

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Sven Mahner

**Einfluss von PGE₂, dem EP1/3- Agonisten
Sulproston und dem EP3- Antagonisten
L798,106 auf Mammakarzinomzelllinien**



Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

Barbara Salzmann
aus Neunkirchen (Saar)

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Schindlbeck
PD Dr. Oliver J. Stötzer

**Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin:** Dr. med. Anna Hester

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas
Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1 Das Mammakarzinom	2
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	2
1.1.2 <i>Risikofaktoren</i>	3
1.1.3 <i>Klassifikation</i>	4
1.1.4 <i>Klinik und Diagnostik</i>	8
1.1.5 <i>Therapie</i>	9
1.1.6 <i>Prognose</i>	12
1.2 Inflammation und Tumorentstehung	13
1.3 Prostaglandine und ihre Rezeptoren bei Tumorerkrankungen	16
1.3.1 <i>Prostaglandinsynthese</i>	16
1.3.2 <i>Wirkung</i>	17
1.3.3 <i>Prostaglandin-E-Rezeptoren</i>	18
2. Fragestellung	23
3. Material, Zellkultur und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 <i>Geräte</i>	25
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	26
3.1.3 <i>Reagenzien und Medien</i>	26
3.1.4 <i>Lösungen und Puffer</i>	28
3.1.5 <i>Gebrauchsfertige Versuchssets („Kits“)</i>	29
3.1.6 <i>Stimulanzen und Antikörper</i>	30
3.1.7 <i>Zelllinien und Charakteristika</i>	31
3.1.8 <i>Software und Computerprogramme</i>	32
3.2 Methoden und Statistik	32
3.2.1 <i>Zellkulturelle Arbeiten</i>	32
3.2.1.1 <i>Voraussetzungen für zellkulturelle Arbeiten</i>	32
3.2.1.2 <i>Zellkultivierung</i>	33
3.2.1.3 <i>Kultivierung von eingefrorenen Zellen</i>	33
3.2.1.4 <i>Zellzählung</i>	34
3.2.1.5 <i>Stimulation der Mammakarzinomzellen</i>	34
3.2.2 <i>MTT-Assay</i>	35
3.2.3 <i>BrdU-ELISA-Assay</i>	36
3.2.4 <i>Western Blot</i>	38
3.2.5 <i>Scratch-Assay</i>	39
3.2.6 <i>cAMP- ELISA</i>	40
3.2.7 <i>Statistische Auswertung</i>	41

4. Ergebnisse	43
4.1 Proteinexpression von EP3 und EP1 in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien	43
4.1.1 <i>EP3-Expression in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien ohne Stimulation</i>	43
4.1.2 <i>EP3-Proteinexpression nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106</i>	44
4.1.2.1 <i>EP3-Proteinexpression von SK-BR-3-Zellen</i>	44
4.1.2.2 <i>EP3-Proteinexpression von T-47D-Zellen</i>	45
4.1.3 <i>EP1-Proteinexpression von Mammakarzinomzelllinien</i>	47
4.2 Zellviabilität von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106	47
4.2.1 <i>Viabilität von SK-BR-3-Zellen</i>	47
4.2.2 <i>Viabilität von T-47D-Zellen</i>	49
4.3 Zellproliferation von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106	50
4.3.1 <i>Proliferation von SK-BR-3-Zellen</i>	50
4.3.2 <i>Proliferation von T-47D-Zellen</i>	52
4.4 Proteinexpression von wichtigen Proteinen des EP3-Signalwegs	53
4.4.1 <i>Gi1-Protein Expression nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106</i>	53
4.4.1.1 <i>Gi1-Protein Expression in SK-BR-3-Zellen</i>	53
4.4.1.2 <i>Gi1-Protein Expression in T-47D-Zellen</i>	54
4.4.2 <i>p-ERK1/2-Expression unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106</i>	55
4.4.2.1 <i>p-ERK1/2-Expression in SK-BR-3 Zellen</i>	56
4.4.2.2 <i>p-ERK1/2-Expression in T-47D-Zellen</i>	57
4.4.3 <i>p53-Expression unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106</i>	59
4.4.3.1 <i>p53-Expression in SK-BR-3-Mammakarzinomzellen</i>	59
4.4.3.2 <i>p53-Expression in T-47D-Mammakarzinomzellen</i>	59
4.5 cAMP-Bildung von SK-BR-3-Zellen nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106	60
4.6 Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106	61
4.6.1 <i>Migrationsverhalten von SK-BR-3-Zellen</i>	62
4.6.2 <i>Migration von T-47D-Zellen</i>	64
5. Diskussion	67
5.1 <i>Expression von EP1 und EP3 in Mammakarzinomzelllinien</i>	68
5.2 <i>Wirkung von PGE₂ auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen</i>	69
5.3 <i>Wirkung des selektiven Antagonisten L798,106 auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen</i>	70
5.4 <i>Wirkung des EP1/3-Agonisten Sulproston auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen</i>	71
5.5 <i>Beeinflussung des EP3-induzierten Signalwegs durch Stimulation oder Inhibition des EP3-Rezeptors</i>	73
5.6 <i>Vergleich der zellkulturellen Daten dieser Arbeit mit immunhistochemischen Daten</i>	75
6. Zusammenfassung	77

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	II
Literaturverzeichnis	III
Publikationsliste	XII
Danksagung	XIV
Eidesstattliche Versicherung	XV

Meinen Eltern.

KAPITEL 1:
EINLEITUNG

1. Einleitung

Bereits im Jahr 1863 formulierte der berühmte Pathologe Rudolf Virchow die Hypothese, dass chronische Entzündung im Zusammenhang mit Tumorentstehung steht [3]. Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandine können in fast allen Tumorarten und auch dem Brustkrebs nachgewiesen werden [4]. Die durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) induzierte Signalkaskade scheint eine zentrale Rolle in der inflammationsvermittelten Tumorgenese zu spielen. Daher wird die Rolle der Elemente dieser Signalkaskade – die synthetisierenden Enzyme Cyclooxygenasen, deren Produkte Prostaglandine und die vermittelnden Prostaglandin-Rezeptoren – bei Tumorerkrankungen weitreichend untersucht [5].

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit ca. 69.000 Neuerkrankungen im Jahr 2016 und rund 30 % aller Krebsneuerkrankungen ist das Mammakarzinom die mit Abstand häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland. Etwa jede achte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 65 und 69 Jahren. Jedoch sind ca. 30 % der Patientinnen bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre [6].

Ebenso wie in Deutschland zählt das Mammakarzinom auch weltweit zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorerkrankungen (s. Abb.1). Mit 2,089 Millionen Neudiagnosen im Jahr 2018 steht es knapp hinter dem Lungenkrebs mit 2,094 Millionen Fällen an zweiter Stelle und stellt die häufigste tumorassoziierte Todesursache dar [7].

Während die Mortalitätsraten über die letzten Jahre zurückgegangen sind, ist die Neuerkrankungsrate in den letzten 10 Jahren fast stetig gestiegen [8].

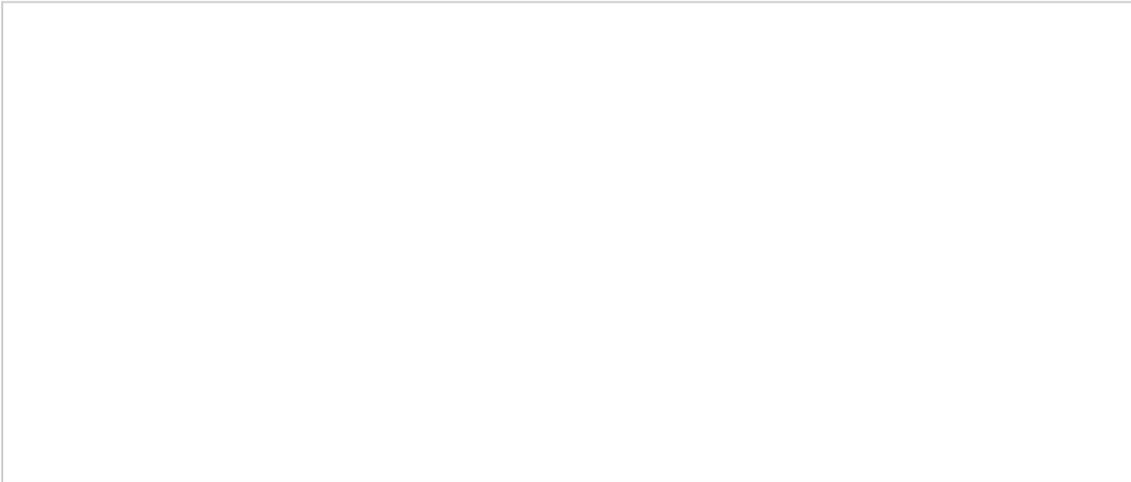


Abbildung 1: Inzidenz der häufigsten Krebsarten unter Frauen weltweit im Jahre 2018 [7] (Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 401); (aus urheberrechtlichen Gründen nicht dargestellt)

1.1.2 Risikofaktoren

Es sind verschiedene Risikofaktoren bekannt, die die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen können. Hierbei unterscheidet man zwischen prä- und postmenopausalen sowie beeinflussbaren und unbeeinflussbaren Risikofaktoren.

Zu den unbeeinflussbaren Risikofaktoren gehört beispielsweise das hereditäre Brustkrebsrisiko. Etwa 5 % aller Brustkrebs-Neudiagnosen sind erblich bedingt. Hierbei spielen Mutationen in den Genen BRCA1 (Breast Cancer 1) und BRCA2 (Breast Cancer 2) die größte Rolle [9]. Bei etwa 20 % aller triple-negativen Mammakarzinome (TNBC) findet sich eine BRCA1/2-Mutation [10]. Das Risiko, bei Vorhandensein einer BRCA1-Mutation im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken, liegt bei circa 65 % und für BRCA2-Mutationsträgerinnen bei 45 % [11]. Der wohl größte unbeeinflussbare Risikofaktor ist jedoch das Alter. Im Jahr 2014 lag das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen in Deutschland bei 64 Jahren. Das relative Risiko, an Brustkrebs zu erkranken ist in der Gruppe der 75-79-jährigen um ein circa dreifaches höher als in der Gruppe der 30-34-jährigen Frauen [12].

Eine weitere große Rolle spielt der hormonelle Status einer Frau: Die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva führt zu einer Risikoerhöhung [13]. Außerdem korreliert ein langer hormonell aktiver Zeitraum mit früher Menarche und später

Menopause mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko [14]. Bei postmenopausalen Frauen konnte gezeigt werden, dass Frauen mit erhöhten Plasma-Östrogen-Spiegeln ein höheres relatives Brustkrebsrisiko haben [15].

Auch die Beschaffenheit des Brustdrüsengewebes spielt eine wichtige Rolle. Frauen mit einer sehr hohen Brustdichte zeigen ein knapp 5-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zu Frauen mit einer sehr geringen Brustdichte [16]. Ein junges Alter bei der ersten Schwangerschaft scheint dagegen einen protektiven Effekt in Bezug auf die Entstehung eines Mammakarzinoms zu besitzen [17]; ebenso wie die Anzahl der Schwangerschaften. Das Brustkrebsrisiko verringert sich mit jeder Geburt um 7 %. Im Zusammenhang damit wurde auch untersucht, wie sich Stillen auf das Brustkrebsrisiko auswirkt. Jedes Jahr Stillen führte zu einer Risikoreduktion von 3-4 % [18-20].

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen beispielsweise der Nikotin- [21] und Alkoholkonsum, sowie Adipositas [22]. Frauen, die 60 g Alkohol pro Tag oder mehr trinken, besitzen ein um 31 % erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken [23].

1.1.3 Klassifikation

Verschiedene biologische Charakteristika von Mammakarzinomen wurden beschrieben. Hierzu zählen neben dem histologischen Subtyp u. a. der Differenzierungsgrad der Zellen, die Proliferationsrate, die Expression von Hormonrezeptoren sowie die Amplifikation des Human epidermal growth factor receptors-2 (HER2).

Auch beim Mammakarzinom wird zwischen Vorstufen und invasiven Karzinomen unterschieden: Wurde die Basalmembran von den Tumorzellen noch nicht durchbrochen, spricht man von einem „Carcinoma in situ“ (CIS). Wurde sie durchbrochen, spricht man von einem „invasive carcinoma“ (IC). Bezüglich des histologischen Subtyps unterscheidet man bei invasiven Mammakarzinomen zwischen duktalem und lobulärem Karzinom sowie weiteren Sonderformen. Duktales Karzinom betrifft das Milchgangsepithel und lobuläres die Milchdrüsenläppchen, wobei duktales Karzinom mit 50-80 % weitaus häufiger auftreten als die lobuläre Unterform mit ca. 5-15 %. Seit dem Jahr 2003 werden nicht anderweitig spezifizierte, invasive duktales Karzinome

als „invasive carcinoma of no special type“ (NST) bezeichnet, alle sonstigen Formen werden als non-NST zusammengefasst [24] [25].

Der Differenzierungsgrad der Zellen wird mittels des Nottingham-Scarff/Bloom/Richardson-Scores (N-SBR) beurteilt. Ausschlaggebend sind hierbei Tubulusbildung, die Pleomorphologie der Kerne und die Mitoserate. Danach ergibt sich eine Einteilung in G1-G3, wobei G1 gut differenzierte Zellen mit geringer Malignität und G3 schlecht differenzierte Zellen mit hoher Malignität beschreibt [26]. Anhand des Ki-67-Index (prozentuale Angabe) wird die Proliferationsrate der Tumorzellen beurteilt. Das Ki-67 Protein kann in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G0 Phase, also in ruhenden Zellen, nachgewiesen werden. Dadurch stellt es einen geeigneten Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion innerhalb einer Zellpopulation [27].

Mammakarzinome können Rezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) exprimieren und werden dann als „Hormonrezeptor-positiv“ (HR positiv) bezeichnet (ca. 70 % aller Mammakarzinome). Die Hormonrezeptorexpression wird immunhistochemisch bestimmt. Bei vorhandener Expression von Hormonrezeptoren kann von einem Ansprechen des Tumors auf eine antihormonelle Therapie (z.B. mit Aromataseinhibitoren, selektiven Estrogenrezeptormodulatoren) ausgegangen werden. Zudem zeigen 20-30 % der Mammakarzinome eine Überexpression von HER2. Der HER2neu-Rezeptor ist ein transmembranärer Tyrosinkinase-Rezeptor, der Einfluss auf Zellwachstum und Zelldifferenzierung hat. Er stimuliert die Zellproliferation über den RAS-MAP-Kinase Weg und hemmt die Apoptose über den mTOR Signalweg. Daher ist eine HER2-Amplifikation mit vermehrter Metastasenbildung und schlechter Prognose assoziiert. Obwohl HER2 auch in anderen malignen Tumoren gefunden werden kann, ist eine Genamplifikation selten. Im Falle einer uneindeutigen Immunhistochemie wird die HER2-Expression mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) bestimmt [28]. Bei 20-30 % der invasiven Mammakarzinome kann eine HER2-Überexpression detektiert werden [29-31].

Durch spezifische HER2- Antikörper wie beispielsweise Trastuzumab steht den Patientinnen eine zielgerichtete Therapie zur Verfügung, welche zu einer deutlichen Prognoseverbesserung führt. Der Einsatz wird jedoch durch Resistenzentwicklung und Nebenwirkungen limitiert [32].

Basierend auf Genexpressionsanalysen konnten verschiedene biologische Subtypen festgelegt werden. Da Genexpressionsanalysen im klinischen Alltag impraktikabel sind, wird zur Bestimmung der Subtypen ein Surrogatsystem verwendet. Hierzu werden anhand der immunhistochemischen Bestimmung des Hormonrezeptorstatus, HER2-Expression und Differenzierungsgrad die biologischen Subtypen unterschieden.

Als „triple negativ“ bezeichnet man einen Tumor mit negativem ER, PR und HER2-Status. HER2-negative Tumoren mit positivem Hormonrezeptorstatus werden als luminal Karzinome bezeichnet. „Luminal A-like“ Tumore werden als HR+ mit niedriger Zellteilungsrate beschrieben. „Luminal B-like“ Tumoren sind ebenfalls Hormonrezeptor-positiv, zeichnen sich jedoch durch eine hohe Zellteilungsrate aus [33]. Im klinischen Alltag ist die Unterscheidung zwischen Luminal A-like und Luminal B-like Tumoren häufig nicht einfach. Hier können Genexpressionstests zur Unterscheidung weiterhelfen. Davon abzugrenzen sind HER2-positive Tumoren mit positivem oder negativem Hormonrezeptorstatus, die als HER2-positiv luminal-like oder HER2 positiv non-luminal-like beschrieben werden [34].

Die klinische Stadieneinteilung der Mammakarzinome erfolgt nach dem TNM-System der UICC (Union International Contre le Cancer). T beschreibt die lokoregionäre Ausbreitung des Tumors, N die Anzahl der befallenen Lymphknoten und M bezieht sich auf das Vorhandensein von Fernmetastasen (s. Tabelle 1). Basierend auf der TNM-Klassifikation werden Mammakarzinome dann in die entsprechenden UICC-Stadien eingeteilt (s. Tabelle 1).

Einleitung

Primärtumor		Regionäre Lymphknotenmetastasen		Fernmetastasen	
Tumorgröße					
Tis	in situ	N0	Keine Lymphknotenmetastasen	M0	Keine Fernmetastasen
T1	≤ 2 cm	N1	Beweglich axillär	M1	Fernmetastasen
T1mic	Mikroinvasion ≤				
T1a	0,1cm				
T1b	≤ 0,5cm				
T1c	> 0,5cm und ≤ 1cm > 1cm und ≤ 2cm				
T2	> 2-5cm	N2a	Fixiert axillär		
		N2b	A.mammaria interna, klinisch erkennbar		
T3	> 5cm	N3a	Infraklavikulär		
		N3b	Axillär und A.mammaria interna, klinisch erkennbar		
T4	Brustwand/Haut				
T4a	Brustwand				
T4b	Hautödem/Ulzeration, Satellitenknötchen				
T4c	4a und 4b				
T4d	Entzündliches Karzinom				

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Mammakarzinoms nach [35]

UICC- Stadium		TNM-Klassifikation
0		<ul style="list-style-type: none"> • Tis, N0, M0
I	IA	<ul style="list-style-type: none"> • T1(mic), N0, M0
II	IIA	<ul style="list-style-type: none"> • T0, T1 (mic), N1, M0 • T2, N0, M0
	IIB	<ul style="list-style-type: none"> • T2, N1, M0 • T3, N0, M0
III	IIIA	<ul style="list-style-type: none"> • T0, T1(mic), N2, M0 • T2, N2, M0 • T3, N1-2, M0
	IIIB	<ul style="list-style-type: none"> • T4, N0-2, M0
	IIIC	<ul style="list-style-type: none"> • Jedes T, N3, M0
IV		<ul style="list-style-type: none"> • Jedes T, jedes N, M1

Tabelle 2: Stadiengruppierung nach UICC – Stadien nach [36]

1.1.4 Klinik und Diagnostik

Die meisten Mammakarzinome zeigen erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung klinische Auffälligkeiten. Sofern sie nicht im Rahmen von

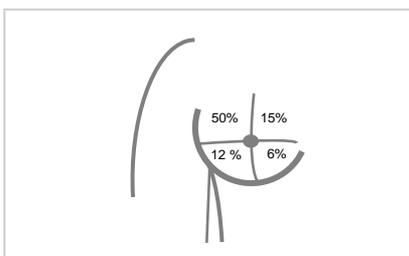


Abbildung 2: Häufigkeit der Karzinomentwicklung in den einzelnen Brustabschnitten nach Janni et al. [2], erstellt mit Microsoft Word

Vorsorgeuntersuchungen entdeckt werden, werden sie daher häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. In 70 % der Fälle stellt das erste klinische Zeichen ein tastbarer Knoten der Brust dar. 50 % aller Tumoren befinden sich im äußeren oberen Quadranten, lediglich 3 % treten multizentrisch auf (s. Abbildung 2) [2].

Weitere Untersuchungsbefunde, die auf ein Mammakarzinom hinweisen, können Schmerzen in der Brust, Veränderungen der Haut - wie Einziehungen, Peau d'orange (Apfelsinenhaut) - Mamillensekretion oder Brustverformungen sein [2, 37]. Zudem können gegebenenfalls Verhärtungen oder Vergrößerungen der axillären Lymphknoten auftreten, welche auf eine bereits erfolgte lymphogene Metastasierung hindeuten. Deshalb gehört zur

klinischen Untersuchung neben der Palpation der Brust auch die Palpation der Lymphabflussgebiete der Axilla-, Supra- und Infraklavikularregion [38].

Eine Früherkennung von Brustkrebs ist durch das 2005 etablierte, zweijährliche Mammographie-Screening für alle Frauen in Deutschland im Alter zwischen 50 und 69 Jahre möglich. Ziel ist es, die Brustkrebsdiagnose bereits in einer präklinischen Phase stellen zu können, um so Krankheitsverlauf und Prognose zu verbessern [39]. Mit einer hohen Sensitivität von rund 85-90 % können damit vor allem Tumoren in drüsenarmem, fettreichem Brustgewebe gut detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Interpretation von drüsenreichem Brustgewebe in der Mammographie teils schwierig, weshalb andere diagnostische Mittel wie die Magnetresonanztomographie oder die Mammasonographie bei klinischem Verdacht oder erhöhtem Risiko eingesetzt werden. MRT und Mammasonographie werden zum Beispiel im Rahmen der intensivierten Früherkennung bei Patientinnen mit familiärer Mammakarzinombelastung eingesetzt, ein routinemäßiges Screening aller Frauen mit diesen Maßnahmen ist nicht etabliert [2, 40]. Die Befundbeurteilung ist nach dem amerikanischen „Breast Imaging and Reporting Data System“ (BIRADS) des American College of Radiology (ACR) standardisiert. Es erfolgt eine Untergliederung der Befunde in 7 verschiedene Kategorien (BI-RADS 0-6) die eine Malignitätseinschätzung widerspiegeln. Bei suspekten (BI-RADS 4) bzw. hochgradig suspekten (BI-RADS 5) Befunden ist die Indikation zu einer histopathologischen Untersuchung gegeben [41].

Eine Studie aus dem Jahre 2012, welche die Auswirkungen europäischer Mammographiescreeningprogramme untersuchte, zeigte, dass durch die Früherkennungsuntersuchungen die brustkrebsassoziierte Mortalitätsrate in Europa um 26 % gesenkt werden konnte [42].

1.1.5 Therapie

Die Auswahl des jeweiligen Therapieschemas muss immer individuell diskutiert werden und richtet sich nach Tumorstadium und biologischen Eigenschaften des Tumors sowie nach Alter und Komorbiditäten der betroffenen Patientin.

Beim primären Mammakarzinom ohne Fernmetastasen ist die operative Entfernung in kurativer Intention essenziell. Je nach Operationstechnik und Tumorstadium ist zudem eine adjuvante Radiatio indiziert. Die zusätzliche

systemische Therapie, die adjuvant oder ggf. auch neoadjuvant appliziert wird, richtet sich vor allem nach den biologischen Eigenschaften des Tumors. Beim metastasierten Mammakarzinom spielt die Operation des Primärtumors in der Regel keine Rolle. Hier wird eine Systemtherapie basierend auf der Tumorbiologie durchgeführt [2, 43].

Das wichtigste Ziel der operativen Therapie ist die Entfernung des Tumorgewebes im Gesunden (R0-Resektion), was essenziell für ein niedriges Rezidivrisiko ist. Bei der operativen Therapie wird zwischen brusterhaltender Therapie (BET) und Mastektomie unterschieden, wobei hinsichtlich der Überlebensraten kein Unterschied zwischen einer BET mit nachfolgender Bestrahlung und einer Mastektomie besteht [44]. Weist die Patientin keine klinischen Anzeichen für einen Lymphknotenbefall auf, erfolgt intraoperativ eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie zur Erfassung des Nodalstatus. Dieser stellt einen wichtigen prognostischen Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben der Patientinnen dar. Zeigt sich kein Lymphknotenbefall, kann auf eine Axilladissektion verzichtet werden [45, 46].

Indikationen für eine brusterhaltende Therapie sind lokal begrenzte Tumoren und Tumoren mit einem guten Tumorgrößen/Brustvolumen-Verhältnis. Kontraindikationen stellen das inflammatorische Mammakarzinom oder multizentrische Tumoren dar [47].

Bei brusterhaltender Therapie schließt sich an die OP immer eine Radiotherapie an. Diese reduziert das Lokalrezidivrisiko [48]. Ist eine BET kontraindiziert oder von der Patientin nicht erwünscht, erfolgt eine Mastektomie, je nach Patientenwunsch ggf. mit anschließender Brustrekonstruktion. Eine Risikoreduktion für Rezidive durch prophylaktische Ablation der kontralateralen Brust konnte bisher für Frauen ohne hereditär erhöhtes Brustkrebsrisiko nicht nachgewiesen werden [49, 50]. An operative Therapie und Radiatio schließt sich beim primären Mammakarzinom je nach Tumorbiologie eine adjuvante Therapie bestehend aus Chemotherapie, endokriner Therapie und/oder einer „targeted therapy“ an. Beim metastasierten Mammakarzinom wird primär eine Systemtherapie – bestehend aus einem oder mehreren dieser Substanzen – durchgeführt. Besteht beim primären Mammakarzinom die Indikation zur Chemotherapie, wird diese meist schon neoadjuvant – also vor der operativen Therapie – appliziert. Dadurch kann zum einen ein irresektabler Tumor in ein resektables Stadium überführt werden. Zum anderen kann überprüft werden,

wie der Tumor auf die Chemotherapie anspricht. Dadurch können frühzeitig Aussagen über den Therapieerfolg und das biologische Verhalten des Tumors getroffen werden. Indikationen für eine neoadjuvante Chemotherapie sind zum Beispiel inflammatorische sowie primär irresektable Mammakarzinome sowie meist auch das triple-negative („triple negative breast cancer“-TNBC) und HER2-positive Mammakarzinom. Alternativ wird die Chemotherapie adjuvant appliziert. Beim metastasierten Mammakarzinom wird eine Chemotherapie bei speziellen Tumorbiologien (TNBC; HER2+ BC) sowie bei hoher therapeutischer Dringlichkeit eingesetzt. Die zielgerichtete („targeted“) Therapie ist ein moderner Ansatz der onkologischen Therapie mit dem Ziel, ausschließlich an Tumorzellen zu wirken. Die targeted Therapie richtet sich daher gegen spezifische Moleküle, die von Tumorzellen exprimiert werden. So können spezifische Signalwege gehemmt werden, welche das Gefäß- und Zellwachstum steuern [51].

Beim Mammakarzinom wird Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper, gegen das HER2-neu Protein eingesetzt. Eine adjuvante Therapie HER2-positiver Mammakarzinompatientinnen mit Trastuzumab führt zu einer signifikanten Reduktion des Mortalitätsrisikos; beim metastasierten Mammakarzinom bewirkt Trastuzumab eine Verlängerung des Gesamtüberlebens [52]. Weitere Beispiele der „targeted therapy“ beim Mammakarzinom sind Tyrosinkinasehemmer, m-TOR Inhibitoren und CDK4/6-Inhibitoren, die beim metastasierten Mammakarzinom eingesetzt werden [53].

