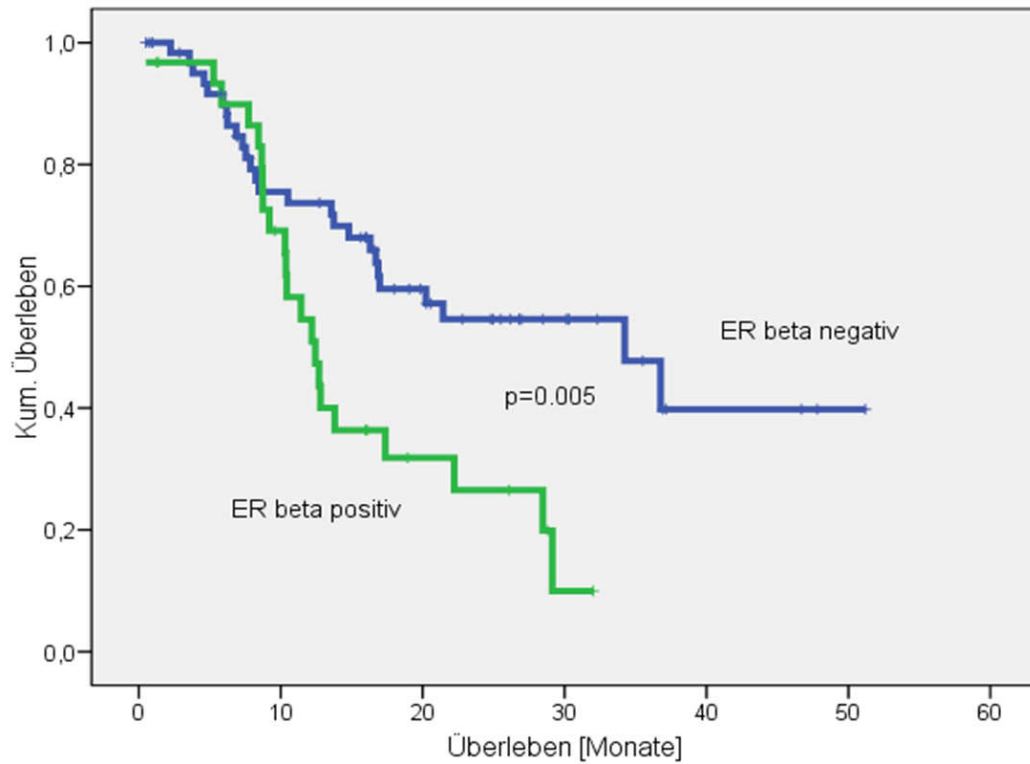


Abbildung 10: Gesamtüberleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positiver versus negativer ER β -Expression in Monaten

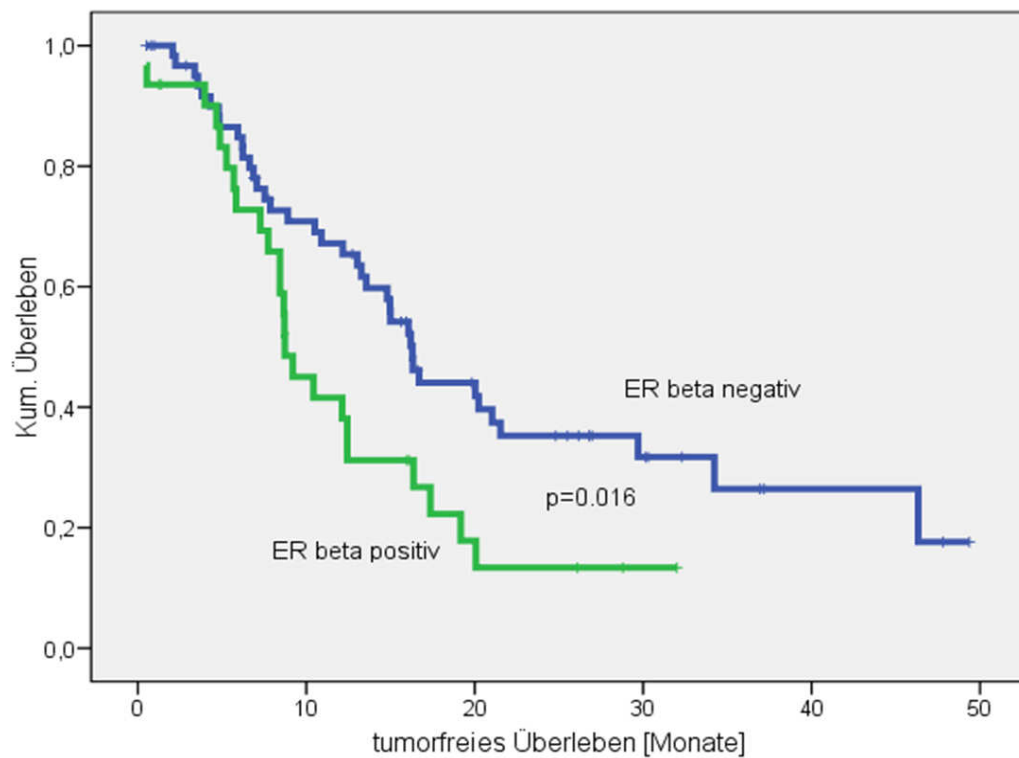


Abbildung 11: Tumorfrees Überleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positiver versus negativer ER β -Expression in Monaten

Die Durchführung einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte den positiven Nodalstatus (Hazard Ratio 2,089, $p = 0,024$) und die Expression von ER β (Hazard Ratio 2,040, $p = 0,024$) als Risikofaktoren mit unabhängiger prognostischer Bedeutung für signifikant kürzere Gesamtüberlebenszeit und progressionsfreie Überlebenszeit bestätigen. Für die Faktoren Alter > 60 und Geschlecht männlich sowie die histologischen Parameter Tumorausdehnung T3-4 und Differenzierungsgrad G3-4 konnten dabei keine signifikanten Zusammenhänge aufgezeigt werden (siehe Tabelle 6).

Parameter	Hazard Ratio	95 % CI	p
Alter > 60	1,631	0,803-3,313	0,176
Männlich	0,650	0,351-1,204	0,171
T3-4	0,864	0,426-1,754	0,686
N1	2,089	1,100-3,969	0,024
G3-4	1,341	0,710-2,534	0,366
ER β	2,040	1,096-3,796	0,024

Tabelle 6: Hazard Ratio und 95-%-Konfidenzintervall (CI) der 94 Patienten mit reseziertem Pankreasadenokarzinom

Die Berechnung bezieht sich auf Alter, Geschlecht, Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenstatus, Grading und ER β -Expression für eine kurze Überlebenszeit.

Weiterhin konnte bei Patienten, die länger als 24 Monate überlebten, im Vergleich zu Patienten, die innerhalb von 12 bzw. 24 Monaten nach der Operation starben, eine signifikant geringere Expression von ER β nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Alle Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Expression von ER β im Tumorgewebe für Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert. ER β stellt somit ebenso wie ein positiver Lymphknotenstatus einen unabhängigen negativen Prognosefaktor dar.

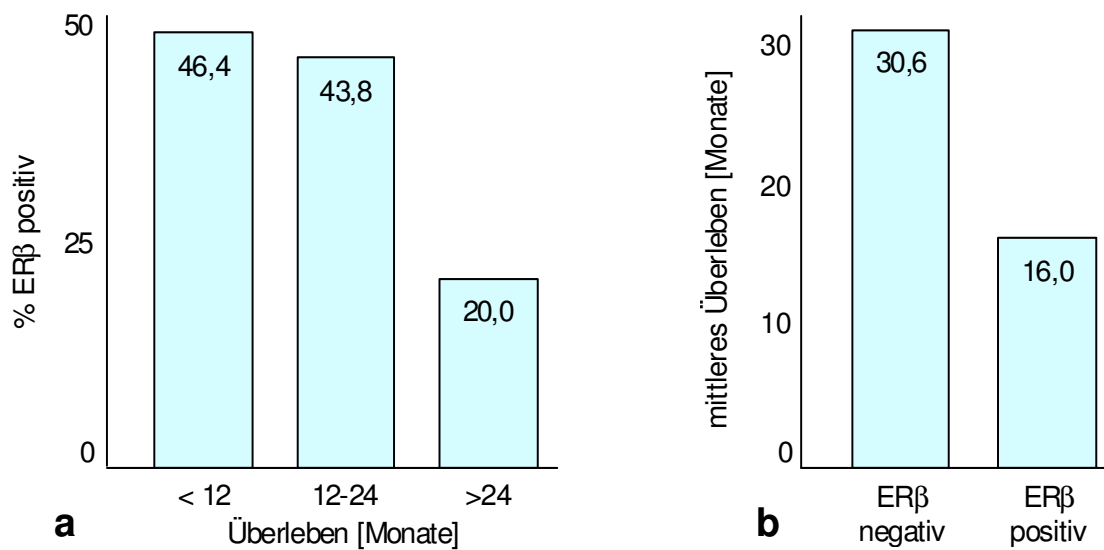


Abbildung 12: Überlebensdauer der ERβ-positiven Patienten in Monaten (a) und mittlere Überlebensdauer von ERβ-negativen und ERβ-positiven Patienten (b)

4.2 Nachweis von ERα und ERβ in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

Um zu überprüfen, ob ERα und ERβ auch auf Proteinebene *in vitro* in Pankreaskarzinomzellen nachweisbar sind, wurde ein Western Blot durchgeführt (siehe Abbildung 13). Dafür kamen vier verschiedene humane Pankreaskarzinomzelllinien zum Einsatz: L3.6pl, AsPC-1, MiaPaCa2 und FG. Ebenso erfolgten Untersuchungen der Kontrollzelllinie HT-29 (Kolonkarzinom) und der ERα-negativen MDA-MB-231- bzw. der ERα-positiven MCF-7-Mammakarzinomzelllinien [166] auf die Expression der beiden Östrogenrezeptoren.

In Höhe von 68 kDa war bei den ERα-positiven Zelllinien MCF-7, AsPC-1, FG, HT-29 und in besonderem Maße L3.6pl jeweils eine Bande zu sehen, die bei den ERα-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und MiaPaCa2 fehlte. ERβ wurde als Einzelbande mit einer Molekularmasse von 55 kDa bei den Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, AsPC-1 und HT-29 deutlich detektiert. Eine schwache ERβ-Bande war bei den Zelllinien FG und MiaPaCa2 zu beobachten. Bei den L3.6pl-Zellen dagegen war keine eindeutige Proteinbande bei 55 kDa identifizierbar.

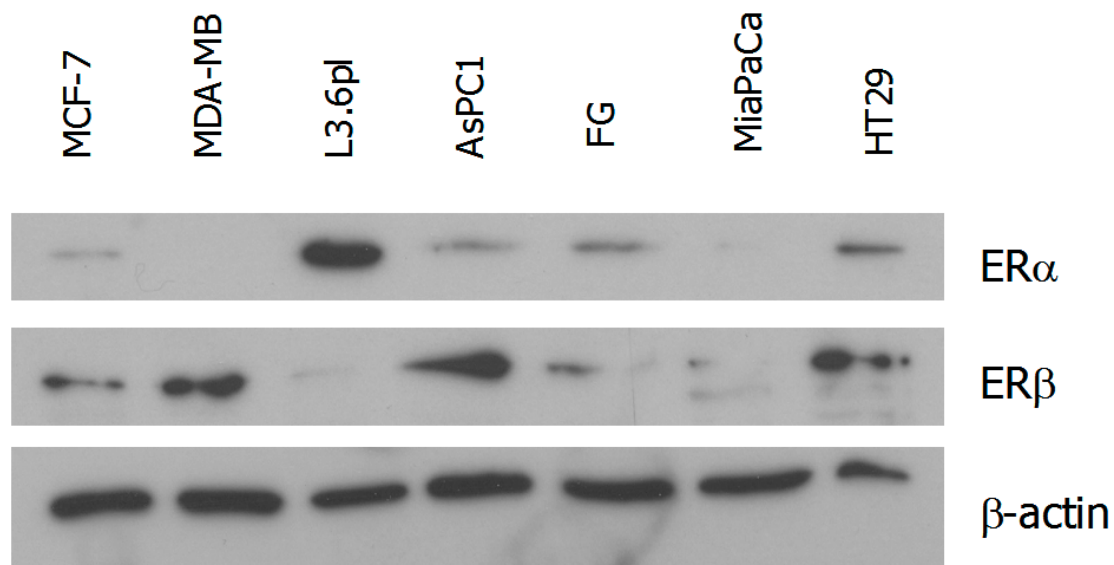


Abbildung 13: Western Blot zur Detektion von ER α und ER β in verschiedenen Karzinomzelllinien

4.3 Antiproliferative Effekte des selektiven Östrogenrezeptormodulators Raloxifen auf Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

Angesichts der Kenntnisse über proliferationsinhibierende Effekte verschiedener SERMs auf Mammakarzinomzellen, bei denen der Hormonrezeptorstatus ein wichtiges Kriterium für die Therapiemethode bedeutet, sollte mit Hilfe eines Proliferationsassays die Auswirkung des SERM Raloxifen auf die Proliferation von L3.6pl-Zellen beurteilt werden. Zum Vergleich wurde die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 herangezogen, deren Reaktion auf Raloxifen in einer Wachstumshemmung resultiert [167], und mit identischen Dosierungen Raloxifen behandelt. 24 Stunden nach Zellaussaat wurde Raloxifen in Dosierungen zwischen 0,1 nM und 1000 nM zugesetzt.

Raloxifen verursachte in beiden Zelllinien eine signifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich bei den L3.6pl-Zellen in der höchsten Konzentration von 1 μ M Raloxifen eine Verringerung der BrdU-Einbaurrate auf 58,9 %, bei den MCF-7-Zellen auf 26,0 %. Die BrdU-Inkorporation ist dabei ein Maß für das Wachstum der Zellpopulation nach Inkubation mit raloxifenfreiem Medium ohne FCS, aber entsprechendem Lösungsmittelvolumen. Die niedrigste Raloxifenkonzentration von 0,1 nM konnte bei den L3.6pl-Zellen praktisch keine (1,3 %) antiproliferativen Effekte erzielen, bei den MCF-7-Zellen ergab sich hier eine Wachstumshemmung um 16,7 %.

Die Senkungen der Proliferationsraten bei Konzentrationen von 100 nM um 26,5 % und 1000 nM Raloxifen um 41,1 % erwiesen sich bei den L3.6pl-Zellen als hoch signifikant ($p < 0,001$), bei einer Konzentration von 10 nM Raloxifen ist die Signifikanz $p < 0,01$ (Wachstumsinhibition um 13,8 %).

Der BrdU-Proliferationstest wurde mehrmals unter identischen Bedingungen mit vergleichbaren Resultaten wiederholt. Die Ergebnisse beruhen jeweils auf Sechsfachbestimmungen ($n = 6$) der unterschiedlichen Dosierungen und Kontrollen (siehe Abbildung 14).

Damit konnte gezeigt werden, dass Raloxifen dosisabhängig in der Lage ist, die Proliferation der L3.6pl- und der MCF-7-Zellen signifikant zu inhibieren.

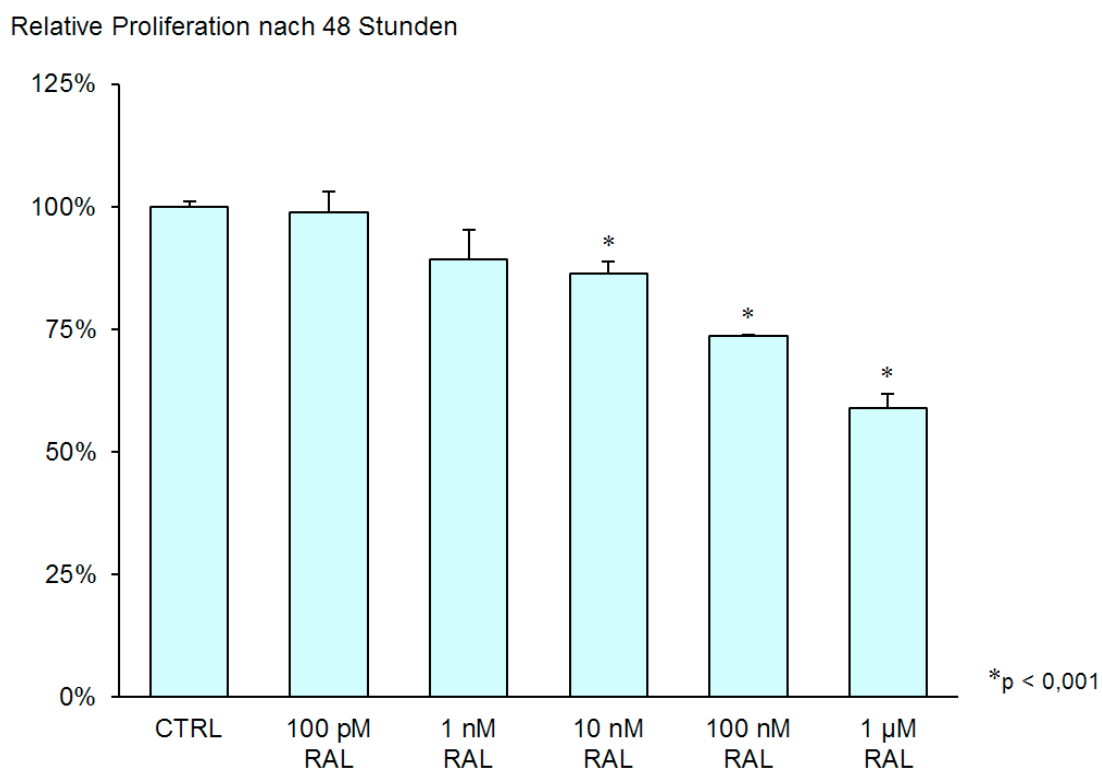


Abbildung 14: Inhibition der Proliferation durch Raloxifen in L3.6pl-Zellen unter Standardbedingungen

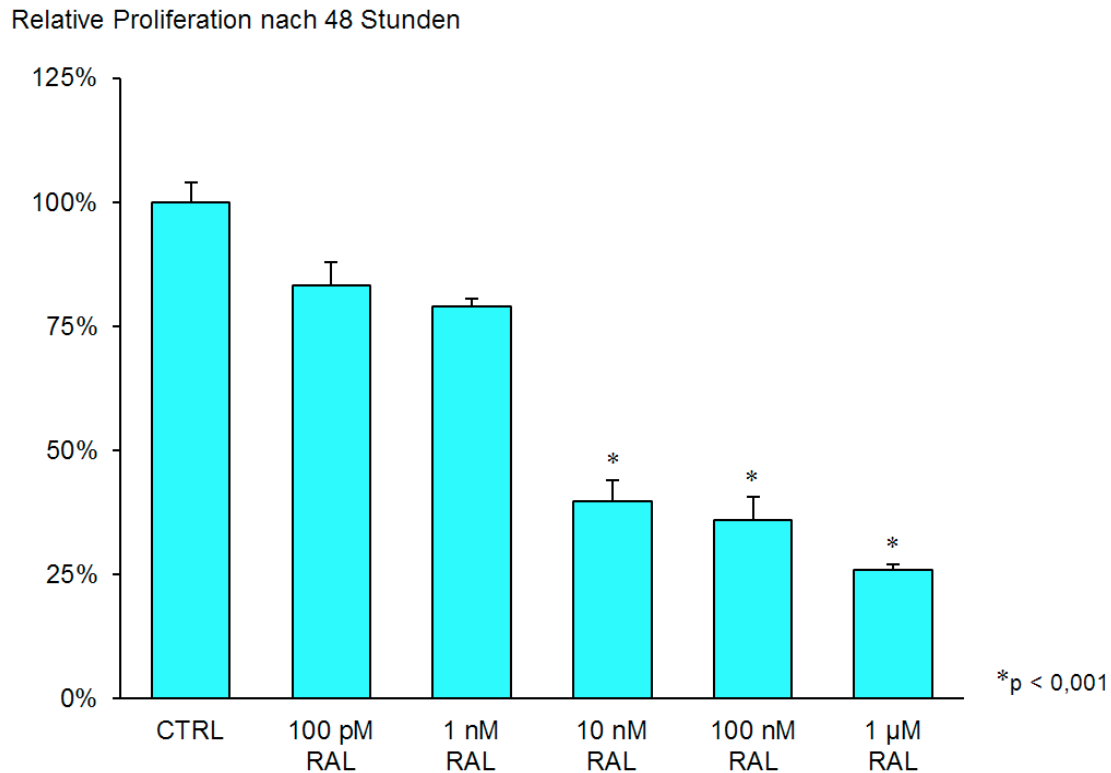


Abbildung 15: Inhibition der Proliferation durch Raloxifen in MCF-7-Zellen unter Standardbedingungen

4.4 Inhibition des Tumorwachstums durch Raloxifen als mögliche Folge einer Down-Regulation des Zytokins Interleukin-6

Da in den vorangegangenen Experimenten belegt werden konnte, dass Raloxifen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inhibitorische Effekte auf das Tumorwachstum des humanen duktales Pankreasadenokarzinoms ausübt, wurde ein Klärungsansatz für die Wirkweise dieses SERM überprüft. In diesem Sinne wurde ein spezifischer Sandwich-ELISA durchgeführt, um die vermutete hemmende Wirkung auf eine Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) zu bestätigen. Die IL-6-Konzentration wurde in Zellkulturüberständen nach Inkubation mit LPS nachgewiesen. IL-6 ist an multifunktionalen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Immunsystems, der Hämatopoese und bei Entzündungsvorgängen. Außerdem scheint IL-6 die Tumorprogression zu fördern, indem es die Angiogenese stimuliert und zudem die Apoptose proliferierender Tumorzellen vermindert [168-170].