Weisen die Brustkrebszellen einen positiven Östrogen- oder Progesteronrezeptorstatus auf, besteht die Indikation zur antihormonellen Therapie mit Tamoxifen und/oder Aromataseinhibitoren [53]. Dadurch kann die Hormonexposition reduziert und die Prognose erheblich verbessert werden. Der adjuvante Einsatz kann beim primären Mammakarzinom sowie beim metastasierten Mammakarzinom erfolgen [54].

Genauere Empfehlungen zu den Therapieoptionen werden regelmäßig im Rahmen der internationalen St. Gallener Brustkrebskonferenzen formuliert [33].

1.1.6 Prognose

Bezüglich der Prognose des Mammakarzinoms ist zu berücksichtigen, dass diese je nach TNM-Stadium, Tumorbiologie, Alter und Vorerkrankungen der Patientin individuell zu beurteilen ist.

In Deutschland ist die Prognose des Mammakarzinoms mit einer 10-Jahresüberlebensrate (JÜR) von 82 % im Vergleich zu anderen bösartigen Tumorerkrankungen relativ gut [55]. Lediglich das maligne Melanom der Haut (10-JÜR 95 %) und Schilddrüsentumoren (10-JÜR 92 %) weisen bei weiblichen Patienten eine bessere 10-Jahresüberlebensrate als das Mammakarzinom auf [55]. Die Mortalitätsrate unterscheidet sich jedoch in verschiedenen Regionen aufgrund der besseren Therapiemöglichkeiten in besser entwickelten Ländern [56]. In Deutschland sind im Jahr 2016 rund 19.000 Frauen am Mammakarzinom verstorben. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 88 % [55]. Im Vergleich dazu lag die 5-Jahres-Überlebensrate in Ländern wie Thailand und Indien beispielsweise bei nur 69 bzw. 66 % [57].

Die Sterblichkeit hat sich seit dem Jahre 1999 unterschiedlich entwickelt. Während die Inzidenz in allen Altersgruppen gestiegen ist, hat sich die Mortalität in den Altersgruppen der unter 50-Jährigen und den 50-69-Jährigen um jeweils ein Drittel bzw. ein Viertel reduziert. Bei den über 70-Jährigen dagegen hat sie sich kaum verändert. Nach wie vor stellt das Mammakarzinom nach den Herz-Kreislaufkrankungen und der nicht näher bezeichneten Demenz die dritthäufigste Todesursache bei Frauen dar [58].

Ist eine Frau an Brustkrebs erkrankt, besteht ein lebenslanges Risiko Fernmetastasen zu entwickeln. Bei 10-15 % der sekundär metastasierten Mammakarzinome treten die Fernmetastasen in den ersten 3 Jahren nach Erstdiagnose auf [59]. Hauptmanifestationsorte sind Knochen (47-60 %), Leber (19-20 %), Lunge (16-34 %) und Gehirn (10-16 %) [60]. Beim metastasierten Mammakarzinom besteht keine kurative Therapieoption; mit den neuen therapeutischen Substanzen ist jedoch eine Überlebensverlängerung möglich. Das mittlere Überleben beträgt je nach Tumoreigenschaften und Metastasierungslokalisation circa 2-3 Jahre [61].

1.2 Inflammation und Tumorentstehung

Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren (wie z.B. Prostaglandine) können bei fast allen Tumorentitäten nachgewiesen werden [4]. Circa 15-20 % aller malignen Tumore scheinen auf Grundlage von Infektionen oder Entzündungen zu entstehen: Hepatitis B ist ein nachgewiesener Risikofaktor für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms, eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus ist die Ursache für den Hauptanteil der Zervixkarzinome [62]. Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben ein bis zu zehnfach erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken [63]. Auch in der Entstehung anderer Tumorarten, wie z.B. Ösophagus- und Brustkrebs, scheint eine chronische Entzündung eine entscheidende Rolle zu spielen [64]. Die tumor-assoziierte Entzündung kann zur Tumorzellproliferation, -migration und Metastasierung beitragen (s. Abbildung 3).

Beim Mammakarzinom kann eine tumor-assoziierte Entzündungsreaktion durch Aktivierung zweier verschiedener Signalwege verursacht werden. Man unterscheidet einen intrinsischen von einem extrinsischen Signalweg. Im Gegensatz zum extrinsischen Signalweg sind beim intrinsischen Weg keine exogenen Trigger wie Entzündungen oder Infektionen, sondern genetische Ereignisse wie Mutationen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen Auslöser für die Aktivierung der Signalkaskade [4]. Der Mechanismus der tumorassoziierten Entzündungsreaktion ist in Abbildung 3 zusammengefasst. Durch Aktivierung des extrinsischen oder intrinsischen Signalwegs werden Transkriptionsfaktoren wie der „Nuclear factor ‚kappa light chain enhancer‘ of activated B-cells“ (NF- κ B) in Tumorzellen aktiviert, welche die Produktion von Chemokinen und Zytokinen, aber auch die COX-2 vermittelte Produktion von PGE₂ induzieren. NF- κ B gilt als tumorfördernder Transkriptionsfaktor, da er u.a. die Expression von anti-apoptotischen Genen wie BCL2 induziert. Durch die Freisetzung von Zytokinen werden wiederum v.a. Leukozyten der myeloiden Reihe wie Mastzellen und Makrophagen rekrutiert. Durch die Zytokine werden zudem pro-inflammatorische Transkriptionsfaktoren auch in Entzündungs-, Stroma- und Tumorzellen aktiviert. Dadurch kommt es zu einer sich selbst verstärkenden Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Prostaglandinen,

die zu einer inflammatorischen Tumorumgebung führen, welche Zellproliferation und Zellmigration fördert [4].

Einleitung

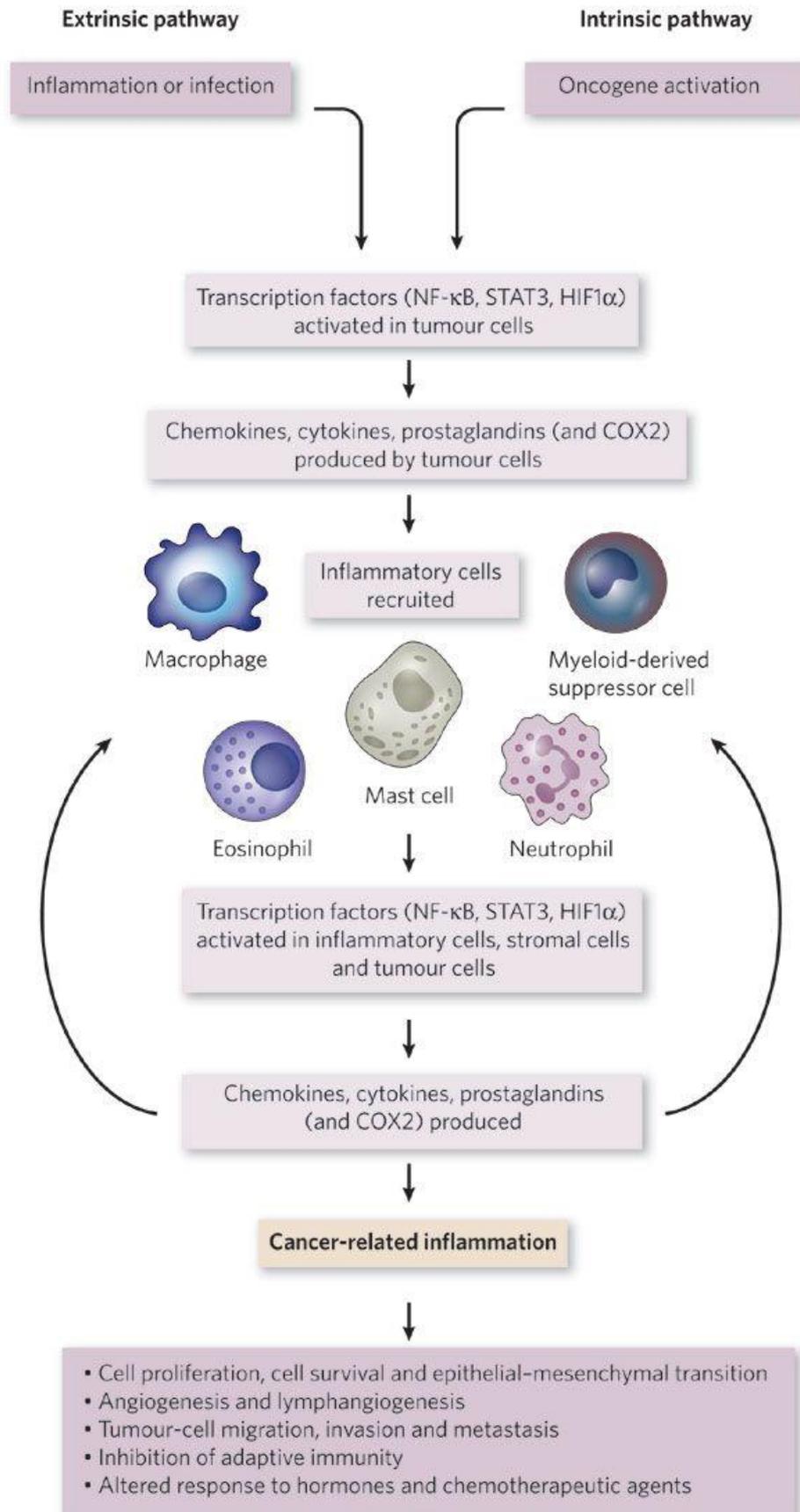


Abbildung 3: Schaubild der tumor-induzierten Inflammation von Mantovani et al. [4]; mit Genehmigung vom Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Cancer-related inflammation, Mantovani, A. et al., COPYRIGHT, 2008, Lizenznummer 5263771281238

1.3 Prostaglandine und ihre Rezeptoren bei Tumorerkrankungen

1.3.1 Prostaglandinsynthese

Prostaglandine gehören neben den Leukotrienen zur Gruppe der Eikosanoide. Diese sind Gewebshormone, die ihre Wirkung autokrin und parakrin vermitteln und unzählige physiologische und pathologische Effekte im menschlichen Körper bewirken. Ausgangsprodukt der Prostaglandinsynthese ist die ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure. Diese wird durch die Phospholipase A2 aus Membranlipiden freigesetzt. Durch Umwandlung der Arachidonsäure durch die Cyclooxygenasen 1 und 2 („COX-1“, „COX-2“) entsteht Prostaglandin H₂, welches ein Edukt verschiedener Isomerasen und Oxidoreduktasen darstellt und das Ausgangsmolekül für die Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin F₂ (PGF₂), Prostaglandin I₂ (PGI₂), Prostaglandin D₂ (PGD₂) und Thromboxan 2 ist (s. Abbildung 4) [64]. PGE₂ wird über die Prostaglandinsynthase 2, welche durch das PTGES2 Gen auf Chromosom 9 codiert wird, synthetisiert [65].

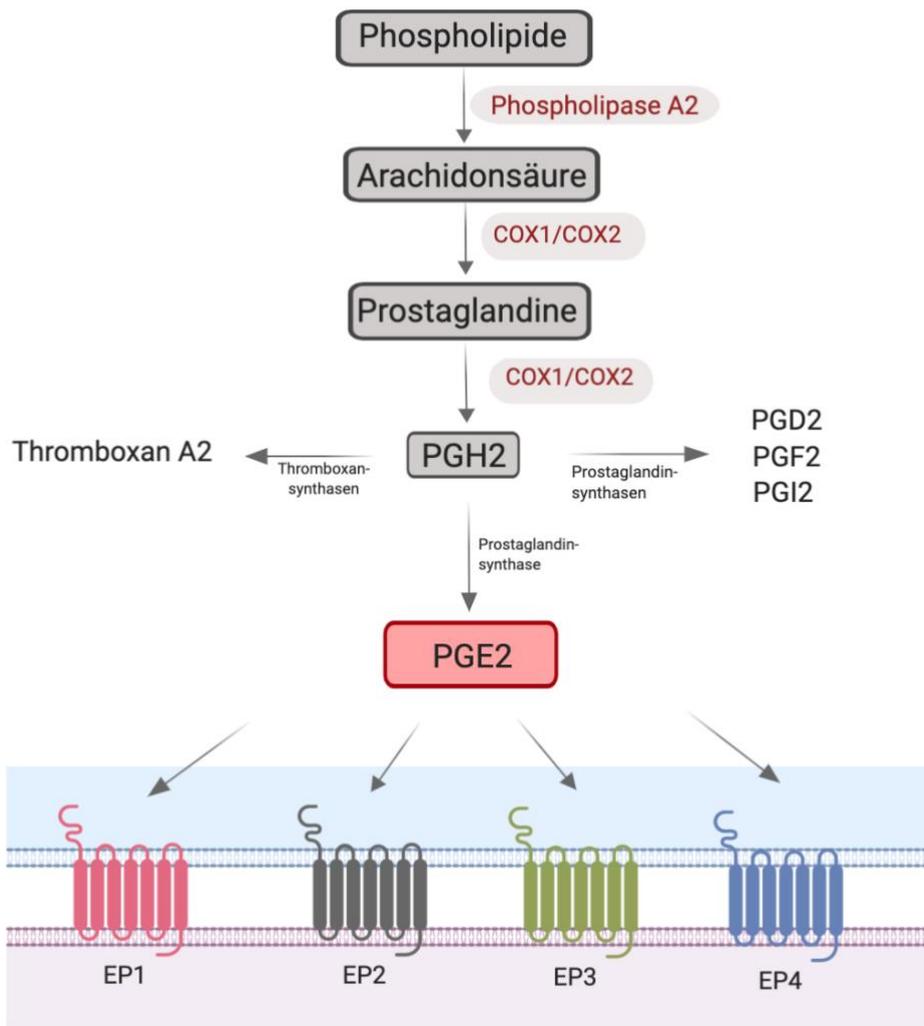


Abbildung 4: Prostaglandinsynthese vereinfacht nach [66], erstellt mit Biorender.com

1.3.2 Wirkung

Prostaglandine werden ubiquitär im menschlichen Körper gebildet [67]. Sie können nicht gespeichert werden, bilden sich aber nach Aktivierung durch Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder spezifische Zytokine neu [68]. Eines der häufigsten Prostaglandine im menschlichen Körper ist das PGE₂. PGE₂ reguliert unzählige physiologische Funktionen des Körpers. Neben Prostaglandin I₂ nimmt es eine Schlüsselrolle in Bezug auf Infekt- oder Gewebsschäden-bedingtes Inflammationsgeschehen ein [69, 70] und führt zu den klassischen Zeichen einer Entzündungsreaktion wie Schmerz, Schwellung und Rötung („rubor, tumor, dolor“). Diese entstehen durch eine gesteigerte Permeabilität und Durchblutung der entzündeten Areale [71]. So genannte

NSAIDs („non-steroidal anti-inflammatory drugs) greifen nicht-selektiv in die PGE₂-vermittelte Entzündungsreaktion ein, indem sie COX-1 und COX-2 hemmen. Coxibe hingegen hemmen selektiv COX-2. Sowohl NSAIDs als auch Coxibe wirken antiinflammatorisch. Dadurch, dass NSAIDs weniger selektiv die Prostaglandinsynthese hemmen, entstehen jedoch andere Nebenwirkungen als unter der Wirkung von Coxiben [72].

In der Niere beeinflusst PGE₂ die Durchblutung, die glomeruläre Filtrationsrate und die Reninfreisetzung [70]. In Blutgefäßen führt es zu verminderter Plättchenaggregation. Dieser Effekt scheint jedoch hauptsächlich PGI₂ vermittelt zu sein, da PGI₂ im Vergleich mit PGE₂ in Endothelzellen vermehrt synthetisiert wird. Im Unterschied zu PGI₂ kann PGE₂ jedoch je nach exprimierten Rezeptor in Gefäßen sowohl eine Vasokonstriktion als auch eine Vasodilatation bedingen. Außerdem führt PGE₂ zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, was eine Gefäßdilataion und infolgedessen die Entstehung eines Erythems begünstigt [70, 73].

In der Geburtshilfe wird Sulproston, ein synthetischer PGE₂- Abkömmling, zur Behandlung von atonischen Blutungen und zur Geburtseinleitung eingesetzt, da es zu einer Kontraktion der glatten Uterusmuskulatur führt [74].

Bezüglich des Gastrointestinaltraktes besitzt PGE₂ einen zellprotektiven Effekt. Dieser wird durch verminderte Magensäureproduktion und gesteigerte Magendurchblutung vermittelt [70].

Bei Karzinomkrankungen scheinen erhöhte PGE₂-Spiegel im Zusammenhang mit der tumorassoziierten Immunsuppression zu stehen. Bei bestimmten Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Mammakarzinom und dem Kolonkarzinom, konnten erhöhte PGE₂-Spiegel in der Tumorumgebung nachgewiesen werden [75]. Beim Kolonkarzinom konnte die Immunsuppression durch Hemmung der Prostaglandinsynthese im Mausmodell unterdrückt werden [70, 76]. Im Mammakarzinom zeigte der Einsatz von Coxiben, selektiven COX-2-Hemmern, einen signifikanten chemopräventiven Effekt [77].

1.3.3 Prostaglandin-E-Rezeptoren

PGE₂ vermittelt seine Effekte dabei über 4 verschiedene Rezeptoren: EP („E prostanoïd receptor“) 1, EP2, EP3 und EP4. Diese vermitteln ihre Wirkung über

verschiedene intrazelluläre Signalwege (vgl. Abbildung 5) und zeigen im menschlichen Körper eine spezifische Organverteilung [78]. Es handelt sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ, die jeweils aus sieben transmembranären Helices bestehen [79].

Der Rezeptor EP1 besteht aus 405 Aminosäuren [80]. Er kommt vor allem in Mastzellen sowie in verschiedenen Zelltypen von Haut, Kolon, Pulmonalvenen und Myometrium vor [78]. Unter allen EP-Rezeptoren besitzt er die niedrigste Bindungsaffinität zu PGE₂ [81]. Die Signalvermittlung erfolgt bei diesem Rezeptor wie auch bei den Prostaglandin-F- und Thromboxan-A₂-Rezeptoren über nur ein Protein [81]. Dadurch kommt es zu einer PhospholipaseC/Inositoltriphosphat-vermittelten intrazellulären Calciumerhöhung [80].

In der Tumorgenese steuert EP1 die Migration und Invasion von Tumorzellen. Eine durch PGE₂ induzierte Aktivierung von EP1 scheint außerdem bei der Anpassung von Tumorzellen an hypoxische Bedingungen eine Rolle zu spielen sowie Immunsuppression zu fördern, welche maßgeblicher Faktor einer Tumorprogression in vivo ist [82].

EP2 kommt unter anderem in Knochen und dem zentralen Nervensystem vor, EP4 in Knochen, im kardiovaskulären System und in Leukozyten. Bei beiden Rezeptoren kommt es nach Stimulation eines G_s-Proteins zu einer Steigerung des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats durch Aktivierung der Adenylcyclase/Proteinkinase A [78].

In Tumorzellen führt eine Aktivierung des EP2-Rezeptors zu einer Induktion der Angiogenese über den ‚Vascular Endothelial Growth factor‘ (VEGF) [82]. Zudem ist eine EP2- und EP4-vermittelte Suppression der Immunantwort beschrieben [83] [84].

Der EP3-Rezeptor besteht aus 366 Aminosäuren und kommt unter anderem im zentralen Nervensystem, dem kardiovaskulären System, der Niere und dem Reproduktionssystem vor. Zusammen mit dem Subtyp EP4 ist er unter allen Subtypen am häufigsten im menschlichen Körper exprimiert und zeigt die höchste Bindungsaffinität zu PGE₂ [78]. Das menschliche EP3-Gen besteht aus 10 Exons und generiert 9 messenger RNAs, aus welchen durch alternatives

Splicing bis zu 8 EP3 Isoformen hervorgehen können. Diese Isoformen unterscheiden sich nur in ihrem C-Terminus [85].

Die Signalvermittlung bei EP3 ist überwiegend an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt. Dadurch wird die Aktivität der Adenylcyclase gehemmt, die cAMP Produktion verringert und die Calciumfreisetzung gesteigert [80]. Bindet PGE₂ an EP3, kommt es durch das inhibitorische G Protein außerdem zu einer Phosphorylierung des ERK („Extracellular-signal related Kinases) - Proteins und im Folgenden zu einer Induktion des Proteins p53 [86].

Je nach Isoform bzw. C-Terminus können EP3-Rezeptoren jedoch auch an andere G-Proteine koppeln und somit verschiedene second-messenger Systeme stimulieren [87].

Neben der Inhibition der Adenylcyclase kann der EP3-Rezeptor auch zur Stimulation der Adenylcyclase und folglich erhöhten cAMP-Leveln sowie zur Erhöhung von intrazellulärem Calcium führen [82].

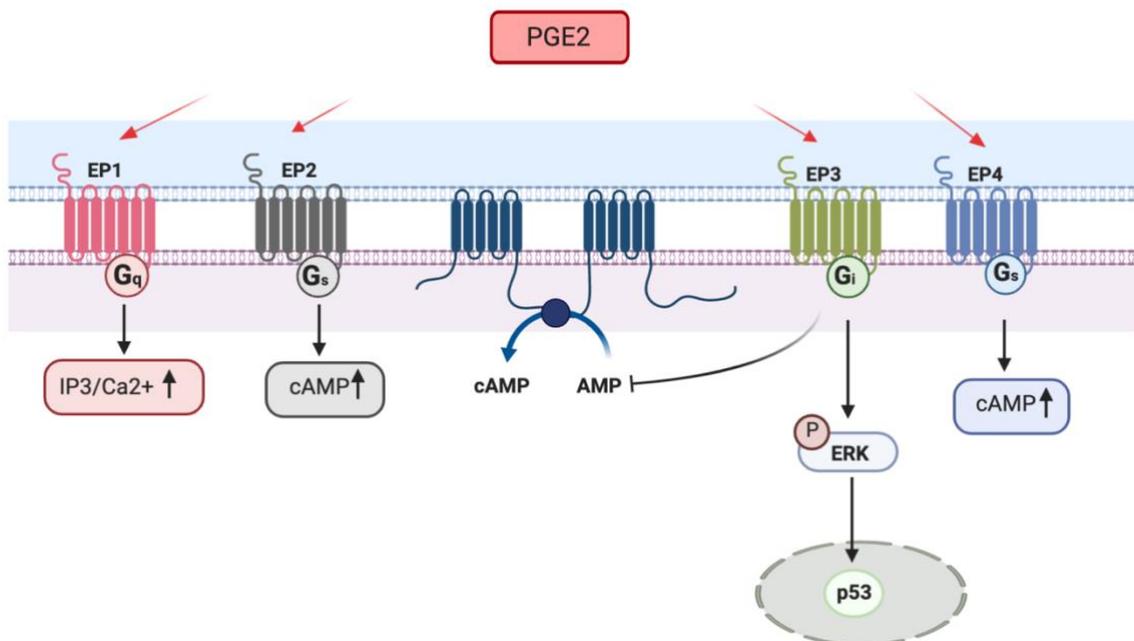


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der EP-Rezeptoren und ihrer Downstream Signalwege nach Friedman et al. [88] und [86], Abbildung erstellt mit Biorender.com

Die Rolle von EP3 bei Tumoren ist noch nicht gänzlich geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass der Rezeptor die Karzinogenese verschiedener Tumoren wie dem Kolonkarzinom [89], dem Prostatakarzinom [90] und dem Leberkarzinom zu beeinflussen scheint. Die Wirkungen auf die Tumorgenese sind jedoch

unterschiedlich. Im Leberkarzinom führt eine Aktivierung des EP3-Rezeptors zu gesteigertem Zellwachstum [91]. Im Kolonkarzinom dagegen war das Zellwachstum bei EP3-Knockout Mäusen gesteigert, was auf ein antikanzerogenes Potential des EP3-Rezeptors im Kolonkarzinom hindeutet [89].

Auch in gynäkologischen Tumoren scheint der EP3-Rezeptor über verschiedene Mechanismen unterschiedliche Effekte zu vermitteln. Im Endometriumkarzinom beispielsweise korreliert die EP3-Expression mit schlechtem Gesamtüberleben der Patientinnen [92]. In Brustkrebszellen, ebenso wie in Zervixkarzinomzellen, ist die EP3-Expression jedoch mit einem verbesserten Gesamtüberleben assoziiert und scheint dementsprechend ein positiv prognostischer Marker zu sein [93, 94].

KAPITEL 2:
FRAGESTELLUNG

2. Fragestellung

Es ist bekannt, dass Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression bei verschiedenen malignen Entitäten spielen. Sowohl COX-2 als auch eines seiner Hauptprodukte, PGE₂, werden in Mammakarzinomen vermehrt gebildet [5]. Ein chemopräventiver Effekt selektiver COX-2 Inhibitoren wurde beschrieben [95]. Die kardiovaskulären Nebenwirkungen der Coxibe schränken jedoch den Einsatz dieser Medikamentengruppe in der Chemoprävention ein [96]. Aktuelle wissenschaftliche Arbeiten zielen daher darauf ab, an anderen Stellen der PGE₂-Signalkaskade einzugreifen und so die PGE₂-vermittelten Effekte zu blockieren. Daher wird die Rolle der EP-Rezeptoren bei der Tumorgenese intensiv untersucht, um hierbei mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu evaluieren. Hierbei ist bislang beim Mammakarzinom die Rolle des EP3-Rezeptors noch am wenigsten verstanden. Neben seiner Rolle bei der Tumorgenese ist auch die möglicherweise spezifische, in Tumorzellen induzierte Signalkaskade, noch nicht bekannt.

Neuere Analysen zeigten, dass eine hohe Expression des EP3-Rezeptors mit einem verbesserten Gesamtüberleben von Mammakarzinompatientinnen assoziiert ist. Es zeigte sich ein progressionsfreies 10-Jahres Überleben von 61 % bei EP3-positiven und nur bei 43 % in EP3-negativen Fällen. Zudem zeigten sich bei EP3-positiven Fällen nach 10 Jahren weniger Lokalrezidive [93], was auf ein tumorpräventives Potential des EP3-Rezeptors hindeutet. Die biologische Grundlage dieser klinisch beobachtbaren Effekte ist jedoch bislang nicht hinreichend bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, diese biologischen Grundlagen zu untersuchen und zu analysieren, welche Rolle der EP3-Rezeptor in Mammakarzinomzellen spielt. Hierzu wurde der EP3-Rezeptor sowohl stimuliert (mit PGE₂ und dem EP1/3-Agonisten Sulproston) als auch inhibiert (mit dem selektiven EP3-Antagonisten L798,106) und essenzielle Zellfunktionen wie Proliferation, metabolische Aktivität und das Migrationsverhalten analysiert.