In diesem Versuch konnte für L3.6pl-Zellen gezeigt werden, dass IL-6 durch Raloxifen herunter reguliert wird. Hierbei waren in Vorversuchen ähnliche Abnahme-Tendenzen für IL-6 nach 24 Stunden Raloxifentherapie zu erkennen wie nach 48 Stunden, so dass die

Wiederholungsexperimente auf 24 Stunden befristet werden konnten, wenn auch die IL-6-Konzentrationen bei kürzerer Inkubationszeit im Allgemeinen etwas niedriger lagen. Für die Untersuchung der Effekte von Raloxifen auf die IL-6-Ausschüttung wurde es in vier verschiedenen Konzentrationen von 1 nM bis 1000 nM in jeweils fünf Wells auf L3.6pl-Zellen angewendet. Im Vergleich zur Kontrolle (100 %; 146,77 pg/ml IL-6) konnte mit steigender Raloxifendosierung ein Abfall der IL-6-Werte festgestellt werden.

Die Raloxifen-Exposition über eine Dauer von 24 Stunden resultierte in einer Reduktion der LPS-induzierten IL-6 Produktion. 10 nM Raloxifen reduzierten die Sekretion von IL-6 um 49,1 % auf 74,63 pg/ml und 100 nM Raloxifen um 51,5 % auf 71,14 pg/ml. Als noch wirkungsvoller erwies sich die Behandlung mit 1 µM Raloxifen. Bei dieser Konzentration wurde die IL-6-Produktion um 88 % auf 17,56 pg/ml signifikant reprimiert. In Abbildung 16 sind die Mittelwerte der in den jeweils fünf Wells bestimmten IL-6-Konzentrationen eines repräsentativen Experiments nach 24 Stunden Raloxifen-Exposition dargestellt.

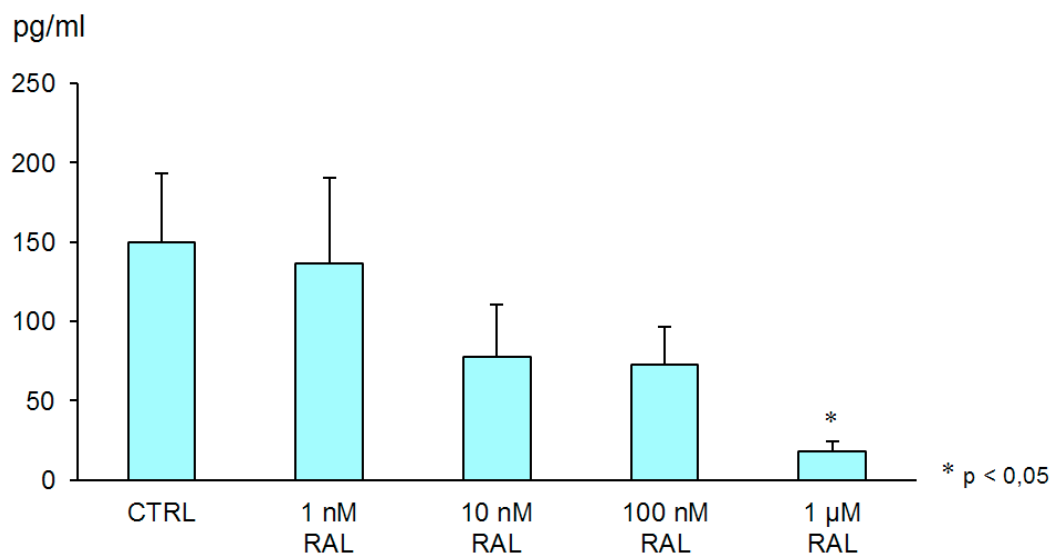


Abbildung 16: Reduktion der IL-6-Sezernierung in L3.6pl-Zellen durch Raloxifen
Der IL-6-Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA ermittelt.

4.5 Die antiproliferative Wirkung von Raloxifen auf humane Pankreaskarzinomzellen ist ER β -vermittelt

Mithilfe des BrdU-Proliferationstests konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass Raloxifen dosisabhängig antiproliferative Effekte auf humane Pankreaskarzinomzellen ausübt. Raloxifen fungiert an ER α als partieller Agonist/Antagonist, entfaltet an ER β jedoch eine rein

antagonistische Wirkung [171, 172]. Da die Expression von ER β auf humanen Pankreasadenokarzinomen nachgewiesen werden konnte, sollte des Weiteren untersucht werden, inwiefern die beobachteten Effekte von Raloxifen über Signaling am ER β vermittelt sind.

Um herauszufinden, ob die *in vitro* belegte Inhibierung der Proliferation dieser Tumorzellen durch Raloxifen allein in Anwesenheit der Östrogenrezeptoren zu Tage treten kann, oder ob die Erklärung hierfür in anderen molekularen Wirkweisen gesucht werden muss, wurde die Technologie der RNA interference (RNAi) angewandt. Durch transiente Transfektion mit ESR1- bzw. ESR2-spezifischer siRNA (small interfering RNA) konnte die Expression der Steroidrezeptoren ER α bzw. ER β , für die diese beiden Gene jeweils kodieren, in den zwei humanen Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und AsPC-1 unterdrückt werden. Da Raloxifen mit beiden Rezeptoren interagiert, wurde neben der Einzel- ebenso eine Doppelinhibierung für ER α /ER β etabliert, um auch gegebenenfalls existierende rezeptorunspezifische Effekte besser erfassen zu können. Für diesen Zweck wurden beide siRNAs gleichzeitig transfiziert. Die Transfektion mit LacZ diente bei beiden Zelllinien der Transfektionskontrolle. Wie aus Abbildung 17 und Abbildung 18 ersichtlich, reagierten die LacZ-Transfektionskontrollen, sowohl bei den L3.6pl- wie auch bei den AsPC-1-Zellen, auf zunehmende Raloxifenkonzentrationen mit einer Wachstumsverminderung, die mit dieser aus den BrdU-Experimenten ohne RNAi durch Transfektion vergleichbar ist (siehe Abschnitt 4.3). Die Proliferationsraten konnten hierbei in der höchsten Raloxifenkonzentration von 1 μ M auf 64 % (L3.6pl) bzw. 82 % (AsPC-1) der unbehandelten Lösungsmittelkontrolle gesenkt werden. Auch beim Knockdown (KD) des für ER α kodierenden ESR1-Gens, ohne Beeinträchtigung der ER β -Expression, war ein hoch signifikanter Abfall der Zellproliferation erkennbar (L3.6pl auf 73,9 % und AsPC-1 auf 81,6 % der Kontrolle, $p < 0,001$).

Allerdings konnte in den beiden Konstellationen, in denen die ER β -Expression auf ein Minimum reduziert war, also sowohl beim alleinigen Knockdown des ESR2-Gens als auch bei der kombinierten Inhibition von ESR1 und ESR2, keine Wachstumsinhibition, weder der L3.6pl- noch der AsPC-1-Zellen, erzielt werden.

Anhand der hierbei gewonnenen Ergebnisse konnte eine Beteiligung von ER β an der Hemmung der Proliferation der zwei untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien L3.6pl und AsPC-1 durch Raloxifen festgestellt werden.

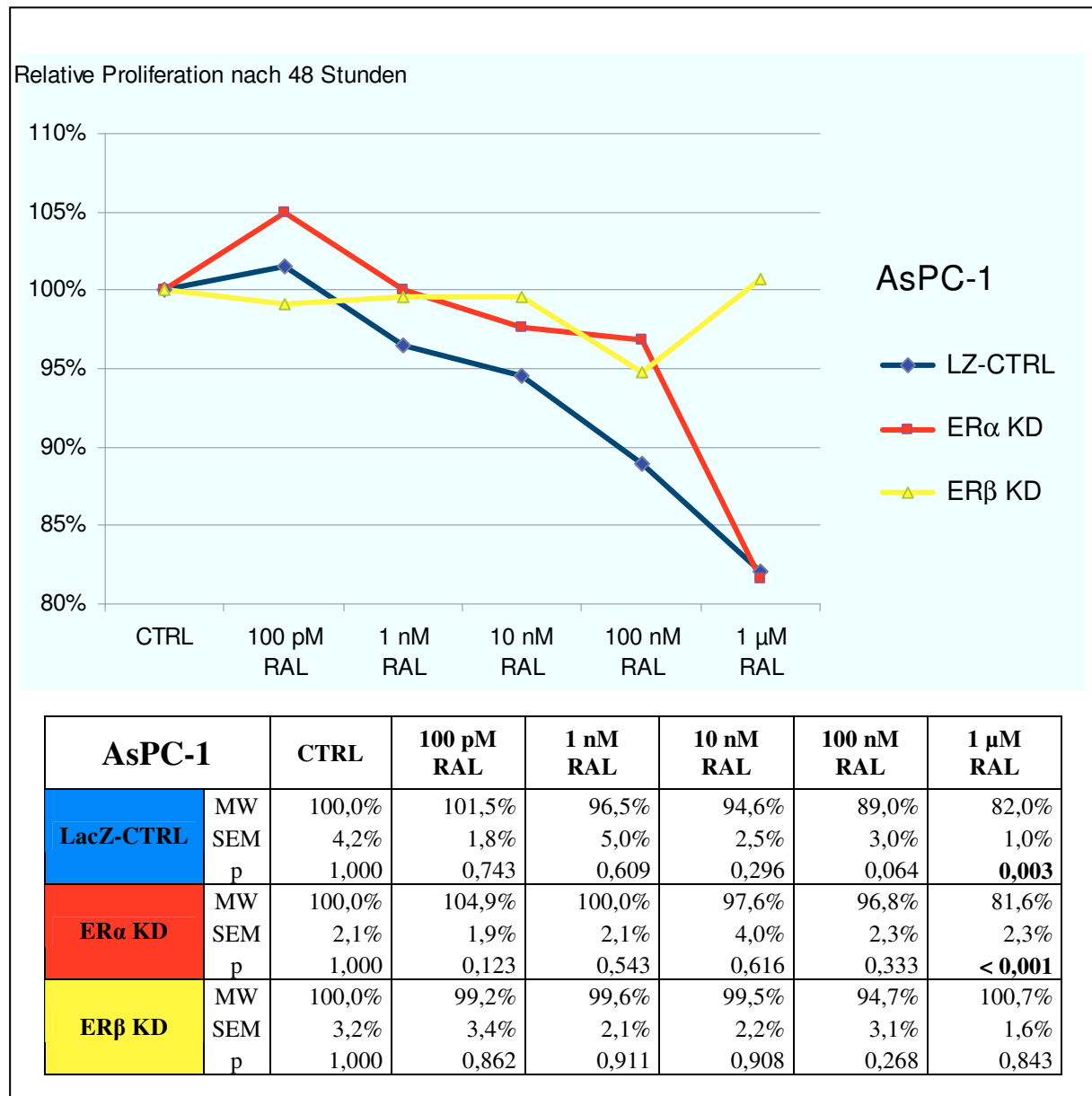


Abbildung 17: Relative Proliferation von AsPC-1-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Raloxifen

Die Zellen wurden zuvor mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. LacZ-Kontrolle (LacZ-CTRL), ERα-Knockdown (KD), ERβ-Knockdown (KD) und Doppelinhibierung ERα/β-Knockdown (KD). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (MW) und die Standardfehler (SEM) aus fünf unabhängigen Messungen eines repräsentativen Experiments. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind fett gedruckt.

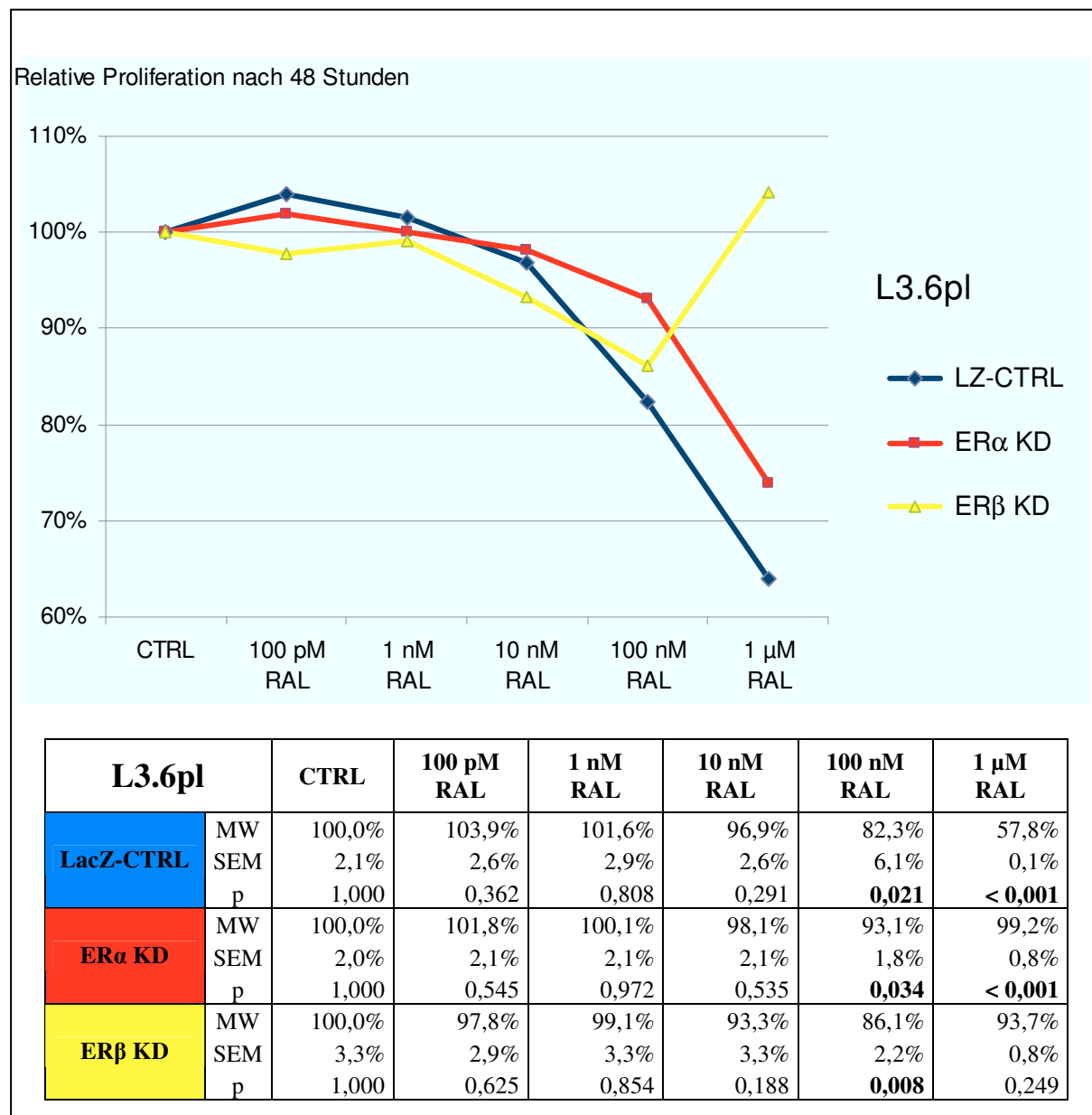


Abbildung 18: Relative Proliferation von L3.6pl-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Raloxifen
Zur Versuchsanordnung und Legende siehe Abbildung 17.

4.6 Inhibition der Tumorprogression beim Pankreaskarzinom durch Therapie mit Raloxifen *in vivo*

Basierend auf den *in vitro*-Ergebnissen sollte die Wirkung von Raloxifen im Vergleich zur Vehikelkontrolle auf die Tumorprogression *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurde ein orthotopes Pankreaskarzinom-Modell in immundefizienten Nacktmäusen gewählt. Die Versuchsgruppe (n = 10) erhielt ab dem zweiten Tag nach Tumorzellinjektion täglich 30 mg/kg KG Raloxifen als intraperitoneale Injektion. Den Kontrolltieren (n = 10) wurde ein

entsprechendes Volumen Corn Oil (Maiskeimöl) injiziert, welches als Lösungsmittel für Raloxifen verwendet wurde.

Als Untersuchungshauptzielgrößen dienten Primärtumorvolumen und -gewicht und die Inzidenz von Lymphknoten- und Lebermetastasen. Des Weiteren wurden immun-histochemische Reaktionen an Paraffinschnitten des entnommenen Tumorgewebes ausgewertet.

4.6.1 Sektion

Die Tiere wurden 31 Tage nach Injektion der Tumorzellen getötet und seziiert. Bei allen Tieren hatten sich in diesem Zeitraum Primärtumore ausgebildet (siehe Abbildungen 19, 20).

4.6.2 Körpergewicht

Jede Maus wurde dreimal wöchentlich gewogen. Ein Verlust von mehr als 20 % des Ausgangsgewichtes galt als Abbruchkriterium für das Einzeltier. Das mittlere Körpergewicht am ersten Behandlungstag betrug in der Kontrollgruppe 21,6 g (Standardfehler $\pm 0,5$ g) und in der Raloxifengruppe 20,3 g $\pm 0,8$ g. Am Versuchsende nach 31 Tagen hatten die Kontrollmäuse mit 19,0 g im Mittel 12,0 % ihres Ausgangsgewichtes verloren, die therapierten Tiere mit einem durchschnittlichen Gewicht von 22,9 g dagegen 12,8 % zugenommen.

4.6.3 Tumorgewicht

Nach 31 Tagen wurde der Versuch beendet, die Tiere beider Gruppen wurden getötet und die Tumore entnommen. Bei allen Tieren hatten sich Primärtumore entwickelt, deren Gewicht und Volumen im Anschluss bestimmt wurde.

Das Tumorgewicht belief sich bei den Kontrolltieren im Mittel auf 1600 mg (Standardfehler: $\pm 151,4$ mg) und bei den Therapietieren auf 631 mg ($\pm 88,2$ mg).

Somit resultierte in der Therapiegruppe eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Reduktion des Pankreaskarzinomgewichtes verglichen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 21).

4.6.4 Tumolvolumen

Von Interesse war neben dem Tumorgewicht auch das Tumolvolumen, das nach der Ellipsoid Volumen Formel (Tumolvolumen = Breite x Tiefe x Höhe / 2) nach Tomayko & Reynolds [173] berechnet wurde. Aus den erhaltenen Messergebnissen resultierte für die Kontrolltiere ein mittleres Tumolvolumen von 990 μl , wohingegen der Mittelwert bei den therapierten Tieren 251 μl betrug.

Das durchschnittliche Tumolvolumen in der Raloxifentherapiegruppe fiel damit im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant ($p < 0,001$) geringer aus (siehe Abbildung 21).

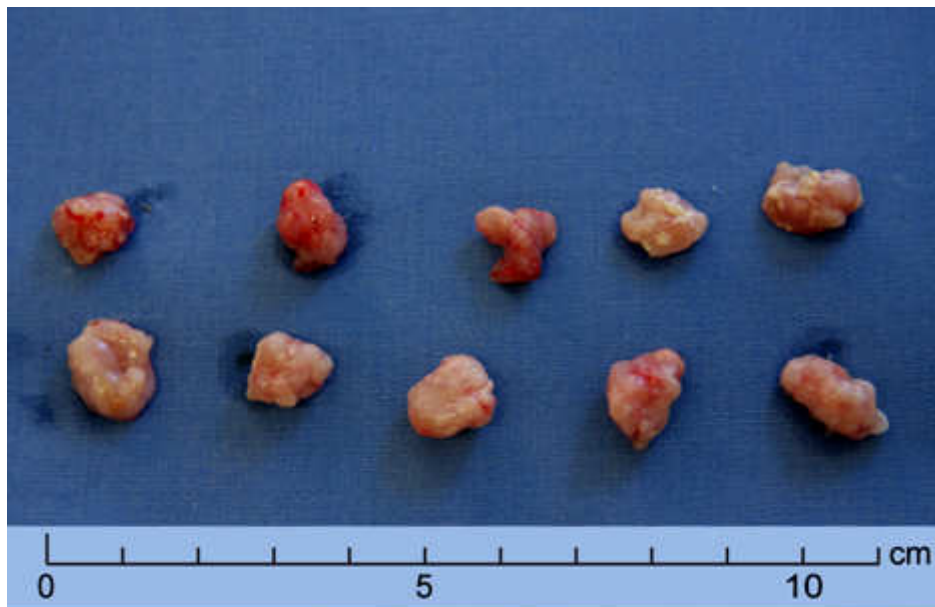


Abbildung 19: Primärtumore des Pankreas der mit Raloxifen behandelten Tiere bei Versuchsende
In der Therapiegruppe traten keine Wundtumore auf.

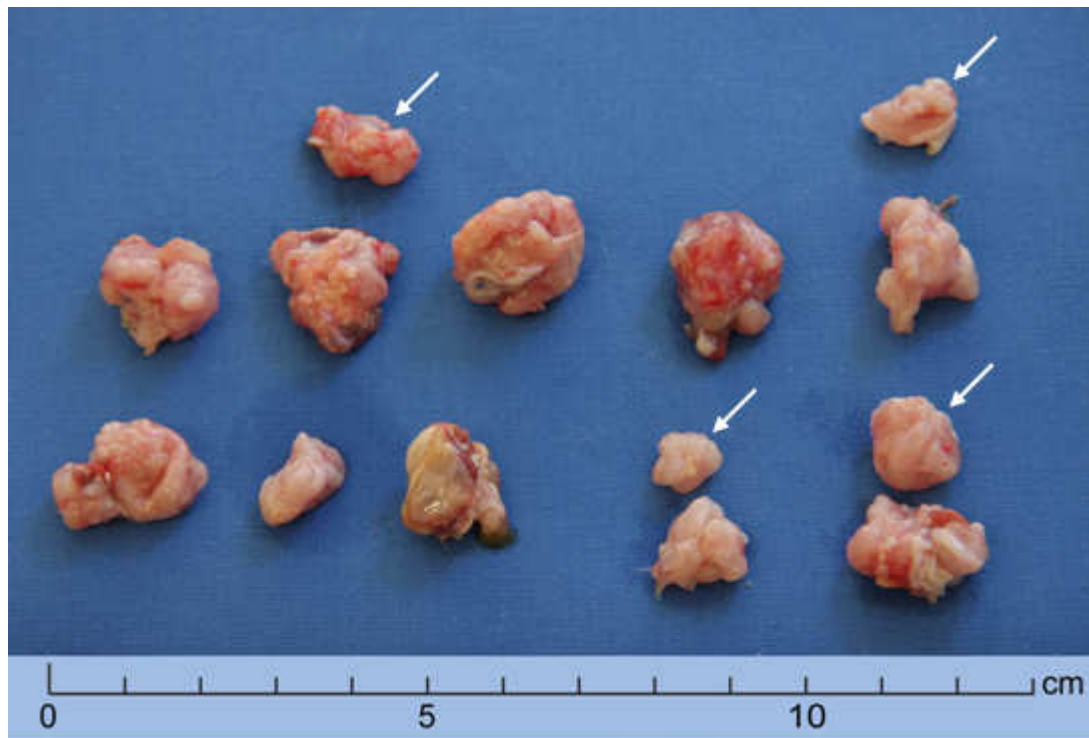


Abbildung 20: Primärtumore des Pankreas der Kontrollgruppe bei Versuchsende
 Vier der Tiere entwickelten zusätzlich Wundtumore (siehe Pfeile).

Gruppe	Wert	Tumorgröße			Tumorgewicht [mg]	Tumorumfangen [µl]
		Länge [mm]	Breite [mm]	Höhe [mm]		
CTRL	MW	16	13	9	1600	990
	SEM	0,7	0,7	1,2	151,4	192,0
RAL	MW	10	8	6	631	251
	SEM	0,9	0,9	0,4	88,1	60,1

Tabelle 7: Tumordaten (Mittelwerte jeweils gerundet auf volle mm, mg, µl) aus der Kontrollgruppe (CTRL) und der Therapiegruppe (RAL); SEM jeweils gerundet auf die erste Kommastelle

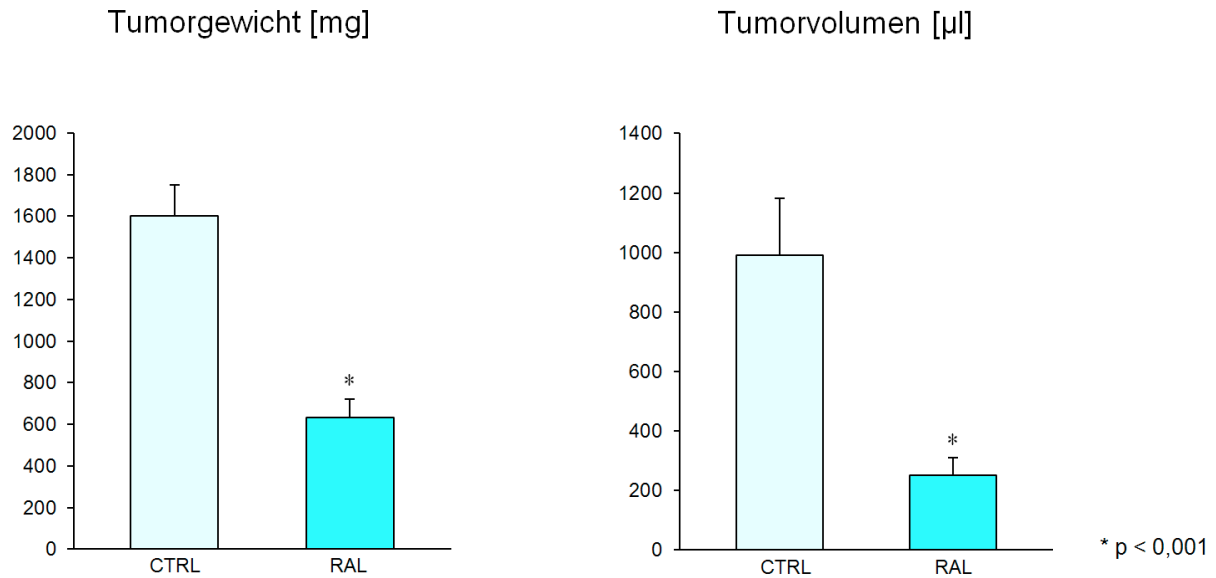


Abbildung 21: Mittleres Tumorgewicht und Tumorumfangen der Tiere aus der Kontrollgruppe und der mit Raloxifen behandelten Tiere

4.6.5 Leber- und Lymphknotenmetastasen

Bei der Untersuchung der Fernmetastasierung konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Insgesamt waren bei sechs Tieren Lebermetastasen zu finden, davon stammten fünf aus der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 22). Nur bei einem Therapietier konnten Lebermetastasen nachgewiesen werden.

Eine deutliche Schwellung der Lymphknoten zeigte sich bei fünf Mäusen. Bei zwei Kontrolltieren waren alle erkennbaren Lymphknoten vergrößert, bei einem beschränkte sich die Schwellung auf die axillären Lymphknoten. In der Raloxifengruppe wurden in einem Fall vergrößerte Inguinallymphknoten festgestellt und einmal waren die Lnn. axillares betroffen (siehe Abbildung 23).

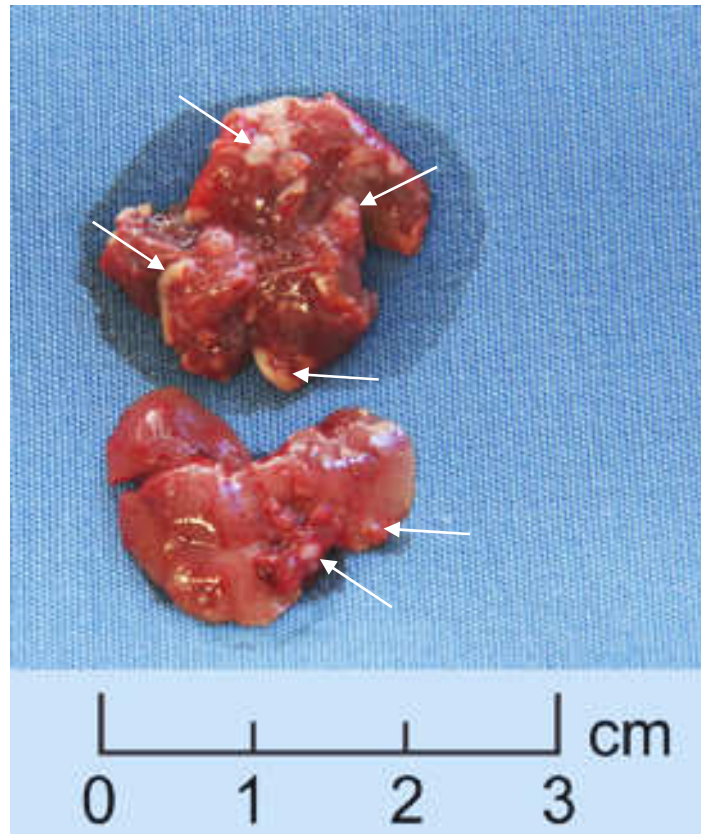


Abbildung 22: Multiple Lebermetastasen bei Kontrolltieren

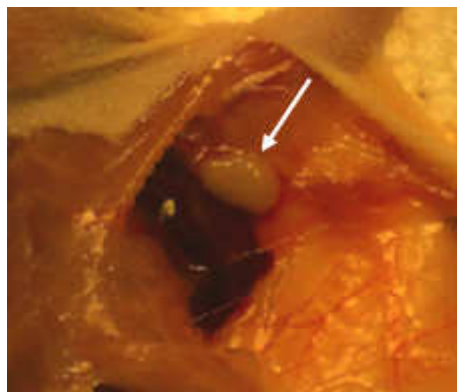


Abbildung 23: Schwellung eines Ln. axillaris einer Maus der Kontrollgruppe

4.6.6 Wundtumore

Wie in Abbildung 20 und Abbildung 24 dargestellt bildeten sich bei vier Kontrolltieren Wundtumore mit einem Gewicht zwischen 288 mg und 408 mg aus. Als Wundtumor bezeichnet man eine typische Entität, die man bei L3.6pl-Tumoren beobachten kann, welche orthotop implantiert werden. Es handelt sich hierbei also um eine Implantationsmetastase durch Tumorzellverschleppung, analog zur Port-site-Metastase bei laparoskopischen Operationen. Zwei der Mäuse mit Wundtumoren fielen zugleich durch die in Abschnitt 4.6.5 beschriebenen multiplen Lebermetastasen auf, eine dritte durch die stark vergrößerten Lymphknoten. Bei den Tieren der Therapiegruppe konnten keine Wundtumore festgestellt werden.

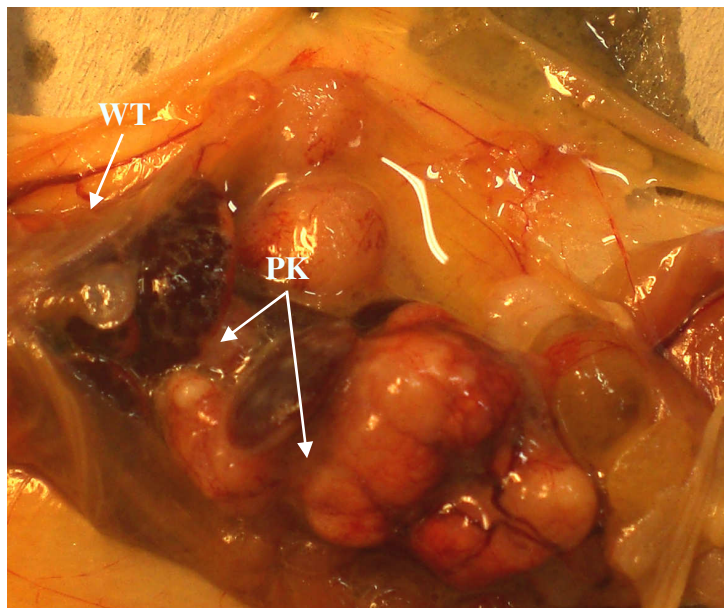


Abbildung 24: Infiltrierendes Pankreaskarzinom (PK) und Wundtumor (WT) einer Maus der Kontrollgruppe

4.7 Immunhistochemische Untersuchungen

4.7.1 Ki67

Aus den entnommenen Tumoren wurden Schnitte hergestellt und unter Verwendung des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistochemisch untersucht (siehe Abbildung 25). Ki67 detektiert Zellen, die sich nicht in der G0-Phase des Zellzyklus befinden. Nach dem oben beschriebenen Quantifizierungsmodus ergab sich für die Kontrollgruppe im Mittel ein Index von 3,6 Punkten (84 % detektierter Zellen). Für die Raloxifengruppe wurden durchschnittlich 3,0 Punkte und 67 % detektierte Zellen ermittelt. Dies entspricht einer deutlichen Reduktion der Proliferation bei den behandelten Tieren und korreliert mit deren geringeren Tumorzellvolumina ($p = 0,014$).

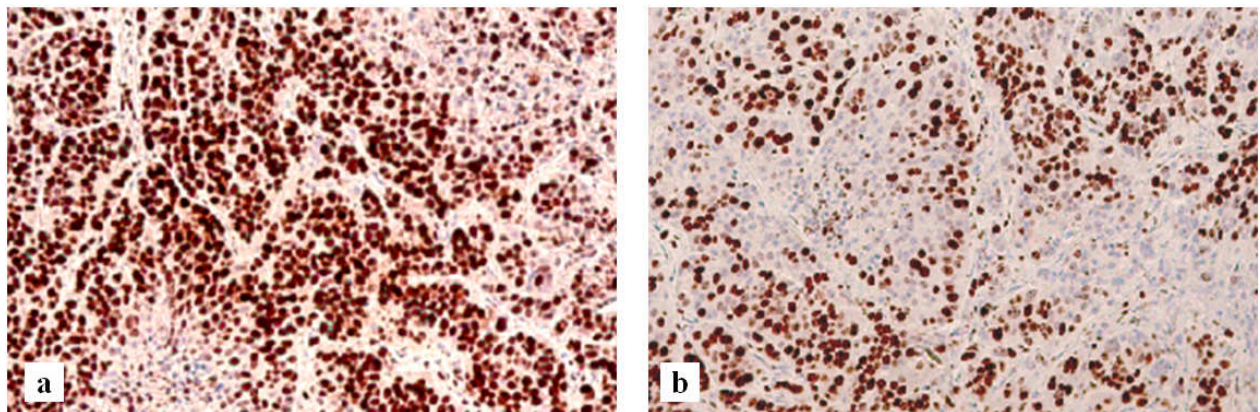


Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67

In der Kontrollgruppe (a) lag der durchschnittliche Anteil detektierter Zellen bei 84 % gegenüber 67 % in der Raloxifengruppe (b).

4.7.2 ER α und ER β

Die Paraffinschnitte der Tumorproben wurden mittels der entsprechenden Antikörper auf ER α und ER β untersucht, um festzustellen, ob sich deren Expression in den Mäusen ebenso verhält wie im humanen Pankreaskarzinomgewebe. Zum Vergleich wurden Schnitte eines gesunden Pankreas einer Maus angefertigt und mit den gleichen Antikörpern behandelt. Die Auswertung der Gewebeproben ermöglichte eine Differenzierung zwischen ER β -positiven und ER β -negativen Zellen. Immunpositive Nuklei erschienen violett bis dunkelbraun im Vergleich zu den blass-rosa gefärbten, immunnegativen Zellkernen. Die Hintergrundfärbung stellte sich nur geringfügig dar und war somit vernachlässigbar. Der ER β war hierbei einzig im Tumorgewebe der Mäuse nachzuweisen, nicht aber im Normalgewebe. Die nukleäre ER α -Reaktion dagegen konnte sowohl im Pankreas-Normalgewebe als auch im Pankreaskarzinom der Maus beobachtet werden (siehe Abbildung 26).

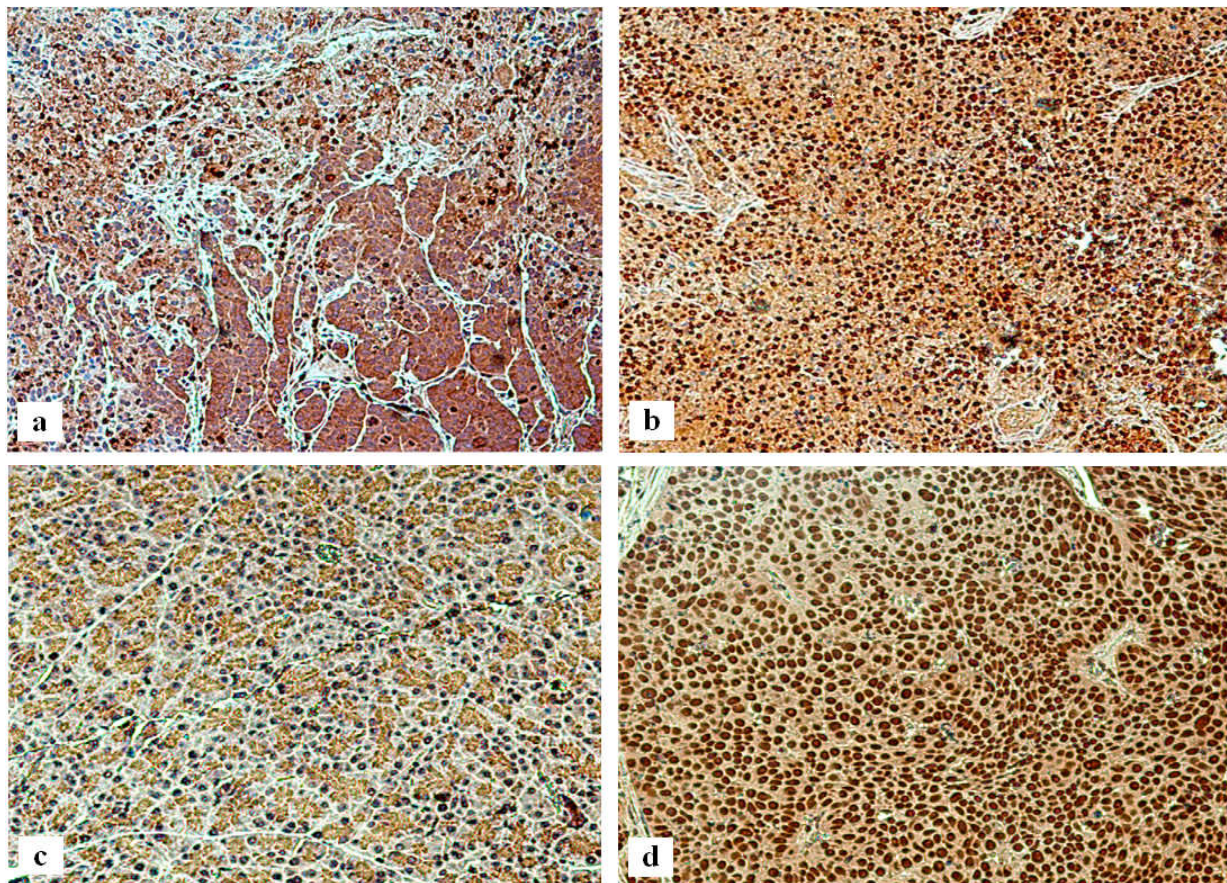


Abbildung 26: Expression von ER β und ER α im Pankreaskarzinom der Maus

Beide Östrogenrezeptoren, ER β (a) und ER α (b), konnten hier nachgewiesen werden. Im Normalgewebe des Pankreas zeigte die Untersuchung auf ER β keine positive Reaktion (c), wohingegen ER α auch hier in hohem Maße darzustellen war (d).