KAPITEL 3:
MATERIAL, ZELLKULTUR UND METHODEN

3. Material, Zellkultur und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
12-Kanal-Pipette	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Abzug Zellkultur Herasafe	Heraeus; Hanau, Deutschland
Elx800 universal Microplate Reader	BioTek; Vermont, USA
Gefrierschrank -20 °C ,Bosch Cooler‘	Robert Bosch GmbH; Gerlingen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C ,Hera Freeze‘	Thermo Electron Corporation; Massachusetts, USA
Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Kamera-Mikroskop	LEICA MC120 HD, Leica; Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank -4 °C	Liebherr; Biberach, Deutschland
Multipipette	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer 0,0025m²	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Pipetten Eppendorf Reference® 10/100/1000 µl	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipet boy“	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann; Eberstadt, Deutschland
Schüttler	IKA-Labortechnik; Staufen im Breisgau, Deutschland
Stickstofftank	Arpege, Cryopal; Bussy-Saint-George, Frankreich
Tischzentrifuge	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Vortex-Genie	VWR; Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL; Burgwedel, Deutschland

Westernblotkammer	BioRad; Kalifornien, USA
Zentrifuge 1	Hettich; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 2	Heraeus; Hanau, Deutschland

Tabelle 3: Geräte und Hersteller

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
12, 24, 48 wells Platte	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich
Eppendorf-Tube 1,5 ml; 2 ml	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Falcon Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich
Glaspipetten für Pipet-boy (1-25 ml)	Sarstedt AG; Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland
Immunblot PVDF Membran	Bio-Rad; Kalifornien, USA
Zellkulturflasche 75m²	Greiner Bio-One; Kremsmünster, Österreich
Zellschaber Cell Scraper	Sarstedt AG; Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien und Hersteller

3.1.3 Reagenzien und Medien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamidsolution (30 %)	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
APS	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland

Material, Zellkultur und Methoden

Aqua ad iniectabilia	B. Braun; Melsungen, Deutschland
BCIP/NBT Coloring Substrate	Promega; Wisconsin, USA
DMSO	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Ethanol 100 %	Apotheke Klinikum Großhadern; München, Deutschland
Fetales Kälberserum/ Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Fixdenat Lösung	Roche; Basel, Schweiz
Glycin	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
HCl	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Methanol	Apotheke Klinikum Großhadern; München, Deutschland
MgCl₂	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland
MTT [3-(4,5-dimethylthiaoly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]	Sigma-Aldrich; Missouri, USA
NaAzid	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Peq Gold Marker IV	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Polyvinylidene fluoride membrane	Bio-Rad; Kalifornien, USA
RIPA buffer (R0278-50ML)	Sigma-Aldrich; Missouri, USA
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA
Schwefelsäure (H₂SO₄) 2,5 mol/l	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich; Missouri, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Temed)	Sigma-Aldrich; Missouri, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom AG; Darmstadt, Deutschland
Tryptan Blue Solution	Sigma Life Science; Missouri, USA
Tween 20	MERCK KGaA; Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Reagenzien/ Medien und Hersteller

3.1.4 Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Inhalt
Western Blot lower gel 10 % Trenngel	3,33 ml Acrylamidsolution 2,5 ml Lower Gel buffer 4,125 ml Aqua dest 30 µl APS 15 µl Temed
Lower gel buffer	1,5 M Tris (MG 121,14) 0,4 % SDS pH 8,8
Western blot upper gel 5 % Sammelgel	0,84 ml Acrylamidsolution (30 %) 1,25 ml Upper Gel buffer 2,95 ml Aqua dest. 15 µl APS 7,5 µl Temed
Upper gel buffer	0,5 M Tris (MG 121,14) 0,4 % SDS pH 6,8

10x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris 1,93 M Glycin 1 % SDS 500 ml Aqua dest pH 8,3
Transferpuffer Stammlösung	2,28 g TRIS 10,8 g Glycin 500 ml Aqua dest. pH 8,3
Transferpuffer Gebrauchslösung	500 ml Transferpuffer 113 ml Methanol 137 ml Aqua dest.
Milchpulverlösung	4 g Milchpulver + 100 ml Neutralisationspuffer (NaAzid)
PBS Tween 0,05 %	9,55 g PBS/ 1 l Aqua dest 500 µl Tween 20

Tabelle 6: Lösungen/Puffer und Inhalt

3.1.5 Gebrauchsfertige Versuchssets („Kits“)

Bezeichnung	Hersteller
cAMP Parameter Assay Kit	R&D systems; Minneapolis, USA
Cell Proliferation Elisa, BrdU	Roche; Basel, Schweiz

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Versuchssets

3.1.6 Stimulanzen und Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Monoclonal anti beta-Actin antibody	Sigma-Aldrich; Missouri, USA	1:1000
P53 (DO-1): sc-126 antibody	Santa Cruz Biotechnology; Texas, USA	1:500
Anti p53 antibody (PAb 240) ab26	Abcam; Cambridge, England	1:1000
Anti ERK 1 (phospho Y204) + ERK2 (phospho Y187) ab47339	Abcam; Cambridge, England	1:500
Anti-Gi- protein antibody, NBP2-16558	Novus Biologicals, Colorado, USA	1:500
EP 3 antibody ab117998	Abcam; Cambridge, England	1: 2000
EP1 antibody MBS420141	MyBioSource; Kalifornien, USA	1:200
Goat anti rabbit/mouse	Jackson Immuno Research; Pennsylvania, USA	1:1000
Sulprostone (EP1+EP3 Agonist)	Tocris Bioscience; Missouri, USA	10 nM, 100 nM, 1000 nM
L798,106 (EP3 Antagonist)	Tocris Bioscience; Missouri, USA	10n M, 100 nM, 1000 nM
Prostaglandin E2 (PGE₂)	Tocris Bioscience; Missouri; USA	10 nM, 100 nM, 1000 nM

Tabelle 8: Stimulanzen/Antikörper, Hersteller und Verdünnung

3.1.7 Zelllinien und Charakteristika

Zelllinie	Gewebe	Alter des Patienten	ER/PR	HER2
SK-BR-3 (ATCC® HTB-30™)	Pleuraerguss	43 Jahre	negativ	positiv
T-47D (ATCC® HTB-133™)	Pleuraerguss	54 Jahre	positiv	negativ
MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)	Pleuraerguss	51 Jahre	negativ	negativ
MCF-7 (ATCC® HTB-22™)	Pleuraerguss	69 Jahre	positiv	negativ
CAMA-1 (ATCC® HTB-21™)	Pleuraerguss	51 Jahre	positiv	negativ

Tabelle 9: Zelllinien und dazugehörige Charakteristika, adaptiert nach [1]

Die Zelllinien wurden von der American Cell Culture Collection erworben.

T-47D (ATCC; HTB-133) ist eine epitheliale Zelllinie, die aus dem Pleuraerguss einer an einem duktalem Mammakarzinom erkrankten, 54-jährigen Frau isoliert wurde. Sie zeigt keine HER2-Amplifikation, exprimiert den Östrogenrezeptor (ER) alpha und ist demnach Östrogen sensitiv (ER alpha-positive Luminal A Zelllinie) [97].

Bei der SK-BR-3 (ATCC; HTB-30) Zelllinie handelt es sich um eine HER2-positive und ER-negative Zelllinie, die ebenfalls aus einem Pleuraerguss einer an einem malignen Adenokarzinom der Brust erkrankten kaukasischen Patientin (43 Jahre) isoliert wurde [98].

Die Zelllinie MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) stammt von einer 51-jährigen kaukasischen, an Mammakarzinom erkrankten Frau. Es handelt sich um eine triple-negative (ER negativ, PR negativ, HER2- negativ), epitheliale, adhärente Zelllinie, die ebenfalls aus einem malignen Pleuraerguss isoliert wurde [99].

3.1.8 Software und Computerprogramme

Software/Computerprogramm	Hersteller
GelScan V6.0 1D Analyse Software	SERVA, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
Image J Version 1.52	imagej.net
SPSS Statistics Version 25	IBM; New York, USA
Microsoft Excel Version 16.25	Microsoft; Washington, USA
BioRender 2020	BioRender; Toronto, Canada

Tabelle 10: Software/Computerprogramme und Hersteller

3.2 Methoden und Statistik

Die Versuche wurden in vitro mit den Mammakarzinom-Zelllinien SK-BR -3, T-47D und MDA-MB-231 durchgeführt. Die metabolische Aktivität der Zellen wurde anhand eines MTT-Assays, das Proliferationsverhalten mittels eines BrdU-ELISA-Assays, die Proteinexpression mittels Western Blot, das Migrationsverhalten mittels Scratching-Assay und die cAMP Konzentration in den Zelllysaten mittels eines ELISA-Assays ermittelt.

3.2.1 Zellkulturelle Arbeiten

3.2.1.1 Voraussetzungen für zellkulturelle Arbeiten

Um Kontaminationen zu verhindern fanden alle Zellarbeiten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank statt. Die Zellen wurden in RPMI Medium (+GlutaMax), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde (im Folgenden als „Nährmedium“ bezeichnet) in 75cm² (T75) Flaschen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank.

3.2.1.2 Zellkultivierung

Je nach Zelllinie erfolgte ein 3-7-tägiges Wechseln des Nährmediums. Dazu wurde das alte Nährmedium (12 ml) abgezogen, die Zellkulturschale mit 10 ml DPBS gespült und im Anschluss 12 ml frisches Nährmedium hinzugefügt. Um ein kontinuierliches Zelllayer zu gewährleisten wurde wöchentlich eine Zellpassagierung durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Nährmedium abgezogen und die Zellkulturschale dann mit 10 ml PBS gespült, um Nährmediums- und Zellreste zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin/EDTA bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung für 10 min inkubiert, um die Adhäsion der Zellen am Boden der Schale zu lösen. War unter dem Mikroskop sichtbar, dass sich der Zellrasen komplett von der Unterfläche gelöst hatte, wurden 8,5 ml Nährmedium hinzugefügt, um den Trypsinierungsvorgang zu stoppen. War dies nicht der Fall, wurde für weitere 10 min inkubiert, um den Zellrasen vollständig vom Gefäßboden zu lösen. Nach gründlichem Mischen der Zellen mit dem Nährmedium wurde eine Zellzählung durchgeführt und die gewünschte Zellzahl in eine neue T75 Flasche überführt, mit 12 ml Nährmedium aufgefüllt und zur erneuten Kultivierung inkubiert.

3.2.1.3 Kultivierung von eingefrorenen Zellen

Die Dauerkonservierung der Zelllinien fand bei -200°C im Stickstofftank statt. Bei Bedarf wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend mit 70-prozentigem Alkohol desinfiziert. Nach Überführung in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen mit DMEM wurde das Zellpellet abzentrifugiert und der Überstand abgezogen. Das Zellpellet wurde in Nährmedium gelöst und mittels Zellzählung die Zellkonzentration bestimmt. Je nach gewünschter Zellzahl wurde nach Zellzählung (s. unten) eine entsprechende Menge der Zellsuspension in T75 Zellkulturflaschen überführt. In jede Zellkulturflasche wurden 12 ml Nährmedium hinzugegeben. Dann erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung. Um ein gutes Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, wurde am zweiten Tag das Zellmedium erneuert.

3.2.1.4 Zellzählung

Um die Zellen zu zählen und so die Zellkonzentration der Suspension zu bestimmen, wurden jeweils 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau vermengt. Um einem Absinken der Zellen vorzubeugen, wurde die Zellsuspension vor jedem Zählvorgang gründlich gemischt. Danach wurden 20 µl des Trypanblau-Zellsuspensions-Gemischs in eine Neubauer Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop begutachtet. Lebende Zellen sind hell. Befinden sich Zellen bereits in der Apoptose, stellen diese sich durch die Trypanblau-Färbung dunkelblau dar und können dann von der Zählung ausgeschlossen werden. Es wurden jeweils alle vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Die Zellkonzentration pro ml der Zellsuspension errechnet sich wie folgt: $(\text{Zellzahl Quadrant 1} + \text{Quadrant 2} + \text{Quadrant 3} + \text{Quadrant 4}) / 4 \times 2 \times 10.000$.

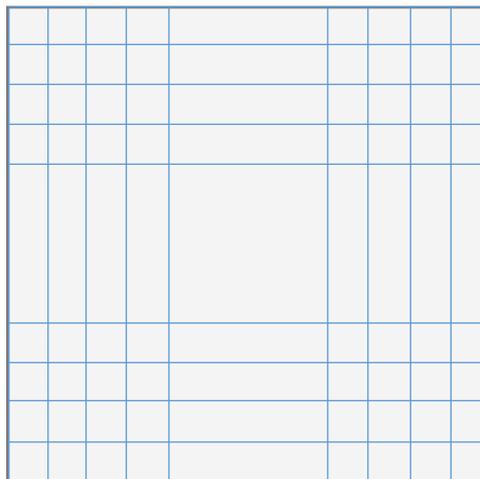


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer, erstellt mit Microsoft Word

3.2.1.5 Stimulation der Mammakarzinomzellen

Bei allen folgenden Versuchen erfolgte als Vorbereitung eine Inkubation der beiden Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3 und T-47D mit PGE₂, dem EP1/3-Agonisten Sulproston sowie dem EP3-Antagonisten L798,106 in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM sowie 1000 nM. Teils wurde auch eine Kombination aus 10, 100 bzw. 1000 nM EP1/3-Agonist Sulproston mit 10, 100 bzw. 1000 nM des EP3-Antagonisten L798,106 eingesetzt. Ein selektiver EP3-

Agonist war auf dem Markt nicht verfügbar, weshalb man sich für den EP1/3-Agonisten Sulproston entschied. Jede Stimulationsbedingung (Stimulanz/Konzentration) wurde in 3 Wells eingesetzt (s. Abbildung 7). Zur Kontrolle wurden jeweils 3 weitere Wells mit dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt. Um Volumenschwankungen durch Temperaturunterschiede zu vermeiden, wurden die randständigen Wells mit dem entsprechenden Volumen an DMSO befüllt.

Anschließend erfolgte je nach Versuch eine Inkubation der Zellen für 1-72 h bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung.

3.2.2 MTT-Assay

Das MTT-Assay dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität (Viabilität) der Zellen. MTT ist die Abkürzung für 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Durch Reduktion wandelt sich das gelbe, wasserlösliche MTT in wasserunlösliches, dunkelblaues Formazan um. Für diesen Prozess sind mitochondriale Reduktasen notwendig, weshalb man anhand der Formazanproduktion auf die mitochondriale Aktivität der Zellen und damit auf deren metabolische Aktivität schließen kann [100, 101]. Diese mitochondrialen Reduktasen sind zum größten Teil NAD(P)H abhängige Enzyme, in geringen Anteilen auch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen [102].

Zur Durchführung des MTT-Assays wurden Zellen in Platten mit Zellkulturschälchen („wells“) ausgesät. Pro Well einer 96-Well Platte wurden 5000 Zellen eingesetzt. Diese wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Danach folgte die Stimulation der Mammakarzinomzelllinien für 72 h unter den beschriebenen Bedingungen (s. Kap. 3.2.1.5).

Im Anschluss an die 72-stündige Stimulation wurden pro Well 20 µl der MTT-Lösung zu den Zellen pipettiert und diese für 5 Minuten auf dem Plattenshaker vermischt. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Die MTT-Lösung wurde anschließend abgekippt und die Platte auf Zellstoff ausgeklopft. Die entstandenen Formazankristalle wurden durch Hinzugabe von 200 µl DMSO gelöst. Nach weiteren 5 Minuten auf dem Plattenshaker wurde die Absorption bei 595 nm am ELISA-Reader (Elx800, BioTek) gemessen. Die Viabilität wird im folgenden

Ergebnisteil als relative Viabilität bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe angegeben.

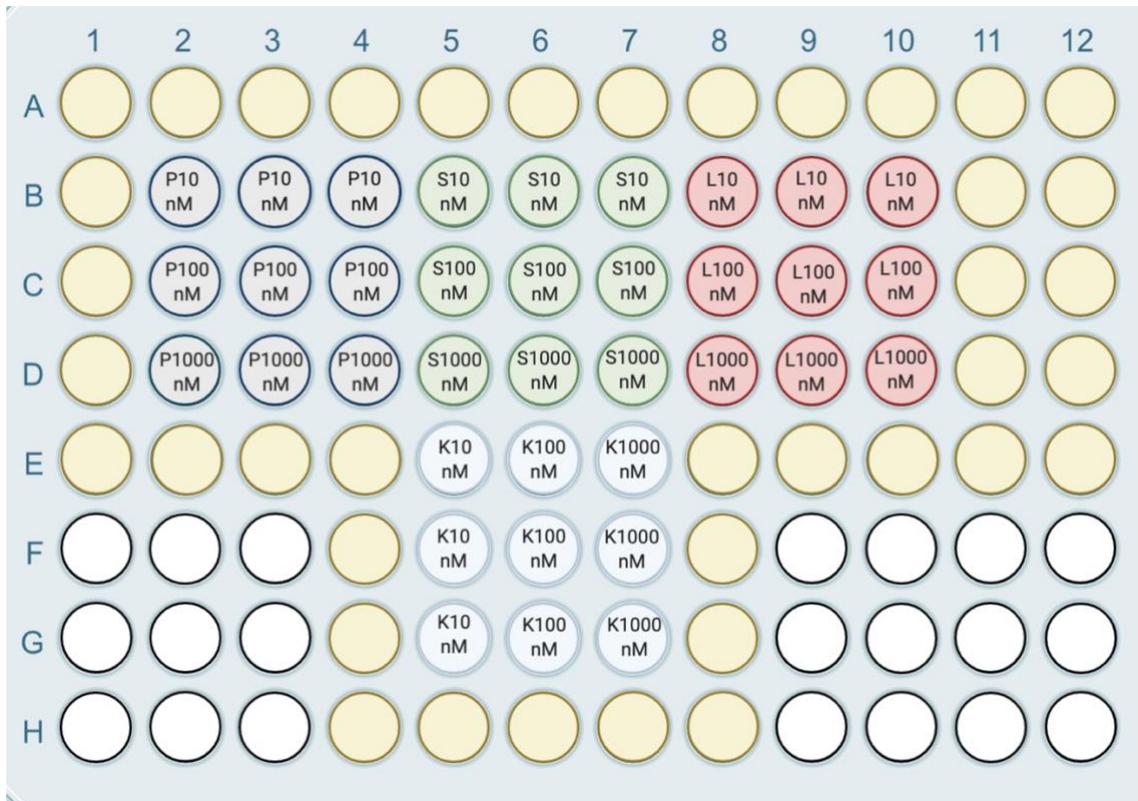


Abbildung 7: Schema MTT-Aufbau: Dargestellt ist eine 96-well Platte mit den Versuchsansätzen für den MTT-Assay (P=PGE₂, S= Sulproston, L=L798,106, K=Kontrolle), erstellt mit Biorender.com

3.2.3 BrdU–ELISA-Assay

Das BrdU-ELISA-Assay dient der Messung der Proliferationsrate der Zellen. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) ist ein Pyrimidinanalogon und fügt sich während der Zellproliferation anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA ein. Nach Fixierung der Zellen und Denaturierung der DNA kann mit Hilfe eines Mausantikörpers das eingebaute BrdU gebunden werden. Dann wird ein Anti-Maus-Antikörper hinzugegeben, um den Mausantikörper-BrdU-Komplex zu detektieren. Der Anti-Maus-Antikörper enthält eine Peroxidase, welche im folgenden Schritt mit 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin einer Substratlösung in einer Enzym-Substrat-Reaktion reagiert und für einen blauen Farbumschlag sorgt. Nach Stoppen dieser Reaktion mit 1M Schwefelsäure kommt es zu einem gelben Farbumschlag, je nach Ausmaß der Peroxidase-Reaktion in

unterschiedlicher Intensität. Die gelbe Farbintensität spiegelt sich in einer unterschiedlichen Extinktionsrate wider, die mittels eines ELISA Readers bei 450 nm und 690 nm Referenzlänge gemessen werden kann. Die Extinktionsrate ist damit proportional zur Proliferationsrate der Zellen. Im Versuch wurde das BrdU Cell Proliferation ELISA Kit der Firma Roche verwendet.

Zum Versuchsbeginn wurden jeweils 5.000 Zellen pro well in eine 96-Well-Platte in Nährmedium ausgesät. Diese wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. Neben den mit DMSO versetzten Kontrollen für jede Stimulanz wurden auch „blanks“ (Medium ohne Zellen, normale Testdurchführung) und „Background Kontrollen“ (normale Testdurchführung jedoch ohne BrdU-Zugabe) vorbereitet. Alle Ansätze erfolgten in Triplets.

Am nächsten Tag (Tag 2) erfolgte die Stimulation der Mammakarzinomzelllinien für 72 h wie in Kap. 3.2.1.5 beschrieben.

Im Anschluss an die 72-stündige Inkubation wurden 10 µl einer 1:100 mit RPMI Medium verdünnten BrdU Lösung zu den Zellen pipettiert, sodass eine Endkonzentration von 10 µM BrdU pro well vorlag. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgekippt, die Platte ausgeklopft und 200 µl Fixdenat-Lösung in jedes well pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch diesen Schritt findet in der Zelle neben der Zellfixierung auch die DNA-Denaturierung statt.

Der Peroxidase-gekoppelte monoklonale Antikörper aus Maushybridzellen wurde gemäß Protokoll für 10 min in 1,1 ml destilliertem Wasser gelöst und im Vortex gemischt. Zur Herstellung der 1:100 verdünnten BrdU-Peroxidase-Gebrauchslösung (POD-Gebrauchslösung) wurden 100 µl des vorher gelösten Antikörpers zu 10 ml der im Kit bereit gestellten Antikörper Verdünnungslösung gegeben.

Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurde der Fixdenat-Überstand abgekippt und die Platte ausgeklopft. Dann wurden pro Well 100 µl der POD-Gebrauchslösung hinzugegeben und für weitere 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die im Kit vorhandene Waschlösung (10-fach konzentriertes PBS) wurde gemäß Protokoll 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Alle Wells

wurden dreimal durch Zugabe von jeweils 300 µl der Waschlösung gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well 100 µl Tetramethylbenzidin (Substratkomponente des Kits) gegeben. Nach Entwicklung einer dunkelblauen Färbung (nach ca. 5-30 min), wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 1M Schwefelsäure pro Well abgestoppt.

3.2.4 Western Blot

Der Western-Blot wurde verwendet, um in der EP3-Signalkaskade beteiligte Proteine nachzuweisen. Die Proteine eines Proteinlysats werden zunächst elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Übertragung auf eine Membran und schließlich der Proteinnachweis mit Hilfe von spezifischen primären und sekundären Antikörpern.

Als Vorbereitung wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.1.5 beschrieben für jeweils 1 h (p-ERK1/2) bzw. 24 h (EP1, EP3, Gi, p53) mit PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 inkubiert. Die Proteinlyse erfolgte dann je nach Zellzahl mittels 100 bis 300 µl RIPA Puffer. Anschließend wurden die Zellproben 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g für 10 min wurde der Überstand abgezogen und in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Zellpellets wurden in 4-fachem Laemmli Puffer resuspendiert. Konnte der Western Blot nicht unmittelbar im Anschluss an die Herstellung der Proteinlysate durchgeführt werden, wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die Detektion der Proteine EP1, EP3, Gi, p-ERK1/2 und p53 erfolgte dann mittels Western Blot. Hierfür wurden die resuspendierten Zellpellets in die Taschen eines 10-prozentigen Polyacrylamid Gels pipettiert. Als Protein-Ladder diente der peq Gold IV Marker. Bei 70 V für 2 h erfolgte die Auftrennung der negativ geladenen Proteine anhand ihrer Größe.

Im nächsten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine bei 145 mV und 4°C über 1 h 15 min auf eine Polyvinylidene Membran transferiert (sog. ‚Blotting‘). Im Anschluss wurden die Membranen für 2 h bei Raumtemperatur in Blockmedium (5-prozentiges Milchpulver gelöst in PBS-dilutiertem Natriumazid) auf dem Schüttler geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Blocklösung wurde abgesaugt und mittels TBS/Tween auf dem

Schüttler gewaschen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Danach wurde die Waschlösung abgesaugt.

Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und mit Folienabdeckung mit dem Erstantikörper inkubiert, welcher an das gesuchte Protein bindet. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit TBS/Tween für 10 min folgte die einstündige Inkubation mit dem gegen den Erstantikörper gerichteten Sekundäantikörper. Danach wurden die Membranen erneut dreimal gewaschen (3 x 10 min in TBS/Tween). Die Membranen wurden dann mit 5-bromo-4-chloro-3-indolye phosphate/nitroblue-tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in 0.1-M Tris-HCl, 0.15-M NaCl für 10 bis 30 min (je nach Färbeintensität) angefärbt. Anschließend wurden die Blots gescannt und mittels der GelScan V6.0 1D Analyse Software (SERVA, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) je nach Dichte bzw. Intensität ausgewertet. Alle Proben wurden zunächst auf ihre Beta-Aktin Expression und im Anschluss auf die Zielprotein-Expression untersucht. Die Dichte der Zielprotein-Banden wurde auf die Beta-Aktin-Bande normalisiert. Die Dichte der stimulierten Proben wurde mit der Dichte der Kontrollproben verglichen.

Alle Western Blots wurden mindestens dreimal wiederholt.

3.2.5 Scratch-Assay

Das Scratch-Assay dient der Messung des Ausmaßes des Migrationsverhaltens von Zellen. Zellen bilden in Kultur ein Monolayer; wenn in diesem eine künstliche Wunde („Scratch“) geschaffen wird, migrieren die Zellen hinein, um die Lücke zu schließen. Je nach Ausmaß des Migrationsverhaltens ist die Lücke unterschiedlich schnell wieder verschlossen.

Auf einer 48-well-Platte wurden jeweils $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Zeigte sich am nächsten Morgen ein kompletter Monolayer (s. Abb. 4; 1), wurde im zentralen Feld jedes Wells mit einer 200 µl-Pipettenspitze ein Scratch hergestellt (s. Abb. 4; 2). Aufgrund des anfallenden Zellschrotts wurde nach jedem Scratch die Pipettenspitze gewechselt. Danach wurde das Medium abgezogen und jedes Well einmal mit 1 ml DPBS gespült. Im Anschluss wurden die Stimulanzen (Sulproston, L798,106 und PGE₂) in den Konzentrationen 100 nM und 1000 nM (wie in Kap. 3.2.1.5 beschrieben) zu den

Wells hinzugegeben. Mittels Fotomikroskop wurde der Scratch zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 48 h (s. Abb. 4; 3+4) dokumentiert. Mittels der Software ImageJ wurde quantifiziert, wie groß die „Scratch area“ zu den verschiedenen Zeitpunkten war. Im Folgenden wird das Ergebnis relativ bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe angegeben.

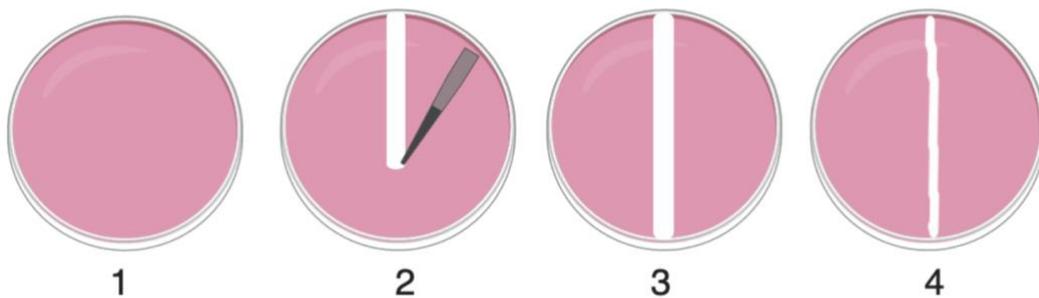


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Scratch-Assays; erstellt mit Biorender.com
1: Monolayer 2: Herstellung einer künstlichen Wunde mittels Pipettenspitze 3: Zellschicht nach 24 h 4: Zellschicht nach 48 h

3.2.6 cAMP- ELISA

CAMP-Konzentrationen in Zelllysaten von je 6×10^6 Zellen wurden mittels eines ELISA-assay kits (R&D system, KGE012B, Minneapolis, USA) bestimmt. SK-BR-3 Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.1.5 für 24 h mit PGE_2 , Sulproston bzw. L798,106 inkubiert. Der Versuch wurde entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls durchgeführt.

Beim ELISA („enzyme linked immuno-sorbent assay“) handelt es sich um ein Verfahren, mit welchem man Antigene oder Antikörper in Körperflüssigkeiten quantitativ bestimmen kann. Bei dem durchgeführten Assay handelt es sich um einen kompetitiven ELISA Test. Eine mit Streptavidin beschichtete 96 Well Platte wurde dabei mit je 50 μ l eines monoklonalen, biotinylierten Antikörper, der gegen cAMP gerichtet ist, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 400 μ l eines gepufferten Tensids, um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden jedem Well 50 μ l des cAMP-Konjugats zugegeben sowie 100 μ l des Standards (Zellysepuffer)

bzw. der Proben hinzugegeben. Als Leerkontrolle („Blank“) wurde der Test an Proben ohne enthaltene Zellen durchgeführt.

Das in der verwendeten Probe enthaltene cAMP konkurriert daraufhin mit dem Peroxidase-gekoppelten cAMP-Antikörper aus der Konjugatlösung.

Nach zweistündiger Inkubation wurde der Waschschrift wiederholt und 200 μ l Substratlösung in jedes Well pipettiert. Die Substratlösung enthält neben Wasserstoffperoxid ein Chromogen (Tetramethylbenzidine). Dadurch kommt es zu einem Peroxidase-vermittelten Farbumschlag des Chromogens (Oxidation), welcher umgekehrt proportional zur in der Probe enthaltenen cAMP Konzentration ist. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz wurde der Vorgang mittels Zugabe von 100 μ l 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption mittels des Elx800-Readers bei 450 nm gemessen. Die cAMP Konzentration in den Proben wurde unter Verwendung einer Standardkurve ermittelt und wird im Folgenden relativ bezogen auf die unstimulierte Kontrollgruppe angegeben.

3.2.7 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse und Erhebung der Daten wurden Microsoft Excel (Version 16.25) und SPSS Statistics („Statistical Package for Social Sciences“, Version 25, SPSS Inc. Headquarters, Chicago, Illinois, USA) für Mac OS X und Windows, verwendet. Die statistische Signifikanz der ordinalen, nicht-parametrischen Daten wurde für den Vergleich von 2 unabhängigen Variablen mittels Mann-Whitney-U-Tests überprüft.

P-Werte ≤ 0.05 wurden im Folgenden als signifikant (*) gewertet, p-Werte >0.05 galten als nicht signifikant.

KAPITEL 4:
ERGEBNISSE

4. Ergebnisse

Teile der Ergebnisse wurden bereits in der Publikation „EP3-receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells“ im Journal “Oncotarget and Therapies” (Hester, Salzmann et. al.) [1] veröffentlicht.

4.1 Proteinexpression von EP3 und EP1 in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien

4.1.1 EP3-Expression in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien ohne Stimulation

Eine Expression des EP3-Proteins konnte in T-47D und SK-BR-3-Zellen (jeweils n = 3) nachgewiesen werden. Normalisiert auf die jeweilige Beta-Aktin-Expression der Zelllinien betrug die mittlere EP3-Expression in T-47D Zellen 77,7 %, in SK-BR-3-Zellen 48,7 %. In MDA-MB-231-Zellen konnte keine EP3-Expression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 9a + b).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde T-47D als Beispiel für eine Zelllinie mit hoher EP3-Expression und SK-BR-3 als Zelllinie mit niedriger EP3-Expression für die folgenden funktionellen Untersuchungen ausgewählt.

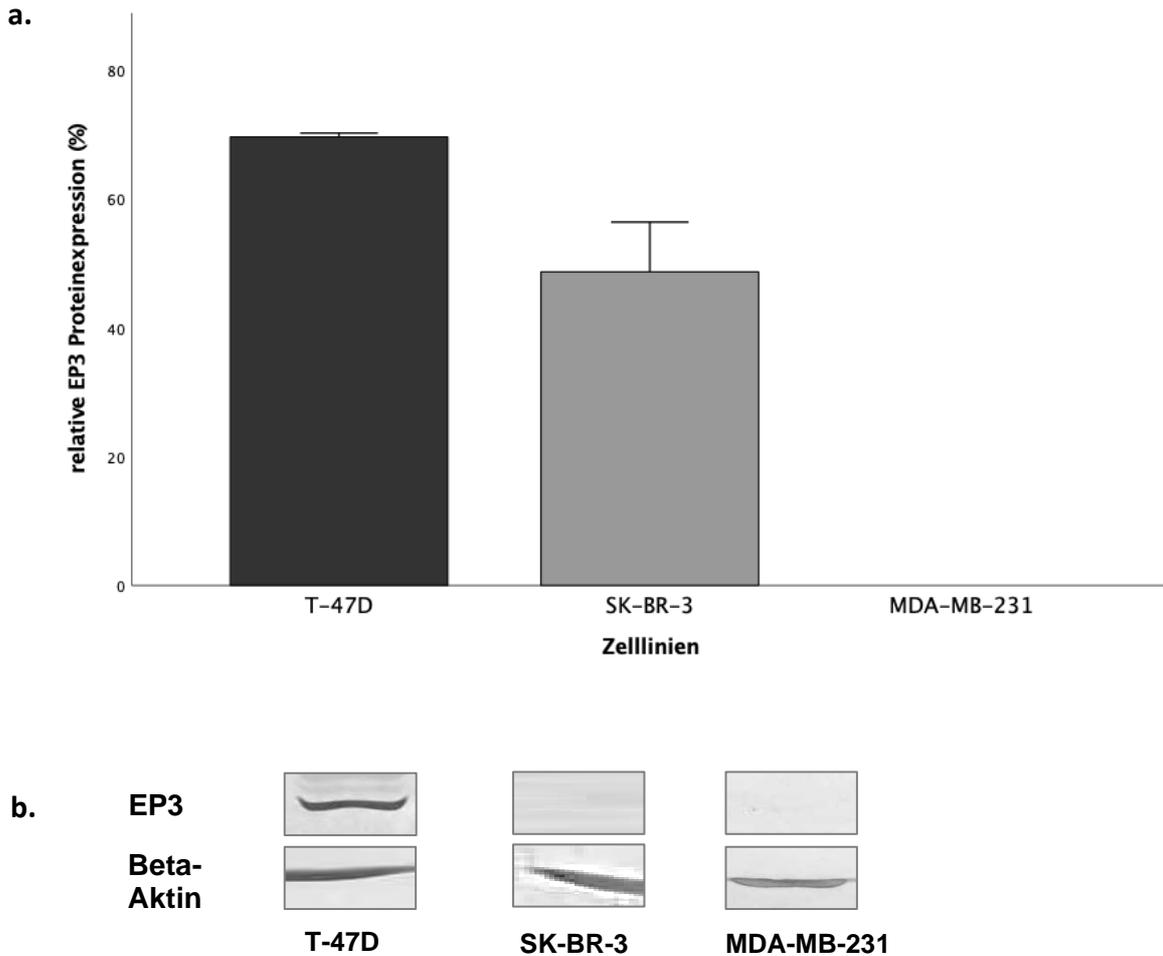


Abbildung 9: **a.** relative EP3 Expression in den Mammakarzinomzelllinien T-47D, SK-BR-3 und MDA-MB-231 ($n = 3$), normiert auf die Beta-Aktin- Expression **b.** repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin; nach [1]

4.1.2 EP3-Proteinexpression nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Um eine mögliche Beeinflussung der Expression des EP3-Rezeptors selbst durch Stimulation mit 10, 100, 1000 nM PGE₂, Sulproston und L798,106 zu detektieren, wurde die EP3-Proteinexpression unter diesen Inkubationsbedingungen mittels Western Blot untersucht.

4.1.2.1 EP3-Proteinexpression von SK-BR-3-Zellen

In SK-BR-3-Zellen bewirkten weder PGE₂ noch Sulproston eine signifikante Veränderung der EP3-Expression. Bei Stimulation mit 10 nM PGE₂ lag die EP3-

Ergebnisse

Expression bei 115 %, mit 100 nM PGE₂ bei 123 % und mit 1000 nM PGE₂ bei 96 % verglichen mit der Kontrolle (p = 0,487 für alle Bedingungen). Mit 10 nM Sulproston betrug die mittlere EP3-Expression 113 %, mit 100 nM 98 % und mit 1000 nM 95 % (p = 0,487 für alle Bedingungen). Die Inkubation mit dem selektiven Antagonisten L798,106 reduzierte die EP3-Expression signifikant: 10 nM L798,106 reduzierten sie auf 75 % (p = 0,037), 100 nM auf 73 % (p = 0,487) und 1000 nM auf 68 % (p = 0,037) (s. Abbildung 10) (n = 3).

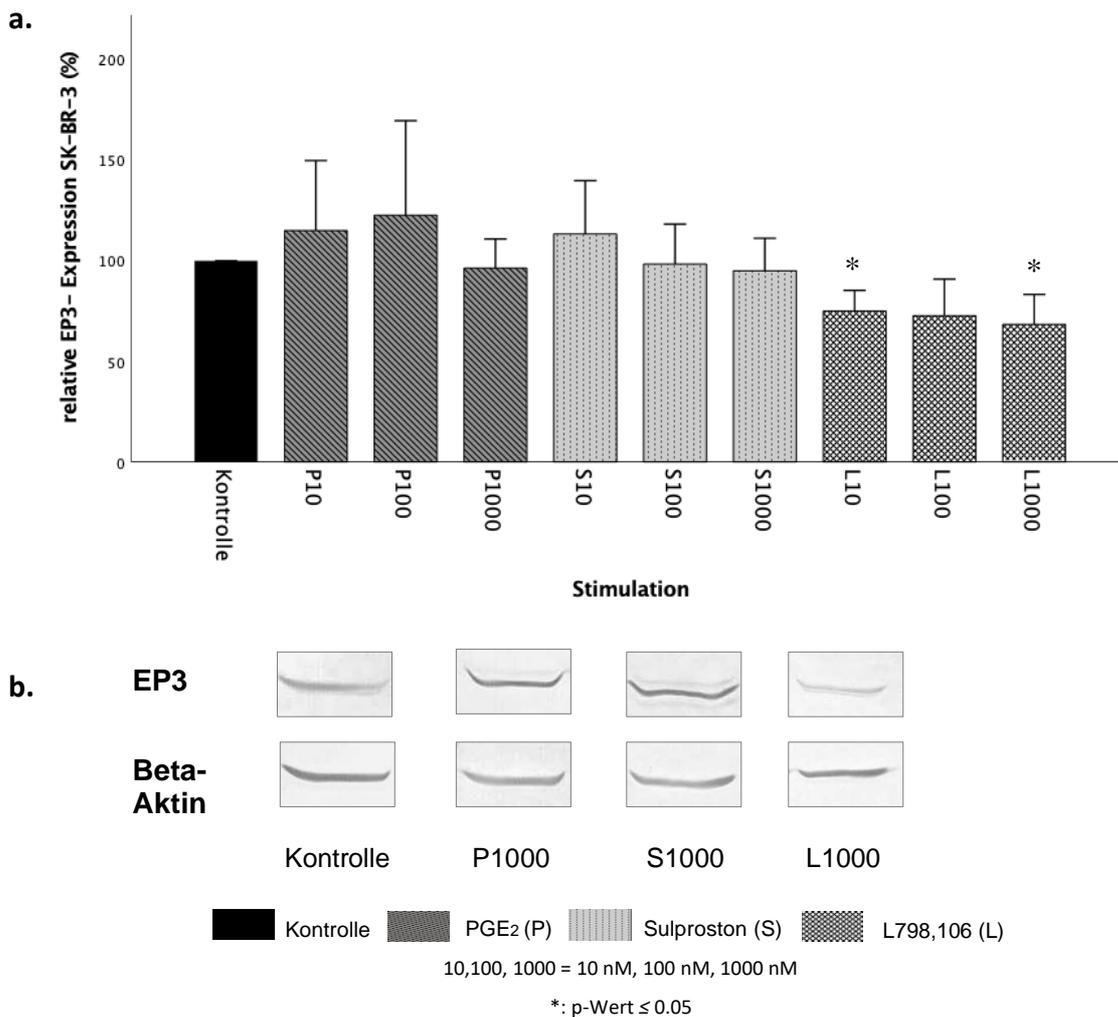


Abbildung 10: **a.** relative EP3 Expression in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 (n = 3) nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die Beta-Aktin-Expression; nach [1] **b.** repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin (n = 3)

4.1.2.2 EP3-Proteinexpression von T-47D-Zellen

In T-47D-Zellen zeigte sich unter Stimulation bzw. Antagonisierung des EP3-Rezeptors im Gegensatz zu SK-BR-3-Zellen keine signifikante Änderung der EP3-Expression (n = 3).

Ergebnisse

Stimulation mit 10 nM PGE₂ führten zu einer relativen EP3-Expression von 84 % (p = 0,53), mit 100 nM PGE₂ von 90 % (p = 0,487) und mit 1000 nM PGE₂ von 101 % (p = 0,487), jeweils verglichen mit der unstimulierten Kontrolle.

Unter Stimulation des EP3-Rezeptors mit Sulproston schwankte die EP3-Expression zwischen 97 % mit 10 nM (p = 0,487), 96 % mit 100 nM (p = 0,487) und 103 % mit 1000 nM Sulproston (p = 0,487). Wurde der EP3-Rezeptor durch L798,106 antagonisiert, stieg die EP3-Expression mit Einsatz von 10 nM L798,106 auf 122 % (p = 0,487), mit 100 nM L798,106 auf 102 % (p = 0,487) und mit 1000 nM L798,106 auf 134 % (p = 0,487) (s. Abbildung 11).

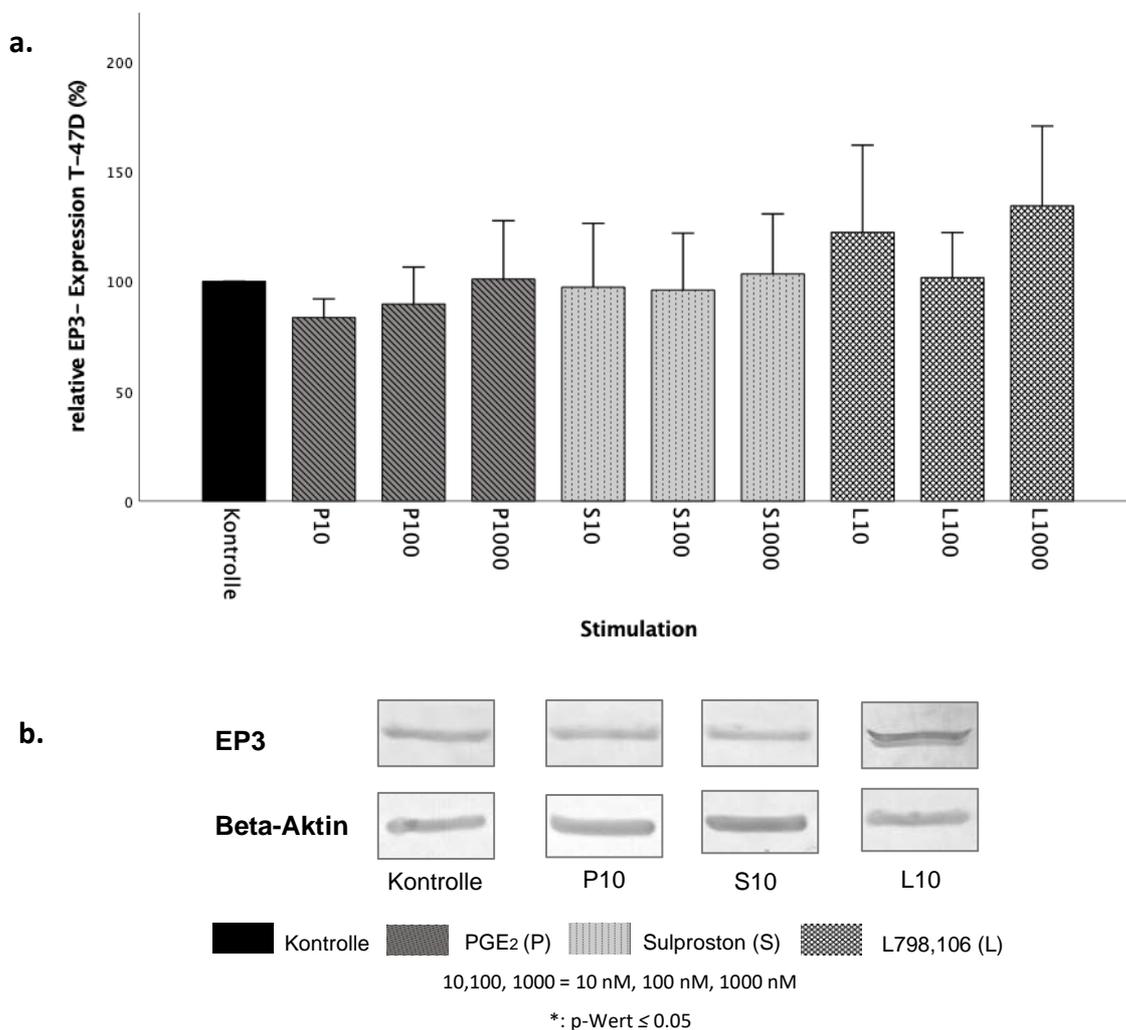


Abbildung 11: **a.** relative EP3 Expression in der Mammakarzinomzelllinie T-47D nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die b-Actin-Expression (n = 3) **b.** repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin (n = 3)

4.1.3 EP1-Proteinexpression von Mammakarzinomzelllinien

Die mittlere EP1-Expression in SK-BR-3 Zellen lag bei 132 % verglichen mit Beta-Aktin, was als Kontrolle diente. In T-47D-Zellen konnte keine EP1 Expression nachgewiesen werden.

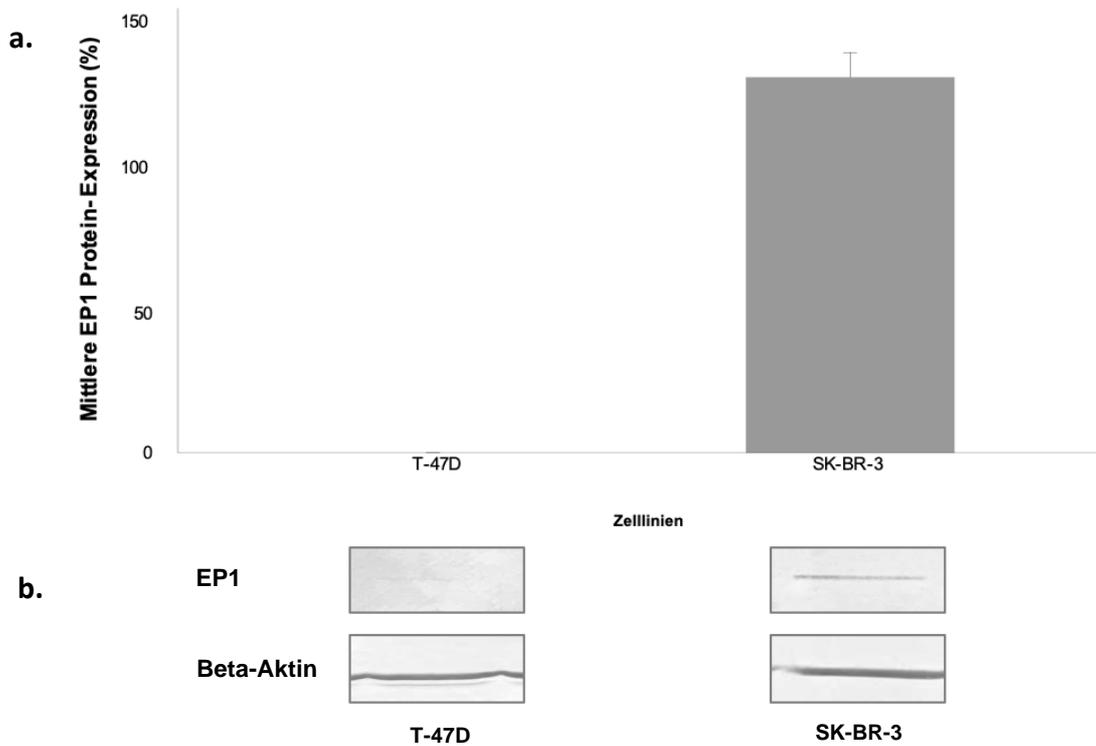


Abbildung 12: **a.** relative EP1 Expression in den Mammakarzinomzelllinien T-47D und SK-BR-3 ($n = 3$), normiert auf die Beta-Aktin- Expression **b.** repräsentative Western Blots von EP1 und Beta-Aktin; nach [1]

4.2 Zellviabilität von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Zur Messung der metabolischen Aktivität, die wie im Methodenteil beschrieben der Viabilität der Zellen entspricht, wurde ein MTT-Assay durchgeführt.

4.2.1 Viabilität von SK-BR-3-Zellen

SK-BR-3 Zellen, die mit 10, 100 oder 1000 nM PGE₂ über 72 h stimuliert wurden, zeigten eine unveränderte metabolische Aktivität im Vergleich zu

Ergebnisse

unstimulierten Kontrollzellen ($p = 0,487$ für alle Konzentrationen) ($n = 3$). Die metabolische Aktivität lag zwischen 96 % für 10 nM PGE₂, 100 % für 100 nM PGE₂ und 93 % für 1000 nM PGE₂, jeweils bezogen auf die unstimulierte Kontrolle.

Nach Stimulation mit dem EP1/3-Agonisten Sulproston zeigte sich ein Trend zu einer verminderten Viabilität. Bei SK-BR-3-Zellen, welche für 72 h mit 10 nM Sulproston stimuliert wurden, reduzierte sich die Zellviabilität dabei auf 94 % ($p = 0,0487$), bei Stimulation mit 100 nM Sulproston auf 92 % ($p = 0,121$). 1000 nM Sulproston führten zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität auf 85 % verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe ($p = 0,037$).

Nach Antagonisierung am EP3-Rezeptor durch den selektiven Antagonisten L798,106 konnte keine eindeutige Beeinflussung der metabolischen Aktivität beobachtet werden. Während 10 nM L798,106 zu einer signifikanten Zunahme der Viabilität auf 111 % führte ($p = 0,037$), reduzierten 100 nM L798,106 die Viabilität auf 90 % verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,037$). Nach Inkubation mit 1000 nM L798,106 stieg die gemessene Viabilität auf 108 % ($p = 0,487$) (s. Abbildung 13).

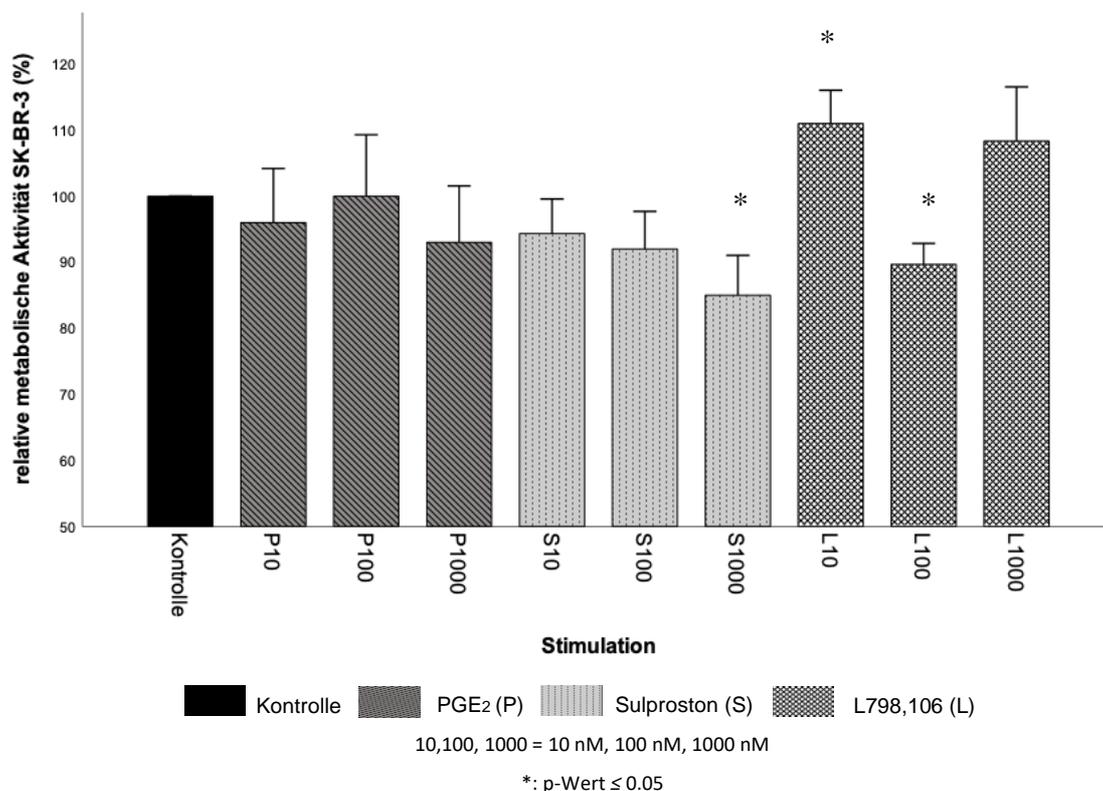


Abbildung 13: relative metabolische Aktivität von SK-BR-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston L798,106, normiert auf die Kontrolle ($n = 3$)

4.2.2 Viabilität von T-47D-Zellen

Im Gegensatz zu SK-BR-3-Zellen zeigte sich bei T-47D-Zellen ($n = 3$) durch Stimulation mit PGE_2 eine signifikante Steigerung der metabolischen Aktivität. Bei Stimulation mit 10 nM PGE_2 stieg sie auf 111 % ($p = 0,037$), bei Stimulation mit 100 nM auf 107 % ($p = 0,037$) an. Unter 1000 nM PGE_2 betrug die metabolische Aktivität 98 % ($p = 0,487$).

Nach Zugabe des EP3-Agonisten Sulproston zeigte sich wie auch bei den SK-BR-3-Zellen eine reduzierte metabolische Aktivität: unter 10 nM Sulproston betrug die metabolische Aktivität 96 % ($p = 0,487$); bei Stimulation mit 100 nM und 1000 nM Sulproston war die metabolische Aktivität signifikant auf 83 % ($p = 0,037$) bzw. 82 % ($p = 0,037$) reduziert.