4.7.3 CD31

Eine immunhistochemische Untersuchung auf die Mikrogefäßsdichte mit einem Antikörper gegen CD31 (PECAM-1) wurde nach beschriebenem Protokoll durchgeführt und die durchschnittliche Anzahl CD31-positiver Endothelzellen pro hpf (high power field) ermittelt. Es zeigten sich bei den Tumoren mit und ohne Raloxifentherapie annähernd gleiche Ergebnisse (siehe Abbildung 27). In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert CD31-positiver Zellen bei 38,5/hpf mit einer Standardabweichung von $\pm 11,25$, in der Therapiegruppe bei 37,8/hpf ($\pm 7,93$). Somit konnten in der Dichte der Mikrogefäßbildung keine signifikanten Rückgänge durch den Einsatz von Raloxifen verzeichnet werden.

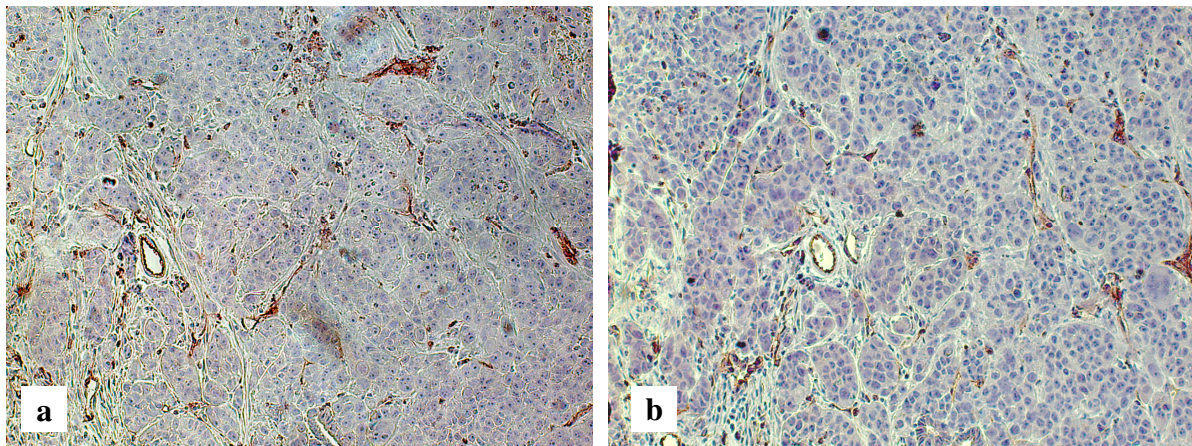


Abbildung 27: Positive CD31-Expression

Die Auszählung der braun gefärbten Endothelzellen von Kontrolltier (a) und Therapietier (b) ergab eine ähnliche Anzahl an Mikroblutgefäßen.

5 Diskussion

Die Idee für diese Arbeit entstand durch die Beobachtung, dass der Hormonrezeptorstatus und speziell die gewebespezifischen Einflüsse der Östrogenrezeptoren auf die Transkription Östrogen-regulierter Gene immer mehr in das wissenschaftliche Interesse hinsichtlich verschiedenster Tumorerkrankungen rücken. Klinische Daten ließen eine mögliche Verbindung von Östrogeneinfluss und Entwicklung bzw. Fortschreiten des humanen duktales Pankreasadenokarzinoms vermuten, die in dieser Arbeit näher untersucht werden sollte.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass Patienten mit einem humanen duktales Pankreasadenokarzinom, in welchem ER β exprimiert wird, eine schlechte Prognose zu erwarten haben. Mittels BrdU und im Tierversuch konnte Raloxifen als potenter Inhibitor der Proliferation von L3.6pl-Zellen *in vitro* sowie des orthotopen Tumorwachstums *in vivo* identifiziert werden. Schließlich wurde im ELISA-Verfahren bestätigt, dass Raloxifen die Sekretion des Zytokins IL-6 in L3.6pl-Zellen reduzieren kann und dass darauf möglicherweise die inhibierende Wirkung von Raloxifen auf Tumorzellproliferation und Tumorwachstum, zumindest anteilig, begründet sein könnte.

5.1 Prognostische Bedeutung von ER β im humanen duktales Pankreasadenokarzinom

Nach Auswertung aller Untersuchungen konnte belegt werden, dass eine ER β -Expression im humanen duktales Pankreasadenokarzinom eine ungünstige Prognose für die betroffenen Patienten bedeutet und der selektive Östrogenrezeptormodulator Raloxifen *in vitro* und *in vivo* potent die Proliferation von L3.6pl-Zellen inhibieren kann.

Wir konnten *in vitro* mittels Western Blot zeigen, dass die Pankreaskarzinomzelllinien FG und AspC-1 ER β exprimieren. Allerdings konnte in den L3.6pl-Zellen auf Proteinebene kein ER β detektiert werden. In den am Ende des Experiments entnommenen Tumorproben erwiesen sich die immunhistochemischen Reaktionen auf ER β jedoch als positiv. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass eine *in vitro* Untersuchung als experimentelles Modell anzusehen ist und somit nicht gleichgesetzt werden kann mit der Situation im Organismus [174]. Nach längerer Kultivierung von Zellen kommt es nicht selten zu einer Dedifferenzierung der Zellen, die die Zelleigenschaften verändern und mit einem Verlust von

Rezeptoren einhergehen kann. Auch die Konzentration der Rezeptoren kann sich im *in vitro* Modell von derjenigen im Organismus unterscheiden.

Die Analyse der Tissue Microarrays aus Tumorproben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom ergab in 32 % der Fälle eine ER β -Expression. Zunächst war davon auszugehen, dass der Nachweis von ER β im Tumorgewebe eine günstige Prognose für diese Patienten bedeutet, da präklinische Daten über die zunehmende Entartung der Milchdrüse infolge verminderter ER β -Expression vermuten ließen, dass es sich bei ER β um einen Tumorsuppressor handelt, der eine unkontrollierte Proliferation der Zellen inhibiert [175]. Zahlreiche Studien beschreiben eine geringere Genexpression von ER β -mRNA und -Protein in invasiven Tumorzellen im Vergleich zur Expressionshöhe in Normalgewebe oder gutartigen Tumoren. Dies trifft auf viele Krebsarten zu, inklusive Mamma-, Ovarial-, Kolon- und Prostatakarzinom [176-189]. Im Einklang damit steht die Korrelation von ER β mit negativem Lymphknotenstatus und niedrigem Grading beim Mammakarzinom [190], und auch die Induktion der Apoptose im Prostatakarzinom bei Zuführung von ER β -Agonisten ist publiziert [191].

Ziel dieser Studie war es, die Expression von ER β mit den klinischen und histopathologischen Daten von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu korrelieren und dies als prognostischen Marker beim Pankreasadenokarzinom gegebenenfalls nutzen zu können. Überraschenderweise erwies sich hierbei ER β als signifikant negativer Prognosefaktor hinsichtlich sowohl des Gesamtüberlebens als auch des rezidivfreien Überlebens für die Patienten. Ebenso erwies sich der Lymphknotenbefall im Einklang mit früheren Studien [192, 193] in unseren Untersuchungen als unabhängiger negativer Prognosefaktor.

Am besten untersucht ist die Bedeutung der Östrogenrezeptorexpression beim invasiven Mammakarzinom. Sowohl das Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren (PR), als auch das ER α /ER β -Verhältnis spielen hier eine wichtige Rolle für Prognose und Therapieentscheidung, so dass heute grundsätzlich zunächst der Gehalt an ER und PR meist immunhistochemisch bestimmt wird. Ein positiver Hormonrezeptorstatus weist auf eine gute Prognose hin und ermöglicht die Therapie mit Hormonantagonisten. Die Expression von ER α ist gegenüber ER β im malignen Mammakarzinomgewebe erhöht. ER β nimmt dabei eine Schutzfunktion in der Mitogenese ein und inhibiert die Zellproliferation, Zellinvasion und die Tumorangio-genese, indem er bei ausreichender Konzentration ER α kontrolliert, über den

Östrogene vornehmlich die zelldifferenzierenden und wachstumsstimulierenden Effekte vermitteln [194-197].

Neuere Erkenntnisse belegen aber, dass ER β in ER α - und PR-negativen Mammakarzinomen seine Funktion als Tumorsuppressor zu verändern oder sogar zu verlieren scheint [198, 199]. Und auch für das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gilt insbesondere die Interaktion zwischen ER α und ER β als prognostischer Faktor [200], nicht allein das Vorhandensein von ER β .

Dass also ER α und ER β nicht unabhängig voneinander agieren, sondern das Verhältnis zueinander eine entscheidende Rolle einnimmt [114], könnte einen Erklärungsansatz dafür bieten, dass ER β im Pankreasadenokarzinom entgegen der weitläufigen Erkenntnis bei einigen Tumorentitäten als negativer Prognosefaktor anzusehen ist. Interessanterweise konnte ER α nicht detektiert werden, was die Daten in Hinsicht auf die Abwesenheit regulatorischer Effekte von ER α auf ER β erklären könnte. Das ER α /ER β -Verhältnis wird jedoch kontrovers in Hinblick auf diese prognostische Relevanz diskutiert. So wurde kürzlich nach immunhistochemischer Auswertung von 100 Tumorproben von Patienten mit Ovarialkarzinom, bei welchem ER β als Tumorsuppressor einzustufen ist, ein kürzeres progressionsfreies Überleben der Patienten bei Verlust von ER α beschrieben, unabhängig davon, ob ER β exprimiert wird oder nicht [201].

Dies führt zu der Vermutung, dass, abgesehen von der ER α /ER β -Ratio, mehrere molekulare Mechanismen dem differentiellen Einfluss von ER β in Tumoren zugrunde liegen, wie zum Beispiel Unterschiede von ER α und ER β in Ligandenaffinität, transkriptioneller Aktivierung von Genen, Interaktionen mit Co-Faktoren, heterogenen Dimerisierungen oder Splicevarianten der Rezeptoren [183, 195].

Inzwischen sind sogar mehrere Isoformen (ER β 2, ER β 4 und ER β 5) und Splicevarianten des Wildtyps ER β 1 bekannt. Diese Isoformen können untereinander keine Homodimere bilden, erfüllen aber als Bindungspartner im Heterodimer mit ER β 1 die Funktion als Aktivitätshancer [202].

Von besonderem Interesse dürfte in diesem Zusammenhang die Splicevariante von ER β 1, ER β cx (= ER β 2) sein. Sie ist in bestimmten Tumorentitäten übermäßig exprimiert [203, 204], bindet aber kein Östrogen und kann somit keine Transkription von östrogensensitiven Genen einleiten. ER β cx fungiert als wirksamer ER α -Repressor, indem er vorzugsweise mit ER α

heterodimerisiert und auf diese Weise die ligandenabhängige Aktivierung von ER α -sensitiven Reportergenen inhibiert [205].

Bis auf diese Fakten ist über die Funktion von ER β cx noch wenig bekannt. Es besteht jedoch möglicherweise ein bedeutsamer Unterschied in der Signaltransduktion von ER β zwischen Nagetieren und Menschen, da die Splicevariante ER β cx nur beim Menschen exprimiert wird [205]. Auch dies könnte ein Grund sein, warum erfolgversprechende klinische Therapieansätze bei östrogenabhängigen Tumoren oftmals versagen, auch wenn sie sich zuvor schon im Tierversuch bewährt hatten.

Dies wirft die Frage auf, inwiefern es als ausreichend beurteilt werden kann, für die Entwicklung neuer Therapien mit Einsatz von SERMs nur den Östrogenrezeptorstatus ER α oder ER β zu bestimmen. Das Augenmerk sollte in Hinblick auf eine individualisierte Therapie auch darauf gerichtet werden, die molekularbiologischen und physiologischen Eigenschaften der Splicevarianten präzise zu charakterisieren und dies bezüglich Therapiealternativen zu berücksichtigen.

Außerdem geht die Transkription von ER β augenscheinlich von mindestens zwei verschiedenen Promotoren aus, ON und OK [206, 207]. Die Methylierung des ER β -Promotors ist in vielen Tumoren zu beobachten und führt zu einem Verlust der ER β -Expression [207]. Anhand einer Studie wurde nachgewiesen, dass der ON-Promotor in normalen epithelialen Mammazellen nicht methyliert wurde, wohingegen er in Brustkrebszelllinien methyliert vorlag. Diese Beobachtung korrelierte mit einem Verlust der ER β -mRNA-Expression, welcher allerdings durch Einsatz von demethylierenden Wirkstoffen rückgängig gemacht werden konnte [208]. Der OK-Promotor befand sich in beiden Fällen in unmethyliertem Zustand. Damit wurde gezeigt, dass die Methylierung der DNA zur Stilllegung des Gens, das für ER β codiert, wesentlich beiträgt und somit eine Behandlung, die auf die Östrogenrezeptoren agonisierende oder antagonisierende Wirkmechanismen beruht, erfolglos verlaufen wird.

Es existieren auch Hinweise, dass die bereits in der Einleitung beschriebene nicht-genomische Aktivierung von ER β andere Effekte auslösen kann als die klassische ligandenabhängige Aktivierung. In einer Studie wurde gezeigt, dass in NSCLC (Non Small Cell Lung Cancer)-Zellen kein ER α vorhanden ist und die hauptsächlich im Zytoplasma liegenden und für das östrogenbedingte Wachstum der Lungenkrebszellen verantwortlichen ER β -Rezeptoren auch

in Anwesenheit von Östrogen nicht in den Zellkern translozieren. Die Östrogene setzen hier vielmehr verschiedene über Kinasen gesteuerte Signaltransduktionswege in Gang, was auf eine nicht-genomische Funktion von ER β hinweist [209]. Ebenso begünstigt ER β offensichtlich durch Aktivierung von zytosolischen Kinase-Kaskaden wie den Src/ERK1/2-Pathway und damit verbundener Hochregulierung von IGF-IR und androgenresponsiven Genen die östrogenabhängige Proliferation von Prostatakarzinomzellen (LNCaP) [210]. Auch über den ER α in Mammakarzinomzellen werden solche schnellen extranukleären Prozesse durch östrogenbedingte Aktivierung des EGFR-abhängigen MAP (Mitogen-Activated Protein)-Kinase-Signalweges vermittelt und tragen im Mammakarzinom möglicherweise zu Resistenzen gegen Antiöstrogentherapien bei [121, 211].

Es ist belegt, dass der PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg mit Östrogenrezeptoraktivierung unabhängig von der Anwesenheit östrogenen Liganden in hormonabhängigen Tumorzellen interagiert [212] und beim duktalem Pankreasadenokarzinom über mehrere Mechanismen konstitutiv aktiviert ist. Dieser Signalweg wurde inzwischen als eine der zentralen Schaltstellen der Karzinogenese, Tumorzellprogression, Metastasierung und Angiogenese bestimmt [213-216]. Da die PI3K/Akt/mTOR-Kaskade auf mehreren Ebenen mit dem Östrogenrezeptor interagiert [217] und auf diese Weise die Sensitivität für eine antiöstrogene Therapie beeinflussen kann, sollte hinsichtlich der Erkenntnis, dass der ER β in der Pathogenese des Pankreasadenokarzinoms offenbar eine bedeutende Stellung einnimmt, in Zukunft das Augenmerk auch darauf gerichtet sein, die molekularbiologischen und physiologischen Mechanismen dieser Signalübertragung besser zu verstehen und spezifisch zu inhibieren.

All diese komplexen Komponenten stellen Erklärungen für die konträren Funktionen von ER β als Tumorsuppressor oder -promotor in den verschiedenen Tumorarten dar und sollten bei zukünftigen Untersuchungen möglichst mit einbezogen werden. Da der Stand der Forschung dies zurzeit jedoch noch nicht zulässt, könnten die vorgelegten Daten dazu beitragen, ein Patientenkollektiv zu eruieren, das möglicherweise von einer Therapie mit SERMs profitiert.

5.2 Inhibition des Tumorwachstums durch Raloxifen

Trotz der etablierten klinischen Anwendung von Raloxifen ist wenig bekannt über seine Wirkung im Pankreaskarzinom. Es konnte zwar gezeigt werden, dass das mit Raloxifen

strukturell und in den meisten Eigenschaften vergleichbare Tamoxifen in der Lage ist, die Proliferation humaner Pankreaskarzinomzelllinien in gewissem Maße zu inhibieren [218]. In klinischen Studien hingegen konnte sich ein therapeutischer Nutzen nicht bestätigen [219], so dass man recht schnell wieder von diesem Weg abließ.

Dies verwundert nicht, wenn man bedenkt, dass zu diesem Zeitpunkt die Existenz des ER β noch gänzlich unbekannt war. So entstand im Verlauf der vorliegenden Arbeit die Idee, die ursprünglichen Ansätze wieder aufzugreifen. In den *in vitro* Experimenten inhibierte Raloxifen im BrdU-Experiment die Proliferation von L3.6pl-Zellen in einer Konzentration von 10 nM signifikant ($p < 0,01$) und ab einer Dosis von 100 nM gar hoch signifikant ($p < 0,001$).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit einer unlängst veröffentlichten Studie von Janakiram et al. über die Wirksamkeit von Raloxifen zur Prävention vor Kolonkarzinomen [220]. Sie zeigt auf, dass Raloxifen imstande ist, das Wachstum der Kolonkarzinomzelllinie HTT-116, die eine hohe ER β -Expression aufweist, zu supprimieren. Dies war verbunden mit einer verminderten ER β -Expression. Ebenso wurde die Expression von PCNA, ein in der DNA-Replikation bedeutendes Enzym, welches als Surrogatmarker für Proliferationsaktivität dient, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen stark inhibiert. Dagegen sprachen DLD-1-Kolonkarzinomzellen, die kein ER β exprimieren, sehr viel weniger sensitiv auf die Raloxifenbehandlung an. Daraus schlossen Janakiram et al., dass die ER β -Expression im Kolonkarzinom nicht wie beim Mammakarzinom als Tumorsuppressor anzusehen ist, sondern vielmehr zu einer Resistenz gegen Wachstumsinhibition führt und zur Proliferation beiträgt. Diese Beobachtungen werden auch von früheren Studien gestützt, in denen sich zeigte, dass in ER β -positiven Mammakarzinomen die höchsten Expressionen der Proliferationsmarker Ki67 und Cyclin A auftraten [221].

Eine andere Untersuchung jedoch belegt, dass auf Behandlung von MCF-7-Zellen mit dem Phytoöstrogen Genistein, welches in großen Mengen in Sojaprodukten enthalten ist, zunächst die ER β -Expression und daraufhin die Proliferation signifikant anstieg [222, 223]. Auch bei einer Studie über Azoxymethan (AOM)-induzierte Kolonkarzinome bei F344 Ratten wirkte Genistein fördernd auf die Tumorigenese [224]. Dies scheint jedoch ein dosisabhängiger und tumorspezifischer Effekt zu sein, da Genistein als antikanzerogen und antiangiogen gilt, indem es Tyrosinkinasen und die VEGF-Expression inhibiert [225-229]. Eine denkbare Erklärung hierzu beschreibt eine Studie, in welcher Genistein in niedrigen Dosierungen die

Proliferation einiger Brustkrebszelllinien förderte, wohingegen hohe Konzentrationen zur Wachstumsinhibition führten [230]. Genistein weist eine ähnliche Wirkweise auf wie SERMs und kann an beide Östrogenrezeptoren binden, zeigt aber eine zwanzigfach höhere Affinität zu ER β [231].

Die dosisabhängigen Unterschiede in der Wirkung auf das Tumorwachstum müssen auch bei einer potenziellen zukünftigen Therapie mit Raloxifen bedacht werden, da ER β möglicherweise in der Lage ist, sich durch positive Rückkopplungsmechanismen selbst hochzuregulieren, wenn es nicht in hohem Maße antagonisiert wird.

Aufgrund dessen wurde in dem hier durchgeführten Tierversuch eine vergleichsweise hohe Dosis Raloxifen (30 mg/kg KG) eingesetzt. Die durchschnittliche Dosierung zur Prophylaxe und Therapie der postmenopausalen Osteoporose beim Menschen liegt bei 60 mg Raloxifenhydrochlorid pro Tag.