Eine Antagonisierung am EP3-Rezeptor mittels L798,106 reduzierte ebenfalls die metabolische Aktivität: Eine Inkubation mit 10 nM des selektiven EP3-Antagonisten reduzierte die metabolische Aktivität der T-47D-Zellen signifikant auf 90 % ($p = 0,037$), mit 100 nM auf 94 % ($p = 0,037$) und mit 1000 nM auf 86 % ($p = 0,487$), jeweils verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe (s. Abbildung 14).

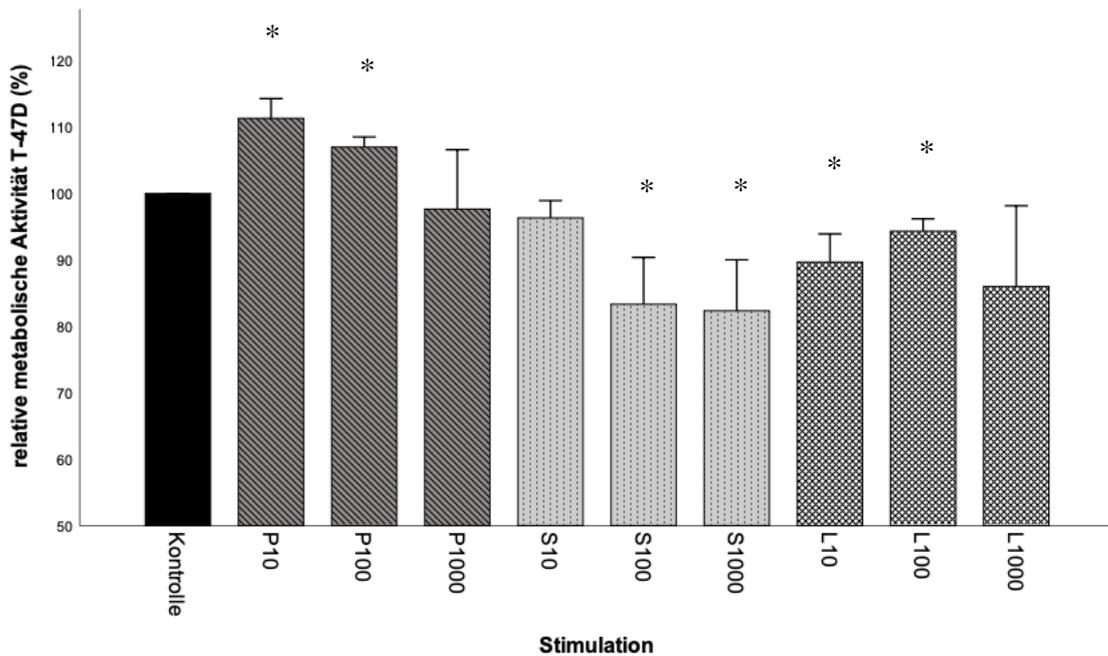


Abbildung 14: relative metabolische Aktivität von T-47D Zellen nach Inkubation mit 10, 100, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die unstimulierte Kontrolle (n = 3)

4.3 Zellproliferation von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Um die Proliferationsrate der Mammakarzinomzelllinien unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen zu analysieren, wurde ein BrdU Assay durchgeführt.

4.3.1 Proliferation von SK-BR-3-Zellen

Bei SK-BR-3-Zellen veränderte die Stimulation mit PGE₂ die Proliferationsrate im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht eindeutig (n = 3). Die Proliferationsrate betrug nach Stimulation mit 10 nM PGE₂ 100 % (p = 0,48), mit 100 nM PGE₂ 96 % (p = 0,034) und mit 1000 nM PGE₂ 99 % (p = 0,487).

Bei Stimulation mit dem EP1/3-Agonisten Sulproston war die Proliferation signifikant reduziert. 10 nM Sulproston reduzierten die Proliferationsrate von SK-BR-3 Zellen auf 90 %, 100 nM auf 88 % und 1000 nM ebenfalls auf 88 % (p = 0,037 für alle Bedingungen).

Ergebnisse

Bei Inkubation mit dem EP3-Antagonisten L798,106 verringerte sich die Proliferationsrate ebenfalls signifikant: Die Inkubation mit 10 nM L798,106 reduzierte die Proliferation auf 88 % ($p = 0,037$), mit 100 nM L798,106 auf 86 % ($p = 0,034$) und mit 1000 nM L798,106 auf 91 % ($p = 0,037$).

Da sowohl der EP1/3-Agonist Sulproston als auch der EP3-Antagonist L798,106 eine Reduktion der Proliferationsrate bewirkten, wurde in diesem Versuch zudem der Effekt der Inkubation mit einer Kombination beider Substanzen untersucht.

Eine Inkubation mit sowohl Sulproston als auch dem EP3-Antagonisten L798,106 führte ebenfalls zu einer verminderten Proliferationsrate verglichen mit der Kontrollgruppe. Jeweils 10 nM beider Substanzen führten zu einer Reduktion auf 92 % ($p = 0,037$), 100 nM auf 94 % ($p = 0,037$) und 1000 nM auf 96 % ($p = 0,053$) (s. Abbildung 15).

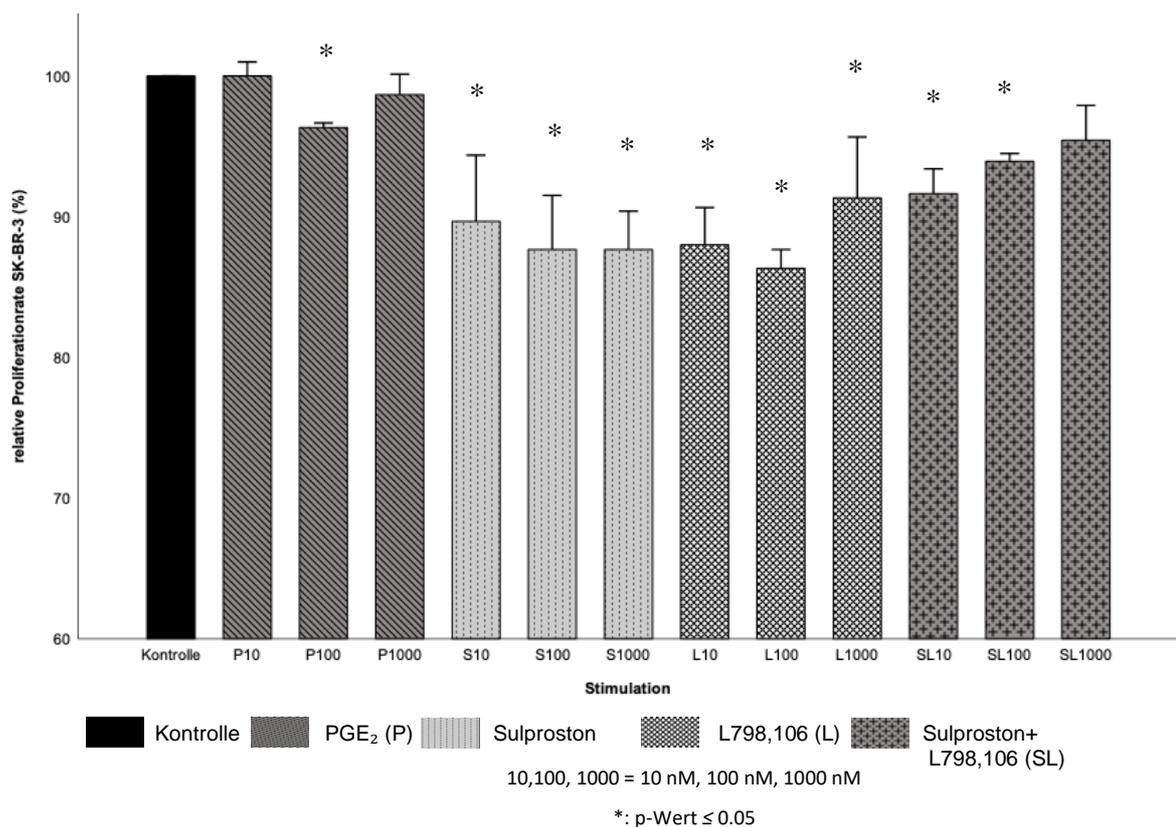


Abbildung 15: relative Proliferation von SK-BR-3-Zellen unter Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston (S), L798,106 sowie der Kombination aus Sulproston und L798,106, normiert auf die Kontrolle ($n = 3$) nach [1]

4.3.2 Proliferation von T-47D-Zellen

Die Inkubation von T-47D-Zellen mit PGE₂, Sulproston und L798,106 beeinflusste die Proliferationsrate nicht eindeutig (n = 3). Bei Zugabe von 10 nM, 100 nM oder 1000 nM PGE₂ schwankte die Proliferationsrate zwischen 99 % mit 10 nM und 1000 nM PGE₂ und 103 % mit 100 nM verglichen mit der Kontrolle

(p = 0,487 für alle Konzentrationen).

Lediglich bei Stimulation mit 1000 nM Sulproston kam es zu einer signifikanten Veränderung: Hier betrug die Proliferationsrate nach Stimulation 91 % im Vergleich mit der Kontrollgruppe (p = 0,037). Die Stimulation mit 10 nM Sulproston (100 %, p = 0,487) oder 100 nM Sulproston (101 %, p = 0,487) veränderte die Proliferationsrate nicht.

Die Inkubation mit dem Antagonisten L798,106 veränderte die Proliferation nicht signifikant: Bei Inkubation mit 10 nM L798, betrug die Proliferationsrate 103 % (p = 0,487), mit 100 nM L798,106 100 % (p = 0,487) und mit 1000 nM L798,106 94 % im Vergleich mit der Kontrolle (p = 0,487) (s. Abbildung 16).

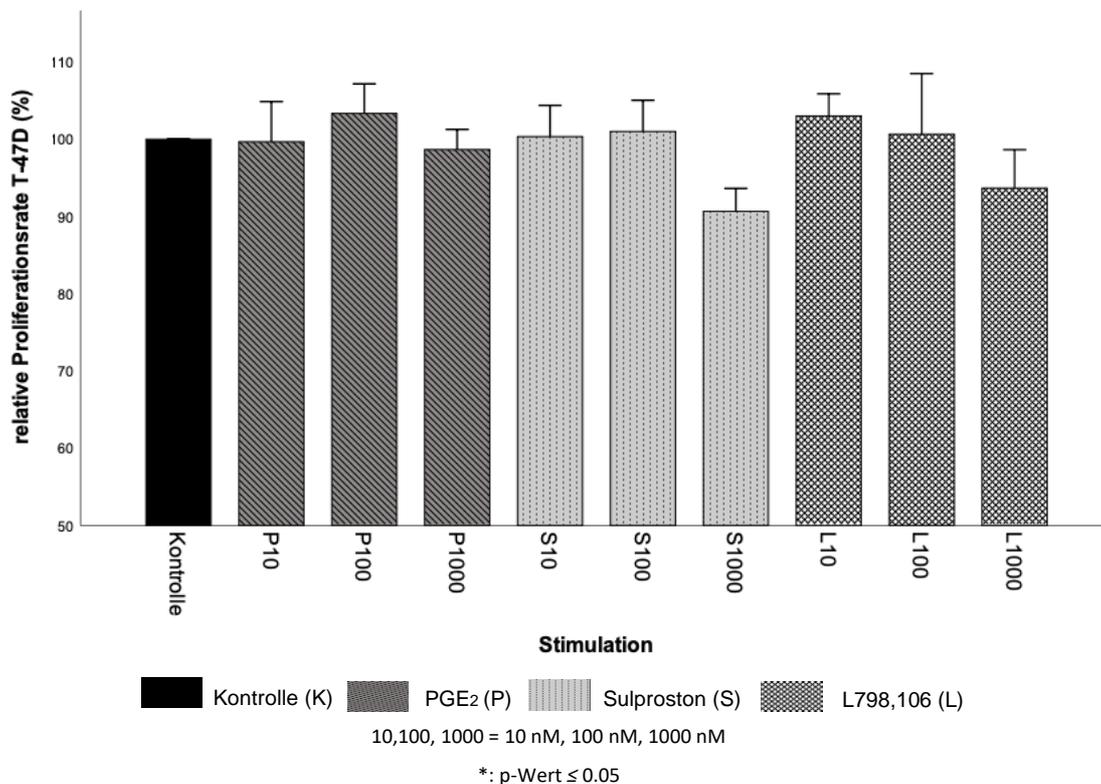


Abbildung 16: mittlere Proliferation von T-47D Zellen unter Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston (S), L798,106, normiert auf die Kontrolle (n = 3)

4.4 Proteinexpression von wichtigen Proteinen des EP3-Signalwegs

4.4.1 Gi1-Protein Expression nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Da der EP3-Rezeptor seine Signale über ein inhibitorisches G-Protein (G_{i1}-Protein) vermitteln kann, wurde zudem die Expression des G_{i1}-Proteins nach 72-stündiger Stimulation mit den o.g. Substanzen analysiert (s. Kap. 3.2.1.5).

4.4.1.1 G_{i1}-Protein Expression in SK-BR-3-Zellen

In SK-BR-3-Zellen führte eine Stimulation mit PGE₂ zu keiner signifikant veränderten Expression des G_{i1}-Proteins im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen. Jedoch konnte sowohl bei Inkubation mit dem EP1/3-Agonisten Sulproston als auch unter EP3-Antagonismus mit L798,106 eine signifikante Reduktion der G_{i1}-Protein-Expression beobachtet werden.

10 nM PGE₂ führten zu einer Expression von 124 % ($p = 0,487$), 100 nM zu 108 % und 1000 nM zu 85 % ($p = 0,487$) verglichen mit der G_{i1}-Protein-Expression in der Kontrollgruppe.

10 nM Sulproston reduzierten die Expression des G_{i1}-Proteins signifikant auf 71 % ($p = 0,037$), 100 nM auf 69 % ($p = 0,037$) und 1000 nM auf 57 % ($p = 0,037$).

Auch EP3-Antagonismus mit L798,106 reduzierte die Expression des G_{i1}-Proteins signifikant: 10 nM L798,106 reduzierte die Expression auf 70 % ($p = 0,037$), 100 nM auf 80 % ($p = 0,037$) und 1000 nM auf 77 % ($p = 0,037$) (s. Abbildung 17).

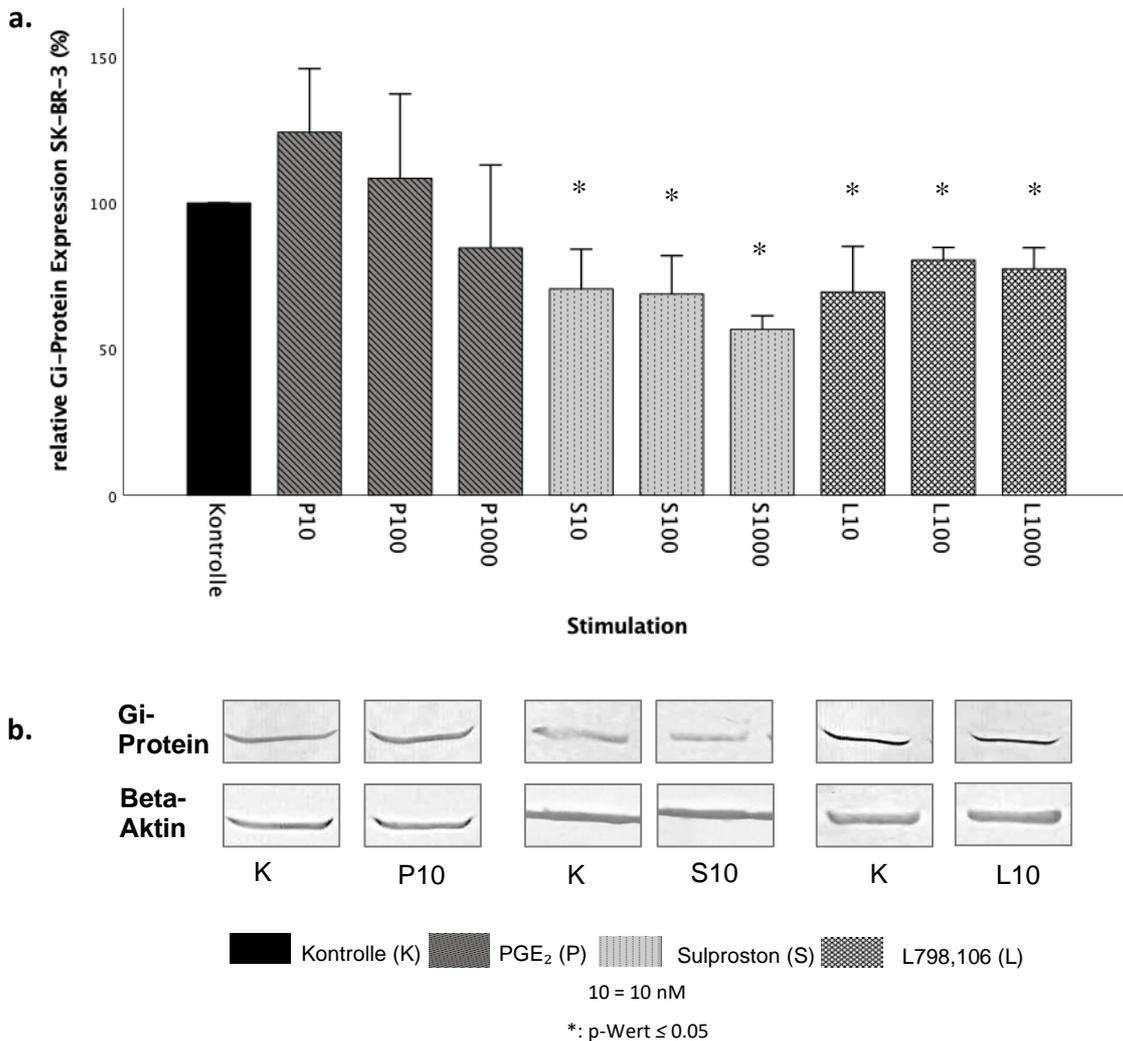


Abbildung 17: **a.** relative Gi-Protein Expression von SK-BR-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) **b.** repräsentative Western Blots (n = 3); nach [1]

4.4.1.2 Gi_{i1}-Protein Expression in T-47D-Zellen

In T-47D-Zellen führte weder Stimulation noch Antagonismus am EP3-Rezeptor zu einer signifikanten Änderung der Expression des Gi_{i1}-Proteins (n = 3).

10 nM PGE₂ führten zu einer Gi_{i1}-Protein-Expression von 124 % (p = 1,0), 100 nM zu 133 % (p = 0,037) und 1000 nM zu 124 % (p = 0,487) verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe.

10 nM Sulproston führten zu einer Gi_{i1}-Protein-Expression von 98 % (p = 0,487), 100 nM zu 96 % (p = 1,0) und 1000 nM zu 111 % (p = 0,487).

10 nM des selektiven Antagonisten L798,106 führten zu einer G_{i1} -Protein-Expression von 75 % ($p = 0,037$), ebenso wie 100 nM ($p = 0,121$). Unter 1000 nM L798,106 lag die Expression bei 151 % ($p = 0,487$) (s. Abbildung 18).

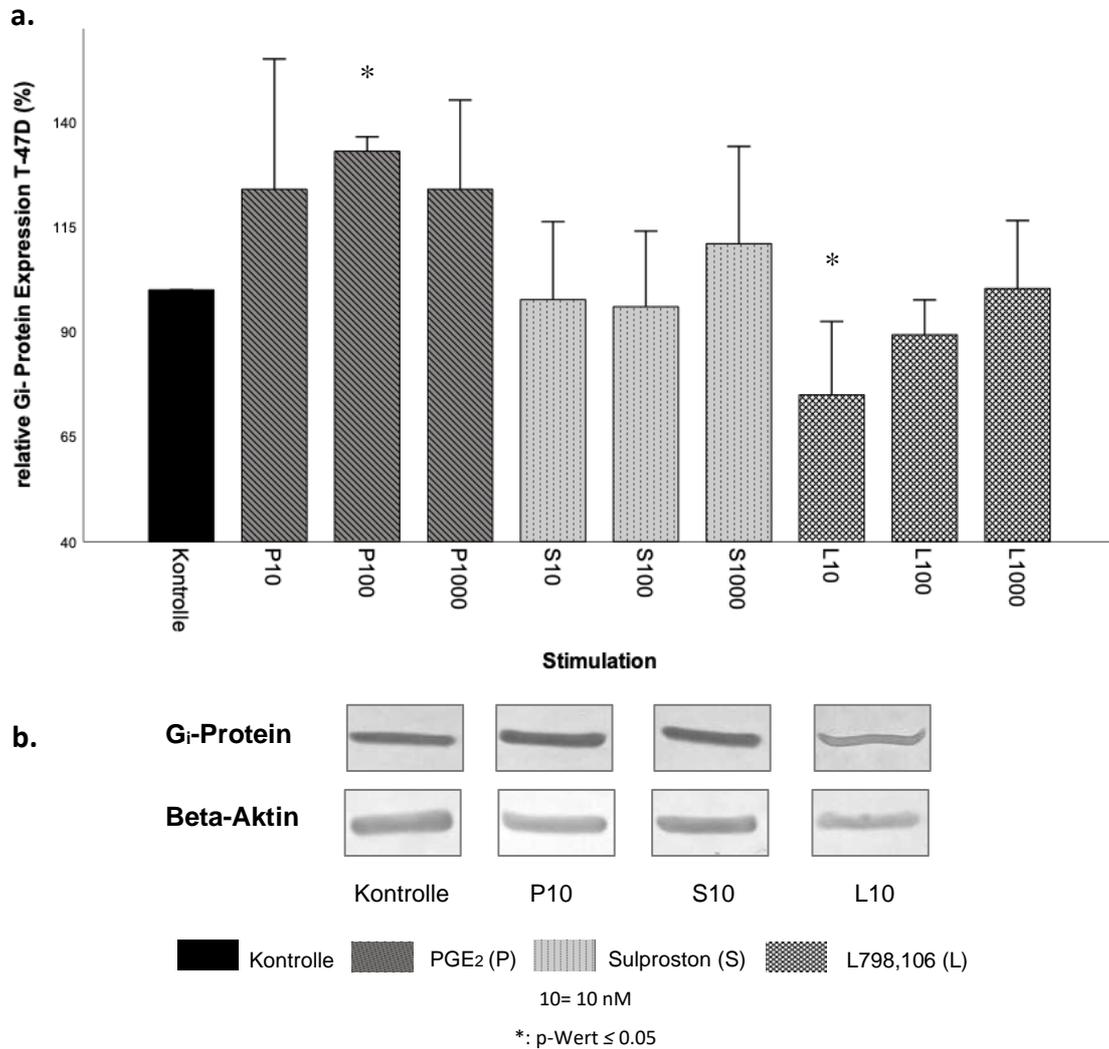


Abbildung 18: **a.** relative G_i -Protein-Expression von T-47D-Zellen nach Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 ($n = 3$) **b.** repräsentative Western Blots ($n = 3$); nach [1]

4.4.2 p-ERK1/2-Expression unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Neben der Vermittlung über das inhibitorische G-Protein ist auch eine EP3-Signalvermittlung über eine Phosphorylierung extrazellulärer Kinasen möglich (p-ERK, „phosphorylated extracellular signal-regulated kinases“), weshalb im Folgenden die Proteinlevel mit und ohne 24-stündige Inkubation mit o.g. Substanzen (s. Kap. 3.2.1.5) gemessen wurden.

4.4.2.1 p-ERK1/2-Expression in SK-BR-3 Zellen

Agonismus am EP3-Rezeptor durch PGE₂ und Sulproston beeinflusste die p-ERK1/2-Expression nicht relevant: 10 nM PGE₂ führten bei SK-BR-3-Zellen zu einer p-ERK1/2-Expression von 107 % (p = 1,0), 100 nM zu 90 % (p = 0,037) und 1000 nM zu 102 % (p = 0,487) verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe.

Mit 10 nM Sulproston lag die p-ERK-Expression bei 84 % (p = 0,487), mit 100 nM bei 102 % (p = 1,0) und mit 1000 nM bei 88 % (p = 0,487).

Unter EP3-Antagonismus mit L798,106 zeigte sich ein Trend zu gesteigerter p-ERK1/2-Expression. 10 nM des selektiven Antagonisten L798,106 führten zu einer p-ERK1/2-Expression von 130 % (p = 0,037), ebenso wie 100 nM (p = 0,121). Bei EP3-Antagonismus mit 1000 nM lag die Expression bei 151 % (p = 0,487) (s. Abbildung 19).

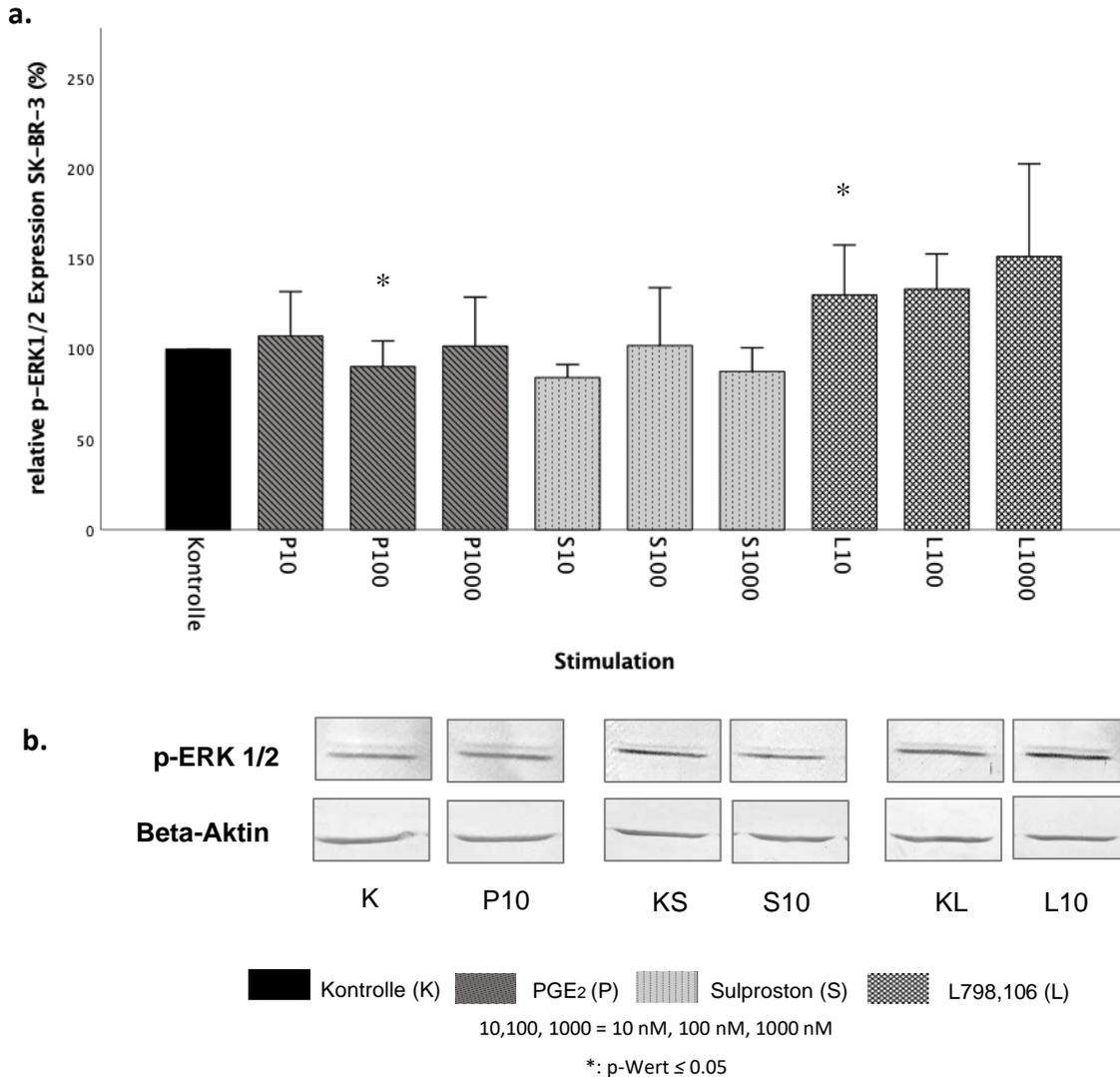


Abbildung 19: a. p-ERK-Proteinexpression von SK-BR-3-Zellen nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) **b.** repräsentative Western Blots (n = 3); nach [1]

4.4.2.2 p-ERK1/2-Expression in T-47D-Zellen

Stimulation mit PGE₂ führte bei T-47D-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der p-ERK1/2-Expression. 10 nM und 100 nM PGE₂ reduzierten die Expression jeweils auf 65 % (p = 0,037 für beide Bedingungen), 1000 nM auf 43 % (p = 0,037).