Janakiram et al. konnten also zeigen, dass ER β beim Kolonkarzinom als Tumorpromotor fungiert und ER β -Targeting mit Raloxifen das Auftreten durch AOM induzierter Kolonkarzinome *in vivo* bei F344-Ratten verhindert und somit der Karzinogenese entgegenwirkt [220]. Die Wirkweise von Pharmaka und anderen präventiven Substanzen beruht auf der Tatsache, dass sie entweder die initiale Phase der Karzinogenese oder die Progression der neoplastischen Zellveränderungen verlangsamen, hemmen oder sogar rückgängig machen können [232-234].

Die mit Raloxifen behandelten Mäuse wiesen in der Versuchsanordnung dieser Arbeit nach 31 Tagen hoch signifikant kleinere Tumoren auf als die Tiere, denen lediglich das Lösungsmittel, also eine entsprechende Menge Maiskeimöl, verabreicht worden war. Auch Lebermetastasen waren bis auf eine Ausnahme nur in der Kontrollgruppe zu finden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Behandlung mit Raloxifen der Inzidenz der Fernmetastasierung entgegenwirkt.

Außerdem zeigte sich in den immunhistochemischen Reaktionen der entnommenen Pankreaskarzinome eine direkte Korrelation der geringeren Tumorumfänge mit Ki67, einem Marker für Zellproliferation.

Dies stellt ein relativ sicheres Ergebnis dar, die Frage nach der Wirkungsweise des Raloxifen bleibt dennoch ungewiss. Inhibiert Raloxifen tatsächlich einzig die Tumorprogression in

frühem Stadium oder kann es auch bei späterer Diagnose, wie sie beim Pankreasadenokarzinom meist gegeben ist, die Progression verhindern oder zumindest noch hinauszögern?

Raloxifen scheint beim Kolonkarzinom durch die ER β -Supprimierung spezifische intrazelluläre Signalwege zu aktivieren, welche schließlich in Apoptose und Wachstumsinhibition resultieren. Auch dies erfordert noch eingehendere Untersuchungen der molekularen Mechanismen.

Um aber Zweifel darüber auszuräumen, ob die Erfolge, die in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch Raloxifen erzielt werden konnten, auf der nachweislichen Präsenz von ER β beruhen, musste ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Wirkweise des SERM und den Östrogenrezeptoren herbeigeführt werden.

Um die Funktion eines bestimmten Gens zu erforschen, muss man dieses vorübergehend ausschalten, um es in den Regulationsmechanismen besser einordnen zu können. Dieses sogenannte „Gene-silencing“ der für die beiden Östrogenrezeptoren kodierenden Gene ESR1 (ER α) und ESR2 (ER β) kann ermöglicht werden, indem eine in die Zellen eingeschleuste siRNA die Konzentration der zelleigenen komplementären mRNA auf ein unerhebliches Maß reduziert, obwohl das jeweilige Gen weiterhin transkribiert wird.

Bei beiden Pankreaskarzinomzelllinien, L3.6pl und AsPC-1, die für den BrdU-Proliferationstest mit Raloxifen eingesetzt wurden, ergaben sich aufschlussreiche Hinweise darauf, dass ER β vorhanden sein muss, um den bestätigten Proliferations-inhibierenden Effekt durch Raloxifen zu erzielen. In der höchsten Raloxifenkonzentration zeigte sich für die LacZ-Kontrolle wie erwartet eine deutliche Verringerung der Einbaurate des Bromdesoxyuridin in die Zell-DNA beider Zelllinien. Auch die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen das für ER α kodierende ESR1 führte zu einer hoch signifikanten Reduktion der Proliferation. In diesen beiden Konstellationen wurde also auf die ER β -Expression keinerlei Einfluss ausgeübt.

War allerdings ER β vom Knockdown durch siRNA betroffen, ergab sich bei beiden Zelllinien keine Senkung der Proliferationsrate durch Raloxifen. Ebenso verhielt es sich beim kombinierten Knockdown der Expression beider Östrogenrezeptoren, ER α und ER β . Die Hemmung der ER β -Expression durch spezifische siRNA resultierte somit möglicherweise in einer Resistenz gegen die antiproliferativen Effekte des Raloxifen.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die wachstumshemmenden Effekte von Raloxifen unabhängig von der Anwesenheit des ER α zum Tragen kommen. Andererseits muss ER β augenscheinlich exprimiert werden, da dieser Östrogenrezeptor offenbar als Angriffspunkt für Raloxifen dient oder zumindest einen entscheidenden Schalterpunkt in den Mechanismen des molekularen Netzsystems darstellt, die für die Wirksamkeit dieses Benzothiohenderivats von fundamentaler Bedeutung sind.

Da Raloxifen gemäß seiner Eigenschaft als selektiver Östrogenrezeptormodulator je nach Gewebe östrogenagonistische oder -antagonistische Wirkungen entfaltet, müssen verschiedene Wege existieren, auf die Rezeptoren einzuwirken. So ist bekannt, dass sich Raloxifen in Endometrium- und Brustgewebe vergleichbar verhält wie das natürlich vorkommende 17 β -Estradiol (E2). Raloxifen bindet im Zellkern mit dem Benzothiohphenring mit ähnlicher Affinität wie E2 an den ER und bewirkt dort durch die darauf folgende Konfigurationsänderung des Rezeptors dessen Aktivierung und das Andocken an das ERE der DNA. Die lange Seitenkette verhindert dabei die Interaktion mit der Helix12 der Ligandenbindungsdomäne, die die AF2-Funktion verkörpert. Somit ist die Bindung von Co-Faktoren blockiert, und es kann keine Gentranskription stattfinden [235, 236].

Im Knochen und Lipidstoffwechsel fungiert Raloxifen jedoch als Agonist, wobei ein anderer Mechanismus zum Zuge kommt. Hier induziert Raloxifen nach Bindung an den Östrogenrezeptor mit Hilfe einer Reihe von Regulationsfaktoren die Aktivierung einer spezifischen Sequenz der DNA, RRE (Raloxifene Responding Element) genannt. Daraufhin generiert eine Gruppe von Genen die Synthese spezifischer Zellproteine, welche für die agonistische Wirkung verantwortlich sind. Auf diesem Wege imitiert Raloxifen den Effekt natürlicher Östrogene [235-237].

5.3 Raloxifen moduliert die Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in humanen Pankreaskarzinomzelllinien

In dieser Arbeit wurde des Weiteren mittels ELISA der Nachweis erbracht, dass Raloxifen in L3.6pl-Zellen eine Inhibition der IL-6-Ausschüttung bewirken kann.

Nachdem die Zellen 24 Stunden lang mit LPS stimuliert wurden, um einen messbaren IL-6-Spiegel zu erhalten und die erhöhten IL-6-Werte im Pankreaskarzinompatienten nachzuahmen, wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit den äquivalenten Dosierungen

Raloxifen inkubiert wie im BrdU- und im siRNA-Versuch. Aus den im ELISA-Reader ermittelten Extinktionswerten der zellfreien Überstände konnten durch Interpolation der Standardkurve die gesuchten IL-6-Konzentrationen ermittelt werden.

Wie erwartet fiel die IL-6-Konzentration mit zunehmender Raloxifendosierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich ab. Bei 1 μ M Raloxifen war der IL-6-Wert gar auf 12 % der Kontrolle gesunken.

Dieses Resultat lässt darauf schließen, dass Raloxifen in Pankreaskarzinomzellen die IL-6-Expression senkt. Der dahinter stehende molekulare Mechanismus ist noch unbekannt. Doch Raloxifen verfügt vermutlich über eine Vielzahl von Möglichkeiten, um Gen-regulierende Prozesse zu beeinflussen oder das Tumorwachstum zu inhibieren. In mehreren Studien wurde bereits der Beweis erbracht, dass Raloxifen in Osteoblasten im Zuge des Knochenstoffwechsels in der Lage ist, IL-6 herunter zu regulieren [238-241].

Zytokine wie IL-6 sind evolutionstechnisch betrachtet ein sehr alter Bestandteil des Immunsystems. Beispielsweise kann IL-2, therapeutisch gesehen eines der wichtigsten Interleukine gegen Tumorerkrankungen [242, 243], bei Echinodermaten, also Stachelhäutern wie Seestern und Seeigel, nachgewiesen werden. Bei Fischen und Amphibien besitzt IL-2 eine engere Verwandtschaft zu Produkten von Onkogenen als bei Säugetieren [244]. Folglich können einige Zytokine im Menschen Akute-Phase-Reaktionen auslösen, nicht aber im Tier, oder umgekehrt [245].

Bei IL-6 handelt sich um ein Phospho-Glykoprotein, welches von unterschiedlichen Zellarten exprimiert wird, unter anderem von Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Es übt eine Vielfalt von Funktionen aus, wie Regulation der Hämatopoese, Akute-Phase-Reaktionen und Beeinflussung der Immunantworten im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen [246]. Eine IL-6-Überexpression stellt somit die Ursache für die Pathogenese vieler inflammatorischer Erkrankungen dar. Ebenso spielen IL-6-abhängige Signalkaskaden bei einigen Autoimmunerkrankungen und Entzündungen eine bedeutende Rolle.

Aufgrund der gemeinsamen Nutzung des Rezeptoranteils gp130 (Glykoprotein 130) durch verschiedene IL-6-Familienmitglieder und der Interaktion von IL-6 sowohl mit einem membrangebundenen Rezeptor (IL-6R) auf Hepatozyten und Leukozyten als auch mit einem

löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) ergibt sich zudem eine sehr komplexe Kinetik der IL-6-Effekte [247].

Da IL-6 auch von Tumorzellen produziert wird, sind in einigen Tumorentitäten ebenfalls erhöhte IL-6-Levels aufzufinden [248]. IL-6 aktiviert über gp130 die JAK/STAT3 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription3)- und die MAPK-Signalkaskade [249, 250]. Beide gehören zu den bekanntesten tumorrelevanten Signalwegen und werden durch Onkogene wie Ras (Rat sarcoma) oder durch Membranrezeptoren wie EGFR (Epidermal-Growth-Factor-Receptor) sowie andere Rezeptortyrosinkinasen reguliert. Insbesondere der Entzündungsmediator STAT3 führt dabei oft über die Vorstufe einer chronischen Pankreatitis zur Entwicklung eines duktales Pankreasadenokarzinoms und stimuliert Zellproliferation und Tumorprogression [251].

Man nimmt an, dass eine Überexpression von IL-6 im Mammakarzinom, möglicherweise in Interaktion mit TGF- α und IL-1 [252], direkt oder indirekt an einer schnell fortschreitenden Progression der Erkrankung beteiligt ist. Auch bei anderen Krebsarten [246, 253-255] wurde in diesem Zusammenhang von fortgeschrittenem Tumorstadium, schneller Metastasierung und kurzer Überlebensdauer der Patienten berichtet, mutmaßlich indem IL-6 Entzündungszellen anlockt, die Tumorangiogenese fördert und Zelladhäsionsmoleküle sowie die Chemotaxis modifiziert [168]. Maligne Transformation und Progression durch IL-6 konnten *in vitro* unter anderem bei Nieren- und Prostatazellen bestätigt werden [256-260]. Außerdem soll IL-6 die Apoptose von Mamma- und Ösophaguskarzinomzellen und Zellen aus multiplen Myelomen inhibieren [169, 170]. Auch beim humanen duktales Pankreasadenokarzinom wurden erhöhte IL-6-Spiegel im Serum ausfindig gemacht [261-264]. Ebenso verhält es sich bei der akuten [265-268] und bei der chronischen Pankreatitis [267, 269, 270].

Dagegen wurde aber auch berichtet, dass IL-6, wie im Prostata-Xenograft-Modell in Mäusen, dem Tumorwachstum sogar entgegenwirken kann [271, 272] oder dass *in vitro* keinerlei Zusammenhänge zwischen Tumorzellprogression und vermehrter IL-6-Ausschüttung aufgedeckt werden konnten [273-275]. Infolgedessen liegen hierüber widersprüchliche Ergebnisse vor, so dass noch keine endgültige Aussage über die Funktion von IL-6 in Tumorprozessen möglich ist [271, 276].

So lag es nahe, in dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Raloxifen-abhängige Inhibition der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen mit einer Senkung von IL-6 verbunden ist, um so einen möglichen Wirkungsmechanismus von Raloxifen im Pankreasadenokarzinom erklären zu können.

Des Weiteren erfolgt die Regulierung von IL-6 auch über den Östrogenrezeptor. Die Suppression des IL-6-Spiegels über den Östrogenrezeptor wird wahrscheinlich durch eine direkte Interaktion des durch 17β -Estradiol aktivierten Östrogenrezeptors mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) vermittelt, welche in einer verminderten Bindeaktivität von NF- κ B an den IL-6-Promotor resultiert [277, 278]. Hierdurch wird die IL-6-Konzentration im Gewebe reduziert.

In einer anderen Studie ergab die Analyse des Zytokinexpressions-Profiles im Durchschnitt ähnlich hohe IL-6-Werte im Serum von 65 Patienten mit Pankreasadenokarzinom vor Tumorresektion bzw. Chemotherapie, verglichen mit dem Serum von 30 gesunden Spendern. Die Patienten mit erhöhtem IL-6-Spiegel im Serum überlebten jedoch signifikant kürzer [168], so dass ein Anstieg des IL-6-Spiegels hier als schlechter Prognosefaktor angesehen werden kann. Zudem ist IL-6 offenbar eng assoziiert mit der Entstehung der durch ein Pankreasadenokarzinom bedingten Tumorkachexie [248, 279, 280], da die IL-6-Werte bei den kachektischen Patienten nach schnellem Gewichtsverlust signifikant höher lagen als bei diesen mit geringem Gewichtsverlust [248]. Dies führt zwangsläufig zu der Überlegung, dass Therapeutika, die der IL-6-Bildung entgegenwirken bzw. die Serumlevel wieder absinken lassen oder die IL-6-Rezeptoren blockieren, die Symptome von Patienten mit Pankreasadenokarzinom abmildern und somit den Krankheitsverlauf hinauszögern könnten.

Es ist unklar, ob die erheblich geringeren Tumervolumina bei den mit Raloxifen behandelten Nacktmäusen in unserem Tierversuch mit einem geringeren IL-6-Serumwert der Tiere im Zusammenhang stehen, da weitere *in vivo* Versuche mit Raloxifen und IL-6-Bestimmung im Serum noch ausstehen und zudem noch nicht geklärt ist, ob Raloxifen die Tumorzellproliferation über Inhibition von IL-6-Signalwegen wie die JAK/STAT- oder MAPK-Kaskaden beeinträchtigt.

Als weiterer kritischer Punkt darf die fragliche Übertragbarkeit von *in vitro* auf *in vivo* erzielte Resultate nicht außer Acht gelassen werden. So wurde *in vitro*, wie erwähnt, vielfach belegt, dass Raloxifen die IL-6-Sekretion im Knochenstoffwechsel senkt (s. o.). Dennoch

konnte in einer neueren Studie bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose keine signifikante IL-6-Senkung im Serum durch Raloxifen (60 mg/Tag p. o. über 12 Wochen) herbeigeführt werden [281], wohingegen dies bei ovariectomierten Mäusen durch das Raloxifenanalog LY117018 (60 µg/Tag s. c. über 7 Wochen) möglich war [239].

Damit steht auch die Frage im Raum, ob durch eine große Abweichung in der IL-6-Homologie zwischen Mensch und Labornager zuverlässige Rückschlüsse aus Tierversuchen gezogen werden können. Humanes IL-6 besteht aus 212 Aminosäuren und ist darin zu 58 % bzw. zu 42 % homolog zum IL-6 von Ratte bzw. Maus. Die Übereinstimmung in der DNA-Struktur des IL-6 beträgt 68 % (Ratte) und 65 % (Maus) [245, 282, 283]. Bei aller Vorsicht, die bei der Frage der klinischen Relevanz von Resultaten aus *in vitro* Experimenten und Tierversuchen generell an den Tag gelegt werden muss, können die komplexe Interaktion zwischen Tumorgewebe, Blutgefäßen und Lymphgefäßen sowie Metastasierungsprozesse im *in vivo* Tumormodell aber dennoch suffizient simuliert werden, wodurch dieses somit weiterhin den Goldstandard für die Untersuchung onkologischer Prozesse verkörpert.

Selbst wenn Raloxifen die Tumor**progression** nicht IL-6-vermittelt, sondern über einen anderen Mechanismus inhibieren sollte, so könnte eine durch Raloxifen induzierte, limitierte IL-6-Ausschüttung und eine dadurch verzögerte oder weniger ausgeprägte Tumorkachexie der Patienten zu deren längerem Überleben mit höherer Lebensqualität entscheidend beitragen.

Nach den bisherigen Erkenntnissen zu urteilen, könnte die erhebliche Differenz im Körpergewicht der Mäuse am Ende des Tierversuchs zumindest zum Teil auf einen zu erwartenden unterschiedlichen IL-6-Serumspiegel der beiden verschiedenen Gruppen zurückzuführen sein. Während Mäuse der mit Raloxifen behandelten Gruppe aufgrund natürlichen Alterswachstums in den 31 Versuchstagen im Schnitt 12,8 % an Körpergewicht zulegten, verlor die Kontrollgruppe aufgrund der eintretenden Tumorkachexie im Mittel 12 % ihres Ausgangsgewichtes.

Alles in allem spricht vieles dafür, dass IL-6 in den Wirkmechanismus von Raloxifen, der in unseren Versuchen zum Erfolg führte, involviert ist, obwohl potenziell auch zahlreiche andere Möglichkeiten in Erwägung zu ziehen sind. Denkbar wäre beispielsweise eine Intervention von Raloxifen in die von Heldring et al. beschriebenen ligandenunabhängigen Signalwege von Östrogenrezeptoren [114]. Durch Wachstumsfaktoren werden Kinasen aktiviert, welche durch Phosphorylierung wiederum eine Aktivierung der Östrogenrezeptoren und

infolgedessen auch anderer assoziierter Co-Regulatoren hervorrufen [284]. Möglicherweise greift Raloxifen in diesen Prozess ein und verhindert die Phosphorylierung des Östrogenrezeptors. Auf diese Weise könnten die verschiedensten Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, wie der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, dessen exakte Regulation jedoch noch nicht vollständig erschlossen ist. Weitere Studien sind notwendig, um zu klären, ob IL-6, entweder allein oder gemeinsam mit anderen Zytokinen, an der Pathophysiologie des Pankreasadenokarzinoms beteiligt ist.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Da der prognostische Wert der Expression von Östrogenrezeptoren beim Pankreasadenokarzinom als unklar gilt, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Expression von ER β mit der klinischen Prognose von Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu korrelieren. Im weiteren Verlauf wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht, ob Raloxifen, ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (SERM), imstande ist, das Tumorwachstum durch Inhibition der ER β -vermittelten Mechanismen zu beeinflussen. Ein weiteres Ziel bestand darin, Ansätze für den Wirkmechanismus von Raloxifen aufzuzeigen.

Aus der vorliegenden Studie sind folgende Ergebnisse ableitbar:

- 1.) ER β wird im humanen duktalem Adenokarzinomen des Pankreas exprimiert und stellt einen unabhängigen Prognosefaktor für ein schlechteres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben dar.
- 2.) Das Benzothiophenderivat Raloxifen inhibiert *in vitro* und *in vivo* über seine Interaktion mit ER β die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen.
- 3.) Raloxifen inhibiert im Tiermodell potent das orthotope und metastatische Tumorwachstum beim Pankreaskarzinom.
- 4.) Raloxifen ist *in vitro* in der Lage, den IL-6-Spiegel in Pankreaskarzinomzellen zu senken.

Es konnte gezeigt werden, dass eine ER β -Expression im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom eine ungünstige Prognose für die betroffenen Patienten bedeutet. Zur endgültigen Validierung dieser Beobachtung ist die Analyse größerer Fallzahlen erforderlich.

Ob die im letzten Punkt genannte Inhibition der IL-6-Produktion lediglich einen positiven Nebeneffekt von Raloxifen darstellt, da hierdurch die Tumorkachexie verzögert werden kann, oder ob Raloxifen seine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum zumindest teilweise über Intervention in IL-6-Signalwege vermittelt, bleibt zunächst ungewiss. Weiterführende Untersuchungen *in vitro* und insbesondere *in vivo* werden diese Frage abschließend klären müssen. Da durch das „Gene-silencing“ der Östrogenrezeptoren mittels siRNA jedoch gezeigt werden konnte, dass Raloxifen ohne ER β -Expression keine Wirkung auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen ausübt, andererseits aber *in vitro* in diesen Zellen die IL-6-Produktion reduziert, deutet dies darauf hin, dass auch eine Interaktion zwischen ER β und IL-6 stattfindet.