Unter EP1/3-Agonismus mit Sulproston kam es zu einer Steigerung der Proteinexpression. 10 nM steigerten sie auf 170 % (p = 0,037), 100 nM auf 139% (p = 0,487) und 1000 nM auf 121 % (p = 0,487).

Ergebnisse

Ein EP3-Antagonismus mittels L798,106 führte zu keiner eindeutigen Beeinflussung der p-ERK1/2-Expression. 10 nM L798,106 reduzierten sie auf 83 % ($p = 0,487$), mit 100 nM stieg sie auf 111 % an ($p = 0,487$) und mit 1000 nM lag die p-ERK1/2-Expression bei 97 % ($p = 0,487$) (s. Abbildung 20).

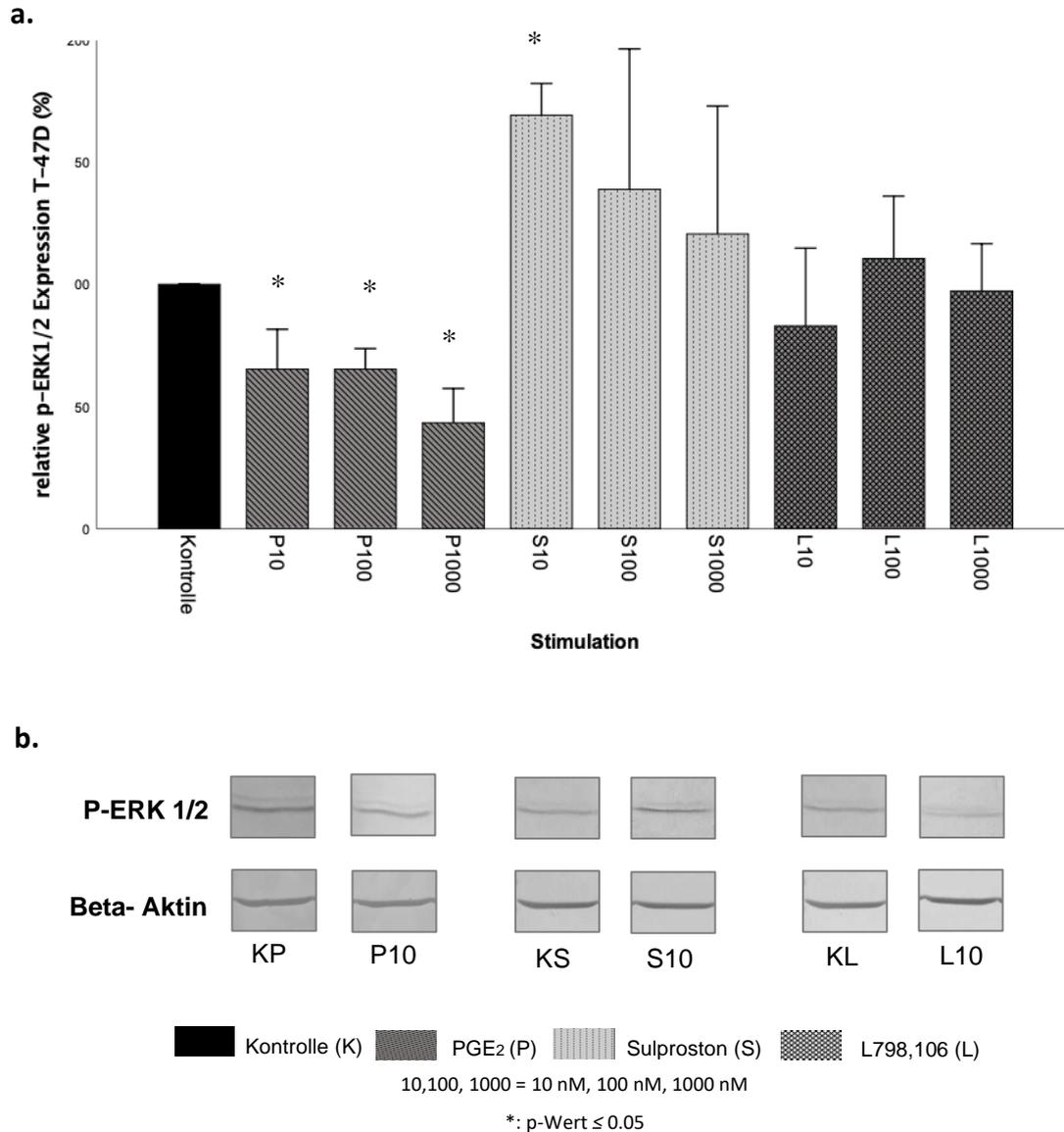


Abbildung 20: **a.** relative p-ERK1/2-Proteinexpression von T-47-D-Zellen nach Inkubation mit PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 ($n = 3$) **b.** repräsentative Western Blots ($n = 3$)

4.4.3 p53-Expression unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Wie bereits beschrieben, kann das phosphorylierte ERK-Protein zu einer Stimulation des p53-Proteins führen (vgl. Abbildung 5). Daher wurde auch die p53-Expression unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen nach einer Inkubationszeit von 72 h untersucht.

4.4.3.1 p53-Expression in SK-BR-3-Mammakarzinomzellen

In SK-BR-3-Zellen (n = 3) konnte das p53-Protein mittels der im Methodenteil aufgeführten p53-Antikörper nicht im Western Blot nachgewiesen werden. Daher war hier eine weitere Analyse nicht möglich.

4.4.3.2 p53-Expression in T-47D-Mammakarzinomzellen

In T-47D-Zellen (n = 3) führte eine Stimulation mit 10 nM und 100 nM PGE₂ zu einer Reduktion der p53-Expression auf jeweils 83 % (p = 0,487 für beide Bedingungen). 1000 nM reduzierten die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe auf 80 % (p = 0,487). Stimulation mit dem EP1/3-Agonisten Sulproston veränderte die p53-Expression nicht signifikant. Diese lag bei Stimulation mit 10 nM Sulproston bei 107 % (p = 1,0), mit 100 nM Sulproston bei 108 % (p = 0,487) und mit 1000 nM bei 96 % (p = 0,487).

Durch EP3-Antagonismus mit L798,106 wurde die p53-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell gesteigert. Diese betrug mit 10 nM L798,106 106 % (p = 0,487), mit 100 nM 116 % (p = 0,487) und mit 1000 nM 121 % (p = 0,487) (s. Abbildung 21).

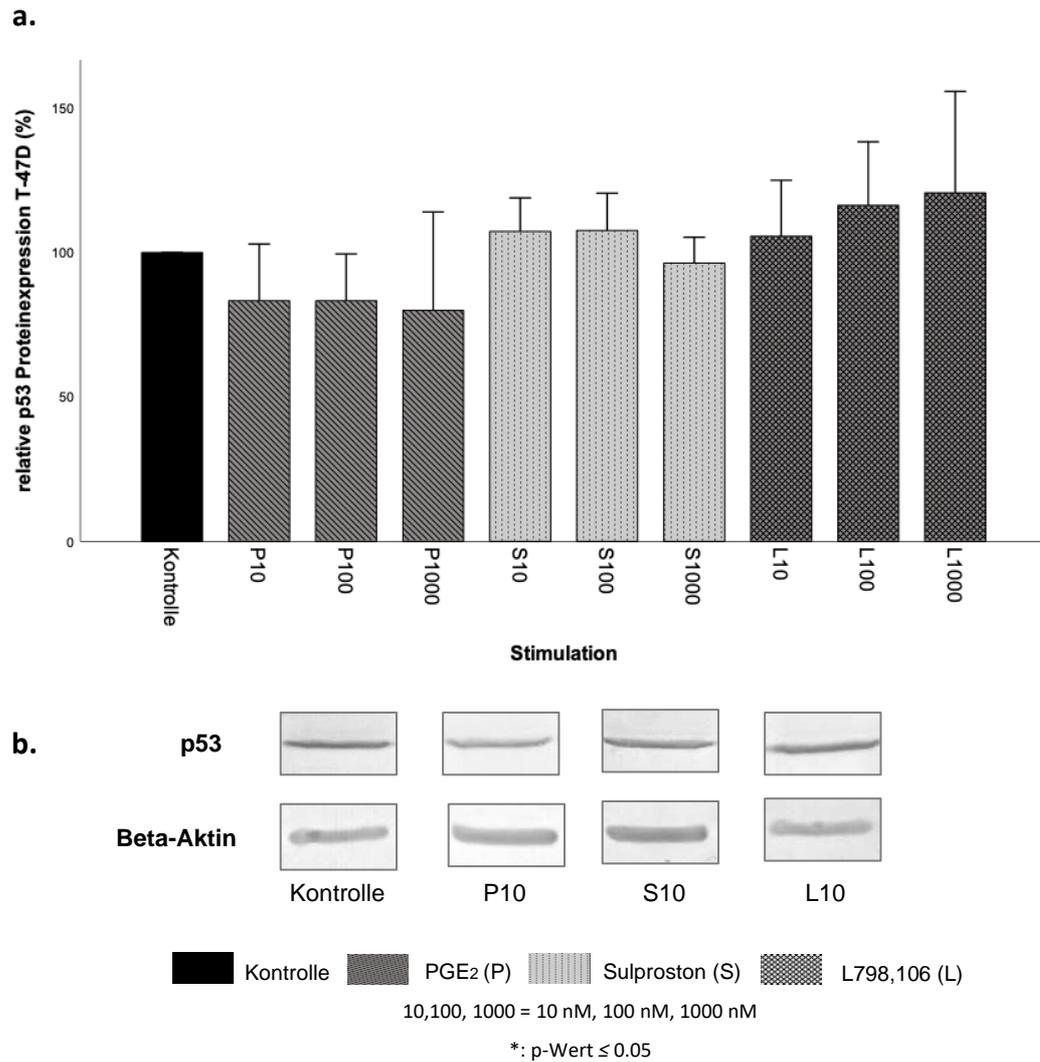


Abbildung 21: **a.** relative p53-Proteinexpression von T-47D-Zellen nach Inkubation mit PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) **b.** repräsentative Western Blots (n = 3)

4.5 cAMP-Bildung von SK-BR-3-Zellen nach Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Mittels eines ELISA-Assays wurde die cAMP-Konzentration in Lysaten von SK-BR-3-Zellen (n = 3), die unter den in Kapitel 3.2.1.5 beschriebenen Bedingungen für 24 h stimuliert wurden, gemessen.

Die Stimulation mit 10 nM PGE₂ reduzierte die mittlere cAMP-Konzentration auf 98 % (p = 0,48), mit 100 nM PGE₂ auf 87 % (p = 0,037) und mit 1000 nM PGE₂ auf 86 % (p = 0,037) des cAMP-Spiegels der unstimulierten Kontrolle.

Unter Stimulation mit 10 nM Sulproston kam es zu einer signifikanten Steigerung der cAMP-Level auf 105 % (p = 0,037) und mit 100 nM auf 107 %

($p = 0,037$). Unter Stimulation mit 1000 nM Sulproston lag die cAMP-Konzentration bei 99 % des Kontrollwertes ($p = 0,487$).

Unter EP3-Antagonismus mit L798,106 zeigte sich ein Trend in Richtung gesteigerter cAMP-Level. 10 nM erhöhten die Konzentration auf 111 % ($p = 0,037$) und 1000 nM auf 104 % ($p = 0,487$). Unter EP3-Antagonismus mit 100 nM L798,106 lag die Konzentration bei 82 % ($p = 0,046$), wobei hier von einem technischen Fehler aufgrund zu geringer Zellzahl in den Lysaten ausgegangen werden muss (s. Abbildung 22).

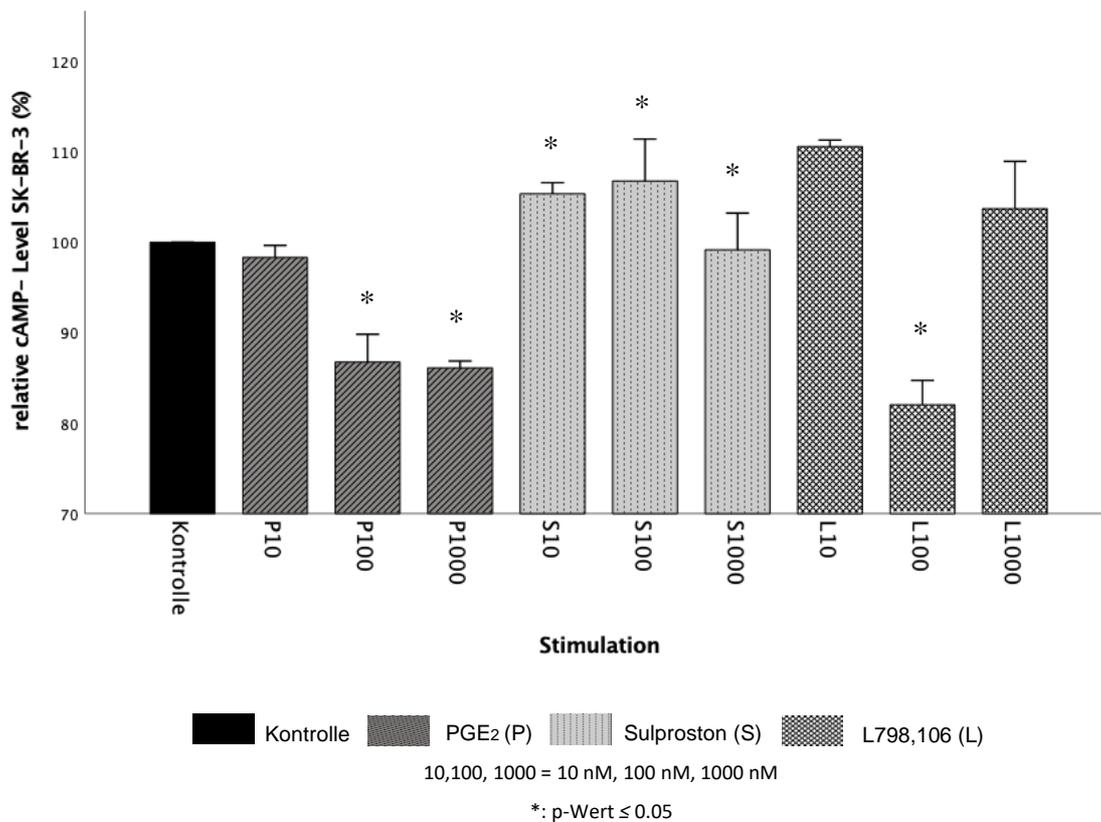


Abbildung 22: relative cAMP Level in SK-BR-3-Zellen nach Inkubation mit PGE₂, Sulproston bzw. L798,106 ($n = 3$); nach [1]

4.6 Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen unter Stimulation mit PGE₂, Sulproston und L798,106

Um das Migrationsverhalten der beiden Zelllinien SK-BR-3 und T-47D unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen zu analysieren, wurde ein Scratch-Assay nach einer Inkubationszeit von 24 h und 48 h durchgeführt.

4.6.1 Migrationsverhalten von SK-BR-3-Zellen

Die Stimulation von SK-BR-3-Zellen ($n = 3$) mit PGE_2 über 24 h oder 48 h beeinflusste deren Migrationsverhalten im Vergleich zu unstimulierten Kontrollzellen nicht signifikant. Zellen, die mit 100 nM PGE_2 stimuliert wurden, zeigten nach 24 h eine mittlere Migrationsrate von 90 % ($p = 0,487$) sowie nach 48 h eine Migrationsrate von 107 % ($p = 0,487$). SK-BR-3-Zellen, welche mit 1000 nM PGE_2 stimuliert wurden, zeigten nach 24 h eine Migrationsrate von 92 % ($p = 0,487$) und von 122 % nach 48 h ($p = 1,0$) jeweils verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe.

Stimulation mit 100 nM oder 1000 nM des EP1/3-Agonisten Sulproston führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate von SK-BR-3-Zellen. Die Stimulation mit 100 nM Sulproston reduzierte die Migrationsrate nach 24 h auf 48 % ($p = 0,037$), nach 48 h lag die relative Migrationsrate bei 46 % ($p = 0,037$). Die Stimulation mit 1000 nM Sulproston führte zu einer reduzierten Migrationsrate von 49 % nach 24 h ($p = 0,037$) und von 79 % nach 48 h ($p = 0,037$).

Ebenso konnte nach EP3-Antagonismus mit L798,106 eine signifikante Reduktion der Migrationsrate der SK-BR-3-Zellen beobachtet werden: 100 nM L798,106 reduzierten die Migrationsrate nach 24 h auf 54 % ($p = 0,037$) und nach 48 h auf 86 % ($p = 0,487$) im Vergleich zur Migration der Kontrollgruppe. Bei Antagonisierung mit 1000 nM L798,106 lag die relative Migrationsrate nach 24 h bei 41 % ($p = 0,037$) und nach 48 h bei 61 % ($p = 0,037$).

Eine Inkubation mit der Kombination aus je 100 nM des Agonisten und des EP3-Antagonisten reduzierte die Migration nach 24 h auf 64 % ($p = 0,037$) sowie nach 48 h auf 54 % ($p = 0,037$). 1000 nM Sulproston und L798,106 reduzierten die Migrationsrate nach 24 h auf 71 % ($p = 0,037$) und nach 48 h auf 85 % ($p = 0,037$) (s. Abbildung 23+24).

Ergebnisse

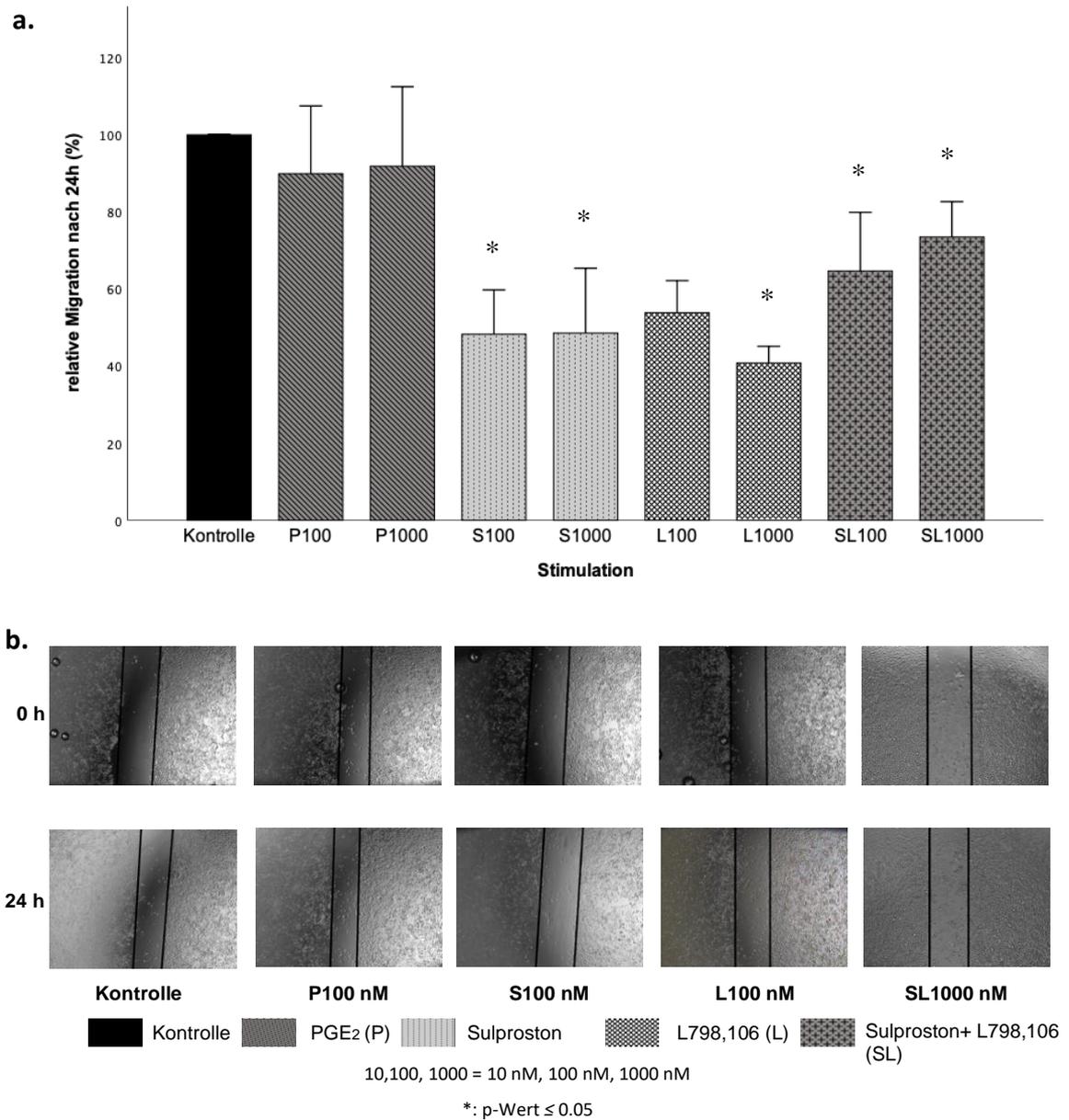


Abbildung 23: **a.** relative Migrationsrate (in vitro) von SK-BR-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit PGE₂, Sulproston, L798,106 bzw. der Kombination Sulproston+ L798,106 in den angegebenen Konzentrationen (n = 3) **b.** repräsentative Bilder (P = PGE₂, S = Sulproston, L = L798,106, SL = Sulproston + L798,106) nach 0 h bzw. 24 h (n = 3)

Ergebnisse

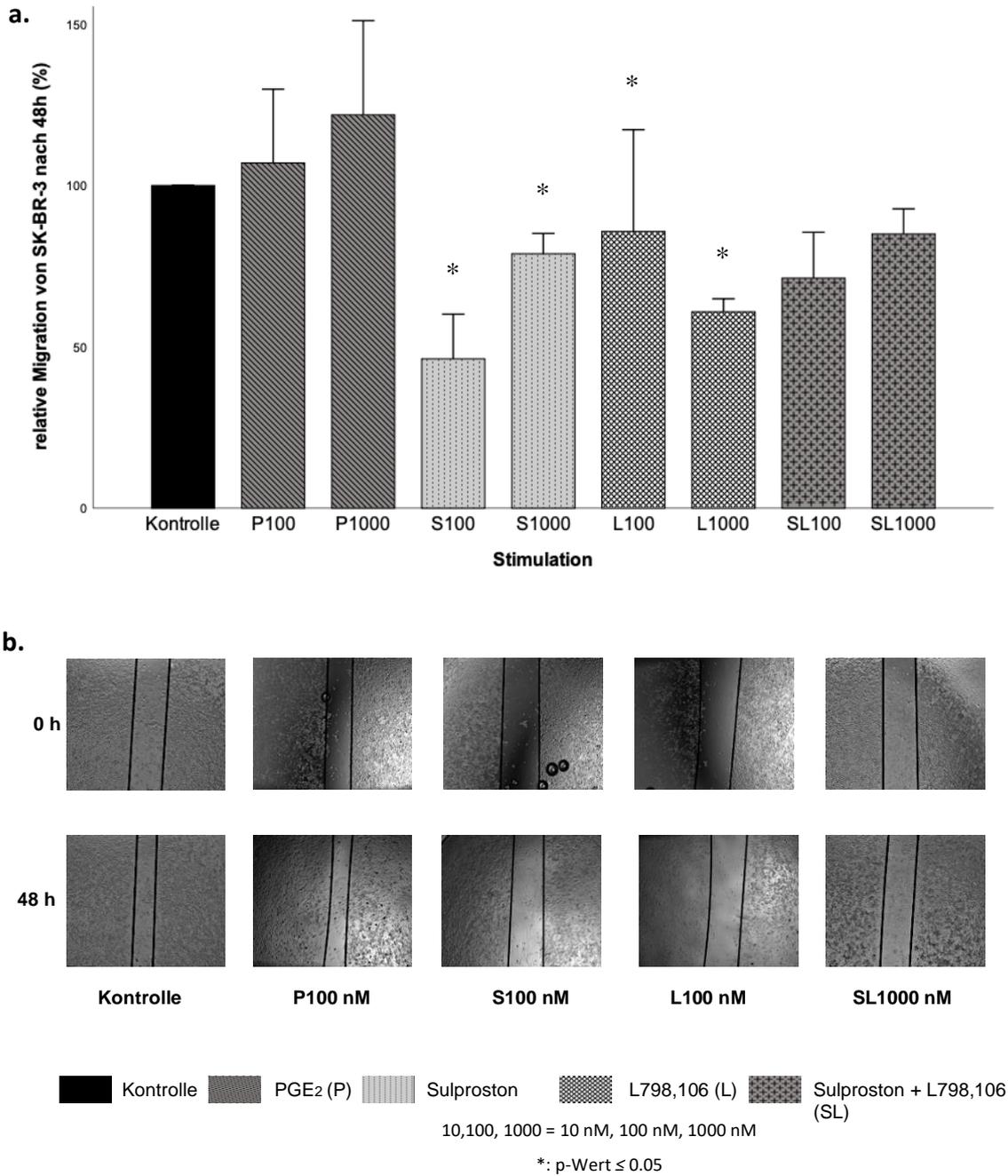


Abbildung 24: **a.** relative Migrationsrate (in vitro) von SK-BR-3-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit PGE₂, Sulproston, L798,106 bzw. der Kombination Sulproston+ L798,106 in den angegebenen Konzentrationen **b.** repräsentative Bilder (P = PGE₂, S = Sulproston, L = L798,106, SL = Sulproston + L798,106) nach 0 h bzw. 24 h (n = 3); nach [1]

4.6.2 Migration von T-47D-Zellen

Das Scratch-Assay wurde auch mit T-47D-Zellen durchgeführt (n = 3). Jedoch zeigte diese Zelllinie sowohl ohne Stimulation als auch mit Stimulation mit den drei beschriebenen Substanzen keine Tendenz, in die künstlich hergestellte

Ergebnisse

Wunde, die sog. „scratch area“, zu migrieren. Aufgrund dieser Tatsache war es nicht möglich, die Migrationsrate für diese Zelllinie zu analysieren.