Diese Studie war auf *in vitro* Experimente beschränkt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des Zusammenspiels von ER β , Raloxifen und IL-6 im lebenden Organismus bedürfen weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ermöglichen die Ergebnisse dieser Arbeit eine genauere Charakterisierung der prognostischen Bedeutung der ER β -Expression im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom sowie dessen Behandlungsmöglichkeit durch Raloxifen und eröffnen wichtige Einblicke in molekulare Zusammenhänge der Wirkmechanismen.

6 Zusammenfassung

Die Prognose für Patienten mit Pankreasadenokarzinom ist trotz multimodalen konventionellen Therapieregimes schlecht. Die allgemeine 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 1 bis 5 %. Daher ist die Entwicklung alternativer Therapiestrategien gegen diesen oft chemotherapieresistenten und hoch aggressiven Tumor von essentieller Bedeutung. Die Rolle der Expression von Östrogenrezeptoren beim Pankreasadenokarzinom ist weitestgehend unbekannt. Frühe klinische Studien unter Einsatz von selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) wie Tamoxifen führten zu keinen erfolgreichen Ergebnissen. 1996 konnte neben dem bekannten ER α eine weitere Isoform des Östrogenrezeptors kloniert werden, der Östrogenrezeptor beta (ER β).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt der Expression von ER β auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben bei Patienten mit reseziertem Pankreasadenokarzinom zu untersuchen und die Wirksamkeit des zur Behandlung und Prävention der postmenopausalen Osteoporose zugelassenen SERM Raloxifen gegen das Tumorwachstum *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren.

Hierfür wurden in Paraffin eingebettete Tumorproben von 94 Patienten, bei denen im Zeitraum zwischen 2003 und 2006 ein duktales Adenokarzinom des Pankreas reseziert wurde, identifiziert. Aus dem archivierten Tumormaterial wurden Tissue Microarrays (TMA) angefertigt und die Schnitte mit einem ER β 1-spezifischen Antikörper behandelt. Die Expression von ER β wurde mit den klinischen und pathologischen Parametern korreliert. Anschließend wurde die Expression von ER β in univariaten und multivariaten Analysen mit den Überlebensdaten in Korrelation gesetzt.

Für die Untersuchung der *in vitro* Effekte von Raloxifen wurde die humane Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl kultiviert und mit Raloxifen in unterschiedlichen Dosierungen von 0,1 nM bis 1000 nM behandelt. Danach wurde die Zellproliferation mittels BrdU gemessen. Um die spezifische Wirksamkeit der durch Raloxifen erzielten Resultate zu analysieren, wurde die Expression von ER α und ER β mittels siRNA spezifisch reduziert und der Versuch erneut durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die nachgewiesene Wirksamkeit von Raloxifen in L3.6pl-Zellen zumindest teilweise auf der Reduktion der IL-6-Expression beruht, wurde die IL-6-Konzentration nach Raloxifenbehandlung im ELISA-Verfahren bestimmt. Für

die *in vivo* Versuche wurde in einem orthotopen Tiermodell in Nacktmäusen täglich Raloxifen injiziert und das Tumorwachstum überwacht. Die Expression von ER β und die Proliferation anhand des Markers Ki67 wurden in dem am Ende des Versuchs entnommenen Tumormaterial immunhistochemisch untersucht.

Die Auswertung der TMA ergab in 32 % der Patienten eine nukleäre Expression von ER β . Die univariate Analyse der Überlebensdaten zeigte, dass das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und die Expression von ER β jeweils mit einer signifikant kürzeren gesamten und rezidivfreien Überlebenszeit einhergingen. Die multivariate Analyse konnte einen positiven Nodalstatus und die Expression von ER β als jeweils unabhängige ungünstige Prognosefaktoren bestätigen.

Die *in vitro* Behandlung der L3.6pl-Zellen mit Raloxifen resultierte in einer potenten, dosisabhängigen Hemmung der Zellproliferation. Dieser Effekt konnte mittels „Gene-silencing“ von ER β durch die spezifische siRNA vollständig rückgängig gemacht werden, unter Verwendung der ER α -spezifischen siRNA blieb der Effekt jedoch erhalten. Da Raloxifen *in vitro* des Weiteren eine Abnahme der IL-6-Sekretion in L3.6pl Zellen induzierte, lassen sich Rückschlüsse auf die Beteiligung von ER β und IL-6 am Wirkungsmechanismus von Raloxifen ziehen. *In vivo* konnte Raloxifen sowohl das orthotope Tumorwachstum als auch die Metastasierung bei den behandelten Mäusen signifikant inhibieren. Die Anzahl der durch den Proliferationsmarker Ki67 detektierten Zellen des entnommenen Tumormaterials fiel bei den behandelten Mäusen signifikant niedriger aus als bei den Kontrolltieren.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine ER β -Expression im humanen duktalem Pankreasadenokarzinom eine ungünstige Prognose für die betroffenen Patienten bedeutet und Raloxifen *in vitro* und *in vivo* potent die Proliferation von L3.6pl-Zellen inhibieren kann. Auch das orthotope Tumorwachstum sowie die Fernmetastasierung in Mäusen können durch Raloxifen supprimiert werden. Der molekulare Wirkmechanismus von Raloxifen sollte zukünftig in weiteren Studien eingehender untersucht werden. Zur endgültigen Validierung dieser Beobachtung ist zudem die Analyse noch größerer Fallzahlen erforderlich.

7 Summary

Despite multimodal conventional therapeutic regime the clinical prognosis for patients with pancreatic carcinoma is poor. The overall five-year survival rate is just one to five percent. To develop an alternative therapy strategy against this chemotherapy resistant and highly aggressive tumor is therefore of the utmost importance. The role of the expression of estrogen receptors in pancreatic cancer has been barely researched. Analysis of prior medical studies shows that using selective estrogen receptor modulators (SERMs) like Tamoxifen has no effect. In 1996 a new isoform of the estrogen receptor was cloned in addition to the known ER α : the estrogen receptor beta (ER β).

This work's purpose was to evaluate the impact of ER β expression on overall survival and disease-free survival of patients with resected pancreatic carcinoma and to characterize the *in vitro* and *in vivo* effectiveness of the osteoporosis treatment and prevention drug SERM raloxifene against tumor growth.

For this purpose paraffin-embedded tumor samples of 94 patients who had a ductal pancreatic adenocarcinoma resected between 2003 and 2006 were identified. Tissue microarrays (TMA) were created out of the archival tumor material and the sections stained using ER β 1-specific antibodies. The expression of ER β was then correlated to clinical and pathological parameters. Subsequently the ER β expression in univariate and multivariate analyses was correlated to the survival rate.

The human pancreas adenocarcinoma cell line L3.6pl was cultured and treated with raloxifene in varying doses of 0.1 nM to 1000 nM for the analysis of raloxifene's *in vitro* effects. The cell proliferation was then measured by BrdU. For the same experiment, specific knockdown of ER α and ER β was performed using siRNA to analyze the specific effectiveness of the results provided by the raloxifene treatment. The IL-6-concentration of the L3.6pl cells was measured through the ELISA-procedure after raloxifene treatment to verify that the detected effectiveness of raloxifene in the cells was caused at least partly by reducing the IL-6-expression. An orthotopic animal model with nude mice was used for the *in vivo* experiment. The mice were injected with raloxifene daily and the tumor growth monitored. At the end of the experiment extracted tumor material was immunohistochemically analyzed to determine the expression of ER β and the proliferation using Ki67 markers.

The result of the TMA evaluation is that 32 % of the patients had a nuclear expression of ER β . A univariate analysis of the survival rate showed that the existence of lymph node metastasis and the expression of ER β are accompanied by a significantly shorter overall survival and disease free survival. Multivariate analysis of the survival data confirmed that a positive nodal status and the expression of ER β are each an independent risk factor β for an adverse prognosis.

The *in vitro* treatment of the L3.6pl cells with raloxifene resulted in a potent, dose-dependent inhibition of the cell proliferation. This effect was completely reversible by gene-silencing ER β through specific siRNA. Using ER α -specific siRNA kept the effect though. Since raloxifene also induced a reduction of the IL-6 secretion in L3.6pl cells one can infer how ER β and IL-6 participate in the effect of raloxifene. Raloxifene was able to inhibit significantly the orthotopic and metastatic tumor growth in treated mice during the *in vivo* animal model. The number of stained cores shown by proliferation marker Ki67 in the afterwards extracted tumor material was significantly lower in treated mice compared to the control animals.

In summary, the results show that an ER β expression in human ductal pancreas carcinoma means an adverse prognosis for affected patients and that raloxifene potentially inhibits the proliferation of L3.6pl cells *in vitro* and *in vivo*. Also: the orthotopic tumor growth as well as distant metastases in mice can be suppressed by raloxifene. Raloxifene's molecular mechanism of action should be researched more closely in future studies. It is also necessary to validate the observed results by analyzing a greater number of cases.

8 Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
2. Robert-Koch-Institut. 2010; Available from:
http://www.rki.de/cln_153/nn_204078/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/Lokalisationen__Tabellen/C25,templateId=raw,property=publicationFile.xls/C25.xls.
3. Bittner, J.J., *The Causes and Control of Mammary Cancer in Mice* Harvey Lectures, 1946-47. **42**: p. 221-246.
4. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
5. Li, L.C., et al., *Cloning and characterization of human estrogen receptor beta promoter*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 682-9.
6. Andren-Sandberg, A., D. Hoem, and P.L. Backman, *Other risk factors for pancreatic cancer: hormonal aspects*. Ann Oncol, 1999. **10 Suppl 4**: p. 131-5.
7. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
8. Henderson, B.E., R. Ross, and L. Bernstein, *Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture*. Cancer Res, 1988. **48**(2): p. 246-53.
9. Pike, M.C., et al., *Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk*. Epidemiol Rev, 1993. **15**(1): p. 17-35.
10. Heinen, M.M., et al., *Active and passive smoking and the risk of pancreatic cancer in the Netherlands Cohort Study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **19**(6): p. 1612-22.
11. Iodice, S., et al., *Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(4): p. 535-45.
12. Bao, Y., et al., *Passive smoking and pancreatic cancer in women: a prospective cohort study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(8): p. 2292-6.
13. MacLeod, S.L. and P. Chowdhury, *The genetics of nicotine dependence: relationship to pancreatic cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7433-9.
14. Fuchs, C.S., et al., *A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer*. Arch Intern Med, 1996. **156**(19): p. 2255-60.
15. Silverman, D.T., et al., *Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(20): p. 1510-6.

16. Brand, R.E., et al., *Pancreatic cancer patients who smoke and drink are diagnosed at younger ages*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(9): p. 1007-12.
17. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for pancreatic cancer: case-control study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(12): p. 2696-707.
18. Michaud, D.S., et al., *Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer*. JAMA, 2001. **286**(8): p. 921-9.
19. Zhang, J., Z. Zhao, and H.J. Berkel, *Animal fat consumption and pancreatic cancer incidence: evidence of interaction with cigarette smoking*. Ann Epidemiol, 2005. **15**(7): p. 500-8.
20. Lowenfels, A.B. and P. Maisonneuve, *Epidemiology and prevention of pancreatic cancer*. Jpn J Clin Oncol, 2004. **34**(5): p. 238-44.
21. de Braud, F., S. Cascinu, and G. Gatta, *Cancer of pancreas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **50**(2): p. 147-55.
22. MacMahon, B., et al., *Coffee and cancer of the pancreas*. N Engl J Med, 1981. **304**(11): p. 630-3.
23. Lin, Y., et al., *Risk of pancreatic cancer in relation to alcohol drinking, coffee consumption and medical history: findings from the Japan collaborative cohort study for evaluation of cancer risk*. Int J Cancer, 2002. **99**(5): p. 742-6.
24. Michaud, D.S., et al., *Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(5): p. 429-37.
25. Shi, C., R.H. Hruban, and A.P. Klein, *Familial pancreatic cancer*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(3): p. 365-74.
26. Cowgill, S.M. and P. Muscarella, *The genetics of pancreatic cancer*. Am J Surg, 2003. **186**(3): p. 279-86.
27. Lowenfels, A.B., et al., *Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(6): p. 442-6.
28. Gruis, N.A., et al., *Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds*. Nat Genet, 1995. **10**(3): p. 351-3.
29. Giardiello, F.M., et al., *Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome*. N Engl J Med, 1987. **316**(24): p. 1511-4.
30. Silverman, D.T., et al., *Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer*. Br J Cancer, 1999. **80**(11): p. 1830-7.
31. Jamal, M.M., et al., *Diabetes mellitus as a risk factor for gastrointestinal cancer among American veterans*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(42): p. 5274-8.

32. Pezzilli, R., R. Casadei, and A.M. Morselli-Labate, *Is type 2 diabetes a risk factor for pancreatic cancer?* JOP, 2009. **10**(6): p. 705-6.
33. Pannala, R., et al., *New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer.* Lancet Oncol, 2009. **10**(1): p. 88-95.
34. Kolb, A., et al., *Glucagon/insulin ratio as a potential biomarker for pancreatic cancer in patients with new-onset diabetes mellitus.* Cancer Biol Ther, 2009. **8**(16): p. 1527-33.
35. Rivenson, A., et al., *Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Areca-derived N-nitrosamines.* Cancer Res, 1988. **48**(23): p. 6912-7.
36. Fraumeni, J.F., Jr., *Cancers of the pancreas and biliary tract: epidemiological considerations.* Cancer Res, 1975. **35**(11 Pt. 2): p. 3437-46.
37. Porta, M., et al., *In pancreatic ductal adenocarcinoma blood concentrations of some organochlorine compounds and coffee intake are independently associated with KRAS mutations.* Mutagenesis, 2009. **24**(6): p. 513-21.
38. Garabrant, D.H., et al., *DDT and related compounds and risk of pancreatic cancer.* J Natl Cancer Inst, 1992. **84**(10): p. 764-71.
39. Anderson, K.E., et al., *Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas.* Carcinogenesis, 1997. **18**(5): p. 1085-92.
40. Costantini, A.S., et al., *Cancer mortality among workers in the Tuscan tanning industry.* Br J Ind Med, 1989. **46**(6): p. 384-8.
41. Kelly, D.M. and I.S. Benjamin, *Pancreatic carcinoma.* Ann Oncol, 1995. **6**(1): p. 19-28.
42. Basso, D., et al., *Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: an open field for proteomic applications.* Clin Chim Acta, 2005. **357**(2): p. 184-9.
43. Brand, R.E. and M.A. Tempero, *Pancreatic cancer.* Curr Opin Oncol, 1998. **10**(4): p. 362-6.
44. Wanebo, H.J. and M.P. Vezeridis, *Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge.* Cancer, 1996. **78**(3 Suppl): p. 580-91.
45. Büchler, M., W. Uhl, and P. Malfertheiner, eds. *Pankreaserkrankungen* 2ed. 2004, Karger: Freiburg. 218 p.
46. Almoguera, C., et al., *Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.* Cell, 1988. **53**(4): p. 549-54.
47. Rozenblum, E., et al., *Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.* Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1731-4.

48. Pellegata, N.S., et al., *K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions*. *Cancer Res*, 1994. **54**(6): p. 1556-60.
49. Morton, J.P., et al., *Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(1): p. 246-51.
50. Caldas, C., et al., *Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia*. *Cancer Res*, 1994. **54**(13): p. 3568-73.
51. Bruns, C., ed. *Gastrointestinale Tumoren. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* 8ed. Manual, ed. T. München. 2010, Zuckschwerdt Verlag. 328 p.
52. Birkmeyer, J.D., et al., *Hospital volume and surgical mortality in the United States*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(15): p. 1128-37.
53. Butturini, G., et al., *Influence of resection margins and treatment on survival in patients with pancreatic cancer: meta-analysis of randomized controlled trials*. *Arch Surg*, 2008. **143**(1): p. 75-83; discussion 83.
54. Cullinan, S.A., et al., *A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin*. *JAMA*, 1985. **253**(14): p. 2061-7.
55. Cullinan, S.A., et al., *Controlled evaluation of three drug combination regimens versus fluorouracil alone for the therapy of advanced gastric cancer. North Central Cancer Treatment Group*. *J Clin Oncol*, 1994. **12**(2): p. 412-6.
56. Brennan, M.F., T.J. Kinsella, and C. E.S., eds. *Cancer of the pancreas*. 4 ed. *Cancer Principles and Practice of Oncology*, ed. V.T.j. De Vita, S. Hellmann, and R.S.A. (eds). 1993, Lippincott: Philadelphia. 849-882.
57. Kelsen, D.P., et al., *A phase I trial of immediate postoperative intraperitoneal floxuridine and leucovorin plus systemic 5-fluorouracil and levamisole after resection of high risk colon cancer*. *Cancer*, 1994. **74**(8): p. 2224-33.
58. Smalley, S.R. and J.S. Macdonald, eds. *Pancreatic cancer*. *Medical Oncology* ed. P. Calabres and P.S.e. Schein. Vol. 2. 1993, McGraw-Hill, : New York. 691-712.
59. Tajiri, H., et al., *Phase II study of continuous venous infusion of 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer*. *Oncology*, 1991. **48**(1): p. 18-21.
60. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
61. Casper, E.S., et al., *Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas*. *Invest New Drugs*, 1994. **12**(1): p. 29-34.

62. Storniolo, A.M., et al., *An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma*. *Cancer*, 1999. **85**(6): p. 1261-8.
63. Carmichael, J., et al., *Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 1996. **73**(1): p. 101-5.
64. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2007. **297**(3): p. 267-77.
65. Stocken, D.D., et al., *Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(8): p. 1372-81.
66. Welch, S.A. and M.J. Moore, *Erlotinib: success of a molecularly targeted agent for the treatment of advanced pancreatic cancer*. *Future Oncol*, 2007. **3**(3): p. 247-54.
67. Adler, G., et al., *[S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2007]*. *Z Gastroenterol*, 2007. **45**(6): p. 487-523.
68. Ng, S.S., et al., *Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(10): p. 777-83.
69. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
70. Dragovich, T., et al., *Erlotinib plus gemcitabine in patients with unresectable pancreatic cancer and other solid tumors: phase IB trial*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007. **60**(2): p. 295-303.
71. Popescu, R.A. and D. Cunningham, *Chemotherapy for advanced pancreatic cancer--some light at the end of the tunnel?* *Ann Oncol*, 1997. **8**(5): p. 415-6.
72. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
73. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(3): p. 313-23.
74. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
75. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. *Nature*, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
76. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.

77. Al-Hajj, M. and M.F. Clarke, *Self-renewal and solid tumor stem cells*. *Oncogene*, 2004. **23**(43): p. 7274-82.
78. Dontu, G., et al., *Stem cells in normal breast development and breast cancer*. *Cell Prolif*, 2003. **36 Suppl 1**: p. 59-72.
79. Yang, Z.F., et al., *Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer*. *Hepatology*, 2008. **47**(3): p. 919-28.
80. Dick, J.E., *Acute myeloid leukemia stem cells*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1044**: p. 1-5.
81. Ischenko, I., et al., *Cancer stem cells: how can we target them?* *Curr Med Chem*, 2008. **15**(30): p. 3171-84.
82. Haraguchi, N., et al., *Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system*. *Stem Cells*, 2006. **24**(3): p. 506-13.
83. Mayr, B., G. Schaffner, and M. Reifinger, *K-ras mutations in canine pancreatic cancers*. *Vet Rec*, 2003. **153**(3): p. 87-9.
84. Mayr, B., et al., *K-ras protooncogene mutations in feline pancreatic adenocarcinomas*. *Vet Rec*, 2003. **153**(15): p. 468-9.
85. Priester, W.A., *Data from eleven United States and Canadian colleges of veterinary medicine on pancreatic carcinoma in domestic animals*. *Cancer Res*, 1974. **34**(6): p. 1372-5.
86. Kircher, C.H. and S.W. Nielsen, *Tumours of the pancreas*. *Bull World Health Organ*, 1976. **53**(2-3): p. 195-202.
87. Niemand H.G, S.P.F., ed. *Praktikum der Hundeklinik*. Vol. 9. 2001, Parey: Berlin.
88. Withrow, S.J., ed. *Exocrine pancreatic cancer*. *Small Animal Clinical Oncology* ed. S.J. Withrow and D.M. Vail. 2007, Saunders Elsevier: St. Louis, MO. 479-480.
89. Kessler, ed. *Kleintieronkologie*. Vol. 2. 2005, Parey: Stuttgart.
90. Fossum, T., ed. *Chirurgie der Kleintiere*. Vol. 2. 2008, Elsevier, Urban & Fischer Verlag: München. 1656.
91. Grünbaum, E. and E. Schimke, eds. *Klinik der Hundkrankheiten*. Vol. 3. 2007, MVS Medizinverlage Stuttgart. 1232.
92. Hänichen, T. and G. Minkus, *Retrospektive Studie zur Pathologie der Erkrankungen des exokrinen Pankreas bei Hund und Katze*. *Tierärztliche Umschau*, 1990. **45**: p. 363-368.
93. Barsnick R, H.M., Köhler K, Fey K, *Adenocarcinoma of the pancreas in a warmblood gelding* . *Tierärztl Praxis*, 2008. **36**: p. 273-277.
94. Rendle, D.I., et al., *Tachypnoea and pleural effusion in a mare with metastatic pancreatic adenocarcinoma*. *Vet Rec*, 2006. **159**(11): p. 356-9.

95. Rowlatt, U. and F.J. Roe, *Epithelial tumors of the rat pancreas*. J Natl Cancer Inst, 1967. **39**(1): p. 17-32.
96. Benitz, K.F. and R.N. Roth, *A spontaneous metastasizing exocrine adenocarcinoma of the pancreas in the rat*. Lab Anim Sci, 1980. **30**(1): p. 64-6.
97. Kelley, L.C., B.G. Harmon, and P.C. McCaskey, *A retrospective study of pancreatic tumors in slaughter cattle*. Vet Pathol, 1996. **33**(4): p. 398-406.
98. Chen, S. and T. Bartick, *Resection and use of a cyclooxygenase-2 inhibitor for treatment of pancreatic adenocarcinoma in a cockatiel*. J Am Vet Med Assoc, 2006. **228**(1): p. 69-73.
99. Effron, M., L. Griner, and K. Benirschke, *Nature and rate of neoplasia found in captive wild mammals, birds, and reptiles at necropsy*. J Natl Cancer Inst, 1977. **59**(1): p. 185-98.
100. Swartout, M.S. and M. Wyman, *Pancreatic carcinoma in a cockatiel*. J Am Vet Med Assoc, 1987. **191**(4): p. 451-2.
101. Yamamoto, S., et al., *Pathological study of naturally occurring adenocarcinomas demonstrating differentiation in ducks*. Avian Pathol, 2004. **33**(6): p. 581-5.
102. Ritchey, J.W., L.A. Degernes, and T.T. Brown, Jr., *Exocrine pancreatic insufficiency in a yellow-naped Amazon (*Amazona ochrocephala*) with pancreatic adenocarcinoma*. Vet Pathol, 1997. **34**(1): p. 55-7.
103. Turek, M.M., *Cutaneous paraneoplastic syndromes in dogs and cats: a review of the literature*. Vet Dermatol, 2003. **14**(6): p. 279-96.
104. Bright, J.M., *Pancreatic adenocarcinoma in a dog with a maldigestion syndrome*. J Am Vet Med Assoc, 1985. **187**(4): p. 420-1.
105. Bjorneby, J.M. and S. Kari, *Cytology of the pancreas*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2002. **32**(6): p. 1293-312, vi.
106. Hermanns, W. *Exokrines Pankreas 02*. Spezielle Pathologie 2011; Available from: <http://www.patho.vetmed.uni-muenchen.de/Pankreas%2002.pdf>.
107. Lamb, C.R., et al., *Ultrasonography of pancreatic neoplasia in the dog: a retrospective review of 16 cases*. Vet Rec, 1995. **137**(3): p. 65-8.
108. Segars, J.H. and P.H. Driggers, *Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(8): p. 349-54.
109. Walter, P., et al., *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 7889-93.
110. Saunders, P.T., *Oestrogen receptor beta (ER beta)*. Rev Reprod, 1998. **3**(3): p. 164-71.

111. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
112. Saville, B., et al., *Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements*. J Biol Chem, 2000. **275**(8): p. 5379-87.
113. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 833-42.
114. Heldring, N., et al., *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol Rev, 2007. **87**(3): p. 905-31.
115. Matthews, J. and J.A. Gustafsson, *Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta*. Mol Interv, 2003. **3**(5): p. 281-92.
116. Taylor, A.H. and F. Al-Azzawi, *Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues*. J Mol Endocrinol, 2000. **24**(1): p. 145-55.
117. Regitz-Zagrosek, V., T.M. Wintermantel, and C. Schubert, *Estrogens and SERMs in coronary heart disease*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(2): p. 130-9.
118. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-70.
119. Dahlman-Wright, K., et al., *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors*. Pharmacol Rev, 2006. **58**(4): p. 773-81.
120. Gustafsson, J.A., *Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action*. J Endocrinol, 1999. **163**(3): p. 379-83.
121. Coutts, A.S. and L.C. Murphy, *Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells*. Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4071-4.
122. Shim, W.S., et al., *Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo*. Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 396-405.
123. Fernandez, E., et al., *Menstrual and reproductive factors and pancreatic cancer risk in women*. Int J Cancer, 1995. **62**(1): p. 11-4.
124. Kreiger, N., J. Lacroix, and M. Sloan, *Hormonal factors and pancreatic cancer in women*. Ann Epidemiol, 2001. **11**(8): p. 563-7.
125. Skinner, H.G., et al., *Parity, reproductive factors, and the risk of pancreatic cancer in women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(5): p. 433-8.

126. Duell, E.J. and E.A. Holly, *Reproductive and menstrual risk factors for pancreatic cancer: a population-based study of San Francisco Bay Area women*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(8): p. 741-7.
127. Lin, Y., et al., *Association of menstrual and reproductive factors with pancreatic cancer risk in women: findings of the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk*. J Gastroenterol, 2006. **41**(9): p. 878-83.
128. Prizment, A.E., et al., *Pancreatic cancer incidence in relation to female reproductive factors: Iowa Women's Health Study*. JOP, 2007. **8**(1): p. 16-27.
129. Teras, L.R., et al., *Parity, other reproductive factors, and risk of pancreatic cancer mortality in a large cohort of U.S. women (United States)*. Cancer Causes Control, 2005. **16**(9): p. 1035-40.
130. Lo, A.C., et al., *Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk*. Pancreas, 2007. **35**(2): p. 120-9.
131. Navarro Silvera, S.A., A.B. Miller, and T.E. Rohan, *Hormonal and reproductive factors and pancreatic cancer risk: a prospective cohort study*. Pancreas, 2005. **30**(4): p. 369-74.
132. Ji, B.T., et al., *Anthropometric and reproductive factors and the risk of pancreatic cancer: a case-control study in Shanghai, China*. Int J Cancer, 1996. **66**(4): p. 432-7.
133. Wahi, M.M., et al., *Reproductive factors and risk of pancreatic cancer in women: a review of the literature*. Ann Epidemiol, 2009. **19**(2): p. 103-11.
134. Qiu, D., et al., *Overview of the epidemiology of pancreatic cancer focusing on the JACC Study*. J Epidemiol, 2005. **15 Suppl 2**: p. S157-67.
135. Slomczynska, M., M. Duda, and J. Galas, *Estrogen receptor alpha and beta expression in the porcine ovary*. Folia Histochem Cytobiol, 2001. **39**(2): p. 137-8.
136. Schuler, G., et al., *Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed differently from ERalpha in bovine placentomes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2005. **113**(2): p. 107-14.
137. Hamilton, J.M., R.W. Else, and P. Forshaw, *Oestrogen receptors in feline mammary carcinomas*. Vet Rec, 1976. **99**(24): p. 477-9.
138. Rutteman, G.R., et al., *Steroid receptors in mammary tumours of the cat*. Acta Endocrinol (Copenh), 1991. **125 Suppl 1**: p. 32-7.
139. MacEwen, E.G., et al., *Estrogen receptors in canine mammary tumors*. Cancer Res, 1982. **42**(6): p. 2255-9.
140. Morris, J.S., J.M. Dobson, and D.E. Bostock, *Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia*. Vet Rec, 1993. **133**(22): p. 539-42.
141. Sato, M., A.L. Glasebrook, and H.U. Bryant, *Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator* J Bone Miner Metab 1994. **12**: p. 9-20.

142. Katzenellenbogen, B.S. and J.A. Katzenellenbogen, *Biomedicine. Defining the "S" in SERMs*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2380-1.
143. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-63.
144. Shang, Y. and M. Brown, *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2465-8.
145. Smith, C.L., Z. Nawaz, and B.W. O'Malley, *Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(6): p. 657-66.
146. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 753-8.
147. Cummings, S.R., et al., *The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation*. JAMA, 1999. **281**(23): p. 2189-97.
148. Ettinger, B., et al., *Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators*. JAMA, 1999. **282**(7): p. 637-45.
149. Raghov, S., et al., *Toremifene prevents prostate cancer in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model*. Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1370-6.
150. Vogel, V.G., et al., *Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial*. JAMA, 2006. **295**(23): p. 2727-41.
151. Diez-Perez, A., *Selective estrogen receptor modulators (SERMs)*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2006. **50**(4): p. 720-34.
152. Wikipedia. Available from:
http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Raloxifene_Chemical_Structure_V.1.svg.
153. Bryant, H.U., et al., *An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **69**(1-6): p. 37-44.
154. Black, L.J., et al., *Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 63-9.
155. Puntoni, M. and A. Decensi, *The rationale and potential of cancer chemoprevention with special emphasis on breast cancer*. Eur J Cancer, 2009. **45 Suppl 1**: p. 346-54.
156. Barrett-Connor, E., et al., *Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women*. N Engl J Med, 2006. **355**(2): p. 125-37.

157. Bakkevold, K.E., et al., *Tamoxifen therapy in unresectable adenocarcinoma of the pancreas and the papilla of Vater*. Br J Surg, 1990. **77**(7): p. 725-30.
158. Taylor, O.M., E.A. Benson, and M.J. McMahon, *Clinical trial of tamoxifen in patients with irresectable pancreatic adenocarcinoma. The Yorkshire Gastrointestinal Tumour Group*. Br J Surg, 1993. **80**(3): p. 384-6.
159. Evans, G.L., et al., *Raloxifene inhibits bone turnover and prevents further cancellous bone loss in adult ovariectomized rats with established osteopenia*. Endocrinology, 1996. **137**(10): p. 4139-44.
160. Turner, C.H., M. Sato, and H.U. Bryant, *Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats*. Endocrinology, 1994. **135**(5): p. 2001-5.
161. Bruns, C.J., et al., *In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice*. Neoplasia, 1999. **1**(1): p. 50-62.
162. Vezeridis, M.P., et al., *In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse*. Cancer, 1992. **69**(8): p. 2060-3.
163. Morgan, R.T., et al., *Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma*. Int J Cancer, 1980. **25**(5): p. 591-8.
164. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
165. Weidner, N., *Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors*. Breast Cancer Res Treat, 1995. **36**(2): p. 169-80.
166. O'Neill, P.A., et al., *Increased risk of malignant progression in benign proliferating breast lesions defined by expression of heat shock protein 27*. Br J Cancer, 2004. **90**(1): p. 182-8.
167. Wolczynski, S., et al., *Estrogenic and antiestrogenic effects of raloxifene on collagen metabolism in breast cancer MCF-7 cells*. Gynecol Endocrinol, 2001. **15**(3): p. 225-33.
168. Bellone, G., et al., *Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(6): p. 684-98.
169. Leu, C.M., et al., *Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways*. Oncogene, 2003. **22**(49): p. 7809-18.
170. Brocke-Heidrich, K., et al., *Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation*. Blood, 2004. **103**(1): p. 242-51.

171. Pike, A.C., et al., *Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4608-18.
172. Sun, J., et al., *Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta*. Endocrinology, 1999. **140**(2): p. 800-4.
173. Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. Cancer Chemother Pharmacol, 1989. **24**(3): p. 148-54.
174. Dietel, M., et al., *[Individualization of chemotherapy through in vitro predictive determination of the cytostatic sensitivity of malignant tumors]*. Dtsch Med Wochenschr, 1989. **114**(43): p. 1645-52.
175. Iwao, K., et al., *Quantitative analysis of estrogen receptor-beta mRNA and its variants in human breast cancers*. Int J Cancer, 2000. **88**(5): p. 733-6.
176. Pujol, P., et al., *Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5367-73.
177. Brandenberger, A.W., M.K. Tee, and R.B. Jaffe, *Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 1025-8.
178. Foley, E.F., et al., *Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 245-8.
179. Roger, P., et al., *Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2537-41.
180. Campbell-Thompson, M., I.J. Lynch, and B. Bhardwaj, *Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 632-40.
181. Fixemer, T., K. Remberger, and H. Bonkhoff, *Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma*. Prostate, 2003. **54**(2): p. 79-87.
182. Rutherford, T., et al., *Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer*. Obstet Gynecol, 2000. **96**(3): p. 417-21.
183. Bardin, A., et al., *Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression*. Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(3): p. 537-51.
184. Skliris, G.P., et al., *Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model*. J Pathol, 2003. **201**(2): p. 213-20.

185. Stettner, M., et al., *The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(10): p. 2626-33.
186. Bonkhoff, H. and R. Berges, *The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer*. Eur Urol, 2009. **55**(3): p. 533-42.
187. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation*. Eur J Cancer, 2003. **39**(9): p. 1251-8.
188. Chan, K.K., et al., *Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation*. Obstet Gynecol, 2008. **111**(1): p. 144-51.
189. Lazennec, G., *Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis*. Cancer Lett, 2006. **231**(2): p. 151-7.
190. Jarvinen, T.A., et al., *Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 29-35.
191. McPherson, S.J., et al., *Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3123-8.
192. Yeo, C.J., et al., *Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients*. Ann Surg, 1995. **221**(6): p. 721-31; discussion 731-3.
193. Yeo, C.J., et al., *Pancreaticoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, part 2: randomized controlled trial evaluating survival, morbidity, and mortality*. Ann Surg, 2002. **236**(3): p. 355-66; discussion 366-8.
194. Hartman, J., et al., *Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11207-13.
195. Lazennec, G., et al., *ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 4120-30.
196. Surekha, D., et al., *Oestrogen receptor beta (ERbeta) polymorphism and its influence on breast cancer risk*. J Genet, 2009. **88**(2): p. 261-6.
197. Williams, C., et al., *A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(7): p. 1019-32.
198. Maehle, B.O., et al., *Estrogen receptor beta--an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer?* APMIS, 2009. **117**(9): p. 644-50.

199. Skliris, G.P., et al., *Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **109**(1-2): p. 1-10.
200. Nozoe, T., et al., *Significance of immunohistochemical expression of estrogen receptors alpha and beta in squamous cell carcinoma of the esophagus*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(14): p. 4046-50.
201. Burges, A., et al., *Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary*. Arch Gynecol Obstet, 2010. **281**(3): p. 511-7.
202. Leung, Y.K., et al., *Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13162-7.
203. Fujimura, T., et al., *Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(3): p. 692-9.
204. Sugiura, H., et al., *Expression of estrogen receptor beta wild-type and its variant ERbetacx/beta2 is correlated with better prognosis in breast cancer*. Jpn J Clin Oncol, 2007. **37**(11): p. 820-8.
205. Warner, M. and J.A. Gustafsson, *The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 63-6.
206. Hirata, S., et al., *The multiple untranslated first exons system of the human estrogen receptor beta (ER beta) gene*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **78**(1): p. 33-40.
207. Suzuki, F., et al., *Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma*. Cancer Sci, 2008. **99**(12): p. 2365-72.
208. Zhao, C., et al., *Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation*. Oncogene, 2003. **22**(48): p. 7600-6.
209. Zhang, G., et al., *Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(2): p. 146-56.
210. Pandini, G., et al., *17beta-estradiol up-regulates the insulin-like growth factor receptor through a nongenotropic pathway in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8932-41.
211. Song, R.X., et al., *Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor I receptor, matrix metalloproteinases, and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells*. Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 4091-101.

212. Treeck, O., et al., *Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells*. Gynecol Oncol, 2006. **102**(2): p. 292-9.
213. Yau, C.Y., et al., *Inhibition of integrin-linked kinase by a selective small molecule inhibitor, QLT0254, inhibits the PI3K/PKB/mTOR, Stat3, and FKHR pathways and tumor growth, and enhances gemcitabine-induced apoptosis in human orthotopic primary pancreatic cancer xenografts*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1497-504.
214. Ito, D., et al., *In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2337-43.
215. Javle, M.M., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies*. BMC Cancer. **10**: p. 368.
216. Seeliger, H., et al., *Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutic target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 611-21.
217. Boulay, A., et al., *Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5319-28.
218. Benz, C., C. Hollander, and B. Miller, *Endocrine-responsive pancreatic carcinoma: steroid binding and cytotoxicity studies in human tumor cell lines*. Cancer Res, 1986. **46**(5): p. 2276-81.
219. Keating, J.J., et al., *A prospective randomised controlled trial of tamoxifen and cyproterone acetate in pancreatic carcinoma*. Br J Cancer, 1989. **60**(5): p. 789-92.
220. Janakiram, N.B., V.E. Steele, and C.V. Rao, *Estrogen receptor-beta as a potential target for colon cancer prevention: chemoprevention of azoxymethane-induced colon carcinogenesis by raloxifene in F344 rats*. Cancer Prev Res (Phila Pa), 2009. **2**(1): p. 52-9.
221. Jensen, E.V., et al., *Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15197-202.
222. Power, K.A. and L.U. Thompson, *Ligand-induced regulation of ERalpha and ERbeta is indicative of human breast cancer cell proliferation*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **81**(3): p. 209-21.
223. Hsieh, C.Y., et al., *Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 1998. **58**(17): p. 3833-8.
224. Rao, C.V., et al., *Enhancement of experimental colon cancer by genistein*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3717-22.

225. Buchler, P., et al., *Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression*. *Cancer*, 2004. **100**(1): p. 201-10.
226. Lamartiniere, C.A., et al., *Genistein suppresses mammary cancer in rats*. *Carcinogenesis*, 1995. **16**(11): p. 2833-40.
227. Akiyama, T., et al., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(12): p. 5592-5.
228. Markovits, J., et al., *Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II*. *Cancer Res*, 1989. **49**(18): p. 5111-7.
229. Yan, G.R., et al., *Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways*. *Proteomics*. **10**(5): p. 976-86.
230. Zava, D.T. and G. Duwe, *Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro*. *Nutr Cancer*, 1997. **27**(1): p. 31-40.
231. Makela, S., et al., *Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. **217**(3): p. 310-6.
232. Ashughyan, V.R., S. Marihart, and B. Djavan, *Chemopreventive trials in urologic cancer*. *Rev Urol*, 2006. **8**(1): p. 8-13.
233. Sporn, M.B., et al., *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)*. *Fed Proc*, 1976. **35**(6): p. 1332-8.
234. Surh, Y.J., et al., *Molecular mechanisms underlying anti-tumor promoting activities of heat-processed Panax ginseng C.A. Meyer*. *J Korean Med Sci*, 2001. **16 Suppl**: p. S38-41.
235. Bryant HU, G.A., Yang NN, Sato M, *A pharmacological review of raloxifene*. *J Bone Miner Metab*, 1996. **14**: p. 1-9.
236. Grese, T., et al., *Benzopyran selective estrogen receptor modulators (SERMs): Pharmacological effects and structural correlation with raloxifene* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1996. **6**(7): p. 903908.
237. Rey, J.R., et al., *Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice*. *Open Orthop J*, 2009. **3**: p. 14-21.
238. Cheung, J., et al., *Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene*. *J Endocrinol*, 2003. **177**(3): p. 423-33.
239. Jochems, C., et al., *Long-term anti-arthritic and anti-osteoporotic effects of raloxifene in established experimental postmenopausal polyarthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(3): p. 593-7.