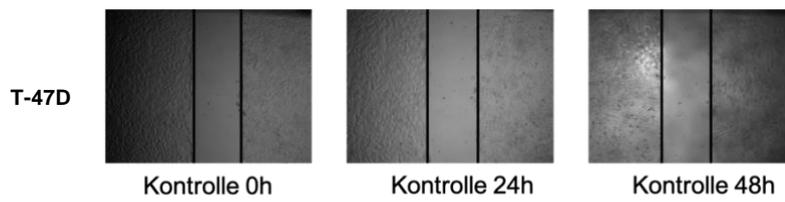


Abbildung 25: repräsentative Darstellung des Migrationsverhaltens von T-47D-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h ($n = 3$)

KAPITEL 5:
DISKUSSION

5. Diskussion

Teile dieser Diskussion wurden bereits in der Publikation „EP3-receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells“ im Journal “Oncotarget and Therapies” (Hester, Salzmann et. al.) [1] veröffentlicht.

Hintergrund der vorliegenden Arbeit waren Studien, welche zeigen konnten, dass eine medikamentöse Hemmung der Cyclooxygenasen und damit die Hemmung einer Prostaglandin-vermittelten Entzündungsreaktion einen chemopräventiven Ansatz in der Therapie von Mammakarzinomen darstellen könnte. Dabei wurden aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) unselektive COX-Hemmer wie Ibuprofen sowie selektive COX-2-Inhibitoren – sogenannte Coxibe – eingesetzt.

Eine große Fall-Kontroll-Studie aus dem Jahre 2016 zeigte, dass die Einnahme von nicht steroidalen Antirheumatika (NSAIDs) mit einer 24-prozentigen Risikoreduktion hinsichtlich des Auftretens von Brustkrebs assoziiert ist [103].

Nicht-steroidale Antirheumatika greifen durch die Hemmung von Cyclooxygenasen in die COX2-PGE₂-Achse ein und tragen so zur Entzündungshemmung bei [104]. Die Möglichkeit, diese Medikamente gegebenenfalls tumorpräventiv einsetzen zu können, ist jedoch aufgrund der Nebenwirkungen nur begrenzt möglich. Coxibe führen zu einer Erhöhung des kardiovaskulären Risikos, welches vermutlich aus der Dysbalance zwischen pro- und antithrombotischen Effekten resultiert. Durch die selektive COX-2-Hemmung wird die PGI₂-vermittelte kardioprotektive Wirkung reduziert, gleichzeitig bleibt die prothrombotische, COX-1-vermittelte Wirkung der Thromboxane jedoch unbeeinflusst, was zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko führt [96].

Beim Mammakarzinom wird die Inflammation unter anderem COX-2 sowie daraus resultierend Prostaglandin E₂- gesteuert vermittelt. COX-2 ist in ca. 40 % der Mammakarzinome und 62,5 % aller untersuchten DCIS überexprimiert

[105,106]. Die Prostaglandinrezeptoren EP1-4, an denen das Hauptprodukt der Cyclooxygenasen PGE_2 wirkt, sind jedoch nur ansatzweise verstanden. Außerdem zeigen neuere immunhistochemische Daten, dass eine hohe Expression des EP3-Rezeptors mit einem verbesserten Gesamtüberleben von Mammakarzinompatientinnen sowie weniger Lokalrezidiven einhergeht [93]. Diese Tatsache spricht für ein tumorpräventives Potential des EP3-Rezeptors. Die biologische Grundlage dieser klinischen Daten sollte im Rahmen dieser Arbeit auf zellkultureller Ebene untersucht werden.

5.1 Expression von EP1 und EP3 in Mammakarzinomzelllinien

Da in einer immunhistochemischen Arbeit gezeigt werden konnte, dass eine hohe EP3-Expression beim Mammakarzinom prognostisch relevant ist [93], wurden für zellkulturelle Versuche Zelllinien bezüglich ihrer EP3-Expression gescreent. Es sollte jeweils eine Zelllinie mit hoher und niedriger EP3-Expression als Modellsystem für Tumore mit hoher und niedriger Expression gewählt werden. Durch vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe lag die mRNA-Expressionsanalyse für EP3 vor. Hier zeigte sich die höchste EP3-Expression in T-47D-Zellen, weshalb diese als Modell für eine Zelllinie mit hoher EP3-Expression ausgewählt wurde. Obwohl MDA-MB-231 die niedrigste mRNA-Expression zeigte, wurde SK-BR-3 mit dem zweitniedrigsten mRNA-Level von EP3 ausgewählt, da für MDA-MB-231 keine EP3-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte. Da EP3 in verschiedensten Isoformen existieren kann [85], ist anzunehmen, dass MDA-MB-231 auf Proteinebene eine EP3-Isoform exprimiert, welche von dem verwendeten Antikörper nicht detektiert werden konnte.

Da der Agonist Sulproston auch an den EP1-Rezeptor bindet, wurde für die Zelllinien SK-BR-3 und T-47D zusätzlich deren EP1-Proteinexpression untersucht, um zu überprüfen, ob die unter Sulproston-Stimulation beobachteten Effekte möglicherweise auch über einen EP1-vermittelten Signalweg erklärbar sein könnten. Während SK-BR-3 EP1 exprimiert, zeigten T-47D-Zellen keine EP1-Proteinexpression. In einer Arbeit von Thorat et al. konnte jedoch eine EP1-Expression auf RNA Ebene sowohl bei SK-BR-3 als

auch bei T-47D-Zellen nachgewiesen werden [107]. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür könnten – wie bereits für EP3 bekannt – verschiedene Isoformen des EP1-Rezeptors sein, welche von den oben genannten Antikörpern nicht detektiert werden konnten.

Die EP3-Expression selbst wurde durch Inkubation mit dem EP3-Antagonisten reduziert; die Stimulation mit PGE₂ oder dem Agonisten Sulproston zeigte hier keinen Einfluss. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus eines selektiven EP3-Rezeptorantagonisten auf die Expression des Rezeptors selbst ist ein Effekt, welcher bisher in keiner veröffentlichten Studie beschrieben wurde.

5.2 Wirkung von PGE₂ auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen

PGE₂ wurde in mehreren, im folgenden genannten Studien als proliferationsfördernd auf Tumorzellen beschrieben.

In Endometriumkarzinomzellen konnte PGE₂ signifikant die Proliferation vermutlich über den Wnt/beta-Catenin Signalweg und den Rezeptor EP4 steigern [65]. Im kleinzelligen Bronchialkarzinom sind COX-2 sowie die Prostaglandinsynthase 1 überexprimiert und PGE₂ scheint hier EP3-vermittelt zu einer gesteigerten Zellproliferation zu führen [108]. In einer aktuellen Studie konnte im Mausmodell beobachtet werden, dass der Einsatz von Indometacin zu einer 80-prozentigen Reduktion der Prostaglandinsynthese sowie zu einer signifikant geminderten Progression der Akuten Lymphatischen Leukämie in den entsprechenden Mäusen führte [109]. Bezüglich des Mammakarzinoms führte der Einsatz von Celecoxib im Rattenmodell zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Inzidenz als auch des Tumorzellvolumens auftretender Mammakarzinome [110]. Auch im Mausmodell reduzierte der Einsatz von selektiven und nicht-selektiven COX-2-Inhibitoren die Migration von Tumorzellen, die Tumorinvasivität sowie die tumorinduzierte Angiogenese [111]. Dies spricht folglich für ein tumorförderndes Potential von PGE₂ bei Karzinomen.

In dieser Arbeit führte eine Stimulation der Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3 und T-47D mit PGE₂ zu keiner eindeutigen Beeinflussung der Proliferations- und Migrationsrate verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe. Bei Stimulation mit PGE₂ war jedoch bei T-47D-Zellen die Viabilität isoliert erhöht, während dies für SK-BR-3-Zellen nicht zutraf. Die funktionelle Relevanz dieser isolierten Steigerung der Viabilität bei T-47D-Zellen bleibt unklar, insbesondere auch, da bei T-47D die Expression relevanter Proteine der PGE₂-Signalkaskade unverändert war.

5.3 Wirkung des selektiven Antagonisten L798,106 auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen

Während die Proliferationsrate von T-47D-Zellen unter Antagonisierung mit L798,106 lediglich einen Trend zu geminderter Proliferation zeigte, führte die Antagonisierung am EP3-Rezeptor bei SK-BR-3-Mammakarzinomzellen zu einer signifikant gesenkten Proliferations- und Migrationsrate.

Ein vergleichbarer Effekt konnte bereits bei Endometriumkarzinomzellen beobachtet werden. Auch hier führte eine EP3-Antagonisierung zu signifikant verminderten Proliferations- und Migrationsraten [92]. Auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom führte die Antagonisierung mit dem selektiven EP3-Antagonisten L798,106 zu verminderter Viabilität, Invasion und Migration der Tumorzellen [112].

Zudem führte die Injektion von Bronchialkarzinomzellen in EP3-defiziente Knockout-Mäuse verglichen mit der Injektion in Wildtyp-Mäuse zu signifikant reduzierter Angiogenese [113], Lymphangiogenese und zu einem reduziertem Tumorwachstum [114]. Dies spricht somit für einen antikanzerogenen Effekt einer Rezeptorhemmung.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Arbeiten hatte eine Antagonisierung von Brustkrebszellen mit einem anderen spezifischen EP3-Rezeptorantagonisten (ONO-AE3-240) im Mausmodell keinen Effekt auf die Metastasierungsrate [115]. Zudem konnte eine reduzierte Expression des EP3-Rezeptors in verschiedenen Tumorarten wie unter anderem Brustkrebs [116], Plattenepithelkarzinomen der Haut [117] und Kolonkarzinomen [89] im

Vergleich zum jeweiligen gesunden Gewebe nachgewiesen werden. Dies spricht wiederum für einen protektiven Effekt des EP3-Rezeptors.

Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Beobachtungen könnte die unterschiedliche Expression der einzelnen EP3-Isoformen in den verschiedenen Tumorarten sein [82]. Wie im Einleitungsteil beschrieben, besteht das menschliche EP3-Gen aus 10 Exons und generiert 9 mRNAs, aus welchen durch alternatives Splicing bis zu 8 EP3-Isoformen hervorgehen können, welche sich nur in ihrem C-Terminus unterscheiden [85]. Je nach Isoform bzw. C-Terminus können EP3-Rezeptoren an verschiedene G-Proteine koppeln und somit unterschiedliche second-messenger Systeme stimulieren [87], welche dann zu einer gesteigerten bzw. inhibierten cAMP-Produktion führen sowie zur Erhöhung von intrazellulärem Calcium [82]. Um die Ursachen der verschiedenen Effekte des EP3-Antagonismus in verschiedenen Tumorarten genauer zu verstehen, sollten zukünftige Analysen die Expression der verschiedenen Isoformen und der damit aktivierten Signalwege untersuchen.

5.4 Wirkung des EP1/3-Agonisten Sulproston auf funktionelle Aspekte von Mammakarzinomzellen

Sulproston wirkt als Agonist sowohl am EP3- als auch am EP1-Rezeptor [118]. Aus diesem Grund müssen die in dieser Arbeit beobachteten Sulproston-vermittelten Effekte vor dem Hintergrund der Stimulation sowohl des EP3- als auch des EP1-Rezeptors interpretiert werden. Im Gegensatz zu EP3 folgt nach Stimulation des EP1-Rezeptors eine intrazelluläre Calciuserhöhung, welche über Phospholipase C bzw. eine Inositoltriphosphat-Erhöhung vermittelt wird [80].

Die Rolle von EP1 in der Karzinogenese wird kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit führte eine EP1/3-Agonisierung mit Sulproston in Bezug auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen zu ähnlichen Effekten wie die Inkubation mit L798,106, dem EP3-spezifischen Antagonisten. Es kam sowohl unter Agonisierung von EP1 und EP3 als auch unter Antagonisierung des EP3-Rezeptors zu einer signifikanten Reduktion der Proliferations- sowie der

Migrationsrate. Somit sind wahrscheinlich die nach Applikation von Sulproston beobachteten Effekte maßgeblich durch den Agonismus am EP1-Rezeptor vermittelt. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich somit auf einen möglicherweise protektiven Effekt des EP1-Rezeptors schließen. Dazu passend wurde in einer Studie aus dem Jahre 2010 nachgewiesen, dass EP1-Antagonisierung sowie EP1-silencing von Mammakarzinomzellen zu signifikant gesteigerten Metastasierungsraten im Mausmodell führte [119], was für einen tumorhemmenden Effekt des EP1-Rezeptors in der Entwicklung von Mammakarzinomen spricht. Des Weiteren konnte bei Patientinnen mit EP1-negativen Mammakarzinomen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben verglichen mit Patientinnen mit EP1-positivem Expressionsstatus beobachtet werden [119].

Im Gegensatz dazu konnte man jedoch im Rattenmodell eine signifikante Reduktion des Wachstums von Mammakarzinomzellen durch Anwendung des spezifischen EP1-Rezeptorantagonisten ONO-8711 nachweisen: Hierunter zeigte sich eine Apoptoseinduktion der Tumorzellen, was für einen tumorfördernden Effekt von EP1 spricht [120].

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Sulproston-bedingte Effekte hauptsächlich EP1-vermittelt sind, wurden sowohl Proliferation als auch Migration von SK-BR3-Zellen bei Inkubation mit einer Kombination aus dem selektivem EP3-Antagonisten L798,106 und dem EP1/3-Agonisten Sulproston untersucht, um eine selektive EP1-Agonisierung bei gleichzeitigem EP3-Antagonismus zu bewirken. Unter diesem selektiven EP1-Agonismus zeigte sich ebenfalls eine signifikant geminderte Proliferation und Migration. Dies stützt die These eines tumorhemmenden Potentials des EP1-Rezeptors. Allerdings war zu beobachten, dass sowohl die Proliferationsminderung als auch die Migrationsreduktion nicht so stark ausgeprägt waren, wie unter alleiniger Sulprostonbehandlung, so dass Wechselwirkungen unter EP3 möglich scheinen. Da bisher keine vergleichbaren Studien unter Verwendung von Sulproston und L798,106 vorliegen, sollte dieser Aspekt durch weitere Untersuchungen – beispielsweise mit einem EP1- oder EP3-Knockout oder einer weiteren Analyse der Signalwege – untersucht werden.

5.5 Beeinflussung des EP3-induzierten Signalwegs durch Stimulation oder Inhibition des EP3-Rezeptors

Aus bisherigen Studien ist bekannt, dass zur Signalvermittlung der EP3-Rezeptor hauptsächlich an das inhibitorische G-Protein koppelt und im Zuge dieses Signalwegs zu erniedrigten cAMP-Spiegeln führt [80]. Außerdem wurde beschrieben, dass je nach EP3-Isoform der aktivierte Rezeptor auch eine Phosphorylierung extrazellulärer signal-regulierter Kinasen (p-ERK1/2) initiieren kann [121]. Diese Signalwege sind in Abbildung 5 dargestellt.

Um zu evaluieren, welches Protein an der Vermittlung der beobachteten Effekte beteiligt ist, wurden die Expression des G-Protein, p-ERK1/2 sowie von p53 und cAMP in den Mammakarzinomzellen untersucht.

Sowohl die Inhibition des EP3-Rezeptors als auch die Agonisierung des EP1- und EP3-Rezeptors führte zu einer signifikant verminderten Gi-Protein Expression. Somit scheint die in diesen Zellen vorliegende EP3-Isoform im Wesentlichen an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt zu sein.

Der Einfluss von zyklischen Nukleotiden wie cAMP auf Mammakarzinomzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. cAMP scheint u.a. je nach Vorliegen von Umgebungsfaktoren wie z.B. der An- oder Abwesenheit von Hormonen wie Östradiol antiproliferativ oder proliferativ zu wirken [122]. Auch die Expression der Hormonrezeptoren scheint hierbei eine Rolle zu spielen [123]. In einer Studie von Dong et al. reduzierte eine Stimulation des cAMP Signalwegs die Migrationsrate von Brustkrebszellen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate [124]. Konträr dazu konnte an MCF-7, T-47D und Cama-1 Brustkrebszellen in einer anderen Studie beobachtet werden, dass eine Inkubation im Medium, welches mit cAMP-stimulierenden Substanzen versetzt war, mit einer Inhibition des Zellwachstums verbunden war [122].

In dieser Arbeit konnten sowohl unter Agonisierung am EP1/3-Rezeptor als auch unter Antagonisierung des EP3-Rezeptors ein Trend zu erhöhter cAMP Produktion beobachtet werden. Somit scheint die oben beschriebene reduzierte Gi-Protein-Expression eine Steigerung der cAMP-Produktion zu bewirken.

Durch Aktivierung des inhibitorischen G-Proteins, welches an den EP3-Rezeptor gekoppelt ist, kommt es außerdem zu einer Reduktion der Phosphorylierung von ERK (extracellular-regulated-kinases). Diese gehören zu

den Mitogen-aktivierten Kinasen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung und Proliferation [125].

Vieles deutet darauf hin, dass das phosphorylierte ERK-Protein auch in der Tumorgenese EP3-vermittelt die Zellteilung und Metastasierung beeinflusst. Eine p-ERK-Defizienz in Mammakarzinomzellen führt zu einer vermehrten Tumorgenese sowie gesteigerter Zellproliferation [126]. In Kolonkarzinomzellen führt die EP3-Stimulation zur Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und damit zur Phosphorylierung von ERK1/2, was die Migrationsrate der Zellen steigerte [127]. Des Weiteren kann die Phosphorylierung von ERK über PI3K zur Induktion der mRNA Expression des ‚vascular epithelial growth factors‘ (VEGF) führen und damit die tumor-induzierte Angiogenese fördern [128].

In dieser Arbeit konnte keine eindeutige Änderung der p-ERK1/2-Expression durch Stimulation des EP1/3-Rezeptors oder Inhibition des EP3-Rezeptors beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch ein nicht-signifikanter, dosisabhängiger Trend zu einer gesteigerten p-ERK1/2-Expression unter Antagonisierung des EP3-Rezeptors in SK-BR-3-Zellen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die p-ERK/PI3K-Achse in Bezug auf die beobachteten antikanzerogenen Effekte der EP3-Rezeptor Stimulation eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Eine schematische Darstellung der im EP3-vermittelten Signalweg beobachteten Effekte bei Stimulation mit Sulproston oder Inhibition mit L798,106 und Sulproston ist in Abbildung 26 dargestellt.

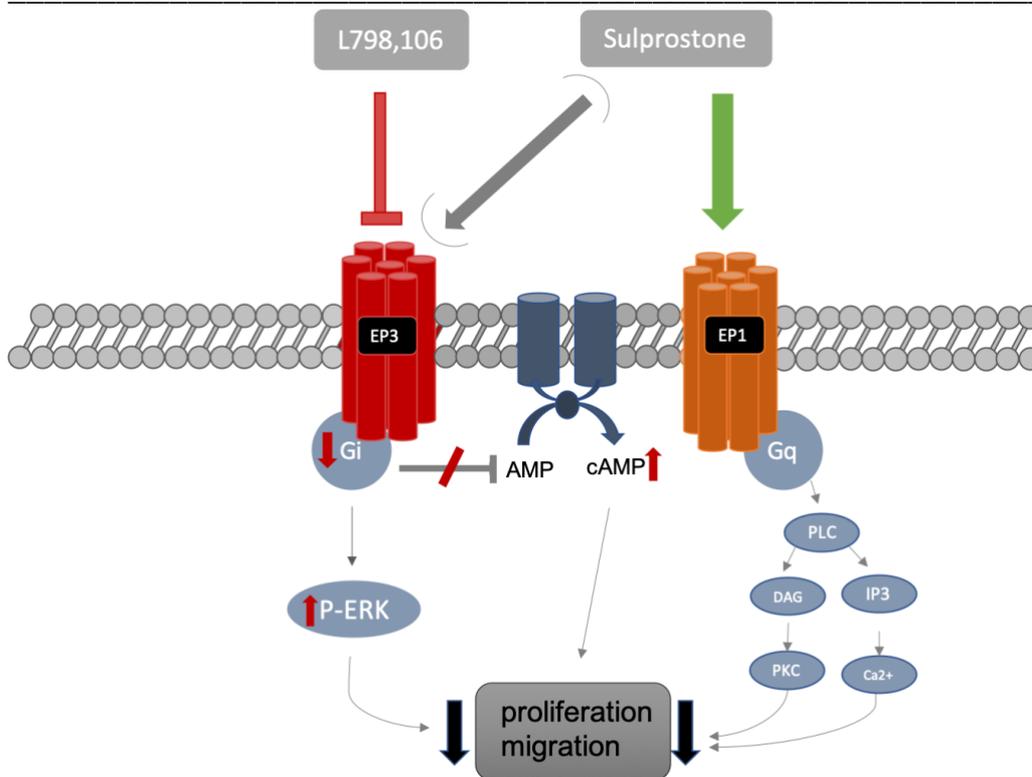


Abbildung 26: Schematische Darstellung des EP3-vermittelten Signalwegs (basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit) sowie mögliche Wechselwirkungen zum EP1-Rezeptor unter Stimulation oder Inhibition [1].

5.6 Vergleich der zellkulturellen Daten dieser Arbeit mit immunhistochemischen Daten

Das als Grundlage der Arbeit dienende, in der Immunhistochemie beobachtete positiv prognostische Potential des EP3-Rezeptors [93] konnte durch die zellkulturellen Versuche nicht erklärt werden. Auf Zellkulturebene führte eine EP3-Antagonisierung zu einer Reduktion der Proliferations- und Migrationsrate der Mammakarzinomzellen, was eher für einen tumorfördernden Effekt von EP3 spricht und somit die positive prognostische Relevanz einer hohen EP3-Expression nicht erklärt. Somit muss diese positive prognostische Relevanz durch andere Faktoren, wie beispielsweise die immunologische Umgebung des Tumors bedingt sein. Weitere Studien, die die immunologische Tumorumgebung mit einbeziehen oder beispielsweise ein Mausmodell einsetzen, können die Beobachtungen genauer einordnen und Co-Faktoren identifizieren.

Bei SK-BR-3-Zellen handelt es sich um eine HER2neu-positive Zelllinie. In den immunhistochemischen Untersuchungen konnte jedoch keine Korrelation

zwischen EP3-Positivität und HER2neu-Überexpression hergestellt werden. Ein positiv prognostisches Potential bezüglich des Gesamtüberlebens der Patientinnen konnte in der Gruppe der HER2neu-negativen, jedoch nicht der HER2neu-positiven Patientinnen beobachtet werden. Diese Tatsache stellt einen möglichen Erklärungsansatz für die vermeintlich konträren Ergebnisse auf Zellkulturebene dar.

Des Weiteren ist zu beachten, dass die antikanzerogene Wirkung bei Antagonismus des EP3-Rezeptors ausschließlich in SK-BR-3-Zellen zu beobachten war. Zu erwähnen ist, dass in dieser Arbeit eine Stimulation des EP3-Rezeptors in T-47D-Zellen im Gegensatz zu SK-BR-3-Zellen keinen Einfluss auf die Expression des Rezeptors selbst hatte. Daraus lässt sich vermuten, dass in T-47D-Zellen – trotz hoher EP3-Expression – dieser Signalweg eine untergeordnete Rolle in der Tumorgenese spielt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird mit Brustkrebs ein Krankheitsbild thematisiert, welches in der heutigen Zeit von großer Bedeutung ist. Das Mammakarzinom stellt das häufigste Malignom der Frau dar, die Neuerkrankungsraten sind in den letzten 10 Jahren stetig gestiegen. Ein Rückgang der Mortalitätsrate ist nicht zuletzt der stetigen Forschung sowohl im experimentellen als auch im klinischen Setting zu verdanken. Eine Verbesserung von Prognose und Überlebenswahrscheinlichkeit ist nur durch weitere wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet zu erreichen.

Entzündungsprozesse sind an der Karzinogenese des Mammakarzinoms beteiligt. Es ist bekannt, dass sowohl COX-2, als auch eines seiner Hauptprodukte, PGE₂, in Mammakarzinomen überexprimiert sind [5]. Inwieweit die verschiedenen Prostaglandinrezeptoren die Tumorentstehung beeinflussen, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Immunhistochemische Analysen konnten EP3, einen der vier Prostaglandinrezeptoren, als positiv prognostischen Marker bezüglich des Gesamtüberlebens von Brustkrebspatientinnen identifizieren [93]. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde untersucht, inwieweit sich dieser Effekt auch auf Zellkulturebene übertragen lässt.

Sowohl Zellviabilität, -proliferation, -migration als auch die Expression verschiedener Proteine, welche an dem Downstream-Signalweg des EP3-Rezeptors beteiligt sind, wurden unter Stimulation mit PGE₂ oder dem EP1/3-Agonisten Sulproston sowie bei Inhibition des EP3-Rezeptors mit dem selektiven Antagonisten L798,106 analysiert.

Während die EP3-Stimulation bzw. der Antagonismus keine wesentlichen Effekte bei T-47D-Mammakarzinomzellen zeigte, führte eine EP3-Antagonisierung bei SK-BR-3-Zellen zu einer signifikanten Reduktion von Proliferation und Migration der Zellen. Hier scheint vor allem der G_i-Protein-cAMP-vermittelte Signalweg eine Rolle zu spielen, der bei Antagonismus von EP3 gehemmt wurde. Diese Ergebnisse sprechen für ein kanzerogenes Potential des EP3-Rezeptors, wie es ähnlich für andere gynäkologische Tumoren beschrieben wurde. Ein proliferations- und migrationsfördernder Effekt

Zusammenfassung

wurde bei Stimulation mit dem EP1/3-Agonisten Sulproston beobachtet. Dieser Effekt scheint am ehesten EP1-vermittelt zu sein.

Zusammenfassend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass der EP3-Rezeptor neben seinen physiologischen Effekten auch maligne Prozesse der Tumorgenese wie das Proliferations- und Metastasierungsverhalten von Mammakarzinomzellen G_i -cAMP-gekoppelt zu steuern scheint. Das immunhistochemisch beschriebene, positiv prognostische Potential des Rezeptors konnte auf Zellkulturebene nicht bestätigt werden, was darauf hindeutet, dass weitere Faktoren, wie beispielsweise die immunologische Tumorumgebung hier eine Rolle spielen müssen.