240. Mendez-Davila, C., et al., *Effects of 17beta-estradiol, tamoxifen and raloxifene on the protein and mRNA expression of interleukin-6, transforming growth factor-beta1 and insulin-like growth factor-1 in primary human osteoblast cultures.* J Endocrinol Invest, 2004. **27**(10): p. 904-12.
241. Gianni, W., et al., *Raloxifene modulates interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha synthesis in vivo: results from a pilot clinical study.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 6097-9.
242. Jacobson, E.L., F. Pilaro, and K.A. Smith, *Rational interleukin 2 therapy for HIV positive individuals: daily low doses enhance immune function without toxicity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10405-10.
243. Krieg, C., et al., *Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(26): p. 11906-11.
244. Westheide, W., G. Rieger, and R. Rieger, eds. *Spezielle Zoologie: Teil 2: Wirbel- Oder Schädeltiere.* 2 ed. 2010, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2010: Heidelberg. 757.
245. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response.* Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.
246. Berek, J.S., et al., *Serum interleukin-6 levels correlate with disease status in patients with epithelial ovarian cancer.* Am J Obstet Gynecol, 1991. **164**(4): p. 1038-42; discussion 1042-3.
247. Pap, T., *Aktuelle Trends in Design und Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen Entzündungsmediatoren zur Therapie der rheumatoiden Arthritis.* Z Rheumatol, 2010. **69** (1): p. 73-78.
248. Okada, S., et al., *Elevated serum interleukin-6 levels in patients with pancreatic cancer.* Jpn J Clin Oncol, 1998. **28**(1): p. 12-5.
249. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
250. Lesina, M., et al., *Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer.* Cancer Cell. **19**(4): p. 456-69.
251. Fukuda, A., et al., *Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression.* Cancer Cell. **19**(4): p. 441-55.
252. Ben-Baruch, A., *Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions.* Breast Cancer Res, 2003. **5**(1): p. 31-6.
253. Michalaki, V., et al., *Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer.* Br J Cancer, 2004. **90**(12): p. 2312-6.

254. Ueda, T., E. Shimada, and T. Urakawa, *Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis*. J Gastroenterol, 1994. **29**(4): p. 423-9.
255. Kovacs, E., *Effects of Viscum album extract therapy in patients with cancer: relation with interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor, and soluble gp130*. J Altern Complement Med, 2004. **10**(2): p. 241-6.
256. Miki, S., et al., *Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas*. FEBS Lett, 1989. **250**(2): p. 607-10.
257. Lou, W., et al., *Interleukin-6 induces prostate cancer cell growth accompanied by activation of stat3 signaling pathway*. Prostate, 2000. **42**(3): p. 239-42.
258. Smith, P.C., et al., *Interleukin-6 and prostate cancer progression*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(1): p. 33-40.
259. Okamoto, M., C. Lee, and R. Oyasu, *Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro*. Cancer Res, 1997. **57**(1): p. 141-6.
260. Nakajima, K., et al., *A central role for Stat3 in IL-6-induced regulation of growth and differentiation in M1 leukemia cells*. EMBO J, 1996. **15**(14): p. 3651-8.
261. Wigmore, S.J., et al., *Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and -6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer*. Int J Oncol, 2002. **21**(4): p. 881-6.
262. Friess, H., et al., *Growth factors and cytokines in pancreatic carcinogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **880**: p. 110-21.
263. Talar-Wojnarowska, R., et al., *Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) gene polymorphism and IL-6 serum level in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis*. Dig Dis Sci, 2009. **54**(3): p. 683-9.
264. Ebrahimi, B., et al., *Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis*. Cancer, 2004. **101**(12): p. 2727-36.
265. Pezzilli, R., et al., *Serum interleukin-6, interleukin-8, and beta 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with serum C-reactive protein*. Dig Dis Sci, 1995. **40**(11): p. 2341-8.
266. Gulcubuk, A., et al., *Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2006. **53**(1): p. 49-54.
267. Szuster-Ciesielska, A., J. Daniluk, and M. Kandefler-Zerszen, *Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2000. **48**(4): p. 301-7.
268. Dambrauskas, Z., et al., *Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis*. World J Gastroenterol. **16**(15): p. 1845-53.

269. Jablonowska, M., et al., *Immunohistochemical localization of interleukin-6 in human pancreatitis*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008. **16**(1): p. 40-3.
270. Bhatnagar, A., J.D. Wig, and S. Majumdar, *Immunological findings in acute and chronic pancreatitis*. ANZ J Surg, 2003. **73**(1-2): p. 59-64.
271. Knupfer, H. and R. Preiss, *Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review)*. Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(2): p. 129-35.
272. Wang, Q., D. Horiatis, and J. Pinski, *Interleukin-6 inhibits the growth of prostate cancer xenografts in mice by the process of neuroendocrine differentiation*. Int J Cancer, 2004. **111**(4): p. 508-13.
273. Kobel, M., et al., *Influence of various cytokines on adhesion and migration of the colorectal adenocarcinoma cell line HRT-18*. Oncology, 2005. **68**(1): p. 33-9.
274. Asgeirsson, K.S., et al., *The effects of IL-6 on cell adhesion and e-cadherin expression in breast cancer*. Cytokine, 1998. **10**(9): p. 720-8.
275. Poppenborg, H., et al., *In vitro modulation of cisplatin resistance by cytokines*. Cytokine, 1999. **11**(9): p. 689-95.
276. Kurebayashi, J., *Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications*. Breast Cancer, 2000. **7**(2): p. 124-9.
277. Stein, B. and M.X. Yang, *Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(9): p. 4971-9.
278. Ray, P., et al., *Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor*. FEBS Lett, 1997. **409**(1): p. 79-85.
279. Strassmann, G., et al., *Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1681-4.
280. Greenberg, A.S., et al., *Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia*. Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4113-6.
281. Ozmen, B., et al., *Influence of the selective oestrogen receptor modulator (raloxifene hydrochloride) on IL-6, TNF-alpha, TGF-beta1 and bone turnover markers in the treatment of postmenopausal osteoporosis*. Eur Cytokine Netw, 2007. **18**(3): p. 148-53.
282. Northemann, W., et al., *Structure of the rat interleukin 6 gene and its expression in macrophage-derived cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(27): p. 16072-82.
283. Lee, D.Y., et al., *Quantitative analysis of interleukin-6 expression in porcine spleen cells and alveolar macrophages using real-time PCR*. Vet Res Commun, 2004. **28**(6): p. 503-13.

-
284. Kato, S., et al., *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. *Science*, 1995. **270**(5241): p. 1491-4.

9 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Struktur und Domänen der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β	11
Abbildung 2: Wege der Modulation von Genexpression durch Östrogenrezeptoren	12
Abbildung 3: Bindung unterschiedlicher Liganden an die ER-Isoforme	15
Abbildung 4: Strukturformel von Raloxifen	16
Abbildung 5: MTA1 Manual Tissue Arrayer (Beecher Instruments)	21
Abbildung 6: Orthotope Injektion von 10 ⁶ L3.6pl-Zellen in das Pankreas	26
Abbildung 7: Expression von ER β in humanem Pankreasnormalgewebe und Pankreasadenokarzinom	35
Abbildung 8: Gesamtüberleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positivem (N1) versus negativem (N0) Lymphknotenstatus in Monaten	37
Abbildung 9: Tumorfrees Überleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positivem (N1) versus negativem (N0) Lymphknotenstatus in Monaten	37
Abbildung 10: Gesamtüberleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positiver versus negativer ER β -Expression in Monaten	38
Abbildung 11: Tumorfrees Überleben von 94 Patienten mit Pankreasadenokarzinom mit positiver versus negativer ER β -Expression in Monaten	38
Abbildung 12: Überlebensdauer der ER β -positiven Patienten in Monaten (a) und mittlere Überlebensdauer von ER β -negativen und ER β -positiven Patienten (b)	40
Abbildung 13: Western Blot zur Detektion von ER α und ER β in verschiedenen Karzinomzelllinien	41
Abbildung 14: Inhibition der Proliferation durch Raloxifen in L3.6pl-Zellen unter Standardbedingungen	42

Abbildung 15: Inhibition der Proliferation durch Raloxifen in MCF-7-Zellen unter Standardbedingungen	43
Abbildung 16: Reduktion der IL-6-Sezernierung in L3.6pl-Zellen durch Raloxifen	44
Abbildung 17: Relative Proliferation von AsPC-1-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Raloxifen	46
Abbildung 18: Relative Proliferation von L3.6pl-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Raloxifen	47
Abbildung 19: Primärtumore des Pankreas der mit Raloxifen behandelten Tiere bei Versuchsende	49
Abbildung 20: Primärtumore des Pankreas der Kontrollgruppe bei Versuchsende	50
Abbildung 21: Mittleres Tumorgewicht und Tumolvolumen der Tiere aus der Kontrollgruppe und der mit Raloxifen behandelten Tiere	51
Abbildung 22: Multiple Lebermetastasen bei Kontrolltieren	52
Abbildung 23: Schwellung der Lnn. axillaris einer Maus der Kontrollgruppe	52
Abbildung 24: Infiltrierendes Pankreaskarzinom (PK) und Wundtumor (WT) einer Maus der Kontrollgruppe	53
Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67	54
Abbildung 26: Expression von ER β und ER α im Pankreaskarzinom der Maus	55
Abbildung 27: Positive CD31-Expression	56

10 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Materialien für die Zellkultur	19
Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) nach REMMELE und STEGNER 1987 (SI x PP)	22
Tabelle 3: Bewertungsindex für die Ki67-Expression	29
Tabelle 4: siRNA Primersequenzen für ER α und ER β	32
Tabelle 5: Klinische und histopathologische Parameter von 94 Patienten mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas	36
Tabelle 6: Hazard Ratio und 95-%-Konfidenzintervall (CI) der 94 Patienten mit reseziertem Pankreasadenokarzinom	39
Tabelle 7: Tumordaten aus der Kontrollgruppe (CTRL) und der Therapiegruppe (RAL)	50

11 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
1M	einmolar
5-FU	5-Fluorouracil
ABC	Avidin Biotin Complex
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AF	Aktivierungsfunktion
Akt	Proteinkinase B
AOM	Azoxymethan
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
BLAST	Basic local alignment search tool
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin-Proliferationstest
BSA	Bovines Serumalbumin
CA19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9, Tumormarker
CEA	Carcino-Embryonales Antigen, Tumormarker
CI	Confidence Interval
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTRL	Kontrolle
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DBD	DNA-binding domain
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Abkürzung	Erklärung
dsRNA	Double-stranded (doppelsträngige) RNA
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintertraacetat
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
ERCP	Endoskopische Retrograde Cholangio-Pankreatikographie
ERE	Estrogen response element (Östrogenbindungsstelle)
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
EtOH	Ethanol
FAMMM	familial atypical multiple mole melanoma-Syndrom
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
hpf	High power field
HRP	Horseradish peroxidase
i. v.	intravenös
IGF-IR	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL	Interleukin
IRS	Immunreaktiver Score
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducer and activator of transcription
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

Abkürzung	Erklärung
LBD	Ligand-binding domain
Ln./Lnn.	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB2	Labelled Streptavidin-Biotin 2
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRCP	Magnetresonanz-Cholangio-Pankreatikographie
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
mTor	mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium-Chlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NO Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
P	Phosphatgruppe
p. o.	per os
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pm	Picomol
POD	Peroxidase
PPD	Partielle Pankreatoduodenektomie

Abkürzung	Erklärung
PPPD	Pyloruserhaltende partielle Pankreatoduodenektomie
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
p-Wert	Signifikanzwert
RAL	Raloxifen
Ras	Rat sarcoma
RE	Responsive elements
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	Ribonucleic acid interference
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRE	Raloxifene Responding Element (Raloxifenbindungsstelle)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
s. c.	subcutan
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor Modulator
sIL	Soluble Interleukin
siRNA	Small interfering RNA
SP-1	Specificity Protein 1
TBS	Tris Buffered Saline
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
TMA	Tissue Microarray
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris-Cl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRS	Target retrieval solution
WF	Wachstumsfaktor

12 Verzeichnis der verwendeten Materialien

12.1 Chemikalien und Kits

Material	Hersteller
ABC-Kit Vectastain®	Vector Laboratories, Burlingame, CA
AEC Substrat Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin, D
Acrylamid 30 %	BioRad, München, D
Ammonium Peroxidsulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, D
Atropinsulfat Injektionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA
BCA Protein Assay	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
BLOCK-iT™ Complete Dicer RNAi Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
BLOCK-iT™ RNAi TOPO® Transcription Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Buprenorphin (Temgesic®)	Boehringer Mannheim, Mannheim, D
Cell Proliferation ELISA BrdU-Kit, colorimetric	Roche, Mannheim, D
Corn Oil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
DAB+ Substrate Chromogen	Dako, Hamburg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Dinatriumphosphat Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
ECL Western blotting detection reagents	Amersham, Freiburg, D
Ethylendiamintertraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Eosin	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (70 %, 96 %, 100 % mit Petrolether vergällt)	Apotheke Klinikum Innenstadt
Ethanol für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, D
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt, D
Hämalaun	Merck, Darmstadt, D
Human IL-6 ELISA-Kit, S 213/2CE	BenderMed Systems, Vienna, A
Isopropanol 70 %	Apotheke Klinikum Innenstadt
Kaliumchlorid KCl	Merck, Darmstadt, D

Material	Hersteller
Ketamin (Ketavet [®])	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, D
Kaiser's Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Lipopolysaccharide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
2-Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Neo-Clear [®] (Xylol-Ersatz)	Merck, Darmstadt, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Protease Inhibitor Cocktail-Kit	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, D
Protein Molecular Weight Marker	Sigma, München, D
Raloxifen-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
SDS 10 % (Sodiumdodezylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
SuperScript [®] III One-Step RT-PCR System with Platinum [®] Taq High Fidelity	Invitrogen GmbH, Darmstadt, D
Tetramethyldiamin (TEMED)	Invitrogen (GIBCO [®]) GmbH, Darmstadt, D
Tris-Hydrochlorid (Trizma [®] -HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Triton-X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Tris base (Trizma [®] base)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
TRS6	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D

Material	Hersteller
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Wasserstoffperoxid (30%ig), Perhydrol [®]	Merck, Darmstadt, D
Xylazinhydrochlorid (Rompun [®])	Bayer AG, Leverkusen, D

12.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Beta-Actin mouse anti human (Prim. AK)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ki-67 (ab66155, Prim. AK) Rabbit polyclonal antibody	Abcam, Cambridge, UK
CD-31 (ab28364, Prim. AK) Rabbit polyclonal antibody	Abcam, Cambridge, UK
Polyclonal goat-anti mouse, IgG-HRP (Sek. AK)	Dako, Hamburg, D
Polyclonal goat-anti rabbit, IgG-HRP (Sek. AK)	Dako, Hamburg, D
Estrogen Receptor alpha (ab39642, Prim. AK) Rabbit polyclonal antibody	Abcam, Cambridge, UK
Estrogen Receptor beta (ab3576, Prim. AK) Rabbit polyclonal antibody	Abcam, Cambridge, UK
Estrogen Receptor alpha (NCL-ER-6F11/2, Prim. AK) Mouse monoclonal antibody	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK
Estrogen Receptor beta (PU385-UP, Prim. AK) Rabbit polyclonal antibody	BioGenex Laboratories, San Ramon, CA

12.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläser	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
Mikrotiterplatteplatte 96 well	Nunc™, Roskilde, DK
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, D
PAP-Pen	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
Paraffin/Histo-Comp® Gewebeeinbettmittel	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen, D
Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran	Amersham, Freiburg, D
Probenröhrchen 1,5 ml, 2 ml	Qiagen GmbH, Hilden, D
Röntgenfolien Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg, D
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon®, Blue Max™, Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, CH

12.4 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Ausgießstation Tissue-Tek [®] Dispensing Console	Sakura, Zoeterwoude, NL
Axioskop 40	Carl Zeiss AG, München, D
Brutschrank Heracell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
ELISA-Reader (VERSAMax tunable mp-reader)	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Gefrierschrank -20 °C	Siemens, München, D
Gelgießvorrichtung	BioRad, München, D
Gelkammer	BioRad, München, D
Handpipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, D
Ikamag Ret Magnetrührer	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mikroskop	Axioskop, Zeiss, D
Mikrotom RM2255	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Mikrowelle	Siemens, München, D
Mini Trans Blotting System	BioRad, München, D
MTA1 Manual Tissue Arrayer	Beecher Instruments, Maryland, USA
Multipipette [®] plus	Eppendorf, D
pH-Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, D
Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, D
Schlittenmikrotom HN 40	Reichert Microscope Services, Depew, USA
Schüttler 3011	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Sicherheitswerkbank	HeraSafe, ThermoScientific, Langenselbold, D
Sterile Pipettenspitzen (Diamond [®]) 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson, Inc., Middleton, USA
TB1 Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, D
Tischzentrifuge	G. Kisker GbR, Steinfurt, D
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, D
Vertical electrophorese	BioRad, München, D
Vortexgerät (MS2 Minishaker)	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

Gerät	Hersteller
Waage 440-21N	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Zell-Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld, D
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, D

12.5 Puffer und Lösungen

Millipore Wasser: Elix-5 Water Purification System

(aus Leitungswasser: deionisiertes und gefiltertes Wasser, für analytische Zwecke geeignet)

10x PBS für IHC:

80 g Natriumchlorid; 2 g Kaliumchlorid; 14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat; 15 g Kaliumdihydrogenphosphat; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 7,4

Tris-Puffer:

87,5 g Natriumchlorid; 68,5 g Tris-HCl; 9 g Tris Base; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 7,5

10x TBS:

80 g Natriumchlorid; 24,2 g Tris base; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 7,6

Tris/Tween-Puffer (TBS-T):

0,1 % in 1x TBS

Lysis-Puffer:

10 ml Lysis Reagent + 1 Tabl. Protease Inhibitor Complete; 100 µl Natriumorthovanadat (Na₃VO₄)

10x Laufpuffer:

30,3 g Tris base; 144 g Glycin; 10 g SDS; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 8,3

10x Transferpuffer:

30,3 g Tris base; 144 g Glycin; 10 g SDS; 200 ml Methanol; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 8,3

Trenngelpuffer (1.5M Tris-HCl pH 8.8):

181,5 g Tris base; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 8,8

Sammelgelpuffer (1M Tris-HCl pH 6.8):

7,4 g Tris base; 148,0 g Tris-HCl; ad 1000 ml Millipore Wasser; pH 6,8

5x Laemmli-Puffer:

2 ml Tris-HCl pH 6,8; 3,2 ml Glycerol; 1,6 ml 10 % SDS; 1,6 ml Bromphenolblau;
0,8 ml β -Mercaptoethanol; 6,8 ml Millipore Wasser; Lagerung bei -20 °C

Blockierungslösung:

5 % fettfreies Trockenmilchpulver in Tris-Puffer

Trenngel (12 %):

2,6 ml H₂O dest; 2,0 ml 1.5M Tris Cl pH 8.8; 80 μ l 10 % SDS; 3,2 ml Acylamid;
80 μ l Ammoniumpersulfat; 4 μ l TEMED (ergibt 8 ml Lösung)

Sammelgel:

2,0 ml H₂O dest; 0,4 ml 1M Tris Cl pH 6.8; 30 μ l 10 % SDS; 0,52 ml Acylamid;
30 μ l Ammoniumpersulfat; 4 μ l TEMED (ergibt 3 ml Lösung)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester und Andi, dem PC-Doktor, für die immer liebevolle Unterstützung über all die Jahre hinweg und für den Glauben an mich und meine Ziele.

Herrn Dr. med. Hendrik Seeliger danke ich für die Überlassung des Themas, für seine engagierte und geduldige Betreuung und für die Unterstützung auf fachlicher und menschlicher Seite.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns, danke ich für die freundliche Aufnahme als Doktorandin und die Möglichkeit, diese Arbeit extern im Klinikum Großhadern am Lehrstuhl für Chirurgie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K.-W. Jauch durchführen zu können.

Frau Andrea Renner, meiner Mitstreiterin an vorderster Front, möchte ich herzlichst Danke sagen für die Motivation und die guten Ideen, wenn im Labor wieder mal alles schief lief.

Bei den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tumorangiogenese, insbesondere unserer AG-Leiterin Prof. Dr. med. Christiane Bruns, Dr. Dr. Peter Camaj, Dr. med. Ivan Ischenko, Dr. med. Bettina Schwarz und Dominik Qaiser bedanke ich mich für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit, ebenso bei den lieben Mädels aus den Nachbarlabors für viele tiefgründige Diskussionen und die Bereitstellung von Laborequipment und -geräten.

Mein herzlichster Dank geht ebenso an Frau Dr. med. Lydia Kriegl und Herrn Dr. med. Gerald Assmann für die Hilfe bei der pathologischen Auswertung der TMAs sowie Frau Andrea Sendelhofert, die die TMA-Färbungen am Pathologischen Institut optimiert hat.

Und zuletzt danke ich allen meinen Freunden, die mir an ruhigen Tagen Antrieb und in hektischen Zeiten neue Kraft gegeben haben, besonders Marcus, der bis zum letzten Tastendruck am PC für mich da war.