Die Tatsache, dass zwei verschiedene Brustkrebszelllinien unterschiedlich auf die Stimulation reagieren, deutet darauf hin, dass der EP3-vermittelte Mechanismus u.a. von spezifischen Tumoreigenschaften oder der Expression verschiedener Isoformen des EP3-Rezeptors abhängig sein könnte. Insgesamt stützt die Arbeit die Hypothese, dass der COX-2-PGE₂-EP3-gekoppelte Signalweg eine Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms spielt und in Zukunft weiterhin Bestandteil wissenschaftlicher Untersuchungen sein sollte, um ein mögliches Potential des Rezeptors in der Krebstherapie ausschöpfen zu können.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA	BReast CAncer
BrdU	Bromdesoxyridin
Ca.	Circa
CIS	Carcinoma in situ
COX	Cyclooxygenase
DCIS	Duktales carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EP	Prostaglandin E
ER	Estrogenrezeptor
Et al.	Und andere
FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HER 2/neu	Human epidermal growth factor 2
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
JÜR	Jahresüberlebensrate
L	L798,106
M	Molar
mA	Milliampère

Anhang

Mamma-CA	Mammakarzinom
MAP	Mitogen- activated protein
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Nano
NaAzid	Natriumazid
P	Prostaglandin E2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE ₂	Prostaglandin E2
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleid acid
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sulproston
s.	siehe
WHO	World Health organisation
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
μ	Mikro
TNBC	Triple negative breast cancer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inzidenz der häufigsten Krebsarten unter Frauen weltweit im Jahre 2018 [7] (Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 2018. 68 (6): p. 401); (aus urheberrechtlichen Gründen nicht dargestellt)	3
Abbildung 2: Häufigkeit der Karzinomentwicklung in den einzelnen Brustabschnitten nach Janni et al. [2], erstellt mit Microsoft Word	8
Abbildung 3: Schaubild der tumor-induzierten Inflammation von Mantovani et al. [4]; mit Genehmigung vom Springer Nature Customer Service Centre GmbH: Nature, Cancer-related inflammation, Mantovani, A. et al., COPYRIGHT, 2008, Lizenznummer 5263771281238	15
Abbildung 4: Prostaglandinsynthese vereinfacht nach [66], erstellt mit Biorender.com	17
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung der EP-Rezeptoren und ihrer Downstream Signalwege nach Friedman et al. [88] und [86], Abbildung erstellt mit Biorender.com	20
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer, erstellt mit Microsoft Word	34
Abbildung 7: Schema MTT-Aufbau: Dargestellt ist eine 96-well Platte mit den Versuchsansätzen für den MTT-Assay (P=PGE ₂ , S= Sulproston, L=L798,106, K=Kontrolle), erstellt mit Biorender.com	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Scratch-Assays; erstellt mit Biorender.com 1: Monolayer 2: Herstellung einer künstlichen Wunde mittels Pipettenspitze 3: Zellschicht nach 24 h 4: Zellschicht nach 48 h	40
Abbildung 9: a. relative EP3 Expression in den Mammakarzinomzelllinien T-47D, SK-BR-3 und MDA-MB-231 (n = 3), normiert auf die Beta-Aktin-Expression b. repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin; nach [1]	44
Abbildung 10: a. relative EP3 Expression in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 (n = 3) nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die Beta- Aktin-Expression; nach [1] b. repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin (n = 3)	45
Abbildung 11: a. relative EP3 Expression in der Mammakarzinomzelllinie T-47D nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die b-Actin-Expression (n = 3) b. repräsentative Western Blots von EP3 und Beta-Aktin (n = 3)	46
Abbildung 12: a. relative EP1 Expression in den Mammakarzinomzelllinien T-47D und SK-BR-3 (n = 3), normiert auf die Beta-Aktin- Expression b. repräsentative Western Blots von EP1 und Beta-Aktin; nach [1]	47
Abbildung 13: relative metabolische Aktivität von SK-BR-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nM,100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston L798,106, normiert auf die Kontrolle (n = 3)	48
Abbildung 14: relative metabolische Aktivität von T-47D Zellen nach Inkubation mit 10,100, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106, normiert auf die unstimulierte Kontrolle (n = 3)	50
Abbildung 15: relative Proliferation von SK-BR-3-Zellen unter Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston (S), L798,106 sowie der	

Kombination aus Sulproston und L798,106, normiert auf die Kontrolle (n = 3) nach [1]	51
Abbildung 16: mittlere Proliferation von T-47D Zellen unter Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston (S), L798,106, normiert auf die Kontrolle (n = 3).....	52
Abbildung 17: a. relative Gi-Protein Expression von SK-BR-3 Zellen nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) b. repräsentative Western Blots (n = 3); nach [1]	54
Abbildung 18: a. relative Gi-Protein Expression von T-47D-Zellen nach Stimulation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) b. repräsentative Western Blots (n = 3); nach [1]	55
Abbildung 19: a. p-ERK-Proteinexpression von SK-BR-3-Zellen nach Inkubation mit 10 nM, 100 nM, 1000 nM PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) b. repräsentative Western Blots (n = 3); nach [1]	57
Abbildung 20: a. relative p-ERK1/2-Proteinexpression von T-47-D-Zellen nach Inkubation mit PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) b. repräsentative Western Blots (n = 3).....	58
Abbildung 21: a. relative p53-Proteinexpression von T-47D-Zellen nach Inkubation mit PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3) b. repräsentative Western Blots (n = 3).....	60
Abbildung 22: relative cAMP Level in SK-BR-3-Zellen nach Inkubation mit PGE ₂ , Sulproston bzw. L798,106 (n = 3); nach [1]	61
Abbildung 23: a. relative Migrationsrate (in vitro) von SK-BR-3-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit PGE ₂ , Sulproston, L798,106 bzw. der Kombination Sulproston+ L798,106 in den angegebenen Konzentrationen (n = 3) b. repräsentative Bilder (P = PGE ₂ , S = Sulproston, L = L798,106, SL = Sulproston + L798,106) nach 0 h bzw. 24 h (n = 3)	63
Abbildung 24: a. relative Migrationsrate (in vitro) von SK-BR-3-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit PGE ₂ , Sulproston, L798,106 bzw. der Kombination Sulproston+ L798,106 in den angegebenen Konzentrationen b. repräsentative Bilder (P = PGE ₂ , S = Sulproston, L = L798,106, SL = Sulproston + L798,106) nach 0 h bzw. 24 h (n = 3); nach [1].....	64
Abbildung 25: repräsentative Darstellung des Migrationsverhaltens von T-47D-Zellen nach 0 h, 24 h und 48 h (n = 3)	65
Abbildung 26: Schematische Darstellung des EP3-vermittelten Signalwegs (basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit) sowie mögliche Wechselwirkungen zum EP1-Rezeptor unter Stimulation oder Inhibition [1].	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Mammakarzinoms nach [32].....	7
Tabelle 2: Stadiengruppierung nach UICC – Stadien nach [33]	8
Tabelle 3: Geräte und Hersteller	26
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien und Hersteller	26
Tabelle 5: Reagenzien/ Medien und Hersteller	28
Tabelle 6: Lösungen/Puffer und Inhalt.....	29
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Versuchssets.....	29
Tabelle 8: Stimulanzen/Antikörper, Hersteller und Verdünnung	30
Tabelle 9: Zelllinien und dazugehörige Charakteristika, adaptiert nach [93]	31
Tabelle 10: Software/Computerprogramme und Hersteller.....	32

Literaturverzeichnis

1. Hester, A., et al., *EP3 receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells*. *Onco Targets Ther*, 2019. **12**: p. 6053-6068.
2. Janni, W. and B. Rack, *11 - Mammaerkrankungen*, in *Facharztwissen Gynäkologie (Zweite Ausgabe)*, W. Janni, et al., Editors. 2017, Urban & Fischer: Munich. p. 297-358.
3. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
4. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-444.
5. Subbaramaiah, K., et al., *Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells*. *Cancer Res*, 1996. **56**(19): p. 4424-9.
6. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut. p. 156.
7. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
8. Kaatsch; D.P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015, 2015.
9. Chang-Claude, J., et al., *[Risk assessment for familial occurrence of breast cancer]*. *Zentralbl Gynakol*, 1995. **117**(8): p. 423-34.
10. Gonzalez-Angulo, A.M., et al., *Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(5): p. 1082-9.
11. Antoniou, A., et al., *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies*. *Am J Hum Genet*, 2003. **72**(5): p. 1117-30.
12. Institut, R.K. *Zentrum für Krebsregisterdaten*. 2014; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html.
13. Morch, L.S., et al., *Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(23): p. 2228-2239.
14. Cancer, C.g.o.H.F.i.B., *Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast*

cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(11): p. 1141-51.

15. Zhang, X., et al., *Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **137**(3): p. 883-92.

16. McCormack, V.A. and I. dos Santos Silva, *Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(6): p. 1159-69.

17. Costarelli, V. and N. Yiannakouris, *Breast cancer risk in women: the protective role of pregnancy*. *Nurs Stand*, 2010. **24**(18): p. 35-40.

18. *Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease*. *Lancet*, 2002. **360**(9328): p. 187-95.

19. Key, T., et al., *Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(8): p. 606-16.

20. Fuhrman, B.J., et al., *Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women*. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(4): p. 326-39.

21. Terry, P.D. and T.E. Rohan, *Cigarette smoking and the risk of breast cancer in women: a review of the literature*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. **11**(10 Pt 1): p. 953-71.

22. Fortner, R.T., et al., *Obesity and Breast Cancer*. *Recent Results Cancer Res*, 2016. **208**: p. 43-65.

23. Smith-Warner, S.A., et al., *Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies*. *Jama*, 1998. **279**(7): p. 535-40.

24. Sinn, H.P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. *Breast Care (Basel)*, 2013. **8**(2): p. 149-54.

25. Tavassoli FA, D.P., *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. 2003, IARC Press.

26. Christgen, M., F. Langer, and H. Kreipe, *[Histological grading of breast cancer]*. *Pathologe*, 2016. **37**(4): p. 328-36.

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

28. Penault-Llorca, F., et al., *Emerging technologies for assessing HER2 amplification*. *Am J Clin Pathol*, 2009. **132**(4): p. 539-48.

-
29. Hudis, C.A., *Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice*. N Engl J Med, 2007. **357**(1): p. 39-51.
30. Tong, Z.J., et al., *Expression and prognostic value of HER-2/neu in primary breast cancer with sentinel lymph node metastasis*. Biosci Rep, 2017. **37**(4).
31. Fan, W., J. Chang, and P. Fu, *Endocrine therapy resistance in breast cancer: current status, possible mechanisms and overcoming strategies*. Future Med Chem, 2015. **7**(12): p. 1511-9.
32. Jiang, N., et al., *Novel treatment strategies for patients with HER2-positive breast cancer who do not benefit from current targeted therapy drugs*. Exp Ther Med, 2018. **16**(3): p. 2183-2192.
33. Curigliano, G., et al., *De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017*. Ann Oncol, 2017. **28**(8): p. 1700-1712.
34. Creighton, C.J., *The molecular profile of luminal B breast cancer*. Biologics, 2012. **6**: p. 289-97.
35. Wittekind, C., Meyer, H.J., Bootz, F., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2002.
36. Brierley, J.D., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2017: John Wiley & Sons.
37. Ryerson, A.B., J. Miller, and C.R. Ehemann, *Reported breast symptoms in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program*. Cancer Causes Control, 2015. **26**(5): p. 733-40.
38. Albert, U.S., H. Altland, and V. Duda, *Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland*. 2008: Zuckschwerdt München.
39. Bock, K., et al., *[Mammography screening in Germany. Current results and future challenges]*. Radiologe, 2014. **54**(3): p. 205-10.
40. Cherel, P., et al., *[Mammographic evaluation of dense breasts: techniques and limits]*. J Radiol, 2008. **89**(9 Pt 2): p. 1156-68.
41. Eberl, M.M., et al., *BI-RADS classification for management of abnormal mammograms*. J Am Board Fam Med, 2006. **19**(2): p. 161-4.
42. Njor, S., et al., *Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies*. J Med Screen, 2012. **19** Suppl 1: p. 33-41.
43. Janni, W.G., Bernd; Sommer, Harald, Untch, Michael; Krause, Annette; Dian, Darius; Runnebaum, Ingo; Rack, Brigitte; Friese, Klaus, *Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms*. Deutsches Ärzteblatt, 2005. **102** (41): **A-2795/ B-2360/C-2226**.

44. Veronesi, U., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(16): p. 1227-32.
45. Tyagi, N.K. and S. Dhesy-Thind, *Clinical practice guidelines in breast cancer*. *Curr Oncol*, 2018. **25**(Suppl 1): p. S151-s160.
46. Voordeckers, M., et al., *The lymph node ratio as prognostic factor in node-positive breast cancer*. *Radiotherapy and Oncology*, 2004. **70**(3): p. 225-230.
47. Wockel, A., et al., *Interdisciplinary Screening, Diagnosis, Therapy and Follow-up of Breast Cancer. Guideline of the DGGG and the DKG (S3-Level, AWMF Registry Number 032/045OL, December 2017) - Part 2 with Recommendations for the Therapy of Primary, Recurrent and Advanced Breast Cancer*. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2018. **78**(11): p. 1056-1088.
48. Kuerer, H.M., P.G. Cordeiro, and R.W. Mutter, *Optimizing Breast Cancer Adjuvant Radiation and Integration of Breast and Reconstructive Surgery*. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2017. **37**: p. 93-105.
49. Rhiem, K., et al., *The risk of contralateral breast cancer in patients from BRCA1/2 negative high risk families as compared to patients from BRCA1 or BRCA2 positive families: a retrospective cohort study*. *Breast Cancer Res*, 2012. **14**(6): p. R156.
50. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms 2018* 28.07.2019]; Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2018-09.pdf.
51. Balic, M., et al., *St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment*. *Breast Care (Basel)*, 2019. **14**(2): p. 103-110.
52. Cameron, D., et al., *11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial*. *Lancet*, 2017. **389**(10075): p. 1195-1205.
53. Harbeck, N. and M. Gnant, *Breast cancer*. *Lancet*, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
54. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. *Lancet*, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
55. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg).Berlin, 2016.
56. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.

57. Allemani, C., et al., *Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries*. *Lancet*, 2018. **391**(10125): p. 1023-1075.
58. 2019, S.B. *Häufigste Todesursachen 2017*. 04.01. 2020].
59. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 591-602.
60. Feng, Y., et al., *Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis*. *Genes Dis*, 2018. **5**(2): p. 77-106.
61. Lobbezoo, D.J., et al., *Prognosis of metastatic breast cancer: are there differences between patients with de novo and recurrent metastatic breast cancer?* *Br J Cancer*, 2015. **112**(9): p. 1445-51.
62. Kuper, H., H.-O. Adami, and D. Trichopoulos, *Infections as a major preventable cause of human cancer*. *Journal of Internal Medicine*, 2000. **248**(3): p. 171-183.
63. Yashiro, M., *Ulcerative colitis-associated colorectal cancer*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(44): p. 16389-97.
64. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. *Oncogene*, 1999. **18**(55): p. 7908-16.
65. Ke, J., et al., *Prostaglandin E2 (PGE2) promotes proliferation and invasion by enhancing SUMO-1 activity via EP4 receptor in endometrial cancer*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12203-12211.
66. Majumder, M., et al., *EP4 as a Therapeutic Target for Aggressive Human Breast Cancer*. Vol. 19. 2018. 1019.
67. Smith, W.L. and L.J. Marnett, *Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1083**(1): p. 1-17.
68. Funk, C.D., *Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1871-1875.
69. Zhang, J. and J.H. Wang, *Prostaglandin E2 (PGE2) exerts biphasic effects on human tendon stem cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e87706.
70. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. *Pharmacol Rev*, 2004. **56**(3): p. 387-437.
71. Legler, D.F., et al., *Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010. **42**(2): p. 198-201.

-
72. Bacchi, S., et al., *Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review*. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2012. **11**(1): p. 52-64.
73. Solomon, L.M., L. Juhlin, and M.B. Kirschenbaum, *Prostaglandin on cutaneous vasculature*. *J Invest Dermatol*, 1968. **51**(4): p. 280-2.
74. Hösli, I. and J. Büchel, *Stellenwert von Kontraktionsmitteln bei der postpartalen Hämorrhagie*. *Der Gynäkologe*, 2019. **52**(6): p. 408-415.
75. Kochel, T.J., O.G. Goloubeva, and A.M. Fulton, *Upregulation of Cyclooxygenase-2/Prostaglandin E2 (COX-2/PGE2) Pathway Member Multiple Drug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4) and Downregulation of Prostaglandin Transporter (PGT) and 15-Prostaglandin Dehydrogenase (15-PGDH) in Triple-Negative Breast Cancer*. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 2016. **10**: p. BCBCR.S38529.
76. Bennett, A., et al., *Prostaglandins from tumours of human large bowel*. *Br J Cancer*, 1977. **35**(6): p. 881-4.
77. Reader, J., D. Holt, and A. Fulton, *Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(3-4): p. 449-63.
78. Markovic, T., et al., *Structural features of subtype-selective EP receptor modulators*. *Drug Discov Today*, 2017. **22**(1): p. 57-71.
79. Huber, T., et al., *Membrane model for the G-protein-coupled receptor rhodopsin: hydrophobic interface and dynamical structure*. *Biophys J*, 2004. **86**(4): p. 2078-100.
80. Sugimoto, Y. and S. Narumiya, *Prostaglandin E receptors*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 11613-7.
81. Ji, R., et al., *EP1 prostanoid receptor coupling to G i/o up-regulates the expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha through activation of a phosphoinositide-3 kinase signaling pathway*. *Mol Pharmacol*, 2010. **77**(6): p. 1025-36.
82. O'Callaghan, G. and A. Houston, *Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: possible therapeutic targets?* *Br J Pharmacol*, 2015. **172**(22): p. 5239-50.
83. Kalinski, P., *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. *J Immunol*, 2012. **188**(1): p. 21-8.
84. Nataraj, C., et al., *Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(8): p. 1229-35.
85. Kotani, M., et al., *Multiple Signal Transduction Pathways through Two Prostaglandin E Receptor EP3 Subtype Isoforms Expressed in Human Uterus*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000. **85**(11): p. 4315-4322.

-
86. Ye, Y., et al., *Prostaglandin E2 receptor 3 signaling is induced in placentas with unexplained recurrent pregnancy losses*. *Endocr Connect*, 2018. **7**(5): p. 749-761.
87. Namba, T., et al., *Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity*. *Nature*, 1993. **365**(6442): p. 166-70.
88. Friedman, E.A., et al., *Understanding the role of prostaglandin E2 in regulating human platelet activity in health and disease*. *Thromb Res*, 2015. **136**(3): p. 493-503.
89. Shoji, Y., et al., *Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development*. *Gut*, 2004. **53**(8): p. 1151-8.
90. Kashiwagi, E., et al., *Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(3): p. 431-41.
91. Ma, J., et al., *Prostaglandin E2 promotes liver cancer cell growth by the upregulation of FUSE-binding protein 1 expression*. *Int J Oncol*, 2013. **42**(3): p. 1093-1104.
92. Zhu, J., et al., *Prostaglandin receptor EP3 regulates cell proliferation and migration with impact on survival of endometrial cancer patients*. *Oncotarget*, 2018. **9**(1): p. 982-994.
93. Semmlinger, A., et al., *EP3 (prostaglandin E2 receptor 3) expression is a prognostic factor for progression-free and overall survival in sporadic breast cancer*. *BMC Cancer*, 2018. **18**(1): p. 431.
94. Heidegger, H., et al., *The Prostaglandin EP3 Receptor Is an Independent Negative Prognostic Factor for Cervical Cancer Patients*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
95. Harris, R.E., J. Beebe-Donk, and G.A. Alshafie, *Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 27.
96. Howe, L.R., *Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(4): p. 210.
97. Judge, S.M. and R.T. Chatterton, Jr., *Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line (T-47D)*. *Cancer Res*, 1983. **43**(9): p. 4407-12.
98. Center, M.S.-K.C. <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-breast-cell-line-sk-br-3>. 2018.
99. Soule, H.D., et al., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 1973. **51**(5): p. 1409-16.

-
100. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
101. Gerlier, D. and N. Thomasset, *Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation*. J Immunol Methods, 1986. **94**(1-2): p. 57-63.
102. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. **303**(2): p. 474-82.
103. Dierssen-Sotos, T., et al., *Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of breast cancer: The Spanish Multi-Case-control (MCC) study*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 660.
104. Harris, R.E., S. Kasbari, and W.B. Farrar, *Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer*. Oncol Rep, 1999. **6**(1): p. 71-3.
105. Half, E., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1676-81.
106. Liu, C.H., et al., *Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18563-9.
107. Thorat, M.A., et al., *Prostanoid receptor EP1 expression in breast cancer*. Mod Pathol, 2008. **21**(1): p. 15-21.
108. Bazzani, L., et al., *PGE2/EP3/SRC signaling induces EGFR nuclear translocation and growth through EGFR ligands release in lung adenocarcinoma cells*. Oncotarget, 2017. **8**(19): p. 31270-31287.
109. Richartz, N., et al., *Targeting cyclooxygenase by indomethacin decelerates progression of acute lymphoblastic leukemia in a xenograft model*. Blood Adv, 2019. **3**(21): p. 3181-3190.
110. Harris, R.E., et al., *Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor*. Cancer Res, 2000. **60**(8): p. 2101-3.
111. Rozic, J.G., C. Chakraborty, and P.K. Lala, *Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis*. Int J Cancer, 2001. **93**(4): p. 497-506.
112. Li, L., Y. Lv, and D. Yan, *Inhibition of Ep3 attenuates migration and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer cells via suppression of TGF-beta/Smad signaling*. Oncol Lett, 2018. **16**(5): p. 5645-5654.
113. Amano, H., et al., *Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 221-32.

-
114. Kubo, H., et al., *Host prostaglandin EP3 receptor signaling relevant to tumor-associated lymphangiogenesis*. Biomed Pharmacother, 2010. **64**(2): p. 101-6.
115. Ma, X., et al., *Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2923-7.
116. Chang, S.H., et al., *Role of prostaglandin E2-dependent angiogenic switch in cyclooxygenase 2-induced breast cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 591-6.
117. Lee, J.L., et al., *Differential expression of E prostanoid receptors in murine and human non-melanoma skin cancer*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(4): p. 818-25.
118. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
119. Ma, X., et al., *Prostaglandin E receptor EP1 suppresses breast cancer metastasis and is linked to survival differences and cancer disparities*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(10): p. 1310-8.
120. Kawamori, T., et al., *Chemopreventive effects of ONO-8711, a selective prostaglandin E receptor EP(1) antagonist, on breast cancer development*. Carcinogenesis, 2001. **22**(12): p. 2001-4.
121. Mizuno, R., K. Kawada, and Y. Sakai, *Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(24).
122. Fentiman, I.S., et al., *Cyclic AMP inhibits the growth of human breast cancer cells in defined medium*. Mol Biol Med, 1984. **2**(2): p. 81-8.
123. Zivadinovic, D., B. Gametchu, and C.S. Watson, *Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(1): p. R101-12.
124. Dong, H., et al., *Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling*. Breast Cancer Res Treat, 2015. **152**(1): p. 17-28.
125. Cagnol, S. and J.-C. Chambard, *ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence*. The FEBS Journal, 2010. **277**(1): p. 2-21.
126. Sequeira, S.J., et al., *Inhibition of Proliferation by PERK Regulates Mammary Acinar Morphogenesis and Tumor Formation*. PLOS ONE, 2007. **2**(7): p. e615.
127. Fujino, H., et al., *Prostaglandin E(2) regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(3): p. 379-87.
128. Taniguchi, T., et al., *Human EP3(I) prostanoid receptor induces VEGF and VEGF receptor-1 mRNA expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(4): p. 1173-8.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als **Artikel:**

- Im Pub Med.gov; US National Library of Medicine, National Institutes of Health: DovePress, ***Onco Targets Ther.*** 2019;12:6053-6068. Published 2019 Jul 29. doi:10.2147/OTT.S204919

“EP3-receptor antagonist L798,106 reduces proliferation and migration of SK-BR-3 breast cancer cells”

Anna Hester*, **Barbara Salzmänn***, Martina Rahmeh, Thomas Kolben, Bastian Czogalla, Nina Ditsch, Sven Mahner, Udo Jeschke, Theresa Maria Kolben

*geteilte Erstautorenschaft

Als **Poster/Abstract**

- Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in Berlin (31.10.18-03.11.18)

„EP3-Agonist Sulproston und EP3-Antagonist L-798,106 reduzieren Proliferation und Migration von Mammakarzinomzellen“

Anna Hester, **Barbara Salzmänn**, Martina Rahmeh, Thomas Kolben, Theresa Maria Kolben, Rachel Würstlein, Nadia Harbeck, Nina Ditsch, Sven Mahner, Udo Jeschke

- Posterpräsentation auf dem BGGF/OEGGG Kongress in München (12.09.19-14.09.19) mit Abstractveröffentlichung in „Geburtshilfe und Frauenheilkunde“, Thieme Verlag, Ausgabe 08, Vol.79

„Der EP3-Antagonist L798,106 reduziert Proliferation und Migration von SK-BR-3 Mammakarzinom-Zellen“

Barbara Salzmann, Martina Rahmeh, Bastian Czogalla, Thomas Kolben, Theresa Maria Kolben, Nina Ditsch, Sven Mahner, Udo Jeschke, Anna Hester

Posterpreis

- Für das Poster **„EP3-Agonist Sulproston und EP3-Antagonist L-798,106 reduzieren Proliferation und Migration von Mammakarzinomzellen“** auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) in Berlin (31.10.18- 03.11.18)

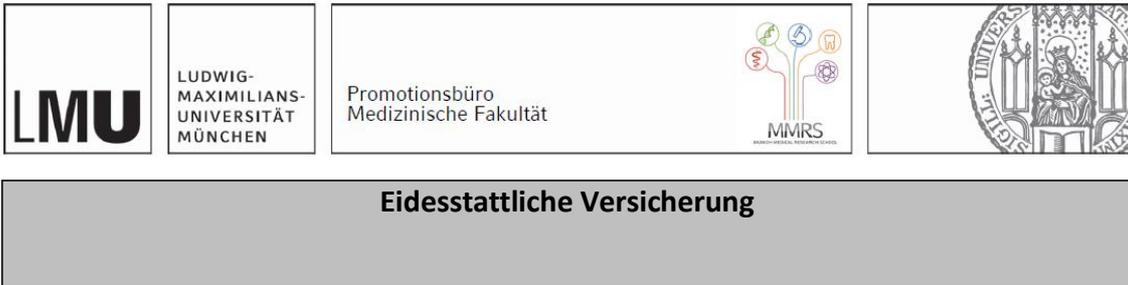
Danksagung

Allen voran möchte ich mich gerne bei meiner Betreuerin Dr. Anna Hester sowie meinem Doktorvater Prof. Dr. Udo Jeschke für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die fachkundige Unterstützung sowie das stets offene Ohr bei allen auftretenden Fragen und Problemen bedanken. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte Team des Forschungslabors der Frauenklinik in Großhadern und der Maistraße. Insbesondere möchte ich mich bei Martina Rahmeh bedanken; zu jedem Zeitpunkt konnte ich auf ihre Unterstützung, Geduld und Ratschläge zählen.

Nicht zuletzt gilt jedoch auch ein großer Dank meiner Familie, meinen Eltern, meinen Brüdern, meinem Freund und auch meiner Großmutter, welche mich durch mein gesamtes Studium und auch in Bezug auf meine Doktorarbeit unermüdlich unterstützten und motivierten.

Eidesstattliche Versicherung



Salzmann, Barbara

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Einfluss von PGE₂, dem EP1/3- Agonisten Sulproston und dem EP3- Antagonisten L798,106 auf Mammakarzinomzelllinien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidelberg, 20.02.2022

Ort, Datum

Barbara Salzmann

Unterschrift